

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



**Desarrollo de técnicas moleculares para la detección
y cuantificación de *Alicyclobacillus* alterantes en zumos
y néctares de frutas**

TRABAJO FIN DE MASTER EN:

INGENIERÍA AGRONÓMICA

Alumno: Antonio Sánchez Sánchez

Tutor: Manuel Hernández Pérez

Cotutor: Jorge García Hernández

Curso Académico: 2016/2017

Localidad: Valencia, Julio 2017

RESUMEN

En 1982, se aislaron distintas especies de *bacilos* acidófilos a partir de zumo de manzana, y se identificaron como una nueva clase de bacterias que podrían provocar daños en la producción, con las consiguientes pérdidas económicas. Denominadas en un principio como *Bacillus acidoterrestris*, se incluyeron más tarde dentro de un género nuevo denominado *Alicyclobacillus* spp.

Dentro del género *Alicyclobacillus* spp., *Alicyclobacillus acidoterrestris* es la principal especie alterante de los zumos de frutas por producción de guayacol. Debido a la resistencia de *Alicyclobacillus acidoterrestris* a elevadas temperaturas (soportando tratamientos de pasteurización) y a bajos valores de pH, es considerada como una amenaza importante en la industria de zumos y bebidas de frutas, originando considerables pérdidas económicas, por la producción de sabores indeseables en el producto final. Este deterioro es difícil de determinar mediante inspección visual, ya que el zumo alterado presenta un aspecto normal.

El microorganismo crece lentamente en los productos terminados y a concentraciones entre 10^5 - 10^6 ufc/mL –en zumo de manzana-, produce suficiente guayacol para alterar el sabor.

Hoy en día, se emplean distintas metodologías para el control de este microorganismo en la industria alimentaria, entre los que destacan los métodos clásicos microbiológicos de recuento en placa seguidos de análisis bioquímicos confirmativos que suelen durar hasta 10-12 días. Si tenemos en cuenta que en la actualidad la mayoría de las empresas tienen una producción en continuo, es interesante desarrollar y aplicar nuevos métodos que sean más rápidos y fiables, con el objetivo de obtener resultados de control microbiológico en un tiempo mucho más reducido.

En el presente trabajo fin de master se propone el desarrollo de una técnica molecular basadas en la hibridación in situ (FISH) para la detección y cuantificación de *Alicyclobacillus acidoterrestris*, haciendo una comparativa con métodos microbiológicos clásicos, evaluándose asimismo su utilidad como prueba diagnóstica en el control microbiológico de distintas materias primas, como zumos concentrados.

PALABRAS CLAVE: Bacteria, *Alicyclobacillus*, técnica FISH, molecular, hibridación, guayacol

ABSTRACT

In 1982, different species of acidophilus bacilli were isolated from apple juice, and identified as a new class of bacteria that could cause production damage, with consequent economic losses. Named initially as *Bacillus acidoterrestris*, they were later included within a new genus called *Alicyclobacillus* spp.

Within the genus *Alicyclobacillus* spp., *Alicyclobacillus acidoterrestris* is the main altering species of fruit juices produced by guaiacol. Due to the resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* to high temperatures (undergoing pasteurization treatments) and low pH values, it is considered a significant threat in the fruit juices and beverages industry, causing considerable economic losses due to the production of undesirable flavors in the final product. This deterioration is difficult to determine by visual inspection, since the altered juice has a normal appearance.

The microorganism grows slowly in the finished products and at concentrations between 10^5 - 10^6 cfu / mL - in apple juice -, produces enough guayacol to alter the taste.

Nowadays, different methodologies for the control of this microorganism in the food industry are used, among them the classic microbiological methods of plate counting followed by confirmatory biochemical analyzes that usually last up to 10-12 days. If we take into account that at present most of the companies have a continuous production, it is interesting to develop and apply new methods that are faster and more reliable, in order to obtain microbiological control results in a much shorter time.

In the present work, the development of a molecular technique based on in situ hybridization (FISH) for the detection and quantification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* is proposed, making a comparison with classical microbiological methods, also evaluating its usefulness as a diagnostic test in the Microbiological control of different raw materials, such as concentrated juices.

KEYWORDS: Bacteria, *Alicyclobacillus*, FISH technique, molecular, hybridization, guayacol

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto ha supuesto el fin de una etapa muy importante de mi vida y el comienzo de otra como ingeniero agrónomo. A lo largo de todos estos años académicos he amado día a día mi profesión, profesión la cual alimenta a la humanidad.

Para mí este punto es igual e incluso más importante que el resto del trabajo, porque tiene una carga emocional importante y porque me brinda la oportunidad de agradecer a todas aquellas personas que han colaborado de alguna manera, porque sin ellas, no lo hubiera conseguido.

A mis padres, **Antonio** y **Olga**, por su incondicional apoyo, aguantándome y soportándome en mis mejores y peores momentos. A mi hermana, **María Cruces**, por preocuparse por mí a pesar de encontrarnos cada uno en diferentes ciudades.

A **Jorge** y **Manolo**, mis tutores del proyecto, por ayudarme, aconsejarme y darme la oportunidad de poder conocer la microbiología de manera profesional.

Al **Instituto de Ingeniería del Agua y Medio Ambiente (IIAMA)**, en especial a **Yolanda**, por abrirme la puerta de su laboratorio.

A mis hermanos de Valencia, **Adrián** y **Marta**, por estar siempre a mi lado, en todo momento.

A mis amigos del Máster, **Juan Manuel**, **Marta** y **Paloma**, por todos los ratos juntos, tanto buenos como malos.

A mis amigos del pueblo, en especial a **Alfonso**, que aunque estemos alejados por trabajo siempre nos tendremos el uno al otro.

ÍNDICE DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	1
1. Características de <i>Alicyclobacillus spp.</i>	1
1.1. Morfología y propiedades fisiológicas y bioquímicas.	1
1.2. <i>Alicyclobacillus</i> como bacteria alterante.	2
1.3. Compuestos responsables del mal olor y sus mecanismos de producción.	2
2. Parámetros que afectan a la detección de <i>Alicyclobacillus spp.</i>	3
3. Métodos clásicos de detección de <i>Alicyclobacillus spp.</i>	4
3.1. Detección en medios de cultivo sólidos.....	4
3.2. Comparación de los diferentes medios de cultivo.....	6
3.3. Método unificado para la detección de bacterias termo-acidófilas.	6
3.4. Método IFU para la detección de <i>Alicyclobacillus</i> en zumos de frutas.....	7
4. Técnicas moleculares de Identificación de microorganismos.	7
4.1. Fundamentos y fases de la PCR.....	8
4.2. Hibridación fluorescente <i>in situ</i> (FISH): Fundamentos de la técnica	9
5. Otras técnicas de detección de <i>Alicyclobacillus spp.</i>	11
OBJETIVOS.....	14
MATERIALES Y MÉTODOS	17
1. Métodos microbiológicos clásicos	17
1.1. Muestras utilizadas para aislamiento de <i>Alicyclobacillus spp.</i>	17
1.2. Preparación de medio de cultivo selectivo	18
1.3. Método IFU para materias primas	18
2. Hibridación in situ (FISH).....	19
2.1. Búsqueda de secuencias específicas y diseño de la sonda	19
2.2. FISH	20
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
1. Resultados microbiología clásica	24
2. Resultados hibridación in situ (FISH)	26
3. Discusión de resultados	29
3.1. Microbiología clásica.....	29
3.2. FISH	29
CONCLUSIONES.....	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología <i>Alicyclobacillus</i> spp. estudiada con microscopía electrónica.....	1
Figura 2 Estructura química molecular del guayacol.....	3
Figura 3: Pasos básicos de la PCR (de Andy Vierstracte 1999)	9
Figura 4: Esquemización de la técnica FISH.....	11
Figura 5: Liófilos de cepas de referencia de <i>A. acidocaldarius</i> y <i>A. acidoterrestris</i>	18
Figura 6: muestras sometidas al test guayacol. A la derecha control positivo (cepa de referencia de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> CECTxxxx), a la izquierda control negativo (cepa de referencia de <i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> CECTxxxx), Y en el medio, muestra positiva nº9	25
Figura 7: muestras sometidas al test guayacol. A la derecha control positivo (cepa de referencia de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> CECTxxxx), a la izquierda control negativo (cepa de referencia de <i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> CECTxxxx), y en el medio, muestra positiva nº10.....	25
Figura 8: muestra 6 observada con la emisión de fluorescencia verde de la sonda AUB	27
Figura 9: muestra 6 observada con la emisión de fluorescencia roja de la sonda específica	27
Figura 10: muestra 11 observada con la emisión de fluorescencia verde de la sonda AUB	28
Figura 11: muestra 11 observada con la emisión de fluorescencia rojo de la sonda específica.....	28

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición medio de cultivo BAT AGAR	4
Tabla 2. Composición del medio de cultivo YSG-Agar (Motohiro y Hiroko, 1994).....	5
Tabla 3. Composición del medio de cultivo K agar (Walls y Chuyate, 1998).....	6
Tabla 4: identificación de las muestras de materia prima empleadas en los análisis.....	17

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. Características de *Alicyclobacillus spp.*

1.1. Morfología y propiedades fisiológicas y bioquímicas.

Alicyclobacillus es un género de bacterias Gram +, con forma bacilar, termófilas, acidófilas y formadoras de esporas (Figura 1). Su rango de temperatura de crecimiento está comprendido entre 20 y 70°C, siendo sus temperaturas óptimas de crecimiento valores entre 42-60°C. También puede crecer en un rango de pH bastante grande, normalmente entre 2,5 y 6,0 (Pettipher *et al.*, 1997; Walls y Chuyate, 1998; Orr *et al.*, 2000; Yamazaki *et al.*, 2000; Chang y Kang, 2004).

