

Bacterias esporuladas en frutas y jugos de naranja

Iacona, Valeria Adela¹; Serrano, Lorena¹; Sanchis Juan Carlos²; Carughi, Isabel²;

Cátedras de Microbiología General¹ y Química General². Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas. Universidad Nacional del Litoral. Paraje El Pozo. CC 242. 3000. Santa Fe. Argentina. E-mail: viacona@fbc.unl.edu.ar

RESUMEN: Durante años se consideró que los jugos de frutas sólo eran susceptibles de ser dañados por levaduras, hongos y bacterias lácticas. En los últimos años se han informado daños producidos en jugos de frutas causados por bacilos aerobios formadores de esporos, ácido-termofílicos (*Bacillus* y *Alicyclobacillus*).

En este trabajo se cuantificó e identificó la presencia de bacterias esporuladas mesófilas, termófilas y de *Alicyclobacillus* en frutas enteras, en jugos de naranja y en mezclas (blending) de jugos concentrados enfríados provenientes de una planta procesadora de cítricos.

Los resultados obtenidos indican que:

- La carga microbiana total hallada en la superficie de la fruta entera se corresponde con valores similares en el jugo exprimido de naranja.
- Al pasteurizar el jugo y luego al concentrarlo y enfríarlo no se obtuvieron recuentos bacterianos.
- Cuando se estudiaron las mezclas (blending) de jugos concentrados enfríados, se hallaron bacterias aerobias esporuladas mesófilas y termófilas.
- No se detectó *Alicyclobacillus* en ninguna muestra.
- Las especies de bacterias esporuladas identificadas fueron: *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. megaterium*, *B. sphaericus*, *B. alvei*, *B. firmus*, *B. badius*.

Se concluye que tanto la calidad de la fruta fresca como la higiene y sanitización de las instalaciones y de los equipos que se ponen en contacto con los jugos, determinan la necesidad de implementar y fijar puntos críticos de control, que la industria debe vigilar estrictamente a fin de evitar las posibles fuentes de contaminación.

Además, el hecho de mezclar diferentes jugos concentrados implica un alto riesgo de contaminación, si la manipulación de los jugos no se realiza bajo estrictas condiciones de Buenas Prácticas de Fabricación.

Palabras claves: Bacterias esporuladas, frutas y jugos de naranja, microorganismos deteriorantes.

SUMMARY: Spore-forming bacteria in fruit and orange juice. Iacona, Valeria A.; Serrano, Lorena; Sanchis, Juan Carlos; Carughi, Isabel. For many years, fruit juice was thought to be susceptible only to yeasts, fungi and lactic-acid bacteria. It has been lately reported that they can also be spoiled by spore-forming, acid-thermophilic, aerobic bacilli (*Bacillus* and *Alicyclobacillus*).

Mesophilic and thermophilic sporulating bacteria as well as *Alicyclobacillus* strains were identified and quantified in whole fruit, orange juice and blendings of chilled concentrated juices from a citrus fruit processing plant.

Our results show that:

- The total microbial load on the surface of whole fruits resembles that found in orange juice.
- No bacterial counts could be detected after the juice was pasteurized, concentrated and chilled.
- When blendings of chilled concentrated juices were studied, mesophilic and thermophilic sporulating bacteria were found.
- *Alicyclobacillus* strains could not be recovered from any of the samples.
- The sporulating bacteria strains identified were: *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. megaterium*, *B. sphaericus*, *B. alvei*, *B. firmus*, *B. badius*.

Therefore, it is important that both quality of fresh fruit and cleanliness and sanitary conditions of facilities and equipment are taken care of. They require that proper critical control points are set, which should be strictly watched over in order to avoid possible sources of contamination.

Blending different concentrated juices involves a high risk of contamination if juices are not handled according to strict norms of Good Manufacturing Practices.

Key words: Spore-forming bacteria, fruit, orange juice, spoiling microorganisms.

* Trabajo desarrollado en el marco del Programa CAI+D/2000, Proyecto 12B/144 de la Universidad Nacional del Litoral.

