UNIVERSIDAD VERACRUZANA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

Región Poza Rica - Tuxpan

Maestría en Ciencias del Ambiente

TRABAJO DE INTERVENCIÓN

“Monitoreo de bacterias *Vibrio* spp. en ostiones *Crassostrea virginica* de las lagunas de Tamiahua y Tampamachoco, Veracruz, México”

P R E S E N T A

Biól. Dulce Maripaz Hernández Mendoza

Directora

Dra. Rosa Idalia Hernández Herrera

Asesor

Dr. Pablo San Martín del Ángel

Tuxpan, Veracruz noviembre, 2018

Universidad Veracruzana

UNIVERSIDAD VERACRUZANA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

MAESTRÍA EN CIENCIAS DEL AMBIENTE

Revisión del Trabajo de Intervención de la alumna: BIOL. Dulce Maripaz Hernández Mendoza

JURADO EXAMINADOR

NOMBRE	FECHA	DICTAMEN	FIRMA
Eduardo Alfredo Zaiza Meza	19/09/18	Aprobada	
María Rebeca Rojas Ranguillo	19/09/18	Aprobado	
Rodrigo Cuevas González	21/09/18	Aprobada	

En la presente revisión se acordó que el Trabajo de Intervención denominado "Monitoreo de bacterias *Vibrio* spp. en ostiones *Crassostrea virginica* de las lagunas de Tamiahua y Tampamachoco, Veracruz, México" que presenta la sustentante para obtener el Grado de Maestra, está terminado por lo que puede proceder a su inmediata impresión.

El presente trabajo de intervención titulado "Monitoreo de bacterias *Vibrio* spp. en ostiones *Crassostrea virginica* de las lagunas de Tamiahua y Tampamachoco, Veracruz, México" realizado por la C. Biól. Dulce Maripaz Hernández Mendoza bajo la dirección de la Dra. ROSA IDALIA HERNÁNDEZ HERRERA y asesoría del consejo particular del Dr. PABLO SAN MARTÍN DEL ÁNGEL ha sido revisado y aprobado como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS DEL AMBIENTE

DRA. ROSA IDALIA HERNÁNDEZ HERRERA

DIRECTORA

DR. PABLO SAN MARTÍN DEL ÁNGEL

ASESOR

Tuxpan de Rodríguez Cano, Ver. Noviembre 2018

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, agradezco a la **Dra. Rosa Idalia Hernández Herrera** y al **Dr. Pablo San Martín del Ángel** por aceptarme como su tesista, por su paciencia, por financiar parte del proyecto y, guiarme tanto en la ejecución y redacción de mi tesis. De la misma manera, agradezco a la comisión revisora, por su contribución al mejoramiento de este trabajo, conformada por la **Dra. María Rebeca Rojas Ronquillo**, el **Dr. Rodrigo Cuervo González** y el **Dr. Eduardo Zarza Meza.**

Igualmente, doy gracias a **Edgar Reyes Tobías** por su valiosa ayuda en la preparación de las muestras de ostión. También, agradezco a **Aurora Vázquez** y **Rogelio Villar** por apoyarme en la realización de los muestreos prospectivos. De la misma manera, doy gracias a quienes me acompañaron a los muestreos: **Esmeralda Simbrón**, **Bardomiano Mata**, **Gustavo del Ángel**, **Rosa Monroy**, **Isela Morales**, **Loreto Gómez**, **Susana Macías**, **Juana Solares**, **Giselle Medina**, **Sharon Cervantes**, **Silvia Muñoz**, **Jesús Sangabriel y Alejandrina Hernández**.

Asimismo, agradezco al **Mtro. José Luís Soto Loya**, a **Don Álvaro**, **a Don Ángel Rivera**, a los **cooperativistas** y **pescadores** de las lagunas de Tamiahua y Tampamachoco, quienes, de manera amable, facilitaron la obtención de las muestras de ostión.

Por último, pero no menos importante, expreso mi gratitud al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por haberme otorgado la beca 785129/607194 y así poder realizar mis estudios de maestría y desarrollar este trabajo de intervención.

DEDICATORIA

Antes que, a nadie, dedico este logro a **Dios**, por brindarme cada día la vida, la oportunidad de compartir estos momentos con mi familia y la dicha de estudiar

Esta investigación también es dedicada:

A mi querido abuelito Isidro Hernández del Rosal Q.E.P.D., por ser el mejor ejemplo de perseverancia y optimismo en mi vida.

A mis papás, por apoyarme en todos los aspectos y en la decisión de seguir estudiando, por alentarme a seguir adelante y por ser mi inspiración.

A mi tía Alejandrina, por tratarme como si fuera su hija y por recibirme en su casa durante mis estudios de posgrado.

A mis amigos Isela, Juanita, Karla y Loreto, por darme consejos y apoyarme, tanto en el ámbito personal como profesional.

A mis primitos Ángel, Ioseph, Brisa y Jeylin, por hacerme ver el mundo con mayor entusiasmo y alegría.

ÍNDICE

Página

I. INTRODUCCIÓN 1

II. ANTECEDENTES 3

2.1.- Características de los vibrios 3

2.2.- Factores que favorecen la presencia y abundancia de *Vibrio* spp. 6

2.3.- Casos reportados de infecciones en humanos por bacterias *Vibrio* spp. en México 7

2.4.- Programas de monitoreo de *Vibrio* spp. en ostiones 8

2.5.- Presencia de *Vibrio* spp. en ostiones del género *Crassostrea* 9

III. OBJETIVOS 14

3.1.- Objetivo general 14

3.1.1.- Objetivos particulares 14

IV. ÁREA DE ESTUDIO 15

V. MATERIALES Y MÉTODOS 19

5.1.- Obtención de ostiones *C. virginica* 19

5.1.1.- Recolecta de ostiones *C. virginica* en bancos ostrícolas 19

5.1.2.- Obtención de ostiones *C. virginica* en cooperativas y restaurantes 20

5.2.- Preparación del medio de cultivo TCBS 21

5.3.- Pruebas preliminares de aislamiento bacteriano 21

5.4.- Aislamiento bacteriano 22

5.5.- Recuento bacteriano de microorganismos viables tras diluciones seriadas . 23

5.6.- Determinación de presencia y abundancia de *Vibrio* spp. y análisis estadísticos 25

VI. RESULTADOS 27

6.1.- Observación de colonias de bacterias *Vibrio* spp. aisladas de ostiones *C. virginica* de las lagunas de Tamiahua y Tampamachoco 27

6.2.- Conteo de UFC/mL de *Vibrio* spp. aisladas de individuos de *C. virginica* provenientes de bancos ostrícolas (fase de recolección) 28

6.2.1. Bancos ostrícolas de la laguna de Tamiahua 28

6.2.2. Bancos ostrícolas de Tampamachoco 31

6.3.- Conteo de UFC/mL de *Vibrio* spp. aisladas de ostiones *C. virginica* obtenidos de cooperativas (fase de postrecolección) 34

6.3.1.- Registro de UFC/mL de *Vibrio* spp. en ostiones *C. virginica* de la cooperativa de la laguna de Tamiahua (Cooperativa Tamiahua) 34

6.3.2 Registro de UFC/mL en ostiones *C. virginica* de la cooperativa de la laguna de Tampamachoco (Cooperativa del Puerto de Tuxpan) 37

6.4.- Registro de UFC/mL de *Vibrio* spp. aisladas de ostiones *C. virginica* obtenidos de restaurantes 39

6.5.- Comparación de los sitios de recolección y postrecolección de ambas lagunas 40

VII. DISCUSIÓN..... 43

6.1.- Registro de vibrios en ostiones recolectados en bancos de Tamiahua y Tampamachoco 43

6.2.- Registro de vibrios en ostiones de las cooperativas de Tamiahua y Tampamachoco 44

6.3.- Ausencia de vibrios en los restaurantes de Tamiahua y Tampamachoco 44

6.4.- Diferencias estacionales en la cantidad de *Vibrio* spp. en la recolección y postrecolección de ostiones 45

VIII. CONCLUSIONES Y APLICACIONES PRÁCTICAS DEL TRABAJO 46

8.1.- Conclusiones 46

8.2.- Aplicaciones prácticas del trabajo 47

IX. BIBLIOGRAFÍA..... 49

X. ANEXOS 63

Anexo A.- Medidas de seguridad en laboratorio y campo 63

Al momento de extracción de los ostiones 63

En laboratorio 63

ÍNDICE DE CUADROS

Página

Cuadro 1.- Características de los miembros de la familia *Vibrionaceae* (Gómez-Gil *et al*., 2014) 3

Cuadro 2.- Características fisicoquímicas de las lagunas de Tamiahua y Tampamachoco (Lara *et al*., 2011). 18

Cuadro 3.- Sitios de muestreo en las dos lagunas. 19

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Figura 1.- Ubicación de los puntos de muestreo en la Laguna de Tamiahua (1.- La Palma, 2.- Mangles y 3.- Panzacolas)..... 15

Figura 2.- Ubicación de la laguna de Tampamachoco (1.-Pipiloya, 2.- En Medio y 3.- El Tubo). 17

Figura 3.- Procedimiento de siembra por dilución utilizado. 23

Figura 4.- Cultivo de bacterias *Vibrio* spp. en medio TCBS (24 horas de incubación) aisladas de ostiones de la cooperativa de Tampamachoco. Las UFC/mL (unidades formadoras de colonias) amarillas indican la presencia de vibrios sacarosa positiva y las UFC verdes demuestran la presencia de vibrios sacarosa negativa. 27

Figura 5.- Valores promedio de UFC/mL (Unidades formadoras de colonias por mililitro de homogenado) sacarosa positiva aisladas de individuos *C. virginica* de

los bancos ostrícolas de la laguna de Tamiahua (1.- La Palma, 2.- Mangles, 3.- Panzacolas) durante las estaciones de primavera, verano, otoño e invierno. El LMP (Límite máximo permisible) fue rebasado durante primavera y verano. Las letras distintas indican que hubo diferencias estadísticas. 29

Figura 6.- Valores promedio de UFC/mL (Unidades formadoras de colonias de por mililitro de homogenado de ostión) sacarosa negativa aisladas de individuos *C. virginica* de los bancos ostrícolas de la laguna de Tamiahua (1.- La Palma, 2.- Mangles y 3.- Panzacolas) durante las estaciones de primavera, verano, otoño e invierno. El LMP (límite máximo permisible) fue rebasado durante primavera y verano. Las letras distintas indican que hubo diferencias estadísticas. 31

Figura 7.- Valores promedio de UFC/mL (Unidades formadoras de colonias por mililitro de homogenado de ostión) sacarosa positiva aisladas de individuos *C. virginica* de los bancos ostrícolas de la laguna de Tampamachoco (1.- Pipiloya, 2.- En Medio, 3.- El Tubo) durante las estaciones de primavera, verano, otoño e invierno. El LMP (límite máximo permisible fue rebasado durante primavera y verano. Las letras similares indican que no hubo diferencias estadísticas. 32

Figura 8.- Valores promedio de UFC/mL (Unidades formadoras de colonias aisladas por mililitro de homogenado) sacarosa negativa aisladas de individuos *C. virginica* provenientes de los bancos ostrícolas de la laguna de Tampamachoco (1.- Panzacolas, 2.- En Medio, 3.- El Tubo). El LMP (Límite máximo permisible), fue rebasado en todos los bancos, durante las estaciones de primavera y verano. Las letras similares indican que no hubo diferencias estadísticas. 34

Figura 9.- Valores promedio de UFC/mL (Unidades formadoras de colonias aisladas por mililitro de homogenado) de *Vibrio* spp. sacarosa positiva en ostiones *C. virginica* obtenidos de la cooperativa de Tamiahua durante primavera, verano e invierno. El límite máximo permisible (LMP) únicamente fue rebasado en invierno. 35

Figura 10.- Valores promedio de UFC/mL (Unidades formadoras de colonias aisladas por mililitro de homogenado) de *Vibrio* spp. sacarosa negativa en ostiones C. virginica obtenidos de la cooperativa de Tamiahua durante primavera, verano e invierno. El límite máximo permisible (LMP) fue rebasado durante primavera..... 36

Figura 11.- Valores promedio de UFC/mL (Unidades formadoras de colonias aisladas por mililitro de homogenado) de *Vibrio* spp. sacarosa positiva en ostiones *C. virginica* obtenidos de la cooperativa de Tampamachoco durante primavera, verano, otoño e invierno. El límite máximo permisible (LMP) fue rebasado durante primavera y verano. 37

Figura 12.- Valores promedio de UFC/mL (Unidades formadoras de colonias aisladas por mililitro de homogenado) de *Vibrio* spp. sacarosa negativa en ostiones *C. virginica* obtenidos de la cooperativa de Tampamachoco durante primavera, verano, otoño e invierno. El límite máximo permisible (LMP) fue rebasado durante primavera y verano. 38

Figura 13.- Valores promedio de UFC/mL (Unidades formadoras de colonias aisladas por mL de homogenado de ostión) aisladas de los restaurantes de las lagunas de Tamiahua (R1, R2) y Tampamachoco (R3, R4 y R5). 39

Figura 14.- Comparación estacional de los valores promedio de UFC/mL de *Vibrio* spp. obtenidas de individuos de *C. virginica* de bancos de las lagunas de Tamiahua y Tampamachoco, Veracruz. 41

Figura 15.- Comparación de los valores de UFC/mL sacarosa positiva y UFC/mL sacarosa negativa de *Vibrio* spp. aisladas de ostiones de las cooperativas de Tamiahua y Tampamachoco durante las estaciones de primavera, verano, otoño e invierno. TAH= Cooperativa de Tamiahua, TAP= Cooperativa de Tampamachoco. 42

RESUMEN

Los vibrios habitan ecosistemas estuarinos y marinos, viven asociados a organismos acuáticos como los invertebrados. Conjuntamente, los moluscos bivalvos se alimentan por filtración, por lo tanto, son reservorios potenciales de estas bacterias. Por otra parte, Los impactos antropogénicos pueden favorecer a la abundancia de vibrios en los ecosistemas acuáticos. El presente estudio propuso conocer si existen diferencias estacionales en la presencia y abundancia de vibrios durante las fases de recolección (bancos ostrícolas) y postrecolección (cooperativas y restaurantes) de ostiones *C. virginica* de las lagunas de Tamiahua y Tampamachoco, Veracruz. En México, se implementa el Programa Mexicano de Sanidad de Moluscos Bivalvos que tiene como objetivo mejorar la calidad sanitaria de los moluscos destinados al consumo humano, a pesar de esto, no es obligatorio y aún no cuenta con vigilancia y monitoreo periódicos. Por lo anterior, el en el presente estudio se muestrearon trece sitios, durante las diferentes estaciones del año. El recuento bacteriano se basó en la NOM-031-SSA1-1993. Se aislaron vibrios (UFC/mL) provenientes de ostiones de ambas lagunas en las etapas de recolección y postrecolección. Se determinó mediante pruebas estadísticas que no existieron diferencias espaciales significativas, no obstante, se presentaron diferencias entre estaciones del año. Generalmente, en los bancos ostrícolas durante primavera se registraron valores significativamente más altos. En esta investigación, se evidencia por primera vez, la presencia de *Vibrio* spp. en ostiones de las cooperativas de Tamiahua y Tampamachoco. También se reporta la ausencia de estas bacterias en los restaurantes adyacentes, cumpliendo, de esta manera, con el límite máximo permisible indicado por la NOM-242-SSA1-2009. Lo anterior exhibe la necesidad de aplicar medidas enfocadas a reducir o evitar la presencia de vibrios durante la fase de postrecolección de ostiones, especialmente en las cooperativas, con el fin de disminuir el riesgo de infección causados por estas bacterias a los consumidores

Palabras clave: bacterias patógenas, ostiones, vigilancia sanitaria, inocuidad alimentaria

I. INTRODUCCIÓN

Los vibrios conforman uno de los grupos más amplios y diversos de bacterias (Gómez-Gil *et al*., 2014; Wietz *et al*., 2010), se distribuyen en ecosistemas estuarinos y marinos (Kingsley, 2014) y pueden vivir asociados a algas nocivas (Greenfield, *et al*., 2017), a, organismos vertebrados e invertebrados (Martínez-Urtaza *et al.,* 2012; Secretaria de Salud, 2012) y en algunos casos, establecen simbiosis (Martín *et al*., 2010), no obstante, algunos de ellos son patógenos (Jones, 2014), y se conoce que los impactos negativos en el ambiente generados por el hombre contribuyen a la presencia, cantidad y expansión geográfica de los vibrios, por lo tanto, el incremento en la abundancia de las poblaciones de vibrios puede afectar la salud de humanos y animales marinos (Labbate *et al.*, 2016).

