



Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.

**RECUPERACIÓN DE *Alicyclobacillus* spp. EN JUGO DE
NARANJA Y MUESTRAS AMBIENTALES POR TÉCNICAS
MICROBIOLÓGICAS E IDENTIFICACIÓN POR REACCIÓN
EN CADENA DE LA POLIMERASA**

Por:

Melvin Roberto Tapia Rodríguez

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

Hermosillo, Sonora

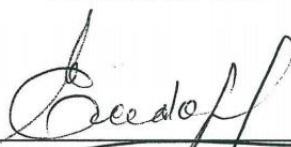
Octubre del 2013

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis del LTA Melvin Roberto Tapia Rodríguez la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



Dra. Verónica Mata Haro
Directora de Tesis



Dra. Evelia Acedo Félix
Asesor



Dra. María Auxiliadora Islas Osuna
Asesor



Dra. Gabriela Ramos Clamont Montfort
Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca brindada durante la realización de este trabajo de maestría.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), principalmente a la Coordinación de Ciencia de los Alimentos por aceptarme y permitirme realizar mis estudios de posgrado.

A la Coordinación de Posgrados Académicos, en especial a la Dra. Gloria Yépiz Plascencia, gracias por las atenciones brindadas durante mis estudios de maestría.

A mi directora de tesis la Dra. Verónica Mata Haro. Por haberme aceptado en su grupo de trabajo y tenerme una enorme paciencia desde el primer día que ingrese a su laboratorio. Le agradezco infinitamente haber confiado en mí teniendo siempre tiempo y comprensión cada vez que le planteaba mis dudas.

A mi comité de tesis: Dra. Mary Islas, Dra. Evelia Acedo y Dra. Gaby Ramos, muchas gracias por todas las asesorías dentro y fuera del salón de clases. Gracias por su disponibilidad para ayudarme durante mis estudios.

A la M.C. Leticia Félix Valenzuela, muchas gracias por toda tu ayuda en el laboratorio, gracias por compartir tantos conocimientos y experiencias conmigo, te estaré eternamente agradecido por toda la disponibilidad y paciencia que tuviste para ayudarme soportando mis inquietudes a lo largo de este trabajo de maestría.

A mis compañeras de laboratorio, M.C. Anna Gonzáles Rascón y M.C. Marina Arenas Padilla, gracias por brindarme buenos momentos dentro y fuera de CIAD desde el inicio de mi maestría, gracias por ayudarme cuando las necesite durante esta etapa.

A los miembros del laboratorio de Microbiología y del laboratorio de Inmunología. Por las facilidades brindadas durante la realización de estos experimentos.

A mis compañeros de maestría que estuvieron en las buenas y en las malas durante todos esos momentos de estrés que se presentaron cada parcial, exposición, cartel, propuesta, seminarios, etc. En especial a Víctor Quintana, muchas gracias por tu amistad y hacer más agradable mi estancia en CIAD.

Al M.C. Gustavo Velderrain, gracias por soportarme a lo largo de toda este tiempo, muchas gracias por estar ahí y brindarme tu amistad desde que estábamos en la universidad.

A mis inolvidables amigos: Ana Lucia, Karen, Betty, Maye, Pato, Robert, Paco, Orlando y Sergio muchas gracias por estar al pendiente de un servidor, aunque sea a la distancia, los estimo demasiado y agradezco bastante tenerlos en mi vida. En especial a Abel Pérez, gracias por ser mi amigo y demostrar que poco importa en qué ciudad te encuentres, siempre estarás ahí y por último, pero no menos importante a Clarissa Espinoza definitivamente eres una de las personas a las que más les agradezco estar ahí siempre cuando te necesito muchas gracias.

A todas las personas que me ayudaron durante esta etapa, desde que inicie mis estudios de maestría hasta el momento en que termine mi trabajo, gracias.

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo principalmente a mis padres, a mi papa Roberto Tapia Chan y a mi mama Gloria Rodríguez Navarro, son lo mejor que me ha pasado en la vida, cada día agradezco tenerlos en mi vida, ustedes me hacen mejor persona y no hay palabras que describan lo orgulloso que estoy de ser su hijo, los quiero.

A mi hermana Miriam Tapia, desde que tengo uso de razón siempre has estado ahí cada que te necesito dándome tu apoyo y consejo. Muchas gracias por toda la compañía durante todo lo que hemos vivido juntos y por traer contigo a esos dos niños, mis sobrinos Luis Fernando y María Fernanda, que realmente día a día con sus acciones me motivan para salir adelante.

A mi tía Xóchitl López, está de más decirte que todo este logro no se hubiera podido concretar sin tu ayuda, realmente gracias por estar siempre pendiente de un servidor durante toda esta etapa y apoyarme en las decisiones que he ido tomando.

Finalmente esto va dedicado a los demás miembros de mi familia de la cual estoy muy orgulloso de formar parte, siempre los tengo presentes aunque no coincidamos seguido, hago una dedicatoria especial a mi abuelita Genoveva Navarro, donde quiera que estés, yo sé que estarás orgullosa de tu nieto y que me sigues cuidando, siempre llevare tu recuerdo conmigo.

CONTENIDO

	Página
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABLAS	x
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT	xiii
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	3
Deterioro de los Alimentos.....	3
Microorganismos Deteriorativos.....	3
Bacterias acidotermófilas	4
<i>Alicyclobacillus</i> spp	5
Guayacol.....	7
Esporas.....	8
Patogenicidad	9
Pasteurización	9
Aspectos Regulatorios Sobre la Presencia de <i>Alicyclobacillus</i> en Alimentos	10
Protocolos Propuestos para la Detección de <i>Alicyclobacillus</i> spp.....	11
HIPÓTESIS.....	13
OBJETIVO GENERAL	14
Objetivos Específicos.....	14
MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
Cepas de <i>Alicyclobacillus</i>	15
Técnicas Microbiológicas para Detectar <i>Alicyclobacillus</i>	15
Selección de medios de cultivo.....	15
Tinción Gram.....	17
Prueba de catalasa.....	17
Prueba de oxidasa	17
Fermentación de carbohidratos.....	18
Detección Molecular por PCR de Punto Final.....	21
Extracción del ADN genómico.....	21
Condiciones de PCR de punto final para identificar <i>Alicyclobacillus</i> spp.....	21
Detección de <i>Alicyclobacillus</i> en Muestras Ambientales.....	22
Muestras ambientales.....	22
Análisis de muestras ambientales de suelo superficial de huertos de naranjas para aislar e identificar <i>Alicyclobacillus</i> spp.....	23
Análisis de muestras de agua de lavado de superficies de naranjas para aislar e identificar al <i>Alicyclobacillus</i> spp.....	23

CONTENIDO (Continuación)

	Página
Recuperación de <i>Alicyclobacillus</i> en Muestras de Jugo de Naranja Bajo Condiciones de Pasteurización.....	24
Análisis Estadístico.....	26
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
Análisis para Identificar <i>Alicyclobacillus</i> por Técnicas Microbiológicas y PCR.....	27
Selección de medio de cultivo idóneo para aislar <i>Alicyclobacillus</i>	27
Identificación bioquímica para diferenciar especies <i>Alicyclobacillus</i>	29
Detección molecular de <i>Alicyclobacillus</i> por PCR de punto final.....	34
Aislamiento e Identificación de <i>Alicyclobacillus</i> en Muestras Ambientales de Suelo y Agua de Lavado de Superficie de Naranjas.....	36
Recuperación de <i>Alicyclobacillus</i> en jugo de naranja bajo condiciones de pasteurización.....	36
Método Propuesto para la Identificación de <i>Alicyclobacillus</i> spp.	39
CONCLUSIÓN	40
RECOMENDACIONES	41
BIBLIOGRAFÍA	42

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Estructuras de ácidos grasos ω alicíclicos presentes en <i>B. acidocaldarius</i> ..	5
2.	Síntesis de guayacol a partir de vainillina.....	7
3.	Fotografía de esporas de <i>A. acidoterrestris</i>	8
4.	Esquema de una prueba de fermentación miniaturizada en microplaca para diferenciar especies de <i>Alicyclobacillus</i>	19
5.	Procedimiento para evaluar recuperación de <i>Alicyclobacillus</i> spp. en muestras de jugo de naranja.....	25
6.	Crecimiento comparativo de <i>A. acidoterrestris</i> ATCC® 49025 en agar YSG y BAT, pH 4 a 45°C por 72 horas.....	28
7.	Tinción Gram de <i>A. acidocaldarius</i> a las 24 y 72 horas.....	30
8.	Prueba de la oxidasa de <i>Alicyclobacillus</i>	31
9.	Pruebas de medio BAM con azul de bromofenol para diferenciar especies de <i>Alicyclobacillus</i>	33
10.	Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% de reacciones de PCR de cepas control para determinar especificidad de los iniciadores.....	35
11.	Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% para determinar el límite de detección de <i>Alicyclobacillus</i> por PCR de punto final.....	35
12.	Porcentaje de recuperación de <i>Alicyclobacillus</i> en jugo de naranja con respecto a los efectos de pasteurización.....	38
13.	Esquema general del método propuesto para la detección de <i>Alicyclobacillus</i>	39

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1.	Medios de cultivo utilizados para aislar <i>Alicyclobacillus</i> spp.....	16
2.	Características diferenciales de algunas especies conocidas del género <i>Alicyclobacillus</i> por fermentación de carbohidratos.....	20
3.	Crecimiento de <i>Alicyclobacillus</i> en distintos medios de cultivo.....	28
4.	Resultados de pruebas de identificación para <i>Alicyclobacillus</i>	29
5.	Medios de cultivo e indicadores de pH utilizados para pruebas bioquímicas para distinguir especies de <i>Alicyclobacillus</i>	32
6.	Resultados de identificación bioquímica de cepas de referencia de <i>Alicyclobacillus</i>	34

RESUMEN

A principios de la década de los ochentas en la industria productora de jugos de fruta se detectaron alteraciones durante la elaboración del producto, ocasionadas por bacterias del género *Alicyclobacillus*. Estos microorganismos esporoformadores, termófilos y acidorresistentes, no son patógenos para el humano. En productos contaminados con estas bacterias, se ha detectado que algunas de sus especies sintetizan el metabolito guayacol que altera las propiedades organolépticas de los jugos, provocando el rechazo por parte de los consumidores, provocando pérdidas económicas. En la actualidad no hay una normatividad, que considere la detección de estas bacterias y México no cuenta con un protocolo para laboratorios de control de calidad alimentaria para detectar la presencia de estas bacterias. El objetivo de este trabajo fue establecer un protocolo microbiológico y molecular para identificar *Alicyclobacillus* spp., además de evaluar su recuperación en jugo de naranja bajo condiciones de pasteurización y aislamiento de muestras ambientales. Se utilizaron las cepas de referencia *A. acidoterrestris* ATCC® 49025 y *A. acidocaldarius* ATCC® 43030 para establecer condiciones de cultivo e identificación. Se probaron los agares extracto de levadura-almidón-glucosa (YSG), papa-dextrosa acidificado (APDA) y agar para bacterias ácido-termófilas (BAT), con el fin de encontrar el medio idóneo para su aislamiento. Para la identificación por pruebas bioquímicas se buscó el medio de cultivo base en conjunto con un indicador de pH apropiado para poder realizar diferenciación por fermentación de carbohidratos. La detección molecular, se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en punto final, con iniciadores previamente reportados. Por otro lado, se realizaron ensayos inoculando jugos de naranja para evaluar la recuperación de las cepas bajo condiciones de pasteurización y proponer un protocolo de aislamiento. Además, para buscar la presencia de *Alicyclobacillus* en muestras ambientales, se analizó suelo superficial proveniente de huertos de naranjas, así como también agua de lavado de las superficies de las naranjas. Se encontró que el medio que produjo mejores resultados para el aislamiento, fue el agar BAT ya que se obtuvo un

mayor número de colonias grandes y uniformes. Para las pruebas bioquímicas se encontró que en el medio BAM con azul de bromofenol se puede observar la fermentación de carbohidratos. La PCR de punto final tuvo un límite de detección establecido de 4 esporas/mL en jugos de naranja inoculados con las cepas de referencia. Se realizaron ensayos de recuperación de *A. acidoterrestris* y *A. acidocaldarius*, en muestras de jugo de naranja, el tipo de cepa y los tratamientos tuvieron diferencias significativas ($p < 0.05$). Se observó que los porcentajes de recuperación son diferentes estadísticamente en la recuperación de *A. acidoterrestris* bajo condiciones de pasteurización respecto a los otros tratamientos. Finalmente en las muestras ambientales de suelo y agua de lavado de la superficie de naranjas analizadas no se encontró la presencia de *Alicyclobacillus*. Se logró implementar un protocolo microbiológico para el aislamiento de *Alicyclobacillus*, además de poder aplicar las pruebas bioquímicas para diferenciación entre especies. Igualmente, se pudo aplicar un protocolo molecular para una detección más rápida y en un menor tiempo, comparado con las técnicas microbiológicas habituales. Posteriormente se logró evaluar la recuperación en muestras de jugo de naranja. En el caso de las muestras ambientales, en suelo superficial y agua de lavado de superficie de naranjas, se reportó ausencia en todas las muestras analizadas.