Introducción

La Citricultura en Argentina es una de las actividades frutícolas más importantes. Nuestro país ocupa el octavo lugar entre los países productores de fruta fresca. (1), siendo el segundo productor de jugos cítricos del hemisferio Sur. (2)

El futuro de la citricultura regional depende de las posibilidades de exportación y del mercado interno. Ambos mercados son muy competitivos y para poder participar en ellos es necesario ofrecer productos cítricos de calidad y con mayor valor agregado.

La historia del aprovechamiento industrial de los cítricos comienza en fecha relativamente reciente. Hasta hace algunas décadas, los cítricos se vendían sobre todo en estado fresco, ya que no era posible conservar los jugos para llevarlos al mercado. A mediados de los años cuarenta se inició el auge propiamente dicho de la industria cítrica, favorecido por la aparición de los modernos métodos de extracción. (3)

La creciente aceptación de las bebidas cítricas por parte de los consumidores ha originado la necesidad de brindar un producto inocuo, que conserve las características organolépticas originales y que asegure el aporte de la totalidad del valor nutricional que poseen, dado que los cítricos están considerados entre las frutas frescas de mayor valor nutritivo. Ello se debe a un equilibrado contenido en agua, azúcares, ácidos, sales minerales, fibras y vitamina C. (4)

Una cuarta parte de los productos cosechados no llegan a consumirse frescos por sufrir alteraciones y son utilizadas por la industria para su procesamiento.

Las frutas están expuestas a la invasión de una gran variedad de microorganismos llevados por el viento o arrastrados por la lluvia, que desde la atmósfera se depositan sobre ellas.

El peligro es aún mayor para las frutas que crecen próximas al suelo, debido al riesgo de contaminación por microorganismos habituales y silvestres de la región, a los cuales se unen los patógenos y banales que transportan el hombre y las heces de los animales, ya sea por abonos o por agua de riego. Al romperse la película que rodea a las frutas, aquella microflora, más la que puede llegar de la planta procesadora o de los manipuladores, entra en contacto con su pulpa y actúa sobre ella. (5)

El deterioro de las frutas frescas suele acontecer durante su almacenamiento y transporte, así como durante la etapa de espera antes de su proce-

sado. Puede evitarse en parte la contaminación masiva de la fruta lavando y desinfectando cajas, canastas, cestas y otros receptáculos que las contienen. (6)

El lavado previo a su industrialización, por agitación de la fruta, tiende a distribuir por todo el conjunto los microorganismos procedentes de piezas deterioradas. Cuando no se realiza la renovación continua del agua de lavado, ésta puede ser fuente de contaminación que facilitará el crecimiento de microorganismos si estas condiciones se mantienen durante algún tiempo. Dentro de las Buenas Prácticas de Fabricación (BPF), el lavado con soluciones detergentes o germicidas y la separación de frutas deterioradas reduce el número de microorganismos contaminantes.

De hecho, cualquier superficie y equipo de la fábrica que entre en contacto con el jugo es una fuente significativa de posible contaminación con microorganismos patógenos, a menos que haya sido lo suficientemente lavada y desinfectada. (7)

Los jugos ácidos tienen una singular propiedad: son inhibidores del desarrollo de la mayoría de los microorganismos patógenos que normalmente contaminan los alimentos. Las características físico-químicas del jugo de naranja concentrado, pH entre 3,5 y 4,0, la baja actividad de agua, la concentración alta de azúcar (66° brix), la viscosidad, la baja capacidad de aireación, el oxígeno disuelto reducido y el tratamiento térmico del proceso de concentración, son elementos fuertemente inhibidores del crecimiento de la mayoría de los microorganismos patógenos y/o que provocan alteraciones. (8)

Sin embargo, los jugos de fruta son sustratos ambientales adecuados para los microorganismos especialmente alterantes: bacterias, hongos y levaduras, capaces de sobrevivir a los tratamientos térmicos y capaces de crecer a pH bajos. Estos microorganismos pueden producir el deterioro de los jugos procesados degradando algunos de sus compuestos (como hidratos de carbono, proteínas y vitaminas), produciendo olor y aroma indeseables, cambios de color, pH y textura.