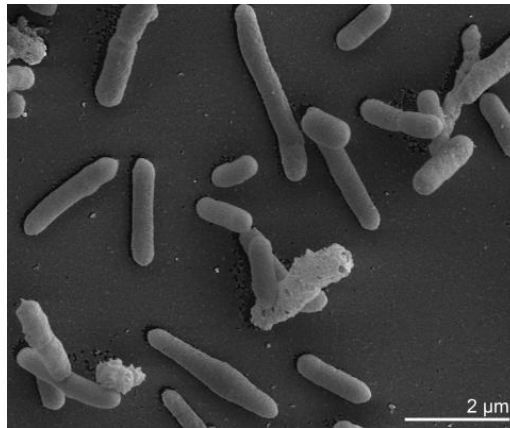


Figura 1. Morfología *Alicyclobacillus spp.* estudiada con microscopía electrónica

Su metabolismo de azúcares suele variar bastante en función de las especies y no va acompañado de producción de gas (Goto *et al.*, 2006). La característica más significativa de *Alicyclobacillus spp.* es la presencia de ácidos grasos ω -alicíclicos como el mayor componente de su membrana (Poralla *et al.*, 1983; Chang y kang, 2004). Algunas investigaciones han sugerido que los ácidos grasos ω -alicíclicos están asociados a la resistencia de *Alicyclobacillus spp.* en condiciones ácidas y altas temperaturas.

Otro factor asociado con la resistencia térmica de las endosporas de *Alicyclobacillus spp.*, es la presencia de proteínas y enzimas estables al calor, así como la mineralización por cationes divalentes con ácido dipicolínico (DPA), especialmente el complejo calcio-dipicolinato (Ca-DPA) (Chang y Kang, 2004; Jay *et al.*, 2005b).

1.2. Alicyclobacillus como bacteria alterante.

Con el objetivo de garantizar la seguridad alimentaria, Walls y Chuyate (2000) realizaron un estudio de patogenicidad de las esporas de *Alicyclobacillus spp.* en ratones, no detectando síntoma alguno de enfermedad. En otro estudio, conejillos de indias fueron alimentados con zumo inoculado con cepas de *A. acidoterrestris*, obteniendo resultados similares. Todas las investigaciones han concluido que *A. acidoterrestris* no es un patógeno alimentario pero si alterante de bebidas ácidas constituyendo un serio problema económico para la industria de zumos de frutas aunque no una preocupación de seguridad alimentaria.

El deterioro de zumos concentrados de fruta por *Alicyclobacillus spp.* no es probable cuando el contenido en sólidos solubles es superior a 20°Brix que inhiben la germinación de endosporas (Splittstoesser *et al.*, 1994; Chang y Kang, 2004). Sin embargo, estas endosporas conservan su viabilidad en el concentrado de fruta, que tras la dilución a zumo, se podrían multiplicar a valores elevados causando deterioro del producto final (Borlinghaus y Engel, 1997).

En el desarrollo de una estrategia para prevenir el deterioro por *Alicyclobacillus spp.*, es importante investigar su resistencia al calor en bebidas comercialmente disponibles. Así, Yamazaki *et al.* (1997) evaluaron la resistencia al calor de la cepa *A. acidoterrestris* AB-1 aislada de una bebida en mal estado, determinando valores de $D_{89^{\circ}\text{C}} = 10,9-13,7$ minutos y $D_{95^{\circ}\text{C}} = 2,1-3,2$ minutos, siendo el valor de D, el tiempo requerido para reducir la población microbiana 1/10, respecto a la cantidad inicial. Estos resultados indican que el proceso de pasteurización aplicado actualmente no es suficiente para la destrucción de esporas de *Alicyclobacillus* en zumos y bebidas de frutas.

Alicyclobacillus spp. como microorganismo termófilo no crece por debajo de 20°C. Sin embargo, algunos zumos de frutas tratados térmicamente son almacenados y distribuidos a temperatura ambiente y, en función de las condiciones climatológicas donde se comercialice, puede existir un mayor o menor riesgo de alteración.

1.3. Compuestos responsables del mal olor y sus mecanismos de producción.

Alicyclobacillus es la principal causa de malos olores (olor medicinal) en zumos de frutas. Los componentes químicos detectados en casos de alteración y formación de mal olor son guayacol, 2,6-dibromofenol y 2,6-diclorofenol. El guayacol (Figura 2) es la principal y más importante preocupación, presentando un olor ácido y “medicinal”. Suele detectarse en zumos alterados, con

una concentración que varía entre 10 y 200 ppb aproximadamente, dependiendo de las cepas productoras y las condiciones de trabajo en la industria (Yokota *et al.*, 2007). Dentro del género *Alicyclobacillus spp.*, *A. acidoterrestris* produce las cantidades más altas de guayacol.

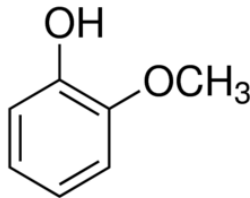


Figura 2 Estructura química molecular del guayacol.

El mecanismo de producción de guayacol como compuesto formador de mal olor ha sido dilucidado por diferentes autores (Peleg *et al.*, 1992; Pettipher *et al.*, 1997; Goto, 2000), debiéndose a una reacción oxidativa o metabólica del ácido ferúlico, vainillina o ácido vainílico.

2. Parámetros que afectan a la detección de *Alicyclobacillus spp.*

La temperatura de crecimiento es el primer factor a tener en cuenta. El rango de temperatura es muy amplio y varía de 20 a 70°C según las distintas especies, aunque la temperatura de crecimiento empleada por el “Unified Method for Detection of Thermoacidophilic bacteria” la sitúa en 45°C, siendo la temperatura óptima de crecimiento de *A. acidoterrestris* y otras especies productoras de guayacol.

El periodo de incubación sería el segundo parámetro a tener cuenta para su detección. Debido a que el crecimiento depende de la concentración inicial de células vegetativas, la metodología unificada recomienda 5 días de enriquecimiento para asegurar el crecimiento de todas las especies de *Alicyclobacillus* (Yokota *et al.*, 2007).

En cuanto al pH como factor de crecimiento, los valores están comprendidos entre 2,5 a 6,0, siendo un pH óptimo de 4,0.

Parámetro también importante a tener en cuenta son las condiciones de choque térmico. Eiroa *et al.* (1999) investigaron la germinación de *A. acidoterrestris* y concluyeron que el tratamiento térmico a 70 °C durante 20 minutos era óptimo para la activación de esporas.

El último parámetro a considerar sería el tipo de zumo y su concentración. Diferentes estudios realizados en los últimos años han evidenciado que las características físico-químicas del zumo y bebidas de frutas influyen enormemente en la presencia de *Alicyclobacillus spp.* en los mismos. Estas características influyen directamente en la termorresistencia de esta bacteria a los tratamientos térmicos aplicados sobre estos productos.

3. Métodos clásicos de detección de *Alicyclobacillus spp.*

3.1. Detección en medios de cultivo sólidos

Los medios de cultivo sólidos utilizados para el aislamiento o detección de *Alicyclobacillus spp.* son BAT AGAR, OSA (Orange Serum Agar), PDA (Potato Dextrose Agar), YSG agar (Yeast-Starch-Glucose agar) y K agar. *Alicyclobacillus* no crece en cualquier medio de cultivo, debido a que este debe estar acidificado con ácido málico, ácido clorhídrico o ácido sulfúrico hasta pH aproximado 3,5-4,0.

3.1.1. BAT ALICYCLOBACILLUS AGAR

Es un medio selectivo recomendado para el aislamiento de microorganismos acidotermófilos en zumos de frutas, concentrados, mermeladas y otros alimentos ácidos, según IFU-12-2007. El AGAR BAT tiene un pH de 4,0.

