

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

Tesis presentada como parte de los requisitos de la Universidad Nacional del Litoral, para la obtención del Grado Académico de:

Magíster en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Determinación de los tiempos de reducción decimal (D) a distintas temperaturas de cepas de *Alicyclobacillus* spp aisladas durante la elaboración de jugos concentrados de manzana. Comportamiento de las mismas frente a sanitizantes de uso industrial

Autor: Licenciada María Isabel Luján

Director: Dr. Juan Carlos Basilico

Codirectora: Dra. María de la Luz Zapata de Basilico

Lugar de realización: en una industria elaboradora de jugos concentrados de manzana y pera de la provincia de Río Negro en colaboración con el Asentamiento Universitario Villa Regina dependiente de la Universidad Nacional del Comahue y la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Litoral

2010

Agradecimientos

Resumen

1.-INTRODUCCIÓN

1.1.-Producción de manzanas y peras	1
1.1.1.-Panorama mundial.....	1
1.1.2.-Producción nacional.....	2
1.2.-Jugos concentrados de manzana y pera	8
1.2.1.-Proceso de obtención de jugos concentrados de manzana y pera.....	8
1.2.2.-Otros procesos de elaboración de jugos concentrados de manzana.....	12
1.2.3.-Perfil productivo del jugo concentrado de manzana.....	14
1.2.3.1.-Mercado mundial.....	14
1.2.3.2.-Producción nacional.....	15
1.2.4.-Perfil productivo jugo concentrado de pera.....	18
1.2.4.1.-Panorama mundial.....	18
1.2.4.2.-Producción nacional.....	19
1.2.5.-Legislación.....	20
1.3.-Microbiología de los jugos de fruta	24
1.3.1.-Generalidades.....	24
1.3.2.-Bacilo o bacteria acidotermófila (TAB).....	26
1.3.3.- <i>Alicyclobacillus</i> spp.....	26
1.3.3.1.-Características de <i>Alicyclobacillus</i> spp.....	28
1.4.-Inactivación térmica de esporos	36
1.4.1.-Principios de la destrucción térmica de los microorganismos.....	36
1.4.2.-Parámetros cinéticos de inactivación térmica.....	39
1.4.2.1.-Tiempo de reducción decimal D.....	39
1.4.2.2.-Constante de resistencia térmica z.....	41
1.4.3.-Medida del grado de destrucción por calor húmedo de microorganismos	42
1.4.4.-Análisis de los datos de destrucción térmica.....	43
1.4.5.-Factores que afectan la destrucción de los microorganismos por calor húmedo.....	45

1.5.-Inactivación química de esporos.....	49
1.5.1.-Factores que ejercen influencia sobre la eficacia de los agentes antimicrobianos.....	49
1.5.1.1.-Condiciones de pretratamiento.....	49
1.5.1.2.-Factores durante el tratamiento.....	51
1.5.1.3.-Factores post – tratamiento.....	55
1.5.1.4.-Biofilms bacterianos.....	57
1.5.2.-Resistencia de esporos bacterianos a agentes químicos.....	57
1.5.3.-Agentes químicos.....	59
1.5.3.1.-Compuestos peroxi.....	59
1.5.3.2.-Cloro y compuestos a base de cloro.....	71
2.-OBJETIVOS.....	76
3.-MATERIALES Y MÉTODOS.....	79
3.1.-Descripción del proceso de elaboración de jugos concentrados y puntos de muestreo. Flow Sheet (donde se indican todos los puntos de toma de muestras: jugos, aguas).....	79
3.2.-Toma de muestras.....	81
3.2.1.-Toma de muestras de productos intermedios y jugos concentrados.....	82
3.2.2.-Toma de muestras de aguas del proceso.....	83
3.3.-Procesamiento de las muestras y recuentos de bacterias ácido termófilas esporuladas (TAB).....	84
3.4.-Confirmación de aislados del género <i>Alicyclobacillus</i>.....	85
3.5.-Identificación de especies pertenecientes al género <i>Alicyclobacillus</i>.....	85
3.6.-Producción de guayacol a partir de aislados de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>.....	87
3.7.-Ensayo de resistencia térmica de esporos de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> productora de guayacol.....	88
3.7.1.-Producción de esporos.....	88
3.7.2.-Ensayo de inactivación térmica.....	89

3.7.3.-Cálculos y análisis estadístico.....	90
3.8.-Evaluación de diferentes sanitizantes para el control de esporos de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> productora de guayacol en suspensión acuosa.....	91
3.8.1.-Producción de esporos.....	91
3.8.2.-Ensayo de inactivación.....	91
3.8.3.-Cálculos y análisis estadístico.....	92
4.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	94
4.1.-Recuentos de bacterias ácido termófilas esporuladas (TAB) en distintas etapas del proceso de producción de jugos concentrados.....	94
4.2.-Recuentos de bacterias acidotermófilas (TAB) en muestras de aguas de proceso.....	99
4.3.-Caracterización de los aislados de <i>Alicyclobacillus</i>.....	100
4.3.1.-Caracterización morfológica y fisiológica.....	100
4.3.2.-Producción de guayacol en aislados de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> ...	102
4.4.-Control de producto final durante el año 2006.....	103
4.5.-Estudio de inactivación térmica en esporos de la cepa de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> EC1 buena productora de guayacol.....	105
4.5.1.-Determinación del parámetro D.....	105
4.5.2.-Determinación de z.....	108
4.6.-Evaluación de diferentes sanitizantes para la inactivación de esporos de la cepa <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> EC1 buena productora de guayacol.....	111
4.6.1.-Evaluación del sanitizante OXI 5.....	111
4.6.2.-Evaluación del sanitizante Vortexx.....	114
4.6.3.-Evaluación del sanitizante hipoclorito de sodio.....	116
5.-CONCLUSIONES.....	120
6.-BIBLIOGRAFÍA.....	122

7.-ANEXOS

ANEXO A.....	144
ANEXO B.....	148
ANEXO C.....	150

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecerle a Dios, el hacedor, la fuerza impulsora del Universo.

Al Doctor Juan Carlos Basílico, por su confianza y aliento en los momentos más difíciles, por ayudarme a crecer, por brindarme una oportunidad. Gracias.

A Adriana, una persona muy importante en mi vida, gracias por acompañarme en el proceso de la vida.

A Fabio y mi madre.

A la Doctora María de la Luz Zapata, por ayudarme y contribuir en mi formación profesional.

A la Universidad Nacional del Litoral y Universidad Nacional del Comahue.

A JUGOS S.A. por abrir sus puertas y brindarme su confianza y todo aquello que estuviera a su alcance. A Carlos, Dolores, Marco, Honorio, Víctor, Ariel, Martín, compañeros con los cuales compartí maravillosos momentos. Gracias por su ayuda desinteresada.

A Mónica, Beatriz, Soraya, Ester, Leonardo, Adriana, Laura, quienes directa o indirectamente colaboraron para que este trabajo sea posible.

A Carolina, gracias por todo lo que me brindaste en mi estadía en Santa Fe. Momentos que perduraran siempre en mi corazón.

Laura, Silvina, gracias por su colaboración.

Tú eres lo que es el profundo deseo que te impulsa.

Tal como es tu deseo es tu voluntad.

Tal como es tu voluntad son tus actos.

Tal como son tus actos es tu destino.

- Brihadaranyaka Upanishad IV.4.5

Argentina produce 1,8 millones de toneladas de frutas pomáceas al año; el 60% de ese volumen corresponde a manzana. La región productora de manzana y pera se localiza en el Alto Valle del Río Negro y Neuquén, y en el Valle Medio del Río Negro, donde se concentra el 80% de la producción. En el caso de la manzana se deriva hacia la industria la mitad de la cosecha. El 80% del volumen industrializado tiene como destino la molienda para elaborar jugo concentrado.

Argentina lidera la producción de jugos concentrados en el hemisferio sur, ocupa el 5° lugar como productor y exportador, ofertando el 5% del comercio mundial. En promedio, el 90% de la producción argentina de jugos concentrados se exporta, fundamentalmente a EE.UU.

Las características fisicoquímicas de los jugos de frutas concentrados sumado al proceso de pasteurización hacen que la mayoría de los microorganismos patógenos y/o alterantes se vean inhibidos en su desarrollo. De los microorganismos contaminantes (mohos y levaduras, bacterias ácido lácticas y bacterias esporuladas), sólo una pequeña proporción tiene la habilidad de crecer en los jugos reconstituidos.

Por otra parte con el proceso de pasteurización sólo se destruye la flora vegetativa, mientras que sobreviven las esporas de bacterias más resistentes al calor.

En la actualidad, *Alicyclobacillus* representa el problema más serio que tiene la industria de bebidas a base de jugos de frutas. Los microorganismos pertenecientes a este género son bacterias con forma de bastón, acidófilas, aeróbicas, formadoras de esporos resistentes al calor, que no presentan desarrollo cuando se cultivan en medios con pH neutro. La presencia de *Alicyclobacillus* en jugos y otros alimentos no produce riesgo para la salud humana. Sin embargo, el deterioro causado por algunos miembros del género *Alicyclobacillus* se manifiesta por la formación de off-flavors y off-odors debido a productos tales como guayacol y halofenoles.

En el presente trabajo se estudió la ocurrencia de *Alicyclobacillus* spp. en jugos de manzana y pera en las diferentes etapas del proceso y en las aguas usadas y producidas en el mismo. El estudio se llevó a cabo en una Planta elaboradora de jugos y aromas concentrados, situada en el Alto Valle de Río Negro y Neuquén. De esta forma se constató la presencia de bacterias esporuladas acidotermófilas (TAB) en la Planta y se confirmó a partir de estos aislados la presencia del género *Alicyclobacillus* por sus

características morfológicas y fisiológicas. Se comprobó en cepas de *Alicyclobacillus acidoterrestris* la capacidad de producir guayacol.

En este estudio también se determinaron los parámetros cinéticos de inactivación térmica en una cepa de *Alicyclobacillus* aislada de la planta, en jugo de manzana a 20 °Bx y pH 3,45. Los valores **D** calculados a 88, 90, 92 y 95 °C fueron respectivamente 15,63, 9,21, 6,23 y 3,50 minutos. El valor **z** resultó ser 10,9°C. Con estos datos se constató la elevada resistencia térmica de la cepa de *Alicyclobacillus acidoterrestris* EC1, buena productora de guayacol.

Por otro lado, se evaluaron sanitizantes de uso industrial sobre esporas de la cepa *A. acidoterrestris* EC1 en suspensión acuosa. Los sanitizantes evaluados fueron hipoclorito de sodio, OXI 5 (ácido peracético 5%, peróxido de hidrógeno 28%) y Vortexx (peróxido de hidrógeno 6,9%, ácido peroxiacético 4,4%, ácido octanóico 3,3%) a diferentes concentraciones y tiempos.

El tratamiento con OXI 5 al 0,15% al cabo de 30 minutos redujo la población de esporos en 2,24 log. Similar resultado (2,31 log) se obtuvo cuando los esporos fueron tratados al doble de la concentración del sanitizante en la mitad de tiempo.

El tratamiento con Vortexx al 0,1%, redujo la población de esporos en 2,51 log a los 30 minutos. Similar reducción (2,6 log) se obtuvo al 0,2% a los 15 minutos.

Con hipoclorito de sodio (500 y 1000 ppm de cloro activo) a los 9 minutos de tratamiento la reducción en la población de esporos fue de 1,17 y 1,68 log respectivamente.

INTRODUCCIÓN

1.1.-PRODUCCIÓN DE MANZANAS Y PERAS

1.1.1.-Panorama mundial

En el período 1998-2007, la producción mundial de pera creció 30%, en tanto que la de manzana se mantuvo estable, al igual que las exportaciones de ambas frutas. En el año 2007 la producción mundial de manzana fresca fue de 47 millones de toneladas, y la de pera fresca alcanzó los 17 millones. Las exportaciones mundiales sumaron 5 y 1,6 millones de toneladas, respectivamente.

China lidera la producción mundial de manzanas y peras frescas, concentrando más de la mitad del volumen. También es el primer exportador de manzana fresca, pero sólo representa el 20% de la oferta mundial, seguida por Chile e Italia, que suman el 30%.

Argentina sólo supera a China en las exportaciones mundiales de pera fresca, ubicándose en el primer lugar con el 30% de la oferta, posición que ha logrado gracias a una regularidad en la oferta de variedades que gozan de buena aceptación y reconocida calidad, como la variedad William's, seguida por Packham's Triumph. Asimismo, Argentina es el principal productor y exportador de pera del hemisferio sur.

La demanda mundial de pomáceas está liderada por Rusia, país que en los últimos años se transformó en un importante consumidor.

Tanto la producción como las importaciones mundiales de manzana y pera están muy concentradas en el hemisferio norte, mientras que los países del hemisferio sur tienen un mayor protagonismo en la oferta.

El 30% de la producción mundial de manzana es destinado a industria y a su vez, la mitad se muele para jugo concentrado.

Sólo el 10% de la producción mundial de pera se industrializa, teniendo como principal subproducto las conservas, seguido por los jugos concentrados (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos, 2007).

1.1.2.-Producción nacional

Argentina produce 1,8 millones de toneladas de frutas pomáceas; el 60% de ese volumen corresponde a la manzana.

Durante la década 1998-2007, la producción nacional de pera creció en alrededor de 40%, debido principalmente a las inversiones en tecnología y a las nuevas plantaciones. Esta situación contrasta con las marcadas oscilaciones interanuales que se presentan en manzana, que en algunos períodos superan el 20%.

La región productora de manzana y pera se localiza en el Alto Valle del Río Negro y Neuquén, y en el Valle Medio del Río Negro, que concentran el 80% de la producción. El resto se genera en el Valle de Uco (Mendoza). Otras zonas de menor relevancia son 25 de Mayo (La Pampa) y el Valle del Tulum (San Juan).

Se estima que son 27.175 las hectáreas cultivadas con manzana y 22.028 las que producen pera. En el Valle de Río Negro y Neuquén y el Valle Medio, el 50% de las chacras tienen menos de 10 hectáreas, mientras que en Mendoza representan el 90%.

Los productores de pera y manzana –unos 4.000- están asociados a la Federación de Productores de Frutas de Río Negro y Neuquén, mientras que en Mendoza, la entidad más representativa es la Cámara de Comercio, Industria y Agricultura de Tunuyán.

El 65% de la cosecha nacional de manzana corresponde a la variedad Red Delicious y sus clones; el 15% corresponde a Gala y sus clones, coincidiendo este porcentaje para Granny Smith. El 5% restante se reparte entre Pink Lady, Rome Beauty, Golden Delicious, Fuji y Braeburn. Aunque aún es incipiente, se registra un proceso de cambio varietal –en especial a través de Gala- como respuesta a las preferencias del mercado mundial.

En cuanto a las variedades cultivadas de pera, el 45% corresponde a William's y el 30% a Packham's Triumph. Le siguen Beurre D' Anjou con el 10%, Red Bartlett con 6% y Abate Fetel con el 2% del volumen producido. El porcentaje restante incluye a Beurre Bosc, Beurre Giffard, Clapps Favourite y Red Beurre D' Anjou.

La cosecha de pera comienza a principios de enero y finaliza a mediados de marzo, en tanto que la de manzana se extiende desde fines de enero hasta mediados de abril.

El calendario tentativo de cosecha, es definido por el SENASA –Res. SAG N° 554/83 y Res. Ex IASCAV N° 203/93 –en función del estado de madurez óptima de la fruta y

difiere según la variedad. Los productores y/o empacadores deben solicitar la autorización para iniciar la cosecha, en las delegaciones zonales del SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria).

El 50% de los productores son independientes y sólo intervienen en la primera venta del producto. Los medianamente integrados –que empacan o comercializan su producción –representan el 30% del total y tienen mayor poder de negociación. El porcentaje restante corresponde a los productores totalmente integrados, que además de contar con tecnología de punta en todas las fases de la cadena, controlan la comercialización en el mercado externo (CAFI, Cámara Argentina de Fruticultores Integrados).

Tabla 1.1. Destino de la producción (%)

Fruta	Exportación	Industria	Mercado interno
Manzana	22	50	28
Pera	63	25	12

La Carpocapsa o “Gusano de la pera y la manzana” (*Cydia pomonella*) es la plaga que mayor perjuicio ocasiona en la producción de estas frutas y –por ende- a la economía regional. Además de las pérdidas directas que provoca al dañar la fruta, este flagelo limita el acceso a nuevos mercados y a destinos tradicionales como Brasil, que ha establecido restricciones cuarentenarias.

SENASA juntamente con la Comisión de Sanidad Vegetal de la FunBaPa (Fundación Barrera Zoofitosanitaria Patagónica), desarrolla un programa de lucha con el objetivo de llevar los porcentajes de daño de la plaga por debajo de umbrales que permitan asegurar la competitividad comercial de las frutas producidas en la región.

La provincia de Mendoza, a través del Escamen (Instituto de Sanidad y Calidad Agropecuaria), cuenta con un sistema de alerta (Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de Plagas).

Debido al tipo de variedad comercializada y a la calidad de la fruta para fresco, son bien diferentes las características de los mercados de estas frutas.

La pera, favorecida por la excelente calidad de la variedad William’s, tiene un destino bien marcado hacia el consumo fresco y en especial hacia la exportación.

En el caso de la manzana, la escasa oferta argentina de las variedades más requeridas por los compradores internacionales y el alto porcentaje de fruta que no cubre las exigencias de calidad del mercado fresco, genera que se derive hacia la industria la mitad de la cosecha. El 80% del volumen industrializado tiene como destino la molienda para elaborar jugo concentrado.

El sector comienza a trabajar para otorgarle mayor valor agregado al producto comercializado. En este sentido, se ha dado inicio a la solicitud de los actores del Valle de Río Negro y Neuquén dirigida a la elaboración del Protocolo de Calidad para manzana y pera fresca, a fin de obtener el sello de calidad “Alimentos Argentinos” (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos, 2007).

Consumo

Argentina consume en promedio 8 Kg. de manzana y 3 Kg. de pera frescas por habitante y por año, valores bajos comparados con China y la Unión Europea. En nuestro país aún son escasas las campañas nacionales de promoción del consumo.

El 80% de la manzana consumida en el mercado interno corresponde a Red Delicious, el 11% a Granny Smith y el 6% a Gala. La pera preferida por el consumidor argentino es la William's (60%), correspondiendo a Packham's Triumph el 35%.

Apenas el 25% de la oferta interna se comercializa a través del Mercado Central de Buenos Aires. Durante los últimos años, han adquirido preponderancia otros mercados del interior del país tales como Córdoba, Mendoza, Tucumán y Rosario.

Un cambio importante en la distribución interna de manzana y pera ha sido el aumento de las ventas directas a supermercados e hipermercados, la modernización de las verdulerías y la mayor heterogeneidad de la demanda. Además, son crecientes las exigencias de calidad, sanidad, color y tamaño, por parte de los distribuidores minoristas.

Pese a los avances tecnológicos registrados, aún puede considerarse inadecuado el manejo y excesivo el manipuleo de la mercadería desde la cosecha hasta la góndola (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos, 2007).

Exportaciones en fresco

En el año 2007 Argentina exportó 283.000 toneladas de manzana fresca y 454.000 de pera, lo que representó un ingreso de divisas de 156 y 269 millones de dólares respectivamente.

Entre 1998 y 2007, las exportaciones que más crecieron fueron las de pera fresca (60%), mostrando una tendencia creciente, al igual que las ventas externas de manzana, que se incrementaron un 25%.

Rusia –integrante de la CEI (Comunidad de Estados Independientes)- y Brasil, absorben casi el 50% de las ventas argentinas de pera y manzana fresca, pero a nivel de bloque económico, el principal destino es la Unión Europea, que concentra entre el 35% y 40% de la oferta total, respectivamente.

En el caso de la pera fresca el tercer comprador es EE.UU., que absorbe el 15% de la oferta argentina.

Asimismo, si bien aún los volúmenes son bajos, se destaca el crecimiento sostenido de los volúmenes de pera fresca adquiridos por México a partir de 2001, año en que se eliminaron los aranceles de importación para los envíos provenientes de Argentina.

A diferencia de la región de los valles Alto y Medio, la producción de manzana y pera frescas de Mendoza se destina principalmente al mercado interno y MERCOSUR.

Si se consideran las exportaciones por variedades, la manzana Red Delicious tiene como principales destinos Brasil y Rusia, en tanto que Gala se envía preferentemente a la Unión Europea y Rusia. La variedad verde Granny Smith tiene al mercado ruso como el más activo.

En lo que se refiere a la pera William's, los principales compradores son la Unión Europea y Brasil, mientras que Packham's Triumph se vende a esos mismos destinos y a Rusia. Las categorías comercializadas son superior, elegida y comercial.

Las frutas salen principalmente por los puertos de San Antonio Este (SAE) –Río Negro- y Buenos Aires hacia ultramar (Rusia, Unión Europea y EE.UU.), en tanto que por Santo Tomé (Corrientes) y Bernardo de Irigoyen (Misiones), sale la mayoría de los envíos vía terrestre hacia Brasil.

El SAE es un puerto especializado en embarques de frutas, debido a la cercanía con las cuencas productivas (450 Km.).

Entre marzo y junio se embarca la fruta con destino a la Unión Europea, concentrándose las cargas durante los primeros dos meses. Durante el segundo semestre se genera el mayor movimiento hacia Brasil. Esta distribución en las ventas, permite atenuar la estacionalidad de la mano de obra.

Durante la campaña 2002-2003, se puso en funcionamiento el Sistema de Mitigación del Riesgo (S.M.R.) para toda la manzana y pera frescas enviadas a Brasil. Este mecanismo contempla la toma de muestras en chacra, empaque, registro e inspección a bulto terminado. Participan funcionarios sanitarios de ambos países y el objetivo es certificar la ausencia de larvas vivas de *Carpocapsa* (Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de Plagas, 2007).

Industrialización

En la región del Alto Valle, el Valle Medio y en Mendoza existe una red de agroindustrias elaboradoras de jugos concentrados, sidra, deshidratados, conservas, pulpas deshidratadas y licores.

Los jugos concentrados se obtienen por concentración del jugo de distintas variedades de pera o manzana, acentuándose el período de elaboración entre enero y mayo.

La industria emplea en promedio 6,7 kg. de manzana para obtener 1 Kg. de jugo concentrado, mientras que en el caso de la pera la relación es de 7,4 a 1.

Existen dos tipos de jugos concentrados: el clarificado (70-71° Brix) que emplea la industria de jugos y gaseosas, y el jugo con pulpa (60° Brix) para jugos y néctares.

El nivel de ocupación del sector juguero es de 1.000 a 1.100 puestos de trabajo que requieren mano de obra calificada.

Las inversiones que concretaron las empresas durante la última década, apuntaron a mejorar la eficiencia del proceso. La tecnología utilizada es de origen italiano y norteamericano.

Los aromas de manzana y pera son subproductos que se recuperan en la elaboración y se comercializan por separado. Representan entre el 0,5% y 1% de la producción de jugo concentrado y son utilizados por las industrias elaboradoras de bebidas y perfumes (CINEX, Cámara Argentina de la Industria y Exportación de Jugos de Manzanas, Peras y Afines).

Otro subproducto es la fruta deshidratada, de excelente calidad y que satisface a los mercados más exigentes. EE.UU. compra el 70% de la manzana deshidratada argentina, y junto al Reino Unido y Chile, absorbe el 65% de las exportaciones argentinas de pera deshidratada.

Manzanas y peras deshidratadas se comercializan bajo distintas formas (cubitos, rodajas, cubos con cáscara, trozos, gajos, cubos sin aditivos y polvos) envasadas en bolsas herméticas de 10 Kg., 12,50 Kg. o 22, 68 kg., contenidas en caja de cartón.

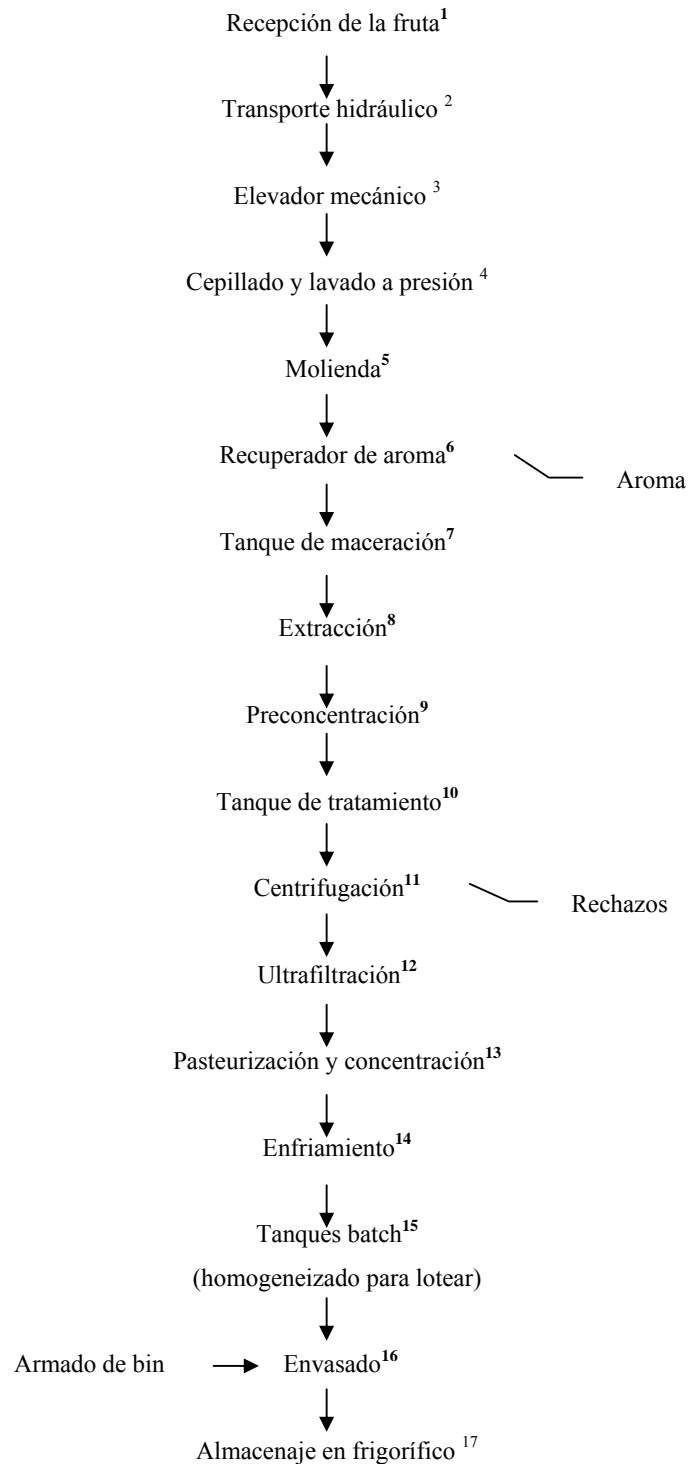
Su utilización como insumo es variada: repostería, cereales para el desayuno, productos snack, servicios de comida e industria láctea, entre otros. Existen dos empresas que elaboran alrededor de 1.400 toneladas de manzana deshidratada anuales, a partir de las variedades Granny Smith y Red Delicious. De pera deshidratada se producen menos de 1.000 toneladas anuales, principalmente a partir de la variedad William's.

Sólo el 3% de la pera en conserva se destina al mercado mundial, donde se destaca EE.UU. como principal comprador.

La sidra es otro producto derivado de la manzana, y el Código Alimentario Argentino autoriza el agregado de hasta un 10% de jugo concentrado de pera en el producto final. (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos, 2007).

1.2.-JUGOS CONCENTRADOS DE MANZANA Y PERA

1.2.1.-Proceso de obtención de jugos concentrados de manzana y pera



Recepción de la fruta

La fruta que ingresa a industria puede proceder de chacra o galpón de empaque y se transporta en bins o a granel en camiones volcadores.

Al llegar a la industria, se controla el peso, se etiqueta e inspecciona. Se toman datos sobre variedad, tipo de fruta, estado de madurez, grados brix, acidez, calidad y residuos de plaguicidas.

Luego, la fruta ingresa a la playa donde se almacena para luego volcarse en silos o lagares, piletas de hormigón armado recubiertas con epoxi. Una vez llenos los lagares o silos, se introduce agua que sirve para realizar un primer lavado de la fruta y transportarla en forma hidráulica. Esto debe contar con un sistema para eliminar sólidos: hojas, piedras, etc.

El transporte hidráulico conduce la fruta hacia un elevador mecánico (cangilones), el cual realiza el transporte pasando por una mesa de selección, por último se realiza el cepillado y lavado a presión de la misma. En una primera instancia el lavado se realiza con agua de pozo y luego, un lavado o enjuague final que se debe realizar con agua de buena calidad (agua de condensado) para evitar la incorporación de minerales a la fruta.

Molienda

En esta etapa, la fruta se muele en un molino a martillo. Luego, hay un sistema de separación de semillas, pedúnculos y cáscaras. Esta separación es necesaria, debido a que las semillas y pedúnculos se rompen con el tratamiento enzimático posterior y originan gusto astringente, amargo por su contenido en aceites esenciales.

Recuperación de aroma

En esta etapa la pulpa se calienta a 100°C para destilar aromas y agua. Se utiliza un evaporador monotubular de película descendente agitada.

Tanque de maceración

Este tratamiento se realiza a 50°C durante 2 horas y consiste en realizar una despectinización e hidrólisis de almidón. Para tal fin se incorporan enzimas comerciales (pectinasas, amilasas) para bajar la viscosidad, colaborar con la etapa de extracción y estabilizar el jugo para evitar el enturbiamiento. Además, el uso de enzimas en esta

industria hoy tiene otros objetivos: obtención de buenos rendimientos de extracción, test de alcohol negativo, estabilidad en los concentrados, altos flujos en UF, limpieza de membranas UF, etc.

Por otra parte, para la producción de un concentrado de 70° Brix es necesario el tratamiento enzimático, ya que las pectinas forman un gel en presencia de altas concentraciones de ácido y azúcares una vez que se alcanzan los 60° Brix.

Extracción

Para la extracción del jugo se usan centrifugas de eje horizontal denominadas decanter, las cuales permiten separar a éste de los sólidos (bagazo).

Preconcentración

En esta etapa el jugo se concentra a 20-22° Brix con un evaporador de película descendente de 5 efectos.

Tanque de tratamiento

Se realiza un tratamiento con enzimas pectolíticas diferentes a las utilizadas anteriormente.

Centrifugación

Se utilizan centrifugas verticales para bajar el contenido de sólidos en el jugo antes de realizar la operación de ultrafiltración.

Ultrafiltración

Se realiza una filtración por membrana, la cual permite separar solutos disueltos. La ultrafiltración tiene muchas ventajas ya que combina la clarificación y la filtración en una sola operación.

Las membranas de ultrafiltración tienen un mecanismo de separación basado en el tamaño de poro (0,005-0,1 micrón) y retienen macromoléculas (20 KD-250 KD). Esta es una técnica simultánea de clarificación, concentración, fraccionamiento de macromoléculas o coloides.

Pasteurización y concentración

La pasteurización del permeado (jugo) se realiza a 127°C durante 30 segundos.

Para realizar la pasteurización/concentración se utiliza un equipo evaporador quintuple efecto de película descendente. En esta etapa se obtiene jugo concentrado a 70° Brix.

Enfriamiento/homogeneización

El jugo se enfría en forma rápida en un enfriador a placas a 45°C y se homogeniza.

Envasado

Los jugos concentrados se envasan en distintos tipos de contenedores de acuerdo a los requerimientos de los clientes, utilizándose principalmente bins y tambores de PEAD (Polietileno de Alta Densidad) o metálicos.

Bins: el envasado del jugo concentrado se realiza en bolsas de polietileno dentro de bins de madera de 1533 Kg. y luego, sigue la operación de zunchado y etiquetado.

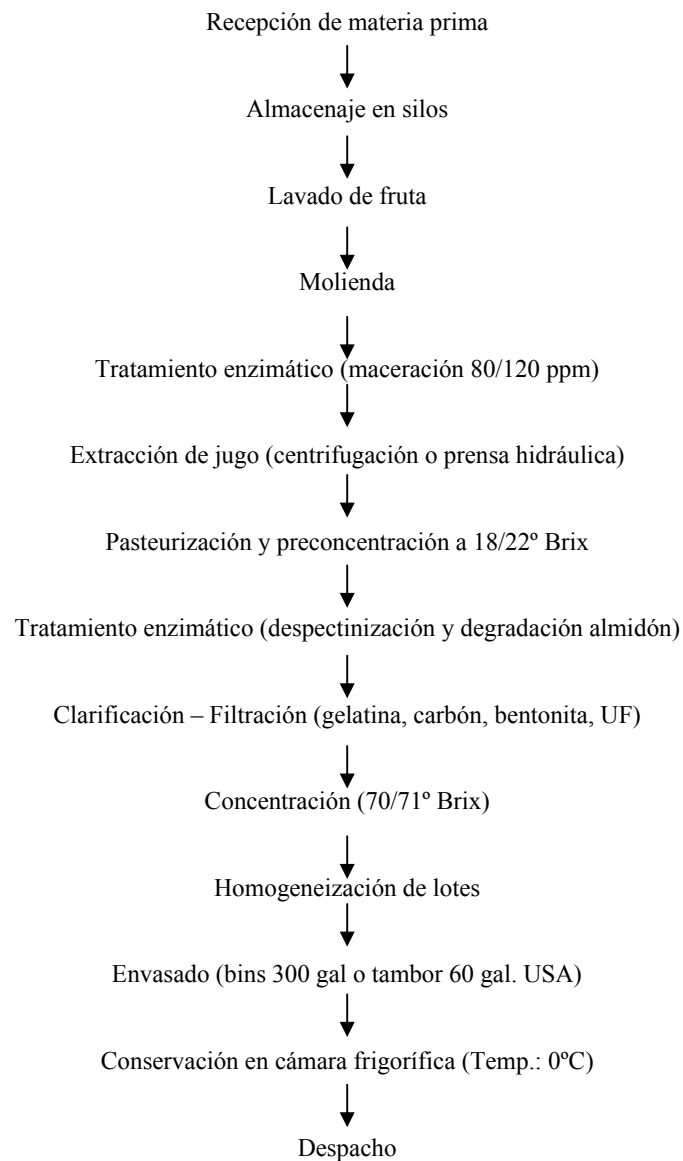
Tambores PEAD y metálicos: tienen una capacidad de 227 litros.

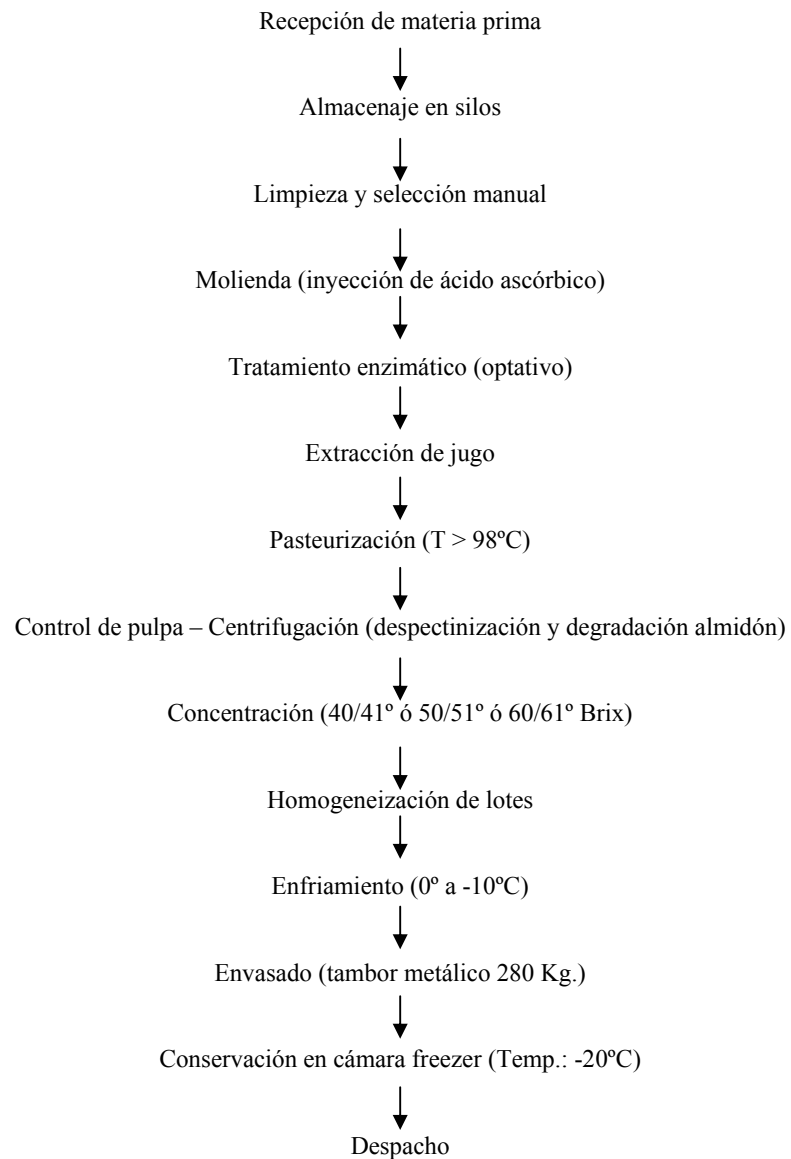
El producto se almacena en frigorífico a 0-5°C hasta su despacho.

