



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

ÁREA ACADÉMICA DE BIOLOGÍA

*“Desarrollo e inactivación térmica de bacterias
patógenas en tortilla de maíz (Zea mays L.) recién
elaboradas”*

T E S I S

Para obtener el título de

Biólogo

PRESENTA:

ANDRES MIGUEL CRUZ GALVEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JAVIER CASTRO ROSAS

MINERAL DE LA REFORMA, HIDALGO ENERO 2010



El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Biotecnología (en el área de microbiología de alimentos) del Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS:

A Dios: por haberme dado la dicha de vivir rodeado de mi familia y de muy buenos amigos, pero sobretodo por haberme regalado el tesoro mas grande, la vida.

A mis padres: quienes han sido mi apoyo más grande para conseguir mis logros más importantes. Por el esfuerzo tan grande que hicieron para poder concluir esta meta en mi vida. Por enseñarme que la vida es dura, pero entre mas fuerte golpea, mas fuerte te hace. A tí papa por haberme tratado con mano dura, y ahora te agradezco, el haberme siempre mantenido por la línea del bien, a tí mama, que sin duda siempre estuviste apoyándome moralmente cuando yo sentía caer, y gracias a ese ánimo que siempre me diste para hacerme entender que sí podía lograrlo. Por todo esto gracias papas ¡LOS AMO!

A mis hermanos: por que se que aunque tenemos diferentes formas de pensar, siempre podemos contar el uno con el otro. Gracias por haber compartido conmigo una vida llena de retos la cual nos ha dado nuevas experiencias para poder enfrentar esta vida. Aunque algún día nos separemos siempre habrá una razón muy grande que siempre nos unirá, la sangre.

A mis amigos: a todos y cada uno de ellos por haberme enseñado cosas nuevas, y compartir tantas cosas como mis triunfos, alegrías, tristezas, y con algunos de ellos hasta lagrimas, gracias por dejarme entrar en sus vidas y aprender de cada uno de ustedes.

Al Dr. Javier por haberme permitido realizar este proyecto con el, y el apoyo recibido durante mi estancia en el laboratorio. Así como también al Dr. Carlos, por haberme permitido tratarlos como amigos, por los regaños y cada uno de sus consejos para ayudar a mejorar mi formación profesional y humana.

A los sinodales, por el tiempo dedicado en las revisiones, para ayudar a mejorar la estructura de mi trabajo escrito.

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Elaboración de la tortilla de maíz: una herencia ancestral	4
2.2. Nixtamalización	6
2.3. Aspectos microbiológicos de la tortilla	13
2.4. Algunos microorganismos patógenos transmitidos por alimentos	11
2.5.1. <i>Listeria monocytogenes</i>	11
2.5.2. <i>Salmonella</i>	13
2.5.3. <i>Shigella</i>	16
2.5.4. <i>Staphylococcus aureus</i>	17
2.5.5. <i>Escherichia coli</i> O157:H7	19
2.6. El uso del horno de microondas	21
3. OBJETIVO GENERAL	24
3.1. Objetivos particulares	24
5. PROCEDIMIENTO	25
5.1. Cepas bacterianas	25
5.2. Preparación del inóculo	26
5.3. Estudio de desarrollo de microorganismos sobre la tortilla	27
5.4. Estudio de inactivación de los microorganismos por calor	28
6. RESULTADOS Y DISCUSIONES	30
6.1. Estudio del comportamiento de microorganismos sobre la tortilla	30

6.2. Estudio de inactivación de los microorganismos por calor	38
7. CONCLUSIONES	52
8. REFERENCIAS	53
9. ANEXO	59
9.1. Material de laboratorio	59

ÍNDICE DE TABLAS

Figura	Pagina
Figura 1: Diagrama de flujo del proceso tradicional para la elaboración de tortillas	9
Figura. 2 : <i>Listeria monocytogenes</i>	13
Figura 3: <i>Salmonella</i>	16
Figura 4: <i>Shigella</i>	17
Figura 5: <i>S. aureus</i>	19
Figura 6: <i>E. coli</i> O157: h7	20
Figura.7 Preparación de las cepas	26
Figura 8.- Curvas de crecimiento de de los microorganismos durante las primeras 24 horas sin tratamiento termico	32
Figura 9: curvas de crecimiento de <i>E.coli</i> O157: H7 al efecto de calor producido por el horno de microondas	40
Figura 10: curvas de crecimiento de <i>S. Typhimurium</i> al efecto de calor producido por el horno de microondas	41
Figura 11: curvas de crecimiento de <i>S.aureus</i> ante el efecto de calor producido por el horno de microondas	41
Figura 12: curvas de crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> ante el efecto de calor producido por el horno de microondas	42
Figura 13: curvas de crecimiento de <i>S.Choleraesuis</i> ante el efecto de calor producido por el horno de microondas	42
Figura 14: temperatura alcanzada por el horno de microondas durante cada uno de los tiempos a los cuales fueron sometidas las tortillas	44
Figura 15: curva de crecimiento de <i>E.coli</i> O157: H7 al efecto de calor producido por un "comal" sometido a la flama producida por una estufa de gas	47
Figura 16: curva de crecimiento de <i>S. Typhimurium</i> al efecto de calor producido por un "comal" sometido a la flama producida por una estufa de gas	47

Figura17: temperaturas alcanzadas por el comal durante cada uno de los tiempos a los que fueron expuestas las tortillas 49

1. INTRODUCCIÓN

En México el cultivo de maíz es el más importante por su superficie sembrada, valor de la producción, además por ser el alimento principal de la población y por ocupar el 20% de la población económicamente activa. En 2002 se sembraron en México 6.48 millones de ha., de este cultivo con un rendimiento de 2.32 t ha⁻¹ y con un consumo anual *per cápita* de 209 Kg. En el área tropical se sembraron 2.5 millones de hectáreas, de las cuales un millón están comprendidas en provincias agronómicas de buena y muy buena productividad y donde es factible el uso de semilla mejorada, híbridos y variedades sintéticas (Sierra, 2007).

México es el principal consumidor de tortilla en el mundo, pues se estima que es consumida por el 94% de la población, por lo que el volumen de producción y consumo es cercano a los 12 millones de toneladas de tortillas por año, lo que representa un porcentaje importante entre los productos alimentarios comercializados en el país. Cabe también señalar que es un alimento de suma importancia en la alimentación de diversos varios de Centroamérica.

Durante la elaboración de la tortilla, ésta puede ser contaminada por microorganismos patógenos para el ser humano, debido a las malas prácticas de higiene, por parte de las personas que manipulan tanto la materia prima como la tortilla durante el proceso: estos pueden ser tanto los trabajadores de los establecimientos, y en ocasiones hasta del mismo consumidor.

Un estudio realizado por Estrada A. (2007) reporta que la tortilla fresca puede estar contaminada con microorganismos de origen fecal como *E. coli* y

patógenos como *Salmonella*. Estos hallazgos sugieren un riesgo presente en las tortillas frescas.

Los estudios para investigar la presencia de microorganismos patógenos o indicadores de malas prácticas de higiene en los alimentos se realizan, entre otras cosas, para tener conocimiento del grado de peligrosidad y riesgo que un alimento puede representar a la población. Estos estudios se complementan con la información epidemiológica de las enfermedades transmitidas por dicho alimentos (ETAs) y con estudios del comportamiento de microorganismo patógenos e indicadores en el alimento en cuestión. Todo este conocimiento es la base para el desarrollo e implementación de medidas eficaces para la prevención y control de las ETAs de origen microbiano.

Por tal motivo, para el caso de la tortilla es necesario conocer el comportamiento de microorganismos patógenos sobre ésta para tener idea del grado de riesgo que representa para el consumidor, así como de proponer alternativas tendientes a prevenir, eliminar o disminuir la posible presencia microorganismos patógenos en la tortilla.

2. ANTECEDENTES

Tres importantes cereales, cada uno asociado estrechamente con el origen de grandes civilizaciones, aparecieron en los pasados 8000 a 10,000 años. El maíz (*Zea mays* L.) fue domesticado en América, el trigo (*Triticum aestivum*) en Europa, y el arroz (*Oryza Sativa* L.) en Asia. Estos granos fueron los detonantes de desarrollos tecnológicos, las civilizaciones, culturas y tradiciones. El maíz ha sido alimento, moneda y motivo religioso para el pueblo de México. El maíz para consumo humano ha sido procesado en México siguiendo la técnica de nixtamalización (*nixtli* cal de cenizas y *tamalli* masa de maíz cocida que significa cocimiento del maíz con cal). Después de 4000 años de la aparición del maíz, se inventaron utensilios como el metate, la olla de barro y el comal que fueron indispensables para el desarrollo de la tecnología de nixtamalización. Este procedimiento fue determinante para incrementar el valor nutricional de productos de maíz de la dieta en México y Centro América como son las botanas, totopos, tacos, tostadas, enchiladas, y nachos entre muchos otros (Cruz y Verdalet, 2007).

Se han elaborado tortillas a base de maíz con otros granos o cereales, como por ejemplo mezclas de sorgo y maíz, Sin embargo, las tortillas de sorgo no tienen la misma calidad organoléptica o nutritiva que las de maíz (Vivas et al., 1988).

Otros estudios comprenden el uso de mezclas de harina de maíz y arroz, y de harina de maíz y harina de trigo. No obstante, los productos de mezclas de arroz y maíz tienen un valor nutritivo superior al de las tortillas de trigo y maíz.

También se han empleado mezclas de maíz germinado ya que se sabe que la germinación aumenta el contenido de lisina (Akingbala et al., 1987).

2.1. Elaboración de la tortilla de maíz: una herencia ancestral

La tecnología para producir tortilla de maíz nixtamalizado (según el proceso tradicional) es muy antigua: Este complejo proceso heredado de nuestros ancestros se utiliza como tal desde hace aproximadamente 3,500 años con sólo algunas modificaciones técnicas en su producción, pero en esencia se sigue utilizando el mismo proceso, que involucra como primera etapa un cocimiento térmico-alcálico del maíz denominado nixtamalización. Fueron los aztecas quienes transmitieron este procedimiento de generación en generación, el cual ha perdurado a través de los años. En aquella época, el maíz nixtamalizado era molido en un metate de piedra para producir la masa que se utilizaba para formar discos de aproximadamente veinte centímetros de diámetro, los que se cocían en comales de barro. El producto resultante era llamado *tlaxcalli* por los aztecas y posteriormente fue bautizado como “tortilla” por los españoles (Cruz y Verdalet, 2007).

La tecnología de la tortilla fue modernizada hace 100 años con la invención del molino de piedra que sustituyó al metate y la tortilladora de aplastón que sustituyó el tradicional torteado y después con las máquinas tortilladoras automáticas con comales giratorios y troqueladores que se inventaron hace 75 años.

Después de varias décadas de investigaciones tecnológicas, en 1915 aparecieron las máquinas tortilladoras de cocimiento automático. En 1947

aparece la primera máquina de la empresa Celorio que reproducía mecánicamente el cocimiento tradicional de la tortilla pero aún persistía el uso de rodillos (que tienden a producir una tortilla áspera), alambres despegadores (que produce una tortilla rasposa) y el troquelado (que producen una tortilla de reborde duro). Actualmente, existen alrededor de 25,000 molinos de nixtamal, que conjuntamente con las 23,000 máquinas tortilladoras completamente automáticas producen aproximadamente 12 millones de toneladas anuales de tortillas que consume el mercado mexicano. Por otra parte, en una época moderna a pesar de los nuevos adelantos como las computadoras, rayos láser, energía de microondas, e infrarojo, celulares televisión etc., ninguna de esas nuevas tecnologías se ha incorporado al equipo comercial para modernizar las tortillerías y molinos de nixtamal del país. Las máquinas no han sufrido modificaciones sustanciales desde que fueron inventadas (Figuroa, 2004).

La tortilla se define como un disco aplanado de masa de maíz nixtamalizado, cuyas dimensiones varían entre doce y dieciocho centímetros de diámetro y de uno a cuatro milímetros de espesor. Se le cuece sobre una superficie caliente (260- 280 °C) generalmente metálica, denominada comal (Cruz y Verdalet, 2007).

La tortilla tiene la versatilidad de acompañar a los demás alimentos sin dominar en sabor; aún seca es comestible, no se descompone con facilidad y es también fácil de hidratar. Esta versatilidad ha permitido a la comida mexicana y en especial a la cultura del taco ganar la preferencia del mercado mundial. Otra bondad de la tortilla que se arraiga en el gusto al nixtamal es el sabor tan

especial e inconfundible. Este sabor se debe principalmente a las reacciones del nixtamal desarrolladas durante el cocimiento alcalino entre la cal, agua y proteína, que rompe el aminoácido triptófano en el maíz produciendo el típico olor y sabor a nixtamal. Otra reacción importante es el aroma a maíz desarrollado por lípidos y proteínas de maíz durante el freído (Figuroa, 2004).

La comida mexicana y en especial el taco, está aumentando su popularidad en el mundo. Por las características mencionadas, la tortilla se puede utilizar como apoyo sustituyendo la cuchara o el plato para consumirse con diferentes alimentos. La tortilla es un producto tan bien diseñado que se ha llevado al espacio por los astronautas debido a sus propiedades de no quebrarse formando polvo que pueda dañar el equipo y su facilidad de transportación (Figuroa, 2004).