Palabras clave: *Alicyclobacillus* spp., *A. acidocaldarius*, *A. acidoterrestris*, jugos de fruta, guayacol, pruebas bioquímicas, PCR.

ABSTRACT

In the early eighties it was observed that during the production of fruit juices there were reported cases of food alterations caused by a microorganism called *Alicyclobacillus*. These sporulated bacteria are thermophilic, acid-resistant, and non-pathogenic for humans; however, some species have the capacity to synthesize a metabolite called guaiacol which alters the organoleptic properties of the juices, causing rejection by consumers and subsequent economic loss. Currently in Mexico there is not a protocol for food quality control laboratories to detect the incidence for these bacteria. The objective of this work was to establish a microbiological and molecular protocol for identifying *Alicyclobacillus* spp., in samples of orange juice, wash water and soil. Reference strains *A. acidoterrestris* ATCC 49025 and *A. acidocaldarius* ATCC 43030 were used to establish culture conditions and identification. Bacteria were tested in several agars, such as YSG, APDA and BAT in order to find the most suitable for isolation. For the identification by biochemical tests, a medium was sought altogether with a pH indicator appropriate to perform differentiation by fermentation of carbohydrates. Endpoint PCR was performed for the molecular detection with primers previously reported in literature. Furthermore, tests were made by inoculating orange juice to evaluate the recovery of the strains under conditions of pasteurization. Moreover, to search for the presence of *Alicyclobacillus* in environmental samples, topsoil from oranges of orchards were analyzed, as well as wash water from the surfaces of the oranges. The selected medium for isolation was BAT agar, because the colonies obtained were more abundant, larger and uniform, due to its formulation. For biochemical tests, BAM medium supplemented with bromophenol blue was found as the best option for fermentation of carbohydrates. The endpoint PCR had a detection limit of 4 spores/mL in reference strains inoculated orange juice. On recovery tests of *A. acidoterrestris* and *A. acidocaldarius* in orange juice, it was found that the type of strain, treatments and their interaction had significant differences ($p < 0.05$), *Alicyclobacillus* was not found in environmental samples, in the topsoil

analyzed, neither on the wash water from the surface of oranges. It was possible to find the suitable conditions for the isolation of *Alicyclobacillus* in addition to apply biochemical tests for carbohydrate fermentation to differentiation of species. It was also possible to apply a molecular protocol for faster detection. Subsequently, it was proved the recovery in artificially inoculated orange juice samples. Finally the analysis of soil samples and wash water to identify this bacterium in the environment rendered no positive results.

Keywords: *Alicyclobacillus* spp., *A. acidocaldarius*, *A. acidoterrestris*, fruit juices, guaiacol, biochemical tests, PCR.

INTRODUCCIÓN

El deterioro de un alimento es toda modificación que lo aleja de ser apropiado para el consumo humano. Por lo general, los microorganismos que lo producen no necesariamente son nocivos para la salud, más bien, modifican las características organolépticas del alimento, disminuyendo la calidad esperada por lo que no son del agrado del consumidor (Gutiérrez, 2000). La industria alimentaria ha implementado diferentes procesos, a fin de controlar a estos microorganismos, disminuyendo la probabilidad de encontrar lotes de producción con alteración y alimentos de mala calidad (Forsythe *et al.*, 2000).

El contenido de nutrientes, la humedad y la actividad de agua, se encuentran entre los factores intrínsecos que hacen a un alimento perecedero. Los principales agentes causales de su deterioro son los distintos microorganismos (bacterias, mohos y levaduras). Algunos de ellos forman parte de la microbiota del alimento y otros se encuentran en el ambiente al que están expuestos durante las diferentes etapas de su obtención y procesamiento (Doyle *et al.*, 2001). A nivel mundial, las alteraciones microbianas durante el procesamiento ocasionan pérdidas económicas hasta de un 25% de su producción. Éstas afectan tanto a los industriales así como a los proveedores y consumidores de los alimentos (Forsythe *et al.*, 2002).

Por otro lado existe la tendencia en la producción de alimentos y en las preferencias del consumidor, en comprar productos lo más naturales posibles, es decir, sin aditivos y que por su proceso de envasado conserven la calidad del producto. En el caso particular de los concentrados y jugos de fruta envasados sin conservadores, el deterioro microbiano de la calidad se atribuye principalmente a bacterias. Se considera que la aplicación de tratamientos

térmicos como la pasteurización, suelen ser una forma eficaz del control a estos agentes biológicos (Jay, 2000). No obstante, las malas prácticas de fabricación, principalmente en productos cuya línea de producción incluye etapas de manipulación o de procesamiento posteriores al tratamiento térmico, pueden facilitar una contaminación cruzada o la incorporación de microorganismos de origen ambiental (Madigan *et al.*, 2004).

A principios de la década de los ochentas se observó en la industria productora de jugos de frutas que durante la elaboración de producto se reportaron casos de contaminación microbiana por *Alicyclobacillus spp.* Esta bacteria esporulada no es patógena para el humano, pero tiene la capacidad de sintetizar un metabolito llamado guayacol que altera las características organolépticas del jugo confiriéndole mal sabor y un olor desagradable que ocasiona el rechazo del consumidor. Además, estas bacterias pueden sobrevivir a procesos de pasteurización comercial (Lima *et al.*, 2009). Por otro lado, la detección de *Alicyclobacillus* no está contemplada en las Normas Oficiales Mexicanas por lo que no existe en la actualidad un protocolo de aislamiento y detección microbiológica en la industria de alimentos. Por este motivo surge la necesidad de determinar la presencia de esta bacteria mediante herramientas microbiológicas y moleculares para su posible aplicación en las áreas de la industria alimentaria. Este trabajo describe un método para el aislamiento, identificación bioquímica, detección molecular, la identificación en muestras ambientales y la evaluación de muestras artificialmente inoculadas de jugo de naranja bajo condiciones de pasteurización.

ANTECEDENTES

Deterioro de los Alimentos

El deterioro en los alimentos puede ocurrir por diversas causas físicas, químicas y/o biológicas, entre las que destacan las siguientes: lesiones físicas (por abrasiones, presiones, congelación, desecación); actividad enzimática de los propios alimentos y otras reacciones químicas inherentes a su composición química; al crecimiento y actividad metabólica de microorganismos (Madigan *et al.*, 2004). A menudo estas causas no actúan aisladamente, por ejemplo, las bacterias, los mohos, los insectos y la luz pueden actuar en conjunto para deteriorar un alimento en un almacén. Igualmente, el calor, la humedad y el aire afectan tanto al desarrollo y actividad de los microorganismos deteriorativos como a la actividad química de las enzimas propias del alimento y del microorganismo (Doyle *et al.*, 2001).

Microorganismos Deteriorativos

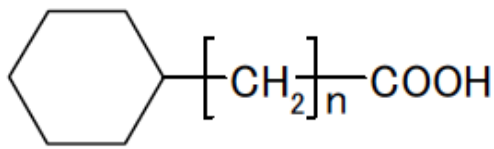
La actividad de los microorganismos deteriorativos produce cambios en las características organolépticas esperadas de un alimento; es decir, afectan las cualidades detectables por los sentidos como: apariencia, olor o sabor, haciéndolos inaceptables para su consumo. Un alimento alterado no siempre presenta riesgos a la salud. Sin embargo, este tipo de alimentos se consideran no aptos para consumo y por lo consiguiente no pueden ser distribuidos. La alteración de los alimentos por microorganismos es un problema en todo el

mundo y en muchas ocasiones se debe al crecimiento no deseado de microorganismos que durante su desarrollo, producen ciertos compuestos aromáticos volátiles detectables por los sentidos del gusto y del olfato (Forsythe, 2002).

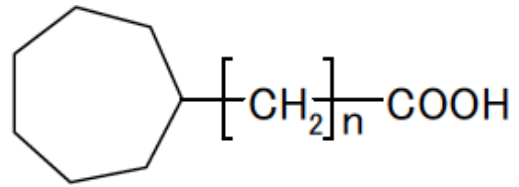
Estos microorganismos pueden desarrollarse bajo distintas condiciones ambientales tales como temperatura, pH, humedad, oxígeno, etc. Durante la producción de alimentos algunos de los microorganismos que más se presentan son los termófilos. En este grupo se incluyen las bacterias termófilas que tienen la capacidad de resistir temperaturas relativamente altas de 60 a 85°C, y algunas esporas perduran aún después de los procesos de limpieza y desinfección de equipos, por lo que es necesario controlar su presencia durante toda la línea de producción de los alimentos para evitar contaminación por bacterias deteriorativas (Evancho & Walls, 2001).

Bacterias acidotermófilas

En 1967 se reportó el aislamiento de un tipo de bacteria esporulada encontrada en una fuente termal en el lago Tazawa en Japón que tuvo la capacidad de crecer bajo condiciones ácidas y geotermales similares a las de *Bacillus coagulans* (Uchino & Doi, 1967). Después, en 1971 se lograron aislar 14 bacterias acidotermófilas en Hawái, dichos aislados pudieron crecer en un ambiente ácido a temperaturas elevadas, siendo clasificados como una nueva especie llamada *B. acidocaldarius* (Darland & Brock, 1971). Además de tener gran parecido con la primera bacteria aislada en Japón, se descubrió que estos microorganismos poseían gran cantidad de ácidos grasos omega-alicíclicos (Figura 1) en su estructura de membrana siendo estos los que les permitían resistir altas temperaturas en el medio ambiente (Walls & Chuyate, 1998).



Ácido graso- ω -ciclohexil



Ácido graso- ω -cicloheptil

Figura 1. Estructuras de ácidos grasos ω alicíclicos presentes en *B. acidocaldarius* (Adaptada de Yokota *et al.*, 2007).

***Alicyclobacillus* spp.**

A inicios de la década de los ochentas en Alemania se aisló del suelo una bacteria acidotermófila que formaba esporas (Hippchen *et al.*, 1981). Más tarde, esa misma bacteria se estudió a detalle por otro grupo de trabajo y se propuso una nueva especie llamada *B. acidoterrestris* (Cerny *et al.*, 1984). Finalmente en 1982 se reportó un caso de deterioro en una gran producción de jugo de manzana el cual se relacionó con *B. acidocaldarius*. Tras varias investigaciones taxonómicas, en 1992 se lograron resaltar las similitudes de un 92% en las secuencias de la región 16S del RNA ribosomal de estos bacilos termófilos y las diferencias respecto a otras especies, se estableció un nuevo género bacteriano llamado *Alicyclobacillus* compuesto por tres especies: *A. acidocaldarius*, *A. acidoterrestris* y *A. cycloheptanicus* (Wisotzkey *et al.*, 1992). Este género mostró características muy distintas a las de otros bacilos como sus temperaturas de crecimiento y el pH al que se desarrollaban, por ello su reclasificación como un nuevo género (Walls & Chuyate, 1998). Además, se consideran bacterias únicas por el contenido de ácidos grasos omega alicíclicos como mayor componente de membrana lipídica, ya que estos fosfolípidos mantienen estable a la bacteria cuando su ambiente se encuentre a temperaturas elevadas o condiciones de pH muy bajas (Kannenberg *et al.*, 1984).

Posteriormente en Alemania surgió un reporte de alteraciones en una producción de jugo de manzana. Este fue el primer incidente en el que se reportó deterioro causado por *Alicyclobacillus*, los autores de esta investigación detectaron alteraciones de mal olor en las muestras contaminadas y se demostró que era causado por estos microorganismos (Cerny *et al.*, 1984). Por otro lado, en Australia, fueron encontrados olores desagradables en lotes de producción de jugo de manzana, en donde fueron detectados compuestos aromáticos como: guayacol, 2-6 dibromofenol y 2-6 diclorofenol. Se confirmó que la alteración no fue causada por ningún aditivo ni conservador adicionado sino por contaminación microbiana por *Alicyclobacillus* spp (Goldberg, 2002).

