

陕西省果库中嗜酸耐热菌的分离鉴定\*

岳田利 耿玉丽 袁亚宏 郭彩霞  
(西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西杨凌 712100)

**摘要:** 为探明陕西省果库中嗜酸耐热菌的分布情况,采用酸化的 AAM 培养基对陕西果库中的空气和苹果中的嗜酸耐热菌进行分离纯化,与参比菌株 *A. acidoterrestris* DSM3922<sup>T</sup>进行细胞形态、菌落形态和生长条件、生理生化特征的比较分析,并以 16S rDNA 序列分析构建系统发育树,明确了 8 株分离菌的遗传学位置。分离株 LC-4 与标准菌的形态和生理生化特性有很大的相似性,16S rDNA 序列分析表明 LC-4 与标准菌的同源性达 99%,可判定为酸土脂环酸芽孢杆菌,其他 7 株属于芽孢杆菌。结果表明嗜酸耐热菌在果库中确有分布,可能对果汁质量造成威胁,需要加强控制。

**关键词:** 苹果汁 嗜酸耐热菌 分离 16S rDNA 鉴定

**中图分类号:** S182; X924.3      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1000-1298(2013)07-0187-07

Isolation and Identification of *Alicyclobacillus* from Shaanxi Apple Libraries

Yue Tianli Geng Yuli Yuan Yahong Guo Caixia  
(College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** In order to make sure the distribution of *Alicyclobacillus* from apple libraries in Shaanxi province, the *Alicyclobacillus* in apple and air were isolated and purified by using acidified AAM medium. The cell morphology, colony morphology, growing conditions, cultural characteristics and physiological characteristics were compared with the reference strain *A. acidoterrestris* DSM3922<sup>T</sup>. A phylogenetic tree based on 16S rDNA sequence analysis was constructed. The genetic location of eight isolated strains was clear. The isolated strain LC-4 was basically consistent with the reference stain *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM3922<sup>T</sup> in morphology and physiological characteristics. By 16S rDNA sequence analysis, isolated strain LC-4 shared a homology of 99% with the reference strain, so it belonged to *A. acidoterrestris* and the other seven strains belonged to *Bacillus ginsengihui*. The results suggested *Alicyclobacillus* was distributed in orchard soil, which might pose a threat to the quality of fruit juice, and needed to be controlled.

**Key words:** Apple juice *Alicyclobacillus* Isolation 16S rDNA Identification

引言

嗜酸耐热菌,又称脂环酸芽孢杆菌(*Alicyclobacillus*),是一类嗜酸、耐热、革兰氏阳性可变、产芽孢的杆菌。自 1984 年,Cerny 首次从腐败果汁中分离出嗜酸耐热菌后<sup>[1]</sup>,各国学者相继在果汁中发现此类具有嗜酸耐热性质,且结构区别于一般芽孢杆菌的细菌<sup>[2~3]</sup>。嗜酸耐热菌的细胞膜组比

较特殊,含有环己烷脂肪酸,这可能与它能够在高温和高酸条件下生存有关<sup>[4]</sup>。嗜酸耐热菌属中存在一些类似于酸土脂环酸芽孢杆菌(*A. acidoterrestris*)的腐败菌,可以引起巴氏灭菌苹果汁的腐败而使果汁的感官品质发生劣变,不仅在果汁中会形成白色沉淀或雾状浑浊,甚至会产生令人不适的气味<sup>[5~8]</sup>,芽孢可污染果汁生产中的半成品和生产材料,包括浓缩苹果汁和加工用水等<sup>[9]</sup>。研究发现,由于其耐

收稿日期: 2013-01-10 修回日期: 2013-01-22  
\* “十二五”国家科技支撑计划资助项目(2012BAD31B01)、国家自然科学基金面上项目(31071550、31171721)和农业部“948”项目  
作者简介: 岳田利,教授,博士生导师,主要从事食品生物工程研究,E-mail: yuetl@nwsuaf.cn

热、耐酸性,嗜酸耐热菌在浓缩苹果汁的加工过程中极难控制和去除,浓缩苹果汁中的嗜酸耐热菌越来越受到关注<sup>[10~13]</sup>。

本文对陕西省果库中的空气和苹果中的嗜酸耐热菌进行分离纯化,对纯化后的菌种进行耐热性、嗜酸性的筛选,并研究生长特性以及生理生化特性,最后结合 16S rDNA 将菌种鉴定到种的水平,以明确嗜酸耐热菌在浓缩苹果汁全产业链果库阶段的分布情况,为嗜酸耐热菌的快速检测和苹果汁的优质生产提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种和培养基

#### 1.1.1 菌种

标准菌:*Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM3922<sup>T</sup>, 购自德国菌种保藏中心。