1.2.2.-Otros procesos de elaboración de jugos concentrados de manzana

Se presentan a continuación los diagramas de flujo utilizados en otras industrias para obtener jugo concentrado de manzana clarificado y turbio.

JUGO CONCENTRADO DE MANZANA CLARIFICADO



JUGO CONCENTRADO DE MANZANA TURBIO

Fuente: Aeberhard C., 2004.

1.2.3.-Perfil productivo del jugo concentrado de manzana

1.2.3.1.-Mercado mundial

En el año 2006, la producción mundial fue de 1,2 millones de toneladas, 18% inferior al año anterior. Sin embargo, analizando el período 1997/2006 la tendencia es creciente, dado que la producción mundial de jugo concentrado de manzana aumentó el 50%. Este aumento se explica por el extraordinario avance de China –principal productor-, que elabora casi la mitad del total mundial y crece a una tasa promedio anual de 30%, pero con tendencia atenuada.

Casi la totalidad de la producción mundial se exporta, correspondiendo la mitad a China –el principal abastecedor- con 614.000 toneladas de jugo concentrado.

La producción de EE.UU. presenta una tendencia decreciente, con una merma promedio anual de 2%. Entre otros factores, explican esta tendencia los menores precios del jugo importado.

Argentina lidera la producción de jugo concentrado en el hemisferio sur, ocupa el 5º lugar como productor y exportador, ofertando el 5% del comercio mundial y superando en 10% a Chile (CINEX, Cámara Argentina de la Industria y Exportación de Jugos de Manzanas, Peras y Afines).

Tanto Japón como los países europeos, demandan jugos con alto porcentaje de acidez. En respuesta a esas exigencias, China está incorporando plantaciones con variedades de manzana de alta acidez.

Todavía el grueso del jugo exportado por China contiene un nivel insuficiente de acidez, lo cual obliga a los compradores a mezclarlo con otro que posea mayor porcentaje.

El producto ofrecido por Polonia –segundo exportador mundial (20%)- es en su mayoría de mediana a alta acidez (con valores de hasta 6 y 7%).

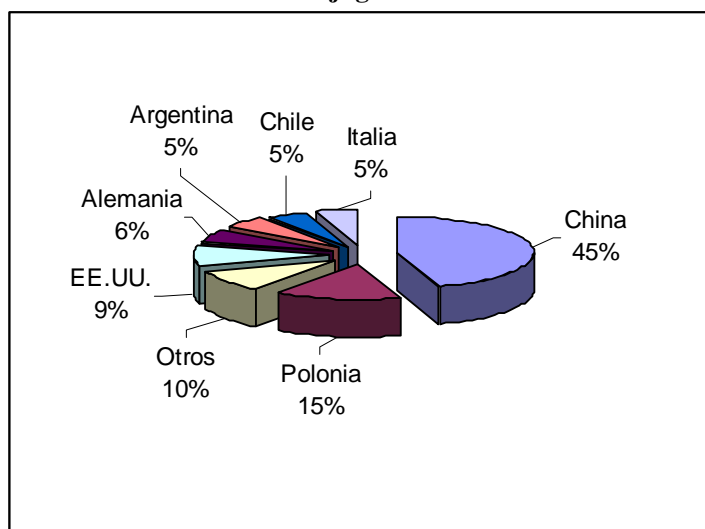
Alemania es el principal importador mundial, con el 50% de las compras, seguido por EE.UU. que absorbe el 40% de la demanda mundial.

Argentina, Chile y China son los principales proveedores de EE.UU.

El crecimiento en la demanda mundial de jugo concentrado de manzana se duplicó durante la década 1997-2006, no sólo por la mayor elaboración de jugos puros o

mezcla, sino también por su utilización como aditivo en cosméticos y en la industria farmacéutica.

Figura 1.1. Producción mundial de jugo concentrado de manzana - Año 2006



Fuente: Dirección de Industria Alimentaria sobre datos del USDA

1.2.3.2.-Producción nacional

En el año 2006, la producción argentina de jugo concentrado de manzana sumó 55.000 toneladas. Las variaciones en la producción de jugo concentrado tienen directa relación con la disponibilidad de fruta para molienda y con el precio internacional del jugo.

El volumen de manzana que ingresa a industria depende de la calidad de la fruta y de su precio en el mercado fresco. La mitad de la producción argentina de manzanas –que promedia el millón de toneladas- se destina a industria, debido al volumen de fruta que no cubre las exigencias de calidad del mercado fresco.

El 80% de lo industrializado, tiene como destino la molienda para jugo concentrado donde se utilizan distintas variedades, principalmente Red Delicious y Granny Smith. La producción es estacional y el período de mayor elaboración va de enero a mayo.

El aroma de manzana es un subproducto que se recupera en la elaboración y se comercializa por separado. Equivale aproximadamente a 1,5% de la producción de jugo concentrado y es demandado por las industrias elaboradoras de bebidas y perfumes.

La fruta es el factor que mayor incidencia tiene en la estructura de costos; le siguen en importancia las enzimas (importadas de Alemania y Francia) y los envases.

En la campaña 2007, el precio promedio pagado por la industria juguera al productor osciló entre \$0,18 y \$0,20 por Kg. de manzana (Dirección Nacional de Alimentos, 2007).

Exportaciones

En promedio, el 90% de la producción argentina de jugo concentrado se exporta, fundamentalmente a EE.UU. Esto refleja una alta dependencia del mercado norteamericano, que demanda jugo concentrado clarificado. El ingreso a este mercado se realiza por el puerto de Filadelfia.

Rusia es un nuevo demandante de jugo argentino, aunque los volúmenes que adquiere apenas representan el 3% del total.

La salida de Argentina es el Puerto de San Antonio Este, distante 450 Km. de la zona de producción (Alto Valle del Río Negro y Neuquén).

En el año 2006, las exportaciones totalizaron 49 millones de dólares y un volumen de 55.000 toneladas.

En 1997-2006 los envíos hacia EE.UU. disminuyeron a una tasa promedio anual de 3% en volumen, mientras que el precio FOB por tonelada cayó 30% en todo el período. En el año 2006, ese país pagó US\$ 890 por la tonelada de jugo argentino, cifra 2% menor al promedio de los últimos 10 años (INDEC).

La presencia de China en el mercado internacional ha sido un factor determinante en la baja de precios.

Durante los primeros cuatro meses de 2007, los envíos fueron 25% superiores en volumen con respecto a igual período del año anterior mientras que el precio promedio por tonelada creció 15%; cabe aclarar que estos envíos están conformados en parte por stocks del año anterior.

El 80% del volumen exportado proviene de industrias ubicadas en Río Negro, el 15% de Neuquén y el 6% de Mendoza. Dos empresas exportan el 70% del volumen total, mientras que las primeras cuatro totalizan el 90% de los embarques.

La comercialización se realiza a granel, en tambores de plástico o de chapa de 307 Kg., o en bins de madera (con bolsa de polietileno doble) con capacidad para 1.535 Kg. netos de jugo concentrado.

El producto se transporta en buques con bodegas (Sistema Reefer) refrigeradas a 0°C para el caso del jugo clarificado y a -20°C para jugo con pulpa.

Algunas empresas exportadoras se agrupan para negociar la contratación de los buques a partir del mes de diciembre y enero. Sin embargo, no existe asociación para la venta del producto.

El aumento de la oferta mundial, implica para Argentina mayores exigencias en cuanto a calidad, y a la necesidad de buscar alternativas para reducir los costos.

A las exigencias de trazabilidad, HACCP y buenas prácticas de manufactura (BPM) que ya imponía EE.UU., se sumó el cumplimiento de la ley de bioterrorismo que entró en vigencia en diciembre de 2004.

El derecho de exportación para el jugo concentrado es de 5%. A su vez, el producto exportado goza de un reintegro extrazona del 5% sobre el valor FOB (Dirección Nacional de Alimentos, 2007).

Consumo interno

El jugo concentrado que no se exporta, se vende en fábricas de bebidas locales que lo diluyen, lo mezclan o lo utilizan como edulcorante para gaseosas y lo envasan con marcas registradas (Dirección Nacional de Alimentos, 2007).

Importaciones

Las compras externas –que provienen de Uruguay y Brasil- promedian las 1.200 toneladas por año y corresponden a fábricas de gaseosas que utilizan el producto como edulcorante (Dirección Nacional de Alimentos, 2007).

Empresas

El sector industrial está integrado por PyMEs, que producen principalmente jugo clarificado con la calidad que demanda el mercado norteamericano.

Existen 10 empresas elaboradoras que operan 11 plantas industriales (Tabla 1.2). La mayoría de las empresas están nucleadas en CINEX (Cámara Argentina de la Industria y Exportación de Jugos de Manzana, Peras y Afines), con sede en Cipolletti (Río Negro).

Tabla 1.2. Empresas elaboradoras de jugo concentrado de manzana

Río Negro	Mendoza	Neuquén
Coop. Agríc.	Jugos de Cuyo S.A.	Jugos del Sur S.A.
Colonia Choele Choe		Natural Agri S.A.
Coop. De Colonia		Sower S.A.
Julia y Echarren Ltda.		
Gold Juice S.A.		
Jugos S.A.		
Proin S.A.		
Jugos del Sur S.A.		
Zumos argentinos S.A.		

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos, 2007.

1.2.4.-Perfil productivo jugo concentrado de pera

1.2.4.1.-Panorama mundial

En promedio, sólo el 10% de la producción mundial de pera se industrializa; el principal destino son las conservas, seguido por la elaboración de jugos concentrados.

Rusia procesa el 50% de su producción, mientras que EE.UU. destina a industria el 40%.

En el hemisferio sur, Australia, Nueva Zelanda y Sudáfrica procesan el 40% de la producción de pera cada uno.

El mercado de jugo concentrado de 70° Brix es liderado por EE.UU. y Argentina, que elaboran el 90% del total. Argentina es líder en producción de jugo concentrado de pera en el hemisferio sur y es el segundo productor mundial (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos, 2006).

1.2.4.2.-Producción nacional

Sólo el 17% de la producción argentina de pera se destina a la industria, ya que por su calidad es muy demandada en el mundo como pera en fresco.

En el período 2001-2005, el procesamiento de pera se redujo 35% (CAFI, Cámara Argentina de Fruticultores Integrados).

En la región productora existe una red de agroindustrias elaboradoras de jugos concentrados, sidras, deshidratados, conservas, pulpas deshidratadas y licores.

En promedio, el 80% de lo industrializado tiene como destino la molienda para jugo concentrado. La producción argentina de jugo concentrado de pera promedia las 20.000 toneladas. Este jugo se obtiene por concentración del jugo de distintas variedades, que por problemas de calidad no cubren las necesidades del mercado fresco.

Existen dos tipos de concentrados: **clarificado** (70-71° Brix) que se emplea en la industria de jugos y **jugo con pulpa** (60° Brix), para jugos y néctares.

La elaboración es estacional, acentuándose en el período enero-mayo (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos, 2006).

Exportaciones

El 95% de la producción argentina de jugo concentrado de pera se exporta a 20 países por un valor de casi 16 millones US\$.

A EE.UU. se vende el 90% -que ingresa por el puerto de Filadelfia- abasteciendo algo más del 30% de ese mercado, que demanda jugo concentrado clarificado.

También son compradores del jugo argentino Guatemala, Brasil, Sudáfrica e Italia, entre otros.

Al igual que la fruta fresca, la salida del jugo concentrado se efectúa por el Puerto de San Antonio Este.

Se exportan por año 20.000 toneladas, envíos que se concentran en el período febrero-junio (CINEX, Cámara Argentina de la Industria y Exportación de Jugos de Manzanas, Peras y Afines, 2006).

1.2.5.-Legislación

- Según **Código Alimentario Argentino**, Capítulo XII “Bebidas hídricas, agua y agua gasificada”

Artículo 1046 - (Res. 2067, 11.10.88)

Se entiende por "**Jugo concentrado de...** (con la indicación en el espacio en blanco del nombre de la fruta u hortaliza de la cual procede) el producto obtenido por concentración de jugos vegetales que cumplan con las exigencias del presente Código. Se admite la restitución del aroma recuperado.

Deberán presentar una relación de concentración mínima de 2 a 1 (en volumen), excepto para las frutas cítricas que será de 3 a 1.

Podrán ser conservados por alguno los siguientes sistemas:

- a) Por los métodos físicos autorizados por el presente Código, debiendo consignarse en el rotulado con caracteres bien visibles el proceso de conservación empleado.
- b) Mediante los siguientes conservadores químicos: Ácido benzoico (o su equivalente en sales de sodio): máx. 1,2 g/Kg. o Ácido sórbico (o su equivalente en sales de sodio): máx. 1,2 g/Kg. o la mezcla de ambos (calculados como ácido benzoico más ácido sórbico) máx. 1,2 g/Kg., debiendo consignar en el rótulo con caracteres de buen realce y visibilidad y 2 mm de alto como mínimo, la leyenda “Con conservadores autorizados”.

Se admite la sulfitación hasta un contenido total de 60 mg de dióxido de azufre/Kg. multiplicado por el grado de concentración, debiendo indicarse en el rotulado "Con dióxido de azufre como antioxidante" o indicación equivalente con caracteres de buen tamaño, realce y visibilidad.

Los jugos concentrados se rotularán "Jugo concentrado de..." (llenando el espacio en blanco con el nombre de la fruta u hortaliza de la cual procede), formando una o dos frases con caracteres de igual tamaño, realce y visibilidad.

Deberá indicarse claramente en el rótulo principal la dilución a operar (volúmenes de agua a agregar por volumen de jugo concentrado) para obtener un jugo que responda a las exigencias del Artículo 1040 y la fecha de elaboración.

En el caso de estar estabilizados por métodos físicos deberá reemplazarse por la fecha de vencimiento o consignar ambas.

Los jugos concentrados destinados exclusivamente a la industria para su reelaboración por dilución podrán presentar una concentración mayor de los conservadores químicos consignados en el Inc. b) y de dióxido de azufre, relacionada directamente con el grado de concentración.

Deberán consignar en el rótulo los grados Brix, la dilución a operar para obtener un jugo que responda a las exigencias del Artículo 1040 y las indicaciones "Con conservante permitido", "Con dióxido de azufre como antioxidante" (si correspondieran), la fecha de elaboración y la leyenda "Uso Industrial".

▪ Especificaciones de jugos concentrados de pera y manzana

Las siguientes especificaciones corresponden a exigencias de los compradores del producto. El comprador de jugos compra exigiendo producción bajo análisis de peligros y puntos críticos de control (HACCP) y normas ISO. A su vez, el productor de jugo produce bajo ISO/HACCP, y compra materia prima exigiendo lo mismo o Buenas Prácticas Agrícolas (BPA).

General: producto 100% auténtico, se produce bajo buenas prácticas de manufactura.

A. ° Brix: $70,5 \pm 0,5^\circ$ Brix refractométricos medidos a 20°C . Sin corrección por acidez.

B. Acidez: % p/p (ácido málico): 1,2-2,8 (manzana)
1,2-2,2 (pera)

C. Color: la transmitancia del jugo reconstituido a 12°Bx debe ser entre 40 y 70% a 440 nm cuando se analiza con un espectrofotómetro de 1 cm de camino óptico.

CH. Defectos: el producto debe estar prácticamente libre de defectos.

Apariencia (concentrado): no debe existir signos de amarronamiento o partículas gelatinosas.

Apariencia (reconstituido): prácticamente libre de defectos, sin partículas de piel, semillas, pedúnculo o puntos negros.

D. Sensorial: el sabor del jugo concentrado de pera o manzana diluido a 12° Bx debe ser característico de jugos de alta calidad, libre de cualquier defecto objetable, aceite castor, quemado, insípido, oleoso, viejo, etc.

E. Brillo: la transmitancia del jugo reconstituido a 12° Bx debe ser mínimo 96% a 625 nm cuando se analiza con un espectrofotómetro de 1 cm de camino óptico.

F. Turbidez: la turbidez del jugo reconstituido a 12° Bx a temperatura ambiente debe ser 3 NTU máximo. El jugo deberá estar libre de turbidez visual, sin signos de material floculado o cualquier otra partícula suspendida.

G. Análisis microbiológicos:

Recuento total: no más de 100 UFC/ml

Hongos: no más de 10 UFC/ml

Levaduras: no más de 10 UFC/ml

TAB (Thermo Acidophilic Bacilli or Bacteria): negativo/10g JP/JM

Coliformes: negativo/10g JCP o JCM

Además de las especificaciones microbiológicas enumeradas, el producto debe estar libre de microorganismos patógenos o toxigénicos.

Tabla 1.3. Especificaciones microbiológicas

	n	c	m	M	UOM	Comentarios
Microorganismos aeróbicos mesófilos	5	3	100	1,000	Cnt/g	
Coliformes	5	0	0		Cnt/g	Lím. detección < 3.0
<i>Escherichia coli</i>	5	0	0		Cnt/g	Lím. detección < 3.0
<i>Salmonella</i>	15	0	0		Cnt/g	No detectado en 375g. Muestras 25g.
Levaduras osmófilas	5	3	10	100	Cnt/g	
Hongos osmófilos	5	3	10	100	Cnt/g	
TAB	5	0	0		Cnt/g	Lím. detección < 1.0

H. pH: 3,4 a 4,3 a 12° Bx.

I. Almidón: jugo a 12° Bx negativo (test del yodo).

J. Pectina: jugo a 12° Bx negativo (test alcohol acidificado).

K. Floculación: el jugo a 12° Bx no deberá mostrar signos de floculación después de permanecer 24 horas a temperatura ambiente en un tubo Nessler de 100 cm³.

L. SO₂: no detectable.

LL. Patulina: menos de 50 ppb en jugo de 12° Bx.

M. Residuos de pesticidas: cumple con estándares de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y World Health Organization (WHO) y/o requerimientos de las regulaciones locales.

N. Aditivos: debe estar libre de cualquier aditivo.

Ñ. Envase: tambor plástico o bins de madera.

O. Condiciones de almacenaje: 0-5°C.

P. Período de aptitud: 18 meses (en las condiciones de almacenaje mencionadas).

Fuente: datos proporcionados por la empresa.

1.3.-MICROBIOLOGÍA DE LOS JUGOS DE FRUTA

1.3.1.-Generalidades

En la microflora espontánea del jugo de manzana predominan las levaduras (Beech, 1993). Generalmente no se tiene en cuenta que una serie de levaduras de bajo poder fermentativo (por ej., *Kloeckera apiculata*) se encuentran dentro de la pulpa y que llegan a multiplicarse hasta $4,5 \times 10^4$ células/g en frutas almacenadas.

Pueden asimismo encontrarse un número significativo de bacterias ácido tolerantes en la superficie del fruto.

Los equipos de molienda y prensado que no se limpien diariamente son la mayor causa de inoculación de microorganismos de forma que un jugo recién prensado puede contener 10^6 levaduras/ml (Beech y Carr, 1977). La fermentación comienza, por tanto, en pocas horas si los jugos no se mantienen refrigerados o se elaboran rápidamente, pero se evita con los procedimientos habituales de pasteurización que eliminan las levaduras. Las esporas de mohos pueden alcanzar 10^5 /ml y son más resistentes al calor que las levaduras (Dittrich, 1987).

El moho de mayor resistencia al calor que se ha encontrado es el *Byssochlamys fulva*, cuyas ascosporas sobreviven en jugo de manzana después de 180 minutos a 85°C (Swanson, 1989).

El deterioro causado por los microorganismos aumenta sensiblemente si baja la acidez y, por ello, los jugos de manzana deben llevarse a un pH inferior a 3,8 antes de envasar. Las características fisicoquímicas de los jugos de frutas concentrados (bajo pH, bajo a_w , elevada viscosidad, escasa disponibilidad de oxígeno) sumado a la pasteurización hacen que la mayoría de los microorganismos patógenos y/o alterantes se vean inhibidos en su desarrollo (King y col., 1969; Parisch y Higgings, 1989).

Levaduras, hongos y bacterias ácido lácticas han sido implicadas en el deterioro de jugos de fruta (Deak y Beuchat, 1993).

En los concentrados de jugo de manzana, las levaduras osmófilas como *Zygosaccharomyces rouxii* y *Z. bailii* fermentan lentamente los concentrados almacenados. Estos microorganismos se hallan especialmente en la superficie del jugo concentrado, donde algo de vapor de agua condensado provoca una ligera dilución. No

es este sólo el problema, sino que pueden constituir un inóculo resistente a los conservantes (aunque no al calor) en las bebidas diluidas si la contaminación se produce en la fase final de la elaboración (Ashurst, 1995).

El bajo pH del jugo significa que aunque haya microorganismos patógenos, no se desarrollan. Aún así, se han atribuido brotes de *Salmonella* a jugos no pasteurizados en Estados Unidos (Swanson, 1989). Tales brotes son raros y tienen su causa en frutas dañadas, mal lavadas, en contacto con estiércol de las plantaciones. Por tanto, para la producción de jugo es necesaria la mayor higiene posible durante la cosecha de la fruta. También ha afectado a la salud pública la presencia de micotoxinas, en especial la patulina, que se produce en manzanas por el desarrollo de especies de *Penicillium*, *Aspergillus* y *Byssochlamys*. Entre los hongos que producen patulina, *Penicillium expansum* es la cepa más comúnmente encontrada en manzanas indicando una substancial pérdida de la fruta debido a la podredumbre blanda azul y la producción de patulina (Doores, 1983). En las frutas completamente infectadas, los niveles registrados de patulina alcanzan 200 ppm, pero en los jugos bien elaborados, el contenido en patulina es muy bajo, del orden de partes por billón (ppb).

Ya que las cantidades de patulina no se reducen por pasteurización, ni por el uso de conservantes (Wheeler y col., 1987), deben ser reducidas por el apropiado almacenamiento de la fruta, seguido de una rigurosa selección de las manzanas previo a la fabricación del jugo.

Tabla 1.4. Microorganismos típicos que se presentan en jugos de manzana (Ashurst, 1995)

Levaduras	Mohos	Bacterias
<i>Candida</i> spp.	<i>Penicillium</i> spp.	<i>Lactobacillus</i> spp.
<i>Kloeckera</i> spp.	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Leconostoc</i> spp.
<i>Saccharomyces</i> spp.	<i>Paecilomyces</i> spp.	<i>Acetobacter</i> spp.
<i>Torulopsis</i> spp.	<i>Byssochlamys</i> spp.	<i>Gluconobacter</i> spp.
<i>Rhodotorula</i> spp.		
<i>Zygosaccharomyces</i> spp.		

De los microorganismos contaminantes (mohos y levaduras, bacterias ácido lácticas y bacterias esporuladas), sólo una pequeña proporción tiene la habilidad de crecer en los jugos reconstituidos. Sin embargo, con el proceso de pasteurización se destruye la flora vegetativa, mientras que sobreviven las esporas de bacterias más resistentes al calor (Cerny y col., 1984).

1.3.2.-Bacilo o bacteria acidotermófila (TAB)

En 1967 Uchino y Doi reportaron el aislamiento de una bacteria esporulada a partir de una fuente termal cerca del Lago Tazawa que creció bajo condiciones ácidas y geotermales y que tenía características similares a *Bacillus coagulans*.

Con posterioridad Darland y Brock, en el año 1971, obtuvieron 14 cultivos de bacterias acidotermófilas a partir de diversos ambientes termo-ácidos, que se aislaron cultivándolos entre 45 y 70 °C y a valores de pH entre 2 y 6 con un óptimo entre 2 y 4. Estos aislados fueron clasificados por dichos autores como una nueva especie: *Bacillus acidocaldarius*.

En estudios recientes realizados en Japón, encontraron que el 97% de los aislados de TAB a partir de suelo de huertas frutícolas pertenecían al género *Alicyclobacillus* (Goto y col., 2008).

1.3.3.-*Alicyclobacillus* spp

En 1982 en Alemania ocurrió una contaminación a gran escala de jugos de manzana pasteurizados (Cerny y col., 1984). Este fue el primer reporte de deterioro por *Alicyclobacillus*. La causa se atribuyó a un organismo relacionado a *Bacillus acidocaldarius*. Sin embargo, estudios realizados con posterioridad demostraron que la causa fue *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

Una bacteria termoacidófila fue aislada de jugo de manzana pausterizado en 1990. Esta fue la primera mención de un aislamiento de este organismo de jugos de fruta contaminados en USA (Splittstoesser y col., 1994).

Ésta bacteria ha dado lugar en 1992 a la creación del nuevo género “*Alicyclobacillus*” que abarca a *A. acidocaldarius*, *A. acidoterrestris* y *A. cycloheptanicus* (Cerny y col., 1984; Wisotzkey y col., 1992).

La secuencia comparativa del rDNA mostró ser suficientemente diferente de otros bacilos para recalificarlo como un nuevo género. Además, *Alicyclobacillus* es único en su perfil de ácidos grasos, conteniendo ácidos grasos omega alicíclicos como el mayor componente natural de la membrana lipídica (Walls y Chuyate, 1998).

La Figura 1.2 muestra los ácidos grasos ω -alicíclicos, principales componentes de los ácidos grasos esenciales de estos organismos.

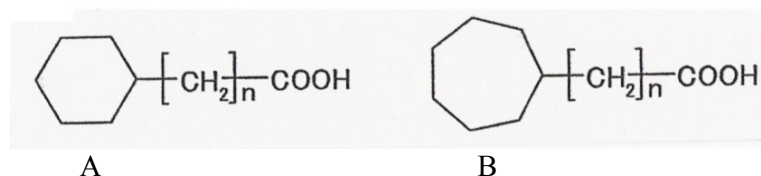


Figura 1.2. Ácidos grasos ω -alicíclicos. A: ácidos grasos ω -ciclohexílicos, B: ácidos grasos ω -cicloheptílicos

Desde entonces, *Alicyclobacillus* representa el problema más serio que ha tenido la industria de bebidas a base de jugos de fruta. Problemas con *Alicyclobacillus* se reflejaron en casos donde hubo un deterioro de jugos y bebidas a base de jugos luego del proceso de pasteurización a temperaturas cercanas a 100°C.

Los microorganismos pertenecientes al género *Alicyclobacillus* son bacterias con forma de bastón, acidófilas, aeróbicas, formadoras de esporos, resistentes al calor y no presentan desarrollo cuando se cultivan en medios con pH neutro (Wisotzkey y col., 1992; Cerny y col., 1984; Splittstoesser y col., 1994; McIntyre y col., 1995). Aislados de *Alicyclobacillus* se encontraron en suelo, fuentes termales, bebidas y materias primas.

Las siguientes especies se agregaron posteriormente como miembros del género: *A. mali*, *A. acidocaldarius* subsp. *rittmannii*, *A. hesperidum*, *Alicyclobacillus* genomic species 1, *A. acidiphilus*, *A. herbarius*, *Alicyclobacillus* genomic species 2, *A. sendaiensis*, *A. pomorum* y *A. vulcanalis* (Kusano y col., 1997; Nicolaus y col., 1998; Albuquerque y col., 2000; Matsubara y col., 2002; Goto y col., 2002; Goto y col., 2002; Tsuruoka y col., 2003; Goto y col., 2003; Simbahan y col., 2004). Recientemente, *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* subsp. *thermotolerans* y *Sulfobacillus disulfidooxidans* fueron reclasificados como *A. tolerans* y *A. disulfidooxidans*, respectivamente (Karavaiko y col., 2005).

Actualmente, *Alicyclobacillus* comprende 12 especies (incluyendo una subespecie), 2 genomic species y una especie propuesta (“*A. mali*”).

Tabla 1.5. Especies de *Alicyclobacillus* y fuente de las mismas (Yokota y col., 2007)

Especies	Fuente
<i>A. acidocaldarius</i> subsp. <i>acidocaldarius</i>	Suelo, materia prima de bebidas, etc.
<i>A. acidocaldarius</i> subsp. <i>rittmannii</i>	Suelo
<i>Alicyclobacillus</i> genomic species 1 "A. mali"	Suelo, materia prima de bebidas, etc. Jugo de manzana
<i>A. sendaiensis</i>	Abono compuesto
<i>Alicyclobacillus</i> genomic species 2	Suelo
<i>A. vulcanalis</i>	Suelo
<i>A. acidoterrestris</i>	Suelo, materia prima de bebidas, etc.
<i>Alicyclobacillus</i> sp. 3 (= <i>A. fastidiosus</i>)	Materia prima de bebidas
<i>A. acidiphilus</i>	Materia prima de bebidas
<i>A. hesperidum</i>	Suelo
<i>Alicyclobacillus</i> sp. 1 (= <i>A. saccharis</i>)	Materia prima de bebidas, etc.
<i>Alicyclobacillus</i> sp. 2	Suelo
<i>A. cycloheptanicus</i>	Suelo
<i>Alicyclobacillus</i> sp. (= <i>A. macrosporangidus</i>)	Suelo
<i>A. pomorum</i>	Jugos de fruta
<i>Alicyclobacillus</i> sp. 4 (= <i>A. contaminans</i>)	Suelo
<i>Alicyclobacillus</i> sp. 5 (= <i>A. contaminans</i>)	Materia prima de bebidas
<i>Alicyclobacillus</i> sp. 6 (= <i>A. kakegawaensis</i>)	Suelo
<i>Alicyclobacillus</i> sp. 7 (= <i>A. kakegawaensis</i>)	Suelo
<i>Alicyclobacillus</i> sp. 8 (= <i>A. shizuokaensis</i>)	Suelo
<i>A. herbarius</i>	Hierba
<i>Alicyclobacillus</i> sp. 9 (= <i>A. herbarius</i>)	Suelo
<i>A. disulfidooxidans</i>	Suelo
<i>A. tolerans</i>	Suelo

1.3.3.1.-Características de *Alicyclobacillus* spp

Morfología

Las células vegetativas de *Alicyclobacillus* tienen forma de bastón con endosporos terminales/subterminales, y mide aproximadamente 0,7-1 μm de ancho y 3-5 μm de largo. La hinchazón de las células debido a la formación de endosporas puede o no ocurrir, dependiendo de las especies (un gran número de cepas muestran hinchazón).

La formación de cadena es rara y la movilidad es débil.

Las células son Gram positiva al comienzo del cultivo y se convierten en Gram negativa o Gram variable al final del cultivo (Wisotzkey y col., 1992; Walls y Chuyate, 2000; Albuquerque y col., 2000; Wisse y Parish, 1998).

El tamaño de las colonias depende del medio de cultivo, alcanzando 2-5 mm (algunas veces los tamaños son mayores), sobre medio agar extracto de levadura-glucosa-almidón (YSG) a temperatura óptima.

La morfología de las colonias puede diferir levemente dependiendo de la cepa, pero en general las colonias son redondas. Algunos cultivos viejos pueden parecer contaminados, debido a su morfología heterogénea.

El color de las colonias varía del blanco al beige, llegando a ser levemente más oscuras con la edad (Yokota y col., 2007).

Propiedades bioquímicas y fisiológicas

Alicyclobacillus puede crecer en un rango de temperatura de 20-70°C con una temperatura de crecimiento óptima entre 40 y 60°C y un rango de pH 2,0-6,0 con un óptimo entre 3,5 y 4,5. El crecimiento es reducido a valores de temperaturas y pH fuera del rango óptimo.

Aunque son aerobios estrictos, estos organismos pueden sobrevivir bajo condiciones microaeróbicas (el crecimiento es inhibido con la ausencia de oxígeno) (Splittstoesser y col., 1994; Wisotzkey y col., 1992; Walls y Chuyate, 1998).

Pueden metabolizar azúcares muy bien, con producción de ácido. El metabolismo de los azúcares no está acompañado por producción de gas.

Dependiendo del estado nutricional de las células, la presencia de sales, ácidos orgánicos, polifenoles y alcoholes pueden inhibir el crecimiento, sin embargo, se conocen algunas cepas que exhiben resistencia a algunos de estos inhibidores (Walls y Chuyate, 1998).

Tabla 1.6. Rango de pH y temperatura de crecimiento de especies de *Alicyclobacillus* (Yokota y col., 2007)

Especies	Rango de temperatura de crecimiento (°C)	Temperatura óptima de crecimiento (°C)	Rango pH de crecimiento	pH óptimo
<i>A. acidocaldarius</i> subsp. <i>acidocaldarius</i>	35-70	55-60	2,5-6,0	4,5-5,0
<i>A. acidocaldarius</i> subsp. <i>rittmannii</i>	45-70	63	2,5-5,0	4,0
<i>Alicyclobacillus</i> genomic species 1 “ <i>A. mali</i> ”	35-70	55-60	2,0-6,0	4,0-4,5
<i>A. sendaiensis</i>	35-65	50	2,0-5,5	4,0-5,0
<i>Alicyclobacillus</i> genomic species 2	40-65	55	2,5-6,5	5,5
<i>A. vulcanalis</i>	35-70	55-60	2,5-6,0	4,0-4,5
<i>A. acidoterrestris</i>	35-65	55	2,0-6,0	4,0
<i>Alicyclobacillus</i> sp. 3 (= <i>A. fastidiosus</i>)	20-55	40-50	3,0-6,0	3,5-4,0
<i>A. acidiphilus</i>	20-55	40-45	2,0-5,5	4,0-4,5
<i>A. hesperidum</i>	20-55	50	2,5-5,5	3,0
<i>Alicyclobacillus</i> sp. 1 (= <i>A. saccharis</i>)	35-60	50-53	2,5-5,5	3,5-4,0
<i>Alicyclobacillus</i> sp. 2	30-55	45-50	2,0-6,0	4,0-4,5
<i>A. cycloheptanicus</i>	No conocido	No conocido	No conocido	No conocido
<i>Alicyclobacillus</i> sp. (= <i>A. macrosporangidus</i>)	30-55	50	3,0-5,5	4,0
<i>A. pomorum</i>	35-60	50-55	3,0-6,5	4,0-4,5
<i>Alicyclobacillus</i> sp. 4 (= <i>A. contaminans</i>)	30-60	45-50	2,5-6,5	4,5-5,0
<i>Alicyclobacillus</i> sp. 6 (= <i>A. kakegawaensis</i>)	35-60	50-55	3,0-6,0	4,0-4,5
<i>Alicyclobacillus</i> sp. 8 (= <i>A. shizuokaensis</i>)	40-60	50-55	3,0-6,5	4,0-4,5
<i>A. herbarius</i>	35-65	55-60	3,5-6,0	4,5-5,0
<i>A. disulfidooxidans</i>	4-40	35	0,5-6,0	1,5-2,5
<i>A. tolerans</i>	≤20-55	37-42	1,5-5,0	2,5-2,7

Composición de ácidos grasos celulares y quinona

Como en *Bacillus*, la quinona relacionada a la cadena respiratoria de *Alicyclobacillus* es MK-7 (menaquinona-7), aunque algunas cepas tienen una quinona con una cadena más corta, como MK-3. La cantidad relativa de estas quinonas es dependiente de la cepa y las condiciones de cultivo (Tabla 1.7).

Excluyendo *A. pomorum*, todos los miembros de *Alicyclobacillus* están compuestos de dos tipos de ácidos grasos ω -alicíclicos (principales ácidos grasos celulares) (Deinhard y col., 1987; Goto y col., 2002; Matsubara y col., 2002; Goto y col., 2003).