2.3. Nixtamalización

Originalmente, el nixtamal se molía varias veces con una piedra plana hasta que las partículas gruesas alcanzaran la finura requerida; en el presente, la molienda se lleva a cabo con un molino de piedras volcánicas. Sin embargo, el uso de este procedimiento tradicional solo se lleva a cabo en algunas comunidades del medio rural y en pequeñas áreas urbanas, debido a que el uso de las harinas nixtamalizadas ha ganado terreno en la elaboración de las tortillas (Méndez y Moreno, 2007).

En la Figura 1 se presenta el diagrama de flujo del proceso de elaboración de tortilla. No se sabe con certeza cuándo fue que los antiguos mexicanos

comenzaron a dar al maíz el tratamiento térmico-alkalino de la nixtamalización. Sin embargo, la importancia de este tratamiento ha sido ponderado en múltiples estudios (Bressani et al, 1958; Vázquez et al, 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 y Saharópulos, 1983; Serna et al, 1988).

La utilización de este procedimiento tradicional está restringido actualmente a partes del medio rural y a pequeñas áreas urbanas, ya que se prefiere utilizar 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).

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 et al., 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. Posteriormente las partículas gruesas son molidas de nueva cuenta y separadas por tamaño, de acuerdo a las características deseadas para la harina, el cual depende del producto que se quiera elaborar (Rooney y Suhendru, 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).

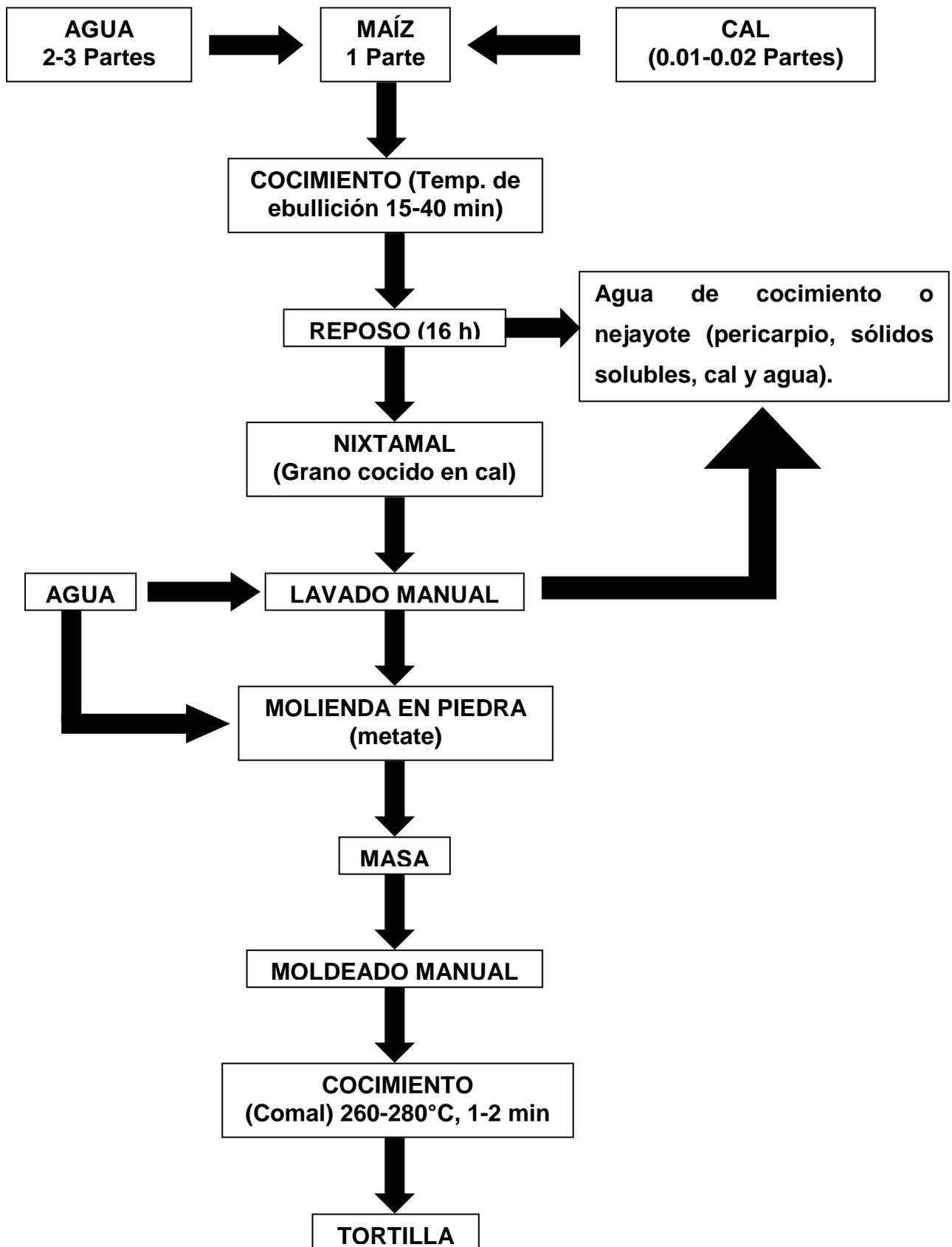


Figura 1: Diagrama de flujo del proceso tradicional para la elaboración de tortillas (Tomado de Serna Saldívar et al., 1990).

2.4. Aspectos microbiológicos de la tortilla.

Existen pocos estudios sobre la microflora de las tortillas de maíz cocido en agua de cal. La mayoría de estudios publicados hacen referencia a los hongos por su importancia como productores de toxinas, tales como aflatoxinas. Por ejemplo, en un estudio realizado con tortillas obtenidas en México, D.F., en distintas épocas del año durante 1977- 1978, se encontró que entre el 15 y 20% de las muestras recolectadas en primavera y en la estación lluviosa contenían aflatoxinas. La concentración de la aflatoxina B1 varió entre 50 y 200 ppb (Martínez, 1979).

Se han evaluado diferentes métodos para eliminar las aflatoxinas de la tortilla, no obstante, el más viable parece ser la inactivación térmica en un medio alcalino (nixtamalización). Martínez (1979), ha reportado también, que la cocción del maíz en agua de cal disminuye las concentraciones de aflatoxinas entre 50 y 75%.

Según Martínez (1979), así como De Campos et al., (1980), concentraciones de cal de hasta el 10 % no resulta más eficaz que una del 2 % para disminuir las aflatoxinas. Price y Jorgensen, (1985) observaron que el proceso de cocción en agua con cal disminuye los niveles de aflatoxinas de 127 µg por kg en el maíz a 68,6 µg por kg en las tortillas. Sin embargo, concluyeron que en general 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). Dichos autores hallaron que la acidificación tal como sucede en el tracto intestinal aumentaba los niveles de aflatoxinas disponibles. (Price y Jorgensen, 1985). En otros estudios se observó que la cocción del maíz en agua con cal al

2 % provocaba la descomposición de las micotoxinas zearalenona y el deoxinivalenol (DON), (Abbas et al., 1988). Los investigadores encontraron reducciones importantes, el porcentaje varió entre 58 y 100 % para zearalenona y entre el 72 y 82% para DON; además, se destruyó completamente el 15-acetil-DON (Abbas et al., 1988).

En un estudio realizado se encontró que en tortillas descompuestas se aislaron microorganismos del genero *Bacillus*, las especies identificadas fueron; *megaterium*, *sphaericus* y *firmus* (Trinidad, 2008)

En otro estudio Estrada (2008) encontró que *Salmonella* fue capaz de multiplicarse en las tortillas tanto a 22 como a 30 °C. y en 6 h puede alcanzar una concentración de al rededor de 1×10^6 UFC/área contaminada. Además menciona que el calentamiento en microondas, como comúnmente se efectúa en los hogares, no es un método que asegure la eliminación de los patógenos microbianos.

2.5. Algunos microorganismos patógenos transmitidos por alimentos

2.5.1 *Listeria monocytogenes*

Es un bacilo corto gram positivo, no esporulado de $1.2 \times 0.5 \mu\text{m}$ a veces calificado de cocoide y corineforme puede mostrar diploformas dispuestas en V, las células también aparecen aisladas (Fernández, 2000). *L. monocytogenes* se recupera de una diversidad de alimentos, tanto crudos como procesados o cocidos, y del medio ambiente (Fernández, 2000). Se ha aislado del agua, de la leche, del ensilado, de las aguas residuales, de las heces de muchos animales e incluso de las heces de las personas (Frazier y Westhoff, 1993).

Este microorganismo es capaz de sobrevivir por tiempo prolongado en el suelo. De aquí que el empleo de estiércol contaminado con *Listeria* pueda tener importancia relevante cuando se aplica a tierra de cultivo, sobre todo cuando la cosecha son frutas u hortalizas que no se someterán a tratamiento térmico. Las características de crecimiento psicrótrofo de este microorganismo sugieren que la contaminación de los alimentos refrigerados podría presentar un importante peligro para la salud. En los adultos, la enfermedad se presenta con mayor frecuencia en individuos inmunocomprometidos y se caracteriza por síntomas de septicemia, de meningitis o de meningoencefalitis que puede derivar en la muerte del paciente (Frazier y Westhoff, 1993).

L. monocytogenes muestra capacidad para sobrevivir en el medio ambiente sobre numerosos sustratos, potencial que varía con la temperatura y humedad prevalente (Fernández, 2000).

El desarrollo de *L. monocytogenes* a niveles suficientes para provocar infecciones en personas hipersensibles, no se acompaña de signos de deterioro del alimento implicado. En el almacenamiento de los alimentos perecederos la temperatura es crítica para controlar su actividad (Rosso et al., 1996).

La dosis infectante mínima para el humano es difícil de establecer; en función de observaciones realizadas en algunos brotes de listeriosis se estima que en ciertos segmentos de la población, el número podría situarse entre varios cientos y unos cuantos miles de células de *L. monocytogenes* (Ryser y Marth, 1991).

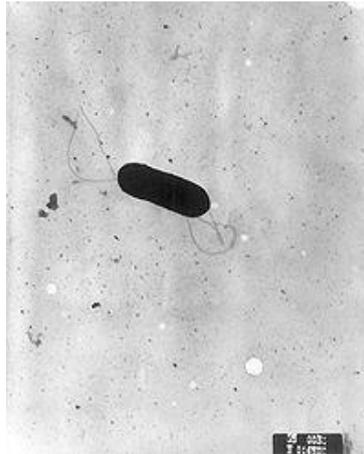


Figura.2. *Listeria monocytogenes* (tomado de <http://es.wikipedia.org/wiki>)

2.5.2 *Salmonella*

Típico bacilo gram negativo de la familia Enterobacteriaceae. Generalmente son móviles, aerobios o facultativos anaerobios (Fernández, 2000). *Salmonella* crecen bien a temperatura ambiente, si bien su temperatura óptima de crecimiento es de aproximadamente 37°C. El intervalo de pH de crecimiento se encuentra comprendido entre los valores 4,1 y 9,0. Su a_w mínima de crecimiento varía para cada alimento aunque es de aproximadamente 0.93 a 0.95 (Frazier y Westhoff, 1993). En la actualidad se han identificado 2463 serotipos de *Salmonella*, no obstante, solo alrededor de 350 han sido relacionados con brotes asociados al consumo de alimentos (Fernández, 2000). Se reconocen actualmente dos especies de *Salmonella*: *enterica* y *bongori* (Popoff y Minor, 1997; Popoff, et al., 2000).

La nomenclatura para designar a *Salmonella* es compleja. A lo largo de los años se han propuesto diferentes formas para nombrar a las especies, subespecies y serotipos de *Salmonella* (Brenner, et al., 2000). Sin embargo, toda vía hasta estas alturas no hay una nomenclatura oficial para designar a las

cepas de *Salmonella*. No obstante, actualmente en todo el mundo los microbiólogos han adoptado dos nomenclaturas a recomendación de la Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en inglés) (Popoff y Minor, 1997) y del Centro para el Control de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC, por sus siglas en inglés) (Brenner, 1998; Brenner, y McWhorter-Murlin, 1998), en la primera se incluye el género, nombre de la especie seguido por la subespecie y finalmente el serotipo; tanto el género como la especie y subespecie se escriben en cursivas y para el caso de la especie y subespecie la primera letra es minúscula, mientras para el caso del serotipo la primera letra es mayúscula y en nombre del serotipo no se escribe en cursivas (Brenner, et al., 2000) por ejemplo: ***Salmonella enterica sub. enterica* serotipo Typhimurium**. En segunda propuesta (del CDC) se omite la especie y subespecie y solo se escribe el género seguido del serotipo; en este caso, tanto el género como el serotipo se escriben como en la primera propuesta, por ejemplo: ***Salmonella* Typhimurium** (Brenner, et al., 2000). El CDC ha adoptado esta nomenclatura debido a que la literatura científica disponible sobre *Salmonella* muestra que en la especie *enterica* se encuentra el 99.2% de los serotipos (Brenner, et al., 2000), por lo que considera que es suficiente con describir el serotipo de *Salmonella* del cual se trata.

Cabe señalar que en esta tesis para referirnos a las cepas de *Salmonella* se empleará la nomenclatura del CDC, solo en la metodología se empleará la propuesta del WHO.