En general, los mariscos son reservorios potenciales de microorganismos patógenos (FAO, 2010), en particular, el tipo de alimentación por filtración realizada por los moluscos bivalvos los convierte en potenciales reservorios de vibrios patógenos (Jones, 2017), es decir, la calidad sanitaria de estos organismos es afectada por la presencia de estos microorganismos nocivos para la salud humana (Costa *et al*., 2011; Negrete y Romero, 2010; FAO, 2010).

Por lo anterior, se realizan esfuerzos a nivel nacional para la vigilancia y control de patógenos en moluscos bivalvos, a través del Programa Mexicano de Sanidad de Moluscos Bivalvos, que es coordinado por la Secretaría de Salud, la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales y la Secretaría de Marina (COFEPRIS,

2017; COFEPRIS, 2011; FDA, 2011). No obstante, hace falta realizar vigilancia y monitoreos continuos para verificar los factores que afectan negativamente a este recurso (Galaviz-Villa *et al*., 2013).

Los monitoreos ambientales evalúan la contaminación en el ambiente y los recursos naturales existentes en determinado sitio (OEFA, 2013). Por lo anterior, las lagunas donde se realizó la presente investigación fueron elegidas de acuerdo con los siguientes criterios: la laguna de Tampamachoco presenta perturbación por urbanización e industria, eutrofización y recibe descargas directas de aguas residuales (Vidal, 2013), mientras que la laguna de Tamiahua también presenta contaminación por aguas residuales (Herrera-Silveira *et al*., 2011) y ha sido detectada la presencia de coliformes fecales (Vidal, 2013). Con el fin de deducir que características (ubicación de los bancos ostrícolas, almacenamiento, estación del año, etc.) influyen en la presencia y abundancia de dichas bacterias, la presente investigación tiene como objetivo monitorear bacterias del género *Vibrio* en la recolección y postrecolección de ostiones *C. virginica* provenientes de las lagunas de Tamiahua y Tampamachoco del estado de Veracruz.

II. ANTECEDENTES

2.1.- Características de los vibrios

Los miembros de la familia *Vibrionaceae,* habitan ambientes acuáticos, son bacilos curvos pequeños anaeróbicos (0.5-0.8 y 1.4-2.6 µ), tienen flagelos polares en una envoltura, son metabólicamente diversos, fermentan D-glucosa y crecen a una temperatura de 20 °C, la mayoría son oxidasa positiva, reducen nitratos a nitritos y requieren de Na+ para su crecimiento, de la misma forma, fermentan D-fructosa, maltosa y glicerol. Estas características son resumidas en el cuadro 1 (Gómez-Gil *et al*., 2014). Particularmente, las bacterias pertenecientes al género *Vibrio* son Gram negativas, su morfología corresponde a bacilos curvos y poseen un único flagelo polar, entre ellas, destaca la presencia de especies patógenas: *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* (Jones, 2014).

Cuadro 1.- Características de los miembros de la familia *Vibrionaceae* (Gómez-Gil *et al*., 2014)

Característica	Miembros de *Vibrionaceae*
Morfología	Bacilos curvos pequeños
Tamaño	0.5-0.8 y 1.4-2.6 µ
Flagelos	Polares contenidos en una envoltura
Metabolismo	Anaeróbico
Fermentan D-glucosa	+
Temperatura de crecimiento	20 °C
Oxidasa	+
Reducción de NO_3^- a NO_2^-	+
Requerimiento de Na+ para crecimiento	+

Fermentación D-fructosa	+
Fermentación de maltosa	+
Fermentación de glicerol	+

El medio tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS) es selectivo para vibrios y es ampliamente utilizado para su detección (Di Pinto *et al*., 2011), en este se pueden distinguir colonias conformadas por vibrios debido a su capacidad de degradar sacarosa, es decir, aquellos vibrios que degradan sacarosa forman colonias amarillas y son denominados sacarosa positiva y los vibrios que no poseen esta cualidad forman colonias verdes o azules y son denominados vibrios sacarosa negativa (Jones, 2014), de esta forma, las colonias amarillas son presuntivamente *V. cholerae, V. alginolyticus*, *V. furnissii* y *V. mimicus*, y las colonias verdes podrían ser *V. parahaemolyticus y Vibrio vulnificus* (Pawan, Uma y Pushpinder 2016).

La bacteria *V. cholerae* es el agente causal de cólera en humanos, enfermedad diarreica aguda que puede ser mortal, se han registrado pandemias de esta enfermedad en los continentes asiático y americano (Secretaria de Salud, 2012). Los serotipos O1 y O139 producen la toxina colérica que causa deshidratación y pérdida de electrolitos mediante la evacuación de heces líquidas y el 60% de los casos sin tratamiento médico pueden ser mortales. Los humanos son un vector de cepas toxígenas y cuando existe un brote de cólera pueden aislarse de aguas residuales. De la misma manera, cepas toxígenas de dicha bacteria están asociadas a otros organismos como: copépodos, moluscos, crustáceos, plantas,

algas y cianobacterias. La infección por cólera es generalmente causada por consumir alimentos contaminados, entre ellos, mariscos crudos (OPS, 2008).

En este sentido, otra bacteria de importancia médica del género *Vibrio* es *V. parahaemolyticus*, dado que es causante de gastroenteritis en humanos, inclusive se han reportado casos de infecciones extraintestinales en los ojos, oídos, tracto urinario y en heridas superficiales, como lesiones en la piel preexistentes en humanos. Esta bacteria utiliza como reservorios al sedimento, plancton, pescados y mariscos (entre ellos ostiones) (Zamora *et al*., 2005). *V. parahaemolyticu*s es moderadamente halófilo, es decir, requiere de sal para sobrevivir y crecer, por lo anterior, se distribuye en ambientes estuarinos (Bhunia, 2018).

Por último, la bacteria *V. vulnificus* es causante de septicemia e incluso la muerte en humanos (Poblete *et al*., 2002), de hecho, puede ocasionar la muerte en pocos días, por lo tanto, es la bacteria del género *Vibrio* que causa mayor mortalidad (Raszl *et al*., 2016), la bacteria habita naturalmente áreas costeras cálidas y se encuentra en concentraciones altas durante verano, organismos acuáticos como los ostiones, están expuestos a concentrar *V. vulnificus* en sus tejidos, debido a que se alimentan por filtración. No obstante, no sólo consumir mariscos crudos o ligeramente cocidos es causa de contraer la infección con dicha bacteria, de igual modo, puede ser mediante cortes, quemaduras o llagas en la piel que tengan contacto con agua de mar o salobre inclusive con organismos marinos. La enfermedad no es transmisible de persona a persona, pero es una amenaza de salud pública sobre todo para aquellas personas inmunocomprometidas. La

mayoría de las infecciones causadas por esta bacteria ocurren durante los meses de calor (ADS, 2005; NOAA, 2007a; FDA, 2009).

2.2.- Factores que favorecen la presencia y abundancia de *Vibrio* spp.

La presencia de ciertas bacterias del género *Vibrio* puede verse influenciada por factores fisicoquímicos como la temperatura, salinidad, conductividad eléctrica y oxígeno disuelto, como es el caso de *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* (León *et al.,* 2013). Por ejemplo, *V. cholerae* puede ser aislada cuando la temperatura del agua y la materia orgánica es alta (Secretaria de Salud, 2012), del mismo modo, el aumento en poblaciones de cianobacterias y dinoflagelados favorece la presencia de vibrios (Greenfield *et al*. 2017).

Por lo anterior, los parámetros fisicoquímicos pueden ayudar a predecir la incidencia de *V. cholerae* en *C. virginica*, inclusive, ya que la bacteria alberga genes patógenos y la presencia de estos genes varía según los cambios en las condiciones ambientales (López-Hernández *et al*., 2015a). El incremento de la abundancia de *Vibrio* spp. a largo plazo es causado por el aumento de la temperatura de la superficie del mar (Vezzulli *et al*., 2016), de esta manera, las anomalías climáticas han expandido las áreas y estaciones de riesgo de enfermedades causadas por *Vibrio* spp. (Martínez-Urtaza *et al*., 2010).

2.3.- Casos reportados de infecciones en humanos por bacterias *Vibrio* spp. en México

Si bien en nuestro país, han sido registrados casos de cólera desde el año 1833 (Jiménez-Corona *et al*., 1995), la primera epidemia se presentó en el periodo de 1991-2001 (OMS, 2013). No obstante, en el año 2013, se reportaron un total de 180 casos de infección por *V. cholerae* O1 Ogawa, distribuidos en los siguientes estados: Hidalgo (88.3 % de los casos), Estado de México (5 % de los casos), Veracruz (4.4 % de los casos) y, por último, San Luís Potosí (1.1 % de los casos), notificándose el deceso de un individuo (OMS, 2013).

Por su importancia epidemiológica las infecciones causadas por la bacteria *V. cholerae* son muy conocidas, sin embargo, en la República Mexicana se han reportado casos de infecciones por *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*. En 2003, en Sinaloa se detectaron 1230 casos de gastroenteritis causados por cepas pandémicas de *V. parahaemolyticus* O3:K6 (Hernández-Díaz *et al.,* 2015).

A pesar de que las infecciones causadas por la bacteria *V. vulnificus* son aisladas, son de gran importancia clínica ya que, como se ha mencionado antes, la infección por *V. vulnificus* es capaz de causar la muerte en pocos días, por ejemplo, en el estado de Durango, durante el periodo de 1990-1999, ocho personas presentaron la infección, de las cuales, siete fallecieron, con un promedio de cuatro días de haber iniciado la infección (Cornejo-Juárez, *et al*., 2000).

En el estado de Veracruz, se han reportado por lo menos dos casos de personas que han muerto por causa de *V. vulnificus*, en uno de ellos, la persona afectada, antes de la infección había nadado en una zona estuarina del Golfo de México y había consumido mariscos, por desgracia, en ambos casos, no se tuvo un diagnóstico pertinente, el agente causal fue identificado de forma tardía (Fonseca, *et al*., 2013; Baizabal-Ramírez *et al*., 2011).

2.4.- Programas de monitoreo de *Vibrio* spp. en ostiones

Con el fin de establecer vigilancia sanitaria, existen programas como el implementado por el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) que consiste en un registro anual de casos de infecciones por bacterias del género *Vibrio* donde destacan *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus, V. cholerae*, *V. fluvialis* y *V. mimicus* (CDC, 2014).

De igual manera, existen programas de monitoreo de bacterias *Vibrio* spp. en moluscos bivalvos con el fin de evaluar el estado de las zonas de cultivo y prevenir el brote de estas infecciones como lo son: El Programa Nacional de Sanidad de Mariscos (NSSP, por sus siglas en inglés), que tiene el objetivo de establecer las condiciones de cómo deben ser transportados los moluscos que serán destinados para consumo, como son la temperatura y tiempo de transporte, así como los estándares bacteriológicos y el proceso postrecolección (FDA, 2011).

En nuestro país, existe el Programa Mexicano de Sanidad de Moluscos Bivalvos de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), que sigue las especificaciones de las Normas Oficiales Mexicanas NOM-242-SSA1-2009 Productos y servicios: Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados, especificaciones sanitarias y métodos de prueba y la NOM-128-SSA-1994 Bienes y Servicios: Análisis de riegos e identificación y control de puntos críticos en la planta industrial procesadora de productos de la pesca. Dicho programa está basado en el Programa Nacional de Sanidad de Mariscos de Estados Unidos de América (COFEPRIS, 2011). Cabe mencionar que este programa es reconocido por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA, 2009) porque se rige bajo los principios del NSSP.

2.5.- Presencia de *Vibrio* spp. en ostiones del género *Crassostrea*

Los ostiones son organismos clave en los ecosistemas estuarinos, ya que contribuyen a su integridad y funcionalidad (NOAA, 2007b). Igualmente, son utilizados como indicadores del estado de los ecosistemas debido a su capacidad bioacumulativa (Baqueiro-Cárdenas *et al.,* 2007). Por otro lado, una de las características sustanciales de los moluscos, es que son una notable fuente alimenticia (Solís y Gómez, 2007), en cuanto a volumen constituyen la quinta pesquería más importante de la República Mexicana, en el año 2014 se produjeron 53,757 toneladas de este recurso, lo que equivale a $245,024,000 MXN (Comisión Nacional de Pesca, 2014).

En el periodo de 2004-2013, el estado de Veracruz ocupó el primer lugar nacional de producción de ostión, aportando el 45.23% del total de la producción (Comisión Nacional de Pesca, 2013). De esta manera, la pesquería de ostión es una fuente considerable de empleo para más de 5,169 pescadores y 10,000 desconchadores (Aldana *et al*. 2014). No obstante, debido a factores que afectan su calidad sanitaria, no se exporta y tiene un precio reducido en el mercado, antes bien, tiene gran demanda en diferentes ciudades del centro del país y del Golfo de México (Aviles-Quevedo y Vázquez-Hurtado, 2006).

Con el fin de monitorear la prevalencia e incidencia de bacterias del género *Vibrio* en ostiones, se han llevado a cabo investigaciones, como es el caso, del estudio realizado en San Paulo, Brasil, en el cual se reportó que la densidad de *V. parahaemolyticus* no patógeno en invierno es significativamente menor que las estaciones de verano y otoño. No obstante, las densidades fueron similares entre estas épocas, los sitios de recolección (cuatro supermercados, tres quioscos de playa, seis restaurantes y dos mayoristas) no influyeron en las densidades de *V. parahaemolyticus* (Costa *et al.,* 2011). En otro estudio, en la Bahía de Chesapeake, Estados Unidos de América se determinó que las densidades de *V. parahaemolyticus* totales y patógenos en ostiones *C. virginica* y muestras de agua, están positivamente correlacionadas con la temperatura del agua, turbidez y oxígeno disuelto (Parveen *et al.*, 2008).

