



Facultad de Veterinaria  
Universidad Zaragoza



# Trabajo Fin de Grado en Ciencia y Tecnología de los alimentos

Aplicación de técnicas moleculares al estudio de la vida útil de filetes de merluza conservados en atmósferas modificadas

Application of molecular techniques for the study of the shelf-life of hake fillets stored under MAP

Autor

Silvia Calero Martínez

Directores

Guillermo Cebrián Auré

Nabil Halaihel Kassab

Facultad de Veterinaria

2018

---

## Índice

|  |    |
|--|----|
| Resumen .....  | 3  |
| Abstract.....  | 4  |
| 1. Introducción.....   | 5  |
| 2. Justificación y objetivos .....   | 12 |
| 3. Material y métodos .....  | 13 |
| 3.1. Materia prima y condiciones de envasado y almacenamiento.....                                 | 13 |
| 3.2. Cepas microbianas y obtención de cultivos .....   | 14 |
| 3.3. Análisis microbiológicos de merluza.....  | 15 |
| 3.4. Modelización de las gráficas de crecimiento microobiano.....                                  | 16 |
| 3.5. Determinación de la concentración de trimetilamina (TMA).....                                 | 17 |
| 3.6. Evaluación sensorial .....  | 17 |
| 3.7. Métodos moleculares .....   | 18 |
| 3.7.1. Aislamiento y purificación de DNA.....  | 18 |
| 3.7.2. Cuantificación del DNA extraído y comprobación de su calidad .....                          | 20 |
| 3.7.3. Amplificación y cuantificación del DNA mediante qPCR.....                                   | 20 |
| 3.7.4. High troughput 16S rRNA sequencing.....   | 23 |
| 4. Resultados y discusión .....  | 23 |
| 4.1. Puesta a punto de la qPCR.....  | 23 |
| 4.1.1. Evaluación de los cebadores diseñados: estudios de inclusividad y<br>exclusividad.....      | 24 |
| 4.1.2. Sensibilidad y límites de cuantificación .....  | 24 |
| 4.2. Obtención de curvas de crecimiento de <i>P. phosphoreum</i> en merluza mediante<br>qPCR ..... | 26 |

|   |    |
|---|----|
| 4.3. Estudio de vida útil: cuantificación de <i>P. phosphoreum</i> en condiciones reales y evaluación de la utilidad de la técnica qPCR para predecir la vida útil de la merluza envasada en atmósferas modificadas ..... | 28 |
| 4.4. Puesta a punto de la metodología para el estudio de la composición de la flora de la merluza en el momento de la alteración.....   | 30 |
| 4.4.1. Comparación de kits de extracción.....   | 31 |
| 4.4.2. Evaluación de la eficiencia de los kits de extracción de DNA y de ácidos nucleicos totales.....  | 32 |
| 4.4.3. Optimización del protocolo de extracción.....  | 33 |
| 5. Conclusiones.....  | 35 |
| 6. Conclusions .....  | 35 |
| 7. Valoración .....   | 36 |
| 8. Bibliografía.....  | 37 |
| ANEXO I.....  | 41 |
| ANEXO II .....  | 42 |

