



**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE MÉRIDA**

# **TESIS**

**“IDENTIFICACIÓN DE LOS PRINCIPALES MICROORGANISMOS Y  
COMPUESTOS VOLÁTILES QUE CAUSAN DETERIORO EN EL  
PULPO *Octopus maya*.”**

PARA OPTAR AL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA:

**ING. MIGUEL ANGEL CARBALLO BAUTISTA**

ASESOR:

**DRA. ELSY NOEMI TAMAYO CANUL**

**MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO**

**10 DE FEBRERO DE 2014**

SEP

SECRETARÍA DE  
EDUCACIÓN PÚBLICA



Subsecretaría de Educación Superior  
Dirección General de Educación Superior Tecnológica  
Instituto Tecnológico de Mérida

"2013. Año de la Lealtad Institucional y Centenario del Ejército Mexicano"

DEPENDENCIA: DIV. DE EST. DE POSG. E INV.  
Oficio N° X.-459/2013

MÉRIDA, YUCATÁN A **11 DE NOVIEMBRE DE 2013**

ASUNTO: SE AUTORIZA IMPRESIÓN

C. MIGUEL ANGEL CARBALLO BAUTISTA  
PASANTE DEL DOCTORADO EN CIENCIAS DE LOS  
ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA  
P R E S E N T E.

De acuerdo al fallo emitido por su asesora la Dra. Elsy Noemi Tamayo Canul, y la comisión revisora integrada por la Dra. María de Lourdes Vargas y Vargas, el Dr. Fernando Peraza Luna, el Dr. Luis Fernando Cuevas Glory, el Dr. Enrique Sauri Duch, y el Dr. Víctor Manuel Toledo López, considerando que cubre los requisitos establecidos en el Reglamento de Titulación de los Institutos Tecnológicos le autorizamos la impresión de su trabajo profesional con la TESIS:

**"IDENTIFICACIÓN DE LOS PRINCIPALES MICROORGANISMOS Y COMPUESTOS VOLÁTILES QUE CAUSAN DETERIORO EN EL PULPO *Octopus maya*"**

ATENTAMENTE  
IN HOC SIGNO VINCES

M.C RAMIRO ALPIZAR CARRILLO.  
JEFE DE LA DIVISION DE ESTUDIOS  
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN



S. E. P.  
INSTITUTO TECNOLÓGICO  
DE MÉRIDA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE  
POSGRADO E INVESTIGACIÓN

RAC/fjaa



SEP Instituto Tecnológico de Mérida, Km.5 Carretera Mérida-Progreso A.P 911  
C.P 97118 Mérida Yucatán, México, Tels. 964-50-00. Ext. 10001, 10401  
10601, 10201 e-mail: itm@itmerida.mx http://www.itmerida.mx



RECONOCIMIENTO  
A LA CALIDAD SEP  
2012  
100 POR CIENTO EN  
SUS PROGRAMAS DE  
BUENA CALIDAD



GL System Certification



RECONOCIMIENTO  
MEG:2003

## *Dedicatorias*

*Dedico el presente trabajo a mi familia*

*De manera especial a mis padres Lorenza y Eulogio por darme la vida, lo cual fue un reto muy grande para ellos al ser un milagro de vida; que dentro de sus posibilidades procuraron lo mejor para mis hermanos y para mí, luchando juntos para darnos la educación. Gracias por haberme guiado y enseñado que las metas se alcanzan con perseverancia, a base de esfuerzo con trabajo constante, por enseñarme que el fracaso no existe que solo son lecciones de vida que nos fortalece a diario para nuestro crecimiento espiritual y personal.*

*A mis hermanos José, Luis, Rita, Roger, Nery y Lucia, de quienes recibí apoyo, comprensión y han sido parte importante en las diferentes etapas de mi vida.*

*A mis sobrinos por su cariño, que con sus travesuras inocentes siempre me sacaron una sonrisa.*

## *Agradecimientos*

*Primero quiero agradecer a Dios por este magnífico viaje en el vagón del tren de la vida, el cual inicio cuando Dios me encomendó a mi familia, que me cuidaron, dieron amor, educación y la enseñanza de luchar por mis metas, hoy gracias a su apoyo me encuentro alcanzado una meta más. A lo largo de este viaje conocí amigos que me brindaron su apoyo y amistad. Amigos de la secundaria, la preparatoria.*

*Posteriormente llega la etapa de tomar decisiones importantes la profesión; en esa etapa me acompañaron Lic. Argelia Yam y Biol. Sofia Cruz, que siempre me demostraron su apoyo incondicional. Concluyendo la licenciatura surge la aventura del posgrado en esta etapa del viaje quiero agradecer al Dr. Ignacio Islas, por su apoyo brindado y recibirme en su laboratorio, permitiéndome aprender a picar piedras; en esta área bonita y complicada de la ciencia. En esta etapa conocí a las Dras. Yeny Couho, Yolanda Nava, Manuelita Estébanez y Dres Fulgencio Alatorre, Iván Estrada y Fernando Moguel, que me brindaron su apoyo.*

*Continuando este viaje en la ciencia llega la etapa del doctorado en la cual quiero agradecer mi asesora Dra. Elsy Tamayo, por recibirme y apoyarme en el aprendizaje del maravilloso mundo de la identificación de los microorganismos, así mismo quiero agradecer a mi comité tutorial y comité revisor de tesis que me brindaron su apoyo y enseñanza: Dra. Lourdes Vargas, Dr. Fernando Peraza, Dr. Luis Cuevas, Dr. Víctor Toledo y el Dr. Enrique Sauri. En esta etapa también me brindaron su amistad y apoyo las Dras. : Alicia Pineda, Evelia Acedo, Norma Lugo, Paty Zapata, a las M. Cs. Margarita Chan, Yamify Burgos y a la pasante de Bioq., Julieta Chan.*

*Gracias a la plantilla de investigadores del área de posgrado los cuales me brindaron su apoyo y enseñanza con las materias que me impartieron y administrativos por los trámites realizados. Así mismo quiero agradecer a DGEST por la beca otorgada 20110000133, a CONACYT- gobierno del estado de Yucatán por el proyecto YUC-2004-C03-009, a las congeladoras: Hukʼin e Inpesmar por el apoyo en especie.*

*Al final de este viaje, quiero agradecer a Dios y a todas estas extraordinarias personas que me acompañaron en esta bella travesía, por su confianza y todo su cariño mil gracias.*

## RESUMEN

En este trabajo mediante un enfoque combinado de microbiología tradicional, biología molecular y espectrometría de masas, fue posible identificar compuestos volátiles, aislar, purificar e identificar bacterias, y sus efectos nocivos en pulpo *Octopus maya* destinado para consumo humano. La identificación molecular de los microorganismos requirió el desarrollo previo de dos protocolos eficientes (calidad y cantidad) para la extracción de ADN genómico y mADN, una selección adecuada de iniciadores específicos y universales, la estandarización de las condiciones para los análisis por PCR, y secuenciación de los fragmentos del gen 16S rRNA obtenidos. Nuestros análisis revelaron la presencia de *Proteus mirabilis*, *Salmonella enterica*, *Shigella flexini*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus casseliflavus*, *Pseudomonas putida*, *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca*. Los efectos de los compuestos volátiles totales producidos por estas bacterias derivados del deterioro de las muestras de pulpo en conservación fueron analizados mediante análisis de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Los perfiles obtenidos revelan la presencia de dimetilamina, trimetilamina, ácido acético, principalmente, los cuales han sido previamente reportados también para otros alimentos marinos en descomposición. La temperatura de almacenamiento de - 20 °C parece ser la más adecuada para la conservación del pulpo como lo sugiere la menor variedad y cantidad de bacterias identificadas y la identificación de solo ácido acético en muestras sometidas a tal tratamiento. Nuestro trabajo muestra el uso combinado de herramientas para la detección certera y oportuna de microorganismos, el cual pudiera ser considerado en el diseño de estrategias para la conservación adecuada y consumo seguro de alimentos de origen marino.

## ABSTRACT

Here we present a combined approach including traditional microbiology, molecular biology, and spectrometry techniques for identifying pathogenic bacteria and its nocive effects on *Octopus* for human consumption. Molecular identification of bacteria species included the development of two DNA extraction protocols in *Octopus maya* samples and an adequate selection of universal and specific oligonucleotides for 16S rRNA gene amplification by PCR. Our analyses revealed the presence of *Proteus mirabilis*, *Salmonella enterica*, *Shigella flexini*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus casseliflavus*, *Pseudomonas putida*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Klebsiella oxytoca* in *Octopus* samples analyzed. Negative effects of bacteria growth on *Octopus maya* preservation were determined by analyses of total volatile compounds (TVC) derived by octopus deterioration. TVC profiling obtained by gas chromatography-mass spectrometry revealed the production of dimethylamine, trimethylamine, acetic acid, mainly, which have been previously reported during descomposition of other marine food. A decreased number of bacteria and acetic acid production found in octopus stored at - 20 °C suggest that such condition is adequate to keep sea foods. Our work demonstrate the combined use of traditional and modern tools for accurate and timely detection of microorganisms, which should be considered during the design of strategies focusing an appropriate storage and safe human consumption of seafood.

## Índice

<b>RESUMEN</b> .....	<b>I</b>
<b>ÍNDICE</b> .....	<b>III</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>VI</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>VII</b>
<b>CAPITULO I INTRODUCCION Y ANTECEDENTES</b> .....	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>3</b>
1.1 BIOLOGÍA Y HÁBITAT DE <i>O. maya</i> .....	3
1.2 IMPORTANCIA ECONÓMICA Y COMERCIALIZACIÓN .....	4
1.3 CALIDAD MICROBIOLÓGICA EN PESCADOS Y MARISCOS .....	5
1.4 MICROFLORA PRESENTE EN DETERIORO DE PESCADOS Y MARISCOS.....	8
A) <i>Pseudomonas</i> .....	10
B) <i>Salmonella</i> .....	10
C) <i>Shewanella</i> .....	11
D) <i>Vibrio</i> .....	11
1.5 ENZIMAS Y COMPUESTOS SECRETADOS POR LAS BACTERIAS EN EL DETERIORO .....	11
1.6 COMPUESTOS VOLÁTILES.....	13
1.7 AMINAS BIOGÉNICAS.....	14
1.8 MÉTODOS DE DETECCIÓN DE AMINAS BIOGÉNICAS.....	15
A) <i>Cromatografía de gases</i> .....	16
B) <i>Identificación de compuestos por espectrometría de masas</i> .....	18
1.9 IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS .....	19
A) <i>RNA ribosomales (rRNA)</i> .....	20
B) <i>Metagenómica</i> .....	23
C) <i>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</i> .....	24
D) <i>PCR anidada</i> .....	26
E) <i>PCR-múltiple</i> .....	26
1.10 JUSTIFICACION .....	27
OBJETIVO GENERAL.....	28
OBJETIVOS ESPECIFICOS .....	28
<b>CAPITULO II MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
2.1 ESTRATEGIA GENERAL DEL ESTUDIO.....	29
2.2 MATERIA PRIMA.....	30
2.3 INDUCCIÓN DE DETERIORO EN PULPO ( <i>O. maya</i> ).....	30
2.4 AISLAMIENTO DE BACTERIAS USANDO MEDIOS SELECTIVOS .....	31
1 <i>Pre enriquecimiento</i> .....	31
2 <i>Crecimiento en medios selectivos</i> .....	31

2.5 MÉTODO PARA LA CUENTA DE BACTERIAS AEROBIAS EN PLACA.....	32
2.6 CONSERVACIÓN DE MICROORGANISMOS AISLADOS Y PURIFICADOS.....	32
2.7 ANÁLISIS FÍSICOS Y QUÍMICOS .....	33
A) <i>Determinación de pH</i> .....	33
B) <i>Acidez total de acuerdo a la Norma NMX-F-206-1986</i> .....	33
2.8 ANÁLISIS COMPUESTOS VOLÁTILES.....	34
A) <i>Manejo de las muestras</i> .....	34
B) <i>Metodología para la microextracción en fase sólida )</i> .....	34
C) <i>Condiciones para la HS-SPME</i> .....	34
D) <i>Cromatografía de gases</i> .....	35
E) <i>Análisis e identificación de compuestos volátiles</i> .....	35
2.9 MÉTODOS MOLECULARES .....	35
A) <i>Preparación de la muestra para extracción de ADN</i> .....	35
1) <i>Preparación de cepas puras</i> .....	35
2) <i>Preparación de comunidades microbianas (metagenoma)</i> .....	36
B) <i>Extracción y purificación de ADN genómico y metagenómico</i> .....	36
C) <i>Cuantificación de ADN genómico y ADN metagenómico</i> .....	37
D) <i>Análisis bioinformático de iniciadores universales y específicos</i> .....	37
E) <i>Concentración de la mezcla de reacción de PCR</i> .....	38
F) <i>Condiciones de amplificación de la PCR</i> .....	38
1) <i>PCR tradicional</i> .....	39
2) <i>PCR gradiente de temperatura de 53 a 59 °C</i> .....	39
3) <i>PCR Touchdown</i> .....	39
G) <i>Electroforesis de ADN y productos de PCR</i> .....	39
1) <i>Electroforesis de ADN</i> .....	39
2) <i>Electroforesis de productos de PCR</i> .....	40
H) <i>Secuenciación</i> .....	40
I) <i>Identificación de microorganismos con programas bioinformaticos</i> .....	41
<b>CAPITULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>42</b>
3.1 VARIACIÓN DEL CONTENIDO DE MICROORGANISMOS EN PULPO ( <i>O. maya</i> ) .....	42
A) <i>Aislamiento y purificación de bacterias psicrófilas por la NOM-092</i> .....	42
B) <i>Aislamiento de bacterias Pseudomonas y Vibrio</i> .....	45
C) <i>Comportamiento de los valores de acidez total y Variación de pH</i> .....	49
3.2 IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES INVOLUCRADOS EN EL DETERIORO .....	53
3.3 EVALUACIÓN DE LA FRACCIÓN VOLÁTIL DE PULPO DURANTE SU ALMACENAMIENTO.....	59
3.4 ESTANDARIZACIÓN DE MÉTODOS DE LA PCR Y DE EXTRACCIÓN DE mADN .....	67
A) <i>Amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</i> .....	67
B) <i>Condiciones de PCR de los iniciadores de Salmonella</i> .....	72
C) <i>Extracción de ADN metagenómico (mADN)</i> .....	74
3.5 IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS A PARTIR DEL GEN 16S RRNA.....	76
3.6 IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS AISLADOS DE PULPO EN DETERIORO POR PCR.....	78
A) <i>Análisis de los microorganismos presuntamente Vibrio</i> .....	78



## INDICE

<i>B) Análisis de los microorganismos presuntamente Pseudomonas</i> .....	80
3.7 ANÁLISIS DEL METAGENOMA DEL PULPO EN DETERIORO.....	83
<i>A) Análisis del metagenoma con iniciadores universales</i> .....	84
<i>B) Análisis del metagenoma con iniciadores para Pseudomonas sp</i> .....	85
<i>C) Análisis del metagenoma con iniciadores para Salmonella</i> .....	86
<i>D) Análisis del metagenoma con iniciadores para Shewanella putrefaciens</i> .....	87
<i>E) Análisis del metagenoma con iniciadores para Vibrio parahaemolyticus</i> .....	88
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>91</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>93</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>110</b>
<b>A.1 ARTÍCULOS</b> .....	<b>110</b>
<b>A.1.1 REVISTA CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS (ISSN 0864-4497)</b> .....	<b>110</b>
<b>A.1.2 EVALUACIÓN DE LA DINÁMICA MICROBIANA EN EL PULPO (ISBN 978-607-7912-04-0)</b>	<b>112</b>
A.2 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA ELECTROFORESIS DE ADN.....	113
<i>A.2.1 BUFFER DE RESOLUCIÓN STOCK TRIS-ACETATO (TAE) 50X</i> .....	113
A.3 BUFFER DE CARGA ADN (6X).....	113
A.4 AGAROSA 0,8%, 1,5% Y 2%.....	113
A.5 BUFFER T.E. PH 8.0 (.5 M TRIS-HCL, 50 MM EDTA ).....	113
A.6 TEN PH 8.0 (0.1 M TRIS-HCL, 50 MM EDTA, 500 MM NAACL).....	113
A.7 FORMULACIÓN DE MEDIOS SELECTIVOS PARA <i>PSEUDOMONAS</i> AGAR F Y AGAR P.....	114
ANEXO B ANEXOS DE RESULTADOS MOLECULARES (ALINEAMIENTO Y SECUENCIAS).....	115
<i>Anexo B1 alineamiento de la cepa PH105</i> .....	115
<i>Anexo B2 secuencias de las cepas reportadas en la base de datos</i> .....	116

## Índice de figuras

FIGURA 1.1 Octopus vulgaris. ....	3
FIGURA 1.2 Diagrama de proceso cadena de pulpo.....	8
FIGURA 1.3 Bacterias que participan en la descomposición de alimentos.....	9
FIGURA 1.4 Bacterias que participan en la descomposición .....	11
FIGURA 1.5 Principales aminas biogénicas .....	15
FIGURA 1.6 Esquema general de un cromatógrafo de gases .....	17
FIGURA 2.1 Metodología general de trabajo.....	29
FIGURA 2.2 Muestreo en el área de recepción de la congeladora.....	30
FIGURA 3.1 Microorganismo aislados de acuerdo a la NOM-092 .....	44
FIGURA 3.2 Cepas presuntivamente <i>Pseudomonas</i> .....	45
FIGURA 3.3 Cepas presuntivamente <i>Vibrio</i> .....	46
FIGURA 3.4 Valores de acidez total expresados como % ácido láctico .....	50
FIGURA 3.5 Valores de pH a - 5 °C y - 20 °C .....	52
FIGURA 3.6 Cromatogramas de los compuestos volátiles .....	54
FIGURA 3.7 Perfiles cromatográficos de muestras de pulpo en deterioro.....	56
FIGURA 3.8 Perfiles cromatográficos de muestras de pulpo en deterioro.....	58
FIGURA 3.9 Cromatograma de volátiles de 90 días -5 °C.....	64
FIGURA 3.10 Cromatograma de volátiles de 120 días -20 °C.....	65
FIGURA 3.11 Cromatograma de volátiles de 2 años a - 20 °C.....	66
FIGURA 3.12 Electroforesis de PCR usando iniciadores DG74 y RW01 .....	68
FIGURA 3.13 Electroforesis de productos de PCR obtenido con PLK1 y PLK2 .....	69
FIGURA 3.14 Electroforesis de PCR con iniciadores Uni1F, Uni1R y Uni2F, Uni2R. ....	70
FIGURA 3.15 Productos de PCR por Touchdown iniciadores Uni2F, Uni2R. ....	72
FIGURA 3.16 Amplificación por PCR con iniciadores para <i>Salmonella</i> . ....	73
FIGURA 3.17 Extracción de mADN.....	75
FIGURA 3.18 Amplificación por PCR a partir de bacterias psicrófilas .....	76
FIGURA 3.19 Electroforesis de ADN de cepas presuntivamente <i>Vibrio</i> . ....	78
FIGURA 3.20 Electroforesis de PCR de cepas presuntivamente <i>Vibrio</i> . ....	79
FIGURA 3.21 Electroforesis del ADN de las cepas presuntivamente <i>Pseudomonas</i> .....	80
FIGURA 3.22 Electroforesis de PCR de bacterias presuntivamente <i>Pseudomonas</i> .....	81
FIGURA 3.23 Electroforesis del mADN de pulpo .....	84
FIGURA 3.24 Electroforesis de productos de PCR del mADN .....	85
FIGURA 3.25 Productos de PCR del mADN usando iniciadores específicos .....	86
FIGURA 3.26 Análisis de la PCR del mADN con iniciadores de <i>Salmonella</i> . ....	87
FIGURA 3.27 Electroforesis de PCR del gen 16S rRNA .....	88
FIGURA 3.28 Productos de PCR del mADN con iniciadores específicos .....	89

## Índice de tablas

TABLA 1.1 LÍMITES MÁXIMOS DE ACUERDO A LA NOM-031-SSA-1993 .....	7
TABLA 1.2 LÍMITES MÁXIMOS DE ACUERDO A LA NOM-129-SSA1-1995.....	7
TABLA 1.3 ORGANISMOS ESPECÍFICOS DE DETERIORO DE ALIMENTOS.....	12
TABLA 1.4 MÉTODOS DE DETECCIÓN DE AMINAS BIOGÉNICAS .....	16
TABLA 2.1 INICIADORES ANALIZADOS Y UTILIZADOS PARA LA PCR .....	38
TABLA 3.1 RECUENTO TOTAL DE MICROORGANISMOS PSICRÓFILOS (UFC/g) .....	43
TABLA 3.2 BACTERIAS AISLADAS EN INDUCCIÓN DE DETERIORO DE PULPO <i>O. maya</i> .....	44
TABLA 3.3 BACTERIAS AISLADAS A DE PULPO <i>O. maya</i> A - 5 °C Y - 20 °C .....	47
TABLA 3.4 VALORES DE ACIDEZ TOTAL Y PH .....	49
TABLA 3.5 TIEMPO DE RETENCIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES .....	55
TABLA 3.6 NÚMERO DE COMPUESTOS VOLÁTILES TOTALES .....	60
TABLA 3.7. TEMPERATURAS ÓPTIMAS DE LOS INICIADORES. ....	67
TABLA 3.8 GÉNEROS DE LAS CEPAS SECUENCIADAS Y PUBLICADAS . ....	77
TABLA 3.9 GÉNEROS DE LAS CEPAS AISLADAS EN MEDIO SELECTIVOS PARA <i>Vibrio</i> .....	81
TABLA 3.10 GÉNEROS DE LAS CEPAS AISLADAS EN MEDIO SELECTIVO PARA <i>Pseudomonas</i> .....	82

## CAPITULO I INTRODUCCION Y ANTECEDENTES

### INTRODUCCIÓN

Productos pesqueros tales como el mero y el pulpo, son de gran importancia en el estado de Yucatán, ya que son utilizados de forma tradicional en la alimentación en México y en muchas regiones del mundo. Por esta razón, la producción de pescados y moluscos ha surgido como una industria importante en el estado de Yucatán, donde las condiciones climatológicas facilitan su explotación, en las costas de los estados de Quintana Roo, Yucatán y Campeche (Solís-Ramírez *et al.*, 1997).

Para las industrias productoras de alimentos y para las autoridades sanitarias ha sido prioritario asegurar la calidad de los mismos, ya que está demostrado que son vehículos de transmisión de enfermedades. De igual manera, se hacen esfuerzos por controlar su calidad con el establecimiento de los sistemas HACCP, que controla el problema de contaminación microbiológica, a fin de prolongar su calidad comercial y evitar en alguna medida, su rápido deterioro. El deterioro de los alimentos marinos puede deberse a fenómenos autolíticos, químicos y microbiológicos (FAO, 1991). Durante su proceso de almacenaje, el pulpo pasa tiempos considerables congelado, y se sabe por algunos estudios que bajo estas condiciones, ciertos microorganismos sobreviven y continúan su crecimiento a una velocidad menor, causando deterioro en tiempos largos de almacenamiento, lo cual puede influir en la calidad del pulpo, causando pérdidas económicas importantes a las empresas encargadas de su distribución.

Es de vital importancia para las industrias alimentarias mantener los alimentos inocuos; las industrias tienen como finalidad preparar alimentos aumentando su vida útil, previniendo que no sufran deterioro por microorganismos, para ello es necesario conocer el tipo de flora microbiana que pudiera estar presente en los alimentos y establecer técnicas rápidas de diagnóstico para asegurar la calidad e inocuidad de los alimentos (López-Sabater *et al.*, 1994; y Ward, 1991). En la actualidad, existen

diversas técnicas moleculares que permiten el estudio de la diversidad microbiana presente en las muestras a analizar.

El uso de la nueva técnica de metagenómica poblacional y la utilización combinada de diferentes herramientas moleculares basadas en el 16S rRNA ha permitido un estudio en profundidad de la diversidad, estructura y dinámica de comunidades microbianas en general (Contreras-Araneda, 2005). Así mismo, la complementación de estas técnicas es de gran importancia para saber las posibles causas del deterioro en pulpo y conocer la flora microbiana durante su cadena productiva, lo que indica que este estudio podría ser una alternativa y un gran avance para prevenir el deterioro del pulpo durante su proceso de almacenamiento en las congeladoras, por lo que se podrían proponer mejores condiciones de almacenamiento repercutiendo en una mejor calidad que conlleve a una mejor comercialización del pulpo.

En el presente trabajo, se realizó un estudio durante el almacenamiento del pulpo a dos temperaturas bajas, para determinar las posibles causas de deterioro en pulpo *Octopus maya*. Se utilizaron herramientas bioquímicas para identificar algunos de los compuestos característicos de deterioro en alimentos de origen marino y herramientas moleculares para identificar la flora microbiana presente en el pulpo durante el almacenamiento.

## ANTECEDENTES

### 1.1 Biología y hábitat de *Octopus maya*

El pulpo es un molusco cefalópodo marino y carnívoro, presente en aguas de climas templados y tropicales de todo el mundo. Esta especie se caracteriza por tener un cuerpo blando, con un cerebro bien desarrollado y ocho brazos, los cuales poseen ventosas y pueden alcanzar un desarrollo hasta 1 m de largo (Solís-Ramírez *et al.*, 1994). En todo el mundo se conocen más de 150 especies. El de menor tamaño corresponde al *Octopus arborescens*, que no llega a cubrir ni cinco centímetros de punta a punta. El mayor, el *Octopus hongkongensis* del Pacífico, que abarca casi diez metros. Y el más peligroso *Hapalochlaena maculosa* de Australia que es pequeño, con un potentísimo veneno capaz de matar en minutos al ser humano (Solís-Ramírez *et al.*, 1967). El pulpo más estudiado es el *Octopus vulgaris*, se le considera una especie cosmopolita, ya que se encuentra ampliamente distribuido en los mares (Figura 1.1A).

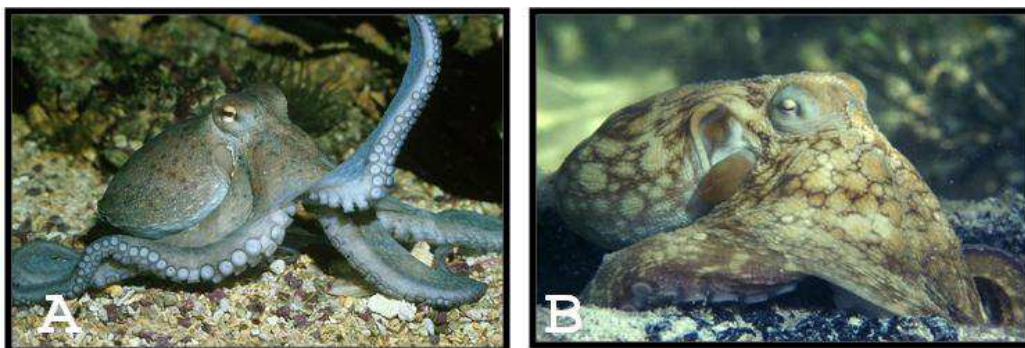


Figura 1.1 *Octopus vulgaris*, especie ampliamente distribuida en el mundo (A). *Octopus maya* especie endémica de la península de Yucatán (B).

El *Octopus maya*, es considerada una especie endémica de la región de la península de Yucatán, es de mediano tamaño, entre 60 centímetros y un metro. Su área de distribución comprende los estados de Quintana Roo, Yucatán y Campeche, (Figura 1.1B) (Pérez *et al.*, 2004; Pérez-Lozada *et al.* 2002). En forma, tamaño, aspecto general y forma de alimentación, el *O. vulgaris* y el *O. maya* son muy parecidos. Estas especies son de gran interés comercial por ser un recurso explotable en

Yucatán y varios países del mundo por lo tanto, está sujeta a una intensa actividad pesquera (Solís-Ramírez *et al.*, 1997a).

La principal diferencia entre ambas especies estriba en la reproducción. El *Octopus vulgaris* pone hasta medio millón de huevecillos, que simplemente expulsa en el agua sin darles protección. De ellos nacen crías todavía no completamente formadas que durante uno, dos o tres meses flotan libremente en las corrientes marinas, mientras completan su desarrollo y mueren en gran número, víctimas de los depredadores (Solís-Ramírez *et al.*, 1962). Por otra parte, *O. maya* únicamente produce entre mil 500 y 2 mil huevos de más de centímetro y medio de longitud (Solís-Ramírez, 1975). La hembra los conserva en su refugio protegiéndolos celosamente durante los dos meses de incubación hasta que brotan, esto sin pasar por la fase larvaria, con la apariencia de un adulto mueve ágilmente los tentáculos, cambian de coloración, atrapan alimento y son capaces, inclusive, de arrojar tinta (Solís-Ramírez *et al.*, 1997b). Durante esos dos meses de cuidados maternos, la hembra no se alimenta en absoluto y cumplida su misión muere (Solís-Ramírez *et al.*, 1988; Solís-Ramírez *et al.*, 1962).

## **1.2 Importancia económica y comercialización**

El pulpo es uno de los productos marinos de importancia en la alimentación por su valor proteico, contenido de vitaminas y minerales (Villaroel *et al.*, 2001). En Yucatán, la producción de pulpo en 2012 fue de 17,462 toneladas lo cual correspondió al 92.6 % de la producción anual en el país (SAGARPA, 2012 INEGI, 2012). Actualmente el pulpo ha cobrado un importante interés por el aumento de la exportación a los mercados europeos, principalmente Italia y España. Para poder exportar el producto a Europa se debe cumplir con las condiciones de calidad y sanidad, establecidas a partir de 1997 en los sistemas HACCP, acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-128-SSA1-1994 y NMX-F-491-1994, para pulpo congelado (Jiménez-Vera, 2001).

### 1.3 Calidad microbiológica en pescados y mariscos

El concepto de calidad de un alimento o producto puede abarcar una gama de atributos que influyen en su valor o aceptabilidad para el consumidor, tales como: el valor nutricional, propiedades sensoriales (apariencia, color, aroma, textura, gusto) y algunos autores consideran la inocuidad como un parámetro de calidad. Muchas de estas características pueden estar sujetas a condiciones regulatorias y normativas (Arispe y Tapia, 2007). En pescados y mariscos los más utilizados son frescura, apariencia, color, aroma, textura, en los últimos años la inocuidad de los mismos, debido que a través de los alimentos se producen ciertas enfermedades, conocidas como enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA's).

Las ETA's, se producen por la ingestión de alimentos y/o bebidas contaminados con microorganismos patógenos, que afectan la salud del consumidor. Sus síntomas son diarreas y vómitos, también se pueden presentar choque séptico, hepatitis, cefaleas, entre los principales efectos (Rosas y Acosta, 2001). Las ETA's son un problema importante de salud pública, debido al aumento en la frecuencia de casos que se presentan con el surgimiento de nuevas formas de transmisión, el aumento de la resistencia de los patógenos a los compuestos antimicrobianos y el impacto socioeconómico que ocasionan (Casas, 2005). Para contrarrestar las enfermedades producidas por los alimentos, es de vital importancia mantener los alimentos inocuos (Lund *et al.*, 2000a). La inocuidad en los alimentos está considerado como la ausencia de contaminantes, adulterantes, toxinas microorganismos o cualquier sustancia que pueda hacer nocivo el alimento para la salud (Morón y Dárdano, 2001).

Alrededor de un tercio de la producción mundial de alimentos se pierden anualmente como consecuencia de la descomposición microbiana (Lund *et al.*, 2000b). La pérdida de la calidad y el deterioro de los productos de la pesca son el resultado principal de la acción bacteriana o por la presencia de otros microorganismos patógenos, es por esta razón que se han utilizado técnicas de preservación para reducir el deterioro del alimento. Las características que presentan son las siguientes; detección de olores y sabores extraños, formación de exudados,



producción de gases, pérdida de color, cambios de textura y cambios en los valores de pH, el desarrollo de estas condiciones de deterioro en pescados y mariscos se debe a la combinación de fenómenos autolíticos, químicos y microbiológicos (Huss, 1999). La congelación es uno de los métodos comúnmente empleados para preservar este tipo de alimento y contrarrestar el proceso de deterioro, ya que permite retardar las reacciones químicas, biológicas y físicas que se puedan presentar (Huss, 1999).

Uno de los parámetros evaluados durante el proceso de deterioro y pérdida de calidad en pescados y mariscos es el pH que es de 7 inmediatamente después de su captura. Posteriormente, desciende a 6.2 ó 6.5 por la acumulación del ácido láctico y por último, aumenta ligeramente debido a la formación de compuestos básicos (Pascual Anderson, 2000; Huss, 1997). La determinación de pH se puede realizar directamente con un potenciómetro sobre una masa homogénea de carne de pescado o marisco triturado, y en caso de no lograr la homogeneidad o de tratarse de una muestra excesivamente seca se recomienda hacer una dilución con agua destilada. Es un método rápido que se puede aplicar *in situ*, pero presenta el inconveniente de ser destructivo. Resulta difícil relacionar un determinado valor de pH con el grado de frescura, ya que el pH final que se alcanza tras la muerte del pescado o marisco depende de las reservas glucolíticas de ese momento, algo que es muy variable ya que dependerá del estado nutricional del pescado y del tipo de captura empleada. Se propone que a pesar de encontrar un aumento significativo del pH durante el deterioro del pescado, debe utilizar este parámetro más como una guía de calidad que como un índice (Ruiz-Capillas y Moral, 2001).

Las normas mexicanas para productos pesqueros manejan dos grupos de indicadores para evaluar la calidad microbiológica, las bacterias mesófilas aerobias y los coliformes fecales. La importancia de estos indicadores radica en que estos métodos usados para el aislamiento y recuento de los microorganismos patógenos en alimentos pueden no ser eficaces, debido a que éstos se encuentran en muy baja cantidad, sobre todo en presencia de números altos de otros microorganismos o que tengan una distribución irregular en el producto (Huss, 1999). Los mesófilos aerobios

son un grupo importante de bacterias utilizadas como indicadores sanitarios, también llamados cuenta total viable, cuenta estándar en placa, cuenta total en placa aerobia (Bravo-Martínez, 2004; Huss, 1999). En México, la responsabilidad del control sanitario en los alimentos para exportación está a cargo de la Secretaría de Salud, con la participación de organismos e instituciones relacionadas quienes establecen las normas sanitarias y se aseguran de su cumplimiento (Robles, 1994). La norma aplicada para evaluar calidad microbiológica en moluscos y bivalvos frescos es la NOM-031-SSA-1993. Estos productos deben de cumplir los siguientes límites máximos y especificaciones microbiológicas (Tabla 1.1).

Tabla 1.1 Límites máximos de microorganismos permitidos para evaluar moluscos y bivalvos frescos de acuerdo a la NOM-031-SSA-1993

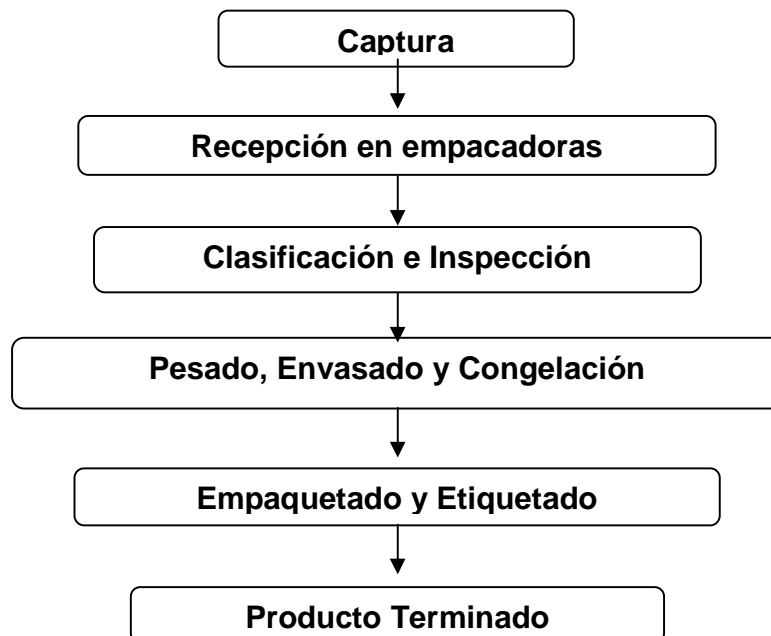
<b>Organismos</b>	<b>Límite máximo</b>
Mesofílicos aerobios	$5 \times 10^5$ UFC/g
Bacterias coliformes fecales	240 NMP/100g
<i>Salmonella spp</i>	Ausencia en 25 g
<i>Vibrio cholerae</i> O1 toxigénico	Ausencia 50 g

La cadena productiva del proceso de pulpo, para producto terminado (pulpo congelado eviscerado) cumple con los criterios microbiológicos establecidos y definidos en función de la Norma Oficial Mexicana NOM-129-SSA1-1995. Las disposiciones y especificaciones sanitarias establecen que los moluscos cefalópodos y gasterópodos frescos-refrigerados y congelados deben cumplir con las especificaciones mostradas en la Tabla 1.2.

Tabla 1.2 Límites máximos de microorganismos permitidos en producto terminado pulpo congelado eviscerado de acuerdo a la NOM-129-SSA1-1995

<b>Organismos</b>	<b>Límite máximo</b>
Mesófilos aerobios	$5 \times 10^5$ UFC/g
Coliformes fecales	<230 NMP/100g
<i>Salmonella ssp</i>	Ausencia en 25 g
<i>Vibrio cholerae</i>	Ausencia 50 g

En la Figura 1.2 se presenta las etapas del proceso de pulpo desde su captura hasta la etapa de empaquetado para comercialización y exportación.