En nuestro país, también se han realizado investigaciones acerca de la presencia de estas bacterias en ostiones, por ejemplo: se reportó la presencia de bacterias patógenas de los géneros *Aeromonas* spp., *Alcaligenes* spp., *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Escherichia* spp., *Flavobacterium* spp., *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Pasteurella* spp., *Pseudomonas* spp., *Salmonella* spp., *Serratia* spp., *Shigella* spp., y *Vibrio* spp. en individuos *C. virginica* desde su recolecta en la Laguna de Alvarado, Veracruz hasta su distribución en centros comerciales de la Ciudad de México. Dentro de las bacterias del género *Vibrio* aisladas que fueron registradas en todas las fases de comercialización, se encuentran: *V. alginolyticus*, *V. cholerae* El Tor, *V. fluvialis*, *V. mimicus* y *V. parahaemolyticus*, excepto *V. vulnificus*, el cual únicamente no fue encontrado en la fase de recolección en la laguna de Alvarado, Veracruz (Negrete y Romero, 2010).

Por otro lado, el crecimiento de *V. parahaemolyticus* y la ocurrencia de genes patógenos a 7 °C involucran cambios en la expresión génica como respuesta al estrés por bajas temperaturas, lo cual contribuye a la sobrevivencia de dicha bacteria, representando un riesgo para la salud pública (Flores-Primo *et al.,* 2015). La adaptación de *V. parahaemolyticus* a los cambios ambientales estacionales puede provocar un aumento en su virulencia y su sobrevivencia (López-Hernández *et al*., 2015b).

En bancos ostrícolas de la Laguna de Mandinga fue aislado *V. cholerae* no: O1 durante todo el año, excepto en el mes de junio, siendo el mes de enero cuando se presentó con mayor frecuencia. De la misma manera, *V. alginolyticus* se aisló

con mayor frecuencia en mayo y agosto y *V. fluvialis* en el mes de noviembre. Existiendo una relación significativa entre la frecuencia de los vibrios en el ostión y la temperatura superficial del agua (Martínez, 2011). No se encontró una correlación entre la concentración de *V. alginolyticus* y la temperatura y salinidad del agua en la época de lluvias en la misma laguna (Reyes-Velázquez *et al*., 2010).

En las lagunas de La Mancha y Alvarado, la temperatura y salinidad regulan la dinámica de *V. cholerae*. Durante la época de lluvias, en las dos lagunas se aisló a *V. cholerae* O1 Inaba. Del mismo modo, indican que la contaminación es debido a las descargas directas de aguas residuales sin tratamiento, lo que favorece la ocurrencia de *V. cholerae*, *E. coli* y *Salmonella* spp. (Castañeda *et al.,* 2005).

En la laguna de Tampamachoco, se registró por primera vez la presencia de *V. cholerae* y *V. parahaemolyticus* en ostiones *C. virginica* (Hernández *et al*., 2015). De la misma manera, se ha determinado mediante pruebas moleculares la presencia de *V. cholerae* no O1 y *V. parahaemolyticus* en poblaciones silvestres de *C. virginica* de la misma laguna (Jiménez, 2012).

De igual modo, en los meses de mayo y junio, se evalúo la presencia de factores de virulencia de *Vibrio parahaemolyticus* (gen TLH y hemolisinas TDH y TRH) en ostiones *Crassostrea virginica* de las lagunas de Pueblo Viejo, Tamiahua, La Mancha y Mandinga, comprobándose la presencia del gen TLH y la ausencia de las hemolisinas TDH y TRH, obteniendo resultados por debajo del nivel máximo permisible según la NOM-242-SSA1-2009 (Galaviz *et al*., 2017).

Debido a la influencia de los factores ambientales y características del ambiente en la prevalencia de *Vibrio* spp. en ostiones (López-Hernández, 2015b), en la presente investigación, se planteó la hipótesis de que la presencia y cantidad de *Vibrio* spp. en ostiones *C. virginica* son influenciadas por el punto de recolección y el manejo durante el proceso de postrecolección.

III. OBJETIVOS

3.1.- Objetivo general

- Evaluar estacionalmente la presencia de bacterias del género *Vibrio* en la recolección y postrecolección de ostiones *C. virginica* provenientes de las lagunas de Tamiahua y Tampamachoco.

3.1.1.- Objetivos particulares

- Registrar las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) de bacterias *Vibrio* spp. en la recolección y postrecolección de ostiones *C. virginica* en ambas lagunas, por sitio y estación de muestreo.

- Estimar la abundancia estacional de bacterias *Vibrio* spp. sacarosa positiva y negativa aisladas en la recolección y postrecolección de ostiones *C. virginica* por sitio, laguna y estación de muestreo.

- Comparar los resultados de conteo de UFC/mL de *Vibrio* spp. de ostiones por bancos ostrícolas, cooperativas y restaurantes por estación del año en las dos lagunas.

IV. ÁREA DE ESTUDIO

A continuación, se detalla la ubicación geográfica, la extensión, los sitios de muestreo que comprendió la presente investigación y características fisicoquímicas. En primer lugar, la laguna de Tamiahua (Figura 1), se encuentra en el norte del estado de Veracruz y comprende los municipios de Ozuluama, Tamalín, Tamiahua, Tampico Alto, Tuxpan. Se ubica en las coordenadas geográficas: 20° 57' 36'' a 22°06'32'' N y 97° 18'41'' a 97°46'17'' O y cuenta con una superficie de 1,405 km^2. El clima de la laguna de Tamiahua corresponde Am(f) cálido húmedo, temperatura media anual mayor de 22 ºC y temperatura del mes más frío mayor de 18 ºC y la precipitación del mes más seco es menor de 60 mm; lluvias de verano y porcentaje de lluvia invernal mayor al 10.2% del total anual (López-Portillo, 2012).

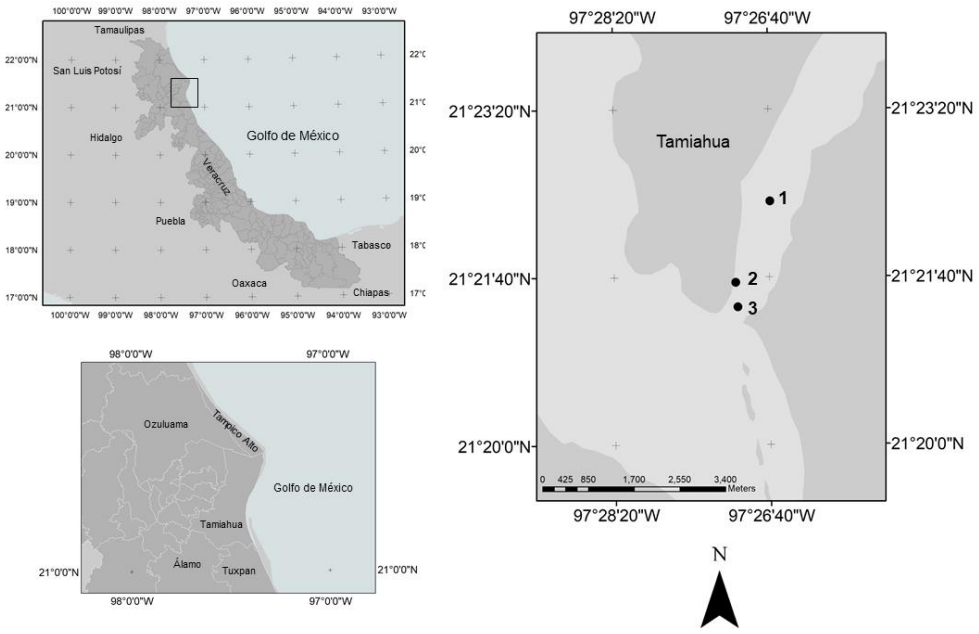

Figura 1.- Ubicación de los puntos de muestreo en la Laguna de Tamiahua (1.- La Palma, 2.- Mangles y 3.- Panzacolas).

En particular, los sitios de muestreo de esta laguna comprenden los bancos ostrícolas La Palma (21°22'25.09" N y 97°26'39.23" O), Mangles (21°21'36.74" N y 97°27'1.65" O) Panzacolas (21°21'22.16" N y 97°27'0.38" O), la Cooperativa Tamiahua y dos restaurantes.

Por otra parte, la laguna de Tampamachoco (Figura 2), está localizada en el norte del estado de Veracruz, en las siguientes coordenadas geográficas: 20°55' y 21°02' N y 97°15' y 97°23' O. Es un cuerpo de agua que posee un canal artificial de navegación que la atraviesa en dirección norte-sur, y tiene una profundidad máxima de cuatro metros. Consta aproximadamente de 11 y 1.3 kilómetros de longitud y anchura máxima respectivamente. Se encuentra separada del mar por la barra de Galindo. Al norte, mediante un canal, tiene comunicación con la laguna de Tamiahua, con el mar a través de la boca de Galindo (origen artificial) y al sur, por medio de un estero, se comunica con el río Tuxpan (Ocaña-Luna y Sánchez-Ramírez, 2000). El clima de la laguna corresponde a Am (f) (100 %) cálido húmedo, temperatura media anual mayor de 22 ºC y temperatura del mes más frío mayor de 18ºC. La precipitación del mes más seco menor de 60 mm; lluvias de verano y porcentaje de lluvia invernal mayor al 10.2 % del total anual (Lara-Domínguez *et al*., 2009).

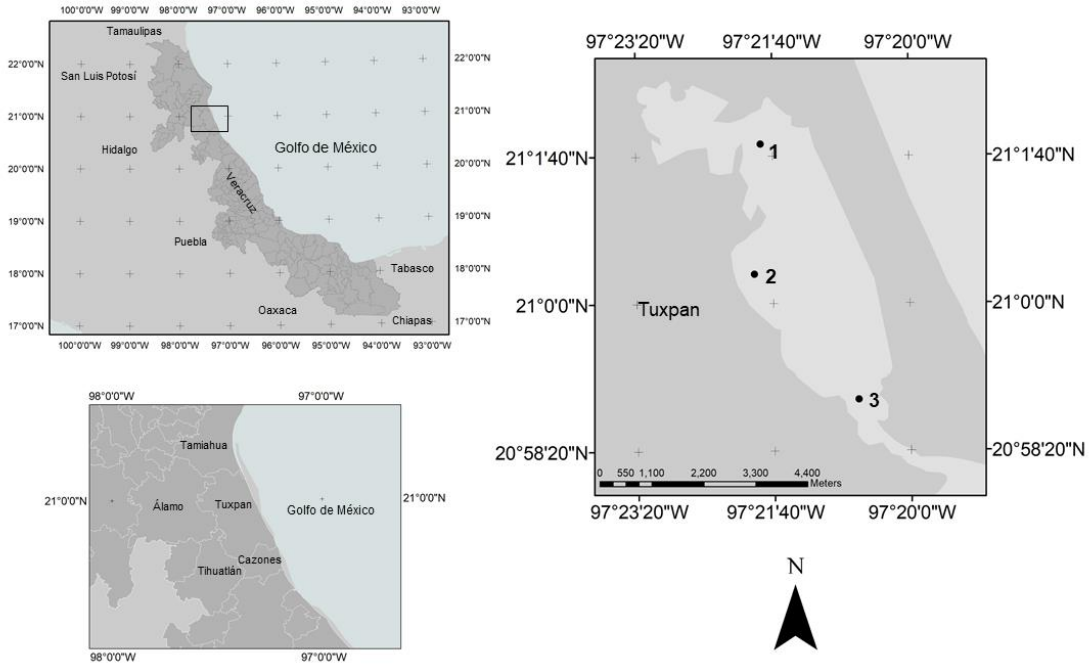

Figura 2.- Ubicación de la laguna de Tampamachoco (1.-Pipiloya, 2.- En Medio y 3.- El Tubo).

Los sitios de muestreo de esta laguna son los bancos ostrícolas Pipiloya (21°1'48.37" N y 97°21'48.83" O), En Medio (21°0'20.04" N y 97°21'53.92"O) El Tubo (20°58'54.82" N y 97°20'38.19" O), la Cooperativa del Puerto de Tuxpan y tres restaurantes.

En cuanto a las características fisicoquímicas, la salinidad de la laguna de Tamiahua es de 20 a 30 ups y la laguna de Tampamachoco presenta 20 a 40 ups. En cambio, la temperatura de ambas lagunas es similar (de 25 a 30 °C). No obstante, Tamiahua tiene un valor de oxígeno disuelto de 6.0 a 7.0 mg/L y la laguna de Tampamachoco, presenta 4.0 a 7.0 mg/L. Por último, respecto a los valores de clorofila α, la laguna de Tamiahua presenta de 0.0 a 10.0 mg/m^3 y la

laguna de Tampamachoco duplica o triplica estos valores, con 20.0 a 30.0 mg/m^3 (Lara *et al*., 2011) (Cuadro 2).

Cuadro 2.- Características fisicoquímicas de las lagunas de Tamiahua y Tampamachoco (Lara *et al*., 2011).

Característica	Tamiahua	Tampamachoco
Salinidad (ups)	20 a 30 (polihalina)	20 a 40 (polihalina-euhalina)
Temperatura (°C)	25 a 30	25 a 30
Oxígeno disuelto (mg/L)	6.0 a 7.0	4.0 a 6.0
Clorofila α (mg/m^3)	0.0 a 10.0	20.0 a 30.0

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1.- Obtención de ostiones *C. virginica*

Se muestrearon un total de 13 sitios (Cuadro 3). A continuación, se describen cada uno de los sitios de captura y colecta. El monitoreo se realizó durante las cuatro estaciones del año; de esta manera, en cada una de las lagunas se realizó un muestreo por estación. El muestreo consistió en tres visitas para cada una de las lagunas. En la primera visita se recolectaron 20 ostiones *C. virginica* en los tres bancos ostrícolas. Durante la segunda visita se obtuvieron 20 ostiones de la cooperativa. Y, por último, en la tercera visita se obtuvieron 20 ostiones en los restaurantes.

Cuadro 3.- Sitios de muestreo en las dos lagunas.

Laguna	Bancos ostrícolas	Cooperativa	Restaurantes
Tamiahua	La Palma, Mangles y Panzacolas	Cooperativa Tamiahua	R1 y R2
Tampamachoco	Pipiloya, En Medio y El Tubo	Cooperativa del Puerto de Tuxpan	R4, R5 y R6

5.1.1.- Recolecta de ostiones *C. virginica* en bancos ostrícolas

En los bancos de la Laguna de Tamiahua (La Palma, Mangles y Panzacolas) y de la laguna de Tampamachoco (Pipiloya, En Medio y El Tubo), la extracción de los ostiones se realizó de manera aleatoria (Vidal-Briseño *et al*., 2015), mediante buceo libre o por el arte de pesca denominado gafas, fueron seleccionados

individuos con tamaño comercial (mayor o igual a 5 cm) (Martínez, 2011). Se extrajeron un total de 20 individuos *C. virginica*. Adicionalmente, se realizaron anotaciones del arte de pesca utilizada. Durante la recolección de ostiones, se utilizaron guantes de jardinería para evitar cortarse al manipularlos.