#### 1.1.2 培养基

AAM 培养基:2 g 葡萄糖,2 g 酵母浸膏,0.4 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,1 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,0.5 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,1.2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,0.5 g  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,15 g 琼脂,1 L 蒸馏水。

LB 培养基:10 g 胰蛋白胨,10 g 酵母粉,5 g NaCl,15 g 琼脂,1 L 蒸馏水,混匀后灭菌备用。

### 1.2 主要仪器和设备

UV-2550 型紫外可见分光光度计(日本岛津公司);HC-3018R 型高速冷冻离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司);HH-6 型恒温水浴锅(上海福玛实验设备有限公司);JA2003 型电子天平(上海精密科学仪器有限公司);PHS-3C 型酸度计(上海虹益仪器厂);CX31 型显微镜(奥林巴斯公司);PTC-200 型 PCR 仪(MJ Research 公司);DYY-7C 型电泳仪(北京六一仪器厂);Dolphin-doc 型凝胶成像系统(美国 Wealtec 公司)。

### 1.3 样品采集

采自陕西省洛川县、白水縣、蒲城县和扶风县的果库。

空气样的采集:将事先配制好的 AAM 培养基按照五点采样法置于果库中,缓慢打开培养皿盖,在空气中放置 5 min,其中每点设重复采样皿一个和空白对照皿一个(不打开皿盖),将收集好的样品带回后迅速分析<sup>[14]</sup>。

苹果样品的采集:从每个果库中随机选取健康苹果 1.5 kg,放入无菌袋中,迅速带回进行分析。

### 1.4 嗜酸耐热菌的分离与纯化

#### 1.4.1 空气样品

将采集的样品于 45℃ 培养,培养 2~5 d 后,挑

单菌落进行划线分离<sup>[14]</sup>。

#### 1.4.2 苹果样品

在无菌条件下,取适量的苹果皮加入盛有 100 mL AAM 液体培养基的三角瓶中,置 80℃ 水浴中 10 min 进行热休克处理(刺激孢子萌发),然后迅速用冰水冷却至 45℃。在 45℃,150 r/min 摇床培养 2 d。选取合适的梯度稀释后各取 200  $\mu\text{L}$  接种于 AAM 培养基培养平板上,45℃ 培养 2~5 d,挑取单菌落进行划线分离。

将样品中分离到的单菌落进行涂片,经复红染色后,在光学显微镜下观察其形态和纯度。含有杂菌的分离株用划线分离法再次进行纯化,纯化后的菌株于 4℃ 保存。

### 1.5 嗜酸耐热菌的筛选

#### 1.5.1 耐热性试验

将分离菌株的纯培养物置于无菌水中制成菌悬液,先在 80℃ 水浴中进行 10 min 的热休克处理,再采用涂布法接种于 AAM 培养基固体平板上,45℃ 培养,可以在 AAM 培养基固体平板上形成菌落的分离菌株为耐热菌<sup>[10~12]</sup>。

#### 1.5.2 耐酸性试验

将分离菌株划线接种于 LB 培养基固体平板(pH 值 7.2)上,在 45℃ 恒温培养箱中培养 48 h,若分离菌株在 LB 培养基平板上不能形成菌落则为嗜酸菌<sup>[13~15]</sup>。

### 1.6 细胞形态观察

选取 24 h 内培养菌株的纯培养物,按照《常见细菌鉴定系统手册》的方法进行简单染色,在光学显微镜下观察分离株的细胞形态<sup>[16]</sup>。

### 1.7 生长条件试验

#### 1.7.1 最适生长 pH 值的确定

采用 1 mol/L 的  $\text{H}_2\text{SO}_4$  溶液调整 AAM 液体培养基的 pH 值,测定菌株生长的最适 pH 值。标准菌和分离菌在液体 AAM(pH 值 4.0)中培养 18 h,作为种子液。配制 pH 值分别为 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0 的 AAM 液体培养基,以种子液接种各 1 mL,培养 24 h 后观察 600 nm 处的吸光度<sup>[17]</sup>。

#### 1.7.2 最适生长温度的确定

从标准菌和分离菌的种子液中,各取 1 mL,接种在 AAM 液体培养基(pH 值 4.0)中,分别置于 20、30、40、50、60 和 70℃ 条件下培养 24 h,观察 600 nm 处的吸光度<sup>[17]</sup>。

#### 1.7.3 0.05 g/mL NaCl 生长试验

每 100 mL AAM 固体培养基中加入 5 g NaCl,经灭菌后制备为固体平板,再将各分离菌株接种于此固体平板上,45℃ 培养 1~2 d,观察生长情况,有菌

