

Trabajos

Bacterias esporuladas ácido termofilas en el proceso de elaboración de jugos concentrados de frutas procedentes de zonas de riesgo de la República Argentina

RECIBIDO: 21/6/07

ACEPTADO: 26/7/07

Sobrero, MS¹. • Fernández, V.¹ • Luján, M.I.² • Martins, J.³ • Basílico, JC.². • Sanchis, JC.¹

1. Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas.

Ciudad Universitaria Paraje El Pozo. 3000. Santa Fe. Argentina.

TE: 0342-4575206.

E-mail: ssobrero@fbc.unl.edu.ar

2. Facultad de Ingeniería Química

3. Escuela Universitaria de Análisis de Alimentos-Gálvez

RESUMEN: Las bacterias ácido-termófilas (TAB) formadoras de esporos pueden resistir a la pasteurización en la elaboración de jugos concentrados y luego crecer en los jugos reconstituídos. Se las ha aislado en regiones volcánicas, de aguas termales y de jugos de frutas tratados térmicamente. Por este motivo se decidió estudiar su presencia en frutas y jugos cítricos de Entre Ríos (aguas termales) y evaluar su incidencia en jugos de manzana y pera de Río Negro (cenizas volcánicas), estudiando el proceso de elaboración. Muestras de frutas, jugos, agua y aire ambiental se sembraron en medio BAM y K, a pH 3,7, siete días a 45 y 55°C. Los resultados demostraron la presencia de TAB en fruta cítrica orgánica y tradicional. La incidencia fue 1,14% para jugos cítricos y 1,86% para jugos de manzana y pera. Se pudo aislar

TAB del agua recuperada del evaporador, pero no del aire ambiental. Por último se observó, que sólo aparecen en el jugo cuando se descuidan las buenas prácticas agrarias o de manufactura.

PALABRAS CLAVE: bacterias ácido termófilas, jugos, manzana, pera, cítricos, elaboración

SUMMARY: *Sporulated acido-thermophile bacteria in the manufacture of concentrated fruit juices coming from risk area in Argentina*

Spore-forming, thermophilic acidophilic bacteria (TAB) have been isolated from volcanic areas, thermal waters and fruit juices subjected to heat treatment, surviving then pasteurization of concentrated juices and growing afterwards, in reconstituted juices. For this reason, their presence in both fruit and fruit juice from Entre Ríos

(thermal waters) and apple and pear juice from Río Negro (volcanic ashes) was assessed. Samples of fruit, juice, water and ambient air were cultured on BAM and K medium (pH 3.7; 7 days) at 45 °C and 55 °C. TAB were shown to be present in citrus fruit both organically and traditionally grown. A 1.14% and 1.86% incidence were found for citrus juice and apple and pear juice,

respectively. In the two plants evaluated, water recovered from the evaporator was shown to be a reservoir of TAB. This was not the case for ambient air. The importance of keeping in with appropriate agrarian and manufacturing practices was also noted.

KEY WORDS: thermophilic acidophilic bacteria, juices, fruits, elaboration

Introducción:

La elaboración de jugos de manzana, pera, naranja y mandarina en la República Argentina se caracterizan por la buena calidad de los mismos. La producción de estas frutas y sus jugos tiene la ventaja competitiva internacional de la contra estación. En la tabla N° 1 se resumen las principales características de la producción de frutas y jugos en Argentina. Tanto manzana y pera, como los cítricos son motores de economías regionales. Para los primeros se destaca la zona del Alto Valle de Río Negro y para naranja y mandarina, Entre Ríos es una de las provincias productoras del noreste argentino (1, 2, 3,4)

Las características fisicoquímicas de los jugos concentrados de frutas (bajos pH, baja actividad acuosa, elevada viscosidad, escasa disponibilidad de oxígeno) sumado a la pasteurización hacen que la mayoría de los microorganismos patógenos y/o alterantes se vean inhibidos de desarrollar (5). La contaminación más frecuente se reduce a mohos, levaduras y bacterias ácido lácticas o esporuladas (6,7,8,9). Las bacterias ácido-termófilas (TAB) por ser formadoras de esporos son capaces de soportar dichas condiciones y luego crecer en los jugos reconstituidos. Dentro de ellas se distingue como alterante frecuente el género *Alicyclo-*

bacillus. Las TAB son microorganismos cosmopolitas que se han aislado del suelo, en particular en zonas de cenizas volcánicas o con aguas termales, de compost orgánico, estiércol y alimentos procesados en caliente. En esta última década muchas TAB se aislaron de jugos de fruta deteriorados en Estados Unidos, Europa, Japón y Brasil. Las mismas fueron identificadas como *Alicyclobacillus acidoterrestris* y *A. acidocaldarius*. (10,11,12,13,14,15, 16,17)

