

**ANÁLISIS DE RIESGO PARA LA BACTERIA
ALICYCLOBACILLUS ACIDOTERRESTRIS EN NARANJAS
(CITRUS SINENSIS) COSECHADAS EN PUERTO RICO**

POR

Ileana Iris Rivera Forestier

Tesis sometida en cumplimiento parcial de los requisitos para el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

en

CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGÜEZ
2009

Aprobado por:

Edna Negrón de Bravo, PhD
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Javier Huertas, MS
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Lynette E. Orellana, PhD
Presidenta, Comité Graduado

Fecha

María Vargas, PhD
Representante de Estudios Graduados

Fecha

Edna Negrón de Bravo, PhD
Programa de Ciencia y Tecnología de Alimentos

Fecha

ABSTRACT

Alicyclobacillus acidoterrestris is a thermoacidophilic spore forming bacteria, which has the ability to survive traditional thermal process. Several studies have found that *A. acidoterrestris* can grow at temperatures from 20 to 55 °C and pH values from 2.5 to 6.0. The ability to survive high temperature and low pH is due to their unique membrane composition that possesses ω -cyclohexane fatty acids. This bacterium has been isolated from various types of habitats, but studies showed it is commonly found in soil and water. Since its discovery, this bacterium has been associated in the spoilage of many foods, especially acidic juices, such as orange juice, apple juice and fruits blend. The presence of *Alicyclobacillus acidoterrestris* has been reported in the United States and Europe causing economic loss due to the recall of the final product. No studies have been made in Puerto Rico regarding the presence of *A. acidoterrestris* in fruit juices. The main objective of this investigation is to set the first risk assessment report regarding the incidence of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in orange juices. Orange samples were collected from a local juice processor in western Puerto Rico. The samples were divided into groups: with and without wash; to each group two different treatments were applied: heat shock versus no heat shock. K-Agar, Orange Serum Agar and Potato Dextrose Agar were used for microbiological isolation and identification. All microbiological mediums were acidified with tartaric and malic acid (pH 3.7) and incubated at 43 °C for 48 hr. Physical-chemical analyses were done to determine variations in pH, Brix and color. *A. acidoterrestris* was not isolated in orange juice from local producers in Puerto Rico under the conditions tested. No significant changes were detected in the physical chemical properties of the orange juice.

RESUMEN

Alicyclobacillus acidoterrestris es una bacteria formadora de esporas que tiene la capacidad de sobrevivir tratamientos térmicos tradicionales. Estudios han revelado que *A. acidoterrestris* puede crecer y desarrollarse a temperaturas entre 20-55 °C y a pH de 2.5-6.0. La capacidad de sobrevivir temperaturas altas y pH bajos se debe mayormente a la composición única de su membrana, la cual consiste de ácidos grasos omega ciclohexano. Esta bacteria ha sido aislada en varios tipos de ambientes, pero estudios revelan que proviene comúnmente del suelo y el agua. Desde su descubrimiento, esta bacteria ha estado asociada al deterioro de alimentos, especialmente jugos ácidos como: jugos de naranja, manzana y frutas. La presencia de *Alicyclobacillus acidoterrestris* ha sido reportado en Estados Unidos y Europa causando pérdidas económicas debido al retiro del producto. En Puerto Rico no se ha realizado estudio alguno que relacione la presencia del *A. acidoterrestris* en jugos de frutas. El objetivo principal de esta investigación fue realizar el primer avalúo de riesgo para determinar la incidencia de *A. acidoterrestris* en el jugo de naranja. Las muestras de jugos de naranja fueron provistas por una planta procesadora de jugos localizada en el área oeste de Puerto Rico. Las muestras fueron divididas en dos grupos clasificados como naranjas *lavadas* y *no lavadas*; a cada grupo se le aplicó dos tratamientos diferentes: choque térmico versus no choque térmico. Los siguientes medios de cultivo fueron utilizados para aislar e identificar la bacteria: K-Agar, Orange Serum Agar (OSA), y Potato Dextrose Agar (PDA). Todos los medios de cultivo fueron acidificados utilizando ácido málico y ácido tartárico (pH 3.7) e incubados a 43 °C por 48 horas. Pruebas fisicoquímicas fueron utilizadas para determinar variaciones en pH, grados

Brix y color. La bacteria *A .acidoterrestris* no fue recuperada en ninguno de los jugos de naranja de los procesadores locales en Puerto Rico. No se observaron cambios significativos en las propiedades fisicoquímicas del jugo de naranja.

**Derechos de Autor Reservados©
Ileana I. Rivera Forestier
2009**

DEDICATORIA

Dedico mi tesis a Dios Todopoderoso por brindarme la fortaleza de terminar esta gran labor, y a mis padres que siempre me han apoyado en todo lo que me propongo y me dan ese impulso para lograrlo.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de investigación se lo dedico a mi familia por brindarme su apoyo incondicional desde el momento que decidí continuar mi grado de maestría. Este trabajo no era posible sin el apoyo y ayuda económica brindada por mis profesores de comité. Quiero agradecer a la Dra. Lynette Orellana, presidenta del comité de tesis por su invaluable asistencia y guía durante todo el transcurso de investigación, la cual hizo que todas mis metas fueran posibles. Me gustaría expresar mi más humilde agradecimiento al Profesor Javier Huertas que fue mi mentor, guía y apoyo en los momentos de debilidad. Al Programa de Ciencia y Tecnología del Alimentos por brindarme las facilidades para realizar mi experimentos. En especial a la Dra. Edna Negrón por enseñarme que hay que luchar y trabajar arduamente para poder lograr nuestras metas. Me gustaría extender mi agradecimiento a Ivette Vissepó “Bessie” y Don Rupert por su ayuda en la parte administrativa.

A la Sra. Magaly Zapata por compartir su conocimiento sobre microbiología y permitirme utilizar el Laboratorio de Microbiología del Departamento de Biología.

Al Profesor Ernesto Riquelme por ayudarme en la preparación del análisis estadístico. Gracias por su disposición y amabilidad.

A los Productores Cítricos de la Montaña por facilitarme los recursos necesarios para realizar el estudio. En especial a Sugeyl Sepúlveda, gerente de control de calidad y Diane Ramos, gerente de ventas que siempre estuvieron a mi disposición.

Al Sr. Daniel Laó Dávila de la Red Sísmica de Puerto Rico, Dr. Miguel Muñoz y el Dr. Juan G Pérez Bolívar del Departamento de Agronomía y Suelos por brindarme información sobre la composición de los suelos de Puerto Rico.

Quiero dar las gracias al Profesor Rafael R. Montalvo y a la Profesora María Vargas del Departamento de Biología y al Profesor Fernando Pérez Muñoz por su valioso tiempo en revisar, criticar y opinar sobre mis borradores.

Agradezco a todas las personas que me ayudaron en esta investigación, los que me acompañaron y recorrieron millas para conseguir los materiales necesarios, en este caso, las naranjas. No puedo agradecerlos suficientes por su tiempo y ayuda. Me gustaría también reconocer la contribución de numerosas personas, compañeros y amigos que entregaron su tiempo, corazón y recursos para apoyarme en esta investigación. Una lista parcial incluye: Yaritza Ramos, Lurdes Siberio, Minerva Rivera, María C. Padilla y Héctor Sánchez.

No existe nadie más importante que mis padres, los cuales me han enseñado que con perseverancia podemos lograr todo lo que nos trazamos en la vida. Estaré eternamente agradecida a Rafael “Rafy” Alfonso Bonilla por estar a mi lado por largas horas de trabajo y brindarme el apoyo necesario para terminar con esta investigación. A mi querida prima Ingrid Forestier por mantenerme siempre alegre en los momentos difíciles. Finalmente agradezco a nuestro Creador por su bendición e inspiración en lograr concluir este trabajo de investigación.

Tabla de Contenido

ABSTRACT.....	ii
RESUMEN.....	iii
DEDICATORIA.....	vi
AGRADECIMIENTOS.....	vii
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Justificación.....	1
1.2 Objetivos.....	5
2 REVISIÓN DE LITERATURA	6
2.1 Estudios Previos al Aislamiento de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	6
2.2 Características de Crecimiento de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	8
2.3 Posibles Fuentes de Contaminación de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> en Jugos de Naranja	10
2.4 Factores que afectan la producción de espора por <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	10
2.4.1 Agentes Físicos	10
2.4.2 Agentes Químicos	11
2.4.3 Agentes antimicrobiales naturales	11
2.5 Valor Decimal (D) de Muerte Termal	12
2.6 Reportes de Contaminación Asociados a <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	12
2.7 Producción de metabolitos secundarios: Guaiacol (<i>2-methoxyphenol</i>)	13
2.8 Pruebas Bacteriológicas para la detección de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> en jugos de frutas.....	14
3 MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1 Colección de muestras de naranjas.....	16
3.2 Preparación de Medios de Cultivos	18
3.3 Análisis Microbiológico en Jugo de Naranja Valencia (Figura 2)	18
3.4 Pruebas Microbiológicas en Jugo de Naranja Valencia Inoculados con <i>A. acidoterrestris</i>	20
3.4.1 Activación de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	20
3.4.2 Curva de Crecimiento	20
3.4.3 Inóculo de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> en Jugos de Naranja Valencia	21
3.5 Pruebas de Cambios Físicoquímicos.....	21
3.5.1 Determinación de pH	21

3.5.2	Determinación de Sólidos Solubles	22
3.5.3	Determinación de Color	22
3.6	Análisis Estadístico	23
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
4.1	Curva de Crecimiento de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	26
4.2	Resultados Jugos de Naranja Valencia Inoculados con <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> (ATCC 49025)	26
4.3	Factores que pueden Influenciar la Ausencia de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> en los jugos de naranja de Puerto Rico.....	29
4.4	Análisis Estadístico	32
4.4.1	Resultados de Pruebas Fisicoquímicas	32
5	CONCLUSIÓN	34
6	RECOMENDACIONES	35
7	BIBLIOGRAFÍA	36
8	APÉNDICE	41