5.1.2.- Obtención de ostiones *C. virginica* en cooperativas y restaurantes

En cada uno de los muestreos, en las cooperativas de ambas lagunas se obtuvieron 20 ostiones *C. virginica*. Más adelante, en los restaurantes colindantes a las lagunas, se obtuvo la pulpa de 20 ostiones refrigerados (almacenados en bolsas con agua purificada). Es importante mencionar que la identidad de los restaurantes se mantuvo de forma confidencial y fueron denominados de la siguiente manera: R1 y R2 (laguna de Tamiahua) R4, R5 y R6 (laguna de Tampamachoco).

Acto seguido a la recolecta, en todos los casos, a los ostiones se les retiró la fauna acompañante o algún otro residuo y se colocaron en bolsas resellables BOLROL® limpias y nuevas, finalmente fueron transportados al laboratorio en una hielera con geles refrigerantes a una temperatura de 4 °C. En el laboratorio, los moluscos se enjuagaron con agua corriente y fueron cepillados para remover lodo restante de las conchas (Gómez-Gil y Roque, 2006) y se colocaron en una charola con papel absorbente para su posterior desconche.

5.2.- Preparación del medio de cultivo TCBS

El medio selectivo TCBS se preparó en condiciones estériles de acuerdo con las instrucciones del fabricante, de esta manera, antes de cada salida a campo, se dispusieron un total de 36 cajas Petri desechables y estériles con medio TCBS, es decir, tres cajas por cada uno de los sitios de muestreo (bancos ostrícolas, cooperativas y restaurantes). En todas las ocasiones, se trabajó conforme a las medidas de seguridad que son especificadas en el Anexo A del presente documento.

5.3.- Pruebas preliminares de aislamiento bacteriano

Con el propósito de conocer el número de ostiones que fueron necesarios para obtener la cantidad de 50 gramos de músculo de ostión (según la NOM-031-SSA1-1993: Productos de la pesca, moluscos bivalvos frescos-refrigerados y congelados. Especificaciones sanitarias) (Secretaría de Salud, 1993), el músculo de ostión fue pesado hasta obtener la cantidad requerida, por lo anterior, se estableció recolectar 20 ostiones por cada uno de los sitios dada la variación de talla y peso. A partir de las muestras de ostión se realizaron aislamientos preliminares de *Vibrio* spp. de acuerdo con la metodología de Gamazo *et al*. (2005), con el fin de determinar la dilución correcta para realizar el conteo de las UFC de bacterias del género *Vibrio*, de esta manera las diluciones 10^{-1}, 10^{-2} y 10^{-3} fueron probadas, siendo la dilución 10^{-3}, la que resultó adecuada debido a que los cultivos inoculados con esta dilución fueron los únicos en los que se pudo realizar el conteo y distinguir entre colonias sacarosa positiva y sacarosa negativa.

5.4.- Aislamiento bacteriano

Una vez en el laboratorio, se procedió a realizar el aislamiento de bacterias *Vibrio* spp. en una campana de flujo laminar, la cual se limpió con alcohol al 70 % antes y después de su uso. Anticipadamente, el material a utilizar en siembras, como vasos de precipitado y cuchillos, se esterilizó durante 15 minutos en autoclave a una temperatura de 121 °C y 15 lbs/pulg^2 de presión.

Más tarde, los 20 ostiones correspondientes a cada uno de los sitios (bancos ostrícolas, cooperativas y restaurantes), fueron desconchados con un cuchillo estéril y su contenido fue vertido en el vaso de la licuadora. En el caso de los restaurantes, se obtuvo la pulpa de ostiones almacenados en bolsas. En todos los casos, la pulpa de ostión fue triturada junto a 5 mL de líquido intervalvar a alta velocidad durante un minuto, por consiguiente, se obtuvo un homogenado por cada sitio. Cada uno de los homogenados, a su vez, fueron vertidos en un vaso de precipitado estéril de 300 mL.

Por cada sitio, se extrajo 1 mL de homogenado de ostión y se diluyó en 9 mL de agua peptonada alcalina amortiguada (Gómez-Gil *et al*., 2014), hasta llegar a la dilución de 10^{-3} (Gamazo *et al*., 2005), a continuación, se inoculó 0.1 mL de la dilución 10^{-3} en tres cajas Petri con medio TCBS mediante siembra extendida, se incubaron las tres cajas por sitio (Figura 3) en una estufa Felisa® a 30 °C durante un periodo 18 a 24 h.

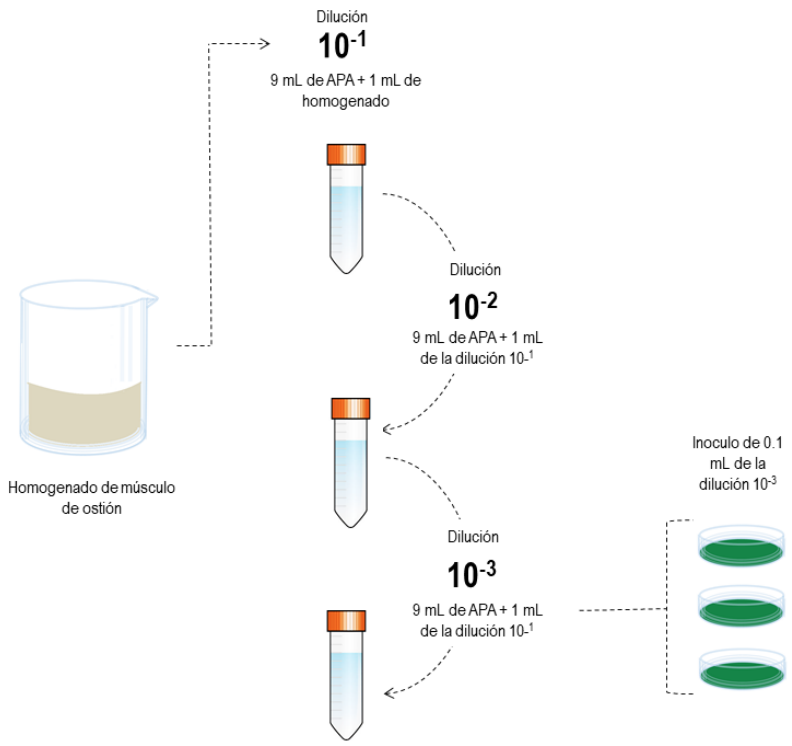

Figura 3.- Procedimiento de siembra por dilución utilizado.

5.5.- Recuento bacteriano de microorganismos viables tras diluciones seriadas

Con el fin de realizar el conteo bacteriano, se asumió que cada colonia aislada representa a bacterias descendientes de una unidad formadora de colonia (UFC) (Gamazo *et al*., 2005). La NOM-092-SSA1-1994 (Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa) (Secretaría de Salud, 1994), establece que el conteo debe realizarse entre 25 y 250 colonias, no obstante, adicionalmente permite reportar el número de UFC de aquellos cultivos en los que hubo crecimiento de *Vibrio* spp. por debajo de esta cifra. El recuento de colonias se realizó de 18 a 24 h de incubación (NOM-031-SSA1-1993). Así, el recuento consistió en contar las

UFC aisladas en el medio TCBS y posteriormente, se calculó el número inicial de UFC/mL de *Vibrio* spp. presentes en el homogenado de ostión, de acuerdo con Gamazo *et al.* (2006):

$$\text{Número de UFC/mL} = \frac{\text{Número de colonias x factor de dilución (1000)}}{\text{0.1 mL (mL sembrados en placa)}}$$

De esta manera, el número de UFC/mL se calculó multiplicando el número de colonias resultantes, el factor de dilución fue de 1000, ya que se utilizó la dilución 10^{-3} y se dividió entre 0.1 mL, que fue el volumen de homogenado sembrado en placa.

Por lo anterior, los valores se reportaron como UFC/mL (Unidades formadoras de colonias por mililitro de homogenado de ostión), tanto sacarosa positiva como sacarosa negativa. Además, se tomó como referencia el nivel máximo permisible indicado por la NOM-242-SSA1-2009 (Productos y servicios, productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados. Especificaciones sanitarias y métodos de prueba) (Secretaría de Salud, 2009) que indica que *V. cholerae* (sacarosa positiva) y *V. vulnificus* (sacarosa negativa) deben estar ausentes en 50 gramos de ostión. Finalmente, los cultivos y residuos fueron esterilizados para su desecho durante 15 minutos a una temperatura de 121 °C y 15 lbs/pulg^2 de presión.

5.6.- Determinación de presencia y abundancia de *Vibrio* spp. y análisis estadísticos

La presencia de bacterias del género *Vibrio* en ostiones *C. virginica* se determinó mediante la observación y registro de UFC/mL aisladas en el medio TCBS. Por otra parte, la abundancia de *Vibrio* spp. sacarosa positiva y *Vibrio* spp. negativa se estimó por medio del conteo del número total de UFC/mL por cada sitio muestreado (bancos ostrícolas, cooperativas y restaurantes) de ambas lagunas.

En cuanto a la comparación estadística, los datos obtenidos fueron analizados mediante la prueba de normalidad Shapiro-Wilk, según la distribución de los datos, se realizaron pruebas de Kruskal-Wallis para establecer si existían diferencias significativas, teniendo como variables el número de UFC/mL cuantificadas y los sitios (bancos ostrícolas, cooperativas y restaurantes). De igual manera, se determinaron las diferencias estadísticas entre estaciones del año. Una vez halladas las diferencias estacionales, se realizaron pruebas U de Mann Whitney y T Student, según su distribución, con el fin de conocer cuales estaciones del año fueron diferentes entre sí. En los casos anteriores, los análisis estadísticos se llevaron a cabo en los programas R x64 versión 3.4.2 (The R Project for Statistical Computing, 2017) y Graphpad PRISM 6.01 (GraphPad Software, Inc. 2012), este último también fue utilizado para graficar.

Por último, en el software Graphpad PRISM 6.01, se realizaron comparaciones estacionales entre los valores promedio de UFC/mL de ambas lagunas obtenidos

en los bancos ostrícolas y cooperativas, mediante las pruebas T Student y U de Mann-Whitney, según la distribución de los datos.

VI. RESULTADOS

6.1.- Observación de colonias de bacterias *Vibrio* spp. aisladas de ostiones *C. virginica* de las lagunas de Tamiahua y Tampamachoco

Las colonias (UFC/mL) de bacterias *Vibrio* spp. aisladas de ostiones *C. virginica* provenientes de bancos ostrícolas, cooperativas y restaurantes de las lagunas de Tamiahua y Tampamachoco exhibieron las siguientes características en común: forma circular, elevación cóncava, borde liso y tamaño de 1 mm a 3 mm. Cabe mencionar que, las colonias fueron diferenciadas, al tener coloración de dos tipos; las colonias sacarosa positiva, es decir, aquellas que son capaces de degradar sacarosa presentaron color amarillo y las colonias de vibrios sacarosa negativa, presentaron coloración verde, las cuales son compuestas por vibrios que no degradan sacarosa (Figura 4).

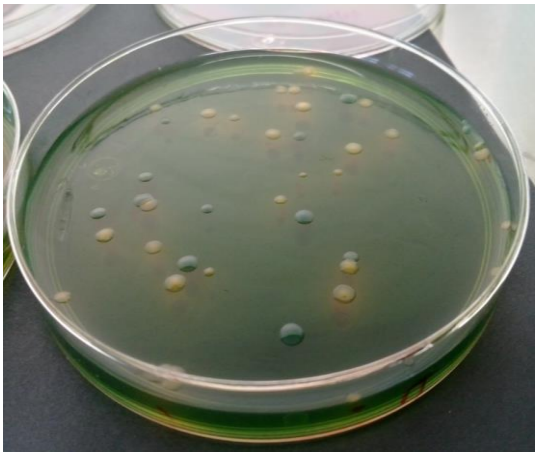

Figura 4.- Cultivo de bacterias *Vibrio* spp. en medio TCBS (24 horas de incubación) aisladas de ostiones de la cooperativa de Tampamachoco. Las UFC/mL (unidades formadoras de colonias) amarillas indican la presencia de vibrios sacarosa positiva y las UFC verdes demuestran la presencia de vibrios sacarosa negativa.

6.2.- Conteo de UFC/mL de *Vibrio* spp. aisladas de individuos de *C. virginica* provenientes de bancos ostrícolas (fase de recolección)

6.2.1. Bancos ostrícolas de la laguna de Tamiahua

- **Registro de UFC/mL sacarosa positiva en bancos ostrícolas de la laguna de Tamiahua**

En la figura 5, se ilustran los valores promedio de las UFC/mL sacarosa positiva aisladas de los bancos ostrícolas de la laguna de Tamiahua a lo largo de las estaciones del año. Se observó que, en primavera, el banco Mangles presentó el valor promedio más alto tanto en esta estación del año y respecto a todo el estudio, con un promedio de 260,000 UFC/mL, seguido por el banco La Palma, con 140,000 UFC/mL, y, por último, el banco Panzacolas exhibió un promedio de 110,000 UFC/mL. En verano, Panzacolas presentó un valor promedio de 26,667 UFC/mL, seguido por el banco Mangles con 3,333 UFC/mL, y, el banco La Palma no presentó UFC/mL. En las estaciones de otoño e invierno los ostiones de los bancos ostrícolas de la laguna de Tamiahua no presentaron UFC/mL sacarosa positiva.

Los análisis estadísticos indicaron que, los valores promedio de las UFC/mL sacarosa positiva aislados de los bancos ostrícolas no fueron diferentes ($p= 0.7406$), en cambio, se presentaron diferencias significativas entre las estaciones del año ($p= 0.000001$), siendo el valor promedio registrado en primavera significativamente más alto que el presentado en la estación de verano. En primavera, en los bancos La Palma, Mangles y Panzacolas y en verano, en los

bancos Mangles y Panzacolas, se sobrepasó el límite máximo permisible (LMP) indicado por la NOM-242-SSA1-2009 (Se tuvo como referencia que *V. cholerae,* que es una bacteria sacarosa positiva, debe estar ausente) (Figura 5).

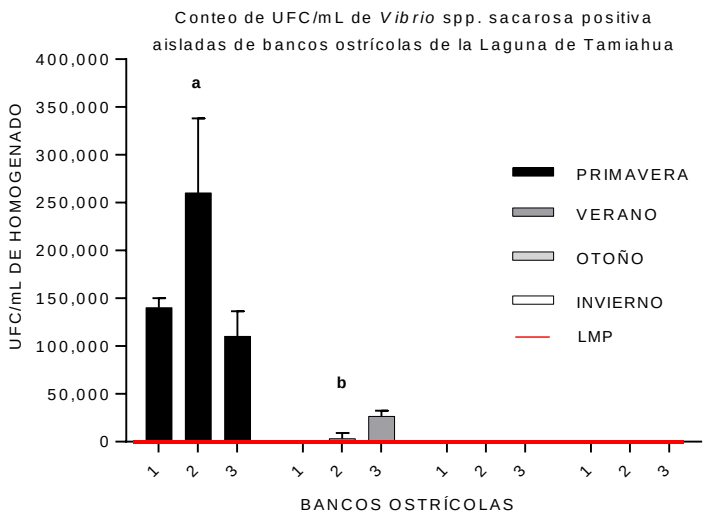

Figura 5.- Valores promedio de UFC/mL (Unidades formadoras de colonias por mililitro de homogenado) sacarosa positiva aisladas de individuos *C. virginica* de los bancos ostrícolas de la laguna de Tamiahua (1.- La Palma, 2.- Mangles, 3.- Panzacolas) durante las estaciones de primavera, verano, otoño e invierno. El LMP (Límite máximo permisible) fue rebasado durante primavera y verano. Las letras distintas indican que hubo diferencias estadísticas.