En la producción de los brotes de infecciones por *Salmonella* se hallan implicados un gran número de alimentos distintos. Los alimentos implicados

con mayor frecuencia son los distintos tipos de carnes y los productos derivados de la misma sobre todo si se mantienen sin refrigerar durante mucho tiempo. Las carnes frescas pueden contener bacterias del género *Salmonella* que produjeron las enfermedades en los animales sacrificados o pueden haber sido contaminadas por manipuladores. La leche y los productos lácteos, incluso la leche fresca, las leches fermentadas, los helados y el queso, han producido infecciones salmonelósicas (Frazier y Westhoff, 1993). Los huevos de gallina se refieren como un vehículo sobresaliente en la transmisión de salmonelosis. Los vegetales procedentes de tierras regadas de aguas negras, cercanas a animales de crianza o domésticos, o abonadas con desechos animales suelen estar contaminados con agentes patógenos intestinales incluidos los del género *Salmonella*. Los alimentos utilizados en la crianza de animales constituyen un eslabón de especial significado en el ciclo de *Salmonella*. Muchos de ellos se obtienen a partir de coproductos de origen animal (harina de pescado, plumas, huesos, vísceras y sangre), que generalmente contienen cifras elevadas de microorganismos patógenos (Morehouse y Wedman, 1961). A los moluscos bivalvos y a otros alimentos de origen marino, *Salmonella* llega a consecuencia de la polución por aguas residuales de los ríos y aguas costeras donde se crían. Ciertos alimentos que contienen diversos serotipos de *Salmonella* pueden ocasionar en el consumidor un síndrome gastroentérico febril: la salmonelosis (Mossel y Moreno, 2003). Los principales síntomas de toda infección gastrointestinal por *Salmonella* son: náuseas, vómitos, dolor abdominal, y diarrea que suele aparecer súbitamente (Frazier y Westhoff, 1993).

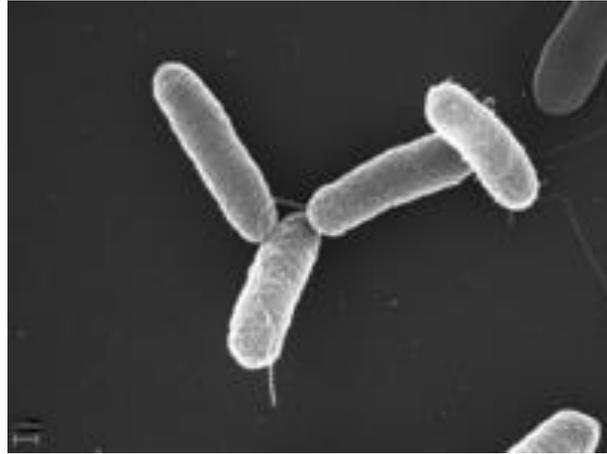
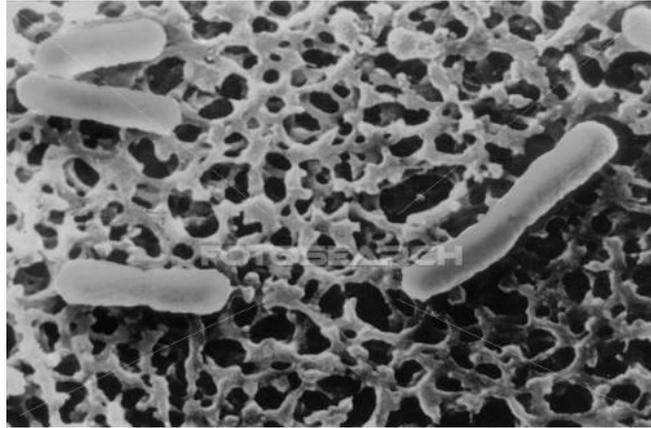


Figura 3: *Salmonella* (tomado de <http://es.wikipedia.org/wiki>)

2.5.3. *Shigella*.

Es un género de bacterias con forma de bastoncillo Gram negativas, no móviles, no formadoras de esporas e incapaces de fermentar la lactosa, que puede ocasionar diarrea en los seres humanos. Fueron descubiertas hace 100 años por el científico japonés Kiyoshi Shiga, de quien tomó su nombre. Hay varias especies diferentes de bacterias en el genero *Shigella*: *Shigella sonnei*, conocida también como *Shigella* del grupo D, que ocasiona más de dos terceras partes de todos los casos de shigelosis en los Estados Unidos. Un segundo tipo, *Shigella flexneri* o *Shigella* del grupo B, ocasiona casi todas las infecciones restantes. Otros tipos de *Shigella* son raros en este país, si bien continúan siendo causas importantes de enfermedad en el mundo en desarrollo. Un tipo que se encuentra en los países del mundo en desarrollo, *Shigella dysenteriae*, del tipo 1, ocasiona epidemias mortíferas (Fernández, 2000).



312752 www.fotosearch.com

Figura 4: *Shigella* (tomado de [www. Fotosearch.com](http://www.fotosearch.com))

2.5.4. *Staphylococcus aureus*

Es una especie bacteriana integrada por formas cocáceas de 0.8-10 μm de diámetro. Que se dividen en más de un plano, por lo que se agrupan irregularmente en racimos. Son inmóviles y carecen de esporas. Son Gram positivas. Es una especie muy sensible a la acción de calor y de los desinfectantes. Su presencia o la de sus toxinas en los alimentos es signo evidente de falta de higiene (Pascual y Calderón, 2000)

Se trata de un estafilococo típico, que se presenta en cúmulos parecidos a racimos de uvas, en parejas o en forma de cadenas cortas. En aerobiosis crecen mejor que en anaerobiosis. *S. aureus* se multiplica con mayor rapidez a temperaturas comprendidas entre 20 y 45°C. La a_w mínima de crecimiento tiene un valor de 0.86 en aerobiosis y aproximadamente 0.90 en anaerobiosis (Frazier y Westhoff, 1993). Los estafilococos enterotoxigénicos pueden encontrarse, en los alimentos en el momento de su obtención, en especial en los de origen animal o bien llegar posteriormente a ellos a partir principalmente de manipuladores. Un porcentaje elevado de personas sanas son portadoras

de *S. aureus* en fosas nasales y garganta. Este germen se encuentra también en la piel y, sobre todo, en procesos cutáneos: acné, forúnculos, heridas infectadas, etc. (Mossel y Moreno, 2003).

Algunas cepas de *S. aureus* productores de toxinas son muy halotolerantes y también toleran los nitritos y de aquí que, si las demás condiciones del medio son favorables, son capaces de crecer en la superficie de las carnes en adobo o adobadas. También toleran los azúcares disueltos (de 50% a 60% de sacarosa). Son fermentativos y proteolíticos aunque en la mayoría de los alimentos no suelen producir olores desagradables, ni los descomponen. Normalmente los estafilococos se encuentran en los alimentos en baja cantidad y son superados en número por las bacterias que compiten con ellos en los alimentos frescos. No obstante, es posible que en los alimentos que han sido sometidos a tratamiento térmico esta competencia no exista, razón por la cual es posible que tenga lugar la multiplicación sin restricción de los estafilococos.

De los muchos alimentos que han sido implicados como causantes de intoxicaciones alimentarias estafilocócicas, los productos de pastelería rellenos de crema o de nata, el jamón y la carne de ave han originado la mayoría de los brotes. Entre los alimentos causantes de intoxicaciones alimentarias se incluyen otras carnes y productos cárnicos, el pescado y los productos derivados del mismo, la leche y los productos lácteos, las ensaladas, los budines, las natillas, las empanadas y los aderezos de ensaladas (Frazier y Westhoff, 1993). Se trata, por lo general, de alimentos con una baja actividad de agua (a_w) (Mossel y Moreno, 2003).



Figura 5: *S. aureus* (Tomado de www.britannica.com/EBchecked/topic-art/563360)

2.5.5. *Escherichia coli* O157:H7

Actualmente existen cinco grupos patógenos o patotipos de *E. coli* que produce gastroenteritis en el hombre (Benenson, 1992).

Entre ellas está *E. coli* enterohemorrágica ((EHEC), por sus siglas en inglés), cuyo principal serotipo es el O157:H7. Se detectó por primera vez en el caso de intoxicación por hamburguesas de Estados Unidos en 1982. *Escherichia coli* es un habitante común de los intestinos de todos los animales, incluyendo el hombre. Normalmente esta bacteria tiene la función útil en el cuerpo humano de suprimir el crecimiento de bacterias peligrosas y contribuir a la síntesis de un apreciable volumen de vitaminas. Una minoría de cepas de *E. coli* son capaces de causar enfermedad humana a través de diferentes mecanismos.

El serotipo O157:H7 es una rara variedad de *E. coli* que produce grandes cantidades de una o más toxinas potentes que causan severos daños a la mucosa intestinal. Estas toxinas (verotoxina) están muy relacionadas o son idénticas a las toxinas que produce *Shigella dysenteriae* (FDA., 1992).

Los microorganismos de *E. coli* O157:H7 pueden sobrevivir en ambientes ácidos que son letales para otros organismos patógenos, tales como alimentos

fermentados (por ejemplo, salchichas), jugo de manzanas, mayonesas y quesos. El tiempo de supervivencia de estos organismos es mayor a temperaturas de refrigeración que a temperatura ambiente (IFT, 1997).

La enfermedad aguda causada por la bacteria *Escherichia coli* O157:H7 se denomina colitis hemorrágica. Las infecciones de colitis hemorrágica no son muy comunes, pero esto quizás no refleje su verdadera frecuencia. Probablemente aquellas personas que presentan síntomas inequívocos (diarreas profusas con sangre) buscan atención médica, mientras que los casos menos severos, que pueden ser más numerosos, conforman un subregistro. La infección en los seres humanos generalmente ocurre por la ingestión de alimentos contaminados. No se transmite por el aire ni a través del contacto normal interpersonal, aunque la transmisión de persona a persona en hogares, centros de atención de niños y ancianos, por la vía fecal-oral, sí puede ocurrir. Los niños pequeños usualmente expulsan los organismos en sus heces durante una semana o dos después de haber rebasado la enfermedad. Los niños mayores raramente son portadores asintomáticos (CDC, 1996). Menos de 10 células de *E. coli* O157:H7 pueden ser suficientes para causar la enfermedad en humanos. Bajas dosis infecciosas de 2 a 2,000 células han sido asociadas con brotes (IFT, 1997).

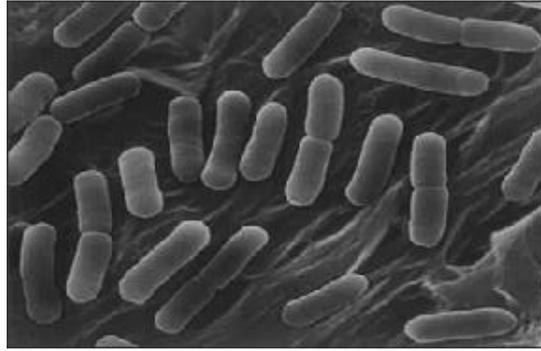


Figura 6: *E. coli* O157: h7 (tomado de, www.astrographics.com)

2.6. EL USO DEL HORNO DE MICROONDAS

En los últimos años, el uso del horno de microondas dentro de la industria alimentaria, establecimientos de comida rápida, instituciones públicas y hogares ha ganado popularidad al permitir cocinar y/o recalentar alimentos en el menor tiempo y de la manera más económica. Entre sus usos se incluye el descongelar, secar y cocinar alimentos, más la inactivación de microorganismos que pueda o no ejercer este tipo de tratamiento, es tema de discusión mundial (Rosenberg, 1987).

La característica fundamental de las microondas reside en que contienen un campo eléctrico y un campo magnético perpendiculares entre sí. Dado el efecto oscilatorio del campo eléctrico, las moléculas tenderían a alinearse en él, dependiendo de su momento dipolar. Las moléculas de agua, por su estructura tienen un momento dipolar de 6.17×10^{-30} cm; y tienden a alinearse con las ondas. Esto se debe a que la posición de los átomos en la molécula la presentan con una distribución de cargas que semeja un dipolo eléctrico. Estas moléculas se comportan como antenas, absorbiendo fácilmente energía. Este dipolo en su campo eléctrico de carácter oscilatorio, como en las microondas,

es forzado a rotar. Así pues todos y cada uno de estos dipolos constituyen una especie de antena capaz de captar las microondas. (Bedrosain, 1984).

En las microondas las frecuencias de 300 a 3000, 000 MHz (300MHz a 300 GHz) varían de un metro a un milímetro; la frecuencia mas usada en los hornos de microondas es de 2 450 MHz (2.45 GHz). Esta radiación es de muy baja energía (menos de 0.00001 electrón-volt), produce ondas de 12.24 cm. y activa moléculas polares como las del agua (Atkins, 1984). En este sistema, energía y radiación son interdependientes y las microondas al ser aplicadas hacen rotar a las moléculas polares a gran velocidad, aproximadamente 2 450 000 000 veces por segundo. Esta vibración genera una fricción en todas las moléculas cercanas, lo cual produce una elevación térmica en toda la masa irradiada en forma simultánea en cuestión de segundos a minutos dependiendo de la potencia aplicada (Agosto, 1976).