## Resumen

El pescado es un producto esencial en la dieta de gran parte de la población mundial y por tanto de gran interés económico. En los últimos años sus canales de distribución han evolucionado estimulando el desarrollo de nuevos métodos de conservación para prolongar su vida útil y de nuevos sistemas para la estimación de su vida útil que ayuden a optimizar su gestión y comercialización. El desarrollo de estos últimos es posible mediante el uso de modelos de predicción del crecimiento microbiano, sin embargo es necesaria una cuantificación rápida y efectiva de los mismos, y más específicamente de los microorganismos responsables de la alteración, que en el caso de la merluza es, principalmente, *P. phosphoreum*. Las técnicas moleculares, en concreto la qPCR, podría suplir a la microbiología “cultivo-dependiente” en este aspecto dada su elevada especificidad, sensibilidad y velocidad para obtener resultados. En este proyecto se ha puesto a punto un ensayo qPCR para determinar la concentración de este microorganismo y evaluado la aplicación de esta técnica para la predicción de vida útil en merluza conservada en atmósfera modificada rica en CO<sub>2</sub>. Los resultados obtenidos indican que el ensayo de qPCR que se ha puesto a punto es un método rápido y efectivo para determinar la concentración de *P. phosphoreum* en filetes de merluza. Por otra parte, este ensayo, combinado con el modelo predictivo desarrollado por Artaiz (2016) estimó una vida útil de la merluza muy similar a la determinada mediante análisis sensorial, lo que indica que de este modo se puede predecir la vida útil del pescado en pocas horas. Finalmente, se ha logrado poner a punto un protocolo de extracción de DNA bacteriano purificado para comenzar el estudio del metagenoma del pescado, que permita comparar la flora total del pescado fresco, frente a la que está presente en el pescado alterado.

## **Abstract**

Fish is an essential product in the diet of a large part of the world's population and therefore of great economic interest. In recent years, its distribution channels have evolved, stimulating the development of new conservation methods to prolong their shelf-life and new systems for estimate their shelf-life to help optimize their management and marketing. The development of these ones is possible through the use of predictive models of microbial growth, however, a rapid and effective quantification of these is necessary, and more specifically of the microorganisms responsible of the spoilage, in the case of hake is mainly *P. phosphoreum*. Molecular techniques, in particular qPCR, could replace 'culture-dependent' microbiology in this area because of its rapidly, high specificity and sensitivity. In this project, a qPCR assay has been developed to determine the concentration of this microorganism and evaluated the application of this technique for the prediction of the shelf-life in hake preserved in MAP rich in CO<sub>2</sub>. The results obtained show that the qPCR assay that has been set up is a fast and effective method to determine the concentration of *P. phosphoreum* in hake fillets. Besides that, this test, combined with the predictive model developed by Artaiz (2016), estimated a shelf-life of hake very similar to the one determined by sensory analysis, which indicates that it is possible to predict shelf fish life within a few hours.. Finally, a protocol for the extraction of purified bacterial DNA has been developed to start the study of the metagenome of fish, which allows a comparison of the total flora of fresh fish against that present in spoilage fish.

## 1. Introducción

El pescado es uno de los alimentos con mayor relevancia en el mundo como consecuencia del aporte nutricional que representa y la riqueza que genera, entre otras cosas porque se trata del medio de subsistencia para millones de personas. Así, el consumo de pescado a nivel mundial alcanzó su pico con 20 kg per cápita en el año 2014 (FAO, 2016). El sector pesquero español aporta el 1,10% de las capturas marinas mundiales, lo que lo sitúa en el puesto 18 como productor mundial. Asimismo, es el primer productor industrial europeo en productos de la pesca representando un 20% de la producción total. Este primer puesto lo ocupa no sólo en volumen de producción, también en valor, ya que la mayoría del pescado producido en España se destina a consumo directo en lugar de a la elaboración de harinas. Además de ser un gran productor, España es un gran consumidor de pescado, con un consumo per cápita de 25,49 kg en el año 2016 según datos de CEPESCA (2017).

De entre todas las especies que se capturan y/o crían, la merluza es una de las de mayor importancia económica en España debido al gran arraigo que tiene en la cultura gastronómica de este país (MAPAMA, 2017(b)). La merluza, junto con la caballa, constituyen las dos especies con mayor número de capturas en el sudeste del Atlántico, lo que es debido a su elevado consumo. El 22% de las capturas realizadas en esta área corresponde a la merluza, pese a la tendencia decreciente que sufre desde hace más de 40 años debido a la dura competencia procedente de Sudáfrica y Namibia. Sin embargo, a pesar del alto volumen de capturas, se ha logrado mantener la estabilidad en los últimos años gracias a la implantación de medidas para el desarrollo sostenible, afianzando esta zona como competidora desde el año 2006 (FAO, 2006). Las especies capturadas en estas zonas son diferentes a las apresadas por los buques europeos, en España es capturada la *Merluccius merluccius*, mientras que en el cono Sur de África, la zona de Namibia y Sudáfrica, se pescan las especies *Merluccius capensis* y *Merluccius paradoxus*. A pesar de ello, se comercializan bajo el nombre de “Merluza”, pues todas ellas pertenecen al género *Merluccius*. La diferencia entre ellas radica en cuestiones de tamaño, aspecto externo y la zona de captura principalmente (MAPAMA, 2017 (b)).