Fuente: CONAPESCA-SAGARPA. 2002

Figura 1.2 Diagrama de proceso de la cadena productiva de pulpo.

#### 1.4 Microflora presente en deterioro de pescados y mariscos

La microflora de los crustáceos es semejante a la de los pescados y pueden agruparse de acuerdo a su hábitat natural en: bacterias nativas y bacterias no nativas. Las nativas son aquellas que se encuentran naturalmente distribuidas en el medio acuático de prácticamente todo el manto marino, por lo que su presencia en los pescados y mariscos es considerada normal; entre ellas se incluyen las diferentes especies de *Vibrio*, *Listeria* y *Clostridium*. Las no nativas son las que se encuentran en el producto mediante contaminación, ya sea ambiental o en cualquier punto después de su captura, por manipulación y almacenaje en condiciones poco higiénicas (Centeno-Briseño *et al.*, 2007). La carga microbiana nativa de los productos de origen marino se caracteriza dependiendo de la región donde se captura. En los productos de climas templados, la microflora es conformada por bacterias aerobias,

anaerobias y psicotrópicas, Gram negativas, representadas por los géneros *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Proteus* y *Vibrio*, difiriendo de los de regiones tropicales en las cuales predominan las bacterias Gram positivas como *Micrococcus*, *Bacillus* y *Clostridium* (Centeno-Briseño *et al.*, 2007; Huss, 1997).

Sin embargo, al momento de extraer la materia prima del mar, la flora microbiológica característica tiende a cambiar, ya que el medio exterior y la manipulación influyen en forma directa en la modificación de la población, la nueva carga microbiana tiende a ser tanto de naturaleza psicotrófica como de naturaleza mesófila. Por lo tanto, la carga microbiana de los productos de origen marino depende de la composición inicial, la manipulación durante su captura, el manejo durante su procesamiento, almacenamiento y su posterior distribución (Centeno-Briseño *et al.*, 2007; Huss, 1997).

En los moluscos, la microflora presente está formada principalmente por *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Salmonella*; bacterias Gram positivas como *Micrococcus* y *Corynebacterium*; también se pueden encontrar *Flavobacterium*, *Alteromonas*, *Moraxella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Serratia*, *Bacillus*, *Vibrio*, *Clostridium*, que producen olores característicos por la formación de aminas biogénicas (AB), (Bourgeois *et al.*, 1994). Las bacterias que participan en la descomposición de alimentos de origen marino pueden ser *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Alteromonas* y especies de *Enterobacteriaceae* (Figura 1.3), debido a la producción de AB.

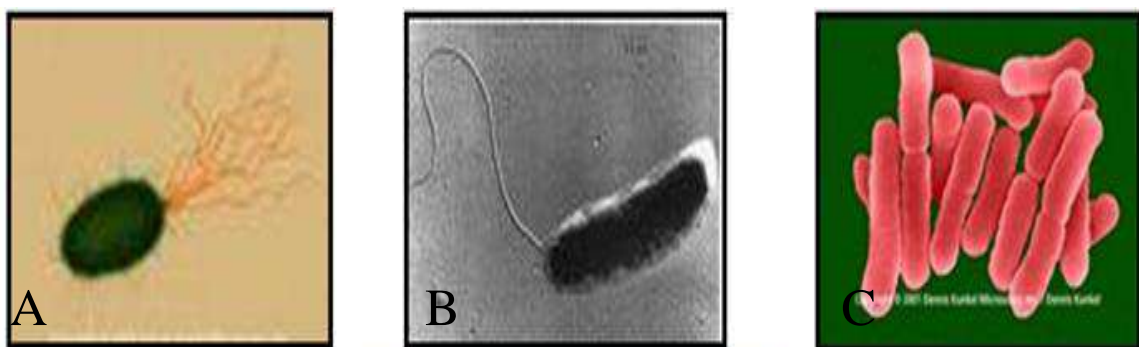


Figura 1.3 Bacterias que participan en la descomposición de alimentos. *Pseudomonas spp* (A); *Shewanella putrefaciens* (B); *Enterobacteriaceae* (C).

Así mismo, *Shewanella putrefaciens* y *Pseudomonas* spp., son capaces de producir diferentes enzimas descarboxilasas, productoras de putrescina y cadaverina, que contribuyen a la descomposición de los alimentos marinos mantenidos a bajas temperaturas (Gram y Dalgaard, 2002).

A continuación, se describen las características más importantes del grupo de bacterias que causan deterioro en los alimentos de origen marino.

### **A) *Pseudomonas***

Las bacterias del grupo *Pseudomonas* están constituidas por microorganismos Gram-negativos, siempre móviles con flagelación polar (Figura 1.3A). Su metabolismo es siempre aerobio (la mayoría usa como aceptor de electrones el O<sub>2</sub>) o anaerobio (algunos usan NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Presentan una versatilidad metabólica muy grande que se traduce en su capacidad de utilizar como fuente de carbono substratos muy variados. Hay especies, como *Pseudomonas cepacia*, que pueden utilizar como nutrientes más de 100 compuestos químicos diferentes.

### **B) *Salmonella***

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Son bacilos Gram-negativos y su tamaño oscila entre 1 y 3 µm de longitud y entre 0.5 y 0.7 µm de diámetro (Figura 1.4A). Generalmente poseen flagelos que les dan movilidad. Son bacterias anaerobias facultativas que fermentan la glucosa, produciendo ácido y gas, casi todas las especies de *Salmonella* producen ácido sulfhídrico a partir de las proteínas y son capaces de descarboxilar algún aminoácido. La temperatura óptima de crecimiento es de unos 37 °C y la actividad del agua (A<sub>w</sub>) mínima es aproximadamente de 0.93. El intervalo de pH de crecimiento está comprendido entre los valores 4.1 y 9.0, multiplicándose, por lo tanto, en los alimentos de baja acidez.

El tratamiento térmico que se aconseja para destruir *Salmonella* en los alimentos perecederos consiste en aplicar un calentamiento a una temperatura de 66 °C y mantenimiento de ésta en todas las partes del alimento durante por lo menos 12 minutos (o una temperatura de 60 °C durante 78 minutos) (Razquin, 2000).

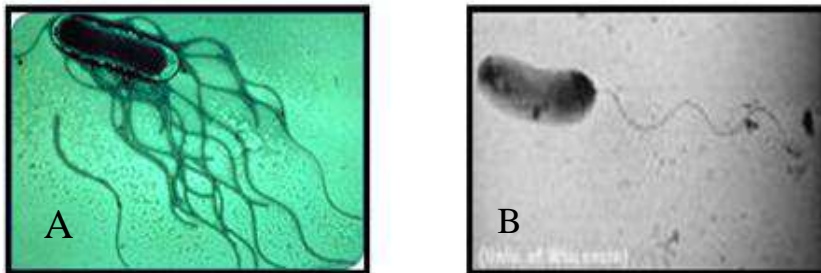


Figura 1.4 Bacterias que participan en la descomposición de alimentos y son patógenas para el hombre, *Salmonella* (A); *Vibrio* (B).

Las bacterias del género *Salmonella* son una de las bacterias patógenas más importantes que pueden provocar enfermedades en el hombre por ingestión de alimentos contaminados.

### **C) *Shewanella***

El taxón *Shewanella putrefaciens* pertenece a un grupo entre cuyas principales características se encuentran la producción de sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S) y un característico color marrón bronceado en el medio de cultivo (Figura 1.3B). Su hábitat preferente está constituido por reservorios acuáticos (marinos, agua dulce, aguas residuales), reservas energéticas naturales (petróleo, gas), y productos animales procedentes de pescados.

### **D) *Vibrio***

Es una bacteria Gram negativa, en forma de bacilo recto o ligeramente curvo de  $1 \times 10^{-3}$  micras de longitud por 0.4 a 0.6 de diámetro, típicamente móvil con un solo flagelo polar; en medios sólidos, sin embargo, presenta un carácter peritríco (Figura 1.4B). Es por otra parte anaerobio facultativo y halófilo obligado (Fernández-Escartín, 1988).

## **1.5 Enzimas y compuestos secretados por las bacterias en el deterioro**

La mayoría de los microorganismos pueden producir metabolitos como las enzimas extracelulares que tienen como función degradar compuestos orgánicos complejos,

transformándolos en sustancias fácilmente metabolizables; este es el caso de las hidrolasas, proteasas y esterases, las cuales se encargan de hidrolizar las moléculas que conforman a las proteínas, azúcares complejos y lípidos; que si bien no tienen importancia en la transmisión de enfermedades, sí la tienen en el deterioro y la disminución del valor nutritivo de estos alimentos. En la Tabla 1.3 se presentan los compuestos secretados por algunos microorganismos específicos de deterioro (Lakshmanan *et al.*, 2002).

Las enzimas producidas con mayor frecuencia por las bacterias aisladas en alimentos son: fosfohidrolasas, 4-hidroxi-butirato deshidrogenada, lipasas, esterases, proteasas, amilasas, oxigenasas, oxidoreductasas, quitinasas, xilinasas (Bourgeois *et al.*, 1994). Los compuestos producidos por las bacterias con mayor frecuencia son: ésteres, cetonas, aldehídos, feniletilamina, metilamina, dimetilamina, etilamina, dietilamina, isopropilamina, isobutilamina, amilamina, pirrolidina, etanolamina y hexilamina.

Tabla 1.3 Organismos específicos de deterioro de alimentos

<b>Organismo específico de deterioro</b>	<b>Compuesto típico de deterioro</b>
<i>Shewanella putrefaciens</i>	TMA, H <sub>2</sub> S, CH <sub>3</sub> SH (metanotiol), (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> S y Hx
<i>Photobacterium</i>	TMA, Hx
<i>Pseudomonas</i> spp.	Cetonas, aldehídos, ésteres, sulfuros no-H <sub>2</sub> S
<i>Vibrionaceae</i>	TMA, H <sub>2</sub> S
Anaeróbicos deteriorativos	NH <sub>3</sub> , ácidos: acético, butírico y propiónico
<b>Sustrato</b>	<b>Compuestos producidos por las bacterias</b>
OTMA	TMA
Cisteína	H <sub>2</sub> S
Metionina	CH <sub>3</sub> SH, (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> S
Carbohidratos y lactato	Acetato, CO <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> O
Inosina, IMP	Hx
Aminoácidos, urea	Ésteres, cetonas, aldehídos y NH <sub>3</sub>

\*TMA: Trimetilamina Hx: Hipoxantina

## 1.6 Compuestos volátiles

Los compuestos volátiles analizados en muestras de pescados y mariscos; para evaluación de calidad y deterioro, podemos mencionar al nitrógeno básico volátil total (N-BVT), medición de TMA producida por el deterioro bacteriano, dimetilamina, amoníaco (producido por desaminación de aminoácidos y catabolitos de nucleótidos) y otros compuestos nitrogenados básicos volátiles asociados con el deterioro de los productos pesqueros (Huss, 1988). Una de las limitaciones del uso del N-BVT como índice de frescura o deterioro, es porque presenta niveles variables en función de la especie, estación del año, hábitat, procesado (Sánchez-Cascado, 2005). Por lo tanto se tendrían que establecer los niveles de aceptabilidad individualizados para las diferentes familias o especies marinas.

Así mismo, el contenido de TMA a lo largo del deterioro, presenta gran variabilidad entre las diferentes especies marinas, principalmente por las diferencias en el contenido inicial de óxido de trimetilamina (OTMA), que presentan en su músculo (Rodríguez *et al.*, 1997). El contenido de TMA también muestra diferencias dentro de una misma especie según el modo de conservación y almacenamiento. Así pues, durante el almacenamiento aerobio se forman cantidades mayores de TMA (Huss, 1997). Tras un período de latencia, los niveles de TMA aumentan siguiendo el perfil de una curva exponencial (Veciana-Nogués *et al.*, 1997), lo que concuerda con el comportamiento del crecimiento bacteriano, lo cual ha llevado a establecer correlaciones entre los niveles de TMA y el recuento total de microorganismos (Pastoriza *et al.*, 1996; Wong *et al.*, 1988; Wong y Gill, 1987) y a proponer la determinación del TMA como método objetivo para evaluar la calidad higiénico – sanitaria. La mayoría de los métodos analíticos propuestos para el análisis del TMA, inician con una etapa de desproteinización que implica una homogeneización en ácido perclórico o tricloroacético. La volatilización de las aminas presentes en las muestras requiere que éstas sean neutralizadas a pH 7 inmediatamente antes del análisis. Cuando deban ser almacenadas por extensos períodos de tiempo antes del análisis deben permanecer en su forma ácida dentro de contenedores sellados (Huss, 1999). Existen muchos métodos y modificaciones de los mismos para la



estimación del TMA. Entre ellos destacan los de microdifusión, colorimétricos, por electrodos específicos, enzimáticos, cromatográficos y por inyección de flujo. La alta volatilidad de las aminas alifáticas de cadena corta (TMA, dimetilamina y monometilamina básicamente) hace menos crítica la aplicación de una determinada temperatura para su separación y que tenga, sin embargo, gran importancia la retención de estos compuestos por parte de la columna cromatográfica (Eerola *et al.*, 1993). Es por ello que se suelen utilizar las columnas de relleno, las cuales permiten una buena separación sobre todo por su retención en la columna debida a fenómenos de adsorción. Estas columnas llevan un soporte de sílice, más o menos modificado para evitar una retención demasiado fuerte de los compuestos amínicos y la consiguiente formación de colas (Veciana-Nogués *et al.*, 1997).

### **1.7 Aminas biogénicas**

Las aminas biogénicas (AB), se forman por descarboxilación de algunos aminoácidos por determinados microorganismos. Una de las más frecuentes es la histamina, que se presenta en vinos, embutidos y pescados. Las AB son compuestos nitrogenados de bajo peso molecular que se forman principalmente por descarboxilación de aminoácidos (Baixas-Nogueras *et al.*, 2001). Atendiendo a su estructura química, pueden clasificarse en alifáticas (Figura 1.5) (putrescina, espermidina, espermita, cadaverina), aromáticas (tiramina, feniletilamina) o heterocíclicas (histamina, triptamina) y en función del número de grupo aminos de la molécula, podemos hablar de monoaminas (histamina, feniletilamina, tiramina), diaminas (putrescina, cadaverina) o poliaminas (espermidina, espermina) (Huss, 1997).

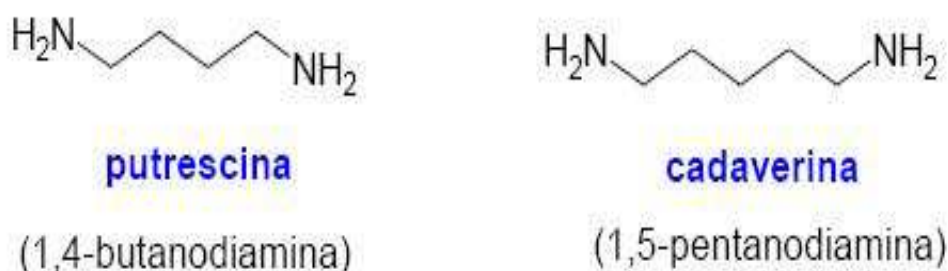


Figura 1.5 Principales aminas biogénicas producidas en los alimentos por bacterias.

Algunas aminas biogénicas pueden ser usadas para indicar la frescura o grado de contaminación de pescados y productos marinos. Estos compuestos están ausentes en pescado fresco y su aparición generalmente está correlacionada con la contaminación bacteriana (Lehane y Olley, 2000). Las bacterias de diversos géneros que participarían en el proceso deteriorativo y secretan AB son *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Kocuria*, *Morganella*, *Vibrio* (Bougeois *et al.*, 1994).

En sardinas en sal se aislaron *Pseudomonas* capaces de producir cadaverina y putrescina (Lakshmanan *et al.*, 2002), mientras que en atún, se aislaron de bacterias pertenecientes a esta familia de *Pseudomonas* capaces de producir histamina (Du *et al.* (2002). Otros trabajos confirman estas capacidades descarboxiladoras de las *Pseudomonas* capaces de descarboxilar histidina, lisina y ornitina. (Ben-Gigerey *et al.*, 1999).

### 1.8 Métodos de detección de aminas biogénicas

Los métodos de detección de AB en los alimentos se han ido desarrollando de forma paralela al desarrollo de la cromatografía (Tabla 1.4). Inicialmente, se determinaba su presencia mediante cromatografía en capa fina, pero este método no permitía la cuantificación; por tal razón, con el fin de mejorar la sensibilidad y hacer posible la cuantificación, diversos investigadores desarrollaron una serie de técnicas que se basan en la separación y la resolución mediante el uso de cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC), el cual permite cuantificar estos tipos de compuestos,

tomando como referencia los estándares indicados en cada tipo de análisis (Novella-Rodríguez *et al.*, 2000).

Actualmente, los métodos más aplicados al análisis de las AB son los de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), que además de presentar, en general, una mayor precisión, exactitud y especificidad que los anteriores, permiten el análisis simultáneo de varias aminos.

Tabla 1.4 Métodos de detección de aminos biogénicas

<b>Método</b>	<b>Aspectos prácticos de su aplicación</b>
Métodos biológicos	Técnicas semi-cuantitativas fundamentadas en el efecto que produce la histamina en órganos o fluidos biológicos después de ser inyectada en animales de experimentación
Métodos ópticos	Una reacción química para la obtención de derivados con alguna propiedad física medible mediante colorimetría, fluorimetría y técnicas electroquímicas.
Métodos enzimáticos	Se usan enzimas como catalizadores o marcadores de la reacción.
Métodos cromatográficos	En capa fina técnica semicuantitativa De gases para identificación de compuestos volátiles Cromatografía líquida de alta eficiencia.

### **A) Cromatografía de gases**

La cromatografía de gases es una técnica cromatográfica en la cual la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de gas inerte. La fase móvil no interacciona con las moléculas del analito; su única función es la de transportar el analito a través de la columna.

Existen dos tipos de cromatografía de gases (CG): la cromatografía gas-sólido (CGS) y la cromatografía gas-líquido (CGL), siendo esta última la que se utiliza ampliamente y que se puede llamar simplemente cromatografía de gases (CG). En la CGS la fase estacionaria es sólida y la retención de los analitos en ella se produce mediante el proceso de adsorción. La CG se lleva a cabo en un cromatógrafo de gases (Figura 1.6). Éste consta de diversos componentes como el gas portador, el sistema de inyección de muestra, la columna (dentro de un horno) y el detector.



Figura 1.6 Esquema general de un cromatógrafo de gases.

La CG tiene dos importantes campos de aplicación. Por una parte, su capacidad para separar mezclas orgánicas complejas, compuestos organometálicos y sistemas bioquímicos. Su otra aplicación es como método para determinar cuantitativa y cualitativamente los componentes de la muestra. Para el análisis cualitativo se emplea el tiempo de retención, que es único para cada compuesto en determinadas condiciones (mismo gas portador, rampa de temperatura y flujo), o el volumen de retención. En aplicaciones cuantitativas, integrando las áreas de cada compuesto o midiendo su altura, con los calibrados adecuados, se obtiene la concentración o cantidad presente de cada analito.

## B) Identificación de compuestos por espectrometría de masas

La espectrometría de masas es una de las técnicas experimentales más usadas que permite la identificación de compuestos. El espectrómetro de masas es un instrumento que permite analizar con gran precisión la composición de diferentes elementos químicos e isótopos atómicos, separando los núcleos atómicos en función de su relación masa-carga ( $m/z$ ). Puede utilizarse para identificar los diferentes compuestos o elementos químicos que forman un compuesto, o para determinar el contenido isotópico de diferentes elementos en un mismo compuesto. Con frecuencia se encuentra como detector de un cromatógrafo de gases, en una técnica híbrida conocida por sus iniciales en inglés, GC-MS (Cromatografía de Gases – Espectrometría de Masas).

El espectrómetro de masas mide razones carga/masa de iones, calentando un haz de material del compuesto a analizar hasta vaporizarlo e ionizar los diferentes átomos. El haz de iones produce un patrón específico en el detector, que permite analizar el compuesto. En la industria es altamente utilizado en el análisis elemental de semiconductores, biosensores y cadenas poliméricas complejas (Hoffmann, 1999).

El espectro de masas se presenta habitualmente como un gráfico de barras, en la que cada una de ellas corresponde a un ión. La información proporcionada incluye la relación  $m/z$  y la intensidad relativa de cada señal. A la más intensa, denominada *pico base*, se le asigna el valor 100. Como la mayor parte de los iones formados tiene carga unidad, las relaciones  $m/z$  se corresponden con sus masas. El ión molecular, es el ión que resulta tras la pérdida de un electrón por parte de la molécula (Hoffmann, 1999).

El análisis de los espectros de masas se lleva a cabo gracias a una base de datos o archivos, en los cuales están contenidos una cantidad considerable de espectros de masas estandarizados asignados a sus respectivos nombres e IR Índice de Retención de compuestos reportados en dos bases de datos: *NIST 02*.

### **1.9 Identificación de microorganismos usando herramientas moleculares y el gen 16S RNA ribosomal (16S rRNA)**

Hasta hace algunos años, antes de la aparición de técnicas moleculares en la década de los años ochenta, la forma de identificar microorganismos se basaba en métodos de cultivo tradicional como son las diferencias morfológicas y pruebas bioquímicas, así como resistencia a antibióticos, las cuales se llevaban a cabo luego de cultivar los microorganismos en medios artificiales; sin embargo se sabe que algunos microorganismos no se pueden cultivar para aislar en su totalidad (McIntosh *et al.*, 2008). Si se considera que solamente el 1% de los microorganismos presentes en el mundo son cultivables, entenderemos que el estudiar e identificar esa gran mayoría de microorganismos con ayuda de la biología molecular resultaría muy valioso (Contreras-Araneda, 2005; Handelsman *et al.*, 1998).

Una de las técnicas moleculares más sencillas para identificar bacterias consiste en determinar el porcentaje de guaninas (G) y citosina (C) presente en su ADN. En este caso se realiza la extracción del ADN de una colonia pura y por espectrometría se determina el porcentaje de guanina y citosina. En bacterias del género *Pseudomonas*, un porcentaje de guaninas y citosinas va del 58 al 70%. Esta técnica tiene la desventaja de no poder identificar especies, solo se pueden identificar bacterias a nivel de género (Rodríguez *et al.*, 2003).

En microbiología, la identificación molecular basada en los genes 16S rRNA se utiliza fundamentalmente para bacterias cuya identificación mediante otro tipo de técnicas resulta imposible, ya que algunas no pueden ser cultivadas por métodos convencionales por sus requerimientos nutricionales o porque requiere mucho tiempo. La amplificación del gen 16S rRNA y su secuenciación, a partir de DNA obtenido de un cultivo puro de la bacteria o directamente de una muestra de interés, permitió el descubrimiento de nuevos agentes patógenos. Teniendo en cuenta su potencialidad, la identificación bacteriana basada en regiones específicas del 16S rRNA encontró una aplicación amplia en el estudio de microbiología (Rodicio y Mendoza, 2004).

El estudio de la diversidad microbiana nativa de diferentes hábitats mediante abordajes moleculares como la secuenciación del gen 16S rRNA, permitió la detección de especies microbianas no cultivables, y condujo a la conclusión de que menos de 1% del total de los microorganismos presentes en el ambiente son cultivables (del 0.3% en el caso del suelo) (Torsvik, 1990). A partir del trabajo pionero del uso de la metagenómica de Carl Woese, Pace *et al.*, se crea una nueva rama de la ecología microbiana (Stahl *et al.*, 1988). Se utilizó el análisis directo de las secuencias de 5S y 16S rRNA en el medio ambiente para describir la diversidad de microorganismos en una muestra ambiental no cultivable (Pace *et al.*, 1986).

Actualmente, una de las técnicas de diagnóstico más ampliamente usada para la detección de organismos patógenos en alimentos es la técnica molecular de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), debido a su rapidez y relativa sencillez, así como su capacidad para detectar ADN del organismo o agente causal de la enfermedad.

La mayoría de las técnicas moleculares se basan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como son Electroforesis en gel desnaturizante de gradiente (DGGE), *Shotgun* sequencing, automated rRNA intergenic spacer analysis (ARISA), bibliotecas metagenómicas y en la hibridación de los ácidos nucleicos utilizando las técnicas de Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) y MicroArrays (Kennedy *et al.*, 2010, Louie *et al.*, 2000).

### **A) RNA ribosomales (rRNA)**

Los RNA ribosomales son estructuras esenciales y componentes funcionales de los ribosomas, las fábricas celulares en las cuales las proteínas son traducidas de acuerdo a la información codificada a partir del ADN. La información del ADN se transmite a los ribosomas a través de un intermediario llamado RNA mensajero (mRNA). Todos los organismos tienen rRNA bastante similares entre sí, que pueden ser reconocidos como la misma molécula, pero lo suficientemente diferentes para marcar una buena medida de la evolución y de esta manera pueden clasificarse usando estas subunidades para la nueva filogenia, derivada de las técnicas de

biología molecular que surgieron a fines de la década de los 70, que incluye a especies nunca vistas por el hombre, conocidas sólo a través de su secuencia de rRNA, su firma molecular (Wiley, *et al.*, 2004). El 16S rRNA, es la macromolécula ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacterianas.

Debido a que todas las especies bacterianas tienen un gen en común el 16S rRNA de la subunidad ribosomal es muy conservado y las variaciones en éste gen definen grupos taxonómicos en las bacterias, secuencias de éste gen han sido utilizadas para analizar la composición de comunidades microbianas en muestras ambientales, o también para determinar rápidamente a que taxón pertenece una cepa o aislamiento bacteriano (Rappé y Giovannoni, 2003).

La comparación de las secuencias de nucleótidos de los genes 16S rRNA permite establecer las relaciones filogenéticas existentes entre los organismos procariontes. Esto ha permitido un enorme avance en taxonomía moderna bacteriana, dando lugar al sistema de clasificación vigente y permitiendo la identificación rápida y precisa de las bacterias (Cole *et al.*, 2005).

El operón ribosómico, está compuesto por tres genes que en procariontes tienen un tamaño de 5S, 16S y 23S. Las moléculas de rRNA bacteriano comúnmente utilizadas en estudios de identificación y taxonomía de muestras mixtas, son el 16S y el 23S que contienen aproximadamente 1,500 y 2,900 nucleótidos, respectivamente (Madigan, 2004).

Los genes correspondientes al gen rRNA son útiles como marcadores biológicos por las siguientes razones:

- A. Son esenciales para la síntesis de proteínas, estando presente en todos los organismos
- B. Contiene regiones variables y otras altamente conservadas, tanto en su estructura primaria como secundaria.
- C. Parecen cambiar en su secuencia muy lentamente.

El gen 16S rRNA se encuentra entre las posiciones 1671 y 3229 de la cadena H del DNA mitocondrial y posee una longitud de 1559 nucleótidos aproximadamente. Los



16S rADN se encuentran altamente conservados, presentando regiones comunes a todos los organismos, pero contienen además variaciones en su secuencia que se concentran en zonas específicas (la presencia de una o más secuencias características que se denominan oligonucleótidos firma o etiquetas). Se trata de secuencias cortas específicas que aparecen en la mayoría de los miembros de un determinado grupo filogenético y no están presentes en otros grupos, incluidos los más próximos (Mandigan *et al.*, 1999). Por ello, los oligonucleótidos firma pueden utilizarse para ubicar a cada bacteria dentro de su propio grupo. De hecho, aunque existen posiciones filogenéticamente informativas a lo largo de todo el gen, la mayor variabilidad se concentra en las primeras 500 bases, correspondientes al extremo 5'. Generalmente, esta secuencia de 500 bases será suficiente para la correcta identificación de una bacteria (Pantel *et al.*, 2000).

La secuenciación del gen 16S rRNA es el método de elección para determinar relaciones taxonómicas altas (arriba del nivel de género). Debido a que la molécula 16S rRNA contiene regiones altamente variables, es posible encontrar regiones de 20 a 30 bases que son completamente exclusivas de una sola especie de bacterias (Madigan *et al.*, 2004)

La comparación de las secuencias del gen 16S rRNA, ha facilitado la identificación de bacterias, incluyendo microorganismos no cultivables, debido a que existen bases como el Ribosomal Database Project, el *GenBank* y el Laboratorio Europeo de Biología Molecular (EMBL), las cuales pueden consultarse libremente, para realizar una comparación estadística de las secuencias obtenidas de un aislamiento, contra las que ya están publicadas.

Para el estudio de poblaciones microbianas a partir de estos principios nace una nueva herramienta para la biología molecular llamada Metagenómica, la cual se caracteriza por permitir el estudio masivo del conjunto de genomas (metagenoma) de todos los microorganismos presentes en dichas muestras, incluyendo aquéllos que no son cultivables por métodos tradicionales en el laboratorio (Handelsman, 2004).

## **B) Metagenómica**

La metagenómica es una herramienta molecular que estudia el complejo genético, la cual se caracteriza por el estudio masivo del conjunto de genomas (metagenoma) de los microorganismos presentes en dichas muestras, incluyendo los no cultivables, usando la subunidad 16S rRNA como marcadores (Handelsman, 2004).

La metagenómica, también llamada genómica de comunidades o genómica ambiental, es una rama de la genómica en la que se estudian los genomas de comunidades enteras de microorganismos, la cual identifica microorganismos cultivables y no cultivables sin la necesidad de aislarlos previamente (Kennedy *et al.*, 2010). Esta técnica es una aplicación de la biología molecular, la cual permite aislar, identificar y caracterizar el material genético total proveniente de las muestras.

La metagenómica permite obtener información no sólo de la estructura de la comunidad (riqueza de especies, diversidad y distribución), sino también de la función potencial de la comunidad (Handelsman *et al.*, 1998).

La metagenómica representa un gran avance de la microbiología, y proporciona nuevos conocimientos sobre un universo de vida que antes eran inaccesibles (Handelsman *et al.*, 2004; Torsvik *et al.*, 2002). El desarrollo de herramientas moleculares ha permitido comenzar a caracterizar desde un punto de vista genómico estos microorganismos aún no cultivables por medio de las secuencias del gen 16S rRNA (Huber *et al.*, 2004).

Se denomina metagenoma al conjunto de información genética de los diferentes microorganismos presentes en una muestra. La metagenómica permite identificar los microorganismos en forma simultánea con una mayor rapidez y confiabilidad. La estrategia general consiste en: primero, extracción de ácido nucleico (DNA o RNA) de una muestra dada; segundo, amplificación de genes que codifican el gen 16S rRNA y tercero el análisis de los productos de PCR en una electroforesis sometida a un gradiente desnaturante con urea o con temperatura (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis DGGE o Temperature Gradient Gel Electrophoresis; TGGE) (Villadas *et al.*, 2002). El DGGE permite diferenciar dos cadenas dobles de ADN con el mismo tamaño pero con diferencias en secuencia si la energía necesaria para llegar a su

desnaturalización es diferente. El DGGE permite entonces definir aproximadamente la cantidad de fragmentos de ADN del mismo tamaño que tienen secuencias con diferente contenido de G-C. La utilidad de esta diferenciación radica en la situación donde hay mezclas de varios fragmentos de ADN con estas características y es muy común cuando se amplifican fragmentos de genes utilizando la técnica PCR. Así mismo, esta técnica tiene la ventaja que en un muestreo que tenga una baja cantidad de microorganismos se puede amplificar sus genes 16S rRNA, gracias a la alta sensibilidad de la PCR (Johnsen *et al.*, 1999). Esto constituye una gran ventaja, ya que se cree que con los métodos tradicionales, basados en el aislamiento y cultivo previo de los microorganismos, se “pierden” hasta un 99% de los microorganismos de una muestra.

### **C) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

La Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ha sido uno de los avances que se han suscitado en los últimos años dentro del campo de la biología molecular. La PCR es la amplificación de un segmento de ADN específico del microorganismo utilizando iniciadores específicos, nucleótidos trifosfatados y una ADN polimerasa; se basa principalmente en realizar millones de copias del segmento de ADN específico. Permite obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN, ya sea de doble cadena o de cadena sencilla en presencia de la enzima *Taq-polimerasa* (Zavala, 2005). Esta es la técnica más utilizada para la detección de microorganismos, (Louie *et al.*, 2000).

El uso de la ADN polimerasa de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*, permite el perfeccionamiento de la técnica por la resistencia de esta enzima a temperaturas de 95°C, necesarias para la separación de dos hebras de ADN, y permite manejar temperaturas de alineamiento y amplificación (Zavala, 2005).

Al someter un ADN a altas temperaturas, las cadenas se separan, por el proceso de desnaturalización y al enfriarlo se alinean por complementariedad los iniciadores, cebadores o *primers*; éstos se alinean en la región adyacente al fragmento que se desea amplificar. Al elevar la temperatura a 72° C, que es la óptima a la que funciona

la polimerasa y en presencia del cofactor catiónico  $Mg^{2+}$ , la *Taq-polimerasa* incorpora polimeriza cada uno de los desoxirribonucleótidos para formar la nueva cadena.

Así se completa un ciclo de amplificación y en lugar de tener las dos cadenas originales, se tendrían cuatro, las cuales sirven como molde para el siguiente ciclo de amplificación. Al final de este, se obtienen ocho cadenas y así después de 30 a 35 ciclos habrá  $2^n$  copias del fragmento específico de ADN (n número de ciclos) (Gorodezky, 2000).

En el primer ciclo, con estas tres temperaturas, se sintetizaran los primeros fragmentos a partir del ADN genómico. Estos primeros fragmentos no tendrán el tamaño esperado, serán un poco más grandes ya que la *Taq polimerasa* copiará hasta donde le sea posible, pero, se obtendrán en cantidades tan pequeñas que al final no podremos detectarlos. Después se repiten una vez más las tres temperaturas, pero en este segundo ciclo, los oligonucleótidos, además de unirse al ADN inicial, también se unirán a los fragmentos recién sintetizados del primer ciclo; por lo tanto, en este segundo paso la polimerasa sintetizará 2 fragmentos largos copiados directamente del ADN y 2 fragmentos del tamaño esperado, que es el tamaño que hay entre los dos oligonucleótidos que hemos usado. De esta forma con cada ciclo aumentará el número de fragmentos del tamaño esperado. Cabe mencionar que antes y después de estos ciclos se programan dos pasos, uno de  $95^{\circ}C$  durante varios minutos para iniciar con desnaturalización, y al final de los ciclos, un último paso de extensión a  $72^{\circ}C$  para permitir que la *Taq polimerasa* termine de sintetizar todos los fragmentos que pudieran haber quedado incompletos.

Las ventajas más importantes de esta prueba sobre otras son:

1. La rapidez en obtener los resultados (2-5 horas)
2. La abstinencia al uso de material radiactivo.
3. El requerimiento de menor cantidad de ADN, y como consecuencia, menor cantidad de tejido disponible.
4. La posibilidad de obtener resultados satisfactorios a partir de ADN parcialmente degradado (Newton, 1997).

**D) PCR anidada**

Es la re-amplificación de un segmento de ADN interno de un segmento de ADN previamente amplificado. La PCR anidada es una técnica que se utiliza principalmente cuando un microorganismo se encuentra en muy bajas cantidades, o bien, cuando se quiere identificar si en una muestra existen microorganismos de un determinado grupo y después determinar las especies de microorganismos presentes (Rocha, 2003). Esta técnica consiste en amplificar un segmento grande de ADN (700-2000 pb) por la técnica de PCR con un par de iniciadores y posteriormente amplificar con otro par de iniciadores un segmento interno del primer fragmento amplificado es decir esta técnicas es una PCR doble y por lo tanto se estima que es mil veces más eficiente que una PCR simple (Jan y Le Borgne, 2001).

**E) PCR-múltiple**

Uno de los problemas de la técnica de PCR discutida anteriormente es que solo permiten la identificación de un solo patógeno a la vez. Con la finalidad de solucionar este problema se ha diseñado la técnica conocida como PCR-múltiple la cual permite la detección de diferentes moléculas o microorganismo de interés en una sola reacción (Rodríguez *et al.*, 2003). En esta técnica se incorporan a la reacción un par de iniciadores por cada uno de las moléculas o microorganismos a detectar, lo cual permite un ahorro en tiempo y costo para la detección de diferentes microorganismos simultáneamente (Rocha, 2003).

## 1.10 JUSTIFICACION

La industria pesquera del pulpo es una de las de mayor importancia en la Península de Yucatán. La cantidad de pulpo que se captura en Yucatán cada año es variable, se encuentra entre las 10,000 y 18,000 toneladas. El pulpo es un producto de exportación, principalmente a Japón y a la Comunidad Europea (CE).

A pesar del gran interés comercial del pulpo en el Estado de Yucatán, con esta especie aún no se han realizado estudios relativos al deterioro y los microorganismos contaminantes causantes del mismo, durante el almacenaje del pulpo en las congeladoras antes de ser exportado o comercializado; dicho deterioro causa que el producto tenga baja aceptación al ser exportado.

El uso de la nueva técnica de metagenómica poblacional y la utilización combinada de diferentes herramientas moleculares basadas en el 16S rRNA, ha permitido un estudio en profundidad de la diversidad, estructura y dinámica de comunidades microbianas en general (Contreras-Araneda, 2005). Así mismo, la complementación de estas técnicas con los análisis bioquímicos del deterioro es de gran importancia para saber las posibles causas del mismo y la flora microbiana que los contamina durante su cadena productiva.