落形成即为阳性,没有菌落则为阴性。

1.8 生理生化反应

参照《常见细菌系统鉴定手册》的方法对所有分离菌株进行接触酶试验、氧化酶试验、明胶液化试验、V-P 试验、吡啶试验、脲酶试验、N 源利用试验、M-R 试验、硝酸盐还原试验、产氨试验等生化试验<sup>[16]</sup>,厌氧性和运动性试验参照文献[18]描述的方法进行,并用统计软件 SAS 9.01 进行聚类分析。

1.9 16S rDNA 鉴定

1.9.1 模板制备

取 18~24 h 培养的分离株纯培养物 2 mL,按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型)(北京百泰克生物技术有限公司)说明书描述的方法提取 DNA。

1.9.2 16S rDNA 基因的 PCR 扩增

上游引物:5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC A-3',下游引物:5'-CGG CTA CCT TGT TAC GAC-3',由北京六合华大基因有限公司合成,加入灭菌的双蒸水稀释,使其终浓度为 10 μmol/L。

PCR 扩增体系:总体积 50 μL,包括 10 μL 模板,1 μL 上游引物,1 μL 下游引物,25 μL Premix(宝生物工程(大连)有限公司)溶液,13 μL 灭菌蒸馏水。

PCR 反应程序:95℃/2 min(预变性);95℃/20 s 变性;55℃/15 s 退火;72℃/2 min 延伸,35 个循环,72℃/10 min 的延伸。

采用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增的 DNA

片段。将检测后的 PCR 扩增产物寄送至深圳华大基因研究院进行测序。

1.9.3 序列分析和系统发育树构建

获得的序列与 GenBank 数据库中已有的细菌 16S rDNA 序列进行 Blast 分析,获取相似性较高的菌株信息;选取这些相关菌株的 16S rDNA 序列,通过 Mega 5.05 软件包进行多序列比对分析和系统发育树的构建。

2 结果

2.1 菌种的分离纯化及嗜酸耐热性的检验

从苹果和果库空气样品分离嗜酸耐热菌,经纯化得到 8 株分离菌株,均是从苹果样品中分离得到的,而从果库空气中未能分离到目的菌株。经耐热性检验,此 8 株分离株均可较好的生长,即为耐热菌;并且它们都不能在 LB 培养基固体平板(pH 值 7.2)上形成菌落,证明具有嗜酸性。

2.2 细胞形态及理化特性

8 株分离菌在 AAM 平板上(pH 值 4.0)的形态大致为乳白色的圆形菌落,菌落表面光滑,湿润,中心凸起(表 1、图 1)。标准菌和分离菌的显微形态为杆状。标准菌和分离菌的生长条件及理化特性试验结果见表 2、3。由表 2 可知,分离菌和标准菌的最适生长温度和 pH 值范围比较接近,而且在较高温度和较低 pH 值都可以生长,符合嗜酸耐热的特点。标准菌和分离菌的显微形态如图 2 所示。

表 1 标准菌和分离菌细胞形态观察结果

Tab.1 Results of colonial morphology characteristics of standard and isolated bacterial

| 菌株                   | 菌落形状   | 细胞形状   | 细胞大小(直径×长度/μm×μm)   | 运动性 | 革兰氏染色 |
|----------------------|--------|--------|---------------------|-----|-------|
| DSM3922 <sup>†</sup> | 圆形,不透明 | 杆状,不膨胀 | (3.0~3.1)×(0.7~0.8) | -   | +     |
| BS-7                 | 圆形,不透明 | 杆状,不膨胀 | (2.0~3.0)×(0.5~0.6) | -   | +     |
| BS-1                 | 圆形,不透明 | 杆状,不膨胀 | (1.5~2.0)×(0.4~0.6) | -   | +     |
| BS-2                 | 圆形,不透明 | 杆状,不膨胀 | (1.5~2.5)×(0.5~0.9) | -   | +     |
| LC-4                 | 圆形,不透明 | 杆状,不膨胀 | (2.5~3.0)×(0.5~0.8) | -   | +     |
| BS-5                 | 圆形,不透明 | 杆状,不膨胀 | 3.0×0.5             | -   | +     |
| LC-8                 | 圆形,不透明 | 杆状,不膨胀 | (1.5~2.0)×(0.5~1.0) | -   | +     |
| LC-9                 | 圆形,不透明 | 杆状,不膨胀 | 2.0×0.6             | -   | +     |
| BS-17                | 圆形,不透明 | 杆状,不膨胀 | (1.8~3.0)×(0.7~1.0) | -   | +     |

注:“+”为阳性、“-”为阴性。

2.3 聚类分析

由表 3 可知,分离菌株与标准菌株间有部分差异,但由聚类分析结果(图 3)可知,分离株 LC-4 和标准菌株归为一支,分离株 BS-1、BS-2、BS-5、LC-8、LC-9 和 BS-17 为一支。说明 LC-4 的生理生化特性与标准菌具有一定的相似性。

