

Justyna Dąbrowska¹, Alina Kunicka-Styczyńska^{2*}

¹ Instytut Podstaw Chemii Żywności, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności, Politechnika Łódzka

² Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności, Politechnika Łódzka

Wpłynęło w grudniu 2017 r., zaakceptowano w marcu 2018 r.

Streszczenie: Rodzaj *Alicyclobacillus* obejmuje Gram-dodatnie, Gram-ujemne i Gram-zmienne, acydotermofilne bakterie przetrwalnikujące, izolowane z różnych środowisk, głównie z gleb kwasowych i geotermalnych, gorących źródeł, powierzchni owoców i zepsutych soków owocowych. Bakterie należące do rodzaju *Alicyclobacillus* charakteryzuje obecność ω-alitycznych kwasów tłuszczowych (ω-cykloheksylowych i ω-cykloheptylowych), izo- i anteizo-rozgałęzionych kwasów tłuszczowych oraz hopanoidów zlokalizowanych w błonach plazmatycznych. Dotychczas zidentyfikowano 23 gatunki oraz dwa podgatunki, wśród których najbardziej rozpowszechniony jest *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Niektóre gatunki stanowią zanieczyszczenia mikrobiologiczne żywności w przemyśle owocowo-warzywnym. Spory *Alicyclobacillus* sp. przeżywa temperatury pasteryzacji i są odporne na niskie pH. Spory bakterii ulegają aktywacji w podwyższonej temperaturze, co może prowadzić do namnażania się w sokach i w następstwie prowadzić do ich psucia. Rodzina *Alicyclobacillaceae* jest ciągle modyfikowana, a w rodzaju *Alicyclobacillus* przybywają nowe gatunki. Bakterie *A. acidoterrestris*, ze względu na szybką adaptację do zmieniających się warunków środowiska, uznano za mikroorganizmy o szybkim tempie ewolucji.

1. Wprowadzenie. 2. Wydzielenie taksonu *Alicyclobacillus* i pozycja systematyczna. 3. Charakterystyczne składniki błon komórkowych i ich funkcje. 4. Charakterystyka morfologiczna i fizjologiczna. 5. Wykrywanie bakterii z rodzaju *Alicyclobacillus*. 6. Podsumowanie

***Alicyclobacillus* – bacteria still not understood**

Abstract: The genus *Alicyclobacillus* includes Gram-positive, Gram-negative or Gram-variable, acidothermophilic, endospore-forming bacteria, which have been isolated from various environments, mostly acidic and geothermal soils, hot springs, fruit surface and spoiled fruit juices. The members of the *Alicyclobacillus* genus are characterized by the presence of ω-alityclic fatty acids (ω-cyclohexane or ω-cycloheptane), the iso and anteiso branched-chain fatty acids, and the hopanoids as the major membrane lipids. There are 23 known species and 2 subspecies, with *Alicyclobacillus acidoterrestris* as the most significant. Certain species cause food spoilage in the fruit-and-vegetable juices industry. The spores of *Alicyclobacillus* are highly tolerant to high temperatures and low pH-values of fruit juices. What is more, they are naturally present on fruit surface and can readily enter the production environment of the fruit and vegetable processing. Due to high thermophilicity of these bacteria, the typical juice pasteurization conditions can stimulate spore germination. This is the reason why they can proliferate in juice and ipso facto cause fruit products spoilage. The family of *Alicyclobacillaceae* has continuously been modified and each successive year brings new species. Additionally, *A. acidoterrestris* is recognized as bacterium with a high evolution rate due to its rapid adaptation to changing environmental conditions.

1. Introduction. 2. Taxonomic identification of *Alicyclobacillus* and its systematic position. 3. The characteristic components of cell membranes and their functions. 4. Morphological and physiological characteristics. 5. Detection of *Alicyclobacillus* bacteria, 6. Summary

Słowa kluczowe: *Alicyclobacillus*, bakterie acydofilne, bakterie termofilne

Key words: *Alicyclobacillus*, acidophilic bacteria, thermophilic bacteria

1. Wprowadzenie

Bakterie z rodzaju *Alicyclobacillus* stanowią nie tylko interesujący obiekt badań naukowych, ale są również jednym z mikroorganizmów szczególnie niepożądanych w gałęziach przemysłu spożywczego zajmujących się przetwórstwem owoców. Te acydotermofilne, przetrwalnikujące bakterie określane przez producentów koncentratów i soków owocowych jako „szkodniki” przeżywiają niemal każdy proces produkcyjny [3]. Spory bakterii mogą ulegać aktywacji w czasie operacji technologicznych prowadzonych w podwyższonej temperaturze, co rodzi niebezpieczeństwo ich kiełkowania i kolonizacji linii technologicznej [7, 27]. Efektywną metodą ich usuwania wydaje się być ultrafiltracja, która stosowana w warunkach przemysłowych jest kosztowna

ze względu na konieczność częstej wymiany membran filtracyjnych [28]. Opracowanie skutecznych i tanich technik niszczenia komórek i spor *Alicyclobacillus* spp. wymaga poznania etiologii zanieczyszczeń oraz dokładnej charakterystyki fizjologicznej, metabolicznej i genetycznej bakterii.

Do rodzaju *Alicyclobacillus* nadal włączane są nowe gatunki bakterii izolowanych zarówno ze środowisk ekstremalnych, jak i tych nie zaliczanych do szczególnie nieprzyjaznych dla rozwoju żywych organizmów. Ta szczególna różnorodność gatunków czyni ten rodzaj interesującym w aspekcie rozważań ewolucji adaptacyjnej. Bioróżnorodność *Alicyclobacillus* oraz skutki rozwoju tych bakterii w warunkach przemysłowych stały się motywem opracowania ich szczegółowej charakterystyki.

* Autor korespondencyjny: Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności, Politechnika Łódzka, ul. Wólczańska 171/173, 90-924 Łódź; tel. 042 631 32 73; e-mail: alina.kunicka@p.lodz.pl

2. Wydzielenie taksonu *Alicyclobacillus* i pozycja systematyczna

Bakterie *Alicyclobacillus* zostały odkryte stosunkowo niedawno, a pierwsze raporty dokumentujące ich izolację i podające charakterystykę datowane są na lata 70. XX wieku [40]. Wówczas, w 1967 roku z gorących źródeł Tahoku w Japonii, wyizolowano trzy szczepy, które określono jako obligatoryjne termofile ściśle powiązane z *Bacillus coagulans*. Jednakże, izolaty te w porównaniu z *B. coagulans* wykazywały tolerancję na niższe pH (2,3–5,0, optimum 3,5–4,0) i zdolność do wzrostu w zakresie temperatur 45–71°C przy optimum 65°C, więc były wówczas jedynym znanym obligatoryjnie ciepłolubnym i kwasolubnym gatunkiem rodzaju *Bacillus*. Nie stwierdzono również znacznego podobieństwa izolatów do dobrze poznanych wówczas ciepłolubnych bakterii *Bacillus stearothermophilus* (obecnie reklasyfikowanych do rodzaju *Geobacillus*) [32].