Considerando la elevada importancia económica y el alto nivel de explotación al que se encuentra sometido el pulpo en la Península de Yucatán, es necesario realizar estudios de un modo científico y razonado, que permitan el establecimiento de mecanismos y estrategias de manejo de esta industria, para el adecuado aprovechamiento del recurso en beneficio de la economía de la región y del país, lo cual indica que este estudio podría ser una alternativa y un gran avance para prevenir el deterioro del pulpo durante su proceso de almacenamiento en las congeladoras, por lo que se podrían proponer mejores condiciones de almacenamiento, lo cual repercutirá en una mejor calidad que conlleve a una mejor comercialización del pulpo.

**OBJETIVO GENERAL**

Identificar los principales microorganismos y compuestos volátiles involucrados en el deterioro del pulpo *Octopus maya* durante su conservación a diferentes temperaturas, utilizando técnicas moleculares y cromatográficas.

**OBJETIVOS ESPECIFICOS**

1. Aislar, purificar e identificar microorganismos de pulpo almacenado bajo diversas condiciones de temperatura y tiempo
2. Estandarizar las condiciones de purificación de ADN genómico y metagenómico de bacterias presentes en el pulpo y la amplificación del gen 16S ribosomal, mediante la reacción de PCR.
3. Secuenciar el gen 16S rRNA e identificar los principales microorganismos presentes en el pulpo *Octopus maya*.
4. Identificar los compuestos volátiles producidos en *Octopus maya* por el metabolismo microbiano durante su deterioro a temperatura ambiente y durante su almacenamiento a 2 temperaturas diferentes, - 5 y - 20 °C.
5. Evaluar la correlación entre los microorganismos que se hallaron con los compuestos volátiles encontrados.

## CAPITULO II MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Estrategia general del estudio

Para alcanzar los objetivos planteados se planteó la estrategia experimental que se presenta en (Figura 2.1).

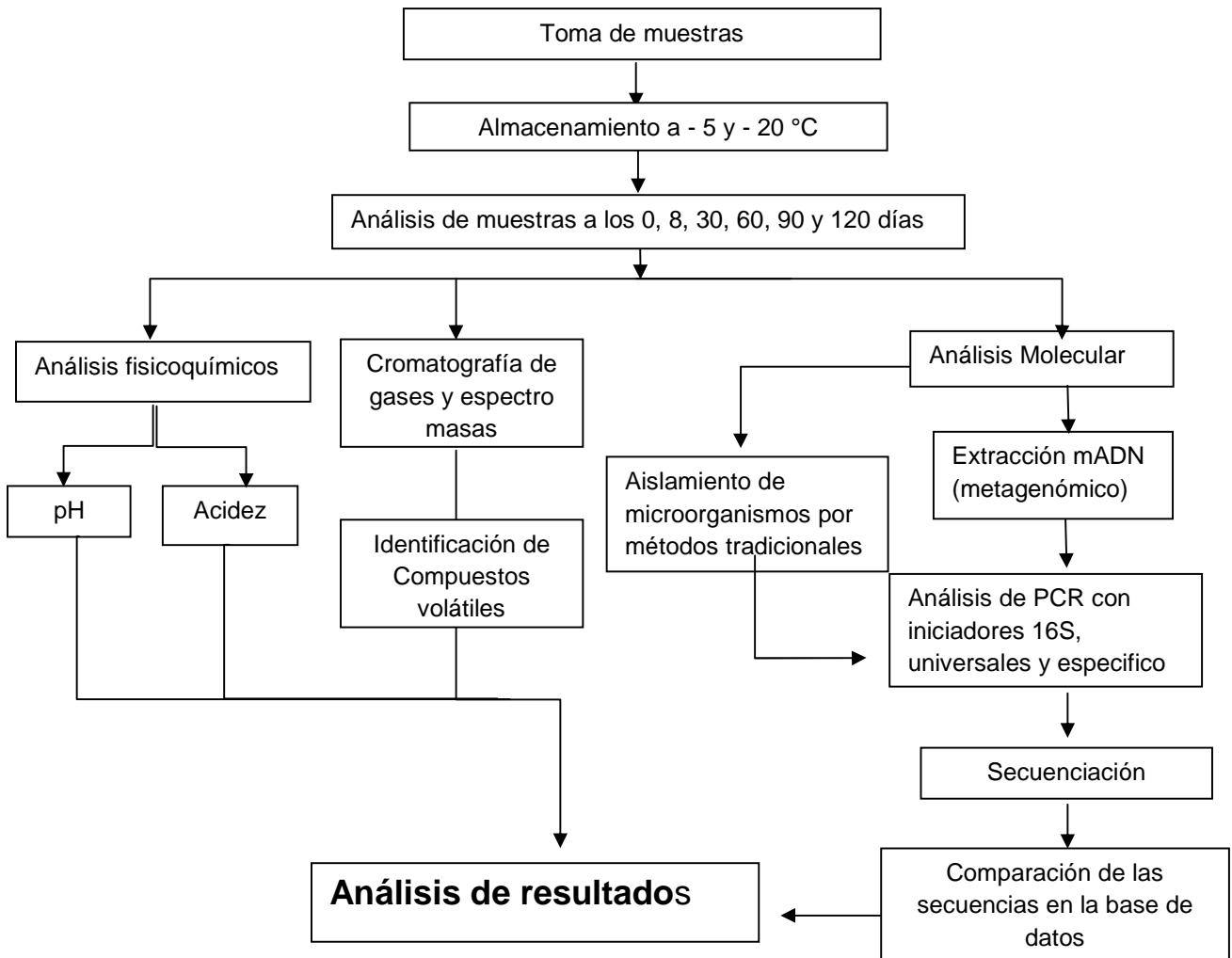


Figura 2.1 Metodología general de trabajo.



## 2.2 Materia prima

Las muestras de pulpo (*Octopus maya*) se obtuvieron de dos congeladoras localizadas en el puerto de Celestún, Yucatán: Hulkin e Impesmar. El muestreo se realizó después de la captura reciente del pulpo; la toma de la muestra se realizó al azar, fue un muestreo tipo casual, no probabilístico, en el cual las muestras se tomaron de los contenedores de la etapa de recepción, en diferentes puntos del mismo, utilizando guantes de látex (Figura 2.2) guardándolas en bolsas estériles impermeables, dentro de una nevera con hielo para su traslado al laboratorio. La toma de las muestras fue realizada de acuerdo a la NOM-109-SSA1-1994.



Figura 2.2 Muestreo en el área de recepción de la congeladora.

Las muestras fueron procesadas en el laboratorio de inocuidad alimentaria del Instituto Tecnológico de Mérida, en condiciones estériles y divididas en porciones para cada uno de los análisis correspondientes de acuerdo al diagrama de la metodología general (Figura 2.1).

## 2.3 Inducción de deterioro en pulpo (*Octopus maya*)

Para aislar microorganismos causantes del deterioro en el pulpo se realizó un experimento que consistió en colocar porciones de 10 g de pulpo en tubos roscado falcón conteniendo 15 ml de caldo lactosado estéril, los cuales se incubaron a dos temperaturas diferentes, - 5 °C y - 20 °C durante 8, 30, 60, 90 y 120 días; en cada

uno de los tiempos señalados se sacaron tres tubos, dos para el análisis físico-químico y uno para el análisis molecular y el aislamiento de los microorganismos. El día 0 se realizaron los análisis correspondientes, (pH, acidez, aislamiento de microorganismos, compuestos volátiles y purificación de mADN).

## **2.4 Aislamiento de bacterias usando medios selectivos**

### **1 Pre enriquecimiento**

Para el aislamiento de bacterias que podrían influir en el deterioro del pulpo se usaron dos medios de enriquecimiento y dos medios selectivos.

- a) Se tomó 1 ml de la muestra correspondiente al apartado 2.2 y se depositó en un tubo de ensayo conteniendo 5 ml de caldo lactosado complementado con sulfato de magnesio al 2 %, se puso en agitación a 1000 rpm, posteriormente se incubó a 37 °C durante 24 a 48 h.
- b) Un ml de la muestra correspondiente del apartado 2.2 fue inoculado en un tubo de cultivo que contenía 5 ml de agua peptonada a un pH de 8.4, se agitó a 1000 rpm por una hora y después se incubó a 37 °C por 24 a 48 h (Guía de Prácticas de Microbiología Ambiental, 2001).

### **2 Crecimiento en medios selectivos**

- a) Del cultivo del primer medio de enriquecimiento se tomó una azada y se sembró por el método de estría cruzada en placa con agar centrimida (Anexo A7). Las placas se incubaron a 42 °C por 24 h y a 15 °C por 4 a 8 días. Después de la incubación se observó y selecciono colonias en las placas presentaron crecimiento y la pigmentación de verde azulada a verde, característica alrededor del crecimiento, correspondiente a las cepas de *Pseudomonas*. Las colonias de bacterias seleccionadas se purificaron en agar centrimida.
- b) Del segundo medio de enriquecimiento se sembró por el método de estría cruzada en medio tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBC) adicionado con NaCl hasta una concentración final de 1% (Anexo A7). Se incubó a 37 °C por 24 h. se

seleccionaron las colonias cuyas características morfológicas (colonias amarillas de 2 a 4 mm) correspondían a las descritas para *Vibrio*.

### **2.5 Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa**

El aislamiento de microorganismos se realizó por medio de la norma oficial mexicana NOM-092-SSA1-1994. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. Esta Norma Oficial Mexicana establece el método para estimar la cantidad de microorganismos viables presentes en un alimento, agua potable y agua purificada, por la cuenta de colonias en un medio sólido, incubado aeróbicamente. El fundamento de la técnica consiste en contar las colonias, que se desarrollan en el medio de elección después de un cierto tiempo y temperatura de incubación, presuponiendo que cada colonia proviene de un microorganismo de la muestra bajo estudio. El método admite numerosas fuentes de variación, algunas de ellas controlables, pero sujetas a la influencia de varios factores. Esta técnica puede aplicarse para la estimación de microorganismos viables en una amplia variedad de alimentos. Por otra parte el recuento de termofílicos, psicofílicos y psicotróficos es importante para predecir la estabilidad del producto bajo diferentes condiciones de almacenamiento.

### **2.6 Conservación de microorganismos aislados y purificados**

Los microorganismos aislados y purificados fueron cultivados por 18 h en caldo lactosado a 37 °C, terminando el tiempo de incubación se tomaron 500 µl del cultivo y se mezclaron con 500 µl de glicerol estéril concentrado quedando en una concentración final de 50 % v/v y se almacenaron a - 20 °C, 3 días después se comprobó la viabilidad de las cepas almacenadas, sembrando una azada de dicha preparación en placa a fin de verificar la integridad y capacidad de crecimiento de la mismas. La conservación de los microorganismos se realizó a - 20 °C.

## 2.7 Análisis físicos y químicos

### A) Determinación de pH

La determinación del pH se realizó mediante la lectura directa con el potenciómetro marca Hanna Instruments, modelo HI99163 especial para cárnicos, equipado con un electrodo FC 232D, diseñado para su uso directo en productos cárnicos, siguiendo las instrucciones del manual del instrumento, (Manual de Instrucciones HI 99163 Medidor de pH para Carne). La muestra se tomó de un tubo falcón preparado como lo indica el apartado 2.2, tomando la lectura directa con el potenciómetro en tres puntos diferentes del tejido, reportando el promedio de las 3 en cada punto de muestreo.

### B) Acidez total de acuerdo a la Norma NMX-F-206-1986

Se realizaron los análisis de acidez total por el medio de titulación volumétrica. El método se basa en determinar el volumen de NaOH estándar necesario para neutralizar el ácido contenido en la alícuota que se titula, determinando el punto final por medio del cambio de color que se produce por la presencia del indicador ácido-base empleado. Se tomó un tubo falcón preparado como lo indica el apartado 2.2.

El contenido fue licuado durante un minuto con 100 ml de agua destilada y se filtró en papel filtro. Se tomaron 25 ml del filtrado, se agregaron 2 a 3 gotas de fenolftaleína y titularon con NaOH 0.01 N. La acidez se expresó como ácido láctico y se calculó con la siguiente ecuación:

$$A = (V \times N \times 90/M \times VT) \times 100$$

A = Acidez expresada en por ciento de ácido láctico (%).

V = Volumen en mililitros de hidróxido de sodio consumido.

N = Normalidad de la solución de hidróxido de sodio.

90 = Equivalente del ácido láctico.

M = Peso en gramos de la muestra.

VT= Volumen final de aforo.

## 2.8 Análisis compuestos volátiles

La extracción de los compuestos volátiles se realizó por micro extracción en fase solida del espacio de cabeza (HS-SPME) para lo cual se tomó como base el estudio reportado por Cuevas (2007).

### A) Manejo de las muestras

Para la evaluación de los compuestos volátiles se tomaron 10 g de tejido de pulpo *Octopus maya* se licuaron en 25 ml de agua destilada estéril y se depositaron en viales de 50 ml sellados con una septa, se almacenaron a dos temperaturas - 5 °C y - 20 °C, tomando muestras a los 0, 8, 30, 60, 90 y 120 días de almacenamiento.

### B) Metodología para la microextracción en fase sólida del espacio de cabeza (HS-SPME)

La extracción de los compuestos volátiles se realizó por HS-SPME para lo cual se tomó como base el estudio reportado por Cuevas (2007), para la cual se utilizaron las siguientes fibras: Fibra 1: apolar (PDMS) 100 µm de diámetro, Fibra 2: de polaridad intermedia (PDMS/DVB) 65 µm de diámetro. El equipo para la microextracción consiste en un baño maría y un cabezal con resistencia eléctrica con bomba de recirculación, con el cual se controla la temperatura del agua, garantizando que la temperatura del vial que contiene la muestra sea uniforme.

### C) Condiciones para la HS-SPME

Para la extracción de los compuestos volátiles se dejaron los viales a temperatura ambiente ( $21 \pm 2$  °C) por un periodo de 30 min, las condiciones para la HS-SPME fueron: tiempo y temperatura de equilibrio de los viales a 37 °C con la fibra en posición retraída y 30 min con la fibra expuesta en el espacio cabeza de los viales; terminado el tiempo de exposición, se retrae la fibra, se retira del vial y se procedió a inyectar en el cromatógrafo de gases.

## D) Cromatografía de gases

Las condiciones de detección de compuestos volátiles en pulpo por cromatografía de gases con espectrometría de masas (CG-EM) se realizaron de acuerdo a las condiciones reportadas por Cuevas, (2007). Los análisis cromatográficos se efectuaron en un cromatógrafo de gases Clarus 500 (Perkin Elmer, Shelton., CT, U.S.A) equipado con un espectrómetro de masas Clarus 500 (Perkin Elmer, Shelton., CT, U.S.A). La desorción de los volátiles retenidos en la fibra se realizó, en modo *split/splitless*, con la válvula cerrada del *split* durante 4 min. Se utilizó gas Helio como fase móvil a un flujo de 1.2 ml/min. La temperatura del Inyector se mantuvo a 250 °C. La separación se realizó en una columna AT5-MS de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.05 µm de espesor de la fase estacionaria. Las condiciones del horno del cromatógrafo fueron las siguientes: temperatura inicial 40 °C, velocidad de incremento de temperatura 3 °C /min hasta 220 °C. El tiempo total de análisis fue de 60 min. Las condiciones del espectrómetro de masas fueron las siguientes: modo de impacto electrónico, energía de la fuente 70 eV, monitoreo de masas (*scan*): 34-450 uma; temperatura de la interface: 220 °C.

## E) Análisis e identificación de compuestos volátiles presentes en muestras de pulpo por cromatografía de gases con espectrometría de masas

El análisis de los compuestos obtenidos de la fracción volátil de las muestras de pulpo fueron comparados con los respectivos Tiempos de Retención (TR) y sus espectros de masas obtenidos de la base de datos con ayuda de los *software's* AMIDIS GC/MS Analysis y NISTMS 2.0 para identificar los compuestos participantes en deterioro.

### 2.9 Métodos moleculares

#### A) Preparación de la muestra para extracción de ADN

##### 1) Preparación de cepas puras

Las cepas en conservación se activaron en un medio de caldo lactosado, presentando crecimiento entre 16 a 24 h. Después de este tiempo de incubación se

decantó en un tubo falcón y se centrifugó a 10000 rpm por 15 minutos, para sedimentar el máximo de bacterias presentes en el medio, se decantó el sobrenadante y el pellet formado se resuspendió en 15 ml de buffer TEN, pH 8.0 (0.1 M Tris-HCl, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl) ver anexo A6; y se centrifugó a 10,000 rpm. Este paso se repitió 3 veces con el pellet formado para eliminar el exceso de impurezas en la muestra. Cuando la extracción y purificación de los ácidos nucleicos se realizó, inmediatamente se le adicionó el buffer de extracción reportado en el inciso B. Las muestras en que no se realizó en forma inmediata la extracción, se resuspendió el pellet en 1.3 ml de TE, pH 8.0 (.5 M Tris-HCl, 50 mM EDTA) ver anexo A5 y se almacenaron las muestras a - 20 °C hasta la extracción y purificación de las mismas.

## **2) Preparación de comunidades microbianas (metagenoma)**

Se almacenaron 10 g de muestra de pulpo con 15 ml de caldo lactosado a - 5 y - 20 °C por periodos de: 0, 8, 30, 60, 90 y 120 días. El tubo previamente almacenado, se lleva a temperatura ambiente (21 ±2 °C) por 20-30 min y se agitó por 1 h a 1200 rpm; el sobrenadante se decantó en un tubo falcón estéril y se centrifugó a 10,000 rpm, por 15 min, para sedimentar el máximo de bacterias presentes en el medio, se eliminó el sobrenadante y el pellet formado se resuspendió en 15 ml buffer TEN, pH 8.0 (0.1 M Tris-HCl, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl); y se centrifugó a 10,000 rpm. Este paso se repitió 3 veces con el pellet formado para eliminar el exceso de impurezas en la muestra. Cuando la extracción y purificación de los ácidos nucleicos se realizó inmediatamente se adicionó el buffer de extracción reportado en el inciso B, en las muestras que no se realizó en forma inmediata se resuspendió el pellet en 1.3 ml de TE pH 8.0 (.5 M Tris-HCl, 50 mM EDTA) y se almacenaron las muestras a - 20 °C hasta la extracción y purificación de las mismas.

## **B) Extracción y purificación de ADN genómico y metagenómico**

La extracción y purificación del ADN genómico de las bacterias y metagenómico de las comunidades bacterianas se llevó a cabo siguiendo el método desarrollado por

Fonnesbech-Vogel, (1997) modificado. El tubo falcón almacenado a - 20 °C del inciso (A), de muestras de cepas puras y comunidades bacterianas. Se centrifugó a 10,000 rpm por 15 min el sobrenadante se decantó y se resuspendió el pellet con 500 µl de buffer de extracción de ácidos nucleicos que contiene, 50 mM Tris-base-50 mM EDTA pH 8.0, 20 µg de RNasa A; se agito en un vortex hasta que el pellet fue disuelto, se cambió la suspensión en un tubo Eppendorf de 2.0 ml y se le adicióno 20 µl de una solución de SDS al 10 % p/v., se incubo en un incubadora con agitación a 56 °C por 20 min o toda la noche para mejor purificación, terminado el tiempo de incubación, se adicióno 250 µl de buffer (3 M acetato de potasio-2 M ácido acético 1 mM EDTA), se centrifugo a 16,000 rpm, por 10 min, el sobrenadante se recuperó en un tubo Eppendorf nuevo de 2.0 ml, al sobrenadante se le adicióno 0.543 vol. de isopropanol, 20 µl de acetato de sodio (3 M pH 5.2) y se centrifugo a 16,000 rpm por 10 min, el sobrenadante se decantó y lavo el pellet 2 veces con etanol frio, el DNA fue secado por 5 min y se resuspendió en 20 a 50 µl de agua libre de RNasas y DNasas.

### **C) Cuantificación de ADN genómico y ADN metagenómico**

El ADN purificado fue cuantificado usando el espectrofotómetro marca Thermo Scientific Nanodrop 2000. La pureza y concentración fue determinada por la Absorbancia con luz UV a 260 nm, tomando la relación OD260/230 y OD260/280 como lo indican Holben *et al.* (1988). La concentración del ADN fue calculado con el software Thermo Scientific Nanodrop 2000 en unidades de nanogramos/µl.

### **D) Análisis bioinformático de iniciadores universales y específicos**

El análisis de los iniciadores universales y específicos (Tabla 2.1), fue realizado con el software Bioinformatic Gene Runner versión 3.5 y el software Primer and Primer. Estos programas ayudan a predecir las temperaturas de alineamiento promedio de los indicadores. Se realizó la PCR *in silico* con ayuda del software Bioinformático, *In silico* PCR amplification de la University of the Basque Country con acceso gratuito en la red <http://insilico.ehu.es/PCR/>, el cual ayuda a predecir el tamaño del



fragmento esperado con las temperaturas obtenidas; teniendo la predicción, se procede a programar el termociclador para realizar PCR.

Tabla 2.1 Iniciadores analizados y utilizados para la PCR

Iniciadores	Secuencia	Tamaño pb	Especie	Autor
Uni1F	5'-agagtttgatcmtggctcag-3'	1600	Universales	Wilson <i>et al.</i> , 1990
Uni1R	5'-tacggytacctgttacgactt-3'			
Uni2F	5'-agagtttgatymtggctc-3'	1600	Universales	Wilson <i>et al.</i> , 1990
Uni2R	5'-cakaaaggaggtgatcc-3',			
DG74	5'-aggaggtgatccaaccgaa-3'	187	Universales	Lee y Levin 2006
RW01	5'-aactggaggaaggtgggat-3'			
PLK1	5'-tacgggaggcagcag-3'	270	Universales	Lee y Levin 2006
PLK2	5'-tattaccgcgcggtgct-3'			
Vp1F	5'-gccaattcgatagggtgtaacc-3'	960	<i>Vibrio</i>	Okura <i>et al.</i> 2004
Vp1R	5'-cgaatcctgaacatacgagc-3'		<i>parahaemolyticus</i>	
Ps9-27	5'-agagtttgatcctggctcag-3'	1528	<i>Pseudomonas</i>	Johnsen <i>et al.</i> , 1999
PSMG	5'-aggaggtgwtccagc-3'			
Sp16F	5'-agagtttgatcmtggctcag-3'	1530	<i>Shewanella</i>	Zienke <i>et al.</i> , 1998
Sp16R	5'-aaggaggtgwtccagcc-3'		<i>putrefaciens</i>	
F#151	5'-gtggcggtacaatattctttt-3'	941	<i>Salmonella</i>	Lampel <i>et al.</i> , 2000
R#152	5'-tcacgaataataatcagtagcgc-3'			

### E) Concentración de la mezcla de reacción de PCR

La mezcla de reacción de la PCR para 50 µl contiene lo siguiente: 10 µl buffer reacción con una concentración final de 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de cada dNTP, 0.2 µM de cada iniciador, 1.25 unidades de DNA polimerasa (5 u/µl), 200-500 ng de ADN como templado y 36 µl de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas.

### F) Condiciones de amplificación de la PCR

Los amplificadores del gen 16S rRNA de los microorganismos se realizaron por medio de la PCR, utilizando una enzima *Hot star* DNA polimerasa. Dichas amplificaciones se realizaron con tres programas diferentes, un programa tradicional de PCR, la segunda fue usando gradientes de temperatura y el último fue por *Touchdown* acoplada a la PCR tradicional. Las condiciones de cada programa se describen a continuación.

**1) PCR tradicional**

Las condiciones de amplificación fueron un ciclo de 95 °C por 5 min, 30 ciclos con las siguientes condiciones, 95 °C por 30 s, 55.2 °C por 40 s, 72 °C por 50 s, seguido de un ciclo de extensión de 72 °C por 7 min y un ciclo de 4°C por tiempo indefinido ( $\alpha$ ).

**2) PCR gradiente de temperatura de 53 a 59 °C**

Se amplificó mediante las siguientes condiciones un ciclo de 95 °C por 5 min, 35 ciclos de gradiente de temperatura con las siguientes condiciones, 95 °C por 30 s, alineamiento a (53 °C carril H, 53.4 °C carril G, 54.1 °C carril F, 55.2°C carril E, 56.6 °C carril D, 57.2 carril C, 58.1 °C carril B y 59 °C carril A) por 40 s, 72 °C por 50 s, seguido de un ciclo de extensión de 72 °C por 10 min y un ciclo de 4°C por tiempo indefinido ( $\alpha$ ).

**3) PCR Touchdown**

El programa de PCR *Touchdown* es un programa acoplado a la PCR tradicional en donde la primera etapa se utilizó un decremento de temperatura de alineamiento de los iniciadores y en la segunda etapa la temperatura de alineamiento se mantiene constante.

Un ciclo a 95 °C por 5 min, 15 ciclos *Touchdown* (95 °C por 30 s, 62-55 °C por 30 s decreciendo 0.5 grados en cada ciclo, 72 °C por 40 s), 17 ciclos PCR tradicional (95°C por 30 s, 55 °C por 30 s, 72 °C por 40 s), 1 ciclo a 72 °C por 5 min, 1 ciclo a 4 °C por tiempo indefinido ( $\alpha$ ).

**G) Electroforesis de ADN y productos de PCR****1) Electroforesis de ADN**

Para verificar la purificación y la integridad del ADN obtenido se realizó la electroforesis en TAE 1x (Anexo A2.1), en gel de agarosa (Anexo A4), con una concentración de 1.2 %, los ácidos nucleicos fueron teñidos con 1.5  $\mu$ g de bromuro de etidio. 5  $\mu$ l de ADN purificado fueron cargados en sus celdas correspondientes y al gel de corrida se le aplicó 80 volts por 40 min. Al finalizar la electroforesis, los ácidos nucleicos fueron visualizados por transiluminación con ayuda del

fotodocumentador Gel doc EZ image de Biorad, a una longitud de onda de 260 nm de luz UV. Finalmente, se realizó la captura de la imagen con ayuda del *software* Image Lab 3.0 de Biorad.

## **2) Electroforesis de productos de PCR**

La concentración del gel, el voltaje y duración de la electroforesis para productos de PCR dependió del tamaño de los fragmentos que se pretendió analizar. Los productos de PCR se fragmentaron por electroforesis en TAE 1X (Anexo A2.1) en geles de agarosa (Anexo A4) con una concentración de 0.8-1.2 % de agarosa, los ácidos nucleicos fueron teñidos con 1.5 µg de bromuro de etidio. 8 µl de producto de PCR fueron cargados en sus celdas correspondientes y se aplicó el voltaje correspondiente según fue lo requerido (60 a 100 volts). Al finalizar la electroforesis, los ácidos nucleicos fueron visualizados por transiluminación con ayuda del fotodocumentador Gel Doc EZ Image de Biorad, a una longitud de onda de 260 nm de luz UV. Finalmente, se realizó la captura de la imagen con ayuda del *software* Image Lab 3.0 de Biorad.

## **H) Secuenciación**

Después de realizar la electroforesis, en las muestras donde se observó banda única se realizó una segunda PCR y dicho producto se purificó en forma directa con el kit de purificación *Wizard* siguiendo las condiciones del proveedor para productos de PCR. En las muestras donde se obtuvieron más de una banda, el fragmento obtenido que coincidió con el esperado para cada una de las muestras, fueron recuperados cortándolo en forma directa del gel y purificados con el kit de purificación *Wizard* siguiendo las condiciones del manual del proveedor para productos de PCR. Las muestras se cuantificaron usando el espectrofotómetro Thermo Scientific Nanodrop 2000, para conocer la concentración del producto y se enviaron a secuenciar en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología, UNAM.

**I) Identificación de microorganismos con programas bioinformaticos**

Los análisis de secuenciación de los ácidos nucleicos se realizaron con los programas bioinformaticos Bioedit utilizado para editar, corregir y ensamblar las secuencias cuando son fragmentos mayores de 1000 pares de bases los proporcionados por la unidad de síntesis y secuenciación de la UNAM; teniendo la secuencia completa, se realizó un análisis comparativo con secuencias reportadas en las bases de datos internacionales. Otros de los programas utilizados fueron *Multi Alin* y *Expasy Translate Tools*, fueron utilizados para realizar los alineamientos y traducción a proteínas de las secuencias obtenidas, estos dos últimos son programas de acceso libre en la red en: <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html> Y <http://web.expasy.org/translate/>. Los alineamientos obtenidos sirvieron para comparar en las bases de datos público NCBI/GenBank, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, Ribosomal Database Project <http://rdp.cme.msu.edu/> y el Laboratorio Europeo de Biología Molecular (EMBL) <http://www.embl-heidelberg.de>. Dichas comparaciones ayudaron a identificar a qué género y especie de microorganismos corresponde la secuencia obtenida. Conociendo el género y especie se procedió a someter a la base de datos internacional <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/> para asignación del número de acceso y publicación en la base de datos internacional de secuencias de bacterias reportadas.

## CAPITULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1 Variación del contenido de microorganismos durante el almacenamiento a bajas temperaturas en pulpo (*O. maya*)

#### A) Aislamiento y purificación de bacterias psicrófilas por la NOM-092

En la Tabla 3.1 se presentan los conteos de unidades formadoras de colonias (UFC/g), de microorganismos psicrófilos encontrados en *O. maya* en los tiempos de almacenamiento a dos temperaturas diferentes. En dicha tabla se muestra que a -5 °C después de los primeros días de almacenamiento la cantidad de microorganismos (UFC/g) disminuye, esto probablemente se deba porque la cantidad de microorganismos iniciales decrece por efecto de la temperatura de almacenamiento y requieren una fase adaptativa los que son capaces de soportar la baja temperatura a la cual fueron sometidos, ya que se incrementan en forma significativa a los 30 días hasta alcanzar  $280 \times 10^3$  UFC/g de muestra, este resultado indica que la condición de -5 °C sigue favoreciendo la viabilidad y crecimiento de las bacterias hasta este periodo, ya que posteriormente a los 60 días decrecen significativamente estos conteos hasta  $14 \times 10^3$  UFC/g, probablemente se debe a que los microorganismos al estar por periodos prolongados a bajas temperaturas disminuyen su metabolismo quedando en condiciones de latencia, para los días 90 y 120 de muestreo se observó una disminución hasta  $8 \times 10^3$  y  $18 \times 10^3$  respectivamente. Para la condición de -20 °C, se puede observar que a los 8 días de almacenamiento no fue posible cuantificar microorganismos, esto podría deberse que para este tiempo sean pocos los microorganismos presentes y la probabilidad de encontrarlos en las placas de conteo es baja, para el día 30 fue posible contar  $380 \times 10^3$  UFC/g, probablemente este conteo es porque los microorganismos capaces de soportar esta temperatura lograron reproducirse y sobrevivir en esta condición, para el día 60 el conteo disminuye significativamente a  $215 \times 10^3$  UFC/g esto estaría indicando que hasta este periodo los microorganismos aún siguen sobreviviendo y su reproducción sea lenta; para los días 90 y 120 el conteo de microorganismos disminuye hasta  $37 \times 10^3$  y  $32 \times 10^3$  UFC/g, una de las razones de esta disminución es que estos microorganismos al

estar por los largos periodos a baja temperatura entren en latencia o en la fase de lisis celular.

Tabla 3.1 recuento total de microorganismos psicrófilos (UFC/g), presentes en pulpo durante su almacenamiento a bajas temperaturas

Día	Recuento (UFC/ml)	
	-5 °C	-20 °C
<b>0</b>	5x10 <sup>3</sup>	5x10 <sup>3</sup>
<b>8</b>	4x10 <sup>3</sup>	0
<b>30</b>	280x10 <sup>3</sup>	380x10 <sup>3</sup>
<b>60</b>	14x10 <sup>3</sup>	215x10 <sup>3</sup>
<b>90</b>	8x10 <sup>3</sup>	37x10 <sup>3</sup>
<b>120</b>	18x10 <sup>3</sup>	32x10 <sup>3</sup>

El efecto de la refrigeración sobre la microflora de un determinado alimento depende de la naturaleza y del tiempo de almacenamiento, así como de las características fisiológicas de los microorganismos (Huss, 1999). Tras la descongelación, el desarrollo microbiano varía, cuando se realiza de manera descontrolada origina un incremento desmedido de la flora, pero si controla la descongelación, no se modifica la flora que sobrevivió. A medida que la temperatura desciende con respecto a la considerada como óptima, el crecimiento se hace más lento y se detiene; aumentando la fase de latencia microbiana, las temperaturas máximas o mínimas a las que crecen los microorganismos producen su muerte o lesiones (Huss, 1998).

En la tabla 3.2, se presenta los resultados de cepas aisladas y purificadas de acuerdo a la NOM- 092 en pulpo *O. maya* almacenada a - 5 °C y - 20 °C, en un periodo de 120 días de muestreo. Se observó que en - 5 °C se aislaron y purificaron 30 cepas y a - 20 °C se aislaron y purificaron 19 cepas, lo cual se puede estar indicando que esta condición sigue favoreciendo la viabilidad de las bacterias hasta este periodo, las bacterias obtenidas en estas condiciones fueron conservadas en glicerol a - 20°C. En la (Figura 3.1A), se observó las diferentes bacterias presentes en las muestras de pulpo que posteriormente fueron purificadas, en la (Figura 3.1B) se observó en la placa tres diferentes cepas purificadas.

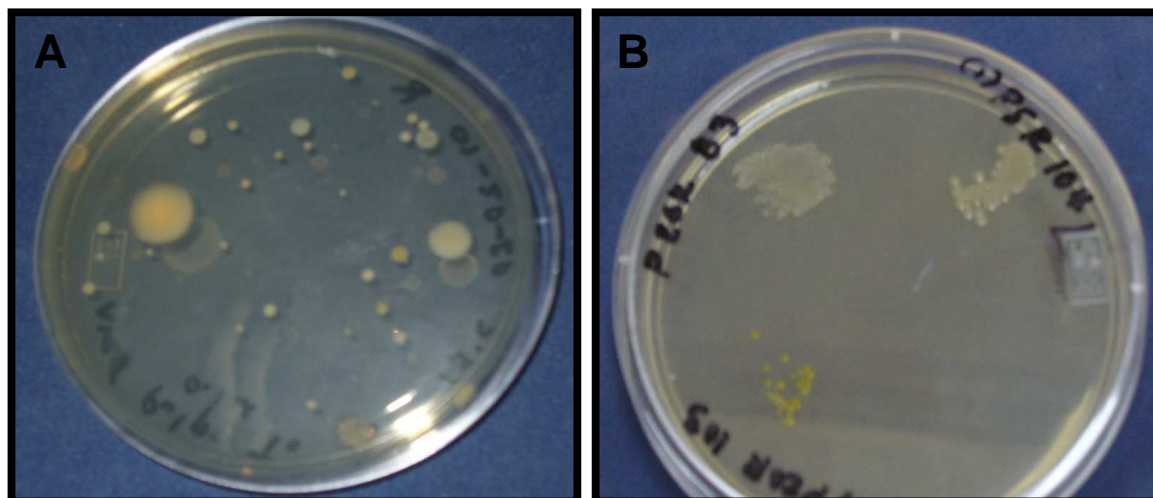


Figura 3.1 Microorganismo aislados de acuerdo a la NOM-092 a partir de pulpo *O. maya*. Bacterias psicrófilas aisladas (A); tres cepas diferentes de bacterias psicrófilas purificadas (B).

Tabla 3.2 Bacterias aisladas en inducción de deterioro de pulpo *O. maya*

Tiempo Días	# cepas	Nomenclatura			
		- 5 °C		- 20 °C	
0	2	P5R0-1	P5R0-2	0	
8	11	P5R8-1	P5R8-5	P20R8-2	P20R8-4
		P5R8-2	P5R8-6	P20R8-3	P20R8-6
		P5R8-3	P5R8-7		
		P5R8-4			
30	8	P5R30-4	P5R30-3'	P20R30-2	P20R30-3
		P5R30-4'	P5R 30-3'		
		P5R30-5	P5R30-2		
60	4	P5R60-1	P5R 60-3	P20R60-1	
		P5R60-2			
90	12	P5R90-1	P5R90-4	P20R90-1	P20R90-4
		P5R90-2	P5R90-5	P20R90-2	P20R90-5
		P5R90-3	P5R90-6	P20R90-3	P20R90-6
120	12	P5R120-1	P5R120-4	P20R20-1	P20R120-4
		P5R120-2	P5R120-5	P20R120-2	P20R120-5
		P5R120-3	P5R120-6	P20R120-3	P20R120-6

\*La nomenclatura de las cepas fue asignado en forma arbitraria: P5: psicrófilos obtenidos a -5 °C; P20: psicrófilos obtenidas a -20°C; R: inicial asignada por la persona que realizo el aislado, el número posteríos corresponde al tiempo de muestreo; número final corresponde al número de cepa aislada.

En trabajos reportados, en pescado almacenado a bajas temperaturas, se identificaron microorganismos de los géneros, *Citrobacter spp*, *Enterobacter spp.*,

*Klebsiella spp.* y *Pseudomonas spp.*, (Yagoup, 2009). Así mismo, en músculo de muestras de camarón se aislaron *Vibrio alginolyticus* (Chung-Hung, 2004).

### B) Aislamiento de bacterias *Pseudomonas* y *Vibrio*

El aislamiento y purificación de cepas de *Pseudomonas* y *Vibrio* presentes en pulpo *O. maya* almacenado a -5 °C y a -20°C, se realizó por métodos selectivos usando medios específicos para cada género en los muestreos realizados. Como se observa en el medio específico agar centrífuga para *Pseudomonas*, las cepas bacterianas aisladas y purificadas tuvieron diferente forma de crecimiento, color y textura (Figura 3.2).

