

Jugos de naranja concentrados congelados sin conservantes. Carga microbiana y bacterias esporuladas

Vaccari, M.C.¹; Benzzo, M.T.¹; Sanchis, J.C.²; Iacona, V.A.¹

1- Cátedra de Microbiología General

2- Cátedra de Química General

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral. Ciudad Universitaria. CC 242, 3000 Santa Fe, Argentina.

RESUMEN: Entre las bacterias contaminantes de jugos concentrados, los géneros *Bacillus* y *Alicyclobacillus* producen endosporos capaces de tolerar las condiciones extremas de los jugos concentrados y de mantener la viabilidad.

Se realizaron recuentos de microorganismos aerobios mesófilos totales, aerobios acidófilos totales, bacterias esporuladas mesófilas y termófilas en 36 muestras de jugos de naranja concentrados congelados (JNCC) sin conservantes. Los resultados obtenidos indican que: en la mayoría de las muestras, los recuentos de todos los grupos bacterianos estuvieron comprendidos entre 0 y 2 logUFCg⁻¹ y sólo en un bajo número de ellas los recuentos fueron mayores, no superando 3,4 logUFCg⁻¹. La especie esporulada aislada en mayor proporción fue *Bacillus subtilis*, un reconocido contaminante ambiental. No se detectó *Alicyclobacillus*. Es necesario realizar la manipulación de los jugos bajo condiciones higiénicas y sanitarias estrictas para no afectar la calidad microbiológica del producto terminado, que al ser utilizado como materia prima en la elaboración de jugos diluidos y bebidas, podría alterarlos provocando un riesgo para la salud del consumidor y pérdidas económicas importantes.

Palabras clave: jugos de naranja, carga microbiana, bacterias esporuladas.

SUMMARY: Frozen concentrated orange juices containing no preservatives: microbial load and sporulating bacteria. Vaccari, M.C.; Benzzo, M.T.; Sanchis, J.C.; Iacona, V.A. Among bacteria usually found to contaminate concentrated juice, genera *Bacillus* and *Alicyclobacillus* are known to produce endospores able to survive under the extreme conditions posed by concentrated juice and remain viable.

Counts to quantify total mesophilic and total acidophilic aerobic microorganisms, mesophilic and thermophilic sporulating bacteria were carried out for 36 samples of frozen concentrated orange juice that contained no preservatives. While most samples produced counts between 0 and 2 log CFU.g⁻¹, only a few showed counts among 2 - 3.4 log CFU.g⁻¹. *Bacillus subtilis* (a well-known environmental contaminant) was the sporulating species most frequently found. *Alicyclobacillus* was not detected. Since it is used to manufacture diluted juice and other beverages, juice should be handled following strict sanitary and hygienic conditions which ensure that the microbiological quality of the product is not affected. Otherwise, the consumers' health could be at risk and important economic losses could result.

Key words: orange juice, microbial load, sporulating bacteria

*** Correspondencia:**

e-mail: mvaccari@fbc.unl.edu.ar

- Trabajo desarrollado en el marco del Programa CAID/2000, Proyecto 12B/144 de la Universidad Nacional del Litoral. Parte de este Trabajo fue presentado en el XVII Congreso Latinoamericano de Microbiología - Bs. As. 17-21/10/04.

Introducción

El constante aumento del consumo de los jugos cítricos y de sus derivados ha impulsado la industrialización de los mismos y la aplicación de nuevas tecnologías cuyo objetivo principal es garantizar la calidad e inocuidad del producto.

Por su naturaleza química los jugos constituyen un caldo de cultivo sumamente apropiado para los microorganismos tanto alterantes como patógenos, que contaminan los jugos no sólo a partir de la materia prima (la fruta) sino también durante las diferentes etapas que involucran su elaboración.

Las barreras fisicoquímicas inherentes a su composición dificultan y retrasan en parte, el crecimiento microbiano. Así, el bajo pH de los jugos cítricos (entre 3,5 y 4) representa un límite que reduce la proliferación microbiana en gran proporción (1, 2). Sin embargo en determinadas ocasiones los microorganismos logran superar los límites de esta barrera logrando sobrevivir o incluso multiplicarse.