Lo importante a considerar, es que la oscilación de todas las moléculas de agua ocurre simultáneamente, generándose calor en toda la masa irradiada al mismo tiempo. De esta forma se presenta un diferencial térmico. Cuando se trata de células dicho diferencial deberá ocurrir tanto en el agua extracelular como en el agua intracelular. Este principio es válido también para una suspensión microbiana. Las células microbianas poseen un contenido citoplasmático de agua superior al 90%, y además contienen solutos que determina presiones osmóticas que van desde 5 a 20 atmósferas. La rotación de las moléculas de agua intracelular determina que por fricción entre ellas, ésta se caliente y pueda alcanzar el punto de ebullición, ocasionando cambios en las células, que producen la muerte en tiempos muy cortos de exposición a

la radiación con microondas. El agua extracelular simultáneamente ejerce un efecto similar (Assinder, 1983). Diversos trabajos citan la reducción en el número de microorganismos al ser tratados con microondas, incluyendo pavo, carne, leche de soya, pollo, papa y alimentos congelados (Aleixo et al., 1985; Farber et. al. 1998; Lin y Sawyer, 1998), pero no su destrucción total; otros estudios citan la sobrevivencia de microorganismos a este tipo de tratamiento, incluyendo bacterias tan importantes en microbiología de alimentos como *Salmonella* (Dealler y Lacey, 1990) *Clostridium perfringens* y *Bacillus cereus* (Rosenberg, 1987; Buono 1989).

3. OBJETIVO GENERAL

Determinar el comportamiento de *Salmonella entérica* sub. *enterica* serotipos Typhimurium y Choleraesuis, *Echerichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri* y *Staphylococcus aureus* en tortilla de maíz recién elaborada así como evaluar el efecto del calentamiento en comal y en horno de microondas en la sobrevivencia de las bacterias patógenas inoculadas sobre tortilla de maíz recién elaboradas.

3.1 OBJETIVOS PARTICULARES

Investigar el comportamiento de microorganismos patógenos en tortillas de maíz almacenadas a 22°C/24h

Evaluar el efecto de la temperatura de calentamiento de las tortillas en horno de microondas y “comal”, en la sobrevivencia de los patógenos en tortilla.

5. PROCEDIMIENTO

5.1. Cepas bacterianas

Se trabajo con 6 cepas de microorganismos: *E. coli* O157:H7, *Salmonella enterica sub. enterica serotipos* Typhimurium (ATCC 14028) y *Choleraesuis* (ATCC 10708), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y *Shigella flexneri* (ATCC 12022). Las cepas de *Escherichia coli* O157:H7 fueron donadas por el departamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV-IPN, México.

En nuestro laboratorio, todas las cepas fueron marcadas con resistencia al antibiótico Rifampicina (Kaspar y Tamplin, 1993). Todas las cepas se mantuvieron de 4-7°C en AST con transferencias quincenales en tubos con AST inclinado y se activaron mediante tres transferencias sucesivas en CST incubando a 35°C/24 h.

Se inocularon tubos de 3 mL de CST con cada una de las 6 cepas, (*Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Choleraesuis, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri*) y se incubaron a 35°C/18h. Una vez desarrollados, por separado cada uno se centrifugó y resuspendió en SSI a una concentración final de 10^9 UFC/mL. Se extendió por separado un mL de la suspensión de cada cepa en tres placas de AST conteniendo 100 ppm de Rifampicina (AST-Rif). Las placas inoculadas se incubaron a 35°C/48-72 h. Las colonias que crecieron fueron estriadas en nuevas placas de AST-Rif para asegurar la resistencia. Todas las cepas se mantuvieron de 4-7°C en AST con transferencias quincenales y se activaron mediante tres transferencias sucesivas en CST incubando a 35°C/24 h. La

resistencia al antibiótico se mantuvo en las nueve cepas a lo largo del estudio. En lo sucesivo las cepas resistentes a Rifampicina serán referidas como R+.

5.2. Preparación del inóculo

Las cepas patógenas fueron inoculadas en CST a 37°C/ 24h. Una vez desarrollados, los cultivos fueron centrifugados a 3500 rpm/20min. Posteriormente, se decantó el sobrenadante y se adicionó a cada tubo 3 ml de SSI. Finalmente cada tubo se agitó 10 segundos en vortex para resuspender las células. A todo este procedimiento comúnmente se le conoce como “lavado del cultivo”. Se realizaron 2 lavados más a cada cultivo. Una vez lavados los cultivos las cepas de cada patógeno se agregó 1 ml en un tubo con 9 ml de diluyente de peptona estéril para obtener la concentración de inóculo deseado (1×10^5) como se explica en la figura 7, se hizo el conteo mediante la técnica de vertido en placa.

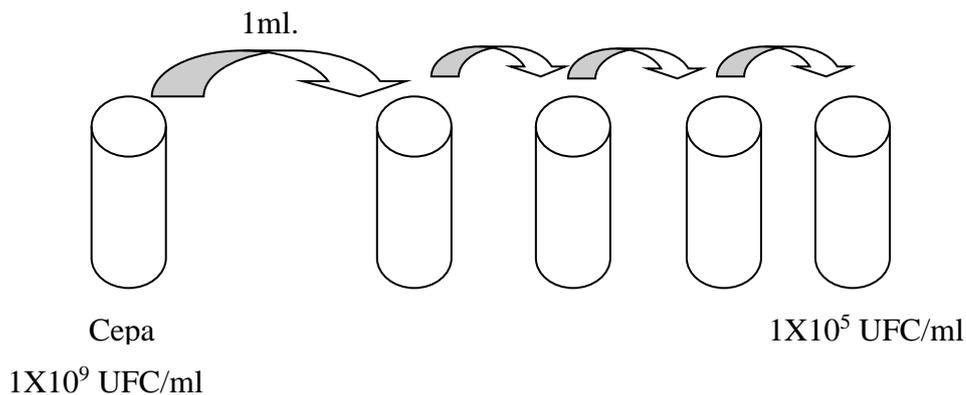


Figura.7 Preparación de las cepas

5.3. Estudio de desarrollo de microorganismos sobre la tortilla.

Se trabajó con tortillas de maíz recién elaboradas obtenidas en una tortillería; estas se compraron 30 minutos antes de iniciar los experimentos y se transportaron bajo condiciones higiénicas. Las tortillas se inocularon por separado con cada cepa resistente como se describe abajo. Los cultivos de 24h/35°C de cada cepa resistente fueron lavados dos veces, centrifugados a 3500 rpm/25 min. y resuspendidos en solución salina isotónica (SSI). La concentración final de los cultivos lavados fue de aproximadamente de 1×10^9 UFC/ml; estos se diluyeron en SSI para obtener una concentración final de 1×10^4 UFC/ml. A partir de estas suspensiones se inoculó 10 μ L en el centro de la superficie de tortillas independientes. Sobre la tortilla inoculada se colocó otra tortilla no inoculada. Las dos tortillas se introdujeron en una bolsa de plástico y se cerró herméticamente. De cada microorganismo se prepararon un total de cinco bolsas con tortillas inoculadas. Por separado, bolsas con las tortillas inoculadas se incubaron a 24°C. Periódicamente, se efectuó el recuento de los microorganismos inoculados en las tortillas; para esto, a partir de bolsas de cada temperatura se sacaron las tortillas, se cortó con navaja de disección el círculo marcado previamente en ambas tortillas (la tortilla inoculada y la de arriba). Las porciones se colocaron en una bolsa estéril; se adicionó 10 mL DP y las porciones de tortillas se frotaron vigorosa y manualmente desde fuera de la bolsa por 1 minuto. A partir de estas suspensiones se efectuó el recuento de las unidades formadoras de colonias (UFC) mediante la técnica de vertido en placa, empleando agar soya tripticasa con 100 mg/L de rifampicina.

Las cajas fueron incubadas a 35°C por 24-48 h. Todos los estudios se efectuaron por duplicado.

5.4. Estudio de inactivación de los microorganismos por calor

Se inocularon por separado tortillas con cada una de las cepas de estudio tal como se describió en el punto anterior, con la diferencia de que para este caso se trabajó con 10 tortillas colocadas una sobre otra (apiladas) y sólo se inocularon 3 tortillas de la pila en orden ascendente: la primera, la quinta y la novena. Cada pila de tortillas inoculadas se introdujo en una bolsa estéril de plástico y se incubó a 24°C por 8 h y luego a 3-5°C por 12 h. Trascurrido el tiempo, las bolsas fueron sacadas del refrigerados y las tortillas fueron sometidas a calentamiento en un microondas (Samsung, modelo MW1235 WB con una potencia de 1100 watts) mientras que otras fueron sometidas a calentamiento en un “comal” de acero inoxidable con un espesor de 2 mm. Para el caso del microondas, la bolsa con las 10 tortillas se introdujo al equipo y se calentó a la máxima potencia; sólo se calentó una bolsa por cada ocasión. Bolsas independientes con las distintas cepas, se calentaron por 0,10, 30, 45 y 60 s. Trascurrido el calentamiento, se midió la temperatura de las tortillas (colocando el termómetro entre la tortilla inoculada y la superior) esto se hizo para las tres partes del paquete de tortillas que fueron inoculadas (inferior, medio y superior), se sacaron las tortillas de la bolsa y se cortó el círculo central en donde se inoculó el microorganismo y también se cortó la parte de la tortilla de arriba que tuvo contacto con el inóculo. El recuento de UFC sobrevivientes se efectuó como se describió en el punto 5.3. Para el caso del calentamiento en comal únicamente se trabajó con *E. coli* O157:H7 y *S.*

Typhimurium. En este caso, sólo las tortillas inoculadas y las que estuvieron sobre éstas durante el almacenamiento se sometieron al tratamiento. Para el calentamiento en comal se empleó una parrilla de 2 quemadores. Previamente se calentó el comal sobre la parrilla durante 2 minutos, trascurrido el tiempo se colocaron las tortillas sobre el comal manteniendo encendida la parrilla. Las tortillas se pusieron en contacto directo con el comal por la parte inoculada durante 0, 10, 20, 30 y 60 s. Después del tratamiento, se cortó el círculo marcado previamente de ambas tortillas (la tortilla inoculada y la de arriba) y se realizó el conteo de UFC sobrevivientes de la misma manera como se describió en el punto 5.3.

6. RESULTADOS Y DISCUSIONES

6.1. Estudio del comportamiento de microorganismos sobre la tortilla.

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.

Desde principios del siglo pasado cuando se hace referencia a las manifestaciones que tendrá un determinado microorganismo en un alimento o material al ser éste inoculado con dicho microorganismo, se ha empleado la palabra “destino” o “comportamiento” para referirse de forma general a tales eventos que manifestará el microorganismo; en inglés se emplean las palabras “fate of” o “behavior of”. En la actualidad se sigue empleando tales palabras.

Como ya se ha mencionado, las tortillas no son un alimento que se relacione con brotes de enfermedad de etiología microbiana. Sin embargo, debido a los malos hábitos de higiene que por lo general se tienen durante todo el proceso de elaboración e incluso hasta su traslado a los hogares, no se puede descartar contaminación del producto por microorganismos patógenos. En estudios previos se ha encontrado que la tortilla fresca puede estar contaminada con microorganismos de origen fecal como *E. coli* y patógenos como *Salmonella* (Estrada, 2008) Estos hallazgos sugieren un riesgo potencial presente en las tortillas frescas. Debido a ello es importante estudiar el comportamiento sobre la tortilla de los microorganismos presentes en las tortillas frescas.

En consecuencia como otra forma de evaluar el riesgo de las tortillas este trabajo pretende determinar el comportamiento de diferentes microorganismos patógenos en tortilla recién elaborada, así como evaluar si el tratamiento térmico al que son sometidas durante el recalentamiento convencional o en un horno de microondas es suficiente para eliminar a los microorganismos presentes.

Todos los microorganismos se multiplicaron sobre las tortillas almacenadas a 24°C (Figura 8). *S. aureus* fue el microorganismo que alcanzó mayor concentración en la tortilla y el menos activo *S. Choleraesuis*. Independientemente, el estudio muestra que los patógenos pueden multiplicarse sobre las tortillas alcanzando a las 7 h niveles muy por arriba de su mínima infectante (entre 5 y 6 log₁₀ UFC/tortilla). Es destacable que *S. aureus* después de alcanzar el máximo tiende a morir; no obstante, la concentración máxima alcanzada estuvo por arriba del mínimo (1x10⁶UFC/g) que se requiere para sintetizar la concentración suficiente de toxina que afecte al humano (Escartin, 2000). Aunque, no se hicieron estudios para determinar la presencia de toxina, es posible que ésta se sintetice.