Tabla 1. Composición medio de cultivo BAT AGAR

Extracto de levadura	2,00 g
Glucosa	5,00 g
CaCl ₂ .2 H ₂ O	0,12 g
MgSO ₄ .7 H ₂ O	0,25 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,10 g
KH ₂ PO ₄	1,50 g
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	0,09 mg
CuSO ₄ . 5 H ₂ O	0,08 mg
MnSO ₄ . H ₂ O	0,07 mg
CoCl ₂ . 6 H ₂ O	0,09 mg
H ₃ BO ₃	0,05 mg
Na ₂ MoO ₄ . 2 H ₂ O	0,15 mg
Agar-agar	20,00 g

3.1.2. Orange Serum Agar (OSA)

Se ha empleado bastante tiempo en el cultivo y recuento de microorganismos relacionados con el deterioro de productos cítricos.

Pettipher et al. (1997) compararon Nutrient Agar, Trypticase Soja Agar, Potato dextrose Agar (PDA), BAT AGAR Y OSA (Orange Serum Agar) para recuperar *A. acidoterrestris*. En PDA y OSA observaron crecimiento mientras que en Nutrient Agar y Trypticase Soja Agar no. Comparado con PDA y BAM, el medio OSA dio los rendimientos más altos en cuanto a número de colonias. Posteriormente, Jensen (2000) informó acerca de un crecimiento mejorado de *Alicyclobacillus spp.* cuando OSA era suplementado con 0,5% de sacarosa.

3.1.3. Potato Dextrose Agar (PDA)

Potato Dextrose Agar es un medio de cultivo estándar utilizado en la determinación de mohos y levaduras en leche y otros alimentos (American Public Health Association, 1976 y 1978). Los métodos estándares recomiendan la acidificación de PDA hasta $\text{pH } 3,5 \pm 0,1$ después de la esterilización. El medio no debe ser calentado una vez acidificado, ya que el ácido hidroliza el agar y destruye sus propiedades de solidificación.

3.1.4. Yeast-Starch-Glucose Agar (YSG Agar)

En Japón, el yeast-starch-glucose agar es usado para la detección de microorganismos termo-acidófilos en bebidas ácidas (Motohiro y Hiroko, 1994). El medio de cultivo suele acidificarse hasta $\text{pH } 3,7$

Tabla 2. Composición del medio de cultivo YSG-Agar (Motohiro y Hiroko, 1994).

Extracto de levadura	2,0 g
Almidón soluble	2,0 g
Glucosa	1,0 g
Agar	15,0 g
Agua destilada	1000 mL

3.1.5. K AGAR

El K agar fue descrito por primera vez por Walls y Chuyate (1998). Para el ajuste de pH posterior a la esterilización (121 °C durante 15 minutos) se emplea ácido málico 25% (p/v) filtrado y esterilizado.

Tabla 3. Composición del medio de cultivo K agar (Walls y Chuyate, 1998).

Extracto de levadura	2,5 g
Peptona	5,0 g
Glucosa	1,0 g
Tween 80	1,0 g
Agar	15,0 g
Agua desionizada	990 mL

3.2. Comparación de los diferentes medios de cultivo.

Henczka *et al.* (2013) realizaron un estudio de comparación de medios de cultivo con el fin de optimizar un método eficiente para la enumeración y detección de esporas de *A. acidoterrestris*, especialmente en productos de frutas. La más alta recuperación de esporas se obtuvo con YSG agar. Este alto rendimiento obtenido hace que sea recomendable para su utilización como medio de cultivo en el aislamiento de *Alicyclobacillus spp.* en zumos de frutas.

Por otra parte, aunque sea el medio que permita recuperar la mayor cantidad de esporas de *A. acidoterrestris* entre los medios anteriormente descritos, tiene también alguna limitación, puesto que su composición es bastante básica y no tiene sistema tampón que pueda mantener el pH. Esta es la causa por lo que no es un medio de cultivo aconsejado para incubaciones largas.

En comparación con YSG agar, BAT agar posee trazas de elementos y más glucosa, lo que facilita el crecimiento de *Alicyclobacillus spp.*

Actualmente BAT agar, YSG agar y K agar son los medios de cultivo más utilizados para la detección de *Alicyclobacillus spp.* (Henczka et al., 2013).

3.3. Método unificado para la detección de bacterias termo-acidófilas.

Se trata de un método para detectar bacterias termo-acidófilas que utiliza YSG agar (pH 3,7) incubado a 45°C como medio de cultivo. Para muestras que sean susceptibles de ser filtradas se emplea el sistema de filtración por membrana adicionalmente al sistema de siembra en estría en placa empleado para las muestras que no puedan ser sometidas a filtración.

3.4. Método IFU para la detección de *Alicyclobacillus* en zumos de frutas.

El método IFU de detección de *Alicyclobacillus* en zumos de frutas (revisión 1) está basado en el uso de K-agar combinado con BAT agar (pH 4,0) o YSG (Yokota *et al.*, 2007). Dependiendo del tipo de muestra, clarificada o turbia y de la concentración de *Alicyclobacillus* presente en la muestra, las etapas de análisis pueden variar, siendo común la dilución del concentrado de zumo tomando 10 mL de muestra y 90 mL de diluyente estéril (agua estéril, solución salina, tampón fosfato, caldo BAT o caldo YSG), y el tratamiento térmico a 80 °C durante 10 minutos y posterior enfriado hasta 40-45 °C.

El sistema de confirmación de este método está basado en la incapacidad de *Alicyclobacillus* para crecer en un medio de cultivo estándar a pH neutro (Plate Count agar), el crecimiento y producción de esporas a 45 °C en medio de cultivo con pH < 4,0 (K-agar y YSG/BAT) y crecimiento poco probable a 65 °C en YSG (IFU 2007; Steyn *et al.*, 2011).

4. Técnicas moleculares de Identificación de microorganismos.

Los métodos microbiológicos clásicos, además de necesitar más tiempo hasta la obtención de resultados, muchas veces pueden dar lugar a falsos positivos o incluso indeterminaciones.

El desarrollo de nuevas técnicas moleculares para la detección y cuantificación de microorganismos han desplazado en los últimos años a los métodos clásicos de cultivo.

Entre estas técnicas, destacan los métodos basados en el análisis de ácidos nucleicos que han revolucionado el campo del diagnóstico microbiano. Actualmente, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) constituye una de las técnicas de mayor utilidad para la detección e identificación de microorganismos como alternativa a los métodos tradicionales, debido a la elevada discriminación, precisión y reproducibilidad, así como a la rapidez y sencillez en la realización de dicha técnica (Hill, 1996).

Otra técnica de detección basada en la biología molecular, en la cual nos centraremos en este trabajo es la técnica de hibridación *in situ* FISH. Esta técnica consiste en la detección de secuencias de ácidos nucleicos mediante la utilización de sondas de oligonucleótidos marcadas con

fluorocromos y complementarias de una región del ARN ribosómico y su posterior observación con microscopio de fluorescencia. Aporta información sobre la morfología, número y distribución espacial de la bacteria. (Boehringer M. Biochemica, 1992; Cunningham, 2002)

4.1. Fundamentos y fases de la PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) tiene por objeto sintetizar muchas veces un fragmento de ADN utilizando una polimerasa denominada Taq Polimerasa, que puede trabajar a temperaturas muy elevadas. La enzima Taq DNA Polimerasa es obtenida en *Escherichia coli* a partir de la expresión de un plásmido portador del gen de *Thermusaquaticus* que codifica esta enzima. Taq DNA polimerasa es una enzima termoestable que cataliza la polimerización de nucleótidos en la dirección 5'--3' a 70-74 °C y que exhibe una vida media de 30-45 minutos a 95°C. Esta enzima posee actividad polimerasa y exonucleasa en la dirección 5'-3' pero carece de actividad exonucleasa en la dirección 3'-5' (prueba de lectura).

Cuando hacemos una reacción de PCR simulamos lo que sucede en una célula cuando se sintetiza el ADN y en el tubo se mezclan todos los ingredientes necesarios para hacerlo: la polimerasa, los oligonucleótidos, desoxyribonucleotidos (dNTPs), componentes que son sometidos a las condiciones apropiadas para que la enzima trabaje adecuadamente (cierto pH, determinadas cantidades de magnesio en forma de MgCl₂, KCl, y pueden necesitarse otras sales o reactivos, dependiendo de cada polimerasa).

Las muestras preparadas con los componentes necesarios son colocadas en tubos en una máquina conocida como termociclador, que sirve para calentar y enfriar a temperaturas muy precisas y a gran velocidad. En resumen, el termociclador repite tantas veces como sea necesario un ciclo de reacción que incluye tres fases que se llevan a cabo a temperaturas diferentes. La primera fase o de desnaturalización tiene lugar a 94 grados, permite desnaturalizar el ADN. La segunda fase se denomina de anillamiento y permite el anillamiento de los oligonucleótidos que permiten amplificar cada fragmento de ADN de interés a sus secuencias diana. La temperatura de esta fase varía en función de la temperatura de desnaturalización de los oligonucleótidos utilizados en cada caso, pero suele variar entre 40 y 60°C. Finalmente transcurre la fase de elongación de los cebadores, que tiene lugar a 72°C. Esto se repite durante tantos ciclos como sea necesario para amplificar en cantidad suficiente cada fragmento de interés, generalmente entre 30 y 40 ciclos.