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características de Crecimiento y Zonas Geográficas para <i>A. acidoterrestris</i>	9
Tabla 2. Valor de Muerte Termal para <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	13
Tabla 3. Resultados de Pruebas Microbiológicas para la detección de <i>A. acidoterrestris</i>	25
Tabla 4. Resultados de Recuento de Colonias Presente en Jugo de Naranja Inoculado con <i>A. acidoterrestris</i>	27
Tabla 5. Resultados de <i>p</i> -valor según tratamiento aplicado a través de los días de almacenamiento	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de Flujo: Condiciones de Procesamiento	17
Figura 2. Diagrama de Flujo: Pruebas Microbiológicas	19
Figura 3. Curva de Crecimiento de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	26
Figura 4. Características macroscópicas y microscópicas de <i>A. acidoterrestris</i> (ATCC 49025) inoculada en jugos de naranja Valencia, (a) Cepa de ATCC 49025 y (b) Gram positivo en microscopio de luz	28

LISTA DE APÉNDICE

Apéndice 1. Ingreso Bruto Agrícola de Naranjas en Puerto Rico	41
Apéndice 2. Equipos utilizados para la detección de <i>A. acidoterrestris</i>	42
Apéndice 3. Empaque de Jugos de Naranja Inoculados con <i>A. acidoterrestris</i> y almacenados a temperaturas de 0, 4 y 25° C por 48 horas.....	43

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Justificación

La fruta más consumida a nivel mundial es la naranja (*Citrus sinensis*). Actualmente la producción mundial de frutas cítricas es de 67.63 millones de toneladas, de los cuales el 71% son naranjas. Los países de mayor producción de naranja son Brasil y Estados Unidos; donde más de un cuarto de la producción de naranja es cultivada en los Estados Unidos (Salunkhe y Kadam, 1995). El cultivo de cítricos es uno de los más importantes en Puerto Rico ya aporta grandemente a la economía del país. En los últimos veinte años el ingreso bruto anual de este cultivo ha aumentado gradualmente. Dentro del grupo de cítricos en Puerto Rico, la naranja ocupa el segundo lugar de mayor ingreso económico agrícola. Para el año 2005/06 se produjeron 138,969 millares de naranja contribuyendo en alrededor de 10,263 millones de dólares (Departamento de Agricultura de Puerto Rico, 2006) (Apéndice 1). La mayoría de esta producción se vende como fruta fresca y la otra parte se utiliza para la elaboración de jugos. Por lo tanto, la industria de jugos de naranja también tiene un rol significativo dentro de la economía puertorriqueña.

El consumo de jugos derivados de naranja ha estado en aumento a través de los últimos años. Junto a esto vienen las exigencias de los consumidores, los cuales exigen alimentos de alta calidad e inocuo para consumo. Un alimento de alta calidad e inocuo para consumo es aquel que mantiene su frescura y sabor durante el largo de vida útil del alimento. Además, estos alimentos deben estar libres de microorganismos responsables de transmitir enfermedades y/o causar deterioro. El deterioro causado por microorganismos tiende a cambiar las propiedades organolépticas de los jugos,

convirtiéndose así en no aceptables para el consumidor. Es por esta razón que es importante conocer y detectar con rapidez cualquier tipo de microorganismo que pueda causar pérdidas económicas.

El jugo de naranja es uno de gran importancia como fuente de vitamina C. Las nuevas tendencias del consumidor para obtener nutrientes esenciales en su dieta, como la vitamina C hacen que este tipo de producto sea más solicitado. Mucho del enfoque nutricional hoy día va dirigido a alimentos que sean mínimamente procesados y con menos preservativos químicos. Por lo tanto, el consumidor está exigiendo que el producto final conserve las propiedades naturales de la fruta a la hora de consumirlo. La mayoría de los jugos de naranja pasan por procesos térmicos para reducir su carga microbiana. En ocasiones estos tratamientos no son suficientes para que un alimento sea considerado libre de microorganismos y/o estéril. Algunos de los estudios mencionan bacterias y hongos como microorganismos capaces de resistir tratamientos tradicionales como la pasteurización (Jay, 2003).

Las procesadoras de jugos tienen parámetros establecidos para elaborar productos que cumplan con los requisitos exigidos por las agencias federales. Por ejemplo, la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA, 2009) requiere el uso de una tecnología o tratamiento para lograr una reducción mínima de 5-log para microorganismos mas resistentes que representen un peligro a la salud publica. Algunos alimentos aunque se produzcan bajo buenas prácticas de manufactura pueden contener microorganismos que no representan un peligro a la salud, pero sí un peligro a la calidad del producto final. Muchos de los microorganismos poseen habilidades de modificar su resistencia a través de nuevas

generaciones. Por ejemplo, existen microorganismos que han desarrollado la capacidad de resistir tratamientos tradicionales como la pasteurización. Condon y Sala (1992) demostraron que *Bacillus subtilis* tiene un amplio rango de resistencia térmica dependiendo del pH del alimento. Este microorganismo aunque no es catalogado como patógeno en algunas ocasiones ha causado envenenamiento al ser humano (Doyle et al, 2001).

La industria de jugos utiliza el proceso de pasteurización HTST, por sus siglas en inglés (“High Temperatura Short Time”) consiste en la aplicación de calor a 72 °C por 15 segundos. La mayoría de estos procesos no están diseñados para bacterias termofílicas formadoras de esporas, las cuales pueden estar latentes por un tiempo prolongado. Muchas de las bacterias termofílicas formadoras de esporas pueden ser controladas por un ambiente ácido (Splittstoesser et al., 1994). *Clostridium botulinum* es una bacteria formadora de esporas de gran importancia industrial ya que puede sobrevivir altas temperaturas. Sin embargo, Blotcher y Busta (1983) demostraron que ésta no sobrevive el tratamiento térmico en ambientes con pH bajos (<4.6). En los últimos años han surgido nuevas preocupaciones sobre la transformación de microorganismos que sobreviven altas temperaturas y ambientes ácidos. Por ejemplo, estudios realizados por Caggia y colaboradores (2008) demuestran que la bacteria *Listeria monocytogenes* gana resistencia luego de varios procesos de adaptación a pH bajos. Esta bacteria puede crecer en jugos de naranja con un pH ácido de 2.6.

En los últimos años, los microbiólogos de alimentos han creado conciencia sobre la bacteria formadora de esporas, *Alicyclobacillus acidoterrestris*, la cual puede ser un problema durante la pasteurización de jugos. Esta bacteria tolera el ácido y el calor permitiéndole sobrevivir las condiciones de pasteurización, lo cual excluye la mayoría de otras bacterias (Doyle et al, 2001). Un estudio realizado por Splittstoesser y colaboradores (1994) demostró que la bacteria *A. acidoterrestris* puede crecer a pH de 2.5 y sobrevivir temperaturas altas ($D_{90} = 23$ minutos). *Alicyclobacillus acidoterrestris* es una bacteria termoacidófila, no patogénica. El deterioro en jugos es causado por la sobrevivencia de las esporas del microorganismo a tratamientos térmicos. El tratamiento térmico activa la germinación de las esporas, causando problemas de contaminación varios días después del empaque. El único signo distintivo de la presencia de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en jugos de frutas es la producción del metabolito secundario conocido como guaiacol. Este metabolito secundario puede producir mal sabor y olor al producto final. Las quejas del consumidor asociado al deterioro del producto pueden traer por consecuencia su retiro inmediato del mercado. Las procesadoras de jugos en Estados Unidos están exigiendo a sus manufactureros que se realicen pruebas para detectar *Alicyclobacillus acidoterrestris* antes de que lleguen a las plantas de procesos. Muchos manufactureros no han podido cumplir con estas demandas ya que este microorganismo es difícil de identificar (Parish y Goodrich, 2005; Jensen, 1999). Casos como este pueden crear problemas en la industria de jugos de naranja puertorriqueñas ya que poco se conoce sobre su procedencia.

1.2 Objetivos

El propósito general de esta investigación fue determinar la incidencia de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en naranja cultivada y cosechada en Puerto Rico para contribuir con nueva información acerca de la transmisión y riesgos asociados a este microorganismo. Para este primer objetivo se evaluaron jugos de naranja obtenidos de la procesadora de *Productos Cítricos del Oeste* en Puerto Rico. Como objetivos específicos se realizaron diferentes pruebas microbiológicas y fisicoquímicas a jugos de naranja procesados bajo diferentes condiciones de producción. Los resultados obtenidos de esta investigación brindan nuevos parámetros de información para las plantas procesadoras de Puerto Rico.

2 REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Estudios Previos al Aislamiento de *Alicyclobacillus acidoterrestris*

Uchino y Doi (1967) aislaron una bacteria acidotermofílica de aguas termales de Japón, la cual se parecía a un *Bacillus coagulans*. Estos autores reportaron que la bacteria podía crecer en ambientes con alta temperatura y alta acidez. Darland y Brock (1971) hicieron estudios de una bacteria similar que clasificaron como *Bacillus acidocaldarius*. Estos últimos sugirieron que la bacteria que estudiaron era la misma que Uchino y Doi habían aislado. Hippenchen y colaboradores (1981) reportaron una bacteria similar a la aislada por Uchino (1967) y Darland (1971), pero con características y propiedades bioquímicas diferentes a *B. acidocaldarius*.

En 1984 Cerny y colaboradores reportan la primera incidencia de una bacteria acidofílica formadora de spora en jugos de manzanas. Este microorganismo presentaba las mismas características reportadas por Hippenchen y colaboradores (1981). Deinhard y colaboradores (1987) continuaron investigando la bacteria aislada por Cerny y propusieron el nombre de *Bacillus acidoterrestris* por su procedencia de ambiente ácidos y suelos. En 1992 se realizó un análisis de comparación genética y se encontró que la especie aislada por Cerny tenía una composición de la membrana diferente a las del género *Bacillus*. Wisotzkey y colaboradores (1992) propusieron colocar esta bacteria en un género nuevo y diferente al que llamaron *Alicyclobacillus*. El nombre “*Alicyclo*” proviene por su composición de membrana lípida compuesta mayormente de ácidos grasos omega ciclohexano y “*bacillus*” por su cercanía en material genético al género *Bacillus* (Wisotzkey et al, 1992). La especie entonces

conocida como *Bacillus acidoterrestris* ahora se conoce como *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

Splittstoesser y colaboradores (1994) aislaron a una bacteria acidotermofílica formadora de espora en jugos de manzana. Pontius y colaboradores (1998) identificaron esta bacteria como *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Sin embargo, Yamazaki y colaboradores (1996) aislaron e identificaron *A. acidoterrestris* en bebidas ácidas. De las cinco especies aisladas por Yamazaki, cuatro obtuvieron una similitud en DNA de 98.0 % a *A. acidoterrestris*. Estudios realizados Pettipher y colaboradores (1997) reportan que *A. acidoterrestris* puede sobrevivir y proliferar luego de la pasteurización en jugos de naranja y manzana. La identificación de bacterias pertenecientes al género de *Alicyclobacillus spp.* sigue en aumento a través de diferentes tipos de alimentos y países.

