



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE  
HIDALGO**

---

---

**CENTRO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS**

**INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍAS**

***“Aislamiento, Identificación y Comportamiento de  
Bacillus en tortilla”***

**TESIS**

**Que para obtener el título de**

**Químico en Alimentos**

**PRESENTA:**

**LUIS MIGUEL TRINIDAD TORRES**



**Director de tesis: Dr. Javier Castro Rosas**

**Pachuca de Soto, 2008**

---

<b>INDICE</b>	<b>Pagina</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	4
<b>INDICE DE TABLAS</b>	5
<b>INDICE DE FIGURAS</b>	6
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	7
<b>II. ANTECEDENTES</b>	9
2.1 Maíz	9
2.2 Consumo de tortilla	12
2.3 Procesos de elaboración de tortillas y de harinas instantáneas	13
2.4 Proceso higiénico de elaboración de tortillas en microempresas (tortillerías)	16
2.5 Microorganismos identificados en granos y en productos a base de granos o semillas	18
2.6 Aspectos microbiológicos de las tortillas y de la harina para tortillas	23
2.7 Fuente de contaminación de granos y semillas	26
2.8 Características de las especies del género <i>Bacillus</i>	29
2.8.1 <i>Bacillus cereus</i>	31
2.8.2 <i>Bacillus coagulans</i>	32
2.8.3 <i>Bacillus anthracis</i>	32
2.8.4 <i>Bacillus stearothermophilus</i>	33
2.8.5 <i>Bacillus subtilis</i>	34
2.8.6 <i>Bacillus polymyxa</i>	34
2.8.7 <i>Bacillus megaterium</i> y <i>Bacillus licheniformis</i>	34
2.9 Pruebas bioquímicas que se emplean para identificar al género <i>Bacillus</i> .	35

---

<b>III. OBJETIVOS</b>	37
3.1 Objetivo general	37
3.2 Objetivos particulares	37
<b>IV. METODOLOGÍA</b>	38
4.1 Material de laboratorio	38
4.2 Medios de cultivo	39
4.3 Reactivos	39
4.4 Equipos	40
4.5 Procedimientos	41
4.5.1 Recolección de muestras	41
4.5.2 Aislamiento y cuantificación de microorganismos a partir de tortillas descompuestas.	41
4.5.3 Identificación de los microorganismos aislados por microscopia y pruebas bioquímicas.	42
4.5.4 Ensayos potencial deteriorador de las cepas de <i>Bacillus</i>	44
4.5.5 Desarrollo de los microorganismos en medio de cultivo a tres diferentes concentraciones de glicerol y manitol (0.5%, 1.0% y 1.5%)	44
4.5.6 Desarrollo en CST de las cepas con mayor potencial para hidrolizar el almidón.	45
4.5.7 Comportamiento de <i>Bacillus</i> ssp, <i>B. megaterium</i> , <i>B. firmus</i> y <i>B. stearothermophilus</i> en tortilla fresca.	46
<b>V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	48
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	66
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA</b>	68
<b>VIII. ANEXOS</b>	77

---

---

## ABREVIATURAS

Aa	Actividad de agua
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AST	Agar soya tripticaseina
BMA	Bacterias mesófilas aerobias
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CST	Caldo soya tripticasa
D.F.	Distrito Federal
D.O.	Densidad optica
DON	Deoxinivalenol
EE.UU.	Estados Unidos de América
ETAs	Enfermedades transmitidas por alimentos
H u h	Horas
H <sub>2</sub> O	Agua
ICMSF	International Comisión on Microbiological Specification for Foods
Kg	Kilogramos
KOH	Hidróxido de potasio
ml	Mililitro
MPC	Maíz con alto contenido de proteína
MR-VP	Medio rojo Voges-proskauer
µg	Microgramos
NaCl	Cloruro de sodio
pH	Potencial de Hidrógeno

---



---

Ppb	Partes por billón
SSI	Solución Salina Isotónica
UFC/g	Unidades formadoras de colonia por gramo

## INDICE DE TABLAS

Tabla	Pagina
1) Especificaciones microbiológicas de productos a base de maíz.	17
2) Especificaciones microbiológicas de aflatoxinas en productos a base de maíz.	17
3) Mínima Aa para el desarrollo de hongos durante el almacenamiento de granos (con óptima temperatura).	20
4) Características de algunas especies de <i>Bacillus</i> .	30
5) Microorganismos microaerófilos.	48
6) Desarrollo microbiano en Agar Cuenta Estándar tanto en aerobiosis como en anaerobiosis a partir de tortillas deterioradas.	50
7) Frecuencia de <i>Bacillus</i> en tortillas provenientes de diferentes tortillerías.	51
8) Porcentaje de cepas aisladas positivas a cada prueba bioquímica.	52
9) Especies de <i>Bacillus</i> encontradas en las muestras analizadas.	53
10) Diámetro de hidrólisis del almidón según cepa examinada	54

---

---

11) Desarrollo de cepas de <i>Bacillus</i> en agar con diferentes concentraciones de humectante.	64
--	----

<b>Figura</b>	<b>Pagina</b>
1) Diagrama de flujo del proceso tradicional para la elaboración de tortillas	15
2) Diferenciación de las especies de <i>Bacillus</i> formadoras de esporas aisladas con más frecuencia.	43
3) <i>Bacillus spp.</i>	51
4) Comportamiento de <i>Bacillus spp</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. firmus</i> y <i>B. sphaericus</i> en caldo soya tripticaseina.	56
5) Comportamiento de <i>Bacillus spp</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. firmus</i> y <i>B. sphaericus</i> en tortilla.	58

---

---

## I. INTRODUCCIÓN

Los granos de los cereales constituyen el fruto de las gramíneas. Son una fuente importante de energía, casi siempre con déficit en algún aminoácido esencial para el hombre. Dentro de los cereales destaca el maíz por su importancia en la alimentación humana y animal.

El maíz (*Zea mays L.*) fue domesticado en América. Estos granos fueron los detonantes de desarrollos tecnológicos, de las civilizaciones, culturas y tradiciones.

En México, uno de los principales usos del maíz es la elaboración de tortillas. La tortilla debe su nombre a la civilización azteca la cual la denominaba "tlaxcalli" que significa "cosa cocida" (Fernández, 2000).

Actualmente en México se consumen 19.7 millones de toneladas de tortillas al año (Fernández, 2000). No obstante, los productores de tortilla y el proceso de producción siempre han atravesado por una diversidad de problemáticas (políticas, sociales, culturales, económicas y ambientales) cada vez más crecientes. Por ejemplo el reciente encarecimiento del maíz ó la falta de tecnologías para incrementar la producción a bajo costo de la tortilla y que generen menores desechos contaminantes ó el problema del deterioro y la rápida descomposición de la tortilla.

Es increíble que a pesar de que la tortilla es un alimento básico para el pueblo de México y para muchos otros de Latinoamérica, existe muy poco avance en la tecnología del proceso de producción de tortilla. Prácticamente no existe mucha información publicada en revista científicas sobre diferentes aspectos de la tortilla

---

---

como su calidad, higiene, inocuidad, deterioro, entre otros. Es evidente la urgente necesidad de generar información científica que contribuya a solucionar la problemática relacionada con la tortilla.

Específicamente para el caso del deterioro, después de una revisión exhaustiva no se encontraron reportes sobre el tipo de microorganismos involucrados en el deterioro y descomposición de la tortilla. Cabe mencionar que a pesar de ello, existe percepción generalizada entre consumidores y productores de tortillas de que el principal microorganismo que descompone las tortillas son los hongos.

El conocer los microorganismos involucrados en el deterioro y descomposición de los alimentos, como las tortillas, es muy importante ya que de estos depende en gran medida el tipo de tratamiento a aplicar para controlar eficientemente la descomposición de la tortilla prolongando con ello su vida de anaquel.

Por tal motivo, en este trabajo se aisló, identificó y se evaluó el comportamiento de algunos microorganismos deterioradores de tortilla.

---

---

## II. ANTECEDENTES

### 2.1. Maíz

El maíz pertenece a la familia de las gramíneas. Las hojas forman una larga vaina íntimamente arrollada al tallo y un limbo más ancho, alargado y flexuoso. Del tallo nacen dos o tres inflorescencias muy densas o mazorcas envueltas en espatas, en la axila de las hojas muy ceñidas. En cada mazorca se ven las filas de granos, cuyo número puede variar de ocho a treinta. A cada grano le corresponde un largo hilo sedoso que sobresale por el extremo de la mazorca. El tallo de la planta está rematado en el extremo por una gran panoja de pequeñas flores masculinas; cuando el polen ha sido aventado, se vuelven secas y parduscas. Hay seis tipos fundamentales de tipos de maíz: dentado, duro, blando y harinoso, dulce, reventón y envainado. El maíz dentado es el que se cultiva en mayor cantidad en los EE.UU. Éste se distingue fácilmente debido a que cuando se seca la parte superior del grano, éste adquiere la forma de un diente. Los granos del tipo duro son muy consistentes y las mazorcas generalmente son largas y delgadas. Algunas variedades de este tipo maduran muy pronto. Al maíz blando y harinoso se le llama también maíz de las momias, esto debido a que es la variedad que generalmente se encuentra en las sepulturas de los aztecas e incas. Se le cultiva extensamente en el sur de los EE.UU. y en México. Los granos son blandos aún en completa madurez. Por lo general son granos pequeños, no obstante, en algunos casos, pueden alcanzar hasta dos centímetros de diámetro (como los granos gigantes del maíz de Cusco, Perú). El maíz dulce es el que más se consume en los EE.UU., para envasar o comer directamente de la mazorca. La clase reventón es de granos pequeños y muy duros; su nombre se debe al hecho

---

---

de que estalla cuando el agua del interior se convierte en vapor durante el calentamiento. Los granos reventados (o pop corn) son un alimento antiguo; este tipos de maíz es el más común de los que se han encontrado en las antiguas tumbas del Perú, en donde se han descubierto también utensilios para reventar el grano. El maíz envainado es muy curioso ya que cada grano esta encerrado en una pequeña cascarilla propia, además de las que cubren la mazorca. Al igual que el reventón, es una de las clases más antiguas de maíz cultivado (Anónimo, 2007a).

En América del Norte se han encontrado ejemplares de maíz envainado que pueden perfectamente considerarse que datan de 2,000 años antes de la era cristiana. Este maíz es poco cultivado comercialmente (Anónimo, 2007a).

En México, uno de los principales usos que se le da al maíz es la elaboración de tortillas, las que se preparan a base de maíz nixtamalizado. Se calcula que el consumo diario de tortillas en México es de aproximadamente 300 millones de tortillas. Desde luego, para satisfacer una demanda de esta magnitud, existen máquinas que las elaboran en grandes cantidades, conocidas como tortilladoras. Sin embargo, en muchas partes del país, especialmente en zonas rurales, hacer las tortillas es el deber cotidiano de las mujeres, además cabe destacar que las zonas rurales es la base de alimentación para las personas (Blanco, 2005).

Desde el punto de vista nutricional, la tortilla de maíz es la responsable de alrededor del 70% de las calorías que consume diariamente más de la mitad de la población mexicana (Fernández, 2000).

---

---

En México el valor del mercado de la tortilla es superior a 4 mil millones de dólares (esta cantidad es aproximadamente la mitad del valor del mercado de automóviles en México). Aun cuando la distribución del consumo decae hacia el norte del país, en los Estados Unidos de América el valor de mercado de la tortilla se está acercando rápidamente al valor del mercado en México. Esto en parte se explica por la migración de mexicanos hacia ese país, aunado al consumo creciente de la población norteamericana de comida mexicana. En general esta última tendencia está mostrada por el resultado de encuestas que indican que existe un consumo creciente de la comida mexicana en los *malls* norteamericanos (Sánchez, 2006).

Además de la tortilla, en México el maíz se consume de muy diversas formas. Los elotes cortados en pedazos se usan en diversos guisos, los granos se usan en sopas, esquites y diversos platillos. El maíz cacahuazintle, es un tipo especial con el que se prepara los pozoles. Sí se muelen los granos de maíz se puede elaborar atole y tortas de elote. Los elotes tiernos se suelen consumir hervidos o asados en brasas. En algunas regiones del centro del país, se consumen los granos tostados y garapiñados como golosinas conocidas como “ponteduro”. Con la masa de maíz se preparan tamales, galletas y gorditas dulces. En el norte del país es común el consumo de pinole que se obtiene de maíz tostado y molido a punto muy fino. Hay muchos otros usos del maíz tales como la elaboración de diversas bebidas, o también de productos relacionados con el maíz como sus hojas que son usadas para envolver tamales, etc., lo evidente es que el maíz está íntimamente ligado a la cultura del mexicano (FAOSTAT, 2003)

---

---

Además de esto, también se preparan a partir del maíz diversos productos alimenticios industriales. Las fábricas de almidón producen almidones y aceite de germen y gluten, el gluten se utiliza en alimentación animal. El almidón tiene diversas aplicaciones. Las fábricas de sémola producen sémolas y harinas de maíz, utilizadas en cervecería y para la preparación de alimentos extruidos-expandidos (Blanco, 2005).

## **2.2. Consumo de tortilla**

El consumo de tortilla en términos de maíz en México es de aproximadamente 300 g diarios por persona. Representa el 70% de la producción; el 10% se destina a forrajes, y 8% a diversos usos industriales. El consumo aparente es de 19.7 millones de toneladas anuales. Para la población de más bajos recursos representa cerca del 70% de los alimentos que ingiere (Fernández, 2000).

En los últimos años, ha crecido de manera acelerada el consumo de tortillas elaboradas a partir de harina de maíz “prenixtamalizada”.

Generalmente, las tortillas son consumidas el mismo día de su producción, no obstante, debido a su alto contenido de humedad, de 45 a 50% y su actividad acuosa (0.94 a 0.98) hacen que el producto sea muy susceptible al deterioro microbiano; después de 24 h de almacenamiento a temperatura ambiente se puede observar la aparición de signos de descomposición (mucosidad, delgados filamentos entre una tortilla y otra, sabor desagradable, etc).

---

---

### **2.3 Procesos de elaboración de tortillas y de harinas instantáneas**

Proceso tradicional.- La tecnología para la producción de tortilla de maíz es muy antigua y se ha transmitido de generación en generación en el transcurso de los años. El proceso central en la elaboración de tortillas es la nixtamalización (del náhuatl, nextli, cal de cenizas y tamalli, masa de maíz cocido (Cabrera, 1992)).

En la figura 1 se presenta el diagrama de flujo del proceso de elaboración de tortilla. No se sabe con certeza cuando fue que los antiguos mexicanos comenzaron a dar al maíz el tratamiento térmico-alcalino de la nixtamalización, sin embargo la importancia de este tratamiento ha sido ponderada en múltiples estudios (Bressani y col., 1958; Vázquez y col., 1990). Inicialmente la ceniza volcánica fue usada como fuente de álcali para llevar a cabo la nixtamalización. Actualmente, en el ámbito artesanal e industrial se utiliza la cal grado alimenticio, es decir óxido de calcio con menos del 5% de óxido de magnesio (Reyes, 1990).