En EUA y Japón se presentaron incidentes con estas bacterias en 1994; se informó que una bacteria ácido-termófila fue aislada de jugos de fruta pasteurizados (Yamazaki *et al.*, 1996). A partir de entonces, la investigación sobre el aislamiento, caracterización, metodología de detección y control, surgió como motivo de preocupación debido a los numerosos informes que se han ido publicando (Duong & Jensen, 2000).

Actualmente el género *Alicyclobacillus* está formado por un grupo de bacterias termófilas, acidorresistentes, esporuladas con forma de bacilo (3 - 5 μm de largo x 0.7 - 1.0 μm de ancho), Gram positivas, aerobias estrictas, con temperaturas de crecimiento, dependiendo de la especie, que oscilan entre 20°-70°C, con rangos óptimos entre 40°-60° C (Chang & Kang, 2004). Estas bacterias pueden aislarse de una gran variedad de fuentes tales como suelo, aguas termales, hojas herbales y jugos de fruta (Goto *et al.*, 2008). Los microorganismos del género no crecen bien a temperaturas inferiores de 20°C y crecen en un rango de pH de 2 a 7, mientras que las esporas germinan en un pH entre 2 y 6 (Evangelia *et al.*, 1999).

Guayacol

Algunas de las especies de *Alicyclobacillus* se les relacionan con olores desagradables debido a la producción de compuestos aromáticos no deseados, causando deterioro de la calidad de las bebidas ácidas. El guayacol es el principal compuesto químico responsable de deteriorar y modificar los aspectos organolépticos de los jugos de fruta (Gocmen *et al*, 2005).

El mal sabor causado por la síntesis del guayacol está relacionado con la conversión de vainillina en este metabolito como se muestra en la Figura 2, y esto es causado por procesos de oxidación que pueden realizar las actividades enzimáticas de algunas cepas de *Alicyclobacillus*.

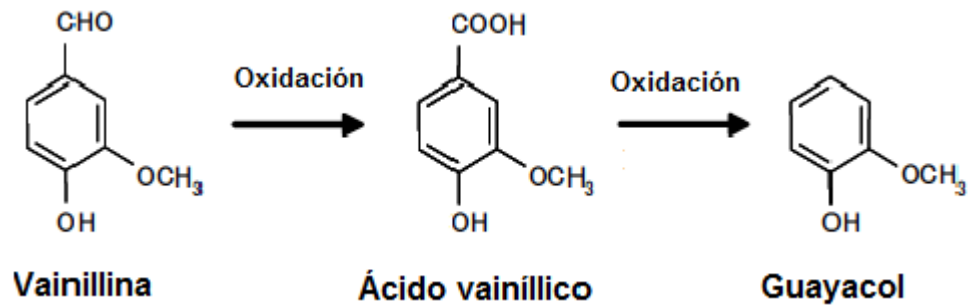


Figura 2. Síntesis de guayacol a partir de vainillina (Adaptada de Goto *et al.*, 2008).

El guayacol tiene un olor medicinal ácido y característico. Es posible detectar su presencia en concentraciones muy bajas debido a que el umbral de detección sensorial es extremadamente bajo. La cantidad de guayacol detectado en jugo contaminado con *Alicyclobacillus*, varía de 0.001 a aproximadamente 0.002 g/L, dependiendo de las diferencias entre las cepas y las condiciones de crecimiento. Principalmente los incidentes en la industria de jugos de fruta están relacionados con la especie *A. acidoterrestris* (Peleg *et al.*, 1992).

Esporas

Alicyclobacillus es aerobio estricto y si las condiciones ambientales de cultivo tienen un nivel bajo de oxígeno disuelto, o estrés térmico, la bacteria no continuará su crecimiento. Como protección al medio las células vegetativas esporularán (Figura 3) (Cerny *et al.*, 2000). Una vez formadas las esporas aumenta la dificultad para controlar la presencia de estas bacterias en la industria, ello debido a que sobreviven a la temperatura de pasteurización pudiendo germinar posteriormente cuando las condiciones del medio sean favorables. Comparando la resistencia al calor de las esporas con respecto a las de *B. stearothermophilus*, esta es similar. Sin embargo, estas últimas no pueden germinar en alimentos ácidos por lo que *Alicyclobacillus* es la única bacteria capaz de sobrevivir a pasteurización en alimentos ácidos (Goto *et al.*, 2008).

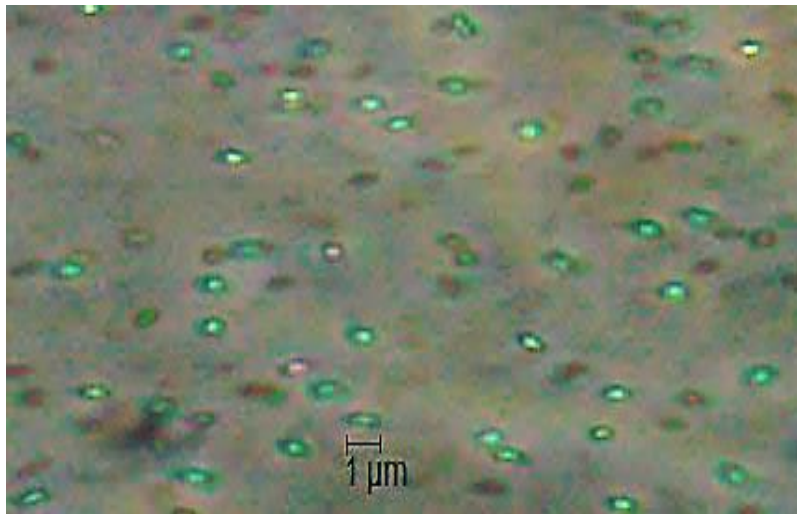


Figura 3. Fotografía de esporas de *A. acidoterrestris*, imagen tomada por microscopía óptica con contraste de fases con aumento 40x. Imagen tomada en el Laboratorio de Microbiología e Inmunología.

Patogenicidad

Los estudios para descartar la patogenicidad de las especies de *Alicyclobacillus* que contaminan alimentos se han realizado en modelos murinos. En un estudio por Walls & Chuyate en 2000 se probó la toxicidad por dos diferentes bioensayos, el primero consistió en inyectar ratones con células vegetativas de *A. acidoterrestris* y *A. acidocaldarius*. El otro ensayo consistió en alimentar cobayos con jugo de manzana inoculado con *A. acidoterrestris*. No se encontraron signos de toxicidad en ninguno de los ensayos. Aunque existan diferencias en la fisiología de humanos y estos modelos de estudio, se consideró que hay poco riesgo a la salud con el consumo de jugos contaminados con *Alicyclobacillus*.

Pasteurización

La pasteurización, definida por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos como un proceso térmico o combinación del mismo, que se aplica a los alimentos para reducir las células vegetativas y esporas de microorganismos resistentes que puedan afectar a la salud pública. El proceso debe ser efectivo de tal manera que reduzca el riesgo bajo condiciones normales de distribución y almacenamiento del alimento (Silva & Gibbs, 2009).

La pasteurización es uno de los métodos más antiguo para el control de la contaminación microbiana en los alimentos. Sin embargo, las bacterias del género *Alicyclobacillus* sobreviven a este proceso. Con este método se inactivan la mayor parte de las formas vegetativas de los microorganismos, pero no sus formas esporuladas (Pinhatti *et al.*, 1997). Por las características de los jugos de fruta, se asume que cuanto mayor es la acidez de los alimentos, menor será el riesgo de alteración microbiana. Sin embargo, las esporas de estas bacterias después de los tratamientos térmicos se activarán y ocasionarán el deterioro en el alimento. Por lo que se necesita aplicar buenas

prácticas de manufactura (BPM) para llevar a cabo un proceso de envasado aséptico para cumplir con las condiciones demandantes del mercado y reducir pérdidas por contaminación microbiana (Yokota *et al.*, 2007).

Aspectos Regulatorios Sobre la Presencia de *Alicyclobacillus* en Alimentos

Se han formado varios grupos de trabajo en la Unión Europea, Japón, Australia, entre otros, con el propósito de controlar su presencia y reducir los daños causados por estas bacterias alterantes e innovar con investigaciones que informen la situación respecto a estos agentes contaminantes. Debido a que este microorganismo no produce gas, en muchas ocasiones la degradación en un producto es detectada por el consumidor en el final de la cadena alimentaria, dando como resultados quejas en el consumidor, el retiro del producto contaminado y pérdidas económicas posteriores (IFU, 2004).

La Comunidad Económica Europea exige a sus productores, que las bebidas hechas a base de frutas frescas se produzcan bajo condiciones higiénicas y obliga a los operadores alimentarios a aplicar los principios de un análisis de riesgos y control de puntos críticos (HACCP, de las siglas en inglés Hazard Analysis and Critical Control Points), para garantizar la calidad de los alimentos. También se obliga a los operadores alimentarios a implementar métodos para minimizar la contaminación de la fruta destinada a la producción de jugo durante su cultivo, cosecha, almacenamiento, procesamiento y transporte durante su destino de consumo (Splittstoesser *et al.*, 1998).

La Asociación Europea de Jugos de Frutas (AIJN) condujo un estudio en el año 2005, reuniendo participantes de varias áreas de la industria del procesamiento de frutas, incluyendo productores, enlatadores, y empacadores. Los fabricantes reportaron que más del 35% de los jugos tuvieron alteraciones relacionadas con *Alicyclobacillus* registrando más de tres incidentes cada uno, aquellos con experiencia en el deterioro de producto los reportaron como incidentes graves.

Los problemas ocurrían principalmente en la línea de producción (Steyn *et al.*, 2011).

Con respecto a microorganismos deteriorativos en jugos o concentrados de frutas, la legislación mexicana no establece normas específicas para su presencia, ya que ésta solo esta solo hace énfasis en ciertos patógenos y en el límite de organismos mesófilos aerobios (NOM-120-SSA1-1994). Sin embargo, también es importante considerar a *Alicyclobacillus*, ya que estos se asocian con la vida útil y alteración de los alimentos, especialmente los envasados asépticamente.

Por lo tanto, las industrias y productores de distintos países han ido determinando sus propias metodologías para controlar estos microorganismos (Yoneda, 2003). La Federación Internacional de Productores de Jugos de Fruta (IFU, por sus siglas en inglés) reconocen que estas bacterias requieren métodos de detección lo más sensibles posible. Además se necesitan establecer metodologías similares en cuanto a los medios de cultivo utilizados y las técnicas aplicadas para aislar estas bacterias, ya que las metodologías reportadas cuentan con grandes variabilidades y no se reportan resultados parecidos, sin concluir qué metodología es la más apropiada para aislar e identificar estas bacterias (IFU, 2004).

Protocolos Propuestos para la Detección de *Alicyclobacillus* spp

A la fecha hay varias técnicas propuestas para aislar e identificar *Alicyclobacillus*; sin embargo, varían mucho entre ellas. Por ejemplo en Japón se utiliza el agar extracto de levadura-almidón-azúcar (YSG), en Europa se tiene como medio de selección al agar para bacterias acidotermófilas (BAT), en Estados Unidos se usan los agares papa-dextrosa acidificado (APDA) y agar Kirin (K) (Walls & Chuyate., 2000).

La ventaja de utilizar el agar YSG, es que su composición es muy simple. Sin embargo, algunos autores no lo recomiendan ya que no es selectivo y pudieran crecer otras bacterias esporuladoras como *B. subtilis* y *B. fumaroli*. En el caso del agar K funciona para recuperar algunas especies de *Alicyclobacillus* pero no es recomendado para la especie *A. acidoterrestris* ya que no presentaba crecimiento en algunas cepas sembradas en ese medio (Murray *et al.*, 2007). Las técnicas aplicadas para el aislamiento también diferían entre ellas, ya que hay reportes con los medios mencionados anteriormente pero con distintos métodos como el vaciado en placa, sembrado en superficie y por último la técnica de filtrado por membranas (Witthuhn *et al.*, 2011).