De acuerdo con la literatura, el microorganismo del género *Alicyclobacillus ssp.* era clasificados como *Bacillus* por poseer características similares a *Bacillus coagulans* (Uchino y Doi, 1967). Solo se habían reportado dos especies de este género: *Alicyclobacillus acidoterrestris* y *Alicyclobacillus acidocaldarius*. Otras especies han sido aisladas en diferentes partes del mundo tales como: *A. cycloheptanicus*, *A. acidiphilus*, *A. herbarius*, *A. hesperidium*, *A. pomorum*, *A. sendaiensis* y *A. vulcanalis*. *Alicyclobacillus spp.* ha sido identificado en casi todos los continentes incluyendo suelos en la Antártica (Nicolaus, 1998). De estas especies solo *Alicyclobacillus acidoterrestris* era asociado como causante de deterioro en alimentos.

2.2 Características de Crecimiento de *Alicyclobacillus acidoterrestris*

Alicyclobacillus acidoterrestris es un bacilo Gram positivo, aerobio y aerobio facultativo (Wisotzkey et al, 1992). La colonia de esta bacteria se detecta luego de 48 horas de incubación. Por lo general, las colonias se presentan de forma redonda, entre 3 a 5 mm de diámetro, color crema blanco desde translúcido a opaco. La bacteria tiene la capacidad de formar esporas subterminales y terminales (Walls y Chuyate, 1997; Chang y Kang, 2004).

Varios autores en estudios independientes aislaron *A. acidoterrestris* en diferentes regiones geográficas y encontraron propiedades de crecimiento similares. Estos estudios reportaron diferentes rangos de crecimiento entre 20 hasta 60 °C. No obstante, la temperatura óptima de crecimiento reportada es de 43 °C. La tabla 1 presenta datos relacionados al crecimiento de esta bacteria proveniente de varios estudios. La habilidad que tiene este microorganismo de crecer a temperaturas altas se ha asociado a la presencia de ácidos grasos omega-ciclohexano como componente principal en la membrana (Chang y Kang, 2004). Kannenberger y colaboradores (1984) demostraron que bacterias que poseen ácidos grasos omega-ciclohexano pueden estabilizar y mantener un equilibrio de difusión en la membrana cuando ocurra un cambio adverso.

Alicyclobacillus acidoterrestris es negativo a la reacción de Voges-Proskauer, reducción de nitrato y producción de indol, pero es positivo a la reacción de catalasa. Además, la bacteria produce ácidos luego de fermentar carbohidratos (Belvilacqua et al, 2008).

Tabla 1. Características de Crecimiento y Zonas Geográficas para *A. acidoterrestris*

Tipo de Cepa (AA ^b)	Temperatura Crecimiento (°C)	pH Crecimiento	Fuente Alimento	Región Geográfica	Referencia
VF	16 – 25				
WAC	Menos de 25	3.5 – 4.0	Jugo de manzana y uvas blancas	Estados Unidos	Splitstoesser et al, 1994
AB-1, 2, 3, 4 y 5	25 – 60	2.5 – 6.0			
ATCC 49025	35 - 55	2.2 – 5.8	Bebidas ácidas, jugo de frutas y zanahoria con frutas	Japón	Yamazaki et al, 1996
NR ^a	25 – 55	3.5 – 5.2	Jugos de manzana	Estados Unidos	Walls y Chuyate, 1997
NR	25 – 44	NR	Jugo de naranja, manzana y bebidas no carbonatadas con base de frutas	Inglaterra	Pettipher et al, 1997
NR	19.5 – 58	2.5 – 6.0	Jugo de mezcla de frutas	Australia	Jensen y Whitfield, 2002
NR	35 – 42	3.5 – 4.5	Jugo de Pera	Italia	Sinigaglia et al, 2003
NR ^a = No Reportado AA ^b = <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>					

La literatura reporta que *Alicyclobacillus acidoterrestris*, además de resistir temperaturas altas, también puede crecer en rangos amplios de pH (ver Tabla 1). En este caso no es la membrana compuesta de lípidos lo que le otorga esta capacidad sino la composición de proteína dentro de su membrana. Esta proteína es bastante estable y permite que se establezca a pH bajos (Harrichandparsad, 2007). El primer reporte realizado por Deinhard y colaboradores (1987) demostró que *Alicyclobacillus acidoterrestris* crecía en un pH entre 2.5 a 6.0, pero su pH óptimo se encuentra entre 3.0 y 5.5 (Pinhatti et al, 1997).

2.3 Posibles Fuentes de Contaminación de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en Jugos de Naranja

Alicyclobacillus acidoterrestris es una bacteria que se encuentra comúnmente en suelos. Groenewald y colaboradores (2008) investigaron el suelo de cultivo de frutas y una procesadora de jugos en África del Sur. Estos investigadores encontraron que *Alicyclobacillus acidoterrestris* estaba presente en el suelo de cultivo, en el agua para lavado y en el concentrado de jugo de frutas. Según Chang y Kang (2004) las frutas utilizadas para la manufactura de jugos pueden contaminarse por una microflora primaria o secundaria. La flora primaria se adhiere a la superficie de la fruta debido a las fuerzas de interacción entre la superficie de la planta y la estructura de la pared celular del microorganismo. La flora secundaria es influenciada por factores externos tales como: el suelo, viento, lluvia, riego o animales, que la depositan en la superficie de la fruta (Chang y Kang, 2004).

2.4 Factores que afectan la producción de espora por *Alicyclobacillus acidoterrestris*

La mayoría de las bacterias formadoras de esporas pierden su resistencia con tratamiento térmicos y en ambientes ácidos, pero este no es el caso para *Alicyclobacillus acidoterrestris*. A continuación se describen los factores que afectan su crecimiento:

2.4.1 Agentes Físicos

Tratamientos térmicos a temperaturas entre 60 a 80 °C favorecen la activación de esporas de *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Pettipher y colaboradores (1997) demostraron que sólo es necesario aplicar un tratamiento térmico de 80 °C por

10 minutos para activar esta espora. Estudios similares hechos por Terano y colaboradores (2005) demostraron que la espora puede resistir temperaturas de 80 °C por 20 minutos. Sin embargo, temperaturas más altas de 80 °C desfavorecen la activación de la espora. Silva y colaboradores (1999) demostraron que temperaturas entre 85 a 97 °C afectan grandemente la resistencia térmica de la espora de la bacteria.

2.4.2 Agentes Químicos

La aplicación de benzoato de sodio y sorbato de potasio sirve para inhibir el crecimiento de bacterias Gram positivo, incluyendo *Alicyclobacillus acidoterrestris* (Komitopoulou et al, 1999). Walker y Phillips (2008) observaron que 0.1 mg/mL de benzoato de sodio y sorbato de potasio inhibió el crecimiento de esta bacteria 1 log cfu/mL y 4 log cfu/mL utilizando 0.5 mg/mL.

2.4.3 Agentes antimicrobiales naturales

La combinación de químicos con otros tipos de tratamientos se ha utilizado por varios años como tecnología de obstáculos. Estudios realizados por Grande y colaboradores (2005), utilizan el agente antimicrobial natural enterocin AS-48 en jugos frescos de manzana y naranja a una concentración de 2.5 µg/mL, el cual inhibió el crecimiento células viables en 24 horas. Durante 14 días de monitoreo se mantuvo un conteo bacteriano en menos de 20 cfu/mL. En jugos comerciales de naranja no se detectó ninguna célula durante 90 días de almacenamiento (Grande et al, 2005).

La adición de nisina en jugos de naranja también exhibe una propiedad antimicrobial (Yamazaki et al, 2000). Luera y colaboradores (2000) encontraron que la

nisina a una concentración de 100 IU/ml en jugos de naranja disminuyó la resistencia térmica entre 21 y 29 % en combinación con un tratamiento térmico entre 92 y 102 °C.

2.5 Valor Decimal (D) de Muerte Térmica

En un estudio realizado por Uboldi y colaboradores (1999) demostró que el valor decimal variaba dependiendo la cepa de *A. acidoterrestris*. El valor decimal reportado por Uboldi y colaboradores (1999) para tres diferentes cepas de *A. acidoterrestris* estuvo entre los rangos de 60.8 - 94.5 minutos, 10.0 - 20.6 minutos y 2.5 - 8.7 minutos para temperaturas de 85, 90 y 95 °C, respectivamente. La tabla 2 presenta varios estudios independientes donde se ha evaluado el valor decimal para *A. acidoterrestris* en diferentes tipos de sustratos. El valor D obtenido por Komitopoulou y colaboradores (1999) demostró que la cepa Z CRA 7182 de *A. acidoterrestris* dentro de jugo de naranja puede sobrevivir altas temperaturas ya que necesitó un tratamiento térmico de 90 °C por 10.3 minutos para destruir aproximadamente 90 % de su población. Estos valores indican que el tratamiento de pasteurización convencional a 72 °C por 15 segundos no es suficiente para eliminar las cepas de esta bacteria.

2.6 Reportes de Contaminación Asociados a *Alicyclobacillus acidoterrestris*

Algunos estudios demuestran que *Alicyclobacillus acidoterrestris* puede crecer en jugos de manzana, uvas blancas, naranja u otros. La bacteria ha sido aislada en líneas de proceso de alimentos cítricos y bebidas derivadas de naranja (Wisse y Parish, 1998). El primer incidente fue reportado en Alemania para 1984 (Cerny et al, 1984). En Estados Unidos se han reportado varios incidentes en jugos de pera, uvas blancas (Witthuhn et al, 2007) y manzana (Lee et al, 2007). Japón, Inglaterra y Australia han

reportado casos de contaminación en diferentes tipos de jugos (Tabla 1). Sin embargo, este microorganismo no crece en jugos derivados de uvas rojas debido a la presencia de ciertos compuestos fenólicos presentes en las uvas rojas, los cuales inhiben su crecimiento (Splittstoesser et al, 1994).

