

ZASTOSOWANIE METOD BIOLOGII MOLEKULARNEJ W DIAGNOSTYCE BAKTERII Z RODZAJU *ALICYCLOBACILLUS*

Agnieszka Dekowska

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego
Zakład Technologii Przetworów Owocowych i Warzywnych
dekowska@ibprs.pl

Streszczenie

Klasyczne, oparte na posiewach i testach biochemicznych, metody wykrywania i różnicowania bakterii z rodzaju *Alicyclobacillus* zajmują kilka do kilkunastu dni. Metody molekularne, oparte na hybrydyzacji lub amplifikacji kwasów nukleinowych umożliwiają szybszą i niejednokrotnie bardziej precyzyjną charakterystykę badanych bakterii. Spośród opisywanych metod, najpopularniej stosowaną w diagnostyce rodzaju *Alicyclobacillus* jest analiza sekwencji genu 16S rDNA. Do metod molekularnych stosowanych w procesie wyodrębniania nowych gatunków w obrębie rodzaju *Alicyclobacillus* zaliczają się również analiza stosunku par G-C do par A-T, hybrydyzacja genomów oraz analiza sekwencji genu *gyrB*.

Najbardziej uniwersalne metody różnicowania genetycznego, jak np. RAPD-PCR, nie wymagają znajomości sekwencji badanego DNA.

Metoda LAMP-PCR ze względu na niskie koszty i specyficzność stanowi atrakcyjną alternatywę w odniesieniu do metod opartych na klasycznej reakcji PCR.

Słowa kluczowe: *Alicyclobacillus*, 16S rDNA, *gyrB*, RAPD-PCR, LAMP-PCR

USE OF MOLECULAR METHODS FOR DIAGNOSTICS OF *ALICYCLOBACILLUS*

Summary

Conventional methods of detecting and differentiation of *Alicyclobacillus* are based on plating and biochemical tests, and require several days to accomplish. Molecular methods are based on hybridization and amplification of DNA, and enable faster and more specific characterisation of tested bacteria. The most popular among all described methods, is the 16S rDNA sequence analysis. Molecular methods used in the process of describing new species belonging to *Alicyclobacillus* genus are also G-C content, genome hybridization, and *gyrB* gene sequence analysis.

The most universal differentiation methods do not require any knowledge of the sequence of tested DNA.

The LAMP-PCR method, due to its low cost and precision, is an attractive alternative to the classic PCR methods.

Key words: *Alicyclobacillus*, 16S rDNA, *gyrB*, RAPD-PCR, LAMP-PCR

Bakterie z rodzaju *Alicyclobacillus* to Gram-dodatnie, kwasolubne ciepłooporne laseczki wytwarzające przetrwalniki. Naturalnym środowiskiem ich występowania jest gleba. Niektóre gatunki należące do tego rodzaju, jak np. *Alicyclobacillus acidoterrestris*, wytwarzają związki o nieprzyjemnym, dezynfekcyjnym zapachu: gwajakol, 2,6-dibromofenol oraz 2,6-dichlorofenol i są częstą przyczyną psucia się soków owocowych.

Przetrwalniki *Alicyclobacillus* charakteryzują się zdolnością do przeżywania w standardowych warunkach pasteryzacji. Zanieczyszczenia soków owocowych powodowane przez te bakterie, choć nie stwarzają zagrożenia dla zdrowia ludzkiego, stanowią istotny problem w branży sokowniczej i mogą nieść ze sobą poważne konsekwencje ekonomiczne. Pomimo podejmowanych powszechnie na całym świecie badań mających na celu identyfikację, opisanie i zahamowanie wzrostu tych bakterii, problem ich występowania w sokach owocowych jest wciąż aktualny.

Klasyczna metoda wykrywania obecności i oznaczania liczby bakterii z rodzaju *Alicyclobacillus* w sokach owocowych, opisana w normie IFU nr 12, oparta jest na posiewach badanego materiału na co najmniej dwóch rodzajach pożywek, a badania trwają około dwóch tygodni.