Dalsze badania prowadzone w latach 70. przez Darlanda i Brock'a nad izolatami pozyskanymi ze środowisk naturalnych o niskim pH i wysokiej temperaturze doprowadziły do wprowadzenia nowego gatunku *Bacillus acidocaldarius* [8]. Wykazano bowiem, iż opisane izolaty charakteryzują się znacznie wyższym poziomem zawartości guaniny i cytozyny w materiale genetycznym (62–64% molowych G+C) [8], niż bakterie z rodzaju *Bacillus* o zawartości G+C równej 45–50% molowych. Wskazano również na znaczne podobieństwo pomiędzy izolatami pozyskanymi w 1967 r. i 1970 r. [8].

W kolejnych badaniach wskazano na obecność w błonie komórkowej bakterii *B. acidocaldarius* ω-alicyklicznych kwasów tłuszczowych, kwasów tłuszczowych izo i anteizo-rozgałęzionych [11, 12] oraz hopanoidów [18]. Kolejne izolacje *B. acidocaldarius* z termalnych kwaśnych środowisk sprawiły, że powstało przekonanie, iż gatunki *Bacillus* zawierające ω-alicykliczne kwasy tłuszczowe są ściśle powiązane ze środowiskiem wód termalnych. Jednak teza ta została obalona przez zespół Cerny'ego [5], gdy z soku jabłkowego wyizolowano bakterie z rodzaju *Bacillus*, zawierające kwasy ω-cykloheksanowe i hopanoidy [5]. Wyizolowany *Bacillus* został uznany za czynnik powodujący zepsucie i powiązany z *B. acidocaldarius* [5]. Bakterie przypominające szczepy opisane przez Cerny'ego [5] wyizolowano również z gleby [18], a ich relacja systematyczna została wyjaśniona w 1987 r., gdy stwierdzono, że obecność w błonie komórkowej kwasów ω-alicyklicznych nie jest specyficzna dla *B. acidocaldarius* [9]. W związku z tym, zaproponowano wprowadzenie nowego gatunku *Bacillus acidoterrestris* [9]. Cechą odróżniającą *B. acidoterrestris* od *B. acidocaldarius* jest zdolność do wykorzystania erytrytolu, sorbitolu i ksylitolu. Ponadto, nowo utworzony gatunek charakteryzuje

się niższą zawartością G+C (51–53,1% molowych) oraz wzrostem w nieco mniejszym zakresie temperatur [7, 9]. W toku dalszych badań, wyizolowano z gleby tlenowe bakterie przetrwalnikujące zawierające ω-alicykliczne kwasy tłuszczowe, które były wyjątkowe pod tym względem, że zawierały kwas ω-cykloheptanowy [10]. Cecha ta odróżniała je od *B. acidocaldarius* i *B. acidoterrestris*, wytwarzających kwasy ω-cykloheksanowe. Zdefiniowano więc nowy gatunek *Bacillus cycloheptanicus*, który był ponadto obligatoryjnym aukso-trofem wobec metioniny, izoleucyny i pantotenu [10]. Analiza porównawcza sekwencji 16S rRNA tych trzech gatunków wykazała bardzo wysokie podobieństwo (98,8%) *B. acidocaldarius* i *B. acidoterrestris*. Podobieństwo pomiędzy *B. cycloheptanicus* a *B. acidocaldarius* i *B. acidoterrestris* było już nieco niższe (odpowiednio 93,2 i 92,7%) [43]. Równocześnie, stwierdzono ściśle powiązanie tych trzech gatunków oraz ich odmienność od innych gatunków w rodzaju *Bacillus*. W rezultacie, Wisotzkey w 1992 roku zaproponował wprowadzenie nowego rodzaju *Alicyclobacillus* w rodzinie *Bacillaceae* [43], a nazwa taksonomiczna bakterii została zmieniona na *Alicyclobacillus acidocaldarius*, *Alicyclobacillus acidoterrestris* i *Alicyclobacillus cycloheptanicus*.

Obecnie, w skład rodziny *Alicyclobacillaceae* wchodzi także rodzaj *Kyrpidia*, *Tumebacillus* i *Effusibacillus*. Rodzaj *Kyrpidia* jako jednostka taksonomiczna został wprowadzony w 2012 roku, a jego przedstawicielem jest *Bacillus tusciae* [25]. Są to Gram-dodatnie, przetrwalnikujące bakterie termoacydofilne o zawartości G+C 59,1% molowych, nie zawierające w błonach komórkowych ω-alicyklicznych kwasów tłuszczowych. Rodzaj *Tumebacillus* obejmujący Gram-dodatnie, przetrwalnikujące, tlenowe bakterie zawierające w błonach komórkowych kwasy tłuszczowe izo-C15:0 i anteizo-C15:0 i genomie z udziałem 55,6% molowych G+C, został oficjalnie wprowadzony do taksonomii w 2008 roku [2, 37]. Wprowadzenie rodzaju *Effusibacillus* połączone zostało z reklasyfikacją dwóch gatunków *Alicyclobacillus*, w tym gatunku *Alicyclobacillus consociatus*, który został wyodrębniony w 2013 roku z próbki krwi 51-letniej laborantki [14] i podważał teorię niepatogenności tych bakterii.

Dotychczas opisano 23 gatunki bakterii z rodzaju *Alicyclobacillus* oraz dwa podgatunki *A. acidocaldarius* [30]. Ostatnio opisanymi gatunkami rodzaju są *Alicyclobacillus tengchongensis* wyodrębniony w 2014 roku z gleb gorącego źródła Tengchong w Chinach [24], *Alicyclobacillus dauci* izolowany w 2015 roku z zepsutych soków owocowych i warzywnych o wyraźnym zapachu gwajakolu [31] oraz Gram-zmienne bakterie *Alicyclobacillus fodiniaquatilis* izolowane z kwaśnych wód kopalnianych [44].

3. Charakterystyczne składniki błon komórkowych i ich funkcja

Cechą charakterystyczną bakterii z rodzaju *Alicyclobacillus* jest zawartość w błonach komórkowych ω -alicyklicznych kwasów tłuszczowych, kwasów tłuszczowych izo i anteizo oraz hopanoidów. Są to związki typowe dla pierwszych 5 gatunków tworzących trzon rodzaju *Alicyclobacillus*. Włączony do rodzaju w 2003 roku gatunek *A. pomorum* nie zawierał kwasów ω -alicyklicznych i do 2007 roku był jedynym wyjątkowym pod tym względem przedstawicielem swego rodzaju. Od 2007 roku wprowadzono do rodzaju *Alicyclobacillus* aż 6 gatunków wytwarzających jedynie kwasy tłuszczowe izo i anteizo [14–16, 21, 22], a reguła obecności kwasów ω -alicyklicznych w komórkach bakterii z rodzaju *Alicyclobacillus* przestała być normą.