2.4 16S rDNA 基因序列系统发育树的构建和菌种鉴定

通过对标准菌株和分离菌株 16S rDNA 扩增产

物(1 500 bp)的两向测序,将测序结果进行拼接及 Blast 比对,构建系统发育树,确定了分离菌株的系统发育地位如图 4 所示。

系统发育树(图 4)表明,分离菌株 BS-7、BS-1、BS-2、BS-5、BS-17、LC-8 和 LC-9 与 *Bacillus ginsengihui* 亲缘关系最近(99%),可能为 *Bacillus ginsengihui*,LC-4 与 *Alicyclobacillus acidoterrestris* 的亲缘关系最近(99%),结合生理生化特征,可以判定为 *Alicyclobacillus acidoterrestris*。

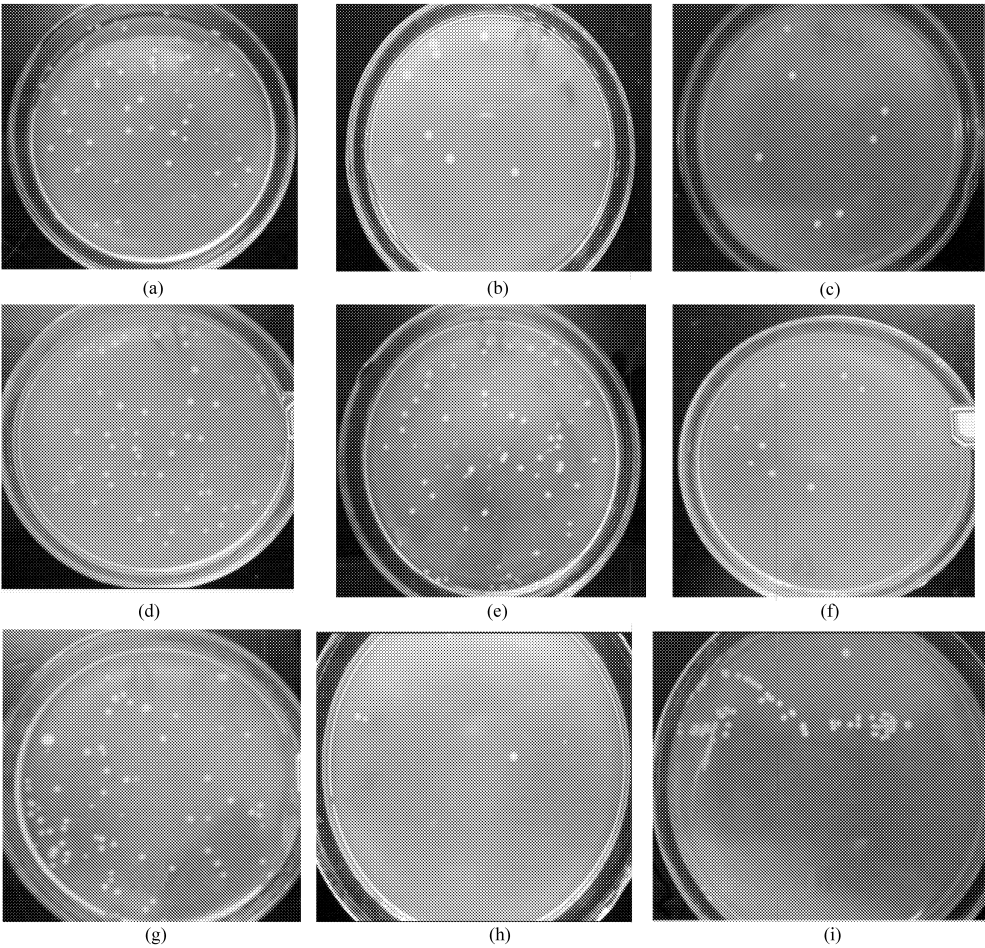


图 1 各菌株菌落形态

Fig. 1 Colony morphology of tested strains

(a) BS-7 (b) BS-1 (c) BS-2 (d) LC-4 (e) BS-5 (f) LC-8 (g) LC-9 (h) BS-17 (i) DSM3922<sup>T</sup>

表 2 标准菌和分离菌的生长条件试验结果

Tab. 2 Result of growing conditions of standard and isolated bacterial

| 参数        | 菌株                   |           |           |           |           |           |           |           |           |
|-----------|----------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|           | DSM3922 <sup>T</sup> | BS-7      | BS-1      | BS-2      | LC-4      | BS-5      | LC-8      | LC-9      | BS-17     |
| 最适生长温度/℃  | 40 ~ 50              | 35 ~ 50   | 35 ~ 50   | 30 ~ 50   | 45 ~ 55   | 35 ~ 45   | 30 ~ 45   | 35 ~ 45   | 35 ~ 45   |
| 最适生长 pH 值 | 3.5 ~ 4.0            | 4.0 ~ 5.5 | 3.5 ~ 5.5 | 3.5 ~ 5.5 | 3.0 ~ 5.0 | 3.5 ~ 5.5 | 3.5 ~ 5.0 | 3.5 ~ 5.5 | 4.0 ~ 5.5 |