Obserwowany w przeciągu ostatnich lat wzrost zastosowania metod biologii molekularnej w taksonomii mikroorganizmów umożliwia coraz szybsze i bardziej precyzyjne przyporządkowywanie zarówno już opisanych, jak i nowo odkrywanych mikroorganizmów do określonych taksonów oraz ustalanie pokrewieństwa pomiędzy nimi. Metody te opierają się najczęściej o właściwości i sekwencję genomowego DNA badanej bakterii. Do najwcześniejszych stosowanych metod użytecznych w taksonomii należy zaliczyć analizę stosunku par guanina-cytosyna (G-C) do par adenina-tymina (A-T) w badanym genomie oraz hybrydyzację genomów.

Procent par G-C w genomie jest cechą charakterystyczną gatunku i może wynosić od wartości poniżej 20% (*Carsonella ruddii*, 16,5%) do ponad 70% (*Anaeromyxobacter dehalogens*, 75%) [Hildebrand i in., 2010]. Wartości te w odniesieniu do gatunku *Alicyclobacillus* wahają się w granicach 51,6%-53,3% w przypadku *A. acidoterrestris*, do 61,2%-62,2% w przypadku *A. acidocaldarius* [Matsubara i in., 2002].

Hybrydyzacja genomów wykorzystuje zjawisko spontanicznego łączenia się komplementarnych, pojedynczych nici kwasów nukleinowych. Jednociowy DNA organizmu referencyjnego może w mniejszym lub większym stopniu, w zależności od pokrewieństwa, hybrydować z genomowym DNA badanego organizmu.

Taka analiza bakterii z rodzaju *Alicyclobacillus*, łącznie z oszacowaniem procentu par G-C oraz analizą sekwencji genów metabolizmu podstawowego, jest jedną ze standardowo stosowanych metod, za pomocą których wyodrębniane są nowe gatunki. Stosowana była w tym celu procedura, w której referencyjny genomowy DNA unieruchomiony na nośniku, hybrydował z wyznakowanym biotyną badanym DNA. Stopień hybrydyzacji mierzono poprzez dodanie związanej ze streptawidyną β -galaktozydazy, której aktywność mierzono za pomocą zmieniającego barwę wskaźnika [Ezaki i in., 1989].

W metodach opartych o hybrydyzację kwasów nukleinowych, możliwe jest również zastosowanie krótkich sond wyznakowanych radioaktywnie, fluorescencyjnie lub enzymatycznie, które łączą się z poszukiwanymi sekwencjami DNA w obrębie analizowanej cząsteczki. Sondami mogą być zarówno fragmenty DNA komplementarne w stosunku do określonych genów, jak i losowe fragmenty genomowego DNA organizmu referencyjnego. Opisano technikę jednoczesnej identyfikacji bakterii z rodzaju *Alicyclobacillus* oraz *A. acidoterrestris*, opierającą się o hybrydyzację wyznakowanych fluorescencyjnie sond komplementarnych do niektórych obszarów rDNA. [Thelen i in., 2003; Pieper i in., 2006]. Jest to odmiana metody FISH (ang.: *fluorescent in situ hybridization*). Sondy, po wnikięciu do komórek łączą się z DNA gospodarza. W trakcie obserwacji badanych komórek za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego, komórki *Alicyclobacillus* świecą na zielono, a *A. acidoterrestris* na zielono i czerwono. Czas analizy łącznie z przednamnażaniem, wynosi dwa dni. Połączenie opisywanej metody z cytometrią przepływową umożliwia odróżnienie komórek żywych od martwych, na co nie pozwala większość technik opartych na PCR [Pieper i in. 2006]. Ma to znaczenie w przypadku analiz mających na celu wykrycie żywych, potencjalnie mogących spowodować zepsucie, komórek *Alicyclobacillus* w badanym materiale.

Inną uniwersalną metodą, nie wymagającą wcześniejszej znajomości sekwencji genomowego DNA badanych bakterii, jest metoda RFLP (ang.: *restriction fragment length polymorphism*), w której produkty trawienia genomowego DNA enzymami restrykcyjnymi rozdzielane są w żelu, tworząc wzór, nazywany również „odciskiem palca”. Podobieństwo uzyskanych wzorów pozwala na ocenę pokrewieństwa badanych organizmów. Duże

fragmenty DNA, które mogą powstać po trawieniu genomu bakteryjnego mogą być rozdzielane w zmiennym polu elektrycznym (PFGE; ang.: *pulsed field electrophoresis*).