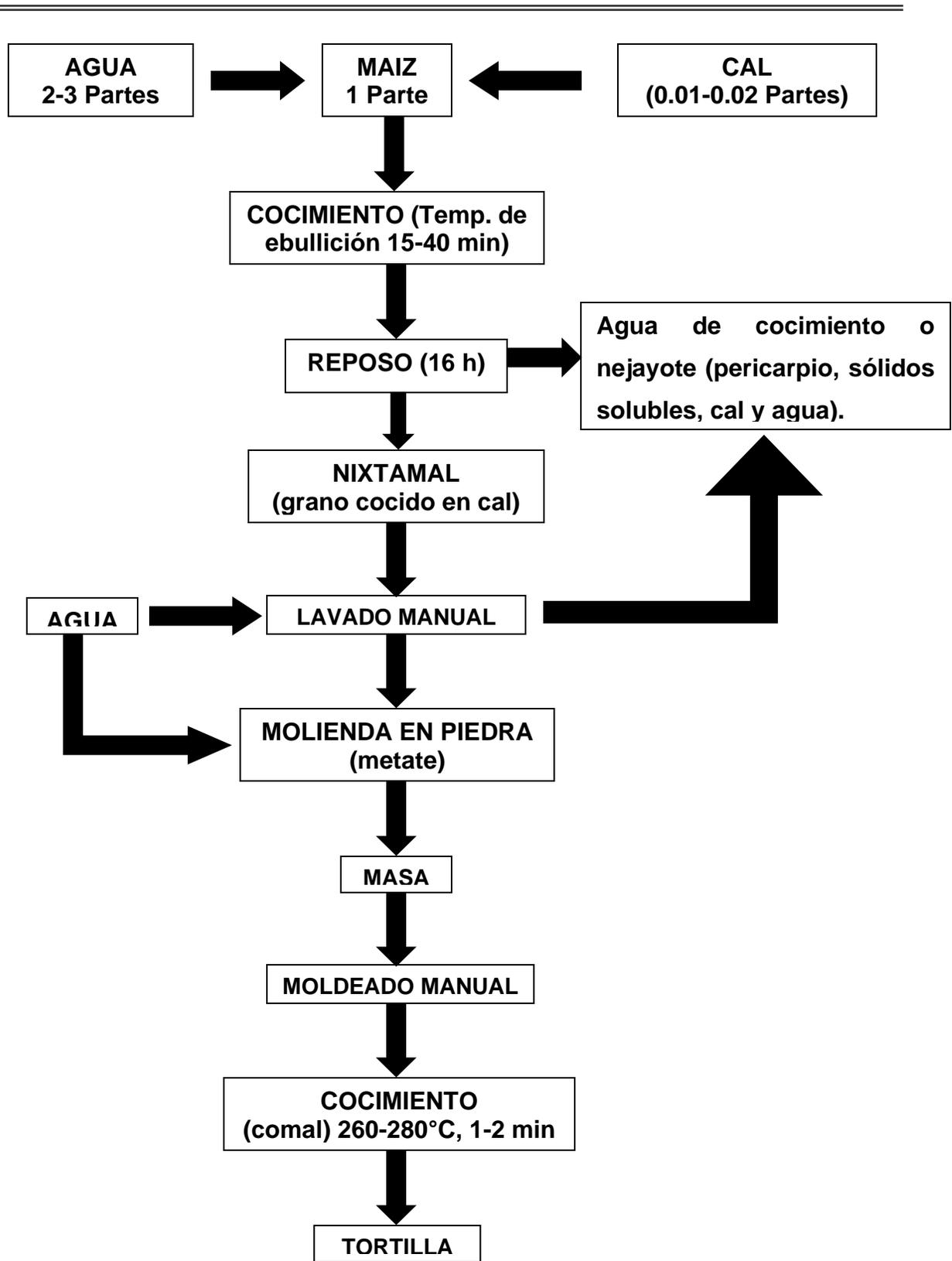
La nixtamalización, cumple varias funciones: facilita el desprendimiento del pericarpio y pedicelo del grano de maíz, controla la actividad microbiana, mejora el sabor, aroma, vida de anaquel y el valor nutricional de las tortillas entre otras (Paredes López y Saharópulos Paredes, 1983; Serna Saldívar y col., 1988a,b).

La utilización de este procedimiento tradicional está restringido actualmente a partes del medio rural y a pequeñas áreas urbanas, ya que se prefiere utilizar las harinas de masa deshidratada, que tienen la ventaja de dar resultados muy parecidos o de menor calidad, pero con menor trabajo y costo (Gómez, 2001).

---

---

Proceso industrial.- En la actualidad, los procesos industriales para la producción de harina instantánea nixtamalizada para la producción de tortillas, utilizan el proceso tradicional con modificaciones tales como: altos volúmenes de producción, tiempos de proceso más cortos, así como también la homogeneidad de los productos obtenidos (Serna Saldivar y col., 1990), es decir, una mejor distribución de tamaños de partícula en las harinas obtenidas. Diferentes métodos son usados para producir harina instantánea. El más común es cocer el grano limpio en una suspensión de cal inyectando vapor en un cocedor rotario entre 30 y 60 min. Dependiendo del tipo de maíz. El maíz cocido se deja reposar por poco tiempo, es enjuagado para remover parte del pericarpio y molido, utilizando un molino de martillos, especialmente diseñado para este fin, las partículas gruesas son molidas de nueva cuenta y separadas por tamaño, finalmente las partículas adecuado de acuerdo a las características deseadas en la harina, el cual depende del producto que se quiera elaborar (Rooney y Suhendro, 1999). El secado es una etapa de importancia crítica, debido a que este puede provocar cocimiento adicional y también que ocurra cierta expansión de las partículas después del proceso de molienda en húmedo (Gómez, 2001).



**FIGURA 1:** Diagrama de flujo del proceso tradicional para la elaboración de tortillas (Serna Saldívar y col., 1990).

---

---

## **2.4 Proceso higiénico de elaboración de tortillas en microempresas (tortillerías).**

De acuerdo a la NORMA Oficial Mexicana NOM-187-SSA1/SCFI-2002, Productos y servicios. Masa, tortillas, tostadas y harinas preparadas para su elaboración y establecimientos donde se procesan, especificaciones sanitarias, información comercial, métodos de prueba. Se tiene que: llevar un registro de las actividades de limpieza y desinfección, en su caso, del equipo, utensilios, instalaciones o materia prima, que se desarrollen conforme al manual de procedimientos, indicando fecha, hora y responsable, o debe hacer figurar como mínimo el nombre de los productos usados, concentraciones, tiempo de contacto y tipo de enjuagues. Además, el personal debe presentarse aseado al área de trabajo y con ropa limpia, lavarse las manos con agua y jabón, el personal que manipule dinero no debe tocar directamente con las manos el producto, esto con el fin de evitar contaminaciones microbiológicas y así cumplir con las especificaciones microbiológicas de los productos elaborados a base de maíz (Tabla 1) (NOM-187-SSA1/SCFI-2002).

De igual manera debe cumplir con especificaciones microbiológicas de aflatoxinas para la elaboración de productos a base de maíz (Tabla 2). El personal debe estar capacitado y cumplir con las buenas prácticas de higiene. Los responsables del proceso deben contar con la evidencia documental de dicha capacitación (NOM-187-SSA1/SCFI-2002).

En cuanto a las instalaciones físicas; Los establecimientos deben proveerse de instalaciones sanitarias para lavarse las manos en el área de elaboración y venta. No debe tener comunicación directa con habitaciones, etc.( NOM-187-SSA1/SCFI-2002).

**Tabla 1. Especificaciones microbiológicas de productos a base de maíz.**

<b>PRODUCTO</b>	<b>Límite máximo de Coliformes totales (UFC/g)</b>
Masa	2000
Tortillas	<30
Harinas de maíz nixtamalizado para preparar tortillas y tostadas.	100
Harinas integrales para preparar tortillas	500

Fuente: NORMA Oficial Mexicana NOM-187-SSA1/SCFI-2002

**Tabla 2. Especificaciones microbiológicas de aflatoxinas en productos a base de maíz**

<b>PRODUCTO</b>	<b>Límite máximo (µg/kg)</b>
Masa	<b>12</b>
Tortillas de maíz nixtamalizado	
Tostadas de maíz nixtamalizado	
Harinas de maíz nixtamalizado para preparar tortillas y tostadas	

Fuente: NORMA Oficial Mexicana NOM-187-SSA1/SCFI-2002

---

---

A pesar de la existencia de la norma, la mayoría de tortillerías en México no la aplican por completo, y algunas ni en parte, por lo que prevalece un aspecto de insalubridad y descuido.

## **2.5 Microorganismos identificados en granos y en productos a base de granos o semillas**

Uno de los principales deterioradores de los granos almacenados son los microorganismos. Los microorganismos (hongos, levaduras y bacterias) son agentes biológicos que pueden contaminar a las semillas en cualquier etapa de su producción, recolección, almacenamiento o comercialización. El desarrollo microbiano puede tener un efecto en el valor nutritivo y en las características organolépticas de los granos (sabor, olor, aspecto) (Fernández, 2000). Es además, responsable de la alteración de importantes propiedades germinativas de las semillas (vigor y poder de germinación) y, en el caso de los hongos, de la eventual formación de peligrosas sustancias tóxicas (micotoxinas). Las impurezas y los granos dañados y agrietados, favorecen el desarrollo de los microorganismos. La temperatura y la humedad tienen también una influencia determinante sobre la velocidad del desarrollo microbiano. Se ha comprobado que cuando la humedad relativa del aire es superior al 65% el desarrollo de microorganismos se produce a temperaturas comprendidas entre  $-1^{\circ}\text{C}$  a  $+37^{\circ}\text{C}$ . Por el contrario, las atmósferas pobres en oxígeno contribuyen a detener el desarrollo de estos agentes. (Fernández, 2000).

---

---

En la forma común de comercialización, los granos normalmente albergan una diversidad de bacterias, hongos y levaduras. El contenido microbiano de los granos o semillas varía con las condiciones ambientales. En la precosecha la lluvia, luz solar, vientos, actividad de animales (pájaros, insectos roedores), temperatura y humedad ambiental, así como la composición de la tierra son factores que contribuyen a configurar el tipo y abundancia de microorganismos presentes. Las principales bacterias corresponden a géneros de bacilos esporulados, coliformes, bacterias lácticas y enterococos (Fernández, 2000). Son comunes en los cereales bacterias psicrótrofas ( $10^4$  a  $> 10^5$  ufc/g), actinomicetes (hasta  $> 10^6$  ufc/g) y bacterias esporuladas ( $10^0$ - $10^5$  ufc/g) (ICMSF,1998). El contenido de hongos de los productos naturales suele oscilar entre 100 y 10000 ufc/g. Las cifras para bacterias mesófilas van de 100 a 1 millón ufc/g, eventualmente más; las levaduras de 10 a 10000; y los coliformes (la mayoría naturales del medio ambiente) de 100 a 10000 ufc/g (Mayou and Moberg, 1994). Entre las bacterias esporuladas con repercusiones sanitarias cabe mencionarse *B. mesentericus* y *B. cereus* en pequeños números durante la precosecha (Fernández, 2000).

El secado de los granos previo al almacenamiento es fundamental para prevenir el desarrollo de hongos y bacterias. Un producto estable para su comercialización no suele mostrar una actividad de agua (Aa) superior a 0.65, límite al cual la mayoría de los microorganismos son incapaces de proliferar. No obstante, a este valor de Aa los hongos pueden proliferar. Las levaduras sólo se desarrollan a niveles de actividad de agua más elevados. El secado natural a base de luz solar y viento confiere protección; el secado artificial disminuye considerablemente la población

---

---

microbiana. Los hongos contaminantes del campo tienden a morir, de manera que después del prolongado almacenamiento que se observa en el comercio, los niveles alcanzados disminuyen el riesgo de diseminación de patógenos fuera de las fronteras de los países exportadores (ICMSF, 1998).

Los hongos originales en los granos (contaminantes durante la precosecha) no suelen constituir un problema mayor; la mínima Aa de especies de *Penicillium* para desarrollar se encuentra cercana a 0.86. Los valores para otros géneros y especies de hongos aparecen en la Tabla 3. Con 13-13.5% de humedad, los que con mayor frecuencia llegan a proliferar son *Eurotium*, *Aspergillus* y *Penicillium* (Troller, 1979).

<b>Tabla 3. Mínima Aa para el desarrollo de hongos durante el almacenamiento de granos (con óptima temperatura).</b>	
Hongo	mínima Aa
<i>Aspergillus halophilicus</i>	0.68
<i>Aspergillus restrictus</i>	0.70
<i>Aspergillus glaucus</i>	0.73
<i>Aspergillus ochraceus</i>	0.80
<i>Aspergillus flavus</i>	0.85
<i>Sporendoma</i>	0.70
<i>Penicillium</i>	0.80-0.90

Fuente: Fernández, 2000

---

---

La temperatura y humedad prevalente, seleccionan géneros de hongos que varían con el tipo de grano. A menos que se rebase un nivel crítico de humedad relativa ( $Aa > 0.90$ ) durante la elaboración, empaqueo y almacenaje, la mayor parte de la población microbiana suele mantenerse relativamente estable. Con una humedad relativa de 22-25% en base húmeda, los microorganismos entran en actividad metabolizando compuestos nitrogenados simples y azúcar que existen en pequeñas cantidades, y además utilizan los minerales. La intervención ulterior de amilasas y proteasas da lugar a una progresiva invasión total del producto. El proceso invasivo puede ocurrir incluso durante el cultivo de la plantas en el campo. En el trigo y cebada destacan los géneros *Alternaria*, *Fusarium*, *Helminthosporium* y *Cladosporium* (ICMSF, 1998).

Pocos microorganismos son capaces de invadir el interior de los granos en la precosecha, por ejemplo, *Alternaria*, *Fusarium*, *Helminthosporium* y *Cladosporium*; no obstante, el proceso requiere una humedad mínima que en consecuencia no suele ocurrir en el campo. Durante el almacenamiento, estos hongos van perdiendo viabilidad; y aparecen *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus restrictus*, *Penicillium*, *Wallemia* y *Chrysosporium*. Específicamente en el maíz predominan especies de *Eurotium* (el deteriorador más común: *E. rubrum*, *E. amstelodami*, *E. chevalieri*), *Aspergillus restrictus*, y *Penicillium aurantiogriseum* y *P. viridicatum* (Fernández, 2000).

La asociación de las semillas con ciertos microorganismos y componentes de la fauna (aves, insectos, ácaros) suele conducir al deterioro, y en general a la

---

---

pérdida de la calidad durante su almacenamiento. El problema se acentúa cuando estos elementos interactúan (Sinha, 1973). La razón principal es que se trata del grupo microbiano que muestra mayor potencial xerotolerante. La presencia de especies toxigénicas como *A. flavus*, *F. graminearum* y *F. moniliforme* se hace más aparente. En consecuencia, los factores que afectan este proceso consisten principalmente en la Aa, la temperatura y la disponibilidad de oxígeno libre (Fernández, 2000).

El desarrollo de hongos fuera de control en los granos almacenados llega a elevar la temperatura a niveles en los que estos pierden su potencial germinativo. Adquieren colores anormales o pueden provocar una combustión espontánea. En el grano de maíz no es rara la presencia de hongos de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. Dependiendo de las condiciones climatológicas es posible la generación de aflatoxinas en el campo durante la formación de los granos. Temperaturas elevadas y sequía provocan una condición de estrés que favorece la invasión por el hongo toxigénico (situación que llevó hace unos años a la contaminación masiva del maíz en Tamaulipas). En otros casos el problema se propicia por las condiciones de humedad que prevalezcan durante el almacenamiento de los granos ya cosechados (Moreno, 1996).

Las esporas de hongos y bacterias presentes en la harina pueden sobrevivir al proceso de panificación. Por lo común en el pan ordinario que se expende en las panaderías (no empacada), la Aa es reducida lo suficiente para impedir la germinación de las esporas y en general la actividad de los microorganismos. La

---

---

presencia de sal o azúcar disminuye la Aa y limita esta actividad. Su propia estructura facilita la pérdida de agua. Es posible que el desarrollo microbiano ocurra en tipos especiales de productos: una formulación o relleno que impliquen un nivel de humedad crítico, o un empaque que mantenga ese nivel. Si el pan se empaca caliente una cierta proporción de humedad se condensará en el interior de la envoltura. En cualquier caso el desarrollo de hongos, o de otros microorganismos puede ser inevitable, por tal razón el fabricante recurre a conservadores químicos como propionato de sodio (dentro de la regulación sanitaria), y a imponer una fecha de caducidad al producto. Una escrupulosa sanidad en la planta, especialmente al tiempo del corte, es imperativa. Los hongos comunes reportado de este tipo de alteración corresponden a *Rhizopus stolonifer* (Spicher, 1967) y *Neurospora sitophila* (Yassin y Wheals, 1992) pero también es posible identificar especies de *Penicillium* y *Aspergillus*. Suficiente humedad y la presencia de ingredientes como la yema de huevo pueden llevar al desarrollo de bacterias esporulada comunes en la harina y en el equipo de fabricación del pan (Fernández, 2000).