表 3 标准菌和分离菌的生理生化特性反应

Tab. 3 Result of physiological and biochemical characteristics reaction of standard and isolated bacterial

| 生化反应                | 菌株                   |      |      |      |      |      |      |      |       |
|---------------------|----------------------|------|------|------|------|------|------|------|-------|
|                     | DSM3922 <sup>T</sup> | BS-7 | BS-1 | BS-2 | LC-4 | BS-5 | LC-8 | LC-9 | BS-17 |
| 氧化酶反应               | -                    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -     |
| 接触酶反应               | +                    | V    | +    | V    | +    | -    | -    | -    | +     |
| 明胶液化试验              | +                    | +    | +    | +    | -    | +    | +    | +    | -     |
| 淀粉水解试验              | +                    | +    | +    | +    | -    | +    | +    | +    | -     |
| 硝酸盐还原试验             | +                    | +    | -    | +    | -    | +    | +    | -    | -     |
| 0.05 g/mL NaCl 生长试验 | +                    | +    | +    | -    | +    | +    | +    | +    | +     |
| 厌氧性试验               | -                    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -     |
| V-P 试验              | -                    | +    | +    | -    | +    | -    | +    | -    | +     |
| M-R 试验              | V                    | V    | +    | -    | +    | V    | +    | +    | +     |
| 产氨试验                | -                    | -    | -    | +    | +    | +    | -    | +    | +     |
| 脲酶试验                | +                    | +    | +    | +    | -    | -    | +    | +    | -     |
| 吡啉试验                | +                    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +     |

注：“+”为阳性、“-”为阴性、“V”为弱阳性。

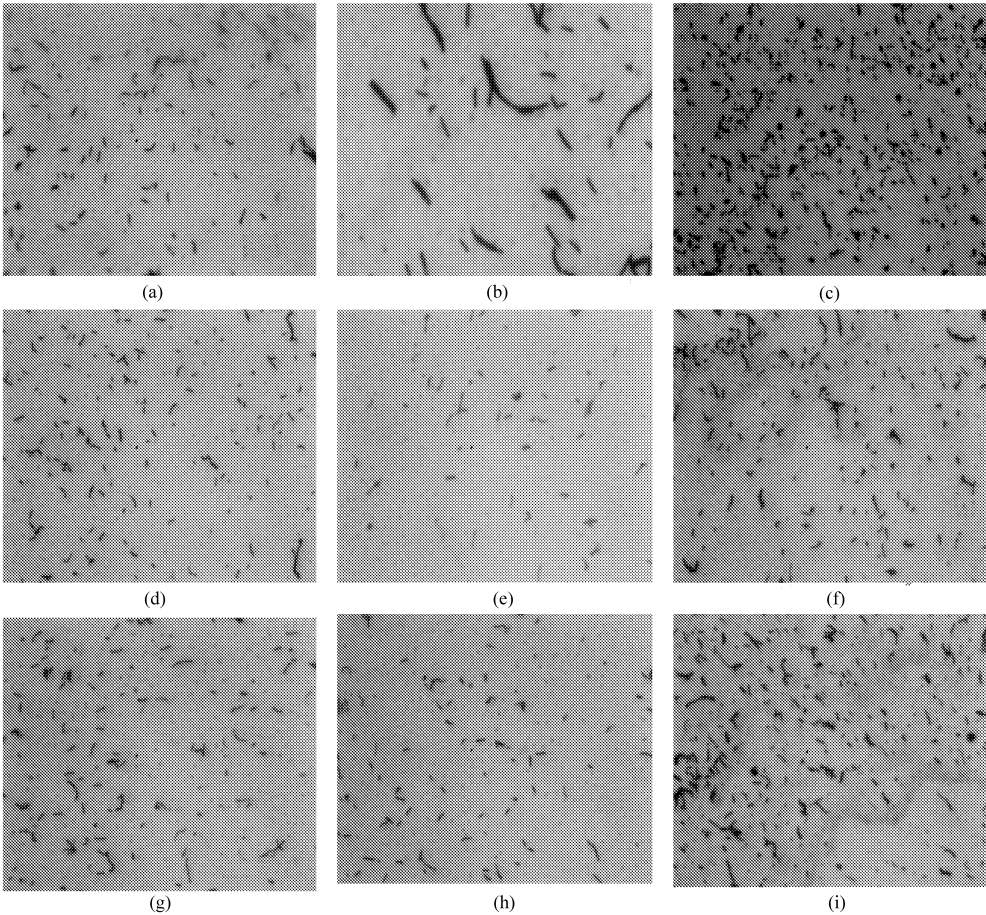


图 2 各菌株显微镜形态的观察结果 (10 × 100)