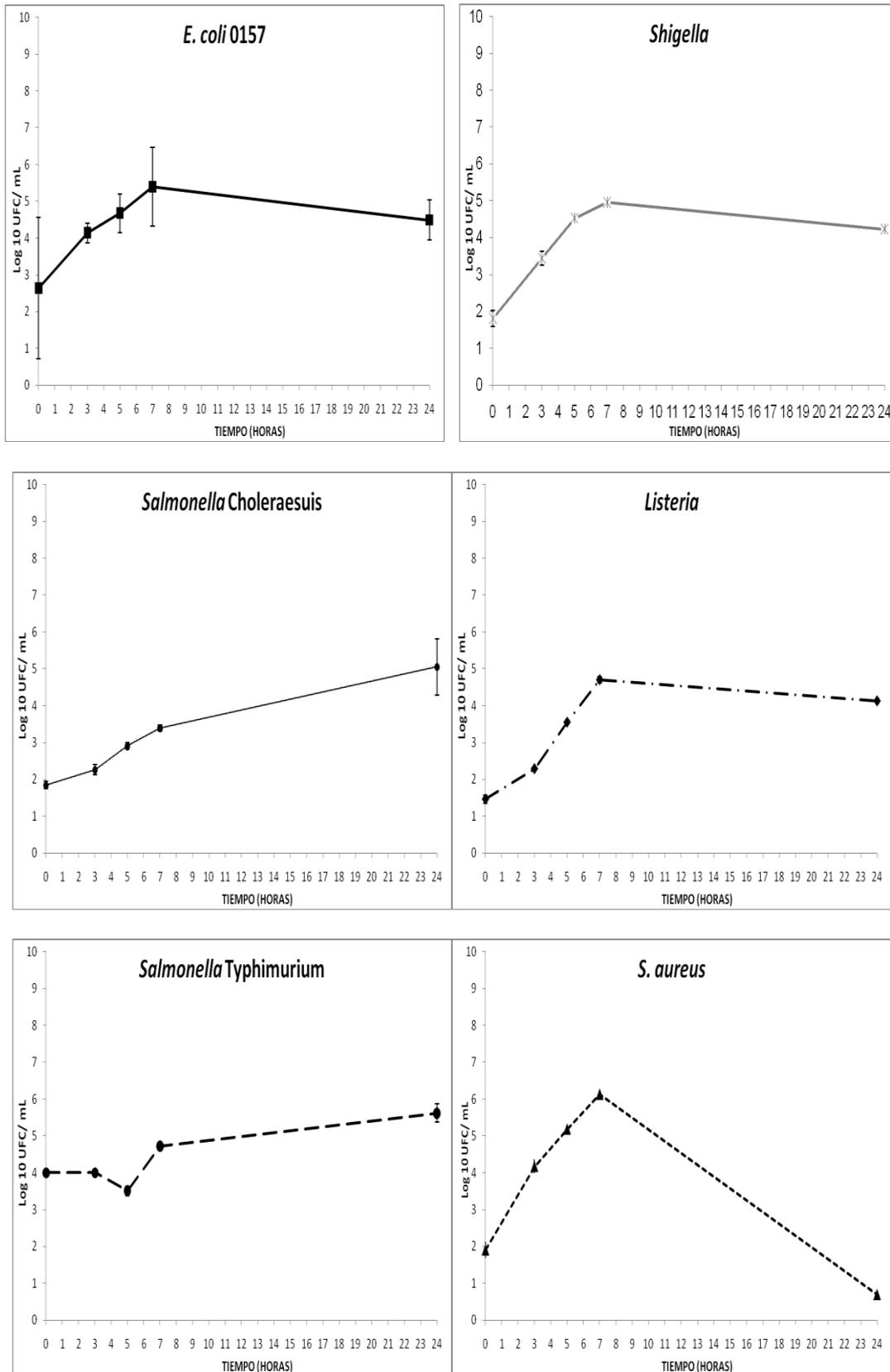


Figura 8.- Curvas de crecimiento de de los microorganismos durante las primeras 24 horas sin tratamiento termico.

Como se puede apreciar aunque todos los microorganismos se multiplicaron, estos presentan diferencias en la tasa de crecimiento. Es posible que estas diferencias se deben a las características propias de los microorganismos en cuestión tales como su diferente respuesta a las condiciones de la tortilla (pH, actividad acuosa, etc.) o del ambiente que la rodea (temperatura, concentración de oxígeno, etc.). Es sabido que el destino de los microorganismos en los alimentos depende de una diversidad de factores relacionados con la disponibilidad de nutrientes, el medio ambiente y los propios microorganismos. De hecho, es la interacción de estos factores lo que define su crecimiento. 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. Sin embargo, ninguno de los microorganismos patógenos estudiados se ha reportado que tengan el potencial para degradar el almidón o los carbohidratos complejos de las tortillas (Bergey's, 2001). Esto sugiere que los microorganismos están utilizando la poca glucosa libre presente en las tortillas para desarrollar, además de que puede 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 (Brackett,

1997). 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 recién elaboradas, ya que la concentración de la flora contaminante que pudiera competir con los patógenos de estudio, es muy baja.

En nuestro estudio, todos los patógenos fueron capaces de multiplicarse durante las primeras horas de almacenamiento de la tortilla a 24 °C; un comportamiento similar pero con otros microorganismos, ha sido reportado en la literatura. Capparelli y Mata, (1975) encontraron que en un estudio realizado en Guatemala se observó que la microflora de tortillas recién elaboradas incrementó su número a partir de las primeras 4 h alcanzando una concentración aproximada de 8 Log₁₀ UFC/g a las 24 h. Los organismos coliformes, *Bacillus* sp y *Streptococcus* sp también se multiplicaron alcanzando a las 24 h una concentración aproximada de 6.5 Log₁₀ UFC/g. En el mismo estudio se observó que cuando las tortillas se fortificaron con harina de soya y vitaminas el microorganismo mostró un desarrollo muy semejante al presentado en las tortillas no fortificadas. 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. 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 tortillas ordinarias con actividad hídrica de 0,97. (Peláez y Karel, 1980). En otros

estudios se ha logrado incrementar de manera significativa la vida de anaquel las tortillas con bajos niveles de sorbatos o propionatos añadidos a la masa con la que se elaboraba la tortilla y también por la adición de sorbatos en la superficie de la tortilla recién elaborada (Hickey et al., 1982). Más recientemente, se afirmó en EUA que la utilización de propionato de calcio puede prolongar de 2 a 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 este sector de la industria (Islam, 1984).

Nuestros resultados muestran el potencial que los patógenos *Escherichia coli* 0157: H7, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Choleraesuis, *Lysteria monocytogenes*, *Shigella flexneri* tienen para multiplicarse en la tortilla a temperatura ambiente (24°C). Las temperaturas a las cuales se observó multiplicación de los patógenos es semejante a la 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 para el desarrollo de todos los patógenos estudiados. Bajo esas condiciones es de esperar un mayor desarrollo de los microorganismos lo cual se reflejaría en incremento en la velocidad de desarrollo y mayor concentración celular alcanzada.

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, favorecería la multiplicación de las bacterias patógenas sobre la tortilla incrementándose el nivel de riesgo. En los restaurantes 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 patógenos desarrollarían alcanzando niveles importantes.

Además, cabe señalar que en las ciudades debido a la alta demanda de la tortilla que se presenta a la hora de la comida (aproximadamente a las 2 de la tarde), los productores comúnmente comienzan a producir la tortilla desde temprana hora (alrededor de las 8 de la mañana) y desde ese momento la almacenan en recipientes que mantienen la temperatura tal como las “hieleras”; que se mantienen a una temperatura alrededor de 35-40°C; la cual es cercana a la óptima de los patógenos entéricos como *Salmonella*. En estos recipientes la tortilla es almacenada hasta la hora “pico” de venta (2 de tarde). Si asumimos que un productor comienza a producir tortillas desde las 8 de la mañana y las contaminara con *Salmonella* por la falta de higiene y, posteriormente las almacenará en las hieleras para su venta posterior a las 2 de la tarde, las bacterias tendrían tiempo suficiente para poder incrementar su

concentración durante el almacenamiento de tal manera que a las 2 de la tarde se encontraría ya en una concentración de por lo menos 1×10^6 UFC/porción o área contaminada; concentración que está por arriba de la dosis mínima infectante (Frazier y Westhoff, 1998).

En consecuencia, si no se va a consumir la tortilla inmediatamente o dentro de las dos primeras horas de elaborada, por lo menos se debe refrigerar. Por otro lado, es evidente que la refrigeración no mejora la calidad sanitaria de la tortilla una vez contaminada. Generalmente una vez contaminado un alimento con microorganismos patógenos, durante su almacenamiento en refrigeración se presentará una lenta inactivación de los mismos, pudiendo incluso el alimento llegar a la descomposición y contener todavía una concentración alta de microorganismos patógenos (Fernández, 2000). Es poco probable que por la sola refrigeración se provoque una “auto-depuración” del alimento que asegure la inocuidad del producto. La sobrevivencia a bajas temperaturas se ha observado en muchos microorganismos patógenos como *Salmonella*, la cual, por ejemplo, después de 9 meses es posible aislarla a partir de carne de pollo cocinada y almacenada en congelación (Gunderson, 1948). Naturalmente, el tiempo de sobrevivencia en refrigeración o congelación va a depender del nivel de inóculo inicial, de las características del alimento y de las condiciones de almacenamiento (Frazier y Westhoff, 1998).

6.2. Estudio de inactivación de los microorganismos por calor

Es práctica común entre la población que las tortillas que no se consumen el mismo día de su preparación, son almacenadas principalmente bajo refrigeración para ser consumidas en los días siguientes. Previo a su consumo, estas tortillas almacenadas son recalentadas. En la actualidad con los avances tecnológicos que se están logrando en el mundo, pero principalmente en el país, cada vez es mucho más común el uso de un horno de microondas para calentar los alimentos. En el caso de las tortillas existen otras alternativas para su calentamiento en los llamados “comales” o planchas metálicas calientes. No obstante, el horno puede llegar a ser preferido por la gente debido a que el calentamiento resulta más fácil y práctico que en el “comal”, además de que las tortillas se pueden calentar en paquetes y no una por una, por lo cual también se ahorra tiempo.

El calentamiento que se aplica a las tortillas es con la finalidad de llevarlas a una temperatura adecuada para su consumo, y no con la finalidad de inactivar microorganismos.

Como pudimos observar en los estudios de comportamiento sobre la tortilla, existe probabilidad de que las tortillas se contaminen con microorganismos patógenos, como *Salmonella*, y es posible que estos se multipliquen sobre las tortillas, aun bajo condiciones de refrigeración. En base a esto, nos cuestionamos si debido a que el calentamiento de la tortilla no se aplica para inactivar microorganismos patógenos (para los consumidores, el objetivo es calentar la tortilla a una temperatura agradable, para que esta pueda ser consumida), estos podrían sobrevivir a tal tratamiento térmico.

Con la finalidad de tener más información al respecto, se diseñó un estudio para determinar si el calentamiento en comal y en horno de microondas eliminaba o inactiva a los microorganismos cuando previamente se habían multiplicado sobre las tortillas.

Para estos estudios de inactivación, se trató de simular una situación que es posible que ocurra en los hogares o restaurantes: dejar por descuido las tortillas (contaminadas) a temperatura ambiente alrededor de 7 horas y después refrigerarlas. Se evaluó si después del recalentamiento de las tortillas frías se inactivaban los patógenos.

En general, cuando las tortillas frías (5°C) se calentaron en el microondas los microorganismos mostraron diferentes curvas de inactivación (Figuras 9-13). Para estos estudios se monitoreó la inactivación de los microorganismos en tres zonas de la "pila" de tortillas: arriba en medio y abajo (tal como se explicó en la metodología). *L. monocytogenes* fue la cepa más sensible al tratamiento del microondas ya que desde los 45 segundos en las tortillas de en medio y las de abajo ya no se detectó al patógeno (Figura 12); todas las demás cepas sobrevivieron al tratamiento del microondas en los tres sitios de la pila examinados al menos hasta 60 s. Es importante mencionar que *S. Choleraesuis* mostró una alta termoresistencia y sobrevivió más de 90 s en cualquier posición de la pila de tortillas (Figura 13).

Es importante también mencionar que en la mayoría de los casos, la muerte de los patógenos fue más rápida cuando estos estaban en las tortillas de arriba de la pila que en cualquiera de las otras posiciones, hecho que refuerza el conocimiento de que el calentamiento de un alimento en microondas no es

homogéneo y nos da evidencias con ello de que este calentamiento no ha sido diseñado para matar o inactivar microorganismos patógenos transmitidos por alimentos.

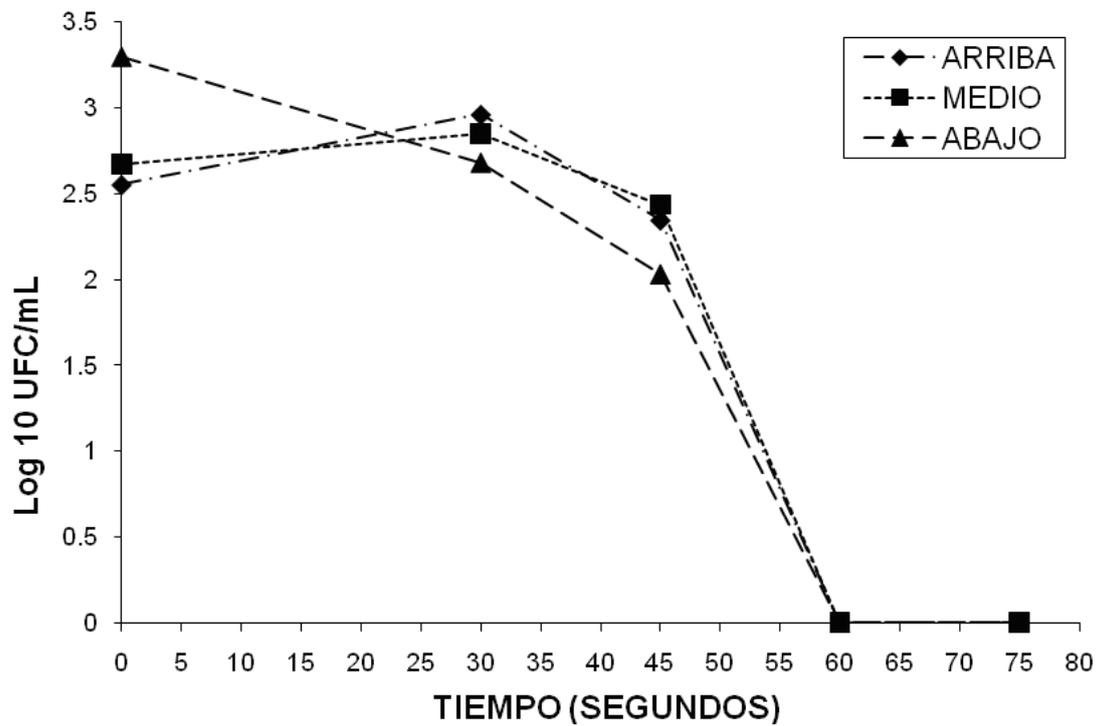


Figura 9: curvas de crecimiento de *E.coli* O157: H7 al efecto de calor producido por el horno de microondas