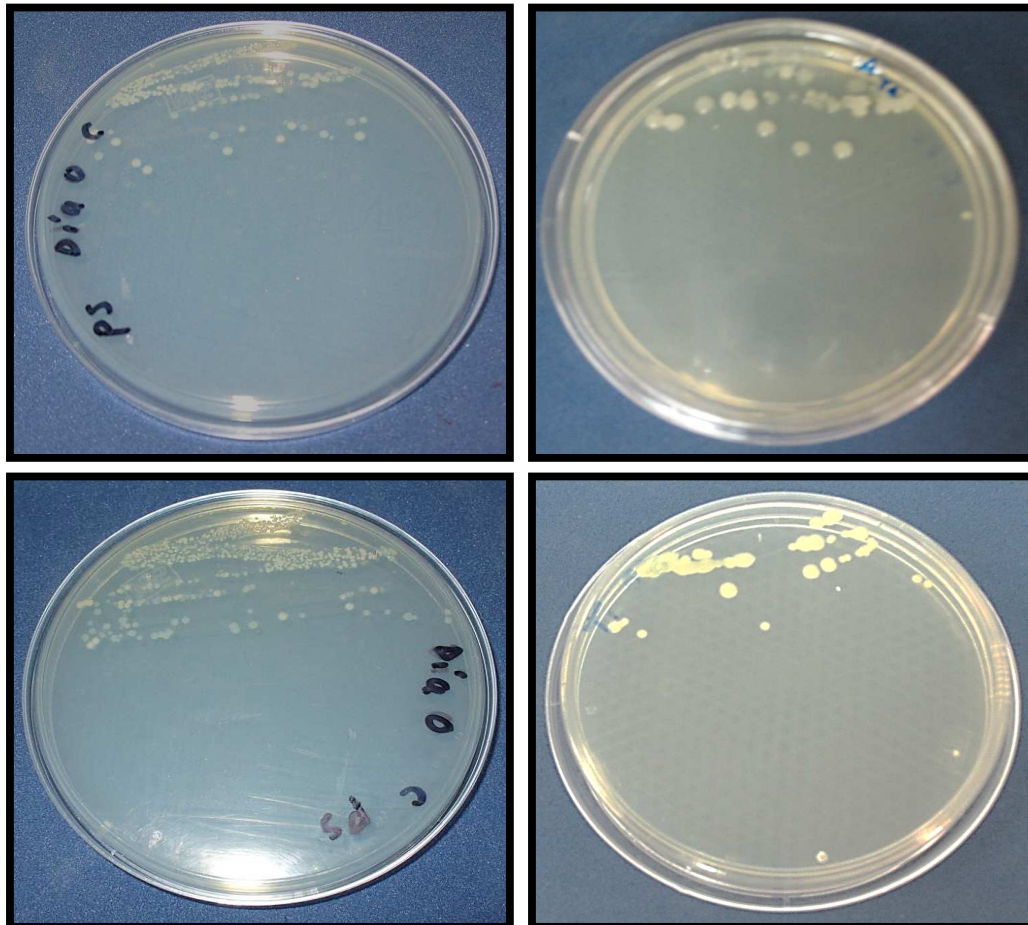


Figura 3.2 Cepas presuntamente *Pseudomonas* aisladas y purificadas de pulpo *O. maya* almacenado a -5 °C y -20 °C.



Las cepas presuntamente *Vibrio* aisladas y purificadas presentaron el color amarillo característico de crecimiento del genero *Vibrio* en el medio selectivo agar TCBS (Figura 3.3), después de la purificación se sembró por estría cruzada en medio nutritivo con 1% de NaCl (Figura 3.3 D).

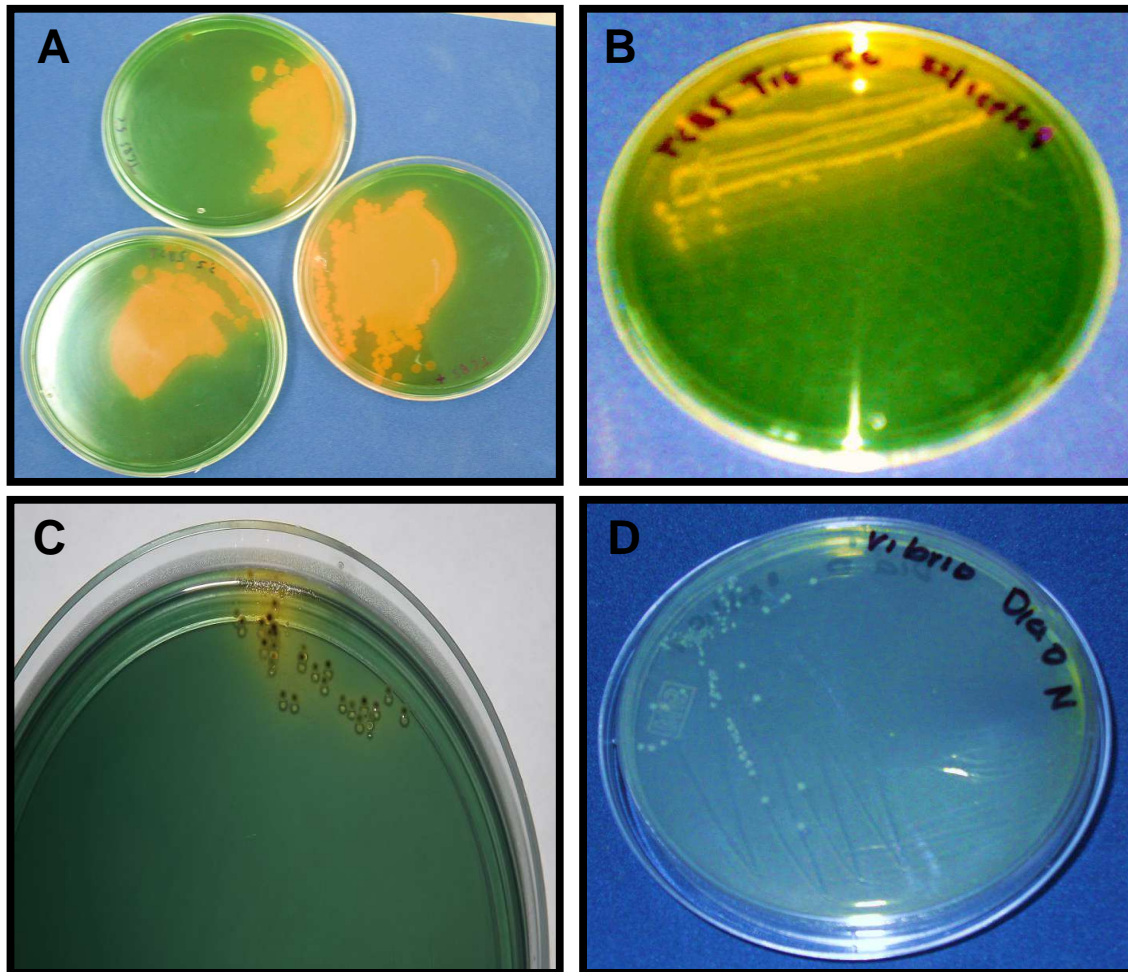


Figura 3.3 Cepas presuntamente *Vibrio* aisladas y purificadas de pulpo *O. maya* almacenado a - 5 °C y - 20 °C. Cepas aisladas y purificadas en medios selectivos TCBS (A, B, C); cepa presuntamente *Vibrio* purificada y estriada en medio nutritivo con 1% de NaCl (D).

En la Tabla 3.3, se presenta el número de distintas cepas bacterianas aisladas en pulpo *O. maya* almacenado a - 5 °C y - 20 °C; por métodos tradicionales usando medios específicos para *Pseudomonas* y *Vibrio*, durante un periodo de 120 días. El

pulpo fue colectado del puerto de Celestún en la etapa de recepción, las bacterias obtenidas en estas condiciones fueron purificadas y conservadas en glicerol a -20 °C. En el pulpo almacenado a - 5 °C se obtuvo un total de 4 cepas presuntivamente *Pseudomonas* y 6 presuntivamente *Vibrio*, 10 cepas en total de ambos géneros; a - 20 °C se obtuvieron 3 cepas presuntivamente *Pseudomonas* y 6 presuntivamente *Vibrio*, 9 cepas en total de ambos géneros. Esto indica que a las temperaturas bajas utilizadas los organismos de estos géneros mantienen, la viabilidad y crecimiento; resultados parecidos se observó en bacterias del genero *Pseudomonas* y *Vibrio* congeladas a - 20 °C por 90 días y cultivadas en medios enriquecidos después de su descongelación (Sánchez-Leal, 2005).

Tabla 3.3 Número de cepas bacterianas diferentes aisladas a diferentes tiempos de muestreo de pulpo *O. maya* a - 5 °C y - 20 °C

Día	No. cepas <i>Vibrio</i>		No. cepas <i>Pseudomonas</i>	
	-5 °C	-20 °C	-5 °C	-20°C
<b>0</b>	1	0	3	0
<b>8</b>	0	2	0	1
<b>30</b>	2	1	1	0
<b>60</b>	1	1	0	1
<b>90</b>	1	1	0	1
<b>120</b>	1	1	0	0

En otros trabajos reportados, se indica que la viabilidad y estabilidad metabólica de cepas de *Pseudomonas* y *Vibrio* que han sido sometidos a un proceso de congelación y descongelación depende de los procesos de adaptación al estrés por bajas temperaturas al producir sustancias que eviten la formación de cristales de hielo intracelular que son los causantes de lisis celular y se ha observado que han mantenido su viabilidad, actividad metabólica y crecimiento al ser cultivados en medios enriquecidos (Acker, 2003). Así mismo, se ha propuesto que las bacterias son capaces de producir biomoléculas que incluyen proteínas anti congelantes y que conservan una alta actividad metabólica para soportar los cambios metabólicas generados por la congelación y activar mecanismos de reparación, relacionados con el mantenimiento e integridad celular, con capacidad de ser cultivables cuando se

descongelan de la manera adecuada sin cambios bruscos de temperatura (Sánchez-Leal, 2005).

Cepas de *Vibrio alginolyticus* fueron aisladas usando el agar específico para *Vibrio* TCBS, en dicho medio también se aisló bacterias no correspondiente al género *Vibrio* (Gamboa-Muñoz, 2011), resultados similares fueron reportados por (Arévalo et al., 2003), el cual indica que el medio TCBS resulto no ser altamente selectivo; ya que en él se aisló bacterias de los géneros *Aeromonas*, *Plesiomonas* y *Enterobacteriaceae*.

Así mismo, se ha reportado que las diferentes especies de *Vibrio* y otros géneros aisladas de muestras clínicas presentan características bioquímicas similares a los géneros de las familias *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* y otros géneros relacionados (Rojas y Gonzalés, 2006).

En musculo de muestras de camarón se reportó el aislamiento e identificación de 6 cepas de *Vibrio alginolyticus* (Chung-Hung, 2004). En investigaciones realizadas en agua de mar usada para acuicultura en 5 de 20 muestras, se detectó *Vibrio alginolyticus* (Hörmansdorfer et al., 2000). En estudios realizados en trucha, se reportó la presencia de *Pseudomonas putida* causando ulceraciones en el pescado; sin embargo, a pesar de ser una bacteria patógena para el pescado es de gran interés industrial, ya que puede degradar compuestos aromáticos y xenobióticos presentes en aguas residuales, por lo cual pueden ser de interés biotecnológico dichos microorganismo (Altinok, 2006).

Los resultados obtenidos demuestran que la conservación de pulpo a - 20 °C, no es suficiente para inhibir el crecimiento de este tipo de bacterias; la presencia de *Vibrio* y *Pseudomonas* en pescados y mariscos representa un peligro potencial para la salud del consumidor por su patogenicidad. Se observó que en las condiciones y tiempos de evaluación, las muestras no presentaron mal olor, cambio de color, que son eventos característicos del deterioro; sin embargo, fue posible aislar y purificar 49 cepas psicrófilas, 12 presuntivamente *Vibrio* y 7 presuntivamente *Pseudomonas*; así mismo, se observó que a - 5 °C se logró aislar y purificar el mayor número de microorganismos. Esto indica que no sería una temperatura favorable para almacenar por tiempos largos y a - 20 °C sería más adecuado.

### C) Comportamiento de los valores de acidez total y Variación de pH del pulpo conservado a - 5 °C y - 20 °C en inducción deterioro de muestras de pulpo

El deterioro de alimentos marinos debido al crecimiento de microorganismos, involucra diferentes mecanismos relacionados entre sí como: producción de ácido láctico, cambios de pH, alteraciones de proteínas y producción de sustancias de degradación y bases volátiles totales (Delgado- Bottini *et al.*, 2000).

El contenido de acidez en muestras de pulpo almacenadas a -5 °C, se observó que a los 8 días, la acidez total expresada como porcentaje de ácido láctico se incrementó (Tabla 3.4), de 0.352 a 0.443 %, que posteriormente disminuyó en el día 60 hasta un valor de 0.274 % (Figura 3.4A); cabe mencionar que en la evaluación de deterioro son de considerar tanto el pH como la acidez total un rango entre 0.1 a 0.4 unidades para considerarlo significativo, tomando como referencia el valor inicial de la acidez total en el día 0. La acidez a - 20 °C presentó una disminución a partir del día 8 hasta 0.263 % de ácido láctico (Figura 3.4A); sin embargo, para el día 30 existe un ligero incremento en relación a los días anteriores, obteniéndose un valor máximo de 0.463 % a - 20 °C (Tabla 3.4), y a partir del día 60 presentó una tendencia como la que presentaron las muestras de -5 °C, con variaciones mínimas en los valores obtenidos.

Tabla 3.4 Valores de acidez total y pH a diferentes tiempos de muestreo de pulpo *O. maya* a - 5 °C y - 20 °C

Días	% Ac. Láctico		% Ac. Acético		pH	
	- 5 °C	- 20 °C	- 5 °C	- 20 °C	- 5 °C	- 20 °C
<b>0</b>	0.352	0.353	0.235	0.235	5.70	5.70
<b>8</b>	0.443	0.263	0.296	0.175	5.43	5.38
<b>30</b>	0.465	0.463	0.310	0.309	5.41	5.51
<b>60</b>	0.274	0.264	0.183	0.176	5.38	5.50
<b>90</b>	0.268	0.249	0.179	0.166	5.45	5.50
<b>120</b>	0.295	0.249	0.197	0.166	5.41	5.53

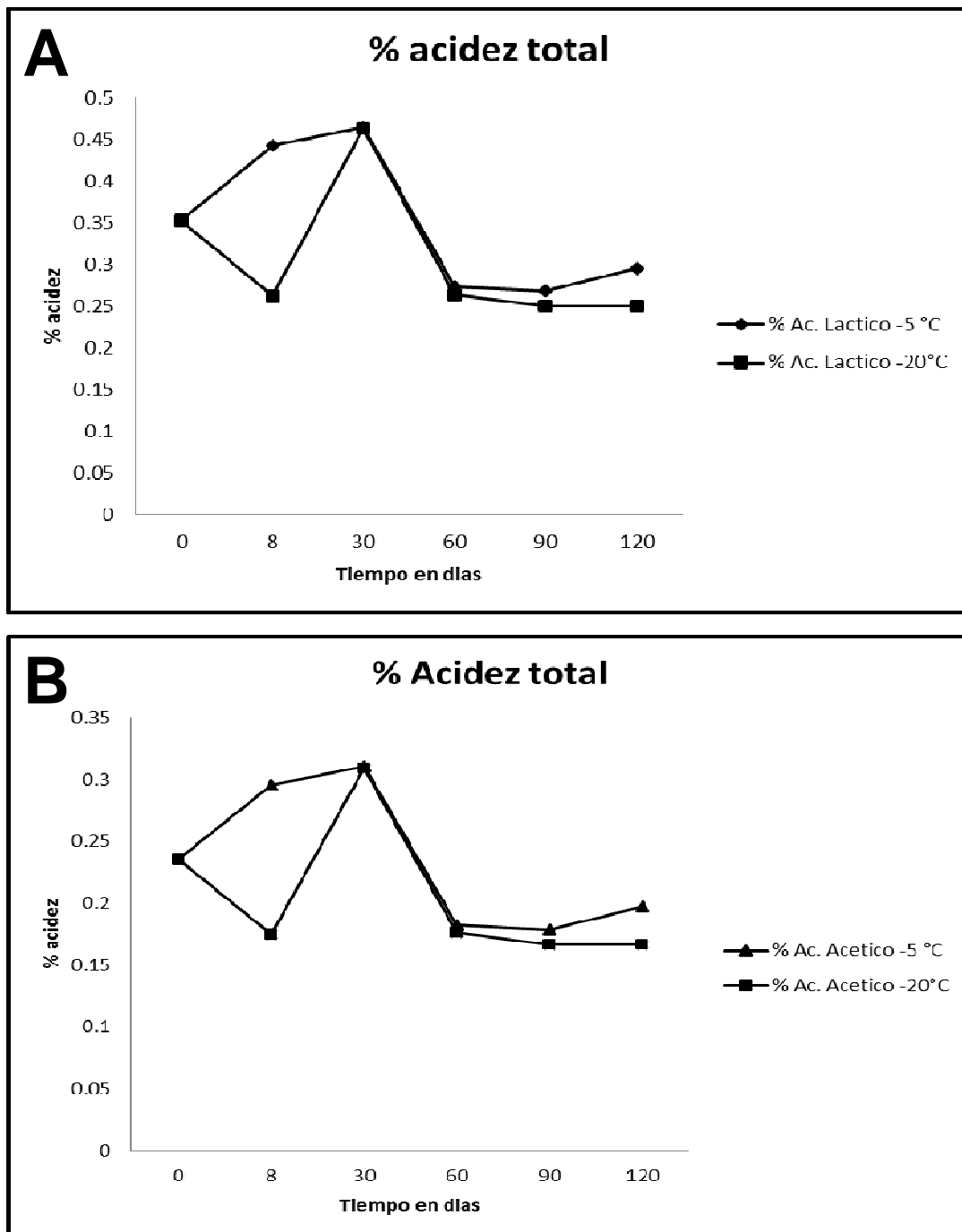


Figura 3.4 Valores de acidez total expresados como % ácido láctico (A) y % ácido acético (B) en deterioro de pulpo a - 5 °C y - 20 °C.

En acidez representada como % ácido acético (Figura 3.4B) se observó que a los 8 días a - 5 °C, existió un incremento en la acidez total, que va de 0.235 a 0.296 % que posteriormente disminuyó en el día 60 hasta un valor de 0.183 % (Tabla 3.4). La acidez a - 20 °C presentó una disminución a partir del día 8 hasta 0.175 % de ácido acético; sin embargo, para el día 30 existe un ligero incremento en relación a los días anteriores, obteniéndose un valor máximo de 0.309 % a - 20 °C (Tabla 3.4) y a partir del día 60 se observó una tendencia parecida las muestras de - 5 °C presentando variaciones mínimas en los valores obtenidos.

En la Tabla 3.4 se observó que en el día 8 existió un decremento en el valor de pH inicial de 5.7 a 5.43 para las muestras de - 5 °C y 5.38 para las muestras de - 20 °C de temperatura; sin embargo, a - 20 °C se incrementó el valor de pH de 5.51 a los 60 días, manteniendo variaciones mínimas hasta el día 120. Por otra parte para las muestras almacenadas a - 5 °C continuó descendiendo el pH en el día 60 hasta 5.38, incrementando este valor a 5.45 para el día 90, para posteriormente descender ligeramente para el día 120 (Figura 3.5).

En ambas condiciones de almacenamiento no se observó cambios en el olor y la textura del tejido analizado, probablemente lo cual indica que el número de microorganismos presentes a un no producen un efecto deteriorativos drástico que se pueda reflejar hasta el día que terminó el análisis.

Las variaciones de los valores de pH en el presente estudio se le pueden atribuir a los compuestos secretados y producidos por la diversidad de microorganismos presentes en las muestras que continúan su crecimiento en estas condiciones de almacenamiento utilizadas.

Los compuestos como la TMA es formada en mariscos como resultado de la descomposición por reducción bacteriana del óxido de trimetilamina (OTMA). La reacción involucra la oxidación simultánea del ácido láctico o ácido acético y dióxido de carbono y esta reacción depende del pH; vivos o muertos, los mariscos son alcalinos, pero después de la muerte hay una rápida caída de pH cuando el glucógeno se degrada produciendo ácido láctico. El OTMA es reducido por las bacterias a TMA; por lo tanto, el pH cae lentamente.

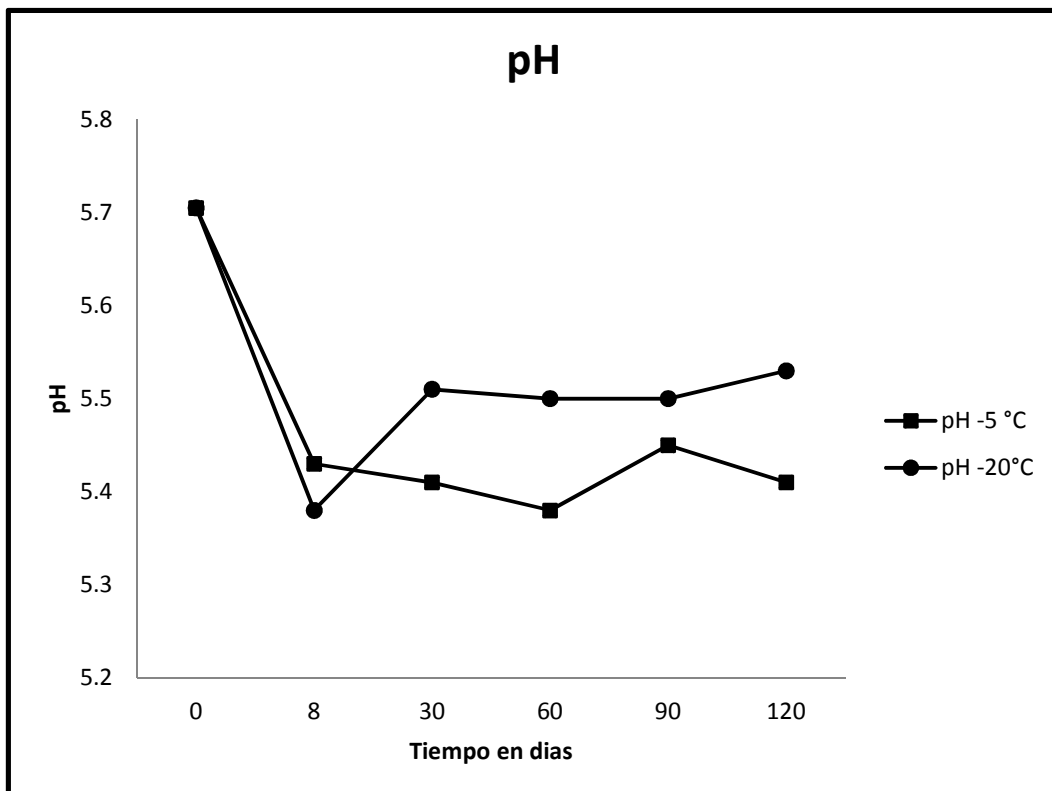


Figura 3.5 Valores de pH a - 5 °C y - 20 °C durante el tiempo de deterioro de pulpo.

Eventualmente, el ácido láctico desaparece y se genera mayor material alcalino, incluyendo amonio y el pH, alcanzando un valor de 8 o más en los mariscos en estado de putrefacción (Veciana-Nogués *et al.*, 1997). Es de importancia mencionar que los cambios y variaciones de las concentraciones de estos compuestos muchas veces no es reflejo del mayor o menor número de microorganismos presentes, más bien es el reflejo del género y especie de microorganismos presentes (Huss, 1999). En general, las bacterias crecen con mayor rapidez a pH comprendido entre 6,0 y 8,0, aunque hay bacterias capaces de crecer a pH bajos como consecuencia de su metabolismo productor de energía, como ejemplo tenemos los *Lactobacilos* cuyo crecimiento óptimo generalmente tiene lugar a un pH comprendido entre 5,0 y 6,0. Si a un alimento se le cambia el pH, ya sea por encima o por debajo del neutro, los microorganismos crecerán lentamente.

Los valores de pH inicial obtenidos en el presente estudio están dentro del rango de 6.0 a 6.6 comúnmente hallado en pescado y mariscos, el pH del músculo se incrementa por la formación de bases volátiles tales como amoníaco y TMA (Huss, 1999). En estudio de bagre almacenado en congelación por un periodo de 24 días, se observó poca fluctuación en los valores de pH comprendidos entre 6.5 y 6.6 (Reyes y Arocha, 2000).

La acidez total tuvo su punto más alto el día 30, que coincidió con el mayor número de microorganismos en ese mismo día, la variación del valor de pH no fue drástica; sin embargo, pudo deberse a la presencia de ácido acético detectado en los diferentes tiempos de muestreo en el presente trabajo, con los análisis cromatográficos realizados donde se corrobora la identificación de dicho compuesto. A pesar de que existió cambio en los valores de acidez total y pH, en el presente estudio no se observó deterioro en las muestras de pulpo analizadas. Así mismo, en dichas muestras no se observaron cambios característicos de deterioro como son el olor y textura en el tejido hasta los días analizados lo cual podría estar indicando que, aunque exista la presencia de microorganismos viables en el pulpo almacenado y que se presente cambios de pH y acidez, las muestras aún se conservan sin deterioro, podrían ser temperaturas a considerar durante tiempos cortos de almacenaje del pulpo.

### **3.2 Identificación de compuestos volátiles involucrados en el deterioro acelerado a temperatura ambiente (21 °C) del pulpo *O. maya* por CG-EM**

En este estudio se evaluaron e identificaron compuestos volátiles totales en muestras de *O. maya* durante la etapa de deterioro inducido después de haber estado en conservación por congelamiento. Los compuestos volátiles totales son determinantes para conocer la buena calidad de los productos marinos, estos compuestos pueden evidenciar el grado de deterioro de las muestras evaluadas (Huss, 1999). Las muestras se analizaron desde el primer día de captura hasta 21 días después del tratamiento de congelamiento. La técnica de extracción y análisis que se utilizó para la identificación de compuestos volátiles fueron la microextracción en fase sólida de espacio de cabeza (HS-SPME) y la cromatografía de gases-espectrometría de



masas (GC-MS). Los volátiles de las muestras de pulpo se evaluaron utilizando fibras de microextracción PDMS y DVB. En este estudio, los análisis del día cero no presentaron indicios de compuestos involucrados en el deterioro (Figura 3.6 A, B).

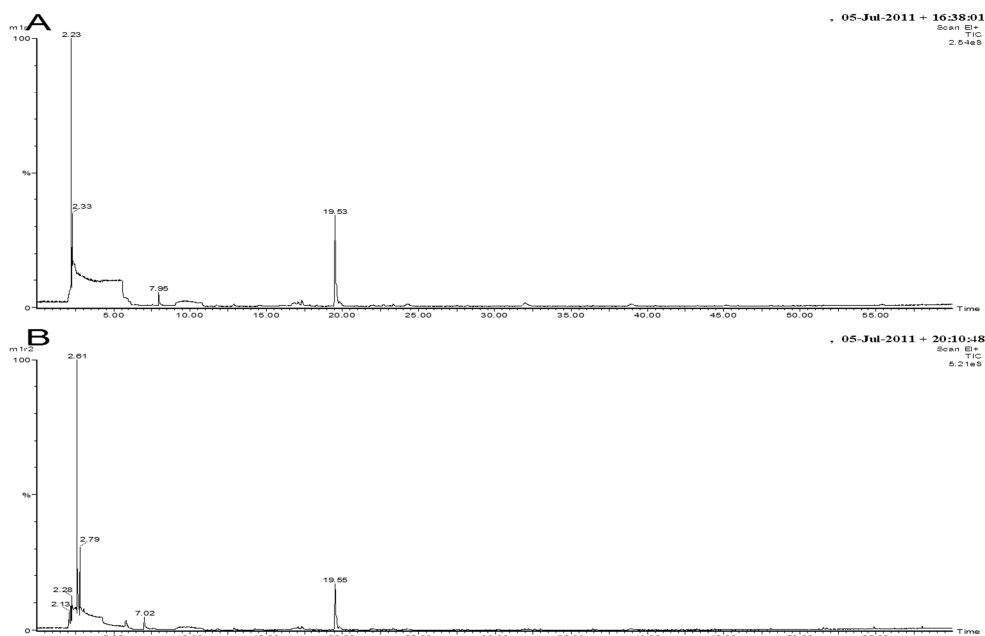


Figura 3.6 Cromatogramas de los compuestos volátiles obtenidas, por proceso de micro extracción en fase solida del espacio de cabeza en muestras de pulpo fresco primer día de muestreo antes de congelar.

Los compuestos encontrados e identificados en pulpo que son trazadores del deterioro se detectaron a partir del día 8, 16 y 21 días (Figura 3.7 A, B y Figura 3.8) y fueron dimetilamina, isopropilamina y TMA. La presencia de estos compuestos se ha reportado anteriormente en la fracción amina de los mariscos, resultando de la descarboxilación de los aminoácidos por la acción bacteriana (Conell *et al.*, 1995). Así mismo, en otros estudios realizados en organismos marinos frescos; se reportó TMA en cantidades bajas (Manríquez *et al.*, 2006) el cual se acumula durante su almacenamiento y deterioro como consecuencia de la degradación bacteriana del óxido de trimetilamina (OTMA) (Huss, 1997).

Por otro lado; los análisis realizados en los tiempos 1, 4, 8 y 16 h de incubación, a temperatura ambiente, no revelaron compuestos indicadores de deterioro (cromatogramas no mostrados). Hasta 24 h de incubación, se detectaron los compuestos involucrados en el deterioro del pulpo así como los ácidos grasos

butíricos, propiónico y pentanoico, los cuales son compuestos del producto de la actividad bacteriana en los alimentos cárnicos y son los causantes del olor característico a rancio (Huss, 1997). En la Tabla 3.5, se presenta la relación de los compuestos identificados en las muestras de pulpo en proceso de deterioro.

Tabla 3.5 Tiempo de retención de compuestos volátiles identificados en pulpo con deterioro inducido

T(min) *	# de muestras	Nombre	Día a**	Fibra	IR***
3.101	23	Dimetilamina	16	PDMS/DVB	426
4.917	24	Isopropilamina	21	PDMS	498
6.152	22	Trimetilamina	16	PDMS	503
7.949	22	Á. acético	8	PDMS, PDMS/DVB	663
10.292	22	Á. propiónico	8	PDMS	718
12.27	22	Á. isobutírico	16	PDMS	793
13.248	22	Á. butanoico	16	PDMS	829
20.257	23	Á. pentanoico	16	PDMS/DVB	841
20.262	23	Á. 4-metil pentanoico	16	PDMS/DVB	949
20.282	23	A. 2-metil pentanoico	16	PDMS/DVB	949
20.33	22	Á. isobutilacético	16	PDMS/DVB	949

T (min)\*= tiempo de retención en minutos; Día a\*\*= día de almacenamiento en el que se identificó el compuesto volátil. IR\*\*\*= Índice de Kovats

En las (Figuras 3.7 A y 3.7 B), se observa un número de compuestos volátiles en muestras de pulpo en proceso de deterioro, del total hallado, fue posible identificar 11 compuestos involucrados en el deterioro, entre los que se destacan algunas aminas biogénicas trazadoras del deterioro, así como ácido acético y ácidos grasos volátiles. En muestras de pescado almacenadas a - 20 °C, en estudios similares por HS-SPME, se reportó la presencia de TMA, ácido butanoico y ácido pentanoico (Phan *et al.*, 2008), los cuales coinciden con algunos de los compuestos identificados en este estudio.

En las muestras almacenadas durante 16 días a - 20 °C y después de incubarlas 24 h a temperatura ambiente (21 °C), se pudo identificar con la fibra PDMS, 6

compuestos trazadores del deterioro del pulpo: TMA, ácido acético, ácido propiónico, ácido isobutírico, ácido butanoico y ácido isobutilacético (Figura 3.4A).

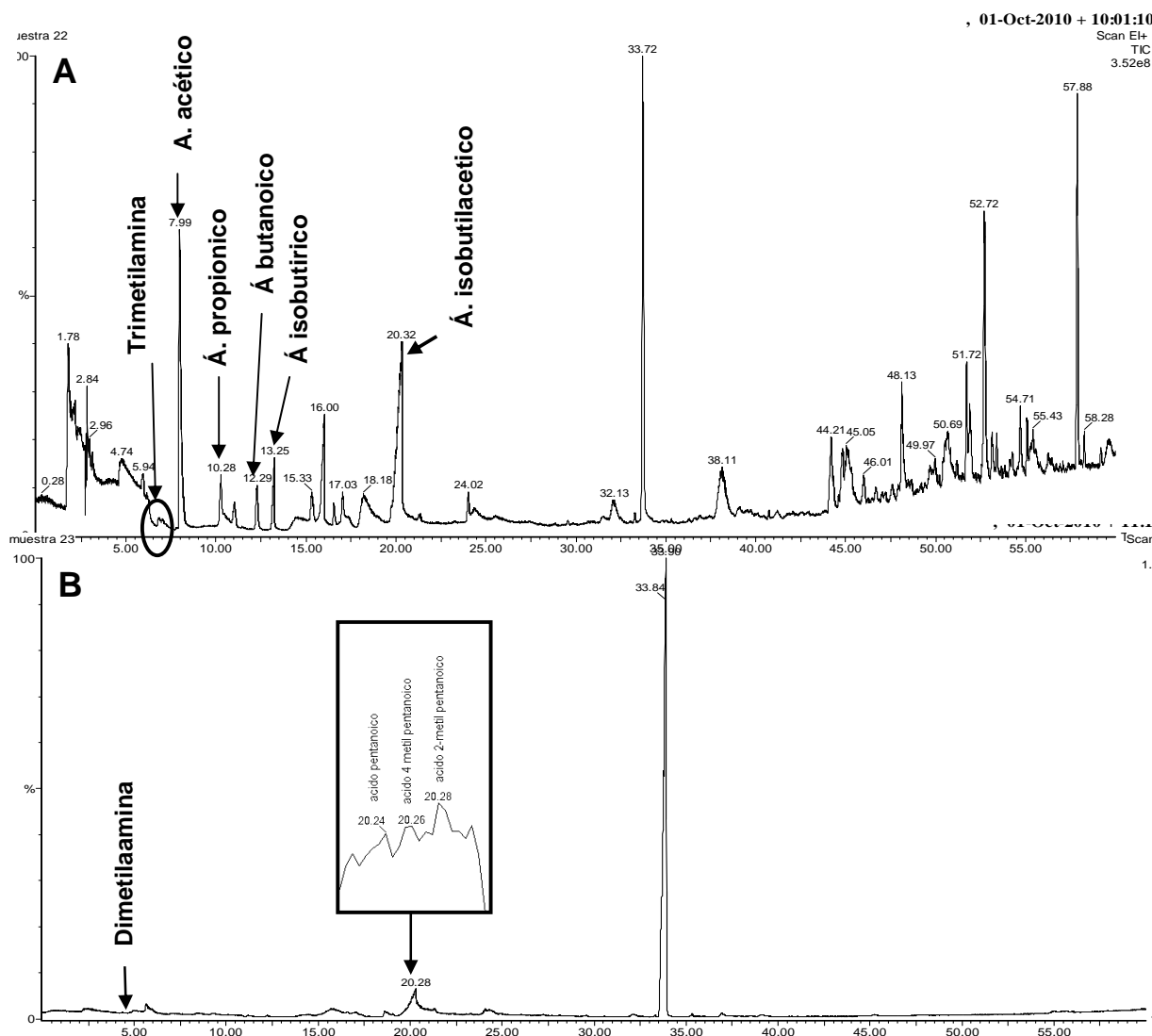


Figura 3.7 Perfiles cromatográficos de muestras de pulpo en deterioro. A), Compuestos identificados a los 16 días con la fibra apolar PDMS, B), compuestos identificados a los 16 días con la fibra intermedia PDMS/DVB.

Estudios del deterioro de *Octopus vulgaris* han demostrado la presencia de TMA y otros compuestos volátiles (Cabello *et al.*, 2004). Sin embargo, las concentraciones

reportadas son inferiores a las establecidas por otros autores (Connell *et al.*, 1995) los cuales podrían indicar el grado de frescura de los moluscos evaluados. La TMA se ha identificado en muestras de pescado almacenadas a - 20 °C por HS-SPME/CG-EM (Iglesias y Medina 2008).

Por otra parte, también existen reportes de la presencia de TMA en sardinas y pescados (Nishikawa *et al.*, 2012); mas no en moluscos, siendo esta investigación de las primeras en reportar dichos compuestos en mariscos como pulpo, lo cual indica que es un compuesto que contamina los alimentos marinos y que también es neurotóxica cuando lo consume el ser humano. Existen reportes, que bacterias de los géneros de *Pseudomonas*, *Acinobacter* y *Moraxella* producen ácido acético y ácido butírico en alimentos con pH menores a 6.0 (Huss, 1999), en este estudio fue posible identificar ambos compuestos, esto podría estar indicando la posible presencia de alguno de estos géneros en las muestras de pulpo deterioradas.

Por otro lado, en esta misma etapa se identificaron con la fibra PDMS/DVB, 4 compuestos trazadores del deterioro los cuales fueron dimetilamina, ácido pentanoico, ácido 4-metilpentanoico y ácido 2-metilpentanoico (Figura 3.4B).

A los 21 días de almacenamiento en congelación, se identificó con la fibra PDMS/DVB, la amina biogénica isopropilamina el cual es otro de los compuestos importantes para predecir el deterioro de los alimentos (Figura 3.8).