El procesamiento y almacenamiento de jugo concentrado (alrededor de 66° Brix) bajo condiciones de congelación inhibe la acción del deterioro. No obstante, después de la reconstitución con agua (alrededor de 11° Brix), el producto se vuelve susceptible a la contaminación y al deterioro por los microorganismos. Cuando el jugo reconstituido se pasteuriza

como último paso antes de ser envasado, se eliminan la mayoría de las formas vegetativas de los microorganismos. (9). Sin embargo, las formas inactivas (esporas) de algunas bacterias son resistentes al proceso de la pasteurización y encuentran en el jugo diluido un ambiente favorable para la germinación y crecimiento que, bajo ciertas condiciones, pueden llevar al deterioro del producto. (10).

Las especies de bacterias que provocan el deterioro de los alimentos también están asociadas a los jugos de fruta procesados (alimentos con pH menor a 4,5). Incluyen microorganismos del género *Bacillus*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, bacterias acetogénicas, y con menor frecuencia *Streptococcus* y *Pediococcus* (11,12)

Las formas esporuladas tienen un rol distintivo en los jugos industrializados. Esto es debido a la elevada resistencia térmica de sus esporas, que en algunas especies todavía permanecen viables luego de los tratamientos de alta temperatura asociados con el proceso de la pasteurización.

Desde hace algunos años se detectó en jugos de frutas deteriorados y no deteriorados, la presencia de bacilos aerobios esporulados ácido-termo-fílicos, capaces de sobrevivir a los tratamientos de pasteurización. Estos microorganismos también se aislaron del suelo, de la superficie de las frutas, del agua utilizada en las plantas procesadoras y de los jugos concentrados (13). Se incluyeron dentro del género *Alicyclobacillus* (14,15). La incidencia de este microorganismo en los jugos de naranja es del 14,7% (16). Investigaciones recientes sugieren que debe evaluarse la presencia de *Alicyclobacillus* como un indicador para estimar la calidad del producto, ya que estas bacterias están siendo asociadas con la contaminación de jugos de fruta ácidos, bebidas suaves y bebidas isotónicas. (17).

Los cambios recientes en las tecnologías del proceso de envasado y almacenado de los jugos por períodos largos de tiempo estarían produciendo contaminaciones post pasteurización (18).

En la actualidad, se han incrementado los controles microbiológicos en la industria de los jugos de frutas procesados a fin de ofrecer un producto de alta calidad para evitar pérdidas por reproceso y descarte de productos elaborados, como así también lograr la confiabilidad de los clientes.

El objetivo del presente trabajo ha sido cuantificar e identificar la presencia de bacterias aerobias esporuladas mesófilas, termófilas y de *Alicyclo-*

bacillus en las frutas enteras y en los jugos de frutas durante las diferentes etapas de producción de una planta procesadora de jugos cítricos. Asimismo, se estudiaron mezclas (blending) de jugos concentrados enfriados.

Materiales y Métodos

Muestras

Se estudiaron 63 muestras, tomadas de una fábrica de jugos concentrados de la ciudad de Concordia (Entre Ríos), durante la zafra 2000 y 2001, cuyas características se detallan a continuación:

- 12 muestras de fruta entera tomadas de la playa de recepción (5 unidades por muestra).
- 12 muestras de jugo exprimido sin concentrar (11°Brix), tomadas del tanque de recepción del jugo sin pasteurizar.
- 12 muestras de jugo pasteurizado a 90°C, 30 segundos en intercambiador a placas, tomadas a la salida del holding.
- 12 muestras de jugo concentrado (60-65°Brix), tomadas a la salida del concentrador.
- 12 muestras de jugo concentrado - enfriado a 15°C, tomado del tanque de almacenaje de 5000 kilos.
- 3 muestras de lotes constituidos por mezclas de jugos concentrados- enfriados.
- (de cada lote se tomaron 4 muestras individuales) tomadas del tanque de almacenaje de 5000 kilos.

Toma de muestras

Las muestras de fruta entera fueron recolectadas de los contenedores (bins de 1m x 1m x 0,70 m) en la planta procesadora. Se colocaron en bolsas de plástico estériles y se trasladaron refrigeradas hasta el laboratorio.

Las muestras de jugo y de mezclas de jugos concentrados fueron recolectadas en la planta procesadora en recipientes estériles de aproximadamente 250 ml y se trasladaron refrigeradas hasta el laboratorio.