Estos microorganismos, no patógenos causan el deterioro de jugos que han sido previamente pasteurizados y que se comercializan como jugos estériles sin conservantes químicos. El choque térmico recibido durante la pasteurización activa los esporos y destruye los microorganismos competidores que podrían limitar su desarrollo. El deterioro consiste en la alteración del olor (medicinal o antiséptico), color y/o formación de una nube o sedimento, sin formación de gas. Es importante destacar que se puede aislar el microorganismo sin que los jugos presenten alteración visible. Desafortunadamente ni los productores, ni los consumidores pueden advertir estas características hasta el momento de consumirlos, porque estos jugos sin conservantes se expenden en envases tipo Tetra Pack. Los jugos de fruta concentrados y pasteurizados se venden

congelados para formular bebidas, que son nuevamente pasteurizadas y envasadas en recipientes adecuados para su comercialización, muchas veces sin agregado de conservantes. A pesar de que los procesos de elaboración de jugos y néctares difieren según la fruta utilizada, se han aislado TAB de diferentes productos: uva blanca, manzana, citrus, tomate, ananá, y sus mezclas (18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28).

En los últimos años, los cambios de conductas alimentarias han hecho que el consumo de jugos naturales crezca considerablemente tanto a nivel interno como en la exportación. La presencia de estos microorganismos en la fruta y otros productos terminados constituye un serio problema en toda la cadena de elaboración, allí el interés de poder identificarlos y eliminarlos del proceso productivo, evitando que se instalen en los lugares de elaboración y contaminen el producto en otro momento.

Hasta el momento no se ha logrado la normalización de su aislamiento e identificación, por ser un microorganismo de difícil desarrollo, que se encuentra en bajas concentraciones. Las discrepancias centrales son los medios de cultivos usados para aislarlos, temperaturas de incubación, necesidad de enriquecimiento previo, entre otros (13,14,15,18,26,27,28,29,30)

La influencia de los procesos de elaboración sobre la posibilidad de aislar TAB de cada tipo de jugo ha sido poco documentada. Las investigaciones realizadas hasta la actualidad ameritan la profundización en los estudios de aislamiento y la determinación de los puntos de control en el proceso de elaboración, con el propósito de lograr una normatización en el hallazgo y control de estas bacterias.

En la Patagonia la erupción del volcán Hudson en 1991 cubrió de cenizas al Va-

lle Fértil y en la provincia de Entre Ríos han proliferado los desarrollos turísticos que explotan aguas termales, por estos motivos existe particular preocupación de productores y compradores por estudiar su presencia en dichas regiones de nuestro país. Por último, si se considera que por el efecto del calentamiento global la temperatura ambiental seguirá aumentando se puede suponer que las TAB serán en un futuro próximo un microorganismo frecuente.

Objetivos:

El propósito de este estudio fue aislar TAB a partir de frutas, jugos y agua en diferentes puntos del proceso de elaboración procedentes de la provincia de Entre Ríos, donde hasta el momento no se han reportado casos. Además, evaluar su presencia en diferentes puntos del proceso en elaboración de jugo de manzana y pera producidos en la provincia de Río Negro, donde ya se las han aislado.

Materiales y Métodos:

Preparación de las muestras: todas las muestras analizadas en este estudio se recogieron entre el 16/03/06 y el 28/12/06.

- Frutas cítricas: se obtuvieron de quintas tradicionales y de otras orgánicas, cada lote corresponde a una plantación de 40 hectáreas.

- Jugos sin pasteurizar, jugos concentrados y jugos concentrados de alta turbidez (JAT) obtenidos de las frutas estudiadas, para el caso de cítricos. Se tomaron muestras en diferentes puntos del proceso.

- Jugos clarificados concentrados y sin concentrar, pasteurizados y sin pasteurizar para manzana (Red Delicious, Granny Smith, Royal Gala, Rome, Pink Lady, Fuji) y pera (William's, Packhams Triumph, Beurre D'anjou). Se tomaron muestras durante el envasado a diferentes tiempos.

- Agua usada en el proceso de elaboración.

- Aire ambiental.

Metodología:

- 50 g de jugos clarificados de manzana o pera, se diluyeron con agua bufferada y se sometieron a choque térmico de 80 °C durante 10 minutos para eliminar competidores y activar los esporos. Se filtraron a través de filtro millipore con tamaño de poro de 0.2 micras, luego se incubaron los filtros en placas con medio K (Agar Premium Bio Pro) pH 3,7 durante 7 días a 45 °C. a cuyo término se realizaron los recuentos en placa.

