

**UNIVERSIDAD DEL MAR**

***Campus Puerto Ángel***



**DETERMINACIÓN MOLECULAR DE GENES CODIFICADORES  
DE ENZIMAS AMINO DESCARBOXILASA EN BACTERIAS  
AISLADAS DEL PULPO ROJO *Octopus maya* (VOSS y SOLÍS, 1966)**

**TESIS**

Que para obtener el Título Profesional de  
**Licenciada en Biología Marina**

Presenta

**Betsabe Natividad Pérez Hernández**

Dirigido por:

**Dra. Mariel Gullian Klanian**

Ciudad Universitaria, Puerto Ángel, Oaxaca, México, 2022

## Resumen

*Octopus maya* es un organismo bentónico altamente explotado en la zona del Golfo de México y Mar Caribe. La pesquería de este organismo es una de las más importantes en el país. Yucatán es el estado donde esta pesquería genera la mayor producción económica, exportando anualmente cerca del 88% del pulpo capturado a países de la Unión Europea. Las condiciones de captura, manejo y almacenamiento de los organismos son estrictamente controladas para mantener su calidad y frescura. La implementación de prácticas sanitarias inadecuadas sobre este recurso promueve el crecimiento, desarrollo y acumulación de microorganismos que lo deterioran, generando compuestos como las aminas biogénicas. Estos compuestos disminuyen la calidad del producto, son un signo de contaminación y provocan efectos tóxicos en el consumidor si se ingieren en concentraciones elevadas. La formación de aminas biogénicas depende de la presencia de enzimas amino descarboxilasa que son codificadas por genes presentes en bacterias descarboxilasa positivas. La detección molecular de estos genes es importante como método de diagnóstico preventivo para conocer las aminas biogénicas que pueden llegar a acumularse en productos marinos. Estudios moleculares de este tipo se han realizado en quesos, vinos, carnes y pescados, existiendo pocos trabajos de esta índole realizados en cefalópodos. El objetivo de este estudio fue identificar la presencia de los genes histidina descarboxilasa (*hdc*), tirosina descarboxilasa (*tdc*), ornitina descarboxilasa (*odc*) y lisina descarboxilasa (*ldc*) en bacterias aisladas de *O. maya*. Se evaluaron en total ocho cepas bacterianas. La extracción de ADN se hizo mediante protocolos estándar y la presencia de los genes se detectó con la técnica de PCR. Los productos de PCR de las cepas 73, 6A y 6B fueron clonados y secuenciados. En las ocho cepas analizadas se obtuvo un amplicón de 1440 pb correspondiente al gen *odc*. Sólo en *Enterobacter* sp. (73) se obtuvieron los amplicones esperados para los cuatro genes analizados. Los genes *ldc* y *odc* de la cepa 73 mostraron un 100% de identidad con la secuencia aminoacídica de *Enterobacter cloacae* y *Enterobacter* sp., respectivamente. El gen *ldc* de la cepa 6A mostró un 97.7% de identidad con el gen *ldc* de *Citrobacter freundii*. El pulpo alberga una gran variedad de enterobacterias y cepas de otros grupos

bacterianos capaces de producir aminas biogénicas. La ingesta de alimentos con bajas concentraciones de alguna amina en específico produce efectos poco significativos en humanos; sin embargo, la presencia de otras aminas en el mismo alimento provoca un efecto sinérgico. Las condiciones de manejo, captura y almacenamiento de los organismos deben mejorarse, pues la presencia de las bacterias aquí encontradas es un peligro prevalente para la calidad del producto y latente para la salud del consumidor.