- **Registro de UFC/mL sacarosa negativa en bancos ostrícolas de la laguna de Tamiahua**

En la figura 6, se muestran los valores promedio de las UFC/mL sacarosa negativa obtenidas de ostiones *C. virginica* en las estaciones del año. A continuación, se describen los resultados obtenidos, en primavera, el banco Mangles obtuvo 56,667 UFC/mL, seguido por Panzacolas con 53,333 UFC/mL, por último, el banco La

Palma obtuvo 23,333 UFC/mL. Durante el verano, el banco La Palma presentó el valor promedio de 10,000 UFC/mL, seguido por Panzacolas con 6,667 UFC/mL, y por último Mangles con 3,333 UFC/mL. En otoño e invierno, no fueron aisladas UFC/mL sacarosa positiva de los ostiones provenientes de los bancos ostrícolas de la laguna de Tamiahua.

En relación con la comparación estadística, no se presentaron diferencias significativas entre los valores promedio de los bancos (p= 0.09608), mientras que, entre las estaciones se presentaron diferencias (p= 0.000001), el valor promedio de UFC/mL registrado en primavera fue significativamente más alto que el presentado en verano. En primavera y verano, en los bancos La Palma, Mangles y Panzacolas, se sobrepasó el LMP indicado por la NOM-242-SSA1-2009 (se tomó como referencia que *V. vulnificus,* que es una bacteria sacarosa positiva, debe estar ausente) (Figura 6).

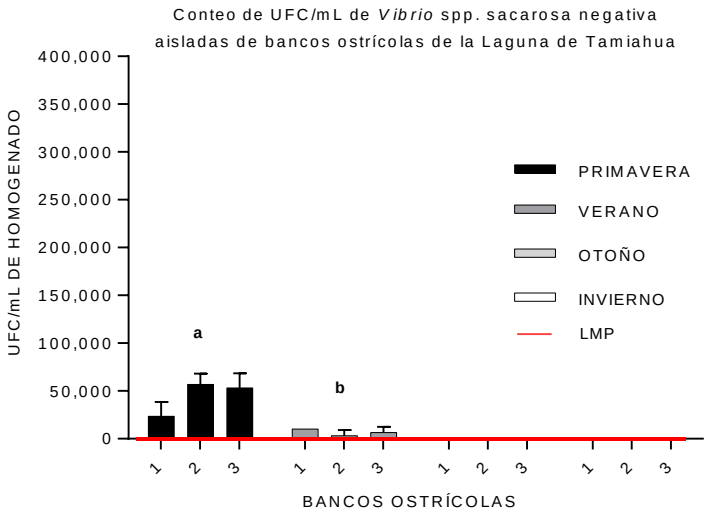

Figura 6.- Valores promedio de UFC/mL (Unidades formadoras de colonias de por mililitro de homogenado de ostión) sacarosa negativa aisladas de individuos *C. virginica* de los bancos ostrícolas de la laguna de Tamiahua (1.- La Palma, 2.- Mangles y 3.- Panzacolas) durante las estaciones de primavera, verano, otoño e invierno. El LMP (límite máximo permisible) fue rebasado durante primavera y verano. Las letras distintas indican que hubo diferencias estadísticas.

6.2.2. Bancos ostrícolas de Tampamachoco

- **Registro de UFC/mL sacarosa positiva en bancos ostrícolas de la laguna de Tampamachoco**

En la figura 7, se aprecian los valores promedio de UFC/mL sacarosa positiva obtenidas de ostiones *C. virginica* de los bancos ostrícolas de Tampamachoco, esto es, durante la estación de primavera, el banco ostrícola Pipiloya obtuvo el valor promedio más alto con 160,000 UFC/mL, seguido por el banco El Tubo con 70,000 UFC/mL, y finalmente, el banco En Medio presentó 13,333 UFC/mL. En verano, el banco En Medio exhibió el valor promedio más alto con 156,667

UFC/mL, el banco Pipiloya obtuvo 66,667 UFC/mL y El Tubo presentó 60,000 UFC/mL. En otoño e invierno, nuevamente, no se presentaron UFC/mL en los ostiones de los bancos ostrícolas de la laguna de Tampamachoco.

En primavera y verano, se sobrepasó el LMP de acuerdo con la NOM-242-SSA1-2009, en los bancos Pipiloya, En Medio y El Tubo. La comparación estadística evidenció que, no existieron diferencias significativas entre bancos (p= 0.8602), en cambio, se presentaron diferencias estadísticas significativas entre estaciones (p= 0.000003), siendo los valores registrados por primavera y verano estadísticamente similares (Figura 7).

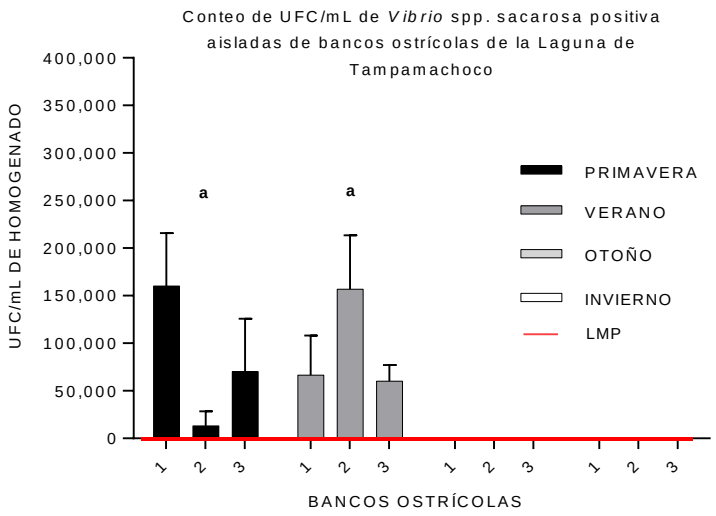

Figura 7.- Valores promedio de UFC/mL (Unidades formadoras de colonias por mililitro de homogenado de ostión) sacarosa positiva aisladas de individuos *C. virginica* de los bancos ostrícolas de la laguna de Tampamachoco (1.- Pipiloya, 2.- En Medio, 3.- El Tubo) durante las estaciones de primavera, verano, otoño e invierno. El LMP (límite máximo permisible fue rebasado durante primavera y verano. Las letras similares indican que no hubo diferencias estadísticas.

- **Registro de UFC/mL sacarosa negativa de ostiones de los bancos ostrícolas de Tampamachoco**

En la figura 8, se muestran los valores promedio de UFC/mL sacarosa negativa aislados de ostiones de los bancos ostrícolas de la laguna de Tampamachoco, durante las diferentes estaciones del año. Esto es, en primavera, el banco Pipiloya presentó un valor promedio de 33,333 UFC/mL, el banco En Medio presentó 13,333 UFC/mL y el Tubo 10,000 UFC/mL respectivamente. Con relación a la estación de verano, el banco En Medio obtuvo 30,000 UFC/mL, seguido por los bancos Pipiloya con 10,000 UFC/mL y el Tubo 6,667 UFC/mL. Durante las estaciones de otoño e invierno no se aislaron UFC/mL sacarosa negativa de los bancos ostrícolas de la laguna de Tampamachoco (Figura 8).

Los análisis estadísticos revelaron que no hubo diferencias estadísticas significativas entre los bancos (p= 0.8415), no obstante, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de UFC/mL entre estaciones (p= 0.0001122), siendo los valores registrados por primavera y otoño estadísticamente similares. Durante las estaciones de primavera y verano se sobrepasó el LMP de acuerdo con la NOM-242-SSA1-2009, en los bancos Pipiloya, En Medio y El Tubo (Figura 8).

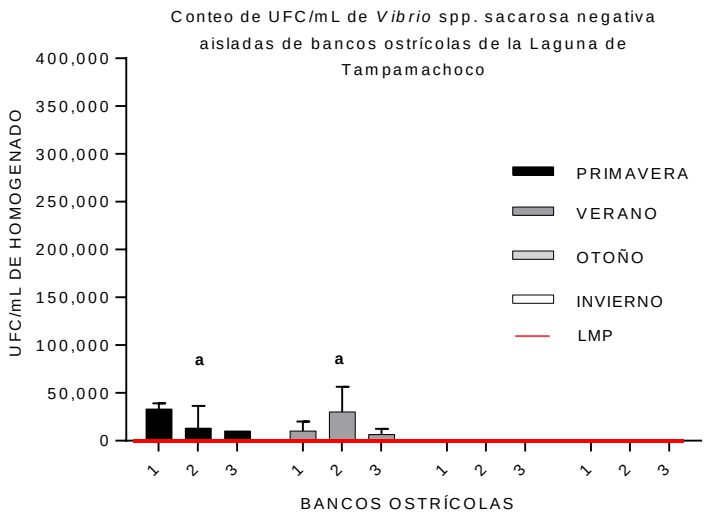

Figura 8.- Valores promedio de UFC/mL (Unidades formadoras de colonias aisladas por mililitro de homogenado) sacarosa negativa aisladas de individuos *C. virginica* provenientes de los bancos ostrícolas de la laguna de Tampamachoco (1.- Panzacolas, 2.- En Medio, 3.- El Tubo). El LMP (Límite máximo permisible), fue rebasado en todos los bancos, durante las estaciones de primavera y verano. Las letras similares indican que no hubo diferencias estadísticas.

6.3.- Conteo de UFC/mL de *Vibrio* spp. aisladas de ostiones *C. virginica* obtenidos de cooperativas (fase de postrecolección)

6.3.1.- Registro de UFC/mL de *Vibrio* spp. en ostiones *C. virginica* de la cooperativa de la laguna de Tamiahua (Cooperativa Tamiahua)

En la figura 9, se exponen los valores promedio de las UFC/mL sacarosa positiva aisladas de los ostiones de la cooperativa Tamiahua, se evidenció que, los ostiones de dicha cooperativa obtenidos en primavera y verano no presentaron UFC/mL de este tipo. No obstante, en la estación de invierno se aislaron un promedio de 6,667 UFC/mL sacarosa positiva. En relación con la comparación

estadística, los valores de UFC/mL sacarosa positiva no presentaron diferencias significativas en (p= 0.3679).

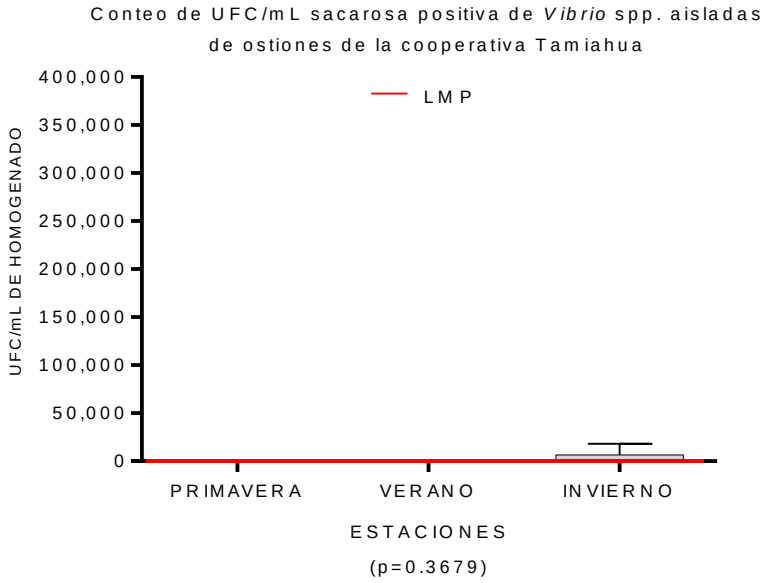

Figura 9.- Valores promedio de UFC/mL (Unidades formadoras de colonias aisladas por mililitro de homogenado) de *Vibrio* spp. sacarosa positiva en ostiones *C. virginica* obtenidos de la cooperativa de Tamiahua durante primavera, verano e invierno. El límite máximo permisible (LMP) únicamente fue rebasado en invierno.

En cambio, respecto a los valores promedio de UFC/mL sacarosa negativa, en primavera se presentaron 10,000 UFC/mL. En verano e invierno no fueron aisladas UFC/mL sacarosa negativa de los ostiones recolectados de la Cooperativa Tuxpan. Los valores de UFC/mL sacarosa negativa, presentados durante primavera, otoño e invierno no exhibieron diferencias significativas (p= 0.3679) (Figura 10).

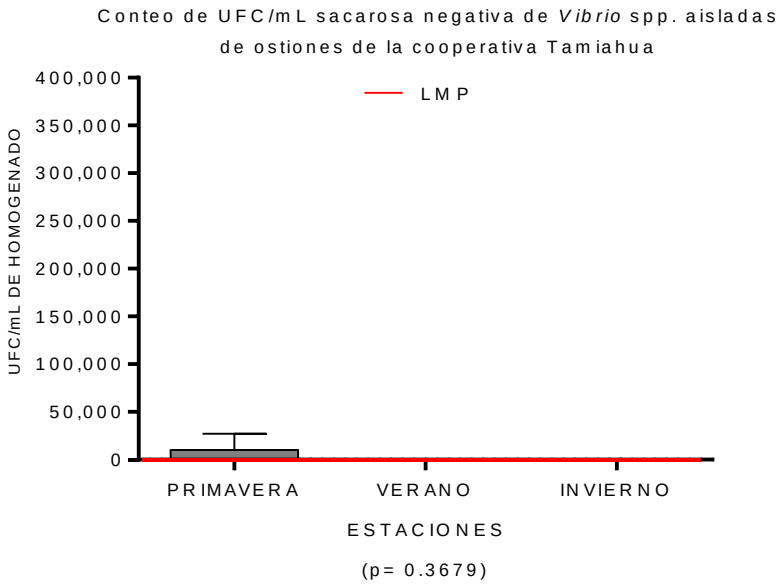

Figura 10.- Valores promedio de UFC/mL (Unidades formadoras de colonias aisladas por mililitro de homogenado) de *Vibrio* spp. sacarosa negativa en ostiones *C. virginica* obtenidos de la cooperativa de Tamiahua durante primavera, verano e invierno. El límite máximo permisible (LMP) fue rebasado durante primavera.

Por lo anterior, el LMP (NOM-242-SSA1-2009) fue sobrepasado en primavera con 10,000 UFC/mL sacarosa negativa e invierno con 6,667 UFC/mL sacarosa positiva.

Durante otoño, no fue posible obtener muestras de ostión de la cooperativa Tamiahua, por lo anterior, el monitoreo no se pudo realizar durante esa estación del año.

6.3.2 Registro de UFC/mL en ostiones *C. virginica* de la cooperativa de la laguna de Tampamachoco (Cooperativa del Puerto de Tuxpan)

A continuación, en la figura 11, se muestran los valores promedio de UFC/mL sacarosa positiva aisladas de ostiones *C. virginica* procedentes de la cooperativa del Puerto de Tuxpan, en primavera se obtuvieron 253,333 UFC/mL, durante el verano se registraron 10,000 UFC/mL. Nuevamente, durante las estaciones de otoño e invierno no fueron aisladas UFC/mL sacarosa positiva de ostiones *C. virginica*. En cuanto a la comparación estadística, se obtuvo que, los valores de UFC/mL sacarosa positiva presentaron diferencias significativas entre las estaciones del año (p= 0.02366).