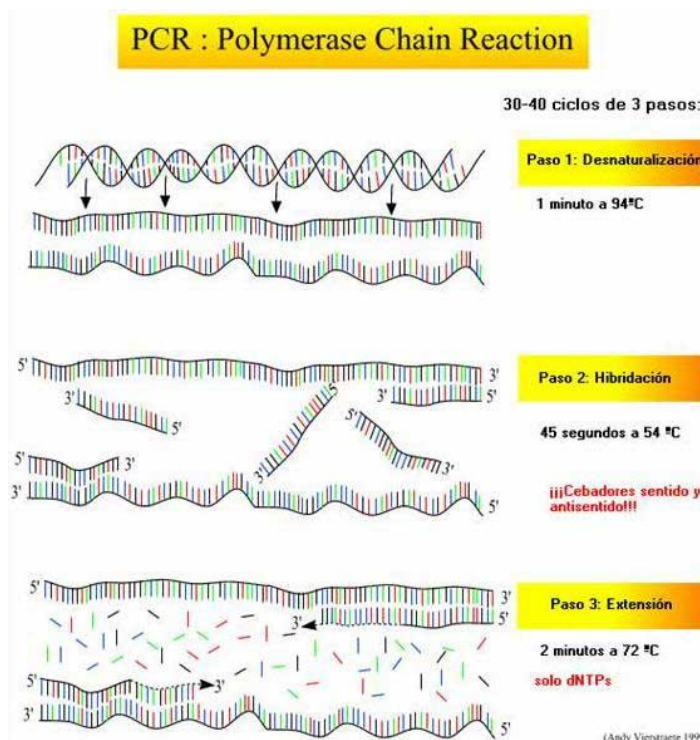


Figura 3: Pasos básicos de la PCR (de Andy Vierstraete 1999)

4.2. Hibridación fluorescente *in situ* (FISH): Fundamentos de la técnica

La técnica de hibridación *in situ* consiste en diseñar y sintetizar secuencias de DNA de una sola hebra, llamadas sondas, que son complementarias de las secuencias de ARNr que se detectar. Estas sondas se "marcan" con moléculas fluorescentes. A diferencia de otras pruebas, la hibridación *in situ* puede ser llevada a cabo en células no activas

Esta técnica se ha convertido en una herramienta potente, rápida y sensible para la detección e identificación de microorganismos en diferentes ambientes microbianos. Presenta ventajas sobre otros métodos como la PCR, ya que no requiere un cultivo previo ni extracción de ácidos nucleicos, ni surgen problemas de uniones inespecíficas ni sustancias inhibitoras que dificulten la hibridación.

La mayor limitación del método es la sensibilidad, en función de la propia sonda y de la matriz donde se hibrida. También puede haber problemas de fluorescencia inespecífica y de ruido de fondo.

La parte más crítica de esta técnica suele ser el diseño de las sondas, que deben ser suficientemente específicas para unirse únicamente a la bacteria que queremos detectar y que suelen estar en presencia de otras, en muchos casos con moléculas de ARNr muy homólogas. También hay que tener en cuenta la accesibilidad de la sonda al ARNr a la hora de diseñarla y su tamaño.

Las sondas de hibridación se pueden clasificar según varios criterios: longitud de la secuencia de interés, método de marcaje y detección, longitud de la sonda, método de preparación, etc. Este último criterio es el más utilizado, distinguiéndose entre sondas preparadas por métodos convencionales y por síntesis química (Luque y Herraes, 2001).

La técnica FISH utiliza tres tipos de sonda:

Sondas específicas de un locus: estas sondas se hibridan a una región particular de un gen

Sondas alfoides o centroméricas: son sondas que contienen secuencias complementarias de las secuencias repetidas que se encuentran en los centrómeros de los cromosomas.

Sondas para cromosomas completos: son colecciones de sondas de un tamaño reducido, cada una de las cuales se hibrida a una secuencia diferente a lo largo de todo un cromosoma.

La hibridación in situ es un procedimiento que incluye los siguientes pasos: preparación del material biológico, selección y marcaje de la sonda, hibridación con la sonda marcada, detección de la sonda, microscopía y análisis de la imagen.

Para sondas de cadena sencilla, se debe usar la secuencia reversa complementaria. Cuando las sondas son sintetizadas por transcripción, involucra generar mRNA del gen endógeno. Cuando se diseñan los oligonucleótidos marcados, es importante recordar que la secuencia antisentido es la hebra complementaria reversa de la cadena líder y debe ser leída de 5' a 3'.

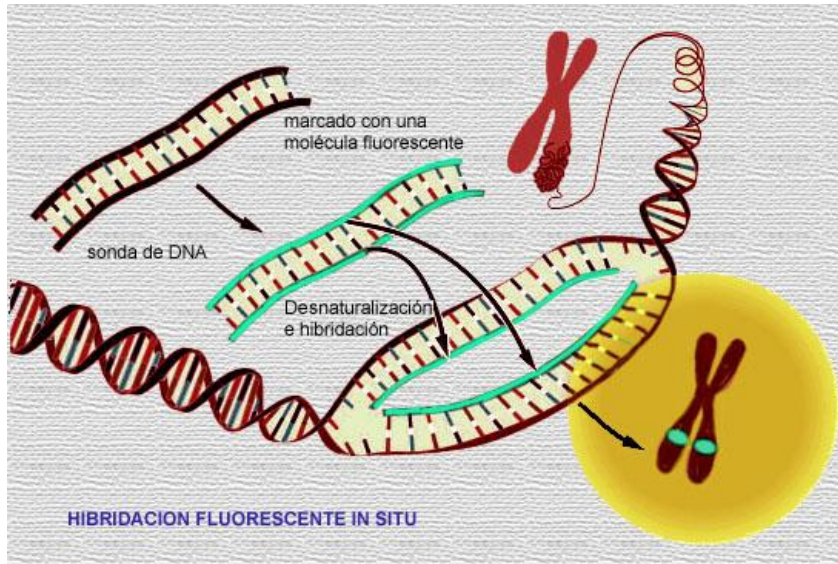


Figura 4: Esquematación de la técnica FISH

5. Otras técnicas de detección de *Alicyclobacillus spp.*

Existen otras metodologías para la detección de *Alicyclobacillus spp.* que se han descrito en bibliografía científica:

- Desarrollo de ensayos indirectos inmuno-enzimático basados en anticuerpos policlonales para la detección de cepas de *Alicyclobacillus* en zumos de frutas (Zhouli *et al.*, 2012).
- Uso de nariz electrónica en la investigación de *Alicyclobacillus spp.* y *Alicyclobacillus acidoterrestris* en zumos de frutas (Gobbi *et al.* 2010; Hartyani *et al.*, 2013).
- Detección de *Alicyclobacillus spp.* en zumos de frutas por combinación de la técnica de separación inmunomagnética (IMS) y ensayo inmunoenzimático (ELISA) (Zhouli *et al.*, 2013).
- Detección de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en zumos de frutas a partir de ensayos inmunoenzimáticos empleando anticuerpos doble sándwich ELISA (DAS-ELISA) (Jianke *et al.*, 2013; Jianke Li *et al.*, 2014).
- Diferenciación entre aislados de *Bacillus* y *Alicyclobacillus* en zumo de manzana a través de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier en combinación con análisis multivariados (Al-Holy *et al.*, 2015).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

LOS PRINCIPALES OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO HAN SIDO:

- Aislamiento de *Alicyclobacillus acidoterrestris* y otras especies de especies de *Alicyclobacillus* por microbiología clásica, mediante la aplicación del método IFU.
- Diseño y validación de una sonda de hibridación específica para *Alicyclobacillus acidoterrestris*.
- Detección de *Alicyclobacillus acidoterrestris* mediante técnicas moleculares de hibridación *in situ* (FISH).
- Comparativa de técnicas microbiológicas clásicas y moleculares para la detección de *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Métodos microbiológicos clásicos

1.1. Muestras utilizadas para aislamiento de *Alicyclobacillus spp.*

Para el aislamiento de *Alicyclobacillus spp.* se utilizaron 14 muestras alteradas de concentrados de zumos (muestras adquiridas a través de una industria alimentaria, para la posterior fabricación de zumos de fruta), siendo 13 concentrados de zumo de naranja y 1 concentrado de pera, las cuales se encuentran identificadas en la siguiente tabla:

Tabla 4: identificación de las muestras de materia prima empleadas en los análisis

Identificación de la muestra	Materia prima procedente
1º 201312041	Concentrado de naranja
2º 20140106-49	Concentrado de naranja
3º 20140116-47	Concentrado de naranja
4º 20131216-53	Concentrado de naranja
5º 1-5179	Concentrado de naranja
6º 270117	Concentrado de pera
7º 20140106-41	Concentrado de naranja
8º Cutrale 11/13	Concentrado de naranja
9º Leon 311	Concentrado de naranja
10º 20131204	Concentrado de naranja
11º 14560	Concentrado de naranja
12º 2-0424412015	Concentrado de naranja
13º 88	Concentrado de naranja
14º 0165	Concentrado de naranja

Además de las muestras anteriormente descritas, se pidieron a la Colección española de cultivos tipo (CECT), dos cepas de referencia de *Alicyclobacillus acidoterrestris* y de *Alicyclobacillus acidocaldarius*, como muestras de control positivo y control negativo para la puesta a punto de la técnica FISH (Figura 6).

