



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
HIDALGO**

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERIA

AREA ACADEMICA DE QUIMICA

CENTRO DE INVESTIGACIONES QUIMICAS

***“FRECUENCIA Y COMPORTAMIENTO DE MICROORGANISMOS
INDICADORES DE HIGIENE Y SALMONELLA EN TORTILLA”***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA:

ALEJANDRO ESTRADA HERNÁNDEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. JAVIER CASTRO ROSAS



AGRADECIMIENTOS

A Dios

Por darme fuerzas, paciencia y salud para salir adelante.

Dr. Javier

Por sus conocimientos y tiempo dedicado a esta tesis y sobre todo por enseñarme que cuando uno se entrega a su vocación nada se percibe como trabajo.

A mis padres

Por su cariño, confianza y consejos y el gran apoyo que me brindaron, los quiero mucho.

Alejandro

I. Índice

	Página
I. Introducción	1
II. Antecedentes	3
2.1 Historia de la tortilla	3
2.1.1 Composición	3
2.1.2 Proceso de elaboración	3
2.1.3 Producción	7
2.2 Micología de la tortilla	8
2.3 Microorganismos patógenos encontrados en semillas	9
2.4 Microorganismos indicadores de higiene	10
2.4.1 Coliformes totales	10
2.4.2 Coliformes fecales	11
2.5 <i>Escherichia coli</i>	12
2.6 <i>Salmonella</i>	13
2.6.1 Presencia en alimentos	16
III. Justificación	19
IV. Objetivos	21
4.1 Objetivo general	21
4.2 Objetivos particulares	21
V Metodología	22
5.1 Frecuencia de <i>Salmonella</i> , <i>E. coli</i> y coliformes en tortilla	22
5.1.1 Recolección de muestras	22
5.2 Análisis microbiológico	22
5.2.1 Preparación de la muestra	22

5.2.2	Recuento de bacterias mesofilas aerobias	23
5.2.3	Recuento de organismos coliformes	23
5.2.4	Cuantificación de <i>E.coli</i>	23
5.2.5	Determinación de <i>Salmonella</i>	24
5.3	Comportamiento de <i>Salmonella</i> y <i>E. coli</i> en tortillas recién elaboradas	25
5.3.1	Cepas	25
4.3.2	Inoculación de la tortilla y monitoreo de los microorganismos	25
5.4	Determinación de la cinética de incremento de temperatura de tortillas calentadas en microondas	26
VI.	Resultados y discusión	27
6.1	Incidencia de coliformes totales (OC), <i>E. coli</i> y <i>Salmonella</i> en tortilla recién elaboradas.	27
6.2	Comportamiento de <i>Salmonella</i> y <i>E. coli</i> en tortillas recién elaboradas.	33
6.3	Incremento de temperatura de tortillas re-calentadas en microondas	40
VII.	Conclusiones	46
VIII.	Bibliografía	47
IX.	Anexos	54

I.- INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) son una causa importante de morbilidad en todos los países. Tradicionalmente, los alimentos que con mayor frecuencia se involucran en brotes de ETAs son los de origen animal (cárnicos o lácteos). Sin embargo, existen muchos tipos de alimentos cuya participación en brotes se desconoce. Es común observar en los reportes que mensual o anualmente emiten los países, tablas de los brotes por alimento, en donde se incluye un renglón en el que un porcentaje importante de los brotes se produjo por alimentos desconocidos. Esta falta de información puede ser debido a varios factores tales como la falta de una cultura para el estudio epidemiológico de los brotes, falta de presupuesto para la investigación de los brotes, alimentos consumidos solo en una región, entre otros.

En México existe una gran variedad de alimentos y bebidas que son producidos y consumidos en los diferentes estados de la república mexicana. Algunos de estos alimentos son producidos en varios estados y se han vuelto representativos de toda una región. Es el caso de la tortilla.

Se ha reportado que actualmente en México se consumen 19.7 millones de toneladas de tortillas al año. No obstante, 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 tecnificación del proceso de producción y manejo higiénico de este producto. Más aun, prácticamente no existe información publicada en revista científicas sobre diferentes aspectos de la tortilla como por ejemplo, calidad, deterioro, higiene e inocuidad. Así por

ejemplo, no se conoce cual es la frecuencia de microorganismos patógenos en la tortilla, ni qué tipo de microorganismos se pueden encontrar asociados a esta, ni su comportamiento en la tortilla, ni hay registros de brotes asociados a su consumo.

Es evidente la urgente necesidad de generar información científica que contribuya a solucionar la problemática relacionada con la tortilla

Por tal motivo, el objetivo de este trabajo fue determinar la frecuencia y comportamiento de microorganismos indicadores de higiene y salmonella en tortilla.

II. Antecedentes

2.1 Historia de la tortilla

La primera tortilla se preparó para satisfacer a un antiguo rey Maya. En el año 10,000 AC, un humilde trabajador inventó la tortilla para satisfacer el hambre de su rey. La primera tortilla se preparó combinando maíz fresco con granos secos (Bárcenas, 2005).

Tres mil años más tarde, en 7,000 AC, los residentes del Valle de Tehauacán empezaron a usar recipientes hechos de piedra para hervir el maíz que crecía salvaje a sus alrededores y lo incluyeron como ingrediente principal de la tortilla. Aproximadamente 1,000 años después, estos mismos Mayas empezaron el cultivo formal del maíz (Bárcenas, 2005).

Los españoles le pusieron "tortilla" a los pequeños círculos de maíz que formaban la base de la comida indígena porque le encontraron un parecido en forma a la tortilla española. Pero la similitud termina allí, ya que la tortilla española es preparada a base de papa. (Bárcenas, 2005).

2.1.1 Composición

La tortilla esta compuesta por una gran cantidad de minerales los cuales se encuentran en diferentes proporciones dependiendo de que tipo de proceso se lleve a cabo para obtenerla (Tabla 1). Por lo cual en la siguiente tabla se puede observar que se tiene una mayor cantidad de minerales utilizándose un proceso industrial que usando uno casero (Bressani y col, 1990).

2.1.2 Proceso de elaboración

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)).

Tabla 1: Composición de minerales según tipo de tortilla de maíz

Producto	P	K	Ca	Mg	Na	Fe	Cu	Mn	Zn
Maíz en bruto	300	325	48	108	54	4,8	1,3	1,0	4,6
Tortilla casera 1	309	273	217	123	71	7,0	2,0	1,0	5,4
Tortilla casera 2	-	-	202	-	-	2,7	0,3	-	3,4
Tortilla casera 3	294	-	104	72	-	3,5	1,3	-	4,6
Tortilla industrial 1	315	-	182	106	-	4,0	2,5	-	3,2
Tortilla industrial 2	240	142	198	60	2	1,2	0,17	0,41	1,2
Tortilla industrial 3	269	185	205	63	9	1,5	0,19	0,40	1,1

Fuentes: Bressani y col, 1990.

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 Saldívar 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).

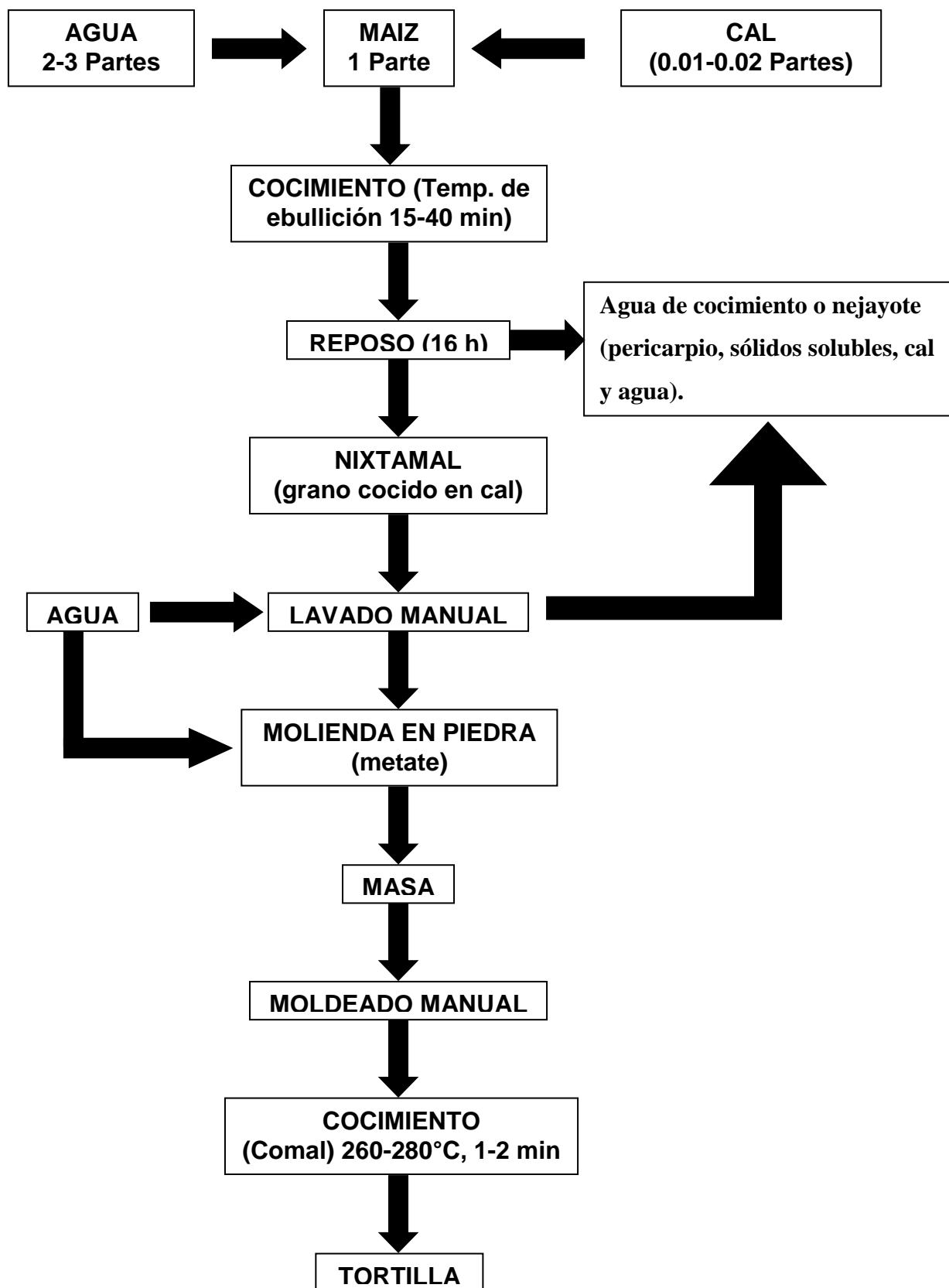


FIGURA 1: Diagrama de flujo del proceso tradicional para la elaboración de tortillas (Serna-Saldívar y col., 1990).