Fig. 2 Micro-morphology results of tested strains (10 × 100)

(a) BS-7 (b) BS-1 (c) BS-2 (d) LC-4 (e) BS-5 (f) LC-8 (g) LC-9 (h) BS-17 (i) DSM3922<sup>T</sup>

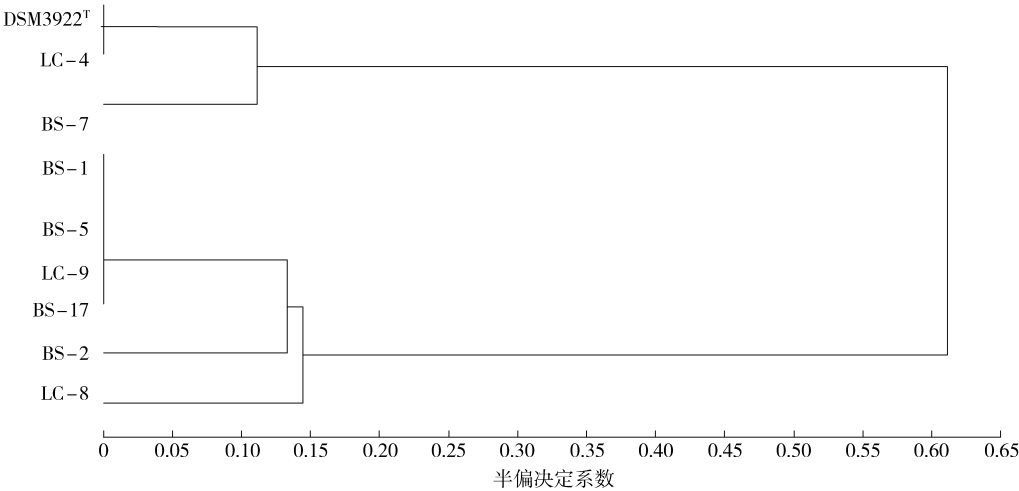


图 3 菌株的聚类分析结果

Fig. 3 Clustering analysis results of strains

2.5 扫描电镜观察结果

标准菌和分离菌株 LC-4 的扫描电镜如图 5 所示。

由图 5 可知,分离菌株 LC-4 的电镜扫描形态与标准菌的形态均为杆状,细胞大小也很相近,进一步证实了 LC-4 为 *Alicyclobacillus acidoterrestris*。

3 讨论

(1) 从陕西省果库中共分离到 8 株嗜酸耐热菌,其中 LC-4 从形态特征、生长特性、生理生化特性及聚类分析来看,与标准菌相似度很高,经过 16S rDNA 亲缘性分析后,分离菌与 *A. acidoterrestris* 最为