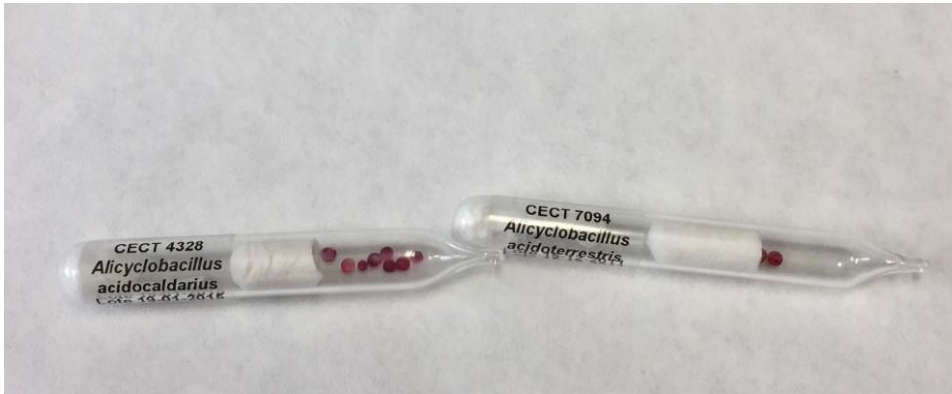


Figura 5: Liófilos de cepas de referencia de *A. acidocaldarius* y *A. acidoterrestris*.

1.2. Preparación de medio de cultivo selectivo

Para el aislamiento mediante microbiología clásica de *Alicyclobacillus spp* se utilizó el medio de cultivo Agar BAT según el método IFU que se describe a continuación. Este medio de cultivo requiere una acidificación (0,9 ml HCL/0,5 L) después de su esterilización en autoclave

1.3. Método IFU para materias primas

Es el Método oficial para la detección de *Alicyclobacillus spp.* de forma selectiva, el cual consta de los siguientes pasos:

- Colocar 1 ml de cada muestra a analizar en un tubo de ensayo con 9 ml de caldo BAT
- Introducir los tubos de ensayo en un baño termostático a 80°C durante 12 minutos
- Una vez pasado los 12 minutos transferir los tubos a hielo durante 6 minutos. De esta forma se provoca la germinación de las esporas.
- Incubar los tubos en estufa a 45°C durante 4 días
- Sembrar en superficie 0,1 ml en placa de Agar BAT e incubar las placas 5 días a 45°C

Si tras 5 días se observa crecimiento en agar BAT, recoger colonias y realizar el test de guayacol, que detecta de forma selectiva este metabolito producido por *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

Este test consta de los siguientes pasos:

- Coger una colonia de la placa e introducirla en tubo con 2ml de caldo de cultivo Bat. Incubar de 1-3 horas
- Añadir 2 ml de tampón, 20 µl de H₂O₂ y 20µl de enzima. Incubar durante 10 minutos a 45°C
- Si pasado este tiempo se visualiza un cambio de color de la muestra (tono rojo anaranjado), entonces hay presencia de guayacol, y por tanto de *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

Una vez confirmada la identificación a nivel de especie, se pasa el cultivo puro a crioviales y se congela a -20°C para su almacenamiento.

2. Hibridación in situ (FISH)

2.1. Búsqueda de secuencias específicas y diseño de la sonda

Para el diseño de la sonda específica de *Alicyclobacillus acidoterrestris* se utilizaron las bases de datos del National Center for Biotechnology Information o NCBI . A través de este almacén genético se fueron analizando genes de *Alicyclobacillus acidoterrestris* comprobando distintas secuencias con una extensión de 15-25 nucleótidos intentando conseguir que fueran únicas para esta especie. De esta forma al realizar la hibridación in situ con la sonda, ésta sería específica y supondría un análisis mucho más rápido y fiable que con las técnicas de microbiología clásica.

Para la comprobación de la especificidad de la secuencia de nucleótidos, se utilizó el programa informático de alineamiento de secuencias BLAST. Se identificó una zona específica formada por 22 nucleótidos del gen 16s del ARN ribosómico, con la siguiente secuencia.

5'ATGCCGGATAATACACGGGTAG'3

Esta secuencia se mandó al laboratorio METABION INTERNATIONAL AG, situado en Alemania para su construcción y marcado.

Como control positivo del dominio Eubacteria, se empleó una combinación de tres sondas complementarias de una región del ARNr 16S (EUB). Estas sondas hibridan con todas las bacterias que pueden estar presentes en la muestra (Fuchs *et al.*, 1998; Amann *et al.*, 1990):

5'GCTGCCTCCCGTAGGAGT'3

5'GCAGCCACCCGTAGGTGT'3

5'GCAGCCACCCGTAGGTGT'3

2.2. FISH

Condiciones de hibridación

Para llevar a cabo la fijación de las células se tomó un asa de siembra cargada de cultivo (se utilizaron las 14 muestras procedente de concentrado y los dos cultivos tipos) y se resuspendió en 1 ml de PBS. Tras la homogeneización, se procedió a la centrifugación (8 minutos-8000 rpm). El pellet resultante se lavó con 1ml de PBS 1X. Tras el lavado y centrifugación de la muestra el pellet se resuspendió en PBS 1X. A continuación, se procedió a dos lavados más de la muestra con 1 ml de PBS 1X y tras los mismos, se resuspendió el pellet con etanol y PBS 1X en proporción 1:1 y se almacenó a -20°C. Una vez fijadas, las muestras se depositaron sobre los pocillos de los portaobjetos de hibridación, tratados previamente con gelatina. Se dejaron secar al aire y se añadió 10 µl de lisozima a una concentración de 10 mg/ml. Se incubó durante 10 minutos a 4°C. Se procedió a la deshidratación y permeabilización de la membrana celular, sumergiendo el portaobjetos en volúmenes de 50, 80 y 100% de etanol, durante 3 minutos en cada uno.

Posteriormente, cada uno de los pocillos se llenó con 10 µl de solución de hibridación (0,9 M/l NaCl, 0,01% SDS, 20 mM/l Tris-HCl y X% formamida, pH 7,6) conteniendo 50 ng de sonda específica marcada con el correspondiente fluorocromo y 50 ng de sonda no específica. Para la puesta a punto de la técnica se probaron varias concentraciones de formamida (10, 20 y 30%). La función de la formamida es aumentar la astringencia de unión, de forma que cuanto mayor sea la concentración, más específica debe ser la unión de la sonda con la secuencia diana.

El portaobjetos se introdujo en posición horizontal en un tubo tipo Sarsted de 50 ml, en el que se había introducido previamente una base de papel de celulosa humedecida con el mismo

tampón de hibridación. La reacción se llevó a cabo a 46°C, en oscuridad y en condiciones de humedad según Moreno et al. (2001). El tiempo de hibridación fue de aproximadamente 2 horas.

A continuación, se procedió al lavado del portaobjetos con una solución de lavado (20 mM/l Tris-HCl, 0,01% SDS, 5 mM/l EDTA) atemperada a 48°C, primero vertiendo una pequeña cantidad sobre el mismo para arrastrar el tampón de hibridación y, después, sumergiéndolo en 50 ml de la misma para eliminar el resto de sonda que no se hubiera unido al ARNr. El tiempo de lavado fue de 15 minutos, manteniéndose a 48°C en oscuridad. Al tampón de lavado se le añadió una concentración de NaCl condicionada por el porcentaje de formamida utilizado en la hibridación.

Tras los 15 minutos de lavado, los portaobjetos se lavaron con agua y se secaron al aire en oscuridad.

Visualización de las muestras

Para la comprobación de la efectividad de la sonda, se realizarán comprobaciones con el microscopio de fluorescencia. La microscopía de fluorescencia se basa en los mismos principios de óptica de la microscopía común, con diferencias en el manejo y el diseño relacionadas con la generación y transmisión de longitudes de onda adecuadas a los fluorocromos que se quieren visualizar, ya sean propios de la muestra o de la coloración utilizada. Los procesos de excitación generalmente requieren longitudes de onda cortas en el UV cercano (lámpara de halógeno-cuarzo, arcos de mercurio, etc.). El objetivo que suele utilizarse es el 100x con el uso de aceite de inmersión, ya que produce una mayor ampliación. El aceite de inmersión proporciona un medio óptico homogéneo al paso de la luz entre la preparación y el lente frontal del objetivo.