2.1.3 Producción

Hoy en día se estima que 630 millones de tortillas son consumidas todos los días alrededor del mundo, en México se consumen diariamente 300 millones de tortillas de maíz contra sólo 60 millones de harina de trigo. Y lo que empezó como un intento para complacer a un rey ha terminado como un elemento integral de la rica cultura Hispana. La tortilla ahora forma parte de la vida cotidiana de no sólo los hispanos sino de diversas culturas alrededor del mundo (Cámara, 2007).

La industria de harina de maíz nixtamalizado inició actividades en el año de 1948, con el establecimiento de una pequeña fábrica de 12 mil toneladas anuales en Cerralvo Nuevo León. Esto con la idea de facilitar la elaboración de la tortilla., evitar que el ama de casa tuviera que hacer y moler el nixtamal diariamente. Actualmente, la harina de maíz es la base para la fabricación de los diversos alimentos tradicionales mexicanos, es clave para la producción económica de la tortilla, con apego a las disposiciones y normas ecológicas, para un procesamiento ágil e higiénico y con una comercialización amplia, dadas su estabilidad y durabilidad en almacenamiento. Este proceso para la transformación económica del maíz en masa de nixtamal, mediante una industrialización integrada y controlada, nació en México con la intención de satisfacer la creciente demanda de tortilla en las zonas urbanas, para preservar las formas y sabores tradicionales y lograr eficiencia y beneficios en higiene y ecología, que se repercuten en precio y calidad en beneficio del consumidor final (Fregoso, 2005).

2.2 Micología 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 dada su importancia como productores de micotoxinas, tales como la aflatoxina. 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 al 20% de las muestras recolectadas en primavera y en la estación lluviosa contenían aflatoxinas. La concentraciones de la aflatoxinas 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), reportó que la cocción del maíz en agua de cal disminuía las concentraciones de aflatoxinas entre un 50 a 75%.

Según Martínez (1979) concentraciones de cal de hasta 10% no resulta más eficaz que una del 2% para disminuir las aflatoxinas. Un estudio realizado en la UNAM, 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. 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). Dichos autores hallaron que la acidificación tal como sucede en el tracto intestinal aumentaba los niveles de aflatoxinas. (Campos y col. (1980), 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 y col., 1988). Los

investigadores encontraron reducciones importantes, el porcentaje de reducción varió entre 58 y 100 % de reducción para zearalenona, y entre el 72 y 82% para el DON; además, se destruyó completamente el 15-acetil-DON (Abbas y col., 1988).

Se han elaborado tortillas con otros 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 y col., 1988).

Otros estudios comprenden el uso de mezclas de harina de tortilla y arroz, y de harina de tortilla 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 (Akingbala y Rooney., 1987). También se han empleado mezclas de maíz germinado ya que se sabe que la germinación aumenta la lisina (Akingbala y Rooney., 1987).

2.3 Microorganismos patógenos encontrados en semillas

Maíz: existen pocos estudios sobre la microbiología del maíz, pero al igual que el trigo, se asocia frecuentemente con la presencia de hongos tales como *Aspergillus* u otros deterioradores de tortilla. No se han encontrado brotes de etiología microbiana asociados a el consumo de tortilla, sin embargo el crecimiento de microorganismos deterioradores provocan mal olor, sabor y perdida de la textura de la misma (Roigé,2005).

Trigo: los microorganismos patógenos más encontrados en éste grano son los hongos tales como *Aspergillus niger* o *parasiticum* los cuales pueden desarrollar en las semillas y producir aflatoxina; esto ocurre con los granos

dañados mecánicamente cuyo germen (parte bioquímicamente más rica), es el mejor punto de partida para el crecimiento de mohos. La pérdida de la capacidad germinativa de los granos y el aumento de acidez grasa durante el almacenamiento, están directamente relacionadas con el desarrollo de hongos sobre los granos. Las lipasas fúngicas producidas por hongos de campo o durante el prealmacenamiento, por el género *Penicilium* son capaces de producir una lenta acidificación de granos y harinas (Roigé, 2005).

2.4 Microorganismos indicadores de higiene

Los microorganismos indicadores se emplean como apoyo para evaluar la higiene de los alimentos; dan una idea de las condiciones higiénicas bajo las cuales se ha elaborado un alimento. La presencia en los alimentos de algunos como *E. coli*, sugiere que el alimento se contaminó con heces fecales (Fernández, 2000). Los grupos microbianos indicadores de mayor uso en los alimentos son: bacterias mesófilas aerobias, organismos coliformes totales, coliformes termotolerantes (fecales), *E. coli*, *Enterococos*, la familia *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus aureus*, así como hongos y levaduras (Fernández, 2000).

Para evaluar el riesgo de un alimento a la población, con frecuencia se recurre al uso de microorganismo indicadores y no al uso de patógenos, ya que a menudo es difícil aislar bacterias patógenas en los alimentos (Fernández, 2000).

2.4.1 Coliformes totales

Los organismos coliformes son buenos indicadores de la calidad higiénica de los alimentos, se basa en la experiencia positiva adquirida en el agua, ya que

las enfermedades transmitidas esta agua generalmente son de carácter intestinal, la presencia de contaminación indica la posibilidad de que existan agentes etiológicos productores de estas enfermedades. El grupo coliforme agrupa a todas las bacterias entéricas que se caracterizan por tener las siguientes propiedades bioquímicas: ser aerobias o anaerobias facultativas; ser Gram negativas; no son esporógenas; fermentan la lactosa a 35 °C en 48 horas.

Los coliformes son una familia de bacterias que se encuentran comúnmente en las plantas, el suelo y los animales, incluyendo a los humanos. En general, las bacterias coliformes se encuentran en mayor abundancia en la capa superficial del agua o en los sedimentos del fondo. Por su amplia diversidad el grupo coliformes ha sido dividido en dos grupos: coliformes totales y coliformes fecales (Fernández, 2000).

2.4.2 Coliformes fecales

Se define como coliformes fecales a aquellos que fermentan la lactosa a 44,5 – 45,5 °C, análisis que permite descartar a *Enterobacter*, puesto que ésta no crece a esa temperatura. Si se aplica este criterio crecerán en el medio de cultivo principalmente *E. coli* (90%) y algunas bacterias de los géneros *Klebsiella* y *Citrobacter*.

Desde el surgimiento de éste grupo microbiano se ha empleado el término “coliformes fecales” para designarlos, sin embargo, recientemente diversas instituciones e investigadores han sugerido que tal término sea cambiado ya que se crea confusión debido a que el solo término da idea de contenido

intestinal en los alimentos, lo cual no es verdad. El nombre actual sugerido es el de coliformes termotolerantes (BAM, 2001; Fernández 2000). Los coliformes termotolerantes se aíslan con frecuencia de la materia fecal pero no son exclusivos de ella; un porcentaje considerable de éstos tienen como hábitat el agua, el suelo y las plantas

2.5 *Escherichia coli*

E. coli es un microorganismo Gram-negativo, tiene forma bacilo y pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Esta bacteria es un habitante común de los intestinos de todos los animales, incluyendo el de los humanos. Cuando se usan métodos de cultivos aeróbicos, esta bacteria es la especie dominante encontrada en las heces. Normalmente cumple una función importante en el cuerpo, suprimiendo el crecimiento de especies de bacterias dañinas así como también sintetizando cantidades apreciables de vitaminas (Fernández 2000). Son pocas las cepas de *E. coli* capaces de causar enfermedades a los humanos a través de diferentes mecanismos. Por ejemplo, el serotipo *E. coli* O157:H7, es una variedad extraña de esta bacteria que produce grandes cantidades de una o más toxinas relacionadas, que causan daños severos en el revestimiento del intestino. Estas toxinas [verotoxina (VT), toxina tipo shiga] están cercanamente relacionados o son idénticas a la toxina producida por *Shigella dysenteriae* (Starovičová, 2006).

Las enterobacterias (incluyendo a la *E. coli*) son sensibles al calor y son inactivadas a través del calentamiento (cerca de 70°C). Entre las mayores causas de la infección se pueden mencionar a los alimentos crudos o a los parcialmente cocinados y a la contaminación cruzada, que ocurre cuando los

alimentos preparados entran en contacto con los crudos o con las superficies contaminadas (tablas para picar, por ejemplo). De este modo, la cocción apropiada e higiénica de los alimentos puede prevenir ampliamente las infecciones enterobacterianas. La hamburguesa cruda o parcialmente cocida (carne molida) ha sido implicada en varias de las epidemias documentadas; sin embargo, las epidemias causadas por una variedad patógena de *E. coli*, la O157:H7, han implicado también al germinado de alfalfa, a los jugos de fruta no pasteurizados, al salami seco-curado, a la lechuga, a la carne de caza y al requesón (Starovičová,2006).

2.6 *Salmonella*

El género *Salmonella* es uno de los más extensamente estudiados entre los patógenos que pueden ser aislados de los alimentos. Ello se debe a la frecuencia con la cual el germen participa en brotes y casos individuales de gastroenteritis (Fernández, 2000). *Salmonella* es un típico bacilo Gram negativo de la familia *Enterobacteriaceae*. Generalmente son móviles por flagelos peritricos, no formadores de esporas, aerobios o anaerobios facultativos con una rica composición antigénica que se emplea como base para la identificación de sus miembros en serotipos. Éstos se definen por la presencia de antígenos somáticos (antígenos O, de naturaleza lipopolisacárida) y flagelares (antígenos H, proteínas) (Fernández, 2000). *Salmonella* es una bacteria primariamente parásita intestinal de los animales, incluido el hombre. Se libera al medio ambiente cuando se le expulsa por las heces. Entonces muestra cierta capacidad de sobrevivencia en los materiales que contacta, y bajo condiciones favorables también para multiplicarse en ellos; los alimentos

no son una excepción. Así, una diversidad de superficies se convierte en reservorio extraintestinal del microorganismo, y por tanto en una fuente de contaminación a los alimentos (Fernández, 2000).

La temperatura óptima de crecimiento de *Salmonella* se encuentra entre 35 y 37°C, aunque es capaz de multiplicarse en un intervalo más amplio de temperatura (6-45°C). Las salmonellas como la mayoría de las bacterias Gram negativas son sensibles al calor de forma que la pasteurización (72°C, 15 s) asegura su destrucción en la leche. La tasa de desarrollo empieza a declinar notoriamente al disminuir la temperatura por debajo de 20°C y se torna ya muy lenta en refrigeración hasta los 5-6°C, cuando ya se suspende. Estudios han demostrado que las temperaturas de refrigeración permiten la sobrevivencia de este microorganismo y la congelación, aunque provoca un descenso considerable en su número, no produce su total desaparición (Feachem y col., 1983). Es más, la adaptación previa de células de *Salmonella* a temperaturas bajas puede aumentar notablemente su crecimiento y supervivencia en productos alimenticios refrigerados (Airoldi y Zottola, 1998) llegándose a informar de la capacidad de este microorganismo para crecer a temperaturas <5°C (Craven y Williams, 1998). Aunque la congelación puede resultar perjudicial para este patógeno, no garantiza su destrucción en los alimentos, de hecho han sido detectadas células de esta bacteria en productos que habían estado almacenados en congelación durante años como carne cruda, pescado y huevo líquido (Georgala y Hurst, 1963; Kamplmacher, 1992).