## **2.6 Aspectos microbiológicos de las tortillas y de la harina para tortillas.**

Existen pocos estudios sobre la microflora de las tortillas de maíz cocido en agua de cal. Capparelli y Mata (1975) mostraron que los principales contaminantes de las tortillas preparadas en las sierras de Guatemala eran coliformes, *Bacillus cereus*, dos especies de estafilococos y muchos tipos de levaduras. En las tortillas recién cocinadas, el número de bacterias asciende como máximo a  $10^3$  organismos por gramo, lo cual constituye un nivel aceptable de consumo. Después

---

---

de ser cocinadas durante unos cinco minutos en una placa caliente, se colocan calientes en un cesto, a menudo tapado con un paño. El paño recoge el vapor de las tortillas y crea un ambiente propicio a la propagación de los microbios. Al cabo de unas 10 horas en esas condiciones, la superficie de las tortillas apiladas adquiere un aspecto viscoso y no son apropiadas para el consumo. Aunque en las zonas rurales es fácil que se produzca una contaminación en la conversión del maíz en tortillas, los factores que pueden contribuir son: el agua empleada para la transformación del maíz cocido en masa y el molinillo utilizado para moler el maíz cocido. En otro estudio (Molina y col., 1978) se halló un aumento mayor del número de bacterias en las tortillas fortificadas con harina de soja y vitaminas que en las tortillas no fortificadas. En este molinillo utilizado para moler el maíz cocido y hacer la masa fue clorado, por lo que disminuyeron las bacterias en el maíz suplementado con soja. Las tortillas elaboradas con ese maíz también tenían menos bacterias y disminuyó asimismo su ritmo de proliferación. Valverde y col., (1983) encontraron un número mayor de bacterias en la masa y en las tortillas fabricadas con maíz con alto contenido de proteína (MPC) que en el maíz común, lo que demostraba el efecto de la calidad nutritiva en la multiplicación de las bacterias (FAOSTAT 1993).

El contenido relativamente elevado de humedad, que reduce el período de conservación, ha limitado la comercialización de las tortillas, pero sigue habiendo demanda en las zonas urbanas, donde se venden previa conservación en recipientes refrigerados. Se han hecho varios intentos de prolongar su período de conservación. Peláez y Karel (1980), elaboraron una tortilla de humedad

---

---

intermedia con un período de conservación estable y protegida frente a la multiplicación de microbios, entre otros *Staphylococcus aureus*, levaduras y mohos y enterotoxinas, gracias al empleo de glicerol, partículas sólidas de maíz DE-42 y sal, así como el agente micostático compuesto por sorbato potásico. Los investigadores afirmaron que el producto empaquetado adecuadamente, podía durar por lo menos 30 días, y que su apariencia, textura y demás características eran similares a las de las tortillas ordinarias con actividad hídrica de 0,97. Hickey y col., (1982) consiguieron una protección relativamente adecuada de las tortillas con bajos niveles de sorbatos o propionatos añadidos a la masa y mediante la pulverización de sorbato en la superficie (por ambos lados) tras tostarla en la placa caliente. Más recientemente, Islam y col., (1984) afirmaron que la utilización de propionato de calcio prolonga a 2-5 días el período de conservación de las tortillas a temperatura ambiente y a 2-11 días usando dimetilfumarato, en idénticas condiciones de almacenamiento y si se emplean bolsas de polietileno. Aunque se ha conseguido prolongar el período de almacenado en anaqueles, la buena conservación sigue siendo un problema para quienes compran alimentos en los supermercados (FAOSTAT 1993).

No existen informes similares respecto a los aspectos microbiológicos de la harina para tortillas y las tortillas mismas, aunque cabe esperar que el número de bacterias sea bajo debido al procedimiento utilizado para prepararla y utilizarla en el hogar (FAOSTAT 1993).

---

---

## **2.7 Fuente de contaminación de granos y semillas**

En su exterior los cereales son productos naturalmente contaminados; al hablar de su flora natural suele emplearse el término de epifítica. Durante su crecimiento se encuentran expuestas a microorganismos provenientes de la tierra y animales. Por lo general contienen también una dotación considerable de materia extraña. Posteriormente el equipo y métodos usados durante la cosecha introducen factores adicionales de contaminación, y a lo largo del procesamiento de los cereales para la obtención de materias primas (fundamentalmente harinas) las condiciones internas de las fábricas aportan una diversidad de microorganismos (Fernández, 2000).

Existen varios tipos de microorganismos que crecen y se reproducen en todo tipo de alimentos, causando serios problemas de daño y pérdida. Los granos y las semillas también son vulnerables a los microorganismos, especialmente, si no se almacenan a una baja humedad. El desarrollo de los microorganismos depende de una adecuada humedad en el aire y la semilla. Si hay humedad disponible la rapidez del proceso de deterioro por los microorganismos aumenta destruyendo la fuente de alimento. En general posterior a la cosecha, los microorganismos son los segundos en importancia después de los insectos, como causantes de pérdidas de granos después de la cosecha. Sin embargo, dependiendo de condiciones ambientales pueden ser, en ocasiones, los principales causantes (Fernández, 2000).

El deterioro de los granos es causado por tres tipos de microorganismos: hongos, bacterias y levaduras. Cada uno con requisitos específicos de oxigenación, nutrientes, humedad y temperatura. De esta forma las condiciones ambientales

---

---

determinan el tipo de microorganismos que va a prevalecer en el producto causando la mayoría del daño (Fernández, 2000).

Los microorganismos son tan pequeños que no se pueden ver fácilmente sin la ayuda de microscopios, sin embargo, sus efectos son claros, decoloran el grano, producen malos sabores y olores, aumentan la temperatura, reducen la germinación, producen semillas arrugadas y en algunos casos hasta toxinas. Todas estas alteraciones tienen un efecto directo en el precio que el productor obtiene por su grano (Fernández, 2000).

Las micotoxinas son producto de la actividad metabólica de los mohos (metabolitos de mohos) y son agentes químicos o mezclas de agentes químicos específicos; aparecen en cultivos maduros, se acumulan y aparentemente ya no tienen un papel en su metabolismo normal (Fernández, 2000).

En general las micotoxinas se mantienen muy estables en los alimentos; son, sin embargo, susceptibles de degradación. Esta puede lograrse (generalmente no con el éxito deseable) por radiación, tratamiento térmico, ácidos o bases fuertes, agentes oxidantes y compuestos químicos como el bisulfito (Doyle y col., 1982).

Martínez (1979), analizó diversas muestras de tortillas en México D.F. en distintas épocas del año, y halló que del 15 al 20 por ciento de las muestras recogidas en la primavera de 1978 y en la estación lluviosa de 1977- 1978 contenían aflatoxinas. Además, detectó concentraciones de aflatoxinas B1 que variaban entre 50 y 200 ppb. También señaló que la cocción del maíz en agua de cal disminuía las concentraciones de aflatoxinas de entre un 50 y un 75 %. Según Martínez, (1979) así como De Campos, y col., (1980), señalan que concentraciones de cal de hasta

---

---

el 10 por ciento no resultaban más eficaces que una del 2 % para disminuir las aflatoxinas (FAOSTAT 1993).

De acuerdo Ulloa y Schroeder (1969), el proceso de elaboración de tortillas no lograba eliminar las aflatoxinas del maíz contaminado. Sin embargo, otros investigadores han obtenido resultados opuestos. Según Solórzano (1985), el maíz inoculado con *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* arrojaba niveles elevados de aflatoxinas que disminuían con la cocción en agua de cal, totalmente en algunos casos, pero en la mayoría en hasta un 80 %. La concentración de cal variaba del 0.6 al 8 % y se efectuaron análisis de maíz, masa, tortillas y aguas de cocción. En otro estudio, De Arriola y col., (1987; 1988), empleando MPC Nutricita, encontraron que los niveles de cal con que se prepara habitualmente el nixtamal en Guatemala no disminuyen las aflatoxinas contaminado lo suficiente para que su consumo resulte inocuo a los seres humanos (FAOSTAT 1993).

De acuerdo Price y Jorgensen (1985), el proceso de cocción en agua de cal disminuía los niveles de aflatoxinas de 127 µg por kg en el maíz en bruto a 68,6 µg por kg en las tortillas. Los investigadores concluyeron que el proceso apenas tenía eficacia, dado que el valor inferior alcanzado aún estaba muy por encima del valor considerado aceptable (unos 20 µg por kg) (FAOSTAT 1993).

Los resultados obtenidos por diversos investigadores son algo contradictorios; en algunos casos se obtuvo una reducción parcial de algunas micotoxinas, mientras que en otros la eliminación fue total (FAOSTAT 1993).

---

---

## 2.8 Características de las especies del genero *Bacillus*

Son bacilos rectos solos o agrupados en cadenas, en general están clasificados dentro de los microorganismos aeróbicos o facultativos y productores de catalasa. Tienen un ADN de 32 -68 cromosomas. En general producen endosporas, es decir esporas que se forman dentro de la célula.

En el genero *Bacillus* se aceptan ahora 34 especies, si bien un número de cepas no se ha clasificado convenientemente; sólo 2 son patógenas al hombre: *B. anthracis* y *B. cereus*. Otras especies se aíslan de procesos infecciosos no intestinales, con un papel etiológico discutible o admitidas como patógenos oportunistas (Fernández, 2000).

Producen endosporas, las que son termoresistentes y también resisten a agentes perjudiciales como la desecación, la radiación, los ácidos y los desinfectantes químicos. Está compuesto por bacilos gram positivos grandes caracterizados por su capacidad para producir endosporas. Muchas otras especies están distribuidas en la naturaleza y se hallan en la mayor parte de las muestras de suelos, agua y polvo. (Fernández, 2000).

Muchos bacilos producen enzimas hidrofílicas extracelulares que descomponen polisacáridos, ácidos nucleicos y lípidos, permitiendo que el organismo emplee estos productos como fuentes de carbono y donadores de electrones. Además producen antibióticos y algunos ejemplos de estos son: la bacitracina, polimixina, tirocidina, gramicidina y circulina. Los bacilos en general crecen bien en medios sintéticos que contienen azúcares, ácidos orgánicos, alcoholes, etc., como las

únicas fuentes de carbono y el amonio como única fuente de nitrógeno. (Fernández, 2000).

Hay especies mesófilas o termófilas, proteolíticas, potentes, débilmente proteolíticas o carecen de esta actividad, puede producir gas o no producirlo, y ser lipolíticas o carecer de esta actividad. Viven dentro los límites de temperatura de 55 a 70°C. El límite inferior de pH para *Bacillus* es de 2 a 3 (Tabla 4) (Fernández, 2000).

**Tabla 4. Características de algunas especies de *Bacillus*.**

Característica	Especie						
	cer	subt	anth	brev	coag	stea	Spha
Grupo							
morfológico	I	I	I	II	I/II	II	III
Movilidad	+	+	-	+	+	+	+
Desarrollo							
anaeróbico	+	-	-	-	+	-	-
7% NaCl	+	+	+	-	-	-	±
50°	-	+	-	+	+	+	-
Hidrólisis							
almidón	+	+	+	-	+	+	-
lecitina	+	-	±	-	-	-	-
gelatina	+	+	-	+	-	±	+
Voges-Proskauer	+	+	+	-	-	-	-
NO <sub>2</sub>	+	+	±	±	±	+	-

Fuente: Fernández, 2000

cer= *B. cereus*; subt= *B. subtilis*; anth= *B. anthracis*; brev= *B. brevis*; coag= *B. coagulans*; stea= *B. stearothermophilus*; spha= *B. sphaericus*.

---

---

### 2.8.1 *Bacillus cereus*

El reconocimiento de esta bacteria como agente etiológico de ETAs ocurrió hasta 1950 cuando Hauge, en Noruega mostró suficiente evidencia que probaba su capacidad patógena, incluidas pruebas realizadas en su propia persona. (Fernández, 2000).

*B. cereus* es un bacilo gram positivo, móvil, con longitud de 3 a 5  $\mu\text{m}$  por 1  $\mu\text{m}$  diámetro. Forma cadenas cortas o hasta con más de 10 células; sus esporas encuadran claramente en el grupo morfológico I. El cuerpo bacteriano presenta con frecuencia vacuolas y sus lados son paralelos con los extremos ligeramente redondeados. La espora de esta bacteria presenta apéndices o pilis que tienen participación en la adhesión a superficies (equipo, utensilios), y probablemente también a células de la mucosa intestinal (Granum, 1997).

Es una bacteria aerobia-anaerobia facultativa. Esporula fácilmente en los medios de laboratorio bien aereados. Puede inducirse la esporulación en medios especialmente diseñados con un rendimiento hasta de 95% de esporas libres (Waites y col., 1988). La esporulación es mínima en medios relativamente ricos como el agar soya tripticasa; en el medio de MYP no esporula. Se encuentra ampliamente disseminado en el medio ambiente. Las colonias son grandes, sin brillo, con aspecto semejante al vidrio esmerilado y borde ondulado. La temperatura óptima de desarrollo es de 30°C, con límites de 5 a 50°C (IAMFES, 1991; Van Netten y col., 1990), o de 4 a 55°C según la ICMSF, 1996. Tiene capacidad para proliferar a baja temperatura por lo que puede propiciar o reforzar mediante incubaciones sucesivas a tales temperaturas (Foegending y Berry,

---

---

1997). A una concentración de 7% de NaCl puede aparecer desarrollo después de 7 días (Kim and Goepfert, 1971). La actividad de agua mínima para crecer es de 0.93, en tanto que el pH óptimo es 7.0 con límites de 4.4 a 9.3 (IAMFES, 1991) o 5.0 a 8.8 (ICMSF, 1996). Hemoliza los eritrocitos en placas de gelosa sangre. No desarrolla en Aa entre 0.92 y 0.93 cuando se utiliza NaCl como soluto activo. Es susceptible al efecto inhibitorio del ácido sórbico (0.26%, pH 5.5) y 0.39% de sorbato de potasio a pH 6.6 (ICMSF, 1996). Esta presente comúnmente en muchos alimentos entre los que hay que enfatizar los cereales, especias, carne y leche crudas (Fernández, 2000).

### **2.8.2 *Bacillus coagulans***

Es una bacteria grampositiva, fermentativa. Es un termófilo facultativo que crece en los medios de cultivo entre 20 y 55°C, y menos frecuentemente a 60°C. Si el pH de un alimento se encuentra en 4.0 o menos, es incapaz de entrar en actividad. Producen catalasa y esporas ovales o cilíndricas. Usualmente hidrolizan caseína y almidón. Los esporangios no son hinchados. La pared de la espora es delgada. Se caracteriza por realizar una fermentación hemoláctica típica, como la de las bacterias ácido lácticas, es decir una fermentación de azúcares con un producto final de ácido láctico y otros productos menores como ácido acético, ácido fórmico y glicerol (Fernández, 2000).

### **2.8.3 *Bacillus anthracis***

Es un bacilo típico, robusto, con tendencia a formar cadenas, inmóvil y formador de esporas en ambientes bien oxigenados. Las cepas virulentas muestran una

---

---

cápsula constituida por un polímero del ácido D-glutámico, y dan lugar a colonias mucoides. Las avirulentas no muestran cápsula y sus colonias son rizoides similares a medusa. Se encuentra ampliamente distribuido en la tierra, que es su reservorio natural. Los materiales que con ella se ponen en contacto fácilmente se contaminan; también se le detecta en agua de río expuesta a desechos de animales, alimentos y fertilizantes a base de animales. En la tierra las esporas pueden permanecer viables por años (Fernández, 2000).

#### **2.8.4 *Bacillus stearothermophilus***

Es una bacteria termófila reconocida como intensamente termorresistente. Esta cualidad se aprovecha para usarlo en la industria y en el laboratorio como indicador de la eficiencia de procesos de esterilización térmica. Es un bacilo típico que exhibe reacción variable a la coloración de Gram, con amplia distribución en la naturaleza. Su tiempo de generación se prolonga bajo condiciones de anaerobiosis. El crecimiento es nulo a pH entre 5 y 9. Producen catalasa. A 37°C y con aereación se promueve la esporulación. No genera cantidades apreciables de gas, pero desarrolla en alimentos de baja acidez como maíz, chícharos y espárragos cuando el alimento se ha mantenido 43°C o más por tiempo suficiente; no suele abombar el envase en alimentos enlatados (Ito, 1981). Una vez germinadas las esporas (requieren alta temperatura), prolifera progresivamente con mas lentitud conforme se alcanza el nivel límite de 30-40°C (Olson y Sorrells, 1992); el superior es de 65-75°C (Fernández, 2000).