Również niektóre metody z zastosowaniem reakcji PCR nie wymagają znajomości sekwencji DNA, należą do nich m. in. RAPD-PCR (ang.: *random amplification of polymorphic DNA*) i rep-PCR (ang.: *repetitive extragenic palindroms*).

RAPD, losowa amplifikacja polimorficznych fragmentów DNA, wykorzystuje tylko jeden krótki starter, który przyłącza się do genomowego DNA w wielu miejscach, w wyniku czego po reakcji PCR powstają produkty o różnej długości, które można rozdzielić na żelu uzyskując charakterystyczny wzór. Główną wadą tej metody jest jej niska powtarzalność. Aby uzyskać odpowiednią ilość produktów, stosuje się dość niską temperaturę podczas przyłączania startera, co oznacza, że do wielu miejsc w obrębie genomu starter przyłącza się niespecyficjnie. W takich warunkach nawet niewielkie różnice w temperaturze lub składzie mieszaniny reakcyjnej mogą wpłynąć na końcowy wynik reakcji.

W metodzie rep-PCR startery zaprojektowane są tak, aby przyłączały się do sekwencji repetytywnych rozproszonych w badanym genomie. Sekwencje repetytywne często są charakterystyczne dla dużych grup bakterii, np. sekwencje ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) czy REP (ang.: *Repetitive Chromosomal Elements*) występują u większości bakterii Gram-ujemnych. W przeciwieństwie do RAPD, metoda ta charakteryzuje się wysoką powtarzalnością, ponieważ stosowane są dłuższe startery oraz wyższe temperatury przyłączania startera.

Opisano zastosowanie metody RAPD-PCR w celu analizy zróżnicowania genetycznego bakterii *Alicyclobacillus* izolowanych z gleby sadów oraz środowiska przetwórci owocowej w Afryce [Groenewald i in., 2009; Yamazaki i in., 1997]. Yamazaki i in. wyodrębnili 3 spośród 42 testowanych dziesięcionukleotydomowych i dwunastonukleotydomowych starterów, które umożliwiały odróżnienie szczepów należących do gatunku *A. acidoterrestris* od *A. acidocaldarius* i innych spokrewnionych bakterii. Startery te zostały wykorzystane później przez Groenewalda i innych do zróżnicowania szczepów *Alicyclobacillus* izolowanych z ziemi sadów oraz środowiska przetwórci. 16 przebadanych gatunków *A. acidoterrestris* podzielono na 4 grupy na podstawie wzorów uzyskanych w reakcji RAPD-PCR.

Bardziej precyzyjne metody analizy genetycznej wymagają znajomości przynajmniej fragmentu sekwencji DNA badanego organizmu, ponieważ opierają się one na badaniach polimorfizmu konkretnego genu lub obszaru. Dużym ułatwieniem są projektowane przez badaczy uniwersalne, zdegenerowane startery umożliwiające izolację, na drodze reakcji PCR, pożądanego fragmentu DNA szerokich grup bakterii. Badania nad polimorfizmem

konkretnych genów umożliwiając późniejsze zaprojektowanie starterów do wykrywania konkretnych, wąskich grup mikroorganizmów.