Salmonella resiste pH en el intervalo de 3.8 a 9 con un óptimo de 7 según la IAMFES (1991) y 3.8 a 9.5 con óptimo de 7.5 según la ICMSF, (1996), aunque existen estudios que revelan su presencia en mayonesas muy ácidas (Chung y

Goepfert, 1970; Leyer y Johnson, 1993). De hecho en determinadas condiciones, como son las bajas temperaturas o la adherencia a superficies, este microorganismo tolera más fácilmente la acidez (Gawande y Bhagwat, 2002). La naturaleza del ácido orgánico también influye en el pH mínimo al que este microorganismo puede crecer (Chung y Goepfert, 1970). La actividad de agua límite para el desarrollo de *Salmonella* es de 0.94 (ICMSF, 1996), óptima de 0.99 aunque a valores muy bajos del orden (0.20) correspondientes a productos deshidratados, sobrevive mucho tiempo. Esta bacteria es bastante sensible al cloruro sódico, sin embargo se ha detectado en salmueras con un contenido de sal de 3.2%; es importante mencionar la influencia del pH y temperatura ya que esta última ejerce una marcada influencia en la tolerancia a la sal (D'Aoust, 1989; Thomas y col., 1992). Algunos serovares proliferan en presencia de 1-2% de NaCl a 8°C, en tanto que otros se reprimen; a 12°C hay desarrollo a concentración de 4% a 22°C hasta en 5-8% y a 37°C se tolera el 7-8% (Matches y Liston, 1972). El germen puede multiplicarse en tocino (3.2% de sal y 16.5 mg/kg de nitrito) conservado a 16°C, y sobrevivir más de 30 días a 22°C (Farrel y Upton, 1978).

Este microorganismo no es buen competidor y, en concreto, es fuertemente inhibido por la microflora láctica; por el contrario se sabe que resiste bien y durante mucho tiempo en los medios exteriores como la tierra, materia fecal, equipos, locales, etc., lo cual ha jugado un papel determinante en la epidemiología de la salmonelosis (Airoldi y Zottola, 1998; McDade y Hall, 1964). Los desinfectantes comunes como fenoles iodados y clorados son eficientes frente a *Salmonella* (Mejía, 2003).

A excepción de la *S. Typhi*, los demás serotipos de *Salmonella* producen un padecimiento conocido como salmonelosis. La salmonelosis humana es una toxiinfección de origen alimentario producida por la ingestión de alimentos donde se han podido multiplicar algunas de las especies de *Salmonella*. La ruta primaria de la infección es la ingestión del microorganismo por un huésped susceptible y en un número suficiente para que se llegue a desarrollar la enfermedad y su patogenia se debe principalmente a la presencia de una endotoxina (LPS). Asimismo, se ha demostrado como algunas cepas de *S. typhimurium* son capaces de producir enterotoxinas (Bryan y col., 1979; Kapperud y col., 1990).

Las especies de *Salmonella* siguen siendo la causa principal de las enfermedades bacterianas transmitidas por alimentos, considerándose a nivel mundial como las zoonosis más frecuentes y las toxiinfecciones alimentarias más comunes. En la actualidad, estudios epidemiológicos indican que las enfermedades transmitidas por alimentos debidas a *Salmonella* aún no están controladas (Boletín Epidemiológico Semanal, 1998; Boletín Epidemiológico Semanal, 2000; Boletín Epidemiológico Semanal, 2002; Boletín Epidemiológico Semanal, 2003).

2.6.1 Presencia de *Salmonella* en alimentos

El principal hábitat de las especies de *Salmonella* es el tracto intestinal de animales. Su transmisión al ser humano tiene lugar por vía fecal-oral mediante el consumo de aguas y alimentos contaminados. Así mismo los animales de compañía como perros y gatos, así como animales salvajes (roedores, reptiles

e insectos) pueden servir de reservorio de *Salmonella* (Feachem y col., 1983; Kapperud, 1990).

Fuera del tracto intestinal (como en pastos, aguas residuales, heces secas) pueden sobrevivir largos periodos de tiempo, incluso años. El género *Salmonella* se encuentra muy extendido en la naturaleza pudiendo contaminar locales de procesamiento de alimentos, materiales de las industrias alimentarias, suelos, mesas, utensilios, etc., lo cual supone un riesgo de contaminación para los alimentos que en ellas se procesan. Los alimentos pueden contaminarse durante cualquier fase de los procesos de manipulación (Feachem y col., 1983; Kapperud, 1990; Pether y Gilbert, 1971).

Prácticamente, todos los alimentos de origen animal pueden ser vehículo de transmisión de *Salmonella* al ser humano, siendo las aves y los huevos la causa más frecuente de salmonelosis. La constante presencia de especies de *Salmonella* en poblaciones animales sensibles (pollos, cerdos, etc.) se debe en parte a la contaminación de animales exentos de este microorganismo por animales de la misma población que son portadores asintomáticos (D'Aoust, 1989; Perales y Audicana, 1988; Todd, 1994).

Los alimentos de alto riesgo de contaminación con *Salmonella* son las carnes y los productos cárnicos, las aves y sus derivados, huevos y ovoproductos, leche y derivados lácteos. La carne puede contaminarse durante las fases de carnización, debido a que es frecuente encontrar a este microorganismo en el equipo y utensilios empleados, superficies, suelos y paredes, pezuñas, pelo y piel de los animales sacrificados, etc. por todo esto, su frecuencia en las canales es alta, siendo un caso especial las canales de aves, donde la incidencia de estas bacterias es mucho mayor. Los alimentos a base de carne

listos para comer también pueden contaminarse fácilmente con *Salmonella*, por ejemplo en los EUA, el roastbeef insuficientemente cocido ha sido el alimento más comúnmente implicado en brotes de salmonelosis (Goodfellow y Brown, 1978).

Finalmente, *Salmonella* puede llegar a la leche por medio de la ubre y de los pezones de las vacas y desde los operarios que manipulan la leche, siendo menos corrientes las contaminaciones durante infecciones septicémicas de las vacas (Bryan, 1983; Tamminga y col., 1977).

Los vegetales procedentes de tierras regadas con aguas negras, cercanas a animales de crianza o domésticos, o abonadas con desechos animales suelen estar contaminadas con agentes patógenos intestinales incluida *Salmonella*. Estos alimentos, también pueden servir de vectores para la transmisión del microorganismo como ocurre con los cereales, las frutas y verduras e incluso en especias y granos (Fernández, 2000). A partir de germinado se han reportado varios brotes de salmonelosis (Galbraith y col., 1960; Nguyen-the y Carlin, 1994).

La recuperación de *E. coli* de los alimentos, implica que otros microorganismos de origen fecal, incluyendo patógenos, probablemente estén presentes. Algunas veces existe correlación entre la abundancia de *E. coli* y la probabilidad de aislar *Salmonella*.

Varios serotipos de *Salmonella* se han visto involucrados en casos de salmonelosis debido al consumo de vegetales crudos, los sitios donde se configuraron los brotes incluyeron puestos en la carretera, supermercados y fiestas escolares (Blöstein, 1993).

En los alimentos con bajo contenido de humedad el número de salmonellas presentes o la frecuencia con la cual se obtienen resultados positivos, generalmente es pequeña. Ello es debido tanto al efecto letal de los procesos aplicados antes y durante el secado como a la muerte progresiva del microorganismo durante el almacenamiento. La negatividad del hallazgo es, sin embargo, una condición relativa y puede bastar recurrir a porciones de mayor tamaño en el análisis para conseguir resultados positivos (D'Aoust, 1994).

Es importante mencionar que también se han registrado brotes de salmonelosis debidas a colorantes de cosméticos (Lang y col., 1967) y por productos farmacéuticos (Glencross, 1972).

III. JUSTIFICACIÓN

Durante el procesamiento de tortillas es inevitable la contaminación externa por microorganismos transportados por el aire o bien por cualquiera de los utensilios que tiene contacto con estas (la mesa, el papel para el empaque, la balanza, entre otros). En general a las tortillas no se les asocia con brotes de enfermedad de etiología microbiana. Sin embargo, tomando en consideración las malas prácticas de higiene que en general ocurren durante el procesamiento de las tortillas, es de esperar que estas sean susceptibles de contaminarse con microorganismos patógenos. Se debe de considerar también que debido a la forma en que comúnmente se produce y comercializa este producto, una de las principales fuentes de contaminación es posiblemente el ser humano. A pesar de ello, no se tiene registrados brotes de enfermedad asociados al consumo de tortillas; dos explicaciones se pueden

tener para este hecho: no se ha considerado a las tortillas como fuente de infección y en consecuencia no se incluyen como alimentos sospechosos en el estudio de los brotes, ó bien en realidad la tortilla no es fuente de infección.

No obstante, es muy posible que este ocurriendo la primera.

Una forma de evaluar el riesgo de enfermedad por el consumo de un alimento en particular es determinar la frecuencia de microorganismos patógenos en él y conocer el potencial para multiplicarse en tal alimento (Fernández, 2000). A partir de esta información es posible tener herramientas objetivas para evaluar el riesgo de enfermedad por un alimento en particular.

Por consiguiente, como una forma de evaluar el riesgo que representa el consumo de de tortilla se investigó: la frecuencia de microorganismos indicadores de higiene, *E. coli* y *Salmonella* en tortilla recién elaborada, el potencial de *E. coli* y *Salmonella* para desarrollar en tortilla recién elaborada y el incremento de temperatura en tortillas cuando son calentadas en un microondas.

IV. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la frecuencia y comportamiento de coliformes totales, *E. coli* y *Salmonella* en tortilla frescas

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.2.1 Determinar la frecuencia de coliformes totales, *E. coli* y *Salmonella* en tortillas recién elaboradas obtenidas de diferentes establecimientos.

4.2.2 Estudiar el comportamiento de coliformes totales, *E. coli* y *Salmonella* en tortilla frescas.

4.2.3. Investigar el incremento de temperatura en tortillas cuando son calentadas en un microondas.

V. METODOLOGIA

5.1 Frecuencia de coliformes totales, *E. coli* y *Salmonella* en tortilla recién elaborada

5.1.1 Recolección de muestras

El estudio se efectuó con tortillas frescas compradas en tortillerías de diferentes municipios del estado de Hidalgo.

Se recolectaron 50 muestras de tortillas en un periodo de 3 meses (Junio-Agosto). Las tortillas fueron compradas en 50 establecimientos de 5 municipios del estado de Hidalgo (Pachuca de soto, Mineral de la reforma, Tula de allende, Tepeji del rio y Tezontepec de Aldama). En todos los establecimientos se compró 500 g de tortillas; éstas fueron transportadas (en el empaque de venta) bajo condiciones asépticas según lo establecido por la NOM-109-SSA1-1994. Las tortillas se analizaron dentro de las 3 primeras horas después de su compra. La cuantificación de BMA, Organismos coliformes, *Escherichia coli* y Hongos y Levaduras, se realizó de acuerdo a los manuales especializados de la Administración de medicamentos y alimentos de los Estados Unidos de América (FDA/JFSAN, por sus siglas en Ingles), 2001; y de acuerdo con los protocolos de la legislación mexicana vigente.