Konsekwentnie, w komórkach wszystkich bakterii z rodzaju *Alicyclobacillus* stwierdza się obecność kwasów tłuszczowych izo i anteizo metylo-rozgałęzionych, najczęściej zawierających od 15 do 18 atomów węgla w głównym łańcuchu. U większości gatunków znajdowano również kwasy tłuszczowe proste zawierające w łańcuchu od 14 do 18 atomów węgla.

ω -alicykliczne kwasy tłuszczowe obecne w błonach komórkowych bakterii *Alicyclobacillus* to kwasy ω -cykloheksylowe i ω -cykloheptylowe. Zawierają one odpowiednio ω -cykliczną grupę heksylową bądź heptylową połączoną z łańcuchem alkilowym, najczęściej o długości od 11 do 20 atomów węgla. ω -alicykliczne kwasy heksylowe występują u większości gatunków z rodzaju *Alicyclobacillus*, zaś ω -alicykliczne kwasy heptylowe są charakterystyczne jedynie dla trzech gatunków rodzaju, którymi są *A. cycloheptanicus*, *A. herbarius* i *A. tengchongensis* [7, 15, 24]. Kwasy ω -alicykliczne występujące najczęściej u większości gatunków to kwas 17-cykloheksylopentadekanowy i kwas 19-cykloheksyloheptadekanowy.

Większość gatunków *Alicyclobacillus* ma wbudowane w błonę komórkową hopanoidy. Są to pentacykliczne triterpenoidy, które wspomagają płynność plazmalemmy, zwiększają jej sztywność i wytrzymałość oraz zmniejszają bierną dyfuzję jonów [35]. Wśród doniesień literaturowych można również odnaleźć informacje o sulfonolipidach w komórkach niektórych gatunków [43].

Obecnością w błonach komórkowych ω -alicyklicznych kwasów tłuszczowych, kwasów tłuszczowych izo i anteizo oraz hopanoidów tłumaczy się wyjątkową oporność bakterii z rodzaju *Alicyclobacillus* na wysokie temperatury i niskie pH [6]. Te komponenty błony komórkowej utrzymują odpowiednią strukturę warstwy fosfolipidów, przez co błona jest stabilna i bardziej wytrzymała. Ponadto, wykazano iż w błonach komórkowych bakterii z rodzaju *Alicyclobacillus*, których hodowle prowadzone są w wysokich tempera-

turach i przy niskim pH znajdują się w dużych ilościach ciasno upakowane kwasy ω -alicykliczne [7]. Wpływ kwasów ω -alicyklicznych na termo- i kwasooporność zasugerowano już w latach 70., gdy historia rodzaju *Alicyclobacillus* dopiero się kształtowała [12].

4. Charakterystyka morfologiczna i fizjologiczna

Komórki bakterii z rodzaju *Alicyclobacillus* mają kształt prostych laseczek o zaokrąglonych końcach. Wyjątkiem są bakterie *A. tolerans* występujące w formie lekko zakrzywionych laseczek [23]. Bakterie *Alicyclobacillus* zazwyczaj występują pojedynczo, rzadziej tworzą ugrupowania. *A. acidocaldarius*, *A. cycloheptanicus* i *A. tolerans* tworzą krótkie łańcuszki [23, 43], natomiast *A. disulfidooxidans* występują pojedynczo, parami bądź w łańcuszkach [13].

Wielkość komórek waha się w granicach 0,9–6,0 μm długości i 0,3–1,1 μm szerokości (Tab. I). Wymiary komórek są zróżnicowane, w zależności od gatunku. Wszystkie gatunki *Alicyclobacillus* sp. są przetrwalnikujące i w niekorzystnych warunkach środowiskowych wykształcają wyjątkowo ciepłooporne i kwasooporne endospory. Przetrwalniki są owalne lub elipsoidalne, ułożone terminalnie bądź subterminalnie. U większości gatunków endospory powodują deformację komórki. Powszechnie uważa się, że do rodzaju *Alicyclobacillus* zaliczamy bakterie ruchliwe. Jednakże rodzaj ten zawiera także kilka gatunków, które nie wykazują zdolności ruchu. Procentowa molowa zawartość guaniny i cytozyny w genoforze bakterii z rodzaju *Alicyclobacillus* waha się w granicach 48,1–62,5 w zależności od gatunku (Tab. I) [15, 23, 29].

Do rodzaju *Alicyclobacillus* należą bakterie Gram-dodatnie, Gram-ujemne oraz Gram-dodatnie zdolne do wykazywania Gram-zmienności (Tab. II) [1, 29, 39]. Niektóre publikacje tłumaczą Gram-zmienność jako zdolność tych bakterii do bardzo szybkiego odbarwienia podczas barwienia Grama, co w efekcie powoduje trudność w wizualnej ocenie efektu barwienia [33]. Z kolei, inne publikacje opisują to zjawisko jako zależne od wieku komórki [6, 7, 34], wskazując na pojawianie się Gram-zmienności u starzejących się komórek. Wynika to z subtelnych różnic w budowie ściany komórkowej bakterii Gram-zmiennych, w porównaniu do bakterii Gram-dodatnich [4].

Wśród bakterii z rodzaju *Alicyclobacillus* można wyróżnić zarówno bakterie chemoorganotroficzne, wykorzystujące związki organiczne jako źródło węgla jak i nieliczne bakterie miksotroficzne wykorzystujące dodatkowo składniki nieorganiczne (Tab. II). Heterotroficzny typ odżywiania *Alicyclobacillus* sp. charakteryzuje się zdolnością do metabolizowania różnych związków bez wytwarzania gazów. Bakterie wykorzystują

Tabela I
Zestawienie cech różnicujących gatunki bakterii z rodzaju *Alicyclobacillus*