Tabla 2. Valor de Muerte Termal para *Alicyclobacillus acidoterrestris*

Tipo de Cepa (AA ^a)	pH	Temperatura (°C)	Valor D	Fuente Alimento	Referencia
VF	3.5	85 90 95	56 ± 14 min 23 ± 7.5 2.8 ± 0.7		
WAC	3.3	85 90 95	57 ± 13 min 16 ± 4.1 2.4 ± 0.9	Jugo de manzana y uvas blancas	Splittstoesser et al, 1994
VF WAC IP	3.1	97	54.3 min 53.2 32.6	Modelo jugo (12 % glucosa + ácido)	Pontius et al, 1997
DSM2498	NR ^b	85 90 95	50.0 min 16.9 2.7	Jugos de naranja	Ulbodi et al, 1999
Z CRA 7182	3.9	85 90 95	54.3 ± 0.42 min 10.3 ± 0.30 3.59 ± 0.04	Jugos de naranja	Komitopoulou et al, 1999
NCIMB13137	NR	95	3.82 ± 0.96 min hasta 5.59 ± 0.96	Néctar de Cupaçu	Viera et al, 2002
AA ^a = <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> NR ^b = No Reportado					

2.7 Producción de metabolitos secundarios: Guaiacol (2-methoxyphenol)

El deterioro causado por *A. acidoterrestris* en jugos no se puede observar a simple vista ya que este no produce CO₂ u otros gases, ni turbidez. Por lo general, la apariencia del producto parece normal, pero contiene aromas peculiares descritos

como fenólicos o medicinales (Orr et al, 2000). Esta bacteria produce un metabolito secundario conocido como guaiacol. Este compuesto químico puede ser considerado positivo o negativo por sus contribuciones al sabor. En algunos alimentos procesados es utilizado como saborizante. Por ejemplo, en el café Arábico, guaiacol promueve un sabor rostizado (Chang y Kang, 2004). En otros casos como en jugos y productos fermentados puede producir sabores no aceptables. El aroma se puede detectar a una concentración de 2 ppm en jugos de frutas (Pettipher et al, 1997). En jugos de naranja y manzana se puede detectar cuando existe una concentración de 10^5 células/mL de *Alicyclobacillus acidoterrestris* (Pettipher et al, 1997). La detección de estos aromas se puede realizar por medio de un análisis instrumental. Estos estudios cuantitativos se pueden realizar utilizando un cromatógrafo de gas acoplado a un espectrofotómetro de masa. Gocmen y colaboradores (2004) identificaron estos aromas medicinales y fenólicos en jugos de naranja inoculados con *Alicyclobacillus acidoterrestris* y almacenados durante 28 días a una temperatura de 45 °C.

2.8 Pruebas Bacteriológicas para la detección de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en jugos de frutas

Diferentes tipos de medios selectivos se han creado para la detección de *Alicyclobacillus acidoterrestris*, pero solo algunos demuestran obtener un mayor recuento de colonias. Entre los más utilizados se encuentran: K-agar, OSA (“Orange Serum Agar”) y PDA (“Potato Dextrose Agar”). Pettipher y colaboradores (1997) detectaron *Alicyclobacillus acidoterrestris* en jugos de naranja y manzana pasteurizados utilizando como medio selectivo OSA. Por otro lado, Walls y Chuyate (2000) compararon varios medios para ver si agar-K era apropiado para aislar esporas

de *A. acidoterrestris*. Estos confirmaron que agar-K tuvo el mayor recuento de colonias que OSA y PDA a una temperatura de incubación de 43 °C. Witthuhn y colaboradores (2007) demostraron que PDA (pH 3.7) y OSA (pH 5.5) eran los medios más apropiados para la detección y aislamiento de esta bacteria. La Asociación Americana de Salud Pública recomienda el uso K-agar (pH 3.7) a una temperatura de incubación de 43 °C (Murray et al, 2007). La acidificación de estos medios es recomendable para crear un ambiente óptimo de crecimiento. Los medios son mayormente acidificados con ácido málico o ácido tartárico para obtener un pH entre 3.5 y 4.0 (Chang y Kang, 2004).

Alicyclobacillus acidoterrestris es una bacteria termofílica, la cual no crece rápidamente a temperaturas mesofílicas, por ende necesita temperaturas altas entre 42 a 53 °C (Jensen, 1997). Muchas investigaciones sugieren aplicar un tratamiento térmico entre 60 y 80 °C por 10 a 20 minutos para activar la esporulación en casos de que las muestras a analizar contengan bajos números de esporas. Ulbodi y colaboradores (1999) recuperaron esporas cuando aplicaron un tratamiento térmico de 70 °C por 20 minutos a jugos de naranja. Por otro lado, Walls y Chuyate (2000) sugieren que al aplicar un tratamiento térmico a 80°C por 10 minutos se obtiene una alta recuperación de esporas.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Colección de muestras de naranjas

Durante el periodo de abril a julio de 2007, se recolectaron diez muestras, cada muestra contenía 30 naranjas Valencia. Estas muestras fueron provistas por la procesadora de Productos Cítricos del Oeste en Lares, Puerto Rico. La procesadora está asociada a 311 agricultores, los cuales se concentran mayormente en la parte oeste de Puerto Rico. La procesadora de Producto Citricos del Oeste procesa el 90% del cultivo de naranja para el consumo en forma de jugo. El otro 10% se destina solamente a la venta de la fruta en su estado fresco. Las muestras fueron divididas en dos grupos clasificados como naranjas *lavadas* y *no lavadas*. El tratamiento de lavado de naranja fue llevado a cabo dentro de la procesadora de Productos Cítricos del Oeste. Esta procesadora utiliza el detergente “General Cleaner” (Oakite®) para el lavado de naranjas. Debido a que esta bacteria proviene mayormente del suelo, el lavado fue realizado para observar si había alguna diferencia en carga microbiana entre la naranja lavadas y no lavadas. Todas las naranjas fueron recogidas a la entrada de la planta procesadora. Las naranjas fueron transportadas al laboratorio de empaque del Departamento de Ingeniería Agrícola y Biosistemas del Recinto Universitario de Mayagüez donde fueron procesadas para la extracción del jugo. Esta extracción se hizo con una exprimidora de naranjas (Zummito), muy similar a la utilizada dentro de la procesadora de Productos Cítrico del Oeste (Apéndice 2). Para el procedimiento se procedió a extraer dos litros de jugo por cada grupo de muestras (lavadas y no lavadas). Cada dos litros de jugo extraído fueron colocados en matraces Erlenmeyer de cuatro litros. Dos de estos matraces fueron colocados en un baño con recirculación

(Modelo RM6-Brinkmann BGW Lauda) y se les aplicó un tratamiento térmico de 80°C por 10 minutos para activar cualquier espora presente (Witthuhn et al, 2007, Walls y Chuyate, 2000 y Pettipher et al, 1997). Si la espora es activada aumenta la capacidad de sobrevivencia por lo que puede aumentar recuperación de *A. acidoterrestris* en los jugos de naranja. También al aplicar un tratamiento térmico eliminamos cualquier otro tipo de competencia microbiana que pueda estar presente en el jugo de naranja, tales como levaduras o bacterias ácido lácticas (Yokota et al, 2007).

No se le aplicó ningún tratamiento térmico a los otros dos matraces. De cada matraz se empacaron 20 muestras de 100 mL de jugo en bolsas plásticas (FoodSaver Plastic Bags modelo T150-00011-002). Las bolsas fueron empacadas al vacío utilizando la máquina FoodSaver Home Vacuum Packaging System Signature Series V845. Todas las muestras fueron almacenadas a temperatura de refrigeración (4 °C) por 0, 4, 8, 13 y 25 días para luego ser analizadas en el laboratorio de microbiología de alimentos localizado en Edificio Piñero del Recinto Universitario de Mayagüez (Apéndice 3).

Figura 1. Diagrama de Flujo: Condiciones de Procesamiento



3.2 Preparación de Medios de Cultivos

Para optimizar la detección de *Alicyclobacillus acidoterrestris* se utilizaron tres medios selectivos según reportados en la literatura: Kirin Agar (KA), Potato Dextrose Agar (PDA) (Walls y Chuyate, 2000) y Orange Serum Agar (OSA) (Pettipher et al, 1997). Los medios OSA y PDA fueron preparados según las instrucciones sugeridas por su fabricante. El K-agar fue preparado siguiendo las indicaciones establecidas por Walls y Chuyate (1997). Fue necesario ajustar la acidez de cada medio utilizado. El KA se ajustó a un pH de 3.7 utilizando ácido málico al 25%. El pH de los medios OSA y PDA se ajustó con ácido tartárico al 10% hasta llegar a 3.7. Además, de los medios selectivos se preparó un medio general Plate Count Agar (PCA) sin acidificar. Este se utilizó para observar si los jugos contenían alguna otra bacteria que no fuese la estudiada y de estar presente *A. acidoterrestris* estimular su crecimiento. Luego de dos días de incubación se le añadió al PCA una capa adicional de KA para promover un crecimiento selectivo. Todos los medios fueron esterilizados en una autoclave (Tuttnauer Brinkmann 3850E) a 121 °C por 15 minutos antes de añadirles el ácido.

3.3 Análisis Microbiológico en Jugo de Naranja Valencia (Figura 2)

Las muestras previamente empacadas y almacenadas por 0, 4, 8, 13 y 25 días fueron analizadas tomando 25 mL de jugo y colocándolo en 225 mL de agua peptonada al 0.1%. Para cada día de análisis se tomó una muestra de cada uno de los tratamientos aplicados al jugo: *lavado/no lavado* y *choque térmico/no choque térmico*. Se realizó una dilución seriada de 10^1 hasta 10^6 para obtener un recuento de colonias presentes en el jugo de naranja.