Tabla 1.7. Composición de menaquinonas de cepas de *Alicyclobacillus acidocaldarius* (Yokota y col., 2007)

Cepa	MK3 (%)	MK7 (%)
<i>Alicyclobacillus</i> genomic species 1 DSM 11984	5,2	94,8
<i>Alicyclobacillus</i> genomic species 1 DSM 11983	4,5	95,5
<i>Alicyclobacillus</i> genomic species 1 DSM 453	17,7	82,3
<i>Alicyclobacillus</i> genomic species 1 DSM 454	6,5	93,5
<i>Alicyclobacillus</i> genomic species 1 DSM 455	9,2	90,8
<i>Alicyclobacillus</i> genomic species 1 DSM 12490	4,7	95,3
<i>Alicyclobacillus</i> genomic species 1 DSM 6481	4,0	96,0
<i>A. acidocaldarius</i> subsp. <i>rittmannii</i> DSM 11297 ^T	7,7	92,3
<i>A. acidocaldarius</i> subsp. <i>acidocaldarius</i> ATCC 27009 ^T	29,0	71,0
<i>A. acidocaldarius</i> DSM 448	11,9	88,1
<i>A. acidocaldarius</i> DSM 449	12,1	87,9
<i>A. acidocaldarius</i> DSM 451	26,8	73,2
<i>A. acidocaldarius</i> DSM 452	9,1	90,9
<i>A. sendaiensis</i> JNTAP-1 ^{T25}	0	100
<i>Alicyclobacillus</i> genomic species 2 MIH 332	2,0	98,0

Estos ácidos grasos son muy raros y, excluyendo el presente grupo, son encontrados solo en *Sulfobacillus* spp. (Golovacheva y Karavaiko, 1979; Dufresne y col., 1996), *Curtobacterium pusillum* (Suzuki y col., 1981) y *Propionibacterium cyclohexanicum* (Kusano y col., 1997) (en estas bacterias los ácidos grasos representan un componente menor).

A nivel de especie, *A. acidocaldarius*, *A. acidocaldarius* subsp. *rittmannii*, *A. acidoterrestris*, *A. acidiphilus*, *A. disulfidooxidans*, “*A. mali*”, *A. hesperidum*, *Alicyclobacillus* genomic species 1, *Alicyclobacillus* genomic species 2, *A. sendaiensis*, *A. tolerans* y *A. vulcanis* poseen ácidos grasos ω -ciclohexílicos. *A. cycloheptanicus* y *A. herbarius* poseen ácidos grasos ω -cicloheptílicos. *A. pomorum* no posee ninguno de estos ácidos grasos.

Se cree que la presencia de ácidos grasos ω -alifáticos es el factor que permite que estos organismos sobrevivan bajo condiciones ácidas y térmicas (Kannenberg y col., 1984; Krischke y Poralla, 1990), pero esta no es una condición indispensable para la supervivencia.

Producción de guayacol

Los compuestos químicos responsables de incidentes de deterioro y formación de off odor son guayacol, 2,6-dibromofenol y 2,6-diclorofenol (Yamazaki y col., 1996). La figura 1.3 muestra la estructura de estos compuestos.

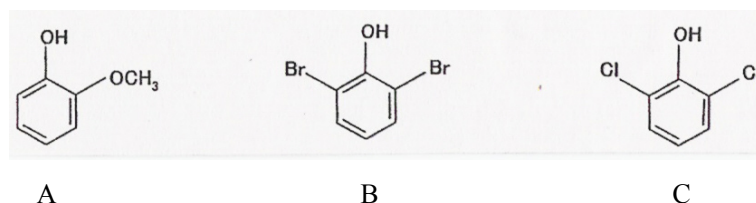


Figura 1.3. Estructura de los compuestos responsables de off odor. A: guayacol, B: 2,6-dibromofenol, C: 2,6-diclorofenol.

Entre estos compuestos, el guayacol es el compuesto principal y de interés más significativo.

Alicyclobacillus es una bacteria no patógena (Borlinghaus y Engel, 1997). Sin embargo, algunas especies producen un olor indeseable debido a la producción de guayacol, causando el deterioro de la calidad de las bebidas ácidas (especialmente aquellas que contienen jugos de fruta) (Pettipher y col., 1997; Orr y col., 2000). El guayacol presenta un característico olor medicinal.

Ya se conocía que *A. acidoterrestris* produce guayacol (Walls y Chuyate, 1998), pero recientemente, *A. acidiphilus*, *A. herbarius* y *Alicyclobacillus* sp. 2 (estrechamente relacionado con *A. hesperidum*: "*A. hesperidum* subsp. *aigle*" DSM 11985) se reportaron como productores de guayacol (Tabla 1.8).

A. acidoterrestris es la principal causa de off-odors en jugos de fruta y produce la mayor cantidad de guayacol.

La cepa *Alicyclobacillus* sp. 2 DSM 11985 es difícil de distinguir de *A. hesperidum*, debido a la estrecha similitud a nivel genómico.

Tabla 1.8. Habilidad de cepas de *Alicyclobacillus* para producir guayacol (Yokota y col., 2007)

Especies	Cepa	Guayacol (ppb)
<i>Alicyclobacillus</i> genomic species 1	DSM 11983	nd
	DSM 453	nd
	DSM 454	nd
	DSM 12490	nd
	KHA 31	nd
	KHC 3	nd
	MIH 2	nd
	P2	nd
<i>Alicyclobacillus</i> genomic species 2	SO6	nd
	MIH 332	nd
<i>A. acidocaldarius</i> subsp. <i>acidocaldarius</i>	ATCC 27009 ^T	nd
	DSM 448	nd
	DSM 449	nd
	DSM 451	nd
	DSM 452	nd
	3B	nd
	3W	nd
	HP2	nd
	MIH 321	nd
	OJ5	nd
UZ1	nd	
<i>A. acidocaldarius</i> subsp. <i>rittmannii</i>	DSM 11297 ^T	nd
<i>A. cycloheptanicus</i>	DSM 4006 ^T	nd
	DSM 4005	nd
	DSM 4007	nd
<i>A. acidoterrestris</i>	ATCC 49025 ^T	218
	DSM 2498	50
	DSM 3923	370
	DSM 3924	500
	B2065	40
	B-064	350
	OR3	120
<i>A. acidiphilus</i>	TA 67 ^T	480
<i>A. hesperidum</i>	DSM 12489 ^T	nd
	DSM 12766	nd
<i>Alicyclobacillus</i> sp. 1	Aislado 3 (RB718)	nd
<i>Alicyclobacillus</i> sp. 2	DSM 11985	146
	Aislado 1	270
	Aislado 2	295
	Aislado 4	347
<i>Alicyclobacillus</i> sp. 3	8-E	nd
<i>A. herbarius</i>	CP 1 ^T	490
<i>A. pomorum</i>	3A ^T	nd

nd: no detectado

Las cepas fueron inoculadas en medio líquido YSG conteniendo 1 ppm de vainillina y cultivadas a cada temperatura óptima por 72 horas. Después del cultivo, la concentración de guayacol en el caldo se analizó por GC-MS.

La cantidad de guayacol detectado en un jugo deteriorado, varía de 10 a aproximadamente 200 ppb, dependiendo de las diferencias entre cepas y las condiciones de crecimiento.

El guayacol se detectó en unos pocos días cuando *A. acidoterrestris* se inoculó en jugo de naranja y almacenó a 25°C (Pettipher y col., 1997). Resultados obtenidos de otro estudio realizado con *A. acidoterrestris*, indicó que la generación de guayacol fue más elevada en jugo de naranja que en jugo de manzana, y 46°C fue más favorable que 37°C para la producción de guayacol (Jensen, 2000).

Con respecto a la relación entre el crecimiento de *A. acidoterrestris* y la producción de guayacol, la misma sigue la curva de crecimiento acumulándose gradualmente y siendo degradado últimamente (Jensen, 2000; Pettipher y col., 1997; Niwa, 2003).

Las otras especies no han sido estudiadas en detalle.

La Tabla 1.9 muestra la habilidad de varias especies de *Alicyclobacillus* para crecer en bebidas ácidas y producir guayacol.

Los compuestos 2,6-dibromofenol y 2,6-diclorofenol son también producidos por *A. acidoterrestris* (Borlinghaus y Engel, 1997; Jensen y Whitfield, 2003) y presentan también olor medicinal.

Tabla 1.9. Crecimiento de *Alicyclobacillus* y generación de guayacol en bebidas ácidas (Yokota y col., 2007)

Cepas	Crecimiento en bebidas ácidas	Generación de guayacol a partir de vainillina
<i>A. acidocaldarius</i> ATCC 27009 ^T	-	-
" <i>A. mali</i> " TA3	+	-
<i>A. acidoterrestris</i> DSM 3923	+	+
<i>A. acidiphilus</i> TA 67 ^T	+	+
<i>A. cycloheptanicus</i> DSM 4006 ^T	+	-
<i>A. herbarius</i> CP 1 ^T	-	+

Existen cepas que pueden crecer en condiciones experimentales, sin embargo la producción de guayacol no se detectó en ninguna de ellas. Por otro lado, hay especies como *A. herbarius* que tiene la habilidad de producir guayacol, pero el crecimiento no se observó en bebidas.

Requerimiento de oxígeno

Alicyclobacillus es un organismo aerobio obligado. Sin embargo, dependiendo de las condiciones del cultivo, un nivel de oxígeno bajo (0,1% oxígeno disuelto) puede permitir el crecimiento celular (Cerny y col., 2000). Cuando el oxígeno se agota el crecimiento cesa, incluso si otros nutrientes están disponibles. En ese momento las células vegetativas esporularán.

Actividad acuosa

Como con *Bacillus*, una alta actividad de agua ($A_w > 0,9$) se necesita para el crecimiento de *Alicyclobacillus*.

En el caso de jugos de fruta (dependiendo del tipo), un brix de 10 permite el crecimiento celular con un límite de 18-20 grados brix (Splittstoesser y col., 1994; Walls y Chuyate, 1998; Yamashita, 1996). Sin embargo, incluso con un brix superior a 60 (jugos de fruta concentrados) los esporos sobrevivirán.

1.4.-INACTIVACIÓN TÉRMICA DE ESPOROS

1.4.1.-Principios de la destrucción térmica de los microorganismos

La muerte se define como la pérdida de habilidad de la célula para reproducirse. En la destrucción de las células y esporos de los microorganismos por calor, el objetivo final es destruir los procesos de la vida. El calor inactiva un sencillo mecanismo evitando la reproducción.

Teorías y modelos de la muerte microbiana

Para obtener los datos de destrucción microbiana comenzamos con una suspensión de microorganismos, un inóculo. El inóculo puede ser heterogéneo u homogéneo. Un cultivo microbiano heterogéneo es una muestra del gran universo de una contaminación microbiana que ocurre en o sobre un material real. Homogéneo es el término para un cultivo puro de microorganismos en el cual todos los organismos tienen idénticas propiedades bioquímicas y físicas.

La utilidad de los resultados de un estudio que usa un inóculo heterogéneo es limitada, mientras que la utilidad de los resultados de un estudio que usa un inóculo homogéneo puede ser ilimitada. Se pueden obtener datos en cuanto al enorme cambio en la población de organismos viables con el estrés. La evaluación de las características de destrucción por calor de una población heterogénea probablemente dará como resultado una curva de sobrevivientes semilogarítmica curvilínea, que indica la presencia de muchos organismos de baja resistencia y de menos organismos con alta resistencia. La interpretación de los resultados se limita a las condiciones del test y no puede ser extrapolado más allá de los datos obtenidos.

Cuando se evalúa una suspensión de esporos homogénea se obtiene el grado de destrucción para el microorganismo específico como una función del estrés letal. Un inóculo homogéneo, sujeto a distintos niveles de estrés letal y tratados idénticamente, debería producir datos que pueden ser tratados analíticamente. Luego, estos datos se pueden utilizar en estudios de muerte y con modelos para el diseño de un proceso de esterilización.

Los modelos de destrucción por calor son idealistas en sus requerimientos; por tanto, para adaptar el modelo, el programa de ensayo debe reunir todos los requerimientos de este: **(1)** el inóculo debe ser homogéneo; **(2)** el estrés letal debe tener un efecto uniforme indiferente al tiempo de calentamiento; **(3)** el medio de recuperación debe actuar de forma óptima, igual sobre esporos calentados y no calentados; y **(4)** no debe haber factores ambientales que tiendan a causar desviación de la reacción ideal de los esporos al test de estrés (Dring y col., 1985).

“Gráfico semilogarítmico” para examinar datos experimentales de sobrevivientes microbianos, según Pflug y Holcomb, 1980.

Esta es una forma apropiada de tratar datos de sobrevivientes microbianos, porque en los estudios de esterilización es de interés el grado de destrucción de los microorganismos aproximándonos a sobrevivientes cero.

Cuando el logaritmo del número de supervivientes se traza como una función del tiempo de calentamiento (curva de supervivientes semilogarítmica), usualmente parte o toda la curva es una línea recta, o la curva de supervivientes puede ser representada por dos líneas rectas. No todas las curvas de supervivientes semilogarítmicas obtenidas experimentalmente son líneas rectas. La literatura tiene muchos ejemplos en los cuales las curvas de supervivientes semilogarítmicas para el calor u otro estrés letal son parabólicas o en algunos casos sigmoideas.

La forma de las curvas de supervivientes semilogarítmicas varía dependiendo del organismo y el test. Cuatro tipos de curvas de supervivientes se muestran en la Figura 1.4.

La forma de la curva semilogarítmica para un cultivo específico de microorganismos, en un test específico y a una temperatura particular es reproducible siempre y cuando el test no sea alterado. Cuando un cultivo homogéneo de microorganismos se somete a idénticas condiciones de estrés ambientales y los resultados obtenidos varían ampliamente, esta variación es a menudo atribuida a los microorganismos; sin embargo, fluctuaciones en el ambiente probablemente son responsables de la variación.

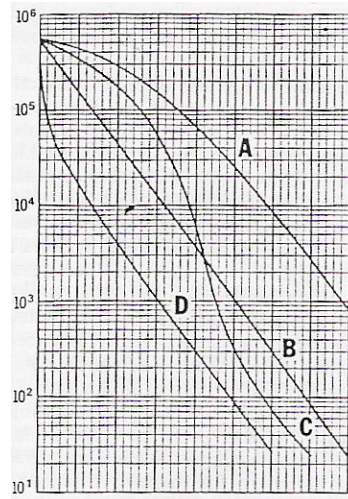


Figura 1.4. Número de supervivientes (ordenada) en función del tiempo de calentamiento. Una curva de supervivientes exponencial (B) y tres curvas de supervivientes observadas no exponenciales (A, C y D). Moats, 1971.

Las cuatro formas de curvas de supervivientes mostradas en la Figura 1.4 han sido obtenidas en estudios con calor seco y húmedo.

Las curvas de supervivientes para alícuotas de una flora natural heterogénea usualmente son similares a la curva mostrada en la Figura 1.5.

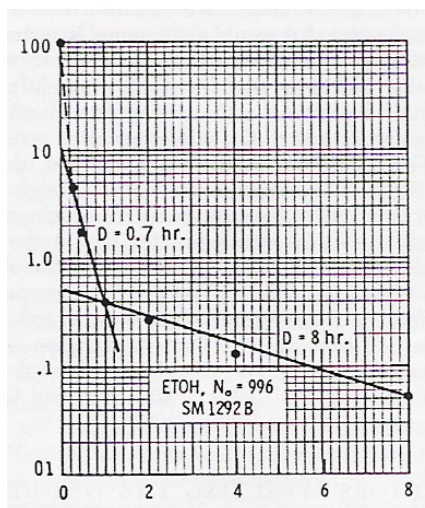


Figura 1.5. Ejemplo de una curva de supervivientes semilogarítmica (% de supervivientes vs. tiempo en horas) de una flora heterogénea natural donde el sustrato es suelo suspendido en etanol (Block, 1991)

1.4.2.-Parámetros cinéticos de inactivación térmica

1.4.2.1.-Tiempo de reducción decimal **D**

La experiencia de la industria del enlatado, por ejemplo, y la investigación científica han demostrado que los esporos de los gérmenes termófilos son los esporos más resistentes al calor producidos por las bacterias contaminantes.

Todos los esporos bacterianos tienen como características comunes su resistencia al calor, a la desecación, al frío y a los agentes químicos. Por estas razones cada año se gastan millones de dólares en las industrias de conservación de alimentos y farmacéuticas para asegurar la esterilidad durante la comercialización de estos productos, ya que debido a los esporos bacterianos se necesitan aplicar procesos especiales, diseñar equipos y efectuar controles de calidad.

En la industria de los alimentos, el término **procesado térmico** se utiliza para describir aquel proceso de calentamiento, mantenimiento a temperatura constante y posterior enfriamiento que se necesita para eliminar el riesgo de una posible enfermedad provocada por la ingestión de alimentos.

La **pasterización** es un proceso térmico diseñado para un microorganismo patógeno específico, pero que no es útil para productos perdurables (almacenables a temperatura ambiente) sin refrigeración.

La **esterilización comercial** es el proceso que permite guardar a temperatura ambiente los productos envasados en latas y similares. Durante la esterilización térmica de alimentos, la población de microorganismos presente en los mismos disminuye en función de la temperatura del producto. La población de bacterias, tales como *E. coli*, *Salmonella* o *Listeria monocytogenes*, disminuirá de manera logarítmica. La población de esporas microbianas disminuirá de forma similar tras un período de retraso inicial.

En la Figura 1.6 se muestra la evolución de la población microbiana a lo largo del tiempo. Representando esos mismos datos en coordenadas semilogarítmicas se obtiene una línea recta, tal como se muestra en la Figura 1.7. La pendiente de la línea recta está directamente relacionada con el tiempo de reducción decimal, **D**.

El tiempo de reducción decimal, **D**, se define como el tiempo necesario para reducir en un 90% la población microbiana. Cuando se representa la población microbiana en

coordenadas semilogarítmicas, el valor de D es el tiempo necesario para la reducción de un orden logarítmico del número de microorganismos.

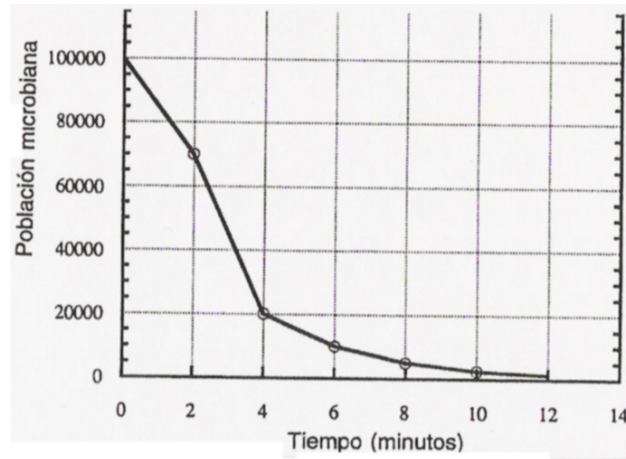


Figura 1.6. Evolución típica de una población microbiana con el tiempo

El valor de D no depende de la población microbiana inicial ya que únicamente depende de la pendiente de la línea recta. La exposición de la población microbiana a mayores temperaturas produce una disminución en el valor D.

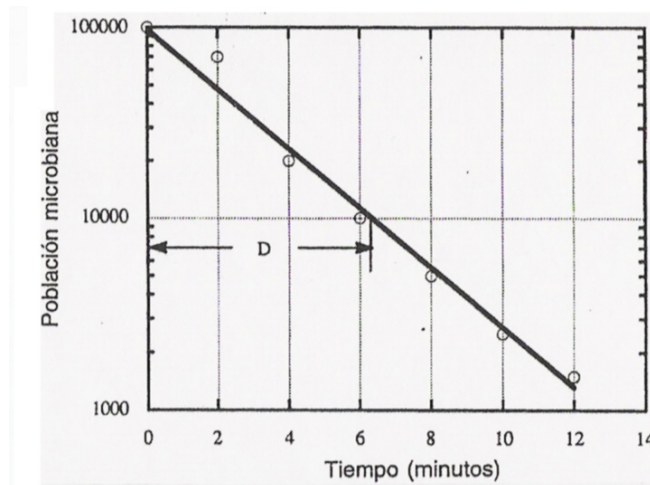


Figura 1.7. Representación semilogarítmica de una población microbiana frente al tiempo

En base a la definición de tiempo de reducción decimal, puede utilizarse la siguiente ecuación:

$$\log N_0 - \log N = t/D \quad \text{ó}$$

$$D = \frac{t}{\log N_0 - \log N} \quad y$$

$$N/N_0 = 10^{-t/D}$$

1.4.2.2.-Constante de resistencia térmica z

La constante de resistencia térmica, z, es un factor que describe la resistencia térmica de las esporas bacterianas. Se define como el aumento de temperatura necesario para causar una disminución del 90% en el tiempo de reducción decimal D.

Representando los valores D obtenidos a diferentes temperaturas en coordenadas semilogarítmicas, el valor de z representa el aumento de temperatura necesario para cambiar un orden logarítmico el valor de D, tal como se muestra en la Figura 1.8. En base a dicha definición, z puede expresarse mediante la siguiente ecuación:

$$z = \frac{T_2 - T_1}{\log D_{T1} - \log D_{T2}}$$

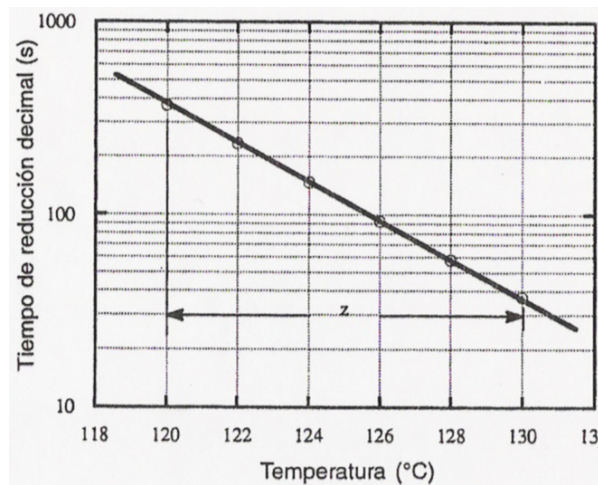


Figura 1.8. Representación semilogarítmica del tiempo de reducción decimal frente a la temperatura, mostrando de forma gráfica el valor de z

Las características de resistencia térmica de los microorganismos que deterioran los alimentos son importantes determinantes del diseño del proceso térmico usado para preservar varios productos alimenticios.

1.4.3.-Medida del grado de destrucción por calor húmedo de microorganismos

Cada entidad biológica es única y diferente de las demás. No hay esporos bacterianos estándares. Así, describimos una población biológica usando medidas estadísticas de los parámetros críticos.

En el ensayo se debe tomar cada cultivo de esporos como estándar, se lleva a cabo esto haciendo ensayos de curvas de supervivientes a varias temperaturas (al menos tres), repitiendo cada curva de supervivientes al menos 2 veces en un día diferente y evaluando todos los datos estadísticamente (cada test debe tener un N_0 más 4 a 5 tiempos de calentamiento, donde el cambio en la población inicial N_0 es de al menos tres ciclos logarítmicos).

En los estudios de destrucción por calor se tiene una segunda variable biológica, el medio de crecimiento o recuperación. Pflug y col., 1981 y Pflug, 1989 demostraron que los medios comerciales deshidratados presentan una variabilidad que producirá una variación significativa en los valores D_T . La forma más simple de eliminar el efecto del medio es obtener suficiente del mismo al comienzo para que perdure todo el proyecto. La performance del medio debería ser validada.

El procedimiento específico para realizar un estudio de destrucción térmica depende del objetivo del experimento y del tipo de aparato disponible.

Los tiempos de calentamiento pueden ser espaciados uniformemente, o el intervalo podría incrementarse logarítmicamente con el incremento de tiempo (Townsend y col., 1956).

Los experimentos de resistencia térmica con la excepción de las corridas preliminares se deberían conducir con un mínimo de 4 temperaturas y preferentemente 5. Los datos de los coeficientes de resistencia térmica obtenidos a tres temperaturas son válidos, pero estos valores z usualmente no tienen el grado de exactitud de los valores z determinados a 4 o 5 temperaturas.

Se han desarrollado dos tipos generales de técnicas para estudiar el efecto del calor: (1) muestreo sucesivo y plaqueo de una suspensión de microorganismos durante el tratamiento de calor; (2) evaluación de un número de pequeñas muestras sometidas a varias condiciones de temperatura-tiempo en base a crecimiento/no crecimiento.

El “**método de muestreo sucesivo**” consiste en un sustrato e inóculo calentado en un baño de agua a temperatura controlada en el cual, a sucesivos intervalos de tiempo, se remueve una alícuota, usualmente con pipeta y luego se hacen diluciones apropiadas y plaquean. El resultado es una curva del grado de destrucción del número de supervivientes con el tratamiento de calor. Aunque este método es simple en concepto, es bastante complicado en la práctica, debido a:

- El sustrato y el inóculo deberían estar a la temperatura de ensayo en un tiempo conocido y reproducible.
- Cuando se estudian organismos sensibles al calor, los tiempos son cortos, requiriendo tiempo preciso y control de temperatura.
- La evaluación de la resistencia térmica de los esporos por encima de 100°C requiere de un sistema de presión.

El “**sistema de unidad réplica múltiple**”, que usa el método de crecimiento/no crecimiento, implica la evaluación de muestras individuales; un mínimo programa de ensayo a una temperatura consistiría de 5 unidades réplica con 5 a 10 sucesivos intervalos de tiempo con un total de 25 a 50 unidades por condición de temperatura.

La precisión del método se mejora por incremento del número de réplicas y la disminución del intervalo de tiempo.

Varios métodos de laboratorio han sido desarrollados para el método de muestreo sucesivo y el sistema de unidad réplica múltiple. En general, se pueden producir datos de resistencia térmica de alta calidad con todos los métodos; sin embargo, cada método sobresale en ciertos aspectos y al mismo tiempo tienen ciertas limitaciones (Block, 1991).

1.4.4.-Análisis de los datos de destrucción térmica

Una vez que se realizan las medidas, el experimentador debe buscar un apropiado método de análisis para utilizar los datos.

El análisis de la información cae en dos categorías: **(1)** tratamiento de los recuentos realizados por enumeración directa de colonias formadas por los organismos supervivientes; y **(2)** tratamiento de los datos donde hay solo una respuesta por parte de los organismos: crecimiento o no crecimiento.

Curva de supervivientes por enumeración directa

El método más sencillo para establecer una curva de supervivientes es a través del calentamiento de alícuotas representativas de la suspensión de microorganismos por diferentes intervalos de tiempo y luego estimar el número de supervivientes plaqueando las alícuotas de la suspensión calentada, y contar las colonias luego de la incubación. La curva de supervivientes semilogarítmica se genera cuando el logaritmo del número de organismos supervivientes se traza en función del tiempo de calentamiento.

Previo al tratamiento de calor, un número conocido de organismos se depositan en o sobre unidades portadoras idénticas. Estas pueden ser tubos de vidrio, tazas de metal, discos de metal, etc. Grupos de estas unidades portadoras se someten al mismo estrés por calor a diferentes intervalos de tiempo. Luego del calentamiento, se hacen diluciones en el sistema de recuperación, y se plaquean alícuotas de acuerdo a una técnica microbiológica estándar. Se calcula un número de supervivientes estimado a cada tiempo de calentamiento usando el factor de dilución y los recuentos en placa.

Se ha observado que cuando el logaritmo del número estimado de organismos supervivientes se traza en función de los tiempos de calentamiento, la curva es a menudo descrita por una línea recta. Los puntos se trazan a partir de datos producidos experimentalmente sobre papel semilogarítmico, y la pregunta que surge es como se ajustará la mejor línea recta a los datos.

A menudo, el parámetro D es el objeto de interés. El valor D es un índice de destrucción dependiente del tipo de organismo, temperatura, humedad relativa y de otros parámetros de estrés por calor.

Uso de los datos de la curva de supervivientes para el diseño de un proceso de esterilización por calor

Cuando se dispone de los resultados de los ensayos de resistencia térmica en la forma de un valor D_T o una curva de supervivientes semilogarítmica, luego se puede establecer F_T o valor de esterilización del proceso. Un acercamiento al diseño del proceso es usar la ecuación $F_T = n D_T$, donde n es el número de logs de destrucción que buscamos.

La práctica usual es evaluar la resistencia de los organismos más resistentes que pensamos estarán en el producto. Para esto el procedimiento general que se sigue en la actualidad es asumir que los esporos en la naturaleza son al menos tan resistentes como

los esporos que crecen en el laboratorio. Para hacer más preciso el diseño del proceso de esterilización, tendremos que conocer más acerca de la resistencia relativa de los organismos en la naturaleza versus de aquellos que crecen en laboratorio.

El valor final de diseño será un juicio basado en los datos de supervivientes en laboratorio y la experiencia del proceso (Block, 1991).

1.4.5.-Factores que afectan la destrucción de los microorganismos por calor húmedo

En la esterilización por calor húmedo el agua líquida debe estar presente o debe haber suficiente agua disponible para producir 100% de humedad relativa a la temperatura de esterilización.

Se considera que los principales factores que afectan la resistencia térmica son:

1. Resistencia intrínseca.
2. Influencias ambientales activas durante el crecimiento y formación de células o esporos.
3. Influencias ambientales activas durante el tiempo de calentamiento de las células o esporos.

La resistencia intrínseca se refiere a que en el mismo medio y bajo las mismas condiciones de crecimiento, diferentes cepas de la misma especie o del mismo tipo general de organismo podrían producir suspensiones de células o esporos que tienen grados diferentes de resistencia. Esto se observó en termófilos obligados (Bigelow y Esty, 1920) y *Clostridium botulinum* (Dickson y col., 1925). Un tipo similar de conducta se demostró en células vegetativas de bacterias (Beamer y Tanner, 1939a) y levaduras (Beamer y Tanner, 1939b).

Influencias ambientales activas durante la formación de las células o esporos se consideran a las relacionadas con la edad del cultivo, temperatura de incubación y composición del medio nutriente.

Influencias ambientales activas durante el calentamiento se consideran aquellas variables tales como pH, fuerza iónica, contenido de carbohidratos, proteínas y grasas del sustrato, sistemas coloidales tales como almidón o suelo, sales y otros compuestos orgánicos o inorgánicos solubles que podrían estar presentes.

Edad

Esty y Meyer (1922) encontraron que esporos jóvenes húmedos son más resistentes que los esporos viejos húmedos. Magoon (1926b) reportó una compleja interrelación entre el tiempo y temperatura de almacenamiento y humedad sobre la resistencia de esporos de *Bacillus mycoides*. Sommer (1930) demostró una resistencia máxima de esporos de *Clostridium botulinum* entre 4 a 8 días de edad de los cultivos. Curran (1934) encontró hasta un año incrementó un poco la resistencia. Williams (1936) no encontró correlación entre la edad y resistencia de los esporos de varias especies diferentes de organismos formadores de esporos.

Fase de crecimiento

Se observó que células microbianas vegetativas muestran diferentes grados de susceptibilidad a influencias adversas en varios estadios del ciclo de crecimiento.

Stark y Stark (1929) encontraron que las células jóvenes son más susceptibles a la destrucción por calor que células viejas. Anderson y Meanwell (1936) encontraron una resistencia incrementada de estreptococos termodúricos a la destrucción por calor durante la fase logarítmica temprana, mientras Ellicker y Frazier (1938), trabajando con *Escherichia coli*, encontraron mayor resistencia al calor durante la fase estacionaria inicial, con disminución cuando la reproducción comenzó y un mínimo durante el periodo de más rápida reproducción.

Hay evidencia suficiente para demostrar que los estudios de grado de destrucción de organismos no formadores de esporos deben tomar en consideración los factores de la fase de crecimiento y edad.

Temperatura de crecimiento

El efecto de la temperatura de crecimiento ha sido estudiado extensamente. Weil (1899) encontró que la resistencia de esporos de *Bacillus anthracis* aumento con la temperatura de crecimiento.

Sames (1900) estudió la resistencia de esporos de miembros termofílicos del grupo *Bacillus* y encontró que los esporos producidos a temperaturas más altas son más resistentes que los producidos a más bajas temperaturas. Sobernheim y Mündel (1936) encontraron que la resistencia de esporos se incremento con la temperatura de incubación.

Williams y Robertson (1954) encontraron que incrementando la temperatura de esporulación, se incrementó la resistencia de esporos de 10 cepas de bacilos termófilos aerobios.

La relación entre la temperatura de esporulación y la resistencia térmica del grupo *Bacillus* ha sido estudiada extensamente (Palop y col., 1999; Lindsay y col., 1990; Sala y col., 1995).

Condiciones de los nutrientes

Williams (1929) realizó estudios del efecto de las condiciones de los nutrientes y otros factores sobre la resistencia de esporos de una cepa de *Bacillus subtilis*. Muchas de las condiciones de los nutrientes ensayados incrementaron o disminuyeron la resistencia comparado con una condición de nutriente estandarizado. Los valores de resistencia obtenidos experimentalmente cuando se modifican las condiciones del sustrato (disponibilidad de hidratos de carbono, ácidos orgánicos, aminoácidos, etc.) se restauran al volver al medio de cultivo estándar.

Curran (1935) encontró que esporos producidos y envejecidos sobre suelo o avena fueron más resistentes que aquellos cultivados en medios artificiales, mientras Görtzen (1937) no encontró diferencias significativas en la resistencia de esporos de organismos anaeróbicos tomados directamente del suelo y aquellos de cultivos, excepto para *Clostridium sphenoides*.

Sugiyama (1951), también encontró usando *C. botulinum*, que la resistencia de los esporos es influenciada por la composición del medio de cultivo.

Numerosos estudios citan la influencia de los nutrientes sobre las propiedades de los esporos (Mazas y col., 1995; Yamazaki y col., 1997).

pH

En general, la mayor resistencia térmica es justamente en el centro de la zona de pH, sobre el punto neutro, pH 7. Aunque existen variaciones entre organismos individuales, la resistencia tiene un máximo en el rango de pH 6 a 8. Esta zona es más ancha o angosta dependiendo de las especies, del cultivo en particular, el medio de suspensión (buffer o sustrato alimenticio), las técnicas usadas y las condiciones de subcultivo (Brown y Thorpe, 1978; Hutton y col., 1991; Condon y Sala, 1992; Fernandez y col., 1995).

Carbohidratos

Altas concentraciones de carbohidratos solubles generalmente resultan en un incremento en la resistencia al calor de levaduras (Corry, 1976a, b), bacterias no formadoras de esporos (Corry, 1976b), y esporos bacterianos (Sugiyama, 1951).

La magnitud del aumento es significativa en la mayoría de los microorganismos, resultando en algunos casos con aumentos de 200 al 300%.

Composición química de los esporos

Alderton y Snell (1970) demostraron usando esporos de *Bacillus megaterium* y *B. stearothermophilus*, que la resistencia al calor de los esporos bacterianos puede ser alterada significativamente por tratamientos químicos previos, debido a modificaciones químicas de los esporos.

Los métodos empíricos usados para la producción y almacenamiento de los esporos probablemente sin saberlo producen esporos más resistentes. El efecto de estos parámetros debería ser evaluado especialmente si se desean esporos de máxima resistencia al calor.

La composición química de las soluciones en las cuales los esporos son almacenados y calentados es importante, por lo que hay que tener en cuenta: (1) las diferencias de composición química de los sustratos en los cuales los esporos son suspendidos durante el calentamiento podrían ser responsables de las diferencias en las resistencias encontradas; (2) cuando la composición química de la suspensión en la cual los esporos son calentados es diferente de la composición química de la solución en la cual fueron almacenados.

Por lo tanto, la historia previa en cuanto a composición química de los sustratos durante el crecimiento, almacenamiento y pruebas de resistencia al calor son factores importantes a tener en cuenta.

1.5.-INACTIVACIÓN QUÍMICA DE ESPOROS

1.5.1.-Factores que ejercen influencia sobre la eficacia de los agentes antimicrobianos

La actividad de biocidas (antisépticos, desinfectantes y preservantes) contra los microorganismos depende de:

1. el ambiente físico externo,
2. la naturaleza, estructura, composición y condición del organismo;
3. la habilidad del organismo para degradar o inactivar la sustancia particular convirtiéndola en una forma inactiva (Russell, 1991a).

Una modificación de la concentración del agente antimicrobiano, o la temperatura o pH en el cual este actúa puede tener una profunda influencia sobre la actividad. Sin embargo, muchos otros parámetros deben ser también considerados. Mientras muchos de estos pueden ser solo de valor académico, podrían dejar un mejor entendimiento de las razones de la sensibilidad o resistencia de microorganismos a biocidas o como sea posible mejorar o potenciar la actividad de los agentes.

Hay tres aspectos principales que ejercen influencia en la actividad, condiciones de pretratamiento, durante el tratamiento y post tratamiento.

De creciente importancia es la existencia de bacterias como biofilms y la posible disminución de la susceptibilidad a biocidas y antibióticos.

1.5.1.1.-Condiciones de pretratamiento

El crecimiento de las bacterias puede ser en forma de cultivo continuo o batch. La principal crítica del cultivo batch es que las células de diferente edad fisiológica estarán presentes, mientras en el cultivo continuo se supera esta problemática.