El jugo de naranja recién exprimido es considerado un alimento altamente perecedero que debe ser sometido a procesos de conservación tales como el tratamiento térmico (pasteurización y concentración) y el posterior congelamiento, que agregan otras barreras al crecimiento de los microorganismos, no requieren necesariamente de la adición de conservantes químicos y permiten obtener un producto estable, seguro y apto para el consumo.

Muchas industrias procesadoras de frutas cítricas elaboran jugos concentrados los cuales son utilizados como materia prima para la elaboración de otros productos tales como bebidas a base de jugo de fruta, cremogenados y néctares.

Existen microorganismos (bacterias, hongos y levaduras) capaces de tolerar las condiciones extremas de los jugos concentrados como son bajo pH, baja a_w , elevada concentración de azúcar (65 ° Brix) y viscosidad y reducción del oxígeno disuelto. Entre estos microorganismos se incluyen las bacterias esporuladas cuyas estructuras de resistencia aseguran su supervivencia en condiciones adversas, germinando posteriormente si las condiciones ambientales se tornan favorables (3-6). Esta situación tiene lugar cuando los concentrados se reconstituyen para la preparación de néctares y bebidas analcohólicas, en las cuales aumenta la actividad

acuosa ($a_w \sim 0.99$) y el oxígeno disuelto, y disminuye la concentración de azúcar (hasta 11°Brix) y la viscosidad. Esta supresión y/o disminución de las barreras fisicoquímicas al desarrollo microbiano los torna nuevamente vulnerables al deterioro (4, 7).

Las especies bacterianas asociadas al deterioro de los jugos se incluyen dentro de los géneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, bacterias acetogénicas y en menor frecuencia especies de *Streptococcus* y *Pediococcus* (8, 9). Desde hace algunos años se agregó el género *Alicyclobacillus* (bacilos aerobios esporulados acidotermófilos) aislado como contaminante de los jugos (10,11,12). Los signos más comunes de alteración de los jugos por este microorganismo incluyen: fuerte aroma y olor (descrito como a antiséptico o desinfectante), poco o ningún cambio de pH, ausencia de producción de gas y en ciertas ocasiones formación de un sedimento blanco en el fondo del envase o turbidez. La incidencia de este microorganismo en los jugos de naranja es del 14,7%. En la actualidad se ha sugerido que debe evaluarse su presencia como un indicador para estimar la calidad del producto, ya que estas bacterias se asocian a la contaminación de los jugos de fruta ácidos (13-18).

Entre las bacterias contaminantes de los jugos concentrados los géneros *Bacillus* y *Alicyclobacillus* son capaces de generar endosporos de elevada resistencia térmica lo cual reviste una particular importancia en los jugos industrializados puesto que permanecen viables luego del tratamiento térmico (9).

El objetivo de este trabajo fue:

- Detectar y cuantificar diferentes grupos de microorganismos que contaminan normalmente los jugos de naranja concentrados, congelados (JNCC), sin conservantes: microorganismos aerobios mesófilos totales, microorganismos aerobios acidófilos totales, bacterias aerobias esporuladas mesófilas y termófilas y *Alicyclobacillus*.

- Aislar e identificar las bacterias esporuladas mesófilas y termófilas presentes en las muestras.

Materiales y Métodos

Procedencia de las muestras:

Se estudiaron 36 muestras de jugo de naranja concentrado, congelado (JNCC), sin conservantes,

obtenidas de una planta procesadora de jugos concentrados de la provincia de Entre Ríos, durante la producción 2002-2003. Todas las muestras fueron tomadas de los tanques de almacenamiento, los cuales contenían tanto jugo concentrado como mezclas (blending) de jugos concentrados, según los requerimientos del cliente.

Las muestras se trasladaron desde la planta procesadora, en recipientes estériles de 250 ml bajo condiciones de refrigeración. Una vez recibidas en el laboratorio, se conservaron a 6°C hasta el momento de su procesado, realizado dentro de las 24 horas de recibidas.

Preparación de las muestras:

Las muestras de jugo concentrado (65°Brix) se reconstituyeron a jugo exprimido (11° Brix) diluyendo 1 en 5 en agua estéril o caldo BAM según correspondiera (16).

Recuentos microbiológicos:

Se realizaron los siguientes recuentos:

– *Microorganismos aerobios mesófilos totales*: se utilizó la técnica de recuento en placa por vertido, empleando Agar para Recuento en Placa (APC, Merk), e incubando a 30°C por 48 horas (6).