5.2 Análisis microbiológico

5.2.1 Preparación de la muestra

Se selecciono una muestra representativa de 25 g a partir de los 500 g de cada muestra comprada, para esto, bajo condiciones asépticas se retiró el empaque (papel) que cubría a las tortillas, se tomó una porción de la tortilla de “arriba” una de en “medio” y otra de “abajo”. La sub-muestra de 25g se colocó

en una bolsa estéril de plástico a la cual se le adicionó 225 mL de Diluyente de Peptona. Esta bolsa se consideró la primera dilución decimal. Finalmente la bolsa se homogeneizó en un Stomacher por 1 minuto a 260 rpm (NOM-093-SSA1-1994).

5.2.2 Recuento bacterias mesófilas aerobias

A partir de la muestra homogenizada se realizaron diluciones decimales en tubos con 9 ml de diluyente de peptona. Diluciones seleccionadas fueron sembradas en cajas de petri mediante la técnica de vertido en placa empleando agar cuenta estándar. Las cajas fueron incubadas a 35°C/24-48 h (NOM-093-SSA1-1994).

5.2.3 Recuento de organismos coliformes

A partir de la muestra homogenizada se realizaron diluciones decimales en tubos con 9 ml de diluyente de peptona. Se empleó la técnica de doble capa: a partir de diluciones seleccionadas se colocó 1 mL en cajas de petri vacías seguido de 15 mL de agar bilis y rojo violeta (ABRV) que se dejó solidificar y posteriormente se adicionaron otros 5 mL del mismo medio. Las placas se incubaron a 35°C durante 24 h y se contaron las colonias rojo oscuras con un diámetro de 0.5 mm a 2 mm con halo de precipitación de bilis (NOM-112-SSA1-1994, NOM-113-SSA1-1994).

5.2.4 Cuantificación de *E. coli*

La cuantificación de los *E. coli* se realizó mediante la técnica del Numero Más Probable (NMP). A partir de la muestra homogeneizada se realizaron dos diluciones decimales más en DP (dilución 10^{-2} y 10^{-3}). A partir de la suspensión homogeneizada (10^{-1}) se inoculó 1 mL en cada uno de tres tubos que contenían Caldo Lactosado (CL) y campana Durham. La misma operación se

realizó a partir de las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} . Los 9 tubos de CL inoculados fueron incubados a 35°C por 24 h. Posteriormente, una asada de los tubos que presentaron desarrollo y producción de gas, se transfirió en tubos conteniendo caldo lactosado bilis verde brillante fluorocult (CLF) y campanas Durham. Los tubos de CLF se incubaron a 44.5°C / 24-48 h. Los tubos de CLF que presentaron desarrollo y producción de gas más producción de fluorescencia e Indol se consideraron positivos para *E. coli*. Cabe mencionar que para comprobar la confiabilidad de la técnica, los tubos positivos a las tres pruebas se estriaron en agar EMB (eosina azul de metileno) y se observaron colonias típicas de *E. coli*.

Finalmente, el cálculo de la concentración de *E. coli* por gramo se realizó con base en las tablas del NMP (NOM-114-SSA1-1994).

5.2.5 Determinación de *Salmonella*

Las muestras homogeneizadas en el Stomacher que contenían la tortilla con caldo lactosado (4.2.1) se incubaron a 35° durante 24 h. Posteriormente se transfirió 1 mL de la muestra a tubos conteniendo 9 mL de caldo selenito cistina y 9 mL de caldo tetrionato, los caldos se incubaron a $35^{\circ}\text{C}/24$ h ó $43^{\circ}\text{C}/24$ h, respectivamente. Después de la incubación, cada tubo se sembró por estría en los medios selectivos: agar *Salmonella-Shigella*, agar sulfito de bismuto y agar verde brillante; las cajas inoculadas se incubaron a $35^{\circ}\text{C}/24$ h. Al menos 3 colonias con morfología típica de *Salmonella* y una atípica que desarrollaron en cada medio de cultivo se sometieron a pruebas bioquímicas empleando agar hierro y triple azúcar, agar hierro lisina, caldo urea, caldo triptona (para producción de Indol) y agar citrato de Simmons. Las colonias con pruebas

bioquímicas típicas de *Salmonella* se confirmaron serológicamente con antisueros polivalentes (NOM-114-SSA1-1994).

5.3 Comportamiento de *Salmonella* y *E. coli* en tortillas recién elaboradas.

5.3.1 Cepas

Se emplearon dos cepas de *Salmonella* Typhi y una de *E. coli*. Las cepas fueron donadas por el laboratorio de Microbiología de Alimentos del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos de la Universidad Autónoma de Querétaro. En estudios anteriores, a partir de estas cepas nativas se obtuvieron cepas resistentes a rifampicina(Rif+) (Rojas, 2005; Moreno, 2006). Estas (Rif+); éstas se mantuvieron en agar soya tripticasa inclinado a 3-5°C hasta su uso. Previo a empleo se activaron dos veces en caldo soya tripticasa incubado a 35°C/24hrs.

5.3.2 Inoculación de las tortillas y monitoreo de los microorganismos

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

Por otro lado, cultivos de 24 h de *S. Typhi* y *E. coli* fueron lavados dos veces en solución salina isotónica (SSI) a 3500 rpm/25 min. Los cultivos se resuspendieron en SSI para obtener aproximadamente de 1×10^9 UFC/mL. A partir de este cultivo lavado, se realizaron diluciones decimales en DP para obtener una concentración aproximada de 1×10^4 UFC/mL. A partir de esta suspensión se inocularon 10 µL de sobre una tortilla, una vez inoculada la tortilla, se colocaron tres tortillas una sobre la inoculada y otra debajo y se

marco con un círculo el área inoculada. 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. Una serie de bolsas se incubó a 30°, otra a 22°C y una más a 3-5°C. Periódicamente, por triplicado de cada temperatura se tomaron bolsas con las tortillas, las tortillas 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), estas porciones se colocaron en una bolsa estéril y se adicionó 100 mL DP; las bolsas se homogeneizaron Stomacher por 1 minuto 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 fueron realizados por triplicado.

4.4 Determinación del incremento de temperatura de tortillas calentadas en microondas

Se tomaron porciones de 10 ó 15 tortillas y se colocaron en bolsa de plástico estéril; estas se cerraron herméticamente. A continuación, cada bolsa con tortillas se sometió a un solo calentamiento diferente en microondas por: 0, 15, 30, 40 ó 45 segundos. Al final de cada tratamiento se registró la temperatura de la parte superior media e inferior de las tortillas y se observó su consistencia y textura. Cada tratamiento se efectuó por triplicado. El horno de microondas que se empleó tenía las siguientes características: Samsung, modelo MW1235WB, 120V, 60Hz, 1.55Kw.

VI. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1. Incidencia de coliformes totales (OC), *E. coli* y *Salmonella* en tortilla recién elaboradas.

De las 50 muestras de tortilla analizadas en general, el 32% mostró positividad para *E. coli* mientras que el 68% fue positivo (Tabla 2) para organismos coliformes(OC); para este ultimo grupo microbiano en algunas muestras se obtuvieron niveles muy elevados. La Norma Oficial Mexicana establece un límite de Oc de < 30 UFC/g; considerando este valor el 60 % esta por arriba de tal limite, por lo que estrictamente hablando esas muestras de tortillas no serían aptas para el consumo humano ya que existe un riesgo elevado de enfermedad (Tabla 2). Es destacable que *Salmonella* serotipo Typhi se aisló en una de las muestras (Tabla 2).

Tabla 2. Positividad de microorganismos indicadores de higiene en tortillas

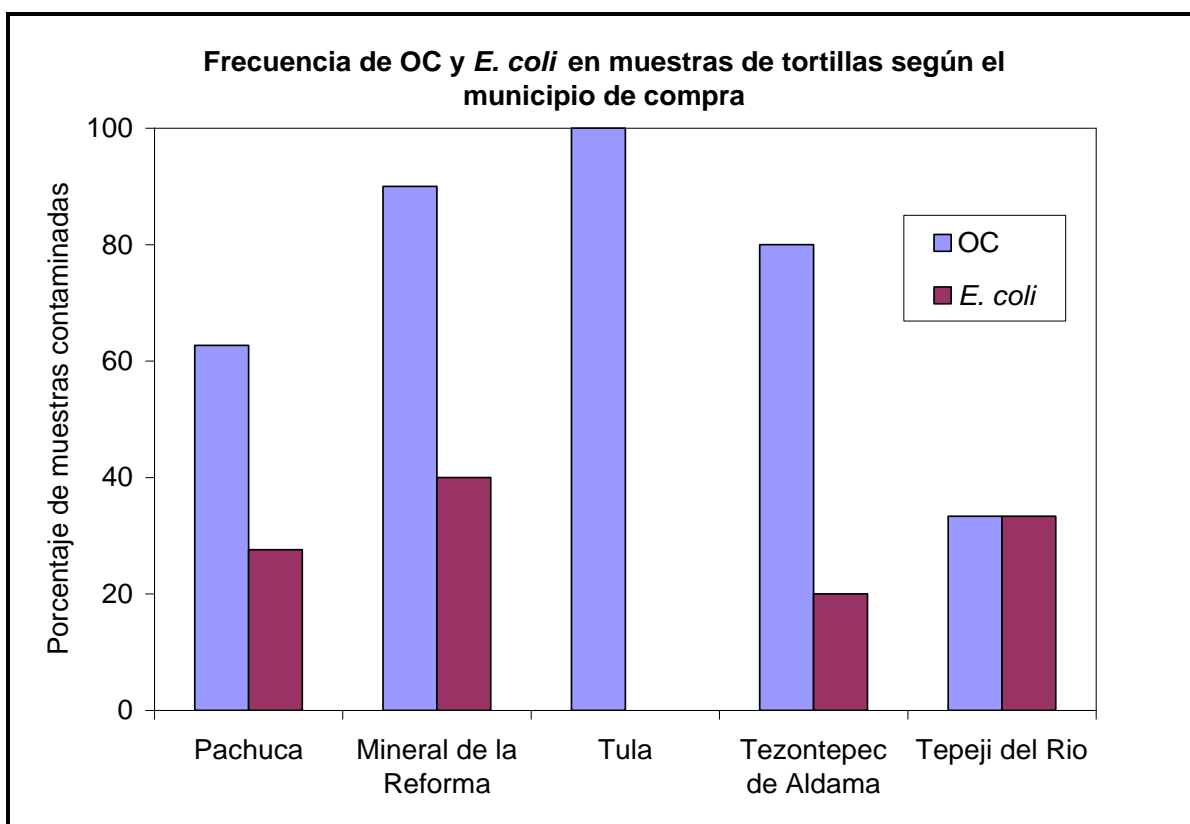
	Frecuencia %	Mínimo	Media	Máximo	Muestras fuera norma (%)
OC *	68	< 10	1.0 x10 ²	1.0x10 ⁸	60
<i>E.coli</i>¹	32	< 3	22	1100	32
<i>Salmonella</i>	2	-	-	-	2

*UFC/g; ¹NMP/g

Como se mencionó, se analizaron muestras de tortillas procedentes de 5 municipios del Estado de Hidalgo. Es destacable que no todas las muestras de tortilla procedentes de los diferentes municipios, presentaron el mismo nivel de

contaminación ni la frecuencia con la que se encontraron contaminadas con los microorganismos indicadores (Gráfica 1). Todas las muestras de tortilla compradas en Tula presentaron coliformes en niveles por arriba del límite permitido (Gráfica 1), sin embargo, *E. coli* no se detectó en éstas muestras. Para el caso de las recolectadas en Mineral de la Reforma, el 90 % estuvo contaminada con Oc y en el 40 % se aisló *E. coli* (Gráfica 1).

