



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Ciencias Químicas

**“MONITOREO DE BMA, COLIFORMES TOTALES Y
COLIFORMES FECALES EN JUGOS FRESCOS DE
ESTABLECIMIENTOS AMBULANTES DE LA ZONA
METROPOLITANA DE PUEBLA”**

**Presentación de tesis para obtener el Título de
Licenciatura en Químico Farmacobiólogo**

Presentada por: p. Q.F.B. Carla Garrido Flores

Director de Tesis: D.C. Edith Diaz Cabrera

Asesor de Tesis: D.C. Alma Cuellar Sánchez

Octubre 2025

Índice

RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	6
MARCO TEÓRICO	8
Antecedentes generales.....	8
Inocuidad y calidad de los alimentos.....	8
Factores de contaminación en los alimentos.....	9
Multiplicación de los microorganismos en los alimentos	11
Importancia de prácticas higiénicas en los manipuladores de alimentos y la aplicación de Normas Oficiales Mexicanas	14
¿Qué son las BMA, coliformes totales y coliformes fecales?.....	15
Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA): la importancia de <i>Escherichia coli</i> como bacteria indicadora de contaminación fecal en alimentos	20
La manipulación de jugos frescos en puestos ambulantes: un riesgo oculto.....	23
MÁRCO DE REFERENCIAS	25
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	28
JUSTIFICACIÓN	29
OBJETIVOS	30
Objetivo general	30
Objetivos específicos	30
HIPÓTESIS.....	31
Hipótesis nula	31
Hipótesis alternativa.....	31
DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	32
Tipo de estudio.....	32
Universo de estudio.....	32
Tamaño de la muestra	33
Sede y lugar de estudio.....	33
Criterios de inclusión	34
Criterios de exclusión.....	34
Análisis estadístico de la información.....	34
METODOLOGÍA	35
Lugar y selección de muestras	35

Transporte y conservación de muestras.....	35
Análisis microbiológico.....	35
Determinación de Bacterias mesófilas aerobias por la técnica de vertido en placa.....	36
Determinación de coliformes totales por la técnica de vertido en placa.....	37
Determinación de coliformes fecales por el método de el Numero Más Probable en tubos (NMP)	38
Antibiograma.....	39
Análisis molecular	40
Aislamiento de ADN genómico de bacterias Gramnegativas.....	40
PCR.....	41
Electroforesis.....	42
MATERIAL Y REACTIVOS	44
EQUIPOS	45
DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO	47
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
Monitoreo.....	48
Análisis microbiológico.....	50
Cuantificación de bacterias mesófilas aerobias (BMA) por la técnica de vertido en placa	51
Cuantificación de coliformes totales por la técnica de vertido en placa.....	55
Cuantificación de coliformes fecales por el método del número más probable (NMP).....	59
Antibiograma.....	74
Análisis molecular	78
Cuantificación del aislamiento de ADN bacteriológico	78
Identificación genómica de <i>E.coli</i> mediante PCR y electroforesis.....	79
CONCLUSIONES	84
BIBLIOGRAFÍA	85
ANEXOS	90
Anexo 1. Checklist del puesto ambulante de jugos frescos que se muestreo	90
Anexo 2. Placas representativas para el recuento de BMA de cada muestra de jugo fresco procesada.....	91
Anexo 3. Placas representativas para el recuento de BMA de cada muestra de jugo fresco procesada.....	93
Anexo 4. Tabla estandarizada del N.M.P. la NMX-AA-042-SCFI-2015	94
Anexo 5. Tabla de identificación de las familias <i>Enterobacteriaceae</i>	95

Anexo 6. Tabla de comparación de halos de sensibilidad en mm (NCCLS), obtenida del inserto del reactivo de multidisco para bacterias Gram (-) de Investigación Diagnóstica y/o Gutiérrez Ramos Abel 96

RESUMEN

En este estudio se realizó un análisis microbiológico de 40 muestras de jugos frescos (jugo verde, naranja, zanahoria, betabel y guayaba) obtenidas de puestos ambulantes en diferentes áreas de la zona metropolitana de Puebla, con el objetivo de determinar la presencia de bacterias mesófilas aerobias (BMA), coliformes totales y coliformes fecales mediante métodos estandarizados de acuerdo con las normas oficiales mexicanas correspondientes.

Los resultados mostraron que un alto porcentaje de las muestras superó los límites permitidos por la NOM-218-SSA1-2011: el 87.5% no cumplió con la carga aceptable de BMA, el 82.5% excedió los límites de coliformes totales y el 97.5% presentó coliformes fecales por encima de lo permitido, evidenciando deficiencias significativas en las condiciones de higiene durante la elaboración y venta de estos productos.

Se logró aislar y caracterizar fenotípicamente *Escherichia coli* en el 15% de las muestras, y posteriormente se evaluó su perfil de resistencia a antibióticos mediante antibiograma con multidisco Gutiérrez Ramos Abel PT-35 Multibac I.D. La totalidad de las cepas aisladas mostró resistencia a amikacina (AK), carbenicilina (CB) y cefalotina (CF), mientras que el 84.6% permaneció sensible a ciprofloxacina (CPF) y gentamicina (GE). Destacó la presencia de multiresistencia a ocho antibióticos en la cepa J21.

La caracterización genómica se realizó mediante PCR del gen 16S rRNA, confirmando la presencia de *E. coli* en todas las cepas analizadas. Además, la técnica de rep-PCR permitió evaluar la diversidad genética mediante la separación de secuencias repetitivas palindrómicas, y el análisis filogenético representado en un dendrograma evidenció relaciones de similitud y diferenciación entre cepas provenientes de la misma muestra y de distintas muestras de jugos frescos.

En conjunto, estos resultados destacan la importancia de la vigilancia microbiológica y de la caracterización genómica y de resistencia antimicrobiana en jugos frescos, con el fin de garantizar la inocuidad de estos alimentos de consumo directo y prevenir riesgos para la salud pública.

INTRODUCCIÓN

En México, es común la venta de alimentos y bebidas en puestos ambulantes que son de costos accesibles y fáciles de adquirir, uno de los productos más vendidos en zonas públicas son los jugos frescos. Los jugos frescos son bebidas a base de extractos de la pulpa de frutas y verduras y se les considera frescos, debido a que son preparados el mismo día del que se consumen, la mayoría de los consumidores opta consumir este producto por su aporte vitamínico, refrescante y saludable; sin embargo, no siempre se analiza el proceso de elaboración de lo que consumimos y mucho menos si se realizó bajo condiciones que garanticen la seguridad alimentaria del consumidor.

La inocuidad alimentaria es fundamental para procurar la salud de cualquier consumidor y reducir los posibles riesgos que puedan dañar el bienestar de una persona, la inocuidad de un producto comestible se garantiza mediante el uso de procesos regulados que garanticen la limpieza y seguridad del alimento, indicando de ese modo que está libre de algún microorganismo, sustancia o artefacto que pueda representar un posible riesgo a la salud pública. Contrariamente a lo que se menciona a lo largo de la historia se han presentado un sinnúmero de casos y brotes causados por la falta de conocimiento o aplicación de inocuidad durante la elaboración de un alimento dando paso a lo que hoy conocemos como Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA). Uno de los ejemplos más comunes ha sido el brote en los EE. UU. en 1993 por el consumo de carne de hamburguesas cruda, la cual se encontraba contaminada por la bacteria *Escherichia coli* O157:H7, este brote dejó más de 700 personas enfermas, 4 fallecimientos de menores de edad y docenas de personas desarrollaron complicaciones graves como el Síndrome urémico hemolítico (SUH), que afecta los riñones.

Un proceso que es de ayuda para la industria alimentaria son los monitores microbiológicos, los cuales cumplen con el objetivo principal de garantizar la seguridad y la calidad de los alimentos o productos ya que cumplen con diversas funciones como la detección de agentes patógenos (virus, parásitos o bacterias) que puedan ocasionar alguna ETA, así mismo permite la verificación del uso de Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) asegurando las buenas prácticas de limpieza e higiene en la producción, procesamiento y manejo de alimentos. Los

monitoreos sirven de control de calidad, ya que ayudan a garantizar que el producto cumple con los estándares microbiológicos establecidos por normativas oficiales tanto nacionales como internacionales, para la prevención de brotes, al realizar un monitoreo regular y eficaz. Las empresas alimentarias tienen la obligación de cumplir con estos requisitos para que su producto sea seguro cuando sale a la venta, por lo que en este sector cuenta con un control más regulado que en su contraparte, como son los puestos ambulantes. Los puestos ambulantes son establecimientos que en su mayoría no se encuentran monitoreados por alguna institución y mucho menos tratan de ajustarse a las normativas ya establecidos, dado a que los mismos propietarios son indiferentes a los estándares microbiológicos.

Por lo tanto, no se puede garantizar la regulación sanitaria de todos los comercios que ofrezcan algún producto alimenticio pero lo que sí se puede realizar es un monitoreo para el análisis en base a los requerimientos de inocuidad de un alimento, en este caso, los jugos frescos de la zona metropolitana de Puebla.

MARCO TEÓRICO

Antecedentes generales

Inocuidad y calidad de los alimentos

La palabra inocuo dentro de una oración hace referencia a cualquier forma libre de contaminantes que puedan causar algún riesgo a la salud, y de acuerdo con la Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (2004) se define a la inocuidad de los alimentos como *“la ausencia de peligro en los alimentos que pueden dañar la salud de los consumidores, o dotarlos de niveles seguros y aceptables”*. Por otro lado, la calidad de los alimentos se refiere al conjunto de cualidades aceptables por el consumidor, en donde se toma en cuenta las propiedades organolépticas del producto, sus características higiénicas y nutricionales. Debido a esto el termino de “calidad” es utilizado más cuando se hace referencia a la relación de la finalidad con la utilidad de algún producto como se define en la Norma Internacional ISO 9000:2000 *“la calidad es el conjunto de propiedades y características de un producto, de un proceso o de un servicio que le confieren su capacidad de satisfacer necesidades implícitas o explícitas”* (FAO, 2004).

De tal forma, tanto la inocuidad como la calidad de los alimentos son requisitos básicos para cualquier producto alimenticio limpio, sano y no dañino apto para el consumo humano, por lo que la falta de conocimiento de estas características en la producción o preparación de alimentos puede desencadenar enfermedades microbianas en los consumidores y por ende se ve reflejado su impacto dentro de las problemáticas sociales que se presentan con frecuencia, producidas por enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) y que una vez más de una persona presenta la misma sintomatología por la misma causa de ETA a este se le llama brote, mejor definido como “un incidente en el que dos o más personas presentan una enfermedad semejante después de la ingestión de un mismo alimento y los análisis epidemiológicos apuntan al alimento como el origen de la enfermedad” por la Organización Panamericana de Salud (SEMARNAT, 2017).

En México existen organismos reguladores como la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) y el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), para el cuidado de la cadena productora de alimentos

en base a la inocuidad de los cada uno de ellos, que a su vez buscan promover controles regulatorios para la reducción de riesgos en cada etapa de manipulación de alimentos (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2020).

Factores de contaminación en los alimentos

Un alimento deja de ser inocuo cuando este presenta impurezas en su composición y puede representar un riesgo exponencial para el consumidor. Un factor importante es el tipo de contaminante que está invadiendo al alimento, como los residuos físicos, químicos, alérgenos o microorganismos patógenos (Bourgeois et al., 1994).

Como se sabe desde hace tiempo atrás, existen microorganismos que se encuentran presentes en el medio ambiente (agua, aire, suelo, etc.) de forma natural para el hombre, sin embargo, hay un grupo de microorganismos que pueden producir mecanismos de daño en el organismo del ser humano, por lo que se le atribuye el nombre de microorganismos patógenos. Debido a esto, los alimentos, transformados o no, que se consumen, pueden estar contaminados por diversos microorganismos y por otro lado, el tipo de microorganismo que invada determinado alimento dependerá de las características físico-químicas que posea el alimento en común para que permita del crecimiento y proliferación de éste, para que a partir de su establecimiento desarrolle alteraciones en este mismo, ya sean importantes o no, pues se puede ver reflejado en las características organolépticas del alimento o en su valor comercial, hasta en ser la causa de alguna infección, intoxicación o toxiinfección. Es importante tomar en cuenta el origen de la contaminación por estos microorganismos, pues como ya se mencionó antes, estos se pueden encontrar en el medio ambiente, pero la contaminación de los alimentos por microorganismos principalmente se da por el contacto con agua, aire, polvo, superficies, materia prima y por los mismos productos alimentarios, desde la elaboración hasta la obtención del producto terminado. La principal fuente de contaminación se puede decir que es a partir del agua, ya que contiene en suspensión una de microorganismos, principalmente bacterias procedentes del suelo (*Streptomyces spp*, *Micrococcus spp*, *Alcaligenes spp*, *Corynebacterium spp*, *Pseudomonas spp*, *Acinetobacter spp*, *Aeromonas spp*, *Chromobacterium spp*, *Moraxella spp*) o a partir de restos fecales del hombre y animales (*Enterobacteriaceae*, *Enterococos spp*); los mohos (*Aspergillus spp*,

Penicillium spp, *Rhizopus spp*, *Fusarium spp*, etc.) se encuentran igualmente en el agua, provocando enfermedades en plantas y alteraciones en alimentos. Por el contrario, es raro encontrar levaduras a través de este medio, ya que estas suelen desarrollarse mejor en ambientes con alta concentración de azúcares, como frutas o productos fermentados, más que en el agua ambiental o potable (Bourgeois et al., 1994).

El agua es un recurso indispensable para el ser vivo y principalmente para el humano, pues es una fuente de recurso que se nos permite usarla como producto alimenticio, siempre y cuando está se encuentre tratada y sea apta para el consumo humano. El agua que se encuentra en entornos donde no sufre ningún tipo de tratamiento, como en lugares en vías de desarrollo, es la que se encuentra contaminada por microorganismos procedentes de individuos enfermos o portadores, y se vuelve una de las causas de enfermedades gastrointestinales. Por otro lado, las aguas residuales y que tampoco son tratadas, se encuentran constituidas principalmente por microorganismos de origen fecal (por ej. *Escherichia coli*, *Salmonella sp.*, *Shigella sp*, etc.) llegan a ser ocupadas como aguas de riego para terrenos de cultivo o incluso puede llegar a contaminar fuentes superficiales de agua (lagos, ríos o pozos) y generar la contaminación de alimentos. Un ejemplo de uso de agua importante es en la industria alimentaria, ya que se usa en múltiples procesos (lavado, limpieza, desinfección, etc.), por lo que el agua que se ocupa en ellas se encuentra regulada por normas oficiales sobre la calidad microbiológica como la NOM-127-SSA1-1994 o la NOM-179-SSA1-2020, para que cada proceso tome en cuenta el tipo de agua a utilizar y con ello minimizar los riesgos de contaminación post fabricación (Cervantes et al., 2017)

Otro origen de contaminación en los alimentos es a partir del suelo y aunque los microorganismos que se encuentran en el son los mismos que se citaron para el agua, estos microorganismos tienen la particularidad de contaminar con mayor facilidad frutas y verduras; en estos alimentos los problemas que se presentan son producidos por la parte superficial o la cubierta o piel de las frutas utilizadas en la fabricación de bebidas fermentadas o no fermentadas: cervezas, jugos de fruta, etc. Una particularidad de los microorganismos del suelo es que pueden contaminar los vegetales mediante la transmisión por parte de insectos, siendo el caso de la contaminación de la pimienta roja por *Aspergillus flavus* (Vásquez de Plata, 2003).

Y por último el aire y polvo son portadores de un gran número de microorganismos en suspensión en donde destacan bacterias, mohos y raramente levaduras; pero una característica de estos medios es que son portadores de una baja concentración de organismos patógenos y los productos más expuestos son las frutas y verduras, la leche y todos aquellos productos que se elaboran con el contacto directo del aire (principalmente productos cárnicos) (Bourgeois et al., 1994).

Multiplicación de los microorganismos en los alimentos

Para que los microorganismos puedan multiplicarse y desarrollarse, necesitan de nutrientes para su crecimiento óptimo, y los alimentos poseen los nutrientes necesarios para ellos, por ende, se les considera un medio óptimo para su crecimiento. Sin embargo, no todos los alimentos son medios óptimos para todas las bacterias, pues se debe tomar en cuenta la composición del medio para conocer el tipo de microorganismos que pueden crecer y los factores que afectan el desarrollo de otros (Madigan et al., 2010).

Los factores que pueden afectar el desarrollo de diversos microorganismos en los alimentos se conocen como factores intrínsecos y extrínsecos; que como su nombre lo indica los factores “intrínseco” son aquellos que perteneces a la composición interna del alimento (ej. Actividad de agua, pH, potencial óxido reducción, composición física y química, o la presencia de sustancias antimicrobianas), mientras que los factores “extrínsecos” son aquellos que, por razones ajenas al alimento, termina afectando el crecimiento de microrganismos (ej. Temperatura, humedad relativa, composición de la atmósfera, etc.) (Prescott et al., 2009).

La actividad de agua (A_w) en un alimento es un factor muy importante debido a que se necesita “agua” para el desarrollo de todo microorganismo, dado a que esto la A_w se refiere a la cantidad de agua disponible para el crecimiento microbiano y si valor puede variar de 0 a 1.0. Microorganismos como mohos y levaduras crecen en un A_w de 0.8 a 0.88, por otro lado, la menor A_w en la cual una bacteria patogénica puede desarrollarse, es 0,85. Los valores de actividad de agua favorables para el desarrollo bacteriano están entre 0,97 y 0,99. De ese modo, los alimentos con A_w dentro de esa variación favorecen a los agentes de enfermedades bacterianas (Prescott et al., 2009).

El pH se mide en una escala que va del 0 (muy ácido) al 14.0 (muy alcalino), siendo la escala de 7.0 un pH neutro. Microorganismos como mohos y levaduras pueden desarrollarse en medios ácidos sin problemas, de hasta 3.0, y la mayoría de las bacterias se desarrollan mejor en pH neutro que va de 6.0 hasta 8.5 (Vásquez de Plata, 2003). Considerando que la mayoría de los alimentos poseen un pH entre 4.6 a 7.0, se puede decir que los alimentos son favorables para el desarrollo de estos microorganismos. Otro factor importante es el potencial de oxidoreducción (Eh), que consiste en el intercambio de electrones entre sustancias químicas, que en el caso de los microorganismos aerobios se necesitan valores de Eh positivos para su crecimiento. En ese grupo, están casi todos los mohos, levaduras oxidativas y muchas bacterias, principalmente las deterioradoras de alimentos (*Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, etc.) y algunas bacterias patogénicas aeróbicas (como *Bacillus cereus*). Mientras que en el caso de los microorganismos anaerobios se necesitan valores de Eh menores, sin embargo, el desarrollo puede darse en ambas condiciones, con aire o sin él, y está conformado principalmente por microorganismos aerobios facultativos. En ese grupo están las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*. Los mohos y levaduras importantes para la ciencia de los alimentos son aeróbicos, raramente son facultativos (Prescott et al., 2009).

La composición física del alimento es importante, pues dependiendo de su consistencia (líquida o sólida) se puede considerar el riesgo de que un microorganismo invada el alimento. Por ejemplo, si un alimento que se encuentra constituido por una corteza o tenga una capa que se pueda extraer, interviene en la capacidad de un microorganismo para invadir todo el alimento a comparación de un alimento líquido y homogéneo (por ej. Jugos, leche, agua, etc.), debido a que una vez que el microorganismo entra en contacto con alimento la probabilidad de contaminar totalmente todo el producto aumenta. Por otro lado, la composición química también interviene de forma significativa en la exigencia de los microorganismos para su crecimiento, una característica microbiana de ellos es su capacidad de aprovechar los sustratos de la composición de los alimentos, como la fuente de carbono (carbohidratos), la fuente de nitrógeno (aminoácidos), fuente de vitamina y de sales minerales (Thatcher, 2004).

Los factores extrínsecos que más afectan el desarrollo microbiano en los alimentos es la temperatura y la humedad relativa, a pesar de que los microorganismos existentes son capaces de proliferar a diferentes intervalos. Desde -8° a $+90^{\circ}\text{C}$ ($17,6$ a 194°F), la temperatura óptima para casi todos los patógenos es 35°C (95°F). La temperatura puede afectar la duración de la fase latente, la velocidad de crecimiento, las exigencias nutricionales y la composición química y enzimática de las células de los microorganismos. La humedad relativa influye directamente sobre la actividad de agua del alimento. Si un alimento con baja actividad de agua está almacenado en un ambiente con alta humedad relativa, la actividad de agua de ese alimento aumenta, permitiendo la multiplicación de microorganismos (Castellari et al., 2015).

Y, por último, la composición de la atmósfera puede afectar o beneficiar la composición de los alimentos, por lo que es importante considerar la influencia de bióxido de carbono (CO_2), ozono (O_3) y los organismos indicadores. Las atmosferas controladas son utilizadas para el almacenaje de alimentos en atmósferas gaseosas (como CO_2 o O_3) para tardar la putrefacción por hongos filamentosos, por lo que se usa principalmente en alimentos cárnicos, frutas y verduras. Los organismos indicadores en un alimento no representan un peligro directo para la salud, sin embargo, son grupos o tipos de microorganismos que, por su origen, procedencia, resistencia térmica, temperatura óptima para desarrollo y otras características, pueden señalar una exposición, manipulación y conservación inadecuadas del producto a consumir por las personas. Para indicar una contaminación de origen fecal o falla en la higiene durante el proceso. Las bacterias coliformes y la *Escherichia coli* son dos indicadores bastante usados con ese propósito. Deben ser de detección rápida y fácil; ser fácilmente distinguibles del microbiota natural de alimentos y del agua; tener el mismo origen y procedencia que el organismo patogénico; tener características de multiplicación y muerte similar al microorganismo patogénico para el mismo tipo de alimento; y estar ausente o en cantidad mínima en el alimento cuando el patógeno esté ausente (Palomino et al., 2018).

Importancia de prácticas higiénicas en los manipuladores de alimentos y la aplicación de Normas Oficiales Mexicanas

Las prácticas higiénicas son un pilar fundamental en la seguridad alimentaria. Para los manipuladores de alimentos, estas prácticas adquieren una relevancia especial, ya que son los responsables directos de garantizar que los productos que llegan a los consumidores estén libres de contaminantes y sean seguros para el consumo (Gómez, 2007)

La implementación de buenas prácticas higiénicas promueve la prevención de enfermedades, ya que una manipulación inadecuada de alimentos puede producir la proliferación de bacterias u otros microorganismos patógenos que causan enfermedades transmitidas por alimentos, por lo que, busca la protección de la salud pública al seguir conductas adecuadas que le permita a los manipuladores de alimentos proteger la salud de toda la población y así mismo evitar brotes de enfermedades que puedan afectar a un número de personas o generar un impacto socioeconómico en los sistemas de salud (Instituto Nacional de las Personas Adultas Mayores, 2023). Además de representar un impacto hacia la sociedad también se busca preservar la calidad del alimento, mediante una higiene adecuada para que ayude a mantener los alimentos en óptimas condiciones y se pueda preservar su sabor, aroma, textura y valor nutricional. Todo esto engloba el cumplimiento de normativas ya establecidas dentro de nuestros sistemas de regulación gubernamentales, las cuales son autoridades sanitarias que establecen normas y regulaciones con determinados estándares mínimos de higiene en manipulación de alimentos, de lo contrario al no cumplir con este tipo de normativas en cualquier establecimiento que manipule alimentos se pueden obtener sanciones legales y económicas (Gómez, 2007).

En la actualidad, las industrias alimentarias implementan en sus procesos de producción las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), ya que son un conjunto de procedimientos que garantizan una producción segura de alimentos, desde la recepción de materias primas hasta el producto final; y el Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP), el cual es un sistema preventivo que identifica, evalúa y controla los peligros que pueden comprometer la inocuidad de los alimentos (Palomino et al., 2018).

En cuanto a una normativa legal puede variar según el país y la región. En nuestro país, se hace uso de las normas oficiales mexicanas (NOM) las cuales se encargan de regular la manipulación de alimentos como en la NOM-251-SSA1-2009, que establece cuáles son los requisitos mínimos de buenas prácticas de higiene, asimismo también se pueden encontrar NOM para la medición parámetros aceptables en base al microorganismo que presente determinado alimento. El Codex Alimentarius es una colección internacional de normas alimentarias elaboradas por la comisión del Codex Alimentarius, que sirve como referencia para muchos países, así como también se hace uso de reglamentos de la unión europea (UE), ya que cuenta con una amplia legislación alimentaria, que establece normas detalladas sobre la producción procesamiento y comercialización de alimentos; y por último se puede recurrir a las normas de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) que regula los alimentos en Estados Unidos y establece normas de seguridad alimentaria que deben de cumplir los fabricantes y distribuidores (Palomino et al., 2018).