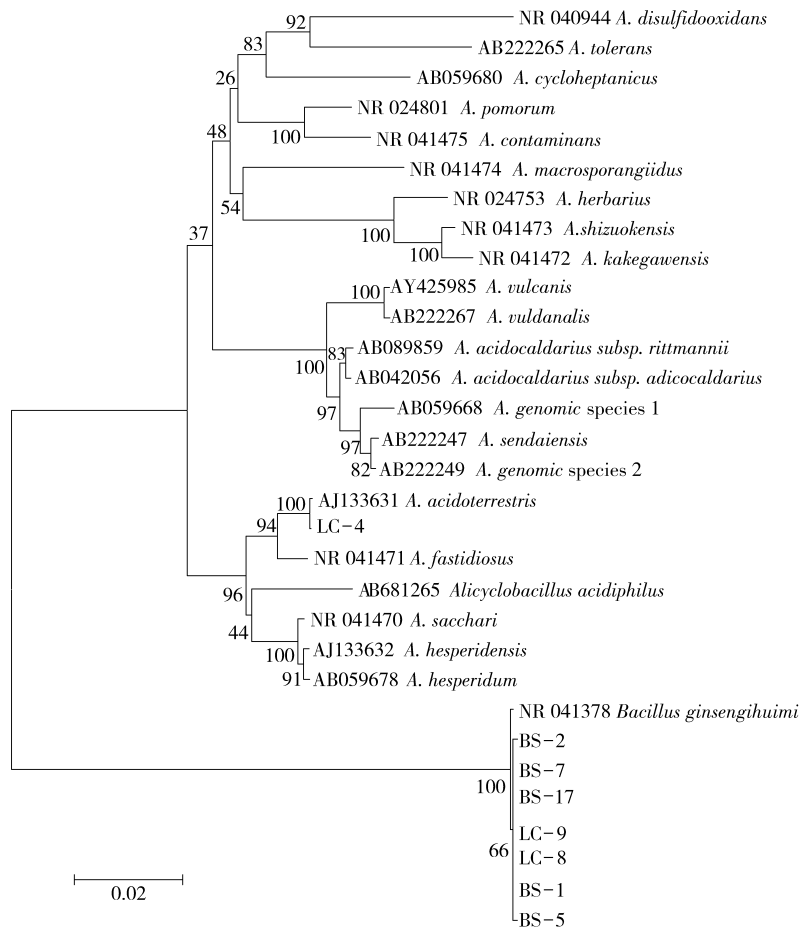


图 4 标准菌和分离菌的系统发育树

Fig. 4 Phylogenic tree based on 16S rRNA gene sequences

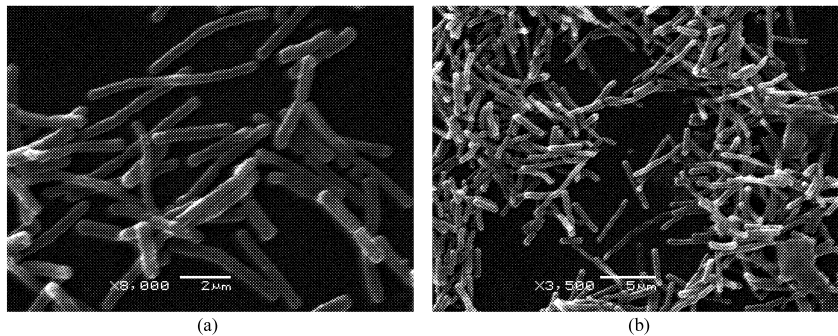


图 5 扫描电镜结果

Fig. 5 Scanning electron microscope of strains

(a) LC-4 (b) DSM3922<sup>T</sup>

相似,相似度达到 99%,可判定为同一菌种;其他 7 株分离菌都属于芽孢杆菌菌属。但果库中存在大量枯草芽孢杆菌及其他具有嗜酸耐热特性的芽孢杆菌属细菌,它们同样会对果汁的安全性造成威胁,这与蒋宏伟等<sup>[19]</sup>对陕西苹果汁数年的检测结果具有高度的一致性,这表明枯草芽孢杆菌与凝结芽孢杆菌等菌种也同样应受到重视,不能忽视其对果汁质量的威胁。

(2) 目前,国内外对嗜酸耐热菌的研究主要集中在快速检测及控制杀灭方法上。我国对嗜酸耐热

菌的研究主要是从生产过程中对其分离鉴定,果园土壤<sup>[20]</sup>也有涉及,但是对浓缩苹果汁全产业链的主要阶段——果库的研究还未见报道。因此,从果库中分离出的嗜酸耐热菌对了解其在全产业链的分布有着重要的意义。

(3) 菌株 LC-4 是酸土脂环酸芽孢杆菌,分离自果库中,表明果库的低温环境只是抑制了嗜酸耐热菌的生长,一旦在适宜的条件下(比如进入加工阶段),就会对果汁造成污染,说明对其的控制需要加强。

4 结束语

研究了陕西省果库中嗜酸耐热菌的分布情况，对果库中的空气和苹果中的嗜酸耐热菌进行分离纯

化,得到 8 株嗜酸耐热菌,其中分离株 LC-4 可判定为酸土脂环酸芽孢杆菌,其他 7 株属于芽孢杆菌。结果表明嗜酸耐热菌在果库中确有存在,对果汁质量造成威胁,需要加强控制。

参 考 文 献

1 Cerny G, Hennlich W, Poralla K. Spoilage of fruit juice by bacillus; isolation and characterizati of the spoiling microorganism [J]. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung, 1984, 179(3): 224 ~ 227.

2 Smit Y, Michelle C, Pierre V, et al. *Alicyclobacillus* spoilage and isolation; a review [J]. Food Microbiology, 2011, 28(3): 331 ~ 349.

3 孔德义,董佳,白小琼. 脂环酸芽孢杆菌的研究进展[J]. 粮食与食品工业, 2011, 18(2): 39 ~ 42.

Kong Deyi, Dong Jia, Bai Xiaoqiong. Research and development of *Alicyclobacillus* [J]. Cereal and Food Industry, 2011, 18(2): 39 ~ 42. (in Chinese)

4 Ana Claudia N F Spinelli, Anderson S Sant’Ana, Salatir Rodrigues-Junior, et al. Influence of different storage temperatures on *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA7152 growth in hot-filled orange juice [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(23): 7 409 ~ 7 416.