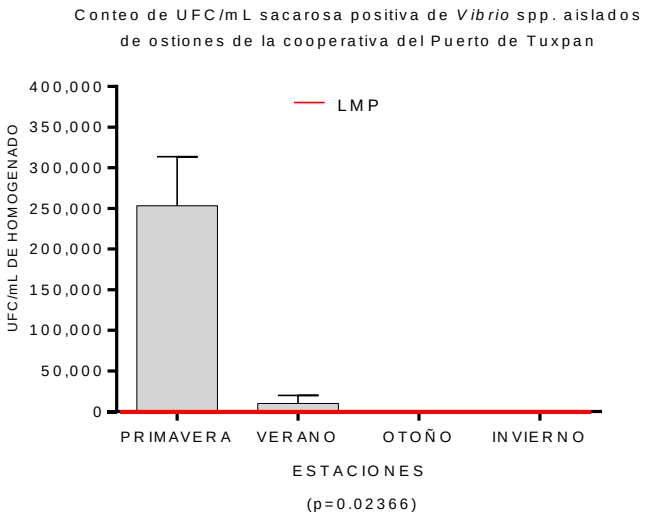

Figura 11.- Valores promedio de UFC/mL (Unidades formadoras de colonias aisladas por mililitro de homogenado) de *Vibrio* spp. sacarosa positiva en ostiones *C. virginica* obtenidos de la cooperativa de Tampamachoco durante primavera, verano, otoño e invierno. El límite máximo permisible (LMP) fue rebasado durante primavera y verano.

En cuanto a los valores promedio de UFC/mL de *Vibrio* spp. sacarosa negativa durante la primavera, se presentaron 156,667 UFC/mL y en verano 6,667 UFC/mL. En otoño e invierno no se presentaron UFC/mL sacarosa negativa aisladas de ostiones *C. virginica* obtenidos de la cooperativa del Puerto de Tuxpan. Los valores de UFC/mL sacarosa negativa, presentaron diferencias estadísticas entre estaciones (p=0.02542) (Figura 12).

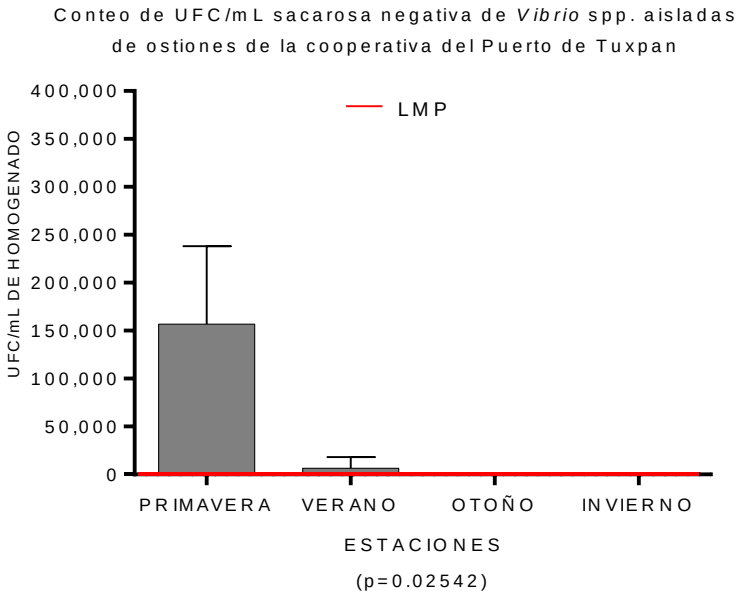

Figura 12.- Valores promedio de UFC/mL (Unidades formadoras de colonias aisladas por mililitro de homogenado) de *Vibrio* spp. sacarosa negativa en ostiones *C. virginica* obtenidos de la cooperativa de Tampamachoco durante primavera, verano, otoño e invierno. El límite máximo permisible (LMP) fue rebasado durante primavera y verano.

Por lo anterior, únicamente en primavera y verano, se presentaron UFC/mL sacarosa positiva y UFC/mL sacarosa negativa, es decir, respecto a los dos tipos se sobrepasó el LMP según la NOM-242-SSA1-2009.

6.4.- Registro de UFC/mL de *Vibrio* spp. aisladas de ostiones *C. virginica* obtenidos de restaurantes

En las lagunas de Tamiahua y Tampamachoco, se evidenció la ausencia de UFC/mL sacarosa positiva y UFC/mL sacarosa negativa en los ostiones *C. virginica* obtenidos, esto es, los restaurantes cumplen con el LMP según la NOM-242-SSA1-2009 (Figura 13).

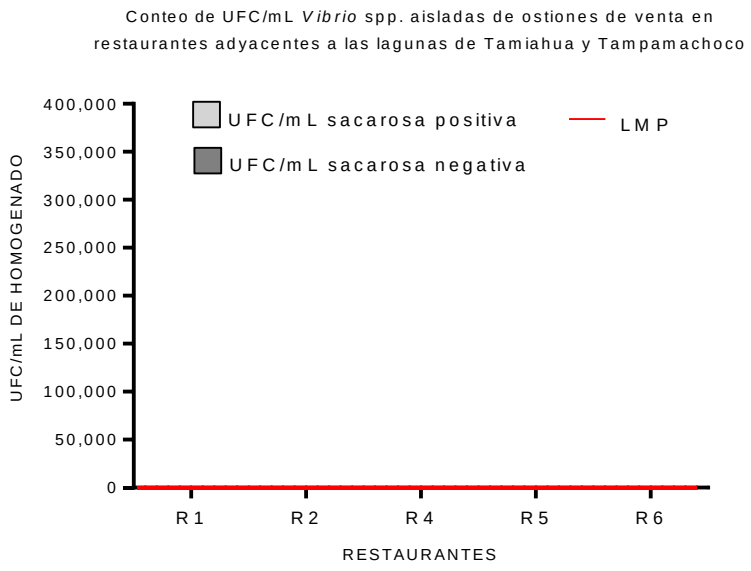

Figura 13.- Valores promedio de UFC/mL (Unidades formadoras de colonias aisladas por mL de homogenado de ostión) aisladas de los restaurantes de las lagunas de Tamiahua (R1, R2) y Tampamachoco (R3, R4 y R5).

6.5.- Comparación de los sitios de recolección y postrecolección de ambas lagunas

En relación con los valores promedio de UFC/mL sacarosa positiva, en la estación de primavera, los bancos ostrícolas de Tamiahua presentaron valores significativamente más altos en comparación con los valores registrados en los bancos de la laguna de Tampamachoco (p= 0.0415). En contraste, en verano, los bancos ostrícolas de la laguna de Tampamachoco presentaron valores más altos estadísticamente respecto a la laguna de Tamiahua (p= 0.0002) (Figura 14). Durante otoño e invierno no se presentaron UFC/mL de *Vibrio* spp. de ninguno de los dos tipos en ambas lagunas.

En cuanto a los valores promedio de UFC/mL sacarosa negativa de *Vibrio* spp. registrados por los ostiones recolectados en bancos ostrícolas, durante primavera, la laguna de Tamiahua presentó valores significativamente más altos que la laguna de Tampamachoco (p= 0.0089). En verano, no se presentaron diferencias estadísticas significativas entre los valores promedios de UFC/mL sacarosa negativa registrados por ambas lagunas (0.2968). En primavera y otoño no se registraron UFC /mL sacarosa negativa en ninguno de los bancos ostrícolas de las dos lagunas (Figura 14).

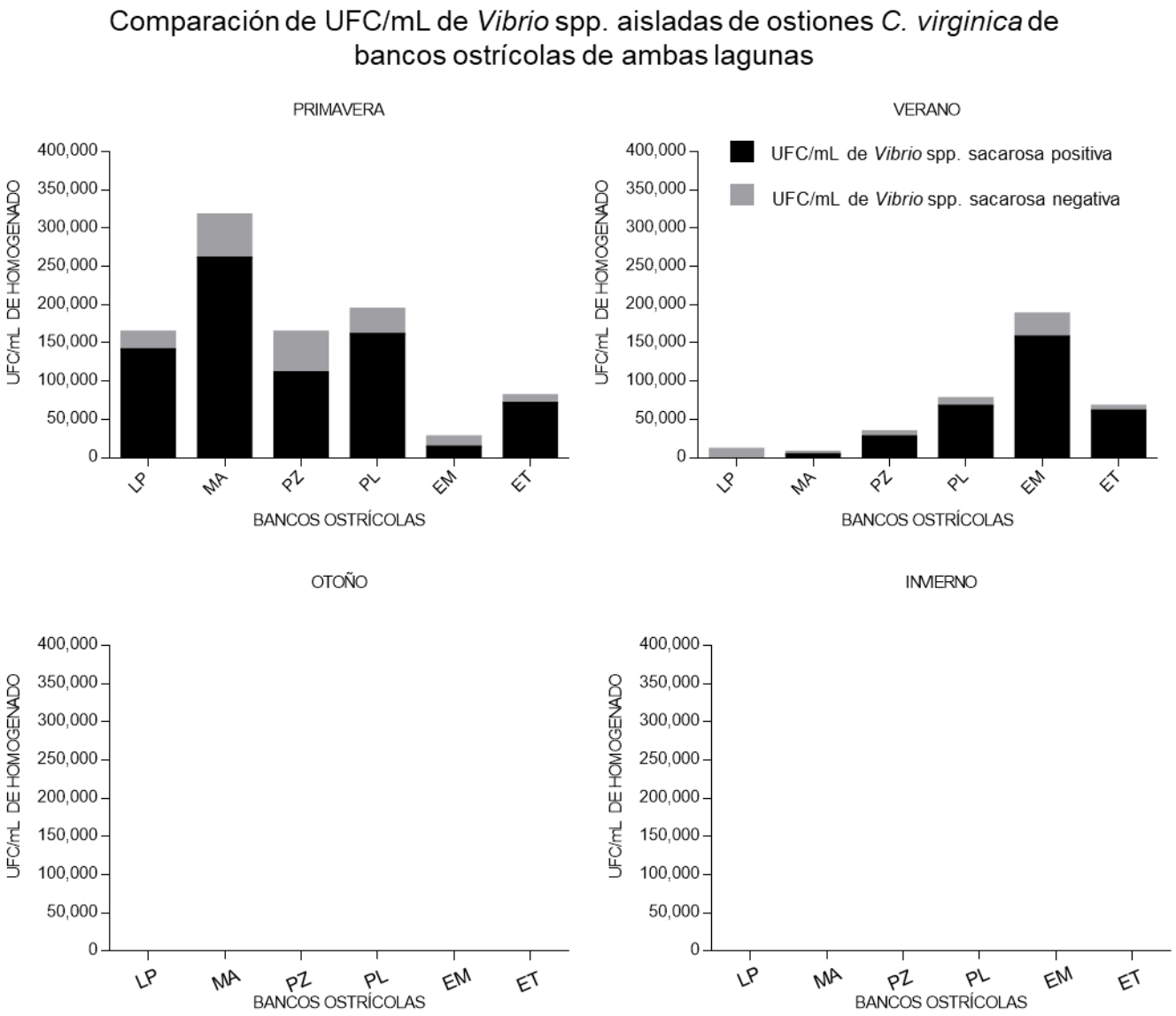

Figura 14.- Comparación estacional de los valores promedio de UFC/mL de *Vibrio* spp. obtenidas de individuos de *C. virginica* de bancos de las lagunas de Tamiahua y Tampamachoco, Veracruz.

En la figura 14, se muestran los valores promedio de UFC/mL de *Vibrio* spp. sacarosa positiva aisladas de ostiones de cooperativas de las lagunas de Tamiahua y Tampamachoco, en cuanto a los valores promedio de UFC/mL no

presentaron diferencias estadísticas estacionales (p= 0.1326). Igualmente, durante las cuatro estaciones, las UFC/mL sacarosa negativa obtenidas de ostiones de las cooperativas de ambas lagunas no presentaron diferencias estadísticas significativas (p= 0.2070).

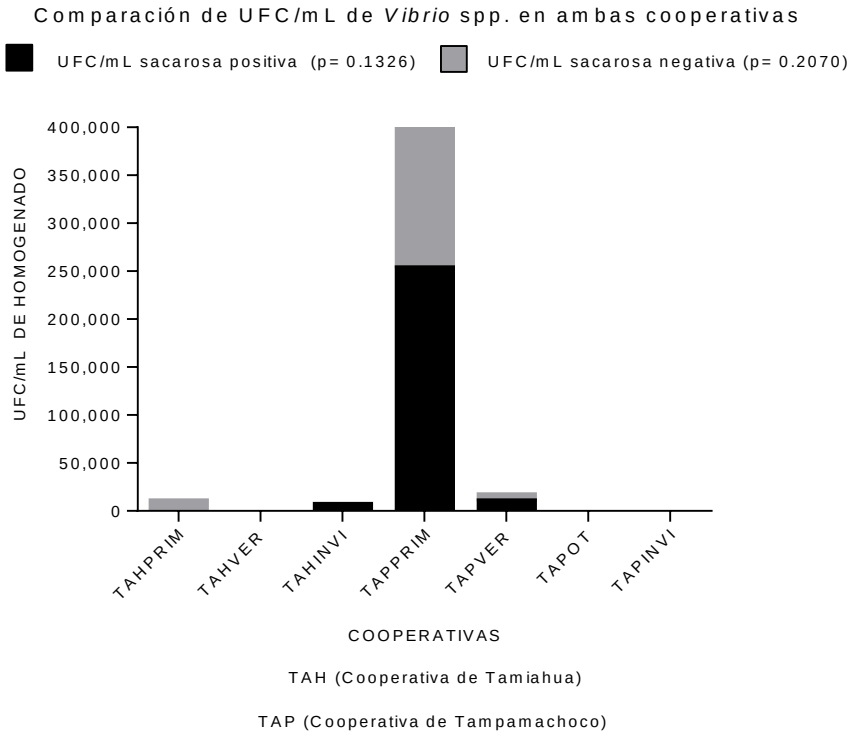

Figura 15.- Comparación de los valores de UFC/mL sacarosa positiva y UFC/mL sacarosa negativa de *Vibrio* spp. aisladas de ostiones de las cooperativas de Tamiahua y Tampamachoco durante las estaciones de primavera, verano, otoño e invierno. TAH= Cooperativa de Tamiahua, TAP= Cooperativa de Tampamachoco.

Por último, como anteriormente se mencionó, no se presentaron UFC/mL de *Vibrio* spp. en los ostiones *C.* virginica recolectados en los restaurantes de ambas lagunas.

VII. DISCUSIÓN

En la presente investigación se registraron bacterias del género *Vibrio* en ostiones *C. virginica* de las lagunas de Tamiahua y Tampamachoco, siendo similar a lo reportado por Vieira *et al.* (2010), quienes aislaron *V. parahaemolyticus*, *V. carcharie* y *V. vulnificus* en ostiones *C. rhizophorae* en Eusébio, Ceará, Brasil. Lo anterior podría ser debido a que los vibrios son bacterias nativas de ecosistemas salobres y marinos (Colwell, 2006), por lo tanto, es común que tengan asociación con invertebrados destinados al consumo humano (Jones, 2014). En los siguientes apartados, se discutirán los principales hallazgos.