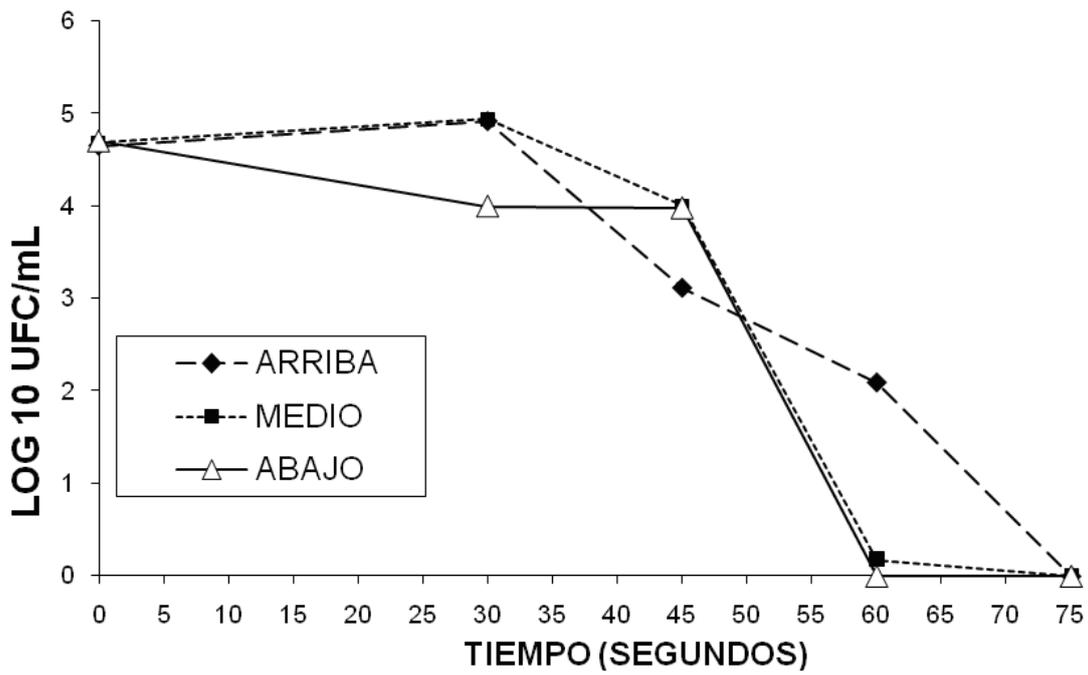


Figura 10: curvas de crecimiento de *S. Typhimurium* al efecto de calor producido por el horno de microondas

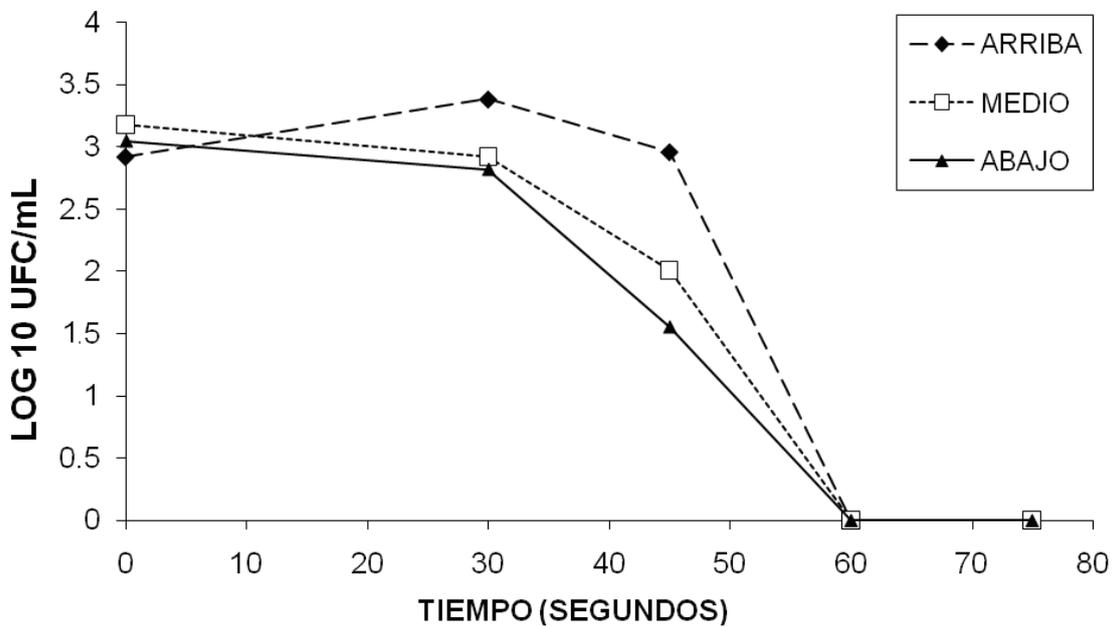


Figura 11: curvas de crecimiento de *S. aureus* ante el efecto de calor producido por el horno de microondas

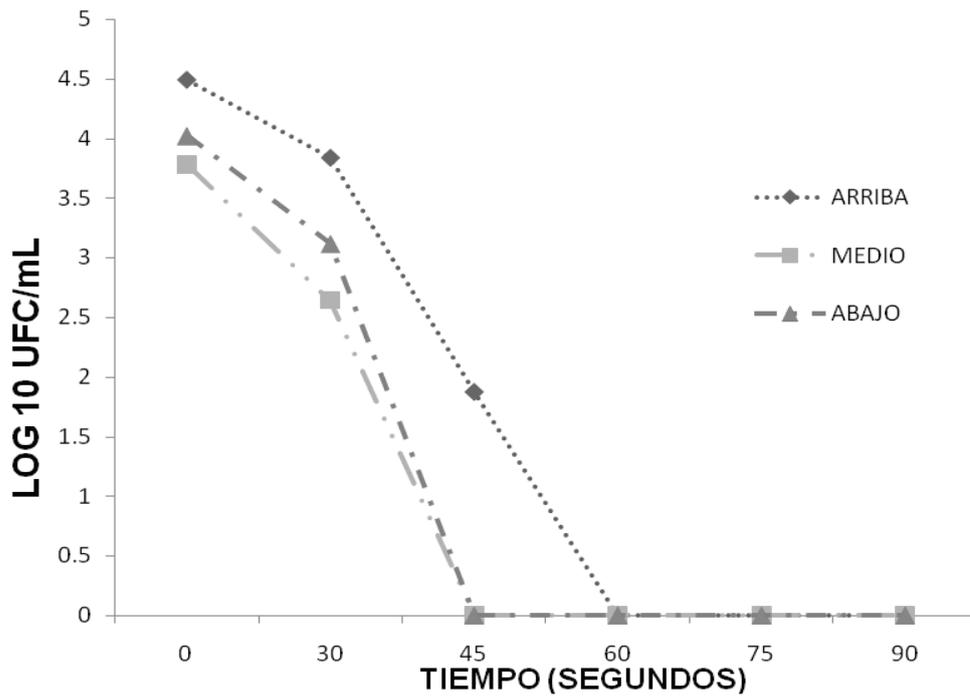


Figura 12: curvas de crecimiento de *L. monocytogenes* ante el efecto de calor producido por el horno de microondas

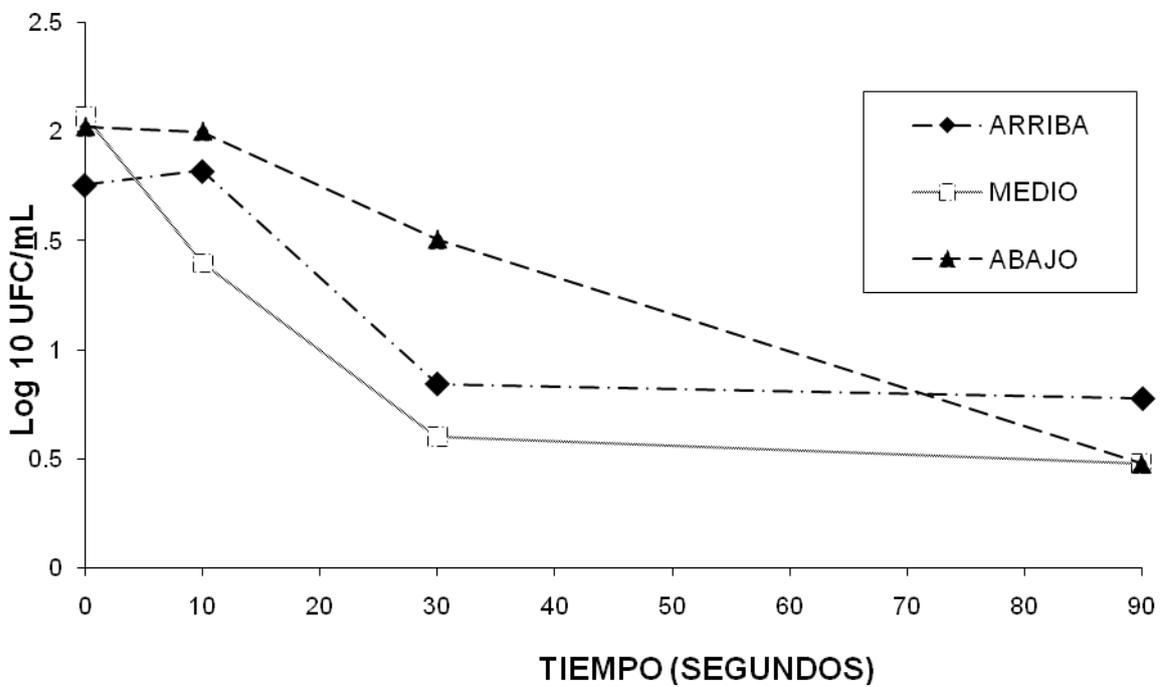


Figura 13: curvas de crecimiento de *S. Choleraesuis* ante el efecto de calor producido por el horno de microondas

Cabe señalar que a los 60 s de tratamiento en microondas, las tortillas alcanzaron una temperatura de entre 65-70°C, según la posición en la pila de tortillas (Figura 14); este incremento de temperatura se podría relacionar directamente con la inactivación de los microorganismos observada. Sin embargo, también en este tiempo se hicieron visibles daños en la textura de la tortilla, como resultado del calentamiento en microondas, afectándose de manera considerable la calidad sensorial de las tortillas. Debido al efecto sobre la textura de la tortilla que el sobrecalentamiento en microondas le provoca, por lo general, los consumidores no llevan hasta esta extremo el calentamiento. De tal manera que emplean menos de 60 s para calentar en promedio 10 tortillas en un microondas convencional; no obstante, como se ha observado en las gráficas correspondientes (Figuras 9-13) un calentamiento en microondas menos a 60 s no elimina la totalidad de microorganismos patógenos potencialmente presentes en la tortilla. En otras palabras, para el caso de 10 tortillas es necesario calentar por lo menos 60 s en microondas para eliminar los posibles peligros microbianos confiriéndole o alcanzando la inocuidad microbiana esperada en la tortilla.

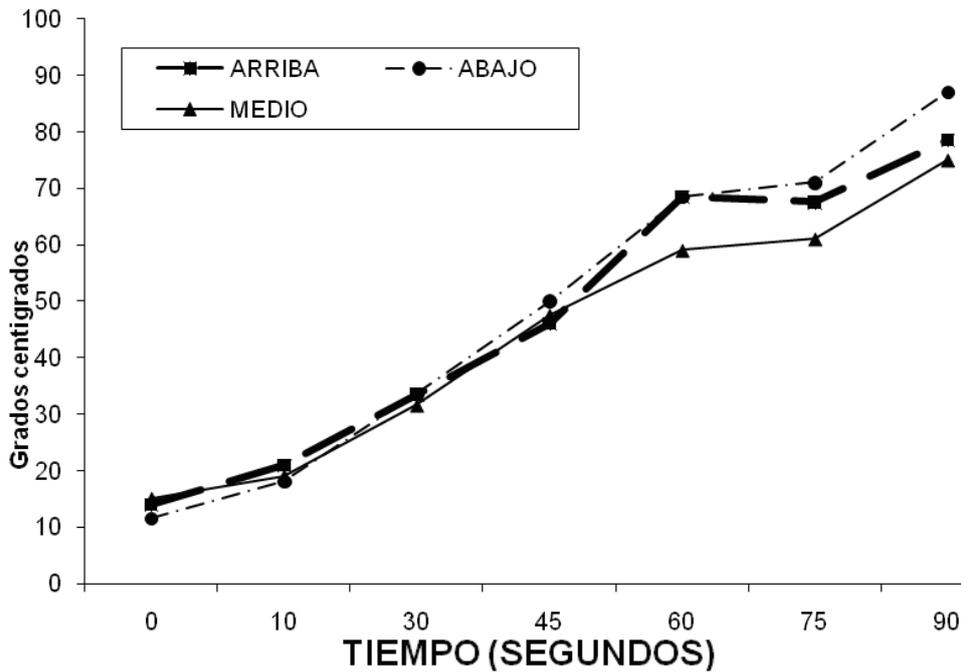


Figura 14: temperatura alcanzada por el horno de microondas durante cada uno de los tiempos a los cuales fueron sometidas las tortillas

Como se pudo apreciar por efecto del calor se presentaron curvas bifásicas o trifásicas de inactivación microbiana. Típicamente las gráficas de sobrevivencia de los microorganismos al calor aparecen como líneas rectas. En ocasiones el trazo es distinto y aparecen líneas cóncavas, convexas o curvas bifásicas, estas últimas, se observaron en nuestro estudio. Se cree que las curvas bifásicas son el resultado de una distribución no uniforme de células individuales con distinta termoresistencia; la gráfica representaría el comportamiento de poblaciones diferentes en ese carácter, dentro del mismo cultivo (Moatz, 1971). Hay que considerar, además, que cuando las células se encuentran en un alimento o adheridas y colonizando una superficie, la población en general puede ser más resistente. En un alimento sus

constituyentes podrían conferir diferentes grados de protección al microorganismo dependiendo de la región o alimento donde se encuentren; como resultado, se tendría una sobrevivencia mayor de los microorganismos. Para el caso de los microorganismos patógenos que se han multiplicado previamente en la tortilla es de esperar que en este proceso hayan colonizado las tortilla y es de esperar entonces que se obtengan curvas bifásicas o trifásicas.