Określany jest polimorfizm genów metabolizmu podstawowego (ang.: *housekeeping genes*) obecnych u wszystkich mikroorganizmów i silnie konserwowanych (m. in.: 16SrRNA, *rpoB*, *gyrB*, *recA*, *groEL*, *atpD*) lub jeśli chodzi o identyfikację lub określenie zróżnicowania wewnątrz określonej grupy organizmów, geny charakterystyczne w odniesieniu do tej grupy. W przypadku *Alicyclobacillus* są to geny kodujące enzymy związane z wytwarzaniem gwajakolu i geny związane z syntezą ω -alicyklicznych kwasów tłuszczowych będących składnikami błony komórkowej [Niwa i Kawamoto, 2003]. Przeprowadzono badania nad genem *vdc* kodującym dekarboksylazę kwasu wanilinowego, która odpowiada za wytwarzanie gwajakolu z kwasu wanilinowego. Gen ten nie jest specyficzny tylko dla gatunku *Alicyclobacillus*, występuje on również u promieniowców i części gatunków bakterii z rodzaju *Bacillus*. Z genomu bakterii *A. acidoterrestris* wyizolowano trzy otwarte ramki odczytu (ORF), które wklonowano do wektora i przeniesiono do bakterii charakteryzujących się brakiem zdolności wytwarzania gwajakolu. Tylko obecność wszystkich trzech ramek odczytu jednocześnie warunkowała zdolność tych bakterii do wytwarzania gwajakolu. Na podstawie sekwencji najdłuższej z ORF zaprojektowano starter, który później wykorzystano do specyficznego wykrywania gatunku *A. acidoterrestris*. Szczegóły dotyczące tego eksperymentu, jak również badań nad genami kodującymi enzymy zaangażowane w syntezę ω -alicyklicznych kwasów tłuszczowych opisano w literaturze patentowej dostępnej w języku japońskim [JP2003000259, JP10234376].

Najpopularniejszym markerem w badaniach nad klasyfikacją mikroorganizmów jest obszar kodujący rRNA, a szczególnie gen 16S rDNA kodujący cząsteczkę rRNA występującą w mniejszej podjednostce rybosomów bakteryjnych. Gen 16S rDNA zawiera w swoim obrębie zarówno sekwencje wysoce konserwowane, jak i bardziej zmienne. Sekwencjonowanie i analiza sekwencji genów 16S rDNA jest w chwili obecnej najszerzej stosowaną metodą klasyfikacji molekularnej mikroorganizmów. Istnieje ogromna i wciąż powiększana baza danych sekwencji genów rDNA. Analiza sekwencji rDNA pozwoliła wyodrębnić rodzaj *Alicyclobacillus* [Wisotzkey i in, 1992], również wszystkie znane obecnie gatunki *Alicyclobacillus* zostały opisane m. in. na podstawie sekwencji tego obszaru.

Analiza sekwencji genu 16SrRNA pomogła scharakteryzować m. in.: 60 szczepów *Alicyclobacillus* izolowanych z gleby komercyjnych upraw owocowych [Goto i in., 2007], kwasolubne i ciepłooporne bakterie pochodzące z sadów w Chinach [Wang i in, 2010]

i z różnych, zakwaszonych środowisk w Japonii [Goto i in., 2002], oraz ciepłolubne bakterie izolowane z zepsutych napojów [Yamazaki i in., 1996].

Na podstawie sekwencji genu 16S rDNA zaprojektowano startery umożliwiające wykrywanie *Alicyclobacillus acidoterrestris* na drodze czulej reakcji PCR z zastosowaniem odwrotnej transkryptazy (RT-PCR) [Yamazaki i in., 1996], jak również startery oraz sondę pozwalające wykryć bakterie z rodzaju *Alicyclobacillus* w reakcji real-time PCR [Connor i in., 2005]. Metoda real-time PCR oparta na genie 16S rDNA została również wykorzystana, obok metody RAPD, w celu zróżnicowania szczepów *Alicyclobacillus* izolowanych z gleby sadów oraz z przetwórci owocowej w Afryce [Groenewald i in., 2008]. W przypadku organizmów bardzo blisko spokrewnionych analiza wyłącznie sekwencji 16S rDNA może okazać się niewystarczająca. Do tego celu stosowane są analizy sekwencji rejonu hiperzmiennego (rejon ITS – ang.: *intergenic spacer region*) położonego pomiędzy genami kodującymi 16S rRNA i 23S rRNA. Obszar ten nie koduje żadnego genu, w związku z czym tempo jego ewolucji oraz zmienność pomiędzy gatunkami i szczepami bakterii są dużo wyższe. Innym podejściem jest analiza sekwencji kilku genów metabolizmu podstawowego (metoda MLST – ang.: *multilocus sequence typing*).