Las paredes de las células bacterianas son estructuras altamente variables, las cuales pueden cambiar en respuesta al ambiente de crecimiento (Tempest y Ellwood, 1969).

Cultivos batch

- Medio de crecimiento

La composición del medio de crecimiento podría marcadamente influenciar la sensibilidad subsiguiente de las células a los agentes antibacterianos (Vaczi, 1973).

La composición del medio de esporulación puede ejercer influencia en la respuesta de los esporos a los agentes antibacterianos, por lo tanto los esporos deberían ser preparados en medios definidos químicamente (Hodges y col., 1980).

Un medio definido químicamente produjo esporos de *B. subtilis* que fueron menos variables en la resistencia al glutaraldehído (Stark y col., 1975) que aquellos producidos en medio extracto suelo usado en el test esporicida de la Association of Official Analytical Chemists (AOAC). La adición de glucosa y sales metálicas al agar nutriente incrementó la resistencia de esporos de *B. subtilis* al peróxido de hidrógeno (Waites y Bayliss, 1979a).

Los medios de esporulación son diseñados para producir un alto porcentaje de esporos libres y pocas células vegetativas o esporos germinados (Gould, 1971) pero es posible que las condiciones que producen esporulación en la mayor parte de la población, produzcan esporos con baja resistencia. Además, los esporos producidos sobre algunos medios pueden tener poca resistencia a un químico pero pueden ser particularmente resistentes a otros, mientras que los esporos que crecen sobre diferentes lotes del mismo medio pueden ser distintos en su resistencia. Pequeños cambios en la preparación del medio y los tiempos de cosecha pueden cambiar la resistencia (Bomar, 1962).

- pH del medio de cultivo

Existe poca información del efecto de las variaciones de pH del medio de cultivo sobre la sensibilidad de las bacterias a los agentes antimicrobianos.

Cambios en las paredes celulares de las bacterias que crecen en medios de diferentes valores de pH podría indicar variaciones en la respuesta de los organismos a biocidas. Sin embargo, ocurrirá un cambio en el valor de pH del medio durante el crecimiento del organismo como resultado de su actividad metabólica.

- **Temperatura de incubación**

Existe poca información sobre el efecto de la temperatura de incubación sobre el medio de cultivo en el cual las células crecen y su sensibilidad cuando más tarde son expuestas a agentes antimicrobianos (no antibióticos).

Cambios en las condiciones de esporulación influenciaron no solo la composición de los esporos sino también sus respuestas al calor y radiación (Russell, 1982).

- **Anaerobiosis**

Los datos del efecto de agentes antibacterianos sobre bacterias que crecen bajo condiciones anaeróbicas son escasos.

En un review de aquellos factores que tienen influencia sobre la actividad antimicrobiana de fenoles, Bennett (1959) subrayó que los organismos aeróbicos fueron más resistentes que los anaerobios, y que los aerobios facultativos fueron sensibles bajo aerobiosis, pero mucho menos bajo condiciones anaeróbicas. La base de esta respuesta se desconoce.

Condiciones del organismo

El estado de hidratación de los microorganismos bajo test podría ser un importante factor para determinar su sensibilidad o resistencia a un agente antimicrobiano.

Las bacterias en seco son considerablemente más resistentes que las bacterias en suspensión líquida. En la práctica las bacterias se encuentran frecuentemente en medios secos, y ensayos simulados pueden proveer información útil.

1.5.1.2.-Factores durante el tratamiento

Varios parámetros ejercen influencia en la actividad de biocidas en uso. Estos incluyen la concentración del agente; el número, tipo y localización de microorganismos; la temperatura y pH de tratamiento y la presencia de material extraño, como materia orgánica u otra materia interferente. Estos tienen efectos importantes sobre la performance de desinfectantes, antisépticos y preservantes.

- Concentración de biocida

Estudios cinéticos involucraron el efecto de la concentración sobre la actividad letal de sustancias microbidas empleando un símbolo, n , llamado exponente de concentración (coeficiente de dilución), el cual es una medida del efecto de los cambios en la concentración (o dilución) sobre el grado de muerte celular. Para determinar n , se necesita la medida del tiempo necesario para producir un grado comparable de muerte en la suspensión bacteriana a dos diferentes concentraciones del agente antimicrobiano. Los grados de muerte se pueden determinar de diferente forma, incluyendo un cálculo de valores D (tiempos de reducción decimal: Hurwitz y McCarthy, 1985).

Luego, si C_1 y C_2 representan las dos concentraciones y t_1 y t_2 los respectivos tiempos para reducir la población viable a un grado similar

$$C_1^n t_1 = C_2^n t_2 \quad \text{ó}$$

$$n = \frac{\log t_2 - \log t_1}{\log C_1 - \log C_2}$$

Una disminución en la concentración de sustancias con valores altos de n resulta en un marcado incremento en el tiempo necesario para lograr una muerte comparable, quedando otras condiciones constantes. En contraste, compuestos con bajos valores de n son mucho menos influenciados.

Un conocimiento del efecto de la concentración sobre la actividad antimicrobiana es esencial en la evaluación de la actividad biocida.

- Número y localización de microorganismos

Un agente antimicrobiano será efectivo cuando hay pocos microorganismos contra los cuales este deba actuar. Igualmente, la localización de los microorganismos debe ser considerado en el cálculo de la actividad (Scott y Gorman, 1987).

- Temperatura

La actividad de un desinfectante o preservante usualmente aumenta cuando la temperatura a la cual este actúa se incrementa.

Una fórmula útil para medir el efecto de la temperatura sobre la actividad está dada por

$$\Theta^{(T_2-T_1)} = k_2/k_1 \quad (1)$$

ó

$$\Theta^{(T_2-T_1)} = t_1/t_2 \quad (2)$$

en la cual k_2 y k_1 son las constantes de velocidad a las temperaturas T_2 y T_1 , respectivamente (ecuación 1) o t_2 y t_1 son los respectivos tiempos para conducir una completa muerte a T_2 y T_1 (ecuación 2).

El coeficiente de temperatura, Θ , se refiere al efecto de temperatura por 1°C de ascenso y siempre está entre 1,0 y 1,5 (Bean, 1967).

Es usual especificar el valor Θ^{10} (o Q_{10}), el cual representa el cambio en la actividad por 10°C de aumento de temperatura.

La relación entre Θ y Q_{10} esta dada por

$$\Theta = \sqrt[10]{Q_{10}}$$

- pH ambiental

El pH puede ejercer influencia en la actividad biocida por cambios que pueden ocurrir en la molécula o en la superficie de la célula.

Además, la partición de un compuesto entre el producto en el cual está presente y la célula microbiana puede ser influenciado por el pH (Bean, 1972).

- Sustancias interferentes

La materia orgánica existe en varias formas y puede interferir con la actividad microbiana de desinfectantes y otros compuestos antimicrobianos. Esta interferencia generalmente se da por la reacción entre el biocida y la materia orgánica, dejando así una concentración reducida del agente antimicrobiano para atacar a los microorganismos.

Esta actividad reducida se ve en compuestos altamente reactivos como desinfectantes a base de cloro. Una posibilidad alternativa es que el material orgánico proteja a los microorganismos del ataque.

La materia orgánica disminuye el efecto de hipocloritos contra bacterias (incluyendo micobacterias y esporos), virus y hongos (Scott y Gorman, 1987; Russell y Hugo, 1987).

El problema se puede superar con una adecuada limpieza antes de emplear un desinfectante o una combinación de desinfectante con un detergente conveniente.

Los detergentes pueden tener un efecto letal sobre los microorganismos y se usan frecuentemente en caliente. Algunos desinfectantes pueden ejercer una acción detergente.

Un resultado aparentemente paradójico es que surfactantes no iónicos pueden incrementar la eficacia de agentes antimicrobianos (Allwood, 1973). Los surfactantes no iónicos son frecuentemente empleados como agentes neutralizantes (Russell, 1981).

Otros agentes de superficie activa que ejercen influencia sobre la actividad de los compuestos antimicrobianos son los jabones.

Además, la actividad de los agentes antimicrobianos puede ser reducida o intensificada o permanecer inalterada en presencia de cationes (Galbraith y Miller, 1973).

- Humedad

La humedad relativa tiene una profunda influencia sobre la actividad de desinfectantes gaseosos como el óxido de etileno, β -propiolactona y formaldehído (Russell, 1982, 1990b).

- Tipo de organismo

Las bacterias gram positivas generalmente son más sensibles a biocidas que las gram negativas. Probablemente la principal razón de esta diferencia en sensibilidad reside en la composición relativa de la pared celular. La pared celular de las bacterias gram positivas se compone básicamente de peptidoglicanos, los cuales forman una gruesa y fibrosa capa. Entremezclado con esta estructura basal pueden existir otras moléculas como ácidos teichoicos y teichuronicos (Rogers y col., 1978) y lípidos, aunque usualmente ocurre en forma mucho menos extendida comparado a la pared de las bacterias gram negativas. Muchos agentes antibacterianos deben penetrar las membranas externa y citoplasmática para alcanzar su sitio de acción.

Los esporos de diferentes especies muestran marcadas diferencias en la resistencia. Esporos de *Bacillus stearothermophilus* fueron 10^3 veces más resistentes al peróxido de hidrógeno que aquellos de *Clostridium botulinum* (Ito y col., 1973) mientras que esporos de *Bacillus subtilis* fueron más resistentes al cloro que aquellos de *B. cereus* y *Cl. bifermentans* (Cousins y Allan, 1967; Dye y Mead, 1972). Diferentes cepas de las mismas especies pueden diferir en su resistencia; la resistencia de los esporos de varias cepas de *B. subtilis* al peróxido de hidrogeno varió por un factor de 10^4 (Waites y Bayliss, 1979b).

La resistencia de las micobacterias a muchos desinfectantes se vincula indudablemente a la composición de las paredes celulares de estos organismos. Estas poseen un inusualmente alto contenido en lípidos de pared, y la naturaleza hidrofóbica resultante puede ser responsable, al menos en parte, de su alta resistencia, la cual es más o menos proporcional al contenido de material ceroso (Croshaw, 1971).

Varias especies de hongos y levaduras son patógenas. Otros son importantes organismos de deterioro de alimentos, productos cosméticos y farmacéuticos. Muchos compuestos muestran actividad antifúngica y antibacteriana. Varios agentes bactericidas poseen propiedades contra virus, aunque la actividad antibacteriana no necesariamente implica potencia antiviral. Los desinfectantes a base de cloro son considerados efectivos para inactivar todo tipo de virus (Dychdala, 1983).

1.5.1.3.-Factores post – tratamiento

Varios factores tienen influencia en la recuperación de los microorganismos expuestos a compuestos antimicrobianos. Cuando se transfieren los esporos no tratados a un medio nutriente bajo óptimas condiciones, usualmente germinan dentro de 20-30 minutos. Para los esporos dañados, la velocidad y extensión de recuperación dependerá de las condiciones usadas; los esporos dañados son particularmente sensibles a las condiciones de recuperación (Roberts, 1970).

Estos incluyen la composición y pH del medio de recuperación, remoción del agente antimicrobiano, la temperatura y período de incubación y la composición del diluyente usado para realizar los recuentos.

- Neutralización de biocidas

Para prevenir una concentración inhibitoria de un agente antimicrobiano que será transferido al medio de recuperación, es esencial que la actividad del compuesto antimicrobiano sea anulada. Esto se puede lograr por medio de un agente inactivante (inactivador, agente neutralizante, antídoto) el cual vence la actividad del agente inhibitorio (antimicrobiano). El antídoto no debe ser tóxico para los microorganismos y los productos resultantes de la neutralización no deben igualmente ser tóxicos.

Los desinfectantes con coeficientes de dilución altos rápidamente pierden su actividad sobre la dilución y esto puede ser suficiente para superar alguna actividad residual.

Los agentes inactivantes como tweens pueden, sin embargo, proveer una alternativa conveniente. Los agentes inactivantes pueden ser incluidos en el primer tubo diluyente o en el medio de recuperación o ambos.

Una tercera técnica es la filtración por membrana. En esta, la mezcla de desinfectante más microorganismos se filtra a través de un filtro de membrana; esta luego se lava *in situ*, y los organismos son retenidos en la membrana y las trazas del agente antimicrobiano se remueven. La transferencia de la membrana a un medio agar apropiado capacita a las células sobrevivientes a producir colonias. Este método fue originalmente inventado para el test de esterilidad y ha sido aplicado para la evaluación de desinfectantes (Prince y col., 1975).

- Diluyente en procedimientos de recuento de viables

Se han empleado como diluyentes agua destilada estéril, solución salina de Ringer's, 0,9% p/v, agua de peptona y caldo nutriente.

Algunas bacterias, *Ps. aeruginosa* (Brown, 1975) y algunas cepas de *Proteus* spp. son afectadas por el agua, y los recuentos viables en los cuales el agua es el diluyente pueden ser más bajos que cuando se emplea otro diluyente.

- Medio de recuperación

La composición del medio de recuperación puede ejercer influencia en los recuentos de células expuestas a los compuestos antimicrobianos químicos. De modo sorprendente, este aspecto ha sido poco estudiado.

- Temperatura de incubación

Las bacterias que sobreviven a un tratamiento de estrés pueden recobrase mejor a una temperatura por debajo del óptimo de las bacterias no dañadas.

Los esporos tratados químicamente pueden requerir largos períodos de incubación antes que ocurran la germinación y crecimiento. En tal instancia puede ser necesario un shock de calor después de la incubación por un número específico de días para inducir la germinación.

1.5.1.4.-Biofilms bacterianos

La interacción de bacterias con superficies es inicialmente reversible pero finalmente irreversible. Tal adhesión irreversible se inicia por bacterias adheridas por medio de polímeros exopolisacáridos del glycocalix (Costerton y col., 1987). Las células producidas como resultado de la división celular se adhieren dentro de esta matriz y finalmente hay un continuo biofilm sobre la superficie colonizada. Las bacterias encerradas en este biofilm existen en un micro ambiente específico que difiere de las células que crecen en cultivo batch bajo condiciones de laboratorio ordinarias.

Las bacterias dentro de los biofilms son mucho más resistentes a los agentes antibacterianos (biocidas y antibióticos) que las células que crecen en batch (LeChevalier y col., 1988; Pyle y McFeters, 1990).

El peróxido de hidrógeno a concentraciones por debajo de las requeridas para la total desinfección removió biofilms (Christensen y col., 1990).

1.5.2.-Resistencia de esporos bacterianos a agentes químicos

Los esporos bacterianos son las formas de vida más resistentes conocidas, y los procedimientos que llevan a su completa destrucción resultaran en la inactivación de todas las otras formas de vida con la posible excepción de los priones.

Los químicos que destruyen esporos son conocidos como esporicidas y tienen el potencial para actuar como agentes esterilizantes. En el laboratorio, se usan varios tipos de tests para determinar la actividad esporistática y esporicida. Los tests esporistáticos usualmente implican la determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias, la mínima concentración requerida para prevenir la germinación y/o crecimiento. La

actividad esporicida se determina por la medición de la velocidad de muerte o el tiempo requerido para completar la destrucción de una población.

En la práctica, la esterilización química es raramente realizada a temperatura ambiente, aunque para materiales termolábiles esta podría ser la única alternativa a la esterilización por calor.

Comparado a las células vegetativas, los esporos pueden ser 100000 veces más resistentes a los químicos (Phillips, 1952). Durante la germinación y crecimiento de los esporos la resistencia se pierde y las células se hacen sensibles a los biocidas.

Cuando los esporos son expuestos a agentes químicos, ellos pueden ser inhibidos, injuriados subletalmente o dañados irreversiblemente. La resistencia relativa de los esporos que crecen en el laboratorio y aquella que ocurre en su medio ambiente natural es desconocida, pero se reconoce que la resistencia de los esporos que crecen en el laboratorio puede variar considerablemente dependiendo no solo del agente químico usado sino también de las especies bacterianas y cepas, el método de producción y cosecha de esporos, preparación y almacenamiento y las condiciones usadas para el estudio de resistencia.

Numerosos métodos han sido ideados para quitar el material no deseado de los medios de esporulación y dejar los esporos inactivos (Murrell, 1969), pero tales métodos pueden modificar la resistencia y deberían ser examinados antes del uso.

La resistencia de los esporos puede cambiar significativamente durante períodos de almacenamiento prolongado (Waites y Bayliss, 1979a). Los esporos pueden ser almacenados en agua destilada y refrigerados (aunque algunas cepas de *Bacillus* pueden germinar en largos periodos de almacenamiento) o congelados. Alternativamente los esporos pueden ser almacenados secos-congelados, lo cual puede dañar los esporos de algunas cepas (Marshall y col., 1963) o en etanol (Molin y Östlund, 1976).

Aunque los factores que afectan la resistencia al calor han sido extensamente estudiados, pocas investigaciones han intentado explicar la resistencia química. Los mismos factores parecen determinar la resistencia al calor y químicos, pero los esporos particularmente resistentes al calor no son especialmente resistentes al fenol (Briggs, 1966), óxido de etileno (El-Bisi y col., 1963), cloro (Dye y Mead, 1972) o peróxido de hidrógeno (Toledo y col., 1973).

Los agentes químicos que destruyen bacterias vegetativas son descriptos como desinfectantes. Muchos desinfectantes altamente activos y ampliamente usados, tales como los fenólicos, compuestos de amonio cuaternario, alcoholes, ácidos orgánicos, esteroides, y mercuriales tienen poca o ninguna actividad esporicida pero son efectivos agentes esporistáticos, impidiendo la germinación y/o crecimiento de los esporos.

Los agentes químicos esporicidas incluyen glutaraldehído y formaldehído, cloro y yodo, ácidos y álcali, peróxido de hidrógeno y otros compuestos peroxi, óxido de etileno, beta-propionolactona y ozono. Para lograr una acción esporicida con estos compuestos se requieren mucho más altas concentraciones y tiempos largos de contacto comparados con aquellos usados para la destrucción de las células vegetativas.

1.5.3.-Agentes químicos

1.5.3.1.-Compuestos peroxi

A. Peróxido de hidrogeno

El peróxido de hidrógeno se considera seguro y ha sido aprobado para el uso en alimentos en muchos países (Schumb y col., 1955). Una de las principales aplicaciones es en la esterilización de envases para alimentos preservados asépticamente como leche fresca y jugos de fruta.

El peróxido de hidrogeno puede ser fácilmente destruido por calor o las enzimas catalasa y peroxidasa para dar productos finales inocuos, oxígeno y agua.

En 1950, se desarrolló un proceso electroquímico para producir preparaciones puras en altas concentraciones estables a elevadas temperaturas y de larga vida en estantería (Schumb y col., 1955).

Ha existido un aumento en el interés por el peróxido de hidrogeno durante los últimos años. Yoshpe-Purer y Eylan (1968) usaron bajas concentraciones para la esterilización del agua de bebida.

Naguib y Hussein (1972) demostraron que 0,1% de peróxido de hidrógeno a 54°C por 30 minutos redujo el total del recuento bacteriano en leche cruda por 99,999%, y los recuentos de coliformes, estafilococos, salmonellae y clostridios en 100%.

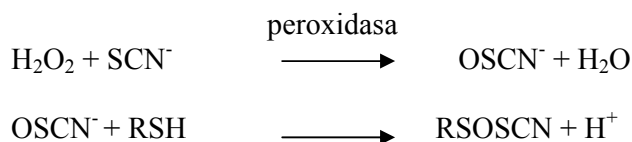
La rápida actividad virucidal del peróxido de hidrógeno fue demostrada por Mentel y Schmidt (1973). El peróxido de hidrógeno en relativamente altas concentraciones (10 a 25%) fue un prometedor agente esporicida (Toledo y col., 1973).

Actualmente el peróxido de hidrogeno se produce en una forma estable en concentraciones de 3% a 90%.

En años recientes la FDA aprobó el uso de peróxido de hidrógeno para la esterilización de equipos y envases en el envasado aséptico de alimentos y bebidas (CFR, 1990).

Mecanismo de acción del peróxido de hidrogeno

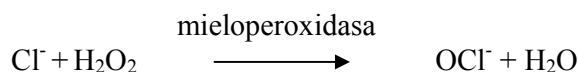
El peróxido de hidrógeno puede ser considerado como un desinfectante propio de la naturaleza y preservante. Se presenta naturalmente en leche y miel, y es un residente normal de los tejidos como resultado del metabolismo celular. Nos protege de infecciones causadas por la invasión de microorganismos patógenos. En la boca, presente en la membrana mucosa, actúa como poderoso oxidante solo o en combinación con tiocianato y peroxidasa en la saliva (Thomas y Aune, 1978):



El peróxido de hidrógeno es el germicida que mata a aquellos microorganismos que penetran las defensas del cuerpo y ganan la entrada a la corriente sanguínea. Los fagocitos, células de la sangre blancas especializadas, limpian y absorben los invasores extraños. Pero ellos no pueden absorber las células vivas; las células deben primero morir, y es el peróxido de hidrogeno en el fagocito que mata a las bacterias.

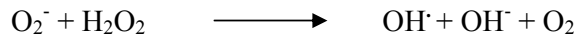
El peróxido de hidrogeno es producido en las células por la reducción del oxígeno. Aunque el oxígeno es requerido para la respiración de las células, también es tóxico para ellas; las células están protegidas porque ellas tienen un sistema para ceder oxígeno por reducción de este a agua.

En presencia de la enzima mieloperoxidasa, el ión cloruro en la bacteria puede ser oxidado por el peróxido de hidrogeno a hipoclorito (Klebanoff, 1968):



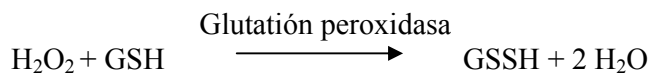
El hipoclorito es un buen oxidante y germicida.

Otro mecanismo propuesto donde el peróxido de hidrogeno participa en la destrucción de bacterias, involucra la reacción del ión superóxido con peróxido de hidrogeno para producir el radical hidroxil (Fridovich, 1978):



El radical hidroxil es el oxidante más fuerte conocido (Fridovich, 1975); y por este mecanismo se creyó que el peróxido de hidrogeno produce la muerte de las bacterias. El radical hidroxil, siendo altamente reactivo, puede atacar los lípidos de la membrana, DNA y otros componentes esenciales de la célula.

¿Qué protege a los fagocitos contra el peróxido de hidrogeno? Se propuso un sistema de detoxificación enzimático glutatión (GSH) (Voetman y col., 1980).



Aunque la catalasa producida por la respiración de las células puede proteger a la misma del daño por niveles de peróxido de hidrógeno producidos metabólicamente, esta defensa es vencida por concentraciones (3% y mayores) usadas para la desinfección.

Russell (1982) describió un mecanismo por el cual ocurre la actividad esporicida del peróxido de hidrógeno. El sugirió que la actividad esporicida es el resultado de remover proteínas de la cubierta de los esporos bacterianos.

Actividad antimicrobiana del peróxido de hidrógeno

El peróxido de hidrogeno es activo contra un amplio rango de organismos: bacterias, levaduras, hongos, virus y esporos (Tabla 1.10 y 1.11). Los anaerobios son más sensibles, ya que no producen catalasa para descomponer el peróxido. 25 ppm o menos impide el crecimiento de bacterias vegetativas. Como solución al 3%, el peróxido de hidrógeno es rápidamente bactericida, es menos rápido contra levaduras, algunos virus y especialmente esporos bacterianos.

En general, el peróxido de hidrogeno tiene una mayor actividad contra bacterias gram negativas que con gram positivas. Aunque esta actividad es afectada por cambios en

pH, mostrando gran actividad en el rango ácido (Tabla 1.12), este es menos afectado que muchos otros desinfectantes como fenoles y ácidos orgánicos.

La destrucción de esporos es incrementada con el aumento en la temperatura y la concentración, convirtiendo al peróxido de hidrogeno en un efectivo esporicida bajo estas condiciones. Leaper (1984a) demostró que un incremento en la temperatura de 20 a 45°C redujo el tiempo de muerte de esporos 10 a 20 veces, y un aumento en la concentración de 17,7 a 35,4% causó una reducción del tiempo de 3 a 4 veces.

Tabla 1.10 Actividad antimicrobiana del peróxido de hidrogeno hacia bacterias, levaduras y virus (Block, 1991)

Organismo	Concent. (ppm)	Letalidad (minutos)	Temp. (°C)
Bacterias			
<i>Staphylococcus aureus</i>	1000	60	—
<i>Staphylococcus aureus</i>	25,8 x 10 ⁴	0,2	24
<i>Escherichia coli</i>	1000	60	—
<i>Escherichia coli</i>	500	10-30	37
<i>Eberthella typhi</i>	1000	60	—
<i>Aerobacter aerogenes</i>	500	10-30	37
<i>Sarcina</i> spp.	500	150	37
<i>Streptococcus lactis</i>	500	150	37
<i>Streptococcus liquefacus</i>	500	240	37
<i>Micrococcus</i> spp.	30	10	—
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	30	10	—
Levaduras			
<i>Torula</i> spp.	500	180-210	37
<i>Oidium</i> spp.	500	180-210	37
Virus			
Orthinosis virus	3,0 x 10 ⁴	180	—
Rhinovirus tipos 1A. 1B. 7	0,75 x 10 ⁴	50-60	37
Rhinovirus tipos 1A. 1B. 7	1,5 x 10 ⁴	18-20	37
Rhinovirus tipos 1A. 1B. 7	3,0 x 10 ⁴	6-8	37
Poliovirus tipo 1	1,5 x 10 ⁴	75	20
Poliovirus tipo 1	3,0 x 10 ⁴	75	20

Actividad sinérgica del peróxido de hidrogeno

El peróxido de hidrogeno muestra sinergismo con agentes físicos y químicos. Bayliss y Waites (1976) trataron esporos de *Clostridium bifementans* con 100 µm de sulfato de cobre y 0,28 M de peróxido de hidrogeno a 25°C. El cobre solo permitió el 95% de formación de colonias; el peróxido solo, 87%. Cuando se usaron juntos la formación de colonias fue 0,028%.

Desde que se conoce que el peróxido de hidrogeno remueve proteínas de las capas del espora, se probó con ditiotreitól, el cual también posee esa propiedad.

Tabla 1.11. Actividad esporicida del peróxido de hidrogeno hacia bacterias formadoras de esporos y esporos bacterianos (Block, 1991)

Organismo	Concentración (ppm)	Letalidad (minutos)	Temp. (°C)	pH	Comentario
<i>Bacillus subtilis</i>	500	420-1080	37	—	cultivo bacteriano
<i>Bacillus cereus</i>	500	420-1080	37	—	cultivo bacteriano
<i>Bacillus megatherium</i>	500	420-1080	37	—	cultivo bacteriano
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 15411*	3,0 x 10 ⁴	1440	37	4,3	esporos
<i>Bacillus subtilis</i> SA 22	25,8 x 10 ⁴	7,3	24	3,8	suspensión esporos
<i>Bacillus coagulans</i>	25,8 x 10 ⁴	1,8	24	3,8	suspensión esporos
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	25,8 x 10 ⁴	1,5	24	3,8	suspensión esporos
<i>Clostridium sporogenes</i>	25,8 x 10 ⁴	0,8	24	3,8	suspensión esporos
<i>Bacillus subtilis</i> var. <i>globigii</i>	25,8 x 10 ⁴	2,0	24	3,8	suspensión esporos
<i>Bacillus subtilis</i> var. <i>globigii</i>	35 x 10 ⁴	1,5	24	3,8	suspensión esporos
<i>Bacillus subtilis</i> var. <i>globigii</i>	41 x 10 ⁴	0,75	24	3,8	suspensión esporos
<i>Bacillus subtilis</i> SA 22	17,7 x 10 ⁴	9,4	20	—	suspensión esporos
<i>Bacillus subtilis</i> SA 22	17,7 x 10 ⁴	0,53	45	—	suspensión esporos
<i>Bacillus subtilis</i> SA 22	29,5 x 10 ⁴	3,6	20	—	suspensión esporos
<i>Bacillus subtilis</i> SA 22	29,5 x 10 ⁴	0,35	45	—	suspensión esporos
<i>Bacillus subtilis</i> SA 22	35,4 x 10 ⁴	2,3	20	—	suspensión esporos
<i>Bacillus subtilis</i> SA 22	35,4 x 10 ⁴	0,19	45	—	suspensión esporos

Tabla 1.12. Efecto del pH sobre la actividad esporicida del peróxido de hidrogeno y ácido peracético (tiempo requerido en minutos para matar esporos de *Bacillus subtilis* ATCC 15441). Baldry, 1983

Compuesto peroxi	Concentración (ppm)	pH 5	pH 6,5	pH 8,0
Peróxido de hidrogeno	10,000	>360	>360	>360
	30,000	180	360	360
Ácido peracético	83	>360	>360	>360
	830	60	180	>360
	8300	<30	<30	<30

Tratamientos con peróxido de hidrogeno solo, dio 93% de formación de colonias, y con ditiotreitolo solo, 40%. Juntos dieron 0,082%.

Se propuso que el ditiotreitol remueve las proteínas de la capa del espora que protege al mismo del peróxido de hidrogeno, y que el cobre incrementa el grado de descomposición del peróxido de hidrogeno y el grado de escisión de cadenas peptídicas por el mismo.

El calor aumenta fuertemente la actividad del peroxido de hidrogeno. Una explicación es que el peroxido de hidrogeno convierte a los esporos más sensibles al calor; esta podría ser la causa de muerte. El peroxido de hidrogeno también actúa sinérgicamente con la radiación ultravioleta. Bayliss y Waites (1979a, 1979b, 1982) encontraron que 0,3% de peroxido de hidrogeno más radiación ultravioleta (UV) dieron 2000 veces más incremento de muerte de esporos que la radiación sola, y 4000 veces mayor que el peróxido de hidrogeno solo. Menos de 1% de peróxido de hidrogeno en presencia de UV produjo muerte, pero el efecto disminuyó cuando se incrementó la concentración. La absorción de UV por el peróxido de hidrogeno se postuló como la causa de la pérdida de sinergismo. El principal inconveniente de UV con peróxido, como con UV solo, es que el UV no es penetrante y se limita a la acción en superficies o a soluciones transparentes que no lo absorban.

Otro agente físico que muestra sinergismo con el peróxido de hidrogeno es la energía ultrasónica. Se piensa que la energía ultrasónica dispersa y agita los agregados celulares, incrementando la superficie de contacto con los desinfectantes, la permeabilidad de la membrana celular y acelerando la relación entre el desinfectante y los componentes celulares.

B. Ácido peracético

Es deseable tener un químico con los atributos del peróxido de hidrogeno –germicida efectivo y capacidad esterilizante, productos de descomposición no perjudiciales, y una infinita solubilidad en agua- pero con mayor solubilidad en lípidos y libertad de desactivación por catalasa y peroxidasa. Tal componente existe, este es el peroxido del ácido acético, ácido peroxiacético, o ácido peracético (PAA). Como efectivo biocida con residuos no tóxicos, este ha sido un tema de considerable interés con recientes análisis por Schroder (1984), Block (1986).

PAA es un agente antimicrobiano más potente que el peróxido de hidrogeno (HP) (Baldry, 1983), siendo rápidamente activo a bajas concentraciones contra un amplio

espectro de microorganismos. Este es un esporicida a muy bajas temperaturas y es efectivo en presencia de materia orgánica.

Como un ácido débil, es más activo sobre el rango ácido pero es germicida en altas concentraciones en el rango alcalino. Como HP, es útil en solución y como vapor. Sprossig (1975) declaró que tiene ventajas para la desinfección y esterilización no encontradas en ningún otro agente.

Hutchings y Xezones en 1949 mostraron a PAA como el más activo de 23 germicidas probados contra esporos de *Bacillus thermoacidurans*. Greenspan y MacKellar en 1951 encontraron que fue bactericida a 0,001%, fungicida a 0,003% y esporicida a 0,3%.

PAA es de especial interés para la industria procesadora de alimentos, porque sus residuos son sólo ácido acético, oxígeno, agua, HP y ácido sulfúrico diluido.

Actividad antimicrobiana del ácido peracético

PAA inhibirá y matará bacterias gram positivas y negativas, hongos y levaduras en 5 minutos o menos, a menos de 100 ppm (Tabla 1.13). Se requiere 200 a 500 ppm en presencia de materia orgánica.

Para virus el rango de dosificación es amplio, con fagos inactivados de 12 a 30 ppm en 5 minutos y los virus entéricos requieren tanto como 2000 ppm (0,2%) de 10 a 30 minutos.

Con 500 a 30.000 ppm (0,05 a 3%) se inactivan esporos bacterianos de 15 minutos a 15 segundos a temperatura ambiente (Tabla 1.14).

PAA es efectivo a concentraciones levemente incrementadas en presencia de materia orgánica (Hutchings y Xezones, 1949; Lensing y Oei, 1984). PAA puede funcionar a bajas temperaturas (Baldry, 1983) y es activo a la temperatura de 85°C (Hutchings y Xezones, 1949).

PAA es afectado por el pH (Tabla 1.12), con gran actividad a bajo pH. Con bacterias (Baldry, 1983) la diferencia no es grande entre pH 5 a 8, pero la disminución de la actividad se demuestra a pH 9. El mismo efecto se notó con levaduras (Baldry, 1983) a 25°C pero no a 4°C. Con fagos tiene gran actividad a bajo pH. En el caso de esporos (Tabla 1.14) se demostró el efecto pH.

La actividad germicida de PAA es la más apreciada cuando se compara con otros desinfectantes (Tabla 1.15). Este resultado ser el más activo en todas estas comparaciones

realizadas por diferentes investigadores. Los más cercanos a este son el cloro y yodo, los cuales también actúan como agentes oxidantes.

Tabla 1.13. Actividad antimicrobiana del ácido peracético hacia bacterias, levaduras y hongos (pH = 7,0, temperatura = 20°C). Block, 1991

Organismos	Concentración (ppm)	Letalidad (minutos)	Comentarios
Bacterias			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50	—	Buffer fosfato
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	250	—	Caldo nutriente
<i>Escherichia coli</i>	10	—	Buffer fosfato
<i>Escherichia coli</i>	200	—	Caldo nutriente
<i>Micrococcus pyogenes</i> var. <i>aureus</i>	10	—	Buffer fosfato
<i>Micrococcus pyogenes</i> var. <i>aureus</i>	200	—	Caldo nutriente
<i>Escherichia coli</i>	10-15	—	
<i>Streptococcus faecalis</i>	75-100	—	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	90	5	
<i>Enterococcus faecium</i> DSM 2918	90	5	
<i>Listeria monocytogenes</i>	90	5	
<i>Legionella pneumophila</i> *	6	<5	
Levaduras			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCYC 762+	83	<5	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCYC 1026+	42	<5	
<i>Zygosaccharomyces baillii</i> NCYC 580+	25	<5	
Hongos			
<i>Aspergillus niger</i>	50	—	Fungistático, buffer
<i>Aspergillus niger</i>	500	—	Fungistático, caldo nutriente
<i>Penicillium roquefortii</i>	50	—	Fungistático, buffer
<i>Penicillium roquefortii</i>	500	—	Fungistático, caldo nutriente

*pH = 5,0 - Temp. = 25°C; + pH = 6,5 - Temp. = 25°C

Leaper (1984b) informó un efecto sinérgico de PAA con alcoholes. Con 0,08% de PAA solo, el valor D fue de 47,2 minutos, mientras con la combinación de 0,08% de PAA y 9,9% de metanol, etanol o propanol-1, los valores D fueron 17,3, 4,7 y 1,6 minutos, respectivamente. Se sugirió el uso simultáneo de PAA y etanol en envasado aséptico.