Gráfica 1



A pesar de las diferencias observadas en la frecuencia de Oc y *E. coli* entre las tortillas de los diferentes municipios, a excepción de las de Tepeji del río, todas las demás presentaron más del 50 % de tortillas con niveles de microorganismos por arriba del límite permitido (grafica 1, anexo 1), lo cual nos sugiere fuertemente falta de higiene en tales muestras.

Se sabe que los OC se relacionan con falta de higiene en productos recién preparados, como las tortillas, y no con presencia de materia fecal ya que estos son frecuentes en diferentes materiales, materias primas, vegetales o en la materia fecal (Geldreich y col., 1971; Khan y col., 1992; Beuchat, 1995; Harris y col., 2001). Por tal razón existe alta probabilidad de que los OC provengan de diferentes materiales y no propiamente de la materia fecal. En consecuencia, la presencia de OC son como indicadores de malas prácticas higiénicas durante la preparación de dichos alimentos (Fernández, 2000).

Los niveles de OC encontrados en las muestras de tortillas pueden explicarse de tres maneras distintas: a) a alta contaminación inmediatamente después de preparadas las tortillas; b) una discreta contaminación en tortillas recién preparadas y debido a la presencia de nutrientes, alta humedad y temperatura ambiente favorable, multiplicación microbiana; este desarrollo puede ser tan activo que rápidamente alcancen su concentración máxima en el alimento, y c) la ocurrencia simultánea de ambas. La primera opción parecería la más viable, no obstante, en función de las deficientes condiciones de higiene durante la producción, preparación y comercialización de las tortillas, es posible la ocurrencia de ambas. Este señalamiento es de especial significado cuando los microorganismos involucrados tienen carácter patógeno, ya que se puede estar propiciando la contaminación y su desarrollo en dicho alimento.

Para el caso de *E. coli*, es sabido que en alimentos recién preparados, como las tortillas, la sola presencia de este microorganismo sugiere en general contaminación fecal reciente. La detección de *E. coli* en los alimentos es esencial por que su presencia en alimentos como la tortilla implica la

probabilidad de que un patógeno pueda estar presente. Y en consecuencia, su presencia se asocia con un riesgo potencial. En algunos alimentos como los mariscos, se ha encontrado una buena correlación de la presencia de *E. coli* con la de bacterias enteropatógenas. Mas aun, aunque la mayoría de las cepas de *E. coli* son no patógenas, existen algunas cepas de *E. coli* que causan enfermedad tal es el caso de *E. coli* O157:H7, cuya dosis mínima infectante es muy baja (10-100 células) (Fernández, 1981).

La presencia de *Salmonella* es inaceptable en cualquier alimento listo para el consumo la justificación es debida a que en ocasiones se han requerido solo 10 células del patógeno para producir la enfermedad (Fernández, 2000). No obstante, este patógeno se aisló en una de las muestras de tortilla que analizamos. El serotipo identificado fue Typhi. Se sabe que *S. Typhi* es un patógeno exclusivo del humano, por lo que su presencia en las tortillas es indicativo de contaminación fecal humana o mejor dicho de contaminación fecal humana (Fernández, 2000). Este serotipo es uno de los más virulentos de *Salmonella*; provoca la enfermedad conocida como tifoidea. En esta hay malestar general, cefalalgia, fiebre alta persistente, dolor abdominal, dolores en el cuerpo y debilidad, generalmente acompañados de una diarrea parecida al puré de guisantes o de estreñimiento. A veces, en el tronco, en el dorso y en el tórax, aparecen manchas de color rosa. Otras veces se observa un ritmo cardíaco lento, un abdomen sensible y dilatado, un aumento del tamaño del bazo y en ocasiones hemorragia intestinal o nasal. Los sentidos están débiles y los pacientes pueden llegar a desvariar. La convalecencia es lenta (1-8 semanas). El estado de portador se puede prolongar durante varios meses y

durar años. Típicamente, las personas portadoras crónicas albergan el organismo en la vesícula biliar (ICMSF, 1996.).

En general existen pocos reportes sobre la frecuencia de microorganismos indicadores o patógenos en alimentos, esto principalmente porque la tortilla en general no es considerada como alimento de riesgo y en consecuencia no hay necesidad por conocer la inocuidad microbiana de este producto. En un estudio realizado en Guatemala, se encontró que los principales microorganismos aislados de tortillas preparadas en las regiones serranas, fueron coliformes, dos especies de estafilococos y varios tipos de levaduras (Capparelli y Mata, 1975). Los autores señalan que los principales factores que contribuyen a la contaminación de la tortilla son el agua empleada para la transformación del maíz cocido en masa y el molinillo utilizado para moler el maíz cocido, así como los utensilios que entran en contacto con la tortilla (Capparelli y Mata, 1975).

La elevada frecuencia con la que se encontraron los microorganismos de higiene en las tortillas recién preparadas procedentes de los diferentes establecimientos del estado de Hidalgo, nos sugieren un problema serio de contaminación en estos sitios de producción. Es posible que estén ocurriendo simultáneamente mecanismos de contaminación directa y cruzada, teniendo como principal vehículo o fuente al humano y a este mismo diseminador de la contaminación dentro de la tortillería. En general, es frecuente observar en las tortillerías que una sola persona realiza diferentes actividades tales como, controlar el nivel de masa en la maquina tortilladora, calibrar la maquina para tener un tamaño adecuado de tortilla, recibir manualmente las tortillas recién

elaboradas (por lo general con la mano desnuda) y despachar el producto al consumidor. La mayoría de las veces entre estas actividades tal persona no se lava las manos o si lo realiza lo hace en agua no potable; otras ocasiones emplea un trapo con el que se limpia las manos para, según él, limpiarse las manos. Esta bien documentado que este tipo de utensilios como los trapos de cocina en realidad son mas bien un reservorio de microorganismos que un elemento que contribuya a la limpieza de las manos (Fernández, 2000). Por otro lado, es muy posible que cada actividad que realiza el humano dentro de la tortillería contribuya a al contaminación de sus manos. En consecuencia, cuando tal persona tiene contacto con las tortillas recién elaboradas es muy posible que las contamine, siendo este el principal factor de contaminación de las tortillas. De hecho aunque la masa pueda contener niveles muy elevados de microorganismos previo a la elaboración de la tortilla, la concentración de tales microorganismos disminuye de manera importante durante la cocción del producto debido a que se alcanzan temperaturas superiores a los 70°C, por lo que microorganismos como los coliformes, *E. coli* y enteropatógenos (como *Salmonella*), remotamente podrían sobrevivir a este tratamiento térmico. En consecuencia, la persona que tiene contacto directo con las tortillas recién elaboradas se convierte en el principal factor de contaminación.

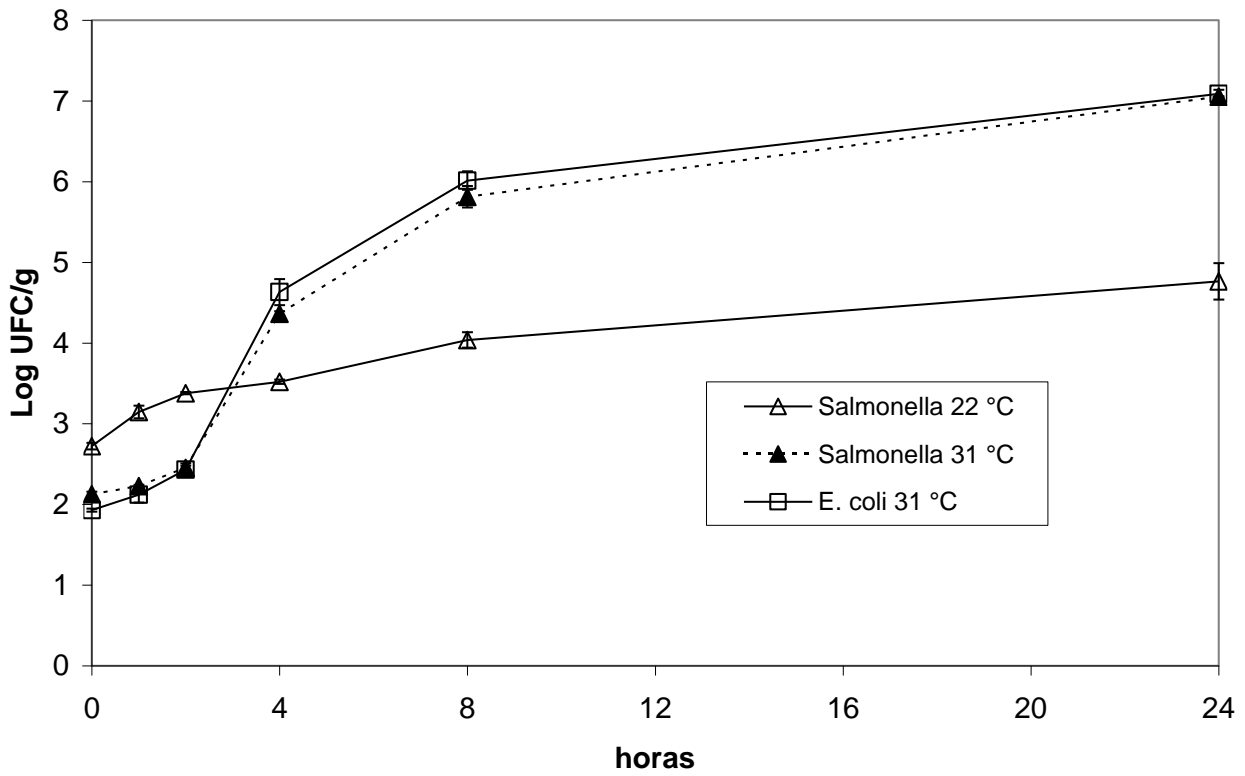
6.2 Comportamiento de *Salmonella* y *E. coli* en tortillas recién elaboradas.

Generalmente, cuando se detectan niveles de microorganismos indicadores muy por arriba de los límites establecidos por la normativa ó la demostración de un microorganismo patógeno en un alimento, es razón suficiente para retíralos del mercado y realizar acciones preventivas o correctivas para evitar la presentación de brotes de enfermedad. La razón es que algunos microorganismos patógenos como *Shigella*, muestran dosis infectante muy baja (ICMSF, 1996); por otra parte la mayoría de los microorganismos patógenos suelen manifestar potencial para desarrollar en los alimentos, lo que depende de una variedad de factores ecológicos (ICMSF, 1996). Su efecto sobre el destino de un microorganismo en particular, puede ser positivo (sobrevivencia / desarrollo) o negativo (inactivación) dependiendo de las condiciones prevalentes al momento de ingresar al alimento y de su manejo ulterior. En consecuencia, un alimento es más o menos peligroso dependiendo del tipo de microorganismos patógenos que contenga y de las facilidades que presente para su eventual desarrollo.