– *Microorganismos aerobios acidófilos totales*: se utilizó la técnica de recuento en placa por vertido, empleando Agar Suero de Naranja (OSA, Merk) e incubando a 30°C por 48 horas (16).

– *Bacterias aerobias esporuladas mesófilas y termófilas*: Una alícuota del jugo reconstituido en agua estéril se calentó a 80°C durante 10 min (activación). Se utilizó la técnica de recuento en placa por vertido, empleando Agar Soya Trypticasa (AST, Merk) adicionado con 0,1 % de almidón e incubando a 30°C y 45°C, respectivamente, por 48 horas (21).

– *Alicyclobacillus*:

Recuento: Una alícuota del jugo reconstituido en caldo BAM se calentó a 80°C durante 10 minutos (activación). Se utilizó la técnica de recuento en placa en superficie, empleando Medio para *Alicyclobacillus acidocaldarius* (BAM), e incubando a 45°C por 7 días (15,16).

Detección: El jugo reconstituido en caldo BAM (previamente activado por choque térmico), se incubó a 45°C durante 7 días. Luego, una alícuota del caldo enriquecido se sembró por duplicado en su-

perficie en Agar BAM, y se incubó a 45°C durante 7 días (16).

Todos los recuentos se realizaron por duplicado, efectuando diluciones decimales con agua de peptona al 0.1 % o caldo BAM, según correspondiera (6,16).

Aislamiento e identificación de bacterias esporuladas:

De acuerdo con las normas internacionales (6,21,22) se aislaron y purificaron un número representativo de colonias con diferentes morfologías. Las cepas purificadas, se identificaron según lo propuesto por el Manual de Bergey, Gordon, Deak y col. y Eguchi y col. (16, 23-25).

Análisis estadístico:

La comparación entre las medias de los recuentos microbianos se calculó mediante el estadístico t de Student. Se consideró como significativo una probabilidad $p \leq 0,05$. Se utilizó el programa SPSS versión 9.0 para Windows.

Resultados y Discusión

Recuentos microbiológicos:

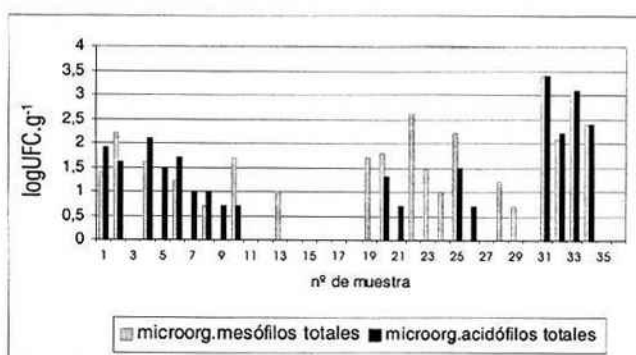
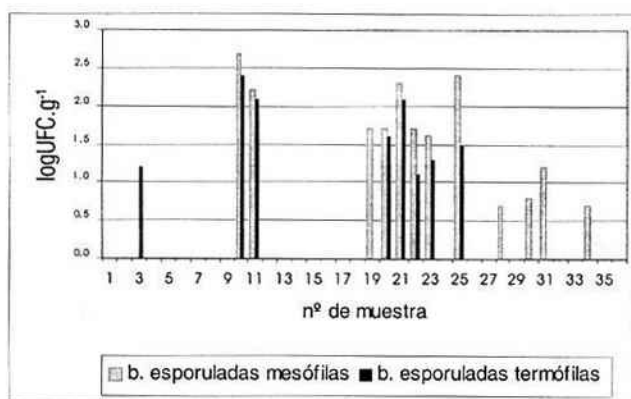
En la tabla 1 y las figuras 1 y 2 se muestran los recuentos microbiológicos de las 36 muestras de JNCC sin conservantes.

Los resultados de la tabla 1 demuestran que los recuentos fueron bajos en la mayoría de las muestras analizadas para todos los grupos de microorganismos estudiados. La legislación vigente, Código Alimentario Argentino (CAA) y Codex Alimentarius, no establece ningún criterio microbiológico para los grupos de microorganismos evaluados en el presente trabajo (26,27). El CAA (Art. 1050) sólo establece un máximo de 100 UFC.g⁻¹ para hongos y levaduras.