Tabla 1.14. Actividad esporicida del ácido peracético hacia bacterias formadoras de esporos y esporos bacterianos (Block, 1991)

Organismos	Concent. (ppm)	Letalidad (minutos)	Temp. (°C)	Comentario
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	100	15	20	BC
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	2000	1	20	BC
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	500	15	20	SS
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	3000	1	20	SS
<i>Bacillus coagulans</i> 43-P	100	15	20	BC
<i>Bacillus coagulans</i> 43-P	2000	1	20	BC
<i>Bacillus coagulans</i> 43-P	500	10	20	SS
<i>Bacillus coagulans</i> 43-P	2000	1	20	SS
<i>Bacillus subtilis</i>	3000	10	20	BC, buffer
<i>Bacillus subtilis</i>	5000	10	20	BC, caldo nutriente
<i>Bacillus subtilis</i> var. <i>niger</i> ATCC 9372	10.000	0,25	20	SS
<i>Bacillus stearothermophilus</i> oxid código BR 23	10.000	0,25	20	SS
<i>Bacillus subtilis</i> * ATCC 15441	25.000	1440	37	Test carrier

BC, cultivo bacteriano; SS, suspensión de esporos, *Iguales resultados a pH 4, 7 y 9

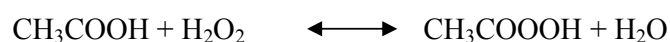
Tabla 1.15. Comparación del ácido peracético con otros desinfectantes hacia bacterias que envenenan alimentos: efecto de la temperatura y concentración en ppm para obtener letalidad en 5 minutos (Orth y Mrozeck, 1989)

Organismo	Ácido peracético	Cloro activo	Cloruro de benzalconio
20°C			
<i>Listeria monocytogenes</i>	45	100	200
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	90	860	500
<i>Enterococcus faecium</i> DSM 2918	45	300	250
5°C			
<i>Listeria monocytogenes</i>	90	860	500
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	90	1100	750
<i>Enterococcus faecium</i> DSM 2918	90	450	500

Estabilidad del ácido peracético

Los peróxidos en general son compuestos con alto estado de energía, y pueden ser considerados termodinámicamente inestables. PAA es considerablemente menos estable que HP. 40% de PAA pierde de 1 a 2% de este ingrediente activo por mes, comparado con HP (30 a 90%), el cual pierde menos de 1% por año. Soluciones de PAA diluido son más inestables.

PAA se produce por la reacción de ácido acético o anhídrido acético con HP en presencia de ácido sulfúrico, el cual actúa como un catalizador, como se muestra:



Para impedir la reacción inversa, la solución de PAA es fortalecida con ácido acético y HP. Además se emplea un estabilizante. Un proceso patentado emplea surfactantes aniónicos con soluciones de PAA diluido que muestra no solo gran estabilidad sino una gran actividad antimicrobiana (Bowling y col., 1977).

Para mantener la estabilidad, las soluciones se deben realizar con químicos puros y agua deionizada, y mantener libre de polvo y otros contaminantes. PAA se debe almacenar preferentemente en ambiente fresco en los envases originales. No es afectado por vidrio y la mayor parte de los plásticos, pero puede sacar los plastificantes de algunas formulaciones vinil usadas como juntas y atacar las gomas sintéticas y naturales (Dychdala, 1988). Aluminio puro, acero inoxidable y estaño-hierro laminado son resistentes a PAA pero acero, hierro galvanizado, cobre y bronce son susceptibles a reacción y corrosión (Schroder, 1984).

Mecanismo de acción del ácido peracético

Se ha realizado poca investigación del mecanismo de acción de PAA como agente antimicrobiano. Uno puede solo especular que este funciona como otros peróxidos y agentes oxidantes. Es probable que los sulfidrilos sensibles y las uniones sulfuro en proteínas, enzimas y otros metabolitos sean oxidados y que las uniones dobles reaccionen. Se sugiere que PAA rompe la función quimiosmótica y transporte de la membrana citoplasmática lipoproteica a través de la dislocación o ruptura de las paredes celulares (Baldry y Fraser, 1988).

Aplicaciones del ácido peracético

La poderosa acción antimicrobiana de PAA a bajas temperaturas con la ausencia de residuos tóxicos deja un amplio rango de aplicaciones. Este fue aceptado en el mundo en las industrias de bebidas y procesamiento de alimentos, las cuales incluyen carne y plantas procesadoras de pollos, fabricas de conservas alimenticias, lecherías, fábricas de cerveza, vinos y plantas de bebidas no alcohólicas (Dychdala, 1988), donde es ideal para los sistemas de limpieza (CIP). Este es utilizado como desinfectante final para el acero inoxidable y tanques de vidrio, tuberías. Su característica de no enjuague, donde sus productos de descomposición en alta dilución no son desagradables desde el punto de vista del olor, sabor o toxicidad, ahorra tiempo y dinero.

Las propiedades de PAA han sido también reconocidas por la comunidad médica. En la preparación de productos farmacéuticos, el PAA permite la esterilización fría de emulsiones, hidrogels, ungüentos y polvos.

La efectividad de PAA contra bacterias y virus permitieron a Baldry y French (1989) investigar su uso como desinfectante para aguas residuales y efluentes de aguas residuales en pruebas en laboratorio y campo. Ellos encontraron que PAA es un efectivo desinfectante de efluentes secundarios.

C. Otros compuestos peroxi

Además de PAA, se han examinado otros ácidos peroxi orgánicos. Los ácidos perfórmico y perpropiónico son similares en la actividad antibacteriana a PAA, pero el perfórmico es volátil e inestable, y el perpropiónico es más costoso.

Baldry y Fraser (1988) expusieron que los ácidos peroxiheptanoico y peroxinonanoico tienen mayor actividad sobre una base molar que PAA.

Derivados del ácido perbenzoico han sido declarados en patentes por su acción esporicida. Las sales de magnesio de peroxiphthalato son un producto comercial. Este es un sólido soluble en agua efectivo contra bacterias, levaduras y esporos (Baldry, 1984).

Los peróxidos inorgánicos se han utilizado para combatir microbios. Los perboratos, han sido usados en pastas dentífricas y polvos. El permanganato es antibacterial, antifúngico y antiviral; este se usó como un antiséptico pero su intenso color púrpura es una desventaja.

Toxicidad de los compuestos peroxi

El peróxido de hidrogeno es un líquido transparente con un olor ligeramente ácido característico. Este tiene baja toxicidad y no es un veneno sistémico, porque es descompuesto en el intestino antes de la absorción (Gleason y col., 1969). Las soluciones concentradas son irritantes para la piel, membranas mucosas y particularmente ojos. Los vapores pueden causar inflamación del tracto respiratorio. No es un carcinógeno o un mutágeno.

Se deben usar guantes de goma, anteojos de seguridad y ropa de protección cuando se maneja HP, PAA concentrado o algún compuesto peroxi líquido o solución. Se debe lavar inmediatamente con grandes cantidades de agua si hay salpicaduras sobre la piel o en ojos. Si se ingiere, suministrar leche o agua tibia y llamar al médico (FMC Corp.).

PAA es una solución transparente con olor picante (conteniendo 40% o menos de ácido peracético). La solución 40% tiene un LD₅₀ para ratas de 1540 mg por kilogramo (National Institute of Safety and Health, 1974).

Para una formulación 4% (P-3 oxonia active) se da un valor de 3,4 g por kilogramo (Dychdala, 1988). La toxicidad aguda por inhalación, LC 50 fue 13.439 mg por metro cúbico.

Para una solución 35% PAA, el vapor es lacrimoso y la inhalación da una sensación de picazón en los vías nasales. Según el trabajo de Bock y col. (1975) PAA es un potente promotor de tumor y un carcinógeno débil.

Yamaguchi y Yamashita (1980) estudiaron la mutagenicidad de los compuestos peroxi, encontrando que HP y PAA no son mutagénicos.

Por su naturaleza química, los compuestos peroxi son poderosos oxidantes y no parecen presentar peligro de toxicidad u otros riesgos cuando son diluidos en agua a su efectiva concentración como desinfectantes y esterilizantes. Sin embargo, en solución concentrada, se deben tratar con cautela, como es el caso con fuertes oxidantes. Se deben almacenar en un lugar frío (no superior a 30°C) en el envase original. Los derrames deberían ser cubiertos con agentes reductores débiles como tiosulfato de sodio. Se deben evitar materiales orgánicos e iones de metales pesados de cobre, hierro y manganeso, porque pueden causar rápida descomposición como para producir ignición y fuego.

1.5.3.2.-Cloro y compuestos a base de cloro

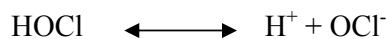
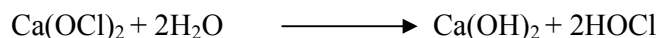
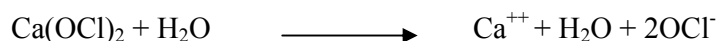
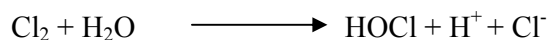
A. Cloro

Aunque el cloro es uno de los elementos más ampliamente distribuidos sobre la tierra, este no se encuentra en estado libre en la naturaleza. En cambio, existe en su mayor parte en combinación con sodio, potasio, calcio y magnesio. El cloro elemental es un gas de coloración verdoso-amarilla, irritante y de olor penetrante.

Mecanismo de la desinfección del cloro

El cloro, en una solución acuosa exhibe una rápida acción bactericida. El mecanismo de esta actividad no ha sido completamente aclarado, a pesar de la extensa investigación realizada en este campo.

Andrewes y Orton (1904) sugirieron que el ácido hipocloroso fue el responsable de la destrucción de los microorganismos. Cuando el cloro elemental o hipocloritos son agregados al agua, ellos sufren las siguientes reacciones:



La disociación del ácido hipocloroso depende del pH y el equilibrio entre HOCl y OCl⁻, aunque HOCl es constantemente consumido a través de su función germicida (Baker, 1959).

Parece que la eficiencia desinfectante del cloro decrece con un incremento en pH y viceversa, la cual es paralela a la concentración del ácido hipocloroso no disociado. Esto indica que HOCl debe ser más fuerte en la acción bactericida que OCl⁻.

De la experiencia, se conoce que soluciones alcalinas de hipoclorito de calcio y sodio con pequeñas cantidades de HOCl y grandes cantidades de OCl⁻ poseen propiedades bactericidas. Esto sugiere que los iones OCl⁻ podrían ser un factor contribuyente en la desinfección, porque el ión OCl⁻ contiene cloro activo, y podría ser este su poder germicida.

Exactamente cómo HOCl destruye los microorganismos no ha sido demostrado nunca experimentalmente.

De acuerdo a Rudolph y Levine (1941), el efecto bactericida de hipocloritos se completa en dos fases sucesivas: (1) la penetración de un ingrediente germicida activo en la célula bacteriana y (2) la reacción química de este ingrediente con el protoplasma de la célula para formar complejos tóxicos (compuestos N-cloro) que destruyen el organismo.

Knox y col. (1948) confirmaron que el efecto bactericida del cloro es producido por la inhibición de ciertos sistemas enzimáticos esenciales para la vida y que el mecanismo es el resultado de una acción oxidativa del cloro sobre los grupos SH de enzimas vitales u otras enzimas sensibles a la oxidación por cloro. Esta reacción es aparentemente irreversible. La inhibición de reacciones metabólicas citoplasmáticas esenciales es en su mayor parte la responsable de la destrucción de la célula bacteriana. Knox y col. (1948) mostraron que el cloro a baja concentración puede conducir una rápida destrucción de la materia bacteriana previo a la formación de compuestos N-cloro dentro del protoplasma.

Marks y col. (1945) indicaron que dos mecanismos diferentes de acción germicida ocurren con los compuestos N-cloro: (1) la molécula de cloramina no disociada actúa directamente sobre la bacteria y (2) HOCl formado vía hidrólisis del compuesto N-cloro es el agente causante de muerte.

Estabilidad del cloro en solución

La estabilidad del cloro libre disponible en solución depende en su mayor parte de los siguientes factores: (1) concentración de cloro, (2) presencia y concentración de catalizadores, (3) pH de la solución, (4) temperatura de la solución, (5) presencia de materia orgánica y (6) irradiación ultravioleta. Algunos de estos factores, solo o en combinación, podría afectar en forma apreciable la estabilidad del cloro disponible en solución.

El hierro y aluminio parecen tener solo un leve efecto sobre la estabilidad de la solución de cloro, mientras el cobre, níquel o cobalto son poderosos catalizadores de descomposición.

Las soluciones de cloro disponible más estables son aquellas que tienen las siguientes características: (1) baja concentración de cloro, (2) ausencia de bajos contenidos de cobre, cobalto, níquel u otros catalizadores, (3) alta alcalinidad, (4) baja temperatura, (5) ausencia de materia orgánica y (6) son almacenadas en envases cerrados y oscuros.

Factores que afectan la actividad biocida del cloro

La efectividad germicida dependerá de la concentración del ácido hipocloroso no disociado en la solución acuosa y la relación entre pH y el grado de disociación de HOCl (Figura 1.9). Otros factores ambientales, solos o en combinación, determinarán la acción antimicrobiana del cloro.

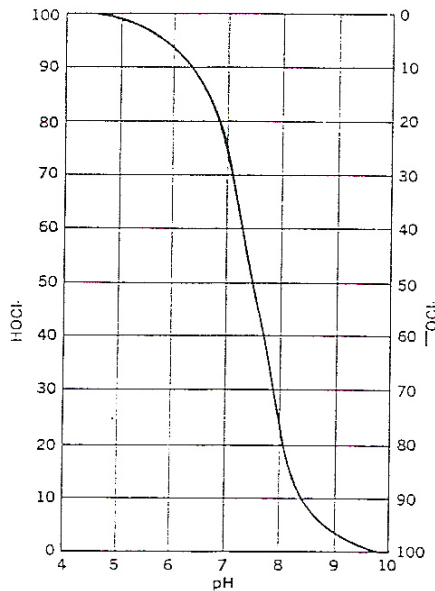


Figura 1.9. Relación entre % HOCl, % OCl⁻ y pH

- Efecto del pH

El pH tiene quizás la mayor influencia sobre la actividad antimicrobiana del cloro en solución. Un aumento en el pH substancialmente disminuye la actividad biocida del cloro y una disminución en el pH aumenta esta actividad.

Johns (1934) mostró esta dependencia del pH sobre la efectividad del hipoclorito. La concentración de HOCl está relacionada con la velocidad de muerte por los hipocloritos en solución.

- Efecto de la concentración

Sería lógico adoptar que un aumento en la concentración de cloro disponible en una solución dará un correspondiente aumento en la actividad antibacteriana. Esta suposición podría ser valedera si otros factores, tales como pH, temperatura y contenido orgánico se mantienen constantes.

- Efecto de la temperatura

Un aumento en la temperatura produce un aumento en la actividad bactericida.

- Efecto del material orgánico

El material orgánico en una solución de cloro consume cloro disponible y reduce su capacidad para la actividad bactericida; esto es evidente especialmente en soluciones con bajo niveles de cloro.

Se ha informado que los hipocloritos son selectivos en su ataque a varios tipos de material orgánico, aunque con respecto a esto hay diferentes opiniones.

- Efecto de la dureza

Componentes de la dureza del agua tales como los iones Mg^{++} y Ca^{++} no manifiestan algún efecto sobre la acción antibacteriana de la solución de hipoclorito.

- Efecto de la adición de amonio o compuestos amino

La actividad bactericida del cloro libre es considerablemente disminuida cuando el cloro se adiciona a agua que contiene amonio o compuestos amino. Parte del cloro reacciona inmediatamente con amonio para formar mono- y di-cloraminas.

Organismos resistentes al cloro

Varios tipos de bacterias, virus, hongos y algas muestran diferente resistencia a hipocloritos bajo diversas condiciones prácticas. Esta selectiva resistencia de organismos al cloro podría ser compensada por un aumento en la concentración, bajo pH o por aumento de la temperatura.

Tonney y col. 1930, en sus estudios con bacterias vegetativas y formadoras de esporos, llegaron a la conclusión que varias cepas de cultivos exhibían diferentes resistencias al cloro. Generalmente, las células vegetativas son menos resistentes al cloro que el grupo formador de esporos, y 0,15 a 0,25 ppm de cloro disponible fue suficiente para destruir el grupo vegetativo dentro de 30 segundos.

Como *E. coli* es más resistente al cloro que otros organismos dentro de las bacterias vegetativas, se seleccionó como el organismo de ensayo para determinar la efectividad de la desinfección por cloro. Los organismos formadores de esporos fueron aproximadamente 10 a 1000 veces más resistentes al cloro que las formas vegetativas.

B. Hipocloritos

Los hipocloritos son los compuestos con cloro activo más antiguos y ampliamente usados en el campo de la desinfección química. Ellos son: (1) poderosos germicidas que controlan un amplio espectro de microorganismos, (2) desodorizantes, (3) no son tóxicos para el hombre a las concentraciones de uso, (4) libres de residuos venenosos, (5) incoloros, (6) de fácil manejo y (7) de uso más económico (Lesser, 1949).

Los hipocloritos son empleados como sanitizantes en la mayor parte de los hospitales, escuelas y edificios públicos. Ellos son ampliamente usados para el control microbiano en restaurantes, y para sanitizar plantas procesadoras de alimentos. Además, los hipocloritos son vendidos para el tratamiento de piletas, agua de bebida y aguas residuales (Block, 1991).

OBJETIVOS

De acuerdo a lo anteriormente expuesto, y teniendo en cuenta que:

- Desde 1982, cuando se conoció el deterioro de jugos de frutas por bacterias ácido dependiente, termotolerantes, formadoras de esporos, miembros del género *Alicyclobacillus* emergieron como los organismos de deterioro de alimentos de mayor significancia en la industria de jugos de frutas.
- El deterioro causado por algunos miembros del género *Alicyclobacillus* se manifiesta por la formación de off-flavors y off-odors debido a productos tales como guayacol y halofenoles.
- Puede ser dificultoso controlar a *Alicyclobacillus* en jugos de frutas ya que sus esporos sobreviven a la temperatura de pasteurización de los mismos y pueden germinar y crecer luego del proceso si las condiciones son favorables.
- Argentina lidera la producción de jugos concentrados en el hemisferio sur y si bien la presencia de *Alicyclobacillus* en jugos y otros alimentos no produce riesgo en la salud humana, ocasiona un alto impacto económico ya que implica el rechazo de estos productos por parte de los principales compradores.
- En Brasil ya se las ha investigado con éxito y se han estudiado métodos para la detección y recuento de bacterias ácido termófilas en jugo de naranja, fuentes de contaminación, determinación de puntos de riesgo en la industria de cítricos, entre otros (Eguchi y col., 1999). Sin embargo, en nuestro país no existen estudios, salvo en la provincia de Río Negro donde se las detectó (datos obtenidos de la industria), pero no se conocen los parámetros de inactivación térmica de contaminantes autóctonos (valores D y z) ni tampoco como reaccionan ante sanitizantes de uso actual.

Se propusieron los siguientes objetivos generales y particulares:

OBJETIVOS GENERALES

1. Estudiar la ocurrencia de *Alicyclobacillus* spp en los jugos de manzana y pera en las diferentes etapas del proceso, en una industria elaboradora de jugos concentrados.
2. Estudiar la ocurrencia de *Alicyclobacillus* spp en el agua usada y producida en el proceso en diferentes sectores de la planta.
3. Estimar los parámetros cinéticos de inactivación térmica, valores D y z, en una cepa de *Alicyclobacillus* (productora de guayacol aislada de la Planta) en jugo de manzana.
4. Evaluar el efecto de sanitizantes de uso industrial sobre esporos de la cepa mencionada en el punto 3. Los sanitizantes a evaluar son hipoclorito de sodio, OXI 5 (ácido peracético, peróxido de hidrógeno), Vortexx (peróxido de hidrógeno, ácido peroxiacético, ácido octanóico) a distintas concentraciones y tiempos.

OBJETIVOS PARTICULARES

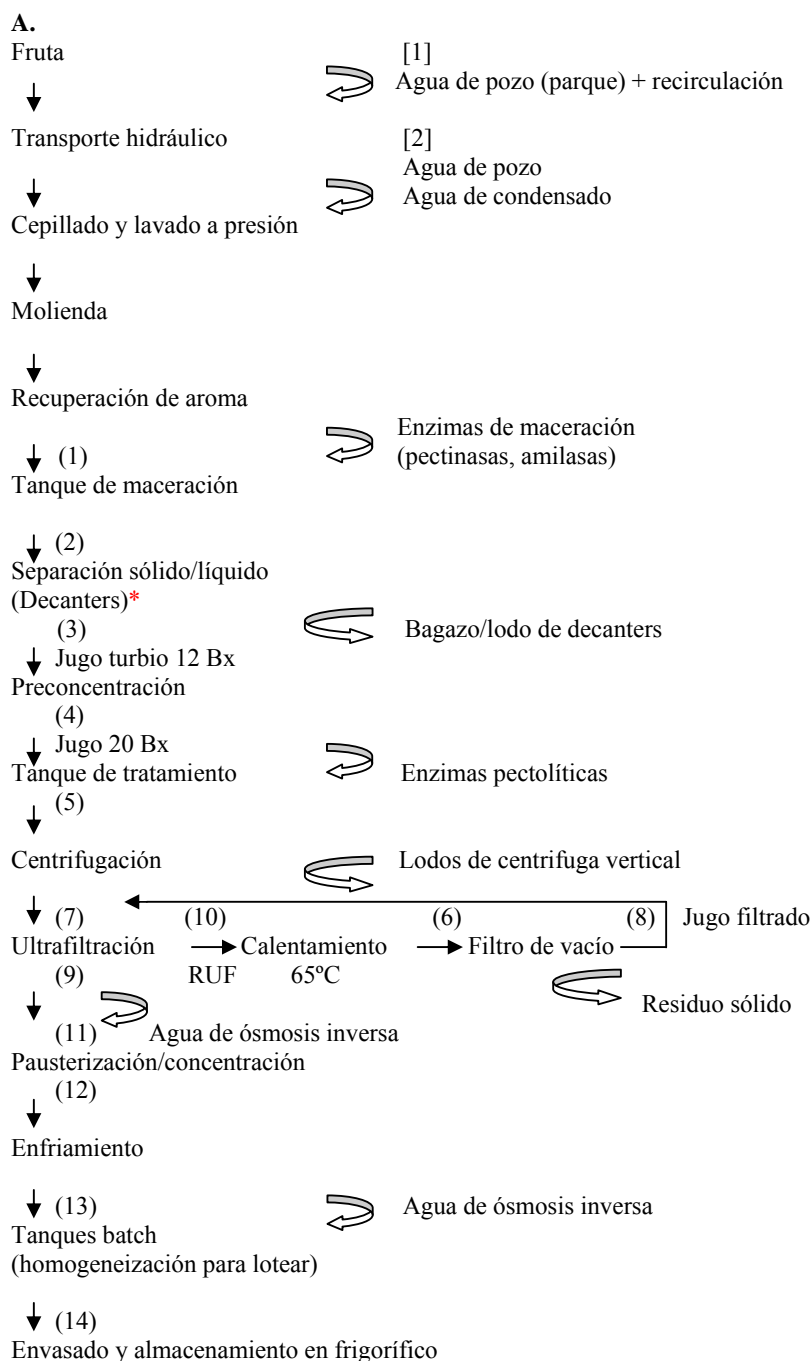
1. Caracterizar las bacterias ácido termófilas formadoras de esporos aisladas de muestras provenientes de la industria teniendo en cuenta sus características macro y microscópicas y mediante pruebas bioquímicas.
2. Poner a punto una metodología para determinar los parámetros de inactivación térmica D y z de esporos de *Alicyclobacillus* en jugo de manzana.

3. Poner a punto una metodología para determinar la reducción en el número de esporos de *Alicyclobacillus* por el efecto de sanitizantes de uso industrial en suspensión acuosa.

MATERIALES Y MÉTODOS

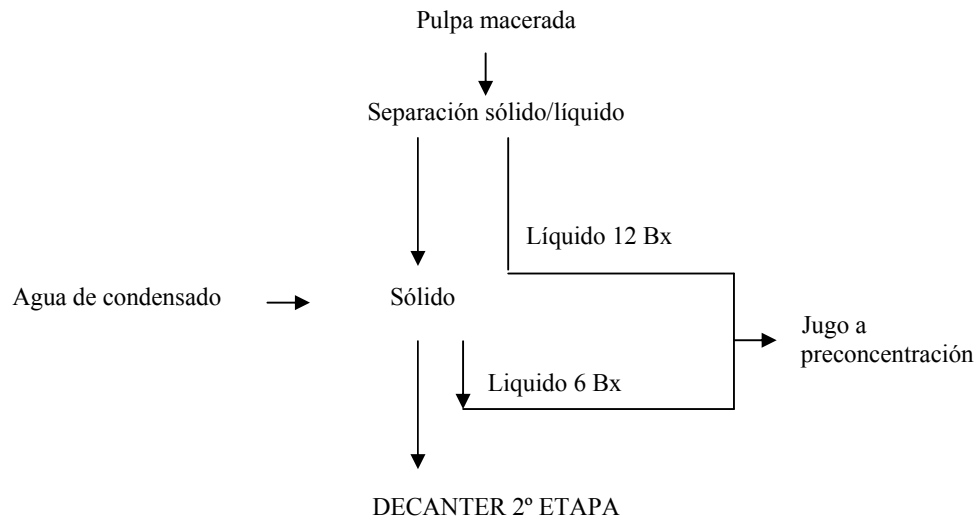
3.1.-DESCRIPCIÓN DEL PROCESO DE ELABORACIÓN DE JUGOS CONCENTRADOS Y PUNTOS DE MUESTREO

A los fines de identificar los puntos de muestreo, se presenta en la Figura 3.1 el proceso de elaboración de jugos concentrados.



B.

* DECANTER 1º ETAPA

**Figura 3.1. A. Proceso de elaboración de jugos concentrados.**

Referencias. RUF: retenido de ultrafiltro; [n]: lugares de toma de muestras de aguas; (n): lugares de toma de muestras de producto intermedio y jugo concentrado.

B. Detalle de la etapa de separación sólido/líquido.

3.2.-TOMA DE MUESTRAS

Los muestreos se realizaron durante las temporadas 2005 y 2006.

Las muestras fueron tomadas en una industria elaboradora de jugos y aromas concentrados de peras y manzanas situada en el Alto Valle de Río Negro y Neuquén (Figura 3.2). Esta Planta atiende con producción propia la demanda interna y externa procesando 200.000 toneladas/año de fruta, lo que representa 30.000 toneladas de jugos concentrados, equivalente al 40% de la producción nacional. El principal destino es la exportación, sobre todo a Estados Unidos de Norteamérica, y en menor medida Canadá, Brasil y países de Europa.

Esta Planta procesa alternativamente peras o manzanas según el momento de la cosecha de las frutas, produciendo en primer término jugo concentrado de pera por ser ésta de cosecha más temprana y menor volumen producido y posteriormente jugo concentrado de manzana cuyo período de elaboración es más extenso.



Figura 3.2. Industria elaboradora de jugos y aromas concentrados de peras y manzanas

El primer muestreo correspondiente al año 2005 se realizó en el mes de marzo y durante el mismo se elaboró jugo concentrado de pera. La fruta que ingresó a la Planta fue toda aquella que no cumplió con las especificaciones para el mercado en fresco, ya sea por tamaño, color, daños (soleada, golpes, rameada, etc.). Las variedades de pera fueron William's, Packhams Triumph, Beurre D' anjou.

El segundo muestreo del año 2005 se llevó a cabo también en el mes de marzo, durante el mismo se elaboró jugo concentrado de manzana. Las variedades de manzanas que ingresaron a la industria, en iguales condiciones que para las peras, fueron Red Delicious, Granny Smith, Royal Gala, Rome, Pink Lady y Fuji.

Durante todo el año 2006 se realizaron controles para detectar la presencia de *Alicyclobacillus* spp. en jugos concentrados de pera y manzana tanto en el tanque batch como en el producto envasado en bins.

Todas las muestras fueron tomadas asépticamente en envases estériles de 130 ml de capacidad y fueron analizadas en forma inmediata al finalizar los muestreos.

3.2.1.-Toma de muestras de productos intermedios y jugos concentrados

En el año 2005 se tomaron muestras de productos intermedios y de jugos concentrados de manzana y pera, de los siguientes sectores según el Flow Sheet del Proceso de Elaboración de Jugos Concentrados:

- (1) Carga tanque de maceración,
- (2) Descarga tanque de maceración,
- (3) Entrada del equipo preconcentrador,
- (4) Salida del equipo preconcentrador,
- (5) Bajada del tanque de tratamiento,
- (6) Entrada filtro de vacío,
- (7) Entrada del ultrafiltro (UF),
- (8) Salida del filtro de vacío,
- (9) Permeado del UF,
- (10) Retenido del UF,
- (11) Entrada del equipo pasteurizador/concentrador,
- (12) Salida del equipo pasteurizador/concentrador.

Posteriormente en el año 2005 de acuerdo a los resultados obtenidos previamente se analizaron los siguientes puntos para realizar recuentos, aislamiento e identificación de *Alicyclobacillus*:

- (8) Salida del filtro de vacío,
- (10) Retenido del UF,
- (11) Entrada del equipo pasteurizador/concentrador,
- (12) Salida del equipo pasteurizador/concentrador,
- (13) Tanque batch,
- (14) Bin de jugo concentrado muestreado al comienzo, media y finalización del envasado.

Asimismo se tomaron muestras de jugos concentrados durante todo el año 2006 para evaluar la incidencia del género *Alicyclobacillus* spp en:

- (13) Tanque batch,
- (14) Bin de jugo concentrado muestreado al comienzo, media y finalización del envasado.

3.2.2.-Toma de muestras de aguas del proceso

Las muestras de aguas de proceso analizadas fueron:

[1] Agua de arrastre de la fruta: es el agua que transporta la fruta desde los lagares hacia el elevador mecánico. Este transporte hidráulico se hace con agua de pozo y de recirculación (20%).

[2] Agua de enjuague de la fruta: es el agua utilizada para lavar la fruta a presión y se realiza con agua de pozo y condensado.

[3] Agua de condensado: es el agua producida durante el proceso de concentración del jugo.

[4] Agua tratada por ósmosis inversa para la limpieza de tanques batch.

[5] Agua de pozo sin tratar.

3.3.-PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS Y RECIENTOS DE BACTERIAS ÁCIDO TERMÓFILAS ESPORULADAS (TAB)

Todas las muestras se sometieron a un shock térmico de $80 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 10 minutos. Este tratamiento permitió inactivar las células vegetativas y activar los esporos para la germinación. Terminado el shock térmico, las muestras se enfriaron en un baño de hielo para alcanzar un descenso rápido de temperatura y se filtraron por membrana usando membranas Millipore de $0,22 \mu\text{m}$. Una vez filtradas, se colocaron las membranas en placas con medio K ($\text{pH } 3,7 \pm 0,1$). Las mismas se invirtieron y colocaron en bolsas plásticas selladas para evitar el secado y se agregó un trozo de algodón embebido con agua estéril a cada bolsa.

La incubación se realizó a 43°C por 72 horas, pero las placas se observaron hasta el 7^{mo} día. Al cabo de dicho lapso, se hicieron los recuentos definitivos de colonias.

Para los recuentos se utilizó un control positivo (testigo) preparado de igual forma que la descrita anteriormente pero inoculado con una cepa de *Alicyclobacillus acidoterrestris* (DSMZ BACT: DSM 2498). La cepa testigo fue cedida por el Centro de Investigación y Asistencia Técnica a la Industria Asociación Civil (CIATI A.C.), asimismo se realizó un control negativo.

Para la determinación de las TAB en las muestras de productos intermedios y aguas de proceso se procedió utilizando la técnica de filtración por membrana de 100 ml de cada una de las mismas tal cual o diluidas con agua buffer estéril. Los recuentos de TAB se realizaron informando UFC/100 ml de muestra.

Para el análisis de los jugos concentrados se tomaron 50 gramos de muestra. Las mismas se diluyeron en 100 ml de agua buffer estéril ($\text{pH } 7,1 \pm 0,1$) y se continuó con el proceso anteriormente descrito. Los recuentos de TAB se realizaron informando UFC/50g de muestra.

3.4.-CONFIRMACIÓN DE AISLADOS DEL GENERO *Alicyclobacillus*

Para la confirmación de la presencia de *Alicyclobacillus* spp. se procedió de la siguiente forma, para cada uno de los muestreos, en los casos que el recuento lo permitió, se tomaron al menos cinco colonias que desarrollaron en el punto 3.3 y se reislaron en placas conteniendo el medio K, incubándolas a 43°C durante 7 días.

Posteriormente de estos aislados se hicieron repiques en placas conteniendo medio Plate Count Agar (pH 7,0) y se incubaron 5 días a 43°C. *Alicyclobacillus* spp. crece en medio K pero no crece en Plate Count Agar incubado en la condiciones antes mencionadas (Walls y Chuyate, 2000).

3.5.-IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES PERTENECIENTES AL GENERO *Alicyclobacillus*

Una vez confirmada la presencia de *Alicyclobacillus* spp., se analizaron características fisiológicas y de cultivo de los aislados de acuerdo con Walls y Chuyate (1998) y Baumgart (1997), para lo cual se analizaron la apariencia macroscópica de las colonias y microscópica de los aislados, asimilación de eritritol, crecimiento en anaerobiosis y crecimiento en 2 y 5% (p/v) de NaCl.

- **Observaciones macroscópicas:** se llevó a cabo prestando especial atención a la forma, tamaño y color de las colonias que crecieron en medio K (pH 3,7 ± 0,1) a 43°C. El tamaño de las colonias depende del medio de cultivo. Las colonias son redondas, blanco crema, traslúcidas a opacas, de 3 a 5 mm de diámetro después de 5 días de crecimiento sobre medio K (pH 3,7), incubado a 35°C (Walls y Chuyate, 1998).

La morfología de las colonias puede diferir levemente dependiendo de la cepa, pero en general las colonias son redondas. Algunos cultivos viejos pueden parecer contaminados, debido a su morfología heterogénea.

El color de las colonias varía del blanco al beige, llegando a ser levemente más oscuras con la edad (Yokota y col., 2007).

- **Observaciones microscópicas:** mediante la coloración de Gram y asimismo se observó la forma de las bacterias y la presencia de esporos.
Las cepas de organismos acidófilos, esporoformadores presentan forma de bastón con presencia de esporos centrales, subterminales o terminales.
La reacción Gram es positiva, con tendencia a Gram variable (Walls y Chuyate, 1998).
- **Asimilación de eritritol:** los aislados se sembraron en placas con medio *Bacillus acidocaldarius* (BAM) suplementado con 10g/L de eritritol y 0,015g/L de azul de bromo fenol como indicador de pH (pH 4,0). Las mismas se incubaron a 46°C como mínimo 3 días y se supervisaron hasta el séptimo día.
Si el agar o las colonias presentan una coloración amarilla o verde, indicará *Alicyclobacillus acidoterrestris* y si el color permanece inalterable (azul), es negativo para *A. acidoterrestris*. Las placas se compararon con una placa testigo sin sembrar.
- **Crecimiento en anaerobiosis:** cada aislado se sembró en medio K (pH 3,7 ± 0,1) y se incubó a 43°C en anaerobiosis como mínimo 3 días. Aunque son estrictos aerobios, estos organismos pueden sobrevivir bajo condiciones microaeróbicas (el crecimiento es inhibido con la ausencia de oxígeno) (Splittstoesser y col., 1994; Wisotzkey y col., 1992; Walls y Chuyate, 1998).
- **Crecimiento en presencia de 2% NaCl:** se sembró cada aislado en medio K suplementado con NaCl y se incubó a 43°C como mínimo 3 días.
- **Crecimiento en presencia de 5% NaCl:** se procedió de igual forma que el punto mencionado previamente. *Alicyclobacillus acidoterrestris* crece en 2% NaCl y no crece en 5% NaCl. *Alicyclobacillus acidocaldarius* crece tanto al 2% como a 5% NaCl (Walls y Chuyate, 1998).

3.6.-PRODUCCIÓN DE GUAYACOL A PARTIR DE AISLADOS DE *Alicyclobacillus acidoterrestris*

En las cepas identificadas como *Alicyclobacillus acidoterrestris* en el Punto 3.5 se analizó la producción de guayacol por el método de la peroxidasa (Niwa, 2003).

Este test se fundamenta en la producción de guayacol a partir de ácido vanílico (precursor del guayacol) a través de un cambio de color en el medio YSG-ácido vanílico luego de una reacción con peroxidasa. Cuatro moléculas de guayacol son convertidas en tetraguayacol (color marrón) en presencia de H₂O₂ y peroxidasa.

3.7.-ENSAYO DE RESISTENCIA TÉRMICA DE ESPOROS DE *Alicyclobacillus acidoterrestris* PRODUCTORA DE GUAYACOL

De las cepas identificadas como *A. acidoterrestris* se seleccionó una buena productora de guayacol para los estudios de resistencia térmica y frente a sanitizantes de uso industrial, caracterizada como EC1.

3.7.1.-Producción de esporos

El procedimiento se realizó según Walls y Chuyate (2000) con ligeras modificaciones. Las células se inocularon en caldo BAM (pH 3,7) y se incubaron a 43°C de 2 a 5 días logrando una excelente turbidez. De la suspensión obtenida se sembró 0,2 ml sobre la superficie de placas de petri conteniendo potato dextrose agar (PDA), pH 3,7. El pH se ajustó con ácido málico. Las placas se incubaron a 43°C, de 5 a 13 días.