Como ya se mencionó anteriormente, nos encontramos regulados por Normativas Oficiales para el cumplimiento de buenas prácticas y para determinar si un alimento es libre de ser algún potencial riesgo biológico, se establece en cada norma que deben ser sometidos a un análisis microbiológico previo, para determinar la aceptabilidad de ese producto dentro del mercado y que no cause daño. Los microorganismos que principalmente se buscan en este tipo de análisis son microorganismos indicadores de contaminación y en algunos casos en específico microorganismos patógenos (Morales et al., 2012).

¿Qué son las BMA, coliformes totales y coliformes fecales?

El análisis microbiológico de un alimento se basa en buscar microorganismos que no pertenezcan al alimento de forma natural y que se le hayan adherido por cualquier tipo de contaminación. Uno de estos microorganismos que se encuentra fácilmente en cualquier alimento pero que es importante dentro de las NOM son las Bacterias Mesófilas Aerobias (BMA), dichos microorganismos tienen la capacidad de crecer en presencia de oxígeno y cuya temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre los 20°C y 37°C, por lo que son bacterias que se encuentran en el medio ambiente y son de fácil crecimiento en temperatura ambiental normal (Secretaría de Salud, 1995).

Por otro lado, se le considera coliformes totales (CT) a las bacterias en forma de bacilos cortos gramnegativos, aerobios o anaerobios facultativos, sin formación de espora, que fermentan la lactosa con producción de ácido y gas dentro de las 48 horas cuando se incuban a 35°C, y aunque su presencia no indica que sea por contaminación fecal, se pueden encontrar en alimentos principalmente por una contaminación general (utensilios sucios, polvo, mala cocción, etc.) (Secretaría de Salud, 1995). Mientras que los coliformes fecales (CF), como lo indica su nombre son derivado por una contaminación fecal, son bacterias en forma de bacilos cortos gramnegativos, aerobios o anaerobios facultativos, que tiene la característica principal de fermentar la lactosa con producción de ácido y de gas dentro de las 48 horas a $44.5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.2\text{ }^{\circ}\text{C}$, y entre las especies bacterianas que más se destacan se pueden encontrar *Escherichia coli* o *Salmonella* sp (Secretaría de Comercio y Fomento Industrial, 2015).

Entre las normas más citadas en el área de salud alimentaria en nuestro país son la NOM-210-SSA1-2014: Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos, la NORMA Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994: Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa, NOM-113-SSA1-1994: Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa. En cada una de estas normas se marca los procedimientos detallados para el procesamiento de cada muestra de alimento que necesite de un análisis microbiológico. Por ejemplo, la mayoría de las normas que buscan la presencia de microorganismos indicadores utilizan el método de conteo por vestido en placa a partir de diluciones o para la búsqueda de bacterias más específicas se usa una serie de procedimientos de enriquecimiento de la bacteria hasta la aplicación de técnicas moleculares para la identificación de la especie patógena (Secretaría de Salud, 1995).

Por ejemplo, para la identificación de una especie patógena en alimentos a partir de la una prueba presuntiva de CF lo primero es la realización de un análisis microbiológico en donde se incluyen las siguientes pruebas:

- La tinción de Gram es un procedimiento importante en el laboratorio para la diferenciación de bacterias, basándose en la forma y en la estructura de su pared celular. Bajo la observación de un microscopio, la tinción de Gram permite observar una gran variedad morfológica de distintas bacterias, como formas de cocos y bacilos

(y sus variaciones); también, tiñe las bacterias de acuerdo a la composición de su pared celular, ya que las bacterias que poseen una pared celular formada por una capa gruesa de peptidoglicano se tiñe de color morado (cristal violeta) y son nombradas como Grampositivas, mientras que las Gramnegativas se tiñen de color rosa (safranina) debido a que tienen una capa delgada de peptidoglicano y poseen una membrana externa rica en lípidos (Casasola. 2022).

- El agar hierro triple azúcar o conocido por sus siglas en inglés TSI, es una prueba bioquímica de laboratorio que determina la capacidad de un microorganismo de fermentar distintos azúcares y producir sulfuro de hidrógeno (H_2S). Este medio tiene en su composición tres azúcares (glucosa, lactosa y sacarosa) y un indicador de pH (rojo fenol) y sulfato ferroso. Cuando un microorganismo posee la capacidad de fermentar los tres azúcares el resultado de este proceso es la acidificación del medio y debido al indicador, todo el tubo vira a un amarillo nombrando esta reacción como ácido sobre ácido (A/A), en caso de una reacción ácida sobre alcalina (A/K) es el resultado de que el microorganismo no pueda fermentar la glucosa, y por ende solo el pico del tubo (zona donde se estiró) virará a amarillo y el fondo permanecerá sin cambios o se alcaliniza; sin embargo, si todo el medio se alcaliniza como una reacción alcalina sobre alcalina (K/K) se observa el tubo completamente rojo o un tono más intenso del medio original. Por otro lado, la presencia de gas o burbujas en el agar es el resultado de los productos en la fermentación y si el microorganismo es capaz de producir H_2S , este compuesto reacciona con el sulfato ferroso, dando como resultado la formación de un precipitado negro en el agar (Bailón, 2003).
- El medio citrato de Simmons se ocupa para determinar si un microorganismo es capaz de utilizar citrato como única fuente de carbono, ya que el medio está compuesto por citrato de sodio como única fuente de carbono, fosfato de amonio como fuente de nitrógeno y azul de bromotimol (indicador de pH) para observar el viraje del medio como resultado de los productos del metabolismo del citrato. Los microorganismos que son capaces de metabolizar el citrato producen una reacción alcalina, lo que hace que el indicador cambie de color verde a azul, para que de esa manera se reporte el resultado como citrato positivo, en caso de que el microorganismo no posee esta

capacidad metabólica, el medio no presentara ningún cambio y se quedara de color verde, equivalente al resultado de citrato negativo (Bailón, 2003).

- El agar lisina hierro (LIA) es una prueba a bioquímica que ayuda a determinar la capacidad de un microorganismo para descarboxilar un aminoácido (lisina y arginina) para formar una amina (compuesto alcalino). Si una bacteria posee enzimas descarboxilasas específicas, capaces de reaccionar a los aminoácidos en su grupo carboxilo dando como resultado la formación de una amina y un anhídrido carbónico, esto provoca en el medio LIA que el pH se eleve y debido al indicador (púrpura de bromocresol) el medio se vuelve púrpura (Bailón, 2003).
- La reacción de ureasa es una prueba bioquímica que se realiza en agar urea de Christensen, en donde se determina la capacidad de una bacteria para desdoblar la urea y formar dos moléculas de amoníaco por la acción de la enzima ureasa, debido a la composición del medio con el indicador rojo de fenol si la reacción es positiva el medio se alcaliniza y vira a un color rosado a rojo (ej. *E.coli*), sin embargo, si la reacción es negativa el medio conserva su color amarillo (Bailón, 2003).
- MIO es un medio de cultivo semisólido que forma parte de las pruebas bioquímicas básicas, debido a que ayuda a observar la movilidad, la producción de indol y la actividad de la enzima ornitina descarboxilasa de una bacteria. Las bacterias que tienen movilidad, es debido a que poseen en su estructura flagelos que les permite ser un organismo móvil, por lo que en este medio las bacterias con movilidad positiva (+) se observará como una turbidez difusa dentro del medio, mientras que los no móviles (-) se mantiene inmóvil la línea de inoculación inicial. Algunas bacterias pueden oxidar al aminoácido triptófano para formar tres metabolitos principales: indol, escatol e indolacético, para que al momento que se añade el reactivo de Kovács el indol liberado reaccione con el grupo aldehído de p- dimetilaminobenzaldehído (sustancia activa del reactivo de Kovács) y se forme un complejo de color rojo que se reporta como indol (+), de ser lo contrario indol (-) donde no se formará ningún complejo, no habrá ningún cambio en el reactivo de Kovács agregado. Por último, la descarboxilación de ornitina será positiva, cuando las bacterias poseen enzimas descarboxilasas específicas capaces de atacar al aminoácido L-ornitina, como resultado de la reacción alcalina el medio mantendrá su coloración purpura, de lo

contario el medio virará a un color amarillo, resultado de una descarboxilación de ornitina negativa. (Bailón, 2003).

- La prueba de oxidación-fermentación se realiza en el medio O/F, este medio ayuda a determinar el metabolismo de un microorganismo. Algunas bacterias tienen la capacidad de metabolizar un carbohidrato solo en condiciones aerobias (presencia de O₂), mientras que otras producen ácido tanto aerobias como anaeróticamente (sin O₂). La fermentación es un proceso anaerobio que requiere la fosforilación inicial de la glucosa previamente a su degradación, mientras que la oxidación es un proceso estrictamente aerobio debido a la ausencia de compuestos inorgánicos (nitrato y sulfato) para la oxidación directa de glucosa no fosforilada. Tanto la fermentación como la oxidación producen un medio ácido y debido al indicador (azul de bromotimol) el medio vira de un color verde a amarillo (Bailón, 2003).

Para complementar la identificación fenotípica se puede realizar un análisis molecular, en donde una vez aislado el ADN bacteriológico, se realiza la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el cual es un método para la amplificación de un segmento de ácido nucleico. En este proceso se implican tres pasos: la desnaturalización, donde el ácido nucleico se somete a una temperatura elevada (92-98°C) para provocar que las dos hebras de ADN se separan y formen hebras individuales, continuando con la hibridación cuando se reduce la temperatura (65-72°C) para que los cebadores se unan a las secuencias complementarias de las hebras molde desnaturalizadas, y el último paso denominado como extensión, el cual se caracteriza por el ADN polimerasa con estabilidad térmica que añade los cuatro deoxinucleósidos trifosfato (dNTP) a los extremos de los cebadores hibridados de manera que se produce una replicación de la cadena a lo largo de la región comprendida. Todos estos pasos son el resultado de un solo ciclo, el cual servirá como molde para el siguiente ciclo, por lo que la PCR es un proceso que tiene una amplificación exponencial (Stephenson, 2010).

Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA): la importancia de *Escherichia coli* como bacteria indicadora de contaminación fecal en alimentos

Según la OMS define las ETAs como “síndromes originados por la ingestión de alimentos o agua, que contengan agentes etiológicos en cantidades suficientes para afectar la salud del consumidor en nivel individual o en grupos de población”; por lo que pueden representar un problema en el ámbito de carácter social, tecnológico, económico, cultural y político. Principalmente este problema tiene mayor recurrencia en los países en vías de desarrollo, debido a esto las autoridades e instancias gubernamentales y otras instituciones afines han tratado de dirigir campañas de control y vigilancia para la asistencia continua, con el fin de prevenir y corregir acciones que puedan ser peligrosas o puedan causar algún daño en la salud de la población (Kopper et al., 2009).

Las ETAs se pueden producir en cualquier etapa de la cadena alimentaria, en donde se pueden involucrar desde los procesos de producción, transporte, almacenamiento, elaboración, distribución y consumo de alimentos. Además de que los grupos más vulnerables para este tipo de enfermedades principalmente se encuentran compuestos por niños, mujeres embarazadas y ancianos (Instituto Nacional de las Personas Adultas Mayores, 2023).

En el año 2015 la OMS analizó la carga mundial de enfermedades, mostrando que existían 31 riesgos globales que causaron 600 millones de casos de enfermedades transmitidas por los alimentos y 420 000 muertes; donde las causas más frecuentes de ETAs eran agentes de enfermedades diarreicas, particularmente Norovirus y *Campylobacter* spp. Los niños menores de 5 años presentan un alto riesgo en la población, representando un 40% de la carga, con 125 000 niños que mueren cada año a causa de ETAs. Mientras que, en nuestro país, de acuerdo con el sistema nacional de vigilancia epidemiológica, México registró en 2022, 3 457 964 casos de enfermedades infecciosas intestinales, con más de 23 000 casos por intoxicación alimentaria bacteriana (Monge, 2020).

La sintomatología que puede causar una ETA puede comenzar a tan sólo unas horas de haber ingerido el último alimento contaminado independientemente de la enfermedad que se

presente, teniendo en común los síntomas más frecuentes como diarrea, cólicos estomacales o dolor abdominal, náuseas, vómito y escalofríos. La respuesta que presente la persona afectada ante la enfermedad va a depender de la cantidad del alimento que haya consumido o de la carga microbiana que contenga (Instituto Nacional de las Personas Adultas Mayores, 2023).

Como ya se mencionó antes una ETA es producida por la presencia de contaminación en los alimentos que se consumen, un factor que causa el descuido para contraer este tipo de enfermedades es debido a las razones socioeconómicas, ya que se pueden presentar casos en las que solo se cuentan con acceso a alimentos de bajo costo, cuya calidad e inocuidad en muchos casos es por lo menos dudosa. Con lo anterior también se puede razonar que puede ocurrir en el caso de los alimentos preparados para la venta al público e incluso en el ámbito del hogar, debido a las prácticas deficientes utilizadas para su preparación, manipulación y consumo. Debido a esto se puede decir que hasta los propios consumidores pueden originar problemas de contaminación cuando tocan directamente los alimentos con las manos sucias o con el contacto del alimento con utensilios o superficies contaminadas (Instituto Nacional de las Personas Adultas Mayores, 2023).

Escherichia coli es una bacteria que se encuentra en el sistema digestivo de tanto animales como de seres humanos, por lo que, su importancia radica en formar parte de los microorganismos indicadores de contaminación fecal que se pueden detectar en alimentos y en agua. En México, las gastroenteritis por *Escherichia coli* forman parte de una de las ETAs más comunes que presentan en nuestro país, esta bacteria no tiene un reporte oficial en base a estadísticas del número de casos que se presentan al año, sin embargo, se sabe que por lo menos cientos de miles de personas se enferman a causa de la *Escherichia coli* (Engleberg et al., 2013).

Generalmente las cepas de *Escherichia coli* son inofensivas, pero algunas son patógenas y pueden contaminar los alimentos y llegan a producir una gastroenteritis más agresiva e incluso llegar a la muerte. Entre las fuentes más comunes de infecciones transmitidas por alimentos se puede tener en cuenta lácteos y jugos no pasteurizados, carne elaborada y cocida de manera insuficiente, frutas y hortalizas crudas, además de un manejo y almacenamiento

insalubre de los alimentos preparados. Hasta el momento los aislamientos de esta bacteria se han diferenciado en base a 3 antígenos de superficie principales para el serotipo: los antígenos O (somáticos), H (flagelos), y K (cápsula), hasta ahora se han identificado más de 180 antígenos O, más de 50 antígenos H y 80 antígenos K (Vidal et al.,2007).

Las cepas de *Escherichia coli* que provocan enfermedades diarreicas de importancia clínica se clasifican en grupos específicos basados en su virulencia, mecanismos de patogenicidad, síndrome clínico y serotipos O:H diferentes. Algunas de estas clases incluye cepas de *E. coli* enteropatógena (EPEC), cepas de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), cepas de *E. coli* de adherencia difusa (DAEC), cepas de *E. coli* enteroinvasora (EIEC), cepas de *E. coli* enteroagregante (EAggEC) y cepas de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC). Una de las cepas de *E. coli* más conocidas y peligrosas es la productora de toxina Shiga (STEC). Esta bacteria produce una potente toxina que puede dañar las células del intestino y los riñones, causando una enfermedad denominada síndrome urémico hemolítico (SHU). El SHU es una complicación grave que puede llevar a la insuficiencia renal, trastornos neurológicos y, en casos severos, incluso a la muerte (Engleberg et al., 2013).

Los síntomas de una infección por *E. coli* pueden variar desde una diarrea leve hasta una enfermedad más grave caracterizada por diarrea sanguinolenta, cólicos abdominales intensos, vómitos y fiebre. Los niños pequeños, los ancianos y las personas con sistemas inmunológicos debilitados son particularmente vulnerables a las complicaciones de esta infección. Para prevenir las infecciones por *E. coli*, es fundamental adoptar buenas prácticas de higiene alimentaria. Algunas medidas preventivas clave incluyen (Hannaoui et al., 2009):

- Cocinar adecuadamente los alimentos: Asegurarse de cocinar los cortes de carne por encima de los 66°C, especialmente la carne picada, a una temperatura interna adecuada para eliminar las bacterias que se encuentre preferentemente mayor a 71°C.
- Lavarse las manos con frecuencia: Lavarse las manos con agua y jabón antes, durante y después de manipular alimentos.
- Consumir agua potable: Evitar el consumo de agua no tratada o de dudosa procedencia.
- Lavar frutas y verduras: Lavar cuidadosamente las frutas y verduras antes de consumirlas.

- Evitar la contaminación cruzada: Separar los alimentos crudos de los cocidos y utilizar utensilios limpios para cada tipo de alimento.

La detección y control de la *E. coli* en los alimentos son esenciales para garantizar la seguridad alimentaria. Los laboratorios de microbiología utilizan diversas técnicas de cultivo y detección molecular para identificar la presencia de esta bacteria en los alimentos y en el medio ambiente. Además, las autoridades sanitarias implementan programas de vigilancia y control para prevenir y responder a los brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (Doyle et al., 2001).

La manipulación de jugos frescos en puestos ambulantes: un riesgo oculto

Uno de los productos más comunes que se encuentran en establecimientos ambulantes actualmente son los jugos frescos, ya que cumplen la función de mantenerte hidratado y refrescado, este producto lo podemos identificar fácilmente, ya que se puede definir como una bebida elaborada a partir de la extracción del líquido o pulpa natural de frutas o verduras frescas, sin la adición de colorantes, saborizantes, conservadores, ni azúcares añadidos. Principalmente, este tipo de bebidas se caracteriza de otras ya que no lleva ningún proceso industrial, como la pasteurización o aditivos artificiales. Por otro lado, algunas instituciones gubernamentales para poder englobar este tipo de bebidas en normativas sanitarias, los jugos frescos se incluyen en la categoría de bebidas no alcohólicas, las cuales definidos como “cualquier líquido, natural o transformado, que proporcione al organismo elementos para la nutrición” según la Secretaría de Salud de México (SSA, 1994).

La venta de jugos frescos en puestos ambulantes es una práctica común en muchas ciudades, ofreciendo una opción refrescante y aparentemente saludable a los consumidores. Sin embargo, detrás de esta aparente inocuidad se esconde un riesgo potencial para la salud, si las prácticas de manipulación de alimentos no son las adecuadas. La elaboración y venta de jugos frescos en la vía pública plantea numerosos desafíos en términos de higiene y seguridad alimentaria (Paredes et al., 2013). La falta de infraestructura adecuada, la exposición a contaminantes ambientales y la carencia de capacitación del personal pueden dar lugar a la proliferación de microorganismos patógenos que contaminan los alimentos y ponen en riesgo

la salud de los consumidores. Los riesgos asociados a la manipulación de jugos frescos en puestos ambulantes (Ocaña et al., 2022):

- Contaminación por microorganismos: Las frutas y verduras utilizadas para la elaboración de los jugos pueden estar contaminadas con bacterias, virus o parásitos. Si no se lavan adecuadamente o si las herramientas de corte están sucias, estos microorganismos pueden transferirse al jugo.
- Condiciones de higiene inadecuadas: La falta de agua potable, jabón y desinfectantes, así como la ausencia de instalaciones sanitarias adecuadas, dificultan el mantenimiento de una buena higiene personal por parte de los manipuladores de alimentos.
- Contaminación cruzada: El uso de los mismos utensilios para cortar diferentes tipos de alimentos sin lavarlos previamente puede provocar la contaminación cruzada y la propagación de microorganismos.
- Temperatura de almacenamiento: Los jugos frescos no siempre se almacenan a temperaturas adecuadas, lo que favorece el crecimiento de bacterias.
- Exposición a contaminantes ambientales: Los puestos ambulantes suelen ubicarse en zonas con alto tráfico vehicular o en entornos poco higiénicos, lo que aumenta el riesgo de contaminación por polvo, humo y otros contaminantes.

El consumo de jugos frescos contaminados puede provocar una amplia variedad de enfermedades, como las gastroenteritis (causada por bacterias como *Salmonella* sp, *Escherichia coli* o *Staphylococcus aureus*.) donde los síntomas incluyen diarrea, vómitos, náuseas y dolor abdominal, la hepatitis transmitida por virus como el virus de la hepatitis A, que puede causar inflamación del hígado, y otras enfermedades, que en casos más graves, el consumo de alimentos contaminados puede provocar enfermedades más severas, como el síndrome urémico hemolítico (SHU) o la salmonelosis (Gómez, 2007).

MÁRCO DE REFERENCIAS

En México, durante la última década no se ha reportado ningún brote importante causado por *Escherichia coli* en bebidas de jugos frescos; sin embargo, se han notificado casos de personas enfermas por infecciones por *E. coli* O157:H7. El último brote de importancia epidemiológica que marco a México a causa de *E. coli*, fue en 2002 en Chalco, Estado de México. En dicho caso se vieron afectados principalmente estudiantes de diversas escuelas, debido al consumo de alimentos y bebidas contaminadas provenientes de puestos ambulantes cercanos a las instituciones educativas, este suceso provocó el reporte de diversos casos de gastroenteritis severa, lo que alertó a las autoridades sanitarias para la implementación de controles más estrictos para la venta de comida en vía pública y con ello, prevenir futuros brotes. Debido a esto se realizó una búsqueda bibliográfica en diversos artículos relacionados con el tema:

Año de publicación	Autores	Descripción
2023	Paredes-Aguilar M. & Rivero-Montes L.	Se hizo un monitoreo microbiológico de 42 productos que se venden en el exterior de 13 escuelas primarias de Guayamas, Sonora, México. Aunque no se detectó la presencia de <i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> sp y <i>S. aureus</i> , los resultados reflejaron que el 66% de las muestras estaban compuestas por coliformes totales y el 21% se cuantificaron con coliformes fecales (Paredes et al., 2013).
2022	Ocaña de Jesús et al.	Se realizó un estudio en establecimientos públicos en México, dichos establecimientos venden jugo de naranja sin pasteurizar en diferentes mercados. A las muestras se les realizó un análisis fisicoquímico: pH, índice de madurez; así como determinaciones microbiológicas de bacterias mesófilas

		aerobias, coliformes fecales, hongos y levaduras. Los resultados arrojaron que ninguno de los jugos presentó crecimiento de hongos filamentosos, mientras que todos tenían levaduras, bacterias mesófilas y coliformes totales; y solo el 14% de las muestras no presentó coliformes fecales, por lo que <i>Salmonella</i> y <i>E. coli</i> estuvieron presentes en el 85% de las muestras (Ocaña et al., 2022).
2022	Figuroa-Ducoing et al.	El estudio trató de evaluar las prácticas higiénicas de jugos de naranja recién exprimidos de vendedores ambulantes en la ciudad de México mediante análisis microbiológicos, se analizó un total de 60 muestras y los resultados que obtuvieron fueron los siguientes: el 100% de las muestras dieron positivos a la presencia de bacterias mesófilas aerobias, el 58.3% dio positivo a coliformes totales, el 45% a coliformes fecales y el 8.3% dieron positivo a <i>E. coli</i> (Figuroa et al., 2022).
2017	Hernández-Anguiano et al.	En la ciudad de México se realizó un estudio en 162 muestras de jugo de nopal fresco no pasteurizados elaborados en Texcoco, durante la temporada de verano y primavera. Se utilizaron métodos microbiológicos estándar, técnica de PCR y métodos serológicos; y mediante los resultados obtenidos se dedujo que todas las muestras contenían coliformes totales y el 91% fueron positivas para <i>Escherichia coli</i> (Hernández et al., 2017).

Mediante el análisis de cada trabajo realizado acerca de la inocuidad de los jugos frescos que se venden en diversos puestos en México, se puede observar una relación muy marcada en sus resultados. Debido a que, a pesar de que se monitorearon lugares diferentes en distintos periodos de tiempo, la mayoría de las muestras que se sometieron a un análisis microbiológico descartaron la presencia de bacterias mesófilas, así como coliformes totales, coliformes fecales y en una parte porcentual por la presencia de microorganismos indicadores identificados, como *Escherichia coli* o *Salmonella* sp.

La presencia de bacterias mesófilas aerobias (BMA), coliformes totales, coliformes fecales o la presencia de un microorganismo indicador de contaminación fecal más específico, como *Escherichia coli*, en cualquier tipo de alimento que se prepara en un establecimiento de comida, representa el desinterés del productor por la inocuidad del alimento y por ende resaltan las malas prácticas higiénicas que se tienen al momento de la manipulación de dicho producto que se entregará al consumidor, y a su vez esto puede propiciar un riesgo potencial hacia la salud de la población. Debido a esto, es importante la realización de análisis microbiológicos de alimentos preparados en puestos públicos con mayor frecuencia, ya que ayuda a la prevención de brotes y promueven el uso de un control sanitario de puestos de comida ambulante.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El consumo de jugos frescos se ha vuelto un producto que ha aumentado su popularidad con el paso del tiempo, debido al aporte de sus múltiples beneficios, por lo que también se ha visto reflejado en el incremento de puestos ambulantes que los preparan y aunque ofrecen una opción de bebida accesible y percibida como saludable; se plantea una serie de riesgos significativos para la salud pública debido a las condiciones sanitarias en las que se preparan y venden, poniendo en riesgo la salud alimentaria y/o el bienestar de los consumidores. El principal problema radica en la falta de control y supervisión sanitaria en este tipo de negocios por parte de una institución de salubridad, como la Secretaría de Salud de México. A diferencia de algunos establecimientos formales, los puestos ambulantes no están sujetos a cumplir con estándares sanitarios o con el cumplimiento de normativas de higiene y, por ende, es más alta la probabilidad de contaminación microbiológica en los jugos frescos.