6.1.- Registro de vibrios en ostiones recolectados en bancos de Tamiahua y Tampamachoco

En el presente trabajo, las bacterias del género *Vibrio* aisladas en individuos *C. virginica* de bancos ostrícolas de las lagunas de Tamiahua y Tampamachoco fueron registradas en primavera y verano, similar a lo reportado por Jiménez en 2012, ya que aisló bacterias del género *Vibrio* en *C. virginica* de bancos ostrícolas de la laguna de Tampamachoco y siendo diferente a lo encontrado por Hernández *et al*. (2015), pues reportaron la presencia de estas bacterias en ostiones durante el periodo de octubre-noviembre. Recientemente, durante los meses de mayo y junio se detectó la presencia de *V. parahaemolyticus* (35 NMP/50 g) en ostiones de la laguna de Tamiahua durante los meses de mayo y junio (Galaviz-Villa *et al.,* 2017).

6.2.- Registro de vibrios en ostiones de las cooperativas de Tamiahua y Tampamachoco

En este trabajo, en primavera y verano se registraron bacterias del género *Vibrio* en las cooperativas de Tampamachoco y Tamiahua lo que fue similar a lo reportado por Martínez (2011) quien aisló a *V. cholerae*, *V. alginolyticus* y *V. fluvialis* en la cooperativa de la laguna de Mandinga. Durante, primavera, la laguna de Tampamachoco presentó valores promedios más altos que la laguna de Tampamachoco. Los datos obtenidos en la cooperativa Tamiahua podrían ser debido a su manejo postrecolección, ya que una vez de su llegada a la cooperativa, el sedimento de los ostiones en las arpillas es retirado con agua potable, para su posterior almacenamiento o transporte a los diversos centros de distribución.

6.3.- Ausencia de vibrios en los restaurantes de Tamiahua y Tampamachoco

En este trabajo de investigación, no se registraron UFC/mL de *Vibrio* spp. en los ostiones provenientes de los restaurantes de ambas lagunas, lo que difiere con lo reportado por Costa *et al*. (2011) en Brasil en ostiones *C. brasiliana* de venta en kioscos de playa y en ostiones *C. rhizophorae* de venta en restaurantes de playa por Barros *et al*. (2007) y los estudios en México por Franco-Monsreal *et al*., (2010) y Franco-Monsreal *et al*. (2014) en alimentos marinos de establecimientos comerciales de Campeche y Oaxaca respectivamente. La ausencia de vibrios en los ostiones podría ser debida al manejo postrecolección, ya que, los ostiones son desconchados y limpiados con agua potable y refrigerados. Lo anterior, podría

deberse a que la refrigeración disminuye, de manera sustancial, la cantidad de vibrios presentes en alimentos marinos (Jones *et al*., 2017).

6.4.- Diferencias estacionales en la cantidad de *Vibrio* spp. en la recolección y postrecolección de ostiones

En general, respecto a las cantidades de UFC de *Vibrio* spp. registradas no existieron diferencias significativas entre los sitios muestreados (bancos ostrícolas, cooperativas y restaurantes de ambas lagunas), en cambio, se encontraron diferencias estadísticas significativas entre estaciones del año, similar a lo reportado por Costa *et al*. (2011), quienes no registraron diferencias estadísticas entre los sitios de venta al menudeo de *C. brasiliana* y lo atribuyeron a que los ostiones eran almacenados a temperatura ambiente. Lo anterior podría ser explicado por las diferencias entre temperaturas de las estaciones climáticas (Parveen *et al*., 2008), y las fluctuaciones de flujo de agua dulce a ecosistemas marinos (Lutz *et al.,* 2013) en las lagunas, ya que, la presencia de vibrios es influenciada mayormente por la temperatura y salinidad del agua principalmente (León *et al.,* 2013).

Por otra parte, especies como *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* tienen una demostrada estacionalidad tanto en el ambiente como en los mariscos y son más recurrentes en meses cálidos (Jones, 2014), lo que corresponde al registro de la presencia y mayor cantidad de estas bacterias en las estaciones de primavera y verano. Por lo anterior, se recomienda la implementación de buenas prácticas de higiene y de manejo del recurso (Galaviz-Villa *et al*., 2013).

VIII. CONCLUSIONES Y APLICACIONES PRÁCTICAS DEL TRABAJO

8.1.- Conclusiones

En la presente investigación fueron registradas UFC/mL de *Vibrio* spp. en ostiones *C. virginica*, tanto sacarosa positiva como negativa en bancos ostrícolas de las lagunas de Tamiahua y Tampamachoco en las estaciones de primavera y verano. Los valores promedio de UFC/mL presentados por los bancos ostrícolas de ambas lagunas no presentaron diferencias estadísticas espaciales, en cambio, se registraron diferencias significativas entre las estaciones del año.

De esta manera, los valores registrados en los bancos ostrícolas de Tamiahua durante primavera fueron estadísticamente más altos que los valores registrados durante verano, otoño e invierno. Los valores de UFC/mL aislados durante primavera y verano en los bancos ostrícolas de la laguna de Tamiahua fueron significativamente más altos que los registrados en otoño e invierno.

Respecto a la comparación entre ambas lagunas, en cuanto a las UFC/mL sacarosa positiva, durante primavera, los bancos ostrícolas de la laguna de Tamiahua presentaron valores más altos que los bancos ostrícolas de la laguna de Tampamachoco, en cambio, durante verano, los bancos ostrícolas de Tampamachoco presentaron valores más altos que los bancos ostrícolas de Tamiahua. En cuanto a los valores de UFC/mL sacarosa negativa aisladas de bancos ostrícolas, durante primavera, la laguna de Tamiahua presentó valores

más altos que la laguna de Tampamachoco, no obstante, durante verano no se presentaron diferencias estadísticas entre los valores de los bancos ostrícolas de ambas lagunas. En ambos casos, durante otoño e invierno no se presentaron UFC/mL sacarosa positiva y sacarosa negativa.

Igualmente, en esta investigación se reporta por primera vez la presencia de estas bacterias en los ostiones recolectados de las cooperativas Tamiahua (laguna de Tamiahua) y Del Puerto de Tuxpan (laguna de Tampamachoco), es decir durante el proceso post-recolección. Si bien, los ostiones de la cooperativa del Puerto de Tuxpan registraron valores promedio de UFC/mL de *Vibrio* spp. más altos que los presentados por los ostiones de la cooperativa Tamiahua, no se presentaron diferencias estadísticas significativas entre las cooperativas.

Por último, no se detectaron UFC/mL de *Vibrio* spp. en ostiones *C. virginica* obtenidos de los restaurantes de ambas lagunas, cumpliendo de esta manera con el límite máximo permisible de acuerdo con la NOM-242-SSA1-2009 Productos y servicios: Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados, especificaciones sanitarias y métodos de prueba.

8.2.- Aplicaciones prácticas del trabajo

La producción del ostión *C. virginica* es un sistema conformado por: el recurso mismo, los productores primarios (pescadores y desconchadores), cooperativistas y almacenistas, minoristas, restauranteros y consumidores, es por ello, que es necesario otorgarle un enfoque multidisciplinario, si bien es vital conocer el estado de la población de *C. virginica* así como las artes de pesca que son utilizadas en

su captura, también, es importante obtener conocimiento acerca de las enfermedades que provocan mortalidad y morbilidad en los ostiones y los factores que afectan su calidad sanitaria, y por ende, a los consumidores.

Es ideal tener un buen manejo del recurso pesquero y planes de vigilancia sanitaria, sin embargo, esto no puede ser factible sin antes realizar un diagnóstico. Los monitoreos ambientales son una herramienta de diagnóstico y obtención de información que nos permite, entre otras cosas, conocer el estado del recurso o la presencia y prevalencia de patógenos en ostiones *C. virginica.*

El presente estudio aporta información acerca de la presencia de bacterias *Vibrio* en los bancos ostrícolas y las cooperativas, asimismo, reporta la ausencia de estas bacterias en restaurantes adyacentes a las lagunas de Tamiahua y Tampamachoco, estos datos pueden ser utilizados para promover la adopción de medidas dirigidas a la disminución de estas bacterias en los ostiones tales como: al momento de la captura almacenar los ostiones en hieleras, retirar el sedimento con agua potable (lo que se realiza en la Cooperativa Tamiahua), y un monitoreo permanente de bacterias *Vibrio* en los bancos ostrícolas y sitios de venta. Lo anterior es debido a que un manejo postrecolección adecuado puede evitar la presencia de vibrios en ostiones destinados al consumo humano.

IX. BIBLIOGRAFÍA

ADS (Acute Disease Service, Oklahoma State Department of Health). 2005. [actualizada al 19 de julio]. Página electrónica (https://www.ok.gov/).

Aldana, D., Enríquez, M., Lango, F., Brulé, T., Montero, J. y Baqueiro, E. 2014. Reproductive Strategies of the Eastern Oyster *Crassostrea virginica (Gmelin 1791)* in Tropical Lagoons of the Mexican Gulf of Mexico. Journal of Shellfish Research. 33(1):145-152.

Aviles-Quevedo, S. y Vázquez-Hurtado, M. 2006. Fortalezas y debilidades de la acuicultura en México. pp. 69-86. *En:* Pesca, acuacultura e investigación en México. P., Guzmán, y D., Fuentes, (ed.). Comisión Nacional de Pesca. Ciudad de México.

Baizabal-Ramírez, O., Negrete-Pérez, M., Guerrero-Daza, D., Martínez-Herrera, N., Aburto-Desanchy, Y. y Mata-Miranda, P. 2011. Choque séptico por *Vibrio vulnificus* en las costas del Golfo de México. Rev. Med. Instituto Mexicano del Seguro Social. 49(4): 433-436.

Baqueiro-Cárdenas, E, R. Borabe, L., Goldaracena-Islas y Rodríguez-Navarro, J. 2007. Los moluscos y la contaminación: Una revisión. Revista Mexicana de Biodiversidad. 78(10).

Barros, L. M. O., Sousa O. V., Lima, E. L., Macrae, A., Vieira, G. H. F., Vieira, R. H. S. 2007. Víbrios sacarosa negativos isolados de ostras *Crassostrea rhizophorae*. Boletim Técnico Cientifico do Cepnor. Belém, 7(1):9-16.

Bhunia, A.K. 2018. Foodborne Microbial Pathogens. Springer. New York. 365 pp.

Castañeda, M.R., Pardío, V., Orrantia, E., y Lango, F. 2005. Influence of Water Temperature and Salinity on Seasonal Occurrences of *Vibrio Cholerae* and Enteric Bacteria in Oyster-Producing Areas of Veracruz, México. Marine Pollution Bulletin. 50 (12) 1641-1648.

CDC (Center for Disease Control and Prevention). 2014. Página electrónica [actualizada el 12 de enero] Página electrónica (https://www.cdc.gov/vibrio/publications.html).

COFEPRIS (Comisión Nacional Para la Protección contra Riesgos Sanitarios). 2011. [Actualizada el 09 de enero] Página electrónica (http://www.cofepris.gob.mx/TyS/Paginas/InformacionAdicionalExportadoresAlimentos/ProgramaMexicanoSanidadMoluscosBivalvos.aspx).

COFEPRIS (Comisión Nacional Para la Protección contra Riesgos Sanitarios). 2017. [Actualizada el 31 de diciembre]. Página electrónica (https://www.gob.mx/cofepris/acciones-y-programas/programa-mexicano-de-sanidad-de-moluscos-bivalvos).

Colwell, R. R. 2006. A Global and Historical Perspective of the Genus *Vibrio*. pp 3-9. *En* The Biology of Vibrios. Thompson F.L., Austin, B. y Swings, J (eds.). ASM Press, Washington, DC.

CONAPESCA (Comisión Nacional de Pesca). 2014. Anuario estadístico de acuacultura y pesca. Comisión Nacional de Pesca. Mazatlán, Sinaloa, México. 306 pp.

Contreras, F. y Castañeda, O. 2004. Las lagunas costeras del Golfo de México hacia el establecimiento de índices ecológicos. pp. 373-416. *En:* Diagnóstico ambiental del Golfo de México. Caso, M., Pisanty, I. y Ezcurra, E. (eds.). Instituto Nacional de Ecología. México D.F.

Cornejo-Juárez, P., Rolón-Montes de Oca, A.L., Tinoco-Favila, J.C. y Sifuentes-Osornio, J. 2000. Sepsis fulminante por *Vibrio vulnificus*: serie de casos. Revista de Investigación Clínica. 52(6):632-637.

Costa, P.S., Destro, M.T., Franco, B. y Landgraf, M. 2011. Occurrence and distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in retail oysters in Sao Paulo State, Brazil. Food Microbiology.128 (1) 354-361.

Di Pinto, A., Terio, V., Novello, L. y Tantillo, G. 2011 Comparison Between Thiosulphate-Citrate-Bile-Salts Sucrose (TCBS) Agar and Chromagar *Vibrio* for isolating *Vibrio parahaemolyticus*. Food Control. 22(2011):124-127.

FDA (Food and Drug Administration). 2009. [actualizada al 05 de marzo]. Página (https://www.fda.gov/InternationalPrograms/Agreements/MemorandaofUnderstanding/ucm107610.htm).

FDA (Food and Drug Administration). 2011. Guide for the Control of Molluscan Shellfish. National Shellfish Sanitation Program (NSSP). FDA. Maryland. 478 pp.

FDA (Food and Drug Administration). 2015. [actualizada al 29 de junio]. Página electrónica (http://www.fda.gov/).

FDA (Food and Drug Administration). 2015. https://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/FederalStateFoodPrograms/ucm2006754.htm.

Flores-Primo A., Pardío-Sedas V.T., López-Hernández, K., Lizárraga-Partida, L. y Uscanga-Serrano, R. 2015. Crecimiento y sobrevivencia de *V. parahaemolyticus* en ostión americano (*Crassostrea virginica*) almacenado en refrigeración. Salud Pública Méx. 57 (3):211-218.

Fonseca, M., Lizárraga, S.L. y De Colsa, A. 2013. *Choque séptico por Vibrio vulnificus:* reporte de un caso en pediatría. Revista de Enfermedades en Pediatría. 27(106):377-383.

Franco-Monsreal, J. Zarza-García, A.L., Villano-Ruano, N., Ramón-Canul, L.G., Galván-Valencia, O.T., Meza-Jiménez, M.L. y Mota-Magaña, L. 2010. Especies patógenas del género *Vibrio* en alimentos marinos de establecimientos de Isla del Carmen, Campeche, México. Ciencia y Mar. 14(40)31-40.

Franco-Monsreal, J., Lara-Zaragoza, E.B., Villa-Ruano, N., Mata-Magaña, L., Serralta-Peraza, L.E.S., Cuevas-Albarrán, C. y Sosa-Castilla, F. 2014. Especies de importancia clínica del género *Vibrio* en alimentos marinos de origen animal de establecimientos de Puerto Ángel, Oaxaca, México. Ciencia y Mar. 20(52):3-30.