Ostatnie doniesienia, bazujące na analizie sekwencji kompletnych genomów bakteryjnych, wskazują na problem heterogeniczności wewnątrzgenomowej genów 16S rDNA. Genomy wielu mikroorganizmów kodują więcej niż jedną kopię operonu rDNA. Kopie te ewoluują niezależnie, w związku z czym wykazują zróżnicowanie, które utrudnia analizę filogenetyczną organizmów blisko ze sobą spokrewnionych, gdzie zróżnicowanie sekwencji 16S rRNA wewnątrz jednego genomu może być porównywalne ze zróżnicowaniem sekwencji pochodzących od spokrewnionych gatunków [Case i in., 2007]. Jedyny zsekwencjonowany jak odtąd w całości genom *Alicyclobacillus*, *A. acidocaldarius* DSM 446, koduje 6 nieidentycznych kopii operonu 16S rDNA.

Występujący powszechnie u bakterii gen *gyrB* koduje podjednostkę B gyrazy, enzymu odpowiedzialnego za wprowadzanie ujemnych super-skretów do kolistej cząsteczki DNA. Jest to jedno z białek niezbędnych podczas procesów replikacji, transkrypcji, rekombinacji i naprawy DNA. Gen *gyrB* występuje w genomie w pojedynczej kopii. Bardzo rzadko ulega transferowi horyzontalnemu. Charakteryzuje go wyższe, w porównaniu do 16S rDNA, tempo ewolucji, dzięki czemu lepiej nadaje się do różnicowania blisko spokrewnionych ze sobą bakterii. Ostatnie publikacje potwierdzają przydatność tego genu jako markera do identyfikacji i badania pokrewieństwa pomiędzy bakteriami, w tym bakteriami z rodzaju *Alicyclobacillus*. Gatunki *Alicyclobacillus*: *A. pomorum*, *A. contaminans*, *A. fastidiosus*,

A. kakegawensis, *A. macrosporangiidus*, *A. sacchari* i *A. shizuokensis* wyodrębniono m. in. na podstawie analizy sekwencji genów 16S rDNA oraz *gyrB* [Goto i in., 2003, Goto i in., 2007]. Gen *gyrB* należy do 10 genów metabolizmu podstawowego, dla których zaprojektowano uniwersalne startery umożliwiające ich amplifikację i sekwencjonowanie u minimum 2/3 w obrębie zróżnicowanej filogenetycznie, testowanej grupy bakterii [Santos i Ochman, 2004].

Amplifikowany za pomocą PCR fragment DNA może zostać również poddany analizie za pomocą cięcia enzymami restrykcyjnymi (PCR-RFLP). Podobnie jak w klasycznej metodzie RFLP, produkty trawienia rozdzielane są w żelu, a podobieństwo profilów restrykcyjnych świadczy o pokrewieństwie badanych bakterii. Metodę tę wykorzystano w celu uzyskania profilów restrykcyjnych genów 16S rDNA kwasolubnych i ciepłolubnych bakterii izolowanych ze środowiska przetwórcy soków owocowych [Chen i in., 2006].

Opisano metodę identyfikacji *Alicyclobacillus spp.* w oparciu o gen *shc* kodujący cyklazę skwalenowo-hopenową [Luo i in., 2004], kluczowy enzym biorący udział w syntezie hopanoidów, cyklicznych lipidów występujących w błonie komórkowej licznych gatunków bakterii. Gen ten występuje w genomie bakterii w pojedynczej kopii i na poziomie nukleotydowym wykazuje znaczne zróżnicowanie nawet pomiędzy różnymi gatunkami tego samego rodzaju bakterii, natomiast zróżnicowanie pomiędzy różnymi szczepami tego samego gatunku jest niewielkie. Sekwencje nukleotydowe genu *shc* kodowanego przez *A. acidoterrestris* i *A. acidocaldarius* są identyczne w 61%. Na chwilę obecną w GenBanku zdeponowane są jedynie 4 sekwencje genów *shc* wyizolowanych z bakterii z rodzaju *Alicyclobacillus*, przy czym tylko 2 z nich to kompletne sekwencje genu. Na podstawie różnic występujących w sekwencjach nukleotydowych tego genu zaprojektowano startery oraz sondę pozwalające wykryć bakterie z rodzaju *Alicyclobacillus* w reakcji real-time PCR. Opisana metoda nie obejmuje różnicowania rodzaju *Alicyclobacillus* na gatunki. Metoda wymaga dalszej weryfikacji. Mała liczba przetestowanych empirycznie szczepów, jak również skąpa ilość danych, na których oparto projekt starterów i sondy nukleotydowej stwarza prawdopodobieństwo, że skuteczność metody może okazać się ograniczona tylko do niektórych gatunków *Alicyclobacillus*.