---

---

### **2.8.5 *Bacillus subtilis***

Los *Bacillus subtilis* son bacterias grampositivas, mesófilas, fermentativas, producen esporas ovales o cilíndricas, la pared de la spora es delgada, hidrolizan la caseína y el almidón, realiza una fermentación 2,3 butanediol, cuyos productos principales son butanediol, etanol, CO<sub>2</sub>, y H<sub>2</sub>O. Estos microorganismos también producen glicerol como un producto de la fermentación. *Bacillus subtilis* no es potencialmente patógeno, no produce endotoxinas y secreta proteínas hacia el medio. Es inofensivo para los animales convencionales (Anónimo, 2007c)

### **2.8.6 *Bacillus polymyxa***

*Bacillus polymyxa* es una bacteria gram variables; mesófilas, produce esporas ovales y la pared de la spora es gruesa. Es de esporangio distintivamente hinchado, se caracteriza por producir 2.3-butanediol, etanol y H<sub>2</sub>, también es fijadora de nitrógeno (Anónimo, 2007c)

### **2.8.7 *Bacillus megaterium* y *Bacillus licheniformis***

Estos dos tipos de *bacillus* son muy bacterias muy similares, debido a que son microorganismos gram positivas, mesófilas, fermentativas y producen esporas ovales o cilíndricas, usualmente hidrolizan caseína y almidón (Anónimo, 2007c)

---

---

## **2.9 Pruebas bioquímicas que se emplean para identificar al genero *Bacillus*.**

### ***Prueba de la Catalasa***

En los ambientes acuosos, que contienen oxígeno disuelto, como el citoplasma de las células, aparecen formas tóxicas derivadas del oxígeno. Las bacterias que viven en ambientes aerobios necesitan un equipo enzimático capaz de neutralizar estas formas tóxicas. Entre estas enzimas se encuentra la catalasa, que convierte el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular. Son ejemplos de catalasa positivo *Escherichia coli* y catalasa negativo *Enterococcus faecalis*. (Anónimo, 2007d)

### ***Producción del indol***

Esta prueba se emplea para detectar la presencia de la enzima triptofanasa en las bacterias. Esta enzima degrada el aminoácido triptófano a indol, compuesto que se determina en el ensayo. Para realizar esta prueba, la bacteria se cultiva en un caldo de triptona con NaCl al 0,5 % (medio especialmente rico en triptófano). Si la bacteria tiene la enzima triptofanasa, al añadir al medio el reactivo de Kovac, este formará un complejo con el indol y se producirá un anillo de color rojo en la superficie del caldo y la prueba será considerada positiva. (Anónimo, 2007d)

### ***Utilización del citrato***

Este medio indica la capacidad de las bacterias de metabolizar el citrato. Contiene citrato como única fuente de carbono, fosfato de amonio como única fuente de fosfato y azul de bromotimol como indicador de pH. Únicamente las bacterias capaces de metabolizar citrato podrán multiplicarse en este medio, al utilizar los fosfatos presentes liberan iones amonio (básicos) que junto con la eliminación de

---

---

citrato (ácido) genera una fuerte basificación del medio que se aparenta con un cambio de color del indicador de pH de verde a azul. (Anónimo, 2007d)

***Prueba del Rojo de metilo (RM) y Voges-Proskauer (VP).***

Las bacterias que en anaerobiosis fermentan los azúcares pueden realizar esto por distintas rutas. Las enterobacterias son anaerobios facultativos que utilizarán la glucosa en dos fases: primero la metabolizan aeróbicamente, consumiendo rápidamente el oxígeno del medio, para, en segundo lugar, continuar metabolizándola por vía anaerobia (fermentación). Esta fermentación puede ser de dos tipos:

a) Fermentación ácido-mixta. Los productos finales son ácidos orgánicos (fórmico, acético, láctico y succínico) y etanol. Fermentación característica de los géneros *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Yersinia*.

b) Fermentación butilén-glicólica. Los productos finales son compuestos neutros como el butanodiol y el etanol, produciéndose acetoína como intermediario. Fermentación característica de los géneros *Enterobacter*, *Serratia* y la mayoría de especies *Erwinia*.

La liberación de ácidos orgánicos en el primer tipo de fermentación (ácido-mixta) generará un acusado descenso del pH que podrá ser detectado añadiendo al medio un indicador de pH como el rojo de metilo (rojo a pH de alrededor 4,0). Si la fermentación que se ha llevado a cabo es del tipo butilén-glicólica, la producción de acetoína puede ser detectada añadiendo al medio KOH y alfa-naftol (prueba Voges-Proskauer) que reaccionará con este compuesto produciendo un color rojo característico. (Anónimo, 2007d)

---

---

### III. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo General

Aislar, identificar y conocer el comportamiento de microorganismos *Bacillus* en tortilla

#### 3.2 Objetivos particulares

- a) Aislar y cuantificar microorganismos a partir de tortillas deterioradas.
- b) Identificar mediante morfología microscópica, macroscópica y pruebas bioquímicas los microorganismos aislados de las tortillas deterioradas.
- c) Identificar las cepas con mayor potencial deteriorador.
- d) Evaluar el comportamiento de cepas de *Bacillus* en caldo de cultivo y tortilla.
- e) Evaluar el efecto de 2 humectantes en el desarrollo de *Bacillus* en medio de cultivo.

---

## **IV. METODOLOGÍA**

### **4.1 Material de laboratorio**

- Agitador de vidrio
- Asas bacteriológicas
- Bolsas de polietileno, presentación en rollo sin marca comercial
- Cajas petri desechable.
- Cuchillo estéril
- Espátula
- Gradilla
- Matraces enlermeyer 250 ml
- Micropipetas (100-1000  $\mu$ l)
- Mechero
- Portaobjetos
- Probeta 100 ml
- Puntas para micropipetas estériles
- Tubos de ensaye con tapón de rosca
- Vasos precipitados de 150, 250 ml.

---

## 4.2 Medios de cultivo

Todos los medios de cultivo fueron de marca Bioxon, México

- Agar de bilis y rojo violeta
- Agar citrato de Simmons
- Agar cuenta estándar
- Agar MR-VP (rojo de metilo y Voges-Proskauer)
- Agar Muller-Hillton
- Agar papa dextrosa
- Agar soya tripticasa
- Caldo biotriptasa
- Caldo soya tripticaseína
- Peptona de caseína

## 4.3 Reactivos

- Aceite de inmersión
- Agua destilada
- Agua oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)
- Alcohol-cetona
- Fenilalanina
- Reactivo de Ehrlich
- Rojo de metilo
- Solución de cristal violeta
- Solución de lugol
- Safranina

---

#### 4.4 Equipos

- Autoclave (Yamato Sterilizer SM 200)
- Balanza analítica (PC 2000 Mettler Toledo)
- Cuenta colonias (American Optical Québec)
- Desecador al vacío
- Higrómetro / termómetro (Frequency standard 128, Model 55000).
- Incubadora bacteriológica (Blue M)
- Lámpara de luz UV ENF-240C (Spectroline)
- Microscopio
- Parrilla de calentamiento
- Potenciómetro (HANNA pH 213, instruments Microprocessor pH Meter).
- Refrigerador (Lab-line Environeers Inc)
- Stomacher 400 Circulator (Seward )
- Vortex-Genie 2 (Scientific Industries)
- Termómetros

---

---

## **4.5 Procedimientos**

### **4.5.1 Recolección de muestras**

44 muestras de tortillas (con 500g cada muestra) fueron compradas en diferentes tortillerías localizadas en diferentes municipios; Pachuca de Soto, Tula de Allende, Tezontepec de Aldama y Tepeji del Río. Durante la recolección de las muestras, no se tuvo contacto directo con las tortillas; estas se transportaron al laboratorio en su envoltura original de venta y fueron procesadas dentro de las 2 h posteriores a su compra.

### **4.5.2 Aislamiento y cuantificación de microorganismos a partir de tortillas descompuestas**

En el laboratorio las tortillas (500 g) “sin despegar” unas de otras se introdujeron en una bolsa de plástico estéril y se cerró la bolsa. Esta se incubó a 20-25°C por 24 h. Después de este tiempo, bajo condiciones asépticas, las tortillas se retiraron de la bolsa y una por una fueron revisadas visualmente para detectar la presencia de signos típicos de descomposición de las tortillas como son mucosidad o formación de filamentos finos entre las tortillas. Se tomaron 10 g de tortillas descompuestas y se colocaron en una bolsa estéril que contenía 90 mL de diluyente de peptona; la bolsa se agitó en un Stomacher durante 1 min. A partir de éste homogeneizado se realizaron diluciones decimales con diluyente de peptona y cada dilución fue inoculada por duplicado (para tener dos series de cajas) sobre cajas de agar de soya tripticaseína mediante la técnica de extensión por superficie (BAM, 2001). Una serie de cajas inoculadas fue incubada en microaerofilia y otra

---

---

en aerofilia a 25°C/ 24h. La microaerofilia se consiguió con el sistema conocido como “Jara con vela”. Este no es más que un recipiente cerrado herméticamente al que previamente se le ha introducido una vela encendida. Al cerrarse el recipiente, el oxígeno se va consumiendo por la combustión de la vela hasta ser insuficiente para que continúe la combustión, por lo que ésta cesa y la flama se apaga. Después de la combustión queda una atmósfera de entre 17-19% de oxígeno y de 2-4% de dióxido de carbono (BAM, 2001). Luego de la incubación se cuantificó y se analizó la morfología macroscópica de las colonias.

#### **4.5.3 Identificación de los microorganismos aislados por microscopia y pruebas bioquímicas**

##### Microscopia.

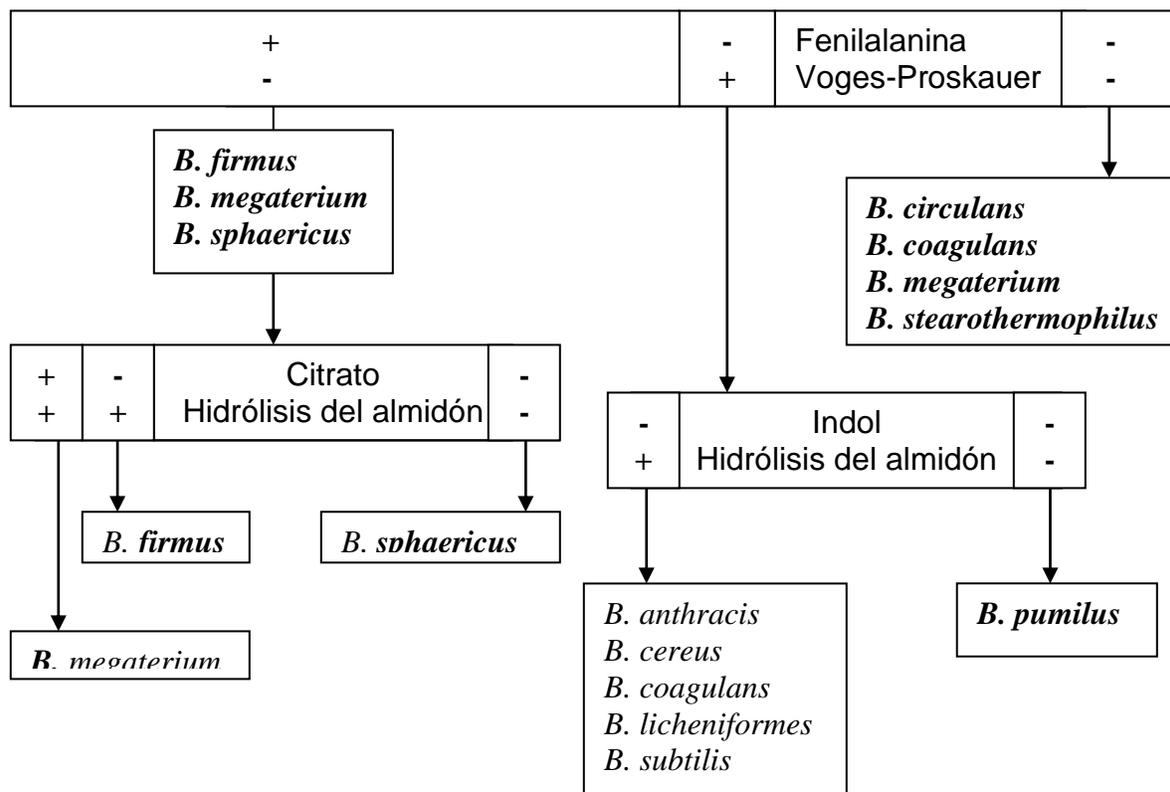
Se realizó la tinción de Gram: Para ello se realizó un frotis de la cepa bajo estudio sobre un portaobjetos, se tiñó con solución de cristal violeta y se fijó con solución de lugol; posteriormente, se decoloró con alcohol-cetona. Finalmente, se aplicó safranina y posteriormente lavar con agua para quitar el exceso de safranina que quedó (BAM, 2001). Bajo el microscopio de luz, las bacterias gram-positivas aparecen de color violeta mientras que las gram-negativa se tiñen de rosa.

##### Pruebas bioquímicas.

La identificación se realizó mediante diferentes pruebas del metabolismo de los microorganismos bajo estudio: catalasa, movilidad, producción del indol, utilización del citrato, hidrólisis del almidón, prueba de rojo de metilo, Vogues-Proskauer y prueba de la fenilalaninasa (MacFaddin, 2003). En el anexo 1 se describe a detalle

los pasos de cada prueba. La identificación de las cepas se realizó según el comportamiento bioquímico de cada cepa siguiendo el esquema descrito en la figura 2.

**Figura 2. Diferenciación de las especies de *Bacillus* formadoras de esporas aisladas con más frecuencia.**



Fuente: Macfaddin, 2003

---

---

#### **4.5.4 Ensayos potencial deteriorador de las cepas de *Bacillus***

Todas las cepas fueron crecidas en agar soya tripticaseína en condiciones de aerobiosis e incubando a 35°C/48 h. Bajo estas condiciones, las cepas de estudio alcanzaron una concentración de alrededor de  $1 \times 10^9$  UFC/mL. A partir de cada cepa se realizaron diluciones decimales hasta tener una concentración de alrededor de  $1 \times 10^6$  UFC/mL. 20 µL de cada cepa fueron colocados sobre agar almidón; una vez que se absorbió el líquido, las cajas fueron almacenadas a 35°C por 48 h a las 24 y 48 h se midió el diámetro del desarrollo de las cepas sobre el agar y el de la zona de hidrólisis que se formó alrededor del desarrollo. Cada cepa se inoculó por triplicado (Macfaddin, 2003).

#### **4.5.5. Desarrollo de los microorganismos en medio de cultivo a tres diferentes concentraciones de glicerol y manitol (0.5% 1.0% y 1.5%)**

La concentración de los humectantes que se proveó se seleccionó debido a que en un tesis previo se trabajo con 2 humectantes (glicerol y manitol) a 3 diferentes concentraciones (0.5 %, 1.0%, y 1.5%), se determinó que no afecta las propiedades sensoriales de las tortillas (Thelpalo, 2006).

Se preparó agar soya tripticaseina AST con tres diferentes concentraciones de glicerol (0.5% 1.0% y 1.5%): el medio de cultivo se preparó únicamente adicionando la concentración correspondiente de glicerol al AST previo a su preparación; en adelante el medio de cultivo se preparó como se prepara de manera normal. Una vez esterilizado el medio y enfriado a una temperatura de aproximadamente 50°C, se vertió en cajas de petri estériles y se dejó solidificar.

---

---

Paralelamente, por separado se prepararon inóculos de cada una de las cepas seleccionadas, tal como se describió en 4.5.4; las cajas de cultivo fueron inoculadas con 20  $\mu$ L de cada una de las cepas, una vez que se absorbió el líquido, las cajas fueron almacenadas a 35°C por 48 h. Después de la incubación se midió el diámetro del desarrollo con un vernier, de igual manera se realizó con el manitol y con las mismas concentraciones (0.5%, 1.0% y 1.5%).