Por otra parte, las especificaciones de clientes en lo que refiere al mercado interno, fija para microorganismos mesófilos totales en medio OSA hasta 100 UFC.g⁻¹ en JNCC sin conservantes (28). Cabe aclarar que las "especificaciones de clientes", no corresponden a Normas, ni tienen el carácter obligatorio de Legislación vigente, sino que son acuerdos que comúnmente se establecen entre el cliente

Tabla 1: Análisis estadístico de los recuentos microbianos en 36 muestras de JNCC sin conservantes.

Rango	Microorganismos mesófilos totales (log UFC.g ⁻¹)	Microorganismos acidófilos totales (log UFC.g ⁻¹)	Bacterias esporuladas (log UFC.g ⁻¹)		Alicyclo bacillus
	0-3.4	0-3.4	Mesófilas	Termófilas	
	0-3.4	0-3.4	0-2.6	0-2.4	0
Mediana	0.7	0	0	0	0

Figura 1: Recuento de microorganismos aerobios mesófilos totales y aerobios acidófilos totales en 36 muestras de JNCC sin conservantes.**Figura 2:** Recuento de bacterias esporuladas mesófilas y termófilas en 36 muestras de JNCC sin conservantes.

y el proveedor o bien las exigencias impuestas por el cliente para comprar.

Además, puede verse que los recuentos de microorganismos mesófilos totales y acidófilos totales evidencian un rango superior al de los recuentos de bacterias esporuladas mesófilas y termófilas.

En la figura 1 se observan los recuentos de microorganismos aerobios mesófilos totales y aerobios acidófilos totales.

Sobre un total de 36 muestras, 29 muestras (80.6%) mostraron recuentos de microorganismos aerobios mesófilos totales en el rango de 0 - 2,0 log UFC.g⁻¹, 5 (13,9%) entre 2,1 - 3,0 log UFC.g⁻¹, y sólo 2 de ellas (5,6%) dieron recuentos de 3,1 y 3,4 log UFC.g⁻¹ (muestras 33 y 31 respectivamente).

Análogamente, 31 muestras (86,6%) dieron recuentos de microorganismos aerobios acidófilos totales entre 0 - 2,0 log UFC.g⁻¹, 3 (8,3%) variaron entre 2,1 - 3,0 log UFC.g⁻¹, y sólo 2 de ellas (5,6%) dieron recuentos de 3,1 y 3,4 log UFC.g⁻¹ (muestras 33 y 31 respectivamente).

Al analizar estadísticamente ambos grupos, no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los recuentos de microorganismos aerobios mesófilos totales y acidófilos totales, por lo cual se podría deducir que los microorganismos mesófilos presentes en las muestras serían también acidófilos, debido a las condiciones o características inherentes a la composición de los jugos cítricos concentrados.

Por otra parte, estudios anteriores realizados sobre muestras de jugos de naranja concentrados y jugos de naranja concentrados y enfriados (15°C) obtenidos sobre la línea de producción, hallaron que los recuentos de microorganismos aerobios mesófilos totales fueron nulos en todas las muestras analizadas (29). Esto estaría indicando que la pasteurización fue eficiente como proceso de destrucción de los microorganismos hasta por lo menos esa etapa del procesamiento. Sin embargo, en las muestras de JNCC sin conservantes analizadas en este trabajo se constató la presencia de dichos microorganismos.

Si bien se trata de producciones distintas, de los resultados de los estudios realizados en ambas, podría inferirse que existen posibilidades de contaminación post pasteurización.

En la figura 2 se muestran los recuentos de bacterias esporuladas mesófilas y termófilas.

Sobre un total de 36 muestras, 32 (88,9%) mostraron recuentos de bacterias esporuladas mesófilas en un rango de 0 - 2,0 log UFC.g⁻¹, y sólo 4 (11,1%) entre 2,1 y 2,6 log UFC.g⁻¹.

Análogamente, en 33 muestras (91,7%) los recuentos de bacterias esporuladas termófilas variaron en un rango de 0 - 2,0 log UFC.g⁻¹, mientras que sólo en 3 de ellas (8,3%) estuvieron entre 2,1 - 2,4 log UFC.g⁻¹.