A pesar de que el consumo de pescado se ha mantenido relativamente estable a lo largo de los años, los canales de compra preferentes para los consumidores están cambiando

de forma evidente. Si bien la compra en supermercados autoservicio está disminuyendo en favor de las tiendas de descuento y del comercio virtual son las tiendas tradicionales, es decir las pescaderías, las que están sufriendo las consecuencias más negativas de este cambio de tendencia, ya que están viendo como disminuyen las adquisiciones en ellas en mayor medida (MAPAMA, 2017(a)). La evolución de la forma de adquirir este tipo de productos perecederos plantea un reto para la industria productora, pues los métodos tradicionales de conservación no pueden satisfacer la demanda de la población. Los consumidores requieren productos seguros, a la par de que conserven sus características organolépticas en las mejores condiciones, que puedan conservarse durante el mayor tiempo posible y con cierta facilidad de almacenamiento. Este es el objetivo final de las empresas, que llega a convertirse en necesidad para seguir siendo competitivas.

Tradicionalmente, los métodos de conservación del pescado sin modificación de sus características sensoriales se reducían al control de la temperatura. Si bien esta medida resulta crucial para garantizar la seguridad alimentaria y retrasar la alteración de estos productos, durante los últimos años se han desarrollado diferentes tecnologías que buscan el mismo fin, entre las que destaca la utilización de atmósferas modificadas (García, Gago y Fernández, 2006). Este tipo de envasado permite alargar la vida útil de los productos de la pesca mediante la inhibición del desarrollo de numerosos microorganismos, entre los que se incluyen los Gram negativo aerobios. A pesar de ocupar un mayor espacio que el envasado a vacío, los envases con atmósfera modificada permiten retrasar la alteración durante más tiempo (Macé, et al., 2012).

La alteración del pescado se puede producir por autólisis, por oxidación o por la actividad bacteriana (Frazier y Westhoff, 1993). Sin embargo, los principales agentes responsables del deterioro del pescado son los microorganismos, y más concretamente, los “specific spoilage organisms” (SSO). Bajo este nombre se incluyen aquellos grupos de microorganismos predominantes en un entorno determinado, cuyo desarrollo es la causa última de la alteración. Esta flora es característica de cada alimento, y también varía a lo largo del tiempo y el almacenamiento pues el crecimiento microbiano está subordinado a las condiciones ambientales de conservación de estos alimentos a la par que a las características del propio alimento (Gram y Dalgaard, 2002).

El pescado es un ecosistema microbiano en el que, en algunos casos, los principios de sucesión ecológica no son tan válidos como en cualquier otro ambiente. Este ambiente consiste en una fuente rica en nutrientes con una tensión de oxígeno muy favorable para el desarrollo rápido de heterótrofos que puede provocar el deterioro de este (Reynisson et al., 2009). La microflora del pescado depende en primera instancia del entorno en el que es capturado, es decir, de las aguas de su ecosistema, que determinarán las especies que se puedan encontrar en la piel y las branquias de estos alimentos. En esta flora es característica la predominancia de bacterias Gram negativas, mayoritariamente psicrótrofas de los géneros: *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium* y *Vibrio*. Por otro lado, el tracto digestivo de los peces constituye por sí mismo un ambiente particular en el que las bacterias dominantes pertenecen a los géneros *Vibrio*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Aeromonas* y *Clostridium*. (Bourgeois, Mescle y Zucca, 1994; Frazier y Westhoff, 1993).