Existen otras tecnologías para analizar la presencia de *Alicyclobacillus* en jugos de fruta como la nariz electrónica, la cual consiste de un sensor con capacidad para detectar compuestos volátiles en jugo contaminado. Sin embargo, esta técnica emergente no está totalmente optimizada para el campo de aplicación y aunque tenga mayor potencial en un futuro. Actualmente se requiere mucha inversión para establecer la especificidad de metodología de este tipo ya que maneja un equipo muy sofisticado. Por lo que las técnicas microbiológicas, presentan mayor rentabilidad y simplicidad para los productores de jugos de fruta (Gobbi *et al.*, 2010).

De hecho, no existe en México un laboratorio donde se realicen técnicas de identificación de estas bacterias. Debido a la carencia de regulación de *Alicyclobacillus* en México, y derivado de las necesidades de la industria de jugos mexicana, se deben erradicar los daños causados por estas bacterias, ya que una tercera parte de jugos y concentrados de fruta son enviados a exportación. Por lo que es necesario cumplir con las reglamentaciones por parte de los corporativos nacionales y extranjeros, entre los que destacan los países asiáticos y europeos demandando el control de este género de bacterias y asegurando la calidad microbiológica en los jugos de fruta industrializados.

HIPÓTESIS

El método diagnóstico propuesto servirá para detectar *Alicyclobacillus* spp., en muestras de jugo de naranja durante un proceso de pasteurización, así como en muestras ambientales de agua y suelo.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la recuperación de *Alicyclobacillus* spp., en jugo de naranja inoculado y muestras ambientales, por técnicas microbiológicas y moleculares.

Objetivos Específicos

1. Implementar una metodología para detección microbiológica de *Alicyclobacillus acidocaldarius* y *Alicyclobacillus acidoterrestris* por medio de pruebas bioquímicas.
2. Identificar la presencia de *Alicyclobacillus* spp., por medio de la técnica de reacción en cadena de polimerasa.
3. Evaluar la metodología para detección de *Alicyclobacillus* spp., en agua de lavado de naranjas y muestras ambientales de suelo.
4. Determinar la recuperación de *Alicyclobacillus acidocaldarius* y *Alicyclobacillus acidoterrestris* en muestras de jugo de naranja bajo condiciones de pasteurización.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas de *Alicyclobacillus*

Se utilizaron dos cepas control: *A. acidocaldarius* ATCC® 43030 y *A. acidoterrestris* ATCC® 49025. Las cepas fueron adquiridas directamente de la American Type Culture Collection, cultivándolas de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se resuspendieron en medio *Bacillus acidocaldarius* (BAM), incubándose a 50°C por 3 días. Para su conservación se les adicionó glicerol (40%) y fueron almacenadas a -80°C hasta su uso.

Técnicas Microbiológicas para Detectar *Alicyclobacillus*

Selección de medios de cultivo

Se utilizaron varios agares para determinar el medio de cultivo idóneo para el aislamiento de las bacterias: agar papa dextrosa acidificado (APDA), agar extracto de levadura almidón glucosa (YSG) y agar bacterias ácido-termófilas (BAT) (Murray *et al.*, 2007). Los cultivos se incubaron bajo las condiciones requeridas para cada medio, las cuales están especificadas en la Tabla 1. Una vez obtenidos cultivos puros se almacenaron a 4 y -20 °C, hasta su uso.

Tabla 1. Medios de cultivo utilizados para aislar *Alicyclobacillus spp.*

Medio	Formulación	Condiciones	Referencia
Agar YSG	Extracto de levadura, 2 g, glucosa, 1 g; y agar, 20 g. Llevar a 1 L y ajustar pH con HCL 1N.	pH:3.7 50°C/5 días	Goto <i>et al.</i> , 2007
Agar PDA (DIFCO™)	Extracto de papa, 4 g; dextrosa 20 g; agar, 15 g. Llevar a 1 L y ajustar pH con ácido tartárico (10%).	pH: 3.5 55°C/3 días	Witthuhn <i>et al.</i> , 2007
Agar BAT (MERCK®)	Extracto de levadura, 2 g; glucosa, 5 g; CaCl ₂ , 0.25 g; MgSO ₄ , 0.5 g; (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0.2 g; KH ₂ PO ₄ , 3 g; agar, 18 g; elementos traza [(CaCl ₂ , ZnSO ₄ , CuSO ₄ , MnSO ₄ (H ₂ O), CoCl ₂ 6(H ₂ O), Na ₂ MoO ₄ y H ₃ BO ₃)] contenidos en el medio. Llevar a 1 L y ajustar pH con H ₂ SO ₄ 1 N.	pH: 4 45°C/3-5 días	Murray <i>et al.</i> , 2007

Tinción Gram

Se preparó un frotis de la colonia fijando un minuto con cristal violeta, se lavó con agua destilada y fue cubierto con solución yodada durante un minuto. Posteriormente se enjuagó de nuevo con agua destilada, se decoloró con alcohol, se escurrió y cubrió con safranina durante 30 segundos. Se lavó y secó, para observar en microscopio (Madigan *et al.*, 2004).

Prueba de catalasa

La catalasa es una enzima que protege a las células de daño oxidativo por peróxido de hidrógeno produciendo agua + oxígeno, detectándose éste último. La prueba se realizó transfiriendo, con un asa de plástico o un palillo tomando una colonia bien aislada, a la superficie de un portaobjeto en el que se colocó una pequeña gota de agua, para homogenizar. Posteriormente se añadieron 2 gotas de peróxido de hidrógeno al 3% (Winn, 2006). Se consideró resultado positivo la aparición inmediata de burbujas visibles, indicando producción de O₂, y resultado negativo cuando no se presentaron las burbujas.

Prueba de oxidasa

La prueba de oxidasa se basa en la producción bacteriana de una enzima oxidasa que reaccionará con la oxidación del citocromo causada por el oxígeno molecular presente (Steel, 1961). La técnica consistió en tomar una porción de una colonia con la punta de un asa y colocarla en placa con papel filtro embebido con el reactivo tetrametil-p-fenilendiamina y se esperó aproximadamente 30 segundos (Blazevic, 1975). Cuando el papel se tornó en

un color violeta o púrpura se consideró como resultado oxidasa positiva, mientras que cuando eran negativas permanecieron incoloras.

Fermentación de carbohidratos

Las pruebas de fermentación de carbohidratos se realizaron con un indicador de pH y un medio de cultivo base suplementado con el carbohidrato a probar a una concentración del 1%. Los carbohidratos utilizados para estas pruebas fueron: D-Rafinosa, D-Galactosa, D-Xilosa, Manitol, D-Manosa, D-Glucosa, D-Sorbitol y Eritritol. Se utilizaron como medios base: caldo nutritivo, caldo YSG y medio BAM, además de distintos indicadores de pH como: rojo de fenol, púrpura de bromocresol y azul de bromofenol, con el fin de encontrar el medio y condiciones idóneas para identificar bioquímicamente a las especies de *Alicyclobacillus*. La interpretación de esta prueba consistió en que si el carbohidrato es fermentando por un microorganismo, el pH baja y el medio virará a otro color. En la Tabla 2 se muestran algunos de los carbohidratos factibles para diferenciar entre especies de *Alicyclobacillus* (Goto *et al.*, 2007).

Una vez determinado el medio de cultivo con indicador de pH seleccionados para la fermentación de carbohidratos se procedió a realizar las pruebas bioquímicas de una manera miniaturizada, de acuerdo a Galaz (2004), con modificaciones para el género *Alicyclobacillus*. Se tomaron las bacterias de referencia en una concentración 1.8×10^9 UFC/mL, utilizando la escala del nefelómetro de MacFarland. Las pruebas se realizaron en una microplaca de 96 pozos (Costar®, EUA) con una capacidad de 300 μ l por pocillo. La microplaca se incubó a 50°C por 5 días, con inspecciones visuales para verificar cambio de color cada 24 h, para evitar falsos positivos. Los pozos con cambio de coloración de morado a verde fueron tomados como resultado de fermentación positiva. En la siguiente imagen (Figura 4) se esquematiza el procedimiento que se siguió para diferenciar especies de *Alicyclobacillus* de una forma optimizada.

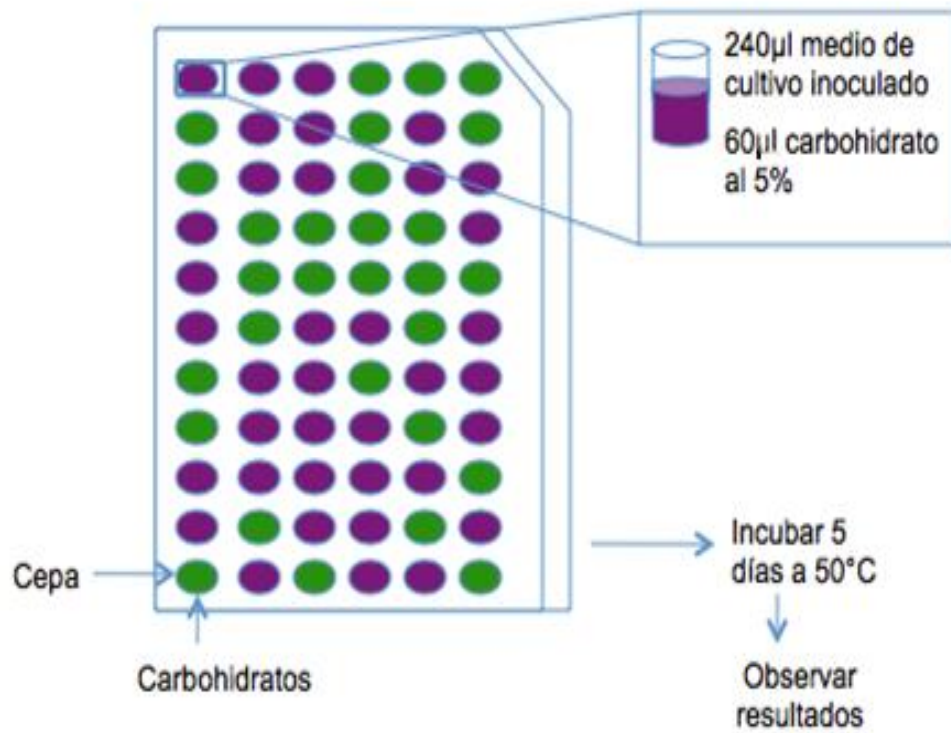


Figura 4. Esquema de una prueba de fermentación miniaturizada en microplaca para diferenciar especies de *Alicyclobacillus*.

Tabla 2. Características diferenciales de algunas especies conocidas del género *Alicyclobacillus* por fermentación de carbohidratos.

Tipo de carbohidrato	<i>A. acidoterrestris</i>	<i>A. acidocaldarius</i>	<i>A. pomorum</i>	<i>A. herbarius</i>
D-Rafinosa	-	+	-	+
Glicerol	+	+	+	+
D-Galactosa	+	+	-	+
Lactosa	+	+	-	+
Fructosa	+	+	+	+
Maltosa	+	+	+	+
D-Xilosa	+	+	-	+
Manitol	+	+	+	+
D-Manosa	+	+	+	+
D-Glucosa	+	+	+	+
D-Sorbitol	+	-	-	-
Eritritol	+	-	-	-
Salicina	+	+	+	+

Adaptación de: Deinhard *et al.*, 1987; Goto *et al.*, 2007

Detección Molecular por PCR de Punto Final

Paralelo a los métodos convencionales para el aislamiento e identificación de *Alicyclobacillus* se implementó un método molecular basado en la reacción en cadena de la polimerasa de punto final (PCR) para lograr la detección de *Alicyclobacillus* en menor tiempo. Este método tiene la ventaja de reportar resultados en cuestión de horas comparado con las técnicas microbiológicas habituales y la desventaja de requerir instalaciones adecuadas para llevarse a cabo.

Extracción del ADN genómico

Se resuspendió una colonia aislada en 200 µL de buffer de fosfatos salino (PBS) estéril y la extracción de ADN se llevó a cabo utilizando un kit comercial (DNeasy Kit; Qiagen, Valencia, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para lo cual, se lisaron las bacterias utilizando proteinasa K. Posteriormente se pasó por una columna de extracción y se centrifugaron a 8000 rpm por 1 minuto, seguido de lavados con los distintos buffers durante el proceso y finalmente se eluyó el ADN de la columna se utilizando buffer de elución AE. La concentración y pureza se analizó por absorbancia a 260/280 nm en un espectrofotómetro Nano-Drop ND-1000 (NanoDrop Tech; Wilmington, EUA). Por último el ADN se almacenó a -20°C hasta su uso.

Condiciones de PCR de punto final para identificar *Alicyclobacillus* spp.