Las visualizaciones se realizaron mediante un microscopio de fluorescencia Olympus BX 50 con los filtros U-MWB, U-MWIB y U-MWIG. Las fotografías se realizaron con la cámara DP-10 de Olympus.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Resultados microbiología clásica

Se partió de 14 muestras, 13 procedentes de concentrado de naranja y 1 procedente de concentrado de pera, y de dos liófilos de cepas de colección, uno como control positivo (*Alicyclobacillus acidoterrestris*) y otro como control negativo (*Alicyclobacillus acidocaldarius*).

Todas estas cepas fueron crecidas según método IFU, el cual es selectivo para la detección de *Alicyclobacillus*. Tras el periodo de incubación y la siembra en agar BAT se observó crecimiento microbiano de todas las muestras y se procedió a continuación a someterlas al test de guayacol.

El test de guayacol resultó positivo para 11 de estas 14 muestras aisladas de producto, en las que se visualizó un cambio de color, hacia un tono anaranjado, y por tanto, fueron caracterizadas como *Alicyclobacillus acidoterrestris*. En las otras 3 muestras el resultado del test fue negativo, lo que significa ausencia de guayacol lo que nos permite caracterizarlas como cepas de la especie *Alicyclobacillus acidocaldarius*.

Las muestras positivas se pueden identificar en el orden que aparecen en la tabla 4 de materiales y métodos. Desde la muestra 1 hasta la muestra 11, los resultados han determinado la presencia de *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Desde la muestra 12 hasta la 14 se determinó la presencia de *Alicyclobacillus acidocaldarius*.

En las siguientes figuras se pueden observar dos muestras positivas, en este caso las muestras 9 y 10 (ambas procedentes de concentrado de zumo de naranja) acompañadas de sus respectivos controles negativo y positivo. Se aprecia con bastante claridad la diferencia de color entre las que son positivas (un tono anaranjado) y las que son negativas (tono amarillo pálido).

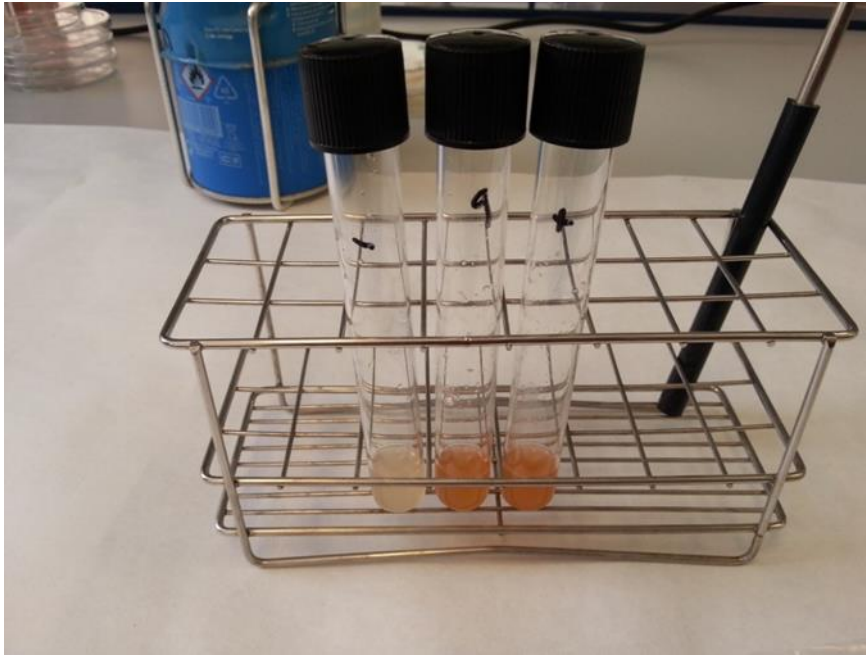


Figura 6: muestras sometidas al test guayacol. A la derecha control positivo (cepa de referencia de *Alicyclobacillus acidoterrestris* CECTxxxx), a la izquierda control negativo (cepa de referencia de *Alicyclobacillus acidocaldarius* CECTxxxx), Y en el medio, muestra positiva nº9

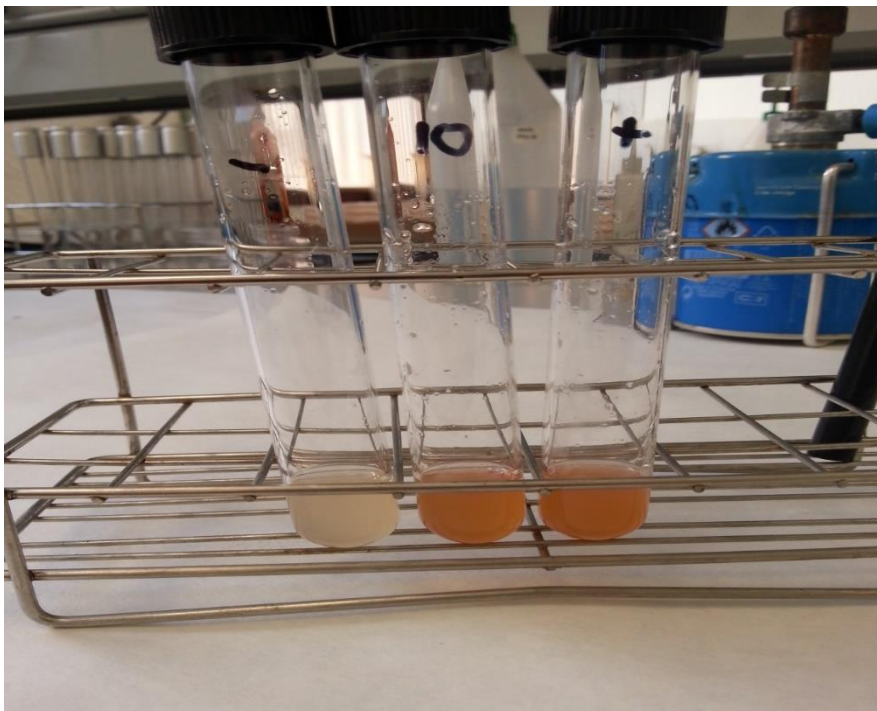


Figura 7: muestras sometidas al test guayacol. A la derecha control positivo (cepa de referencia de *Alicyclobacillus acidoterrestris* CECTxxxx), a la izquierda control negativo (cepa de referencia de *Alicyclobacillus acidocaldarius* CECTxxxx), y en el medio, muestra positiva nº10

2. Resultados hibridación in situ (FISH)

Una vez aplicadas las técnicas de microbiología clásica para diferenciar las muestras positivas y negativas, se quiso evaluar la detección mediante la hibridación in situ con la sonda específica previamente diseñada. Al igual que con el test guayacol, se utilizó un control positivo (*Alicyclobacillus acidoterrestris*) y negativo (*Alicyclobacillus acidocaldarius*) y las 14 muestras de concentrado de fruta.

La secuencia de la sonda específica viene detallada en el apartado de materiales y métodos, la cual pertenece al gen 16s del ARNr. Las hibridaciones también se realizaron con un mix de sondas EUB (descrito en material y métodos) como control positivo de detección de bacterias, puesto que estas sondas son capaces de hibridar con cualquier bacteria presente en la muestra, pero están marcadas con un fluorocromo diferentes. De esta forma la muestra positiva que hibride con la sonda específica hibridará con ambas sondas, pudiendo en un mismo campo apreciar la hibridación simultánea a longitudes de onda diferentes. De esta forma los resultados tras la visualización en el microscopio de fluorescencia dieron una emisión en verde a todas las muestras, y una emisión en rojo a aquellas muestras que con éxito fueron positivas, habiendo una correlación al 100% con el método IFU, de 11 positivas y 3 negativas, poniendo en evidencia la efectividad de la sonda específica diseñada para la detección de *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

En las siguientes figuras, se puede apreciar la visualización de algunas muestras sometidas a la técnica FISH, en donde la emisión de fluorescencia confirmó cuales pertenecían a la especie de interés.

Las **figuras 8 y 9**, pertenecen a la muestra 6. Se puede observar la diferencia de emisión de fluorescencia en las dos fotos. La primera corresponde a la sonda general EUB y la segunda a la sonda específica. Las **figuras 10 y 11**, pertenecen a la muestra 11. Al igual que en las figuras anteriores, Se observa la fluorescencia de las células hibridadas con las dos sondas.