Todas las muestras se analizaron dentro de las 24 horas de recibidas. Durante este tiempo, se conservaron refrigeradas a 4°C.

Procesamiento de las muestras

• **Fruta entera:** se realizó un lavado cuidadoso de la superficie de las frutas (5 unidades), agitando-las vigorosamente dentro de bolsas de plástico estériles con 160 ml de agua de peptona 0,1%, durante 5 minutos. El agua de lavado se escurrió en un recipiente estéril.

• **Jugo exprimido sin concentrar (11°Brix) y jugo pasteurizado:** se procesaron directamente.

• **Jugo concentrado (60-65°Brix), jugo concentrado - enfiado a 15°C y mezclas de jugos concentrados enfiados:** Se reconstituyeron a jugo exprimido (11°Brix), diluyendo 1 en 5 en agua estéril o en caldo BAM, según el recuento a realizar (19). *Caldo BAM:* en g/l: Cl_2Ca . 2 H_2O 0,25g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,50g; $(NH_4)_2SO_4$ 0,2g; KH_2PO_4 3g; glucosa 1g; extracto de levadura 1g; agua destilada 1litro; pH:4 (20).

Recuentos microbiológicos

Se efectuaron los siguientes recuentos:

• **Bacterias aerobias mesófilas totales:** se utilizó la técnica de recuento en placa por vertido, empleando Agar Para Recuento en Placa (APC, Merck) e incubando a 30°C por 48 horas (21).

• **Bacterias aerobias esporuladas mesófilas y termófilas:** se utilizó la técnica de recuento en placa por vertido, empleando Agar Soya Triptica (AST, Merck) adicionado con 0,1 % de almidón e incubando a 30°C y 45°C, respectivamente, por 48 horas (22).

• ***Alicyclobacillus*.** Recuento y detección: se utilizó caldo BAM (para enriquecimiento) y agar BAM (para recuento y detección) (19).

Todos los recuentos se realizaron por duplicado, efectuando diluciones decimales con agua de peptona 0,1% ó caldo BAM, según corresponda.

Procedimiento para el recuento y detección de *Alicyclobacillus*

Según el tipo de muestra se procedió de la siguiente forma:

• **Fruta entera:** una alícuota de 5 ml de agua de lavado se agregó a 100 ml de caldo BAM. Luego del choque térmico a 90°C por 20 min., para activar los esporos, se sembró inmediatamente y por duplicado 0,1 ml de esa dilución en agar BAM, en superficie (recuento). El resto de la suspensión se incubó a 45°C durante 10 días (enriquecimiento), luego se sem-

bró por duplicado 0,1 ml en agar BAM en superficie (detección). Todas las placas se incubaron a 45°C por 48 horas o hasta 7 días (19).

• **Jugo exprimido sin concentrar y jugo pasteurizado:** una alícuota de 100ml del jugo exprimido sin concentrar se calentó a 90°C durante 20 min (activación), mientras que 100ml del jugo pasteurizado se calentó a 80°C durante 10 min, dado que esta muestra ya sufrió un tratamiento térmico en la pasteurización. A continuación se procedió de igual manera que para la fruta entera.

• **Jugo concentrado, jugo concentrado enfiado a 15°C y mezclas de jugos concentrados enfiados:** una alícuota de 20 g de muestra se agregó a 80 ml de caldo BAM (dilución 1 en 5). Se calentó a 80°C durante 10 min (activación). A continuación se procedió de igual manera que para la fruta entera.

Aislamiento e identificación de bacterias esporuladas

De acuerdo con las normas internacionales (21-23) se aislaron y purificaron un número representativo de colonias con diferentes morfologías. Las cepas purificadas, se identificaron según lo propuesto por Sneath, P. H. A.; Gordon, R.; Deak y col y Eguchi y col. (24-26,19).

Análisis estadístico

Todos los recuentos microbiológicos se transformaron a logaritmos para el análisis estadístico. Se utilizó el programa SPSS versión 6 para Windows. Las diferencias entre las medias se calcularon por análisis de varianza (ANOVA). La probabilidad $\leq 0,05$ se consideró significativa. (27).