La manipulación incorrecta de las frutas y verduras que se ocupan en la preparación de jugos frescos es importante para evitar el crecimiento y propagación de microorganismos patógenos, como *E.coli*, que pueden causar enfermedades gastrointestinales severas. Por lo que, el lavado y desinfección de las frutas y verduras, es de suma importancia para la preparación de esta bebida; también influye el tipo de agua empleada tanto para lavar o limpiar equipo y utensilios. No usar la cadena de frío es otro punto por considerar, debido a que los jugos frescos son un producto sin pasteurizar y más si estas bebidas permanecen a temperatura ambiente elevadas por periodos prolongados, es muy probable que se acelere su proceso de deterioro y se facilite la proliferación de microorganismos dañinos. Otro aspecto fundamental es la higiene personal de los vendedores, la manipulación del dinero, la falta de lavado de manos frecuentes y el uso inadecuado o ausencia de guantes para la preparación de los jugos, que contribuyen directamente a contaminación cruzada.

Por lo tanto, el consumo de jugos en puestos ambulantes representa una problemática en la vulnerabilidad de los consumidores frente a las enfermedades transmitidas por alimentos e impactando en la salud pública y en la confianza de este tipo de comercio. Es por lo que se plantea la siguiente pregunta de investigación: ¿existirá la presencia de bacterias mesófilas aerobias, coliformes totales y coliformes fecales en jugos frescos de establecimientos ambulantes de la zona metropolitana de Puebla?

JUSTIFICACIÓN

El auge del consumo de jugos frescos se debe a la creencia generalizada de sus beneficios nutricionales y los consumidores buscan opciones rápidas y accesibles para incorporar vitaminas y minerales a su dieta, lo que ha generado un incremento en la demanda y ha impulsado el aumento el número de puestos ambulantes que ofrecen estas bebidas a bajos costos, lo que lo convierte una alternativa muy atractiva para un amplio sector de la población, especialmente para áreas urbanas como la Zona Metropolitana de Puebla. Sin embargo, esta conveniencia y precepción de salud se ven seriamente comprometidas por la falta de control, y supervisión sanitaria en este tipo de establecimientos informales. A comparación de los negocios de alimentos establecidos, los puestos ambulantes operan en una zona que llaman “zona gris regulatoria”, donde la ausencia de inspecciones rigurosas por parte de instituciones como la Secretaría de Salud de México permite que se ignoren sistemáticamente los estándares de higiene básicos, propiciando la contaminación microbiológica.

En consecuencia, el consumo de jugos en puestos ambulantes representa un riesgo potencial en las enfermedades transmitidas por alimentos, impactando negativamente en la salud pública, por lo que surge la urgente necesidad de cuantificar esta problemática en la Zona Metropolitana de Puebla a través de la determinación de la presencia de bacterias mesófilas aerobias, coliformes totales y fecales en jugos frescos; además, se justifica para proporcionar evidencia científica que respalde la implementación de medidas sanitarias y regulatorias efectivas para este tipo de comercios informales, protegiendo así el bienestar de la población.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la presencia de bacterias mesófilas aerobias (BMA), coliformes totales y coliformes fecales en jugos frescos de establecimientos ambulantes de la zona metropolitana de Puebla

Objetivos específicos

1. Realizar el monitoreo microbiano de BMA, coliformes totales y coliformes fecales en jugos frescos de establecimientos ambulantes de la zona metropolitana de Puebla.
2. Analizar en base a los estándares microbianos de la NOM-218-SSA1-2011, si se cumple con la carga microbiana aceptable de BMA, coliformes totales y coliformes fecales en jugos frescos de establecimientos ambulantes de la zona metropolitana de Puebla.
3. Aislar y caracterizar, tanto fenotípicamente como genotípicamente, a la bacteria *Escherichia coli* en jugos frescos de establecimientos ambulantes de la zona metropolitana de Puebla.
4. Realizar un perfil de resistencia a antibióticos a las cepas aisladas de *Escherichia coli* en jugos frescos de establecimientos ambulantes de la zona metropolitana de Puebla.

HIPÓTESIS

Hipótesis nula

Los jugos frescos que se venden en establecimientos ambulantes de la zona metropolitana de Puebla no cumplen con los estándares microbiológicos en base a la NOM-218-SSA1-2011 para el recuento de BMA, coliformes totales y coliformes fecales.

Hipótesis alternativa

Los jugos frescos que se venden en establecimientos ambulantes de la zona metropolitana de Puebla cumplen con los estándares microbiológicos en base a la NOM-218-SSA1-2011 para el recuento de BMA, coliformes totales y coliformes fecales.

DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

Tipo de estudio

Se trata de un estudio experimental, ya que busca realizar una evaluación sobre la eficacia de las buenas prácticas higiénicas al preparar jugos frescos en distintos puestos ambulantes; así mismo, también es un estudio de corte transversal ya que se hará el muestreo solo a vendedores ambulantes y se recolectaran las muestras a partir de las 10 a.m. hasta las 12 p.m.

Universo de estudio

Con el fin de evaluar la presencia de BMA, coliformes totales y coliformes fecales, así como la presencia de la bacteria *Escherichia coli* esta investigación fue dirigida al análisis de muestras de jugos frescos de puestos ambulantes de la zona metropolitana de Puebla (Figura 1), tomando de referencia los municipios más poblados que la componen, como San Andrés Cholula, San Pedro Cholula y Puebla:

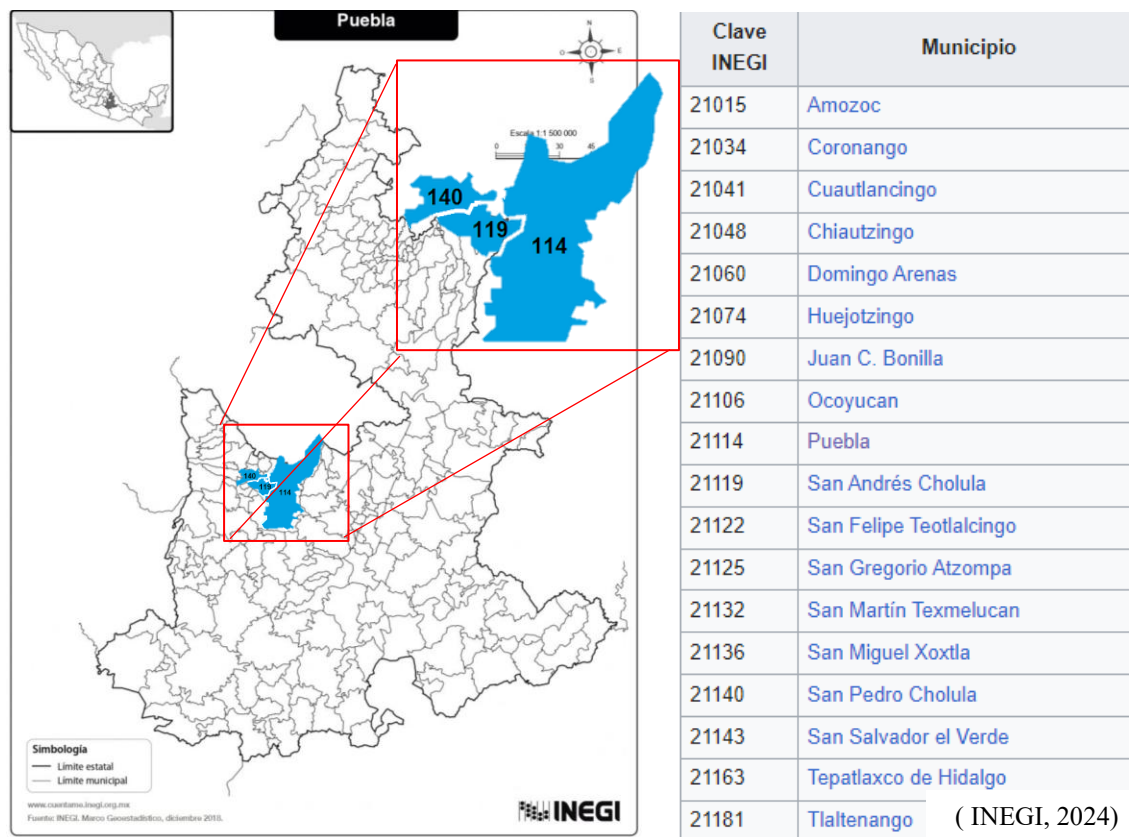


Figura 1. Mapa de la división municipal de la zona metropolitana de Puebla con su código de INEGI.

La zona que será muestreada se dividirá en 4 áreas como en la Figura 2.

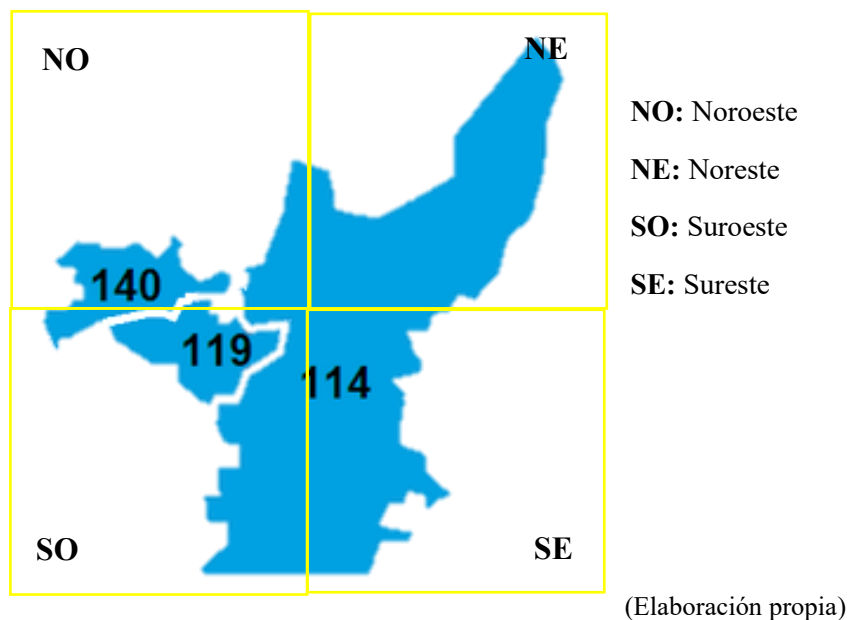


Figura 2. División de muestreo de la zona metropolitana de Puebla

Tamaño de la muestra

Por el tipo de estudio, se plantea analizar un número de 40 muestras.

Sede y lugar de estudio

Se contempla obtener muestras de puestos ambulantes (Figura 3) que se encuentren dentro de la zona metropolitana de Puebla, principalmente de los municipios ya antes mencionados anteriormente.



(Altamirano S., 2023)

Figura 3. Puesto ambulante de jugos

Criterios de inclusión

Muestras de jugos frescos de naranja, zanahoria, betabel, jugo verde y guayaba, obtenidos de puestos ambulantes expuestos a condiciones ambientales (como aire y polvo) que se encuentren dentro de la zona metropolitana de Puebla.

Criterios de exclusión

Muestras de jugos frescos que se encuentren combinados a excepción del jugo verde, así mismo, muestras de jugos que sean elaborados en puestos locales con acceso a agua potable y que estén fuera de la zona metropolitana de Puebla.

Análisis estadístico de la información

Para el análisis de datos de esta investigación se hará el uso de la estadística descriptiva, mediante el uso de tablas y gráficos que apoyen a la explicación de los resultados.

METODOLOGÍA

Lugar y selección de muestras

La recolección de muestras se realizó en puestos ambulantes que ofrecen a la venta jugos de frutas frescas y sus derivados, que se encuentren dentro de los municipios que componen la zona metropolitana de Puebla, se buscó principalmente jugos de venta común como jugo de betabel, zanahoria, jugos verdes, etc. Así mismo se realizó un Checklist (anexo 1) al puesto ambulante que se seleccionó para el control de datos del lugar.

Transporte y conservación de muestras

Todas las muestras se recolectaron en los envases que proporcionó cada establecimiento y se procurará transportarlas en un ambiente “termoestable” y óptimo (no mayor a 7°C) para que las enzimas que degradan al alimento se inactiven y los microorganismos entren en un estado de letargo. Para la conservación de las muestras al momento de transportar las se utilizó una hielera portátil con hielos para mantener estable el producto y evitar algún cambio en la estructura o propiedades de la bebida, y por ende se altere el resultado. Por último, el tiempo de transporte de las muestras, desde que es elaborado hasta que llegó al laboratorio, no excedió un tiempo máximo de 2 horas para poder ser procesadas o por lo menos ser refrigeradas.

Análisis microbiológico

Para el procesamiento de cada muestra se realizó primero la preparación de la muestra en base la NOM-110-SSA1-1994, Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico (Secretaría de Salud, 1995):

- 1) Preparación de la dilución primaria: Agitar la muestra manualmente con 25 movimientos de arriba a abajo en un arco de 30 cm efectuados en un tiempo de 7 segundos. Tomar 1mL de la muestra y diluir con 9mL del diluyente (agua peptonada) el cual debe encontrarse a una temperatura similar a ésta, evitando el contacto entre la punta de la micropipeta y el diluyente.
- 2) Preparación de las diluciones decimales adicionales:

- a) Transferir 1mL en otro recipiente conteniendo nueve veces el volumen del diluyente estéril a la temperatura apropiada, evitando el contacto entre la punta de la micropipeta y el diluyente.
- b) Repetir el punto anterior las veces necesarias hasta obtener la dilución deseada. Mezclar cuidadosamente cada tubo de diluyente como se describió anteriormente en el punto 1.
- c) Utilizar puntas diferentes para cada dilución inoculando simultáneamente las cajas que se hayan seleccionado. El volumen que se transfiera nunca debe ser menor al 10% de la capacidad total de la punta de micropipeta.
- d) Mientras se afora el líquido de la pipeta, la punta de ésta debe apoyarse en el interior del cuello del frasco y mantenerla en posición vertical, para lo cual este último debe inclinarse lo necesario.

Determinación de Bacterias mesófilas aerobias por la técnica de vertido en placa

Para el procesamiento de cada muestra se realizó primero la preparación de la muestra en base la NOM-092-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa (Secretaría de Salud, 1995):

- 1) Distribuir las cajas estériles en la mesa de trabajo de manera que la inoculación, la adición de medio de cultivo y homogenización, se puedan realizar cómoda y libremente. Marcar las cajas en sus tapas con los datos pertinentes previamente a su inoculación y correr por duplicado.
- 2) Después de inocular las diluciones de las muestras preparadas según la NOM-110-SSA1-1994, Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico, en las cajas Petri, agregar de 12 a 15 mL del medio de cultivo Agar Triptona-Extracto de Levadura (agar para cuenta estándar) preparado, mezclarlo mediante 6 movimientos de derecha a izquierda, 6 en el sentido de las manecillas del reloj, 6 en sentido contrario y 6 de atrás a adelante, sobre una superficie lisa y horizontal hasta lograr una completa incorporación del inóculo en el medio; cuidar que el medio no moje la cubierta de las cajas. Dejar solidificar.

- 3) Incluir una caja sin inóculo por cada lote de medio y diluyente preparado como testigo de esterilidad.
- 4) El tiempo transcurrido desde el momento en que la muestra se incorpora al diluyente hasta que finalmente se adiciona el medio de cultivo a las cajas, no debe exceder de 20 minutos.
- 5) Incubar las cajas en posición invertida (la tapa hacia abajo) a una temperatura de $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por un tiempo de 48 ± 2 horas.
- 6) En la lectura se selecciona aquellas placas donde aparezcan entre 25 a 250 UFC, para disminuir el error en la cuenta.
- 7) Contar todas las colonias desarrolladas en las placas seleccionadas, incluyendo las colonias puntiformes. Hacer uso del microscopio para resolver los casos en los que no se pueden distinguir las colonias de las pequeñas partículas de alimento.

Determinación de coliformes totales por la técnica de vertido en placa

Para el procesamiento de cada muestra se realizó primero la preparación de la muestra en base la NOM-113-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa (Secretaría de Salud, 1995):

- 1) Colocar en cajas Petri 1mL de la muestra líquida directa o de la dilución primaria, utilizando una pipeta estéril.
- 2) Repetir el procedimiento tantas veces como diluciones decimales se requiera sembrar, utilizando una pipeta estéril diferente para cada dilución.
- 3) Verter de 10 a 15 mL del medio de cultivo Agar Rojo-Violeta-Bilis-lactosa (RVBA), anteriormente mantenido a $45 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ en baño de agua. El tiempo transcurrido entre la preparación de la dilución primaria y el momento en que se vierte el medio de cultivo, no debe exceder de 20 minutos.
- 4) Mezclar cuidadosamente el inóculo con el medio con 6 movimientos de derecha a izquierda, 6 movimientos en el sentido de las manecillas del reloj, 6 movimientos en el sentido contrario al de las manecillas del reloj y 6 de atrás para adelante, sobre una superficie lisa y nivelada. Permitir que la mezcla solidifique dejando las cajas Petri reposar sobre una superficie horizontal fría.
- 5) Preparar una caja control con 15 mL de medio para verificar la esterilidad.

- 6) Después de que está el medio completamente solidificado en la caja, verter aproximadamente 4 mL del medio RVBA a $45 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ en la superficie del medio inoculado. Dejar que solidifique.
- 7) Invertir las placas y colocarlas en la incubadora a 35°C , durante 24 ± 2 horas.
- 8) Después del periodo especificado para la incubación, contar las colonias con el contador de colonias.
- 9) Seleccionar las placas que contengan entre 15 y 150 colonias. Las colonias típicas son de color rojo oscuro, generalmente se encuentran rodeadas de un halo de precipitación debido a las sales biliares, el cual es de color rojo claro o rosa, la morfología colonial es semejante a lentes biconvexos con un diámetro de 0,5 a 2,0mm.

Determinación de coliformes fecales por el método de el Numero Más Probable en tubos (NMP)

Para el procesamiento de cada muestra se realiza primero la preparación de la muestra en base la NMX-042-SCFI-2015, Análisis de agua, enumeración de organismos coliformes totales, organismos coliforme fecales (termotolerantes) y *Escherichia coli* - Método de número más probable en tubos múltiples (Secretaría de Comercio y Fomento Industrial, 2015):

- 1) Prueba presuntiva
 - a) Tomar cinco tubos con 20 mL con medio selectivo de enriquecimiento (Caldo lauril sulfato de sodio al 200%) con una campana de Durham previamente sumergida sin presencia de burbujas en su interior. Usar una pipeta limpia para transferir a cada uno de estos tubos 10mL de la muestra líquida
 - b) Incubar los tubos a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 24 ± 2 horas y observar si hay formación de gas, en caso contrario prolongar la incubación hasta 48 ± 2 horas
- 2) Prueba confirmativa
 - a) De cada tubo que muestre formación de gas y turbidez, tomar de 3 a 5 asadas y sembrar en un tubo con medio de confirmación (como el caldo EC o con caldo lactosa bilis verde brillante) este tubo contendrá una campana de Durham, para el

caldo lactosa bilis 2% verde brillante resembrado se incuba a $35 \pm 0,5$ °C por 24 ± 2 horas y el caldo EC a $44,5 \pm 0,2$ °C por $24 \text{ h} \pm 2$ horas.

- b) Examinar la producción de gas y turbidez. Registrar los tubos positivos de caldo lactosa verde brillante bilis 2% de cada muestra para compararlos con las tablas estandarizadas de la norma (Anexo 2) y determinar el N.M.P.
- c) Los tubos de caldo EC que presenten gas dentro de la campana de Durham se sembrarán en medios selectivos y diferenciales para *E.coli* (agar Mac Conkey y agar eosina azul de metileno) para el aislamiento de la bacteria y realizar pruebas bioquímicas (Tinción de Gram, TSI, LIA, MIO, OF, citrato, urea, rojo de metilo y la prueba de Voges Proskauer).

Antibiograma

De las muestras que se logró identificar la bacteria *E.coli* se le realizó una prueba a estas cepas de resistencia a diferentes antibióticos para bacterias Gramnegativas, también conocido como antibiograma, y se realizó de la siguiente manera:

- 1) Preparación de la suspensión bacteriana: se toma una muestra bacteriana aislada de un cultivo puro con un asa bacteriana estéril y se suspende en un caldo LB, utilizando una escala de turbidez de McFarland (como referencia para la concentración bacteriana).
- 2) Siembra en placa: Se selecciona el medio de cultivo agar LB que permite el crecimiento adecuado de la bacteria y se vierte en placas petri de tamaño 100 x 15mm., para que, una vez solidificado el medio se le coloque 100µL de la suspensión bacteriana sobre la superficie del agar y utilizando un asa Drigalsky estéril extender toda la suspensión mediante diferentes movimientos sobre todo el medio para asegurar una distribución homogénea.
- 3) Colocación de los discos de antibióticos: se ocuparán multidiscos de la marca Gutierrez Ramos Abel PT-35 Multibac I.D., con 12 antibióticos para bacterias Gramnegativas, que se colocarán sobre la placa utilizando pinzas estériles y asegurando un buen contacto con el agar.
- 4) Incubación: se incubarán las placas a 37°C de 18 a 24 hrs, colocando las placas con el agar hacia arriba.

- 5) Interpretación de resultados: después del periodo de incubación, se observan los halos de inhibición alrededor de los discos, los cuales se les mide el diámetro con una regla milimétrica para comparar los resultados de los diámetros con las tablas de interpretación estandarizadas, y lograr determinar si la bacteria es sensible, intermedia o resistente a cada antibiótico (Anexo 2).

Análisis molecular

Aislamiento de ADN genómico de bacterias Gramnegativas

Para este procedimiento se utilizó el Wizard genomic DNA Purification Kit A1120 de la marca Promega para el aislamiento de ADN genómico de bacterias Gramnegativas y así mismo, se siguió el protocolo del kit de la siguiente manera (Promega,2023):

- 1) Agregue 1 mL de la muestra bacteriana en caldo LB a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL.
- 2) Centrifugue a 10000 RPM durante 2 minutos para recoger las células. Retirar el sobrenadante.
- 3) Agregue 600 μ L de la Solución de Lisis de Núcleos. Pipetear suavemente hasta que las células estén resuspendidas.
- 4) Incubar a 80°C durante 5 minutos para lisar las células; luego enfriar a temperatura ambiente.
- 5) Agregar 3 μ L de la Solución de RNasa al lisado celular. Invertir el tubo de 2 a 5 veces para mezclar.
- 6) Incubar a 37°C durante 60 minutos. Enfriar la muestra a temperatura ambiente.
- 7) Agregar 200 μ L de la Solución de Precipitación de Proteínas al lisado celular tratado con RNasa. Vórtex vibrando a alta velocidad durante 20 segundos para mezclar la Solución de Precipitación de Proteínas con el lisado celular.
- 8) Incubar la muestra en hielo durante 5 minutos.
- 9) Centrifugar a 13 500 RPM durante 3 minutos.
- 10) Transferir el sobrenadante que contiene el ADN a un tubo de microcentrífuga limpio de 1.5 mL que contenga 600 μ L de isopropanol enfriado previamente. Nota: Puede quedar algo de sobrenadante en el tubo original que contiene el pellet de proteínas.

- 11) Dejar ese líquido residual en el tubo para evitar contaminar la solución de ADN con las proteínas precipitadas.
- 12) Mezclar suavemente por inversión hasta que los filamentos de ADN formen una masa visible.
- 13) Centrifugar a 13 500 RPM durante 2 minutos.
- 14) Verter con cuidado el sobrenadante y escurrir el tubo sobre papel absorbente limpio. Agregar 600 μL de etanol al 70% a temperatura ambiente y voltear suavemente el tubo varias veces para lavar el pellet de ADN.
- 15) Centrifugar a 13 500 RPM durante 2 minutos. Aspirar con cuidado el etanol.
- 16) Escurrir el tubo sobre papel absorbente limpio y deje que el pellet se seque al aire durante 10–15 minutos.
- 17) Agregar 100 μL de Solución de Rehidratación de ADN al tubo y rehidratar el ADN incubándolo a 65 °C durante 1 hora. Mezclar periódicamente la solución golpeando suavemente el tubo. Alternativamente, rehidrate el ADN incubando la solución durante toda la noche a temperatura ambiente o a 4 °C.
- 18) Almacenar el ADN a 2–8 °C.