Gatunek	Temperatura wzrostu (°C)		pH wzrostu		Zawartość G+C (% mol.)	Wielkość komórki dł. × szer. (µm)	Zdolność ruchu	Deformacja sporangium
	zakres	optimum	zakres	optimum				
<i>A. acidocaldarius</i>	45–70	63–65	2,0–6,0	3,0–4,0	60,3	2–3 × 0,7–0,8	+	–
<i>A. acidoterrestris</i>	35–55	42–53	2,2–5,8	4,0	52,2	2,9–4,3 × 0,9–1,0	+	+/-
<i>A. cycloheptanicus</i>	40–53	48	3,0–5,5	3,5–4,5	55,6	2,5–4,5 × 0,35–0,55	–	+
<i>A. hesperidum</i>	35–60	50–53	2,0–6,0	3,5–4,0	54,0	2,1–3,9 × 0,5–0,7	–	–
<i>A. herbarius</i>	35–65	55,6	3,0–6,5	4,5–5,0	56,2	bd	+	+
<i>A. acidiphilus</i>	20–55	50	2,5–5,5	3,0	54,1	4,8–6,3 × 0,9–1,1	+	+
<i>A. pomorum</i>	30–60	45–50	3,0–6,0	4,5–5,0	53,1	2,0–4,0 × 0,8–0,1	+	+
<i>A. sendaiensis</i>	40–65	55	2,5–6,5	5,5	62,3	2,0–3,0 × 0,8	–	+
<i>A. vulcanalis</i>	35–65	55	2,0–6,0	4,0	62,0	1,5–2,5 × 0,4–0,7	bd	bd
<i>A. tolerans</i>	20,55	37–42	1,5–5,0	2,5–2,7	48,1–49,3	3,0–6,0 × 0,9–1,0	–	+
<i>A. disulfidooxidans</i>	4–40	35	0,5–6,0	1,5–2,5	53,0	0,9–3,6 × 0,3–0,5	–	+
<i>A. sacchari</i>	30–55	45–50	2,0–6,5	4,0–4,5	56,6	4,0–5,0 × 0,6–0,7	+	+
<i>A. shizuokensis</i>	35–60	45–50	3,0–6,5	4,0–4,5	60,5	4,0–5,0 × 0,7–0,8	+	+
<i>A. kakegawensis</i>	40–60	50–55	3,0–6,5	4,0–4,5	61,3–61,7	4,0–5,0 × 0,6–0,7	+	+
<i>A. macrosporangiidus</i>	35–60	50–55	3,0–6,5	4,0–4,5	62,5	5,0–6,0 × 0,7–0,8	+	+
<i>A. fastidiosus</i>	20–55	40–45	2,0–5,5	4,0–4,5	53,9	4,0–5,0 × 0,9–1,0	–	+
<i>A. contaminans</i>	35–60	50–55	3,0–6,0	4,0–4,5	60,1–60,6	4,0–5,0 × 0,8–0,9	+	+
<i>A. ferrooxydans</i>	17–40	28	2,0–6,0	3,0	48,6	1,0–1,5 × 0,4–0,6	–	bd
<i>A. aeris</i>	25–35	30	2,0–6,0	3,5	51,2	1,5–2,5 × 0,4–0,6	+	bd
<i>A. cellulosityticus</i>	40–67,5	55	3,5–6,5	4,5	60,8	2,0–6,0 × 0,5–0,8	–	bd
<i>A. tengchongensis</i>	30–50	45	2,0–6,0	3,2	53,7	2,0–3,5 × 0,5–0,7	+	+
<i>A. dauci</i>	20–50	40	3,0–6,0	4,0	49,6	2,0–5,0 × 0,5–0,7	–	bd
<i>A. fodiniaquatilis</i>	20–45	40	2,5–5,5	3,5	49,8–51,3	1,5–5,0 × 0,5–0,8	–	bd

Oznaczenia: + występuje, – nie występuje, +/- cecha zmienna, bd brak danych. Na podstawie: [7, 8, 13–15, 16, 21–24, 29, 31, 39, 43, 44].

przede wszystkim różnorodnie węglowodany m.in. pentozy, heksozy, disacharydy i trisacharydy, a także alkohole wielowodorotlenowe, poliole, glikozydy, glukoniany, kwasy organiczne i aminokwasy [41]. Miksotrofizm wykazują *A. tolerans*, *A. disulfidooxidans*, *A. ferrooxydans*, *A. aeris* i *A. cellulosityticus* [16, 22, 23, 29]. Są to fakultatywne chemoorganotrofy, które dostosowują wymagania pokarmowe do panujących warunków środowiska. W niesprzyjających warunkach zmieniają metabolizm z heterotroficznego na autotroficzny i prowadzą utlenianie głównie żelaza, siarki elementarnej, siarczków, piryty, tetrasiarczanu i tiosiarczanu. Jednakże miksotrofy wykazują szybszy wzrost i większy przyrost biomasy w obecności jonów żelaza (II).

Z reguły, bakterie *Alicyclobacillus* sp. do wzrostu nie wymagają obecności dodatkowych czynników. Wyjątkiem są *A. cycloheptanicus*, aukstotrofy zależne od metioniny (lub witaminy B12), pantotenianu i izoleucyny [41]. Z kolei, bakterie *A. disulfidooxidans* w warunkach laboratoryjnych wymagają suplementacji pożywki np. ekstraktem drożdżowym [13].

Bakterie *Alicyclobacillus* sp. są ściśle tlenowe (obligatoryjne aeroby) i wykazują zdolność wzrostu jedynie w obecności tlenu. Wyjątkami są nieliczne gatunki zaliczane do względnych beztlenowców (fakultatywne anaeroby). Typ oddychania tych bakterii jest uzależniony od warunków środowiskowych, jednak i one najlepiej rosną w warunkach tlenowych. Głównym chinonem izoprenoidowym w łańcuchu oddechowym bakterii *Alicyclobacillus* jest menachinon-7 (MK-7) [38].

Bakterie z rodzaju *Alicyclobacillus* pod względem fizjologicznym i metabolicznym różnicuje m.in. zdolność do redukcji azotanów, wytwarzania indolu i acetoiny, zdolność do hydrolizy związków takich jak np. żelatyna, skrobia, eskulina, tyrozyna, fenyloalanina oraz obecność enzymów katalazy i oksydazy [41, 29]. Większość bakterii *Alicyclobacillus* sp. nie jest zdolna do redukcji azotanów, nie wytwarza oksydazy oraz indolu i acetoiny (Tab. II).