No existe información sobre el comportamiento de *E. coli* ni de microorganismos patógenos entéricos en tortilla. En consecuencia como otra forma de evaluar el riesgo de las tortillas se propuso determinar el comportamiento de *E. coli* y *Salmonella* en tortilla fresca.

Se observó que tanto *E. coli* como *Salmonella* se multiplicaron sobre la tortilla (Gráfica 2); para *E. coli* únicamente se investigó su comportamiento a 22° C y para *Salmonella* tanto a 22 como a 31° C (Gráfica 2). A 22° C, la multiplicación de *Salmonella* fue menor y más lenta que a 31° C.

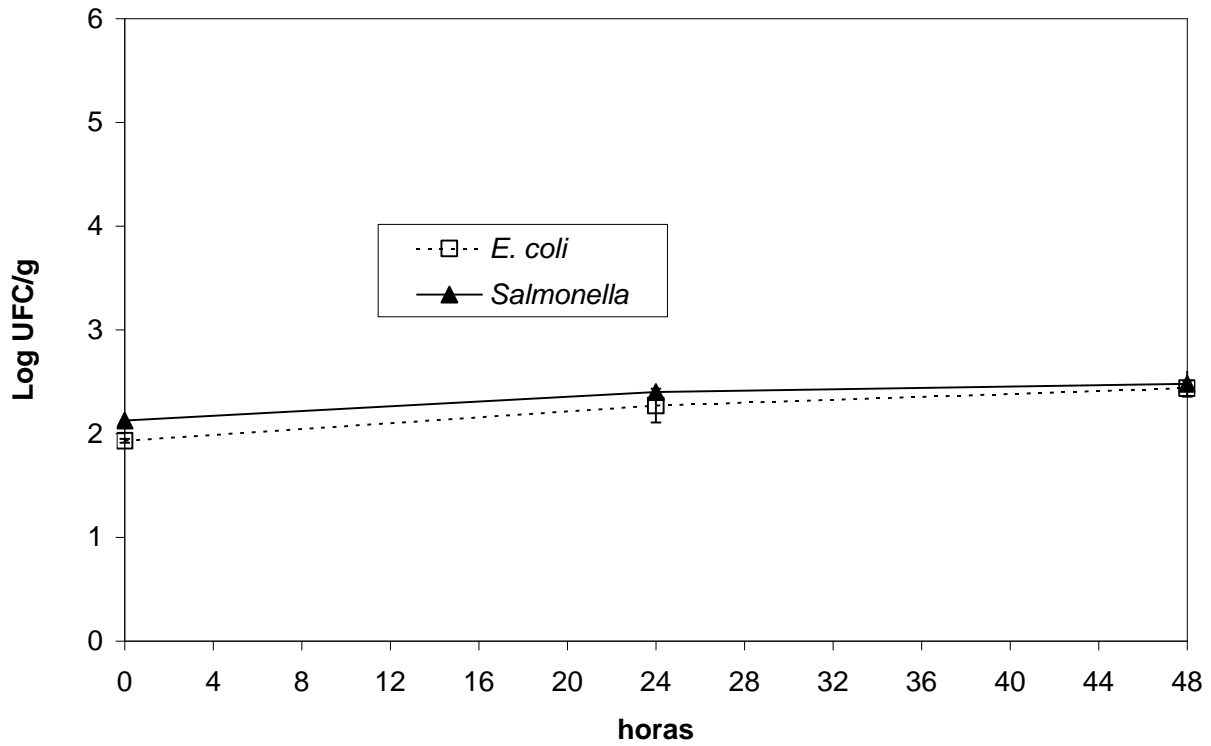
Gráfica 2. Comportamiento de *Salmonella* y *E. coli* en tortilla almacenada a 22 o a 31°C



Para ambas temperaturas, partir de las primeras 2 horas *Salmonella* comienza a multiplicarse alcanzando a 31°C en tan solo 8 horas una concentración aproximada de 6 Log₁₀ UFC/tortilla; a 22°C, en el mismo tiempo la concentración se incrementó en aproximadamente 1.5 Log₁₀ UFC/tortilla, con respecto a la concentración inicial (Gráfica 2). Por otro lado, *E. coli* mostró un comportamiento muy semejante al observado en *Salmonella* a 31°C.

Un estudio semejante se efectuó en refrigeración; como era de esperar, bajo ésta condición, ninguno de los dos microorganismos se multiplico ya que estos microorganismos no son psicrótrofos (Gráfica 3). No obstante, la concentración del microorganismo se mantuvo constante al menos 48 h.

Gráfica 3. Comportamiento de *Salmonella* y *E. coli* en tortilla almacenada a 5°C



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. Sin embargo, ni *E. coli* ó *Salmonella* tienen el potencial para degradar el almidón o los carbohidratos complejos de las tortillas (Bergey's, 2001). Es posible que los microorganismos para desarrollar estén utilizando la poca glucosa libre presente en las tortillas, 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 integros a expensas de los escasos nutrientes (sales, vitaminas, carbohidratos, proteínas) que se disuelven en el agua de exudación (Brackett,1997; Thaysen 1930). 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 *E. coli* ó *Salmonella*, es muy baja.

Por otro lado, el desarrollo de los microorganismos de estudio en la tortilla se favorece por la elevada actividad acuosa.

En este estudio, tanto *E. coli* como *Salmonella* fueron capaces de multiplicarse durante las primeras horas de almacenamiento de la tortilla, tanto a 22 como a 31°C; un comportamiento similar pero con otros microorganismos, ha sido reportado en la literatura. 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 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 (Capparelli y Mata, 1975). 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 (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 Karen, 1980). En otros estudios se ha logrado incrementar de manera significativa la vida de anaquel de 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 de 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).

Nuestro resultados muestran el potencial que *E. coli* y *Salmonella* tiene para multiplicarse en la tortilla tanto a 22 como a 31°C, pero no en refrigeración. Es destacable que aunque el estudio no se realizó a la temperatura óptima para el desarrollo de estos microorganismos, aun así, se multiplicaron. Las temperaturas a las cuales efectuamos los estudios son 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 para el desarrollo tanto de *Salmonella* como de *E. coli*. 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 mayor concentración de celular alcanzada.

Por otro lado, con frecuencia 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 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. Cabe señalar que en las grandes ciudades (Monterrey, Ciudad de México, Guadalajara) 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 como las "hieleras"; en estos recipientes la tortilla se mantiene a una temperatura entre 35-40°C; la cual es una temperatura

cercana a la óptima de los patógenos entéricos como *Salmonella*. Y en estos recipientes la tortilla es almacenada hasta la hora “pico” de venta (2 de tarde). Si asumimos que un productor comenzara a producir tortillas desde las 8 de la mañana, y las contaminara con *Salmonella* por la falta de higiene, y posteriormente almacenara estas tortillas contaminadas en las hieleras para su posterior venta a las 2 de la tarde, la salmonela tendría el 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 se encuentra por arriba de la dosis mínima infectante.

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. 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 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 baja temperatura se ha observado en muchos microorganismos patógenos como *Salmonella*, la cual 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).

6.3 Incremento de temperatura de tortillas recalentadas en microondas

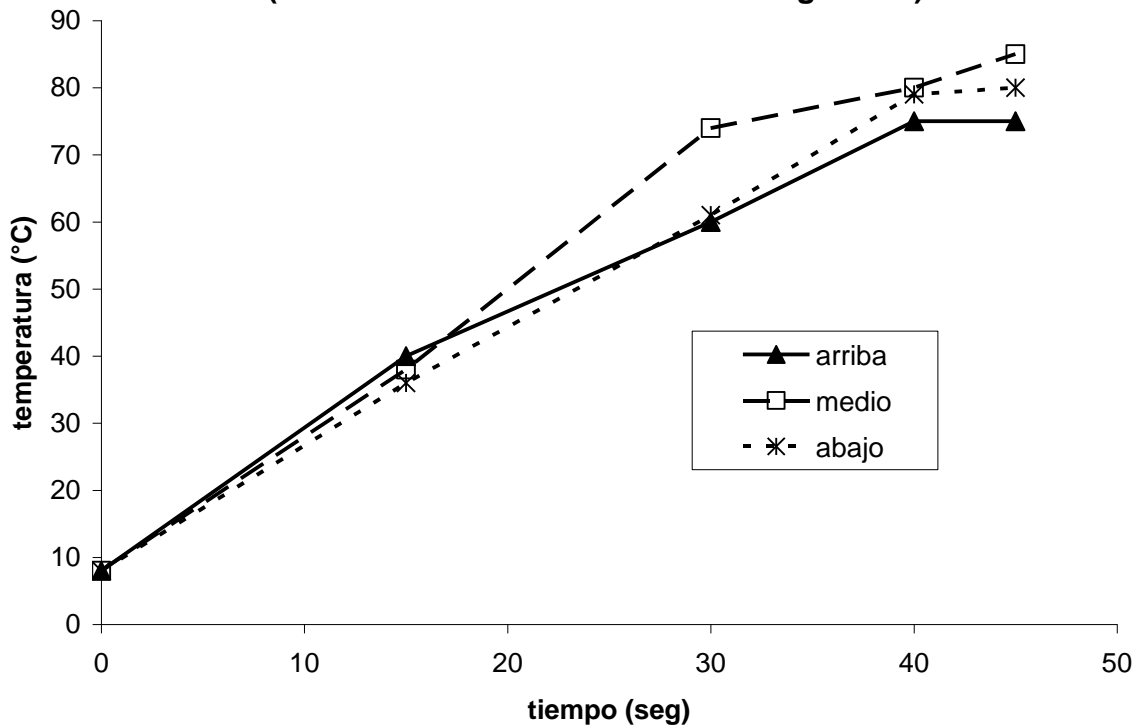
Con frecuencia, las tortillas que no se consumen el mismo día de su preparación, son almacenadas principalmente bajo refrigeración para ser consumidas en los días siguientes. Previo a su consumo, estas tortillas almacenadas son recalentadas. En las ciudades el calentamiento de los alimentos mediante los hornos de microondas es un procedimiento que se emplea cada vez más con mayor frecuencia; otra forma de recalentar las tortillas es con los llamados "cómales" o planchas metálicas calientes. 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 anteriores, existe la probabilidad de que las tortillas se contaminen con microorganismos patógenos, como *Salmonella*, y es posible que estos se multipliquen sobre las tortillas. De esta manera, si las tortillas contaminadas son almacenadas en refrigeración, los patógenos microbianos sobreviven. Nos cuestionamos si debido a que el recalentamiento de la tortilla no se aplica para inactivar microorganismos patógenos, estos podrían sobrevivir a tal tratamiento térmico de recalentamiento de la tortilla en microondas.