Se utilizaron iniciadores reportados previamente para identificar el género *Alicyclobacillus*: CC16S-F (5'CGTAGTTCGGATTGCAGGC3') y CC16S-R (5'GTGTTGCCGACTCTCGTG3'), los cuales amplifican un segmento de aproximadamente 134 pb del gen 16S rRNA (Connor *et al.*, 2005).

La mezcla de reacción se conformó con un volumen total de 50 μL que incluyeron: 1.5 μL de cada primer, 5 μL de dNTPs 25 mM, 0.25 μL de Taq ADN polimerasa, 5 μL de buffer de reacción 10X, 5 μL de MgCl_2 , 29.75 μL de PCR H_2O y 2 μL de ADN genómico (Groenewald *et al*, 2009). Se utilizó agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) como control negativo. Las condiciones de reacción de PCR fueron: 1 ciclo a 95°C/3 min; 35 ciclos de 94°C/30s, 55°C/30s y 72°C/30s, con elongación final de 72°C/2 min.

Finalmente los productos obtenidos de la PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa (Sigma; Aldrich St Louis, EUA) al 1.2 %, utilizando SyberSafe® como fluorocromo y un marcador molecular de referencia (1Kb plus DNA Ladder Invitrogen). Las condiciones de electroforesis fueron a 45 minutos a 90 volts para separar los fragmentos esperados. Los geles se visualizaron en un fotodocumentador (Gel doc™ XR+System; BIO-RAD; Hercules, EUA) mediante un transiluminador de luz ultravioleta (UV). Las imágenes se analizaron utilizando el programa Image Lab software (BIO-RAD, EUA).

Detección de *Alicyclobacillus* en Muestras Ambientales

Muestras ambientales

Para los análisis de suelo superficial, se tomaron 12 muestras de 6 sitios al azar provenientes de dos huertas de naranja del municipio de Cajeme ubicadas en el ejido “Cuauhtémoc” (campos 5) y ejido “Francisco Javier Mina” (campo 60). El muestreo se realizó en puntos libres de hojas, ramas y rocas, con una pala desinfectada y colocando el suelo en una bolsa estéril (Nasco Whirl-pak®; Fort Atkinson, EUA). Se trasladaron en frío al Laboratorio de Microbiología e Inmunología de CIAD Posteriormente se almacenaron a 4°C hasta su análisis.

Para las muestras de agua de lavado, se utilizó el agua con la que se lavaron 4 lotes de 25 naranjas provenientes de los huertos, éstas fueron colocadas en bandejas de plástico desinfectadas previamente con alcohol, a las naranjas se

les dio un enjuague manual con 1 litro de agua estéril y el agua de lavado se recogió en otra bandeja desinfectada. Posteriormente se llevó a cabo la concentración de las muestras descrita en los siguientes párrafos. La concentración de muestras y la siembra se realizó el mismo día.

Análisis de muestras ambientales de suelo superficial de huertos de naranjas para aislar e identificar *Alicyclobacillus spp.*

Se tomaron 10 g de cada muestra y se resuspendieron en 90 mL de caldo YSG estéril con pH ajustado a 4 y se les dio un choque térmico de 70°C por 20 minutos (Hippchen *et al.*, 1981), después se incubaron por 24 h, finalmente se tomaron los sedimentos y se prepararon diluciones con agua estéril (10^{-1} - 10^{-6}) y se colocó 0.1 mL de cada dilución en placas de agar por duplicado y fueron incubadas a 50°C por 72h. (Groenewald *et al.*, 2008).

Análisis de muestras de agua de lavado de superficie de naranjas para aislar e identificar *Alicyclobacillus spp.*

Las muestras de agua de lavado fueron centrifugadas en tubos con membrana con punto de corte de 10kDa (Amicon Ultra-15, Millipore; Billerica, EUA) a 4000 rpm por 15 minutos en una centrifuga Sorvall® ST 16R (Thermo Scientific, EUA), con la finalidad de concentrar partículas menores a ese tamaño de poro como lo son las bacterias. El concentrado se recolectó en un tubo estéril y se le dio un choque térmico a 70°C/20min. Finalmente, se sembró 0.1 mL del concentrado en placas de agar por duplicado, incubándose 50°C por 72h.

Recuperación de *Alicyclobacillus* en Muestras de Jugo de Naranja Bajo Condiciones de Pasteurización

Se siguió un protocolo similar al de cuenta en placa de bacterias aerobias descrito en la Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994. Se prepararon 4 lotes de jugo de naranja bajo condiciones asépticas, elaborados con un extractor de acero inoxidable estéril.

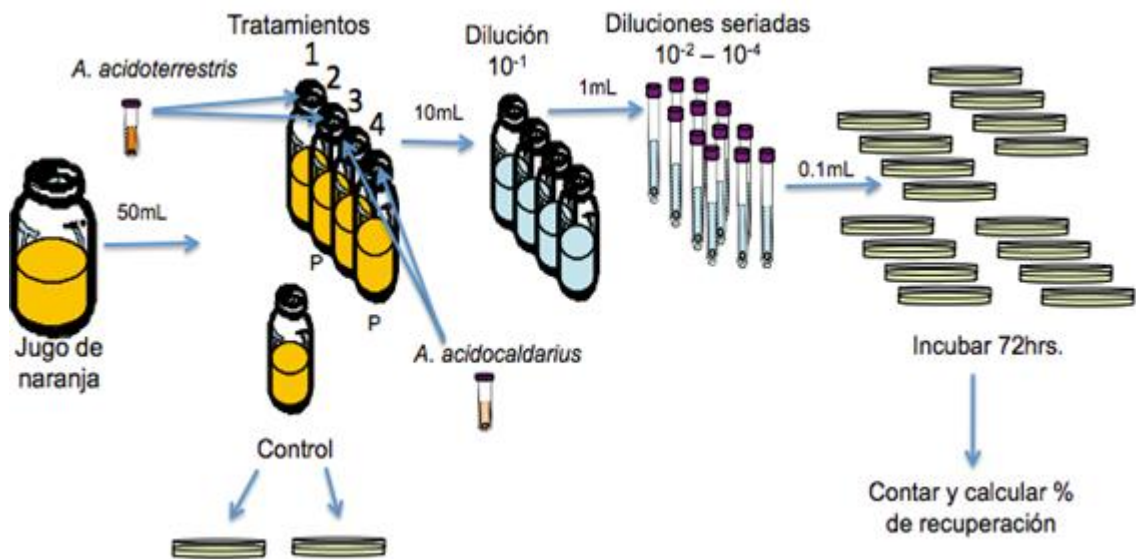
Para la preparación del inóculo se cultivaron masivamente las cepas de referencia en placas de agar a 50°C/18 días (Silva *et al.*, 2012). Las soluciones y el material usados fueron esterilizados previamente. Una vez obtenido el cultivo se agregaron 2 mL de PBS y con ayuda de una varilla de vidrio se recolectaron los cultivos para obtener suspensiones concentradas. Posteriormente se centrifugaron y lavaron los cultivos 3 veces con PBS a 4000 rpm/20min/4°C. Finalmente se resuspendieron en PBS y se llevaron a un volumen de 50 mL. Posteriormente se dio tratamiento térmico a 80°C/10min en baño de agua, para eliminar células vegetativas y preservar esporas en una solución stock. Las suspensiones almacenadas a 4°C hasta su uso. Para determinar la concentración celular se empleó la técnica de cuenta en placa en agar descrita en la NOM-092.-SSA1-1994, para lo cual se prepararon diluciones hasta 10^{-7} para poder determinar concentración de esporas, 100 μ L de cada dilución se aplicaron en placas de agar (por duplicado) y se incubaron a 50°C, contándose a las 72 horas. Se contó el número de colonias obtenidas y se multiplicó por la dilución inversa, para reportarlo como esporas/mL.

Una vez preparado el inóculo se procedió a elaborar el jugo de naranja que sirvió de muestra para evaluar la recuperación de estos microorganismos. Se prepararon 4 lotes de jugo de naranja y se colocaron en frascos de vidrio estéril, tal como se muestra en la Figura 5, dejando uno sin inocular como control. Posteriormente se inocularon con 1 mL de la suspensión de inóculo previamente mencionada conteniendo una concentración conocida de las cepas control. A partir de éstas se procedió con el aislamiento e identificación de la

bacteria. Después a 2 de los frascos se les dio un tratamiento de pasteurización 65°C durante 30 minutos, con el propósito de evaluar la recuperación en este tipo de muestras con y sin tratamiento térmico. Posteriormente se sembraron placas (por duplicado) y se contaron colonias hasta las 72 horas. Al finalizar la incubación se llevó a cabo el recuento del inóculo y la determinación del porcentaje de recuperación de *Alicyclobacillus* spp., en cada jugo (Centeno-Briceño, 2001), aplicando las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ Recuperación} = 100\% - \% \text{ Reducción}$$

$$\% \text{ Reducción} = (\text{Inóculo inicial} - \text{Inóculo final}) / \text{Inóculo inicial} * 100$$



P: pasteurización (65°C/30min)

Figura 5. Procedimiento para evaluar recuperación de *Alicyclobacillus* spp., en muestras de jugo de naranja.

Análisis Estadístico

La recuperación de *Alicyclobacillus* se analizó con un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2x2, cuyos factores fueron el tipo de cepa (*A. acidoterrestris* y *A. acidocaldarius*) y los tratamientos (bajo condiciones de pasteurización y sin pasteurizar). Se realizó un análisis de varianza de una vía. Las diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$) se determinaron mediante la prueba de comparación de medias de Tukey-Kramer. Los datos se analizaron utilizando el paquete estadístico NCSS 2007 (Hintze, 2009).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis para Identificar *Alicyclobacillus* por Técnicas Microbiológicas y PCR

Selección de medio de cultivo idóneo para aislar *Alicyclobacillus*

Los medios de cultivo son las soluciones que contienen nutrientes, requeridos para cultivar microorganismos de interés. Principalmente se preparan añadiendo cantidades precisas de elementos orgánicos o inorgánicos purificados, mezclados con agua destilada. Una vez preparado este debe ser inoculado e incubado bajo las condiciones que favorezcan el desarrollo de dichos microorganismos (Madigan et al., 2004). Por lo anterior para el aislamiento de bacterias acidotermófilas como *Alicyclobacillus*, se probaron distintos medios que cumplieran con la demanda nutrimental requerida para estas bacterias, con el propósito de encontrar en el que dichas bacterias crecieran en mayor cantidad en menor tiempo.

La selección de los medios de cultivo se realizó en primer término mediante la técnica de estriado en placa por agotamiento. Para lo cual las cepas reconstituidas en caldo BAM, fueron inoculadas en los agares APDA, YSG y BAT. De acuerdo al crecimiento observado mediante esta técnica, se seleccionó el medio más adecuado para la recuperación en muestras de jugo inoculadas. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Crecimiento de *Alicyclobacillus* en distintos medios de cultivo.

Microorganismo	Medio de cultivo	Condiciones	Observaciones
<i>A. acidoterrestris</i>	Agar APDA	45°C/72 h	Crecimiento escaso, colonias poco uniformes.
<i>A. acidocaldarius</i>		65°C/72 h	
<i>A. acidoterrestris</i>	Agar YSG	45°C/5 días	Colonias pequeñas, velocidad de crecimiento lento, posterior a 72 h de incubación.
<i>A. acidocaldarius</i>		65°C/5 días	
<i>A. acidoterrestris</i>	Agar BAT	45°C/72 h	Buen crecimiento a partir de las 48 h, colonias abundantes y uniformes en tamaño y forma.
<i>A. acidocaldarius</i>		65°C/72 h	

El medio ideal para el aislamiento de *Alicyclobacillus* fue el agar BAT, esto se atribuye a que este medio de cultivo contiene una pequeña cantidad de los siguientes elementos traza: cobalto, cobre, manganeso y zinc) en su formulación, aunque estos elementos se requieren en muy pequeñas cantidades son igual de importantes que los macronutrientes. Estos micronutrientes son requeridos por ciertas bacterias, ya que algunos de estos tienen una función estructural en varias enzimas bacterianas, además de que se lograron encontrar las condiciones adecuadas para que *Alicyclobacillus* creciera y estas fueron a 50°C por 3 días como se muestra a continuación (Figura 6), donde se aprecian las colonias de *A. acidoterrestris*, estas son color beige, de consistencia cremosa, con borde y superficie regular.