- 50 ml de agua de diferentes etapas del proceso fueron sometidos a la misma técnica que en el punto anterior.

- 25 g de cáscara de frutas cítricas (naranja Valencia late, mandarina Ellendale, Satsuma y Murckott) o 25 g de jugos cítricos se mezclaron con 100 ml de caldo BAM (Medio para *Alicyclobacillus*) y se sometieron a choque térmico de 80 °C durante 10 minutos. A continuación se incubaron durante 7 días a 45 °C y 55 °C. Luego se sembró 1 ml de dicho caldo enriquecido en medio BAM agarizado y medio K, incubando nuevamente 7 días a 45 °C y 55 °C.

- El aire ambiental se muestreó con un impactador aire superficie SAS marca Hi-media, modelo Hi-air, India, usando medio BAM (en caso de desarrollo las cepas aisladas se someten a choque térmico). Los puntos elegidos para la toma de muestra fueron: zona de volcado de fruta, zona de extractoras, zona de concentrador de JAT y jugo y zona de envasado

Se trabajó siempre por triplicado, a pH 3,7 ajustado con ácido málico esterilizado por filtración y con dos cepas patrón de *Alicyclobacillus* provenientes de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT N° 5137: *Alicyclobacillus* sp. aislado de jugos de fru-

tas y CECT N° 4328: *Alicyclobacillus acidocaldarius*) (31).

- Las colonias se aislaron, purificaron y se identificaron siguiendo la metodología de Eguchi y col. (32)

La figura N° 1 muestra el flujograma que representa el proceso de producción de jugos concentrados de manzana y pera y la figura N° 2 el de cítricos. En el caso de jugos sin concentrar se debe quitar del mismo la etapa de evaporación. Los jugos concentrados de alta turbidez (JAT) se elaboran con el lavado de pulpas y cáscaras recuperadas del proceso de elaboración de jugos concentrados.

Resultados:

Se pudo establecer trabajando con CECT N° 5137 y CECT N° 4328, que para ajustar el pH convenía utilizar ácido málico, en lugar de acético o clorhídrico. El valor de p tanto del test de Kruskal Wallace para los estudios realizados con la primer cepa, como los del test F del ANOVA, para la segunda fueron menores a 0,5 mostrando diferencias significativas entre ácido málico y los otros dos ensayados.

Con respecto a la temperatura las dos cepas de colección desarrollaron mejor a 55 °C, coincidiendo con lo recomendado por el cepario de origen (31).

Las muestras de jugo de manzana y pera se incubaron solo 45 °C y en medio K, que son las condiciones exigidas más frecuentemente por los compradores y que ya habían permitido aislar TAB de estos jugos. En cambio todas las muestras de cítricos se cultivaron a 45 y 55 °C, en medio BAM y K, con el propósito de brindar mayores oportunidades de desarrollo ya que en estos jugos no se había aislado TAB con anterioridad (33 y 34). Las muestras positivas desarrollaron a las dos temperaturas y en ambos medios de cultivo.

La tabla N° 2 muestra los resultados obtenidos del aislamiento de TAB.

Manzanas y peras no se incluyeron en el estudio de la fruta por no tener diferenciadas las quintas.

Las muestras de naranja y mandarina TAB positivas correspondieron tanto a quintas orgánicas como tradicionales. Las frutas denominadas orgánicas provienen de quintas en las que por un lapso mayor a 8 años han demostrado no utilizar agroquímicos. Las mismas han certificado su condición frente a organismos Nacionales y/o Internacionales (35,36)

En las quintas orgánicas el pie de injerto existente es naranjo trifoliata, el único fertilizante permitido fue compost orgánico y como plaguicida se usaron soluciones cúpricas.

Las características climáticas del periodo estudiado fueron representativas para las medias históricas para las frutas de pepita. En el caso de los cítricos, el año 2006 se caracterizó por una sequía en la región entrerriana. Sabiendo que el principal reservorio natural de *Alicyclobacillus* es el suelo, las épocas de sequía son particularmente riesgosas, debido a que permiten que el polvo se fije a la superficie de las frutas. La fruta es la principal fuente de ingreso de TAB a la planta por lo que su lavado con agua controlada es un punto crítico del proceso (32).