Charakterystycznymi metabolitami bakterii z rodzaju *Alicyclobacillus* są gwajakol i halofenole (2,6-dibromofenol i 2,6-dichlorofenol), powodujące

Tabela II
Zestawienie cech różnicujących gatunki bakterii z rodzaju *Alicyclobacillus*

Gatunek	Obecność enzymów		Metabolity			Redukcja azotanów	Hydrolizowany substrat		Wynik barwienia Grama	Sposób odżywiania
	katalazy	oksydazy	gwajakol	indol	acetoina		skrobia	żelatyna		
<i>A. acidocaldarius</i>	+	-	+	-	+/-	-	+	+	dotądnie	heterotrofizm
<i>A. acidoterrestris</i>	+	-	+	-	+/-	-	+	-	zmiennie	heterotrofizm
<i>A. cycloheptanicus</i>	+	+	+	bd	bd	-	-	-	dotądnie	heterotrofizm
<i>A. hesperidum</i>	+/-	-	+	bd	bd	-	+	+	dotądnie	heterotrofizm
<i>A. herbarius</i>	+	-	+	-	-	+	-	-	dotądnie	heterotrofizm
<i>A. acidiphilus</i>	+	-	+	-	+/-	-	-	-	dotądnie	heterotrofizm
<i>A. pomorum</i>	+	+	+	bd	bd	-	+	+	zmiennie	heterotrofizm
<i>A. sendaiensis</i>	-	-	bd	+	+	+	bd	bd	ujemne	heterotrofizm
<i>A. vulcanalis</i>	-	-	bd	bd	bd	bd	bd	+	dotądnie	heterotrofizm
<i>A. tolerans</i>	+/-	+/-	bd	bd	bd	-	-	+	dotądnie	miksotrofizm
<i>A. disulfidooxidans</i>	-	-	bd	bd	bd	-	-	+	dotądnie	miksotrofizm
<i>A. sacchari</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	zmiennie	heterotrofizm
<i>A. shizuokensis</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	zmiennie	heterotrofizm
<i>A. kakegawensis</i>	+/-	-	-	-	-	+/-	-	-	zmiennie	heterotrofizm
<i>A. macrosporangiidus</i>	+/-	-	-	-	-	-	-	-	zmiennie	heterotrofizm
<i>A. fastidiosus</i>	+	-	-	-	-	+/-	+	-	zmiennie	heterotrofizm
<i>A. contaminans</i>	-	-	-	-	-	+/-	+	-	zmiennie	heterotrofizm
<i>A. ferrooxydans</i>	+	+	bd	+	-	-	-	+	dotądnie	miksotrofizm
<i>A. aeris</i>	-	-	bd	-	-	+	+	-	zmiennie	miksotrofizm
<i>A. cellulolyticus</i>	-	-	bd	-	-	-	-	-	ujemne	miksotrofizm
<i>A. tengchongensis</i>	+	-	bd	-	bd	-	+	+	dotądnie	bd
<i>A. dauci</i>	+	-	+	bd	bd	bd	bd	bd	zmiennie	bd
<i>A. fodiniaquatilis</i>	-	-	bd	-	-	-	+/-	-	zmiennie	bd

Oznaczenia: + występuje, - nie występuje, +/- zmiennie, bd brak danych. Na podstawie: [7, 8, 13-15, 16, 21-24, 29, 31, 39, 43, 44].

nieprzyjemny zapach skażonych produktów. Gwajakol to związek organiczny z grupy fenoli (2-metoksyfenol), który powstaje w wyniku aktywności metabolicznej niektórych gatunków bakterii z rodzaju *Alicyclobacillus* [7, 26]. Nie wszystkie gatunki *Alicyclobacillus* sp. są zdolne do wytwarzania gwajakolu [6]. Gwajakol jest często tworzony przez te bakterie w sokach owocowych. W zepsutych produktach występuje nawet w 1000-krotnie wyższych stężeniach niż halofenole, a jego zapach określany jest jako słodki, dymny [26], medyczny, fenolowy [42], czy chemiczny [7]. Prekursorem gwajakolu w sokach jest kwas ferulowy, a także wanilina i kwas wanilinowy. Kwas ferulowy jest głównym składnikiem ligniny i obficie występuje w ścianach komórek roślinnych. Przy udziale enzymów bakteryjnych może być metabolizowany do waniliny i kwasu wanilinowego, które są następnie przekształcone do gwajakolu. Innym prekursorem gwajakolu jest tyrozyna, która w wysokim stężeniu występuje w soku jabłkowym [42]. Czynniki warunkujące produkcję gwajakolu to poziom namno-

żenia bakterii *Alicyclobacillus* sp., temperatura przechowywania i szok cieplny. Gwajakol zaczyna być wyczuwalny, gdy liczba komórek *A. acidoterrestris* osiąga poziom 10^5 jtk/ml w przypadku większości soków np. jabłkowego, pomarańczowego; bądź 10^4 jtk/ml w przypadku soku z białych winogron [26]. Skaza ta zazwyczaj jest wyczuwalna po 4 dniach przechowywania soków w temperaturze ok. 30°C. Szybkość produkcji gwajakolu przez *Alicyclobacillus* sp. wzrasta wraz ze wzrostem temperatury inkubacji. Ponadto, należy pamiętać, że związek ten wytwarzają komórki wegetatywne, a szok cieplny stymuluje kiełkowanie spor. Gwajakol jest bardzo łatwo wyczuwalny ze względu na niski próg wrażliwości sensorycznej. Stężenie progowe w wodzie wynosi 0,021 ppm w przypadku wrażliwości zapachowej i 0,013 ppm dla wrażliwości smakowej. Próg wrażliwości zapachowej w sokach wynosi około 2 ppb [17]. Gwajakol jest często wykorzystywany jako syntetyczny środek aromatyzujący do wytwarzania zapachu dymu, wędzenia i spalenizny. Zawdzięczamy mu

charakterystyczny zapach niektórych gatunków palonej kawy Arabica i słoju jęczmiennego [26]. Halofenole powodują powstawanie nieprzyjemnego zapachu określanego podobnie jak w przypadku gwajakolu jako dezynfekcyjny i medyczny. Jednakże obecność tych związków nie zawsze oznacza zanieczyszczenie mikrobiologiczne, a może świadczyć o zanieczyszczeniu chemicznym środkami dezynfekcyjnymi zawierającymi fenol i jego pochodne. Bakterie *A. acidoterrestris* są zdolne do wytwarzania halofenoli w sokach, ze względu na obecność haloperoksydaz – systemu enzymów przeprowadzających reakcję fluorowcowania [7]. Haloperoksydazy bakteryjne nie wymagają obecności kofaktorów, a prekursorzy fenolowe, nadtlenuk wodoru oraz jony halogenków będące substratami reakcji są naturalnie obecne w sokach. Czynniki warunkujące produkcję halofenoli przez *Alicyclobacillus* sp. są takie same jak w przypadku gwajakolu, dodatkowo istotna jest objętość pomiędzy sokiem a opakowaniem. Im większa jest ta przestrzeń tym szybsza i intensywniejsza produkcja halofenoli [7].

5. Wykrywanie bakterii z rodzaju *Alicyclobacillus*

Do rutynowych metod izolacji bakterii z rodzaju *Alicyclobacillus* z zawiesiny gleby oraz napojów i soków zaliczamy filtrację membranową [6] oraz metodę DEFT (Direct Epifluorescent Filter Technique) [7]. Obecnie, jest to rutynowa metoda stosowana w kontroli jakości soków i koncentratów soków w zakładach produkcyjnych.