De cada dilución se inoculó 0.1 mL en los medios: K-agar, Potato Dextrose Agar y Plate Count Agar. Esto se realizó por duplicado utilizando la técnica de vertido en plato. Los tres medios fueron incubados a 43 °C por 48 horas siguiendo las recomendaciones de estudios previos con esta bacteria (Walls y Chuyate, 2000; Pettipher et al, 1997). La presencia de colonias redondas color crema fueron indicativo de la posible presencia de *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

Para determinar solamente presencia de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en jugos de naranja se utilizó el medio OSA siguiendo el método establecido por Pettipher y colaboradores (1997). El método utilizado fue el siguiente:

- El jugo previamente almacenado a 4 °C fue colocado en una incubadora a 43°C por 48 horas.
- El jugo pre incubado fue inoculado en el medio OSA utilizando la técnica de estriado en plato.
- Todos los medios inoculados con el jugo de naranja fueron incubados a 43 °C y examinados a las 48 horas.
- Se examinaron colonias redondas color crema
- Se realizó una tinción Gram para verificar que éste fuese un bacilo Gram positivo.

Figura 2. Diagrama de Flujo: Pruebas Microbiológicas



3.4 Pruebas Microbiológicas en Jugo de Naranja Valencia Inoculados con *A. acidoterrestris*

3.4.1 Activación de *Alicyclobacillus acidoterrestris*

Para corroborar que los métodos utilizados en esta investigación eran los adecuados una cepa de *Alicyclobacillus acidoterrestris* (ATCC 49025) fue inoculada en los medios de KA, PDA y OSA. También fue inoculada en los jugos de naranja Valencia cosechados en Puerto Rico. La bacteria deshidratada fue activada siguiendo las instrucciones establecidas por el American Type Culture Collection (ATCC®). Se preparó un caldo de enriquecimiento siguiendo el mismo procedimiento utilizado por Walls y Chuyate (1997), en el cual se utilizaron los mismos compuestos el medio Kirin Agar, excepto que no se le añadió agar (Difco). Este caldo fue acidificado utilizando 25% ácido málico hasta llegar a un pH de 3.7. La cepa ATCC 49025 fue inoculada en el K-broth y se colocó en una incubadora con agitación (Brinswick Scientific C24 Incubator Shaker) a 43 °C por 48 horas a una velocidad de 150 rpm. Del K-broth se transfirió 1 mL al medio K-Agar, el cual fue incubado a 43 °C por 48 horas. Las colonias presentes en el medio K-agar fueron estriadas a los medios: PDA, OSA y KA. Se realizó una tinción Gram para corroborar su arreglo morfológico.

3.4.2 . Curva de Crecimiento

Se preparó un inóculo puro de la bacteria *A. acidoterrestris* 18 horas antes de tomar la primera lectura en el espectrofotómetro UV (Genesys 6) (Apéndice 2). El caldo K-agar sin inocular se utilizó para calibrar el equipo.

La cantidad necesaria de concentración bacteriana (mL) para empezar la curva de crecimiento se determinó utilizando la siguiente fórmula:

$$\frac{DO \text{ deseado}}{DO \text{ real}} \times \left(\frac{\text{mL caldo o jugo}}{\text{a inocular}} \right) \quad (3.1)$$

Donde, DO es la densidad óptica. La densidad óptica deseada es 0.025, este valor es constante. La densidad óptica real se determinó tomando 1 mL del inóculo pre incubado y evaluando la absorbancia en un espectrofotómetro UV. El largo de onda utilizado fue de 600 nm. Se tomó una lectura de absorbancia cada 30 minutos por 30 horas.

3.4.3 Inóculo de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en Jugos de Naranja Valencia

Se inoculó 67 ml de la cepa de *A. acidoterrestris* (ATCC49025) dentro de 1 L de jugos de naranjas Valencia. El jugo inoculado fue empacado en varias bolsas plásticas con 50 mL de jugo en cada una de ellas. Estos empaques fueron almacenados a temperaturas de 0, 4 y 25 °C por 12, 24 y 48 horas para luego realizar pruebas microbiológicas.

3.5 Pruebas de Cambios Físicoquímicos

Se utilizaron las muestras de jugos previamente empacadas y almacenadas por 0, 4, 8, 13 y 25 días a 4 °C para las pruebas físicoquímicas que se describen a continuación:

3.5.1 Determinación de pH

Se determinó el pH de los jugos de naranjas utilizando un potenciómetro o metro de pH (Accumet Basic, AB15 pH meter, Fisher Scientific) previamente calibrado con

soluciones estándares de pH entre 4.00 y 7.00. Para este análisis se tomaron 10 mL de cada muestra almacenada. El análisis fue realizado por duplicado.

3.5.2 Determinación de Sólidos Solubles

La cantidad de sólidos solubles se determinó utilizando un refractómetro (Reichert 0-50°Brix, # modelo 10431), previamente calibrado con agua destilada. Se colocó 1 mL de muestra de jugo en el refractómetro y se tomaron los grados Brix de cada muestra por duplicado.

3.5.3 Determinación de Color

Se determinó el cambio de color a través del tiempo utilizando un colorímetro de refracción (HunterLab Mini Scan XE Color Analyst). Las muestras de jugo de naranja (10 mL) se colocaron en un plato plástico de aproximadamente 3 cm de diámetro. Los parámetros utilizados en el colorímetro para medir el jugo de naranja fueron configurados a 10° de observador y D65 iluminante. Utilizando un fondo blanco se procedió a tomar las lecturas de color siguiendo la escala de color Hunter *L*, *a*, *b*. El parámetro *L* mide luminosidad (0 → blanco y 100 → negro), el parámetro *a* mide colores rojo y verde (+ → rojo, - → verde y 0 → neutral) y el parámetro *b* mide colores amarillo y azul (+ → amarillo, - → azul y 0 → neutral) (Good, 2004). Las lecturas fueron tomadas por duplicado.

3.6 Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos de pH, sólidos solubles y color se evaluaron estadísticamente utilizando el programa *Statistical Analysis System* (SAS). El diseño experimental estadístico utilizado fue parcelas sub divididas en el tiempo. Se examinaron individualmente los factores de lavado, temperatura y días sobre la incidencia que tenía sobre el pH, grados Brix y color. La prueba de hipótesis es la siguiente:

H_0 : Si hay incidencia de días, temperatura y lavado sobre el pH, grados Brix y color.

H_a : No hay incidencia de días, temperatura y lavado sobre el pH, grados Brix y color.

Rechazamos la hipótesis nula si el valor de $p < 0.05$.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Alicyclobacillus acidoterrestris puede afectar la calidad de jugos de naranja si no es detectada a tiempo. Al sobrevivir y proliferar a temperaturas altas y pH bajos puede ser una amenaza económica para la industria de jugos de frutas. Una serie de experimentos fueron llevados a cabo para evaluar si la bacteria estaba presente en los jugos de naranja procesadas en Puerto Rico. Se utilizaron diez muestras de jugos de naranja Valencia y se realizó un experimento a pequeña escala simulando el procesamiento industrial para la extracción de jugo de naranja. Un tratamiento térmico de 80 °C por 10 minutos se le aplicó a las muestras de jugos para activar cualquier espora presente. Como control se utilizaron los jugos que no se les aplicó el tratamiento térmico. El objetivo principal de este experimento fue realizar pruebas microbiológicas para demostrar la presencia *Alicyclobacillus acidoterrestris* en jugos de naranja. Se utilizaron tres tipos de medios selectivos, K-agar, Orange Serum Agar (OSA) y Potato Dextrose Agar (PDA) acidificado para detectar la presencia de este microorganismo. Las pruebas realizadas reflejan aproximadamente un mes de almacenamiento a una temperatura de 4 °C. Esta temperatura se utilizó ya que es comúnmente utilizada para el almacenamiento de los jugos de naranja. Siguiendo el protocolo establecido, la bacteria *A. acidoterrestris* no fue recuperada en ninguna de las diez muestras de jugos de naranja bajo las diferentes condiciones de procesamiento. No hubo ningún crecimiento de colonias redondas color crema en los medios selectivos K-agar, OSA y PDA.

Tabla 3. Resultados de Pruebas Microbiológicas para la detección de *A. acidoterrestris*

Microorganismo	Medios de Cultivo	Cantidad de muestras analizadas	Días de Almacenamiento	Presencia/Ausencia
<i>A. acidoterrestris</i>	K- agar	10	25	Ausencia
	Orange Serum Agar	10	25	Ausencia
	Potato Dextrose Agar	10	25	Ausencia

El análisis microbiológico se repitió diez veces y para cada muestreo se utilizaron 4 L de jugo. Al finalizar el experimento se analizaron un total 40 L de jugo de naranja. La bacteria no estuvo presente en ninguna de las diez repeticiones realizadas (Tabla 3).

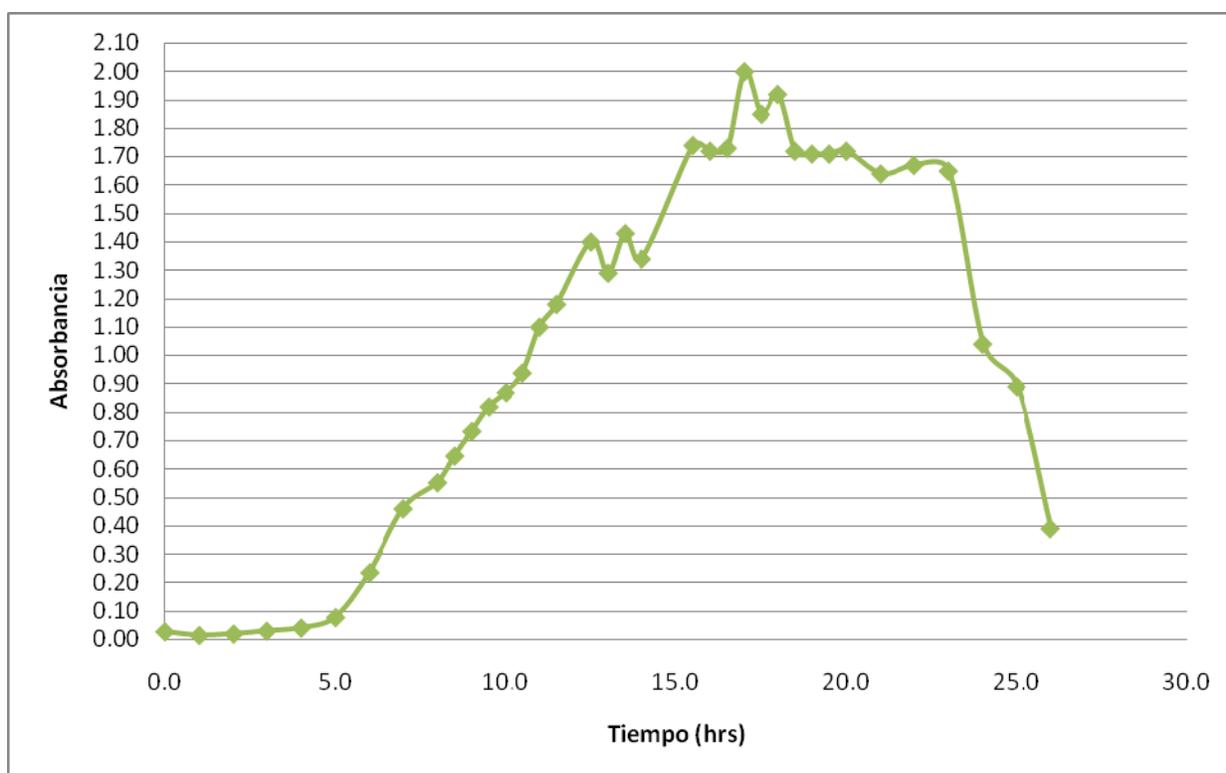
Al observar que no había crecimiento de *A. acidoterrestris* se procedió hacer varios experimentos para corroborar que el método utilizado fuese el correcto. Se preparó un medio general, *Plate Count Agar* (PCA) para observar si existían otros microorganismo que le estuviesen brindando competencia a *A. acidoterrestris* para crecer. Luego de 48 horas de incubación se le añadió una capa del medio selectivo K-agar a la superficie del PCA para estimular cualquier presencia de *A. acidoterrestris*. No se encontró ninguna colonia formadora de unidades en este medio combinado.