Los jugos sin pasteurizar, concentrados y de alta turbidez, en la mayoría de los casos resultaron negativos para TAB, aún cuando se prepararon a partir de frutas TAB positivas. Debido a que un jugo concentrado de mandarina dio resultado TAB positivo al final del proceso de envasado, habiendo partido de frutas TAB negativas, es que se decidió analizar todo el proceso de elaboración (ver Fig. 2). De esta forma se pudo determinar que el reservorio de TAB se encontraba en

el agua condensada del evaporador, la que había sido utilizada para ajustar los grados Brix de dicho lote. Estos resultados coinciden con lo hallado por Eguchi y col., en Brasil, quienes demostraron que la mayor contaminación de las plantas elaboradoras de jugos se concentraba en la parte cálida del proceso, ya que la parte inicial del mismo se lleva a cabo a temperaturas (menores a 30°C) no adecuadas para favorecer el crecimiento y proliferación (32).

El estudio realizado en el aire ambiental de las plantas elaboradoras evaluadas no arrojó resultados positivos (tabla 2).

La incidencia de TAB en jugos de manzana y pera es muy baja del orden del 1,86%. Al analizar el proceso de elaboración de pera y manzana por medio de muestreos a diferentes tiempos durante el envasado, pudo establecerse que los resultados TAB positivos se observan al final del proceso de envasado. En todas las muestras que resultaron TAB positivas los valores de UFC siempre fueron muy bajos, nunca superaron las 20 UFC/50g. Por otro lado se tuvo un comportamiento análogo para los jugos de frutas cítricas obteniéndose en éstos una incidencia de TAB de 1,14 %. Estos datos constituyen un avance con respecto a estudios anteriores, realizados con jugos cítricos provenientes de la misma región, en los cuales no se los había podido aislar (33 y 34).

Además se pudo establecer la variación de los recuentos de las unidades formadoras de colonias luego de dos, cinco o siete días de incubación, siendo estos últimos iguales, por lo que se podrían informar resultados preliminares a los 5 días de iniciada la incubación.

Conclusiones:

Se pudo demostrar la presencia de TAB en frutas cítricas de quintas orgánicas y tra-

dicionales, en el agua del proceso y jugos concentrados provenientes de empresas ubicadas en las zonas de riesgo antes mencionadas.

La incidencia en los jugos concentrados es muy baja. Si bien están en las frutas no aparecen en el jugo salvo en casos particulares, cuando se descuidan las buenas prácticas agrarias (BPA) o las buenas prácticas de manufactura (BPM).

La reutilización del agua de condensado ya sea para ajustar los °Brix, restablecer aromas o lavar las cáscaras en los JAT, puede convertirse en un riesgo.

El muestreo a lo largo del proceso de elaboración demostró el incumplimiento de las BPM, y permitió establecer las causas de las fallas para implementar las medidas correctivas. Por este motivo es importante que el sector cumpla eficientemente con esta metodología obligatoria (Código Alimentario Argentino)(38) , y que así se logre ausencia de TAB en jugos de acuerdo a lo requerido nacional e internacionalmente por los compradores.

Tabla 1: Caracterización de la producción de frutas y jugos de Argentina

Indicadores de producción	Pera	Manzana	Cítricos
Producción de frutas en Argentina (toneladas/año)	500 .000	1.300.000 10 a 30% considerada eco fruta	Limón 1.3120.000 Naranja 770.000 Mandarina 463.000 Pomelo 175.000
Producción de fruta Mundial (toneladas/año)	13.000.000	43.500.000	100.000.000
Importancia como productor de fruta	Principal productor del hemisferio sur		Segundo productor del hemisferio sur
% de fruta exportada sobre el total producido en toneladas/año	60 %	14 %	Limón 230.000, Naranja 100.000, Mandarina 40.000, Pomelo 25.000
Variedades más importantes producidas en Argentina	Williams, Packham's Triumph	Red Delicious, Granny Smith, Gala y Golden.	Okitsu, Ellendale, Satsuma, Murckott, Valencia, Navel

Indicadores de producción	Pera	Manzana	Cítricos
Principales Regiones productoras	Río Negro, Neuquén y Mendoza	Río Negro, Neuquén y Mendoza	NOA (Tucumán y Salta), NEA (Entre Ríos, Corrientes y Misiones) y Buenos Aires (San Pedro)
% de fruta destinada a industria	20 %	50 %	70 % de la produc. de limón. 90 % de la de pomelo blanco. Naranja, mandarina y pomelo rosado, el principal destino es el consumo fresco.
% destinado a jugo	65 %	80 %	34 %
Toneladas de jugo / año	20.000	88.000	46.000
Promedio en kg fruta/kg de jugo concentrado	7,4 (70 °Brix finales)	6,7(70 °Brix finales)	El rendimiento industrial depende (entre otros) de la especie a procesar, variedad, zona de producción y época del año.
Características de la producción de jugos	Ppal. productor del hemisferio Sur	Principal productor del hemisferio Sur	Principal exportador mundial de jugo de limón.
Nº de puestos de trabajo	41.000 en toda la cadena		100.000
Nº de Industrias	14, (10 en Río Negro)		16 (3 en Concordia, Entre Ríos)