#### **4.5.6. Desarrollo en CST de las cepas con mayor potencial para hidrolizar el almidón.**

Los estudios de cinética se realizaron en un equipo computarizado conocido como Bioscreen C (Labsystems, Growth Curves Ltd, USA). Este es un equipo que consta de una unidad analizadora y una computadora. La unidad analizadora contiene una unidad dispensora, una incubadora móvil y un turbidímetro. Este último mide los cambios en la turbidez de un medio de cultivo inoculado durante su incubación. Las muestras son incubadas en una placa que tiene 100 pocillos con un volumen de 400  $\mu$ L para pruebas individuales. El Bioscreen C puede monitorear el crecimiento de los microorganismos de hasta 200 fosas simultáneamente. El equipo se programa para obtener las condiciones de incubación deseadas en el aparato (tiempo-temperatura de incubación y frecuencia del registro de absorbancia y de la agitación) colocándose la placa en el aparato para su incubación. Finalizado el tiempo programado aparecen en la pantalla de la computadora gráficas de cinéticas de desarrollo de los microorganismos, que muestran los cambios de densidad óptica (D.O.) contra el tiempo. El comportamiento de los microorganismos estudiados puede evaluarse de acuerdo a los siguientes parámetros: a) La pendiente de la fase Log, b) El área

---

---

bajo la curva de desarrollo, y c) El inicio de la fase logarítmica, reportada por el equipo como el tiempo de detección, que es el tiempo en el cual el aparato detecta un cambio de 0.020 nm en la D.O. con respecto a la inicial. El equipo provee una temperatura de incubación constante. Las cepas con mayor potencial para hidrolizar el almidón se crecieron en CST a 35°C/ 24 h. A partir de estos cultivos se realizaron diluciones decimales en solución salina isotónica SSI hasta tener una suspensión con una concentración de  $1 \times 10^5$  UFC/mL . 100  $\mu$ L de esta suspensión se depositaron en 10 mL de CST para tener una concentración aproximada de 1000 UFC/mL de caldo. Finalmente a partir de la suspensión en CST (caldo soya tripticasa) porciones de 400  $\mu$ L fueron tomadas y se depositaron en cada una de las fosas de la charola del Bioscreen y se incubó en el equipo a 37°C/24 h. Cada 20 minutos el equipo registró los cambios en la densidad óptica de cada fosa. Se investigó el comportamiento de *Bacillus ssp*, *B. megaterium*, *B. firmus* y *B. stearothermophilus*; estas cepas fueron aisladas de las tortillas deterioradas, previamente aisladas e identificadas.

#### **4.5.7 Comportamiento de *Bacillus ssp*, *B. megaterium*, *B. firmus* y *B. stearothermophilus* en tortilla fresca.**

En un centro comercial se compraron 2 kg de muestras de tortillas frescas procesadas en tortilladora, se transportaron al laboratorio y se procesaron dentro de las siguientes 2 horas como se describe posteriormente.

Se trabajó con cepas de *Bacillus ssp*, *B. megaterium*, *B. firmus* y *B. stearothermophilus* que fueron aisladas de las tortillas deterioradas. Las cepas fueron marcadas con resistencia al antibiótico rifampicina, como previamente se

---

---

ha descrito (Rojas, 2005; Moreno, 2006). Las cepas resistentes a rifampicina (Rif+) se mantuvieron en agar soya tripticasa inclinado a 3-5°C hasta su uso. Previo a este se activaron dos veces en caldo soya tripticasa incubado a 35°C/24hrs.

Por otro lado, cultivos de 24 h de *Bacillus* ssp, *B. megaterium*, *B. firmus* y *B. stearothermophilus* R+ fueron lavados dos veces en solución salina isotónica (SSI) a 3500 rpm/25 min. Los cultivos se resuspendieron en SSI para obtener aproximadamente  $1 \times 10^9$  UFC/mL. A partir de este cultivo lavado, se realizaron diluciones decimales en diluyente de peptona para obtener una concentración aproximada de  $1 \times 10^2$  UFC/mL. A partir de esta suspensión se inocularon 10  $\mu$ L de sobre una tortilla, una vez inoculada la tortilla, se colocó una tortilla sobre la inoculada y otra debajo. Las tres tortillas se introdujeron en una bolsa de plástico y se cerró herméticamente. Se prepararon varias bolsas con tortillas inoculadas de la misma forma y se incubaron a 30°C. Después de 48 h se tomaron las bolsas por triplicado con las tortillas, estas se sacaron y se cortó circularmente con ayuda de un cuchillo estéril la parte de las tortillas que tuvieron contacto con el inóculo (la tortilla de arriba y la inoculada), esta porciones se colocaron en una bolsa estéril y se adicionó 100 mL de diluyente de peptona; las bolsas se homogeneizaron en Stomacher por 1 min. a 260 rpm. A partir de estas suspensiones homogeneizadas, el recuento de los microorganismos se efectuó mediante la técnica de vertido en placa empleando agar con 100 ppm de rifampicina. Las cajas fueron incubadas a 35°C por 24-48 h, todos los estudios se realizarón por duplicado.

---

---

## V. RESULTADOS Y DISCUSION

### 5.1 Aislamiento, cuantificación e identificación de microorganismos presentes en la tortilla

El número de microorganismos encontrados después de la incubación de cada una de las muestras analizadas se reportan en el anexo 5 de la tesis. En este apartado sólo se incluyen los máximos, mínimos y el promedio alcanzado en cada muestra (Tabla 5). Después de 24 h a 30°C, todas las muestras se descompusieron; la descomposición se manifestó en aparición de filamentos translucidos muy delgados pero visible y presencia de olor característico a descomposición. Este ocurrió entre las tortillas que no se despegaron. Después de la incubación, todas las tortillas examinadas presentaron niveles elevados de microorganismos microaerófilos ( $1 \times 10^9$  ufc/g). Sólo dos muestras presentaron baja concentración ( $3.1 \times 10^3$  y  $9.0 \times 10^4$ )(anexo 5).

**Tabla 5. Microorganismos microaerófilos (ufc/g)**

	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>Promedio</b>
<b>microaerófilos</b>	<b><math>3.1 \times 10^3</math></b>	<b><math>1.0 \times 10^9</math></b>	<b><math>1.5 \times 10^8</math></b>

En los medios de cultivo, las colonias presentaron un color amarillo y la mayoría presentó un aspecto mucóide; la cual es una morfología típica de bacterias del genero *Bacillus*. Otros investigadores también han reportado un incremento en el número de microorganismos de la tortilla durante su almacenamiento. Martínez y col. (2004), observaron un crecimiento inicial elevado de bacterias mesófilas

---

---

aeróbicas (BMA) con un valor de  $5.40 \log_{10} \text{ ufc/g}$  tres horas después de la cocción de las tortillas almacenadas a  $22^{\circ}\text{C} \pm 1$ . El valor inicial de BMA encontrado en el estudio de Martínez y col. (2004) es similar al obtenido por Higuera y Nieblas (1995), quienes encontraron un valor inicial de BMA de  $5.1 \log_{10} \text{ ufc/g}$  en tortillas de maíz fabricadas sin conservadores, analizadas inmediatamente después de haber sido cocinadas. Téllez y col. (1988) observaron un crecimiento inicial elevado de bacterias aeróbicas ( $8.0 \log_{10} \text{ ufc/g}$ ) en tortillas de maíz preparadas sin conservadores, evaluadas el primer día de almacenamiento a  $25^{\circ}\text{C}$ . La Norma Mexicana establece que el valor máximo de BMA permitido en tortillas de maíz es  $3.30 \log_{10} \text{ ufc/g}$  (PROY-NOM-187-SSA1-2000).

Los estudios anteriores son un reflejo de la mala calidad microbiológica de las tortillas; tal calidad puede deberse a varios factores, entre ellos, las malas prácticas de higiene durante su elaboración e inadecuada temperatura de almacenamiento. Aunque en México existe una norma (NOM-187-SSA1/SCFI-2002) que establece los requisitos que deben cumplir las tortillerías, muchas no cumplen con lo establecido.

A partir de 44 muestras de tortillas se efectuó el recuento de microorganismos mesófilos (Tabla 6), para ello algunas cajas de petri inoculadas fueron incubadas en condiciones de aerobiosis, y otras en microaerófilia; en estos estudios se observó un mayor crecimiento de colonias en condiciones de microaerófilia que en aerobiosis. No obstante, la morfología colonial fue similar (Tabla 6). Estos resultados muestran que las cepas desarrollan mejor en concentraciones bajas de

oxígeno; condiciones que se pueden presentar por lo general cuando las tortillas no se “despegan” ya que cuando estas están calientes y se juntan, el vapor de agua desprendido por ambas en esta región que tiene contacto, puede desplazar al aire generando con ello una microatmósfera de vapor de agua; cuando el vapor se enfría éste podría condensar y formar micro-regiones con bajo nivel de oxígeno o anaerobias favoreciéndose el desarrollo de los microorganismos deterioradores.

**Tabla 6. Desarrollo microbiano en Agar Cuenta Estándar tanto en aerobiosis como en microaerofilia a partir de tortillas (ufc/g)**

No. Muestra	Aerobiosis (A)	Microaerofilia (M)	Porcentaje de similitud visual entre las colonias crecidas en A y en M
1	530	2000	100
2	250	5000	100
3	540	6000	100
4	350	5000	100
5	450	5000	100

## **5.2 Identificación de microorganismos aislados de las tortillas deterioradas.**

Mediante morfología, macroscópica, microscópica, desarrollo en microaerofilia y tinción de gram, se determinó que los microorganismos de las colonias provenientes de las tortillas deterioradas eran del género *Bacillus* (Tabla 7). Todos los resultados sobre la morfología macro y microscópica de las colonias aisladas según la procedencia de las tortillas están descritos a detalle en los anexos 4; en esta sección de resultados sólo se describen los hallazgos más importantes.

---

---

En general, se observó un solo tipo de microorganismo por lo que se consideraron como cultivos puros. Se observaron bacilos gram negativos largos ó cortos, unidas entre si, formando líneas muy largas, en algunos casos se detectaron bacilos con espora (figura 3).

**Figura 3. *Bacillus spp***



**Tabla 7. Frecuencia del género *Bacillus* en tortillas provenientes de diferentes tortillerías.**

<b>Microorganismo o grupo</b>	<b>Muestras analizadas</b>	<b>Positivas</b>	<b>Frecuencia %</b>
<i>Bacillus</i>	44	44	100

Una vez identificado el género de los microorganismos deterioradores se procedió a determinar la especie a la que pertenecen. Para ello, se aplicaron diferentes pruebas bioquímicas (Tabla 8). Los resultados de las pruebas en cada una de las

---

---

muestras analizadas y en cada tipo de establecimiento, se reportan en el anexo 2.

En este apartado sólo se incluye un resumen de las pruebas (Tabla 8).

La mayoría de las cepas de *Bacillus* aisladas fueron positivas a la prueba de rojo de métilo y a la de hidrólisis de almidón (Tabla 8).

**Tabla 8. Porcentaje de cepas aisladas positivas a cada prueba bioquímica**

Prueba	Cepas analizadas	Positivas	Frecuencia (%)
Catalasa	44	38	86.36
Movilidad	44	38	86.36
Producción de Indol	44	0	0
Utilización del Citrato	44	2	4.54
Hidrólisis de almidón	44	42	95.45
Rojo de Métilo	44	44	100
Voges Proskauer	44	0	0
Fenilalanina	44	22	50

Mediante las pruebas bioquímicas se identificaron varias especies de *Bacillus* (Tabla 9). Cabe señalar que debido a la falta de reactivos en el 50 % de las cepas no se pudo determinar con precisión la especie y sólo se llegó hasta una identificación parcial; no obstante, 4 especies pueden estar integrando este grupo: *circulans*, *coagulans*, *megaterium* ó *stearothermophilus* (Tabla 9). Esto debido a que el 50 % de las cepas fue negativa a dos pruebas claves en la identificación: fenilalanina y Voges-Proskauer (Figura 2). Solo cuatro especies son negativas simultáneamente a estas dos pruebas bioquímicas (Figura 2). De las 22 cepas restantes de *Bacillus* aisladas, 20 fueron de la especie *B. firmus* y sólo 1 correspondió a *B. megaterium* y otra a *B. sphaericus* (Tabla 9).

**Tabla 9. Especies de *Bacillus* encontradas en las muestras analizadas.**

<b>Especies de <i>Bacillus</i> encontradas</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
1) <i>B. circulans</i> , 1) <i>B. coagulans</i> , 1) <i>B. megaterium</i> ó 1) <i>B. stearothermophilus</i>	50.00
3) <i>B. firmus</i>	45.45
2) <i>B. megaterium</i>	2.27
4) <i>B. sphaericus</i>	2.27

Existen pocos estudios sobre la microbiología de la tortilla, y para el caso de los microorganismos deterioradores, por lo general, los que se han identificado en tortillas corresponden a microorganismos esporulados que están presentes desde la semilla de maíz. Los granos ó semillas normalmente albergan una diversidad de bacterias, hongos y levaduras. Las principales bacterias identificadas en estos materiales corresponden a géneros de bacilos esporulados (como *Bacillus* spp), organismos coliformes, bacterias lácticas y enterococos (Fernández, 2000). Entre las bacterias esporuladas de importancia en alimentos destacan *B. mesentericus* y *B. cereus*, los cuales contaminan la semillas en pequeños números durante la precosecha (Fernández, 2000). Pocos microorganismos son capaces de invadir el interior de los granos en la precosecha. Específicamente, se ha reportado que en el maíz predominan especies de *Eurotium* (el deteriorador más común: *E. rubrum*.

*E. amstelodami*, *E. chevalieri*), *Aspergillus restrictus*, y *Penicillium aurantiogriseum* y *P. Viridicatum* (Fernández, 2000).

En nuestro estudio, una vez identificados los microorganismos deterioradores de tortilla se evaluó la capacidad de hidrolizar el almidón como una forma de conocer el potencial deteriorador de las cepas aisladas e identificadas.

**Tabla 10. Diámetro de hidrólisis del almidón según cepa examinada**

Microorganismo	Diámetro de hidrólisis *	Microorganismo	Diámetro de hidrólisis
<i>B. megaterium</i>	0.5	<i>Bacillus spp</i> AU	1.1
<i>B. sphaericus</i>	0	<i>Bacillus spp</i> AL	0.9
<i>Bacillus firmus</i> PE <sup>1</sup>	1.0	<i>Bacillus spp</i> AL	0.8
<i>Bacillus firmus</i> SH	1.0	<i>Bacillus spp</i> CZ	0.8
<i>Bacillus firmus</i> MH	0.8	<i>Bacillus spp</i> SZ	0.75
<i>Bacillus firmus</i> TT	0.75	<i>Bacillus spp</i> TA	0.75
<i>Bacillus firmus</i> CR	0.75	<i>Bacillus spp</i> AG	0.75
<i>Bacillus firmus</i> AN	0.7	<i>Bacillus spp</i> FE	0.7
<i>Bacillus firmus</i> MA	0.7	<i>Bacillus spp</i> AB	0.6
<i>Bacillus firmus</i> CA	0.65	<i>Bacillus spp</i> JU	0.6
<i>Bacillus firmus</i> FE	0.65	<i>Bacillus spp</i> TO	0.55
<i>Bacillus firmus</i> MI	0.6	<i>Bacillus spp</i> MH	0.5
<i>Bacillus firmus</i> ME	0.6	<i>Bacillus spp</i> A2	0.5
<i>Bacillus firmus</i> MY	0.6	<i>Bacillus spp</i> M1	0.4
<i>Bacillus firmus</i> LL	0.5	<i>Bacillus spp</i> BA	0.35
<i>Bacillus firmus</i> JE	0.5	<i>Bacillus spp</i> SN	0.3
<i>Bacillus firmus</i> AM	0.5	<i>Bacillus spp</i> CH	0.2
<i>Bacillus firmus</i> M3	0.5	<i>Bacillus spp</i> PV	0.1
<i>Bacillus firmus</i> MS	0.4	<i>Bacillus spp</i> NV	0.1
<i>Bacillus firmus</i> RE	0.4	<i>Bacillus spp</i> PR	0.1
<i>Bacillus firmus</i> A1	0.1	<i>Bacillus spp</i> LI	0.1
<i>Bacillus firmus</i> TA	0.1	<i>Bacillus spp</i> M2	0

\* Centímetros <sup>1</sup>Clave interna de cepa

---

---

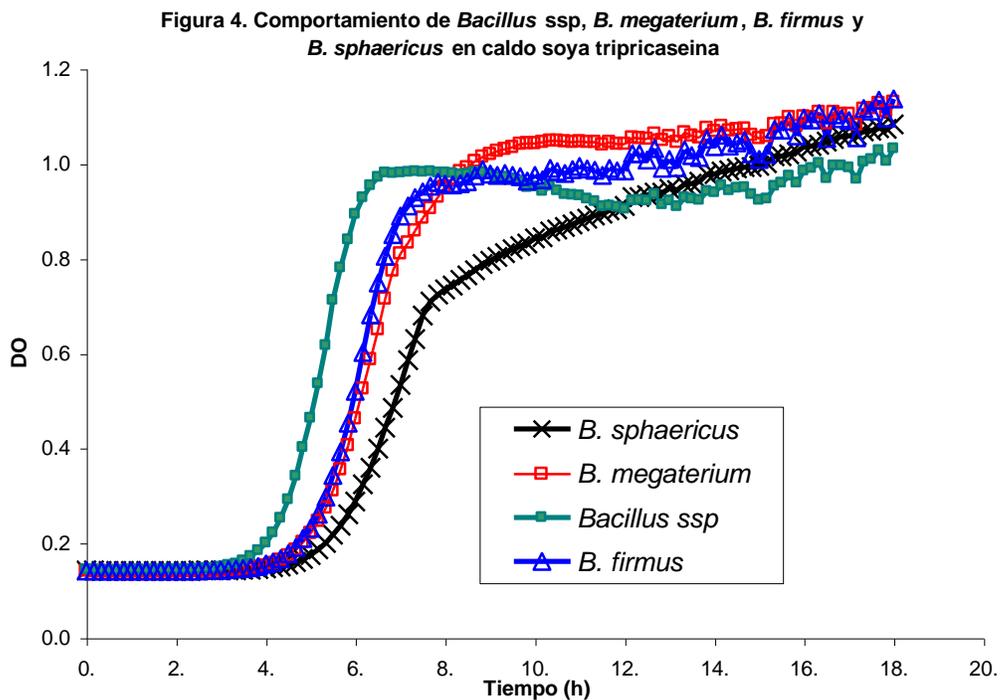
Se observa que sólo dos cepas no presentaron potencial para hidrolizar el almidón; de estas una de ellas correspondió a *B. sphaericus*. Esto concuerda con lo reportado en la literatura ya que la mayoría de las cepas de esta especie no hidrolizan el almidón. Tres cepas mostraron el mayor potencial deteriorador: *Bacillus spp* AU, *Bacillus firmus* PE y *Bacillus firmus* SH. Dos cepas de *B. firmus* y 4 de *Bacillus spp*, presentaron la mas baja actividad de hidrólisis. Una cepa de *Bacillus spp* no hidrolizó el almidón (Tabla 10).