Para descartar cualquier otro error aleatorio y verificar que los medios utilizados eran los adecuados para su crecimiento, *A. acidoterrestris* (ATCC 49025) fue inoculada dentro de los tres medios selectivos. Esta creció en los tres medios selectivos sin ningún problema al cabo de 48 horas a una temperatura de incubación de 43 °C.

4.1 Curva de Crecimiento de *Alicyclobacillus acidoterrestris*

Se preparó una curva de crecimiento para observar su comportamiento a través del tiempo dentro del medio K-agar. La fase exponencial o log comenzó a ser evidente luego de 5 horas de adaptación al caldo. Luego de 30 horas de análisis se pudo observar todas las fases de crecimiento típico de un crecimiento microbiano (Ver Figura 1)

Figura 3. Curva de Crecimiento de *Alicyclobacillus acidoterrestris*



4.2 Resultados Jugos de Naranja Valencia Inoculados con *Alicyclobacillus acidoterrestris* (ATCC 49025)

Otro experimento microbiológico fue preparado para corroborar que *A. acidoterrestris* podía crecer en los jugos de naranja Valencia elaborados en Puerto Rico. Se utilizó el mismo protocolo establecido en los materiales y métodos para la

extracción del jugo, choque térmico y empaque. La diferencia fue que la bacteria fue inoculada en los jugos de naranja y analizada a temperaturas de almacenamiento de 0, 4 y 25 °C durante 48 horas (Tabla 4).

Tabla 4. Resultados de Recuento de Colonias Presente en Jugo de Naranja Inoculado con *A. acidoterrestris*

Microorganismo	Temperatura Almacenamiento (°C)	Tiempo Análisis (hr)	Tratamiento Térmico (80 °C x 10 min)	Promedio de colonias presentes (cfu/mL)		Presencia/Ausencia
				K-agar	PDA	OSA
<i>A. acidoterrestris</i> (ATCC 49025)	0	0	SI	< 1 x 10 ²	< 1 x 10 ²	+
			No	9.55 x 10 ³	< 1 x 10 ²	+
		12	SI	< 1 x 10 ²	-	+
			No	2.55 x 10 ²	< 1 x 10 ³	+
		24	SI	< 1 x 10 ²	< 1 x 10 ²	+
			No	< 1 x 10 ³	< 1 x 10 ³	+
48	SI	< 1 x 10 ²	-	+		
	No	< 1 x 10 ²	-	+		
<i>A. acidoterrestris</i> (ATCC 49025)	4	12	SI	< 1 x 10 ²	< 1 x 10 ²	+
			No	< 1 x 10 ²	< 1 x 10 ²	+
		24	SI	-	-	+
			No	-	-	+
		48	SI	< 1 x 10 ²	< 1 x 10 ²	+
			No	< 1 x 10 ²	< 1 x 10 ²	+
<i>A. acidoterrestris</i> (ATCC 49025)	25	12	SI	9.8 x 10 ⁴	7.95 x 10 ³	+
			No	11.1 x 10 ⁴	23.5 x 10 ³	+
		24	SI	< 1 x 10 ⁴	17.1 x 10 ³	+
			No	16.7 x 10 ³	18.1 x 10 ³	+
		48	SI	23.2 x 10 ³	20.3 x 10 ³	+
			No	< 1 x 10 ²	-	+

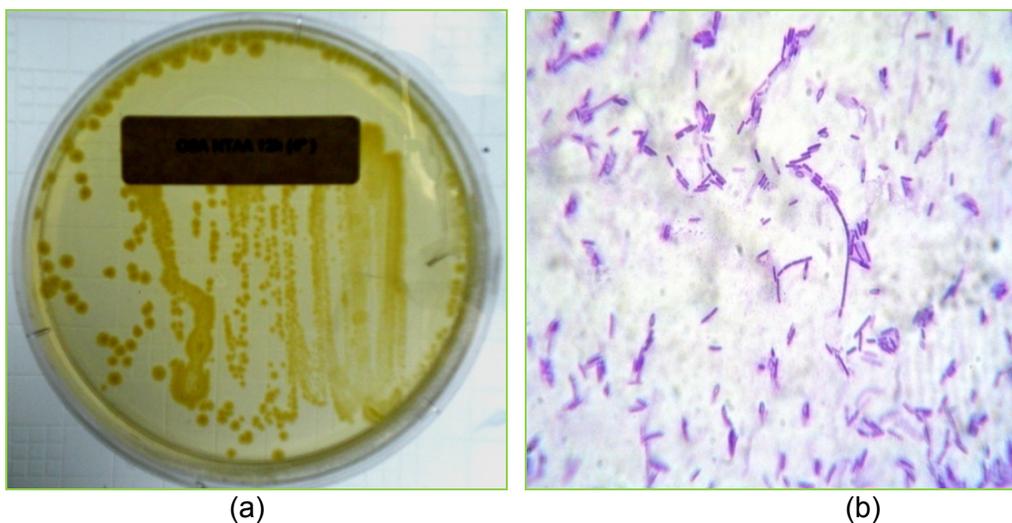
Legenda: " + " presencia / " - " ausencia

Alicyclobacillus acidoterrestris se mantuvo presente durante las 48 horas de almacenamiento y fue recuperada en todas las temperaturas. El mayor recuento de colonias se obtuvo a la temperatura de 25°C seguida por 0 °C y 4 °C. El medio K-agar tuvo una mayor recuperación de colonias que el medio PDA, esto coincide con los

estudios realizados por Orr y Beuchat (2000). Los jugos tratados con el choque térmico de 80 °C x 10 minutos tuvieron un mayor conteo de colonias cuando estos fueron almacenados a 25 °C. El choque térmico activa la esporulación, la cual la hace más resistente a sobrevivir casi cualquier tipo de temperaturas.

El medio OSA se utilizó para verificar la presencia de *A. acidoterrestris* luego de incubado a una temperatura de 43 °C por 48 horas. La bacteria estuvo presente en el medio OSA durante las 48 horas de almacenamiento en todas las temperaturas. Estos resultados concuerdan con los reportados por Pettipher y colaboradores (1997) donde las colonias formadas de unidades en los medios de cultivos fueron de color crema claro y redondas (Figura 2a). Algunas colonias presentaron márgenes irregulares. Se preparó una tinción Gram y se observó que la cepa ATCC 49025 era un bacilo Gram positivo con arreglo de cadenas largas (Figura 2b).

Figura 4. Características macroscópicas y microscópicas de *A. acidoterrestris* (ATCC 49025) inoculada en jugos de naranja Valencia, (a) Cepa de ATCC 49025 y (b) Gram positivo en microscopio de luz



4.3 Factores que pueden Influenciar la Ausencia de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en los jugos de naranja de Puerto Rico

Aunque la bacteria no estuvo presente en los jugos analizados no se puede concluir que ésta no va a estar presente en otros lugares de Puerto Rico. El estudio sólo se concentró en analizar frutas de naranjas cosechadas en el área oeste de Puerto Rico. Los suelos de la región de oeste son considerados ácidos ya que contienen un pH entre 4.5 a 5.0 (Gierbolini, 1976). Factores como estos podrían crear un ambiente óptimo para su crecimiento.

Alicyclobacillus acidoterrestris ha sido mayormente aislada en ambientes con temperaturas y pH extremos, por ejemplo, aguas termales y áreas volcánicas. Actualmente, en Puerto Rico no existe este tipo de ambiente extremo cerca de zonas agrícolas donde se cultiva la naranja. Existe la posibilidad que islas cercanas que posean zonas volcánicas puedan fomentar a que *Alicyclobacillus acidoterrestris* se transmita a través del viento a Puerto Rico. La isla de Puerto Rico se caracteriza por tener suelo volcánico sobre el cual se deposita un sedimento de naturaleza arcillosa y/o orgánica dependiendo la consolidación del lugar. La zona oeste de la isla se caracteriza por poseer un sedimento de naturaleza mayormente orgánico y rico en nutrientes (Gierbolini, 1976). Basado en los resultados obtenidos en este estudio, dicho tipo de suelo no provee las condiciones extremas de crecimiento que esta bacteria requiere para crecer. Por lo tanto, sería preciso determinar en futuros estudios si suelos con sedimento arcilloso dedicados al cultivo de productos cítricos para la elaboración de jugos pudiera proveer las condiciones de crecimiento adecuadas para este tipo de microorganismo.