Indicadores de produc.	Pera	Manzana	Cítricos
Tipos de jugos y usos	Clarificado (70 - 71 °Brix) industria de jugos	Clarificado (70 - 71 °Brix) industria de jugos y endulzar gaseosas.	Jugos concentrados: Limón (60 %), Naranja (22 %), Pomelo (11 %), Mandarina (7 %) Usados en elaboración de bebidas sin alcohol, jugos exprimidos pasteurizados y cremogenados
	Jugo c/ pulpa (60 °Brix), para jugos y néctares.	Jugo c/ pulpa (60 °Brix), para jugos y néctares.	
% del jugo exportado	95 %	95 %	50 %

FUENTE: SAGPyA, Federcitrus, Cafí, Federfrutícola (1,2,3,4)

Tabla 2: Bacterias Ácido Termófilas (TAB) en frutas y Jugos

Tipo de muestra		Nº de muestras analizadas	Nº de muestras TAB positivas	°Brix	pH
Fruta	Naranja Valencia *	24	4	-	-
	Naranja Valencia **	48	No detectado	-	-
	Mandarina *	8	No detectado	-	-
	Mandarina **	16	1	-	-
Jugo exprimido sin concentrar	Naranja *	2	No detectado	10-11	3,40±0,20
	Mandarina *	1	No detectado	10-12	4,34±0,12
Jugo concentrado	Manzana	267	5	70-71	3,55±0,20
	Pera	267	5	70-71	3,50±0,10
	Naranja **	60	No detectado	55-60	3,10±0,20
	Mandarina **	9	1	55-60	3,50±0,10
	Pomelo	4	No detectado	48-52	2,98±0,10
JAT	Naranja	13	No detectado	50-52	3,70±0,20
	Mandarina	1	No detectado	50-52	3,70±0,20
	Pomelo	1	No detectado	45-47	3,50±0,20
Agua de arrastre de frutas	Pera y manzana	2	No detectado	-	6,50±0,10
	Cítricos	-	-	-	6,60±0,20
Agua del parque industrial	Pera y manzana	4	1	-	-
	Cítricos	4	No detectado	-	6,80±0,20
Agua de ósmosis	Pera y manzana	4	No detectado	-	6,90±0,10
Agua de condensado	Pera y manzana	4	4	-	6,90±0,10
	Cítricos	10	10	-	6,70±0,10
Aire	Pera y Manzana	12	No detectado	-	-
	Cítricos	12	No detectado	-	-

*: Procedentes de frutas de quintas orgánicas.