El nivel de esporulación se siguió microscópicamente, para tal fin se hicieron preparados y tinción de los mismos con verde de malaquita.

Cuando se alcanzó el nivel de esporulación deseado (85%), se procedió a cosechar los esporos (Orr y Beuchat, 2000). Para tal fin, se agregó 1 ml de agua destilada estéril a cada placa de PDA, y se procedió a raspar la superficie con una espátula de vidrio estéril y la suspensión se recolectó en un tubo de centrifuga estéril. Luego, se centrifugó a 2500 revoluciones por minuto durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 10 ml de agua destilada estéril. Se realizó un segundo lavado centrifugando a 2500 revoluciones por minuto durante 10 minutos. Los esporos se resuspendieron en 50 ml de agua destilada estéril y se conservaron a 4°C hasta su uso.

Para la determinación de la concentración de esporos en el momento de su uso, se tomó 1 ml de la suspensión conservada previa homogenización y se adicionó a 9 ml de agua buffer estéril, y se realizó un shock térmico a $80 \pm 1^\circ\text{C}$ por 10 minutos. A continuación, se enfrió en baño de hielo y se hicieron las diluciones correspondientes en agua buffer estéril para después realizar la siembra directa en placa (por duplicado) conteniendo medio K (pH 3,7).

La incubación de las placas se realizó a 43°C por un lapso de 7 días, a cuyo término se realizó el recuento de colonias, que se expresó como UFC/ml.

3.7.2.-Ensayo de inactivación térmica

Se siguió la metodología propuesta por Block, 1991.

Para cada tratamiento térmico se agregaron 2 ml de jugo de manzana en tubos con tapa a rosca estériles (1,2 cm. de diámetro interno, 8,5 cm. de largo) colocados en baños de vaselina. Las temperaturas estudiadas fueron 88, 90, 92 y 95°C y los ensayos para cada una de estas temperaturas se realizaron por triplicado.

Se trabajó a pH 3,45 y 20° Brix y se usó un tubo igual a los mencionados anteriormente con una termocupla en su interior, como tubo control, ya que al no usar tubos capilares, se supuso que la temperatura no se alcanzaría en forma inmediata.

Cuando el jugo adquirió la temperatura deseada, se agregó 0,1 ml de la suspensión de esporos. Una vez que se alcanzó la temperatura deseada en el baño, se comenzó a tomar desde allí el tiempo de residencia de los tubos, los cuales se dejaron en el baño diferentes períodos de tiempo (Tabla 3.1). Luego de cumplidos dichos períodos, los respectivos tubos se enfriaron rápidamente en un baño de hielo.

Tabla 3.1. Esquema de tiempos – temperaturas utilizadas en el ensayo de resistencia térmica de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* productora de guayacol

Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
88	0 - 11 - 22 - 30
90	0 - 6 - 12,5 - 20
92	0 - 6,5 - 10 - 15
95	0 - 4 - 6 - 8

De cada tubo se realizaron diluciones en agua destilada estéril y luego, se hizo siembra directa en placa.

El medio utilizado y las condiciones de incubación son las mismas que las utilizadas en el punto 3.3 con la diferencia que el seguimiento de las placas se hizo hasta el décimo día.

Cumplido el período de incubación se realizó el recuento de unidades formadoras de colonias promedio, ya que en todos los casos se sembró por duplicado.

3.7.3.-Cálculos y análisis estadístico

Con los datos obtenidos de los supervivientes a los tratamientos térmicos se construyeron gráficas y de ellas se calcularon los parámetros que caracterizan la destrucción de los esporos por el calor: valores D y z. Donde D representa el tiempo de reducción decimal y z es la constante de resistencia térmica.

Se supuso una respuesta lineal correspondiente a una cinética de primer orden.

Las gráficas que se construyeron fueron:

- Logaritmo del número de supervivientes (Log N) vs. tiempo, de la inversa de la pendiente de la misma se obtuvieron los valores del tiempo de reducción decimal (D).
- Logaritmo de D vs. temperatura, de la inversa de la pendiente de la curva de termo destrucción se obtuvo el valor de z.

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa Statgraphics[®] Plus 5.1. El mismo consistió en:

- Regresión lineal para obtener las curvas antes mencionadas y calcular los parámetros de muerte térmica. Análisis de residuos. Modelos alternativos.

Por último, los valores D y z obtenidos se compararon con los correspondientes aislados de referencia hallados en la bibliografía.

3.8.-EVALUACIÓN DE DIFERENTES SANITIZANTES PARA EL CONTROL DE ESPOROS DE *Alicyclobacillus acidoterrestris* PRODUCTORA DE GUAYACOL EN SUSPENSIÓN ACUOSA

Los sanitizantes ensayados fueron:

- Agente químico a base de ácido peracético (5%) y peróxido de hidrógeno (28%). (OXI 5, Suttley, Argentina).
- Agente químico a base de peróxido de hidrogeno (6,9%), ácido peroxiacético (4,4%) y ácido octanóico (3,3%). (Vortexx, ECOLAB).
- Hipoclorito de sodio de uso industrial.

3.8.1.-Producción de esporos

La obtención de los esporos se realizó como se detalla en el punto 3.7.1.

3.8.2.-Ensayo de inactivación

Se evaluaron los sanitizantes de acuerdo a la metodología propuesta por Lee y col., 2004.

Se agregó 1 ml de la suspensión de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* productora de guayacol en 9 ml de sanitizante, se mezcló con vortex y a diferentes tiempos de contacto se tomaron 2 ml de la mezcla, la cual se homogeneizó antes de cada extracción. Las alícuotas extraídas se colocaron en 8 ml de caldo neutralizante D/E (Acumedia, Michigan) ajustado a pH 7,0 con HCl. Luego se realizó un shock térmico de 10 minutos a $80 \pm 1^\circ\text{C}$ con posterior enfriamiento en un baño de hielo para el descenso rápido de temperatura.

En la Tabla 3.2 se mencionan las concentraciones, pH y tiempos ensayados para cada solución sanitizante.

A continuación, se hicieron las diluciones correspondientes en agua destilada estéril y se sembraron cada una por duplicado en K agar ($\text{pH } 3,7 \pm 0,1$) mediante siembra

directa en placa. La incubación se realizó de igual forma al punto 3.3 con la diferencia que el seguimiento de las placas se hizo hasta el décimo día.

Finalizado el período de incubación se realizó el recuento de UFC/ml, eligiendo para realizar el recuento las placas que presentan valores entre 30-300 colonias.

Tabla 3.2. Características de los sanitizantes de ensayo

Sanitizante	Concentración	pH	Tiempo (minutos)
Hipoclorito de sodio	500 ppm cloro activo	9,03	3, 6, 9
Hipoclorito de sodio	1000 ppm cloro activo	9,49	3, 6, 9
OXI 5	0,3% v/v	3,52	5, 10, 15
OXI 5	0,15% v/v	3,67	10, 20, 30
Vortexx	0,2% v/v	3,31	5, 10, 15
Vortexx	0,1% v/v	3,42	10, 20, 30

Los ensayos se realizaron a temperatura ambiente ($26 \pm 2^{\circ}\text{C}$) por triplicado con cada sanitizante y condición evaluada. Paralelamente, en cada ensayo se hizo un control para evaluar la concentración de esporos inicial (UFC/ml, tiempo 0).

3.8.3.-Cálculos y análisis estadístico

Con los datos obtenidos se construyeron gráficas para cada sanitizante y concentración evaluados. Se supuso una respuesta lineal correspondiente a una cinética de primer orden.

Las gráficas que se construyeron fueron:

- Logaritmo del número de supervivientes (Log N) vs. tiempo.

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa Statgraphics[®] Plus 5,1. El mismo consistió en:

- Regresión lineal para obtener las curvas antes mencionadas. Análisis de residuos. Modelos alternativos.
- Análisis de varianza y test de Duncan de comparaciones múltiples para determinar si existen diferencias significativas entre los valores medios en los tratamientos.

Por último las reducciones obtenidas se compararon con los correspondientes aislados de referencia hallados en la bibliografía.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.-RECUENTOS DE BACTERIAS ÁCIDO TERMÓFILAS ESPORULADAS (TAB) EN DISTINTAS ETAPAS DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE JUGOS CONCENTRADOS

Los muestreos realizados en el año 2005, permitieron obtener datos sobre la ocurrencia de TAB en diferentes etapas de los procesos, los cuales se pueden observar en la Tabla 4.1 para jugo concentrado de pera y en la Tabla 4.2 para jugo concentrado de manzana. En las mismas puede observarse la presencia de TAB en la mayoría de las muestras extraídas así como la temperatura y los grados Brix de las mismas. Dichas temperaturas en el momento del muestreo estuvieron comprendidas entre 51 y 67°C, este rango de temperatura es óptimo para el crecimiento de varias especies de *Alicyclobacillus*, ya que las mismas presentan un rango de temperatura óptima de crecimiento que oscila entre 35 a 63°C (Yokota y col., 2007).

Tabla 4.1. Recuento de bacterias acidotermófilas esporuladas (TAB) correspondiente al procesamiento de jugo concentrado de pera

Lugares de muestreo	TAB (UFC/100ml)*	° Brix	Temp. (°C)
(1) Carga tanque maceración	4000	12	53
(2) Descarga tanque maceración	1000	12	52
(3) Entrada preconcentrador	10000	12	53
(4) Salida preconcentrador	2600	20	54
(5) Bajada tanque de tratamiento	1000	20	52
(6) Entrada filtro de vacío	2000	20	67
(7) Entrada ultrafiltro (UF)	Nd	-	53
(8) Salida filtro de vacío	70	-	55
(9) Permeado UF	Nd	20	53
(10) Retenido UF	2500	22	52
(11) Entrada al pasteurizador/concentrador	1	21	52
(12) Salida del pasteurizador/concentrador	2 UFC/50g**	70	-

* Límite de detección 1UFC/100ml

** Límite de detección 1UFC/50g

Nd = no detectado

Si bien los recuentos resultaron de magnitud variable, la presencia de TAB demuestra que están presentes en la planta y representan un riesgo potencial.

En función de los resultados precedentes se decidió realizar nuevamente en el año 2005 seis muestreos sucesivos durante la producción de jugo de manzana – período 27/04/05 al 03/06/05 – en los siguientes lugares: retenido UF, salida del filtro de vacío, entrada y

salida del equipo concentrador, tanque batch y en bins con producto envasado (tanto al comienzo, al promediar y al finalizar el envasado), algunos de estos puntos considerados de riesgo en el proceso de producción.

Tabla 4.2. Recuento de bacterias acidotermófilas esporuladas (TAB) correspondiente al procesamiento de jugo concentrado de manzana

Lugares de muestreo	TAB (UFC/100ml)*	° Brix	Temp. (°C)
(1) Carga tanque maceración	1000	12	53
(2) Descarga tanque maceración	200	12	52
(3) Entrada preconcentrador	3000	12	56
(4) Salida preconcentrador	200	20	-
(5) Bajada tanque de tratamiento	2800	20	51
(6) Entrada filtro de vacío	21000	20	65
(7) Entrada ultrafiltro (UF)	Nd	20	52
(8) Salida filtro de vacío	100	-	55
(9) Permeado UF	Nd	-	52
(10) Retenido UF	4000	-	53
(11) Entrada al pasteurizador/concentrador	4	20	57
(12) Salida del pasteurizador/concentrador	Nd**	70	-

* Límite de detección 1UFC/100 ml

** Límite de detección 1UFC/50g

Nd = no detectado

La etapa de ultrafiltración es una verdadera barrera microbiológica entre el jugo turbio y el jugo clarificado, ya que la filtración por membrana es a nivel molecular, reteniendo moléculas de peso mayores de 100.000 dalton, este valor en longitud corresponde a 0,05 micrones. El retenido de la etapa de ultrafiltración es el que fue muestreado y está concentrado unas 10 veces en el contenido de TAB que trae el jugo turbio debido a la concentración sufrida.

La salida del filtro de vacío, que es el equipo que se encarga de filtrar todo este retenido, fue otro de los puntos muestreados; por otro lado, es el equipo más abierto que tiene la planta, en donde el jugo toma contacto íntimo con el aire del ambiente. Este jugo filtrado es la corriente más contaminada con TAB que retorna al UF. En este reciclo, previo al filtrado, el jugo se calienta a unos 65°C para mejorar la velocidad de filtrado, pero a la vez podría generar termo resistencia.

La entrada al concentrador es un punto de control de la higiene de las cañerías y tanques pulmones previo a la pasteurización. Es un indicador de la operación de los CIP de los UF y las cañerías asociadas (zona limpia de la planta).

La salida del concentrador es un indicador de la acción de la pasteurización. La toma de muestra del tanque batch, es la más representativa ya que presenta la ventaja de integrar todo el tiempo de elaboración de un lote, mientras que el resto de las muestras obtenidas son sólo puntuales. Por lo que el tanque batch es la unidad básica de control de producto terminado. El producto envasado en los bins también integra el control de la cañería de envasado y el envase así como la posible contaminación pos pasteurización. Se hace al comienzo, al promediar y finalizar el envasado.

Los datos derivados de estos muestreos se presentan en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3. Recuentos de TAB en muestras de la planta procesadora de jugo concentrado de manzana, período 27/04/05 – 03/06/05

Lugares de muestreo	TAB (UFC) ¹
(8) Salida filtro de vacío	33,7*
(10) Retenido UF	3400*
(11) Entrada al pasteurizador/concentrador	2,29*
(12) Salida del pasteurizador/concentrador**	Nd
(13) Tanque batch JCM**	Nd
(14) Bin 1 JCM**	Nd
(14) Bin 30 JCM**	Nd
(14) Bin 96 JCM**	Nd

⁽¹⁾ Los valores corresponden a la Media Geométrica de seis determinaciones realizadas durante el período de producción

Nd: no detectado * Límite de detección 1 UFC/100ml ** Límite de detección 1UFC/50g

JCM: jugo concentrado de manzana

De los datos presentados en la Tabla 4.3, se observa que las muestras extraídas de retenido UF, salida del filtro de vacío y en los jugos antes de la etapa de concentración (entrada al equipo concentrador) resultaron contaminadas. A partir de estos muestreos, se realizó el aislamiento y confirmación de la presencia de *Alicyclobacillus* spp en aquellas muestras donde se detectó la presencia de TAB.

El proceso de ultrafiltración es el elemento central para eliminar células vegetativas y esporos bacterianos. Por especificaciones comerciales, el permeado tiene que estar libre de *A. acidoterrestris*. Los esporos de *A. acidoterrestris* tienen una dimensión típica de $0,6 \times 2,9 \mu\text{m}$ por lo que son retenidos por la membrana. Esto concuerda con los resultados presentados en las Tablas 4.1 y 4.2 en las cuales no se detectaron TAB luego de este proceso. Sin embargo, los fabricantes de membranas usualmente no garantizan la ausencia de *A. acidoterrestris*, ya que carecen de control sobre el proceso y, además,

las membranas UF se pueden dañar y posiblemente no retener en forma apropiada. Este daño se puede deber a excesiva abrasión (baja calidad del carbón activado, bentonita, etc.) o por el uso de las mismas por un período de tiempo mayor al garantizado por los fabricantes. Las membranas dañadas podrían producir un jugo clarificado aceptable desde el punto de vista químico (con valores que cumplan con Unidades de Turbidez menores de 2), pero esto plantearía un riesgo elevado de contaminación microbiana.

En la Planta procesadora el jugo filtrado al vacío es nuevamente ultrafiltrado a diferencia de otras industrias donde para optimizar la producción pasan el retenido a través de un filtro de vacío rotatorio y adicionan este filtrado al jugo ultrafiltrado, por lo tanto, si el retenido contiene *A. acidoterrestris*, el jugo de estas industrias estará también contaminado (Schauwecker y Sommer, 2005).

De los resultados mostrados en la Tabla 4.3 puede también observarse que durante estos muestreos no se detectaron TAB en la salida del equipo concentrador, tanque batch y en los bins conteniendo el producto final, lo cual confirma que el proceso de ultrafiltrado conjuntamente con la pasteurización/concentración del jugo los ha eliminado (127°C – 30 segundos).

Durante el año 2006, de un total de 267 lotes de jugos concentrados analizados, se detectó la presencia de *Alicyclobacillus* spp en 2 lotes de jugo concentrado de pera y 7 lotes de jugo concentrado de manzana. Cabe aclarar que cada lote de jugo concentrado consta de 96-97 bins y se muestrea tanque batch y bins N°1, N°30 y N°96 o 97. Los datos se muestran en el Punto 4.4. Estos datos concuerdan con reportes donde se menciona que el deterioro es más frecuente en jugos de manzana, si bien se da en otros jugos y productos alimenticios (Walls y Chuyate, 1998).

Los datos de una encuesta presentada por Howard (2005) sobre la presencia de *Alicyclobacillus* proporcionó la siguiente información: de un total de 68 encuestados (envasadores de jugos, productores de jugos o jugos concentrados, productores y envasadores, productores de enlatados), el 45% de los mismos detectaron la presencia de *Alicyclobacillus* en los últimos 3 años, siendo la manzana la materia prima más implicada.

Pettipher y col. (1997) mostraron que *A. acidoterrestris* está presente en jugos concentrados. Sin embargo, este microorganismo no se encontró en un rango de productos comerciales UHT (UK), pero fue aislado de cuatro baches de jugo de

manzana (USA). *Alicyclobacillus acidoterrestris* está presente en jugos de fruta y concentrados y es capaz de sobrevivir a la pasteurización. Cabe señalar que los tratamientos térmicos a los que se sometían estos productos en 1997 eran menos drásticos que los que se usan en la actualidad.

4.2.-RECUENTOS DE BACTERIAS ACIDOTERMÓFILAS (TAB) EN MUESTRAS DE AGUAS DE PROCESO

Durante el año 2005 se hicieron 3 muestreos, donde se analizaron muestras de cinco lugares de la fábrica. Las muestras de aguas y los recuentos se presentan en la Tabla 4.4. Los datos obtenidos muestran la presencia de TAB en las aguas analizadas excepto en aguas de parque proveniente de pozo no tratado y la de ósmosis inversa, los mismos reflejan que las aguas en la Planta son una fuente de contaminación ya que son utilizadas en diferentes etapas del proceso productivo.

Los resultados obtenidos coinciden con datos aportados por Schauwecker y Sommer (2005), de la experiencia en la elaboración de jugo concentrado de manzana, donde se menciona que el agua condensada ha sido contaminada por *Alicyclobacillus acidoterrestris* y luego al ser utilizada como agua de enjuague se convirtió en fuente de infecciones posteriores. Asimismo Eguchi y col. (1999) detectaron la presencia de *Alicyclobacillus* en aguas del proceso de elaboración de jugo de naranja.

Por otra parte Groenewald y col. (2009), han aislado especies de *Alicyclobacillus* a partir de muestras del suelo de huertas, suelo del local de procesamiento de la fruta, agua de lavado, piel de peras de la prensa, agua del evaporador de entrada y concentrado de pera.

La calidad de las diferentes aguas utilizadas representa un riesgo en la Planta estudiada, por lo cual sería conveniente realizar algún tratamiento a las mismas, ya que representan un foco de contaminación en la línea de producción de jugos concentrados.

Tabla 4.4. Recuentos y detección de bacterias acidotermófilas (TAB) en muestras de aguas. Periodo 23/05/05 – 07/09/05

Muestras	TAB ¹ (UFC/100ml)
[1] Agua de arrastre de la fruta	100*
[2] Agua de enjuague de la fruta	35*
[3] Agua de condensado	174*
[4] Agua tratada por ósmosis inversa	Nd
[5] Agua de parque (pozo)	Nd

¹Los valores corresponden a la Media Geométrica de tres determinaciones
Nd: no detectado *Límite de detección 1 UFC/100ml

4.3.-CARACTERIZACIÓN DE LOS AISLADOS DE *Alicyclobacillus*

4.3.1.-Caracterización morfológica y fisiológica

Los muestreos realizados en el estudio del año 2005 permitieron obtener aislados de TAB, los cuales para confirmar la presencia de *Alicyclobacillus* spp se sembraron en el medio PCA (pH 7,0) donde no desarrollan.

Durante el estudio, se aislaron solamente 14 cepas de *Alicyclobacillus* spp., 9 provenientes del procesamiento de jugos y 5 de aguas de proceso. Todas las cepas se sembraron y subcultivaron para obtener cultivos puros y se caracterizaron en relación a la morfología de las colonias y células, así como las características fisiológicas de las mismas.

Los aislados presentaron prueba de Gram variable. Esto concuerda con la descripción dada por Yokota y col. (2007), donde menciona que las células son Gram positiva al comienzo del cultivo y se convierten en Gram negativa o variable al final del mismo.

Todos los aislados fueron organismos con forma de bastón, esporulados y presentaron una morfología de colonia similar a una cepa de referencia de *Alicyclobacillus acidoterrestris* (Figura 4.1). Las colonias resultaron redondas, blancas amarillentas, cremosas de 2 a 4 mm de diámetro después de 5 días de crecimiento sobre medio K (pH $3,7 \pm 0,1$) incubadas a 43°C. El color de las colonias se tornó más oscuro con la edad del cultivo. Estas características coinciden con datos publicados (Walls y Chuyate, 1998).

Se observó que todas las cepas crecieron a 43°C, no crecieron en anaerobiosis y formaron ácido de eritritol a 46°C.

Los aislados desarrollaron en medio con NaCl al 2%, pero no se observó desarrollo en NaCl al 5%.

Las características de los 14 aislados estudiados coinciden con las de *Alicyclobacillus acidoterrestris* halladas en la literatura (Walls y Chuyate, 1998). Por otra parte, *Alicyclobacillus acidoterrestris* es la única especie de *Alicyclobacillus* que asimila eritritol con producción de ácido (Baumgart, 1997).

Los resultados se informan en la Tabla 4.5.



Figura 4.1. Morfología de las colonias de *A. acidoterrestris* en medio K (43°C, 5 días)

Estos resultados coinciden con Howard (2005) en una encuesta realizada a envasadores de jugos, productores de jugos/concentrados, envasadores/productores sobre *Alicyclobacillus*, donde entre quienes contestaron haber tenido contaminación con el microorganismo en los últimos tres años, informan que la materia prima mayormente involucrada fue la manzana y *A. acidoterrestris* fue el más frecuente.

De las actualmente diecisiete especies reconocidas de *Alicyclobacillus*, tres han sido aisladas de productos de jugos vegetales y fruta deteriorada, *Alicyclobacillus acidoterrestris*, *Alicyclobacillus acidocaldarius* y *Alicyclobacillus pomorum* (Goto y col., 2003; Jensen y Whitfield, 2003; Gouws y col., 2005).

La industria juguera cuando detecta esporos de bacterias acidotermófilas (TAB) en los jugos concentrados, solo confirma la presencia de *Alicyclobacillus* spp., ya que las especificaciones de los compradores son exigentes al respecto, exigiendo ensayo negativo en 10 g de jugo concentrado de pera o manzana.

4.3.2.-Producción de guayacol en aislados de *Alicyclobacillus acidoterrestris*

Se utilizó el método de la peroxidasa para determinar la capacidad de producir guayacol en los aislados de *A. acidoterrestris*, presentando distinta intensidad en el desarrollo del color como puede observarse en la Tabla 4.5. Estos hallazgos concuerdan con la bibliografía, ya que los aislados analizados en el presente estudio correspondieron a *A. acidoterrestris* y este organismo figura como productor de guayacol.

Tabla 4.5. Caracterización de cepas de *Alicyclobacillus* a partir de las bacterias acidotermófilas esporuladas aisladas

Nº aislado	Cepa	Gram	Eritritol	Anaerobiosis	NaCl 2%	NaCl 5%	Guayacol*
1	Ret1	v	+	-	+	-	++
2	SFV1	v	+	-	+	-	+
3	EC1	v	+	-	+	-	+++
4	Ret2	v	+	-	+	-	+
5	SFV2	v	+	-	+	-	++
6	Ret3	v	+	-	+	-	++
7	EC2	v	+	-	+	-	++
8	Ret4	v	+	-	+	-	+++
9	EC3	v	+	-	+	-	++
10	AgAr	v	+	-	+	-	++
11	AgCo1	v	+	-	+	-	+
12	AgCo2	v	+	-	+	-	+++
13	AgCo3	v	+	-	+	-	+
14	AgCo4	v	+	-	+	-	++

SFV: salida del filtro de vacío, EC: entrada al concentrador, Ret: retenido, AgAr: agua de arrastre, AgCo: agua de condensado

* +, tenue; ++, medio; +++, intenso

Pettipher y col. (1997), han demostrado que *A. acidoterrestris* es capaz de crecer a 25, 35 y 44°C (pero no a 4°C), y producir altos niveles de guayacol a las tres temperaturas mencionadas en jugo de naranja, manzana y en bebida no carbonatada que contiene jugo de fruta. El nivel de guayacol detectado por estos autores fue superior a 100 ppb y se requirió 1×10^5 células ml^{-1} antes que *A. acidoterrestris* produzca suficiente guayacol para que en los productos se detecte el olor característico.

4.4.-CONTROL DE PRODUCTO FINAL DURANTE EL AÑO 2006

Para el control de producto final realizado durante el año 2006, los datos hallados muestran que los recuentos de *Alicyclobacillus* spp fueron bajos, cabe acotar que a principio de temporada cuando se usó fruta fresca los recuentos fueron inferiores a cuando a fines de temporada se utilizó fruta conservada en frigorífico.

Los recuentos de *Alicyclobacillus* spp hallados en el producto final fueron de 2 a 3 UFC en 50 g de jugo concentrado de pera y de 1 a 4 UFC en 50 g de jugo concentrado de manzana, originando su sola presencia un alto impacto económico debido al rechazo de los lotes por parte de los compradores.

Tabla 4.6. Muestras de lotes de jugo concentrado con presencia de *Alicyclobacillus* spp. en UFC/50 g durante el año 2006

Muestra	Lugar muestreo	Fecha siembra	Rcto. 3° día	Rcto. 5° día
JCPera	Batch	24/02/06	Nd*	Nd
JCPera	Bin N° 97	24/02/06	Nd	2
JCPera	Bin N° 30	24/02/06	Nd	Nd
JCPera	Bin N° 1	24/02/06	Nd	Nd
JCManz	Batch	24/03/06	Nd	1
JCManz	Bin N° 97	24/03/06	Nd	Nd
JCManz	Bin N° 30	24/03/06	Nd	Nd
JCManz	Bin N° 1	24/03/06	Nd	Nd
JCManz	Batch	25/03/06	Nd	1
JCManz	Bin N° 96	25/03/06	Nd	1
JCManz	Bin N° 30	25/03/06	Nd	Nd
JCManz	Bin N° 1	25/03/06	Nd	Nd
JCManz	Batch	09/06/06	Nd	Nd
JCManz	Bin N° 97	09/06/06	Nd	Nd
JCManz	Bin N° 30	09/06/06	Nd	4
JCManz	Bin N° 1	09/06/06	Nd	Nd
JCManz	Batch	26/06/06	Nd	Nd
JCManz	Bin N° 97	26/06/06	Nd	Nd
JCManz	Bin N° 30	26/06/06	Nd	1
JCManz	Bin N° 1	26/06/06	Nd	1
JCManz	Batch	26/06/06	Nd	Nd
JCManz	Bin N° 96	26/06/06	Nd	3
JCManz	Bin N° 30	26/06/06	Nd	Nd
JCManz	Bin N° 1	26/06/06	Nd	Nd
JCManz	Batch	29/06/06	Nd	Nd
JCManz	Bin N° 96	29/06/06	Nd	Nd
JCManz	Bin N° 30	29/06/06	Nd	Nd
JCManz	Bin N° 1	29/06/06	Nd	1
JCPera	Batch	02/10/06	2	2
JCPera	Bin N° 97	02/10/06	3	3
JCPera	Bin N° 30	02/10/06	2	3
JCPera	Bin N° 1	02/10/06	Nd	3
JCManz	Batch	23/12/06	2	2

Nd: no detectado. Límite de detección 1UFC/50 g

De cada lote de JC (96 o 97 bins) se muestrea batch y bin 1, 30 y 96 o 97

Total de lotes analizados: 267

4.5.-ESTUDIO DE INACTIVACIÓN TÉRMICA EN ESPOROS DE LA CEPA DE *Alicyclobacillus acidoterrestris* EC1 BUENA PRODUCTORA DE GUAYACOL

Se realizó el estudio de inactivación térmica sobre esporos de una cepa de *Alicyclobacillus acidoterrestris* EC1 buena productora de guayacol obtenida a partir de jugo de manzana antes del ingreso a la etapa de concentración.

Se eligió hacer el ensayo con jugo de manzana a 20°Bx y pH 3,45, parámetros que presenta el jugo a su ingreso a la etapa de pasteurización/concentración. Las temperaturas de los ensayos fueron: 88, 90, 92 y 95°C. El número de supervivientes a las temperaturas mencionadas a cada tiempo de ensayo se muestran en el Anexo C.

4.5.1.-Determinación del parámetro D

Las curvas de sobrevivientes de *A. acidoterrestris* EC1 buena productora de guayacol fueron lineales a todas las temperaturas de ensayo y se muestran en las Figuras 4.2 a 4.5. Si el valor del estadístico R^2 (adecuación al modelo) de la curva de inactivación térmica fue mayor a 0,90, esta puede ser considerada lineal (Byrne y col., 2006). En este estudio, los valores obtenidos fueron superiores a este valor por lo que se trabajó en una región lineal.

Los valores D obtenidos en los ensayos realizados por triplicado a cada temperatura se muestran en la Tabla 4.7. Los coeficientes de correlación fueron en todos los casos superiores a 0,95.

Tabla 4.7. Valores D de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* EC1 buena productora de guayacol en jugo de manzana de 20°Bx y pH 3,45

Temp. (°C)	Valor D (min.)	Intervalo confianza D (min.)
88	15,63	(14,19 - 17,38)
90	9,21	(8,50 - 10,06)
92	6,23	(5,82 - 6,70)
95	3,5	(3,2 - 3,8)

Figura 4.2. Curva de sobrevivientes de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* EC1 buena productora de guayacol a 88°C. Coef. correlación = - 0,952 y $R^2 = 90,751\%$

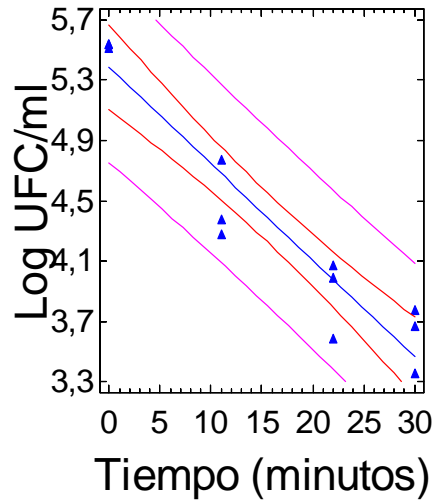


Figura 4.3. Curva de sobrevivientes de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* EC1 buena productora de guayacol a 90°C. Coef. correlación = - 0,966 y $R^2 = 93,410\%$

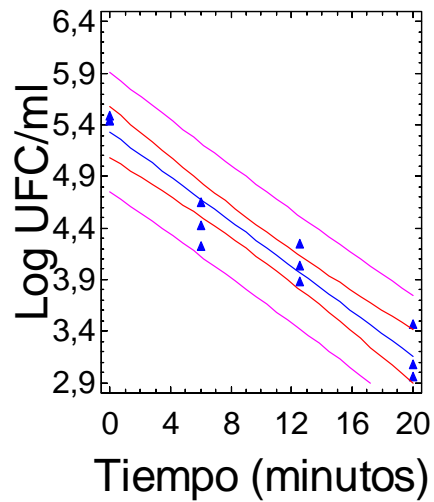


Figura 4.4. Curva de sobrevivientes de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* EC1 buena productora de guayacol a 92°C. Coef. correlación = - 0,976 y $R^2 = 95,291\%$

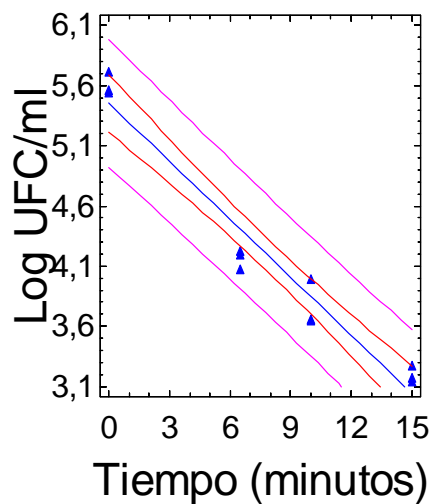
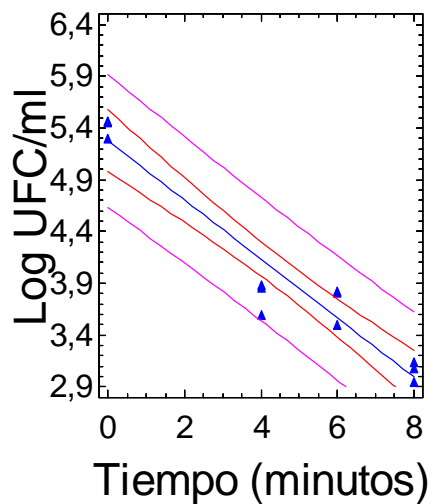


Figura 4.5. Curva de sobrevivientes de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* EC1 buena productora de guayacol a 95°C. Coef. correlación = - 0,963 y $R^2 = 92,831\%$

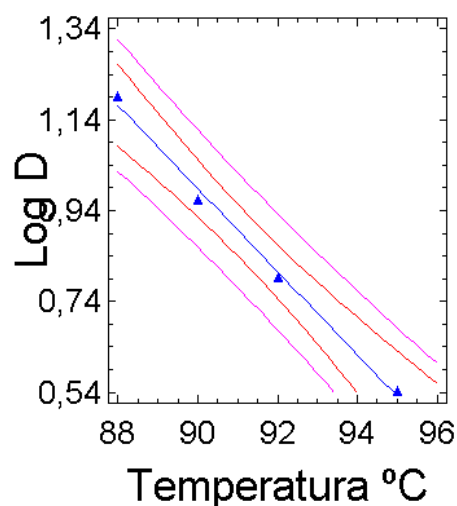


4.5.2.-Determinación de z

La Figura 4.6 muestra la curva Log D (min.) vs. T (°C) de donde se obtuvo el valor del parámetro **z**.

El valor **z** calculado sobre el rango de temperaturas de ensayo fue de 10,9°C y el coeficiente de correlación - 0,996. El intervalo de confianza para **z** es 10,3 – 11,5°C.

Figura 4.6. Curva de tiempos de reducción decimal de esporos de la cepa *Alicyclobacillus acidoterrestris* EC1 buena productora de guayacol en jugo de manzana a pH 3,45 y 20°Bx. Coef. correlación = - 0,996 y $R^2 = 99,38\%$



No se hallaron datos de los parámetros de resistencia térmica en la bibliografía para jugo de manzana a 20 °Bx, no obstante el valor de **z** obtenido se encuentra comprendido entre los hallados en la bibliografía en condiciones similares a las de este estudio (Tabla 4.8).

Varios estudios evaluaron el efecto de los sólidos solubles sobre la resistencia térmica de esporos de *Alicyclobacillus* en diversos medios, mostrando que con el incremento en el contenido de los mismos, aumenta la resistencia al calor (Yokota y col., 2007).

En la Tabla 4.8 se muestran los valores D y **z** hallados en la bibliografía para esporos de *A. acidoterrestris* en distintos medios de calentamiento. Como puede observarse, los

valores D obtenidos en este estudio a 90 y 95°C son más altos a los obtenidos con la cepa Z (CRA 7182) en jugo de manzana a pH 3,5 a las mismas temperaturas.