Con la finalidad de tener más información al respecto, se realizó un experimento para conocer de manera indirecta si existían posibilidades para que los patógenos microbianos sobrevivieran al recalentamiento. Para estos estudios trabajamos con el horno de microondas. Porciones de 10 o 15 tortillas se sometieron a calentamiento en microondas por diferentes tiempos. Las tortillas que utilizamos estaban en refrigeración y una vez retiradas de éste

inmediatamente se calentaron en el microondas. Como se puede observar en las gráficas 4 y 5 conforme transcurre el tiempo de calentamiento la temperatura de las tortillas se va incrementando. Sin embargo, la temperatura no es homogénea en todas las tortillas. Paralelamente a estos estudios se examinó visualmente la apariencia y textura que las tortillas presentaron después del tratamiento térmico. Observamos que a los 30 segundos del calentamiento de las porciones de 10 tortillas, la apariencia y textura de las tortillas presentaban daños evidentes (figuras A-C). Aunque no se realizó un estudio cuantitativo para cuantificar los daños que sufrió la tortilla por el calentamiento en microondas (por ejemplo, daño en la rolabilidad, etc), las figuras A-C muestran el tipo de daño que se presentó.

Gráfica 4. Incremento de la temperatura en tortillas calentadas en microondas según tiempo de tratamiento y posición de las tortillas (10 tortillas recién sacadas del refrigerador)



A



B



C



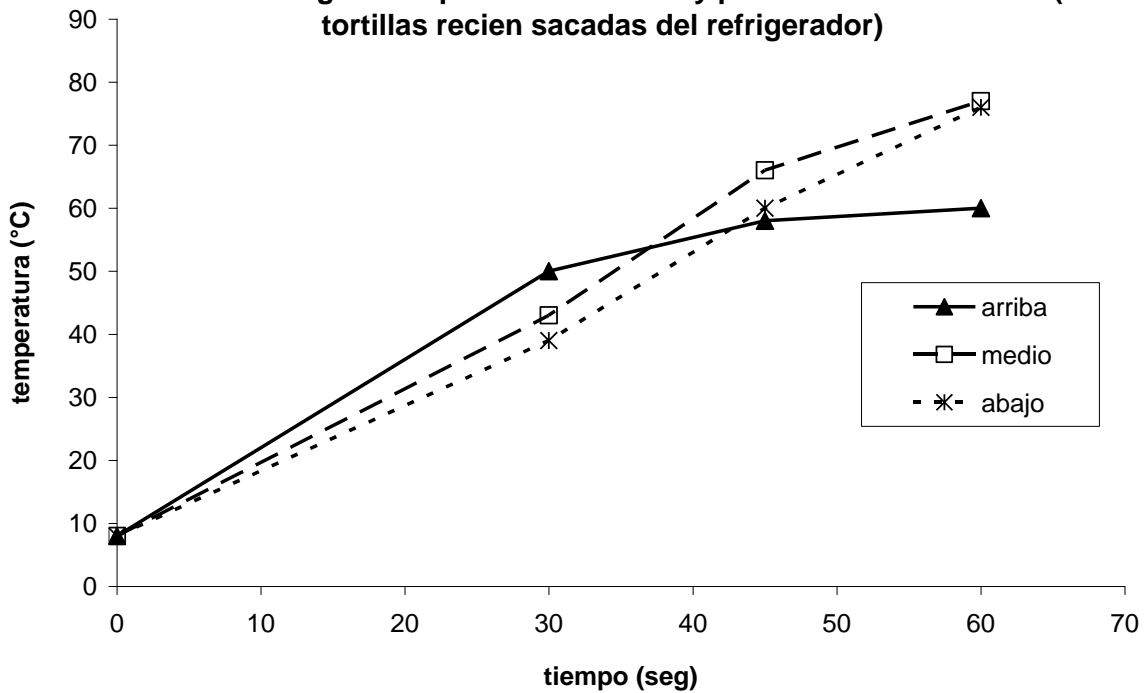
Figuras A, B, C. Efecto del calentamiento sobre la apariencia de tortilla: A 20 s de calentamiento, B. 30 s y C 45 s

Es importante mencionar que se tuvieron limitaciones durante la realización de este estudio, por ejemplo la temperatura fue medida con termómetro de vidrio, ya que no se contaba con termopares, no se midió simultáneamente los tres sitios, primero se midió la parte de arriba, enseguida la de en medio y por último la parte inferior.

A pesar de ello, la temperatura de la mayoría de las tortillas fue 60°C. A los 40 segundos de calentamiento se alcanzó una temperatura equivalente a la de la pasteurización en todas las tortillas (Wilbey,1993). Sin embargo, en estas condiciones, la tortilla presentó daño en más del 50 % de su superficie: se perdió la textura en las zonas dañadas por reblandecimiento, se tornaron muy quebradizas y pegajosas.

Para el caso de las porciones de 15 tortillas, a los 45s se presentó un ligero daño en la superficie de la tortilla, pero en términos generales las tortillas presentaron una calidad aceptable. Sin embargo, en este tiempo las tortillas sólo alcanzaron en promedio una temperatura de alrededor de 60° (Gráfica 4). Una temperatura equivalente al tratamiento de pasteurización (Wilbey,1993) se alcanzó a los 60s pero solo en las tortillas de la parte inferior y las de en medio; las de parte superior apenas alcanzaron 60°C (Gráfica 5). La mayoría de las tortillas sometidas a este tratamiento, presentaron daño en gran parte de su superficie; el daño fue semejante al descrito para el caso de las porciones de 10 tortillas.

Gráfica 5. Incremento de la temperatura en tortillas calentadas en microondas según tiempo de tratamiento y posición de las tortillas (15 tortillas recién sacadas del refrigerador)



Los resultados anteriores muestran que aunque en teoría es posible a los microorganismos por un calentamiento 10 tortillas por 40s ya que se alcanzan condiciones de tiempo/temperatura que serian equivalentes al tratamiento de pasteurización, no sería un tratamiento adecuado por que se afecta de manera importante la textura y la apariencia de la tortilla. Una situación un poco diferente ocurrió para el caso de las porciones 15 tortillas, en las cuales aun con un tratamiento de calentamiento de 60s, que ya daña de manera importante la textura y en general la apariencia sensorial de la mayoría de las tortillas, en las tortillas de la parte superior no se alcanza una temperatura que en teoría fuera equivalente a la de pasteurización. Por consiguiente, existe alta probabilidad de sobrevivencia de microorganismos patógenos si se encontrasen en estas tortillas.

Los resultados evidencian que el calentamiento en microondas, como en ocasiones 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. Es necesario enfatizar que con el propósito de disminuir riesgos a la salud por consumo de tortillas “frescas”, es pertinente subrayar la importancia de manipularlas bajo condiciones adecuadas de higiene durante su producción, comercialización y en los hogares. Además de no dejar por más de dos horas 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.

En nuestro país, anualmente se reportan numerosos casos de tifoidea por *S. Typhi*, de hecho México es una área endémica de este patógeno (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 *Salmonellas* zoonóticas. Su presencia en cualquier alimento y en especial en los vegetales constituye un riesgo especialmente preocupante.

Finalmente, al parecer la tortilla de maíz puede ser un alimento de riesgos para la población; 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.

VII. Conclusiones

1. El 60 % de las muestras de tortilla estuvieron por arriba del límite microbiológico permitido la normativa sanitaria de México.
2. El 32 % de las muestras presentaron indicios de contaminación fecal reciente.
3. *Salmonella Typhi* se aisló en el 2 % de las muestras de tortillas
4. Con respecto a la procedencia de las tortillas, en general las provenientes del municipio de Mineral de la reforma fueron las que presentaron la menor calidad microbiológica y *S. Typhi* se aisló de las procedentes de Pachuca.
5. *Salmonella* fue capaz de multiplicarse en las tortillas tanto a 22 como a 30°C. A 30° en 6 h puede alcanzar una concentración de al rededor de 1×10^6 UFC/área contaminada.
6. *E. coli* y *Salmonella* no se multiplicaron en las tortillas mantenidas en refrigeración.
7. El experimento sobre el recalentamiento de las tortillas en microondas, bajo las condiciones empleadas en este estudio, sugiere que este tipo de tratamiento no asegura la inactivación total de los microorganismos patógenos de las tortillas.

VIII. 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. Abbas et al. 1988 Contaminación natural con micotoxinas en maíz forrajero y granos *Cereal Food World.*
3. Airoidi, A. A. y Zottola, E. A. 1998. Growth and survival of *Salmonella typhimurium* at low temperature in nutrient deficient media. *J. Food Sci.*, 53: 1511-1513.
4. 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.
5. (BAM) Bacteriological Analytical Manual Online. 2001. <http://vm.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-toc.html>.
6. Barcenas, A. La tortilla, sol del maíz.2005. <http://www.mexicodesconocido.com.mx/notas/526-La-tortilla,-sol-de-maz>
7. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2001 Ed. GM Garrity.
8. Blostein, J. 1993. An outbreak of *Salmonella javiana* associated with consumption watermelon. *J. Environ. Health*, 56: 29-31.
9. Boletín Epidemiológico Semanal. 1998. Infecciones por *Salmonella* notificadas al Sistema de Información Microbiológica de España, 6: 285-296.
10. Boletín Epidemiológico Semanal. 2000. Estado de las Enfermedades de Declaración Obligatoria. España, 8: 265-276.
11. Boletín Epidemiológico Semanal. 2002. Enfermedades de Transmisión Alimentaria. España, 10: 277-284.
12. Beuchat, L. R. 1995. Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. *J. Food Prot.*, 59: 204-216.
13. Boletín Epidemiológico Semanal. 2003. Incidencia de la fiebre tifoidea (*Salmonella typhi*) y fiebre paratifoidea (*Salmonella paratyphi*). España, 11: 277-284.

14. 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.
15. Bryan, F. L., Fanelli, M. J. y Riemann, H. 1979. Salmonella infections. En: Foodborne infections and intoxications, 2.^a ed., p. 74-130, Riemann, H. y Bryan, F. L. ed., Academic Press (Nueva York).
16. Bressani y col, 1990. El maíz en la nutrición humana. <http://www.fao.org/docrep/T0395S/T0395S08.htm>.
17. Bryan, F. L. 1983. Epidemiology of milk borne diseases. J.Food Prot., 46: 637-649.
18. Cámara, M. Tortilla, una tradición 100% mexicana. 2007. <http://uneabasto.com/modules.php?name=News&file=print&sid=176>
19. Capparelli y Mata 1975. Microflora of Maize Prepared as Tortillas www.cs.urjc.es/alumnos/carreras/ asignaturas/4409.htm - 14k.
20. Craven, S. E. y Williams, D. D. 1998. In vitro attachment of Salmonella typhimurium to chicken fecal mucus: effect of cations and pretreatment with Lactobacillus spp. isolated from the intestinal tracts of chickens. J. Food Prot., 61: 265-271.
21. Chung, K. C. y Goepfert, J. M. 1970. Growth of Salmonella at low pH. J. Food Sci., 35: 326-328.
22. D'Aoust, J. Y. 1989. Salmonella. En: Foodborne bacterial pathogens. Doyle M.P. ed., pp. 327-445. Marcel Dekker, Inc. (Nueva York).
23. D'Aoust, J. Y. 1994. Salmonella and the internacional food trade, Review paper. Int. J. Food Microb., 24: 11-31.
24. Farrel, G. M. y Upton, M. E. 1978. The effect of low temperature on the growth and survival of Staphylococcus aureus and Salmonella typhimurium when inoculated on to bacon. J. Food Techn., 13: 15-23.
25. FDA/CFSAN, 2001. Bacteriological Analytical Manual Online, <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-toc.html>, equivalente a Bacteriological.
26. Fernández, E. E. 1981. Microbiología Sanitaria. Agua y Alimentos. Universidad de Guadalajara, México. pp. 209-349.