** : Procedentes de frutas de quintas tradicionales

(-): No realizado

Figura 1: Proceso de elaboración de jugo de manzana y pera

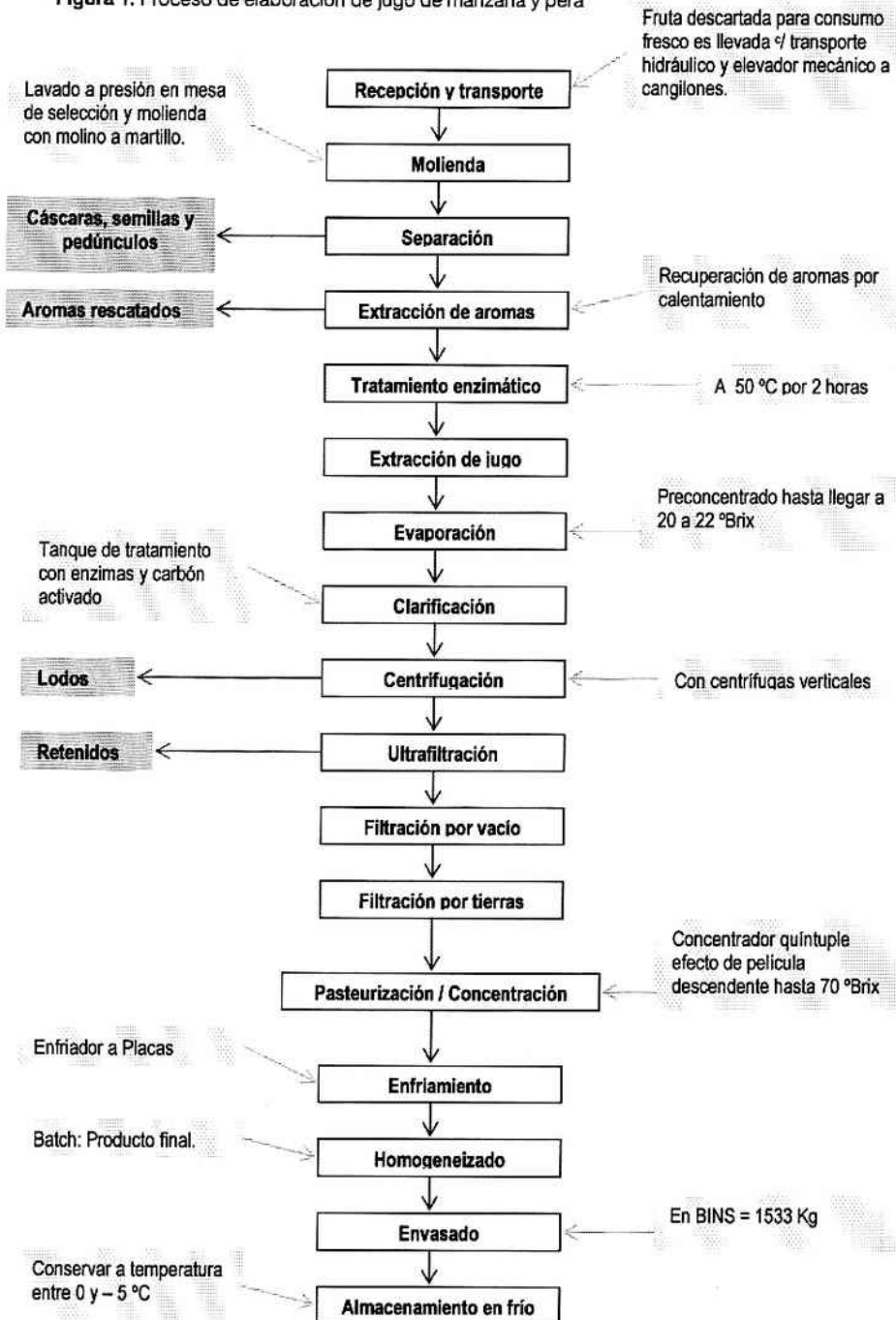
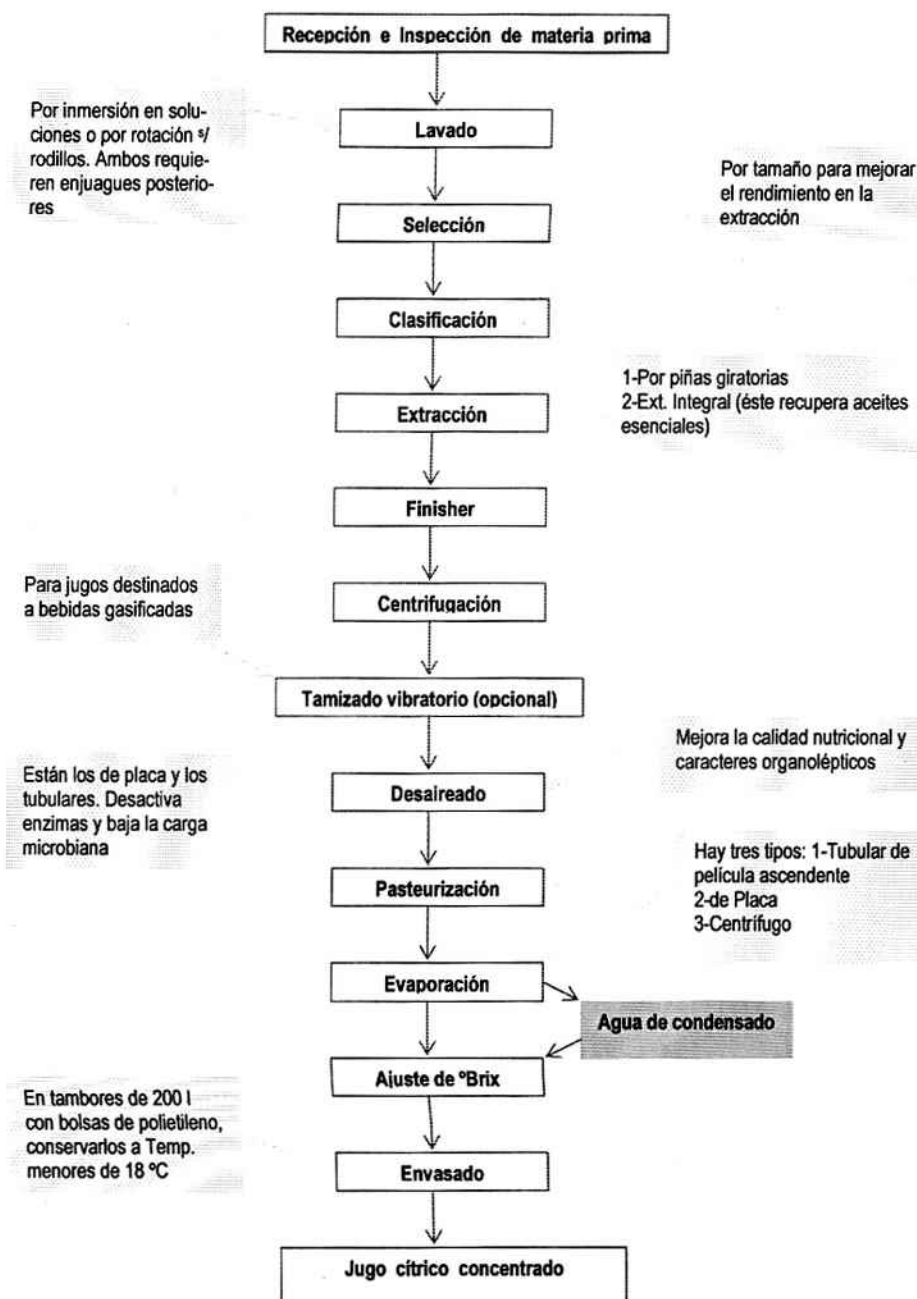