Aunque se ha encontrado mayormente en ambientes extremos, la bacteria también ha sido aislada de zonas no termales, por ejemplo en el norte y sur de Estados Unidos. Estados como la Florida, donde varios estudios han demostrado la presencia de esta bacteria (Parish y Goodrich, 2005) se caracterizan por ser terrenos pantanosos que al parecer proveen condiciones de crecimiento extremo que necesita esta bacteria para crecer. Parish y Goodrich (2005) identificaron una cepa de *Alicyclobacillus spp.* en la superficie de frutas de naranjas cosechadas en Florida y dentro de dos plantas de procesamiento. Otro estudio realizado por la Asociación Brasileira de Exportadores Cítricos (ABECitrus) (Eguchi et al, 1999) indica la presencia de *Alicyclobacillus spp.* en el suelo de cultivo, superficie de la fruta, en el agua de lavado y en jugos. Este mismo estudio revela que la contaminación causada por *A. acidoterrestris* en jugos de naranja aumentó durante épocas secas ya que esta se pudo transportar del suelo a la fruta fácilmente. Durante el período de análisis, de abril a julio 2007 la cantidad de precipitación tiende ser un poco alta, por lo que puede dificultar transporte de la bacteria a través del viento (Gierbolini, 1976).

La composición química de los jugos de naranja pueden afectar el crecimiento de *A. acidoterrestris*. Su crecimiento se puede ver afectado por el tipo de nutrientes, compuestos antimicrobiales naturales y la cantidad de oxígeno disponible dentro de los jugos de naranja. Según, el Laboratorio de Data Nutricional del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (2009), por sus siglas en inglés NLD-USDA, el jugo de naranja está mayormente compuesto de agua, carbohidratos, minerales y vitaminas. Es por esto que los jugos de naranja de Puerto Rico crean un excelente sustrato para fomentar su crecimiento. Esto coincide con el experimento realizado en este proyecto,

donde se observó el crecimiento de *A. acidoterrestris* (ATCC 49025) inoculado en jugos de naranja Valencia cosechadas en Puerto Rico. Los agentes antimicrobiales naturales presentes en varios tipos de frutas han demostrado que puede inhibir el crecimiento de *A. acidoterrestris*. Por ejemplo, la presencia de compuesto fenólicos en jugo de uvas rojas demuestra tener una capacidad para inhibir el crecimiento (Yokota et al, 2007). El ácido cítrico presente en las naranjas puede ser utilizado como un agente antimicrobial para muchos tipos de bacterias. Sin embargo, el ácido cítrico no muestra ninguna diferencia significativa en inhibir su crecimiento (Yokota et al, 2007).

Por el momento, podemos recomendar que los sistemas y programas de monitoreo en las industrias de jugos sean reformados para identificar y controlar este tipo de microorganismo. La contaminación puede ser controlada por medio de procesos que se enfoquen en eliminar microorganismos que formen esporas. Se puede mencionar tratamientos tales como: pasteurización UV, bactericidas (Ej. hipoclorito de sodio), filtración, tratamientos térmicos a altas temperaturas y otros. De la bacteria estar presente se puede disminuir la posibilidad de contaminación causada por *Alicyclobacillus acidoterrestris* siguiendo buenas prácticas agrícolas durante el manejo y procesamiento del fruto. De esta forma se reducen la posibilidad de que la bacteria se adhiera la superficie de la fruta y perjudique la calidad del producto final.

4.4 Análisis Estadístico

4.4.1 Resultados de Pruebas Fisicoquímicas

Durante el estudio examinamos por individual los valores pH, grados Brix y color para observar cambios significativos a través de los días de almacenamiento. Además, se evaluó si había cambios al aplicar una operación de lavado y un choque térmico al producto terminado. Para estos propósitos se llevo a cabo un análisis de regresión múltiple en donde valores de p menores de 0.05 indicaban cambios significativos entre los diferentes tratamientos. El coeficiente de determinación (R^2) se utilizó para explicar cuanta variación de la variable dependiente puede ser determinada por la variable independiente (Montgomery, 2001). El apéndice 4 presenta los resultados obtenidos del análisis de regresión. Los resultados de la regresión para las variables dependientes de pH y grados Brix no mostraron cambios significativos a través de los días (Tabla 5). La hipótesis nula proponía cambios significativos durante los días de almacenamiento y los parámetros: choque térmico, lavado, pH, grados Brix y color. Según el análisis estadístico solo se observaron cambios significativos ($p < 0.05$) en los parámetro L y b de color en las frutas no lavadas con y sin choque térmico (Tabla 5). Estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos de las pruebas microbiológicas. Inicialmente se propuso que si *Alicyclobacillus acidoterrestris* estaba presente en los jugos de naranja cambios significativos podrían ser observados para el pH, grados Brix y color. *A. acidoterrestris* no estuvo presente en las muestras de jugos analizadas, por lo que es de esperar ningún cambio significativo en pH, grados Brix y color. Además, el periodo de almacenamiento analizado se encuentra dentro del largo de vida útil esperado para este tipo de producto.

Tabla 5. Resultados de p -valor según tratamiento aplicado a través de los días de almacenamiento

Variable Dependiente	p -valor			
	No lavado/ No choque térmico	No lavado/ Choque térmico	Lavado/ No choque térmico	Lavado/ Choque térmico
pH	0.2832	0.3110	0.4647	1.000
Grados Brix	0.8748	0.2700	0.8094	0.8600
L	0.4416	0.5476	0.0112	0.5346
a	0.1561	0.4734	0.6146	0.2315
b	0.0011	0.0416	0.0904	0.3051

5 CONCLUSIÓN

- ♦ . *Alicyclobacillus acidoterrestris* no fue aislada de ninguna muestra de jugos de naranja Valencia elaborados por los Productores Cítricos del Oeste.
- ♦ De acuerdo con los resultados del análisis estadístico no hubo cambios significativos en las pruebas pH y grados Brix, sólo se observó cambios en color (b) a través de los días de almacenamiento.
- ♦ El método fue corroborado inoculando los medios y el jugo de naranja con *Alicyclobacillus acidoterrestris*.
- ♦ *Alicyclobacillus acidoterrestris* creció bajo diferentes condiciones de procesamientos. Sobrevivió luego de 48 horas de almacenamiento a temperaturas de 0, 4 y 25 °C.

6 RECOMENDACIONES

- Evaluar suelos de cultivos a través de diferentes zonas geográficas para determinar presencia de este microorganismo.
- Diseñar nuevos procesos de pasteurización utilizando *A. acidoterrestris* como microorganismos de referencia.
- Llevar a cabo una curva de crecimiento de *A. acidoterrestris* en jugos de naranja para determinar el largo de vida útil del producto.
- Realizar análisis molecular mediante la amplificación y secuenciación del gen 16S rRNA para evaluar suelos agrícolas donde se cultivan las naranjas.
- Compartir estos resultados con las diferentes procesadoras de alimentos y profesionales para establecer guías para el monitoreo de este microorganismo.

7 BIBLIOGRAFÍA

- Bevilacqua, A., Sinigaglia, M. y Corbo, M.R. 2008. *Alicyclobacillus acidoterrestris*: new method for inhibiting spore germination. *International Journal of Food Microbiology*. 125: 103-110
- Blotcher, J.C. y Busta, F.F. 1983. Bacterial spore resistance to acid. *Food Technology*. 37: 87
- Caggia, C., Scifo, G.O., Restuccia, C. y Randazzo, C.L. 2008. Growth of acid-adapted *Listeria monocytogenes* in orange juice and in minimally processed orange slices. *Food Control*. 20: 59-66
- Cerny, G.W., Hennlich, W. y Poralla, K. 1984. Fruchsoftverderb durch Bacillen: Isolierung and Charakterisierung des Verderbserregers. *Food Research and Technology*. 179: 224-227
- Chang, S.S. y Kang, D.H. 2004. *Alicyclobacillus spp.* in the fruit juice industry: history, characteristics, and current isolation/detection procedures. *Critical Reviews in Microbiology*. 30(2): 55-74.
- Compendio de Ingreso Bruto de la Agricultura de Puerto Rico: Cifras Revisadas 2004/2005 y Preliminares 2005/2006.
- Condon, S. y Sala, F.J. 1992. Heat resistance of *Bacillus subtilis* in buffer and foods of different pH. *Journal of Food Protection*. 55(8): 605-608
- Darland, G. y Brock, T.D. 1971. *Bacillus acidocaldarius* sp. Nov., an acidophilic thermophilic spore forming bacterium. *Journal of General Microbiology*. 67: 9-15
- Dienhard, G, Blanz, P., Poralla, K. y Altan, E. 1987. *Bacillus acidoterrestris* sp. nov., a new thermotolerant acidophilic isolated from different soils. *Systematics and Applied Microbiology*. 10: 47-53
- Doyle, M.P., Beuchat, L.R. y Montville, T.J. 2001. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. 55 p.p.
- Eguchi, S.Y., Manfio, G.P., Pinhatti, M.E., Azuma, E. y Variane, S. 1999. Acidothermophilic sporeforming bacteria (ATSB) in orange juices: detection methods, ecology, and involvement in the deterioration of fruit juices. ABECitrus. www.abecitrus.com.br/english/dload/ep_atsb.PDF
- Gierbolini, R.E. 1976. Soil Survey of Mayaguez Area of Western Puerto Rico. United States Department of Agriculture, Soil Conservation Services in cooperation with the UPR-Mayagüez. 205-289 p.p.

Grande, M.J., Lucas, R., Abriouzel, H., Ben Omar, N., Maqueda, M., Martinez-Bueno, M., Martinez Cañamero, M., Valdivia, E. y Gálvez, A. 2005. Control of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices by enterocin AS-48. *International Journal of Food Microbiology*. 104: 289-297

Groenewald, W.H., Gouws, P.A. y Witthuhn, R.C. 2008. Isolation, identification and typification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and *Alicyclobacillus acidocaldarius* strains from orchard soil and the fruit processing environment in South Africa. *Food Microbiology*. 10: 1-6

Gocmen, D., Elston, A., Williams, T. Parish, M. y Rouseff, R.L. 2004. Identification of medicinal off-flavours generated by *Alicyclobacillus* species in orange juice using GC-olfactometry and GC-MS. *Letters in Applied Microbiology*. 40: 170-177

Good, H. 2004. Measure to ensure the color stays right. *Food Quality Magazine*. Feb/Mar: 90

Harrichandparsad, Z. 2007. Evaluation of bacteriological techniques, sensory evaluation, Gas Chromatography and Electronic Nose Technology for the early detection of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices. Tesis M.S. Durban University of Technology, Durban, South Africa.