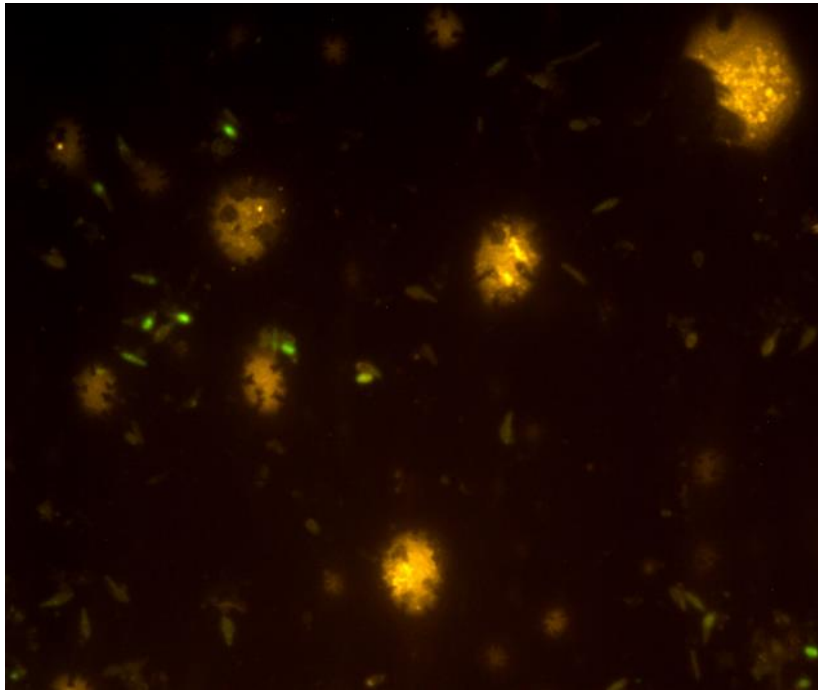


Figura 8: muestra 6 observada con la emisión de fluorescencia verde de la sonda AUB

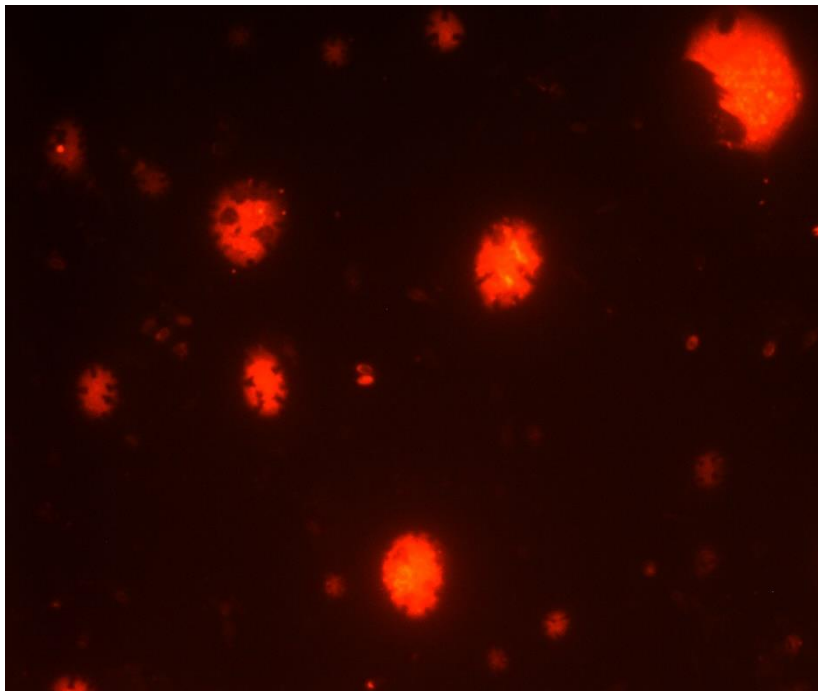


Figura 9: muestra 6 observada con la emisión de fluorescencia roja de la sonda específica

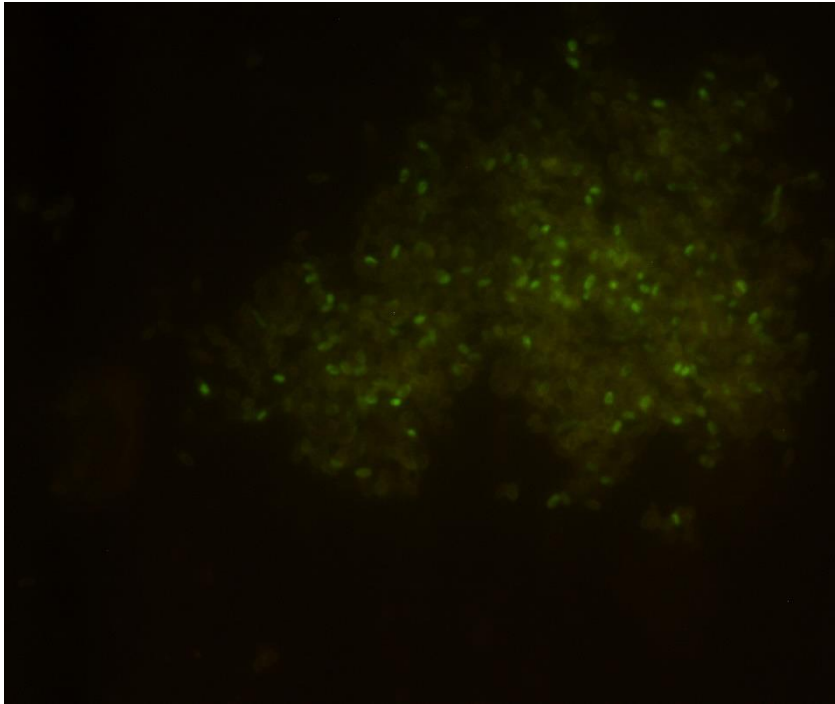


Figura 10: muestra 11 observada con la emisión de fluorescencia verde de la sonda AUB

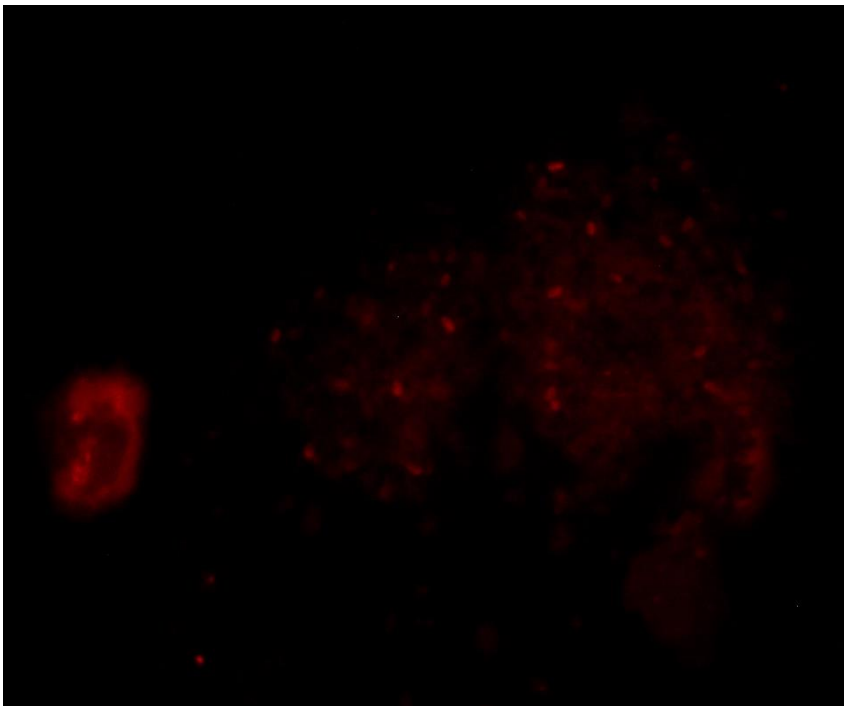


Figura 11: muestra 11 observada con la emisión de fluorescencia rojo de la sonda específica

3. Discusión de resultados

3.1. Microbiología clásica

El método IFU ha resultado ser bastante fiable, selectivo y reproducible, que junto con el test guayacol han conseguido una detección clara y sencilla de la presencia de *Alicyclobacillus acidoterrestris*. El mayor inconveniente es el tiempo medio de detección del microorganismo, el cual se tarda unos 10 días aproximadamente (4 de incubación, 5 días de cultivo y 1 día para el test del guayacol). Este tiempo excesivo hace que se convierta en una técnica no muy conveniente desde el punto de vista de la industria alimentaria, puesto que la mayoría de las empresas tienen una producción en continuo y una detección tan lenta les puede ocasionar pérdidas económicas importantes.

3.2. FISH

La identificación de microorganismos mediante métodos moleculares se ha vuelto cada vez más popular en aspectos de calidad y seguridad, y en la producción de alimentos, debido a que estas técnicas son reproducibles, muy sensibles, y sobre todo rápidas. El auge de este tipo de técnicas diagnósticas alternativas se ha sustentado principalmente en los problemas que presentan los métodos microbiológicos tradicionales como por ejemplo la lentitud del crecimiento de algunas bacterias, la existencia de distintos perfiles bioquímicos compatibles con varios microorganismos y la localización intracelular de algunos de ellos que dificulta su detección (Gibello *et al.*, 2001; Cunningham, 2002).