Como se mencionó anteriormente, durante las primeras horas después de incubación a temperatura ambiente, los análisis de las muestras no demostraron indicios de compuestos atribuibles al deterioro. Una de las razones podría deberse a que los microorganismos presentes tienen baja viabilidad o se encuentran en proceso adaptativo en esas etapas del deterioro, por lo cual no están activos metabólicamente (Huss, 1998).

Asimismo, podría deberse a que los microorganismos requieren un mayor tiempo de activación al estar en estado latente durante el tiempo de almacenamiento a bajas temperaturas (Huss, 1999) o tal vez a que existe una baja densidad microbiana por lo cual la actividad de descarboxilación de los aminoácidos para la producción de las aminas biogénicas volátiles no se ve reflejada.

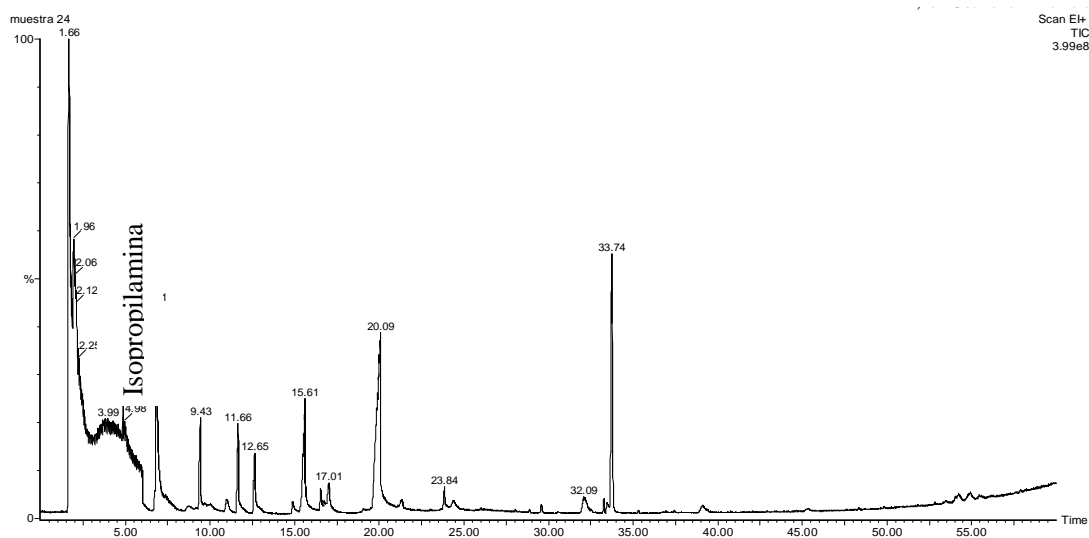


Figura 3.8 Perfiles cromatográficos de muestras de pulpo en deterioro. Compuestos identificados con la fibra PDMS 100  $\mu\text{m}$  apolar a los 21 días de almacenamiento y 24 horas a temperatura ambiente identificando isopropilamina.

Para el estudio de la composición de la fracción volátil del pulpo mediante microextracción se requirió cantidades pequeñas de muestra, mínima manipulación y corto tiempo de análisis, lo cual puede ser de gran utilidad como herramienta de diagnóstico para las empresas de alimentos cárnicos ya que en poco tiempo se pudo conocer la calidad del alimento (5 h) a diferencia de otros métodos que requieren mayor tiempo (hasta 24 h) y a una mayor manipulación de la muestra. Este método permite diagnosticar en forma rápida la calidad de los alimentos, lo cual es de gran utilidad para las empresas ya que los resultados rápidos permiten conocer la calidad del alimento antes de ser aceptado para su comercialización.

Se estandarizó un método analítico para la extracción y determinación de los compuestos volátiles asociados al deterioro del pulpo a través del uso de las fibras PDMS y PDMS/DVB para SPME. El uso de ambas fibras permitió extraer e identificar un mayor número de compuestos en función de su polaridad y afinidad a las fibras. Así, ciertos compuestos asociados al deterioro de los mariscos fueron detectados

solamente con la fibra PDMS y otros con la fibra PDMS/DVB. Se identificaron 11 compuestos involucrados en el deterioro del pulpo, de los cuales, los más importantes fueron las aminas biogénicas dimetilamina, isopropilamina y TMA. Así mismo, se detectó la presencia de ácido acético el cual es un indicador en las etapas tempranas del deterioro, otros compuestos identificados fueron ácidos grasos que son parte de los compuestos volátiles totales presente en las muestras de pulpo analizadas.

Este método de análisis de los compuestos volátiles puede ser aplicado con éxito para indicar el grado de deterioro en pulpo y otros alimentos de origen marino, a través de la detección de compuestos marcadores de deterioro tales como las aminas biogénica.

### **3.3 Evaluación de la fracción volátil de pulpo durante su almacenamiento a - 5 °C y - 20 °C**

En la tabla 3.6 se presentan los resultados del número de compuestos volátiles totales obtenidos del análisis de CG-EM, a fin de saber que cuales están presentes en las muestras de pulpo antes del deterioro, se realizó el análisis al día cero, esto permitió saber el tipo de compuestos que están presentándose durante el deterioro y sirvió como referencia para determinar los que están apareciendo cuando está deteriorando las muestras. En el día cero entre los compuestos volátiles que se encontraron ninguno corresponde a los reportados como marcadores de deterioro, se observaron 23 elementos en la fracción volátil con la fibra PDMS y 30 con la fibra PDMS/DVB, siendo con esta segunda fibra la que mayor número de compuestos se observaron en el cromatograma en este punto de análisis. (Datos no presentados).

En el análisis cromatográfico realizado a las muestras con 8 días de almacenamiento a - 5 °C, se detectaron 40 compuestos volátiles, en tanto que las muestras almacenadas a - 20 °C fueron 25 compuestos volátiles los encontrados usando la fibra PDMS (Tabla 3.6). En el análisis con la fibra PDMS/DVB se observaron en los cromatogramas el mismo número de compuestos volátiles en ambas temperaturas de almacenamiento usadas, los cuales ninguno de ellos han sido reportados como marcadores de deterioro en alimentos.

Tabla 3.6 Número de Compuestos volátiles totales identificados en muestras de pulpo durante su almacenamiento a temperaturas de congelación

Día de muestreo	Temperatura - 5 °C		Temperatura - 20 °C	
	PDMS	PDMS/DVB	PDMS	PDMS/DVB
<b>0 (antes de congelar)</b>	23	30		
<b>8</b>	40	30	25	30
<b>30</b>	68	43	45	37
<b>60</b>	65	58	33	54
<b>90</b>	74	68	37	72
<b>120</b>	83	93	43	85
<b>2 años</b>	---	----	41	64

En el análisis cromatográfico realizado a las muestras con 30 días de almacenamiento a - 5 °C, se observó la presencia de 68 compuestos volátiles, en tanto que las muestras almacenadas a - 20 °C se observaron en el cromatograma 45 usando la fibra PDMS (Tabla 3.6). Para el análisis con la PDMS/DVB se observó la presencia de 43 compuestos volátiles a - 5 °C y 37 a - 20 °C (Tabla 3.6), los compuestos volátiles presentes en este punto de muestreo con ambas fibras en las dos temperaturas de almacenamiento no son los reportados como marcadores de deterioro en alimentos. Es importante notar que a la temperatura de - 5 °C se observó en el cromatograma un mayor número volátiles presentes con ambas fibras, lo cual podría estar indicando que a esta temperatura la formación de los volátiles se favorece.

En el análisis cromatográfico realizado a las muestras con 60 días de almacenamiento a - 5 °C, se observó la presencia de 65 compuestos en la fracción volátil, en tanto que en las muestras almacenadas a - 20 °C se observaron 33 usando la fibra PDMS (Tabla 3.6). Para el análisis con la fibra PDMS/DVB se observaron 58 compuestos volátiles a - 5 °C y 54 a - 20 °C (Tabla 3.6). Los compuestos volátiles presentes en los cromatogramas en este punto de muestreo en las condiciones analizadas a las dos temperaturas de almacenamiento no corresponden a compuestos reportados como marcadores de deterioro en alimentos. Es importante notar que a - 5 °C se observaron mayor número de compuestos

volátiles con ambas fibras y a - 20 °C con la fibra PDMS se observó en los cromatogramas un menor número de compuestos. Es de notar que a - 5 °C fue la condición en la cual se observaron en los cromatogramas el mayor número de compuestos volátiles con ambas fibras (Tabla 3.6).

En el análisis cromatográfico realizado a las muestras con 90 días de almacenamiento a - 5 °C, se observaron 74 compuestos volátiles, en tanto que las muestras almacenadas a - 20 °C se observaron 37 usando la fibra PDMS (Tabla 3.6). Para el análisis con la fibra PDMS/DVB, observaron 68 compuestos volátiles a - 5 °C y 72 a - 20 °C (Tabla 3.6). En los compuestos presentes en este punto de muestreo con ambas fibras en las dos temperaturas de almacenamiento solo el ácido acético está reportado como marcador de deterioro en alimentos (Figura 3.9). En sardinas y pescados con pH menores a 6.0; se ha reportado que bacterias de los géneros de *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y *Moraxella* producen ácido acético y ácido butírico (Nishikawa et al., 2012). En este estudio fue posible identificar solo ácido acético, esto indica la posible presencia de alguno de estos géneros en las muestras de pulpo analizadas.

Es importante notar que a - 5 °C se observaron en los cromatogramas un mayor número de compuestos volátiles con la fibra PDMS, en tanto que a - 20 °C se observaron en los cromatogramas un mayor número de compuestos con la fibra PDMS/DVB. Es de notar que a - 20 °C fue la condición en la cual se presentaron el menor número de compuestos con la fibra PDMS (Tabla 3.6). Una de las razones en la variación de la identificación de los compuestos volátiles podría ser que acorde pasa el tiempo de almacenamiento, la población de los microorganismos presentes varía y con ello se da los cambios de los perfiles de los compuestos volátiles generados por el metabolismo de los microorganismos presentes; otra razón podría ser que al inicio del análisis, la presencia de microorganismos sea baja y con el paso del tiempo se incrementa a la temperatura que lo favorece. Cabe mencionar que en análisis moleculares realizados en el presente estudio, en el día 90 de muestreo se identificó la presencia de *Shewanella putrefaciens* a la temperatura de - 5 °C (Carballo-Bautista 2013 datos no publicados), se conoce que este microorganismo es



causante de deterioro y como parte de su metabolismo es capaz de producir ciertas cantidades de compuestos deteriorativos.

En el análisis cromatográfico realizado a las muestras con 120 días de almacenamiento a - 5 °C, se observaron 83 compuestos volátiles, en tanto que las muestras almacenadas a - 20 °C fueron 43 usando la fibra PDMS (Tabla 3.6). Para el análisis con la fibra PDMS/DVB detectaron 43 compuestos volátiles a - 5 °C y 85 a - 20 °C (Tabla 3.6), los compuestos observados en este punto de muestreo con ambas fibras en las dos temperaturas de almacenamiento solo ácido acético está reportado como marcador de deterioro en alimentos (Figura 3.10), el ácido acético fue identificado en otro estudio realizado en el presente trabajo en muestras de pulpo deterioradas (Carballo-Bautista, *et al.*, 2013; en prensa). Es importante notar que a - 5 °C y - 20 °C se identificaron mayor número de compuestos con la fibra PDMS/DVB. Es de notar que a - 20 °C fue la condición en la cual se observaron en los cromatogramas el menor número de compuestos volátiles con la fibra PDMS (Tabla 3.6). Esto indica que el perfil de los compuestos volátiles en este punto de muestreo tiene mayor afinidad por la fibra PDMS/DVB en ambas temperaturas. Así mismo, para este punto de muestreo en el análisis molecular se identificó la presencia de *Shewanella putrefaciens* a la temperatura de - 5 °C.

En el análisis cromatográfico realizado a las muestras con 2 años de almacenamiento a - 20 °C con la fibra PDMS se observó la presencia de 41 compuestos volátiles totales y con la fibra PDMS/DVB se observaron 64 en el cromatograma (Tabla 3.6), siendo solo ácido acético el único compuesto identificado con ambas fibras reportado como marcador de deterioro (Figura 3.11).

En el presente estudio, el análisis por CG-EM de las muestras evaluadas se identificaron en las muestras de pulpo, la presencia de ácido acético hasta el día 90, 120 y 2 años de almacenamiento a - 5 °C y - 20 °C, no presentando evidencias de deterioro severo, ya que el ácido acético es un compuesto que se presenta en las primeras etapas deteriorativas de los alimentos de origen marino. Esto indica que en ambas condiciones de temperatura, es posible almacenar las muestras hasta por un periodo de 90 días y a - 20 °C por un periodo de hasta 2 años sin que en éstas se

identifiquen compuestos trazadores de deterioro como la dimetilamina, TMA e isopropilamina, los cuales son reportados como causantes de pérdida de calidad de los alimentos y causan enfermedades en los seres humanos.

Mediante el método establecido, microextracción en fase sólida en el espacio cabeza, se establecieron las condiciones con las cuales se identificaron los compuestos volátiles totales presentes durante la etapa de deterioro en pulpo *O. maya*, utilizando dos fibras de diferente polaridad; este método analítico permitió la determinación simultánea de los compuestos volátiles totales. Los resultados mostrados en este estudio, constituyen los primeros datos sobre el perfil cromatográfico de los compuestos volátiles totales en muestras de pulpo durante el curso temporal del proceso de deterioro.

Los compuestos volátiles totales son determinantes para conocer la buena calidad de los productos marinos; estos compuestos pueden evidenciar el grado de deterioro de las muestras evaluadas (Huss, 1999); por lo tanto, estos estudios podrían ayudar a enfocar futuros estudios para identificar en una forma rápida y eficiente los compuestos volátiles que participen directamente en el deterioro y contribuyan a su alteración, los cuales puedan representar un riesgo para la salud de los consumidores al no ser un alimento inocuo.

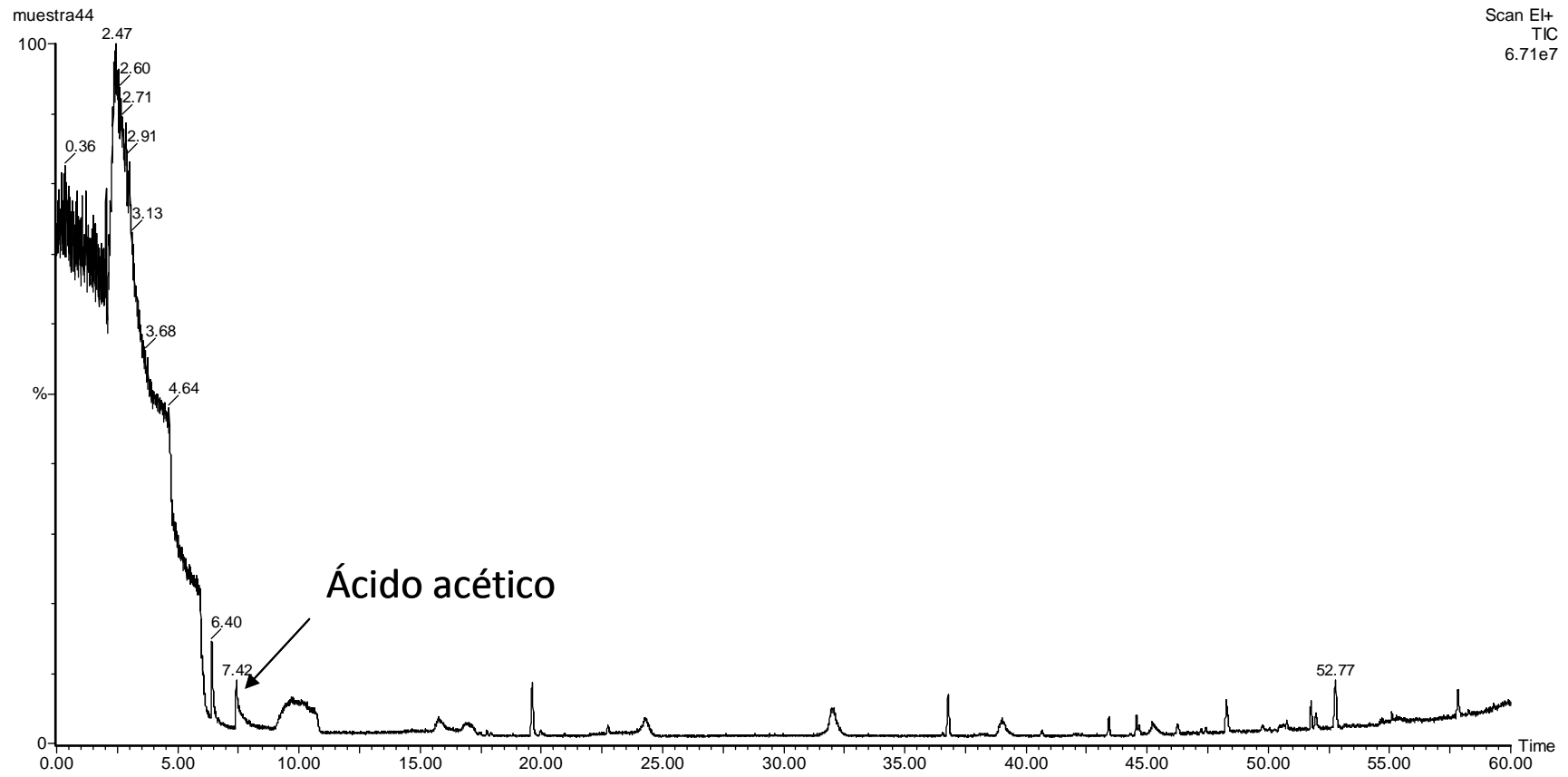


Figura 3.9 Cromatograma de los compuestos volátiles de pulpo almacenado por 90 días -5 °C.

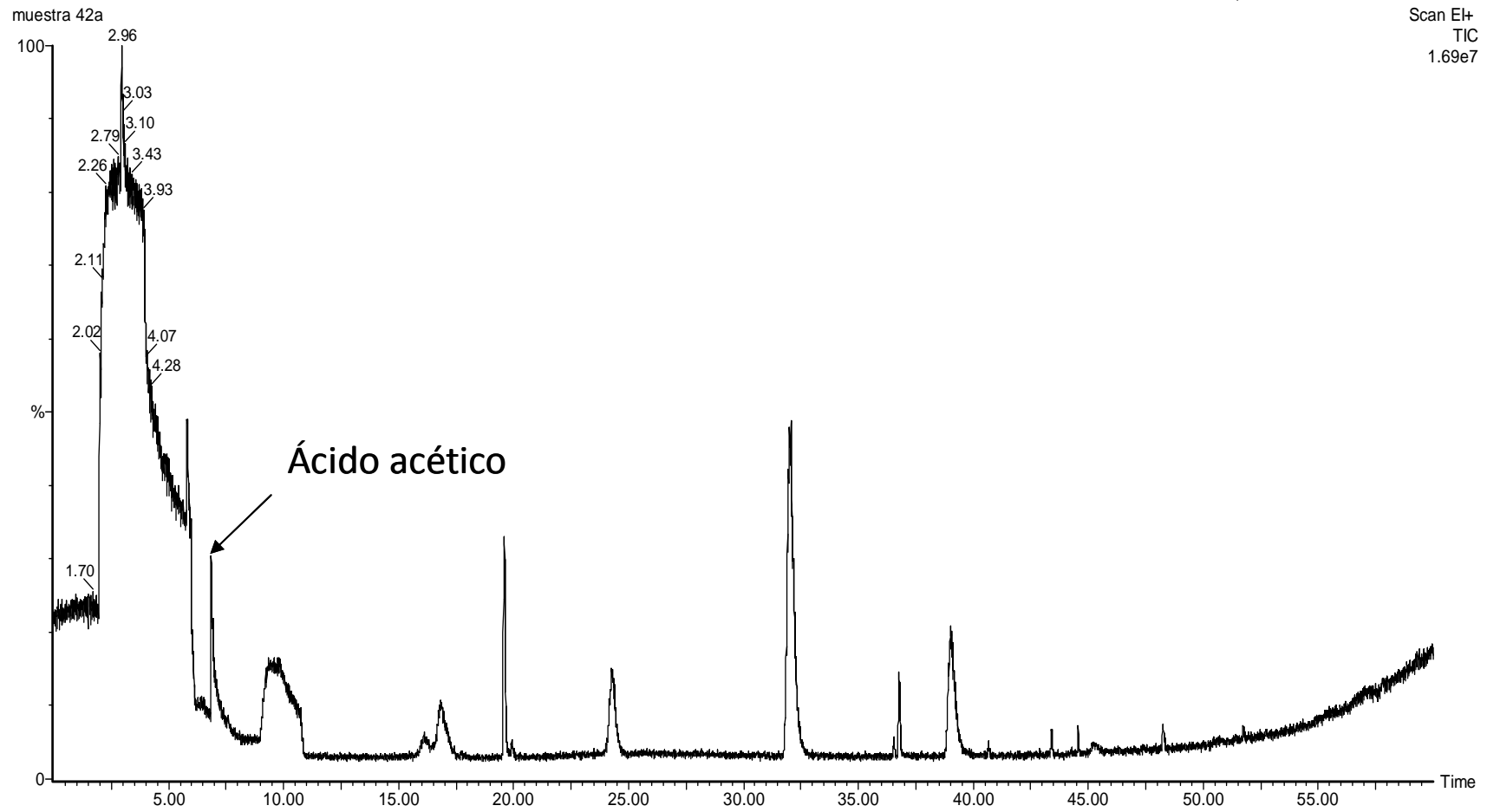


Figura 3.10 Cromatograma de los compuestos volátiles de pulpo almacenado por 120 días -20 °C.

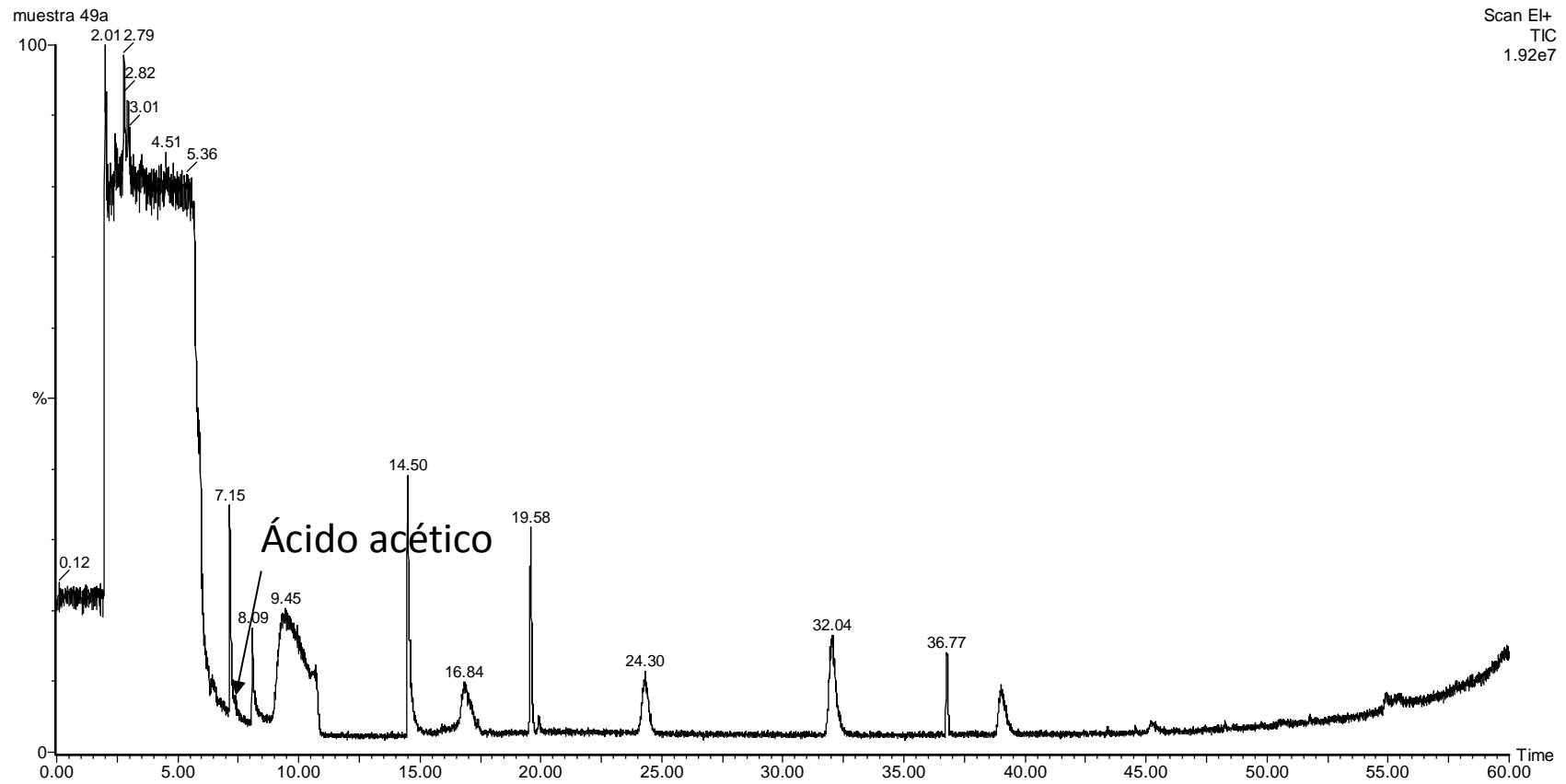


Figura 3.11 Cromatograma de los compuestos volátiles de pulpo almacenado por 2 años a - 20 °C.

### 3.4 Estandarización de métodos de la PCR y de extracción de mADN

#### A) Amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en bacterias aisladas de pulpo

Se realizó un análisis de los iniciadores universales con la ayuda del software bioinformático GENE RUNER (Tabla 3.7), con el fin de obtener las temperaturas medias ( $T_m$ ) de alineamiento, de los iniciadores en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), debido que la temperatura óptima de la reacción es un paso crítico para el éxito de la misma.

Tabla 3.7. Temperaturas óptimas de los iniciadores.

Nombre iniciadores	Secuencia	* $T_m$ alineamiento	Gradiente de temperaturas
DG74	5'-AGGAGGTGATCCAACCGAA-3'	55-63°C	52-62 °C
RW01	5'-AACTGGAGGAAGGTGGGGAT-3'	59-53 °C	
PLK1	5'-TACGGGAGGCAGCAG-3'	55-63°C	50-55 °C
PLK2	5'-TATTAC CGC GGC GGCTGC T-3'	59-53 °C	
Uni1F	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'	55°C- 47 °C	
Uni1R	5'- TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'	59°C-51°C	
Uni2F	5'-AGAGTTTGATYMTGGCTC-3',	59-48 °C	50-55 ° C
Uni2R	5'-CAKAAAGGAGGTGATCC-3'	52-45 °C	

\* $T_m$ . Temperatura media de alineamiento de los iniciadores.

Las temperaturas obtenidas para los iniciadores se encuentran en un rango de 50 a 62 °C (Tabla 3.7); para amplificar los fragmentos del gen 16S rRNA por PCR. Se realizó un gradiente a fin de obtener la temperatura óptima de los iniciadores DG74 y RW01, los cuales son específicos para bacterias, usando como templado de la reacción ADN genómico de la cepa *Pseudomonas stutzeri* aislada de pulpo, el gradiente de temperatura fue entre 53 a 59 °C; posteriormente, 8  $\mu$ l del producto de la reacción de PCR conteniendo el fragmento del gen 16S rRNA se fraccionó por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8 % (Figura 3.12), lo cual permitió visualizar una banda única de aproximadamente 200 pb, estos productos del gen 16S rRNA obtenidos indican que se tiene mayor especificidad en las temperaturas de 53 y 54.5 °C (carriles C1 y C2); por ello se obtiene mayor producto de amplificación (como lo indica la flecha Figura 3.12).

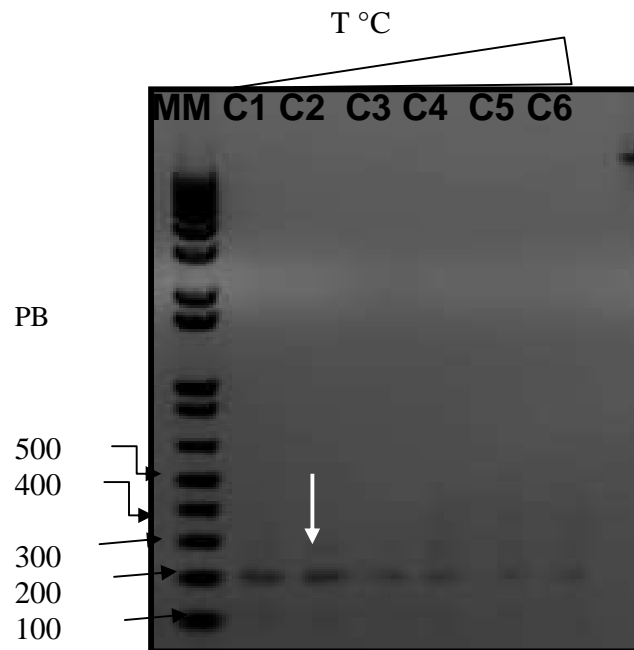


Figura 3.12 Electroforesis de PCR usando iniciadores DG74 y RW01 obtenidos con gradiente de temperatura de alineamiento. MM, marcador de ADN; C1 alineamiento a 53 °C; C2 alineamiento a 54.5, C3 alineamiento a 55.2°C; C4 alineamiento a 56.6 °C; C5 alineamiento a 57.8 °C; C6 alineamiento a 59 °C.

Para las temperaturas de entre 55 °C hasta 59 °C, los productos del gen 16S rRNA obtenidos fueron bandas únicas de aproximadamente 200 pb pero en menor concentración, esto indica que en estas temperaturas el alineamiento de los iniciadores no es favorable para obtener un mayor producto de PCR.

Este juego de iniciadores *DG74* y *RW01* permitió amplificar un fragmento de 187 pb del gen 16S rRNA de bacterias Gran positivas y Gran negativas de acuerdo a los estudios realizados en muestras de filetes de pescado por( Lee y Levin, 2006), donde reportan la temperatura de alineamiento de los iniciadores a 55 °C; sin embargo, en el análisis realizado en el laboratorio se obtuvo una menor cantidad de productos de PCR a las temperaturas de 55.2 °C (C3), 56.6 °C (C4), 57.8 °C (C5), 59 °C (C6), en relación a las temperaturas de 53 °C y 54.5 °C; esto indica que temperaturas menores a 55 °C son adecuadas para obtener mayor amplificado de PCR.

Se realizó una PCR para obtener un fragmento de aproximadamente 370 pb del gen 16S rRNA utilizando los iniciadores PLK1 y PLK2 y ADN genómico de la cepa de *Pseudomonas stutzeri* como templado en la reacción, utilizando la temperatura de alineamiento de 53 °C, al producto obtenido se le realizó una electroforesis en un gel de agarosa (Figura 3.13).

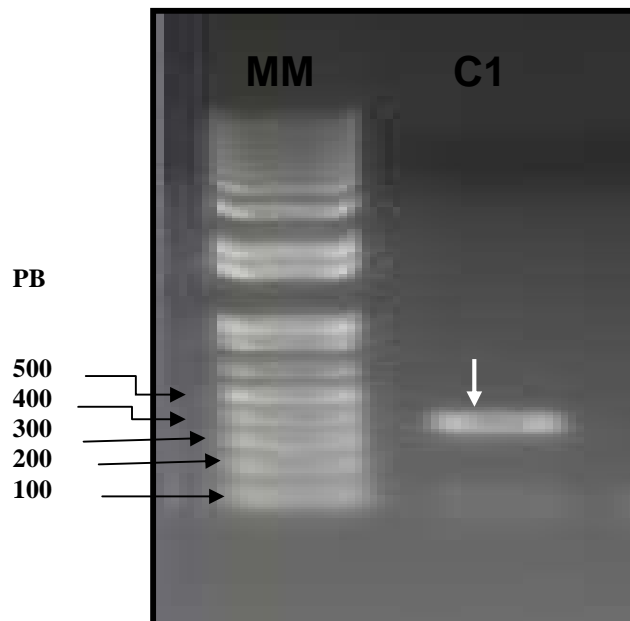


Figura 3.13 Electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % de productos de PCR obtenido con temperatura de alineamiento de 53 °C usando iniciadores PLK1 y PLK2. MM: escalera de ADN de 100 pb; C1: producto de PCR alineado a 53 °C.

En este trabajo modificando las condiciones de la PCR utilizando estos iniciadores a una temperatura de 52 °C, se obtuvo una mayor cantidad del producto de PCR de aproximadamente 370 pb que es del mismo tamaño al reportado por Lee y Levin (2006).

Se realizó una PCR para obtener un fragmento de aproximadamente 1650 pb del gen 16S rRNA utilizando los iniciadores Uni1F- Uni1R y Uni2F- Uni2R y ADN genómico de la cepa de *Pseudomonas stutzeri* como templado en la reacción, utilizando la temperatura de alineamiento de 53 °C. A los productos de PCR obtenidos, se les realizó una electroforesis en gel de agarosa, en la cual se puede observar que los iniciadores Uni1F, Uni1R a esta temperatura amplificaron un



fragmento único e intenso de 1650 pb como se ve en C2 (Figura 3.14), los iniciadores Uni2F- Uni2R amplificaron un fragmento de 1650 pb con menor intensidad como se ve en C3 (Figura 3.14).

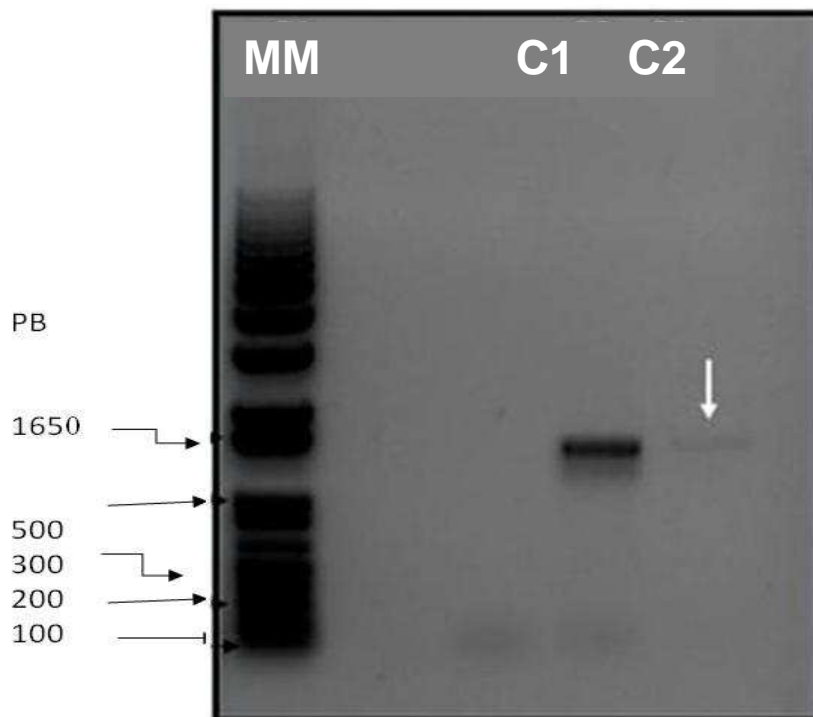


Figura 3.14 Electroforesis de productos de PCR obtenido con una temperatura de alineamiento de 53 °C usando iniciadores Uni1F, Uni1R y Uni2F, Uni2R. C1: escalera de ADN de 1 kb; C2: producto de PCR alineado a 53 °C con los iniciadores Uni1F y Uni1R; C3: producto de PCR alineado a 53 °C con los iniciadores Uni2F y Uni2R.

En otros estudios se reportaron el uso de estos iniciadores identificando microorganismos de los géneros *Staphylococcus*, *Coxiella*, *Rickettsia*, *Clostridium*, *Neisseria*, *Mycobacterium*, *Bilophila*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Lactobacillus* y de la familia *Enterobacteriaceae*, las condiciones de temperatura de alineamiento fueron de 55 °C, con un tiempo de extensión de 2.5 min y un producto de PCR de 1650 pb (Wilson *et al.*1990). Las condiciones obtenidas en laboratorio por nuestro grupo de trabajo indicaron que la mejor temperatura fue de 53 °C y el tiempo de extensión de 50 s; esto indica que se logró obtener una mayor eficiencia en los productos

amplificados con una menor temperatura y un menor tiempo de extensión, teniendo el conocimiento de las especificaciones de la taq polimerasa que adiciona 1000 pb por min y se obtuvieron fragmentos del gen 16S rRNA de 1650 pb en 50 s, la reacción de PCR fue eficiente con las condiciones obtenidas para los iniciadores Uni1F- Uni1R.

Con el juego de iniciadores Uni2F y Uni2R correspondientes al carril C3 (Figura 3.14), se observó una banda única amplificada de baja concentración, esto podría deberse a que la temperatura de alineamiento no es la óptima y por ello el producto de PCR obtenido es de menor concentración a lo esperado, por lo cual se realizó una siguiente reacción de amplificación a fin de obtener la condición óptima que incrementara la concentración del producto esperado.