Hippchen, B., Roll, A. y Poralla, K. 1981. Occurrence in soil of thermophilic bacilli possessing ω -cyclohexane fatty acids and haponoids. *Archives of Microbiology*. 129: 53-55

Jay, J.M. 2003. *Modern Food Microbiology*. Kluwer Academic/Plenum, New York, 341 p.p

Jensen, N. 1997. *Alicyclobacillus*: a new problem for acidic, heat-processed foods? *Microbiology Australia*. Nov.: 13-14

Jensen, N. 1999. *Alicyclobacillus* – a new challenge for the food industry. *Food Australia*. 51(1/2): 33-36

Jensen, N. y Whitfield, F.B. 2002. Role of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in the development of a disinfectant taint in shelf-stable fruit juice. *Letter in Applied Microbiology*. 36: 9-14

Kannenbergh, E., Blume, A. y Poralla, K. 1984. Properties of ω -cyclohexane fatty acids in membranes. *FEBS Letters*. 172(2):331-334.

Komitopoulou, E., Boziaria, I.S., Daies, E.A., Delves-Broughton, J. y Adams, M.R. 1999. *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices and its control by nisin. *International Journal of Food Science and Technology*. 34: 81-85

Lee, S.Y., Chang, S.S., Shin, J.H y Kang, D.K. 2007. Membrane filtration method for enumeration and isolation of *Alicyclobacillus* spp. From Apple juice. Letters in Applied Microbiology. 45: 540-546

Luera Peña, W.E. y Rodriguez de Massaguer, P. 2000. Microbial modeling of *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA 7152 growth in orange juice with nisin added. Journal of Food Protection. 69: 1904-1912

Montgomery, D.C. 2001. Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons, Inc. 411 p.p.

Murray, M.B., Gurlter, J.B., Ryu, J.H., Harrison, M.A. y Beuchat, L.R. 2007. Evaluation of direct plating methods to enumerate *Alicyclobacillus* in beverages. International Journal of Food Microbiology. Oct: 1-11

Nicolaus, B, Improta, R., Manca, M.C., Lama, L. Esposito, E. y Gambocorta, A. 1998. Alicyclobacilli from an unexplored geothermal soil in Antarctica. Polar Biology. 9: 133-141.

Orr, R.V. y Beuchat, L.R. 2000. Efficacy of disinfectants in killing spores of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and performance of media for supporting colony development by survivors. Journal of Food Protection. 63: 1113

Orr, R.V., Shewfelt, R.L., Huang, C.J, Tefera, S. y Beuchat, L.R. 2000. Detection of Guaiacol Produced by *Alicyclobacillus acidoterrestris* in Apple Juice by Sensory and Chromatographic Analyses, and comparison with spore and vegetative cell populations. Journal of Food Protection. 63(11): 1517-1522

Parish, M.E y Goodrich, R.M. 2005. Recovery of presumptive *Alicyclobacillus* strains from orange fruit surfaces. Journal of Food Protection. 68(10): 2196-2200

Pettipher, G.L., Osmundson,, M.E. y Murphy, J.M. 1997. Methods for the detection and enumeration of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and investigation of growth and production of Saint in fruit juice and fruit juice-containing drinks. Letters in Applied Microbiology. 24:185-189

Pinhatti, S., Variane, S., Euguchi, Y. y Manfio, G.P. 1997. Detection of Acidothermophilic Bacilli in industrialized fruit juices. Fruit Processing. 9: 350-353

Pontius, A.L, Rushing, J.E. y Foegeding, P.M. 1998. Heat Resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores as affected by various pH values and organic acids. Journal of Food Protection. 61(1): 41-46.

Salunkhe, D.K. y Kadam, S.S. 1995. Handbook of Fruit Science and Technology: Production, Composition, Storage and Processing. Marcel Dekker, Inc 39. p.p.

Silva, F.M., Gibbs, P., Vieira, M.C. y Silva, C.L.M. 1999. Thermal inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores under different temperature, soluble solids and pH conditions for the design of fruit processes. *International Journal of Food Microbiology*. 51:95-103

Sinigagli, M., Corbo, M.R., Altieri, C., Campaniello, D., D'amato, D. y Bevilacqua, A. 2003. Combined effects of temperature, water activity, and pH on *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores. *Journal of Food Protection*. 66(12): 2216-2221

Splittstoersser, D.F., Churey, J.J. y Lee, C.Y. 1994. Growth characteristics of Aciduric Sporeforming Bacilli isolated from fruit juices. *Journal of Food Protection*. 57(12): 1080-1083

Terano, H., Takahashi, K. y Sakakibara, Y. 2005. Characterization of spore germination of a thermoacidophilic spore-forming bacterium, *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60(6): 1217-1220.

Uchino, F. y Doi, S. 1967. Acidothermophilic bacteria from thermal waters. *Agricultural. and Biological Chemistry*. 31: 817-822.

Uboldi Eiora, M.N., Amstalden Junqueira, V.C. y Schmidt, F.L. 1999. *Alicyclobacillus* in orange juice: occurrence and heat resistance of spores. *Journal of Food Protection*. 62(8): 883-886

United State Department of Agriculture-National Agricultural Library (USDA-NAL). 2009. <http://www.nal.usda.gov/>

Vieira, M.C., Teixeira, A.A., Silva, F.M., Gaspar, N. y Silva, C.L.M. 2002. *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores as a target for Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) nectar thermal processing: kinetic parameters and experimental methods. *International Journal of Food Microbiology*. 77: 71-81

Walker, M. y Phillips, C.A. 2008. The effect of preservatives on *Alicyclobacillus acidoterrestris* and *Propionibacterium cyclohexanicum* in fruit juice. *Food Control*. 19: 974-981

Walls, I y Chuyate, R. 1997. *Alicyclobacillus* – Historical Prespective and Preliminary Characterization Study. *Dairy, Food and Enviromental Sanitation*. 18: 499-503

Walls, I. y Chuyate, R. 2000. Isolation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from fruit juices. *Journal of AOAC International*. 83(5): 1115-1120

Wisotzkey, J.D., Jurtshuk, Jr., P., Fox, G.E., Dienhard, G. y Poralla, K. 1992. Comparative sequence analyzes on the 16S rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris* and *Bacillus cycloheptanicus* and Proposal for creation of a new genus, *Alicyclobacillus* gen. nov. International Journal of Systematic Bacteriology. 42(2): 263-269

Wisse, C.A. y Parish, M.E. 1998. Isolation and enumeration of sporeforming, thermoacidophilic, rod-shape bacteria from citrus processing environments. Dairy, Food and Environmental Sanitation. 8: 504

Witthuhn, R.C., Duvenage, W. y Gouws, P.A. 2007. Evaluation of different growth media for the recovery of the species of *Alicyclobacillus*. Letters in Applied Microbiology. 45: 224-229.

Yamazaki, K., Tenduka, H. y Shinano, H. 1996. Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from acidic beverage. Bioscience Biotechnology and Biochemistry. 60: 543-545.

Yamazaki, K., Murakami, M., Kawai, Y., Inoue, N. y Matsuda, T. 2000. Use of nisin for inhibition of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in acidic drinks. Food Microbiology. 17: 315-320.

Yokota, A., Fujii, T. y Goto, K. 2007. *Alicyclobacillus Thermophilic Acidophilic Bacilli*. Springer, Japan, 101-102 p.p.

8 APÉNDICE

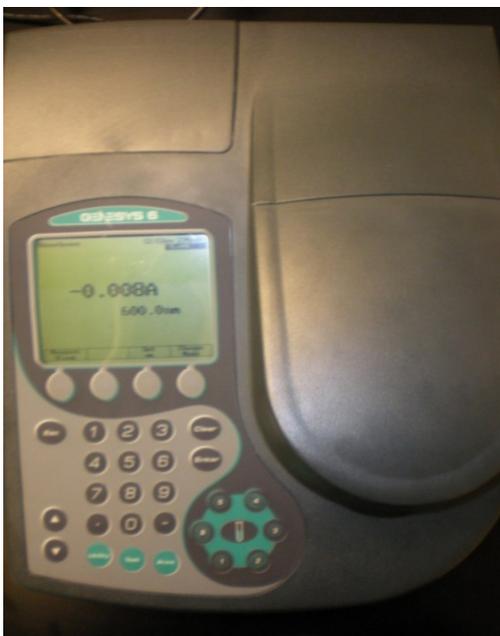
Apéndice 1. Ingreso Bruto Agrícola de Naranjas en Puerto Rico (Departamento de Agricultura/Oficina de Estadísticas Agrícolas, 2006)

Tabla de Ingreso Bruto de Naranjas			
ANO	CANTIDAD (MILLAR)	PRECIO (\$MILLAR)	VALOR (\$'000)
1980/81	160,000	19.64	3,142
1981/82	166,000	21.18	3,516
1982/83	167,700	23.59	3,956
1983/84	164,200	24.10	3,957
1983/84	163,000	26.41	4,305
1985/86	152,400	25.71	3,918
1986/87	152,200	28.43	4,327
1987/88	154,200	29.01	4,473
1988/89	153,400	32.00	4,909
1989/90	161,000	33.32	5,365
1990/91	155,000	37.99	5,888
1991/92	143,300	38.77	5,556
1992/93	135,000	39.52	5,335
1993/94	100,000	41.95	4,195
1994/95	96,000	42.08	4,040
1995/96	92,000	42.71	3,929
1996/97	88,500	43.72	3,869
1997/98	82,000	45.65	3,743
1998/99	45,926	111.85	5,137
1999/00	145,469	77.58	11,285
2000/01	93,249	55.10	5,138
2001/02	92,286	63.41	5,852
2002/03	96,579	64.96	6,274
2003/04	97,447	65.60	6,393
2004/05	103,425	72.65	7,514
2005/06	138,969	73.85	10,263

Apéndice 2. Equipos utilizados para la detección de *A. acidoterrestris*



Exprimidora de Naranjas (Zummito)



Espectrofotómetro UV Genesys 6

Apéndice 3. Empaque de Jugos de Naranja Inoculados con *A. acidoterrestris* y almacenados a temperaturas de 0, 4 y 25° C por 48 horas

TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO: 0 °C



TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO: 4 °C





TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO: 25 °C