Además se observa que las muestras que presentaron recuentos de bacterias esporuladas termófilas también presentaron bacterias esporuladas mesófilas, salvo la muestra 3. Esto estaría indicando la posibilidad que las cepas termófilas aisladas podrían ser facultativas respecto de la temperatura de crecimiento, si bien esta condición no fue comprobada en el presente trabajo.

El mismo estudio citado anteriormente (29) obtuvo recuentos nulos de bacterias esporuladas mesófilas y termófilas en jugo de naranja concentrado y en jugo de naranja concentrado y enfriado (15°C), en todas las muestras analizadas sobre la misma línea de producción.

Por otra parte, en la figura 3 se observa que las muestras con mayores recuentos de bacterias esporuladas no están necesariamente asociadas a los mayores recuentos de microorganismos mesófilos totales.

El género *Alicyclobacillus* no fue detectado en ninguna de las 36 muestras analizadas, aún considerando el previo enriquecimiento de las mismas. Este resultado coincide con estudios realizados por otros autores, que hallaron una baja incidencia de *Alicyclobacillus* (14,7%) en jugos de naranja (13,16).

Estos resultados indican que el tratamiento térmico en la línea de producción de los jugos permite obtener un producto de buena calidad microbiológica en base a las exigencias de la legislación vigente, aunque un bajo porcentaje de muestras no cumple con las especificaciones de clientes mencionadas anteriormente. La presencia de microorganismos en algunas de las muestras indicaría que el producto se contaminó luego del procesamiento térmico. Por otra parte, estos resultados coinciden con los hallados en el estudio citado anteriormente (29), en el cual se obtuvieron recuentos similares de bacterias

Figura 3: Recuento de microorganismos aerobios mesófilos totales y promedio de los recuentos de bacterias esporuladas mesófilas y termófilas en 36 muestras de JNCC sin conservantes.

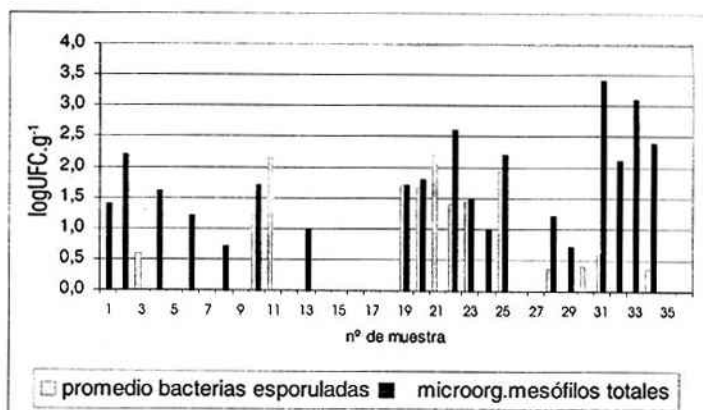
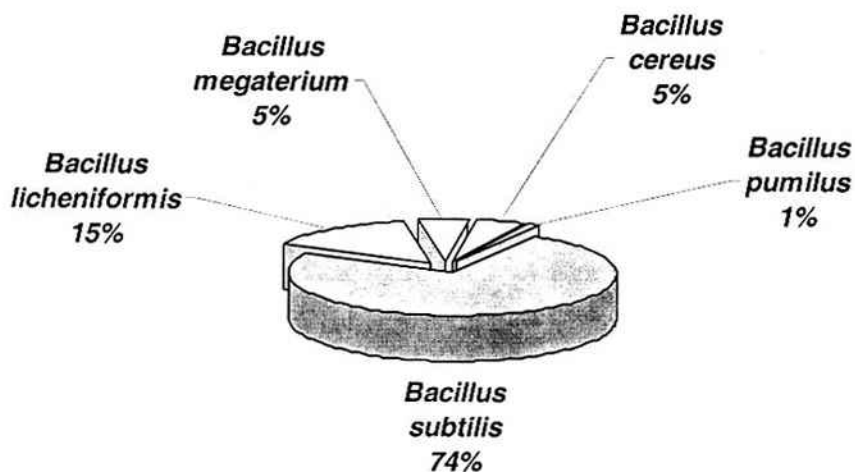


Figura 4: Distribución porcentual de especies de *Bacillus* en las 80 cepas aisladas.



esporuladas mesófilas y termófilas en mezclas (blending) de jugo de naranja concentrado. Lo expresado en este párrafo reforzaría la hipótesis de contaminación post-pasteurización, dado que las mezclas (blending) provienen de partidas individuales que se almacenaron después de la pasteurización y posteriormente se sometieron al proceso de mezclado.