Se realizó un Touchdown (decrementos de temperatura de alineamiento graduales), para mejorar el rendimiento y concentración del producto de PCR del gen 16S rRNA de 1650 pb, utilizando los iniciadores Uni2F y Uni2R, usando una temperatura de alineamiento inicial de 62 °C hasta alcanzar 55 °C al final del Touchdown cuando se concluyen 15 ciclos; posteriormente, se utiliza 54 °C como temperatura de alineamiento en el paso 2 del Touchdown por 17 ciclos de la reacción al final de la PCR. El producto de la reacción de PCR se fraccionó por electroforesis en un gel de agarosa, esto permitió visualizar una banda única y con mayor concentración en el carril C1 (Figura 3.15), obteniéndose así las condiciones de amplificación óptimas. Utilizando estos iniciadores Wilson et al. (1990) obtuvieron un fragmento de aproximadamente 1650 pb en microorganismos de diferentes géneros.

En el presente trabajo, se lograron estandarizar las concentraciones de la mezcla de PCR y condiciones de alineamiento de los diferentes iniciadores utilizados que permitieron amplificar un fragmento del gen 16S rRNA de algunas cepas que posteriormente se enviaron a secuenciar para conocer la identidad.

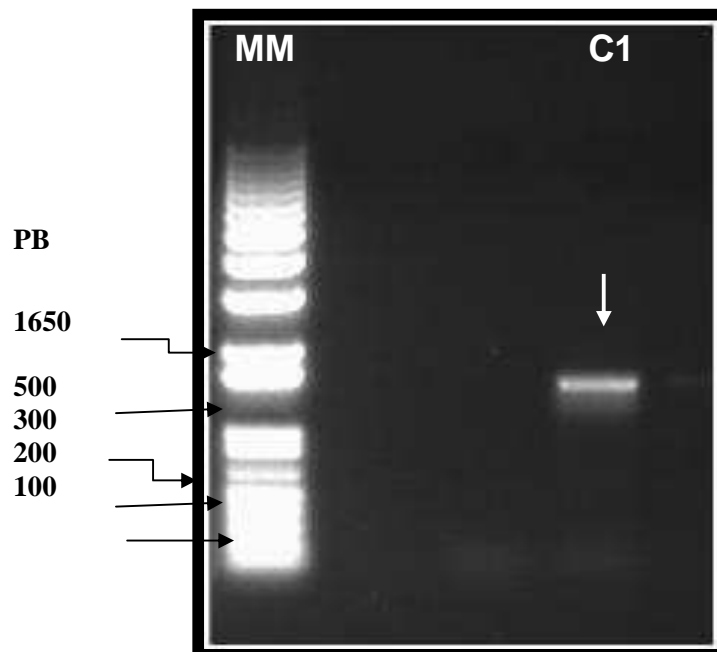


Figura 3.15 Productos de PCR obtenido por Touchdown a una temperatura de alineamiento de 62-55 °C usando iniciadores Uni2F, Uni2R. MM: escalera de ADN de 1 kb; C1: producto de PCR del gen 16S rRNA de aproximadamente 1650 pb obtenido con los iniciadores Uni2F y Uni2R.

### B) Condiciones de PCR de los iniciadores de *Salmonella*

Entre los microorganismos que pueden causar deterioro en alimentos marinos se reporta la presencia de *Salmonella*. En este estudio se realizó una reacción de PCR para la amplificación de un fragmento de 940 pb del gen 16S rRNA con los iniciadores específicos para *Salmonella*, a fin de encontrar la temperatura adecuada de alineamiento para esta especie. Así mismo, se utilizaron diferentes cepas bacterianas para verificar la especificidad de los iniciadores, obteniéndose un fragmento solo en la PCR donde se utilizó como templado ADN genómico de la cepa de *Salmonella* (Figura 3.16), en el carril C2 el producto de amplificación de control positivo de una cepa de *Salmonella*, y en los carriles C3 (*Pseudomonas stutzeri*), C4 (*Psychrobacter sp.*) y C5 (*Acinetobacter baumannii*). Este resultado indicó que la temperatura de alineamiento utilizada fue la óptima y que los iniciadores usados son específicos para *Salmonella*, ya que solo amplificó un fragmento del gen 16S rRNA en el control positivo (C2) y no amplificó ningún fragmento del gen 16S rRNA de las

demás cepas utilizadas como controles de los iniciadores (C3 a C5). Por lo tanto, es alto el grado de confiabilidad de estos iniciadores en la identificación de *Salmonella*; dichos iniciadores pueden servir para establecer diagnóstico rápido y confiable en la identificación de *Salmonella* en alimentos.

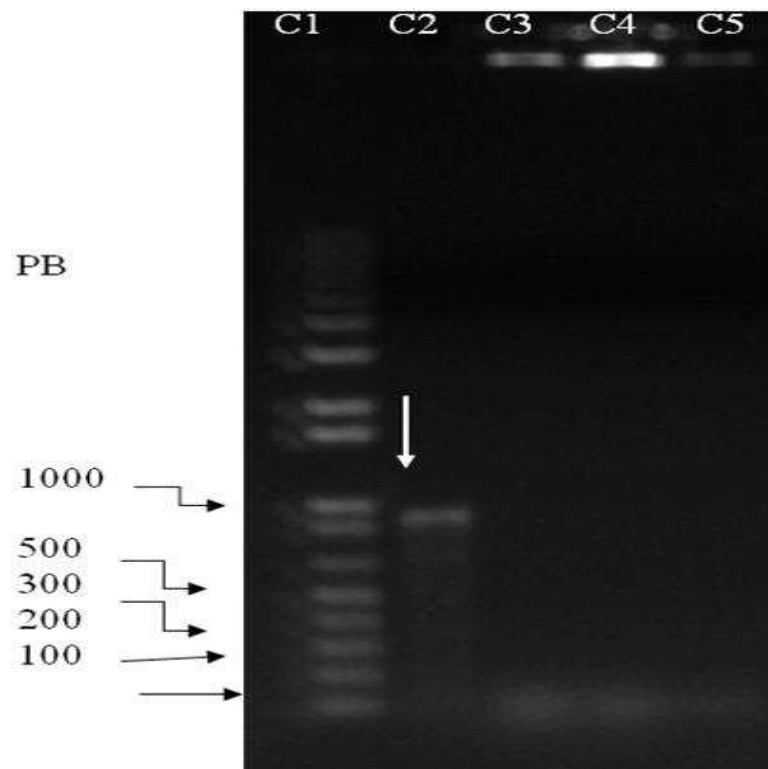


Figura 3.16 Amplificación por PCR utilizando iniciadores específicos para *Salmonella*. C1: marcador de ADN; C2: PCR control positivo de *Salmonella*; C3, PCR de la cepa PH105 control negativo; C4: PCR de la cepa PNH102 control negativo; C5, PCR de la cepa PH108 control negativo.

Usando estos iniciadores, se reportó la amplificación de un fragmento de 940 pb de cepas de *Salmonella* aisladas de diferentes alimentos cárnicos y frutas como manzana, verificando en el mismo análisis la alta especificidad de dichos iniciadores al probar los iniciadores con cepas de *Shigella flexneri*, *Salmonella enterica* serotipo *Typhimurium* y *Listeria monocytogenes*, amplificando un fragmento solo en la cepa de *Salmonella* (Lampel *et al.*, 2000).

En muestras de alimentos analizadas se reportó la alta sensibilidad de la PCR para identificación de *Salmonella*, obteniendo una alta especificidad de los iniciadores usados (Espinosa *et al.*, 2007).

En el presente estudio se encontraron las condiciones óptimas de amplificación de la PCR y alineamiento de los iniciadores específicos para *Salmonella*, por lo que dichas condiciones están sirviendo para el análisis de las muestras del metagenoma en pulpo.

### **C) Extracción de ADN metagenómico (mADN)**

En la reacción de PCR es importante contar con ADN de buena calidad libre de impurezas; por lo tanto, se usaron dos protocolos de extracción de ADN. La extracción de ADN comprende dos pasos fundamentales: A)- Lisis celular; es la ruptura de la membrana y la pared celular liberando los ácidos nucleicos contenidos en la célula y B)- Purificación posterior de los ácidos nucleicos, que es la eliminación de los componentes celulares, su contenido como son las proteínas, lípidos y carbohidratos. Se implementó la técnica de extracción de mADN, utilizando el protocolo de Fonnesbech (1997), el de Camacho-Villasana (2002) y el de Camacho-Villasana (2002), combinado con Fonnesbech (1997) modificado en laboratorio 2010 para obtener mADN de mejor calidad, posterior a la purificación de los ácidos nucleicos se realizó la electroforesis en geles de agarosa, observando un mADN de buena calidad. (Figura 3.17),

Los resultados de este análisis permite contar con dos protocolos con los cuales se puede extraer mADN de buena calidad, con el protocolo de Fonnesbech se obtuvo mADN de buena calidad (Figura 3.17 C1); así mismo, se observó que la adición de acetato de potasio en la etapa de precipitación con isopropanol a - 20 °C en el protocolo de Fonnesbech modificado en 2010 permitió obtener una mayor cantidad mADN, con mejor calidad ya que el pellet fue más limpio (Figura 3.17 C2), el mADN obtenido se utilizó para realizar las reacciones de PCR.

Por otra parte, con el protocolo de Camacho-Villasana (2002), el rendimiento de la purificación de los ácidos nucleicos no fue eficiente por la baja cantidad de mADN obtenido (Figura 3.17 C3). La combinación del protocolo de Camacho-Villasana y

Fonnesbech, con las modificaciones molares de los buffers, la adición de un paso de precipitación con citrato de sodio ( $\text{NaH}_2(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{COO})_3)$ ),  $\text{NaCl}$  y posteriormente una re precipitación con  $\text{LiCl}$  4 M se purificó y recuperó mADN de buena calidad, obteniendo un pellet libre de impurezas (Figura 3.17 C4). Posteriormente se realizó una electroforesis a fin de verificar la integridad del mADN (Figura 3.17).

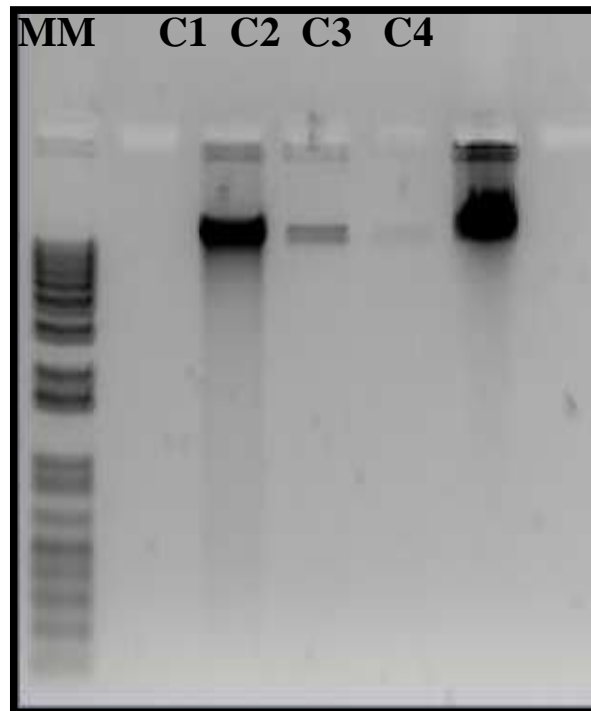


Figura 3.17 Extracción de mADN. MM: marcador de ADN; C1: mADN método Fonnesbech; C2, mADN método Fonnesbech modificado; C3: mADN método Camacho-Villasana; C4, mADN método Camacho-Villasana-Fonnesbech.

Algunos reportes, indican que se debe dar mayor importancia al uso de métodos de extracción, que permitan la recuperación de los ácidos nucleicos con una alta calidad y condiciones con el fin de obtener los productos de PCR con una mayor especificidad, antes de llevar a cabo una investigación sobre el estudio de comunidades bacterianas en un nuevo hábitat, cuando se utilizan los métodos moleculares para identificación de microorganismos o diferentes estudio como árboles filogenéticos (Lou *et al.*, 2007).

En nuestro estudio se logró establecer dos protocolos de extracción y purificación de ADN genómico y ADN metagenómico de bacterias, los cuales fueron usados con éxito para la purificación del mADN de las muestras inducidas de deterioro en pulpo.

### 3.5 Identificación de bacterias a partir del gen 16S rRNA

Por métodos moleculares se identificaron las cepas aisladas; usando los iniciadores universales UNI1F y UNI1R, se realizó la amplificación de fragmentos del gen 16S rRNA. Las cepas analizadas son las siguientes PNH102, PH 105, PNH 108 y la NH110 obteniéndose productos de PCR de 1650 pb (Figura 3.18). Dichos productos de PCR fueron purificados para eliminar los residuos de la reacción de PCR que podrían interferir con la secuenciación de los mismos y se enviaron a secuenciar. La alta fidelidad en la identificación de los microorganismos para la clasificación a nivel de género y especie, a partir de un fragmento de 1650 pb. Requiere la secuenciación de sentido y antisentido, ya que se conoce que la fidelidad de la secuenciación es confiable hasta cerca de los 700 pares de bases, se secuenciaron ambos sentidos de los productos de PCR del gen 16S rRNA obtenidos.

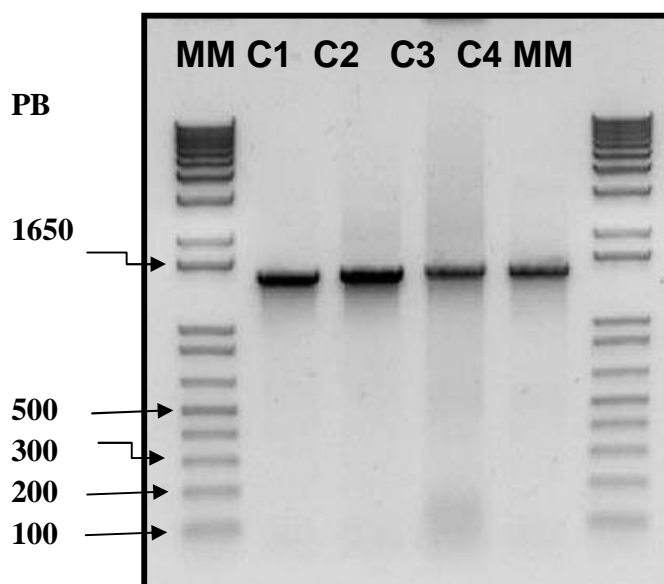


Figura 3.18 Amplificación por PCR a partir de bacterias psicrófilas con iniciadores Uni1F, Uni1R. MM: marcador de ADN; C1: PCR de la cepa PH110; C2, PCR de la cepa PNH105; C3: PCR de la cepa PH102; C4, PCR de la cepa PH108.

Los alineamientos permitieron identificar el género y especie de las cepas enviadas a secuenciar el gen 16S rRNA. En la tabla 3.8 se presentan los géneros de las 10 cepas secuenciadas y publicadas en la base de datos internacional *GenBank*. En el Anexo B1 se presenta un alineamiento con la cepa PH105, la cual alineó en un 95 % de similitud con *Pseudomonas stutzeri*. Las cepas que fueron aisladas de muestras de pulpo presentan entre el 93 al 98 % de similitud con diferentes géneros. En el Anexo B2 se presentan las secuencias de cada una de estas cepas.

Tabla 3.8 Géneros de las cepas secuenciadas y publicadas en la base de datos internacional *Genbank* <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>.

Accesión	Nombre	Pb	Género y especie	% similitud
HQ686271	CL101	1321	<i>Flavobacteriaceae bacterium</i>	97
BankIt 1411389	CL103	1090	<i>Acinetobacter baumannii</i>	87
HQ686270	CL106	1364	<i>Acinetobacter baumannii</i>	98
HQ686278	CLM107	1375	<i>Enterobacter cloacae</i>	99
HQ686273	CL108	1320	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	98
HQ686274	CL110	1371	<i>Psychrobacter cryohalolentis</i>	96
HQ686275	PH105	1304	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	95
HQ686277	PH108	1366	<i>Acinetobacter baumannii</i>	98
HQ686276	PNH102	1358	<i>Psychrobacter sp.</i>	98
BankIt 1412173	PNH110	1027	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	96

Los resultados obtenidos en este estudio de las bacterias aisladas de pulpo son similares con estudios previos realizados en pulpo, en los cuales se reporta que la comunidad bacteriana está compuesta en su mayoría por *Psychrobacter sp*, *Pseudomonas sp*, *Shewanella putrefaciens*, *Enterobacteriaceae* y *Flavobacterium* (Cruz-Leyva *et al.*, 2010). En otro trabajo previo realizado en sedimentos marinos, se identificaron y aislaron cepas de la familia *Flavobacteriaceae* (Olivera *et al.*, 2007). Una razón de encontrar esta especie de bacterias en muestras de pulpo podría ser porque en su hábitat natural el pulpo mantiene constante contacto con sedimentos marinos. En el presente estudio, se aisló e identificó una cepa de *Acinetobacter baumannii* usando la secuenciación del gen 16S rRNA. Resultados similares fueron obtenidos en estudios realizados en pescado, reportando que esta bacteria es



productora de histamina, amina biogénica involucrada en deterioro (Hwi-Chang *et al.*, 2010).

Los iniciadores universales y las temperaturas de alineamiento fueron las condiciones idóneas para lograr identificar microorganismos de diferentes géneros y especies, indicando que estos iniciadores pueden ser utilizados para identificar microorganismos de un amplio espectro de géneros posibles.

### 3.6 Identificación de microorganismos aislados de pulpo en deterioro por PCR

#### A) Análisis de los microorganismos presuntamente *Vibrio*

Para hacer la identificación molecular de los microorganismos presuntamente *Vibrio* aislados durante el almacenamiento del pulpo en congelación, se extrajo el ADN de acuerdo al protocolo de Fonnesbech (1997), modificado en las etapas previas a la purificación de los ácidos nucleicos. Las muestras obtenidas demostraron la obtención y recuperación de un ADN de buena calidad (Figura 3.19), se observó el ADN genómico de las cepas presuntamente *Vibrio*, en un gel de agarosa en el cual se verificó su integridad. Los carriles C1 a C6, corresponden a las cepas aisladas a - 5 °C, los carriles C7 a C12 corresponde a las cepas aisladas a - 20 °C. Con este protocolo se extrajo el ADN de todas las cepas en forma eficiente; esto indica que es un protocolo idóneo para la extracción del ADN genómico de bacterias.

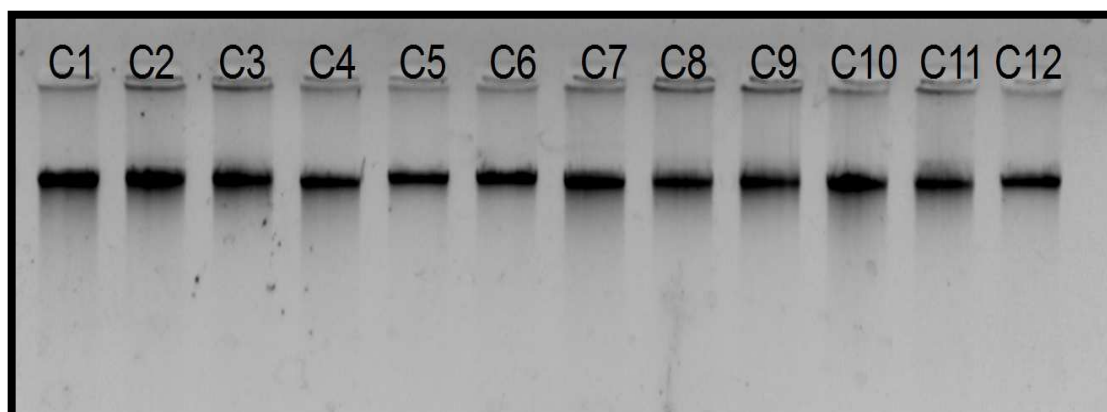


Figura 3.19 Electroforesis de ADN purificado de cepas presuntamente *Vibrio*. Los carriles C1 al C6, corresponden a cepas aisladas a - 5 °C, en los carriles C7 al C12 corresponde a cepas aisladas a - 20 °C.

La amplificación del gen 16S ribosomal de las cepas presuntamente *Vibrio* se realizó con iniciadores universales, las condiciones de amplificación de los iniciadores Uni1F y Uní 1R fueron previamente estandarizados en el laboratorio, (Carballo-Bautista *et al.*, datos no publicados), 5  $\mu$ l de los productos de PCR de cada cepa fueron visualizados por electroforesis en un gel de agarosa de 1.2 % (Figura 3.20), la banda obtenida fue de 1650 pb, la amplificación fue específica por la obtención de solo una banda, lo cual indica la alta especificidad de los iniciadores al alinearse con el templado del ADN. El carril MM corresponde a los marcadores de peso molecular de 1 Kb, los carriles C1 al C6, corresponden a los productos de PCR de las cepas aisladas a - 5 °C, los carriles C7 al C12 corresponden a los productos de PCR de las cepas aisladas a - 20 °C, estos productos de PCR fueron purificados y enviados a secuenciar para obtener la identidad de estas cepas.

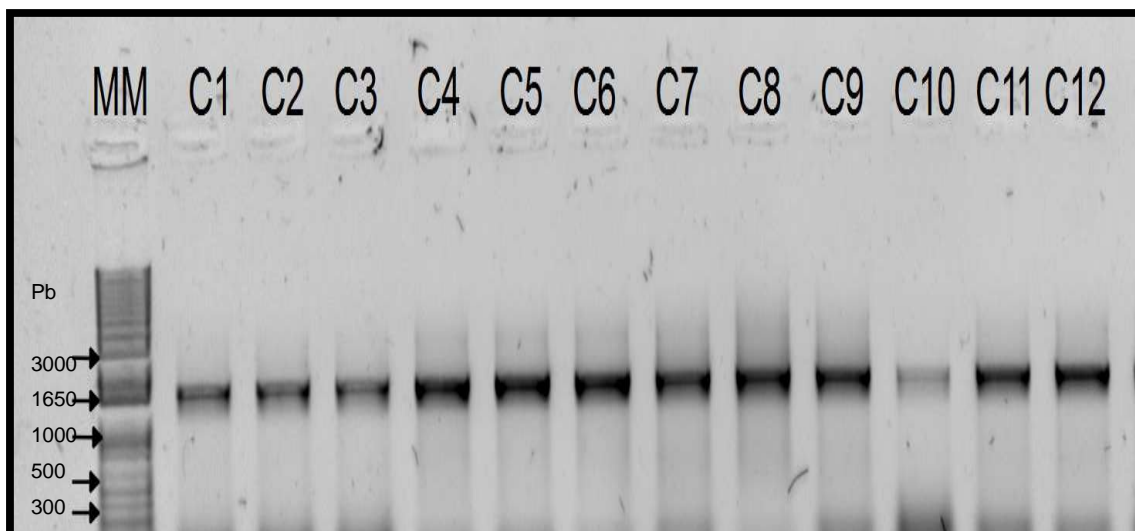


Figura 3.20 Electroforesis de los productos de PCR de 1650 pb obtenidos con los iniciadores Uni1F y Uni1R del gen 16S ribosomal de las cepas presuntamente *Vibrio*. En cada carril fueron cargados 5  $\mu$ l de los productos de PCR, MM, marcadores de peso molecular de 1Kb, en los carriles C1 al C6, corresponden a productos de PCR de cepas aisladas a -5 °C, los carriles C7 al C12 corresponden a productos de PCR de cepas aisladas a - 20 °C.

**B) Análisis de los microorganismos presuntivamente *Pseudomonas***

Se realizó la electroforesis del ADN genómico extraído de las cepas aisladas presuntivamente *Pseudomonas* con medio selectivo en un gel de agarosa para verificar su integridad (Figura 3.21); dicha electroforesis muestra que los productos obtenidos son de buena calidad; sin embargo, en las 3 primeras muestras (C1 a C3), se obtuvo una mayor cantidad de ADN, ya que la banda observada fue de mayor intensidad; dichas muestras fueron usadas como plantados para la identificación de las bacterias aisladas por PCR.

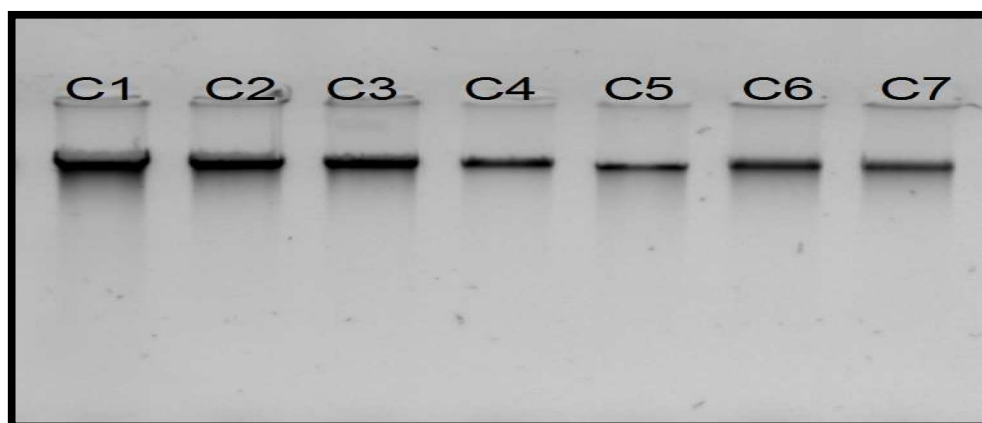


Figura 3.21 Análisis de electroforesis del ADN de las cepas presuntivamente *Pseudomonas*. Los carriles C1 al C4, corresponden a cepas aisladas a - 5 °C; los carriles C5 al C7 corresponde a cepas aisladas a - 20 °C.

La amplificación del gen 16S ribosomal de las cepas aisladas con medio selectivo se realizó con iniciadores universales Uni1F y Uní 1R, los productos de PCR obtenidos con las 7 cepas fueron fragmentados por electroforesis en un gel de agarosa del 1.2 % visualizadas con luz UV (Figura 3.22), la banda obtenida fue de 1650 pb. El carril MM corresponde a los marcadores de peso molecular de 1 Kb, los carriles C1 al C4, corresponden a los productos de PCR de las cepas aisladas a - 5 °C, los carriles C5 al C7 corresponden a los productos de PCR de las cepas aisladas a - 20 °C, estos productos de PCR fueron purificados y enviados a secuenciar para obtener la identidad de estas bacterias.

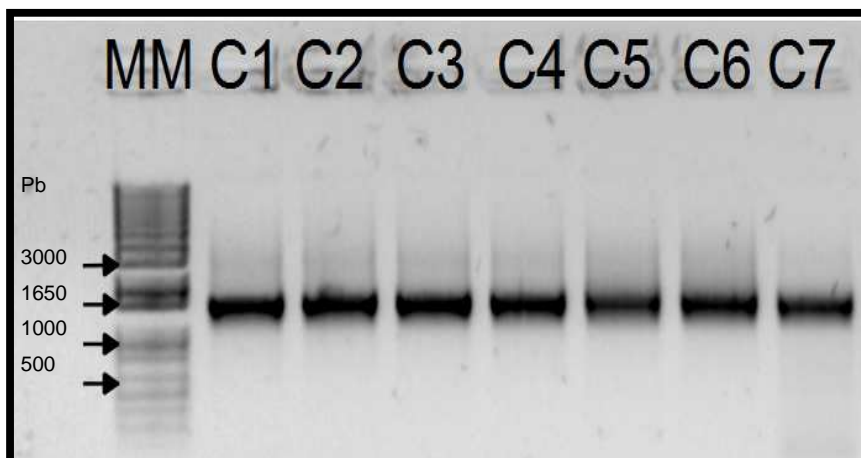


Figura 3.22 Electroforesis de los productos de PCR obtenidos con los iniciadores Uni1F y Uni1R del gen 16S ribosomal de bacterias presuntamente *Pseudomonas*. MM, marcadores de peso molecular, en los carriles C1 al C4, corresponden a cepas aisladas a - 5 °C, los carriles C5 al C7 corresponden a cepas aisladas a - 20 °C.

Por medio del análisis de las secuencias se identificaron a nivel de género y especie los microorganismos y se publicaron en la base de datos internacional GenBank. Los géneros de las 12 cepas enviadas a secuenciar se presentan en la tabla 3.9.

Tabla 3.9 Géneros de las cepas aisladas en medio selectivos para *Vibrio*

Clave	Genero	% de identidad
MACB201	<i>Salmonella entérica</i>	98
MACB202	<i>Proteus mirabilis</i>	99
MACB203	<i>Proteus mirabilis</i>	99
MACB204	<i>Proteus mirabilis</i>	97
MACB205	<i>Proteus mirabilis</i>	99
MACB206	<i>Proteus mirabilis</i>	98
MACB207	<i>Proteus mirabilis</i>	99
MACB208	<i>Shigella flexieri</i>	98
MACB210	<i>Enterobacter aerogenes</i>	98
MACB211	<i>Bacillus subtilis</i>	98
MACB213	<i>Staphylococcus aureus</i>	98
MACB214	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	97

Estas secuencias presentan entre el 97 al 99 % de identidad con diferentes géneros y ninguna de las cepas corresponde al género *Vibrio* como se esperaba, el 50 % de las cepas tuvieron una identidad con el género *Proteus mirabilis*, también se

identificó una cepas de *Salmonella entérica*, una de *Shigella flexini* y una de *Staphylococcus aureus*, la mayoría de estos microorganismos están reportados como causantes de enfermedades transmitidas por los alimentos.

Los resultados de las secuencias de las cepas de *Pseudomonas* confirmaron la identidad de la cepa MACB101 la cual se aisló en el tiempo 0, el 42% de las demás cepas pertenecen al género *Klebsiella pneumoniae* y el otro 42 % a *Klebsiella oxytoca* (Tabla 3.10). Los resultados bioinformaticos fueron sometidos a la base de datos de secuencias internacional NBCI para su publicación.

Tabla 3.10 Géneros de las cepas aisladas en medio selectivo para *Pseudomonas*

Clave	genero	% de identidad
MACB101	<i>Pseudomonas putida</i>	99
MACB102	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	97
MACB103	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	97
MACB104	<i>Klebsiella oxytoca</i>	98
MACB105	<i>Klebsiella oxytoca</i>	99
MACB106	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	98
MACB107	<i>Klebsiella oxytoca</i>	97

Los resultados de la secuenciación indicaron la presencia de una variedad de géneros presentes en las muestras de pulpo; así mismo, evidenció que con los medios selectivos usados se pueden aislar una variedad de microorganismos de diferentes géneros, lo cual no los hace altamente específicos como lo están indicando los resultados moleculares. En el presente estudio se aisló y secuenció el gen 16S rRNA de una cepa que resulto ser *Pseudomonas putida*, resultados parecidos se obtuvieron en estudios realizados en trucha donde reportó la presencia de *Pseudomonas putida* causando ulceraciones en el pescado (Altinok *et al.*, 2006); sin embargo, a pesar de ser una bacteria patógena para el pescado; es de gran interés industrial, ya que puede degradar compuestos aromáticos y xenobióticos. Por otra parte, se reportó el aislamiento e identificación de 6 aislados de *Vibrio alginolyticus* en músculo de muestras de camarón (Chung-Hung *et al.*, 2004). En investigaciones realizadas en agua de mar usada para acuicultura en 5 de 20 muestras se detectó *Vibrio alginolyticus* (Hörmansdorfer *et al.*, 2000).

En el presente estudio, en pulpo almacenado las cepas aisladas correspondieron a *Proteus mirabilis* y *Klebsiella pneumoniae*, resultados parecidos se obtuvo en muestras de pescado en otros estudios en el cual se identificaron diferentes bacterias, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter brackii*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter sakazakii*, *Enterobacter cloacae*, *Vibrio cholerae*, *Proteus vulgaris* y *Aeromonas hydrophila* (Mhango *et al.*, 2010). La presencia de diversas bacterias entéricas indica el grado de contaminación. *Bacillus subtilis*, *Klebsiella oxytoca*, *K. pneumoniae*, *Proteus mirabilis* y *Staphylococcus aureus* son parte de los microorganismos encontrados en el pulpo almacenado en el presente estudio y que también se reportaron por Oladosu-Ajayi (2011), en sus resultados identificaron un total de once microorganismos patógenos y de importancia en deterioro se aislaron en varios intervalos de muestras de peces, incluyendo *Acinetobacter spp*, *Bacillus subtilis*, *B. megaterium*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *K. pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Lundensis Pseudomonas* y *Staphylococcus aureus*.

Se identificaron un total de 11 diferentes géneros de bacterias aisladas en pulpo entre las cuales podemos mencionar *Klebsiella oxytoca*, *K. pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Bacillus subtilis*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas putida*, *Shigella flexieri*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella entérica*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus casseliflavus*. La mayoría de estas bacterias se reportan con cierta frecuencia en alimentos de origen marino; algunos de los cuales son patógenos, por lo cual es de gran importancia poder identificarlos con rapidez para poder mantener los alimentos inocuos y evitar también su deterioro.

### **3.7 Análisis del metagenoma del pulpo en deterioro**

Para la extracción del ADN metagenómico (mADN) de pulpo durante su proceso de deterioro, se utilizó el protocolo de Fonesbech modificado en el laboratorio con el que se obtuvo un ADN de buena calidad (Figura 3.23).

En electroforesis se observó un mADN de buena calidad que mantiene su integridad; como puede observarse en todas las muestras se recuperó alta concentración de mADN, el carril C1 corresponde a la muestra del T<sub>0</sub> correspondiente al día de muestreo, de C2 al C6 correspondiente a los muestreos del día 8 al día 120 de las muestras almacenadas a - 5 °C, los carriles C7 al C11 correspondientes a los muestreos del día 8 al día 120 de las muestras almacenadas a - 20 °C, las flechas indican el incremento de días transcurridos en los puntos de muestreo que fue del día 8 al día 120.

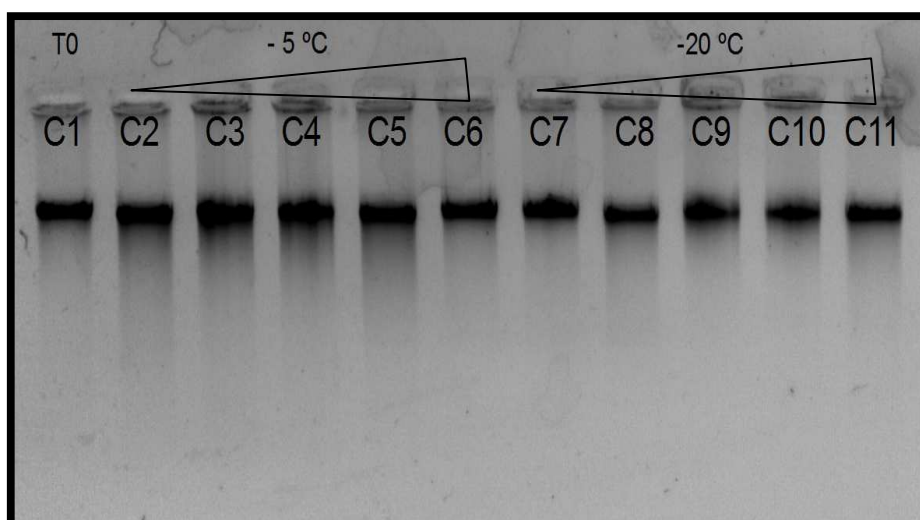


Figura 3.23 Electroforesis del mADN de pulpo almacenadas durante su deterioro. El carril C1 corresponde a la muestra del T<sub>0</sub> que fue el correspondiente al día de muestreo, de C2 al C6, corresponde a las muestras incubadas a - 5 °C, los carriles C7 al C11 son las muestras correspondientes a - 20 °C.

#### A) Análisis del metagenoma con iniciadores universales

Se realizó la PCR mADN con iniciadores universales, los productos de 1600 pb fueron los esperados, la electroforesis demostró amplificación en todas las muestras analizadas (Figura 3.24) en el carril CP, es una muestra utilizada como control positivo de la reacción de PCR, C1 corresponde al tiempo cero T<sub>0</sub>, de C2 al C6 corresponde a las muestras incubadas a - 5 °C, de C7 al C11 corresponde a las muestras incubadas a - 20 °C.

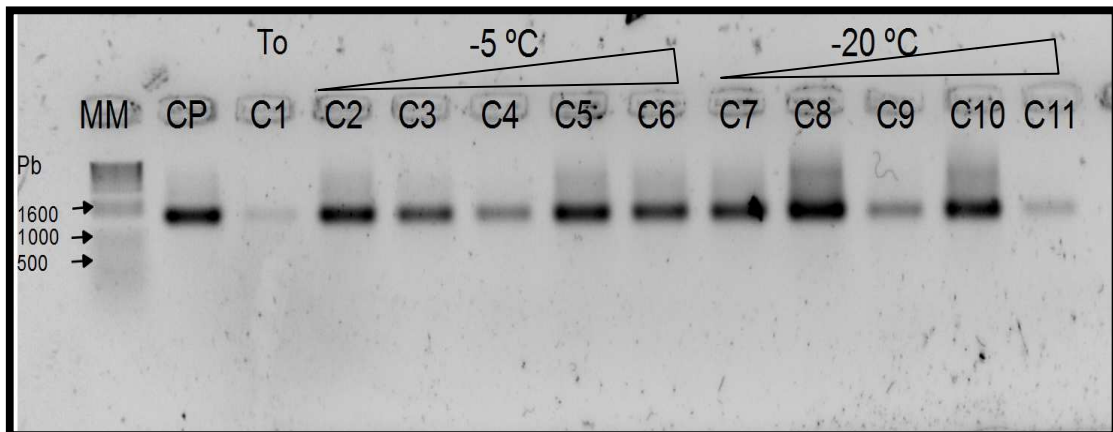


Figura 3.24 Electroforesis de productos de PCR de 1600 pb del mADN con iniciadores universales de muestras de pulpo durante su deterioro. En el carril CP, producto de PCR de una muestra control, C1 productos de PCR corresponde a la muestra del To correspondiente al día de muestreo, de C2 alC6, Productos de PCR que corresponde a muestras incubadas a - 5 °C, en los carriles C7 al C11 productos de PCR que corresponde a muestras incubadas a - 20 °C.