Para el caso del calentamiento en comal únicamente se trabajó con dos microorganismos, la principal razón fue el tiempo con el que se contaba para concluir esta tesis. Debido a ello se determinó sólo trabajar con dos patógenos: *S. Typhimurium* y *E. coli* O157:H7. *S. Typhimurium* que se eligió por el hecho de que fue la bacteria que alcanzo un mayor numero de UFC cuando fue sometida en el horno de microondas, además de ser una bacteria que aunque su hábitat natural lo constituye el tracto digestivo de los animales y el hombre, su localización es, en realidad, potencialmente ubicua, habiendo sido aisladas prácticamente de cualquier tipo de sustrato. Resisten bien las condiciones habituales de humedad y de temperatura ambiente y son capaces, bajo determinadas situaciones, de crecer y desarrollarse fuera del organismo animal. *Salmonella* tiene importancia a nivel clínico por su capacidad de producir infecciones intestinales y/o sistémicas en el hombre y en los animales (salmonelosis). Su poder patógeno, así como su especificidad, dependen de las características de cada cepa en particular (mediñá, 2002).

Por otro lado, par el caso de *E. coli* O157:H7, de acuerdo con las últimas estadísticas presentadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS), entre

los principales patógenos involucrados en estas enfermedades se encuentran *Escherichia coli* O157:H7. La infección causada por *Escherichia coli* O157:H7 puede ser letal y está frecuentemente asociada a los más importantes y mejor documentados casos de enfermedades de transmisión alimentaria alrededor de todo el mundo (Doyle, 1999). Sin embargo, debido a que los métodos de detección no son usados ampliamente, este serotipo ha sido poco estudiado y existe un registro importante en cuanto a su asociación con patología en humanos (Samedpour y Liston, 1994)

Es importante mencionar que *L. monocytogenes* no fue utilizada debido a que su eliminación en el horno de microondas fue más rápida que en la de las otras dos cepas que fueron utilizadas (*Escherichia coli* O157:H7 y *S. Typhimurium*).

Se observó que cuando el calentamiento se realiza en comal los patógenos sólo sobrevivieron 20 s luego del contacto directo de la parte inoculada de la tortilla con el comal (Figuras 15-16). Además, a los 20 s de calentamiento en comal no se afectaron las características sensoriales ni de textura de la tortilla. Por otro lado, se pudo observar que bajo este tipo de calentamiento el incremento de la temperatura en la tortilla hasta alcanzar la temperatura letal para los microorganismos patógenos de estudio fue más rápido que el observado en el caso del calentamiento en el horno de microondas.

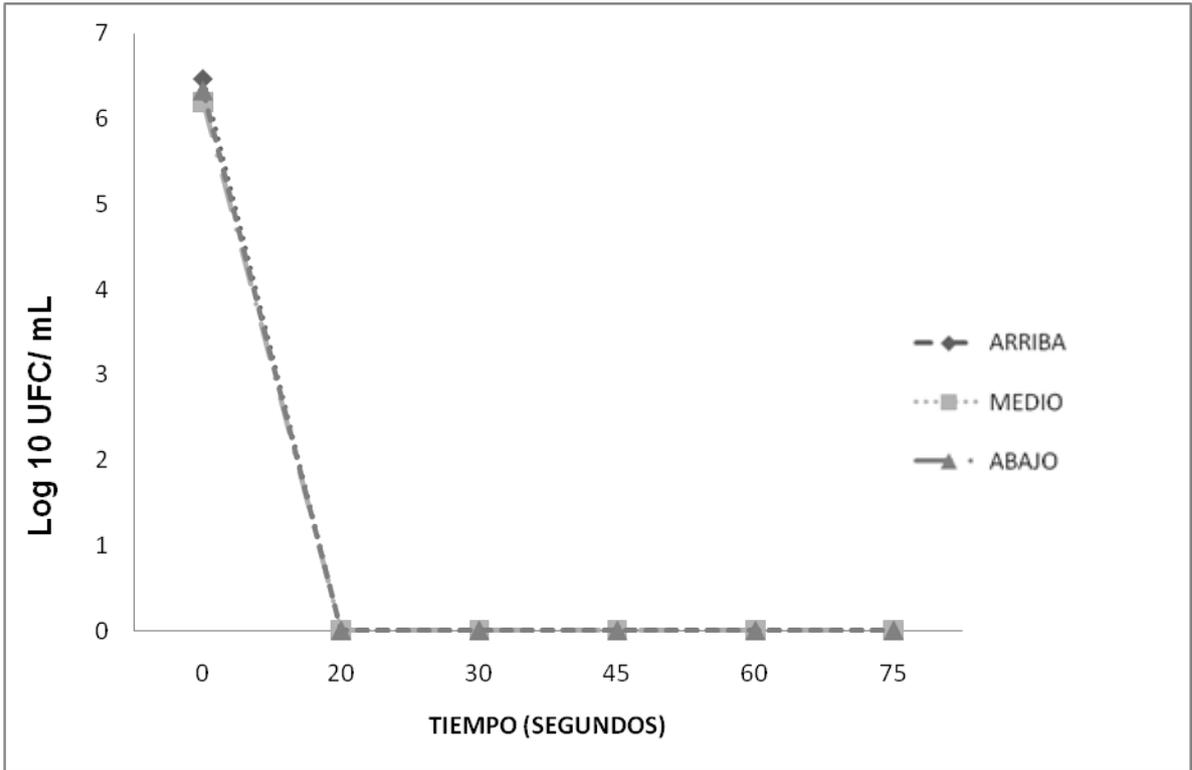


Figura 15: curva de crecimiento de *E.coli* O157: H7 al efecto de calor producido por un “comal” sometido a la flama producida por una estufa de gas

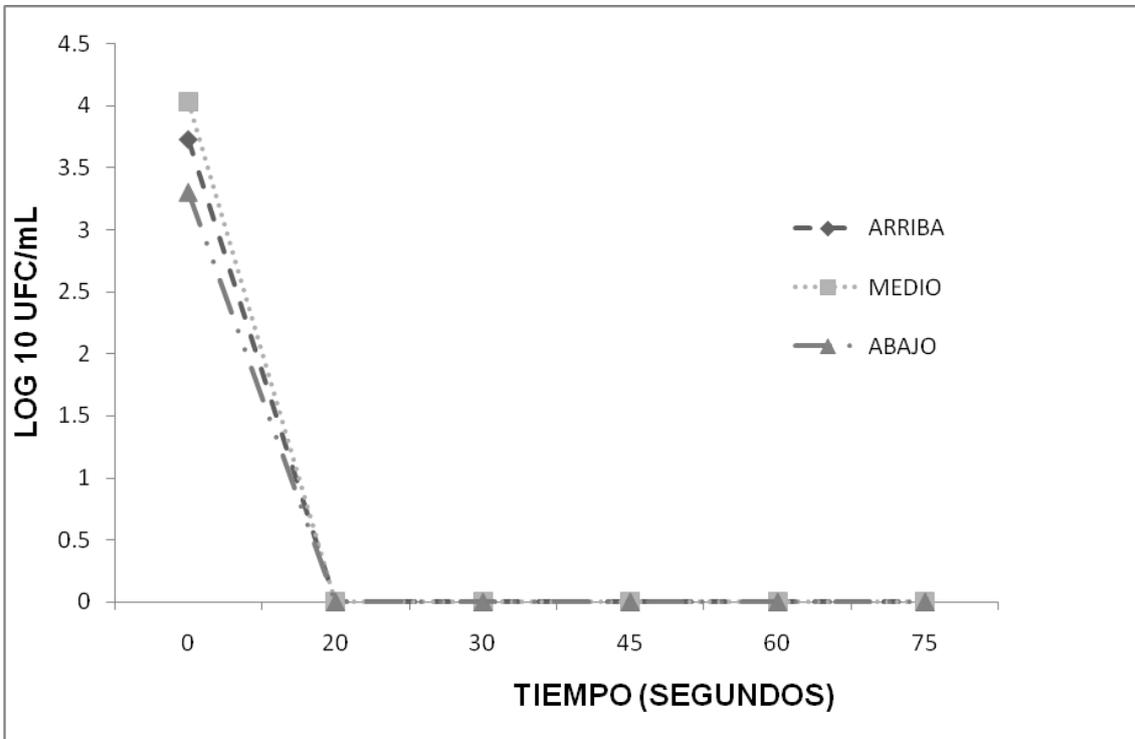


Figura 16: curva de crecimiento de *S. Typhimurium* al efecto de calor producido por un “comal” sometido a la flama producida por una estufa de gas

Estos resultados muestran que el calentamiento de la tortilla en comal es más efectivo para matar en menos tiempo a los microorganismos patógenos presentes en tortilla que el calentamiento en horno de microondas, ya que este alcanza temperatura mas elevadas en menor tiempo (Figura 17). Una razón por lo cual ocurre esto, es por que el “comal” requiere un precalentamiento, lo cual ocasiona que cuando la tortilla se ponga sobre este, inmediatamente reciba calor, a diferencia en el horno de microondas no hay un precalentamiento del horno el calentamiento de la tortilla comienza con el inicio del funcionamiento del horno. También se debe considerar que en el calentamiento en comal, las tortillas se exponen directamente una por una con el comal caliente lo cual hace que también los microorganismos tengan un contacto directo con la superficie caliente. A diferencia, en el horno de microondas, las tortillas son introducidas en “paquetes” o “apiladas”, lo cual provocaría que el calentamiento no sea homogéneo ya que las ondas generadas por el equipo (responsables del calentamiento) no impactan de manera homogénea en todas las tortillas.

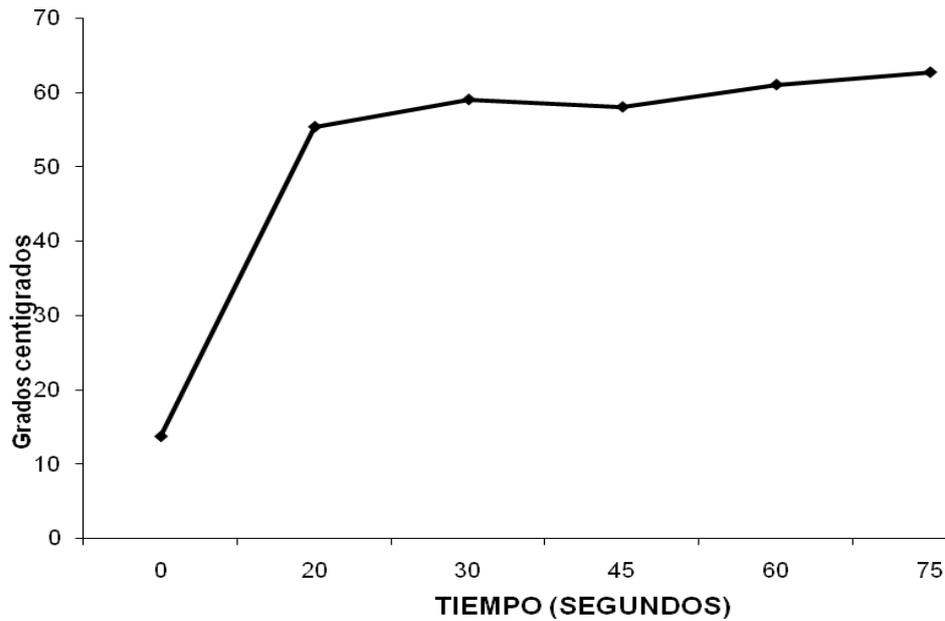


Figura17: temperaturas alcanzadas por el comal durante cada uno de los tiempos a los que fueron expuestas las tortillas.

Los resultados evidencian que el calentamiento en microondas, como comúnmente se efectúa en los hogares, no es un método que asegure la eliminación de los patógenos microbianos. La eliminación se podría alcanzar con este tratamiento sacrificando la calidad sensorial del alimento. A diferencia la eliminación de los patógenos si se puede alcanzar con un calentamiento en comal.

Es necesario enfatizar que con el propósito de disminuir riesgos a la salud por consumo de tortillas frescas o recién elaboradas, es pertinente subrayar la importancia de manipularlas bajo condiciones adecuadas de higiene durante su producción, comercialización y en los hogares. Además es importante no dejar más de 2 h las tortillas a temperatura ambiente, ya que como quedo evidenciado, los microorganismos contaminantes entran fácilmente en

actividad. A la postre pueden alcanzar niveles muy elevados superiores o iguales a sus dosis mínimas infectantes.