Los microorganismos presentes en el pescado consumen en primer lugar los componentes más sencillos, compuestos nitrogenados no proteicos, y debido a este metabolismo se liberan sustancias volátiles causantes de los malos olores y la depreciación organoléptica del pescado. Estos compuestos nitrogenados que ven disminuida su concentración a lo largo del proceso de alteración, son transformados en otros que se consideran productos de la alteración. Esto es lo que sucede con el óxido de N-trimetilamina (TMAO), cuya concentración disminuye por degradación microbiana en favor de la aparición de trimetilamina (TMA). El TMAO se encuentra de forma natural en los pescados de agua salada, mientras que en pescado fresco no debería encontrarse TMA o de hacerlo debería hacerse en pequeñas cantidades (Jay, Loessner y Golden, 2009). La TMA es considerada la principal causante del olor desagradable del pescado alterado, y por tanto, es utilizado como indicador del deterioro de este tipo de productos. El aumento de su concentración ha sido relacionado con el deterioro en el almacenamiento así como con los cambios sensoriales del pescado, y particularmente de la merluza (Baixas-Nogueras et al., 2003). A pesar de la capacidad de ciertas enzimas musculares de algunos pescados de reducir el TMAO, los microorganismos son considerados los principales responsables de esta reacción. Es necesario considerar que no todos ellos presentan la misma capacidad de llevar a cabo esta transformación, y que siempre dependerá del pH del medio en el que se desarrolle (Jay, Loessner y Golden,



2009). En el caso de la merluza, existe una relación directa entre el crecimiento exponencial de las bacterias y el aumento de la concentración de este compuesto volátil. Además muestra una buena correlación con las modificaciones sensoriales y el deterioro de la calidad en esta especie (Baixas-Nogueras et al., 2003).

En base a los factores anteriores, es considerado un índice de calidad adecuado, ya que se trata de una determinación objetiva y puede realizarse de forma rápida. Además se trata de un producto generado por los SSO y por tanto se adecua mejor al grado de alteración que los recuentos microbianos de grupos no específicos, como los aerobios mesófilos o los psicrótrofos. Así, es posible que recuentos microbianos elevados no se correspondan con un deterioro elevado, debido a que no todos ellos son capaces de generar compuestos que impliquen cambios sensoriales. A pesar de estas ventajas, el análisis de TMA plantea ciertos inconvenientes a la hora de ser aplicado para la determinación de la frescura del pescado. Una de las principales es la imposibilidad de ser aplicada a estadíos primarios de alteración (FAO, 1998), lo que implica que su determinación no permite predecir la vida útil de los productos. Esto representa un gran inconveniente en el caso de los productos que se comercializan envasados, corriente en aumento dada la tendencia de adquisición, que cada vez se aleja más de la tienda tradicional a favor del aumento de la compra de productos en grandes superficies o a través de internet (MAPA, 2017(b)). Este tipo de productos requieren un etiquetado en el que se indique la fecha de duración mínima según el R (UE) n° 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 25 de octubre de 2011, y por tanto es necesario predecir su vida útil. Por tanto, puede concluirse que los análisis microbiológicos de las especies SSO, dado que permiten efectuar predicciones y están directamente relacionados con el estado real de alteración del producto, serían en un principio, los más apropiados para predecir la durabilidad de los productos de la pesca.

En base a este tipo de ensayos, se han elaborado durante las dos últimas décadas modelos dinámicos predictivos de la alteración microbiana en esta matriz. (García et al., 2015). Estos modelos requieren, para ser aplicados de forma práctica, una cuantificación previa de la carga microbiológica de la materia prima. En este sentido, la microbiología clásica plantea un importante problema como método para esta determinación. Son métodos costosos en el tiempo que implican largos periodos de incubación (FAO,

1998), lo que impide que se pueda estimar la vida útil aplicando un modelo predictivo en un tiempo adecuado que permita predecir la vida útil de los pescados (incluidos los envasados en atmósferas modificadas).