Figura 2: Proceso de elaboración de jugo cítrico



Bibliografía

1. SAGPyA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación de la Nación Argentina). www.alimentosargentinos.gov.ar
2. Cámara Argentina de Fruticultores Integrados. <http://www.cafi.org.ar>
carfin@peedy.com.ar
3. Federación de Productores de frutas de Neuquén y Río Negro.
www.federfruticola.org.ar
fpfrnn@neunet.com.ar
4. FEDERCITRUS: www.federцитrus.org
federцитrus@ciudad.com.ar
5. Sadler, G., Parish, M.E., Wicker, L. 1992. "Microbial, enzymatic and chemical changes during storage of fresh and processed orange juice". *Journal of Food Science*. **57**: 1187 - 1191.
6. Parish, M.E., Higgings, D.P. 1989 "Yeast and molds isolated from spoiling citrus products and by-products". *J.Food Protect*. **52**, 261-263.
7. Berry, J.M.; Witter, L.D.; Folinazzo, J.F. 1956 "Growth characteristics of spoilage organisms in orange juice". *Food Technology*, **10**: 553 - 556.
8. Parish, M.E.; Hill, E.C. 1959. "Microbiology of citrus fruit processing". Gainesville, Florida, Fl. Ag. Expt. Sta. Bull. pp. 618.
9. Parish, M.E. 1991 "Microbiological concerns in citrus juice processing". *Food Technology*. **45**: 128-134.
10. Borlinghaus, A., Engel, R. 1997. "*Alicyclobacillus* incidences in commercial apple juice concentrate (AJC): supplies, method development and validation". *Fruit processing*. **7**:1-5.
11. Cerny, G., W. Hennlich, K. Poralla. 1984. "Spoilage of fruit juice by bacilli: isolation and characterization of the spoilage organism". *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **179**:224-227.
12. Lusardi, C., Prevedi, M.P., Colla, C., Barbieri, G., Bolsón, L. 2000. "Capacita' dap arte di ceppi di *Alicyclobacillus* di alterare succhi e netari di frutta". *Ind. Conserve*, **5**, 113.
13. Walls I, Chuyate R. 2000. "Isolation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from fruit juices". *J. AOAC Int. Sep-Oct*; **83** (5):1115-20.
14. Wisse, C. A., Parish, M.E. 1998. "Isolation and enumeration of spore forming, thermo acidophilic, rod-shaped bacteria from citrus processing environments". *Dairy Food and Environ. Sanitation*. **18**:504-509.
15. Yamazaki, K., Teduka, I., Shinano, I. 1996a "Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from acidic beverages". *Biosci. Biotech. Biochem.* **60**:543-545.
16. Prevedi, P., Colla, F., Vicini, E. 1995. "Characterization of *Alicyclobacillus*, a sporeforming thermophilic acidophilic bacterium". *Industrial Conserve*. **70**:128-132.
17. Walls, I. and Chuyate, R. 1998. "*Alicyclobacillus* Historical perspective and preliminary characterization studies". *Dairy Food and Environ. Sanitation*. **18**:499-503.
18. Darland, G., Broock, T.D. 1971. "*Bacillus acidocaldarius* sp. nov., an acidophilic thermophilic spore-forming bacterium". *Journal of General Microbiology*. **67**:9-15.
19. Fellers, P.J. 1988. "Shelf life and quality of freshly squeezed, unpasteurized, polyethylene-bottled citrus juice". *Journal of Food Science*. **53**: 1699.
20. Murdock, D.I.; Hatcher, W.S., Jr. 1975. "Growth of microorganisms in chilled orange juice". *Journal of Milk Food Technology*. **38**: 393 - 396.
21. Deinhard, G. 1987. "*Bacillus acidoterrestris* sp. Nov. und *Bacillus cycloheptanicus* sp. Nov. zwei neue acidophile Bacillus-Arten, die w-alicyclische Fettsauren enthalten". PhD Thesis. University of Tübingen, Germany.
22. Eiroa, M.N, Junqueira, V.C, Schmidt, F.L. 1999. "*Alicyclobacillus* in orange juice: occurrence and heat resistance of spores". *J. Food Prot.* Aug; **62**(8):883-6.
23. Jensen, N, Whitfield, F.B. 2003. "Role of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in the development