Ze względu na niski poziom zanieczyszczenia bakteriami *Alicyclobacillus* sp. przed wykonaniem posiewów stosuje się procedurę wstępnego wzbogacania [42]. W celu aktywacji przetrwalników wykonuje się szok termiczny (80°C, 10 minut) i próbki soków inkubuje się w temperaturze 40–50°C przez 48 h, a następnie posiewy na pożywki specyficzne dla tych bakterii.

Tradycyjne metody identyfikacji *Alicyclobacillus* obejmują standardowe testy morfologiczne i biochemiczne oraz wykrywanie obecności gwajakolu metodami chromatograficznymi np. chromatografii gazowej GC (Gas Chromatography) bądź wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Profil biochemiczny bakterii określa się za pomocą testów API 50CH [26].

Standardowa metoda hodowlana wykorzystywana do wykrywania bakterii z rodzaju *Alicyclobacillus* polega na inokulacji zawiesiny bakterii po szoku termicznym (80°C ± 1°) na bulion ziemniaczany PDB (Potato Dextrose Broth) o pH 3,5 i inkubacji w temperaturze 46°C przez 3 dni [6]. Następnie, wykonuje się posiew redukcyjny na pożywkę PDA (Potato Dextrose Agar) i inkubuje przez 2 dni w temperaturze 46°C. Eta-

pem końcowym jest wykonanie testu potwierdzającego, który polega na przeniesieniu typowych kolonii na pożywkę PCA (Plate Count Agar) o pH 7,0 i inkubacji w temperaturze 46°C przez 3 dni. Bakterie z rodzaju *Alicyclobacillus* nie wykazują zdolności do wzrostu na tej pożywce.

Inny sposób wykrywania *Alicyclobacillus* sp. nie obejmuje szoku termicznego i polega na wykonaniu posiewu próbki na pożywkę PDA o pH 3,5 i inkubacji w temperaturze 46°C przez 3 dni [6] oraz testów potwierdzających.

Test potwierdzający obecność bakterii *A. acidocaldarius* przeprowadza się z wykorzystaniem pożywki BAM (Bacillus Acidocaldarius Medium) z dodatkiem erytrytolu i błękitu bromofenolowego. Hodowlę prowadzi się przy pH 4,0 i w temperaturze 60°C przez 3 dni [6]. *A. acidocaldarius* na tej pożywce rośnie w postaci niebieskich kolonii. Popularnym testem potwierdzającym obecność *A. acidoterrestris* jest sprawdzenie zdolności wzrostu na pożywce OSA (Orange Serum Agar) o pH 4,0 oraz niezdolności wzrostu na pożywce OSA o pH 7,0 i wyższym [42].

Wykrywanie bakterii z rodzaju *Alicyclobacillus* zgodnie ze standardem IFU (International Federation of Fruit Juice Producers) w koncentratkach soków i surowcach przebiega w kilku etapach [20]. Po homogenizacji w rozcieńczonej płynnej pożywce BAT lub YSG (1:10) próbki przeprowadza się szok temperatury (80°C ± 1°C, 10 minut). Następnie prowadzi się wstępne wzbogacanie, polegające na inkubacji próbki z pożywką w temperaturze 45 ± 1°C. Opcjonalnie, można również wykonać bezpośrednią inokulację próbki po szoku termicznym na zalecane pożywki bądź przeprowadzić jej filtrację przez filtr membranowy o wielkości porów 0,45 µm. Kolejnym etapem jest inokulacja na pożywkę agarową K agar (Kirin Agar) oraz BAT (Bacillus Acidoterrestris Thermophilic Agar) lub YSG (Yeast Starch Glucose Agar) i inkubacja w temperaturze 45 ± 1°C od 2 do 5 dni. Ostatnim etapem są testy potwierdzające. W tym celu wykonuje się sprawdzenie zdolności wzrostu bakterii w temperaturze 45 ± 1°C oraz 65 ± 1°C, a także na pożywce PCA, TSA (Tryptic Soy Agar) lub BHI (Brain Heart Infusion Agar) o pH 3,7 oraz 7,0. Dodatkowo, można wykonać test sprawdzający zdolność do produkcji gwajakolu z wykorzystaniem bulionu YSG zawierającego kwas waniliowy (YSGVA, Yeast Starch Glucose Vanillic Acid).

Bakterie wytwarzające przetrwalniki podczas hodowli w temperaturze 45 ± 1°C na pożywkach o pH 3,7 oraz nie wykazujące wzrostu na pożywkach o pH powyżej 6 i podczas hodowli w temperaturze 65 ± 1°C to bakterie *Alicyclobacillus* [20]. Oceniając wyniki testu sprawdzającego zdolność do produkcji gwajakolu, należy uwzględnić fakt, iż nie wszystkie bakterie z rodzaju *Alicyclobacillus* są zdolne do wytwarzania gwajakolu.

Wykrywanie bakterii *Alicyclobacillus* sp. w sokach lub napojach owocowych polega na wstępnej preinkubacji oryginalnie zapakowanego produktu w temperaturze $45 \pm 1^\circ\text{C}$ przez 7 dni [20]. Następnie, zalecane jest wykonanie inokulacji preinkubowanego produktu na pożywkę agarową K agar oraz BAT lub YSG i inkubacji w temperaturze $45 \pm 1^\circ\text{C}$ przez 2–5 dni. Ostatnim etapem jest wykonanie testów potwierdzających.

Do szybkiej detekcji bakterii z rodzaju *Alicyclobacillus* powszechnie wykorzystuje się metody biofizyczne i metody biologii molekularnej, takie jak technika PCR (Polymerase Chain Reaction), Real Time PCR, RT-PCR (Reverse Transcription PCR), Taqman real-time PCR, sekwencjonowanie genu 16S rRNA, spektroskopię w podczerwieni z transformacją Fouriera FT-IR, analizę RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA), sekwencjonowanie genu 16S rRNA oraz test ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Najczęściej metody genetyczne opierają się na wykrywaniu charakterystycznych dla bakterii *Alicyclobacillus* sp. genów *SHC* kodującego enzym szlaku biosyntezy hopanoidów oraz *VIT-Alicyclobacillus* [19, 26]. Powyższe metody zapewniają jednoznaczność identyfikację, jednakże są kosztowne i pracochłonne i nie stanowią rutynowych procedur kontroli czystości mikrobiologicznej soków owocowych.