Existen pocos estudios reportados en la literatura sobre el comportamiento de microorganismos deterioradores de tortilla (por ejemplo: Martínez y col., 2004, Higuera y Nieblas, 1995, Téllez y col.,1988) y en todos los existentes no se reporta la cinética de desarrollo de tales microorganismos; solo se indica si hubo o no incremento en la concentración de los microorganismos en un periodo de tiempo determinado.

El conocimiento de la cinética de desarrollo microbiano es importante ya que por un lado permite conocer la velocidad con la que los microorganismos están desarrollando y por el otro, permite tener un marco de referencia a partir del cual se puede evaluar (al comparar ) si un tratamiento en caminado a evitar el desarrollo microbiano tiene efecto significativo. Además, el conocimiento del comportamiento de los microorganismos directamente sobre la tortilla puede dar una idea del tiempo que se puede mantener este producto a temperatura ambiente (o a una temperatura determinada) antes de que inicie el desarrollo de los deterioradores o bien, conocer la vida de anaquel de la tortilla bajo diferentes condiciones de almacenamiento.

Por tal motivo, se procedió a evaluar el comportamiento de algunas cepas de los microorganismos deterioradores tanto en caldo de cultivo como sobre tortilla.

En el caldo de cultivo, las 4 cepas de *Bacillus* (*B. ssp*, *B. megaterium*, *B. firmus* y *B. sphaericus*) comenzaron su desarrollo entre las 4 y 5 h de incubación (Figura 4). La cepa de *Bacillus ssp* mostró una fase Lag más corta y *B. sphaericus* la más larga. Tres cepas de *Bacillus* alcanzaron su máximo desarrollo alrededor de las 6 horas de incubación: *ssp*, *firmus* y *megaterium*, mientras que *sphaericus* lo hizo hasta alrededor de las 18 h, sin embargo es importante señalar que el microorganismo continua desarrollandose. Es importante destacar la fase Lag tan corta que presentan tres cepas pues esto podría estar sugiriendo que hacia las 5 horas de almacenamiento de un producto rico en azúcares o en almidón y en condiciones adecuadas para el desarrollo microbiano, tales productos comenzarían a ser deteriorados por estos microorganismos.

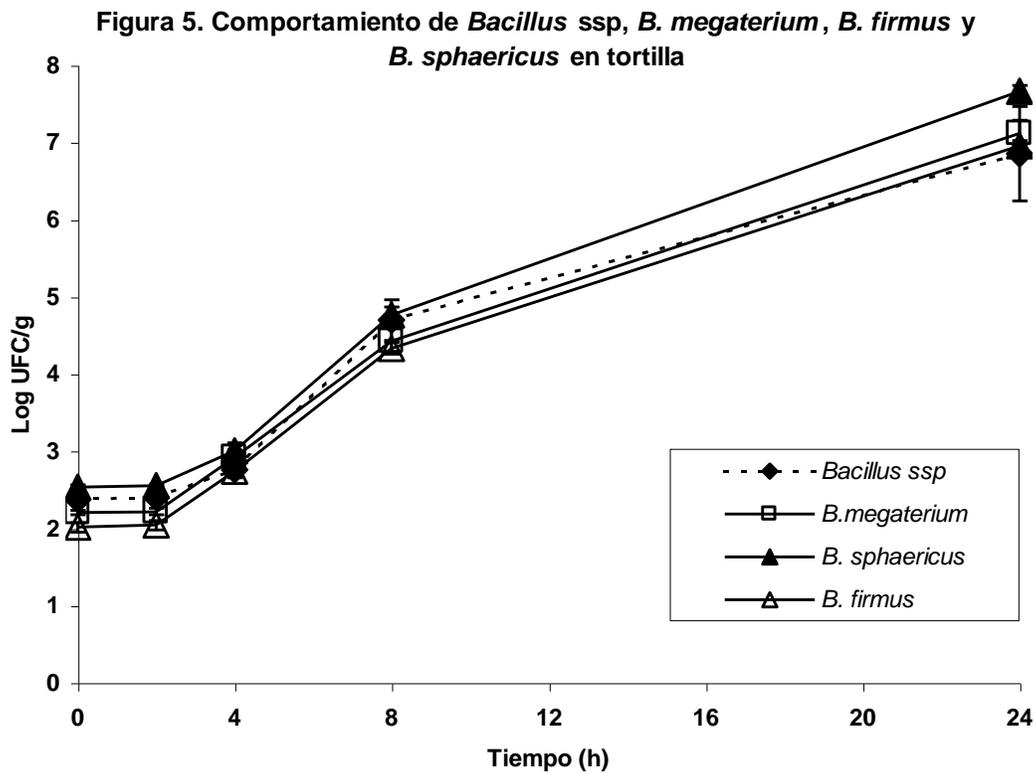


---

---

No obstante, es sabido que el destino de los microorganismos en los alimentos depende de una diversidad de factores relacionados con el alimento, el medio ambiente y los propios microorganismos. De hecho es la interacción de estos factores lo que define su comportamiento. Aunque la tortilla es rica en carbohidratos, estos se encuentran principalmente en forma de almidón o carbohidratos complejos; en cualquier caso, las bacterias necesitan la maquinaria enzimática adecuada para poder utilizarlos como fuente de energía. En consecuencia, el comportamiento exhibido por las cepas de *Bacillus* en el caldo de cultivo podría ser muy diferente a cuando estos microorganismos se encontrasen en tortilla. Por tal, motivo se efectuó un estudio semejante pero ahora inoculando los microorganismos directamente sobre las tortillas.

Cuando los mismos microorganismos se inocularon sobre tortilla y estas se almacenaron a 30°C, las 4 cepas también se multiplicaron (Figura 5). En este caso, el inicio del desarrollo se registró entre las 3 y 4 h de almacenamiento. Paralelamente se observó el aspecto de las tortillas, y a las 4 h no se detectó visualmente algún cambio en la apariencia de la tortilla (respecto a las tortillas frescas) o con indicios de deterioro. Sin embargo, a las 8 h de almacenamiento se comenzó a hacer evidente un ligero filamento entre las tortillas inoculadas y un ligero aroma típico de tortillas descompuestas. Estos cambios visuales o detectables en la tortilla coincidieron con el incremento de las cepas de *Bacillus* a un nivel cercano a 100,000 UFC/g de tortilla (Figura 5).



Es importante señalar que aunque *B. Sphaericus* se multiplicó en la tortilla no se observaron signos de descomposición; esto puede ser debido a que empleamos la cepa que no hidroliza el almidón por lo que al haber pocos nutrientes disponibles para el desarrollo el microorganismo esta limitado para producir los compuestos típicos del deterioro en las tortillas (como el polímero o filamento que se produce) o bien, este comportamiento también podría estar sugiriendo que las cepas de *B. sphaericus* (o al menos la que empleamos en este estudio), no son las responsables de deterioro de la tortilla o bien su participación en este proceso es limitado.

Cabe recordar que en este estudio se trabajó con cepas de *Bacillus* resistentes al antibiótico rifampicina, esto con la finalidad de monitorear mejor y sin interferencia

---

---

el comportamiento de tales cepas sobre la tortilla ya que se estaba trabajando con tortillas no estériles que podrían contener diferentes microorganismos. Así, la siembra de *Bacillus* se efectuó en el agar no selectivo para métodos estándar al que se le adicionó rifampicina. Se observó que la rifampicina a la concentración utilizada en el medio de cultivo fue suficiente para inhibir a todos los microorganismos no resistentes presentes en la tortilla.

Finalmente, en este estudio de la cinética de desarrollo de las cepas de *Bacillus* sobre la tortilla, a las 24 h de desarrollo de las cepas de *Bacillus* se observó una descomposición muy evidente de las tortillas inoculadas, coincidiendo con un nivel de los microorganismos inoculados cercano a 100 millones de UFC/g (Figura 4). A las 24 h del estudio el recuento se realizó tanto en medio de cultivo con y sin rifampicina y la concentración de microorganismos fue la misma en ambos medios de cultivo lo cual sugiere que los responsables del deterioro fueron las cepas resistentes que se inocularon en la tortilla.

Tres de las cepas de *Bacillus* que empleamos en éste estudio tenían capacidad de hidrolizar el almidón. Otra de las cepas por el contrario no tenía esta capacidad. No obstante, en la tortilla las cepas de *Bacillus* para su desarrollo pueden estar utilizando otros nutrientes que también se encuentran en la tortilla pero en menor concentración, tales como, proteínas, vitaminas y minerales. Se ha reportado que numerosos microorganismos son capaces de desarrollar sobre diferentes materiales con sólo trazas de nutrientes; por ejemplo, una diversidad de microorganismos puede subsistir y multiplicarse en la superficie de los vegetales íntegros a expensas de los escasos nutrientes (sales, vitaminas, carbohidratos, proteínas) que se disuelven en el agua de exudación. Se sabe además que la

---

---

actividad de los microorganismos depende de la eficiencia para competir con la flora microbiana nativa del alimento; sin embargo, este efecto es menor en el caso de las tortillas ya que en tortillas recién elaboradas la concentración de la flora contaminante que pudiera competir es baja.

Por otro lado, el desarrollo de los microorganismos de estudio en la tortilla se favorece por la elevada actividad acuosa y el valor de pH; en la tortilla que utilizamos en el estudio el valor de pH fue de 7, por lo que resulta un valor muy favorable para el desarrollo de estos microorganismos ya que se encuentra cercano a la neutralidad.

Un comportamiento similar al que mostraron las cepas de *Bacillus* ha sido reportado en la literatura con otros microorganismos. En un estudio realizado en Guatemala se observó que la microflora de tortillas recién elaboradas incremento su número a partir de las primeras 4 horas alcanzando una concentración aproximada de 8 Log<sub>10</sub> UFC/g a las 24 h. Los organismos coliformes, *Bacillus* spp y *Streptococcus* spp también se multiplicaron alcanzando a las 24 h una concentración aproximada de 6.5 Log<sub>10</sub> UFC/g (Capparelli y Mata, 1975). En el mismo estudio se observó que cuando las tortillas fortificaron con harina de soja y vitaminas el microorganismo mostró un desarrollo muy semejante al presentado en las tortillas no fortificadas (Capparelli y Mata, 1975). En otro estudio efectuado en Guatemala, se desarrolló una formulación para tener una tortilla de humedad intermedia con larga vida de anaquel contra *Staphylococcus aureus*, levaduras y hongos. Entre otros componentes se utilizó glicerol, partículas sólidas de maíz DE-42 y sal, así como sorbato potásico, entre otros. Los investigadores afirmaron que el producto empaquetado adecuadamente, podía durar por lo menos 30 días, y

---

---

que su apariencia, textura y demás características eran similares a las de las tortillas ordinarias con actividad hídrica de 0,97 (Peláez y col., 1980). En otros estudios se ha logrado incrementar de manera significativa la vida de anaquel las tortillas con bajos niveles de sorbatos ó propionatos añadidos a la masa con la que se elaborará la tortilla y también por la adición de sorbatos en la superficie de la tortilla recién elaborada (Hickey y col, 1982). Recientemente, se afirmó en EUA que la utilización de propionato de calcio puede prolongar de 2-5 días el período de conservación de las tortillas a temperatura ambiente y a 2-11 días usando dimetilfumarato, en idénticas condiciones de almacenamiento siempre y cuando se empleen bolsas de polietileno. Aunque se ha conseguido prolongar la vida de anaquel de la tortilla, éste sigue siendo un problema muy importante para la industria de la tortilla (Islam y col, 1984).

Nuestros resultados muestran el potencial que las cepas de *Bacillus* tienen para multiplicarse en la tortilla a 30°C. Es destacable que aunque el estudio no se realizó a la temperatura óptima para el desarrollo de estos microorganismos, aun así, se multiplicaron a una velocidad considerable. La temperatura a las cuales efectuamos los estudios es muy semejantes a las que comúnmente se comercializa la tortilla en el centro de la República; no obstante, en algunos estados del norte o en las regiones costeras, la temperatura es más elevada llegando a ser en promedio de 37°C, la cual es la temperatura óptima de las cepas de *Bacillus* que examinamos bajo estas condiciones es de esperar entonces un mayor desarrollo de los microorganismos lo cual se reflejaría en incremento en la

---

---

velocidad de desarrollo y por ende mayor rapidez de deterioro o menor vida de anaquel de la tortilla.

Es común en los hogares que una vez que se ha terminado de ingerir alimentos, las tortillas no se refrigeran inmediatamente y se dejan a temperatura ambiente por más de dos horas antes de refrigerarlas. Esta práctica entonces, favorecería la multiplicación de las bacterias deterioradoras sobre la tortilla disminuyendo su calidad microbiológica y vida de anaquel. En los restaurante o sitios donde se preparan alimentos cocinados a gran escala, se presenta además otra situación; debido al uso constante y abundante de las tortillas, con frecuencia éstas se mantienen fuera del refrigerador a la temperatura que existe en la cocina, se ha reportado que la temperatura dentro de las cocinas de estos establecimientos puede oscilar de 30-40°C (Fernández, 2000), en consecuencia los microorganismos deterioradores desarrollarían rápidamente alcanzando nivel importantes y deteriorando la tortilla en un corto tiempo.

En consecuencia, si no se va a consumir la tortilla inmediatamente o dentro de las dos primeras horas después de elaborada, por lo menos se debe refrigerar.

No obstante, es importante precisar que aun en refrigeración puede ocurrir deterioro microbiano por lo que es necesario aplicar otros métodos de conservación en la tortilla, ya sea solos o en combinación con la refrigeración. Debido a esto se ha recurrido a tratamientos como el incremento del pH (> 9) en la tortilla para evitar el desarrollo microbiano; en tales estudios se ha logrado detener el desarrollo microbiano pero se ha afectado la calidad de la tortilla ya que al incrementarse el pH intensifica el color amarillo de la tortilla y aparece un sabor

---

---

amargo, característico de la cal (Tellez y col., 1988). Debido a esto, se ha experimentado también incorporando conservadores a la tortilla; los primeros estudios en este sentido fueron efectuados por Rubio (1972a, 1972b, 1973, 1974a, 1974b y 1975) quien experimentó incorporando diferentes compuestos a la tortilla con muy buenos resultados para inhibir el desarrollo microbiano, sin embargo, las concentraciones de los conservadores utilizadas o las que mostraron un efecto importante excedieron los límites permitidos por la FDA (Food and Drug Administration). Otros investigadores como Luke y Andres (1981), incrementaron hasta 45 días en refrigeración la vida de anaquel de la tortilla mediante la aplicación de una solución de sorbato de potasio en la superficie de la tortilla. Islam y col., (1984) incrementaron de manera significativa la vida de anaquel de la tortilla mediante el empleo de dimetil fumarato, sin embargo, el uso de este compuesto no está permitido en alimentos.