**Palabras clave:** alimento; cefalópodos; enterobacterias; intoxicación; métodos moleculares.

## Abstract

*Octopus maya* is a benthic organism very exploited in the Gulf of Mexico and Caribbean Sea. The fishery of this organism is one of the most important in the country. Yucatan is the state where this fishery generates the highest economic production. Yucatan exports annually about 88% of the octopus caught to countries of the European Union. Therefore, the conditions of capture, handling and storage of this organism are strictly controlled to maintain its quality and freshness. The improper sanitary practices on the resource promote the growth, development and accumulation of microorganisms that deteriorate it, generating compounds such as biogenic amines. These compounds decrease the quality of the product; it is a sign of contamination and it cause toxic effects on the consumer if they ingested it in high concentrations. The formation of biogenic amines depends on the presence of amino decarboxylase enzymes that are encoded by genes present in positive decarboxylase bacteria. The molecular detection of these genes is important as a preventive diagnostic method to know the biogenic amines that can accumulate in fishery products. Molecular studies of this type have been done in cheeses, wines, meats and fish. There are few studies of this nature carried out in cephalopods. The aim of this study was to molecularly identify the presence of histidine decarboxylase (*hdc*), tyrosine decarboxylase (*tdc*), ornithine decarboxylase (*odc*) and lysine decarboxylase (*ldc*) genes in bacteria isolated from *O. maya*. A total of eight bacterial strains were evaluated. DNA extraction was done using standard protocols and the presence of genes was detected with the PCR technique. The PCR products of strains 73, 6A and 6B were cloned and sequenced. The eight strains analyzed amplified a 1440 bp fragment corresponding to the *odc* gene. Only *Enterobacter* sp. (73) amplified the expected fragment for the four genes analyzed. The *ldc* and *odc* genes of strain 73 showed 100% identity with the amino acids sequence of *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter* sp. respectively. The *ldc* gene of strain 6A showed 97.7% identity with the *ldc* gene of *Citrobacter freundii*. The octopus harbors a wide variety of enterobacteria and strains of other bacterial groups capable of producing biogenic amines. The intake of foods with low concentrations of a specific amine produces

minor effects in humans; however, the presence of other amines in the same food causes a synergistic effect. The conditions of management, capture and storage of organisms must be improved. The presence of the bacteria found here is a prevalent danger to the quality of the product and latent to the health of the consumer.

**Key words:** cephalopods; enterobacteria; food; molecular methods; poisoning.

## **Agradecimientos**

A mi Poder Superior. Porque en cada momento de mi vida me ha demostrado su amor, porque comprendo que desea lo mejor para mí. Gracias a Él por darme esta prueba y por no abandonarme nunca.

A mis padres, Elodia y Fulgencio, quienes siempre me apoyaron y lo siguen haciendo incondicionalmente para lograr todos mis propósitos; me aceptan, me brindan un amor absoluto tal como soy y que no encontraré dos veces y me impulsan a ser mejor. Son mis pilares.

A la Dra. Mariel Gullian Klanian por haberme dado la oportunidad de formar parte de su proyecto gracias al cual surgió esta tesis; por haberme guiado en este proceso, por sus observaciones, comentarios, aliento y sobre todo, su paciencia.

Al Dr. Rolando Cardeña López por sus importantes contribuciones y acertadas correcciones a este manuscrito; por su sincera y desinteresada amistad, por su paciencia, tolerancia, tiempo, dedicación y la confianza depositada.

A mis revisores M. en C. Yolanda Huante, Dra. Ivonne Sandra Santiago y a la Dra. Mónica Marcela Galicia Jiménez por su disponibilidad, contribución, paciencia y su sincero deseo de apoyarme para mejorar este proyecto.

A mi mejor amigo Habib, quien a pesar de la distancia siempre ha estado pendiente de mí y de la tesis.

A Mariana Delgadillo y Monse Terrats, quienes hicieron más amena mi estancia en Mérida haciéndome sentir como en casa; especialmente a Mariana, quien, a pesar de la distancia, sigue siendo mi ángel guardián de la tesis.

A mis amig@s más cercan@s: Hammu, Dupont, Seyer, Sofi, Doc, Figue, Isra, Gaby, Shuna y demás. Gracias por haber compartido conmigo buenos momentos y hacer más amena y divertida mi estadía en la universidad y en la localidad.