PCR

Para la configuración de PCR, se utilizó de referencia el protocolo de Thermo Scientific DreamTaq PCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific, 2023):

- 1) Agitar suavemente y centrifugar brevemente el Master Mix de PCR DreamTaq (2X) después de descongelarlo.
- 2) Colocar un tubo de PCR (microtubo de 0.2mL) de pared delgada en hielo y agregar los componentes de la Tabla 1, para cada reacción final de 50 μL .

Tabla 1. Cantidades de cada componente para la preparación de un tubo de PCR.

DreamTaq PCR Master Mix (2X)	25 μL
Primer forward	1 μL
Primer Reverse	1 μL
Muestra de AND	1 μL
Agua libre de nucleasas	22 μL

Volumen total	50µL
----------------------	------

(Thermo Fisher Scientific, 2023)

- 3) Agitar suavemente las muestras y centrifugarlas.
- 4) Realizar la PCR utilizando un termociclador bajo las condiciones de ciclo térmico necesarias para PCR-gen 16S (Tabla 2) y rep-PCR (Tabla 3):

Tabla 2. Condiciones de ciclo térmico para PCR-gen 16s.

Pasos	Temperatura °C	Tiempo	Numero de ciclos
Desnaturalización inicial	95	5 min	35
Desnaturalización	95	40 seg	
Hibridación	55	40 seg	
Elongación	72	1:30 min	
Elongación final	72	10 min	

(Elaboración propia)

Tabla 3. Condiciones de ciclo térmico para rep-PCR.

Pasos	Temperatura °C	Tiempo	Numero de ciclos
Desnaturalización inicial	95	10 min	40
Desnaturalización	94	1 min	
Hibridación	35	1 min	
Elongación	65	5 min	
Elongación final	65	16 min	

(Elaboración propia)

Electroforesis

El procedimiento para hacer un gel de electroforesis de agarosa implica la preparación de una solución de agarosa, la formación del gel, la carga de las muestras y la ejecución de la electroforesis.

- 1) Preparación de 50mL la solución de agarosa:
 - a) Pesar 0.4g de agarosa (agarosa al 0.8%) y medir 50mL de buffer TAE 1X
 - b) Verter el buffet TAE 1X en un matraz o vaso de precipitados y agregar la agarosa en polvo. Agitar suavemente para disolver la agarosa.

- c) Calentar la solución hasta que la agarosa se disuelva completamente. Esto se puede hacer en un microondas, un baño de agua o una placa calefactora.
 - d) Dejar que la solución de agarosa se enfríe a una temperatura segura para verter (aproximadamente 55-60°C).
- 2) Formación del gel:
- a) Verter la solución de agarosa caliente en una caja de gel de electroforesis, asegurándose de que el peine esté correctamente colocado.
 - b) Dejar que el gel se solidifique. Para acelerar el proceso, se puede refrigerar la caja de gel.
- 3) Carga de las muestras:
- a) Mezclar las muestras con un tampón de carga que contenga colorantes (GelRed) para facilitar la observación de la separación.
 - b) Pipetear las muestras en los pocillos del gel, asegurándose de que estén bien ubicadas.
- 4) Ejecución de la electroforesis:
- a) Colocar el gel en la caja de electroforesis y cubra con el tampón (buffer TAE 1X) de ejecución.
 - b) Conectar la caja de electroforesis a una fuente de alimentación y ajuste el voltaje y el tiempo de acuerdo con las necesidades.
 - c) Los fragmentos de ADN se separarán según su tamaño, moviéndose a través del gel bajo la influencia del campo eléctrico.
 - d) Una vez que la electroforesis haya finalizado, puede visualizar el gel con una fuente de luz UV para observar las bandas de ADN.

MATERIAL Y REACTIVOS

Para la elaboración de este trabajo se necesitará del siguiente material:

- Hielera portátil
- Hielo
- Gradilla
- Cajas Petri 90x15 mm
- Cajas Petri 60x15 mm
- Micropipetas de 1 μ L, 10 μ L, 20 μ L, 200 μ L y 1000 μ L
- Puntillas de micropipeta 0.5-10 μ L (puntillas transparentes), 20-200 μ L (puntillas amarillas) y 100-1000 μ L (puntillas azules).
- Pipeta de 10mL
- Perilla de hule para pipeta
- Tubos con rosca
- Asa bacteriológica
- Pinzas estériles
- Asa de Digrafsky
- Tubos tipo Eppendorf de microcentrífuga (1.5 mL)
- Campanas de Durham
- Agua destilada
- Agua peptonada
- Agar Triptona-Extracto de Levadura (agar para cuenta estándar)
- Agar-rojo-violeta-bilis-lactosa (RVBA)

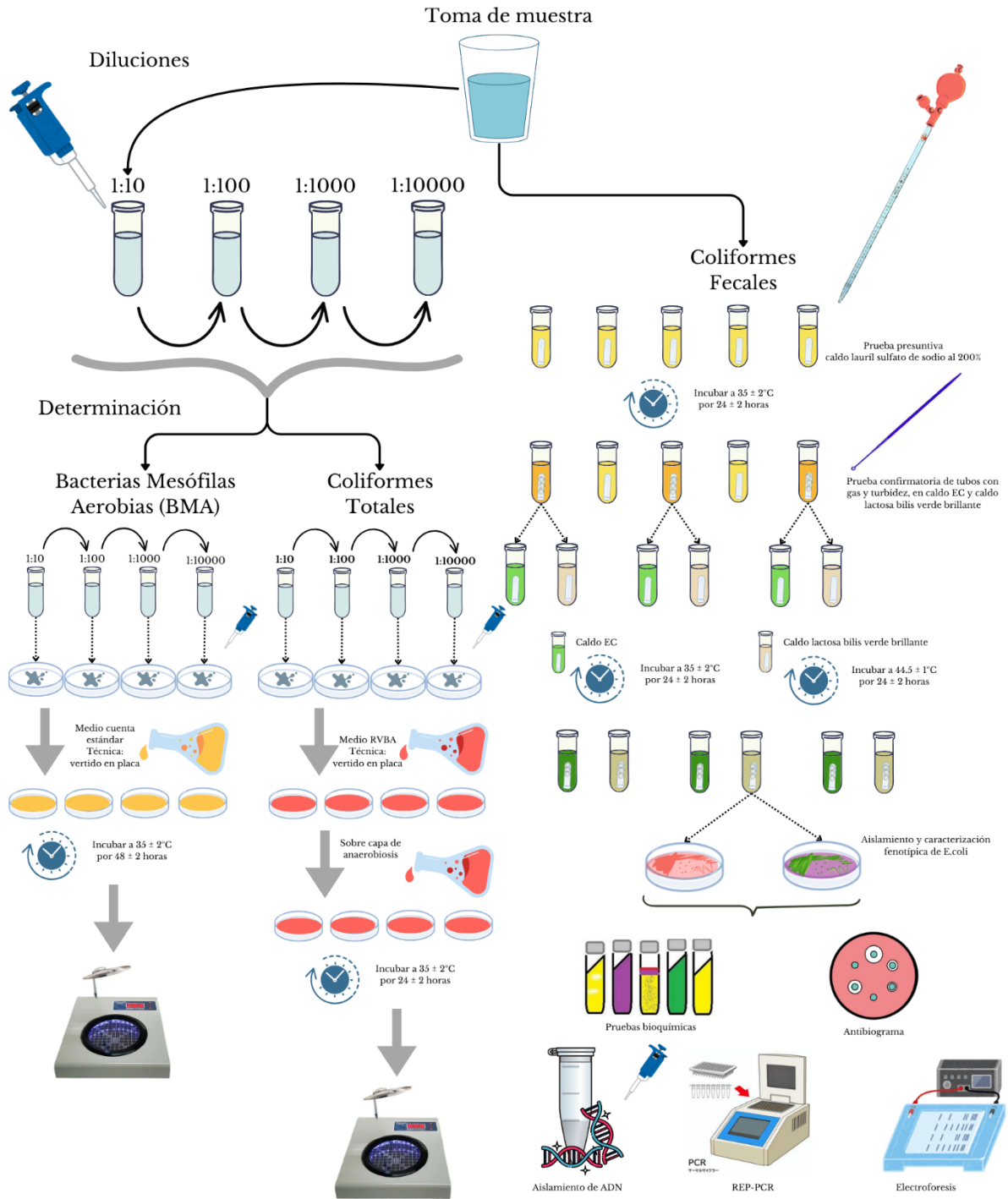
- Caldo lauril sulfato de sodio
- Medio EC (*Escherichia coli*)
- Caldo lactosa bilis 2% verde brillante
- Agar MacConkey
- Agar Eosina Azul de Metileno (EMB)
- Agar LB(Luria-Bertani)
- Caldo LB (Luria-Bertani)
- Pruebas bioquímicas: Tinción de Gram, oxidasa, catalasa, TSI, LIA, MIO, OF, citrato, urea, rojo de metilo y Voges Proskauer.
- Isopropano
- Etanol al 70%
- Agarosa LE
- Buffer TAE 50X
- GelRed
- Kit DreamTaq PCR Master Mix (2X)
- Multidisco para pruebas de sensibilidad bacteriana de Gutiérrez Ramos Abel PT-35 Multibac I.D.
- Wizard genomic DNA Purification Kit A1120 Thermo Fisher Scientific

EQUIPOS

- Cámara de electroforesis
- Baño de agua digital Daihan LabTech modelo LWB-106D
- Equipo de Cuenta Colonias CC-10, Aparatos de laboratorio BG.
- Termociclador o máquina de PCR Labnet - MultiGene

- Microcentrifuga PrismR Labnet Internatinal INC.
- Agitador Vórtex Cole-Palmer mixer
- Incubadora Memmert, Lab-Line Imperial III Incubator y Rios Rocha EC-41.
- Transiluminador de luz UV Superbright
- Espectrofotómetro NanoDrop One Thermo Scientific
- Fuente de poder para cámaras de electroforesis

DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO



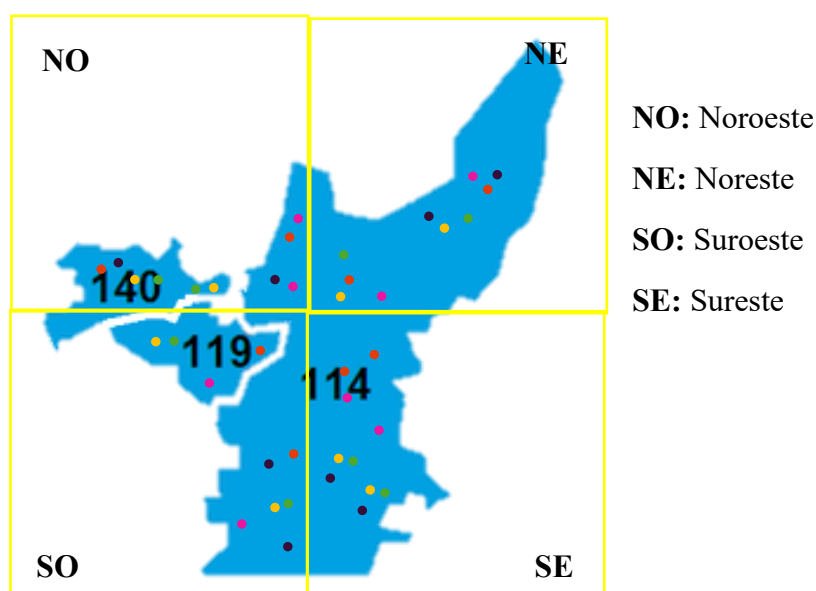
(Elaboración propia)

Figura 4. Diagrama de trabajo de la metodología de trabajo para el procesamiento de muestras de jugos frescos de puestos ambulantes

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Monitoreo

Con base a la Figura 2, se seleccionaron 10 muestras de cada uno de los cuadrantes sobre la zona a muestrear, en las cuales se eligió comprar 2 jugos de naranja, 2 jugos verdes, 2 jugos de guayaba, 2 jugos de betabel y 2 jugos de zanahoria, para que al final, multiplicado por cada región dieran un total de 40 muestras obtenidas de manera homogénea. Para una mejor comprensión del muestreo se representa de forma gráfica en la Figura 5.



	Muestra	NO	NE	SE	SO
●	Naranja	2	2	2	2
●	Jugo verde	2	2	2	2
●	Betabel	2	2	2	2
●	Guayaba	2	2	2	2
●	Zanahoria	2	2	2	2
Total global: 40 muestras					

(Elaboración propia)

Figura 5. Representación gráfica del muestreo de la zona metropolitana de Puebla

A partir de la recolección de cada muestra, se les fue asignando un código, así mismo se fue registrando de que área se estaba recolectando. Por lo que, en la Tabla 4 se muestra el código que se le asignó a cada muestra de jugo fresco y el área de donde se obtuvo.

Tabla 4. Códigos y zonas procedentes de cada jugo procesado de la Zona Metropolitana de Puebla.

Código	Zona	Tipo de jugo	Código	Zona	Tipo de jugo
J01	NE	Naranja	J21	NO	Jugo verde
J02	NE	Zanahoria	J22	NO	Naranja
J03	NE	Jugo verde	J23	NO	Naranja
J04	NE	Betabel	J24	NO	Jugo verde
J05	SO	Zanahoria	J25	NE	Guayaba
J06	SO	Jugo verde	J26	NE	Jugo verde
J07	SE	Betabel	J27	NE	Betabel
J08	SE	Zanahoria	J28	NE	Guayaba
J09	SE	Jugo verde	J29	NE	Naranja
J10	SE	Guayaba	J30	NE	Zanahoria
J11	SE	Naranja	J31	NO	Zanahoria
J12	SE	Guayaba	J32	NO	Guayaba
J13	SE	Jugo verde	J33	NO	Betabel
J14	SE	Naranja	J34	NO	Guayaba
J15	SO	Naranja	J35	SE	Zanahoria
J16	SO	Betabel	J36	SE	Betabel
J17	SO	Zanahoria	J37	SO	Guayaba
J18	SO	Guayaba	J38	SO	Betabel
J19	NO	Zanahoria	J39	SO	Naranja
J20	NO	Betabel	J40	SO	Jugo verde

En México, es común encontrar en un puesto ambulante de jugos frescos la presencia de carencias en relación a las buenas prácticas higiénicas, como lo menciona Figueroa-Ducoing et al. (2022), lo que resalta en este tipo de negocios es el poco conocimiento de los vendedores sobre el cuidado de la higiene y la salud del consumidor, ya sea al momento de conservar las frutas, el proceso de lavado o utilización de agua corriente, la limpieza de procesadoras o utensilios, el envasado y la conservación del producto final. Lo que arrojó como resultado en este trabajo de investigación que el 25% de las muestras fueron preparadas al momento y el 75% restante ya se encontraban preparados, en cuestión de las practicas higiénicas, el 65% presenta practicas deficientes y el 35% buenas prácticas, resultados muy similares a los que obtuvo Figueroa-Ducoing et al. (2022) en su investigación en jugos frescos de naranja en la ciudad de México.

Análisis microbiológico

Para la determinación de bacterias mesófilas aerobias y coliformes totales es necesaria la preparación de diluciones, basándose en la NOM-110-SSA1-1994. Se determinó que se realizarían la dilución primaria agitando la muestra manualmente con 25 movimientos de arriba a abajo en un arco de 30 cm efectuados en un tiempo de 7 segundos. Posteriormente, tomar 10mL de la muestra y diluir con 90mL del diluyente (agua de peptona) el cual debe encontrarse a una temperatura similar a ésta, evitando el contacto entre la punta de la micropipeta y el diluyente.

Para la preparación de las diluciones decimales adicionales, se transfirió 1mL en un tubo conteniendo nueve veces el volumen del diluyente estéril a la temperatura apropiada, evitando el contacto entre la punta de la micropipeta y el diluyente. Las muestras de jugos frescos elaborados con frutas más ácidas (ej. naranja, guayaba y jugo verde) se les realizó 3 diluciones (1:1000), mientras que para los jugos elaborados con vegetales menos ácidos (ej. zanahoria y betabel) se requirieron 4 diluciones (1:10000), como se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Diluciones ocupadas según el tipo de jugo fresco

Tipo de jugo	Diluciones			
Naranja	Directa	1:10	1:100	1:1000
Jugo verde	Directa	1:10	1:100	1:1000
Betabel	1:10	1:100	1:1000	1:10000
Guayaba	Directa	1:10	1:100	1:1000
Zanahoria	1:10	1:100	1:1000	1:10000

Colocando 1mL de cada dilución en una placa Petri para el procesamiento de BMA y coliformes totales, se obtuvieron 4 placas de diluciones por cada muestra. En el caso de los jugos que se les realizaron 3 diluciones se colocó 1mL de muestra directa para observar su crecimiento; todo esto se hizo en el fin de que la placa contable se encontrara entre estas diluciones y reducir el margen de error al momento de contar las unidades formadoras de colonias (UFC) de cada placa.

Cuantificación de bacterias mesófilas aerobias (BMA) por la técnica de vertido en placa

Siguiendo la metodología de la NOM-092-SSA1-1994, se ocupó el medio de cultivo de métodos estándar porque este es un medio de cultivo universal que brinda los nutrientes y condiciones necesarias para el crecimiento de una variedad de bacterias. Este medio de cultivo contiene peptona de caseína que provee de aminoácidos y nitrógeno para el crecimiento bacteriano, así como extracto de levaduras (contiene vitaminas B y otros nutrientes) y glucosa que actúa como fuente de carbono y energía para las bacterias (Casado, 2012).

Después de incubar las cajas inoculadas en agar de método estándar en posición invertida (la tapa hacia abajo) a una temperatura de $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por un tiempo de 48 ± 2 horas, se realizó la lectura en un contador de colonias seleccionando aquellas placas donde aparezcan entre 25 a 250 UFC, como se muestra en la Figura 6.

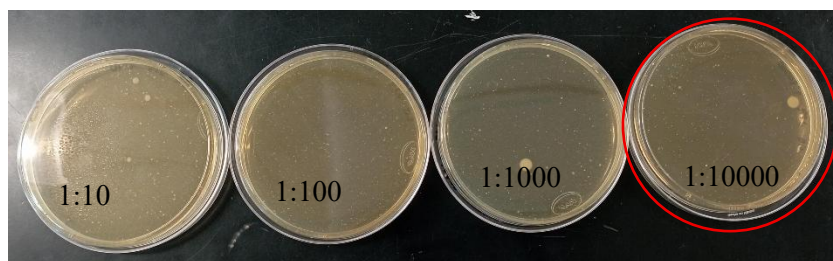


Figura 6. Selección de la placa representativa de BMA entre 25 a 250 UFC

A partir del conteo de UFC de cada dilución conocida en placa (Anexo 2), se multiplica el número de colonias por el factor de dilución para obtener el conteo total de UFC por volumen (mL o g) de la muestra original, para que sucesivamente de forma más clara se reflejan los resultados de cada muestra para comprender mejor los datos (Tabla 6).

Tabla 6. Resultados del conteo de UFC de bacterias mesófilas aerobias por mililitro de muestra en jugos frescos de la Zona Metropolitana de Puebla

Código	Tipo de jugo	BMA (UFC/mL)
J01	Naranja	3120
J02	Zanahoria	154000
J03	Jugo verde	6900

J04	Betabel	90
J05	Zanahoria	384000
J06	Jugo verde	14300
J07	Betabel	47000
J08	Zanahoria	870000
J09	Jugo verde	3114000
J10	Guayaba	89000
J11	Naranja	4900
J12	Guayaba	52000
J13	Jugo verde	20600
J14	Naranja	0
J15	Naranja	7200
J16	Betabel	326000
J17	Zanahoria	3720000
J18	Guayaba	7100
J19	Zanahoria	5460000
J20	Betabel	4380000
J21	Jugo verde	2034000
J22	Naranja	7100
J23	Naranja	160
J24	Jugo verde	45400
J25	Guayaba	9500
J26	Jugo verde	20800
J27	Betabel	320
J28	Guayaba	4700
J29	Naranja	1040
J30	Zanahoria	185000
J31	Zanahoria	10870000
J32	Guayaba	6100
J33	Betabel	2030000
J34	Guayaba	3100
J35	Zanahoria	7810000
J36	Betabel	1454000
J37	Guayaba	2200
J38	Betabel	8900
J39	Naranja	140
J40	Jugo verde	25000

*UFC/mL: Unidad formadora de colonias/mililitro, Valores dentro de norma

En México, no existe una norma oficial específica que establezca límites máximos permitidos de bacterias mesófilas aerobias en jugos frescos en puestos ambulantes. Sin embargo, se pueden aplicar los límites establecidos en la NOM-218-SSA1-2011, Productos y servicios. Bebidas saborizadas no alcohólicas, sus congelados, productos concentrados para prepararlas y bebidas adicionadas con cafeína. Especificaciones y disposiciones sanitarias. Métodos de prueba, menciona que el límite máximo permitido para el recuento de bacterias mesófilas aerobias para este tipo de bebidas similares debe ser de 1000 UFC/mL y, por lo tanto, con base a la Tabla 6 se determina que 35 muestras de 40 no cumplen con los requerimientos microbianos permitidos, equivalente al 87.5% de las muestras de jugos frescos muestreados. Así mismo, se obtuvo que el 100% de las muestras de jugo verde, zanahoria y guayaba sobrepasan este límite microbiano, mientras que betabel fue del 75%, siendo naranja el porcentaje más bajo con 62.5% como se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Concentraciones de bacterias mesófilas aeróbicas (BMA) con los valores mínimo, mediana y máximo en \log_{10} UFC/mL en cada tipo de jugo fresco y el número de muestras fuera de norma.

Tipo de jugo	Mínimo	Mediana	Máximo	Número de muestras fuera de norma por jugo (%)
Jugo verde	3.83	4.35	6.49	8 (100)
Zanahoria	5.18	6.36	7.03	8 (100)
Guayaba	3.34	3.81	4.94	8 (100)
Naranja	<0.1	3.31	3.85	5 (62.5)
Betabel	1.95	5.27	6.64	6 (75)

La cantidad de BMA presente en estos alimentos indica el nivel de contaminación bacteriana de forma general, por ejemplo, los jugos con mayor contenido de BMA podrían estar relacionados con frutas más maduras o con daños en la pulpa, lo que favorece el crecimiento microbiano. Además, la falta de una adecuada desinfección o el contacto con utensilios y superficies contaminadas durante el procesamiento pueden contribuir al aumento de este grupo microbiano; a su vez también se asocia a los prolongados tiempos de exposición de los jugos en los puestos ambulantes a temperatura ambiente, tal y como lo menciona Figueroa-

Ducoing et al. (2022). En este estudio los rangos de concentraciones de BMA (Tabla 7) en jugo de naranja esta entre <0.1 a $3.85 \log_{10}$ UFC/mL con una mediana de 3.31, dichos resultados son similares a los obtenido en estudios anteriores realizados en jugos de naranja en diferentes entidades de México (Figueroa-Ducoing et al., 2022; Ocaña de Jesús et al., 2022).

Los resultados obtenidos por Figueroa-Ducoing et al. (2022) muestran que todas las muestras de jugo de naranja recién exprimido de vendedores ambulantes presentaron crecimiento de bacterias mesófilas aerobias (AMB), con concentraciones que oscilaron entre 1 y $6.8 \log$ UFC/mL. Este hallazgo pone en evidencia que la carga microbiana en jugos expendidos en la vía pública puede alcanzar niveles considerablemente altos, lo cual representa un riesgo potencial para la inocuidad del alimento.

De manera similar, el estudio de Ocaña de Jesús et al. (2022) reportó recuentos de mesófilos aerobios en todos los minoristas evaluados, con un valor promedio de $3.98 \pm 0.08 \log$ UFC/mL, estableciendo además diferencias estadísticamente significativas entre los grupos analizados ($p < 0.05$). Estos resultados, aunque muestran un valor medio menor al reportado por Figueroa-Ducoing, confirman la presencia constante de una carga microbiana en los jugos recién preparados, independiente del punto de venta.

En conjunto, ambos estudios coinciden en que la presencia de mesófilos aerobios en jugos de naranja frescos es inevitable bajo las condiciones actuales de manipulación y expendio ambulante. La diferencia en los rangos reportados podría atribuirse a factores como el origen de la fruta, las condiciones higiénicas de preparación, el agua utilizada, la calidad del exprimidor, así como la temperatura y tiempo de almacenamiento previo a la venta.

Estos hallazgos refuerzan la necesidad de establecer mejores prácticas higiénicas y controles microbiológicos en la elaboración de jugos frescos vendidos en espacios públicos. Asimismo, sugieren que el monitoreo de mesófilos aerobios puede considerarse un indicador confiable de la calidad microbiológica general, ya que su presencia refleja contaminación ambiental y deficiencias en el manejo del producto.