Otros autores (30), indican que el almacenamiento de los jugos congelados durante largos períodos de tiempo y su posterior descongelamiento para realizar mezclas (blending) constituyen la causa principal de la contaminación post-pasteurización.

Identificación de las bacterias esporuladas:

De las 80 cepas de bacilos esporulados mesófilos y termófilos aislados, las especies identificadas fueron:

Bacillus subtilis 59 cepas (73,75%), *B. licheniformis* 12 cepas (15%), *B. megaterium* 4 cepas (5%), *B. cereus* 4 cepas (5%), *B. pumilus* 1 cepa (1,25%) (figura 4).

Las especies identificadas en este trabajo son las que se encuentran con mayor frecuencia como contaminantes de alimentos (31,32).

La especie aislada en mayor proporción fue *Bacillus subtilis*, un reconocido contaminante ambiental.

El almacenamiento del jugo concentrado bajo condiciones de congelamiento impide la acción deteriorante de estas bacterias, dado que los esporos difícilmente germinarán en este producto.

Sin embargo, después de la reconstitución con agua, el producto se vuelve susceptible a la acción de deterioro por estos microorganismos, si los esporos que sobrevivieron al estrés ácido y al congelamiento, encuentran mejores condiciones para su desarrollo.

Conclusiones

Tanto las características físicas de los jugos de naranja concentrados como el proceso de conservación de los mismos (pasteurización, concentración) producen la eliminación de la mayor parte de los microorganismos, asegurando un producto de buena calidad microbiológica.

Los bajos niveles de contaminación en las muestras después de la pasteurización se deberían

a la supervivencia de endosporos de elevada termorresistencia o a la contaminación ambiental post-pasteurización.

Por todo lo expuesto se concluye que un factor de fundamental importancia es el control de la contaminación ambiental. Es necesario realizar la manipulación de los jugos bajo condiciones higiénicas y sanitarias suficientemente controladas para no afectar la calidad microbiana del producto terminado que, al ser utilizado como materia prima en la elaboración de jugos diluidos y bebidas, podría alterarse provocando un riesgo para la salud del consumidor y pérdidas económicas importantes.

Bibliografía

1. ICMSF, 1990. Ecología Microbiana de los alimentos 1. Factores que afectan la supervivencia de los microorganismos en los alimentos. Editorial Acribia, España. 19-25.
2. Murdock, D.I., 1977. "Citrus Science and Technology" Chap 11 Microbiology of Citrus Products. Nagy, S.; Shaw, P.; Veldhuis, M. (eds).. (Westpoint, Conn.) II: 445-491.
3. Murdock, D.I.; Hatcher, W.S., 1975. Growth of microorganisms in chilled orange juice. Journal of Milk Food Technol. 38: 393-396.
4. Parish, M., 1991. Microbiological concerns in citrus juice processing. Food Technol. 4:129-132.
5. Madrid, A.; Cenzano, I.; Vicente, J.M., 1994. "Nuevo Manual de Industrias Alimentarias". AMV ediciones-Mundi prensa S.A.. (Madrid, España). IV: 93-130.
6. Vanderzant, C.; Splittstoesser, D.F., 1992. "Compendium of Methods of the Microbiological Examination of Foods". Tercera edición. American Public Health Association. (Washington, D.C.) 265-456.
7. Pascual Anderson, M., 1992. "Microbiología Alimentaria. Metodología Analítica para alimentos y bebidas". Díaz de Santo Ed. (Madrid, España) XL: 345-352.
8. Berry, J.M.; Witter, L.D.; Folinazzo, J.F., 1956. Growth characteristics of spoilage organisms in orange juice. Food Technology 10: 553-556.
9. Thompson, P. J., 1981. Thermophilic organisms involved in food spoilage: aciduric flat – sour sporeforming aerobes. J. Food Protection. 44 (2): 154-156.
10. Borlinghaus A.; Engel R., 1997. Alicyclobacillus incidence in commercial apple juice concentrate (AJC): supplies, method development and validation. Fruit Processing 7: 1-5.
11. Splittstoesser, D.; Churey, J.; Lee, C., 1994. Growth characteristics of aciduric sporeforming bacilli isolated from