Tabla 4.8. Recopilación de valores de resistencia térmica de esporos de *A. acidoterrestris*

Medio de calentamiento	Cepa	pH	°Brix	Temp (°C)	Valor D (min.)	Desv. est.	Valor z (°C)
Jugo de manzana	VF	3,5	11,4	85	56	14	7,7 Splittstoesser et al. (1994)
				90	23	7,5	
				95	2,8	0,7	
Jugo de manzana	Z (CRA 7182)	3,5	nr	90	7,38	0,85	12,2
				95	2,30	0,03	
				80	54,3	0,4	
Jugo de manzana clarificado		3,8	11,2	95	2,2-3,3		6,4-7,5 Previdi y col. (1997)
Jugo de uva	WAC	3,3	15,8	90	16	4,1	7,2 Splittstoesser et al. (1994)
				95	2,4	0,9	
Jugo de naranja	nr	4,1	5,3	95	5,3	nr	9,5 Baumgart, Husemann, Schmidt (1997)
Jugo de naranja	Z	3,9	nr	90	10,3	0,3	12,9 Komitopoulou y col. (1999)
				95	3,59	0,04	

nr = no reportado

Sin embargo, los valores D y z hallados en bibliografía difieren entre los distintos investigadores, ya que la resistencia térmica en esporos de *Alicyclobacillus* se ve afectada por la cepa, la composición del medio de esporulación, temperatura de formación de la endospora, pH y °Brix del medio de calentamiento entre otros factores. Bahceci y Acar (2007) determinaron valores D en esporos de *A. acidoterrestris* entre 11,1 minutos a 90°C y 0,7 minutos a 100°C en jugo de manzana (pH 3,68). El valor de z hallado fue de 8,5°C.

Eiroa y col. (1999) investigaron la resistencia térmica de esporos de *Alicyclobacillus* spp. aislados de jugo de naranja concentrado (cepas N° 46, 70 y 145) y ensayadas en jugo de naranja, siendo los valores D, respectivamente, $D_{85^{\circ}\text{C}} = 60,8 - 94,5$ minutos, $D_{90^{\circ}\text{C}} = 10 - 20,6$ minutos y $D_{95^{\circ}\text{C}} = 2,5 - 8,7$ minutos. El rango para el valor z fue de $7,2 - 11,3^{\circ}\text{C}$.

Palop y col. (2000) informaron que un incremento en 20°C en la temperatura de esporulación (de 45 a 65°C) incrementó la resistencia térmica de *A. acidocaldarius* ($D_{110^{\circ}\text{C}} = 0,48$ min. a 45°C y $3,9$ min. a 65°C). Estos resultados concuerdan con los hallados por otros autores para *A. acidoterrestris*, donde la resistencia al calor fue baja en esporos formados a temperaturas menores (Yokota y col., 2007).

A. acidoterrestris tiene una membrana celular única que contiene ácidos grasos ω -ciclohexílicos. Diferentes investigadores sugieren que estos ácidos están asociados con la excepcional resistencia de *A. acidoterrestris* en condiciones ácida y temperaturas altas. Wisotzkey y col., 1992 propusieron que esta propiedad suministra una ventaja cuando los cultivos están creciendo a temperaturas altas o pH bajo. Los ácidos grasos ω -alicíclicos pueden formar una capa de protección para la membrana celular y contribuir a la resistencia de esta bacteria en condiciones ácidas y temperaturas altas (Chang y Kang, 2004).

4.6.-EVALUACIÓN DE DIFERENTES SANITIZANTES PARA LA INACTIVACIÓN DE ESPOROS DE LA CEPA *Alicyclobacillus acidoterrestris* EC1 BUENA PRODUCTORA DE GUAYACOL

Se evaluó el efecto de tres sanitizantes de uso industrial sobre esporos de la cepa *Alicyclobacillus acidoterrestris* EC1 buena productora de guayacol.

4.6.1.-Evaluación del sanitizante OXI 5

Se estudiaron dos concentraciones diferentes: 0,15 y 0,30 %, que figuran dentro del rango de uso recomendado por el fabricante. OXI 5 es un agente químico a base de ácido peracético (5%) y peróxido de hidrógeno (28%).

En la Tabla 4.9 se muestran los valores de pH de las soluciones de OXI 5 de acuerdo a las concentraciones estudiadas, asimismo se presentan las poblaciones de esporos de *A. acidoterrestris* EC1 sobrevivientes al tratamiento con OXI 5 a tres intervalos de tiempo estudiados que se encuentran en el rango utilizado a nivel industrial.

Para neutralizar la acción del desinfectante luego de finalizados los ensayos a los distintos tiempos de contacto, se usó el caldo neutralizante D/E (Anexo A). Este caldo resultó adecuado en inhibir la acción de los tres sanitizantes evaluados en el presente estudio, ya que el recuento de esporos de *A. acidoterrestris* EC1 no se modificó luego del agregado simultaneo de sanitizante y caldo neutralizante con respecto al cultivo control (sin tratamiento) en ensayos realizados para probar si efectivamente el caldo neutralizante cumplía su función (datos no mostrados).

Después del tratamiento con OXI 5 (0,15%), las reducciones en log UFC/ml fueron significativamente diferentes con respecto al control (tiempo 0) a un nivel de confianza del 95,0% ($P < 0,05$).

Asimismo, cuando los esporos se trataron con OXI 5 (0,30%), las reducciones en log UFC/ml fueron significativamente diferentes al control (tiempo 0) a un nivel de confianza de 95,0%.

De los resultados expuestos puede observarse que con el tratamiento OXI 5 0,15% al cabo de 30 minutos la población de esporos de *A. acidoterrestris* EC1 se redujo en 2,24

log., similar resultado se obtuvo cuando los esporos fueron tratados con OXI 5 0,30% en la mitad de tiempo. A esta concentración la población de esporos se redujo en 2,31 log.

Tabla 4.9. Poblaciones (log UFC/ml)¹ de esporos de *A. acidoterrestris* EC1 sobrevivientes al tratamiento con OXI 5 a intervalos de tiempo diferentes²

Conc. OXI 5	pH	Tiempo de tratamiento (minutos)					
		0	5	10	15	20	30
0,15%	3,67	5,54 ±	–	4,54 ±	–	3,98 ±	3,30 ±
		0,067 ^{3A}		0,094 ^B		0,16 ^C	0,32 ^D
0,30%	3,52	5,48 ±	4,27 ±	3,46 ±	3,17 ±	–	–
		0,063 ^A	0,080 ^B	0,12 ^C	0,21 ^D		

¹ Los datos representan los valores promedio ± desvío estándar de tres tratamientos

² Los tratamientos se realizaron a temperatura ambiente 26 ± 2°C

³ Los valores medios con diferente letra muestran diferencias significativas a un nivel de confianza de 95,0%

Las Figuras 4.7 y 4.8 muestran las curvas de esporos sobrevivientes de *A. acidoterrestris* EC1 tratados con OXI 5 a las concentraciones de ensayo, 0,15% y 0,30%.

Block (1991) recopiló la actividad letal del cloro, dióxido de cloro, H₂O₂ y ácido peracético en esporos de otros géneros bacterianos. Respecto a la acción esporicida del ácido peracético los resultados presentados son variables respecto de la cepa, concentración del ácido peracético y el tiempo de exposición.

En el presente estudio, el tratamiento con OXI 5 (0,30%) por 10 minutos redujo la población de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* EC1 en 2,02 log, presentando un efecto similar al tratamiento de esporos de *A. acidoterrestris* con ClO₂ (120 ppm) durante 0,5 minutos (Lee y col., 2004).

Orr y Beuchat (2000) obtuvieron reducciones de 2,2, 0,4 y 0,1 log. en el número de esporos viables de *A. acidoterrestris* cuando fueron suspendidos en 200 ppm de cloro, 500 ppm de clorito de sodio acidificado o soluciones de H₂O₂ (0,2%), respectivamente, por 10 minutos a 23°C. Con tratamientos de H₂O₂ (4%) redujo el número de esporos por más de 5 log. Sin embargo, el sanitizante Tsunami, el cual contiene ácido peracético como componente activo resultó ineficiente a las concentraciones ensayadas (0, 40, 80 y 160 ppm; pH = 3,7 ± 0,2) durante 10 minutos a 23°C. Por otra parte,

estudiaron los medios K (pH 3,7), OSA (orange serum agar, pH 5,0) y PDA (potato dextrose agar, pH 3,5), resultando el medio K el mejor para el desarrollo de las colonias de esporos de *A. acidoterrestris* tratados químicamente.

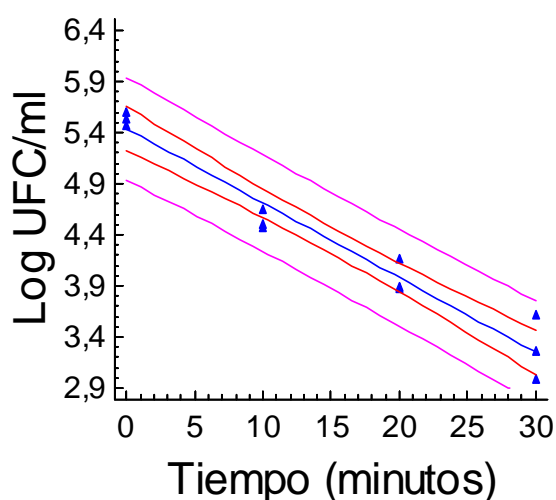


Figura 4.7. Curva de sobrevivientes de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* EC1 tratados con OXI 5 0,15%. R² 95,11%

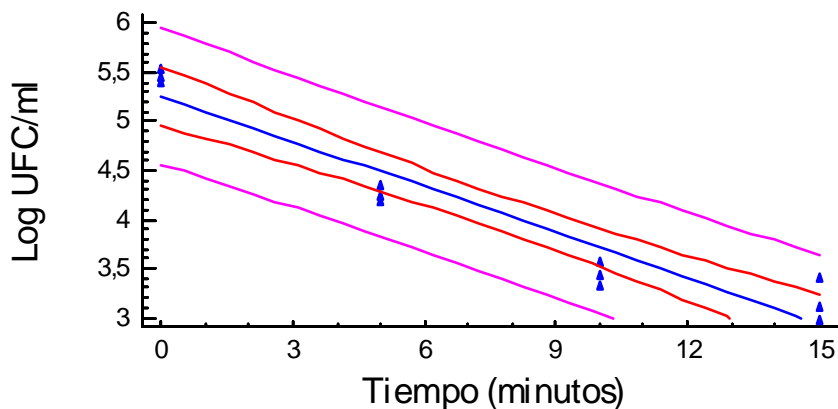


Figura 4.8. Curva de sobrevivientes de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* EC1 tratados con OXI 5 0,3%. R² 91,88%

La Empresa Ecolab Inc. proporcionó datos sobre la eficacia del ácido peracético para esporos de *Alicyclobacillus*. El anitizante ensayado (Oxonia Active) es una preparación compuesta de ácido peracético, hidroperóxido, ácido acético y

estabilizantes; dependiendo de la cepa, el efecto del sanitizante sobre esporos de *Alicyclobacillus* spp. produjo una reducción de 4,3 log o más, cuando se usó una concentración de 1% a 50°C durante 15 minutos.

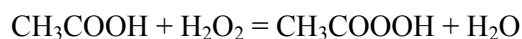
En el presente estudio, se constató que a los 15 minutos de tratamiento con OXI 5 (0,30%) a temperatura ambiente ($26 \pm 2^\circ\text{C}$) la reducción de la población de esporos de *A. acidoterrestris* EC1 fue 2,31 log.

La actividad de un desinfectante usualmente aumenta cuando la temperatura a la cual este actúa se incrementa. Es posible que a una temperatura de ensayo superior se hubieran obtenido mayores reducciones en la población de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* EC1.

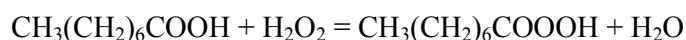
4.6.2.-Evaluación del sanitizante VORTEXX

Este sanitizante fue estudiado a dos concentraciones diferentes: 0,10 y 0,20%. Vortexx es un agente químico a base de peróxido de hidrogeno (6,9%), ácido peroxiacético (4,4%) y ácido octanóico (3,3%) a partir de las siguientes reacciones de síntesis:

Ácido peroxiacético



Ácido peroxioctanóico



La Tabla 4.10 muestra las poblaciones de esporos de *A. acidoterrestris* EC1 sobrevivientes al tratamiento con Vortexx a las concentraciones mencionadas anteriormente, donde asimismo se muestran los valores de pH correspondientes a las concentraciones de Vortexx ensayadas.

Luego del tratamiento con Vortexx (0,10% y 0,20%), se obtuvieron diferencias en las reducciones de esporos de *A. acidoterrestris* EC1 (valores medios de log UFC/ml) de un tiempo de tratamiento a otro con un nivel de confianza de 95,0% ($P < 0,05$).

Con Vortexx (0,10%) la población de esporos de *A. acidoterrestris* EC1 se redujo en 2,51 log a los 30 minutos de tratamiento. Similar reducción se obtuvo con Vortexx (0,20%) a los 15 minutos de tratamiento, siendo la reducción de 2,6 log.

Las Figuras 4.9 y 4.10 muestran las curvas de sobrevivientes de esporos de *A. acidoterrestris* EC1 tratados con Vortexx.

Tabla 4.10. Poblaciones (log UFC/ml)¹ de esporos de *A. acidoterrestris* EC1 sobrevivientes al tratamiento con Vortexx a intervalos de tiempo diferentes²

Conc. Vortexx	pH	Tiempo de tratamiento (minutos)					
		0	5	10	15	20	30
0,10%	3,42	5,69 ¹ ± 0,053 ^{3A}	–	4,78 ± 0,037 ^B	–	4,09 ± 0,15 ^C	3,18 ± 0,14 ^{D3}
0,20%	3,31	5,69 ± 0,10 ^A	4,61 ± 0,12 ^B	3,87 ± 0,12 ^C	3,09 ± 0,29 ^{D3}	–	–

¹ Los datos representan los valores promedio ± desvío estándar de tres tratamientos

² Los tratamientos se realizaron a temperatura ambiente 26 ± 2°C

³ Los valores medios con diferente letra muestran diferencias significativas a un nivel de confianza de 95,0%

Al comparar el efecto de los sanitizantes OXI 5 (ácido peracético) y Vortexx sobre esporos de la misma cepa de *A. acidoterrestris* EC1, se observa que las reducciones fueron similares a los 15 y 30 minutos de tratamiento; sin embargo, las concentraciones de Vortexx ensayadas fueron menores, datos que sugieren que Vortexx es más efectivo que OXI 5.

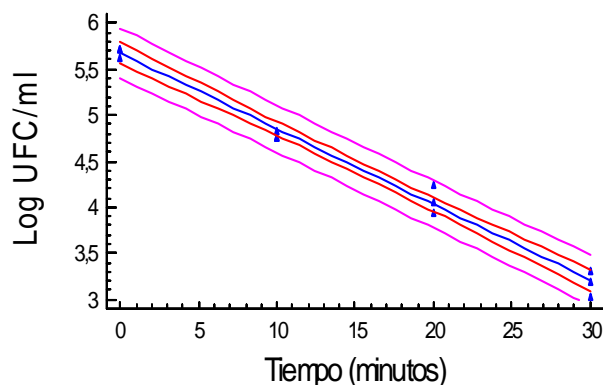


Figura 4.9. Curva de sobrevivientes de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* EC1 tratados con Vortexx (0,1%). R² 98,81%

El poder sanitizante del ácido peroxi depende del largo de la cadena alquílica y el ácido peroxioctanóico (C8) tiene un poder sanitizante más fuerte que el ácido peracético (C2). Según la Empresa Ecolab Inc. esta composición tiene un mejor efecto sanitizante sobre bacterias espora formadoras a una concentración más baja comparado a Oxonia Active, cuyo principal ingrediente es el ácido peracético. Por lo tanto, Vortexx es

superior a Oxonia Active (con ácido peracético como el único ácido peroxi) y trabaja más eficientemente sobre un amplio rango de microorganismos, especialmente sobre bacterias acidófilas termófilas las cuales son resistentes a los antimicrobianos.

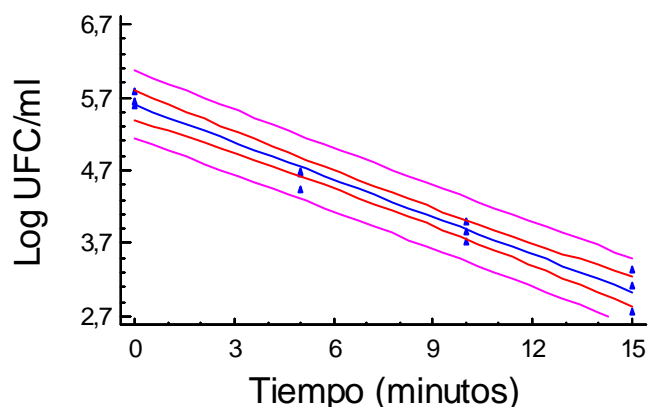


Figura 4.10. Curva de sobrevivientes de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* EC1 tratados con Vortexx (0,20%). R^2 96,88%

4.6.3.-Evaluación del sanitizante hipoclorito de sodio

En la Tabla 4.11 se muestra el efecto del hipoclorito de sodio sobre esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* EC1. Los valores de pH que figuran corresponden a las concentraciones ensayadas de hipoclorito de sodio.

A los 9 minutos de tratamiento la reducción en la población de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* EC1 fue de 1,17 y 1,68 log a 500 y 1000 ppm de cloro activo respectivamente.

Del análisis con hipoclorito de sodio (500 ppm de cloro activo) se observó que hay diferencia estadísticamente significativa entre los valores medios de log UFC/ml de un tiempo de tratamiento a otro ($P < 0,05$).

De forma similar, del análisis del tratamiento con hipoclorito de sodio (1000 ppm cloro activo) se observó diferencia estadísticamente significativa en los valores medios de log UFC/ml de un tiempo de tratamiento a otro ($P < 0,05$).

Las Figuras 4.11 y 4.12 muestran las curvas de sobrevivientes de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* EC1 al tratamiento con hipoclorito de sodio.

Tabla 4.11. Poblaciones (log UFC/ml)¹ de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* EC1 sobrevivientes al tratamiento con hipoclorito de sodio a tres intervalos de tiempo diferentes²

Conc. (ppm cloro)	pH	Tiempo de tratamiento (minutos)			
		0	3	6	9
500	9,03	5,71 ± 0,038 ^{13A}	5,19 ± 0,043 ^B	4,85 ± 0,091 ^C	4,54 ± 0,12 ^D
1000	9,49	5,72 ± 0,046 ^A	5,04 ± 0,089 ^B	4,65 ± 0,088 ^C	4,04 ± 0,21 ^D

¹ Los datos representan los valores promedio ± desvío estándar de tres tratamientos

² Los tratamientos se realizaron a temperatura ambiente 26 ± 2°C

³ Los valores medios con diferente letra en la fila indican diferencias significativas a un nivel de confianza de 95,0%

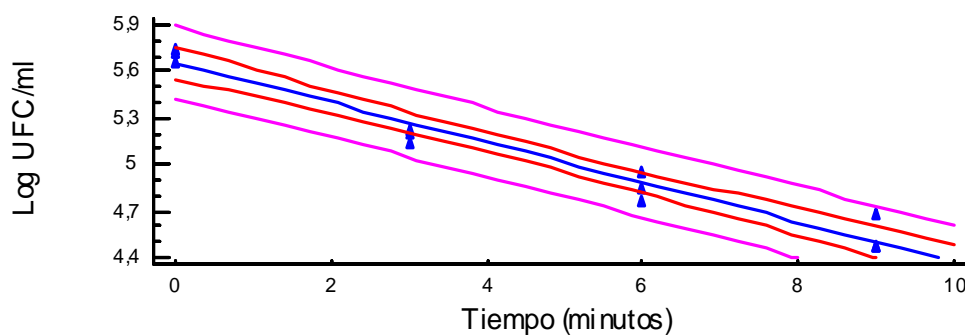


Figura 4.11. Curva de sobrevivientes de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* EC1 al tratamiento con hipoclorito de sodio (500 ppm cloro activo). R² 96,03%

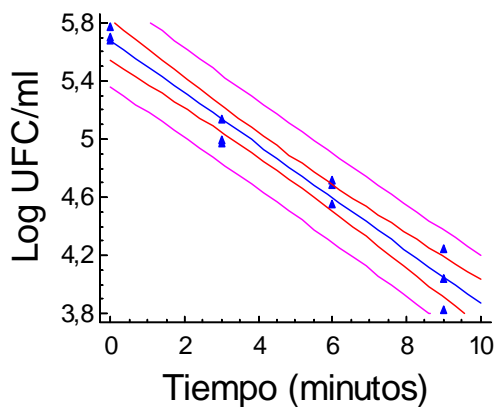


Figura 4.12. Curva de sobrevivientes de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* EC1 al tratamiento con hipoclorito de sodio (1000 ppm cloro activo). R² 96,29%

Orr y Beuchat (2000) trataron una suspensión de esporos compuesta por cinco cepas de *A. acidoterrestris* con hipoclorito de sodio (pH = 6,9 ± 0,2) a 0, 200, 500, 1000, 2000 y 5000 ppm de cloro durante 10 minutos a 23°C. A las concentraciones de 1000, 2000 y 5000 ppm de cloro el número de esporos se redujo por 6 log.

Sin embargo, Friedrich y col. (2009) estudiaron la acción del hipoclorito sobre esporos de *Alicyclobacillus* spp. demostrando que 500 y 1000 ppm de cloro activo resultaron inefectivos durante los primeros 10 minutos de tratamiento.

En este estudio, las reducciones en las poblaciones de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* EC1 tratadas con hipoclorito de sodio a 500 y 1000 ppm de cloro activo fueron mucho menores con respecto a los datos obtenidos por Orr y Beuchat (2000) mencionados anteriormente. Sin embargo, el pH de las soluciones de hipoclorito de sodio usadas en este trabajo fueron de 9,03 a 500 ppm y 9,49 a 1000 ppm de cloro activo.

Se estableció previamente que el pH tiene una gran influencia sobre la actividad antimicrobiana del cloro en solución. Sagripanti y Bonifacino (1996) observaron que el hipoclorito de sodio a pH neutro fue el agente que más rápidamente inactivó una suspensión de esporos de *B. subtilis*; sin embargo, a ese pH fue el más inestable de las sustancias ensayadas. El hipoclorito a pH 11 fue inefectivo a 20 y 8°C y mostró una moderada inactivación de los esporos a 40°C después de 30 minutos.

Bloomfield y Arthur (1989) informaron una muerte de esporos superior al 99,9% de *B. subtilis* en 5 minutos de exposición a 100 ppm de cloro. Tratamientos de esporos de *B. subtilis* con 1000 ppm de hipoclorito (pH 10,9) dio como resultado una muerte total dentro de las 3 horas. Cousins y Allan (1967) estudiaron los efectos de 200 ppm de NaOCl sobre *B. subtilis* y observaron una reducción del 99,9% después de aproximadamente 3,5 horas. Es posible que un largo tiempo de exposición podría eliminar los esporos viables de *Alicyclobacillus* de forma similar a la observada para los esporos de *B. subtilis*.

El bajo nivel de actividad del hipoclorito de sodio a pH alcalinos es importante ya que el hipoclorito de sodio comercial es obtenido a pH 12. En la industria elaboradora de jugos concentrados de manzana y pera se utiliza hipoclorito de sodio a pH alcalino para evitar dañar las membranas del ultrafiltro y equipamiento de acero inoxidable.

El hipoclorito de sodio es un bactericida usado en las industrias de manufactura de alimentos por su fuerte efecto oxidativo. Sin embargo, el cloro pierde este efecto de sanitización con la presencia de compuestos orgánicos, siendo necesario lavar los objetos a ser sanitizados, como el equipo de manufactura de alimentos y frutas previo al tratamiento de sanitización.

Además, los efectos de sanitización del cloro varían en función de la temperatura. En la Tabla 4.12 se muestran algunas características de los sanitizantes ensayados en el presente trabajo.

Tabla 4.12. Características de Vortexx y su comparación con otros desinfectantes

Característica	Vortexx	Ácido peracético	Cloro
Impacto ambiental	bajo	bajo	alto
Bacterias vegetativas	excelente	excelente	excelente
Hongos	excelente	bueno	muy bueno
Levaduras	excelente	bueno	muy bueno
Remoción de la película mineral	muy bueno	bueno	nulo
Detergencia	moderada	nula	nula
Corrosión	muy baja	baja	alta
Sensibilidad a la temperatura del agua	baja	moderada	baja
Sensibilidad al pH	baja	baja	moderada

Fuente: ECOLAB FOOD & BEVERAGE DIVISION

Otro compuesto del cloro, el dióxido de cloro, es un bactericida fuertemente oxidante que permanece en agua por más tiempo que el cloro porque reacciona pobremente con compuestos nitrogenados.

El dióxido de cloro mostró una gran efectividad en el control de los esporos de *A. acidoterrestris* en suspensiones acuosas y sobre manzanas. Tratamientos con 80 y 120 ppm por 5 minutos redujeron la viabilidad de los esporos a niveles no detectables (< 0,7 log UFC/ml). En manzanas, la reducción de esporos fue de más de 4,8 log con 120 ppm de dióxido de cloro libre después de 1 minuto de tratamiento (Lee y col., 2004). En este estudio, a los 9 minutos de tratamiento la reducción en la población de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* EC1 fue de 1,68 log con 1000 ppm de cloro activo, similar a la reducción obtenida por Lee y col. (2004) con 20 ppm de dióxido de cloro durante 5 minutos de tratamiento.

CONCLUSIONES

- En el presente estudio se constató la presencia de bacterias esporuladas acidotermófilas (TAB) en una Planta elaboradora de jugos y aromas concentrados situada en el Alto Valle de Río Negro y Neuquén.
- En los estudios realizados en el año 2005, se detectaron TAB en diferentes etapas del proceso, en jugos concentrados de manzana y pera y en muestras de agua utilizadas durante el proceso.
- Se confirmó a partir de los aislados de TAB la presencia del género *Alicyclobacillus* por sus características morfológicas y fisiológicas.
- Los diferentes puntos del proceso productivo muestreados presentaron un rango de temperatura que es óptimo para el crecimiento de varias especies del género *Alicyclobacillus*.
- Se comprobó la presencia en cepas de *Alicyclobacillus acidoterrestris* la capacidad de producir guayacol, principal responsable del off-odor en los jugos deteriorados.
- De 267 lotes de jugos concentrados de manzana y pera analizados durante el año 2006 sólo el 3,4% resulto contaminado con *Alicyclobacillus* spp.
- Se determinaron los parámetros D y z, que caracterizan la destrucción de los esporos por el calor. Los valores D determinados a 88, 90, 92 y 95 °C fueron respectivamente 15,63, 9,21, 6,23 y 3,50 minutos. El valor z calculado sobre el rango de temperaturas de ensayo fue de 10,9°C. Con estos datos se pudo comprobar la elevada resistencia térmica de esporos de una cepa de *Alicyclobacillus acidoterrestris* EC1 aislada de la Planta y buena productora de guayacol en jugo de manzana a 20 °Bx y pH 3,45, condiciones que presenta el jugo a su ingreso a la etapa de concentración/pasteurización.

- Se determinó el grado de destrucción de los esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* EC1 buena productora de guayacol, por acción de sanitizantes de uso preferencial en la Planta: OXI 5, Vortexx e hipoclorito de sodio en el rango de concentraciones y tiempos utilizados por la industria.
- El tratamiento con OXI 5 (ácido peracético 5% y peróxido de hidrógeno 28%) al 0,15% al cabo de 30 minutos redujo la población de esporos de *A. acidoterrestris* EC1 en 2,24 log. Similar resultado (2,31 log) se obtuvo cuando los esporos fueron tratados al doble de la concentración del sanitizante en la mitad de tiempo.
- El tratamiento con Vortexx (peróxido de hidrogeno 6,9%, ácido peroxiacético 4,4% y ácido octanóico 3,3%) al 0,1%, redujo la población de esporos de *A. acidoterrestris* EC1 en 2,51 log a los 30 minutos. Similar reducción (2,6 log) se obtuvo al 0,20% a los 15 minutos.
- Con hipoclorito de sodio (500 y 1000 ppm de cloro activo) a los 9 minutos de tratamiento la reducción en la población de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* EC1 fue de 1,17 y 1,68 log respectivamente.
- Los tres sanitizantes ensayados son efectivos en las condiciones de uso en la Planta elaboradora de jugos y aromas concentrados. La elección de cualquiera de ellos dependerá de un análisis de costos, lugar de uso en la Planta, daño de equipamiento, presencia de residuos orgánicos, entre otros factores.

BIBLIOGRAFÍA

Aeberhard C. (2004) Curso teórico-práctico “Industrialización de Peras y Manzanas” (40 horas reloj), AUVR – UNCo.

Albuquerque L., Rainey F. A., Chung A. P., Sunna A., Nobre M. F., Grote R., Antranikian G., Da Costa M. S. (2000) *Alicyclobacillus hesperidum* sp. nov. and a related genomic species from solfataric soils of São Miguel in the Azores. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 50, 451-457.

Alderton G. and Snell N. (1970) Chemical states of bacterial spores: dry heat resistance and its kinetics at intermediate water activity. *Appl. Microbiol.*, 19, 565-572.

Allwood M. C. (1973) Inhibition of *Staphylococcus aureus* by combinations of non-ionic surface-active agents and anti-bacterial substances. *Microbios*, 7, 209-214.

Anderson E. B. and Meanwell L. J. (1936) Studies in bacteriology of low temperature pasteurization. Part II. The heat resistance of a thermoduric streptococcus grown at different temperatures. *J. Dairy Res.*, 7, 182-191.

Andrewes F. W. and Orton K. S. P. (1904) Disinfectant action of hypochlorous acid. *Zentrabl. Bakteriol. (Orig. A)* 35, 645-651; 811-815.

Ashurst P. R. (1995) Producción y envasado de zumos y bebidas de frutas sin gas. Editorial Acribia, S.A.

Bahceci K. S. and Acar J. (2007) Modeling the combined effects of pH, temperature and ascorbic acid concentration on the heat resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *Int. J. Food Microbiol.*, 120, 266-273.

Baker R. J. (1959) Types and significance of chlorine residuals. *J. Am. Water Works Assoc.*, 51, 1185-1190.

Baldry M. G. C. (1983) The bactericidal, fungicidal and sporicidal properties of hydrogen peroxide and peracetic acid. *J. Appl. Bacteriol.*, 54, 417-423.

Baldry M. G. C. (1984) The antimicrobial properties of magnesium monoperoxyphthalate hexahydrate. *J. Appl. Bacteriol.*, 57, 499-503.

Baldry M. G. C. and Fraser J. A. L. (1988) Disinfection with peroxygens. In *Industrial Biocides*. Edited by K. R. Payne. New York, John Wiley & Sons, 91-116.

Baldry M. G. C. and French M. S. (1989) Activity of peracetic acid against sewage indicator organisms. *Wat. Sci. Tech.*, 21, Brighton, 1747-1749.

Baumgart J. and Menje S. (2000) The impact of *Alicyclobacillus acidoterrestris* on the quality of juices and soft drinks. *Fruit Process.*, 10, 251-254.

Baumgart J., Husemann M., Schmidt C. (1997) *Alicyclobacillus acidoterrestris*: occurrence, significance and detection in beverages and beverage base. *Flussiges Obst*. 64, 178-180.

Bayliss C. E. and Waites W. M. (1976) The effect of hydrogen peroxide on spores of *Clostridium bif fermentans*. *J. Gen. Microbiol.*, 96, 401-407.

Bayliss C. E. and Waites W. M. (1979a) The combined effect of hydrogen peroxide and ultraviolet irradiation on bacterial spores. *J. Appl. Bacteriol.*, 47, 1658.

Bayliss C. E. and Waites W. M. (1979b) The synergistic killing of spores of *Bacillus subtilis* by hydrogen peroxide and ultra-violet light irradiation. *FEMS Microbiol. Lett.*, 5, 331.

Bayliss C. E. and Waites W. M. (1982) Effect of simultaneous high intensity ultraviolet irradiation and hydrogen peroxide on bacterial spores. *J. Food Technol.*, 17, 467-470.

Beamer P. R. and Tanner F. W. (1939a) Resistance of non-sporeforming bacteria to heat. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk.*, II, 100, 81-98.

Beamer P. R. and Tanner F. W. (1939b) Heat resistance studies on selected yeasts. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk.*, II, 100, 202-211.

Bean H. S. (1967) Types and characteristics of disinfectants. *J. Appl. Bacteriol.*, 30, 6-16.

Bean H. S. (1972) Preservatives for pharmaceuticals. *J. Soc. Cosm. Chem.*, 23, 703-720.

Beech F. W. and Carr J. G. (1977) In: *Economic Microbiology*, Vol 1, Alcoholic Beverages, A. H. Rose (ed.), Academic Press, London, 139-313.

Beech F. W. (1993) In: *The Yeasts*, Vol 5, *Yeast Technology*, 2nd edn., A. H. Rose and J. S. Harrison (eds.), Academic Press, London, 169-213.

Bennett E. O. (1959) Factors affecting the antimicrobial activity of phenols. *Advances Appl. Microbiol.*, 1, 123-140.

Bigelow W. D. and Esty J. R. (1920) Thermal death point in relation to time of typical thermophilic organisms. *J. Infect. Dis.*, 27, 602.

Block S. S. (1991) *Disinfection, Sterilization, and Preservation*. Fourth Edition. Lea & Febiger, London.

Block S. S. (1986) Disinfection, where are we headed. A discussion of hydrogen peroxide and peracetic acid. *Proc. 3rd Conf. Prog. Chem. Disinfection*, Binghamton, NY, pp. 1-28.

Bloomfield S. F. and Arthur M. (1989) Effect of chorine-releasing agents of *Bacillus subtilis* vegetative cells and spores. Lett. Appl. Microbiol., 8, 101-104.

Bock F. G., Meyers H. K., Fox H. W. (1975) Carcinogenic activity of peroxy compounds. J. Natl. Cancer Inst., 55, 1359-1361.

Bomar M. (1962) The relationship between the age of *Bacillus subtilis* spores and their resistance to ethylene oxide. Folia Microbiologica Praha, 7, 259-261.

Borlinghaus A. and Engel R. (1997) *Alicyclobacillus* Incidence in Commercial Apple Juice Concentrate (AJC) Supplies – Method Development and Validation – Fruit Processing, 7 (7), 262–266.

Bowing W.G., et al. (1977) Stable peroxy-containing microbiocides. U.S. Patent 4, 051, 058.

Briggs A. (1966) The resistance of spores of the genus *Bacillus* to phenol, heat and radiation. J. Appl. Bacteriol., 29, 490-504.

Brown K. L. and Thorpe R. H. (1978) The effect of the pH on the heat resistance and recovery of bacterial spores. In Technical Memorandum, N° 185. Chipping Campden, Campden Food Preservation Research Association.

Brown M. R. W. (1975) The role of the cell envelope in resistance. In Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* (ed. Brown, M. R. W.) pp. 71-107. London: John Wiley and Sons.

Byrne B., Dunne G., Bolton D. J. (2006) Thermal inactivation of *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* vegetative cells and spores in pork luncheon roll. Food Microbiol., 23, 803-808.

Cerny G., Duong H. A., Hennlich W., Miller S. (2000) *Alicyclobacillus acidoterrestris*: influence of oxygen content on growth in fruit juices. *Food Australia*, 52, 289-291.

Cerny G., Hennlich W., Poralla K. (1984) Spoilage of fruit juice by bacilli: isolation and characterization of the spoilage organism. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 179, 224-227.

CFR (1990) Code of Federal Regulations, Title 21, Parts 178. 1005-1010. Published by the Office of Federal Register. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.

Chang S. S. and Kang D. H. (2004) *Alicyclobacillus* spp. in the fruit juice industry: history, characteristics, and current isolation/detection procedures. *Crit. Rev. Microbiol.*, 30, 55-74.

Christensen B. E., Tronnes H. N., Vollan K., Smidsrod O., Bakke R. (1990) Biofilm removal by low concentrations of hydrogen peroxide. *Biofouling*, 2, 165-175.

CINEX, Cámara Argentina de la Industria y Exportación de Jugos de Manzanas, Peras y Afines.

Código Alimentario Argentino 2009/10. Capítulo XII “Bebidas hídricas, agua y agua gasificada”.

Condon S. and Sala F. L. (1992) Heat resistance of *Bacillus subtilis* in buffer and foods of different pH. *J. Food Prot.*, 55, 605-608.

Corry J. E. L. (1976a) The effect of sugars and polyols on the heat resistance and morphology of osmophilic yeasts. *J. Appl. Bacteriol.*, 40, 269-276.

Corry J. E. L. (1976b) Sugar and polyol permeability of *Salmonella* and osmophilic yeast cell membranes measured by turbidimetry, and its relationship to heat resistance. *J. Appl. Bacteriol.*, 40, 277-284.

Costerton J. W., Cheng K. J., Geesey G. G., Ladd T. I., Nickel J. C., Dasgupta M., Marrie T. J. (1987) Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual Rev. Microbiol.*, 41, 435-464.

Cousins C. M. and Allan C. D. (1967) Sporicidal properties of some halogens. *J. Appl. Bacteriol.*, 30, 168-174.