Existen otros estudios en la literatura en los que se emplean diferentes compuestos con el objetivo de incrementar la vida de anaquel de la tortilla, sin embargo, en la mayoría, a las concentraciones en las que se logra un importante efecto inhibitorio de la actividad microbiana o se está ante una dosis que excede el límite permitido por las legislaciones correspondientes o bien se afecta también de manera importante la apariencia sensorial de las tortillas.

Es posible que mediante la aplicación de otros factores como la sola disminución de la actividad acuosa se pueda incrementar de manera importante la vida de anaquel de la tortilla. En los alimentos comúnmente se emplea a humectantes, como el glicerol o el manitol, para disminuir la actividad acuosa sin efecto en la textura o plasticidad del alimento. Por tal razón, como un último estudio de nuestro

trabajo, efectuamos un experimento para tener idea de si mediante la incorporación de un humectante se podría contribuir a disminuir la actividad de los microorganismos deterioradores. En este estudio se trabajo solo incorporando el humectante a un medio de cultivo de laboratorio sólido (Agar cuenta estándar).

En el estudio se emplearon tres concentraciones de los humectantes que previamente se evaluaron en otro trabajo (Thelpalo, 2006), estas concentraciones no afectaron la calidad o aspecto sensorial ni la textura de la tortilla.

Todas las cepas examinadas crecieron en los medios de cultivo ajustados a las tres concentraciones de los humectantes (Tabla 11). Prácticamente no se observó diferencia en el crecimiento de los microorganismos de estudio en los tres tipos de medio.

**Tabla 11. Desarrollo de cepas de *Bacillus* en agar con diferentes concentraciones de humectante**

CRECIMIENTO EN AGAR CON MANITOL Y GLICEROL						
Nombre	Agar con manitol (%)			Agar con glicerol (%)		
	0.5	1.0	1.5	0.5	1.0	1.5
<i>Bacillus</i> spp AL	0.1*	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
<i>Bacillus</i> spp CZ	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
<i>Bacillus</i> spp NV	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
<i>Bacillus</i> spp AU	0.5	0.1	0.5	0.3	0.3	0.3
<i>Bacillus firmus</i> SH	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
<i>Bacillus firmus</i> PE	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
<i>Bacillus</i> spp AB	0.8	0.8	0.8	0.8	0.5	0.5
<i>Bacillus</i> spp TA	0.8	0.8	0.8	0.8	0.5	0.5

\* Diámetro de desarrollo (mm)

---

Las cepas de *B. firmus* fueron las que mostraron el mayor diámetro de desarrollo a en los medios con las tres concentraciones de ambos tipos de humectantes. Solo con 2 las cepas de *Bacillus ssp* y con glicerol a concentración tanto del 1 como del 1.5 % se obtuvo menor desarrollo que con 0.5 %.

---

---

## VI. CONCLUSIONES

1. En el 100% de las muestras de tortillas descompuestas se aislaron en gran número y casi de manera exclusiva microorganismos del género *Bacillus*.
2. Las especies de *Bacillus* identificadas fueron: *megaterium*, *sphaericus* y *firmus*; esta última se aisló en al menos el 45 % de las muestras de tortillas descompuestas.
3. A excepción de 2 cepas, todas las demás aisladas mostraron potencial para hidrolizar el almidón.
4. Las cepas de *Bacillus* mostraron potencial para desarrollar tanto en caldo de cultivo de laboratorio como sobre la tortilla.
5. La aparición de signos de deterioro en las tortillas inoculadas con cepas de *Bacillus* comenzó a detectarse a partir de las 8 horas de almacenamiento a 30°C.
6. Los microorganismos del género *Bacillus* parecen ser los principales microorganismos deterioradores de la tortilla y parecen ser los responsables de la producción de los productos típicos observados en las tortillas descompuestas (mucosidad, presencia de filamentos finos y olores y sabores desagradables).

---

---

## **Perspectiva**

Los resultados sugieren que el uso de humectantes no detiene o inhibe el desarrollo de los microorganismos deterioradores en la tortilla, no obstante, es necesario hacer un estudio semejante pero ahora directamente con la tortilla ya que es posible que trabajando con la tortilla se obtengan resultados diferentes a los que observamos en el medio de cultivo, esto debido a que las condiciones en la tortilla son diferentes a las que se tienen en un medio de cultivo de laboratorio (pH, actividad de agua, nutrientes, flora microbiana asociada, potencial redox, etc).

Otra posibilidad también sería experimentar ahora combinando sobre la tortilla factores como pH, aplicación de conservadores, disminución de actividad acuosa y temperatura.

---

---

## VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas, H.K., Mirocha, J.K., Rosiles, R. y Carvajal, M.1988. Decomposition of zearalenone and deoxynivalenol in the process of making tortillas from corn. *Cereal Chem.* 65:15- 19.
2. Anónimo 2007a, [www.monografias.com/trabajos/elmaíz](http://www.monografias.com/trabajos/elmaíz).
3. Anónimo, 2007b, <http://es.wikipedia.org/wiki/Tortilla>
4. Anónimo, 2007c. <http://www.bioland.cl/mo-biobac.htm>
5. Anónimo, 2007d, <http://www.telmeds.org/AVIM/>
6. Bacteriological Analytical Manual. (BAM) Online. 2001. <http://vm.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-toc.html>.
7. Blanco V., R. 2005. Boletín: [jornada.com.mx](http://jornada.com.mx) “Nuestro maíz”.
8. Brackett E. R. Fruits, Vegetables, and Grains. En : Doyle, P. M., Beuchat. L. R. and Montuile. J. T.(eds.). 1997. *Food Microbiology Fundamentals and Fronters*. ASM-Press, Washington D.C.
9. Bressani, R., Paz, R. P. y Scrimshaw, N. S. 1958 Chemical Changes in Corn during preparation of tortillas. *Agric. Food Chem.* 6: 770-774.
10. Bullerman, L.B. and Hartung, T.E. 1973. Mycotoxin-production potential of molds isolated from flour and bread. *Cereal Sci. Today* 18:346-347
11. Cabrera, L. 1992, *Diccionario de aztequismos* Editorial COFOFON. Primera Edición México.
12. Capparelli, E. y Mata, L. 1975. Microflora of maize prepared as tortillas. *Appl. Microbial.* 29: 802-806.
13. Carvajal, M., Rosiles, R., Abbas, H.K. and Moricha, C.J. 1987. Mycotoxin carryover from grain to tortillas in Mexico. En M.S. Zuber, E.B. Lillehoj y B.L

- 
- 
- Renpro, eds. Aflatoxin in maize proceedings of the workshop p. 318-319. El Batán, México, CIMMYT.
14. Chefetl, J. C., Cheftel H. Introducción a la Bioquímica y Tecnología de los alimentos. Volumen 1, Ed. Acribia, Zaragoza (España).
15. Davidsson L, Dimitriou E, Boy E, Walczyk T and F Hurrell R. Iron bioavailability from iron-fortified Guatemalan meals based on corn tortillas and black bean paste. *Am J Clin Nutr* 75 (3)535-539, 2002.
16. De Arriola, M.C., De Porres, E., De Cabrera, S., De Zepeda, M. y Rolz, C. 1987. Aflatoxin and tortilla preparation in Guatemala. En M.S. Zuber, E.B. Lillehoj y B.L. Renpro, eds. Aflatoxín in maize, proceedings of the workshop, p. 298-307. El Batán, México, CIMMYT.
17. De Arriola, M.C., De Porres, E., De Cabrera, S., De Zepeda, M. y Rolz, C. 1988. Aflatoxin fate during alkaline cooking of corn for tortilla preparation. *J. Agric Food Chem.*, 36: 530-533.
18. De Campos, M., Crespo-Santos, J. y Olszyna-Marzys, A.E. 1980. Aflatoxin contamination in grains from the Pacific coast in Guatemala and the effect of storage upon contamination. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 24: 789-795.
19. Diario Oficial de México. PROY-NOM-187-SSA1-2000. 22 de Mayo del 2000. p:77
20. Doyle, M.P., Applebaum, R.S., Bracket, R.E. and Marth, E.H. 1982. Physical, chemical and biological degradation of mycotoxins in foods and agricultural commodities. *J. Food Prot.* 10:964-971.

- 
- 
21. FAO STAT, Statistics data base. *Internet*. <http://apps.fao.org/>. "El maíz en la nutrición humana", ISBN 92-5-303013-5, Código FAO: 86 AGRIS: S01, 1993.
22. Fennema, Owen R., Tannenbaum, Steven R., *Química de Alimentos*, 2000.
23. Fernández, Escartín E., *Microbiología e inocuidad de los alimentos*. Universidad Autónoma de Querétaro, 2000.
24. Foegeding, P.M. and Berry, E.D. 1997. Cold temperature growth of clinical and food isolates of *Bacillus cereus* J. Food Prot. 60:1256-1258
25. Gómez Aldapa, C. A., 2001. Determinación de las interacciones moleculares almidón de Maíz-Lípido Agua, En sistema modelo, mediante medición de las propiedades térmicas, mecánicas y estructurales. Tesis Doctoral en ciencias, Facultad de Química. Programa de Posgrado en alimentos del centro de la Republica (PROPAC). Querétaro, Qro.
26. Granum, P.E. 1997. *Bacillus cereus*: 327-336. In: *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*. Doyle, M.P., Beuchat, L.R. and Montvile, T.J. (Eds.), ASM Press, Washington, DC.
27. Hickey, C.S., Stephens, D.O. y Flowers, R.S. 1982. Preservation of flour tortillas. Artículo N° 221, presentado a la 42° reunión anual, Inst. Food Technol., Las Vegas, EE. U U.
28. Higuera-Ciapara y J.M. Nieblas. 1995. Conservación y estabilidad de la tortilla de maíz a temperatura ambiente. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. Vol. 45 No. 2. Pp. 122-127.
29. Howard R. Roberts, *Sanidad alimentaria*, Editorial Acribia, S, a, Zaragoza (España).

- 
- 
30. International Association of Milk Food and Environmental Sanitarians. 1991. Procedures to Implement the Hazard Analysis Critical Control Point System. IAMFES. Iowa, USA
31. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. 1996. Microorganisms in Foods. 5. Microbiological Specifications of Food Pathogens. Blackie Acad. and Professional, London.
32. International Commission on Microbiological Specifications for Food. 1998. Microorganisms in Foods. 6. Microbial Ecology of Foods Commodities. Blackie Acad. and Profess. Press, London
33. Islam, M.N., Lirio, M.E. y Del Valle, F.R. 1984. Mold inhibition in tortilla by dimethyl fumarate. J. Food Proc. Preserv. 8: 41-45.
34. Ito, K.A. 1981. Thermophilic organisms in food spoilage: flat sour aerobes. J. Food Prot. 44:157-163
35. Kim, H.U. and Goepfert, J.M. 1971 Occurrence of *Bacillus cereus* in selected dry food products. J. Milk Food Technol. 34:12-15.
36. Luke T. and Andres C. 1981. Tortilla shelf life increased by over 50%. Food Processing. 42:32.
37. Macfaddin, Jean F., 2003, Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica, Ed. Medica panamericana. Tercera Edición. Pag. 538.
38. Marth, E.H. 1990. Mycotoxins: 137-157. In: Foodborne Diseases. Cliver, D.O (Ed.). Academic Press, Inc.
39. Martínez, Flores Héctor E., Gaytan M. M., Figueroa C. J., Martínez B. F. 2004. Efecto de algunos conservadores sobre la vida útil de tortillas de maíz

- 
- obtenidas a partir de masa extrudida. *Agrociencia*, mayo-junio, año/vol. 38, numero 003, Colegio de postgraduados Texcoco, México. pp.285-292.
40. Martínez, R. R. 1979. Las aflatoxinas en las tortillas. *Vet. Mex.*, 10: 37-44.
41. Martínez-Herrera, M.L. 1968. Efecto de ciertos hongos sobre el valor nutritivo, calidad y conservación del maíz en Guatemala. Tesis, Universidad de San Carlos de Guatemala
42. Mayou, J. and Moberg, L. 1994. Cereal and cereal products:995-1006. In: *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. Vanderzant, C. And Splittstoesser, D.F. (Eds.). 3th ed. Am. Public Health Assoc., Washington, DC.
43. Molina, M.R., Baten, M.A. y Bressani, R.1978. Características microbiológicas de la masa y tortillas con y sin agregado de harina de soya y el efecto de clorinación. *INCAP Informe Anual 1977*, p. 39-42. Guatemala, INCAP.
44. Moreno Martínez, E. 1996. El maíz y las aflatoxinas; 139-147. En: *La Industria de la Masa y la Tortilla: Desarrollo y Tecnología*. Torres, F., Moreno, E., Chong, I. Y Quintanilla, J. (Eds.). Universidad Nacional Autónoma de México.
45. Moreno, M.L. 2006. Frecuencia y comportamiento de *Salmonella*, *Escherichia coli* y Organismos coliformes en chile jalapeño y chile serrano. Tesis de licenciatura. Centro de Investigaciones Químicas. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
46. NOM-187-SSA1/SCFI-2002, Productos y servicios. Masa, tortillas, tostadas y harinas preparadas para su elaboración y establecimientos donde se

- 
- procesan, especificaciones sanitarias, información comercial, métodos de prueba.
47. Olson, K. E. And Sorrells, K. M. 1992. Thermophilic flat sour sporeformers: 299-307. In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Vanderzant, C. and Splittstoesser, D.F. (Eds). 3th Ed. Am. Public Health Assoc. Washington, DC.
48. Paredes López, O. y Saharópolos Paredes, M. E. 1983, Maíze. A review or tortilla production technology. Bakers Digest. Sep 16-25.
49. Pascual, R.P. 1992. Microbiología Alimentaria. Ed. Díaz de Santos, S.A. , España.
50. Pelaéz, J. y Karel, M. 1980. Development and .stability of intermediate moisture tortillas. .J. Food Proc. Preserv.,4: 51 -65.
51. Price, R.L. y Jorgensen, K.V. 1985. Effects of processing on aflatoxin levels and on mutagenic potential of tortillas mude from naturally contaminated corn. J. Food Sci., 50: 347-349.
52. Reyes, C.P. 1990. El maíz y su cultivo. Edit AGT Editor S.A. Primera Edición, México, D.F.
53. Rojas, O.M 2005. Comportamiento de Tres Grupos Patógenos de *Escherichia coli* en Cuatro Tipos de Verduras Crudas. Tesis de licenciatura. Centro de Investigaciones Químicas. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
54. Rooney, L. W. y Suhendru, E. L. 1999 Perspectives on nixtamalization (alkaline cooking) of maize for tortillas and snacks. Cereal food world. 44: 466-470.

- 
- 
55. Rubio M., J. 1972a. Tortilla and process using epichlorohydrin. U.S. Patent 3,690,893.
56. Rubio M., J. 1972b. Tortilla and process using polycarboxylic acids and their anhydrides. U.S. Patent 3,694,224.
57. Rubio M., J. 1973. Tortilla and process using hydrophilic inorganic gels. U.S. Patent 3,709,696.
58. Rubio M., J. 1974a. Tortilla and process using methyl, ethyl, butyl, and propyl ester of parahydroxybenzoic acid. U.S. Patent 3,853,998.
59. Rubio M., J. 1974b. Tortilla and process using ascorbic acid and its salts. U.S. Patent 3,853,997.
60. Rubio M., J. 1975. Tortilla and process using acetic and propionic acids. U.S. Patent 3,859,449.
61. Serna Saldívar, S. O., Cannet, R., Vargas, J., González, M., Bedolla, S., y Medina, C. 1988a. Effect of soybean and sesame addition on the nutritional value of maize and decorticated sorghum tortillas produced by extrusion cooking. *Cereal chem.* 64: 44-48
62. Serna Saldívar, S. O., Gómez, M. H., y Rooney, L. W. 1990. Technology, Chemistry and nutritional value of alkaline caged corn products. Cap. 4. En: "Advances in cereal science and technology." Vol x. Pomeranz, Y. (Ed). AACC, Inc., St. Paul, MN. EUA. pp 243-307.
63. Serna Saldívar, S. O. Téllez Girón, A., y Rooney, L. W. 1988 b. Production of tortilla chips from soghum and maize. *J. Cereal sci*: 8: 275-284
64. Sinha. R.N. 1973. Ecology of storage. *Ann. Technol. Agr.* 22:351-359.