Galaviz-Villa, I., Castañeda-Chavez, M.R., Lango-Reynoso, F., Amaro-Espejo, I.A., Romero-González, L, Salcedo-Garduño, M.G. y Sánchez-Chavez. A. 2017. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* (tlh) and virulence factors in Oyster *Crassostrea virginica* in the Gulf of Mexico. Revista Bio Ciencias. 4(6):1-15.

Galaviz-Villa, I., Lango-Reynoso, F. y Castañeda-Chávez, M.R. 2013. Estudio de la calidad sanitaria del Ostión del Golfo de México. Editorial académica española. Saarbrücken, Alemania.

Gamazo, C., López-Goñi, I. y Díaz, R. 2005. Manual práctico de Microbiología. Elsevier Masson. Barcelona, España. 226 pp.

Gómez-Gil, B. y Roque, A. 2006. *Isolation, Enumeration, and Preservation of the Vibrionaceae*. pp. 15-26. *En* The Biology of Vibrios. Thompson, F.L. Austin, B. y Swings, J. (Eds.) ASM Press. Washington D.C.

Gómez-Gil, B., Thompson, C.C., Matsamura, Y., Sawabe, T., Lida, T., Christen, R., Thompson, F. y Sawabe, T. 2014. *The Family Vibrionaceae*. 659-747. *En:* The Prokaryotes - Gammaproteobacteria. E. Rosenberg, E.F., Delong, Lory, S., Stackebrandt, E. y Thompson, F. (eds.). Springer- Verlag Berlín Heidelberg. Nueva Dheli.

GraphPad Software, Inc. 2012. [actualizada al 21 de septiembre de 2012]. Página electrónica (https://www.graphpad.com/).

Greenfield, D.I., Gooch, J., Stewart, J.R., Hilborn, E.D., George, B.J., Li, Q., Dickerson, J. Keppler, C.K. y Sandifer, P.A. 2017. Temporal and Environmental

Factors Driving *Vibrio vulnificus* and *V. parahaemolyticus* Populations and Their Associations with Harmful Algal Blooms in South Carolina Detention Ponds and Receiving Tidal Creeks. GeoHealth.1:306–317.

Guzmán-García, X., Barrera, G., y Wong, I. 2005. Efectos del almacenamiento en la calidad sanitaria del ostión *Crassostrea virginica* (Gmelin) de la laguna de Tamiahua, Veracruz, p.525-534. *En* Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias. Botello, A. V., Rendón-von Osten, J., Gold-Bouchot, G. y Agraz-Hernández, C. (eds.). Instituto Nacional de Ecología. pp. 525-534.

Hernández, R.I., Jiménez, A. C. y San Martin, P. 2015. Bacterias del género *Vibrio* presentes en el ostión americano. pp. 93-100. *En*: Avances en la investigación biomédica. Caba, M., Zepeda, R. C., Meza, E. y Juárez, C. (eds.). Universidad Veracruzana. Xalapa, México.

Hernández-Díaz, L.J., León-Sicarios, N., Velazquez-Román, J., Flores-Villaseñor, H., Guadron-Llanos, A.M., Martínez-García, J.J., Vidal, J.E. y Canizalez-Roman, A. 2015. A pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 clone causing most associated diarrea cases in the Pacific Northwest coast of Mexico. Frontiers in Microbiology. 6(221):1-11.

Herrera-Silveira, J.A., Morales-Ojeda S.M. y Cortes-Balan, T. O. 2011. Eutrofización en los ecosistemas costeros Del Golfo de México. SEMARNAT-NOAA-GEF-UNIDO. 88 pp.

Jiménez, A.C.J. 2012. Determinación de *Vibrio cholerae* 01 por métodos moleculares en poblaciones silvestres del ostión americano *Crassostrea virginica*. Tesis de licenciatura. Universidad Veracruzana. Tuxpan, México.

Jiménez-Corona, A., Gutiérrez-Cogio, L., López-Moreno, S. y Tapia-Conver, R. 1995. El cólera en México situación epidemiológica actual. Gaceta médica de México. 131(3):363-366.

Jones, J.L. 2014. Introduction, Including *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* and other *Vibrio Species*. pp. 691-698. *En*: Encyclopedia of Food Microbiology. Batt, C.A. y Tortorello, M. (eds.). Elsevier, Ltd. Ámsterdam.

Jones, J.L. 2017. *Vibrio*. *En:* Foodborne Diseases: Third edition. Elsevier. Dodd, C.E.R., Aldsworth, T., Stein, R.A. y Cliver, D.O. (eds.). Elsevier. Amsterdam.

Jones, J.L., Lydon, K.A., Kinsey, T.P., Friedman, B., Curtis, M., Schuster, R. y Bowers, J.C. 2017. Effects of ambient exposure, refrigeration, and icing on *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* abundances in oysters. International Journal of Food Microbiology. 253:54-58.

Kingsley, D.H. 2014. Shellfish Contamination and Spoilage. pp. 389-396. *En*: Encyclopedia of Food Microbiology. Batt, C.A. y Tortorello, M. (eds.). Elsevier, Ltd. Ámsterdam.

Labbate, M., Seymour, J. R., Lauro, F. y Brown, M. V. 2016. Anthropogenic Impacts on the Microbial Ecology and Function of Aquatic Environments. Lausanne: Frontiers Media. 248 pp.

Lara, A., Contreras, F., Castañeda-López, O., Barba-Macías, E. y Pérez-Hernández, M.A. 2011. Lagunas costeras y estuarios. 2011. En: La biodiversidad en Veracruz: Estudio de Estado. Cruz, A. (ed.) Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Gobierno del Estado de Veracruz, Universidad Veracruzana, Instituto de Ecología, A.C. Xalapa, México.

Lara-Domínguez, A. L., J. López-Portillo, A. Ávila-Ángeles y Vázquez-Lule, A. D. 2009. Caracterización del sitio de manglar Tuxpan, en Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Sitios de manglar con relevancia biológica y con necesidades de rehabilitación ecológica. CONABIO. Ciudad de México.

León, A., Acedo, E., Gómez-Gil, B., Quiñones E.I., Nevárez-Martínez, M. y Noriega-Orozco, L. 2013. Relationship of aquatic environmental factors with the abundance of *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio mimicus* and *Vibrio vulnificus* in the coastal area of Guaymas, Sonora, Mexico. Journal of Water and Health. 4(11) 700-712.

López-Hernández, K.M., Pardío-Sedas, V., Lizárraga-Partida, L., Williams, J.J., Martínez-Herrera, D., Flores-Primo, A. y Uscanga-Serrano, R. 2015a. Seasonal abundance of *Vibrio cholerae* non O1/non O139 chxA þ in oysters harvested in a coastal lagoon of Mexico's Gulf coast: A seafood safety risk concern. Food Control. 53: 46-54.

López-Hernández, K.M., Pardío-Sedas, V.T., Lizárraga-Partida, L., Williams, J.J., Martínez-Herrera, D., Flores-Primo, A., Uscanga-Serrano, R. y Rendón-Castro, K. 2015b. Environmental parameters influence on the dynamics of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* densities in *Crassostrea virginica* harvested from Mexico's Gulf coast. Marine Pollution Bulletin. 91(1):317-329.

López-Portillo, J. A. 2012. Programa regional para la caracterización y el monitoreo de ecosistemas de manglar del Golfo de México y Caribe mexicano: inicio de una red multi-institucional. Instituto de Ecología A.C. Informe final SNIB-CONABIO, proyecto No. FN007. México D. F.

Lutz, C., Erken, M., Noorian, P., Sun, S. y McDougald, D. 2013. Environmental reservoirs and mechanisms of persistence of *Vibrio cholerae*. Frontiers in Microbiology. 4:156-170.

Martín, A., Serrano, S., Santos, A., Marquina, D. y Vázquez, C. 2010. Bioluminiscencia bacteriana. Reduca (Biología). 3(5):75-86.

Martínez, J.F. 2011. Ocurrencia estacional de *Vibrio* spp. en moluscos bivalvos (*Crassostrea virginica*) procedentes de Mandinga, Veracruz. Tesis de licenciatura. Universidad Veracruzana. México.

Martinez-Urtaza, J., Blanco-Abad, V., Rodríguez-Castro, A., Ansede-Bermejo, J., Miranda, A. y Rodríguez-Alvarez, M.X. 2012. Ecological determinants of the

occurrence and Dynamics of *Vibrio parahaemolyticus* in Offshore Areas. International Society for Microbial Ecology.6:994-1006.

Martínez-Urtaza, J., Bowers, J.C., Trinanes, J. y DePaola, A. 2010. Climate anomalies and the increasing risk of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* illnesses. Food Research International. 2010(43):1780-1790.

Negrete, P. y Romero, J. 2010. Carga bacteriana en ostión *(Crassostrea virginica),* desde su recolecta hasta su consumo. 2010. Sociedades rurales, producción y medio ambiente. 10 (20): 75-102.

NOAA (National Oceanic and Atmospheric Administration). 2007a. [03 de diciembre]. Página electronica (safeoysters.uga.edu/medical/Vv_Fact_Sheet_Spanish.pdf).

NOAA) (National Oceanic and Atmospheric Administration). 2007b. Status Review of the Eastern Oyster *(Crassostrea virginica)*. NOAA Fisheries Eastern Oyster Biological Review Team. Food and Agriculture Organization of The United Nations. 105 pp. Maryland.

Ocaña-Luna, A. y Sánchez-Ramírez, M. 2000. Diversidad del ictioplancton en las lagunas Madre y Almagre, Tamaulipas, y laguna de Tampamachoco, Veracruz. Instituto Politécnico Nacional. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. L070. México D.F. 27 p.

Organismo de Evaluación y Fiscalización Ambiental. 2013. [Actualizado al 06 de diciembre]. Página (https://www.oefa.gob.pe/actividades-principales/monitoreo-ambiental-2).

Organización de las Naciones unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). 2010. Depuración de bivalvos: aspectos fundamentales y prácticos. FAO. 152 pp. Roma.

Organización Mundial de la Salud. 2013. [Actualizado al 10 de enero]. Página electrónica (http://www.who.int/csr/don/2013_11_13/es/).

Organización Panamericana de Salud. 2008. [08 de diciembre de 2008]. Página electrónica (http://www.bvsde.paho.org/).

Parveen, S., Hettiarachchi, K.A., Bowers, J.C., Jones, J.L., Tamplin, M., McKay, R., Beatty, W., Beohawn, K., DaSilva, L. y DePaola, A. 2008. Seasonal distribution of total and pathogenic *Vibrio paraemolyticus* in Chesapeake Bay oysters and waters. International Journal of Food Microbiology. 128 (2008) 354-361.

Pawan, K., Uma, S. y Pushpinder, P. 2016. Identification the Presence of *Vibrio* Species by TCBS Media in Different Water Samples Collected from Different Locations. International Journal of Science and Research (IJSR). 5(3)2319-2064.

Poblete, U. R., Andresen H. M., Pérez C. C., Dougnac L. A., Díaz P. O. y Vinko T.F. 2002. *Vibrio vulnificus*: una causa infrecuente de shock séptico. Revista médica de Chile. 130(7):787-791.

Raszl, S.M., Froelich, B.A., Vieira, C. R. W., Blackwood, A.D. y Noble R.T. 2016. *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in South America: water, seafood and human infections. Journal of Applied Microbiology. 121(5):1201-1222.

Reyes-Velázquez, C., Castañeda-Chávez M.R., Landeros-Sánchez, C., Galaviz-Villa, I., Lango-Reynoso, F., Minguez-Rodríguez, M.M. y Nikolskii-Gavrilov, L. 2010. Vibrios patogénicos en el ostión *Crassostrea virginica* en el sistema lagunar de Mandinga, Veracruz, México. Rev. Hidrobiológica. 20(3):238-245.

Secretaría de Salud. 1993. NOM-031-SSA1-1993, BIENES Y SERVICIOS. PRODUCTOS DE LA PESCA. MOLUSCOS BIVALVOS FRESCOS-REFRIGERADOS Y CONGELADOS. ESPECIFICACIONES SANITARIAS. México.

Secretaría de Salud. 1994. NOM-092-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. MÉTODO PARA LA CUENTA DE BACTERIAS AEROBIAS EN PLACA. México.

Secretaría de Salud. 2009. NOM-242-SSA1-2009, PRODUCTOS Y SERVICIOS. PRODUCTOS DE LA PESCA FRESCOS, REFRIGERADOS, CONGELADOS Y PROCESADOS. Especificaciones sanitarias y métodos de prueba. México.

Secretaria de Salud. 2012. Manual de procedimientos estandarizados para la vigilancia epidemiológica de Cólera. México. 56 pp.

Solís, A. y Gómez, D. 2007. [actualizada el 09 de enero]. Página electrónica (http://www.cicy.mx/Sitios/Biodiversidad/Biodiversidad/capitulo-IV/especies).

The R Project for Statistical Computing. 2017. [actualizada al 28 de septiembre de 2017]. Página electrónica (https://www.r-project.org/).

Vera, B. 2011. Aislamiento, identificación y caracterización bioquímica de *Vibrio* spp. en el ostión americano *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791*),* en la laguna de Tampamachoco, Veracruz. Tesis de licenciatura. Universidad Veracruzana. México.

Vezzulli, L., Grande, C., Reid, P.C., Hélaouët, P., Edwards, M., Höfle, M.G., Brettar, I., Colwell, R.R. y Pruzzo, C. 2016. Climate Influence on *Vibrio* and Associated Human Diseases During the Past Half-Century in The Coastal North Atlantic. Proceedings of the National Academy of Sciences. 113(34):1-10.

Vidal, E. 2013. Caracterización socioeconómica de las cooperativas pesqueras de Pueblo Viejo, Tampamachoco, Tamiahua y Alvarado del estado de Veracruz: un análisis de su realidad social. 114-151. *En* Manejo de los recursos pesqueros de la cuenca del Golfo de México y el mar Caribe. Aldana, D., Enríquez, M. y Vidal, E. (eds). Universidad Veracruzana. Xalapa, México.

Vidal-Briseño, C.I., Hernández-Herrera, R.I., Galindo-Cortés, G. y San Martín-del Angel. 2015. Estructura poblacional del ostión *Crassostrea virginica* en las lagunas de Tamiahua y Tampamachoco, Veracruz, México. Hidrobiológica. 25(2): 265-273.

Vieira, R. H. F., Sousa, O.V., Costa R.A., Diogo, G. N., Macrae, A., Fonteles, A.A., Rodrigues, D. P. 2010. Raw Oysters can be a risk for infections. The Brazilian Journal of Infectious Diseases. 14(1):66-70.

Wietz, M., Gram, L., Jørgensen, B., Schramm, A. 2010. Latitudinal patterns in the abundance of major marine bacterioplankton groups. Aquatic Microbial Ecology. 61:179-189.

Zamora, D.R., Quiroz, C. y Quiñónez, E.I. 2005. Un enemigo marino silencioso *Vibrio parahaemolyticus*. Revista Digital Universitaria. 6(4):1-9.

X. ANEXOS

Anexo A.- Medidas de seguridad en laboratorio y campo

Sitio	Medidas de seguridad
Al momento de extracción de los ostiones	Durante la manipulación de los ostiones, se utilizaron guantes de hule con el fin de evitar heridas.
En laboratorio	Se usaron: bata, cofia, tapaboca, gafas protectoras y guantes de látex, para evitar contaminar los cultivos y evitar tener contacto con las bacterias patógenas.