of a disinfectant taint in shelf-stable fruit juice". *Lett. Appl. Microbiol.* 36(1):9-14.

24. Matsubara H, Goto K, Matsumura T, Mochida K, Iwaki M, Niwa M, Yamasato K. 2002. "*Alicyclobacillus acidiphilus* sp. nov., a novel thermo-acidophilic, omega-alicyclic fatty acid-containing bacterium isolated from acidic beverages". *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* Sep; (52):1681-5.
25. Goto, K., Mochida, K., Asahara, M.A., Suzuki, M., Kasai, H., Yolota, A. 2003. "*Alicyclobacillus pomorum* sp. nov., a novel thermo-acidophilic, endospore-forming bacterium that does not possess w-alicyclic fatty acids, and emended description of the genus *Alicyclobacillus*". *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53(5): 1537 - 1544.
26. McIntyre, S., Ikawa, J.Y., Parkinson, N., Haglund, J., Lee, J. 1995. "Characteristics of an acidophilic *Bacillus* strain juices". *J. Food Protect.* 58, 319-321.
27. Splittstoesser, D. F., J. J. Churey, Lee, C. 1994. "Growth characteristics of aciduric sporeforming bacteria isolated from fruit juices". *J. Food Protection* 57:1080.
28. Deak T, Timar E. 1998. "Simplified identification of aerobic sporeformers in the investigation of foods". *Intern. Journal of Food Microbiology.* 6(XII):115-125.
29. Pettipher GL, Osmundson ME, Murphy JM. 1997. "Methods for the detection and enumeration of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and investigation of growth and production of taint in fruit juice and fruit juice-containing drinks". *Lett Appl Microbiol.* Mar; 24(3):185-9.
30. Splittstoesser, D. F., Lee, C., Churey, J. 1998. "Control of *Alicyclobacillus* in the juice industry". *Dairy Food and Environ. Sanitation.* 18:585-587.
31. Colección Española de Cultivos Tipo. CECT. www.cect.org
32. Eguchi, SY; Manfio, GP; Pinhatti, ME; Azuma, E; Variane, SF. (1999) "Acidothermophilic Sporeforming Bacteria (ATSB) in Orange Juice: Detection, Methods, Ecology, and Involvement

in the Deterioration of Fruit Juices". ABECitrus. Fundación André Tosello, Brasil. 1-52

34. Iacono, V.A.; Serrano, L.; Sanchis, J.C.; Carughi, Isabel. 2002. "Bacterias esporuladas en frutas y jugos de naranja". FABICIB. Vol 6. pag: 89-96.
35. Vaccari, MC; Benzzo, MT; Sanchis, JC, Iacono, VA. 2005. Jugos de naranja concentrados congelados sin conservantes. Carga microbiana y bacterias esporuladas. FABICIB. Vol 9. pp: 17-24.
36. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. INTA. 2001. PROTOCOLO. Producción Integrada de Cítricos. Región del Río Uruguay. 34pp., Centro Regional Entre Ríos, EEA Concordia.
37. Magdalena, C., Di Masi, S. y Colodner, A. 2001. Programa "Producción Integrada de Frutas-Patagonia".
38. Código Alimentario Argentino. Zumos (jugos) normas alimentarias. www.anmat.gov.ar/codigoa/caa1.htm.