En el caso de la aplicación de la técnica FISH, ha demostrado ser una técnica efectiva y que reduce los tiempos de detección respecto a las técnicas de microbiología clásica de días a unas 12 horas máximo. Aun siendo más rápida para la detección de *Alicyclobacillus acidoterrestris* que el método IFU, en cuanto a tiempo de detección, su aplicación en la industria alimentaria presenta algunas desventajas, como la falta de protocolos estandarizados. Adicionalmente, requieren en comparación con los métodos clásicos, equipos y reactivos costosos. Esta técnica es relativamente complicada; necesita personal técnico con experiencia y utiliza productos químicos peligrosos, por lo que el análisis rutinario de muchas muestras resulta poco práctico.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- Se ha conseguido la detección de *Alicyclobacillus acidoterrestris* mediante la técnica de microbiología clásica, utilizando el método IFU en combinación con el test del guayacol, pudiendo diferenciarse de otras especies de *Alicyclobacillus no alterantes*.
- Se ha llevado a cabo el diseño de una sonda de hibridación para FISH para la detección específica de *Alicyclobacillus acidoterrestris*, a través de la base de datos del NCBI y el programa de alineamiento de secuencias BLAST.
- Se ha conseguido la detección selectiva y específica de *Alicyclobacillus acidoterrestris* mediante la técnica de hibridación in situ (FISH).
- Tanto los métodos de microbiología clásica como las técnicas de hibridación in situ han permitido la detección de la especie de interés (*Alicyclobacillus acidoterrestris*). Ambos métodos son eficaces, reproducibles y fiables, sin embargo, desde el punto de vista de la industria alimentaria, el tiempo de detección es un factor clave para la incorporación de una técnica molecular como la que se ha estudiado. En este caso, la técnica FISH se ha mostrado como una técnica de diagnóstico molecular muy precisa y que acorta los tiempos de detección de 10 días a unas 12 horas. Por lo tanto, sería una opción a tener en cuenta para su implantación de forma rutinaria en la industria, siempre y cuando se estandarizara el método.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Al-Holy, M.A., Mengshi Lin, Alhaj, O.A., Abu-Goush, M.H. (2015). Discrimination between *Bacillus* and *Alicyclobacillus* isolates in apple juice by Fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis. *Journal of Food Science* 80 (2): M399-M404.
- Amann, R.I.; Krumholz, L. and Stahl, D.A. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *Journal of Bacteriology*, February 1990, vol. 172, no. 2, p. 762-770.
- Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica. Nonradioactive in situ hybridization application manual. Mannheim 31, Germany. 72 p. 1992
- Borlinghaus, A., Engel, R. (1997). *Alicyclobacillus* incidence in commercial apple juice concentrate (AJC) - supplies-method development and validation. *Fruit Processing* 7: 262-266.
- Chang, S.S., Kang, D.H. (2004). *Alicyclobacillus* spp. in the fruit juice industry: history, characteristics, and current isolation/detection procedures. *Critical Reviews in Microbiology* 30: 55-74.
- Cunningham CO. Molecular diagnosis of fish and shellfish diseases: present status and potential use in disease control. *Aquaculture* 206: 19-55, 2002.
- Eiroa, M.N.U., Junqueira, V.C.A., Schmidt, F.L. (1999). *Alicyclobacillus* in orange juice: occurrence and heat resistance of spores. *Journal of Food Protection* 62: 883-886.
- Fuchs BM, Wallner G, Beisker W, Schwippl I, Ludwig W, Amann R. *Appl Environ Microbiol.* 1998 Dec;64(12):4973-82.
- Gibello A, Blanco M, Domínguez L y Fernández-Garayzábal J. Utilización de la PCR para el diagnóstico en ictiopatología. *Revista AquaTIC*. Nro. 15, Noviembre 2001.
- Gobbi, E., Falasconi, M., Concina, I., Mantero, G., Bianchi, F., Mattarozzi, M., Musci, M., Sberveglieri, G. (2010). Electronic nose and *Alicyclobacillus* spp. spoilage of fruit juices: An emerging diagnostic tool. *Food Control* 21 (10): 1374–1382.
- Goto, K., Mochida, K., Kato, Y., Asahara, M., Ozawa, C., Kasai, H., Yokota, A. (2006). Diversity of *Alicyclobacillus* isolated from fruit juices and their raw materials, and emended description of *Alicyclobacillus acidocaldarius*. *Microbiological Culture Collections* 22: 1-14.
- Hartyani, P., Dalmadi, I., Knorr, D. (2013). Electronic nose investigation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* inoculated apple and orange juice treated by high hydrostatic pressure. *Food Control* 32 (1): 262-269.

- Henczka, M., Djas, M., Filipek, K. (2013). Optimisation of a direct plating method for the detection and enumeration of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores. *Journal of Microbiological Methods* 92: 1-8.
- Hill M., Witsenboer H., Zabeau M., Vos P., Kesseli R., Michelmore R. (1996). PCR-based finger printing using AFLP as a tool for studying genetic relationships in *Lettuca* spp. *Theoretical and Applied Genetics* 93: 1202–1210
- Jay, J.M., Loessner, M.J., Golden, D.A. (2005a). Food protection with high temperatures, and characteristics of thermophilic microorganism, 7th ed. *Modern Food Microbiology*. Springer Science + Business Media, Inc., New York: 415-441.
- Jensen, N. (2000). *Alicyclobacillus* in Australia. *Foods Australia* 52: 282-285.
- Jianke, L., Kai, X., Chaozhou, Y. (2013). Detection of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice concentrate by enzyme-linked immunosorbent assay. *Food Control* 30 (1): 251-254.
- Jianke L, Ruirui H., Kai X., Liu L. (2014). Double antibodies sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice concentrate. *Food Control* 40: 172-176.
- Luque J y Herraes A. *Biología molecular e ingeniería genética. Conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud*. Hardcourt, 2001.
- Motohiro, N., Hiroko, S. (1994). Selective culture medium for detecting thermotolerant acid-fast bacillus and its detection. Patent application number 06-283459, Japanese Patent Office.
- Orr, R.V., Beuchat, L.R. (2000). Efficacy of disinfectants in killing spores of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and performance of media for supporting colony development by survivors. *Journal of Food Protection* 63: 1117-1122.
- Peleg. H., Naim, M., Zehavi, J., Rouseff, R.L., Nagy, S. (1992). Pathways of 4-vinylguaiacol formation from ferulic acid in model solutions of orange juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 40(5): 764-767.
- Pettipher, G.L. Osmudson, M.E., Murphy, J.M. (1997). Methods for the detection and enumeration of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and investigation of growth and production of taint in fruit juice and fruit juice-containing drinks. *Letters in Applied Microbiology* 24: 185-189.
- Porralla, K., König W.A. (1983). The occurrence of ω -cycloheptane fatty acids in a thermoacidophilic bacillus. *FEMS Microbiology Letters* 16: 303-306.

- Walls, I., Chuyate, R. (1998). Alicyclobacillus – Historical perspective and preliminary characterization study. Dairy, Food and Environmental Sanitation 18: 499-503.
- Splittstoesser, D.F., Churey, J.J., Lee, C.Y. (1994). Growth characteristics of aciduric sporeforming bacilli isolated from fruit juices. Journal Food of Protection 57: 1080-1083.
- Yamazaki, K., Murakami, M., Kawai, Y., Inoue, N., Matsuda, T. (2000). Use of nisin for inhibition of Alicyclobacillus acidoterrestris in acidic drinks. Food Microbiology 17: 315-320.
- Walls, I., Chuyate, R. (1998). Alicyclobacillus – Historical perspective and preliminary characterization study. Dairy, Food and Environmental Sanitation 18: 499-503.
- Walls, I., Chuyate, R. (2000). Isolation of Alicyclobacillus acidoterrestris from fruit juices. Journal of AOAC International 83: 1115-1120.
- Walls, I., Chuyate, R. (2000). Spoilage of fruit juices by Alicyclobacillus acidoterrestris. Food Austria 52: 286-288.
- Yokota, A., Fujii, T., Goto, K. (2007). Alicyclobacillus: Thermophilic Acidophilic Bacilli, parameters for detection of Alicyclobacillus and test methods. Springer Science + Business Media, Shinano Inc., Japan: 49-78.
- Zhouli, W., Tianli, Y., Yahong, Y., Rui, C., Caixia, G., Xin. W., Chen, N. (2012). Development of polyclonal antibody-based indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of Alicyclobacillus strains in apple juice. Journal of Food Science, 77 (11): M643-M649.
- Zhouli, W., Tianli, Y., Yahong, Y., Rui, C., Chen, N., Caixia, G. (2013). Development and evaluation of an immunomagnetic separation-ELISA for the detection of Alicyclobacillus spp. in apple juice. International Journal of Food Microbiology 166(1): 28-33.

Webs consultadas:

<http://www.medioscultivo.com/bat-alicyclobacillus-agar-2/> - FOTO AGAR BAT