Resultados y Discusión

La Tabla 1, presenta las medias de los recuentos microbiológicos de las muestras de fruta y jugos de naranja analizadas

Se observa que no existe una diferencia significativa ($p > 0,05$) entre las medias de los recuentos de bacterias aerobias mesófilas totales en la superficie de la fruta entera (4,22 log ufc/cm²) y en el jugo exprimido de naranja (5,04 log ufc/ml).

Tabla 1: Recuentos microbiológicos en muestras de fruta y jugos de naranja, Zafra 2000.

Recuentos Microbiológicos(a)	Muestras				
	Fruta entera(b)	Jugo exprimido sin concentrar(b)	Jugo pasteurizado(b)	Jugo Concentrado(b)	Jugo concentrado enfriado(b)
Bacterias Aerobias Mesófilas Totales	4,22 ± 0,26 (3,69-4,54)	5,04 ± 0,59 (3,95-5,59)	0	0	0
Bacterias Aerobias Esporuladas Mesófilas	2,11 ± 0,04 (2,04-2,18)	2,34 ± 0,02 (2,30-2,38)	0	0	0
Bacterias Aerobias Esporuladas Termófilas	1,92 ± 0,06 (1,78-2,03)	2,24 ± 0,06 (2,13-2,29)	0	0	0
<i>Alicyclobacillus</i>	0	0	0	0	0

(a) Media ± Desviación Estandar. La media del número de bacterias viables se expresa como log ufc/cm² para fruta fresca; log ufc/ml para jugo exprimido y pasteurizado y log ufc/g para jugo concentrado y concentrado enfriado. El rango se muestra entre paréntesis.

(b) Número de muestras: 12

Posteriormente, al pasteurizar el jugo y luego al concentrarlo y enfriarlo no se obtuvieron recuentos de las citadas bacterias.

Análogamente, no se obtuvieron diferencias significativas ($p > 0,05$) para las medias de los recuentos de bacterias aerobias esporuladas mesófilas y las termófilas en la superficie de la fruta entera y en el jugo exprimido de naranja.

Asimismo, tampoco se obtuvieron recuentos de estas últimas bacterias en el jugo pasteurizado, jugo concentrado, y jugo concentrado enfriado.

Estos resultados indican que la materia prima (fruta entera) aporta un número importante de microorganismos aerobios totales y de microorganismos aerobios esporulados mesófilos y termófilos a través de la cáscara de la fruta, que contami-

nan el jugo exprimido durante el proceso de extracción. Se observa un mayor recuento de todos los microorganismos investigados, en el jugo exprimido, lo que indicaría que existe una contaminación del jugo, no sólo proveniente de la cáscara, sino aportada también durante la etapa de extracción.

Sin embargo, durante el proceso de pasteurización, que se realiza a altas temperaturas y corto tiempo (90°C 30 seg) se logra eliminar la carga microbiana originada durante las etapas anteriores del proceso.

Como se observa en la Tabla 2, en todos los lotes de mezclas de jugos concentrados se hallaron bacterias aerobias esporuladas mesófilas (2,31 log ufc/g, 2,07 log ufc/g y 1,91 log ufc/g), y en uno de ellos bacterias aerobias esporuladas termófilas (1,19 log ufc/g).

Tabla 2: Recuentos microbiológicos en mezclas de jugos concentrados de naranja, Zafra 2001.

Recuentos Microbiológicos(a)	Muestras		
	Jugo Concentrado Lote N° 1 (b)	Jugo Concentrado Lote N° 2 (b)	Jugo Concentrado Lote N°3 (b)
Bacterias Aerobias Mesófilas Totales	0	0	0
Bacterias Aerobias Esporuladas Mesófilas	2,31 ± 0,28 (2,70-1,70)	2,07 ± 0,16 (2,30-1,62)	1,91 ± 0,21 (2,27-1,48)
Bacterias Aerobias Esporuladas Termófilas	0	1,19 ± 0,33 (1,60-0,47)	0
<i>Alicyclobacillus</i>	0	0	0

(a) Media ± Desviación Estandar. La media del número de bacterias viables se expresa como log ufc/g. El rango se muestra entre paréntesis.

(b) Número de muestras: 4

No se detectó *Alicyclobacillus* en ninguna de las muestras analizadas. Investigaciones recientes citan una baja incidencia, 14,7% de *Alicyclobacillus*, en jugos de naranja (16).