Cuantificación de coliformes totales por la técnica de vertido en placa

Siguiendo la metodología de la NOM-113-SSA1-1994, se utilizó el agar-rojo-violeta-bilis-lactosa (RVBA) debido a que este medio de cultivo está diseñado para seleccionar y diferenciar el crecimiento de coliformes totales, mientras inhibe el crecimiento de otras bacterias. Este medio de cultivo contiene cristal violeta y sales biliares que permiten la inhibición de bacterias grampositivas, así mismo, contiene lactosa para que mediante su fermentación se pueda identificar a las bacterias coliformes. Por otro lado, se realiza una capa de anaerobiosis en la determinación de coliformes totales para crear un entorno sin oxígeno y así, favorecer el crecimiento de ciertos tipos de bacterias (Casado, 2012).

Después de incubar las muestras a 35°C, durante 24 ± 2 horas, de manera invertida (con la tapa hacia abajo), se identifican las colonias de coliformes como aquellas colonias rojas o rosadas, debido al viraje del indicador de pH rojo neutro y a la posible precipitación de bilis se forma una zona rojiza alrededor de las colonias. Se contaron las colonias con el contador de colonias, buscando seleccionar las placas de cada muestra que contengan entre 15 y 150 colonias, para que sea la caja representativa, como se muestra en la Figura 7.

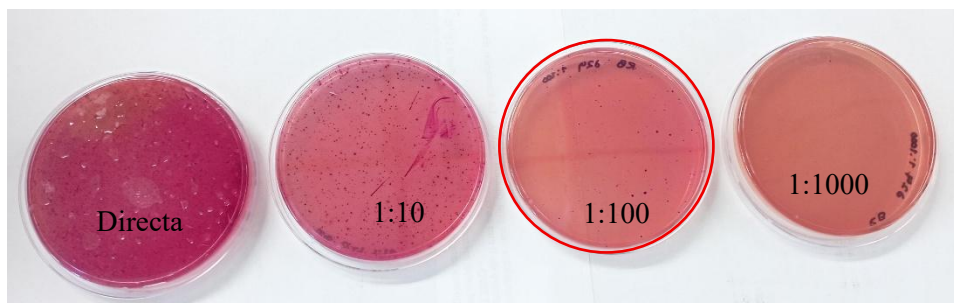


Figura 7. Elección de la placa representativa de coliformes totales entre 15 y 150 UFC

A partir del conteo de UFC de cada dilución conocida en placa (Anexo 3), se multiplica el número de colonias por el factor de dilución para obtener el conteo total de UFC por volumen (mL o g) de la muestra original, para que sucesivamente de forma más clara se reflejan los resultados de cada muestra para comprender mejor los datos (Tabla 8).

Tabla 8. Resultados del conteo de UFC de coliformes totales sobre mililitro por la técnica de vertido en placa de muestra en jugos frescos de la Zona Metropolitana de Puebla

Código	Tipo de jugo	Coliformes Totales (UFC/mL)
J01	Naranja	0
J02	Zanahoria	171000
J03	Jugo verde	380000
J04	Betabel	0
J05	Zanahoria	262000
J06	Jugo verde	75000
J07	Betabel	1900000
J08	Zanahoria	770000
J09	Jugo verde	768000
J10	Guayaba	79000
J11	Naranja	10
J12	Guayaba	108
J13	Jugo verde	70000
J14	Naranja	0
J15	Naranja	70
J16	Betabel	110
J17	Zanahoria	2090000
J18	Guayaba	1600
J19	Zanahoria	630000
J20	Betabel	320000
J21	Jugo verde	680
J22	Naranja	130
J23	Naranja	2
J24	Jugo verde	14100
J25	Guayaba	5
J26	Jugo verde	20000
J27	Betabel	15000
J28	Guayaba	1900
J29	Naranja	0
J30	Zanahoria	104000
J31	Zanahoria	50000
J32	Guayaba	190
J33	Betabel	8100
J34	Guayaba	1300
J35	Zanahoria	64000

J36	Betabel	2400
J37	Guayaba	270
J38	Betabel	1120000
J39	Naranja	380
J40	Jugo verde	83000

*UFC/mL: Unidad formadora de colonias/mililitro, Valores dentro de norma

La evaluación de coliformes totales en jugos frescos es un criterio fundamental para determinar la calidad microbiológica y la seguridad de este tipo de productos. Los jugos, al ser alimentos de consumo directo y sin tratamiento térmico posterior, representan un medio propicio para el crecimiento microbiano, debido a su contenido de azúcares, nutrientes y agua disponible.

En la NOM-218-SSA1-2011, Productos y servicios. Bebidas saborizadas no alcohólicas, sus congelados, productos concentrados para prepararlas y bebidas adicionadas con cafeína. Especificaciones y disposiciones sanitarias. Métodos de prueba, menciona que el límite máximo permitido para el recuento de coliformes totales para este tipo de bebidas debe ser de 10 UFC/mL. En este contexto, la presencia de coliformes totales en concentraciones superiores a los límites establecidos por la NOM-218-SSA1-2011 (para jugos y bebidas no alcohólicas) o por organismos internacionales, evidencia fallas en la higiene durante el lavado de frutas, la desinfección, el exprimido, la manipulación del personal o la calidad del agua empleada. Incluso valores bajos, aunque no necesariamente implican la presencia de patógenos, son indicativos de una posible contaminación fecal o ambiental.

Los resultados de la Tabla 8 muestran que 33 de 40 muestras sobrepasan en límite microbiano ya antes mencionado, lo que equivale al 82.5% de las muestras totales de jugos frescos. A su vez, también se determinó que 100% de las muestras de jugo verde y zanahoria no cumplen con la norma, seguido del jugo de betabel y guayaba con un 87.5% y, por último, el jugo de naranja con un 37.5% de muestras fuera del rango de aceptación microbiana, siendo éste último el jugo con menor porcentaje del resto, como se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9. Concentraciones de coliformes totales (CT) con los valores mínimo, mediana y máximo en \log_{10} UFC/mL en cada tipo de jugo fresco y el número de muestras fuera de norma.

Tipo de jugo	Mínimo	Mediana	Máximo	Número de muestras fuera de norma por jugo (%)
Jugo verde	2.83	4.86	5.88	8 (100)
Zanahoria	4.69	5.33	6.32	8 (100)
Guayaba	0.69	2.89	4.89	7 (87.5)
Naranja	<0.1	0.77	2.57	3 (37.5)
Betabel	<0.1	4.06	5.27	7 (87.5)

Con los resultados obtenidos en la Tabla 9, se muestra que los valores de CT puede variar dependiendo del tipo de jugo, como lo menciona Hernández-Anguiano et al. (2017), por ejemplo, el jugo que presento los valores más elevados de CT fue el de zanahoria con un rango de 4.69 a 6.32 \log_{10} UFC/mL, a comparación del jugo de naranja que fue el tipo de jugo con valores más bajos entre <0.1 a 2.57 \log_{10} UFC/mL de CT.

Sin embargo, los resultados de este último tipo de jugo difieren de algunos estudios publicados, como el de Figueroa-Ducoing et al. (2022) y Ocaña de Jesús et al. (2022) en donde informaron que el 58,3% de las muestras fueron positivas a CT en muestras de jugo de naranja fresco recolectadas de vendedores ambulantes, mientras que en el otro se reportó que el 71% de las muestras de jugo de naranja estaban por encima del límite normal.

El jugo verde se prepara a base de nopal, apio, piña, perejil, entre otros ingredientes, y diversos estudios sobre jugos frescos con nopal han reportado conteos elevados de coliformes totales, lo que indica que este ingrediente puede actuar como vector de contaminación si no se aplican procesos adecuados de limpieza y desinfección. Un estudio publicado anteriormente coincide con los resultados obtenidos en este trabajo en relación con el análisis de CT en jugo verde a base de nopal (Hernández-Anguiano et al., 2017), ya que detectaron coliformes totales en todas las muestras de distintos jugos de nopal (100%) con un valor promedio de 4,5 Log UFC/mL.

Cuantificación de coliformes fecales por el método del número más probable (NMP)

Resultados de la prueba presuntiva

La metodología que se ocupó en este procedimiento se basó en la NMX-042-SCFI-2015, específicamente se siguió la metodología para muestras líquidas, donde por cada muestra se obtuvieron cinco tubos con medio selectivo de enriquecimiento (Caldo lauril sulfato de sodio al 200%) con una campana de Durham previamente sumergida sin presencia de burbujas en su interior, a los cuales se le transfirió a cada uno de estos tubos 10mL de la muestra de jugo fresco (Figura 8).

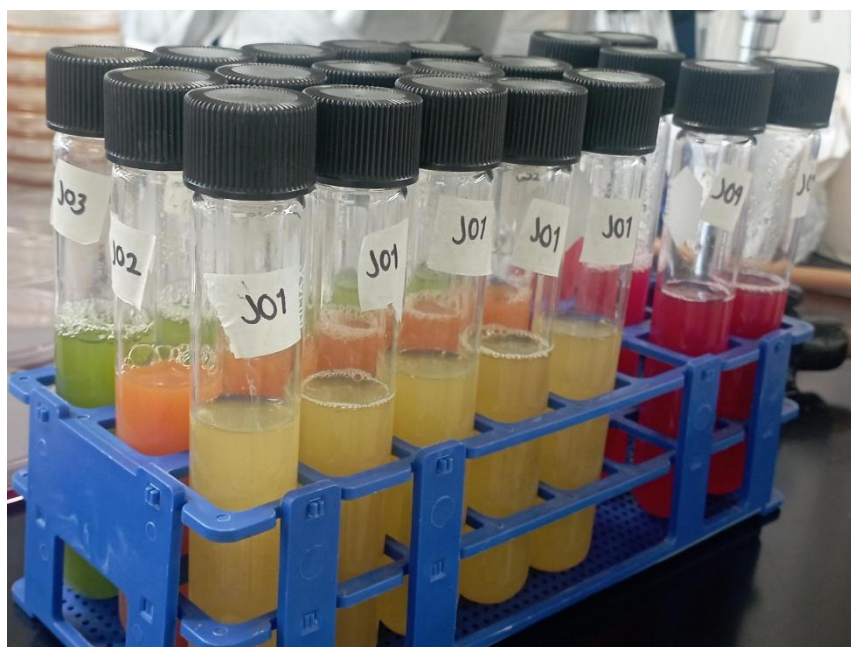


Figura 8. Tubos de caldo lauril sulfato de sodio al 200% con la muestra inoculada de jugo. Posteriormente se incubaron los tubos a $35 \pm 0,5$ °C por $24-48 \pm 2$ horas, para determinar los tubos positivos (+) de los negativos (-) a partir de la formación de gas dentro de la campana de Durham y la turbidez, como se muestra en la Figura 9. Debido a que el medio de cultivo contiene lauril sulfato de sodio se inhibe el crecimiento de bacterias grampositivas, así como también algunas gramnegativas, permitiendo el crecimiento de coliformes y así fermenten la lactosa, produciendo gas en el caldo (Casado, 2012).

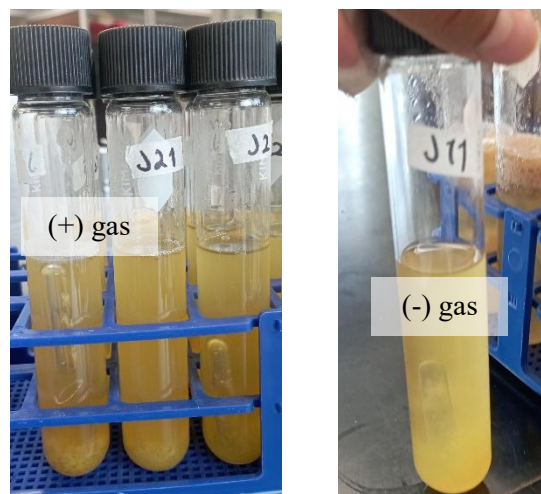


Figura 9. Tubos de la muestra J21 positivos (+) y un tubo de la muestra J11 negativo (-)

De esta manera se realiza la observación de cada uno de los tubos incubados de todas las muestras y se registró el resultado de la prueba presuntiva en la Tabla 10, recordando que los tubos positivos (+) serán aquellos que tengan la formación de gas dentro de la campana de Durham y la turbidez, como se muestra:

Tabla 10. Resultados de la prueba presuntiva del método del N.M.P. en jugos frescos de la Zona Metropolitana de Puebla.

Código	Tipo de jugo	Prueba presuntiva				
		Tubo 1 (+)	Tubo 2 (-)	Tubo 3 (-)	Tubo 4 (-)	Tubo 5 (-)
J01	Naranja	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (-)	Tubo 3 (-)	Tubo 4 (-)	Tubo 5 (-)
J02	Zanahoria	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (+)
J03	Jugo verde	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (+)
J04	Betabel	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (+)
J05	Zanahoria	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (-)
J06	Jugo verde	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (+)
J07	Betabel	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (+)
J08	Zanahoria	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (+)
J09	Jugo verde	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (+)
J10	Guayaba	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (+)
J11	Naranja	Tubo 1 (-)	Tubo 2 (-)	Tubo 3 (-)	Tubo 4 (-)	Tubo 5 (-)
J12	Guayaba	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (-)
J13	Jugo verde	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (+)
J14	Naranja	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (+)
J15	Naranja	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (+)
J16	Betabel	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (+)

J17	Zanahoria	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (+)
J18	Guayaba	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (+)
J19	Zanahoria	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (+)
J20	Betabel	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (+)
J21	Jugo verde	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (+)
J22	Naranja	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (-)
J23	Naranja	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (-)	Tubo 4 (-)	Tubo 5 (-)
J24	Jugo verde	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (+)
J25	Guayaba	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (+)
J26	Jugo verde	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (+)
J27	Betabel	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (+)
J28	Guayaba	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (+)
J29	Naranja	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (+)
J30	Zanahoria	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (+)
J31	Zanahoria	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (+)
J32	Guayaba	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (+)
J33	Betabel	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (+)
J34	Guayaba	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (+)
J35	Zanahoria	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (+)
J36	Betabel	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (+)
J37	Guayaba	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (+)
J38	Betabel	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (+)
J39	Naranja	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (+)
J40	Jugo verde	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (+)

*positivo (+) *negativo (-)

Resultados de la prueba confirmativa

De cada tubo que mostró formación de gas y turbidez en la prueba presuntiva, se tomó de 3 a 5 asadas y se inoculó en dos tubos con medio de confirmación, los cuales son el caldo EC y el caldo lactosa verde brillante bilis al 2% (VBB 2%), ambos tubos contendrán una campana de Durham respectivamente. Los tubos caldo lactosa verde brillante bilis 2% se incubaron a $35 \pm 0,5$ °C por 24 ± 2 horas y una vez transcurrido el tiempo se examinó la producción de gas y turbidez, como se observa la diferencia entre un tubo positivo (+) y uno negativo (-) en la Figura 10. Este medio es crucial en esta prueba, ya que ayuda a confirmar la presencia de coliformes, asegurando la selección de estas bacterias frente a otras.

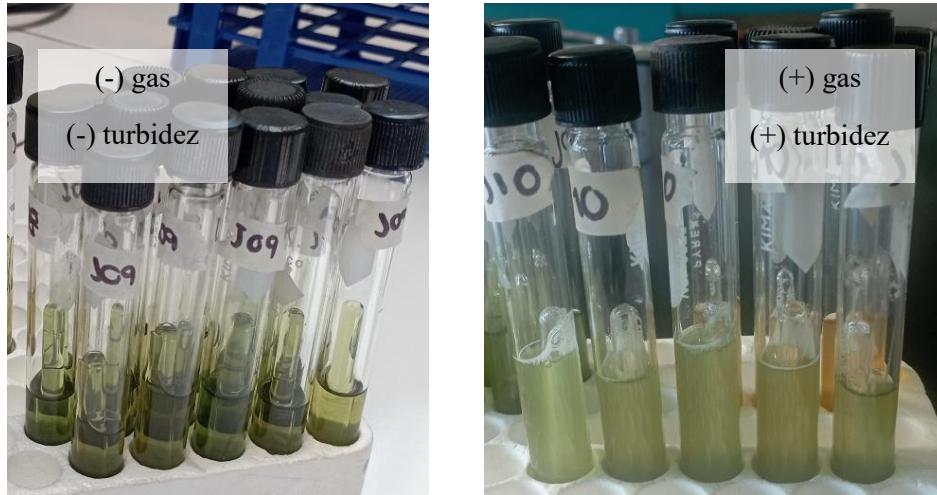


Figura 10. Tubos positivos (+) y negativos (-) de caldo VBB 2%

De esta manera, se registraron los resultados de cada uno de los tubos positivos y negativos de cada una de las muestras respectivamente (Tabla 11).

Tabla 11. Resultados de la prueba confirmativa del método del N.M.P. en caldo verde brillante bilis 2% (VBB 2%) en jugos frescos de la Zona Metropolitana de Puebla.

Código	Prueba confirmativa en caldo VBB 2%				
	Tubo 1 (-)	Tubo 2 NO	Tubo 3 NO	Tubo 4 NO	Tubo 5 NO
J01	Tubo 1 (-)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (+)
J02	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (+)
J03	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (+)
J04	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (+)
J05	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (-)	Tubo 5 NO
J06	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (+)
J07	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (+)
J08	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (+)
J09	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (+)
J10	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (+)
J11	Tubo 1 NO	Tubo 2 NO	Tubo 3 NO	Tubo 4 NO	Tubo 5 NO
J12	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 NO
J13	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (+)
J14	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (+)
J15	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (+)

J16	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (-)
J17	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (+)
J18	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (+)
J19	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (+)
J20	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (-)
J21	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (-)
J22	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 NO
J23	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 NO	Tubo 4 NO	Tubo 5 NO
J24	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (+)
J25	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (+)
J26	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (+)
J27	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (+)
J28	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (+)
J29	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (-)	Tubo 4 (-)	Tubo 5 (-)
J30	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (+)
J31	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (+)
J32	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (+)
J33	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (+)
J34	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (+)
J35	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (-)
J36	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (-)	Tubo 4 (-)	Tubo 5 (-)
J37	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (-)
J38	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (+)
J39	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (-)
J40	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (+)

*positivo (+) *negativo (-) *NO: No se inoculo

Posteriormente se compararon en la Tabla 12 los resultados obtenidos en la prueba presuntiva junto con la prueba confirmativa con las tablas estandarizadas de la norma NMX-042-SCFI-2015 (Anexo 4) para buscar determinar el N.M.P. de cada muestra. Por ejemplo, la muestra

J36 tuvo 5 tubos positivos de la prueba presuntiva y en la prueba confirmativa tuvo 2 tubos positivos, arrojando un el N.M.P. para esa muestra de 6 NMP/100mL.

Tabla 12. Determinación de coliformes fecales (CF) en N.M.P./100mL en jugos frescos de la Zona Metropolitana de Puebla.

Código	Tubos positivos de CLSNa 200%	Tubos positivos de caldo VBB 2%	N.M.P./100mL
J01	1	0	2
J02	5	5	>18
J03	5	5	>18
J04	5	5	>18
J05	4	3	9
J06	5	5	>18
J07	5	5	>18
J08	5	5	>18
J09	5	5	>18
J10	5	5	>18
J11	0	0	<1
J12	4	4	16
J13	5	5	>18
J14	5	5	>18
J15	5	5	>18
J16	5	4	16
J17	5	5	>18
J18	5	5	>18
J19	5	5	>18
J20	5	4	16
J21	5	4	16
J22	4	4	6
J23	2	2	6
J24	5	5	>18
J25	5	5	>18
J26	5	5	>18
J27	5	5	>18
J28	5	5	>18
J29	5	2	6
J30	5	5	>18
J31	5	5	>18

J32	5	5	>18
J33	5	5	>18
J34	5	5	>18
J35	5	4	16
J36	5	2	6
J37	5	4	16
J38	5	5	>18
J39	5	4	16
J40	5	5	>18

*Caldo lauril sulfato de sodio 200% (CLSNa al 200%) * Verde brillante bilis al 2% (VBB 2%), Valor dentro de norma

La detección de coliformes fecales en jugos frescos constituye un indicador de contaminación de origen fecal y refleja fallas en las prácticas de higiene durante la producción, manipulación o procesamiento. Con base en la NOM-218-SSA1-2011, Productos y servicios. Bebidas saborizadas no alcohólicas, sus congelados, productos concentrados para prepararlas y bebidas adicionadas con cafeína. Especificaciones y disposiciones sanitarias. Métodos de prueba, se establece que los jugos frescos no deben existir la presencia de coliformes fecales, por lo tanto, el resultado debe ser 0 o <1 NMP en 100mL de coliformes fecales. Sin embargo, analizando los datos de la Tabla 12 se determinó que solo 1 de las 40 muestras totales cumple con esta norma, es decir que el 97.5% de las muestras esta fuera del límite microbiano permitido de coliformes fecales en jugos frescos. Estos resultados difieren completamente de otro estudio previo relacionado, el cual se realizó en productos de vendedores ambulantes afuera de diferentes primarias en Sonora, México y se reportó que solo el 40% de las muestras fueron detectadas con CF (Paredes A. & Rivero M., 2023).

Tabla 13. Concentraciones de coliformes fecales (CF) con los valores mínimo y máximo en NMP/100mL en cada tipo de jugo fresco y el número de muestras fuera de norma.

Tipo de jugo	Mínimo	Máximo	Número de muestras fuera de norma por jugo (%)
Jugo verde	16	>18	8 (100)
Zanahoria	9	>18	8 (100)
Guayaba	16	>18	8 (100)
Naranja	<1	>18	7 (87.5)

Betabel	6	>18	8 (100)
---------	---	-----	---------

A partir de las Tabla 13 se puede observar que 4 de 5 diferentes tipos de jugos frescos presentaron coliformes fecales (CF) y que estuvieron fuera de norma en su totalidad (100%) con un rango entre 6 a >18 NMP/100mL, pero en el jugo de naranja solo una muestra presento <1 NMP/100mL, por lo que, solo el 87.5% estuvo fuera de norma en un rango de 2 a >18 NMP/100mL. Estos últimos resultados sobre las muestras de jugo de naranja son respaldados por el trabajo previamente publicado de Ocaña de Jesús et al., (2022), en donde se obtuvieron datos muy similares a este trabajo, ya que se reportó que el 86% de las muestras presentaron CF que superaban el límite microbiano permitido.

Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio muestran valores superiores de coliformes fecales en jugos de naranja frescos en comparación con lo reportado por Hernández-Anguiano et al. (2017), quien reportó que el 45% de sus muestras analizadas dieron positivo para CF. Esta discrepancia puede deberse a diferencias en el tipo de muestreo, condiciones de higiene durante la elaboración o métodos de análisis empleados.

La presencia de coliformes fecales en alimentos constituye un hallazgo de gran relevancia, pues este grupo microbiano se asocia directamente con contaminación de origen fecal y representa un riesgo para la salud del consumidor. Dentro de este grupo se buscó la detección de *Escherichia coli*, ya que es particularmente significativa, debido a que se considera como un indicador más preciso de contaminación fecal reciente y ayuda a evidenciar las deficiencias en la higiene durante la producción, manipulación o procesamiento de los alimentos.

A partir de la prueba presuntiva, se realizó otra prueba confirmativa con tubos de caldo EC (*Escherichia coli*), el cual es un medio selectivo y diferencial, ya que contiene sales biliares que inhiben el crecimiento de otro tipo de bacterias que no sean coliformes fecales y específicamente *E.coli*. Además de que se distingue del resto de medios, ya que se incubaba a $44,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,2\text{ }^{\circ}\text{C}$, lo que permite que sea una prueba especialmente eficaz para aislar *E. coli* (Casado, 2012).

Después del periodo de incubación, los tubos de caldo EC que presenten gas dentro de la campana de Durham y estén turbios se les determinará como positivos (+), de lo contrario serán negativos (-) tal y como se muestra en la Figura 11.

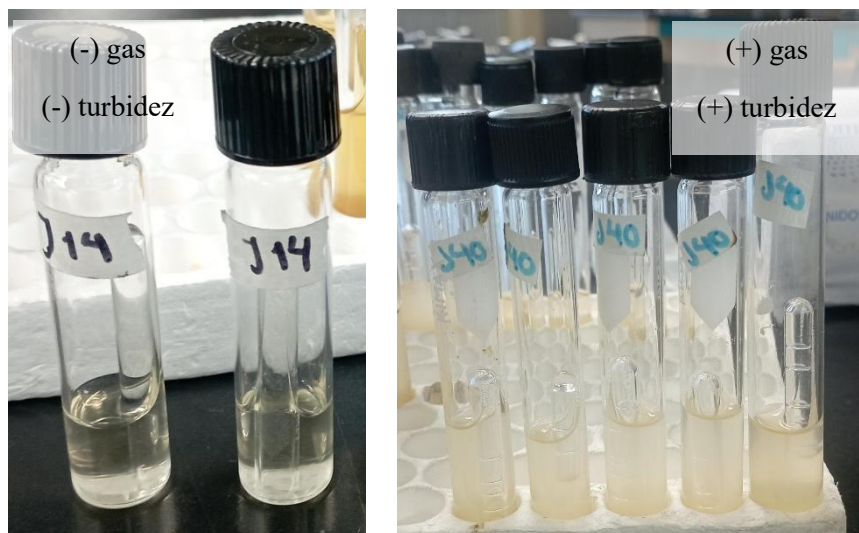


Figura 11. Tubos positivos (+) y negativos (-) de caldo EC

A continuación, en la Tabla 14 se presenta el resultado de todos los tubos que se sembraron en caldo EC en relación con los tubos positivos de la prueba presuntiva de la Tabla 10.