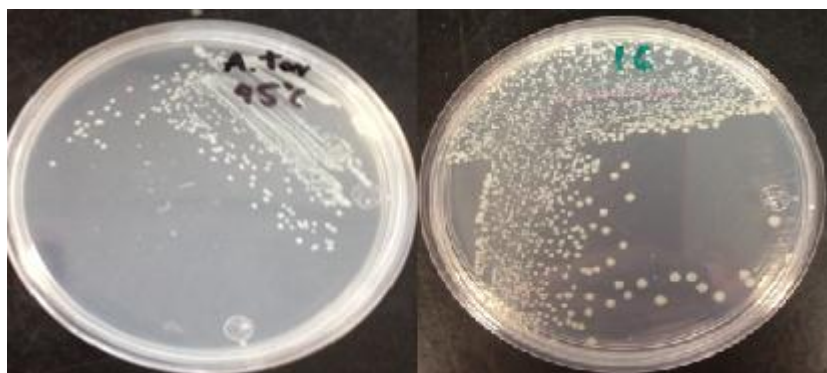


Figura 6. Crecimiento comparativo de *A. acidoterrestris* ATCC® 49025 en agar YSG y BAT, pH 4 a 45°C por 72 horas.

Los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con los reportados por Murray *et al.*, 2007 quienes encontraron una óptima recuperación en agar BAT de *A. acidoterrestris*, *A. acidocaldarius* y *A. cycloheptanicus*, cultivados a 43-50°C por 3 a 10 días. Witthuhn *et al.* 2011 realizaron una comparación del crecimiento de *A. acidoterrestris* en concentrado de durazno en agar BAT, APDA y agar K, utilizando las técnicas de difusión en placa, dilución en placa y filtros de membrana. Obtuvieron una recuperación de 76% en agar BAT, 50% en agar APDA y 5% en agar K. En los medios donde no obtuvieron los resultados esperados, el mismo grupo de investigadores en otro estudio, reportó que si obtienen mejor recuperación en los agares APDA y K, pero en recuperación de un concentrado de pera. Por lo que se pueden recomendar estos medios para muestras de frutos ácidos como la pera, ya que en su recuperación en el durazno no obtuvieron resultados adecuados de recuperación.

En base a estos trabajos la IFU optó por aplicar el método de aislamiento con agar BAT con la técnica de difusión en placa por presentar mejores resultados contra los otros medios de cultivo. Sin embargo, en Japón, se utiliza el agar YSG con las 3 técnicas de siembra mencionadas para detectar *Alicyclobacillus*. Debido a que no hay un medio oficialmente para su detección se probaron varios medios hasta encontrar el idóneo.

Identificación bioquímica para diferenciar especies de *Alicyclobacillus*

Los resultados de las pruebas de catalasa, oxidasa y tinción Gram se muestran a continuación (Tabla 4).

Tabla 4. Resultados de pruebas de identificación para *Alicyclobacillus*.

Prueba	<i>A. acidoterrestris</i>	<i>A. acidocaldarius</i>
Tinción Gram	(+/-)	(+/-)
Catalasa	(-)	(+)
Oxidasa	(-)	(-)

(+/-) Variable, (+) Positivo, (-) Negativo

El resultado variable en la tinción Gram observado en este estudio, también ha sido reportado por otros autores y se demostró que el resultado de tinción dependerá de la etapa del cultivo bacteriano y el contenido de ácidos grasos en su membrana (Deinhard *et al.*, 1987; Wisotzkey *et al.*, 1992). Si se cuenta con un cultivo joven de aproximadamente 48 horas o menos el resultado será mayor número de bacterias Gram (+) y si se realiza posteriormente aumentarán las Gram (-) como se muestra en la Figura 7. Sin embargo en bibliografía se les clasifica como Gram (+) por su resultado inicial. Aunque se menciona que esta tinción más que para clasificar se aplica para ver la morfología de las bacterias, que en este caso se pudo apreciar la forma bacilar de las bacterias así como sus esporas.

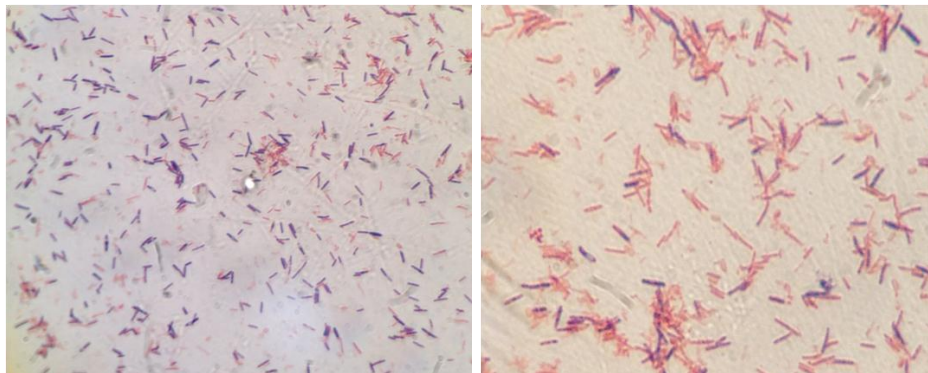


Figura 7. Tinción Gram de *A. acidocaldarius* a las 24 y 72 horas. Imagen por microscopía óptica con aumento 100x. Imagen tomada en el Laboratorio de Microbiología e Inmunología.

En la prueba de la catalasa el resultado fue negativo para *A. acidoterrestris* y positivo para *A. acidocaldarius*. Se asume que la mayoría de las bacterias de este género son positivas. Sin embargo existen reportes que indican que en algunas especies se pueden observar resultados débiles, incluso la especie *A. sendaiensis* es catalasa negativa (Tsuruoka *et al.*, 2003). El resultado obtenido en esta investigación fue similar a otros investigadores quienes realizaron la prueba de la catalasa a 6 cepas distintas de *Alicyclobacillus*, entre ellas, *A. acidoterrestris* (Albuquerque *et al.*, 2000). Los resultados de todas sus cepas

analizadas fueron débiles o negativos por lo que se concluye que no todas las especies de estas bacterias son catalasa positiva.

Ambas cepas resultaron oxidasa negativa. Esto concuerda con lo reportado por Yokota (*et al.*, 2007), cuando estas bacterias aún eran clasificadas en el género de *Bacillus*. Ello que no pueden utilizar el oxígeno en la cadena de transferencia de electrones o aplican una citocromo oxidasa diferente para transferir electrones al oxígeno en su metabolismo, por ello el reactivo tetrametil-p-fenilendiamina no se oxida permaneciendo incoloro (Figura 8).

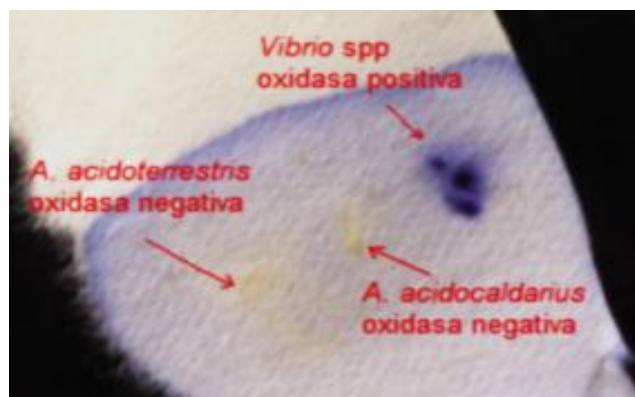


Figura 8. Prueba de la oxidasa de *Alicyclobacillus*. Se usó *Vibrio* spp como control positivo.

Cabe mencionar que estas pruebas primarias son importantes ya que son necesarias para iniciar con la identificación de una bacteria, en cuanto a morfología, reacciones metabólicas como producción de enzimas y reacciones de óxido. Posteriormente, se buscó la combinación de medio de cultivo e indicador de pH idóneo, para poder aplicar las pruebas de fermentación con distintos carbohidratos, los medios utilizados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Medios de cultivo e indicadores de pH utilizados para aplicar pruebas bioquímicas para distinguir especies de *Alicyclobacillus*.

Medio de cultivo	Indicador de pH	Condiciones	Resultado
Caldo nutritivo	Rojo de fenol	pH: 6, 45°C/48h.	Sin crecimiento
Caldo YSG	Rojo de fenol	pH: 6, 45°C/48h.	Sin cambio
Caldo YSG	Púrpura de bromocresol	pH: 5, 45°C/72h.	Sin cambio
Caldo YSG	Azul de bromofenol	pH: 4, 45°C/96h.	Sin cambio
Medio BAM	Azul de bromofenol	pH: 4, 45°C/96h.	Cambio en medio

Cabe mencionar que fue necesario determinar el caldo de cultivo adecuado ya que el medio BAT adquirido comercialmente donde se encontró el crecimiento idóneo, solamente estaba disponible con agar adicionado y al tratar de prepararlo por sus constituyentes, no se contó con todos los elementos traza requeridos en su formulación. Los medios probados fueron seleccionados de acuerdo a otros medios de cultivo utilizados comercialmente para fermentación de carbohidratos. Por ejemplo, el caldo nutritivo con rojo de fenol, es el más comúnmente utilizado en los protocolos para diferenciar especies del genero *Bacillus* (Doyle, 2001), así como en las baterías comerciales de fermentación de carbohidratos. Sin embargo, *Alicyclobacillus* no creció en este medio de cultivo.

Posteriormente se probó el caldo YSG en el cual esta bacteria crece fácilmente y se decidió utilizar además del rojo de fenol los indicadores púrpura de bromocresol y azul de bromofenol. En este medio de cultivo se obtuvo crecimiento abundante, sin embargo, no hubo cambios en ninguno de los indicadores, pues aunque en algunos de los tubos hubo crecimiento bacteriano, no se pudo apreciar el viraje buscado que indicara la modificación al pH. Esto

quizás pudo deberse a la coloración inicial del medio YSG con una tonalidad ligeramente oscura que dificultaba apreciar el viraje que daba el cambio de pH en el medio. Una vez seleccionado el medio con indicador, se concluyó que aunque en algunos de los medios seleccionados hubo crecimiento, no se dio el viraje por que la peptona presente en los medios de cultivo también es degradada por las bacterias y esto produce sustancias alcalinas impidiendo ver el cambio de pH (Cowan, 1974). El ácido orgánico producto de la fermentación de un carbohidrato tiene que ser mayor que las sustancias alcalinas presentes para tener la observación de un cambio de color que denote acidez influenciada por el indicador de pH y las propiedades del medio.

Finalmente la última combinación de medios utilizada fue el medio BAM con el indicador azul de bromofenol, siendo este último un indicador que muestra cambios de color cuando el pH presente en el medio desciende de 4, indicando niveles muy ácidos en el medio, virando de una tonalidad violeta opaca a un tono verde que se puede apreciar a un pH de 3 (Figura 9). En la Tabla 5 se muestran los resultados de las pruebas bioquímicas.



Figura 9. Pruebas de medio BAM con azul de bromofenol para diferenciar especies de *Alicyclobacillus*.

Tabla 5. Resultados de identificación bioquímica de cepas de referencia de *Alicyclobacillus*.

Prueba Bioquímica	<i>A. acidoterrestris</i>	<i>A. acidocaldarius</i>
Oxidasa	(-)	(-)
Catalasa	(-)	(+)
Fermentación de Carbohidratos		
D-Rafinosa	(-)	(+)
D-Galactosa	(+)	(+)
D-Xilosa	(+)	(+)
Manitol	(+)	(+)
D-Manosa	(+)	(+)
D-Glucosa	(+)	(+)
D-Sorbitol	(+)	(-)
Eritritol	(+)	(-)

(+) Positivo, (-) Negativo

Detección molecular de *Alicyclobacillus* por PCR de punto final

Para la detección de *Alicyclobacillus* por PCR se elaboraron diluciones seriadas (10^{-1} - 10^{-7}) a partir de una muestra de jugo de naranja de 50 mL inoculada con (4×10^4 esporas de *A. acidoterrestris*), con el propósito de encontrar el límite de detección de esporas de la técnica. Posteriormente se extrajo el ADN de las diluciones con un tratamiento térmico previo de 120°C con un choque de 4°C (3 veces) para facilitar la liberación del material genético de las esporas (Pribylka *et al.*, 2013), y se llevó a cabo la PCR de punto final con las condiciones previamente mencionadas.