Croshaw B. (1971) The destruction of mycobacteria. In *Inhibition and Destruction of the Microbial Cell* (ed. Hugo, W.B.) pp. 419-449. London: Academic Press.

Curran H. R. (1934) The influence of some environmental factors upon thermal resistance of bacterial spores. *J. Bacteriol.*, 27, 26.

Curran H. R. (1935) The influence of some environmental factors upon the thermal resistance of bacterial spores. *J. Infect. Dis.*, 56, 196-202.

Darland G. and Brock T. D. (1971) *Bacillus acidocaldarius* sp. nov., an acidophilic thermophilic spore-forming bacterium. *J. Gen Microbiol.*, 67, 9-15.

Deak T. and Beuchat L. R. (1993) Yeasts associated with fruit juice concentrates. *J. Food Prot.*, 56 (9), 777-782.

Deinhard G., Saar J., Krischke W., Poralla K. (1987) *Bacillus cycloheptanicus* sp. nov., a new thermoacidophile containing w-cycloheptane fatty acids. *System Appl. Microbiol.*, 10, 68-73.

Dickson E. C., Burke G. S., Beck D., Johnston J. (1925) Studies on thermal death time of spores of *Clostridium botulinum*. *J. Infect. Dis.*, 36, 472-483.

Dittrich H. (1987) In: *Fruchte und Gemüsesäfte*, 2nd edn., U. Schobinger (ed.), Ulmer Verlag, Stuttgart, 470-518.

- Doores S. (1983) CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutrition, 19, 133-149.
- Dring G. J., Ellar D. J., Gould G. W. (Eds.) (1985) Fundamental and Applied Aspects of Bacterial Spores. London, Academic Press.
- Dufresne S., Bousquet J., Boissinot M., Guay R. (1996) *Sulfobacillus disulfidooxidans* sp. nov., a new acidophilic, disulfide-oxidizing, gram-positive, spore-forming bacterium. Int. J. Syst. Bacteriol., 46, 1056-1064.
- Dychdala G. R. (1983) Chlorine and chlorine compounds. In Disinfection, Sterilization and Preservation (ed. Block, S. S.) 3rd Ed. pp. 157-182. Philadelphia: Lea y Febiger.
- Dychdala G. R. (1988) New hydrogen peroxide-peroxyacetic acid disinfectant. Proc. 4th Conf. Prog. Chem. Disinfection, Binghamton, NY, pp. 315-342.
- Dye M. and Mead G. C. (1972) The effect of chlorine on the viability of clostridial spores. J. Food Tech., 7, 173-181.
- Ecolab Food & Beverage Division.
- Eguchi S. Y., Manfio G. P., Pinhatti M. E., Azuma E., Variane S. F. (1999) Acidothermophilic Sporeforming Bacteria (ATSB) in Orange Juices: Detection Methods, Ecology, and Involvement in the Deterioration of Fruit Juices. Coleção de Culturas Tropical (CCT), Fundação André Tosello – ABECitrus. p 1-52.
- Eiroa M. N. U., Junqueira V. C. A., Schmidt F. L. (1999) *Alicyclobacillus* in orange juice: occurrence and heat resistance of spores. J. Food Prot., 62, 883-886.
- El-Bisi H. M., Vondell R. M., Esselen W. B. (1963) Studies on the kinetics of the bactericidal action of ethylene oxide in the vapor phase. Bacteriological Proceedings, p. 13.

Ellicker P. R. and Frazier W. C. (1938) Influence of time and temperature of incubation on heat resistance of *Escherichia coli*. J. Bacteriol., 36, 83-98.

Esty J. R. and Meyer K. F. (1922) The heat resistance of the spores of *B. botulinus* and allied anaerobes. XI. J. Infect. Dis., 31, 650-663.

Fernandez P. S., Gomez F. J., Ocio M. J., Rodrigo M., Sanchez T., Martinez A. (1995) D values of *Bacillus stearothermophilus* spores as a function of pH and recovery medium acidulant. J. Food Prot., 58, 628-632.

FMC Corp. Technical Bulletin 4. Peracetic Acid, 35%. FMC Corp. Industrial Chemicals Group, 2000 Market St., Philadelphia.

Fridovich I. (1975) Oxygen: Boon y bane. Am. Sci., 63, 54-60.

Fridovich I. (1978) The biology of oxygen radicals. Science, 201, 875-879.

Friedrich L. M., Goodrich-Schneider R., Parish M. E., Danyluk M. D. (2009) Mitigation of *Alicyclobacillus* spp. spores on food contact surfaces with aqueous chlorine dioxide and hypochlorite. Food Microbiol., 1-6.

Galbraith H. and Miller T. B. (1973) Effect of metal cations and pH on the antibacterial activity and uptake of long chain fatty acids. J. Appl. Bacteriol., 36, 635-646.

Gleason M. N., Gosselin R. E., Hodge H. C., Smith R. P. (1969) Clinical Toxicology of Commercial Products. 3rd Ed. Baltimore, Williams & Wilkins.

Golovacheva R. S. and Karavaiko G. I. (1979) *Sulfobacillus* – a new genus of thermophilic spore-forming bacteria. Microbiology, 47, 658-664.

Görtzen S. (1937) Untersuchungen über die Widerstandsfähigkeit nativer anaerober Erdsproren gegen siedehitze. Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk., 1 Orig., 138, 227-241.

Goto K., Nishibori A., Wasada Y., Furuhata K., Fukuyama M., Hara M. (2008) Identification of thermo-acidophilic bacteria isolated from the soil of several Japanese fruit orchards. *Lett. Appl. Microbiol.*, 46, 289-294.

Goto K., Tanimoto Y., Tamura T., Mochida K., Arai D., Asahara M., Suzuki M., Tanaka H., Inagaki K. (2002) Identification of thermoacidophilic bacteria and a new *Alicyclobacillus* genomic species isolated from acidic environments in Japan. *Extremophiles*, 6, 333-340.

Goto K., Matsubara H., Mochida K., Matsumura T., Hara Y., Niwa M., Yamasato K. (2002) *Alicyclobacillus herbarius* sp. nov., a novel bacterium containing w-cycloheptane fatty acids, isolated from herbal tea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 52, 109-113.

Goto K., Moshida K., Asahara M., Suzuki M., Kasai H., Yokota 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, 1537-1544.

Gould G. W. (1971) Methods for studying bacterial spores. In *Methods in Microbiology* (eds Norris, J. R. and Ribbons, D. W.) Vol. 6A, pp. 326-381. London: Academic Press.

Gouws P. A., Gie L., Pretorius A., Dhansay N. (2005) Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidocaldarius* by 16S rRNA from mango juice and concentrate. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 40, 789-792.

Greenspan F. P. and MacKellar D. G. (1951) The application of peracetic acid germicidal washes to mold control of tomatoes. *Food Technol.*, 5, 95-97.

Groenewald W. H., Gouws P. A., Witthuhn R. C. (2009) Isolation, identification and typification of *Alicyclobacillus acidoterrestri s* and *Alicyclobacillus acidocaldarius*

strains from orchard soil and the fruit processing environment in South Africa. *Food Microbiol.*, 26, 71-76.

Hodges N. A., Melling J., Parker S. J. (1980) A comparison of chemically defined and complex media for the production of *Bacillus subtilis* spores having reproducible resistance and germination characteristics. *J. Pharm. Pharmacol.*, 32, 126-130.

Howard I. Technical Manager – Raw Materials Gerber Foods Soft Drinks (2005) *Alicyclobacillus* Questionnaire.

Hurwitz S. J. and McCarthy T. J. (1985) Dynamics of disinfection of selected preservatives against *Escherichia coli*. *J. Pharm. Sci.*, 74, 892-894.

Hutchings I. J. and Xezones H. (1949) Comparative evaluation of the bactericidal efficiency of peracetic acid, quaternaries and chlorine containing compounds. *Proc. 49th Ann. Mtg. Soc. Am. Bacteriol. (Abstract)*, 50-51.

Hutton M. T., Koskinen M. A., Hanlin J. H. (1991) Interacting effects of pH and NaCl on heat resistance of bacterial spores. *J. Food Sci.*, 56, 821-822.

Ito K. A., Denny C. B., Brown C. K., Yao M., Seeger M. L. (1973) Resistance of bacterial spores to hydrogen peroxide. *Food Tech.*, 27 (11), 58-66.

Jensen N. (2000) *Alicyclobacillus* in Australia. *Foods Australia*, 52, 282-285.

Jensen N. and 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.

Johns C. K. (1934) Germicidal power of sodium hypochlorite. *Ind. Eng. Chem.*, 26, 787-788.

Kannenber E., Blume A., Poralla K. (1984) Properties of w-cyclohexane fatty acids in membranes. FEBS, 172, 331-334.

Karavaiko G.I., Bogdanova T. I., Tourova T. P., Kondrat'eva T. F., Tsaplina I. A., Egorova M. A., Krasil'nikova E. N., Zakharchuk L. M. (2005) Reclassification of “*Sulfobacillus thermosulfidooxidans* subsp. *thermotolerans*” strain K1 as *Alicyclobacillus tolerans* sp. nov. and *Sulfobacillus disulfidooxidans* Dufresne et al. 1996 as *Alicyclobacillus disulfidooxidans* comb. nov., and emended description of the genus *Alicyclobacillus*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 55, 941-947.

King A. D., Michener H. D., Ito K. A. (1969) Control of *Byssochlamys* and related resistant fungi in grape products. Appl. Microbiol., 18, 166-173.

Klebanoff S. (1968) Myeloperoxidase-halide-hydrogen peroxide antibacterial system. J. Bacteriol., 95, 2131.

Knox W. E., Stumpf P. K., Green D. E., Auerbach V. H. (1948) The inhibition of sulfhydryl enzymes as the basis of the bactericidal action of chlorine. J. Bacteriol., 55, 451-458.

Komitopoulou E., Boziaris I. S., Davies E. A., Delves-Broughton J., Adams M. R. (1999) *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices and its control by nisin. Int. J. Food Sci. Tech., 34, 81-85.

Krischke W. and Poralla K. (1990) Properties of *Bacillus acidocaldarius* mutants deficient in w-cyclohexyl fatty acid biosynthesis. Arch. Microbiol., 153, 463-469.

Kusano K., Niwa M., Yamasato H. (1997) Kaju yori bunnri sareta tainetsusei kousanseikin no bunrui. Nihon-Seiryoinryo-Kenkyukai, Dai-6-kai Kenkyu Hapyokai.

Kusano K., Yamada H., Niwa M., Yamasato K. (1997) *Propionibacterium cyclohexanicum* sp. nov., a new acid-tolerant w-cyclohexyl fatty acid-containing

propionibacterium isolated from spoiled orange juice. Int. J. Syst. Bacteriol., 47, 825-831.

Leaper S. (1984a) Comparison of the resistance to hydrogen peroxide of wet and dry spores of *Bacillus subtilis* SA22. J. Food Tech., 19, 695.

Leaper S. (1984b) Synergistic killing of spores of *Bacillus subtilis* by peracetic acid and alcohol. J. Food Tech., 19, 355.

LeChevalier M. W., Cawthorn C. D., Lee R. G. (1988) Inactivation of biofilm bacteria. Appl. Environ. Microbiol., 54, 2492-2499.

Lee S., Gray P. M., Dougherty R. H., Kang D. (2004) The use of chlorine dioxide to control *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in aqueous suspension and on apples. Int. J. Food Microbiol., 92, 121-127.

Lensing H. H. and Oei H. L. (1984) Study of the efficiency of disinfectants against anthrax spores. Tijdschr. Diergeneeskd, 109 (13), 557-563.

Lesser M. A. (1949) Hypochlorites as sanitizers. Soap Sanit. Chem., 25, 119-125, 139.

Lindsay J. A., Barton L. E., Leinart A. S., Pankratz H. S. (1990) The effect of sporulation temperature on sporal characteristics of *Bacillus subtilis*. A. Curr. Microbiol., 21, 75-79.

Magoon C.A. (1926b) Studies on bacterial spores. II. Thermal resistance as affected by age and environment. J. Bacteriol., 11, 253-283.

Marks H. C., Wyss O., Strandkov F. B. (1945) Studies on the mode of action of compounds containing available chlorine. J. Bacteriol., 49, 299-305.

Marshall B. J., Murrell W. G., Scott W. J. (1963) The effect of water activity, solutes and temperature on the viability and heat resistance of freeze-dried bacterial spores. *J. Gen. Microbiol.*, 31, 451-460.

Matsubara H., Goto K., Matsumura T., Mochida K., Iwaki M., Niwa M., Yamasato K. (2002) *Alicyclobacillus acidiphilus* sp. nov., a new thermo-acidophilic w-alicyclic fatty acid-containing bacterium isolated from acidic beverages. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 52, 1681-1685.

Mazas M., González I., López M., González J., Martín R. (1995) Effects of sporulation media and strain on thermal resistance of *Bacillus cereus* spores. *Int. J. Food Sci. Tech.*, 30, 71-78.

McIntyre S., Ikawa J. Y., Parkinson N., Haglund J., Lee J. (1995) Characteristics of an acidophilic *Bacillus* strain isolated from shelf-stable juices. *J. Food Prot.*, 58 (3), 319-321.

Mentel R. and Schmidt J. (1973) Investigations on rhinovirus inactivation by hydrogen peroxide. *Acta Virol.*, 17, 351-354.

Moats W. A. (1971) Kinetics of thermal death of bacteria. *J. Bacteriol.*, 105, 165-171.

Molin G. and Östlund K. (1976) Dry-heat inactivation of *Bacillus subtilis* var *niger* spores with special reference to spore density. *Canadian J. Microbiol.*, 22, 359-363.

Murray M. B., Gurtler J. B., Jee-Hoon Ryu, Harrison M. A., Beuchat L. R. (2007) Evaluation of direct plating methods to enumerate *Alicyclobacillus* in beverages. *Int. J. Food Microbiol.*

Murrell W. G. (1969) Chemical composition of spores and spore structures. In *The Bacterial Spore* (eds Gould, G.W. and Hurst, A.) pp. 215-273. London: Academic Press.

Naguib K. and Hussein L. (1972) The effect of hydrogen peroxide on the bacteriological quality and nutritive value of milk. *Milchwissenschaft*, 27, 758-762.

National Institute of Safety and Health (1974) Toxic Substances List. Rockville, MD.

Nicolaus B., Improta R., Manca C. M., Lama L., Esposito E., Gambacorta A. (1998) *Alicyclobacilli* from an unexplored geothermal soil in Antarctica: Mount Rittmann. *Polar Biol.*, 19, 133-141.

Niwa M. (2003) *A. acidoterrestris* Rapid Detection Kit. *Fruit Processing*, 13, 328-331.

Orr R. V. and Beuchat L. R. (2000) Efficiency of disinfectants in killing spores of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and performance of media for supporting colony development by survivors. *J. Food Prot.*, 63, 1117-1122.

Orr R.V., Shewfelt R. L., Huang C. J., Tefera S., Beuchat L. R. (2000) Detection of gualacol produced by *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice by sensory and chromatographic analysis, and comparison with spore and vegetative cell population. *J. Food Prot.*, 63, 1517-1522.

Orth R. and Mrozeck H. (1989) Is the control of *Listeria*, *Campylobacter*, and *Yersinia* a disinfection problem? *Fleischwirtschaft*, 69 (10), 1575-1576.

Palop A., Alvarez I., Raso J., Condón S. (2000) Heat resistance of *Alicyclobacillus acidocaldarius* in water, various buffers, and orange juice. *J. Food Prot.*, 63, 1377-1380.

Palop A., Mañas P., Condón S. (1999) Sporulation temperature and heat resistance of *Bacillus* spores: a review. *J. Food Saf.*, 19, 57-72.

Parisch M. E. and Higgings D. P. (1989) Yeast and molds isolated from spoiling citrus products and by products. *J. Food Prot.*, 52, 261-263.

Pettipher G. L., Osmundson M. E., Murphy J. M. (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.*, 25, 185–189.

Pflug I. J. (1989) Biologically validating the sterilization process delivered to particles in a heat-hold-cool system. In *Proceedings at the First International Congress on Aseptic Processing Technologies*. Department of Food Science and Nutrition, Purdue University, Lafayette, Indiana.

Pflug I. J. and Holcomb R. G. (1980) The use of bacterial spores as sterilization process monitoring devices: a discussion of what they can do and some of their limitations. In *Proceedings of the Third PMA Seminar Program on Validation of Sterile Manufacturing Processes: Biological Indicators*. Lincolnshire, IL.

Pflug I. J., Smith G. M., Christensen R. (1981) Effect of soybean casein digest agar lot on number of *Bacillus stearothermophilus* spores recovered. *Appl. Environ. Microbiol.*, 42, 226-230.

Phillips C. R. (1952) Relative resistance of bacterial spores and vegetative bacteria to disinfectants. *Bacteriol. Rev.*, 16, 135-138.

Previdi M. P., Quintavalla S., Lusardi C., Vicini E. (1997) Heat resistance of *Alicyclobacillus* spores in fruit juices. *Indust. Conserve*, 72, 353-358.

Prince J., Deverill C. E. A., Ayliffe G. A. J. (1975) A membrane filter technique for testing disinfectants. *J. Clinical Pathol.*, 28, 71-76.

Pyle B. H. and McFeters G. A. (1990) Iodine susceptibility of pseudomonads grown attached to stainless steel surfaces. *Biofouling*, 2, 113-120.

Roberts T. A. (1970) Recovering spores damaged by heat, ionizing radiations or ethylene oxide. *J. Appl. Bacteriol.*, 33, 74-94.

Rogers H. J., Ward J. B., Burdett I. D. J. (1978) Structure and growth of the walls of Gram-positive bacteria. In *Relations between Structure and Function in the Prokaryotic Cell* (eds Stanier, R.Y., Rogers, H.J., Ward, J.B.) 28th Symposium of the Society for General Microbiology, pp. 139-175. Cambridge: Cambridge University Press.

Rudolph A. S. and Levine M. (1941) Factors affecting the germicidal efficiency of hypochlorite solutions. *Bull. 150. Eng. Exp. Sta., Iowa State College.*

Russell A. D. (1981) Neutralization procedures in the evaluation of bactericidal activity. Society for Applied Bacteriology. Technical Series N° 15. London: Academic Press.

Russell A. D. (1982) *The Destruction of Bacterial Spores.* London: Academic Press.

Russell A. D. (1990b) The effect of chemical and physical agents on microbes: disinfection and sterilization. In *Topley y Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity* (eds Dick, H.M. and Linton, A.H.) 8th edn., pp. 71-103. London: Edward Arnold.

Russell A. D. (1991a) Principles of antimicrobial activity. In *Disinfection, Sterilization and Preservation* (ed. Block, S.S.) 4th Ed. (In press.) Philadelphia: Lea y Febiger.

Russell A. D. and Hugo W. B. (1987) Chemical disinfectants. In *Disinfection in Veterinary and Farm Animal Practice* (eds. Linton, A.H., Hugo, W.B. and Russell, A.D.) pp. 12-42. Oxford: Blackwell Scientific Publications.

Sagripanti J. L. and Bonifacino A. (1996) Comparative Sporicidal Effects of Liquid Chemical Agents. *Appl. Environ. Microbiol.*, 545-551.

Sala F. J., Ibarz P., Palop A., Raso J., Condon S. (1995) Sporulation temperature and heat resistance of *Bacillus subtilis* at different pH values. *J. Food Prot.*, 58, 239-243.

Sames T. (1900) Zur Kenntnis der bei höher Temperatur wachsenden Bakterien und Streptococcusarten. *Z. Hyg. Infektionsk.*, 33, 313-362.

Schauwecker P. and Sommer J. E. (2005) Filtration Technology and Post Filtration Sanitation. AIJN Workshop on *Alicyclobacillus*, Brussels.

Schroder W. (1984) Peracetic acid. Disinfectant for the food industry. *Brauwelt Internat.*, Jan., pp.115-120.

Schumb W. C., Satterfield C. N., Wentworth R. L. (1955) In Hydrogen Peroxide. New York, Van Nostrand Rheinhold, pp. 813-816.

Scott E. M. and Gorman S. P. (1987) Chemical disinfectants, antiseptics and preservatives. In *Pharmaceutical Microbiology* (eds. Hugo, W.B. and Russell, A.D.) 4th Ed., pp. 226-252. Oxford: Blackwell Scientific Publications.

Simbahan J., Drijber R., Blum P. (2004) *Alicyclobacillus vulcanalis* sp. nov., a thermophilic, acidophilic bacterium isolated from Coso Hot Spring, California, USA. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54, 1703-1707.

Sobernheim G. and Mündel O. (1936) Grundsätzliches zur Technik der Sterilisationsprüfung. *Z. Hyg. Infektionsk.*, 118, 328-345.

Sommer E. W. (1930) Heat resistance of the spores of *Clostridium botulinum*. *J. Infect. Dis.*, 46, 85-114.

Splittstoesser D. F., Lee C.Y., Churey J.J. (1994) Growth characteristics of aciduric sporeforming bacilli isolated from fruit juices. *J. Food Prot.*, 57, 1080-1083.

Sprossig M. (1975) Peracetic acid and resistant microorganisms. In Resistance of Microorganisms to Disinfectants: Second International Symposium. Edited by W.B. Kedzia. Warsaw, Polish Academy of Sciences, pp. 89-91.

Stark C. N. and Stark P. (1929) The relative thermal death rates of young and mature bacterial cells. J. Bacteriol., 18, 333-337.

Stark R. L., Ferguson P., Garza P., Miner N. A. (1975) An evaluation of the Association of Official Analytical Chemists sporicidal test method. Develop. Industrial Microbiol., 16, 31-36.

Sugiyama H. (1951) Studies of factors affecting the heat resistance of spores of *Clostridium botulinum*. J. Bacteriol., 62, 81.

Suzuki K., Saito K., Kawaguchi A., Okuda S., Komagata K. (1981) Occurrence of w-cyclohexyl fatty acids in *Curtobacterium pusillum* strains. J. Gen. Appl. Microbiol., 27, 261-266.

Swanson K. M. J. (1989) In: Processed Apple Products, D. L. Downing (ed.), AVI Van Nostrand, New York, 343-364.

Tempest D. W. and Ellwood D. C. (1969) The influence of growth conditions on the composition of some cell wall components of *Aerobacter aerogenes*. Biotechnol. Bioeng., 11, 775-783.

Thomas E. and Aune T. (1978) Lactoperoxidase, peroxide, thiocyanate antimicrobial system: Correlation of sulfhydryl oxidation with antimicrobial action. Infect. Immun., 20, 456-463.

Toledo R. T., Escher F. E., Ayres J. C. (1973) Sporicidal properties of hydrogen peroxide against food spoilage organisms. Appl. Microbiol., 26, 592-597.

Tonney F. O., Greer F. E., Liebig G. F., Jr., (1930) The minimal “chlorine death points” of bacteria. II. Vegetative forms. III. Sporebearing organisms. Am. J. Public Health, 20, 503-508.

Townsend C. T., Somers I. I., Lamb F. C., Olson N. A. (1956) A Laboratory Manual for the Canning Industry. 2nd Edition. Washington D.C., National Canners Association Research Laboratories, Chapters 4, 6, and 7.

Tsuruoka N., Isono Y., Shida O., Hemmi H., Nakayama T., Nishino T. (2003) *Alicyclobacillus sendaiensis* sp. nov., a novel acidophilic, slightly thermophilic species isolated from soil in Sendai, Japan. Int. J. Syst. Environ. Microbiol., 53, 1081-1084.

Uchino F. and Doi S. (1967) Acido-thermophilic bacteria from thermal waters. Agric. Biol. Chem., 31, 817-822.

Vaczi L. (1973) The Biological Role of Bacterial Lipids. Budapest: Akademiai Kiadó.

Voetman A., Loos J., Roos D. (1980) Changes in the level of glutathione in phagocytosing human neutrophils. Blood, 55, 741.

Waites W. M. and Bayliss C. E. (1979a) The preparation of bacterial spores for evaluation of the sporicidal activity of chemicals. Society for Applied Bacteriology Technical Series N° 15 (eds. Gould, G.W. and Corry, J.E.L.) pp. 159-172. London: Academic Press.

Waites W. M. and Bayliss C. E. (1979b) The effect of changes in spore coat on the destruction of *Bacillus cereus* spores by heat and chemical treatment. J. Appl. Biochem., 1, 71-76.

Walls I. and Chuyate R. (1998) *Alicyclobacillus* – Historical perspective and preliminary characterization study. Dairy Food Environ. Sanitation, 18, 499–503.

Walls I. and Chuyate R. (2000) Isolation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from fruit juices. J. AOAC Int., 83, 1115-1120.

Weil R. (1899) Zur Biologie der Milzbrandbazillen. Arch. Hyg. Bakteriolog., 35, 355-408.

Wheeler J. L., Harrison M. A., Koehle P. E. (1987) J. Food Sci., 52, 479-480.

Williams F. T. (1936) Attempts to increase the heat resistance of bacterial spores. J. Bacteriol., 32, 589.

Williams O. B. (1929) The heat resistance of bacterial spores. J. Infect. Dis., 44, 421.

Williams O. B. and Robertson W. J. (1954) Studies on heat resistance. VI. Effect of temperature of incubation at which formed on heat resistance of aerobic thermophilic spores. J. Bacteriol., 67, 377.

Wisotzkey J. D., Jurtshuk J. R. P., Fox G. E., Deinhard G., Poralla K. (1992) Comparative sequence analyses on the 16S rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris* and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus, *Alicyclobacillus*. Gen. nov. Int. J. Syst. Bacteriol., 42, 263-269.

Wisse C. A. and Parish M. E. (1998) Isolation and enumeration of spore forming, thermo acidophilic, rod-shaped bacteria from citrus processing environments. Dairy Food Environ. Sanitation, 18, 504-509.

Yamaguchi T. and Yamashita Y. (1980) Mutagenicity of hydroperoxides of fatty acids and some hydrocarbons. Agric. Biol. Chem., 44, 1675-1678.

Yamashita M. (1996) Arukorurui no biseibutsu ni taisuru sayou. J. Antibact. Antifung. Agents, 24, 25-49.

Yamazaki K., Kawai Y., Inoue N., Shinano H. (1997) Influence of sporulation medium and divalent ions on the heat resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores. Lett. Appl. Microbiol., 25, 153-156.

Yamazaki K., Teduka H., Inoue N., Shinano H. (1996) Specific primers for detection of *Alicyclobacillus acidoterrestris* by RT-PCR. Lett. Appl. Microbiol., 23, 350-354.

Yamazaki K., Teduka H., Shinano H. (1996) Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from acidic beverages. Biosci. Biotech. Biochem., 60, 543-545.

Yokota A., Fujii T., Goto K. (2007) *Alicyclobacillus* Thermophilic Acidophilic Bacilli. Springer.

Yoshpe-Purer Y. and Eylan E. (1968) Disinfection of water by hydrogen peroxide. Health Lab. Sci., 5, 233-238.

PAGINAS DE INTERNET

www.alimentosargentinos.gov.ar (Revista Sector Alimenticio de la Dirección Nacional de Alimentación).

www.cafi.org.ar (Cámara Argentina de Fruticultores Integrados).

www.funbapa.org.ar (Fundación Barrera Zoofitosanitaria Patagónica).

www.indec.gov.ar (Instituto Nacional de Estadística y Censos).

www.sagpya.mecon.gov.ar (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos).

www.senasa.gov.ar (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria).

www.sinavimo.gov.ar (Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de Plagas).

ANEXOS

MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS

1- **“K Agar”** BioPro Premium (Biotrace International – USA)

K Agar es un medio especialmente formulado para la recuperación y cultivo de *Alicyclobacillus* spp. y organismos acidófilos.

Composición (g/l)	
Bio – Zyme peptona	5,00
Glucosa	1,00
Bio – Extracto de levadura	2,50
Tween 80	1,00
Agar	15,00

Requiere esterilización en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Enfriamiento a 48°C y ajuste de pH a $3,7 \pm 0,1$ vía adición de 8,0 mls de ácido málico (25%) esterilizado por filtración.

2- **“Plate Count Agar”** (Agar peptona de caseína-glucosa-extracto de levadura) – Merck

Composición (g/l)	
Peptona de caseína	5,0
Extracto de levadura	2,5
D (+) glucosa	1,0
Agar-agar	14,0

Requiere esterilización en autoclave a 121°C durante 15 minutos. pH del medio preparado a 25°C es $7,0 \pm 0,2$.

3- **“Potato Dextrose Agar”** (Agar patata-glucosa) - Merck

Composición (g/l)	
Infusión de patata	4,0 (infusión de 200 g patata)
D (+) glucosa	20,0
Agar-agar	15,0

Requiere esterilización en autoclave 15 minutos a 121°C. pH $5,6 \pm 0,2$ a 25°C.

4- **“BAM”** (Medio *Bacillus acidocaldarius*)

Solución A	
Extracto de levadura	1 g
Sulfato de amonio	0,2 g
Sulfato de magnesio heptahidratado	0,5 g
Cloruro de calcio dihidratado	0,25 g
Fosfato diácido de potasio	0,6 g
Agua destilada	500 ml

Requiere ajustar pH de 3,0 a 4,0.

Solución B	
Glucosa	1 g
Agar	20 g
Agua destilada	500 ml

Requiere esterilización de A y B separadamente en autoclave a 1 atm, 121°C por 15 minutos. Luego, enfriamiento a 45°C y mezcla.

5- **“Caldo D/E neutralizante”** (Acumedia manufacturers, Inc. Lansing, Michigan).

Caldo D/E para el ensayo y neutralización de antisépticos y desinfectantes.

Composición (g/l)	
Digesto enzimático de caseína	5
Extracto de levadura	2,5
Dextrosa	10
Tioglicolato de sodio	1
Tiosulfato de sodio	6
Bisulfito de sodio	2,5
Lecitina	7
Bromocresol púrpura	0,02

pH final $7,6 \pm 0,2$ a 25°C.

Requiere disolver 34 g del medio y 5 g de polisorbato 80 en 1 litro de agua purificada. Calentar con frecuente agitación y hervir por un minuto para completar de disolver el medio. Esterilización a 121°C durante 15 minutos.

6- **“AGUA DE DILUCIÓN BUFFER FOSFATO”**

a) Solución stock: consta de 34,0 g de KH_2PO_4 y 500 ml de agua de OI.

Requiere ajustar a pH $7,1 \pm 0,1$ con NaOH 1N y llevar el volumen a 1L con agua desmineralizada o de osmosis inversa. TREE TOP aconseja llevar a $7,2 \pm 0,1$.

Esterilización a 121°C durante 15 minutos y almacenamiento en heladera.

b) Solución de trabajo

Se toma 1,25 ml de la solución stock y se lleva a 1L con agua de OI.

Requiere esterilización a 121°C durante 15 minutos.

7- **“AGAR YSG”**

Composición	
Extracto de levadura	2,0 g
Glucosa	1,0 g
Almidón soluble	2,0 g
Agar	15,0 g

Requiere combinar los ingredientes y adicionar a 1 litro de agua desmineralizada. Esterilización en autoclave (15 minutos, 121°C) y luego, enfriar a 50°C. Ajustar a pH 3,7 con HCl 1N.

8- **“CALDO YSG”**

El caldo YSG es similar al agar YSG, sin el agar. El ajuste de pH es recomendado antes de autoclavar para el caldo pero no para el agar.

9- “CALDO YSG CON ÁCIDO VANILICO”

Requiere disolver 2 g de extracto de levadura, 1 g de glucosa, 2 g de almidón soluble y 100 mg de ácido vanílico en 1000 ml de agua destilada, luego ajustar el pH a $3,7 \pm 0,1$ (aprox. 550 μ l de HCl 4N).

10- “BUFFER PFTALATO HIDRÓGENO DE K (50 MM)”

10,21 g en 1000 ml de agua del MilliQ. pH inicial 4,05. Para 100 ml agregar aproximadamente 630 μ l de HCl 1N para ajustar a pH 3,5.

TÉCNICAS EMPLEADAS

COLORACIÓN GRAM

1. Se colocó sobre el frotis ya preparado cristal violeta durante 1 minuto.
2. Se lavó con agua.
3. Se trató con lugol durante 1 minuto.
4. Se lavó con agua y se escurrió bien.
5. Se decoloró con decolorante durante 30 segundos aproximadamente (hasta arrastre total del exceso de colorante). Las Gram (-) perderán el color.
6. Se lavó con agua.
7. Se coloreó con safranina durante 1 minuto.
8. Se lavó con agua y se secó en la columna de aire caliente sobre el mechero.
9. Se observó en el microscopio con objetivo de inmersión, colocando sobre el preparado coloreado una gotita de aceite de cedro.

Las bacterias que retienen la coloración violeta son Gram (+) y las que presentan una coloración rosada son Gram (-).

DETERMINACIÓN DE GUAYACOL

1. Se inocularon los aislados en caldo YSG (5 ml) conteniendo ácido vanílico.
2. Se inoculó un control positivo (*A. acidoterrestris*) y un control negativo (*A. acidocaldarius*). Se dejaron dos tubos adicionales no inoculados como controles (blanco y control guayacol).
3. Se incubaron todos los tubos en un baño de agua con agitación a $45 \pm 1^\circ\text{C}$ por 3 horas.
4. En el tubo control guayacol se adicionó 100 μl de la solución de guayacol.
5. En un tubo de ensayo estéril se colocó 2 ml del cultivo anterior, y luego se adicionó a cada tubo 1ml de buffer pftalato de pH 3,5.
6. Luego, 8,5 μl de una solución de H_2O_2 (3%).

7. 2 µl de la solución peroxidasa 5U (Novo).
8. Se mezcló el contenido de los tubos con vortex y se mantuvo a temperatura ambiente por 5 minutos.

A continuación, se evaluó el cambio de color comparando los aislados en estudio con los controles:

- Cultivo control positivo con la cepa *Alicyclobacillus acidoterrestris* (DSMZ BACT: DSM 2498) (color marrón).
- Cultivo control negativo *A. acidocaldarius* (color beige claro sin cambio).
- Blanco (color beige claro sin cambio).
- Control guayacol (color marrón muy fuerte/naranja).

COLORACIÓN DE ESPORAS

1. Se preparó el frotis en forma común y se lo fijó a la llama. Se agregó en abundancia verde de malaquita (solución 5%).
2. Se dejó actuar el colorante de 1 a 2 minutos calentando 3 a 4 veces hasta desprendimiento de vapor (que no se seque).
3. Se lavó con agua durante 25 a 30 segundos hasta eliminar el exceso de colorante.
4. Se coloreó con safranina durante 30 segundos.
5. Se lavó con agua, secó y observó con objetivo de inmersión.

Las esporas se colorean de verde y el resto de la célula de rosa salmón.

Datos correspondientes a los ensayos de resistencia térmica de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* productora de guayacol

Ensayo	Temp. (°C)	Tiempo (min.)	UFC/ml	Log UFC/ml
1	88	0	350000	5,54406804
1	88	11	24000	4,38021124
1	88	22	9900	3,99563519
1	88	30	4700	3,67209786
2	88	0	330000	5,51851394
2	88	11	19000	4,2787536
2	88	22	3900	3,59106461
2	88	30	2300	3,36172784
3	88	0	350000	5,54406804
3	88	11	60000	4,77815125
3	88	22	12000	4,07918125
3	88	30	6000	3,77815125
1	90	0	310000	5,49136169
1	90	6	45000	4,65321251
1	90	12,5	11000	4,04139269
1	90	20	3000	3,47712125
2	90	0	280000	5,44715803
2	90	6	17000	4,23044892
2	90	12,5	7700	3,88649073
2	90	20	930	2,96848295
3	90	0	280000	5,44715803
3	90	6	27000	4,43136376
3	90	12,5	18000	4,25527251
3	90	20	1200	3,07918125
1	92	0	530000	5,72427587
1	92	6,5	17000	4,23044892
1	92	10	9900	3,99563519
1	92	15	1900	3,2787536
2	92	0	370000	5,56820172
2	92	6,5	12000	4,07918125
2	92	10	4600	3,66275783
2	92	15	1500	3,17609126
3	92	0	350000	5,54406804
3	92	6,5	16000	4,20411998
3	92	10	4500	3,65321251
3	92	15	1400	3,14612804
1	95	0	290000	5,462398
1	95	4	7300	3,86332286
1	95	6	6500	3,81291336
1	95	8	1200	3,07918125
2	95	0	200000	5,30103
2	95	4	4000	3,60205999
2	95	6	3200	3,50514998
2	95	8	900	2,95424251
3	95	0	300000	5,47712125
3	95	4	7800	3,8920946
3	95	6	6700	3,8260748
3	95	8	1400	3,14612804