## ÍNDICE

Índice de tablas.....	x
Índice de figuras.....	xi
Índice de anexos.....	xii
Listado de abreviaturas.....	xiii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ESTADO DEL CONOCIMIENTO.....	2
<b>2.1. Aspectos generales de <i>Octopus maya</i></b> .....	<b>2</b>
2.1.1. <i>Deterioro del pulpo</i> .....	3
<b>2.2 Aminas biogénicas</b> .....	<b>4</b>
2.2.1. <i>Clasificación de las aminas biogénicas</i> .....	4
2.2.2. <i>Rutas bioquímicas implicadas en la formación de aminas biogénicas</i> .....	4
2.2.3. <i>Aminas biogénicas en los alimentos</i> .....	6
2.2.4. <i>Efectos tóxicos de las AB y detoxificación en el cuerpo humano</i> .....	6
<b>2.3. Factores que favorecen la síntesis de AB en los alimentos</b> .....	<b>8</b>
<b>2.4. Presencia de genes codificadores de EAD en bacterias aisladas de <i>O. maya</i></b> .....	<b>9</b>
2.4.1. <i>Familia Enterobacteriaceae</i> .....	10
2.4.2. <i>Familia Moraxellaceae</i> .....	11
2.4.3. <i>Familia Streptococcaceae</i> .....	11
<b>2.5. Métodos de detección de aminas biogénicas en los alimentos</b> .....	<b>12</b>
<b>2.6. Método molecular para la detección de genes que codifican para EAD</b> .....	<b>12</b>
2.6.1 <i>Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)</i> .....	13
<b>2.7 Primers utilizados para la detección de genes codificadores de EAD en bacterias</b> .....	<b>14</b>
<b>2.8. Secuenciación</b> .....	<b>16</b>
3. ANTECEDENTES.....	16
4. JUSTIFICACIÓN.....	17
5. HIPÓTESIS.....	18
6. OBJETIVOS.....	19
<b>6.1. General</b> .....	<b>19</b>
<b>6.2. Específicos</b> .....	<b>19</b>
7. ÁREA DE ESTUDIO.....	20

8. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
<b>8.1. Obtención de las cepas bacterianas</b> .....	<b>21</b>
<b>8.2. Extracción de ADN bacteriano</b> .....	<b>21</b>
8.2.1. <i>Lisis celular</i> .....	21
8.2.2. <i>Separación del ADN</i> .....	21
8.2.3. <i>Precipitación y re-suspensión del ADN</i> .....	22
<b>8.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa</b> .....	<b>22</b>
8.3.1. <i>Visualización de los fragmentos de ADN y productos de PCR</i> .....	23
<b>8.4. Purificación y cuantificación del ADN genómico</b> .....	<b>24</b>
<b>8.5. Clonación de ADN</b> .....	<b>24</b>
8.5.1. <i>Ligación</i> .....	24
8.5.2. <i>Transformación y selección de colonias bacterianas recombinantes</i> .....	25
<b>8.6. Identificación de genes en las células transformadas</b> .....	<b>26</b>
<b>8.7. Análisis de datos</b> .....	<b>26</b>
9. RESULTADOS .....	27
<b>9.1. Descripción de las muestras analizadas</b> .....	<b>27</b>
<b>9.2. Calidad de ADN de las cepas bacterianas aisladas de <i>O. maya</i></b> .....	<b>27</b>
<b>9.3. Genes codificadores de EAD en bacterias aisladas de <i>O. maya</i></b> .....	<b>28</b>
9.3.1. <i>Amplificación del gen <i>hdc</i> de bacterias aisladas de <i>O. maya</i></i> .....	28
9.3.2. <i>Amplificación del gen <i>tdc</i> de bacterias aisladas de <i>O. maya</i></i> .....	29
9.3.3. <i>Amplificación del gen <i>odc</i> de bacterias aisladas de <i>O. maya</i></i> .....	30
9.3.4. <i>Amplificación del gen <i>ldc</i> de bacterias aisladas de <i>O. maya</i></i> .....	30
<b>9.4. Clonación y secuenciación de las EAD</b> .....	<b>31</b>
10. DISCUSIONES .....	34
<b>10.1. Cepas aisladas de <i>O. maya</i></b> .....	<b>34</b>
10.1.1. <i>Amplificación del gen <i>hdc</i> de bacterias aisladas de <i>O. maya</i></i> .....	34
10.1.2. <i>Amplificación del gen <i>tdc</i> de bacterias aisladas de <i>O. maya</i></i> .....	37
10.1.3. <i>Amplificación del gen <i>odc</i> de bacterias aisladas de <i>O. maya</i></i> .....	38
10.1.4. <i>Amplificación del gen <i>ldc</i> de bacterias aisladas de <i>O. maya</i></i> .....	39
<b>10.2. Clonación y secuenciación de las EAD</b> .....	<b>41</b>
11. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	42