La banda de ADN amplificado del gen 16S (Figura 10) correspondió con el fragmento reportado en bibliografía (Connor *et al.*, 2005) de 134pb y el límite de detección de la técnica fue de 4 esporas/mL, como se muestra en la Figura 11. El identificar el género *Alicyclobacillus* con herramientas moleculares es importante desde el punto de vista que son técnicas que permiten tener un resultado en cuestión de horas comparándose con las técnicas microbiológicas habituales de los laboratorios de calidad de alimentos. Sin embargo, esta

técnica solo confirma presencia del género, si se desea conocer la especie de la bacteria analizada, será necesario llevar a cabo una secuenciación del producto genético obtenido.

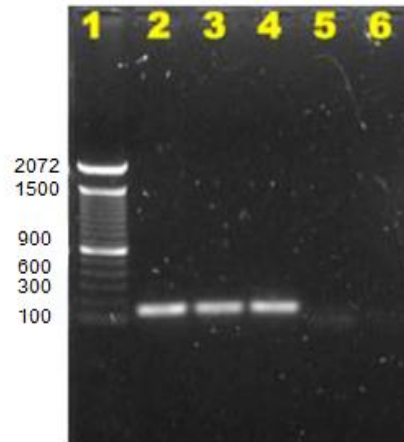


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% de las reacciones de PCR de cepas control para determinar especificidad de los iniciadores utilizados. 1: marcador PM TrackIt 100 bp DNA Ladder; 2 y 3: *A. acidoterrestris*; 4: *A. acidocaldarius*, 5: *Bacillus* spp (control negativo); 6: agua.

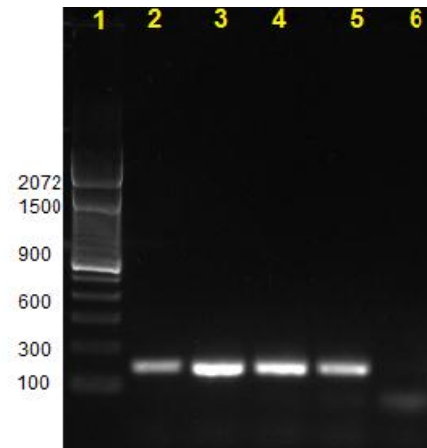


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% para determinar el límite de detección de *Alicyclobacillus* por PCR de punto final. 1: marcador PM TrackIt 100 bp DNA Ladder; 2: 4×10^3 esporas/mL; 3: 4×10^2 esporas/mL; 4: 4×10^1 esporas/mL; 5: 4 esporas/mL; 6: 4×10^{-1} esporas/mL.

Aislamiento e Identificación de *Alicyclobacillus* en Muestras Ambientales de Suelo y Agua de Lavado de Superficie de Naranjas

En los análisis de muestras ambientales de suelo superficial y de agua de lavado de naranjas, no se encontró la presencia de ninguna especie de *Alicyclobacillus*. En el caso de las muestras de suelo, Groenewald *et al.* (2009), lograron aislar 5 cepas de *Alicyclobacillus* de distintos huertos de manzana en Sudáfrica, aunque mencionan poco sobre las condiciones en las que se llevó a cabo este estudio, se puede pensar que es importante en que temporada del año sean tomadas las muestras ya que cuando se reporta mayor incidencia de estas bacterias es en la temporada de verano, haciendo mención a la influencia de las condiciones como temperatura, lluvias y pH del suelo. Finalmente en la superficie de naranjas, Parish y Goodrich (2005) reportaron el aislamiento de un presunto *Alicyclobacillus* obtenido del agua de lavado de naranjas en una línea de proceso de jugo de naranja en Florida. En conclusión estos resultados se pueden atribuir a las distintas temporadas en las que se realizó el muestreo, ya que en este estudio las muestras fueron tomadas en invierno.

Estos análisis son importantes en esta región ya que en Sonora, se producen anualmente 175 mil toneladas de naranja y la mayoría de esta producción es enviada a centros de producción para su proceso fuera del estado, por esta razón no fue posible determinar de líneas de producción de jugos directamente la presencia de estas bacterias deteriorativas.

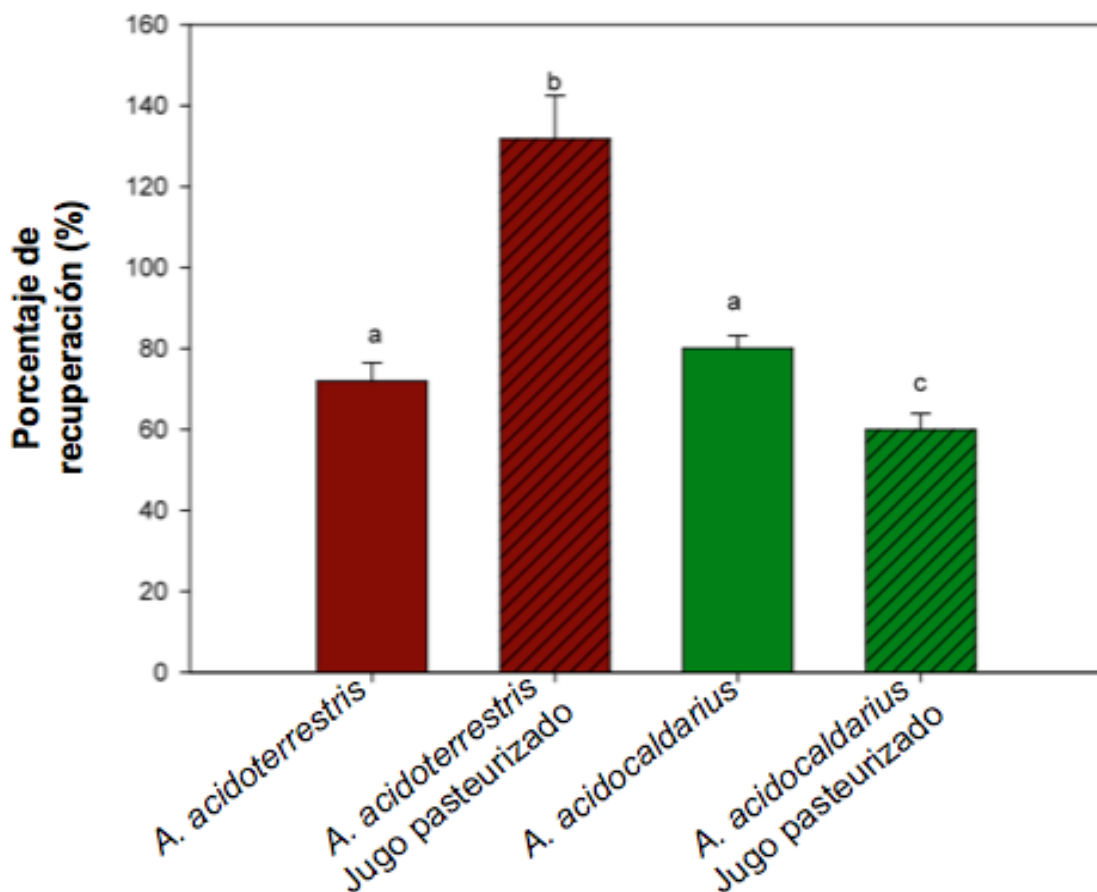
Recuperación de *Alicyclobacillus* en Jugo de Naranja Bajo Condiciones de Pasteurización

Una vez estandarizadas las técnicas de identificación con los controles positivos, se llevó a cabo el procedimiento para analizar muestras de jugo de naranjas inoculadas con las cepas control. Se inocularon muestras de 50 mL de jugo de naranja en cuatro tratamientos, el primero con una concentración conocida de una cepa y el otro con la otra cepa, (4×10^4 de *A. acidoterrestris*) y

(2×10^4 de *A. acidocaldarius*) respectivamente, además otros tratamientos que fueron puestos bajo condiciones de pasteurización con la misma concentración de inóculo. En la Figura 12 se muestra la gráfica de porcentaje de recuperación de ambas cepas, inoculadas en jugo de naranja con y sin tratamiento térmico. Hubo diferencias significativas en los tratamientos de ambas recuperaciones. Se observó un aumento con respecto a la recuperación de *A. acidoterrestris* bajo condiciones de pasteurización, lo que podría indicar que este género de bacterias, además de sobrevivir a estos procesos, tiene la capacidad de incrementar su población bajo condiciones de estrés térmico. Por otro lado, la cepa de *A. acidocaldarius* no tuvo efecto significativo ($p < 0.05$) entre tratamientos.

Respecto a los resultados obtenidos en la recuperación, en el caso de *A. acidoterrestris* se recuperó el 72% del inóculo inicial, obtenidos del conteo de las placas sembradas como se mencionó anteriormente en la metodología y de *A. acidocaldarius* se obtuvo un 84%. Sin embargo, al contar bajo condiciones de pasteurización, *A. acidoterrestris* pudo aumentar su número a un 130% rebasando la cantidad de inóculo inicial. Se ha reportado que esta especie en particular cuando es sometida a condiciones térmicas incrementa su esporulación (Chang & Kang., 2004). Pettipher *et al.* (1997), mencionaron que no consideran necesario someter las muestras a un tratamiento térmico porque es posible su detección sin ese tratamiento. Sin embargo, en un estudio para evaluar recuperación de *A. acidoterrestris* en jugo de manzana se demostró que aunque es posible que los componentes del jugo puedan ser capaces de inducir la germinación de las esporas, la tasa de germinación es distinta en comparación de un jugo pasteurizado. Por otra parte, Walls y Chuyate en un estudio en el año 2000, sugieren aplicar un choque térmico a posibles muestras contaminadas, ya que cuando estas bacterias se encuentran en bajas concentraciones (10^3 o menos), al aplicar el tratamiento térmico aumentara su población notablemente facilitando ser detectadas en productos posiblemente contaminados.

Finalmente la recuperación de *A. acidocaldarius*, se redujo hasta un 60% lo que nos indica que aunque la temperatura ideal de crecimiento de esta bacteria es elevada, cuando se aplica un choque térmico se reduce una parte de la población, sin embargo, no la elimina totalmente aunque poco se sabe de la capacidad de esporulación bajo condiciones de pasteurización, ya que la mayoría de las investigaciones reportadas son utilizando *A. acidoterrestris* por su relación con la síntesis de guayacol, los resultados de recuperación de las bacterias sin tratar obtenidas fueron relativamente similares a *A. acidoterrestris*.



Tratamientos

Figura 12. Porcentaje de recuperación de *Alicyclobacillus* en jugo de naranja con respecto a los efectos de pasteurización. Los porcentajes fueron determinados en relación al inóculo inicial. Las bacterias fueron contadas por 72 h y se reportaron como esporas por mL de jugo de naranja. Los gráficos representan la media y el SEM de una n=4. Para determinar diferencias significativas entre tratamientos se utilizó la prueba de comparación de medias Tukey-Kramer, ($p < 0.05$).

Método Propuesto para la Identificación de *Alicyclobacillus* spp.

Se propone el siguiente protocolo para detectar *Alicyclobacillus* spp, en jugos de fruta de acuerdo a la Figura 13. Indicando ambas metodologías tanto microbiológica como molecular, pudiéndose adecuar a las necesidades de los productores de alimentos que les sea necesario erradicar incidentes de contaminación por estas bacterias.

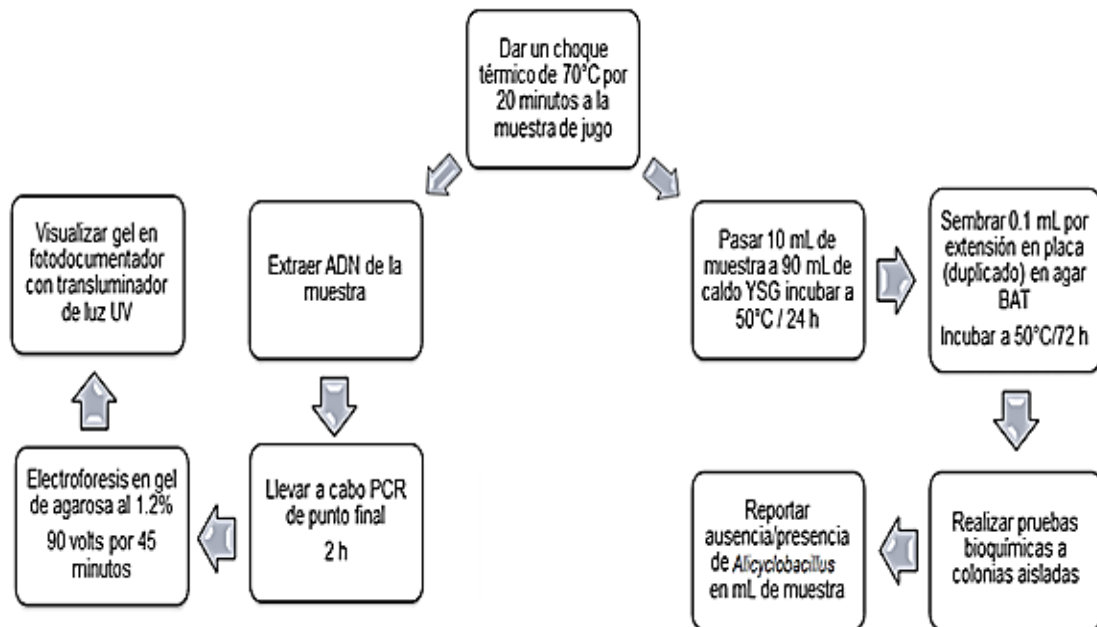


Figura 13. Esquema general del método propuesto para la detección de *Alicyclobacillus*.