Un procedimiento habitual en las plantas industrializadoras de jugos cítricos, es realizar mezclas de jugos ya concentrados con el objetivo de estandarizar el producto respecto de sus características físico – químicas (°Brix, nitrógeno amínico, azúcares) y organolépticas (color, aroma, sabor) en función de los requerimientos del cliente.

Las mezclas, normalmente se realizan luego de pasteurizar y concentrar el jugo. En general las plantas no poseen la infraestructura suficiente para realizar esta operación bajo condiciones higiénicas y sanitarias suficientemente controladas, lo que afecta a menudo la calidad microbiana del producto terminado.

Si bien la mayoría de las bacterias esporuladas no germinan a pH < 4,1 su presencia en las mezclas de jugos concentrados implica un riesgo de deterioro, cuando éstos son utilizados como materia prima en la elaboración de jugos diluidos, en los cuales el pH es mayor a 4.

Internacionalmente se recomienda la aplicación de tratamiento térmico a los jugos cítricos (jugos frescos y diluidos a partir de los concentrados), que permita la destrucción de los microorganismos sin alterar mayormente los caracteres organolépticos ni destruir su valor nutricional.

Sin embargo, algunas bacterias esporuladas son lo suficientemente termorresistentes para sobrevivir al proceso térmico de los jugos. Entre ellas se destacan los esporos del género *Alicyclobacillus*, en los cuales se determinó un valor D a 90°C de 23 min y un valor z de 7,7°C. (28).

Identificación de las cepas aisladas

De los 42 bacilos Gram-positivos esporulados aislados, las especies identificadas fueron:

B. subtilis, 12 cepas (28,5%); *B. licheniformis*, 4 cepas (9,5%); *B. pumilus*, 8 cepas (19,3%); *B. megaterium*, 6 cepas (14,4%); *B. sphaericus*, 4 cepas (9,5%); *B. alvei*, 2 cepas (4,7%); *B. firmus*, 2 cepas (4,7%); *B.adius*, 2 cepas (4,7%), no clasificables, 2 cepas (4,7%).

• Cabe destacar que estas especies fueron identificadas tanto de los aislamientos de bacterias esporuladas mesófilas como termófilas.

Sin embargo, las bacterias que desarrollaron a 45 °C crecieron también a 30 °C.

Esto demuestra que las cepas termófilas aisladas son facultativas respecto de la temperatura de crecimiento.

Conclusión

Tanto la calidad de la fruta fresca como la higiene y sanitización de las instalaciones y de los equipos que se ponen en contacto con los jugos, determinan la necesidad de implementar o fijar puntos críticos de control, que la industria debe vigilar estrictamente a fin de evitar las posibles fuentes de contaminación.

Además, el hecho de mezclar diferentes jugos concentrados implica un riesgo de contaminación, si la manipulación de los jugos no se realiza con estrictas condiciones de BPF.

Bibliografía

1- FAO, 1998. Comité de problemas de productos básicos. Grupo Intergubernamental sobre frutos cítricos 12ª reunión. Valencia España
 2- Federación Argentina del Citrus, 1998. La actividad Citrícola Argentina. Información Estadística. Informes regionales presentados en la XX Jornada Citrícola Nacional, 5/12/97. Buenos Aires Argentina.
 3- FAO, 1989. Políticas Nacionales y Regionales Relacionadas con los Cítricos. Comité de Problemas de Productos Básicos. Grupo Intergubernamental sobre Frutos Cítricos. Octava Reunión. Montevideo, Uruguay.