27. Fernández, E. E. 2000. Microbiología e Inocuidad de los Alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro, México.
28. Feachem, R. G., Bradley, D. J., Garelick, H. y Mara, D. D. 1983. Salmonella, enteric fevers and salmonellosis. En: Sanitation and disease: Health aspects of excreta and wastewater management, pp. 251-286.
29. Fregoso, J. El zar de la tortilla. 2005. <http://www.jornada.unam.mx/2005/01/17/007n1sec.html>.
30. Frazier, W.C. and Westhoff, D.C. Food Microbiology. 4th Ed. McGraw-Hill Book Co., 1998.
31. Galbraith, N. S., Hobbs, B. C., Smith, M. E. y Tomlinson, A. J. H. 1960. Salmonella in desiccated coconut: an interim report. Mon. Bull. Med. Res. Counc., 19: 99-104.
32. Gawande P. V. y Bhagwat A. A. 2002. Protective effects of cold temperature and surface contact on acid tolerance of Salmonella. J. Appl. Microb., 93: 689-696.
33. Geldreich, E. E. y Bordner, R. H. 1971. Fecal contamination on fruits and vegetables during cultivation and processing for market. A review. J. Milk Food Techn., 34: 184-195.
34. Georgala, D. L. y Hurst, A. 1963. The survival of food poisoning bacteria in frozen foods. J. Appl. Bacteriol., 26: 346-358.
35. Glencross, E. J. G. 1972. Pancreatic as a source of hospital-acquired salmonellosis. J. Br. Med., 2: 376-381.
36. Goodfellow, S. J. y Brown, W. L. 1978. Fate of Salmonella inoculated into beef for cooking. J. Food Prot., 41: 598-605.
37. 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.
38. Gunderson, M. F. and Rose, K. D. 1948. Survival of bacteria in a precooked, fresh frozen food. Food Res. 13 : 254-263.
39. 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.
40. Harris L. J., Beuchat, L. R., Kajs, T. M., Ward, T. E. y Taylor, C. H. 2001. Efficacy and reproducibility to a produce wash in killing *Salmonella* on the surface of tomatoes assessed with a proposed standards method of produce sanitizers. *J. Food Prot.*, 64:1477-1482.
 41. Hichey y col, 1979. Sensory Attributes of Corn Tortillas with Substitutions of Potatoes
http://www.aplegal.com/officialgazette/archive/20041130_RC.pdf.
 42. Internacional Comisión on Microbiological Specifications for Foods. ICMSF. 1996. *Microorganisms in Foods. 5. Microbiological Specifications on Food Pathogens.* Blackie Acad. & Professional, London.
 43. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. 1991. *Teniasis y Cisticercosis por Taenia solium.* Publ. Tec. No. 4. México.
 44. Islam y col, 1984. Protein quality of maize and tortillas, www.jornada.unam.mx/2005/01/17/007n1sec.html - 14k.
 45. Kamplmacher, E. H. 1992. A Bacteriological profile of salad vegetables in Bangladesh with special reference to coliforms. *Abstract, Lett. Appl. Microb.*, 14: 88.
 46. Kapperud, G., Gustavsen, S., Hellesnes, I., Hasen, A. H., Lassen, J., Hirn, J., Jahkola, M., Montenegro, M.A. y Helmuth, R. 1990. Outbreak of *Salmonella typhimurium* infection traced to contaminated chocolate and caused by a strain lacking the 60 megadalton virulence plasmid. *J. Clin. Microb.*, 28: 2597-2601.
 47. Leyer, G. J. y Johnson, E. A. 1993. Add adaptation induces cross protection against environmental stresses in *Salmonella typhimurium*. *J. Appl. Microb.*, 59: 1842-1847.
 48. Khan, M. R. Saha, M. L. y Kribia, A. H. M. G. 1992. A Bacteriological profile of salad vegetables in Bangladesh with special referente to coliforms. *Abstract, Lett. Appl. Microb.*, 14: 88.
 49. Martinez y col, 1979. Reported on studies of tortilla samples collected in Mexico. Ed. Instituto Nacional de Salud Publica, Mexico, 1996: 175-182.

50. Molina y col, 1978. Sensory Attributes of Corn Tortillas with Substitutions. *Journal of Food Science* 48.
51. Matches, J. R. y Liston, J. 1972. Effects of incubation temperature on the salt tolerance of *Salmonella*. *J. Milk Food Techn.*, 35: 39-44.
52. McDade, J. H. y Hall, L. B. 1964. Survival of Gram negative bacteria in the environment. Effect of relative humidity on surface exposed organisms. *Am. J. Hygiene*, 80: 192-204.
53. Mejía, S. J. 2003. Epidemiología de la salmonelosis porcina en granjas de Cataluña y determinación de los factores de riesgo de la infección. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Veterinaria.
54. Moreno, G. D. 1994. *Microbiología de los Alimentos*. 1ª ed. Editorial AcribiaNOM, Norma oficial mexicana.
55. 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.
56. Nguyen-the, C. y Carlin, F. 1994. The microbiology of Minimally Processed Fresh Fruits and Vegetables. *Cri. Rew. Food Sci. Nut.*, 34: 371-400.
57. Norma Oficial Mexicana NOM-109-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Procedimiento para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. Secretaría de Salud. México.
58. Norma Oficial Mexicana NOM-112-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Determinación de bacterias coliformes. Técnica del Número Más Probable. Secretaría de Salud. México.
59. Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la cuenta de organismos coliformes totales en Placa. Secretaría de Salud. México.
60. Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos. Secretaría de Salud. México.
61. Norma Oficial Mexicana NOM-093-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Bienes y servicios. Prácticas de higiene y sanidad en la preparación de alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos.

62. Lang, D. J., Kunz, L. J., Martin, A. R., Schroeder, S. A. y Thomsosn, L. A. 1967. Carmine as a source of nosocomial salmonellosis. *N. Engl. J. Med.*, 276: 829-833.
63. Pacheco, C. Tortilla. 2005. <http://enciclopedia.us.es/index.php/Tortilla>
64. Pasteurization of foods: Principles of pasteurization: In *Encyclopedia of food science*", Wilbey, R. A. (1993), food technology and nutrition (pp. 3437-3441), Academic Press.
65. Pelaez, J. y Karel, M. 1980. Development and stability of intermediate moisture tortillas. *J. Food Proc. Preserv.*, 4: 51 -65.
66. Perales, I. y Audicana, A. 1988. Salmonella enteritidis and eggs. *Lancet* 2: 1133-1137.
67. Pether, J. V. S. y Gilbert, R. J. 1971. The survival of Salmonella on fingertips and transfer of the organisms to foods. *J. Hygiene*, 69: 773-681
68. 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*.
69. 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.
70. Roigé, M.B. Frecuencia de hongos y alimentos fermentados y trigo. 2005 <http://www.aapa.org.ar/congresos/2006/SaPdf/SA12.pdf>.
71. Rooney, L.W. (1982). Tortilla y alimentos tipo botana de maíz nixtamalizado. *Soya noticias* oct-dic 1-7.
72. 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.
73. Starovičová, M. 2006. Escherichia coli O157:H7 . <http://www.food-info.net/es/bact/colio157.htm>.
74. Tamminga, S. K., Beunmer, R. R., Kampelmacher, E. H. y van Leusden, F. M. 1977. Survival of Salmonella eastborne and Salmonella typhimurium in

milk chocolate prepared with artificially contaminated milk powder. *J. Hygiene*, 79: 333-337.

75. Todd, E. C. D. 1994. Surveillance foodborne disease. En: *Foodborne Disease Handbook. Disease caused by bacteria. 1: 461-536*, Hui, Y.H., Gorham, J.R., Murrell K.D. y Cliver D.O. eds., Marcel Dekker. Inc. (Nueva York).
76. 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.
77. Thomas, L. V., Wimpenny, W. T. y Peters, A. C. 1992. Testing multiple variables on the growth of a mixed inoculum of Salmonella strains using gradient plates. *Int. J. Food Microb.*, 15: 165-175.
78. Vivas y col, 1988. Effect of the components of maize on the quality of masa and tortillas during the traditional nixtamalisation process. www.cnmaiz.org.mx/industria.

IX. Anexos

Anexo I: Tabla de Concentración de Oc y E.coli por muestra de tortillas.

Origen	Oc	<i>E.coli</i>
Felix	5×10^2	<3.0
S/N	<10	<3.0
Bosch	2.07×10^3	<3.0
Carmelito	1.70×10^2	<3.0
Masita	<10	<3.0
Revolucion	1.60×10^2	<3.0
La Fé	<10	<3.0
Tlaxcalteca	<10	<3.0
Lluvia	<10	<3.0
Mary's	<10	<3.0
Aurrera-pach	1.50×10^2	<3.0
Juanita	2.0×10^1	<3.0
Mercado	1.20×10^2	<3.0
Miraje	4.10×10^2	<3.0
Sazón	2.30×10^2	<3.0
Liconsa	2.0×10^2	<3.0
Alicia	5.40×10^2	<3.0
Minero	8.0×10^1	<3.0
Tolteca	5.10×10^2	<3.0
Antojitos	9.0×10^1	<3.0
Perico	2.80×10^4	<3.0
Valencia	1.80×10^4	<3.0
Bajadita	2.70×10^6	<3.0
Tlaco	1.0×10^3	<3.0
Chacón	3.20×10^4	<3.0
Nuevo	4.60×10^6	<3.0
Proveedor	1.0×10^8	<3.0
Centro	<10	<3.0
Manantial	2.0×10^2	<3.0
Michonita	<10	<3.0
Mexicana	<10	<3.0
Especial	5.0×10^1	<3.0
Norteña	2.0×10^1	<3.0
Vero	3.0×10^1	6.2
Taz	4.30×10^2	3.6
Ignacio Zaragoza	2.0×10^2	<3.0
Aurrera-tula	5.0×10^1	<3.0
Intensa	3.0×10^2	<3.0
San Carlos	3.80×10^2	>1100

Loma	5.0×10^1	<3.0
La buena	7.30×10^2	<3.0
Repartidora	<10	<3.0
San Fernando	3.0×10^1	<3.0
Única	<10	<3.0
Torres	<10	9.2
Valenciana	<10	<3.0
Atengo	<10	<3.0
Salida	2.0×10^2	<3.0
Frontera	2.0×10^1	<3.0
La Esquina	<10	<3.0