- 
- 
65. Solomons, NW. Micronutrients and urban life-style: lessons from Guatemala. Arch Lationoam Nutr 47(2 Suppl 1):44-9. 1997.
66. Solórzano-Mendizábal, M. de C. 1985. Destrucción de aflatoxinas durante el proceso de nixtamalización. Tesis, Universidad de San Carlos de Guatemala.
67. Spicher, G. 1967. Causes and control of mold contamination of bakeries. Bakers' Digest 41:30-36
68. Tanner, F.W. 1944. The Microbiology of foods. 2<sup>nd</sup> Ed. Garrad Press, Champaign, Ill.
69. Téllez-Girón A., G. Acuff R., Vanderzant, and C. L. Rooney W. 1988. J. Food Protection, 51 (12); 945-948.
70. Thaysen, A. C. and Galloway, L. D. 1930. " The Microbiology of Starch and Sugars" p.191. Oxford Univ. Press, New York. En : "Fruit and Vegetables". Vanderzant, C. and Splittstoesser, D. F. 1992. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 3rd (ed). American Public Health Assoc. Washington.
71. Thelpalo, C. B. S. 2006. Efecto de humectantes sobre la cinética de secado y rolabilidad de tortillas elaboradas con harina de maíz nixtamalizado Maseca. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México.
72. Torreblanca, A., Bourges, H. y Morales, J.1987. Aflatoxin in maize and tortillas in Mexico. En M.S. Zuber, E.B. Lillehoj y B.L. Renpro, eds. Aflatoxin in maize proceedings of the workshop ,p. 310-317. El Batán, México, CIMMYT.

- 
- 
73. Troller, J.A. 1979. Food spoilage by microorganisms tolerating low aw environments. *Food Technol.* 33(1):72-75.
74. Ulloa-Sosa, M. y Schroeder, H.W. 1969. Note on aflatoxin decomposition in the process of making tortillas from corn. *Cereal Chem.* 46: 397-400.
75. Valverde V., Delgado, H., Belizan, J.M., Martorell, R., Mejía-Pivaral, V., Bressani, R., Elias, L.C., Molina, M.R. y Klein, R. E. 1983. The Patulu' project: production, storage, acceptance and nutritional impact of opaque corns in Guatemala. Pub. INCAP p. 179. Guatemala, INCAP.
76. Van Netten, P., Van de Moosdijk, A., van Hoensel, P., y col. 1990. Psychrotrophic strains of *Bacillus cereus* producing enterotoxin. *J. Appl. Bacteriol.* 69:73-79.
77. Vázquez, C. M. G., Márquez, S. A. R., y Márquez, S. F. 1990. Evaluación Física, Química y tortillería del compuesto pepitilla de maíz. *Re. Fitotecnia Mexicana.* 13:10-13.
78. Waites, W.M., Harding, S.E., Fowler, D.R., et al. 1988. The destruction of spores of *Bacillus subtilis* by the combined effects of hydrogen peroxide and ultraviolet light. *Lett. Appl. Microbiol.* 7:139-140.
79. Yassin, S. And Wheals, A. 1992. *Neurospora* species in bakeries. *J. Appl. Bacteriol.* 72:377-380.
80. Zazueta-Morales, J. J. 2003. Extrusión de maíz (*Zea mays* L.) azul: Efecto del hidróxido de calcio sobre las propiedades fisicoquímicas y funcionales. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México.

---

---

## **Anexo 1: Procedimientos de las pruebas bioquímicas.**

### **Catalasa**

- a) Colocar una gota de  $H_2O_2$  en un portaobjetos
- b) Con un asa bacteriológica previamente estéril tomar una colonia a partir de las cepas.
- c) Colocar la muestra tomada de la cepa en la gota de  $H_2O_2$  y homogeneizarlo perfectamente.
- d) La reacción positiva se observara por la producción de gas.

### **Movilidad**

- a) Tomar 10  $\mu$ l de las cepas sembradas en caldo soya tripticaseina e incubadas a 35°C durante 24h.
- b) Colocar en un portaobjetos
- c) Observarlo en un microscopio a 100X (utilizando el aceite de inmersión para facilitar la resolución)
- d) Describir si los bacilos son móviles o inmóviles.

### **Producción del Indol**

- a) Con un asa bacteriológica previamente estéril tomar una colonia a partir de las cepas.
- b) Inocular en caldo biotriptasa.
- c) Incubar a 35°C durante 24 h.
- d) Después de la incubación agregar 2-3 gotas del reactivo de Erlich.
- e) La reacción positiva se observara por la formación de un anillo rojo intenso en la superficie del medio de cultivo y negativo no hay cambio de color.

### **Utilización del citrato**

- a) Con un asa bacteriológica previamente estéril tomar una colonia a partir de las cepas.
- b) Inocular en un tubo contenido 3 ml del medio citrato de simmons
- c) Incubar a 35°C durante 24 a 48 h.

- 
- 
- d) Observar los tubos y describir si son positivos o negativos:
  - e) Positivo: crecimiento con un color azul intenso en el pico de flauta
  - f) Negativo: No se observa ni crecimiento ni cambio de color.

### **Hidrólisis del almidón**

- a) Con un asa bacteriológica previamente estéril tomar una colonia a partir de las cepas.
- b) Sembrar por estría en agar Muller-Hilton.
- c) Incubar a 35°C durante 24 a 48 h.
- d) Observar las cajas de petri y describir si son positivos o negativos.
- e) Positivos: Formación de un halo claro alrededor de las colonias típicas.
- f) Negativos: No hay formación de halo claro alrededor de las colonias típicas.

### **Prueba del Rojo de Metilo y Vogues-Proskauer**

- a) Con un asa bacteriológica previamente estéril tomar una colonia a partir de las cepas.
- b) Inocular en medio MR-VP
- c) Incubar a 35°C durante 45 a 72 h.
- d) Después de la incubación agregar de 3 a 4 gotas de rojo de metilo.
- e) La reacción positiva se observara por la formación de un anillo rojo intenso en la superficie del medio de cultivo y negativo no hay cambio de color.

## Anexo 2: Pruebas bioquímicas

Muestra	Pruebas bioquímicas					
	P. de Catalasa	Movilidad	P. del Indol	P. del Citrato	P. del Almidón	P. MR-VP
Chacon	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
Proveedor	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
Perico	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
Tlaxcalteca	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
Shanty	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
Masa Tortillera	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
Tlacotalpilco	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
Bajadita	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
Nuevo Tulancingo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
Miguel Hgo.	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
Ame	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
Campestre	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
Abasolo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
Félix	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
Porvenir	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
Taco	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
Juanita	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
Aurrera-pach	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
Miraje	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
Alicia	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
Liconsa	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
Tolteca	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
Sazón	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
La Fe	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
Minero	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
Antojitos	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
Mercado	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
Masa	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
Revolución	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
Carmelito	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
Lluvia	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
Bosch	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
Felipe	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
S/N	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
Mary	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
Ale 1	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
M 2	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
M 1	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
A 2	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
Ange	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
M 3	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
M 4	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
Ale 2	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo

### Anexo 3:

Origen de la muestra	Especie identificada	Clave de cepa	Origen de la muestra	Especie identificada	Clave de cepa
Bosh	<i>B. megaterium</i>	-	Aurrera-pachuca	<i>Bacillus spp</i>	AU
M4	<i>B. sphaericus</i>	-	Alicia	<i>Bacillus spp</i>	AL
Perico	<i>Bacillus firmus</i>	PE	Ale 2	<i>Bacillus spp</i>	AL
Shanty	<i>Bacillus firmus</i>	SH	Corza	<i>Bacillus spp</i>	CZ
Miraje	<i>Bacillus firmus</i>	MH	Sazón	<i>Bacillus spp</i>	SZ
Tlacotalpilco	<i>Bacillus firmus</i>	TT	Tlare	<i>Bacillus spp</i>	TA
Carmelito	<i>Bacillus firmus</i>	CR	Ange	<i>Bacillus spp</i>	AG
Antojitos	<i>Bacillus firmus</i>	AN	Fe	<i>Bacillus spp</i>	FE
Masa	<i>Bacillus firmus</i>	MA	Abasolo	<i>Bacillus spp</i>	AB
Campestre	<i>Bacillus firmus</i>	CA	Juanita	<i>Bacillus spp</i>	JU
Felix	<i>Bacillus firmus</i>	FE	Tolteca	<i>Bacillus spp</i>	TO
Minero	<i>Bacillus firmus</i>	MI	Miguel Hidalgo	<i>Bacillus spp</i>	MH
Mercado	<i>Bacillus firmus</i>	ME	A2	<i>Bacillus spp</i>	A2
Mary	<i>Bacillus firmus</i>	MY	M1	<i>Bacillus spp</i>	M1
Lluvia	<i>Bacillus firmus</i>	LL	Bajadita	<i>Bacillus spp</i>	BA
Felipe	<i>Bacillus firmus</i>	JE	S/N	<i>Bacillus spp</i>	SN
Ame	<i>Bacillus firmus</i>	AM	Chacon	<i>Bacillus spp</i>	CH
M3	<i>Bacillus firmus</i>	M3	Provedor	<i>Bacillus spp</i>	PV
Masa	<i>Bacillus firmus</i>	MS	Nuevo		
tortillera			Tulancingo	<i>Bacillus spp</i>	NV
Revolución	<i>Bacillus firmus</i>	RE	Porvenir	<i>Bacillus spp</i>	PR
A1	<i>Bacillus firmus</i>	A1	Liconsa	<i>Bacillus spp</i>	LI
Tlaxcalteca	<i>Bacillus firmus</i>	TA	M2	<i>Bacillus spp</i>	M2

#### Anexo 4: Tinción de gram

<b>MUESTRA</b>	<b>OBSERVACIONES</b>	<b>GRAM</b>
<b>M1</b>	Bacilos rosados	Negativo
<b>M2</b>	Bacilos rosados	Negativo
<b>M3</b>	Bacilos rosados	Negativo
<b>A1</b>	Bacilos rosados	Negativo
<b>A2</b>	Bacilos rosados	Negativo
<b>LM</b>	Bacilos rosados	Negativo
<b>LM1</b>	Bacilos rosados	Negativo
<b>LM2</b>	Bacilos rosados	Negativo
<b>AEH1</b>	Bacilos rosados	Negativo
<b>AEH2</b>	Bacilos rosados	Negativo
<b>Miguel Hgo.</b>	Bacilos rosados	Negativo
<b>Masa Tortilleria</b>	Bacilos rosados	Negativo
<b>Abasolo</b>	Bacilos rosados	Negativo
<b>Felipe</b>	Bacilos rosados	Negativo
<b>Porvenir</b>	Bacilos rosados	Negativo
<b>Bosch</b>	Bacilos rosados	Negativo
<b>Tlaxcalteca</b>	Bacilos rosados	Negativo
<b>Revolución</b>	Bacilos rosados	Negativo
<b>Masita</b>	Bacilos rosados	Negativo
<b>Lluvia</b>	Bacilos rosados	Negativo
<b>Mary´s</b>	Bacilos rosados	Negativo
<b>La Fé</b>	Bacilos rosados	Negativo
<b>Félix</b>	Bacilos rosados	Negativo
<b>S/N</b>	Bacilos rosados	Negativo
<b>Carmelito</b>	Bacilos rosados	Negativo
<b>Alicia</b>	Bacilos rosados	Negativo
<b>Juanita</b>	Bacilos rosados	Negativo
<b>Miraje</b>	Bacilos rosados	Negativo
<b>Antojitos</b>	Bacilos rosados	Negativo
<b>Tolteca</b>	Bacilos rosados	Negativo
<b>Sazón</b>	Bacilos rosados	Negativo
<b>Minero</b>	Bacilos rosados	Negativo
<b>Liconsa</b>	Bacilos rosados	Negativo
<b>Aurrera-pach</b>	Bacilos rosados	Negativo
<b>Mercado</b>	Bacilos rosados	Negativo
<b>Chacón</b>	Bacilos rosados	Negativo
<b>Bajadita</b>	Bacilos rosados	Negativo
<b>Valencia</b>	Bacilos rosados	Negativo
<b>Proveedor</b>	Bacilos rosados	Negativo
<b>Nuevo Tulancingo</b>	Bacilos rosados	Negativo
<b>Perico</b>	Bacilos rosados	Negativo
<b>Tlacotalpilco</b>	Bacilos rosados	Negativo

## Anexo 5: Microaerófilos

#	MUESTRA	DILUCIONES			Concentración
		-2	-4	-6	
1	M1	N/C	N/C	53	5.30x10 <sup>7</sup>
2	M2	N/C	N/C	25	2.50 x10 <sup>7</sup>
3	M3	N/C	N/C	54	5.40 x10 <sup>7</sup>
4	A1	N/C	106	7	7.00x10 <sup>6</sup>
5	A2	N/C	193	94	9.40x10 <sup>7</sup>
6	LM	N/C	165	160	1.60 x10 <sup>8</sup>
7	LM1	N/C	193	20	2.00 x10 <sup>7</sup>
8	LM2	N/C	N/C	34	3.40 x10 <sup>7</sup>
9	AEH1	N/C	325	38	3.80 x10 <sup>7</sup>
10	AEH2	N/C	N/C	42	4.20 x10 <sup>7</sup>
11	Miguel Hgo.	N/C	N/C	76	7.60 x10 <sup>7</sup>
12	Masa Tortillería	N/C	N/C	16	1.60 x10 <sup>7</sup>
13	Abasolo	N/C	N/C	241	2.41 x10 <sup>8</sup>
14	Felipe	N/C	N/C	88	8.80 x10 <sup>7</sup>
15	Porvenir	N/C	52	41	4.10 x10 <sup>7</sup>
16	Bosch	N/C	N/C	75	7.50 x10 <sup>7</sup>
17	Tlaxcalteca	N/C	N/C	1000	1.00 x10 <sup>9</sup>
18	Revolución	N/C	N/C	1000	1.00 x10 <sup>9</sup>
19	Masita	N/C	22	1	1.00 x10 <sup>6</sup>
20	Lluvia	N/C	N/C	1000	1.00 x10 <sup>9</sup>
21	Mary's	N/C	425	17	1.70 x10 <sup>7</sup>
22	La Fé	N/C	56	6	6.00 x10 <sup>6</sup>
23	Félix	N/C	9	0	9.00 x10 <sup>4</sup>
24	S/N	N/C	45	31	3.10 x10 <sup>7</sup>
25	Carmelito	31	0	0	3.10 x10 <sup>3</sup>
26	Alicia	N/C	N/C	58	5.80 x10 <sup>7</sup>
27	Juanita	N/C	255	133	1.33 x10 <sup>7</sup>
28	Miraje	N/C	N/C	95	9.50 x10 <sup>7</sup>
29	Antojitos	N/C	N/C	72	7.20 x10 <sup>7</sup>
30	Tolteca	N/C	N/C	75	7.50 x10 <sup>7</sup>
31	Sazón	N/C	N/C	40	4.00 x10 <sup>7</sup>
32	Minero	N/C	234	111	1.11 x10 <sup>8</sup>
33	Liconsa	N/C	N/C	81	8.10 x10 <sup>7</sup>
34	Aurrera-pach	N/C	N/C	114	1.14 x10 <sup>8</sup>
35	Mercado	N/C	N/C	36	3.60 x10 <sup>7</sup>
36	Chacón	N/C	N/C	208	2.08 x10 <sup>8</sup>
37	Bajadita	N/C	N/C	23	2.30 x10 <sup>7</sup>
38	Valencia	N/C	N/C	25	2.50 x10 <sup>7</sup>
39	Proveedor	N/C	N/C	194	1.94 x10 <sup>8</sup>
40	Nuevo Tulancingo	N/C	N/C	1000	1.00 x10 <sup>9</sup>

---

41	Perico	N/C	N/C	33	3.30 x10 <sup>7</sup>
42	Tlacotalpilco	N/C	N/C	32	3.20 x10 <sup>7</sup>
				Mínimo	3.10 x10 <sup>3</sup>
				Máximo	1.00 x10 <sup>9</sup>
				Promedio	1.54 x10 <sup>8</sup>