Tabla 14. Resultados de la prueba confirmatoria en caldo EC para cada muestra de jugos frescos de la Zona Metropolitana de Puebla.

Código	Prueba confirmativa en caldo EC				
	Tubo 1 (-)	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5
J01	Tubo 1 (-)	NO	NO	NO	NO
J02	Tubo 1 (-)	Tubo 2 (-)	Tubo 3 (-)	Tubo 4 (-)	Tubo 5 (-)
J03	Tubo 1 (-)	Tubo 2 (-)	Tubo 3 (-)	Tubo 4 (-)	Tubo 5 (-)
J04	Tubo 1 (-)	Tubo 2 (-)	Tubo 3 (-)	Tubo 4 (-)	Tubo 5 (-)
J05	Tubo 1 (-)	Tubo 2 (-)	Tubo 3 (-)	Tubo 4 (-)	NO
J06	Tubo 1 (-)	Tubo 2 (-)	Tubo 3 (-)	Tubo 4 (-)	Tubo 5 (-)
J07	Tubo 1 (-)	Tubo 2 (-)	Tubo 3 (-)	Tubo 4 (-)	Tubo 5 (-)
J08	Tubo 1 (-)	Tubo 2 (-)	Tubo 3 (-)	Tubo 4 (-)	Tubo 5 (-)
J09	Tubo 1 (-)	Tubo 2 (-)	Tubo 3 (-)	Tubo 4 (-)	Tubo 5 (-)
J10	Tubo 1 (-)	Tubo 2 (-)	Tubo 3 (-)	Tubo 4 (-)	Tubo 5 (-)
J11	NO	NO	NO	NO	NO

J12	Tubo 1 (-)	Tubo 2 (-)	Tubo 3 (-)	Tubo 4 (-)	Tubo 5 NO
J13	Tubo 1 (-)	Tubo 2 (-)	Tubo 3 (-)	Tubo 4 (-)	Tubo 5 (-)
J14	Tubo 1 (-)	Tubo 2 (-)	Tubo 3 (-)	Tubo 4 (-)	Tubo 5 (-)
J15	Tubo 1 (-)	Tubo 2 (-)	Tubo 3 (-)	Tubo 4 (-)	Tubo 5 (-)
J16	Tubo 1 (-)	Tubo 2 (-)	Tubo 3 (-)	Tubo 4 (-)	Tubo 5 (-)
J17	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (-)	Tubo 3 (-)	Tubo 4 (-)	Tubo 5 (-)
J18	Tubo 1 (-)	Tubo 2 (-)	Tubo 3 (-)	Tubo 4 (-)	Tubo 5 (-)
J19	Tubo 1 (-)	Tubo 2 (-)	Tubo 3 (-)	Tubo 4 (-)	Tubo 5 (-)
J20	Tubo 1 (-)	Tubo 2 (-)	Tubo 3 (-)	Tubo 4 (-)	Tubo 5 (-)
J21	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (-)	Tubo 4 (-)	Tubo 5 (-)
J22	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (-)	Tubo 3 (-)	Tubo 4 (-)	Tubo 5 NO
J23	Tubo 1 (-)	Tubo 2 (-)	Tubo 3 NO	Tubo 4 NO	Tubo 5 NO
J24	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (+)
J25	Tubo 1 (-)	Tubo 2 (-)	Tubo 3 (-)	Tubo 4 (-)	Tubo 5 (-)
J26	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (+)
J27	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (-)
J28	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (+)
J29	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (-)	Tubo 5 (-)
J30	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (+)
J31	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (-)	Tubo 3 (-)	Tubo 4 (-)	Tubo 5 (-)
J32	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (+)
J33	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (-)	Tubo 3 (-)	Tubo 4 (-)	Tubo 5 (-)
J34	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (-)	Tubo 3 (-)	Tubo 4 (-)	Tubo 5 (-)
J35	Tubo 1 (-)	Tubo 2 (-)	Tubo 3 (-)	Tubo 4 (-)	Tubo 5 (-)
J36	Tubo 1 (-)	Tubo 2 (-)	Tubo 3 (-)	Tubo 4 (-)	Tubo 5 (-)
J37	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (+)
J38	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (+)
J39	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (-)	Tubo 5 (-)
J40	Tubo 1 (+)	Tubo 2 (+)	Tubo 3 (+)	Tubo 4 (+)	Tubo 5 (+)

*positivo (+) *negativo (-) *NO: No se inoculo

Otra prueba que se realizó para determinar la presencia de *E. coli* además de la producción de gas y turbidez en los tubos de caldo EC, es la prueba de indol y fluorescencia en los tubos de caldo EC. La prueba de indol detecta la capacidad de una bacteria para descomponer triptófano en indol mediante la enzima triptofanasa y se realiza, añadiendo el reactivo de Kovac al caldo ya incubado, y si aparece un anillo rojo en la superficie, el resultado es

positivo para indol como se muestra en la Figura 12. Mientras que, para la prueba de fluorescencia, después del periodo de incubación, se observa los tubos bajo la luz UV, la presencia de fluorescencia azul brillante indica la presencia de *E.coli*, esto se debe a la capacidad de *E.coli* para hidrolizar la sustancia MUG (4-metilumbeliferona- β -D-glucurónido) y producir un producto fluorogénico, así como se observa en la Figura 12 (Bailón, 2003).

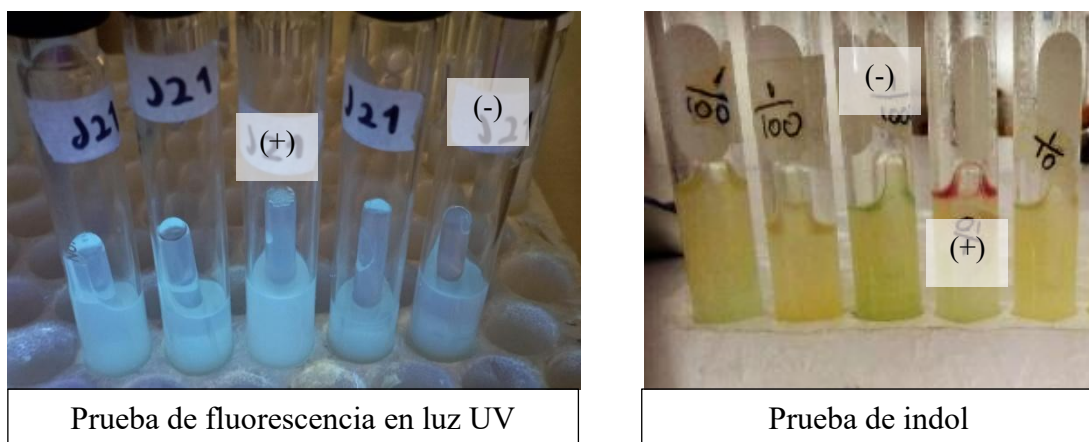


Figura 12. Tubos positivos y negativos de caldo EC en la prueba de fluorescencia en luz UV e indol.

Al final se obtuvieron un total de 57 tubos positivos de caldo EC y a partir de estos se buscó aislar las bacterias que crecieron dentro del medio, para después realizar las pruebas fenotípicas necesarias para la identificación de las cepas de *E.coli*, tal y como se menciona a continuación.

Aislamiento e Identificación fenotípica de *E.coli* en jugos frescos de la Zona metropolitana de Puebla

A partir de los tubos positivos de caldo EC inoculados, se tomó una asada del tubo y se sembró en medios selectivos y diferenciales para *E.coli* (agar MacConkey y agar eosina azul de metileno).

El medio de cultivo MacConkey es un medio selectivo y diferencial, comúnmente utilizado para el aislamiento e identificación de enterobacterias, ya que inhibe las bacterias grampositivas por su composición de sales biliares y cristal violeta. así mismo, contiene

lactosa y un indicador a rojo neutro para la identificación de enterobacterias capaces de fermentar la lactosa, los cuales producen la acidificación del medio y como resultado las colonias adquieren un color rosa intenso a rojo (Figura 13), mientras que las enterobacterias que no son capaces de fermentar la lactosa se observarán como colonias incoloras o amarillentas. (Casado, 2012)

El medio de cultivo eosina azul de metileno (EMB) es un medio de cultivo utilizado para el aislamiento y diferenciación de enterobacterias, la composición de este medio permite diferenciar las colonias fermentadoras de lactosa de las no fermentadoras por su formulación de eosina y azul de metileno, de este modo los organismos coliformes (ej. *E.coli*) se diferencian por la formación de colonias de 2 a 3 mm de diámetro y la presencia de color púrpura oscuro en el centro y un brillo verde metálico muy característico, como se muestra en la Figura 13, (Rodríguez, 2018).

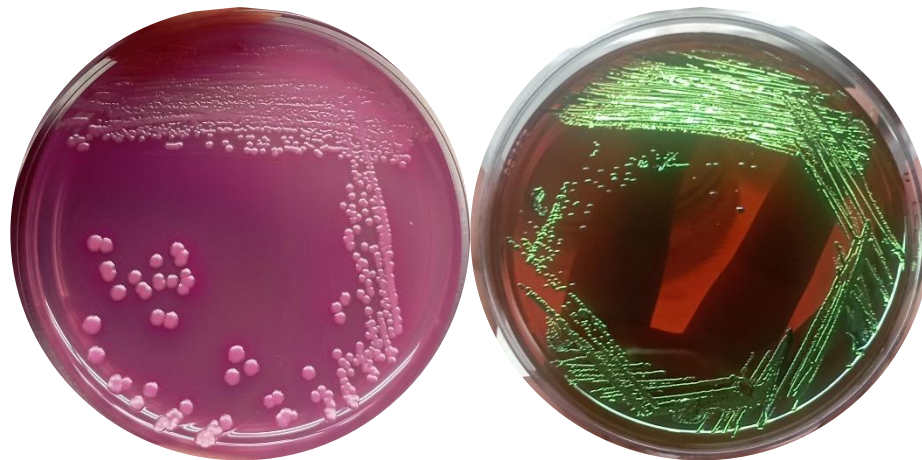


Figura 13. Placas de agar MacConkey lactosa positiva (imagen izquierda) y agar EMB inoculada con colonias brillosas metálicas (imagen derecha).

A partir de las cepas posiblemente características de *E. Coli*, se tomó un inóculo de las colonias aisladas en el medio MacConkey para la realización de pruebas bioquímicas para confirmar el aislamiento de *E.coli* en las muestras de jugos frescos de puestos ambulantes. Las pruebas que se realizaron a las muestras fueron tinción de Gram, TSI, LIA, citrato de Simmons, urea, MIO y OF.

Con base en el Anexo 5 la bacteria *E.coli* frente a las pruebas bioquímicas presenta las siguientes características fenotípicas: es una bacteria en forma de bacilo gramnegativo, en la

prueba de TSI da como resultado A/A con producción de gas, LIA es K/K, con movilidad positiva, producción de indol positivo, descarboxilación de ornitina positivo, negativo a la prueba de citrato y urea (Figura 14).

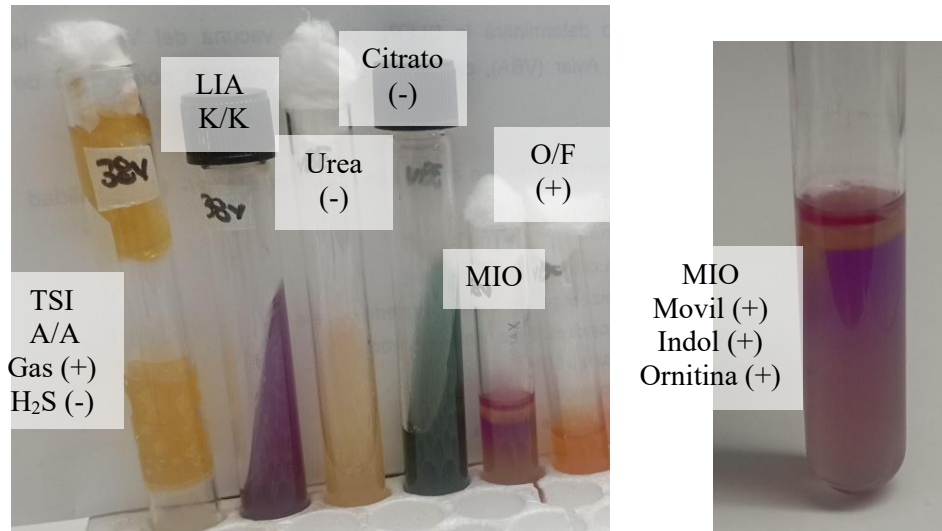


Figura 14. Resultado de las pruebas bioquímicas incubadas durante 24 horas de una muestra positiva a *E. coli*

Se realizaron otras pruebas bioquímicas complementarias para identificar con mayor certeza a *E. coli* como la prueba de rojo de metilo (RM) y Voges Proskauer (VP), dichas pruebas se realizaron en caldo RM/VP.

En la Figura 15 se muestra la prueba de RM, la cual se basa en la capacidad de la bacteria de fermentar glucosa y producir una variedad de ácidos (ácido láctico, acético y fórmico), para que a partir del indicador rojo de metilo se pueda detectar estos ácidos, mostrando un color rojo en el medio, caso de *E. Coli* (Bailón, 2003).

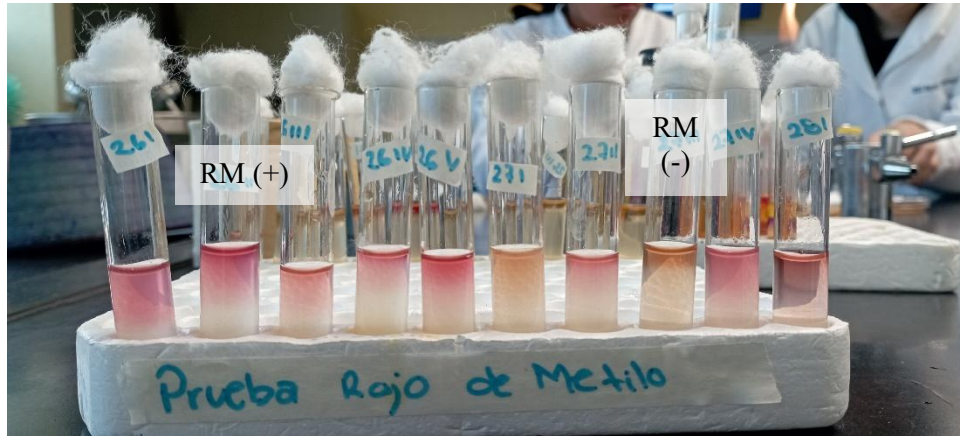


Figura 15. Resultados de la prueba de rojo de metilo en caldo RM-VP

Mientras que la prueba de VP se basa en la detección de acetona, como producto final derivado de la fermentación de glucosa, para que al momento de la presencia de hidróxido de potasio (KOH) y oxígeno, la acetona se oxida a diacetilo, el diacetilo reacciona con α -naftol y la guanidina de la peptona generando un polímero de color rojo o rosado. Este compuesto final rosado indica una prueba positiva a la producción de acetoina de una bacteria, así como se muestra en la Figura 16, en el caso de *E.coli* no se presenta este cambio de coloración (Bailón, 2003).

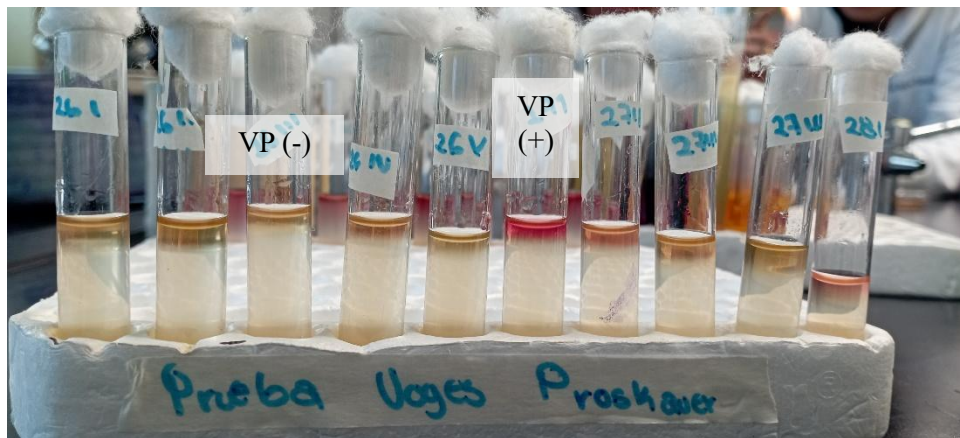


Figura 16. Resultados de la prueba de Voges Proskauer en caldo RM-VP

Al final de realizar todas estas pruebas para la identificación de cepas de *E. Coli* en muestras de jugos frescos de puestos ambulantes, de un total de 57 tubos positivos de caldo EC, se obtuvieron 13 muestras que corresponden con cada una de las características anteriormente mencionadas (recordando que las 13 cepas de *E.coli* obtenidas, son a partir de los subtubos

de la prueba por el NMP correspondientes a 6 muestras diferentes de jugos frescos), así como se muestra en la Tabla 15.

La presencia de *Escherichia coli* en jugos frescos refleja deficiencias higiénicas a lo largo de la cadena de elaboración, desde el lavado inadecuado de frutas y vegetales hasta el uso de agua no potable y la falta de sanitización en utensilios y equipos. En este sentido, los resultados obtenidos evidencian que la ausencia de controles sanitarios adecuados en la preparación de jugos frescos no solo incrementa el riesgo de contaminación, sino que también representa una amenaza para la salud del consumidor, al favorecer la posible transmisión de cepas patógenas o resistentes a antibióticos.

Tabla 15. Muestras de jugos frescos de puestos ambulantes en las que se identificó fenotípicamente a *Escherichia coli*

Tipo de jugo	Código muestra	No. Tubo	Bacteria aislada e identificada
Jugo verde	J21	I	<i>Escherichia coli</i>
		II	<i>Escherichia coli</i>
Jugo verde	J24	I	<i>Escherichia coli</i>
		II	<i>Escherichia coli</i>
		III	<i>Escherichia coli</i>
		IV	<i>Escherichia coli</i>
		V	<i>Escherichia coli</i>
Jugo verde	J26	II	<i>Escherichia coli</i>
		V	<i>Escherichia coli</i>
Betabel	J33	I	<i>Escherichia coli</i>
Guayaba	J37	III	<i>Escherichia coli</i>
		V	<i>Escherichia coli</i>
Betabel	J38	V	<i>Escherichia coli</i>

Las 6 muestras positivas a la identificación de *E.coli* equivalen al 15% del total de muestras de jugos frescos analizados, si hablamos según los tipos de jugos frescos, se identificó *E.coli* en 1 muestra de jugo de guayaba (12.5%), en 2 muestras de jugos de betabel (25%) y en 3 muestras de jugo verde (37.5%); Hernández-Anguiano et al. (2017) en su estudio en jugos a base de nopal en establecimientos comerciales de Texcoco, Estado de México, menciona que la elaboración de forma inocua de jugos frescos es inaceptable, debido a que reportó la presencia de *E.coli* en 148 de 162 muestras equivalente al 91%, lo que respalda a los

resultados obtenidos en este estudio sobre el jugo verde, que entre sus ingredientes está compuesto por nopal, ya que fue el jugo del que se aisló más muestras con *E.coli*.

Contrario a lo que se reportado previamente en otros estudios sobre la presencia de *E.coli* en jugos de naranja, en este trabajo no se encontró la presencia de la bacteria indicadora de contaminación fecal en ninguna muestra de jugo de naranja. Dichos artículos mencionan la presencia *E.coli* en este tipo de jugo, desde un 8.3% hasta un 85% reportado en diferentes zonas de México (Figueroa-Ducoing et al., 2022; Ocaña de Jesús et al., 2022).

Antibiograma

La detección de *Escherichia coli* en jugos frescos no solo implica un riesgo por su origen fecal, sino que también cobra relevancia en el contexto de la resistencia a antibióticos. La realización de antibiogramas en cepas aisladas de alimentos es fundamental para identificar perfiles de resistencia que podrían transmitirse al microbiota intestinal del consumidor, favoreciendo la diseminación de genes resistentes. Este aspecto resulta crítico para la salud pública, ya que el consumo de alimentos contaminados con *E. coli* multirresistente puede dificultar el tratamiento de infecciones entéricas y contribuir a la propagación de la resistencia antimicrobiana, lo que subraya la necesidad de integrar el análisis de susceptibilidad como parte de los estudios de inocuidad alimentaria.

De las muestras en las que se aisló e identificó cepas de *Escherichia coli* se realizó un método de antibiograma disco-placa, el cual busca estudiar la sensibilidad de los microorganismos frente a los antibióticos. En otras palabras, el antibiograma refleja la capacidad de un antibiótico de inhibir el crecimiento de una bacteria o población bacteriana, con el fin de aportar a la farmacología de los antimicrobianos un resultado que sirva para el tratamiento de infecciones microbianas, en relación con el lugar de infección y los aspectos clínicos del paciente y de la enfermedad (Ingraham et al., 1998).

En este caso, se realizó un antibiograma a todas las muestras aisladas de *E.coli* de jugos frescos y se añadió una cepa control (*E.coli* ATCC 11229), utilizando un multidisco para bacterias gramnegativas con 12 antibióticos diferentes (amikacina, ampicilina, carbenicilina, cefalotina, cefotaxima, ciprofloxacina, cloranfenicol, gentamicina, netilmicina, nitrofurantoina, norfloxacina, sulfametoxazol/ trimetoprim y ciprofloxacina) para su análisis

después del periodo de incubación, en donde se midió los halos de inhibición de cada antibiótico como se observa en la Figura 17.



Figura 17. Antibiograma de *E.coli* frente a un multidisco de antibióticos para bacterias gramnegativas

Tras haber transcurrido las 18-24 horas de incubación de las placas con los multidiscos de antibióticos, se registró en la Tabla 16 el diámetro (mm) de la zona de inhibición alrededor de los discos, para determinar si la cepa puesta frente al antibiótico es sensible, intermedia o resistente con base en la tabla del Anexo 6.

Tabla 16. Resultado de los diámetros de inhibición de cada antibiótico en las cepas de *E.coli*

	AM	AK	CB	CF	CFX	CPF	CL	GE	NET	NOF	NF	STX
<i>E.coli</i> ATCC	R	I	R	R	R	S	I	I	R	S	R	S
J21 I	R	I	R	R	R	R	R	S	I	I	I	S
J21 II	R	R	R	R	R	I	R	S	R	I	R	S
J24 I	R	I	R	R	I	S	S	S	I	S	S	R

J24 II	R	I	R	R	I	S	S	S	I	S	R	R
J24 III	R	R	R	R	I	S	S	I	R	S	R	R
J24 IV	R	I	R	R	I	S	S	S	R	S	R	R
J24 V	R	I	R	R	I	S	S	S	R	S	R	R
J26 II	R	I	R	R	I	S	S	S	R	S	R	S
J26 V	R	R	R	R	I	S	S	I	I	S	R	R
J33 I	R	R	R	R	I	S	S	S	S	I	R	S
J37 II	R	I	R	R	I	S	S	S	S	S	R	S
J37 V	R	R	R	R	I	S	I	S	I	S	R	S
J38 V	R	I	R	R	I	S	S	S	I	S	R	S

* AK: Amikacina, AM: Ampicilina, CB: Carbenicilina, CF: Cefalotina, CFX: Cefotaxima, CL: Cloranfenicol, CPF: Ciprofloxacina, GE: Gentamicina, NET: Netilmicina, NF: Nitrofurantoina, NOF: Norfloxacin, STX: Sulfametoxazol/ Trimetoprim*

Es importante resaltar, con base en la Tabla 16, que la cepa J21-II presentó el mayor número de antibióticos a los que mostró resistencia, alcanzando un total de ocho: amikacina, ampicilina, carbenicilina, cefalotina, cefotaxima, cloranfenicol, netilmicina y nitrofurantoina. Este hallazgo resulta particularmente relevante, ya que evidencia un patrón de multiresistencia que reduce significativamente las alternativas terapéuticas disponibles y refleja la posible adquisición de múltiples mecanismos de resistencia. La presencia de una cepa con este perfil en un alimento de consumo directo, como los jugos frescos, constituye un riesgo potencial para la salud pública, dado que puede actuar como reservorio y vehículo de genes de resistencia transferibles a otras bacterias patógenas en el intestino humano.