5 蔡福带. 苹果浓缩汁生产中耐热菌的分离鉴定及控制技术研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2005: 18 ~ 31.

Cai Fudai. Research on isolation identification and control technique of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in AJC processing [D]. Yangling: Northwest A&F University, 2005: 18 ~ 31. (in Chinese)

6 王峰,李建科,郭玉蓉,等. 苹果浓缩汁中嗜酸耐热菌的分离与鉴定[J]. 微生物学通报, 2008, 35(11): 1 755 ~ 1 759.

Wang Feng, Li Jianke, Guo Yurong, et al. Isolation and identification of thermoacidiphilic bacteria from apple juice concentrate [J]. Microbiology, 2008, 35(11): 1 755 ~ 1 759. (in Chinese)

7 姚培鑫,马小魁. 浓缩果汁生产厂中嗜酸耐热菌的跟踪检测[J]. 饮料工业, 2001, 4(3): 42 ~ 44, 48.

8 曾祥奎,黄斌,于娟. 浓缩苹果汁主要技术指标控制的研究[J]. 饮料工业, 2002, 5(1): 19 ~ 30.

9 王思新,焦中高,王晓燕. 浓缩苹果汁加工中耐热菌的分析与控制[J]. 食品科学, 2000, 21(9): 54 ~ 56.

10 陈世琼,胡小松,石维妮,等. 浓缩苹果汁生产过程中脂环酸芽孢杆菌的分离及初步鉴定 [J]. 微生物学报, 2004, 44(6): 816 ~ 819.

Chen Shiqiong, Hu Xiaosong, Shi Weini, et al. Isolation and identification *Alicyclobacillus* from concentrated apple juice processing[J]. Acta Microbio Logica Sinica, 2004, 44(6): 816 ~ 819. (in Chinese)

11 王宏,常玉华,仇农学. PCR 法检测耐热耐酸菌条件的优化[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(11): 99 ~ 101, 105.

Wang Hong, Chang Yuhua, Qiu Nongxue. Optimization of PCR reaction conditions in detection of *Alicyclobacillus acidoterrestris* [J]. Food and Fermentation Industries, 2004, 30(11): 99 ~ 101, 105. (in Chinese)

12 李建科,冯再平,仇农学. 耐热菌的竞争定量 PCR 检测方法优化与建立[J]. 中国农业科学, 2006, 39(2): 375 ~ 381.

Li Jianke, Feng Zaiping, Qiu Nongxue. Optimization and establishment of quantitatively competitive PCR system for the detection of *Alicyclobacillus acidoterrestris* [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2006, 39(2): 375 ~ 381. (in Chinese)

13 陈颖. 臭氧对耐酸耐热菌杀灭作用的研究 [D]. 西安:陕西师范大学, 2004: 33 ~ 35.

Chen Ying. Studies on sterilizing effect of ozone to *Alicyclobacillus acidoterrestris* [D]. Xi’ an: Shanxi Normal University, 2004: 33 ~ 35. (in Chinese)

14 胡贻春,岳田利,袁亚宏,等. 浓缩苹果汁车间空气中嗜酸耐热菌的分离鉴定研究[J]. 农产品加工·学刊, 2007 (3): 11 ~ 13, 21.

Hu Yichun, Yue Tianli, Yuan Yahong, et al. Research on thermoacidiphilic bacteria isolated from the air of AJC production workshop [J]. Academic Periodical of Farm Products Processing, 2007(3): 11 ~ 13, 21. (in Chinese)

15 Walls I, Chuyate R. *Alicyclobacillus*-historical perspective and preliminary characterization study [J]. Dairy, Food and Environmental Sanitation, 1998, 18(8): 499 ~ 503.

16 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 221 ~ 259.

17 Ding Jiannan, He Huan, Zhang Chenggui. Isolation and characterization of YNTC-1, a novel *Alicycobacillus sendaiensis* strain [J]. Cent. South Univ. Technol., 2008, 15: 508 ~ 514.

18 程丽娟,薛宏泉. 微生物学实验技术[M]. 西安: 世界图书出版公司, 2000: 221 ~ 222.

19 蒋宏伟,张耀相,李高华. 几种耐热耐酸芽孢杆菌在浓缩苹果汁中的比较试验[J]. 陕西农业科学, 2006 (2): 46 ~ 47.

20 袁亚宏,刘晓珂,岳田利,等. 一株源于果园 *Alicycobacillus* 的分离、鉴定及其生物学特性[J]. 食品科学, 2012, 33 (17): 129 ~ 135.

Yuan Yahong, Liu Xiaoke, Yue Tianli, et al. Isolation, identification and biological characterization of a strain of *Alicyclobacillus* from orchard soil in Shaanxi [J]. Food Science, 2012, 33 (17): 129 ~ 135. (in Chinese)