12. BIBLIOGRAFÍA.....	45
13. ANEXOS.....	54

## Índice de tablas

<b>Tabla I.</b> Efectos toxicológicos provocados por la ingesta de concentraciones elevadas de AB. ....	7
<b>Tabla II.</b> Genes codificadores de EAD precursoras de cuatro AB. ....	9
<b>Tabla III.</b> Primers utilizados en el ensayo de PCR. ....	22
<b>Tabla IV.</b> Componentes de las reacciones de ligación. ....	24
<b>Tabla V.</b> Especies bacterianas analizadas en este estudio. ....	27
<b>Tabla VI.</b> Resultados de la amplificación mediante PCR para la detección de genes codificadores de EAD en bacterias aisladas de <i>O. maya</i> . ....	28
<b>Tabla VII.</b> Secuencias aminoacídicas de los genes codificadores de enzimas amino descarboxilasa aisladas de bacterias procedentes de <i>O. maya</i> ....	32
<b>Tabla VIII.</b> Secuencias aminoacídicas relativamente más cercanas de enzimas amino descarboxilasas provenientes de las cepas aisladas de <i>O. maya</i> . ....	32

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Anatomía general de <i>Octopus maya</i> .....	3
<b>Figura 2.</b> Esquema general de una reacción de descarboxilación en aminoácidos .....	5
<b>Figura 3.</b> Reacciones de descarboxilación implicadas en la formación de aminas biogénicas .....	6
<b>Figura 4.</b> Mecanismo de desintoxicación de AB por MAO y DAO y factores potenciadores.....	8
<b>Figura 5.</b> Área de influencia de la pesquería de <i>O. maya</i> en el Golfo de México .....	20
<b>Figura 6.</b> Temperatura promedio de la costa norte de la Península de Yucatán .....	20
<b>Figura 7.</b> Mapa del vector de clonación de productos de PCR .....	25
<b>Figura 8.</b> Calidad de la extracción de ADN de las cepas bacterianas.....	27
<b>Figura 9.</b> Amplificación del gen histidina descarboxilasa ( <i>hdc</i> ) utilizando los primers HIS1/f y HIS1/r.....	29
<b>Figura 10.</b> Amplificación del gen histidina descarboxilasa ( <i>hdc</i> ) utilizando los primers HIS2/f y HIS2/r.....	29
<b>Figura 11.</b> Amplificación del gen tirosina descarboxilasa ( <i>tdc</i> ) utilizando los primers TYR/f y TYR/r .....	30
<b>Figura 12.</b> Amplificación del gen ornitina descarboxilasa ( <i>odc</i> ) utilizando los primers PUT1/f y PUT1/r.....	30
<b>Figura 13.</b> Amplificación del gen lisina descarboxilasa ( <i>ldc</i> ) utilizando los primers CAD1/f y CAD1/r .....	31
<b>Figura 14.</b> Relaciones evolutivas de los taxos basados en las secuencias aminoacídicas de enzimas descarboxilasa.....	33

## **Índice de anexos**

<b>Anexo 1.</b> Primers elaborados para la detección del gen <i>hdc</i> en bacterias. ....	54
<b>Anexo 2.</b> Primers elaborados para la detección del gen <i>tdc</i> en bacterias Gram positivas.....	55
<b>Anexo 3.</b> Primers elaborados para la detección del gen <i>odc</i> en bacterias. ....	55
<b>Anexo 4.</b> Primers elaborados para la detección del gen <i>ldc</i> en bacterias. ....	55
<b>Anexo 5.</b> Ingredientes para la preparación del Agar Niven y Caldo Histidina (1L)..	56
<b>Anexo 6.</b> Protocolo para la extracción de ADN plasmídico. ....	56