Los resultados obtenidos evidencian que el 100% de las cepas de *Escherichia coli* aisladas de jugos frescos presentaron resistencia a amikacina (AK), carbenicilina (CB) y cefalotina

(CF), lo que refleja un perfil preocupante de resistencia múltiple y sugiere la posible exposición de estas bacterias a antibióticos de uso frecuente en el ámbito clínico. Por el contrario, en la Figura 18 se observada la alta sensibilidad frente a ciprofloxacina (CPF) y gentamicina (GE) (84.6%) indica que aún existen opciones terapéuticas efectivas, aunque el hallazgo subraya la importancia de realizar antibiogramas como herramienta de vigilancia. Estos resultados destacan la necesidad de un control riguroso en la cadena alimentaria, ya que el consumo de jugos contaminados con cepas resistentes podría favorecer la diseminación de genes de resistencia y representar un riesgo emergente para la salud pública.

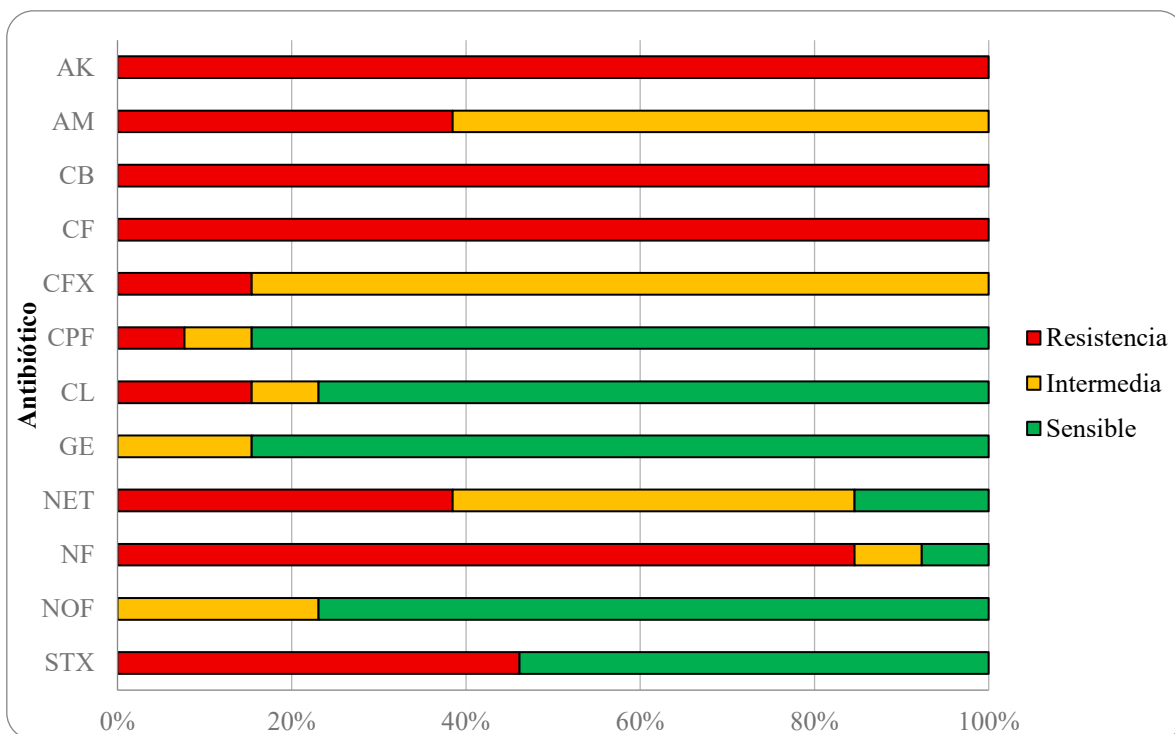


Figura 18. Grafica del porcentaje de resistencia y sensibilidad antibiótica en cepas de *E.coli* de jugos frescos. (AK) Amikacina, (AM) Ampicilina, (CB) Carbenicilina, (CF) Cefalotina, (CFX) Cefotaxima, (CL) Cloranfenicol, (CPF) Ciprofloxacina, (GE) Gentamicina, (NET) Netilmicina, (NF) Nitrofurantoina, (NOF) Norfloxacin, (STX) Sulfametoxazol/ Trimetoprim.

Análisis molecular

Cuantificación del aislamiento de ADN bacteriológico

El aislamiento de ADN es un paso crucial para la realización de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ya que antes se necesita obtener una muestra de ADN limpia y de alta calidad, con el fin de permitir una amplificación mucho más precisa y obtener un análisis confiable. Una vez que se realizó el protocolo de aislamiento del Wizard genomic DNA Purification Kit A1120 Thermo Fisher Scientific, y obtener una muestra libre de proteínas, ARN y otros agentes impuros que pueden interferir en la PCR. Debido a las bases nitrogenadas que se encuentran a lo largo de la hebra de ADN, absorben la radiación ultravioleta (UV) a una longitud de onda de 260 nm, lo que es proporcional a la concentración de ADN en la solución; por lo tanto, se prosiguió a cuantificar la cantidad de ADN en el nanodrop a una absorbancia de A260, y los datos se registraron en la siguiente Tabla 17.

Tabla 17. Cuantificación del ADN bacteriológico de las muestras de *Escherichia coli*

Código muestra	No. Tubo	Concentración de ADN (ng/μL)	A260/A280	A260/A230
J21	I	146.0	2.02	1.91
	II	37.4	1.96	-5.86
J24	I	15.7	1.88	1.48
	II	46.3	2.04	1.97
	III	128.8	2.02	2.01
	IV	63.1	2.00	2.21
	V	31.3	1.97	2.50
J26	II	56.7	2.05	2.10
	V	59.9	2.00	2.54
J33	I	214.5	2.05	2.47
J37	III	161.9	2.03	2.40
	V	166.5	2.01	2.40
J38	V	328.0	1.94	1.66
<i>E. coli</i> ATCC 11229		222.1	2.01	2.28

Nanogramo/microlitro (ng/μL), Absorbancia (A)

Para evaluar la pureza del ADN se ocupó la relación de absorbancia de A260/A280 y A260/A230, ya que la A260 nm nos permite detectar la presencia de ácidos nucleicos en solución, mientras que si se mide a una absorbancia de 280 nm nos permite determinar la

presencia de proteínas y la A230 nos permite determinar la presencia de cualquier otro componente insoluble que disperse la luz. El cálculo de la relación entre lecturas obtenidas a diferentes absorbancias (A260/A280) nos da la estimación de pureza del ADN, un ADN puro, libre de proteína contaminante tendrá una relación de A260/A280 cercana a 1.8, pero si hay presencia de proteínas o fenol será menor a 1.8 o si es mayor, indica la presencia de ARN (Stephenson, 2010).

Con relación a la concentración, para la mayoría de las PCR, se recomienda por lo menos una concentración entre 30 y 100 ng/ μ L de ADN, pero este rango puede variar dependiendo del protocolo de PCR a utilizar y en este caso fue suficiente para realizar el siguiente análisis.

Identificación genómica de *E.coli* mediante PCR y electroforesis

En el caso de este estudio se realizaron dos tipos diferentes de PCR: rep-PCR y PCR del gen 16s. En el caso del proceso de amplificación de ADN por PCR del gen 16s rRNA (ARN ribosomal 16s), es una técnica molecular que se utiliza para detectar, identificar y clasificar bacterias, debido a que el gen 16s rRNA está presente en todas las bacterias y es el encargado de codificar una parte del ribosoma, lo que produce que esta técnica produzca regiones altamente conservadas entre bacterias y a su vez, tenga regiones variables específicas para cada especie, lo que la hace ideal para identificar bacterias. En esta técnica se utilizan cebadores (primers) específicos para las regiones conservadas del gen 16s, para demostrar si existe la presencia de bacterias al obtener una banda de ADN amplificado al realizar la electroforesis (Sontakke et al., 2009).

Se prepararon en microtubos de PCR de 0.2mL la mezcla aproximada a 50 μ L para llevar a cabo la PCR, donde se añadieron los componentes del Kit DreamTaq PCR Master Mix (2x) de la siguiente manera: 22 μ L de agua libre de nucleasas, 25 μ L de DreamTaq PCR Master Mix (2x), 1 μ L de primer forward (63F), 1 μ L de primer reverse (1389R) y 1 μ L del ADN extraído. Los primers 63F y 1389R que mencionan anteriormente son oligonucleótidos universales diseñados por Sigma para amplificar un fragmento del gen 16S rRNA bacteriano, y presentan la siguiente secuencia: 63F (5'-CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC-3') y 1389R (5'-ACG GGC GGT GTG TAC AAG-3). Son conocidos como primers universales bacterianos, que amplifican aproximadamente un fragmento de 1300 pb.

Al obtener la mezcla final, se realizaron las amplificaciones de PCR en un termociclador de la marca Labnet modelo MultiGene, bajo las condiciones de la Tabla 2. Pero para obtener un análisis más claro y preciso, de cada producto de PCR, se purificó con un kit de purificación de PCR Wizard (Promega) utilizado de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Seguido del corrimiento de las muestras por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% a 1000A /98V durante 35 minutos.

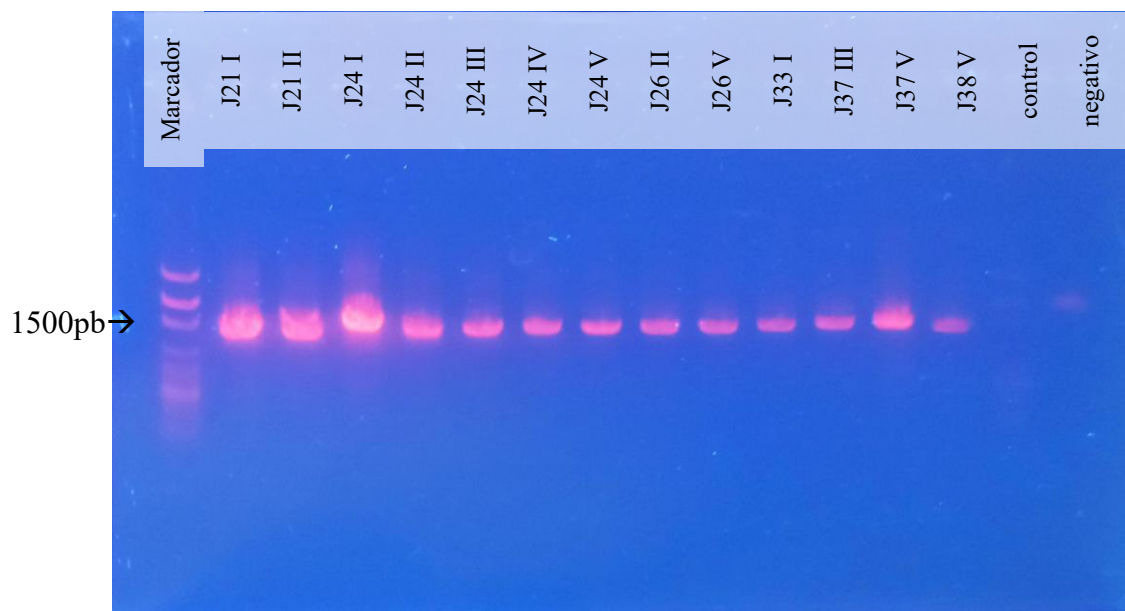


Figura 19. Electroforesis de la PCR del gen 16s rRNA en gel de agarosa al 0.8%

Los primers 63F y 1389R que se utilizaron para amplificar un fragmento del gen 16S rRNA bacteriano, son conocidos como primers universales bacterianos, ya que amplifican aproximadamente un fragmento entre 1500 a 1300 pb. Como se observa en la Figura 19, se colocaron en un pozo del gel de agarosa el marcador de peso molecular, en otras las muestras y en el último se colocó el control negativo de la PCR, con el fin de analizar la presencia de bacterias como *E.coli* dentro de la posición específica que se indicó anteriormente.

La electroforesis de todas las muestras sometidas (Figura 19) demostró que la reacción de PCR generó un resultado positivo de amplificación del gen 16s sobre todas las muestras dentro del rango de 1500 a 1300 pb, determinado que la bacteria de principal interés en este estudio se encuentra presente en los jugos frescos de puestos ambulantes que se muestrearon en este trabajo de investigación.

La segunda técnica de amplificación que se realizó fue rep-PCR, esta técnica consiste en obtener bloques de secuencias repetitivas intercaladas en diferentes sitios del genoma bacteriano, para la generación de una huella dactilar o un perfil único para las cepas involucradas. Estos fragmentos amplificados de ADN, cuando se separan por electroforesis, construyen un código genómico que puede emplearse para la discriminación de subespecies y definición de cepas bacterianas (Caugant, 2009).

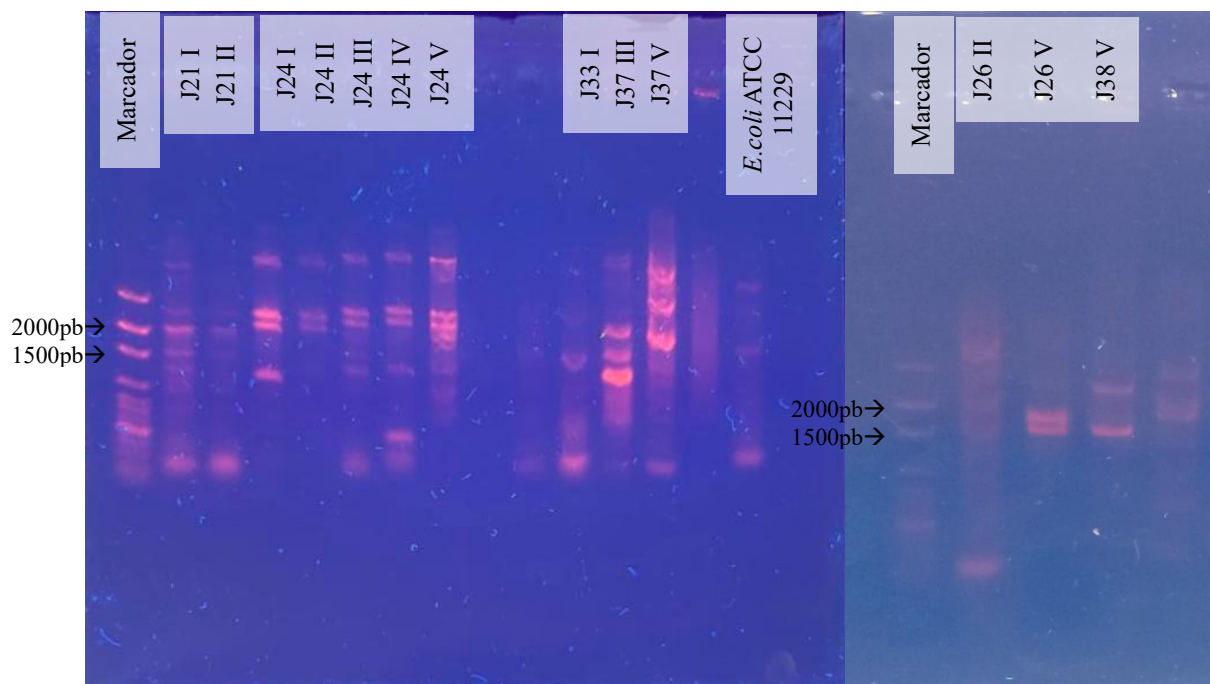


Figura 20. Electroforesis de rep-PCR en gel de agarosa al 0.8%

Se prepararon en microtubos de PCR de 0.2mL la mezcla aproximada a 50µL para llevar a cabo la PCR, donde se añadieron los componentes del Kit DreamTaq PCR Mster Mix (2x) de la siguiente manera: 21µL de agua libre de nucleasas, 25µL de DreamTaq PCR Mster Mix (2x), 1µL de primer forward (REP1), 1µL de primer reverse (REP2) y 2µL del ADN extraído. Los primers para el método de rep-PCR que se utilizarón provienen de Versalovic et al. (1994), además de que presentan la siguiente secuencia: Rep 1 (5'-III ICG ICG ICA TCI GGC- 3') y Rep 2 (5'-ICG ICT TTA TCI GGC TAC- 3'). Y una vez obtenida la mezcla final, se realizaron las amplificaciones de PCR en un termociclador de la marca Labnet modelo MultiGene, bajo las condiciones de la Tabla 3. Seguido del corrimiento de las muestras por

electroforesis en gel de agarosa al 0.8% a 1000A/98V por 50 minutos, para la observación de resultados bajo la luz UV (Figura 20).

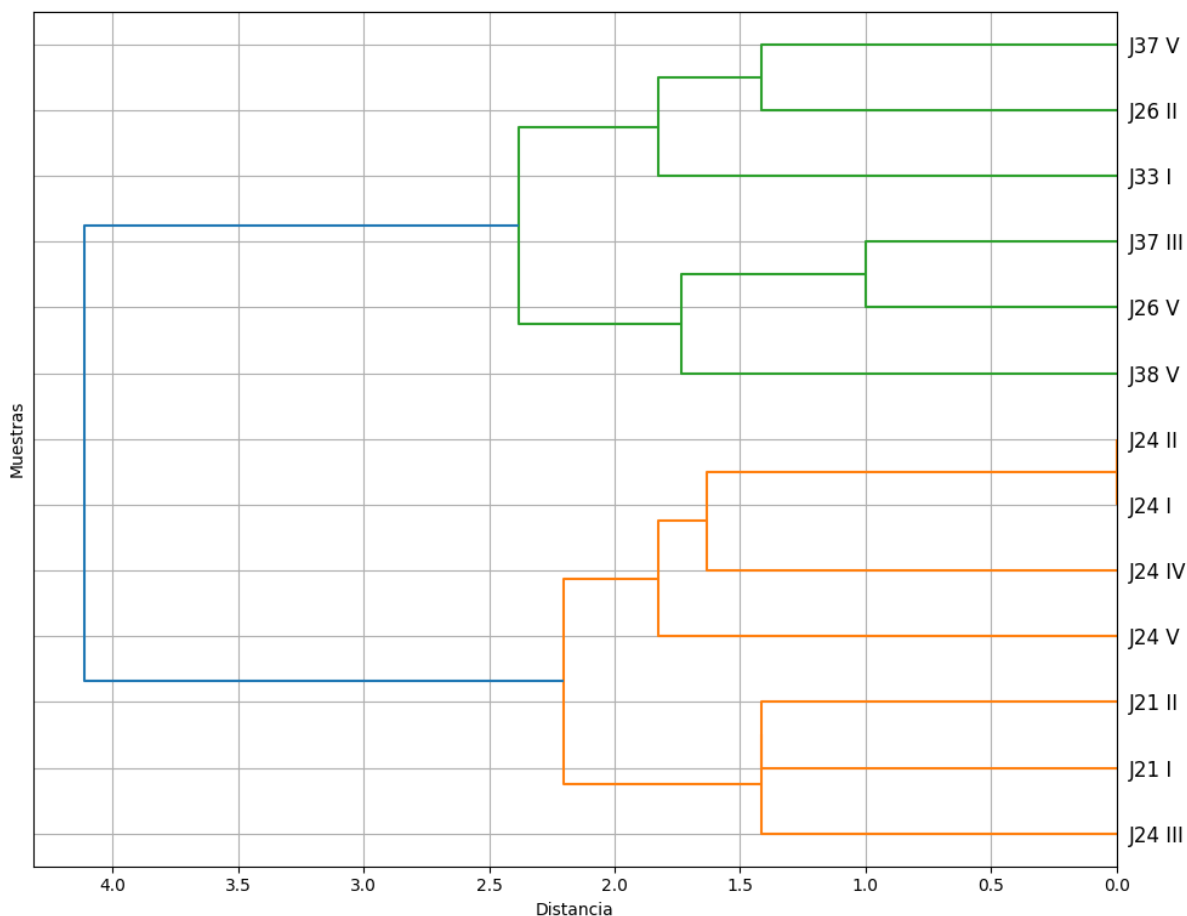


Figura 21. Dendrograma a partir de la electroforesis de rep-PCR

La electroforesis de secuencias repetitivas permitió realizar un análisis filogenético mediante la construcción de un dendrograma, con el cual se representaron gráficamente las relaciones de similitud y diferenciación entre las cepas analizadas. En la Figura 21 se observa el dendrograma correspondiente a las 13 cepas de *E. coli* aisladas de seis jugos frescos diferentes, en el cual se distinguen claramente dos grupos principales. El grupo señalado en color naranja muestra una mayor similitud entre las muestras J21-I, J21-II y J24-III, así como entre las cepas J24-I, J24-II, J24-IV y J24-V, aunque estas últimas se encuentran separadas de las primeras. Por su parte, el grupo verde se subdivide en dos conjuntos: el primero integrado por J37-V, J26-II y J33-I, y el segundo por J37-III, J26-V y J38-V.

Estos resultados permiten interpretar que las cepas obtenidas de una misma muestra, en particular las de la serie J24, corresponden a clonas estrechamente relacionadas, lo que sugiere una contaminación común o una fuente compartida durante la elaboración de los jugos. La excepción es la cepa J24-III, que presenta mayor similitud con las cepas de la muestra J21, lo que indica la posible coexistencia de diferentes linajes de *E. coli* en un mismo producto o en condiciones de elaboración similares. Asimismo, el hecho de que cepas provenientes de una misma muestra se encuentren distribuidas en diferentes subgrupos evidencia la presencia de variabilidad genética intra-muestra, lo que puede estar relacionado con la existencia de subespecies o clones distintos de *E. coli* circulando en los jugos frescos analizados.

Este hallazgo tiene implicaciones relevantes para la inocuidad alimentaria, ya que la diversidad genética observada podría reflejar la exposición de los jugos a múltiples fuentes de contaminación (agua, utensilios, superficies, manipulación humana) en lugar de un único foco. Además, la identificación de grupos clonales refuerza la importancia de implementar estudios moleculares de tipificación, ya que estos permiten trazar rutas de transmisión y establecer vínculos epidemiológicos que no se podrían detectar únicamente con pruebas convencionales de cultivo.

Este análisis filogenético no solo confirmó la relación clonal entre varias cepas, sino que también puso en evidencia la heterogeneidad genética de *E. coli* en jugos frescos, lo que subraya la necesidad de reforzar las buenas prácticas de manufactura y los sistemas de control sanitario para reducir la diseminación y persistencia de múltiples linajes de esta bacteria en alimentos de consumo directo.

CONCLUSIONES

Se determinó la presencia de bacterias mesófilas aerobias, coliformes totales y coliformes fecales en jugos frescos expendidos en establecimientos ambulantes de la zona metropolitana de Puebla, observándose niveles variables de contaminación microbiana.

De acuerdo con los parámetros de la NOM-218-SSA1-2011, las muestras no cumplieron con la carga aceptable de bacterias mesófilas aerobias, coliformes totales y coliformes fecales, lo cual pone en evidencia un riesgo significativo para la salud del consumidor.

Se logró aislar y caracterizar fenotípicamente *Escherichia coli* en las muestras analizadas obteniendo una variabilidad genética, lo que indica la posible coexistencia de distintos linajes en los jugos frescos evaluados.

El análisis de resistencia a antibióticos de las cepas de *E. coli* aisladas demostró la presencia de multirresistencia en jugos frescos, generando un riesgo en la salud pública.

BIBLIOGRAFÍA

- Bailón, L. L. (Ed.). (2003). *Atlas de pruebas bioquímicas para identificar bacterias* [Versión online]. Academia.edu.
https://www.academia.edu/77817622/Atlas_de_pruebas_bioquímicas_para_identificar_bacterias
- Bergey, D. H., & Holt, J. G. (1993). *Bergey's manual of determinative bacteriology* (9th ed.). Williams & Wilkins.
- Bourgeois, C., Mescle, J., & Zucca, J. (1994). *Microbiología alimentaria. Volumen I: Aspectos microbiológicos de la seguridad y calidad alimentaria*. Editorial Acribia.
- Casado González, M. C., Torrico Cabezas, G., & Medina Anguita, M. (2012). *Medios de cultivo en un laboratorio de microbiología*. <https://libroslaboratorio.wordpress.com/wp-content/uploads/2012/09/medios-de-cultivo-en-un-laboratorio-de-microbiologc3ada.pdf>
- Casasola Bado, M. J. (2022). La importancia de realizar una correcta tinción de Gram en la identificación bacteriana. *Revista del Colegio de Microbiólogos y Químicos Clínicos de Costa Rica*, 27(2), 89–98.
- Castellari, C. C., Cendoya, M. G., Marcos, F. J., Barrera, V., & Pacin, A. M. (2015). Factores extrínsecos e intrínsecos asociados a poblaciones fúngicas micotoxigénicas de granos de maíz (*Zea mays* L.) almacenados en silos bolsa en Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 47(4), 350–359. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.08.003>
- Caugant, D. A. (2009). *Molecular epidemiology of microorganisms: Methods and protocols*. Humana Press.
- Cervantes-Martínez, J., Orihuela-Equihua, R., & Rutiaga-Quñones, J. G. (2017). Acerca del desarrollo y control de microorganismos en la fabricación de papel. *Conciencia Tecnológica*, (54), 39–44.
- Doyle, M., Beuchat, L., & Montville, T. (2001). *Microbiología de los alimentos*. Editorial Acribia.