### B) Análisis del metagenoma con iniciadores para *Pseudomonas sp*

En la (Figura 3.25) se presenta la electroforesis de los productos de PCR del análisis del MADN con iniciadores específicos *Pseudomonas sp* de las muestras de pulpo evaluadas durante su deterioro en las dos condiciones de temperatura de - 5 °C y - 20 °C. En donde MM corresponde a los marcadores de peso molecular de 1Kb, Cp, es control positivo de la reacción de PCR usando como templado ADN genómico de *Pseudomonas strutseri*, C1 es la muestra en tiempo cero, en los carriles C2 a C6, corresponden a las muestras incubadas a - 5 °C; en los carriles de C7 a C11 son muestras incubadas a - 20 °C. La muestra de control positivo amplificó un fragmento de 1600 pb, esto indica que la reacción de PCR tiene la capacidad de amplificar; sin embargo, en ninguna de las muestras analizadas del mADN en ambas condiciones fue posible obtener fragmentos esperados lo cual implica que no existe la presencia de *Pseudomonas* en las muestras analizadas en este trabajo.



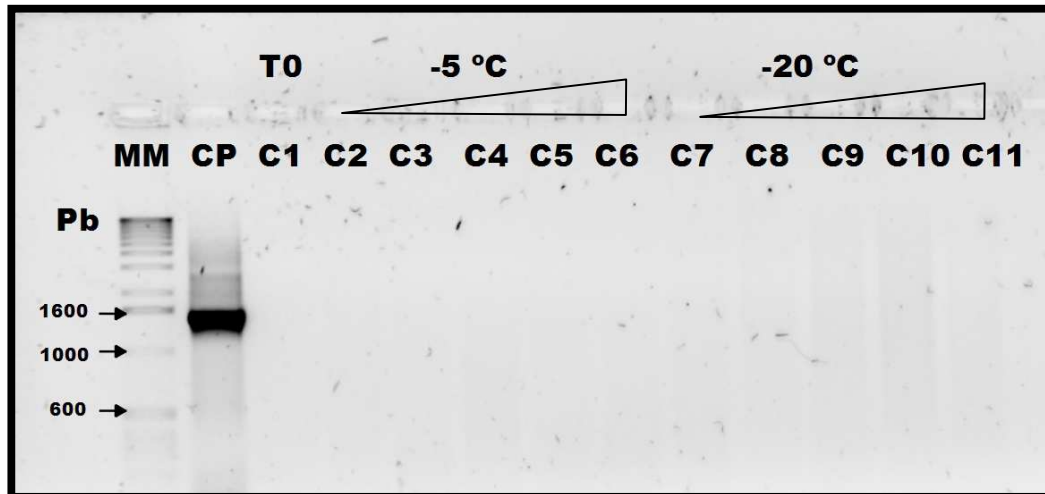


Figura 3.25 Productos de PCR del mADN usando iniciadores específicos de *Pseudomonas sp.*, de las muestras de pulpo incubadas durante su deterioro. En el carril CP, producto de PCR de una muestra control con iniciadores universales, C1 productos de PCR corresponde a la muestra del T<sub>0</sub>, de C2 a C6, Productos de PCR de las muestras incubadas a - 5 °C, en los carriles C7 a C11 productos de PCR de las muestras incubadas a - 20 °C.

### C) Análisis del metagenoma con iniciadores para *Salmonella*

En el análisis del metagenoma de pulpo con iniciadores específicos de *Salmonella*, los productos de PCR del gen 16S rRNA fueron separados por electroforesis (Figura 3.26), se puede observar que solo en los carriles correspondientes al control de reacción de PCR (CU) y control de la cepa de *Salmonella* (CS), se obtienen productos esperados y en ninguna de las muestras analizadas del metagenoma (C2 a C11), se amplificaron productos de PCR con estos iniciadores específicos.

El carril MM corresponde a los marcadores de peso molecular, en el carril CU, corresponde al control positivo de *Salmonella* amplificado con iniciadores universales; se obtuvo un fragmento de 1600 pb, en el carril CS; control positivo de *Salmonella* amplificado con iniciadores específicos de *Salmonella*, se obtuvo un fragmento de 900 pb. En carril C1 corresponde a muestra en T<sub>0</sub>; día del muestreo, en los carriles del C2 a C6 fueron muestras incubadas para deterioro a - 5 °C, en los carriles C7 a C11 corresponde muestras incubadas a - 20 °C, no se amplificó

productos de PCR en los diferentes días de muestreo, lo cual indica que no existe la presencia de *Salmonella* en las muestras analizadas en el trabajo, lo siendo esto importante ya que este microorganismo es tanto deteriorativo como patógeno para el ser humano. Se aisló y secuenció una cepa de *Salmonella entérica*, esto podría estar indicando que es mínima la presencia de ADN de *Salmonella entérica* en el mADN obtenido del pulpo en deterioro.

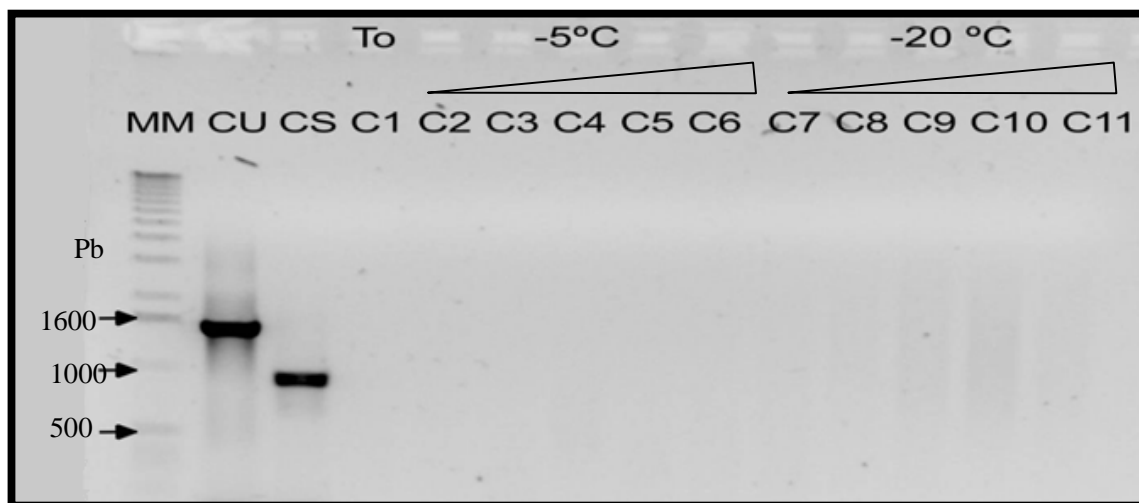


Figura 3.26 Análisis de la PCR del mADN con iniciadores específicos de *Salmonella* las muestras de pulpo incubadas durante su deterioro. MM, marcadores de peso moléculas de 1 kb. En el carril CU, producto de PCR de 1600 pb con iniciadores universales cepa control de *Samonella*; CU, producto de PCR de 900 pb de la cepa control de *Samonella* con iniciadores específicos, C1: muestra del To., de C2 a C6, productos de PCR de muestras incubadas a - 5 °C; en los carriles C7 a C11, productos de PCR de muestras incubadas a - 20 °C.

#### D) Análisis del metagenoma con iniciadores para *Shewanella putrefaciens*

Amplificación del gen 16S rRNA por PCR con iniciadores específicos para *Shewanella putrefaciens* en muestras del metagenoma de pulpo en deterioro, en la (Figura 3.27) se presenta la electroforesis realizada de los productos de PCR del gen 16s rRNA, el carril CP es el control positivo de reacción de PCR con iniciadores universales, en la cual se obtiene un fragmento de 1600 pb, de C1 al C6, corresponde a las muestras incubadas a - 5 °C amplificados con los iniciadores específicos, en los carriles C5 y C6 se obtuvo un fragmento de 1600 pb

correspondiente al tamaño esperado de acuerdo a los análisis bioinformáticos realizados de la PCR *in silico*, lo cual confirma la presencia de *Shewanella putrefaciens* en estos puntos de muestreo que corresponden al día 90 y 120; en los carriles C7al C11, corresponden a las muestras de - 20 °C; en dicha condición no fue posible obtener ningún producto de PCR, probablemente esta condición no sea favorable al crecimiento de dicho microorganismo; por tal motivo, no fue posible identificarlo; otra de las razones podría ser que en esta condición tarde más tiempo en observarse la presencia de *Shewanella putrefaciens* o está presente en cantidades bajas que no fue posible detectar por la PCR.

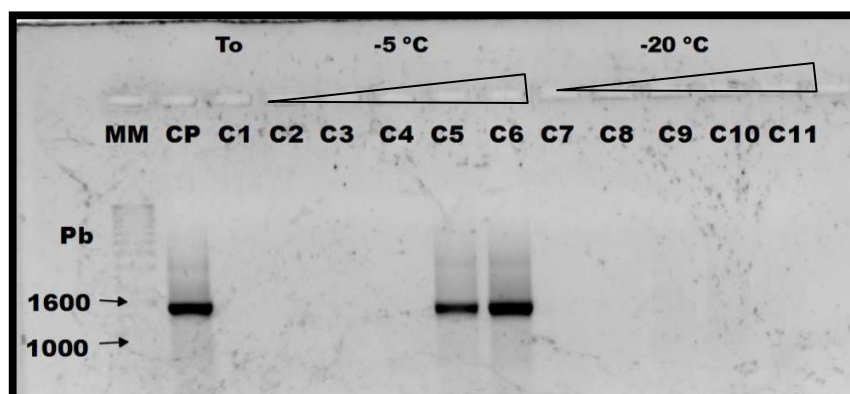


Figura 3.27 Electroforesis de los productos de PCR del gen 16S rRNA de bacterias presentes en pulpo durante su deterioro con los iniciadores específicos de *Shewanella putrefaciens*. En el carril CP, producto de PCR de control con iniciadores universales, C1 productos de PCR la muestra del To, de C2 al C6, Productos de PCR que corresponde a las muestras incubadas a - 5 °C, en los carriles C7 al C11, productos de PCR que corresponde a las muestras incubadas a - 20 °C.

El pulpo es un producto perecedero que se conserva a temperaturas de refrigeración y congelación; sin embargo está descrito que el deterioro de estos productos pesqueros es causado por acción microbiana de especies de *Shewanella* (Vogel *et al.*, 2005).

### E) Análisis del metagenoma con iniciadores para *Vibrio parahaemolyticus*

La electroforesis realizada a los productos de PCR del gen 16S rRNA del mADN con iniciadores específicos de *Vibrio parahaemolyticus* del procesos de deterioro de

pulpo (Figura 3.28), mostró que no se obtuvo fragmentos esperados del productos de PCR con los iniciadores específicos utilizados en ambas condiciones de temperatura analizadas en los diferentes puntos de muestreo.

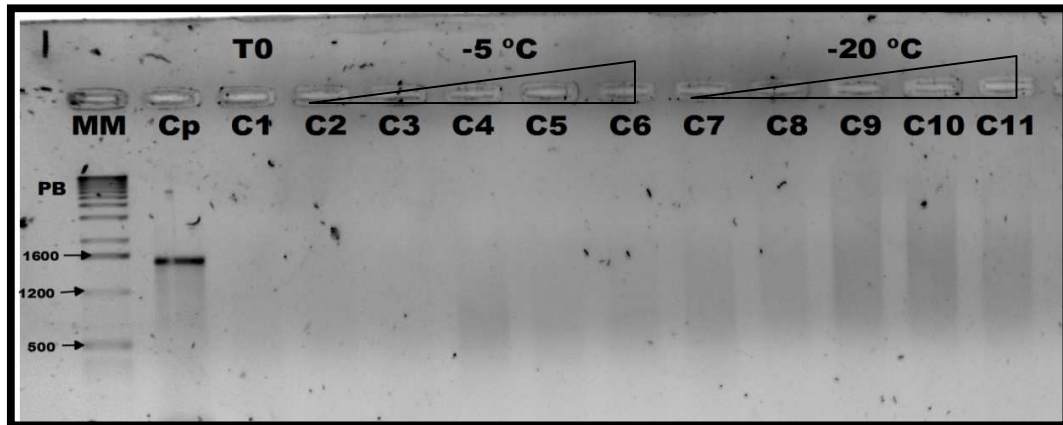


Figura 3.28 Productos de PCR del mADN con iniciadores específicos de *Vibrio parahaemolyticus* de las muestras de pulpo incubadas durante su deterioro. En el carril CP, producto de PCR de una muestra control con iniciadores universales; C1 productos de PCR corresponde a muestra del T<sub>0</sub>, de C2 a C6, Productos de PCR de muestras incubadas a - 5 °C, carriles C7 a C11: productos de PCR que corresponde a muestras incubadas a - 20 °C.

En el carril uno (MM) del gel de la electroforesis son los marcadores de peso molecular El control positivo (CP), de la reacción de PCR usando iniciadores universales el cual amplificó un producto de 1600 pb; en el carril C1 se cargaron los productos de PCR que corresponde a la muestra del tiempo cero. En los carriles C2 al C6, corresponden a las muestras a - 5 °C, de los carriles C7 al C11 corresponden a las muestras incubadas a - 20 °C. Este análisis demostró la ausencia de *Vibrio parahaemolyticus* en el metagenoma de pulpo en deterioro; lo cual es de importancia, ya que este microorganismo además de ser deteriorativo es también patogénico.

El estudio del metagenoma de pulpo permitió identificar con iniciadores específicos del gen 16S rRNA la presencia de *Shewanella putrefaciens* a los días 90 y 120 en la temperatura de - 5 °C, pero no en los demás días de muestreo y en otra condición de incubación. En tilapia almacenada en congelación se reportó que la presencia de *Shewanella putrefaciens* el causante de pérdida de calidad (Oramadike *et al* 2010);

así mismo se reportó la identificación de 23 cepas de *Shewanella putrefaciens* en estanques de peces y en el interior de las tilapias cultivadas, indicando una alta incidencia de estas cepas en alimentos marinos (Lu y Levin, 2010).

En la identificación de *Vibrio parahaemolyticus* en el metagenoma de pulpo no fue posible amplificar fragmento del gen 16S rRNA, una de las posibilidades es que en estas muestras no existiera la presencia de dicho organismo; sin embargo, existen reportes de otras especies de *Vibrio* encontradas en *Octopus maya*, como *Vibrio alginolyticus* mas no la de *Vibrio parahaemolyticus*. (Gamboa-Muñoz, 2011).

Para *Pseudomonas* y *Salmonella*, no se identificó su presencia en los estadios evaluados en las condiciones de incubación en el metagenoma de pulpo. Esto estaría indicando una probable ausencia de dichos microorganismos en las muestras evaluadas.

## Conclusiones

En el presente estudio se estandarizaron las condiciones de evaluación de los compuestos volátiles totales, por el método de microextracción en fase sólida, el cual demostró ser un método rápido y confiable, que permitió la identificación de compuestos marcadores de deterioro.

Se identificaron en muestras de pulpo deterioradas 11 compuestos volátiles conocidos como compuestos trazadores de deterioro, los cuales se mencionan a continuación: Dimetilamina, isopropilamina, TMA, ácido acético, ácido propiónico, ácido isobutírico, ácido butanoico, ácido pentanoico, ácido 4-metil pentanoico, ácido 2- metil pentanoico y ácido isobutilacético.

En las muestras almacenadas a - 5 °C y - 20 °C que fueron analizadas para determinar si presentan deterioro se identificó ácido acético a los 90 y 120 días de almacenamiento, lo cual estaría indicando que las muestras evaluadas en ambas condiciones de temperatura no presentan un deterioro avanzado. Cabe mencionar que a los 90 días a - 5 °C, el análisis molecular coincidió la presencia de *Shewanella putrefaciens* con la producción de ácido acético, estos microorganismo y este compuesto se presenta en las primeras etapas de deterioro de los alimentos.

Se cuenta con dos protocolos de extracción y purificación de ADN genómico y mADN de bacterias, los cuales fueron usados con éxito para la purificación del mADN de las muestras inducidas de deterioro en pulpo.

Se establecieron las condiciones óptimas de PCR de los diferentes iniciadores utilizados amplificando un fragmento del gen 16S rRNA. Estos resultados indican que estos iniciadores pueden ser utilizados para identificar microorganismos de un amplio espectro de géneros posibles.

Se estableció las condiciones óptimas de amplificación de la PCR con iniciadores específicos para *Salmonella*, lo cual puede servir para futuros diagnósticos de la presencia de este microorganismo en alimentos.

Se identificaron y publicaron en base de datos *GenBak* 11 cepas bacterianas obtenidas de pulpo.

Se identificaron y publicaron en base de datos *GenBak* 11 diferentes géneros de bacterias aisladas en pulpo en deterioro, entre las cuales podemos mencionar *Klebsiella oxytoca*, *K. pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Bacillus subtilis*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas putida*, *Shigella flexieri*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella entérica*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus casseliflavus*.

En la evaluación del metagenoma de pulpo con los iniciadores específicos de *Salmonella*, *Vibrio*, *Pseudomonas* y *Shewanella*, solo fue posible amplificar un fragmento de gen 16S rRNA en los tiempos de 60 y 90 días del almacenamiento a la temperatura de - 5 °C con los iniciadores específicos de *Shewanella putrefaciens*, en los demás tiempos de evaluación no fue posible amplificar fragmentos de los demás microorganismos analizados a pesar que el control con los iniciadores universales demostró la presencia de mADN de buena calidad al obtener con los iniciadores universales un fragmento de 1600 pb del gen 16S rRNA.

Los resultados indican que la temperatura de - 20 °C es la que permite almacenar los alimentos por un mayor periodo sin que se presente un deterioro severo. Nuestro trabajo muestra que con el uso combinado de herramientas cromatográficas y moleculares fue posible identificar compuestos y microorganismos trazadores de deterioro, el cual pudiera ser considerado en el diseño de estrategias para la conservación adecuada y consumo seguro de alimentos de origen marino.

**BIBLIOGRAFÍA.**

Acker J, Locksley E. (2003) Protective effect of intracellular ice during freezing. *Criobiology*; 46: 197-202.

Altinok I., Kayis S., Capkin E. (2006). *Pseudomonas putida* infection in rainbow trout. *Aquaculture*, 261 (3), pp. 850-855.

Arévalo Z., Clavijo A., Álvarez M., Conroy D., Santander J. (2003). Aislamiento de *Vibrio cholera* a partir de lisas y tilapias en Venezuela. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 23, 127- 130.

Arispe Ivello y Tapia María Soledad (2007). Inocuidad y calidad: Requisitos indispensables para la protección de la salud de los consumidores. *Agroalimentaria* No. 24.

Ayala-Labarríos L.A., Rodríguez-Herrera R., Aguilar-González C. N., Lara-Victoriano F. y Quero-Carrillo A. R. (2004). Detección de *Clavibacter michiganensis* subsp *nebraskensis* usando la reacción en cadena de la polimerasa. *Revista Fitopatología Mexicana* 22(2):239-245.

Bai Y., D'Aoust F., Smith D.L. and Driscoll B.T., (2002). Isolation of plant-growth-promoting bacillus strains from soybean root nodules. *Can. J. Microbiol.*, 48: 230-238.

Baixas-Nogueras S.; Bover-Cid S.; Vidal-Carou M. C.; Veciana-Nogués M. T. (2001). Volatile and nonvolatile amines in Mediterranean hake as a function of their storage temperature. *J Food Sci*, 66 (1): 83-88.



## BIBLIOGRAFIA

Ben-Gigirey B.; Vieites Baptista de Sousa, J. M.; Villa, T. G.; Barros-Velázquez, J. (1999). Histamine and cadaverine production by bacteria isolated from fresh and frozen albacore (*Thunnus alalunga*). *J Food Protect*, 62 (8): 933-939.

Bougeois C.M., Mescle J.F. and Zucca J. (1994). Microbiología Alimentaria. Vol. 1 Aspectos microbiológicos de la seguridad y calidad alimentaria. Arabia S.A. Zaragoza. p 235.

Bravo Martínez (2004). *El manejo higiénico de los alimentos*. Editorial Limusa.

Cabello A. M., Villarroel-Lezama R. del V., Figuera-García B. E., Ramos-Marcano M. C., Márquez-Figueroa Y. del V. y Vallenilla-González O. M. (2004). Parámetros de frescura de Moluscos. *Revista Científica*, vol. XIV, núm. 5, pp. 457-466.

Camacho-Villasana Y.M., Ochoa-Alejo N., Walling L. y Bray E.A. (2002) An improved method for isolating RNA from dehydrated and nondehydrated chili pepper (*Capsicum annuum* L.) plant tissues. *Plant Mol. Biol. Rep.* 20: 407.

Carballo-Bautista M. A. (2009). Foto tomada en centro de acopio Inpesmar, Celestun Yucatán. Colecta de muestras de pulpo *Octopus maya*.

Carballo-Bautista M. A. (2010). Foto tomada en el laboratorio de Química Analítica Alimentaria del Instituto Tecnológico de Mérida. Cromatógrafo de Gases con Espectro de Masas.

Casas L. (2005). Inocuidad bacteriológica en camarón para exportación en México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México.

Castro Gabriela (2007). Muestreo Estadístico.

## BIBLIOGRAFIA

Centeno-Briseño S. y Rodríguez-Bejarano R. (2007). Actividad enzimática de bacterias frecuentes en camarones (*Litopenaeus schmitti*), mejillones (*Perna viridis*) y calamares (*Loligo plei*) congelados producidos en Cumaná, Estado Sucre, Venezuela. *Rev. Soc. Ven. Microbiol*, vol.27, no.1, p.349-363.

Chun-Hung Liu, Winton Cheng, Jung-Ping Hsu, Jiann-Chu Chen (2004). *Vibrio alginolyticus* infection in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* confirmed by polymerase chain reaction and 16S rDNA sequencing. *Dis Aquat Org* 61: 169–174.

Cole J. R., Chai B., Farris R. J., Wang Q., Kulam S. A., McGarrell D. M., Garrity G. M. and Tiedje J. M. (2005). The Ribosomal Database Project (RDP-II): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*, Vol. 33.

CONAPESCA-SAGARPA. (2002). Estudio de la Cadena Productiva del Pulpo, elaborado por el Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores (ITESM).

CONAPESCA-SAGARPA. (2011). Anuario Estadístico de Pesca. Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca, Gobierno Federal. México.

CONAPESCA-SAGARPA. (2012). Anuario Estadístico de Pesca. Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca, Gobierno Federal. México.

Connell J. J. (1995). Control of fish quality. Ed. Fishing New. Ltd, Surry, Reino Unido, pp. 235.

Contreras-Araneda P. A. (2005). Suelos Contaminados Con Hidrocarburos: RNA 16S Como Indicador De Impacto. Memoria Para Optar Al Título De Ingeniero Civil En Biotecnología Santiago De Chile.

## BIBLIOGRAFIA

Cruz-Leyva M. C. (2010). Estudio de la comunidad bacteriana asociada al pulpo mediante técnicas moleculares. Tesis Doctoral. Unidad de Posgrado e Investigación. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Cuevas G.L. (2007). Aplicación de métodos modernos para la caracterización del origen floral de mieles de abeja de Yucatán. Tesis Doctoral. Departamento de Química y Bioquímica. Instituto Tecnológico de Mérida. México.

Delgado-Bottini A.; Valls-Puig J. y Tomé-Boshian E. (2000). Evaluación de aminas biogénicas, microbiológica y sensorial de sardina (*Sardinella aurita*) durante su almacenamiento en hielo. Revista Científica (FCV-LUZ). X(6):494-502.

Du W. X., Lin C. M., Phu A. T., Cornell J. A., Marshall M. R., Wei C. I. (2002). Development of biogenic amines in yellow fin tuna (*Thunnus albacares*): Effect of storage and correlation with decarboxylase-positive bacterial flora. *J Food Sci*, 67 (1): 292-301.

Eerola S.; Hinkkanen R.; Lindfors E.; Hirvi T. (1993). Liquid Chromatographic Determination of Biogenic Amines in Dry Sausages. *J. Aoac Int.* 76(3): 575-578.

Espinoza E., Revollo S. y Espada A. (2007). Identificación de *Salmonella sp.*, mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa Anidado (Nested PCR) y técnicas convencionales en huevos recolectados en los principales mercados de la ciudad de La Paz. *Visión Científica No.2 Vol. 1.*

FAO (1991). Documento Técnico de Pesca. No. 334. Roma, FAO. 174p.

Fernández-Escartin E., (1981) Microbiología Sanitaria, Agua y Alimentos. Vol .EDUG/Universidad de Guadalajara. pp 541-542.

Fonnesbech-Vogel B., Jørgensen K., Christensen H., Elmerdahl-Olsen J., and Gram L. (1997). Differentiation of *Shewanella putrefaciens* and *Shewanella alga* on the

## BIBLIOGRAFIA

Basis of Whole-Cell Protein Profiles, Ribotyping, Phenotypic Characterization, and 16S rRNA Gene Sequence Analysis. *Applied And Environmental Microbiology*, P. 2189–2199.

Gamboa-Muñoz A. M. (2011) Evaluación Microbiológica y Diseño de un PCR para la Detección de *Vibrio sp.* En el pulpo *Octopus maya*. Tesis licenciatura Instituto Tecnológico De Mérida. Mérida Yucatán México. Pag. 32.

Giese J. (2001). New microorganism detection methods introduced. *Food Technology* 55(7):68-69.

Gram L, Dalgaard P. (2002). Fish spoilage bacteria-problems and solutions. *Curr Opin Biotechnology*.; 13:262-266.

Gentry-Weeks C., Hutcheson H., Kim L, Bolte D., Traub-Dargatz J., Morley P. (2002). Identification of two phylogenetically related organisms from feces by PCR for detection of *Salmonella* spp. *J Clin Microbiol*;40:1487-1492.

Guía de Prácticas de Microbiología Ambiental (2001). Departamento de Microbiología 2. Facultad de Formación Universidad Complutense pp 13.

Gorodezky C. (2000). Manual de procedimientos de genética molecular. Departamento de Inmunogenética del Indre. México. 70.

Handelsman J., (2004) Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68, 669-685.

Handelsman J., Rondon M., Brady S.F., Clardy j. and Goodman R.M. (1998). Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes, a new frontier for natural products. *Chemistry and Biology* 5,245-249.

## BIBLIOGRAFIA

Hataway S. (1997) Development of food safety risk assessment guidelines for foods of animal origin in international trade. J Food Prot.; 60:1432-38.

Hielm S, Björkroth J, Hyytiä E, Korkeala H. (1998). Prevalence of *Clostridium botulinum* in finnish trout farms: Pulsed-field gel electrophoresis typing reveals extensive genetic diversity among type E isolates. Appl Environ Microbiol; 64:4161-4167.

Hoffmann, V. Stroobant (1999). Espectrometría de masas, principios y aplicaciones. 2nd Ed.

Holben WE, Jansson JK, Chelm BK, Tiedje JM (1988). DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community. Appl. Environ. Microb. 54: 703-711.

Hörmansdorfer S., Helmut W., Neugebauer-Büchler K. and Baue J. (2000). Isolation of *Vibrio alginolyticus* from seawater aquaria International Journal of Hygiene and Environmental Health .Volume 203, Issue 2, Pages 169-175.

Huber I., Spanggaard B., Appel K.F., Rossen L., Nielsen T. and Gram L. (2004). Phylogenetic analysis and *in situ* identification of the intestinal microbial community of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). Journal of Applied Microbiology, 96, 117–132.

Huss H.H. (1988). Fresh fish - quality and quality changes. A training manual prepared for the FAO/DANIDA Training Programme on Fish Technology and Quality Control. Rome, FAO, FAO Fisheries Series, 29:132p.

Huss H.H. (1997). Aseguramiento de la Calidad de los productos Pesqueros Documento técnico de pesca N° 334. Roma. FAO.

## BIBLIOGRAFIA

Huss H.H. (1999) El Pescado Fresco: Su Calidad y Cambios de su Calidad. FAO. Documento Técnico de pesca 348.

Hwi-Chang C., Yu-Ru H., Hsiu-Hua H., Chung-Saint L., Wen-Chieh C., Chia-Min L. and Yung-Hsiang T. (2010). Determination of histamine and biogenic amines in fish cubes (*Tetrapturus angustirostris*) implicated in a food-borne poisoning. Food Control. Volume 21 páginas 13-18.

Iglesias J., Medina I. (2008). Solid-phase microextraction method for the determination of volatile compounds associated to oxidation of fish muscle. Journal of Chromatography A, 1192 9–16.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) presenta la Perspectiva estadística Yucatán. Diciembre 2012.

Jan, J. y LeBorgne, S. (2001). Uso de técnicas moleculares para realizar estudios de biodiversidad microbiana en ambientes petroleros. BioTecnología 5(3):103-109.

Jiménez-Vera R. (2001). Evaluación de la carga bacteriana en productos pesqueros de importancia económica en congeladoras Yucatecas, Tesis para optar al grado de Maestro en Ciencias. Facultad de Ingeniería Química. Universidad Autónoma de Yucatán.

Johnsen K., Enger O., Jacobsen-Carsten S., Thirup L. and Torsvik V. (1999). Quantitative Selective PCR of 16S Ribosomal DNA Correlates Well with Selective Agar Plating in Describing Population Dynamics of Indigenous *Pseudomonas* spp. in Soil Hot Spots. Applied and Environmental Microbiology, apr. P. 1786–1789.

Kennedy J., Flemer B., Jackson S. A., Lejon D., Morrissey J., O’Gara F. and Dobson A. (2010). Marine metagenomics: New Tools for the Study and Exploitation of Marine Microbial Metabolism. Mar. Drugs, 8, 608-628.

Kim D.H., Brunt J. and Austin B. (2007). Microbial diversity of intestinal contents and mucus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Applied Microbiology* 102:1654-1664.

Lakshmanan R.; Leya S.; Leyasekaran G. (2002). Survival of amine-forming bacteria during the ice storage of fish and shrimp. *Food Microbiology*. 19, 617-625.

Lampel-Keith A., Orlandi-Palmer A. And Kornegay L. (2000). Improved Template Preparation for PCR-Based Assays for Detection of Food-Borne Bacterial Pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, oct. P. 4539–4542.

Lee K.D., Bai Y., Smith D., Han H.S., Supanjani (2005). Isolation of Plant-Growth-Promoting Endophytic Bacteria from Bean Nodules *Res. J. Agric. & Biol. Sci.* 1(3): 232-236.

Lee J. L. and Levin R. E. (2006). Selection of Universal Primers for PCR Quantification of Total Bacteria Associated With Fish Fillets *Food Biotechnology*, 20:275–285.

Lehane L.; Olley J. (2000). Histamine fish poisoning revisited. Review. *Int J Food Microbiol*, 58: 1-37.

López-Sabater E. I., Rodríguez-Jerez J. J., Roig-Sagués A. X., Mora-Ventura M. T. (1994). Bacteriological quality of tuna fish (*Thunnus thynnus*) destined for canning: Effect of tuna handling on presence of histidine decarboxylase bacteria and histamine level. *J Food Prot*, 57: 318-323.

Louie M., Louie L. and Simor A. E. (2000). The role of ADN amplification technology in the diagnosis of infectious diseases. *CMAJ* 163(3):301-309.

## BIBLIOGRAFIA

Lu S. and Levin R.E. (2010) *Shewanella* in a tilapia fish farm. *Journal of Fisheries Sciences.com* 4(2): 159-170.

Lund M.B., Baird-Parker T.C.; Gould G. W. (Editors). (2000a). *Microbiological Safety and Quality of Food, Volumes 1-2*. Springer - Verlag. (Libro clásico).

Lund M.B.; Baird-parker T.C. y Gould G.W. (2000b). *The microbiological safety and quality of food*, aspen publication.

Madigan M.T. Martinko J.M. Parker J.B. (2004) *Biología de los microorganismos*. 10ª edición. Pearson Education, S.A., Madrid.

Madigan M., Martinko J. y Parker J. (1999). *Brock Biología de los microorganismos*. 8ª ed. Madrid, Prentice Hall,. 1064p.

Manriquez-Allyson D. (2006) *Bases volátiles totales: Origen, Mecanismos, Determinación y Prevención de su formación en productos Marinos*.

McIntosh D., Forward B.F., Puvanendran V., Boyce D., Ritchie R., (2008). Culture-independent characterization of the bacterial populations associated with cod (*Gadus morhua* L.) and live feed at an experimental hatchery facility using denaturing gradient gel electrophoresis. *Aquaculture*. 275:42-50.

Mhango M., Mpuchane S. and Ba G. (2010). Incidence of indicator organisms, opportunistic and pathogenic bacteria in fish. *African Journal of Food Agriculture Nutrition and Development*. Volume 10 No. 10 October.

*Microbial Ecology* (1999). Ribosomal RNA as a tool in microbial ecology. *Molecular Microbial Ecology Workshop* Nayagüez.



## BIBLIOGRAFIA

Morón C. y Dárdano C. (2001). Importancia del Codex Alimentarius en la seguridad alimentaria y el comercio de alimentos. Oficina Regional de la FAO, Santiago de Chile.

Newton C.R., Graham G.A. (1997). PCR. Introduction to bitechniques. In: D. Billington (eds). Second edition. Bios Scientific Publishers. Oxford, U.K. 190.

Nishikawa H., Tabata T., Kitani S. (2012). Simple Detection Method of Biogenic Amines in Decomposed Fish by Intramolecular Excimer Fluorescence Food and Nutrition Sciences, 2012, 3, 1020-1026.

NOM-031-SSA-1993 Bienes y servicios. Productos de la pesca. Moluscos bivalvos frescos-refrigerados y congelados. Especificaciones sanitarias.

NOM-092-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.

NOM-109-SSA1-1994. Bienes y servicios. Procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

NOM-110-SSA1-1994. Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

NOM-129-SSA1-1995. Bienes y servicios. Productos de la pesca: secos-salados, ahumados, moluscos cefalópodos y gasterópodos frescos-refrigerados y congelados. Disposiciones y especificaciones sanitarias.

NMX-F-206-1986. Determinación de acidez total por titulación volumétrica con NaOH.

## BIBLIOGRAFIA

Novella-Rodríguez S., Veciana-Nogués M.T., y Vida-Carou M.C. (2000). Biogenic amines and polyamines in miles and cheeses by ion-pair High Performance Liquid Chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 48:5117-5123.

Okura M., Osawa R., Atsushi I., Takagi M., Arakawa E, Terajima J., and Watanabe H. (2004). PCR-Based Identification of Pandemic Group *Vibrio parahaemolyticus* with a Novel Group-Specific Primer Pair. *Microbiol. Immunol.*, 48(10), 787–790.

Oladosu-Ajayi, R.N.; George, F.O.A.; Obasa, S.O.; Ajayi, A. A. and Bankole M.O. (2011). Bacterial load, composition and succession in the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) held at ambient temperatures. *Researcher.* 3(7):67-73.

Olivera, N.L., Sequeiro, C., Nievas, M.L. (2007). Diversity and enzyme properties of protease-producing bacteria isolated from sub-antarctic sediments of Isla de los Estados Argentina. *Extremophiles* 11 517-526.

Oramadike C.E., Ibrahim A.O., Adejonwo O.A., Akande G.R., and Kolade O. (2010). Post Harvest Quality Changes in wild *Tilapia melanotheron* and *Chryaschtys negrodigitatus* Obtained from ogudu/ Agboyi Lagoon South-West Nigeria. *World Journal of Fish and Marine sciences* 2(3):216-220.

Pace N.R., Stahl D. A., Lane D. J., and Olsen G. J. (1986). The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. *Adv. Microb. Ecol.* 9:1–55.

Pascual-Anderson MR, Calderón-Pascual V (2000). *Microbiología de los alimentos: metodología analítica para alimentos y bebidas.* Editorial Díaz de Santos, pp 122–125.

Pantel JB, Leonard DG, Pan X, Musser JM, Berman RE, Nachamkin I. (2000). Sequence based identification of *Mycobacterium* species using the MicroSeq 500 16S rDNA bacterial identification system. *J Clin Microbiol*;38: 2 4 6-51.

Pham A.J., Schilling M.W., Yoon Y., Kamadia V.V., Marshall D.L. (2008). Characterization of Fish Sauce Aroma-Impact Compounds Using GC-MS, SPME-Osme-GCO, and Stevens' Power Law Exponents Journal of Food Science. Volume 73, Issue 4, pages C268–C274.

Pastoriza, L.; Sampedro, G.; Herrera, J. J.; Cabo, M. (1996). Effect of modified atmospheres packaging on shelf-life of iced fresh hake slices. J Sci Food Agr, 17: 541-547.

Pérez-Lozada, M., A. Guerra y A. San Juan. (2002). Allozyme divergence supporting the taxonomic separation of *Octopus mimus* and *Octopus maya* from *Octopus vulgaris* (Cephalopoda: Octopus). Bull. Mar. Sci. 71(2): 653-664.

Pérez-Pérez M., Santos-Valencia J., Burgos-Rogerio W., Kusunoki A. (2004). "Evaluación de la población de pulpo (*Octopus maya*) en la península de Yucatán 2004". S.A.G.A.R.P.A, INP.

Quitral V., Abugoch-James L., Vinagre J., Guarda M. A., Larraín-Barth, M. y Santana, G. (2003). Efecto de tratamientos térmicos sobre las características químicas de carne de jaiba mora (*Homalaspis plana*). Disponible <http://hdl.handle.net/2250/13472>.