4- FAO, 1993. Frutos Cítricos y Elaborados. Estadísticas Anuales. Comité de Problemas de Productos Básicos. Grupo Intergubernamental sobre Frutos Cítricos.
 5- Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, 1996. Manual para producción de naranja y mandarina de la región del Río Uruguay. 1-215.
 6- Parish, M.; Hill, E., 1959. Microbiology of citrus fruit processing. Gainesville, Florida, Fl. Ag. Expt. Sta Bull. 1-618.
 7- Faville, L.W; Hill, E.C., 1951. Incidence and significance of microorganisms in citrus juice. Food Technol. 5: 923 – 925.
 8- Murdock, D. I., 1977. "Microbiology of Citrus Products". Chap 11. In Nagy, S; Shaw, P; Veldhuis, M (eds). Citrus Science and Technology. Westpoint, Conn. 2. 445-491.
 9- Murdock, D. I; Hatcher, W.S., 1975. Growth of microorganisms in chilled orange juice. Journal of Milk Food Technol. 38: 393-396.
 10- Parish, M., 1991. Microbiological concerns in citrus juice processing. Food Technol. 4: 129-132.
 11- Berry, J.M; Witter, L.D; Folinazzo, J.F., 1956. Growth characteristics of spoilage organisms in orange juice. Food Technol. 10: 553-556.
 12- Thompson, P. J., 1981. Thermophilic organisms involved in food spoilage: aciduric flat – sour sporeforming aerobes. J. Food Prot. 44 (2): 154-156.
 13- Borlinghaus A.; Engel R., 1997. Alicyclobacillus incidence in commercial apple juice concentrate (AJC):supplies, method development and validation. Fruit Processing 7:1-5.
 14- Splittstoesser, D. F.; Churey, J. J.; Lee, C. Y., 1994. Growth characteristics of aciduric sporeforming bacilli isolated from fruit juices. J. Food Prot. 57:1080-1083.
 15- Cerny, G; Hennlich, W; Poralla, K., 1985. Spoilage of fruit juice by bacilli: isolation and characterisation of the spoiling microorganisms. Z Lebensm. Untewrs. Forsch. 179:224-227.
 16- Uboldi Eiroa M. N.; Amstalden Junqueira V. Ch. ; Schmidt F. L., 1999. Alicyclobacillus in orange juice: occurrence and heat resistance of spores. J. Food Prot., 62, 8: 883-886.
 17- Yamazaki, K; Teduka, H & Shinano, H., 1996. Isolation and Identification of Alicyclobacillus acidoterrestris from acidic beverages. Biosciences and Biotechnology Biochemistry 60:543-545.
 18- Wyatt, M; Parish, M., 1995. Low temperature germination of conidia and arthrospores from citrus related filamentous fungi. Food Microbiol. 12: 237-243.
 19- Eguchi, S; Manfio, G.; Pinhatti, M.; Azuma, E.; Variane, S., 1999. Acidothermophilic sporeforming bacteria in orange juices: detection methods, ecology and involvement in the deterioration of fruit juices. Fundacion André Tosello, Brasil. 1-52
 20- Darland G.; Brock T., 1971. Bacillus acidocaldarius sp.nov., an Acidophilic Thermophilic Spore-forming Bacterium. J. Gen. Microbiol., 67: 9-15.

- 21- Vanderzant, C.; Splittstoesser, D.F 1992. "Compendium of Methods of the Microbiological Examination of Foods". 3rd. ed. American Public Health Association, Washington, D.C.. 265-456.
- 22- Elliot, R. P, D. S. Clark, K. H. Lewis, H. Lundbec, J. C. Olson, Jr., and B. Simonsen (ed.) 1978. "Microorganisms in foods. 1. Theirs significance and methods of enumeration", 2nd ed. University of Toronto Press. Toronto
- 23- Frazier, Williams C., 1985. "Microbiología de los Alimentos". Ed Acribia. Zaragoza. España. 425-436.
- 24- Sneath P.H.A., 1986. Endosporeforming Gram positive rods and cocci. En: Holt JG. (Ed), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Williams & Welkins, Baltimore. 2: 1104-1139.
- 25- Gordon, R., 1973. "The Genus *Bacillus*" en CRC, Handbook of Microbiology, Eds. Laskin, A.I.; Lechevalier, H. A., CRC Press, Cleveland, 1: 71-88
- 26- Deak, D; Timar, E., 1988. Simplified Identification of aerobic sporeformers in the investigation of foods. Intern. J. Food Microbiol. 6: 111-125.
- 27- Bethea, R. M.; B. S. Duran, and T. L. Boullion, 1995. Statistical methods for engineers and scientists. 3rd. ed. Marcel Dekker. New York.
- 28- Pontius, A; Rushing, J. 1998 Heat Resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores as affected by varius pH values and organic acids. J. Food Prot, 61:41-46.