Powszechnie stosowaną metodą detekcji skażenia produktów owocowych przez *Alicyclobacillus* są testy na obecność gwajakolu, zarówno sensoryczne, jak i chemiczne [26]. Analiza sensoryczna najczęściej wykonywana jest z użyciem elektronicznego nosa. Procedury wykrywania gwajakolu zakładają zastosowanie metod fizykochemicznych m.in. GC-FID (Gas Chromatography with Flame Ionisation Detection), GC-O (Gas Chromatography with Olfactometry), GC-MS (Gas Chromatography with Mass Spectrometry), HPLC (High Performance Liquid Chromatography), LLE (Liquid-Liquid Extraction), SPE (Solid Phase Extraction), SPME (Solid Phase Microextraction), HS-SPME (Headspace Solid Phase Microextraction). Analiza chemiczna opiera się na spektrofotometrycznym pomiarze ($\lambda = 420 \text{ nm}$) 3,3'-dimetoksy-4,4'-bifenochinonu, który powstaje w wyniku utlenienia gwajakolu przez peroksydazę w obecności nadtlenu wodoru. Obecnie dostępne są gotowe zestawy do identyfikacji gwajakolu opierające się na powyższej reakcji, które umożliwiają hodowlę mikroorganizmów w pożywkach YSG oraz BAT wzbogaconych w kwas wanilinowy (YSGVA, BATVA).

6. Podsumowanie

Rodzaj *Alicyclobacillus* zawiera niepatogenne, tlenowe, przetrwalnikujące bakterie, wytwarzające ω -alicykliczne kwasy tłuszczowe, hopanoidy oraz kwasy

tłuszczowe izo i anteizo. Do rodzaju należą zarówno bakterie Gram-dodatnie, Gram-ujemne jak i Gram-dodatnie z tendencją do Gram-zmienności. Na temat bakterii z rodzaju *Alicyclobacillus* nadal stosunkowo niewiele wiadomo. Rodzina *Alicyclobacillaceae* ciągle jest modyfikowana, a w rodzaju *Alicyclobacillus* przybywają nowe gatunki. Wysoce termooporne bakterie *Alicyclobacillus* sp. nie są deaktywowane w procesie standardowej pasteryzacji soków owocowych w niskim pH. Dodatkowo, bakterie *A. acidoterrestris* stanowiące powszechne zanieczyszczenia soków określono jako mikroorganizmy o szybkim tempie ewolucji, a tym samym szybkiej adaptacji do warunków środowiska. Niepokój budzi fakt, iż nie wdrożono skutecznej metody niszczenia tych bakterii w sokach owocowych. Jedyny dostępny i skuteczny sposób walki z *Alicyclobacillus* poprzez stosowanie konserwantów, nie jest akceptowany przez podążających w kierunku ekologicznego sposobu odżywiania konsumentów.

Piśmiennictwo

1. Alberice J.A., Funes-Huacca M.E., Guterres S.B., Carrilho E.: Inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in orange juice by saponin extracts combined with heat-treatment. *Int. J. Food Microbiol.* **159**, 130–135 (2012)
2. Baek S.-H., Cui Y., Kim S.-C., Cui C.-H., Yin C., Lee S.-T., Im W.-T.: *Tumebacillus ginsengisoli* sp. nov., isolated from soil of a ginseng field. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **61**, 1715–1719 (2011)
3. Bahçeci K.S., Gokmen V., Serpen A., Acar J.: The effect of different technologies on *Alicyclobacillus acidoterrestris* during apple juice production. *Eur. Food Res. Technol.* **217**, 249–252 (2003)
4. Beveridge T.J.: Mechanism of gram variability in select bacteria. *J. Bacteriol.* **172**, 1609–1620 (1990)
5. Cerny G., Hennlich W., Poralla K.: Spoilage of fruit juice by bacilli: isolation and characterisation of the spoiling microorganism. *Z. Lebensm. Unters. For.* **179**, 224–227 (1984)
6. Chang S.-S.: Guaiacol producing *Alicyclobacillus* spp. – differentiation, detection, and control. Doctoral thesis, Washington State University, School of Food Science, 2008
7. Chang S.-S., Kang D.-H.: *Alicyclobacillus* spp. in the fruit juice industry: history, characteristics, and current isolation/detection procedures. *Crit. Rev. Microbiol.* **30**, 55–74 (2004)
8. Darland G., Brock T.D.: *Bacillus acidocaldarius* sp. nov., an acidophilic thermophilic spore-forming bacterium. *J. Gen. Microbiol.* **67**, 9–15 (1971)
9. Deinhard G., Blanz P., Poralla K., Altan E.: *Bacillus acidoterrestris* sp. nov., a new thermotolerant acidophile isolated from different soils. *Syst Appl Microbiol.* **10**, 47–53 (1987)
10. Deinhard G., Saar J., Krischke W., Poralla K.: *Bacillus cycloheptanicus* sp. nov., a new thermoacidophile containing ω -cycloheptane fatty acids. *Syst. Appl. Microbiol.* **10**, 68–73 (1987)
11. De Rosa M., Gambacorta A., Minale L.: Cyclohexane fatty acids from a thermophilic bacterium. *J. Chem. Soc. D*, **1**, 1334–1334 (1971)
12. De Rosa M., Gambacorta A., Bu'lock, J.D.: Effects of pH and temperature on the fatty acid composition of *Bacillus acidocaldarius*. *J. Bacteriol.* **117**, 212–214 (1974)
13. Dufresne S., Bousquet J., Boissinot M., Guay R.: *Sulfobacillus disulfidooxidans* sp. nov., a new acidophilic, disulfide-oxidizing,