- Engleberg, N., DiRita, V., & Dermody, T. (2013). *Mecanismos de las enfermedades microbianas* (5a ed.). P&M Healthcare Publishing Services, S.A. de C.V.
- Figuroa-Ducoing, et al. (2022). In Mexico City, fresh-squeezed street-vended orange juice is contaminated with fecal coliforms, *Escherichia coli*, and Shiga toxin-producing *E. coli*: A potential risk for acquiring foodborne diseases. *Food Science and Technology*, 42, e52022. <https://doi.org/10.1590/fst.52022>
- Freifelder, D. (1981). *Técnicas de bioquímica y biología molecular*. Reverté
- Gómez, E. de E. (2007). *Higiene en alimentos y bebidas* (5a ed.). México: Trillas.
- Hannaoui Rodríguez, E. J., Villalobos, L. B., & Martínez Nazaret, R. E. (2009). *Escherichia coli* shigatoxigénica: Patogénesis, diagnóstico y tratamiento. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 29(1), 13–20.
- Hernández-Anguiano, A., Salgado, P., Carlos, A., Carlos, E., Vargas-Hernández, M., & Patel, J. (2017). Microbiological quality of fresh nopal juice. *Microorganisms*, 4(4), Article 46. <https://doi.org/10.3390/microorganisms4040046>
- Ingraham, J. L., & Ingraham, C. A. (1998). *Introducción a la microbiología* (Vol. 2). Reverté.
- Instituto Nacional de las Personas Adultas Mayores. (2023, julio). Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) tienen mayor riesgo de contraerlas las personas adultas mayores. <https://www.gob.mx/inapam/es/articulos/las-enfermedades-transmitidas-por-alimentos-eta-tienen-mayor-riesgo-de-contraerlas-las-personas-adultas-mayores#:~:text=Las%20ETA%20son%20una%20causa,mueren%20en%20todo%20el%20mundo>
- Kopper, G., Calderón, G., Schneider, S., Gutiérrez, G., & FAO Consultores. (2009). *Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico: Estudio de caso en Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras y Nicaragua*. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.

- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Stahl, D. A., & Clark, D. P. (2010). *Brock biology of microorganisms* (13th ed.). Pearson Benjamin Cummings.
- Monge-Arroyo, J. (2020). *Evaluación de conocimientos de inocuidad alimentaria en manipuladores de alimentos de establecimientos de comida étnica de la comuna de Providencia* (Tesis de magíster, Universidad de Chile).
- Morales Guerrero, J. C., García Zepeda, R. A., Flores Ruvalcaba, E., & Martínez Michel, L. (2012). Evaluación de los métodos de la normatividad mexicana para la determinación de nitritos en alimentos infantiles. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 62(3), 295–302.
- Ocaña de Jesús, et al. (2022). Microbiological quality and presence of enteropathogenic bacteria in orange juice sold in popular markets. *Food Science and Technology*, 42, e09621. <https://doi.org/10.1590/fst.09621>
- Organización Panamericana de la Salud. (2005). *Manual para la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana mediante pruebas de laboratorio* [Archivo PDF]. <https://www.paho.org/sites/default/files/2021-03/susceptibilidad-antimicrobiana-manual-pruebas-2005.pdf>
- Palomino-Camargo, C., González-Muñoz, Y., Pérez-Sira, E., & Aguilar, V. H. (2018). Metodología Delphi en la gestión de la inocuidad alimentaria y prevención de enfermedades transmitidas por alimentos. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 35(3), 483–490. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2018.353.3086>
- Paredes-Aguilar, M., & Rivero-Montes, L. (2023). Calidad microbiológica de alimentos que se venden al exterior de escuelas primarias. *South Florida Journal of Development*, 4(4), 1751–1757. <https://doi.org/10.46932/sfjdv4n4-024>
- Pascual, A. M. D. R. C. Y. (2000). *Microbiología alimentaria*. Madrid, España: Díaz Santos.
- Prescott, L. M., Harley, J. P., & Klein, G. A. (2009). *Microbiología* (3ª ed.). McGraw-Hill Interamericana.

- Promega Corporation. (2023). *Wizard® Genomic DNA Purification Kit: Technical Manual* (TM050). https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/wizard-genomic-dna-purification-kit-protocol.pdf?rev=4365298e7d1148e78b6c466889006f83&sc_lang=en
- Rodríguez Martínez, C., & Zhurbenko, R. (2018). *Manual de medios de cultivo 2018*. Centro Nacional de Biopreparados (BioCen). <https://www.biocen.cu/wp-content/uploads/2021/05/Manual-MC-2018.pdf>
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (2020). Inocuidad alimentaria en México. <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/inocuidad-alimentaria-en-mexico?idiom=es>
- Secretaría de Comercio y Fomento Industrial (SCFI). (2015). *NMX-042-SCFI-2015, Análisis de agua, enumeración de organismos coliformes totales, organismos coliformes fecales (termotolerantes) y Escherichia coli - Método de número más probable en tubos múltiples*. Ciudad de México: SCFI.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (2017). La inocuidad de los alimentos es asunto de todos y todas. <https://www.gob.mx/semarnat/articulos/la-inocuidad-de-los-alimentos-es-asunto-de-todos-y-todas>
- Secretaría de Salud (SSA). (1995). *NOM-092-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa*. Ciudad de México: SSA.
- Secretaría de Salud (SSA). (1995). *NOM-110-SSA1-1994, Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico*. Ciudad de México: SSA.
- Secretaría de Salud (SSA). (1995). *NOM-112-SSA1-1994, Bienes y servicios. Determinación de bacterias coliformes. Técnica del número más probable*. Ciudad de México: SSA.
- Secretaría de Salud (SSA). (1995). *NOM-113-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa*. Ciudad de México: SSA.

- Secretaría de Salud (SSA). (2011). *NOM-218-SSA1-2011, Productos y servicios. Bebidas saborizadas no alcohólicas, sus congelados, productos concentrados para prepararlas y bebidas adicionadas con cafeína. Especificaciones y disposiciones sanitarias. Métodos de prueba*. Ciudad de México: SSA.
- Secretaría de Salud (SSA). (2014). *NOM-210-SSA1-2014, productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos*. Ciudad de México: SSA.
- Sontakke, S., Cadenas, M. B., Maggi, R. G., Diniz, P. P., & Breitschwerdt, E. B. (2009). Use of broad range 16S rDNA PCR in clinical microbiology. *Journal of Microbiological Methods*, 76(3), 217–225. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.11.017>
- Stephenson, F. H. (2010). *Cálculo de la biología molecular y biotecnología: Guía de materiales para laboratorio* (2.^a ed.). Elsevier.
- Thatcher, F. S. (2004). *Análisis microbiológico de los alimentos* (7^a ed.). Editorial Acribia.
- Thermo Fisher Scientific. (2014). *DreamTaq™ PCR Master Mix (2X) User Guide* (Rev. 7). https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012703_DreamTaqDNA_K1072_UG.pdf
- Vásquez de Plata, G. (2003). La contaminación de los alimentos, un problema por resolver. *Salud UIS*, 35(1), 49–54.
- Vidal, J. E., Canizález-Román, A., Gutiérrez-Jiménez, J., & Navarro-García, F. (2007). Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. *Salud Pública de México*, 49(5), 376–386.

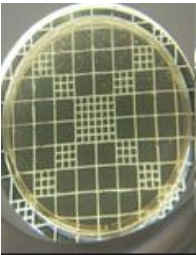
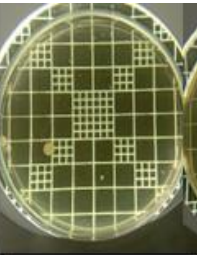
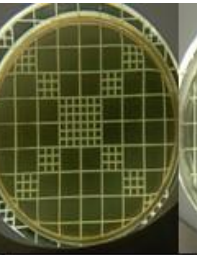
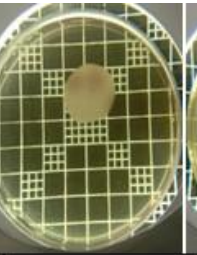
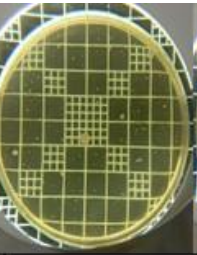
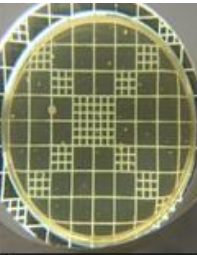
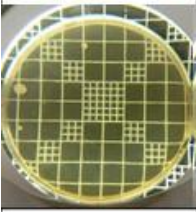
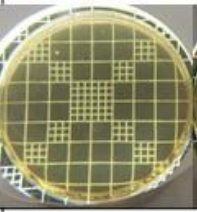
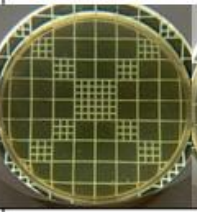
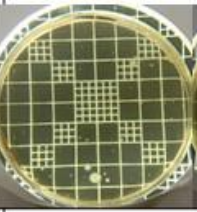
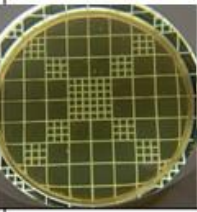
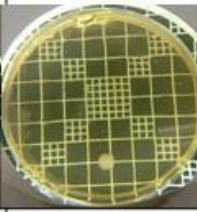
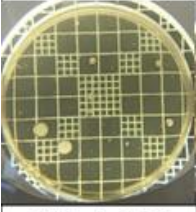
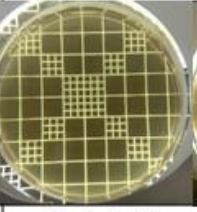
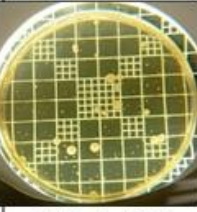
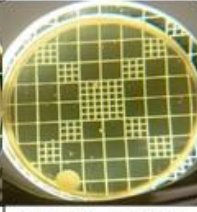
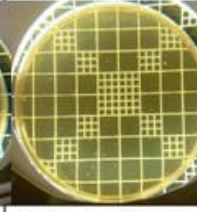
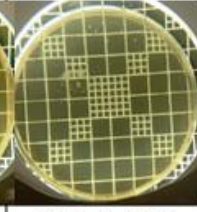
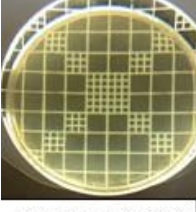
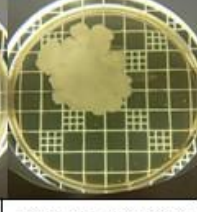
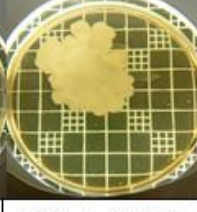
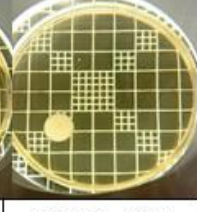
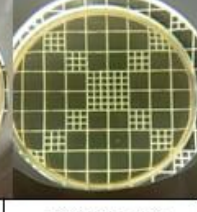
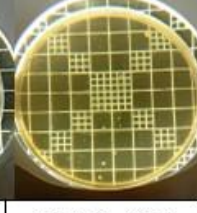
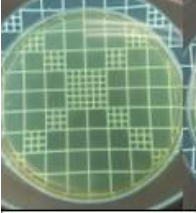

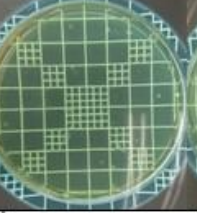
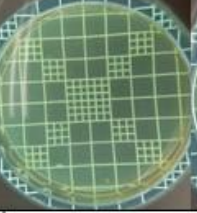
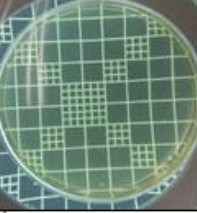
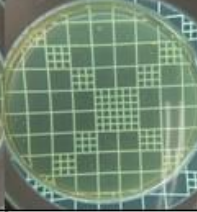
ANEXOS

Anexo 1. Checklist del puesto ambulante de jugos frescos que se muestreo

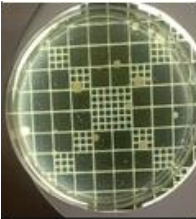
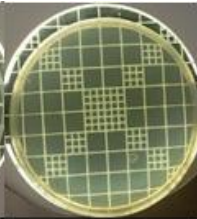
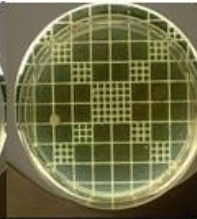

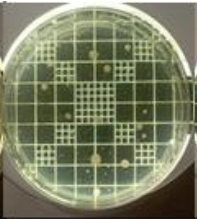
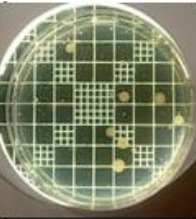
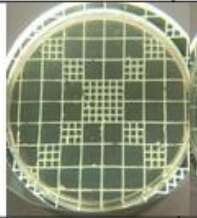
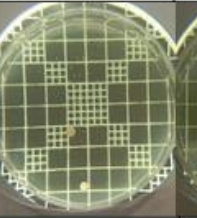
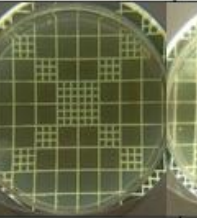
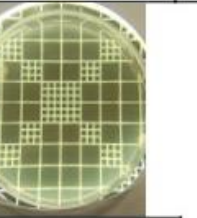
	Características	Sí	No
1	¿El puesto está en un lugar con mucho polvo o viento?		
2	¿El puesto está en un lugar con encharcamientos o humedad?		
3	¿El trapo que utilizan para limpiar se ve limpio?		
4	¿La tabla y cuchillo donde cortan la fruta se ven limpios?		
5	¿Las frutas o vegetales que ocupan para preparar los jugos están en el suelo?		
6	¿Ocupan el mismo exprimidor o procesadora de alimentos para todos los jugos?		
7	¿Limpian el exprimidor o procesadora de alimentos para elaborar un diferente jugo?		
8	¿Los jugos fueron exprimidos al momento que se solicitó?		
9	¿Los jugos se encuentran en jarras?		
10	¿Usan la misma cuchara para mover el precipitado de los jugos?		
11	¿El jugo lo entregan en envase con tapa?		
12	¿La persona que preparó el jugo tiene las uñas largas de las manos?		
13	¿La persona que preparó el jugo recibió el dinero con la mano directamente?		

(Elaboración propia)

Anexo 2. Placas representativas para el recuento de BMA de cada muestra de jugo fresco procesada

					
J01 1:10 312 UFC	J02 1:1000 154 UFC	J03 1:100 69 UFC	J04 1:10 9 UFC	J05 1:1000 384 UFC	J06 1:100 143 UFC
					
J07 1:1000 47 UFC	J08 1:10000 87 UFC	J09 1:1000 3114 UFC	J10 1:1000 89 UFC	J11 1:100 49 UFC	J12 1:1000 52 UFC
					
J13 1:100 206 UFC	J14 1:10 0 UFC	J15 1:100 72 UFC	J16 1:1000 326 UFC	J17 1:10000 372 UFC	J18 1:100 71 UFC
					
J19 1:10000 546 UFC	J20 1:10000 438 UFC	J21 1:1000 2034 UFC	J22 1:100 71 UFC	J23 1:10 16 UFC	J24 1:100 454 UFC
					
J25 1:100 95 UFC	J26 1:100 208 UFC	J27 1:10 32 UFC	J28 1:100 47 UFC	J29 1:10 104 UFC	J30 1:1000 185 UFC

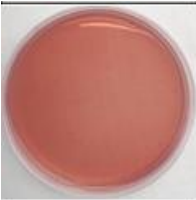
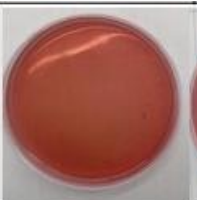
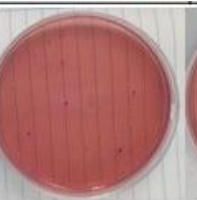
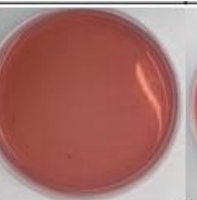
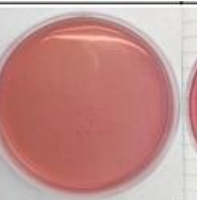
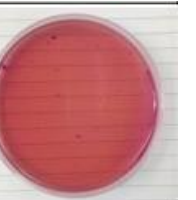
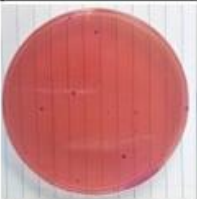
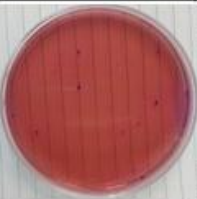
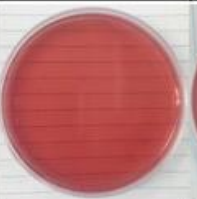

(continuación del Anexo 2)

					
J31 1:10000 1087 UFC	J32 1:100 61 UFC	J33 1:10000 203 UFC	J34 1:100 31 UFC	J35 1:10000 781 UFC	J36 1:1000 1454 UFC
					
J37 1:100 22 UFC	J38 1:100 89 UFC	J39 1:10 14 UFC	J40 1:1000 25 UFC		

Anexo 3. Placas representativas para el recuento de BMA de cada muestra de jugo fresco procesada

J01 Directa 0 UFC	J02 1:1000 171 UFC	J03 1:1000 380 UFC	J04 1:10 0 UFC	J05 1:1000 262 UFC	J06 1:100 750 UFC
J07 1:10000 190 UFC	J08 1:10000 77 UFC	J09 1:1000 768 UFC	J10 1:1000 79 UFC	J11 1:10 1 UFC	J12 1:100 108 UFC
J13 1:1000 70 UFC	J14 1:10 0 UFC	J15 1:10 7 UFC	J16 1:10 11 UFC	J17 1:10000 209 UFC	J18 1:100 1 UFC
J19 1:10000 63 UFC	J20 1:10000 32 UFC	J21 1:10 68 UFC	J22 1:10 13 UFC	J23 Directa 2 UFC	J24 1:100 141 UFC
J25 Directa 5 UFC	J26 1:1000 20 UFC	J27 1:100 150 UFC	J28 1:100 19 UFC	J29 Directa 0 UFC	J30 1:1000 104 UFC

(continuación del Anexo 3)

					
J31 1:10000 5 UFC	J32 1:10 19 UFC	J33 1:100 81 UFC	J34 1:100 13 UFC	J35 1:100 64 UFC	J36 1:100 24 UFC
					
J37 1:10 27 UFC	J38 1:10000 112 UFC	J39 1:10 38 UFC	J40 1:1000 83 UFC		

Anexo 4. Tabla estandarizada del N.M.P. la NMX-AA-042-SCFI-2015

Número de tubos que dieron reacción positiva		NMP por 100 mL	Límite de confianza al 95 %	
1 de 50 mL	5 de 10 mL		Inferior	Superior
0	0	< 1		
0	1	1	< 1	4
0	2	2	< 1	6
0	3	4	< 1	11
0	4	5	1	13
0	5	7	2	17
1	0	2	< 1	6
1	1	3	< 1	9
1	2	6	1	15
1	3	9	2	21
1	4	16	4	40
1	5	> 18		

(SCFI, 2015)

Anexo 5. Tabla de identificación de las familias *Enterobacteriaceae*

Familia <i>Enterobacteriaceae</i>	TSI				LIA		M	I	O	C	U	RM	VP
	S	F	H ₂ S	Gas	S	F							
<i>Citrobacter freundii</i>	A	A	+	+	K	A	+	-	-	+	-	+	-
<i>Citrobacter diversus (koseri)</i>	K/A	A	-	+	K	A	+	+	+	+	+	+	-
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	K	A	-	+	K	A	+	+	+	+	+	+	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	A	A	-	+	K	K	+	-	+	+	-	-	+
<i>Enterobacter cloacae</i>	A	A	-	+	K	A	+	-	+	+	+	-	+
<i>Enterobacter agglomerans</i>	A	A	-	-	K	A	+	-	-	+/-	-	+/-	+
<i>Proteus mirabilis</i>	K	A	+	+	R	A	+	-	+	+	+	+	+/-
<i>Proteus vulgaris</i>	A	A	+	+	R	A	+	+	-	-	+	+	-
<i>Salmonella (7 serotipos)</i>	K	A	+	+	K	K	+	-	+	+	-	+	-
<i>Salmonella typhi</i>	K	A	+	-	K	K	+	-	-	-	-	+	-
<i>Salmonella paratyphi A</i>	K	A	-	+	K	A	+	-	+	-	-	+	-
<i>Serratia marcescens</i>	A	A	-	+/-	K	K	+	-	+	+	-	-	+
<i>Escherichia coli</i>	A	A	-	+	K	K	+	+	+	-	-	+	-
<i>Escherichia coli (inactiva)</i>	K	A	-	-	K	A	-	+	-	-	-	+	-
<i>Shigella grupos A, B, C</i>	K	A	-	-	K	A	-	+/-	-	-	-	+	-
<i>Shigella sonnei</i>	K	A	-	-	K	A	-	-	+	-	-	+	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	A	A	-	+	K	K	-	-	-	+	+	-	+
<i>Klebsiella oxytoca</i>	A	A	-	+	K	K	-	+	-	+	+	-	+
<i>Klebsiella ozaenae</i>	K	A	-	+/-	K	A	-	-	-	-	-	+	-
<i>Klebsiella rhinozcleromatis</i>	A	A	-	-	K	A	-	-	-	-	-	+	-

**S:superficie, F: fondo, M: movilidad, I: indol, O: ornitina, C: citrato, U: urea, RM: rojo de metilo,

VP: Voges Proskauer, A: ácido, K: alcalino, +: positivo, -: negativo**

*Elaboración propia basada en *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Bergey & Holt, 1993).

Anexo 6. Tabla de comparación de halos de sensibilidad en mm (NCCLS), obtenida del inserto del reactivo de multidisco para bacterias Gram (-) de Investigación Diagnóstica y/o Gutiérrez Ramos Abel

TABLA DE COMPARACIÓN DE HALOS DE SENSIBILIDAD EN MM (NCCLS)				
Clave – antibiótico	Concentración	R Iguual o menor	I Entre	S Iguual o mayor
(AK) Amikacina	30 mcg	14	15-16	17
(AM) Ampicilina	10 mcg			
Enterobacteriaceae		11	12-13	14
Staphylococcus sp.		28	----	29
Enterococos		16	----	18
Estreptococos		21	----	30
(CB) Carbenicilina	100 mcg			
Enterobacteriaceae		18	18-22	23
Pseudomonas sp.		13	14-16	17
(CF) Cefalotina	30 mcg	14	15-17	18
(CFX) Cefotaxima	30 mcg	14	----	23
(CTZ) Ceftazidima	30 mcg	14	15-17	18
(CTX) Ceftriaxona	30 mcg	13	----	21
(CKM) Cefuroxima	30 mcg	14	15-17	18
(CPF) Ciprofloxacina	5 mcg	15	16-20	21
(CLM) Clindamicina	30 mcg	14	15-20	21
(CL) Cloranfenicol	30 mcg	12	13-17	18
(DC) Dicloxacilina	1 mcg	--	----	--
Staphylococcus sp.		10	11-12	13
(ENX) Enoxacina	10 mcg	14	15-17	18
(E) Eritromicina	15 mcg	13	14-17	18
(GE) Gentamicina	10 mcg	12	13-14	15
(NET) Netilmicina	30 mcg	12	13-14	15
(NF) Nitrofurantoina	300 mcg	14	15-16	17
(NOF) Norfloxacina	10 mcg	12	13-16	17
(PE) Penicilina	10 U			
Enterococos		14	----	15
Estreptococos		19	20-27	28
Staphylococcus sp.		28	----	29
N. gonorrhoeae		19	----	20
Neumococos		19	----	20
(SXT) Sulfametoxazol Trimetoprim	25 mcg	10	11-15	16
(TE) Tetraciclina	30 mcg	14	15-18	19
(VA) Vancomicina	30 mcg	--	----	--
Enterococos		14	15-16	17
Staphylococcus aureus		--	----	15