Rappé M. S. and Giovannoni S. J. (2003). The uncultured microbial majority. *Annu. Rev. Microbiol.* 57: 369-394.

Razkin V. (2000). Especificidad y sensibilidad de la PCR para detectar *Salmonella* spp. en cultivos puros y en alimentos. Ingeniero Técnico Agrícola (Industrias Agroalimentarias), Universidad Pública de Navarra.

## BIBLIOGRAFIA

Reyes M G. y Arocha P. (2000). Determinación del tiempo de vida útil de filetes de bagre cacumo (*Bagre marinus*) almacenado en hielo. Saber, Universidad de Oriente, Venezuela. vol. 12. Nº 1 48-53.

Rocha R. J.C. (2003). Detección de *Pantoea stewartii* directamente de la semilla de maíz usando la técnica inmuno-PCR. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Coahuila. Saltillo Coahuila, México. 56p.

Robles E. (1994). Contaminación de moluscos, Información Científica y Tecnológica 16(217):40.

Rodicio M., Mendoza MC. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*; 22: 238-45.

Rodriguez, J.L.M., Silva-Stenico, M.E., Gomes, J. E., Lopes, J.R.S., and Tsai, S.M. (2003). Detection DNA diversity assessment of *Xylella fastidiosa* in field-collected plant DNA insect.

Rodríguez, C.; Masoud, T.; Huerta, M. D. (1997). Estudio de los principales productos de degradación de la trimetilaminaoxido en cuatro especies de pescado sometidas a refrigeración. *Alimentaria*, 288: 131-135.

Rojas H. R., González F.T. (2006). Detección e identificación de bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos mediante la reacción en cadena de la polimerasa. *Bioquímica*. Distrito Federal, México. 31, 69-76.

Rosas GA, Acosta VM. (2001). Manual de manejo higiénico de los alimentos. México, D.F.: Secretaría de Salud.

## BIBLIOGRAFIA

Ruiz-Capillas, C. y Moral, A. (2001). Production of biogenic amines and their potential use as quality control indices for hake (*Merluccius merluccius*, L.) stored in ice. *Journal of Food Science* 66(7): 1030-1032.

Sánchez-Cascado S. P. (2005). Estudio de alternativas para la evaluación de la frescura y la calidad del boquerón (*Engraulis encrasicolus*) y sus derivados Tesis doctoral, Universidad Barcelona, España.

Sánchez- Leal L. C., Corrales-Ramírez L. C. (2005). Evaluación de la congelación para conservación de especies autóctonas bacterianas. *Publicación Científica* Vol.3 no. 4:1-116

Secretaría de Salud Pública, NOM-109-SSA1-1994. Bienes y servicios. "Procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico" México (DF): SSA, 1994.

Secretaría de Salud Pública, NOM-129-SSA1-1995. Bienes y servicios. Productos de la pesca: secos-salados, ahumados, moluscos cefalópodos y gasterópodos: frescos-refrigerados y congelados. Disposiciones y especificaciones sanitarias.

Solís-Ramírez, M.J. (1994). Molusca de la Península de Yucatán, México. En: Recursos faunísticos del Litoral de la Península de Yucatán. A. Yáñez- Arancibia (ed.). Univ. Aut. De Camp., EPOMEX. Serie Científica (2):136 p

Solís-Ramírez, M. J., F. Arreguín-Sánchez y J. C. Seijo. (1997b). Pesquería de pulpo de la plataforma continental de Yucatán, p 61-80. En: D. Flores-Hernández, P. Sánchez-Gil, J. C. Seijo y F. Arreguín-Sánchez (Eds.). Análisis y Diagnóstico de los Recursos Pesqueros Críticos del Golfo de México. Universidad Autónoma de Campeche. EPOMEX Serie Científica, 7. 496 p.

## BIBLIOGRAFIA

Solís-Ramírez, M. J. (1962). Contribución al estudio del pulpo (*Octopus vulgaris*, Lamarck) de la Sonda de Campeche.

Solís-Ramírez, M. J. (1967). Aspectos biológicos del pulpo, *Octopus maya*, Voss y Solís. Publ. I.N.I.B.P.

Solís-Ramírez, M. J. (1975). Posibilidades de la pesca del pulpo de la Península de Yucatán. Publ. Inst. Mex. Com. Ext.

Solís-Ramírez, M. J. (1988). El recurso pulpo del Golfo de México y el Caribe. En: Los Recursos Pesqueros del País. Instituto Nacional de la Pesca.

Solís-Ramírez, M. J. (1997a). The *Octopus maya* fishery of the Yucatan Peninsula. En: Lang, Hochberg & Ambrose (Eds.). The Fishery and Market Potential of Octopus in California.

Stahl, D. A., Flesher B., Mansfield H. R., and Montgomery L. (1988). Use of phylogenetically based hybridization probes for studies of ruminal microbial ecology. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:1079–1084.

Torsvik V., Goksoyr J. y Daae F. L. (1990). High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 782-787.

Torsvik, V., L. Øvreås, and T. F. Thingstad (2002). Prokaryotic diversity- Magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science* 296: 1064-1066.

Veciana-Nogués, M. T; Mariné-Font, A.; Vidal-Carou, M. C. (1997). Changes in biogenic amines during the storage of Mediterranean anchovies immersed in oil. *J Agric Food Chem*, 45: 1385-1389.

Villadas PJ, Martínez-Abarca F, Toro N (2002). *Anal Biochem* 300:101-103.

Villarroel R.; Cabello A.; Figuera B., and Vallenilla O. (2001). Características bromatológicas de moluscos comerciales. Memorias del VI Congreso Científico de la Universidad de Oriente. 5 al 7 diciembre. <File:///D:/ALIMENTOS/TA006.HHTML>. Diciembre. 2001.

Vogel B.F., Venkateswaran K. Satomi M., Gram L. (2005). Identification of *Shewanella baltica* as the Most Important H<sub>2</sub>S-Producing Species during Iced Storage of Danish Marine Fish. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 6689–6697.

Ward O. (1991). *Biología de la fermentación: Principios, Procesos y Productos*. España. Acribia.

Wiley John & Sons Ltd, (2004). *Molecular Genetics of Bacteria*.

Wilson-Kenneth H., Blitchington-Rhonda B., and Greene-Ronald C. (1990). Amplification of Bacterial 16S Ribosomal DNA with Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, sept. p. 1942-1946.

Wong, K.; Bartlett, F.; Gill, T. A. (1988). A diagnostic test strip for the semiquantitative determination of trimethylamine in fish. *J Food Sci*, 53 (6): 1653-1655.

Wong, K.; Gill, T. A. (1987). Enzymatic determination of trimethylamine and its relationship to fish quality. *J Food Sci*, 52 (1): 1-3 y 6.

Yagoub-Sanaa O. (2009). Isolation of *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas spp.* from raw fish sold in fish market in Khartoum state *Journal of Bacteriology Research* Vol. 1(7), pp. 085-088, October.

Zavala-Castro J. E. (2005). *Manual de técnicas básicas de Biología Molecular*. Edición de la Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, Yucatán, México.

Ziemke F., Manfred G. Hofle, Lalucat J. and Rossello-Mora R. (1998).  
Reclassification of *Shewanella putrefaciens* Owen's genomic group II as *Shewanella baltica* sp. nov. International Journal of Systematic Bacteriology, 48, 179–186.

Paginas usadas de la red.

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/DQ197952.1>
- <http://insilico.ehu.es/PCR/>
- <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>
- Gene Runer ® versión 3.05
- <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>



**ANEXOS**

**A.1 Artículos**

**A.1.1 Revista Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ISSN 0864-4497)**



Instituto de Investigaciones para la Industria Alimentaria  
Carretera al Guatao km 3½, La Habana 19200, Cuba  
Teléfono: (537) 202 0919 E-mail: agu@iiaa.edu.cu

La Habana, Octubre 9 de 2013

A Quien pueda interesar:

Me es grato comunicar que el trabajo: Identificación de los compuestos volátiles del deterioro en el pulpo *Octopus maya*, de los autores Miguel A. Carballo-Bautista, Luis F. Cuevas-Glory, María de Lourdes Vargas y Vargas, Enrique Sauri-Duch y Elsy Noemí Tamayo-Canul, ha sido ACEPTADO para su publicación en la revista Ciencia y Tecnología de Alimentos. Este trabajo saldrá publicado en el No. 3 del presente año.  
En espera de su atención, reciba mis saludos cordiales,

Dr. Cs. Jorge A. Pino  
Editor

Miguel A. Carballo-Bautista\*, Luis F. Cuevas-Glory, María de Lourdes Vargas y Vargas,  
Enrique Sauri-Duch, Elsy Noemí Tamayo-Canul

Instituto Tecnológico de Mérida, División de Estudios de Posgrado e Investigación, km 5  
Carr. Mérida-Progreso. C.P.97118. Mérida, Yucatán, México. Tel. y Fax: (999)9448479.

E-mail: lfcuevas@yahoo.com

\*Miguel A. Carballo-Bautista: Graduado de Ingeniero Bioquímico (Instituto Tecnológico de Mérida, México 2001), cDr. En ciencias bioquímicas y biotecnología de alimentos (Instituto Tecnológico de Mérida, México 2013). Su temática de trabajo abarca estudio de inocuidad alimentaria, análisis de compuestos volátiles en alimentos en estado deteriorativo e identificación de microorganismos en alimentos por métodos de biología molecular.

#### **ABSTRACT**

In this work it was evaluated and identified total volatile compounds in samples of Octopus maya during decomposition by using headspace-solid-phase microextraction (HS-SPME) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The samples were analyzed from the first day of capture until 21 days after treatment of freezing. A total of 11 volatile compounds involved in the degradation of O. Maya were identified. The volatiles of Octopus samples were analyzed by using PDMS and DVB SPME fibers. Several extraction times and temperature conditions were tested in order to achieve optimum conditions for the analysis. By using the PDMS fiber was possible identifying trimethylamine and isopropylamine, and by using DVB fiber, dimethylamine. These compounds are usually used as indicators of food decomposition. Also, was possible detecting acetic acid, which, is a compound related to food spoilage in the early stages.

Palabras clave: Aminas Biogénicas, HS-SPME, CG-EM

### **A.1.2 Evaluación de la dinámica microbiana en el pulpo (*Octopus maya*) durante su deterioro. (ISBN 978-607-7912-04-0)**

<sup>1</sup>Carballo-Bautista Miguel A. \*, <sup>1</sup>Lugo-Gimenez Norma, Kantun-Can Romi A. <sup>1</sup>Vargas y Vargas Lourdes, <sup>1</sup>Sauri-Duch Enrique. y <sup>1</sup> Tamayo-Canul Elsy N.

<sup>1</sup>Instituto Tecnológico de Mérida, División de Estudios de Posgrado e Investigación. Km. 5 Carr. Mérida-Progreso. C.P.97118. Mérida, Yucatán, México. Tel. y Fax: (999)9448479.

[etamayo@itmerida.mx](mailto:etamayo@itmerida.mx)

La producción de pescados y moluscos ha emergido como una industria importante en el estado de Yucatán (Solís-Ramírez *et al.*, 1997). Para las industrias productoras de estos alimentos y para las autoridades sanitarias es prioritario asegurar la calidad de los mismos, ya que en la cadena productiva el pulpo pasa largo tiempo congelado y en estas condiciones ciertos microorganismos psicrófilos sobreviven y continúan su crecimiento provocando su deterioro (Jimenez-Vera., 2001). El deterioro de los alimentos de origen marino se puede originar por fenómenos autolíticos, químicos y microbiológicos (FAO, 1991). Por esto es importante aislar e identificar la carga microbiana en estos productos para un mejor manejo poscaptura. El objetivo de este trabajo es evaluar la carga de bacterias psicrófilas del pulpo (*Octopus maya*) durante su proceso de deterioro.

**A.2 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA ELECTROFORESIS DE ADN****A.2.1 BUFFER DE RESOLUCIÓN STOCK TRIS-ACETATO (TAE) 50X**

Reactivo	Cantidad	Concentración final
Tris base	242 g	1,9 M
Ácido acético glacial	571 ml	57,1%
EDTA 0,5M Ph8, 0	100 ml	0,05 M
Completar con 1 Litro de agua bidestilada		

**A.3 BUFFER DE CARGA ADN (6X)**

Reactivo	Cantidad	Concentración final
Azul de bromofenol	25 mg	0,25% w/v
Xilene cianol FF	25 mg	0,25% w/v
Sacarosa	4 g	40% w/v
Disolver en 10 mL de TAE 1X		

**A.4 AGAROSA 0,8%, 1,5% Y 2%**

Agarosa Disolver 0,8 g, 1,5 g ó 2 g  
 Agua bidestilada de en 98 ml de. Adicionar a la solución 2 ml de TAE 50X,  
 homogeneizar y disolver la agarosa en horno microondas o en baño María.

**A.5 Buffer T.E. pH 8.0 (.5 M Tris-HCl, 50 mM EDTA )**

Reactivo	Concentración final	Cantidad
Tris-HCl	.100 M	7.878 g
E.D.T.A.	.050 M	9.35 g
Agua destilada aforar a		500 ml

**A.6 TEN pH 8.0 (0.1 M Tris-HCl, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl)**

Reactivo	Concentración final	Cantidad
Tris-HCl	.100 M	7.878 g
E.D.T.A.	.050 M	9.35 g
NaCl	.500 M	14.6 g
Agua destilada aforar a		500 ml

**A.7 Formulación de medios selectivos para *Pseudomonas* agar F y agar P**

***Pseudomonas* Agar F Base Composición (g / litro):**

Peptona de caseína 10 gr; peptona de carne 10 gr; sulfato de magnesio 1,5 gr; fosfato de potasio dibasico 1,5 gr; agar-agar 12.0 gr. 10 ml de glicerol.

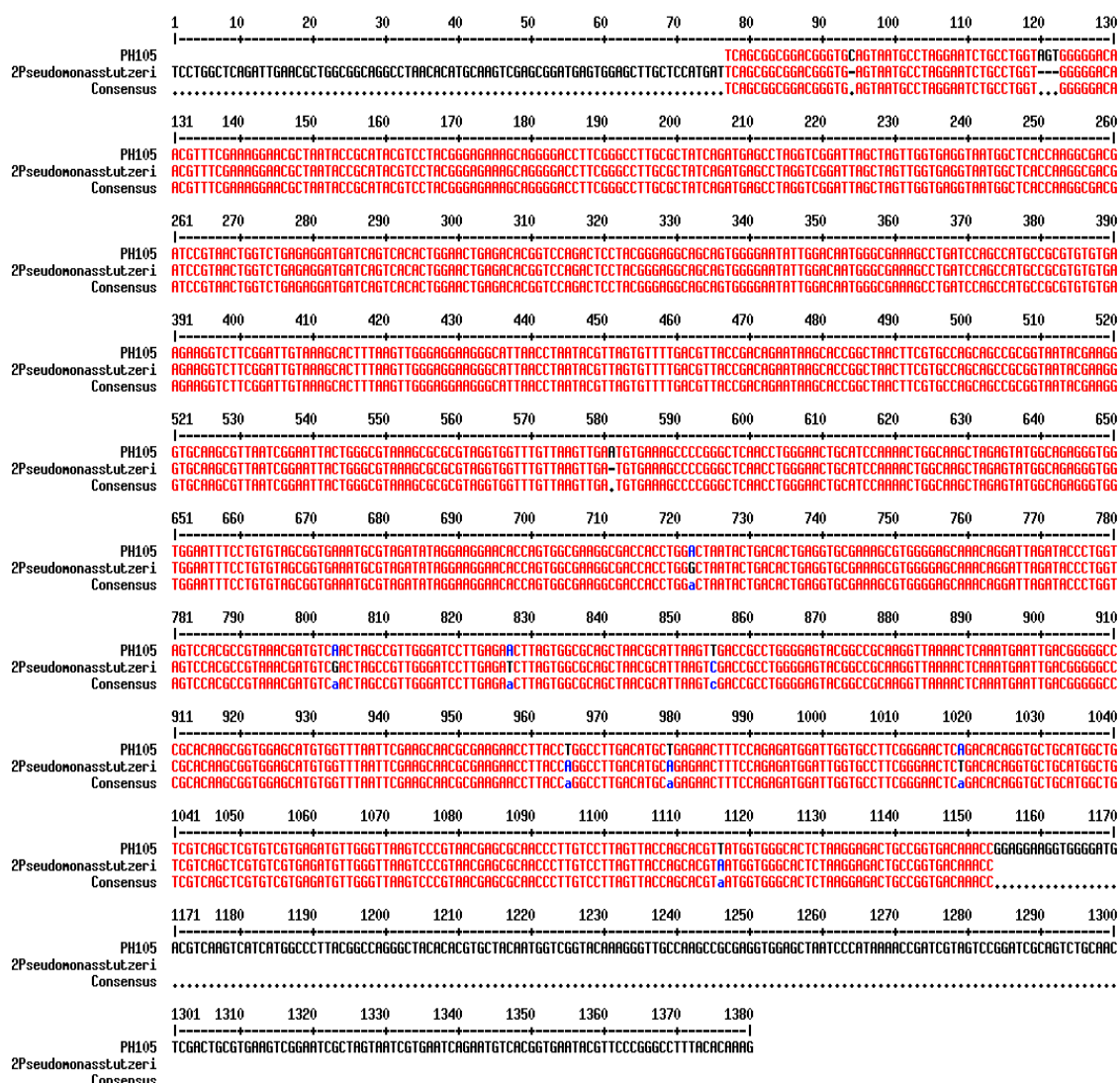
***Pseudomonas* Agar P Base Composición (g / litro):**

Peptona 20 gr; cloruro de magnesio 1,4 gr; sulfato de potasio 10 gr; agar-agar 12.6 gr y 10 ml de glicerol.

**Anexo B Anexos de resultados moleculares (alineamiento y secuencias)**

**Anexo B1 alineamiento de la cepa PH105**

En la Figura B1 se presentan la secuencia ensamblada de la cepa PH105 comparada en la base de datos obteniéndose el siguiente alineamiento con un 95 % de similitud (color rojo), con las secuencia comparadas que corresponden a para *Pseudomonas stutzeri*.



**Figura B1. -Alineamiento de la secuencia ensamblada de la cepa PH105, la cual presentó un 95 % de homología con *Pseudomonas stutzeri***

**Anexo B2 secuencias de las cepas reportadas en la base de datos.****>CL101** *Flavobacteriaceae bacterium*

TAGCTTGCTATCCAGAGAGCGGCGCACGGGTGCGTAAACAGTGTGCAACCTACCTTTATCTGGGGGATAGCCTTTTCAAAG  
 GAAGATTAATACCCATAATAAATTGATGGCATCATTGATTATTGAAAACCTCCGGTGGATAGAGATGGGCACGCGCAAGATT  
 AGATAGTTGGTGGGTAACGGCTCACCAAGTCAATGATCTTTAGGGGCTCTGAGAGGGAGATCCCCACACTGGTACTGAG  
 ACACGGACCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAAGGAATATTGGACAATGGGTGAAAGCCTGATCCAGCCATCCCGCGTG  
 AAGGATGACGGTCTATGGATTGAAACTTCTTTGTACAGGGATAAACCTACTCTCGTGAGGGTAGCTGAAGGTACTGTAC  
 GAATAAGCACCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGTTTAAA  
 GGGTCCGTAGGCGGACCCCGTAAGTCAGTGGTGAATCTCATAGCTTAACTATGAAACTGCCATTGATACTGCGGGTCTTG  
 AGTAAATTTGAAGTGGCTGGAATAAGTAGTGTAGCGGTGAAATGCATAGATATTACTTAGAACACCAATTGCGAAGGCAGGT  
 CACTAAGATTTAACTGACGCTGATGGACGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAC  
 GATGCTAACTCGATTTTTCGGATTTTCGAGATTTCAGAGACCAAGCGAAAGTGAATAAGTTAGCCACCTGAGGAGTACGTCGCAAG  
 AATGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGATTATGTGGTTTAAATTCGATGATACGCGAGGAACCTTA  
 CCAAGACTTAAATGGGAATTGACAGATTTAGAAATAGATCCTCCTTCGGGCAATTTTCAAGGTGCTGCATGGTTGTCGTCAG  
 CTCGTGCCGTGAGGTGTTAGGTTAAGTCTGCAACGAGCGCAACCCCTGTCACTAGTTGCTAACATTAAGTTGAGGACTCTA  
 GTGAGACTGCCAAGTACGCAAGTAGAGAGGAAGGTGGGATGATGCAAAATCATCAGCGCCCTTACGTCTTGGGCCACACAGC  
 TAATAAATGGCCGTACAGAGGGCAGCTACACAGCGATGTGATGCAAATCTCGAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGAGT  
 CTGCAACTCGACTCTATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGCATCAGCCATGGCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGT  
 ACACACCGCCCGTCAAGCCA

**>CL103** *Acinetobacter baumannii*

GGTAACAGGAGAAGCTTGCCTTCTTGCTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATACTTAGGAATCTGCCAGTAGTGGGGGA  
 TAGCTCGGGGAAACTCGAATTAATACCGCATACACCCTACGGGAAAAGGGGCGCTTGCCTCTCGCTATTGGATGAGCC  
 TAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACA  
 CCGGGACTGAGACACGGCCCGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGAACCCCTGATCCAG  
 CCTACTGACACTGAGTGTGTCGAAGAAGGCCCTTTGGTTGTAAGCACTTTAAGCAGTGATTAGAAGACCCTATGGTTAATC  
 CACGCCATAAACGATGACTACTAGTCGTTGCAGAACTTGATTCCCTTAGCGACGCAGCTAACGCAATAAGTAGACAGCAGCCT  
 GCGGGAATACAGAGCCTGCAAGCGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGAGCGGAGCATGTGGCTTA  
 ATAAGTCAGATGCGAAATCCCCGAAGAACCTTAACTTGGGAACCTTGACATATCTAGATACTCCTAGGCTAGAGATAGCGTGA  
 GAGTGCCTTCGAGGAATTAGAATATCAGGTGCTAGCATGGCTGAAATGCGTAGAGATCGTGAAGTGAGATACCGATGGCGT  
 TAAGGCAGCCGCAACTGAGCATCATACCCTGATCACTGAGTTTCAACAGCGTGTGGCCGGGGACTCTAAGGATACTGC  
 CAGTGACAACTGGAGGAAGGCGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATG  
 GTAGGTACAGAGGGCTGCTACACAGCGATGTGATGCGAATCTCAAAAAGCCTATCGTAGTCCAGATTGGAGTCTGCAACTC  
 GACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGAATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCC  
 CGTCACACCATGGGAGTTGATTGCACCAGAAGTGGGTAGCC

**>CL106** *Acinetobacter baumannii*

CGAGGTTGCTTCGGTAACTGAGCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGGACAACATTC  
 CGAAAAGGATGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAAGCAGGGGATCTTTATGACCTTGCCTAATAGATGAGCCTAA  
 GTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCACACT  
 GGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGAACCCCTGATCCAGCC  
 ATGCCCGGTGTGTGAAGAAGGCCCTTTGGTTGTAAGCACTTTAAGTGGGGAGGAGCTTACCTGGTTAATACCTGGGCTA  
 AGTGGACGTTACCCACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGGCAGCGTTAATC  
 GGATTTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTAATTAAGTCAAATGTGAAATCCCCGAGCTTAACTTGGGAATTGCATTC  
 GATACTGGTTAGCTAGAGTATGGGAGAGGATGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATAC  
 CGATGGCGAAGGCAGCCATCTGGCCTAATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCATGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTG  
 GTAGTCCATGCCGTAACGATGTCTACTAGCCGTTGGGGATTTGATCCTTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTAGACC  
 GCCTGGGGAGTACGGTGCAGACTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAAT  
 CGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATAGTAGAGACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAATCTACAT  
 ACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGTCTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTTTCCCTTAC  
 TTGCCAGCATTTTCGGATGGGAACCTTAAAGGATACTGCCAGTGACAACTGGAGGAAGGCGGGGACGACGTCAAGTCATCAT  
 GGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGGTACAAAGGGTTGCTACCTCGCGAGAGGATGCTAATCTCAA  
 AAAGCCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGAATGCC  
 GCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTTTGTTCACCAGAAGTATT

CLM107 *Enterobacter cloacae*

CTCTATGAGCTACTGATCTGATAAACTCTAACTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCGGGAACGTATTCACCGTAGC  
 ATTCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCGACTTTCATGGAGTTCGAGTTGACAGACTCCAATCCGGACTACGACGACTTTATGA  
 GGTCCGCTGCTCTCGCAGGTCGCTTCTTTGTATGCGCCATTGTAGCAGTGTGTAGCCCTGGTTCGTAAGGCCATGA  
 TGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCCTCCAGTTTATCACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGCGCGGACCGCTGGCAACAAG  
 GATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAAACCAACATTTACAACACGAGCTGACGACAGCCATGACGACACTGTCTCAC  
 AGTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGAAAGTTCTGTGGATGTCAAGACCAGGTAAGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTA  
 AACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCGCTCAATTCATTTAGTTTTAACCTTGCGGCCGACTCCCGAGCGGGTCCG

ATTTAACGCGTTAGCTCCGGAAGCCACGCCTCAAGGGCACAACTCCAATCGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGG  
 TATCTAATCCTGTTTGTCCCCACGCTTTCGCACCTGAGCGTCAGTCTTTGTCCAGGGGGCCGCTTCGCCACCGGTATTCC  
 TCCAGATCTCTACGCATTTACCAGCTACACCTGGAATTTCAcCCCCCTCTACAAGACTTAGCCTGCCAGTTTCGAATGCAG  
 TTCCCAGGTTGAGCCCGGGATTTACATCCGACTTGACAGACCCTGCGTGCCTTTACGCCAGTAATCCCGATTAAC  
 GCTTGACCCCTCCGTATTACCGCGGTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTGTCTTCTGCGGGTAACGTCAATTGCTGTGGT  
 TATTAACCACAACACCTTCCCTCCCGCTGAAAGTACTTTACAACCCGAAGGCCCTTCTCATAACGCGGCATGGCTGCATCA  
 GGCTTGCGCCATTGTGCAATATTTCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTGGCTGGT  
 CATCTCTCAGACCAGCTAGGGATCGTCGCCTAGGTGAGCCGTTACCCACCTACTAGCTAATCCCATCTGGGCACATCTG  
 ATGGCAAGAGGCCGAAGGTCCCCCTTTGGTCTTGGCAGCTTATGCGGTATTAGCTACCGTTTCCAGTAGTTATCCCCCT  
 CCATCAGGCAGTTTCCAGACATTACTACCCGTCGCCACTCGTACCCGAGAGCAAGCTCTCTGGCTCC

>CL108 *Klebsiella pneumoniae*

TTGAGAGCGGGACGGGTGAGTAATACCTAGGAATCTGCCTGATAGTGGGGGATAACGTTTCGAAACGGACGCTAATAC  
 CGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGG  
 TGAGGTAATGGCTACCAAGGCTACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCA  
 GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGCAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAG  
 GTCTTCGGATTGTAAGGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTTACCTAATACGTGACTGTCTTGACGTTACCGACAGAATA  
 AGCACCGGTAACCTGCGCCAGCAGCCGCGTAATACAGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGAACTAAAGCGC  
 CGCTAGTGGTTTTGTTAAGTTGAATGTGAAATCCCCGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAACCTGGCAAGCTAGAGTAT  
 GGTAGAGGGTAGTAGAATTTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGGCAGCA  
 CCTGGACAAAGACTGACACTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGTACCCTGGTAGTCCACGCGCTAAAC  
 GATGTCGATTTGGAGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCCTGGGGAGTACGGCC  
 GCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCGACACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAA  
 CCTTACCTGGTCTTGACATCCACAGAATTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGAACTGTGAGACAGGTGCTGCATGGC  
 TGTCGTACAGTCTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTCCGGC  
 CGGGAACCTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAG  
 GGCTACACAGCTGCTACAATGGCGCATACAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCGTGCTAG  
 TCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTT  
 CCGGGCCTTGATACACACCGCCGTCACACCA

>CL110 *Psychrobacter cryohalolentis*

GGAAACGATGATAGCTTGCTATCAGGCGTCGAGCGCGGACGGGTGAGTAATACTTAGGAATCTGCCAGTAGTGGGGGA  
 TAGCTCGGGAAACTCGAATTAATACCGCATACACCCTACGGGAAAAGGGGGCGCTTGCCTCTCGCTATTGGATGAGCC  
 TAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAGGCGACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACA  
 CCGGGACTGAGACACGGCCCGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGAAACCCTGATCCAG  
 CCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTTTGGTTGTAAGCACTTTAAGCAGTGAAGAAGACTCTATGGTTAATACCCATAGA  
 CGATGACATTAGCTGCAGAATAAGCACCGGCTAAGTGTGCCAGCAGCCGCTAATACAGAGGGTGAAGCGTTAATCG  
 GAATTAAGTGGGCGTAAAGCGAGCTAGGTGGCTTAATAAGTCAAGTGTGAAATCCCCGGCTTAACTGGGAACCTGCATCT  
 GATACTGTTAGGCTAGAGTAGGTGAGAGGGAGGTAGAATTTAGGTGTAACGGTGAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATAC  
 CGATGGCGGAAGGCGAGCCTCCTGGCATCATACTGACACTGAGGTTGCAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGG  
 TAGTCCACGCGTAAACGATGTCTACTAGTCTGTGGGAACTTGATTCTTAGTGACGCAAGTAAACGAAATAAGTAGACCCG  
 CTGGGGAGTACGGCCGAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCGACACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTC  
 GATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATATCTAGAATCCTGCAGAGATGCGGGAGTGCCTTCGGGAATTAGAATA  
 CAGGTGCTGCATGGCTGTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTTCTTGTAGT  
 TACCAGCGGTTCCGGCCGGGACTCTAAGGATACTGCCAGTGACAACTGGAGGAAGGCGGGGACGAGCTCAAGTCATCAT  
 GGCCCTTACGACCAGGGCTACACAGCTGCTACAATGGTAGGTACAGAGGGCTGATACACAGCGATGTGATGCGAATCTCAA  
 AAAGCCTATCGTAGTCCAGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGAATGCC  
 GCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGATACACACCGCCGTCACCCCATGGGAGTTGATTGCACCAGAAGTGGGTAGCC

>PH105 *Pseudomonas stutzeri*

TCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTTTCGAAAGGAACGCTAATACCG  
 CATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGA  
 GGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGAC  
 TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTC  
 TTCGGATTGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCATTAACTAATACGTTAGTGTTTTACGTTACCGACAGAATAAGCA  
 CCGGCTAATTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGT  
 AGGTGGTTTTGTTAAGTTGAATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACTGGGAACCTGCATCCAAAACCTGGCAAGCTAGAGTATGGCA  
 GAGGGTGGTGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGGCACCACCTGGA  
 CTAATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACCGCGTAAACGATGTCA  
 ACTAGCCGTTGGGACTTTGAGAACCTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCTGGGAGTACGGCCGCAAGTT  
 AAAACTCAAATGAATTCAGGGGGCCCGCACAAAGCGGTTGGAGCATGTGGTTTTAATTTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCT  
 GGCCCTGACATGCTGAGAATTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCTCAGACACAGGTGCTGCATGGCTGTGCTCA  
 GCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCCTGTCTTAGTTACCAGCACGTTATGGTGGGCAC



TCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACA  
CACGTGCTACAATGGTCGGTACAAAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAACCGATCGTAGTCCGGATC  
GCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCC  
TTTACACAAAG

**>PH108** *Acinetobacter baumannii*

TAGCTTGCTATCAGGCGTCGAGCGGGACGGGTGAGTAATACTTAGGAATCTACCTAGTAGTGGGGGATAGCACGGGGA  
AACTCGTATTAAATACCGCATACGACCTACGGGAGAAAGGGGGCAGTTTACTGCTCTCGCTATTAGATGAGCCTAAGTCGGAT  
TAGCTAGATGGTGGGGTAAAGGCCTACCATGGCGACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACCGGGACTG  
AGACACGGCCCGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTGGACAATGGGGAAACCCCTGATCCAGCCATGCCGC  
GTGTGTGAAGAAGGCCTTTTGGTTGTAAGCACTTTAAGCAGTGAAGAAGACTCCGTGGTTAATACCCACGGACGATGACAT  
TAGCTGCAGAATAAGCACC GGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGTAATACAGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTA  
GGCGTAAAGGGAGCGTAGGTGGCTCTATAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACTGGGAAGTGCATCTGAAACTGTA  
GAGCTAGATATGTGAGAGGAAGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAATACCGATGGCGA  
AGGCAGCCTTCTGGCATAACTGACACTGAGGCTCGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAGC  
CCGTAACAGATGTCGTAAGTCTGGTGGTCCCTTGGAGACTTAGTGACGCAGCTAACGCAATAAGTAGACCCGCTGGGGA  
GTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAAC  
GGCAAGAACCTTACCTGGTCTTGGACATATCTAGAATCTGACAGATGCGGGAGTGCCTTCGGGAATTAGAATACAGGTGG  
TGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGC  
GGGTTAAGCCGGGAAGTCTAAGGATACTGCCAGTGACAACTGGAGGAAGGCGGGGACGACGTCAGTCAATCATATGGCCCT  
TACGACCAGGGCTACACAGTGTACAATGGTAGGTACAGAGGGCAGCTACACAGCGATGTGATGCGAATCTCAAAAAGCC  
TATCGTAGTCCAGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTAGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGAATGCCCGGGT  
AATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACC GCCGTACACCATGGGAGTTGATTGCACCAGAAGTGGATAGCTTA

**>PNH102** *Psychrobacter sp.*

TGCTTCTTGCTGACGAGCGGGCAGCGGGTGAAGTAATACTTAGGAATCTGCCAGTAGTGGGGGATAGCTCGGGGAAACTC  
GAATTAATACCGCATACACCCTACGGGAAAAGGGGGCGCTTGCCTCTCGCTATTGGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTA  
GTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACCGGGACTGAGACAC  
GGCCCGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTGGACAATGGGGGAACCCCTGATCCAGCCATGCCCGTGTGT  
GAAGAAGGCCTTTTGGTTGTAAGCACTTTAAGCAGTGAAGAAGACTCTATGGTTAATACCCATAGACGATGACATTAGCTG  
CAGAATAAGCACC GGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGTAATACAGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTA  
AAGCGAGCGTAGGTGGCTTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACTGGGAAGTGCATCTGATACTGTTAGGCTA  
GAGTAGGTGAGAGGGAGGTAGAATTTAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGAAGGAATACCGATGGCGAAGGCA  
GCCTCCTGGCATAACTGACACTGAGGCTCGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA  
AACGATGTGTAAGTCTGGTGGTCCCTTGGAGACTTAGTGACGCAGCTAACGCAATAAGTAGACCCGCTGGGGAGTACGG  
CCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAG  
AACCTTACCTGGTCTTGGACATATCTAGAATCCTGCAGAGATGCGGGAGTGCCTTCGGGAATTAGAATACAGGTGGTGCATG  
GCTGTGCTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCGGGTTA  
AGCCGGGAAGTCTAAGGATACTGCCAGTGACAACTGGAGGAAGGCGGGGACGACGTCAGTCAATCATATGGCCCTTACGAC  
CAGGGCTACACAGTGTACAATGGTAGGTACAGAGGGCAGCTACACAGCGATGTGATGCGAATCTCAAAAAGCCTATCGT  
AGTCCAGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTAGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGAATGCCCGGGTGAATACG  
TTCCCGGGCCTTGTACACACC GCCGTACACCATGGGAGTTGATTGCACCAGAAGTGGATAGCTTA

**>PNH110** *Pseudomonas stutzeri*

TAGACTAGCTACTTCTGGTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTACCCGTGA  
CATTCTGATTACGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTATG  
GGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCCTTGTACCGACCATTTGTAGCAGTGTGTAGCCCAGGCCGTAAGGGCCATG  
ATGACTTGACGTATCCCCACCTTCCCGGTTTGCACCCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCCACCACTTACGTGTGTTAACT  
TAAGTGACAAGCCTTTCGCAAGTTACGGTGTATCTTAAACCAACATCTCACGATTTTACCAGCTGACGACTAGCCTATGCCA  
GCCACCTGTACAATGTTACTCGAAGACACTGCAGTATCAATGGCAGTTTCATAGATAAGCTCATTGAGATGTCAGCCACT  
GACTTACAGGTTCTTCGCGTTGCTACGAACCCCTTAAACCCACATAAATCCGGACAACGCTTGTGCAGGCCCTCCGTCAATT  
ACAGCGCTGCTGGCAGCGAGTTAACCTTGCCTGCTTATTGCTACAGTACCTTACGCTACCCTCAACGTAGAGTAGCGTTTA  
GCTGCGCTGTACAAAAGAAGTTACAGACTCCCATACGGACCAGTTGACATCCTTACGCGCGATGGACTGGACCAGGCT  
ATCTAATCCATTGTCCAATATGCTCCCCACTGCTGCCGACCGTCAAGAGTCTGGTCCGTGTCTCAGTACCAGTGTGGGGG  
ATCTCCCTCTCAGGACCCCTAAAGATCATTGACTTGGTGGAGCGTTACCTACCAACTATCTAATCTTGCAGCGTGGCCATCT  
CTATCCACCGGAGTTTTCAATAAATGATGCCAATCATTATATTATGGGGTATTAATCTTCTTTCGAAAGGCTATCCCCCA  
GATAAAGGTAGGTTGCACAGTGTACGCACCCGTACGCCGCT