CONCLUSIÓN

Con el protocolo propuesto en este trabajo se pudieron detectar e identificar *A. acidoterrestris* y *A. acidocaldarius*, tanto por pruebas bioquímicas como por PCR. Además, las pruebas de recuperación de *Alicyclobacillus* inoculado en jugo de naranja pasteurizado fueron exitosas. Por otro lado, no se encontró la presencia de estas bacterias, en ninguna de las muestras ambientales analizadas.

RECOMENDACIONES

La erradicación de *Alicyclobacillus* ha tenido un creciente interés ya que es reconocido a nivel internacional como el responsable del deterioro a gran escala de bebidas hechas a base de jugo de fruta. A nivel nacional es necesario contar con un protocolo que tenga las herramientas necesarias para su detección. Es importante mencionar que en este trabajo se desarrolló un protocolo diagnóstico para la detección de *Alicyclobacillus* en nuestro país, con las herramientas microbiológicas habituales y con una técnica molecular que da resultados de detección en un menor tiempo. Se recomienda identificar la fuente de contaminación por *Alicyclobacillus*, monitoreando zonas productoras de jugos de frutas ácidas, en diferentes épocas del año.

BIBLIOGRAFÍA

- Albuquerque, L., Rainey, F. A., Chung, A. P., Sunna, A., Nobre, M. F., Grote, R., Da Costa, M. S. 2000. *Alicyclobacillus hesperidum* sp. nov. and a related genomic species from solfataric soils of São Miguel in the Azores. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*; 50(2): 451-457.
- Blazevic, D. J. 1975. Principles of biochemical tests in diagnostic microbiology. New York: John Wiley & Sons; 127:91-93
- Centeno Briceño, S. J. 2001. Evaluación microbiológica de tapones de corcho para vinos. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Cerny, G., Duong, H. A., Hennlich, W., Poralla, K. 1984. Fruit juice spoilage bacilli: isolation and characterization of the spoilage organism. *Z Lebensm Unters Researchers*; 179: 224-227.
- Cerny, G., Duong, H. A., Hennlich, W., Miller, S. 2000. *Alicyclobacillus acidoterrestris*: influence of oxygen content on growth in fruit juices. *Food Australia*; 52: 289-291.
- 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(2): 55-74.
- Connor, C., J., Luo, H., McSpadden 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. *International Journal of Food Microbiology*; 99: 229-235.
- Cowan, S. T. 1974. Cowan & Steel's Manual for the identification of Medical Bacteria. Cambridge University Press; 2:137-146
- Darland, G., & Brock, T. D. 1971. *Bacillus acidocaldarius* sp. nov., an acidophilic thermophilic spore-forming bacterium. *Journal of General Microbiology*; 67(1), 9-15.
- Deinhard, G., Blanz, P., Poralla, K., Altan, E. 1987. *Bacillus acidoterrestris* sp. Nov., a new thermotolerant acidophile isolated from different soils. *System Applied Microbiology*; 10: 47-53

- Doyle, M. P., Beuchat, L. R., Montville, T. J. 2001. Microbiología de los alimentos: fundamentos y fronteras. Acribia; 69-71
- Duong, H. A. Jensen, N. 2000. Spoilage of iced tea by *Alicyclobacillus*. Food Australia; 52, 292.
- Evancho, G. M., Walls, I. 2001. Aciduric flat sour sporeformers. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4th Ed. Washington, DC: American Public Health Association.
- Evangelia, K., Ioannis, S. B., Allison, E. D., Kps, D. B. Martin, R. A. 1999. *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices and its control by nisin, International Journal of Food Science Technology; 34:81-85.
- Forsythe, S. J. 2000. Alimentos seguros: microbiología. Zaragoza: Editorial Acribia; 41-42.
- Forsythe, S. J., Hayes, P. R., Scott, R. 2002. Higiene de los alimentos, microbiología y HACCP. Acribia; 132-133.
- García-Galaz, A., Pérez-Morales, R., Díaz-Cinco, M., Acedo-Félix, E. 2004. Resistance of *Enterococcus* strains isolated from pigs to gastrointestinal tract and antagonistic effect against *Echerichia coli* K 88. Revista latinoamericana de microbiología; 46(1): 5-11.
- Gobby, E., Falasconi, M., Concina, I., Mantero, G., Bianchi, F., Mattarozzi, M., Sberveglieri, G. 2010. Electronic nose and *Alicyclobacillus* spp., spoilage of fruit juices: An emerging diagnostic tool. Food Control; 21(10): 1374-1382.
- Gocmen, D., Elston, A., Williams, T., Parish, M., Rouseff, R.L. 2005. Identification of medicinal off-flavours generated by *Alicyclobacillus* species in orange juice using GC-olfactometry and GC-MS. Letters in Applied Microbiology; 40, 172-177.
- Goldberg, D. 2002. Experiences with *Alicyclobacillus* (ACB). Berri Limited, Australia/New Zealand.
- Goto, K., Mochida, K., Kato, Y., Asahara, M., Fujita, R., An, S. Y., 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. International journal of systematic and evolutionary microbiology; 57(6), 1276-1285.

- 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. *Letters in Applied Microbiology*; 46, 289-294.
- Groenewald, W. H., Gouws, P. A., Witthuhn, R. C. 2008. Isolation and identification of species of *Alicyclobacillus* from orchard soil in the Western Cape, South Africa. *Extremophiles*; 12(1), 159-163.
- 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 Microbiology*; 26, 71-76.
- Gutiérrez, J. B. 2000. Ciencia bromatológica: principios generales de los alimentos. Ediciones Díaz de Santos; 279-280.
- Hintze, J. 2009. NCSS, NCSS, LLC. Kaysville, Utah.
- Hippchen, B., Röhl, A., Poralla, K. 1981. Occurrence in soil of thermo-acidophilic bacilli possessing ω -cyclohexane fatty acids and hopanoids. *Archives of Microbiology*; 129(1), 53-55.
- IFU. 2004. Method on the Detection of taint producing *Alicyclobacillus* in Fruit Juices, IFU Handbook Microbiological Methods, Method No. 12
- Jay, J. 2000. Modern Food Microbiology. Sixth edition. Editorial Aspen Publishers Inc. USA.
- Kannenbergh, E., Blume, A., Poralla, K. 1984. Properties of ω -cyclohexane fatty acids in membranes. *FEBS letters*; 172(2): 331-334.
- Lima Tribst, A. A., de Souza Sant'Ana, A., & de Massaguer, P. R. 2009. Review: Microbiological quality and safety of fruit juices-past, present and future perspectives. *Critical reviews in microbiology*; 35(4), 310-339.
- Madigan M., Martinko, J., Parker, J. 2004. Brock. Biología de los Microorganismos. 10 a. Edición. Editorial Pearson Educación S. A. Madrid, España; 108-111.942-944.
- Murray, M. B., Gurtler, J. B., Ryu, J. H., Harrison, M. A., Beuchat, L. R. 2007. Evaluation of direct plating methods to enumerate *Alicyclobacillus* in beverages. *International journal of food microbiology*; 115(1), 59-69.
- NOM-092-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.

- NOM-120-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Prácticas de higiene y sanidad para el proceso de alimentos, bebidas no alcohólicas y alcohólicas.
- Orr, R.V., Robert L., Shewfelt, C. J. H., Sebhat, T., Beuchat L. Y. R. 2000. Detection of guaiacol produced by *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice by sensory and chromatographic analyses and comparison with spore and vegetative cell populations. *Journal of Food protection*; 63:1517-1522.
- Palop, A., Alvarez, I., Raso, J., Condon, S. 2000. Heat resistance of *Alicyclobacillus acidocaldarius* in water, various buffers, and orange juice. *Journal of Food Protection*; 63(10), 1377-1380.
- Parish, M. E., Goodrich, R. M. 2005. Recovery of presumptive *Alicyclobacillus* strains from orange fruit surfaces. *Journal of Food Protection*; 68(10), 2196-2200.
- 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*; 40:764-767.
- Pettipher, G. L., Osmundson, 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(3), 185-189.
- Pinhatti, M., Variante, S., Eguchi, S., Mamfio, G., 1997. Detection of acidothermophilic bacilli in industrialized fruit juices. *Food Processing*; 7: 350-357.
- Přibylka, A., Almeida, A. V., Altmeyer, M. O., Petr, J., Sevcík, J., Manz, A., Neužil, P. 2013. Fast spore breaking by superheating. *Lab on a chip*; 13(9), 1695-1698.
- Silva, F. and Gibss, P. 2009. Engineering Aspects of Thermal Food Processing Chapter II. Principles of Thermal Food Processing. 1-26. CRC Press, Boca raton.
- Silva, F. V., Tan, E. K., Farid, M. 2012. Bacterial spore inactivation at 45–65° C using high pressure processing: Study of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in orange juice. *Food microbiology*; 32(1), 206-211.
- Splittstoesser, D. F., Lee, C. Y., Churry, J. J. 1998. Control of *Alicyclobacillus* in the juice industry. *Dairy Food and Environmental Sanitation*; 18:585-587.
- Steel, K. J. 1961. The oxidase reaction as a taxonomic tool. *Journal of General Microbiology*; 25(2), 297-306.

- Steyn, C. E., Cameron, M., Witthuhn, R.C. 2011. Occurrence of *Alicyclobacillus* in the fruit processing environment a review. *International Journal of Food Microbiology*; 147(1), 1-11.
- Tsuruoka N, Isono Y, Shida O, Hemmi H, Nakayama T, Nishino T. 2003. *Alicyclobacillus sendaiensis* spp. nov., a novel acidophilic, slightly thermophilic species isolated from soil in Sendai, Japan. *International Journal of Systematic and Environmental Microbiology*; 53:1081-1084.
- Uchino, F., & Doi, S. 1967. Acido-thermophilic bacteria from thermal waters. *Agricultural and Biological Chemistry*; 31(7), 817-822.
- Walls, I., Chuyate, R. 1998. *Alicyclobacillus*: Historical perspective and preliminary characterization study. *Dairy, Food and Environmental Sanitation*; 18(8), 499-503
- Walls, I. & Chuyate, R. 2000. Isolation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from fruit juices. *Journal of AOAC International*; 83, 1115-1120
- Winn, W. C. 2006. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. E. W. Koneman Ed. Wolters Kluwer Health.
- Wisotzkey, J. D., Jurtshuk, J. R. P., Fox, G. E., Deinhard, G., Poralla, K. 1992. Comparative sequence analyses on the 16S rRNA (rADN) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris* and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus, *Alicyclobacillus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*; 42, 263-269.
- Witthuhn, R. C., Duvenage, W., Gouws, P. A. 2007. Evaluation of different growth media for the recovery of the species of *Alicyclobacillus*. *Letters in applied microbiology*; 45(2), 224-229.
- Witthuhn, R. C., Smith, Y., Cameron, M., Venter, P. 2011. Isolation of *Alicyclobacillus* and the influence of different growth parameters. *International Journal of Food Microbiology*; 146(1): 63-68
- Yamazaki, K., Tezuka, H., Shinano H. 1996. Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from acid beverages. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*; 60:543-545.
- Yokota, A., Fujii, T., Goto, K. 2007. *Alicyclobacillus*: Thermophilic acidophilic bacilli; 3:12-24.
- Yoneda, H. 2003. Inspection methods for thermotolerant, acidophilic bacteria. *Report of Japan Fruit Association*; 11: 1-8.