Zmodyfikowana reakcja PCR, tzw. LAMP-PCR (ang.: *Loop-Mediated Isothermal PCR*) została zastosowana do szybkiego wykrywania *Alicyclobacillus acidoterrestris* [Chen i in., 2011]. Jako matrycę wykorzystano rejon hiperzmienny pomiędzy genami 16S i 23S rDNA. Uzyskano amplifikację 8 szczepów *A. acidoterrestris* w odniesieniu do 6 szczepów *A. acidocaldarius* i 13 szczepów innych rodzajów, w przypadku których nie uzyskano amplifikacji.

W metodzie LAMP wykorzystywane są cztery startery, a cała reakcja zachodzi w takiej samej temperaturze. Przyrost produktu amplifikacji można mierzyć poprzez dodanie barwnika fluorescencyjnego wiążącego się z dwuniciowym DNA, np. SYBR Green [Notomi, 2000]. Możliwa jest też analiza produktów reakcji na żelu. Metoda ta charakteryzuje się wysoką specyficnością, nie wymaga również drogiego sprzętu, co czyni ją atrakcyjną alternatywą do metod opartych na klasycznej reakcji PCR.

Niskie koszty, szybkość wykonania analizy, specyficzność i czułość reakcji to parametry, które decydują o atrakcyjności metody badawczej. W przeciągu ostatnich lat dostępność i spadek ceny pojedynczej reakcji sekwencjonowania uczyniły tę metodę jedną z najczęściej stosowanych w celu pozyskania informacji pozwalających na określenie przynależności badanej bakterii do gatunku. Aktualnie rozwijane i wprowadzane alternatywne techniki sekwencjonowania, jak pirosekwencjonowanie, pozwalają na dalszą redukcję czasu i kosztów analiz. Siłą metod opartych o analizę sekwencji genów markerowych, szczególnie genu 16S rDNA jest również bardzo obszerna i wciąż rosnąca baza danych analogicznych sekwencji, pochodzących od różnych organizmów. Na podstawie zebranych danych możliwe jest projektowanie systemów przeznaczonych do regularnego wykorzystywania w praktyce, np. mających za zadanie szybkie i precyzyjne wykrycie konkretnego gatunku bakterii w badanym materiale.

PIŚMIENNICTWO

1. Case R.J., Boucher Y., Dahllöf I., Holmström C., Doolittle W. F., Kjelleberg S. (2007). Use of 16S rRNA and *rpoB* Genes as Molecular Markers for Microbial Ecology Studies. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(1), 278–288.
2. Chen J., Ma X., Yuan Y., Zhang W. (2011). Sensitive and rapid detection of *Alicyclobacillus acidoterrestris* using loop-mediated isothermal amplification. *J. Sci. Food Agric.* 91(6), 1070-4
3. Chen S., Tang Q., Zhang X., Zhao G., Hu X., Liao X., Chen F., Wu J., Xiang H. (2006). Isolation and characterization of thermo-acidophilic endospore-forming bacteria from the concentrated apple juice-processing environment. *Food Microbiol.* (5):439-45.
4. Connor C.J., Luo H., Gardener B.B., Wang H.H. (2005). Development of a real-time PCR-based system targeting the 16S rRNA gene sequence for rapid detection of *Alicyclobacillus spp.* in juice products. *Int. J. Food Microbiol.* 99(3), 229-35.