En nuestro país, anualmente se reportan numerosos casos de enfermedades diarreicas ya sea por *Salmonella* ssp u otros enteropatógenos, así como también numerosos casos de fiebre tifoidea por *S. Typhi* (Fernández, 1981; Gutiérrez, 1994). A diferencia de los restantes miembros del género *Salmonella*, *S. typhi* es un patógeno que en condiciones naturales no afecta a los animales. Esta especie de *Salmonella*, exhibe una mayor virulencia que las salmonelas zoonóticas. Su presencia en cualquier alimento y en especial en los vegetales constituye un riesgo especialmente preocupante.

Además de las bacterias, otros agentes patógenos como los parásitos podrían llegar a las tortillas. Aunque incapaces de multiplicarse en las tortillas constituyen un riesgo de consideración; por ejemplo un sólo huevecillo de *Taenia solium* basta para provocar cisticercosis cerebral en un individuo (Instituto nacional de diagnóstico y referencia epidemiológicos 1991). Las fuentes de contaminación de las tortillas con huevecillos de parásitos principalmente sería el humano ya sea por actuar como fuente de contaminación directa ó como vehículo activo en los mecanismos de contaminación cruzada. La elevada tasa de portadores de bacterias patógenas y parásitos en México da soporte a esa posibilidad.

Finalmente, al parecer la tortilla de maíz puede ser un alimento de riesgo para la población; riesgo que hasta ahora no había sido considerado. Es necesario implementar medidas adecuadas de higiene durante la elaboración y venta de las tortillas, así como también, es recomendable que los consumidores

recalienten las tortillas antes de ser consumidas independientemente de si están recién hechas o no.

7. CONCLUSIONES

1.- Todos los microorganismos patógenos estudiados fueron capaces de multiplicarse durante las primeras 7 horas alcanzando una concentración de aproximadamente 1×10^5 UFC/ tortilla en este período.

2.- Cuatro de los 5 microorganismos patógenos sobrevivieron hasta 60 s en tortillas sometidas al calentamiento con el horno de microondas; el microorganismo más sensible fue *L. monocytogenes* y el más resistente fue *S. Choleraesuis*.

3.- *E. coli* O157:H7 y *S. Typhimurium* fueron inactivados en 20 s de calentamiento de las tortillas en comal.

4. A los tiempos de calentamiento que se logró eliminar a los microorganismos patógenos de la tortilla cuando estas se calentaron con el horno de microondas se afectó la textura y apariencia sensorial de la tortilla, cosa que no ocurrió cuando el calentamiento se efectuó en el comal.

5.- El calentamiento de la tortilla en comal resultó más efectivo en la eliminación de microorganismos patógenos que el calentamiento en horno de microondas.

8. REFERENCIAS

- 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.
- Agosto, W., (1976). Microwave power, IEE Spectr. 7:24-25
- Akingbala, J.O. and L.W. Rooney. 1987. Paste properties of sorghum flour and starches. J. Food Proc. And Preservation. Food chemistry 11:13-24.
- Aleixo D, B Swaminathan, K Jamersen, D Pratt. Destruction of pathogenic bacteria in turkeys roasted in microwave ovens. J Food Sci. 1985;50: 873-880.
- Arias ML, Monge R, Chaves C, Antillón F., 2001. Effect of storage temperatures on growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 inoculated in foods from a neotropical environment. Rev Biol Trop. 49(2): 517-524
- Atkins, P. W., (1984) Physical Chemistry 2nd. Oxford University p. 31-34
- Assinder, Y., (1983). Microwaves for food processing trans. IMPI 2: 77-89
- Bedrosain, K., (1984). The necessary ingredients for successful microwave applications. J. Microw. power 8:173-178
- Benenson, A. El control de las enfermedades transmisibles en el hombre. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 1992
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2001 Ed. GM Garrity.
- Brackett E. R. Fruits, Vegetables, and Grains. En : Doyle, P. M., Beuchat. L. R. and Montuile. J. T., 1997. Food Microbiology Fundamentals and Fronters. ASM-Press, Washington D.C.
- Brenner, F. W. 1998. Modified Kauffmann-White scheme. Centers for Disease

- Control and Prevention, Atlanta, Ga.
- Brenner, F. W., and A. C. McWhorter-Murlin. 1998. Identification and serotyping of *Salmonella*. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Ga.
- Brenner, F. W., R. G. Villar, F. J. Angulo, R. Tauxe, and B. Swaminathan. 2000. *Salmonella* Nomenclatura. *Journal of Clinical Microbiology*. 38 (7): 2465–2467.
- Bressani, R., Paz, R. P. y Scrimshaw, N. S. 1958 Chemical Changes in Corn during preparation of tortillas. *Agric. Food Chem.* 6: 770-774.
- Buono M, F Niroomand, Y Fung, L Erickson. Destruction of indigenous *Bacillus* spores in soymilk by heat. *J Food Prot.* 1989;52: 825-826.
- Capparelli y Mata 1975. Microflora of Maize Prepared as Tortillas
www.cs.urjc.es/alumnos/carreras/asignaturas/4409.htm - 14k
- CDC. Division of Bacterial and Mycotic Diseases. Preventing Foodborne Illness: *Escherichia coli* O157:H7. 1996
- Cruz Huerta E., Verdalet Guzman İ., Tortillas de maiz: una tradicion muy nutritiva. *Revista de divulgacion cientifica y tecnologica de la universidad veracruzana.* Volumen XX, No. 3
- Dealler R, R Lacey. Microwave reheating of convenience meals. *British Food J.* 1990;92: 19-22.
- 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.
- Doyle M. (1999) *Escherichia coli* O157:H7 and its significance in foods. *Int J Food Microb.* 12: 299-302

- Estrada Hernandez A. (2008) frecuencia y comportamiento de Microorganismos indicadores de higiene y *Salmonella* en tortilla de maíz. Tesis de licenciatura. Area academica de quimica. Pachuca Hidalgo. P.p. 55
- Farber J, J Aoust, M Diotte, A Sewell, E Daley. (1998) Survival of *Listeria* spp. on raw whole chickens cooked in microwave ovens. J Food Prot. 61: 1465-1469.
- Fernández, Escartín E., (2000.) Microbiología e inocuidad de los alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro
- Figueroa Cardenas J. D. D. 2004 "La cultura del maíz", CINVESTAV, Queretaro, <http://www.maiztortilla.com/es/introduccion/pasado.htm>
- Frazier, W.C. and Westhoff, D.C. (1998) Food Microbiology. 4th Ed. McGraw-Hill Book Co
- 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.
- Gunderson, M. F. and Rose, K. D. 1948. Survival of bacteria in a precooked, fresh frozen food. Food Res. 13 : 254-263.
- Gutiérrez Cogco, L., Gonzalez Bonilla, C., Giono Cerezo, S. y G. Beltran, L. 1994. Principales Serotipos de *Salmonella* Identificados en 10703 cepas en México entre 1982 y 1993. Rev. Lat.-Amer.Microbiol. 36 : 221-226
- Hichey, 1979. Sensory Attributes of Corn Tortillas with Substitutions of Potatoes http://www.aplegal.com/officialgazette/archive/20041130_RC.pdf
- Institute of Food Technologists. News release on E. coli O157:H7, Sept. 25, 1997

- Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. 1991. Teniasis y Cisticercosis por *Taenia solium*. Publ. Tec. No. 4. México
- Islam, 1984. Protein quality of maize and tortillas, www.jornada.unam.mx/2005/01/17/007n1sec.html - 14k
- Kaspar, C.W. and Tamplin, M.L. 1993. Effects of temperature and salinity on the survival of *Vibrio vulnificus* in seawater and shellfish. *App. Environ. Microbiol.* 59: 2425-2429.
- Lin W, C Sawyer. Bacterial survival and thermal responses of beef loaf after microwave processing. *Int. Microw. Power Inst.* 1988;23:183-194.
- Martínez, R. R. 1979. Las aflatoxinas en las tortillas. *Vet. Mex.*, 10: 37-44
- Mediñá. C., 2002. Riesgos de contaminación en materias primas y piensos, ganadería, ISSN 1695-1123, N° 18, P. 46-50, http://www.mapa.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf_Ganad/Ganad_2002_18_46_50.pdf
- Méndez Albores A., Moreno Martinez E., "Aflatoxinas en las tortillas de maíz". *Revista Ciencia y Desarrollo*, Agosto 2007, vol. 33, no. 210, p. 14-19, ISSN: 0185-0008
- Moatz, W.A. 1971 Kinetics of thermal death of Bacteria. *J. Bacteriol.* 105:165-171.
- Mossel D.A.A. y Moreno Garcia B. 1982. *Microbiología de los alimentos*. Ed. Acribia S.A. España.
- Morehouse, L.G. and Wedman. E. E. 1961. *Salmonella and other disease. Producing organism in animal by products: a survey*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 139; 989-995.

- Paredes López, O. y Saharópolos Paredes, M. E. 1983, Maíze. A review or tortilla production technology. *Bakers Digest*. Sep 16-25.
- Pascual Anderson Ma. R., Calderon Pascual V., 2000, *Microbiología alimentaria, Metodología analítica para alimentos y bebidas*. 2ª edición, Madrid. Ed. Diaz de Santos. p.p. 417
- Popoff, M. Y., and L. Le Minor. 1997. Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars, 7th revision. World Health Organization Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Pasteur Institute, Paris, France.
- Popoff, M. Y., J. Bockemuhl, and F. W. Brenner. 2000. Supplement 1998 (no. 42) to the Kauffmann-White scheme. *Res. Microbiol.* 151:63–65.
- Price, R. L., Jorgensen, K. V. 1985. "Effects of Processing on Aflatoxin Levels and on Mutagenic Potential of Tortillas Made From Naturally Contaminated. *Journal of Food science*
- Reyes, C.P. 1990. *El maíz y su cultivo*. Edit AGT Editor S.A. Primera Edición, México, D.F.
- 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.
- Rosenberg U, W Bogl. 1987. Microwave pasteurization, sterilization, blanching and pest control in the food industry. *Food Technol.* 41: 92-99.
- Rosso, L., Bajard, S., Flandrois, J.P. Lahellec, C., Fournaud, J. y Veit, P., 1996. Differential growth of *Listeria monocytogenes* at 4 and 8°C: consequences for the self life of chilled products. *J. Food Prot.* 59:944-949

- Ryser, E.T., and Marth, E.H., 1991 *Listerias*, Listeriosis and food Safety. Marcel Dekker, Inc. N.Y.
- Samedpour M, JE, Liston J., 1994 Occurrence of Shiga-like toxin producing *Escherichia coli* in retail fresh sea food, beef, lamb, pork and poultry from grocery stores in Seattle, Washington. *Appl Environ Microbiol*; 60: 1038-40.
- Serna Saldívar, S. O., Cannet, R., Vargas, J., González, M., Bedolla, S., y Medina, C. 1988. 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
- 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.
- Sierra M., M., 2007. Comportamiento de híbridos de maíz con alta calidad de proteína, por su buen rendimiento y tolerancia al "Achaparramiento". *Agronomía mesoamericana*. 18 (1): 27-35
- U.S. Food and Drug Administration. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins 1992
- 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.
- Vivas 1988. Effect of the components of maize on the quality of masa and tortillas during the traditional nixtamalisation process. www.cnmaiz.org.mx/industria.

World Health Organization. Foodborne diseases- possibly 350 times more frequent than reported. World Health Organization, Geneva, 1997.

9. ANEXO

MATERIAL DE LABORATORIO

- Agitador de vidrio
- Asas bacteriológicas
- Bolsas de polietileno de 20 x 30 cm y 10 x 15 cm
- Cajas petri desechable.
- Cuchillo estéril
- Espátula
- Gradilla
- Matraces enlermeyer 2000 ml
- Micropipetas (5-50 μ l) (100-1000 μ l)
- Mechero
- Probeta 100 y 1000 ml
- Puntas para micropipetas estériles
- Tubos de ensaye con tapón de rosca
- Vasos precipitados de 150, 250 y 1000 ml
- Pinzas de disección

MEDIOS DE CULTIVO

Todos los medios de cultivo fueron de marca Bioxon, México

- Agar métodos estándar
- Agar soya tripticasa
- Caldo soya tripticaseína
- Peptona de caseína

-
-
- Agar Base Sangre (ABS)
 - Agar Métodos Estándar (AME)
 - Agar Sulfito Bismuto (ASB)
 - Agar Soya Trypticaseina (AST)
 - Agar Eosina azul de metileno (EMB)
 - Agar Verde Brillante (AVB)
 - Caldo Soya Trypticaseina (CST)
 - Peptona de caseína

REACTIVOS

- Agua destilada

EQUIPO

- Autoclave (Yamato Sterilizer SM 200)
- Balanza analítica (Adventurer Pro AV412)
- Cuenta colonias (American Optical Québec)
- Incubadora bacteriológica (Blue M)
- Parrilla de calentamiento
- Refrigerador (Lab-line Environeers Inc)
- Vortex-Genie 2 (Scientific Industries)
- Termómetros
- Horno de microondas de 2450 MHz (samsung MW1235WB)
- “comal” de 25 cm de diámetro y 3mm de grosor
- Parrilla de gas
- Centrifuga (HERMLE Z 323 K)