- gram-positive, spore-forming bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**, 1056–1064 (1996)
14. Glaeser S.P., Falsen E., Martin K., Kampfer P.: *Alicyclobacillus consociatus* sp. nov., isolated from a human clinical specimen. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **63**, 3623–3627 (2013)
 15. Goto K., Mochida K., Kato Y., Asahara M., Fujita R., An S.-Y., Kasai H., Yokota A.: Proposal of six species of moderately thermophilic, acidophilic, endospore-forming bacteria: *Alicyclobacillus contaminans* sp. nov., *Alicyclobacillus fastidiosus* sp. nov., *Alicyclobacillus kakegawensis* ssp. nov., *Alicyclobacillus macrosporangiidus* sp. nov., *Alicyclobacillus sacchari* sp. nov. and *Alicyclobacillus shizuokensis* ssp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**, 1276–1285 (2007)
 16. Guo X., You X.-Y., Liu L.-J., Zhang J.-Y., Liu S.-J., Jiang C.-Y.: *Alicyclobacillus aeris* sp. nov., a novel ferrous – and sulfur-oxidizing bacterium isolated from a copper mine. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**, 2415–2420 (2009)
 17. Groenewald W.H., Gouws, P.A., Witthuhn R.C.: Thermal inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores isolated from a fruit processing plant and grape juice concentrate in South Africa. *Afr. J. Microbiol. Res.* **7**, 2736–2740 (2013)
 18. Hippchen B., Röhl A., Poralla K.: Occurrence in soil of thermophilic bacilli possessing ω -cyclohexane fatty acids and hopanoids. *Arch. Microbiol.* **129**, 53–55 (1981)
 19. Huang X.-C., Yuan Y.-H., Guo C.-F., Gekas V., Yue T.-L.: *Alicyclobacillus* in the fruit juice industry: spoilage, detection, and prevention/control. *Food Rev. Int.* **31**, 91–124 (2015)
 20. IFU Method on the Detection No. 12, International Federation of Fruit Juice Producers (2007)
 21. Imperio T., Viti C., Marri L.: *Alicyclobacillus pohliae* sp. nov., a thermophilic, endospore-forming bacterium isolated from geothermal soil of the north-west slope of Mount Melbourne (Antarctica). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**, 221–225 (2008)
 22. Jiang C.-Y., Liu Y., Liu Y.-Y., You X.-Y., Guo X.: *Alicyclobacillus ferrooxydans* sp. nov., a ferrous-oxidizing bacterium from solfataric soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**, 2898–2903 (2008)
 23. Karavaiko G.I., Bogdanova T.I., Tourova T.P., Kondrateva T.F., Tsaplina I.A., Egorova M.A., Krasil'nikova E.N., Zakharchuk M.L.: Reclassification of *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* subsp. thermotolerans strain K1 as *Alicyclobacillus tolerans* sp. nov. and *Sulfobacillus disulfidooxidans* Dufresne et al., 1996 as *Alicyclobacillus disulfidooxidans* comb. nov., and emended description of the genus *Alicyclobacillus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**, 941–947 (2005)
 24. Kim M.G., Lee J.-C., Park D.-J., Li W.-J., Kim C.-J.: *Alicyclobacillus tengchongensis* sp. nov., a thermo-acidophilic bacterium isolated from hot spring soil. *J. Microbiol.* **52**, 884–889 (2014)
 25. Klenk H.-P., Eisen A.J. i wsp.: Complete genome sequence of the thermophilic, hydrogen-oxidizing *Bacillus tusciae* type strain (T2T) and reclassification in the new genus, *Kyrpidia* gen. nov. as *Kyrpidia tusciae* comb. nov. and emendation of the family *Alicyclobacillaceae* da Costa and Rainey, 2010. *Stand. Genomic Sci.* **5**, 121–134 (2011)
 26. Kumar R., Bawa A.S., Kathiravan T., Nadanasabapathi S.: Inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* by non-thermal processing technologies – a Review. *IJAR.* **8**, 386–395 (2013)
 27. Kunicka A.: Wykrywanie obecności mikroflory acidotermofilnej w sokach owocowych za pomocą systemu BacT/ALERT. *Aktualności bio/Merieux*, **33**, 21–23 (2005)
 28. Kunicka-Styczyńska A.: Bakterie *Alicyclobacillus acidoterrestris* problem aktualny w przemyśle sokowniczym. *Przem. Spoż.* **63**, 34–37 (2009)
 29. Kusube M., Sugihara A., Moriwaki Y., Ueoka T., Shimane Y., Minegishi H.: *Alicyclobacillus cellulolyticus* sp. nov., a thermophilic, cellulolytic bacterium isolated from steamed Japanese cedar chips in lumbermill. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **64**, 2257–2263 (2014)
 30. List of prokaryotic names with standing in nomenclature, www.bacterio.net/alicyclobacillus.html, 26.10.2017
 31. Nakano C., Takahashi N., Tanaka N., Okada S.: *Alicyclobacillus dauci* sp. nov., a slightly thermophilic, acidophilic bacterium isolated from a spoiled mixed vegetable and fruit juice product. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **65**, 716–722 (2015)
 32. Nazina T.N., Ivanov M.V. i wsp.: Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen.nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothersmophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothersmophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 433–446 (2001)
 33. Sapers G.M., Gorny J.R., Yousef A.E.: Microbiology of fruits and vegetables. CRC Press Taylor & Francis Group. Boca Raton, London, New York, 2006, s. 136–187
 34. Satora P.: *Alicyclobacillus acidoterrestris* – przetrwalnikująca bakteria skażająca soki. *Lab. Przem.* **5**, 20–24 (2009)
 35. Seipke R.F., Loria R.: Hopanoids are not essential for growth of *Streptomyces scabies* 87–22. *J. Bacteriol.* **191**, 5216–5223 (2009)
 36. Smit Y., Cameron M., Venter P., Witthuhn R.C.: *Alicyclobacillus* spoilage and isolation – A review. *Food Microbiol.* **28**, 331–349 (2011)
 37. Steven B., Chen M.Q., Greer C.W., Whyte L.G., Niederberger T.D.: *Tumebacillus permanentifrigoris* gen. nov., sp. nov., an aerobic, spore-forming bacterium isolated from Canadian high Arctic permafrost. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**, 1497–1501 (2008)
 38. Tianli Y., Jiangbo Z., Yahong Y.: Spoilage by *Alicyclobacillus* bacteria in juice and beverage products: chemical, physical, and combined control methods. *Compr. Rev. Food Sci. F.* **13**, 771–797 (2014)
 39. Tsuruoka N., Isono Y., Shida O., Hemmi H., Nakayama T., Nishino T.: *Alicyclobacillus sendaiensis* sp. nov., a novel acidophilic, slightly thermophilic species isolated from soil in Sendai, Japan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**, 1081–1084 (2003)
 40. Uchino F., Doi S.: Acido-thermophilic bacteria from thermal waters. *Agric. Biol. Chem.* **31**, 817–822 (1967)
 41. Vos P., Garrity G., Jones D., Krieg N.R., Ludwig W., Fred A.R., Schleifer K.-H., Whitmann W.B.: Bergey's manual of systematic bacteriology. Volume 3. The Firmicutes. Springer, Dordrecht, Heidelberg, London, New York, 2009, s. 229–243
 42. Walker M., Phillips C.A.: *Alicyclobacillus acidoterrestris*: an increasing threat to the fruit juice industry? *Int. J. Food Sci. Tech.* **43**, 250–260 (2008)
 43. Wisotzkey J.D., Jurtshuk P., Fox G.E., Deinhard G., Poralla K.: Comparative sequence analyses on the 16s rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris*, and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus, *Alicyclobacillus* gen. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **42**, 263–269 (1992)
 44. Zhang B., Wu Y.-F., Song J.-L., Huang Z.-S., Wang B.-J., Liu S.-J., Jiang C.-Y.: *Alicyclobacillus fodiniaquatilis* sp. nov., isolated from acid mine water. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **65**, 4915–4920 (2015)