5. Ezaki T., Hashimoto Y., Yabuuchi E. (1989). Fluorometric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39, 224-229
6. Goto K., Mochida Y., Kato M., Asahara Fujita R., An S-Y., Kasai H., Yokota A. (2007). Proposal of six species of moderately thermophilic, acidophilic, endospore-forming bacteria: *Alicyclobacillus contaminans* sp. nov., *Alicyclobacillus fastidiosus* sp. nov., *Alicyclobacillus kakegawensis* sp. nov., *Alicyclobacillus macrosporangiidus* sp. nov., *Alicyclobacillus sacchari* sp. nov. and *Alicyclobacillus shizuokensis* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 1276–1285
7. Goto K., Mochida K., Sahara M., Suzuki M., Kasai H., Kokota A. (2003). *Alicyclobacillus pomorum* sp. nov., a novel thermo-acidophilic, endospore-forming bacterium that does not possess omega-alicyclic fatty acids, and emended description of the genus *Alicyclobacillus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53(Pt 5), 1537-44.
8. Goto K., Nishibori A., Wasada Y., Furuhashi K., Fukuyama M., Hara M. (2008). Identification of thermo-acidophilic bacteria isolated from the soil of several Japanese fruit orchards. *Lett. Appl. Microbiol.* 46(3), 289-94.
9. Goto K., Tanimoto Y., Tamura T., Mochida K., Arai D., Asahara M., Suzuki M., Tanaka H., Inagaki K. (2002). Identification of thermoacidophilic bacteria and a new *Alicyclobacillus* genomic species isolated from acidic environments in Japan. *Extremophiles.* 6(4), 333-40.
10. Groenewald W.H., Gouws P.A., Witthuhn R. C. (2009). Isolation, identification and typification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and *Alicyclobacillus acidocaldarius* strains from orchard soil and the fruit processing environment in South Africa. *Food Microbiol.* 26, 71-76
11. Hildebrand F., Meyer A., Eyre-Walker A. (2010). Evidence of Selection upon Genomic GC-Content in Bacteria. *PLoS Genet.* 6(9): e1001107.
12. Jensen G.B., Fisker N., Sparsøb T., Andrup L. (2005). The possibility of discriminating within the *Bacillus cereus* group using *gyrB* sequencing and PCR-RFLP. *Int. J. Food Microbiol.* 104(1), 113-120.
13. Luo H., Yousef A. E., Wang H.H. (2004). A real-time polymerase chain reaction-based method for rapid and specific detection of spoilage *Alicyclobacillus* spp. in apple juice. *Lett. Appl. Microbiol.* 39(4),376-82.

14. Matsubara H., Goto K., Matsumura T., Mochida K., Iwaki M., Niwa M., Yamasato K. (2002). *Alicyclobacillus acidiphilus* sp. nov., a novel thermo-acidophilic, omega-alicyclic fatty acid-containing bacterium isolated from acidic beverages. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52(Pt 5),1681-5
15. Niwa M., Kawamoto A. (2003). Development of a rapid detection method of *A. acidoterrestris*, hazardous bacteria to acidic beverage. *Fruit Process.* 13(2), 102-107
16. Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., Hase T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 28(12), E63.
17. Pieper M., Spengler H.-P., Thelen K., Becker B. (2006). Rapid flow cytometric Detection of oligonucleotide probe labeled bacteria in fruit juice. *Fruit Process.* 5, 298-301.
18. Santos S. R., Ochman H. (2004) Identification and phylogenetic sorting of bacterial lineages with universally conserved genes and proteins. *Environ. Microbiol.* 6(7), 754-9.
19. Thelen K., Beimfohr C., Snaidr J. (2003). Specific rapid detection of *Alicyclobacillus* by fluorescently-labelled gene probes in fruit juices. *Fruit Process.* 6, 416-418.
20. Wang Y., Yue T., Yuan Y., Gao Z. (2010). Isolation and identification of thermo-acidophilic bacteria from orchards in China. *J. Food Prot.* 73(2), 390-4.
21. Wisotzkey J.D., Jurtshuk P. Jr., Fox G.E., Deinhard G., Poralla K. (1992). Comparative sequence analyses on the 16S rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris*, and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus, *Alicyclobacillus* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42(2), 263-9.
22. Yamazaki K., Okubo T., Inoue N., Shinano H. (1997). Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) for rapid identification of spoilage bacterium *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61, 1016-1018
23. Yamazaki K., Teduka H., Inoue N., Shinano H. (1996). Specific primers for detection of *Alicyclobacillus acidoterrestris* by RT-PCR. *Lett. Appl. Microbiol.* 23, 350-354.
24. Yamazaki K., Teduka H., Shinano H. (1996). Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from acidic beverages. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60(3), 543-5.