- fruit juices. *J. Food Protection* **57**: 1080-1083.
12. 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.
13. Uboldi Eiroa M.; Amstalden Junqueira V.; Schmidt F., 1999. *Alicyclobacillus* in orange juice: occurrence and heat resistance of spores. *J. Food Protection*, **62**, (8): 883-886.
14. Yamazaki, K.; Teduka, H. & Shinano, H., 1996. Isolation and Identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from acidic beverages. *Biosciences and Biotechnology Biochemistry* **60**: 543-545
15. Darland G.; Brock T., 1971. *Bacillus acidocaldarius* sp. nov. an Acidophilic Thermophilic Spore-forming bacterium. *Journal of General Microbiology*, **67**: 9-15.
16. Eguchi, S.; Manfio, G.; Pinhatti, M.; Azuma, E.; Variane, S., 1999. Acido termophilic sporeforming bacteria in orange juice: detection methods, ecology and involvement in the deterioration of fruit juice. *Fundación André Tosello, Brasil*. 1-52.
17. Priest F.; Goodfellow M.; Tood C. 1981. "The genus *Bacillus*: A numeral analysis". In: Berkeley R., Goddellow M. "The aerobic endospore-forming bacteria: classification and identification. 2^o ed. Academic press, (London) 91-104.
18. Walls, Isabel; Rolenda Chuyate, 2000. Isolation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from fruits juices. *Journal of AOAC International*. **83** (5): 1115-1120
19. Deinhard G.; Saar J.; Krischke W.; Poralla K. 1987. *Bacillus cycloheptanicus* sp. Nov., a New Thermoacidophile Containing ω -Cycloheptane Fatty Acids System. *Appl. Microbiol.* **10**: 68-73.
20. Pontius, A.; Rushing, J., 1998. Heat Resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores as affected by various pH values and organic acids. *J. Food Prot.* **61**: 41-46.
21. ICMSF, 1983. "Microorganismos de los Alimentos 1. Técnicas de Análisis Microbiológico" Edit. Acribia. Zaragoza. España. 105-230.
22. Frazier, Williams C., 1985. "Microbiología de los Alimentos". Ed Acribia. (Zaragoza. España) 425-436.
23. Sneath, P.H.A., 1986 Endosporeforming Gram positive rods and cocci. En: Holt J.G. (Ed). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams & Welkins, Baltimore. **2**: 1104-1139
24. Gordon, R., 1973. "The Genus *Bacillus*", *Handbook of Microbiology*, CRC, Laskin, A.I.; Lechevalier, H. A. Eds., Cleveland, **1**: 71-88
25. Deak, D.; Timar, E., 1988. Simplified Identification of aerobic sporeformers in the investigation of foods. *Intern. J. Food Microbiol.* **6**: 11-125.
26. Codex Alimentarius, 1992. Norma General para Néctares de Fruta No Regulados por Normas Individuales. *Codex Stan* 161-1989. **6**: 93-95.
27. Código Alimentario Argentino, 2000. Capítulo 12, Art. 1050. Marzochi Ediciones.
28. Cives, H. "Comunicación personal". II Congreso Argentino de Microbiología de los Alimentos. Santa Fe. 24-26/11/2003.
29. Iacona, V.A.; Serrano, L.; Sanchis, J.C.; Carughi, I., 2002. Bacterias esporuladas en fruta y jugos de naranja. *Revista FABICIB*. **6**: 89-96.
30. Sobrero, S., 2002. "Identificación de mohos en el proceso de elaboración de jugos cítricos concentrados". Tesis del Magister en Ciencias y Tecnología del Alimento. Santa Fe, Argentina.
31. Somogyi, L.P.; Ramaswamy, H.S.; Hui, Y.H. 1996. «Processing fruits: Science and Technology» Technomic Publishing Company, Vol 1.
32. Brown, K. L. 2000. Control of bacterial spores. *British Medical Bulletin* **56** (1): 158-171.