La ciencia de los alimentos ha aprovechado el desarrollo de tecnologías en el campo de la biología molecular, buscando solventar los problemas de la microbiología clásica, para caracterizar los ecosistemas microbianos que constituyen los alimentos, la detección de patógenos o alterantes y la identificación de starters o microorganismos beneficiosos. Desde el desarrollo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, del inglés *Polymerase Chain Reaction*) en 1983, diferentes técnicas se han desarrollado en relación al DNA, constituyendo una herramienta fundamental para la biología molecular. Este método de análisis se basa en la detección de ácidos nucleicos (Budding, 2016). Consiste en esencia en la replicación in vitro del ADN. Pueden obtenerse miles de millones de copias de secciones específicas, u otras secciones, mediante el proceso conocido como amplificación (Madigan, et al., 2015). La PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR, del inglés *quantitative real-time PCR*) permite cuantificar en poco tiempo el número de copias de ADN que se generan durante la amplificación, por lo que se puede conocer la cantidad inicial de una fracción del genoma de un microorganismo concreto y por consiguiente, la concentración de microorganismos en la muestra. La cuantificación se realiza mediante la adición de colorante fluorescente a la reacción. El colorante SYBR Green se une inespecíficamente a todas las secciones de DNA bicatenario que se encuentre en la misma solución. La especificidad de la técnica depende de los cebadores, que son oligonucleótidos sintéticos. Tienen una longitud de unos 15 - 25 nucleótidos específicos, que junto con las temperaturas de hibridación altas, confieren a la PCR una elevadísima especificidad. El DNA amplificado es prácticamente homogéneo, puesto que las uniones inespecíficas son mínimas. La técnica permite determinar la especificidad del producto mediante la temperatura de fusión del producto amplificado. La mezcla es sometida a un tratamiento térmico de temperatura ascendente que provoca la separación de las hebras por calor. El pico de separación se observa como pérdida de la fluorescencia y la temperatura a la que se produce es característica de cada secuencia, muy influida por la proporción de las diferentes nucleótidos (A-T, C-G) que la componen (Madigan, et al., 2015).

Con el fin de preparar los cebadores de los que dependerá la especificidad de la técnica, es necesario seleccionar el microorganismo objetivo que se tratará de cuantificar en las muestras. Cuando esta técnica se aplica a la predicción de la vida útil, la atención se fijará, como es obvio, en los microorganismos responsables de la alteración, los SSO. Como se ha mencionado anteriormente, estos grupos son propios de cada especie y dentro de cada una de ellas, serán característicos de las condiciones de conservación, muy influidos por la temperatura de almacenamiento. Concretamente, en el caso de los filetes de merluza envasados en atmósfera modificada con elevada concentración de CO<sub>2</sub> se sospecha que el agente último responsable de la alteración es *Photobacterium phosphoreum* (Artaiz, 2016).

*P. phosphoreum* es un microorganismo que puede encontrarse como simbiótico y parásito de peces de aguas marinas frías y profundas, como sucede en la merluza. También ha sido posible aislarlo a partir de agua marina de forma libre (Budsberg, Wimpee, y Braddock, 2003). Se trata de un microorganismo altamente resistente a las concentraciones elevadas de CO<sub>2</sub> y esto supone una ventaja para su desarrollo frente a sus competidores en el entorno de una atmósfera modificada rica en este gas (Dalgaard et al., 1997). Tiene unos requerimientos de sodio elevados, por lo que se considera una especie exclusivamente marina y que se favorece de los entornos salados para sobrevivir, como es el pescado (Budsberg, Wimpee, y Braddock, 2003). La importancia de *P. phosphoreum* radica en su elevada capacidad para convertir el TMAO en TMA (Dalgaard et al., 1997).

Por otra parte, los avances tecnológicos en el campo de la biología molecular son cada vez más rápidos, empujados por la mejora continua y la búsqueda constante de la eficiencia económica de los procesos, lo que ha permitido de forma colateral el aumento del número de muestras que se pueden analizar simultáneamente y a la reducción del tamaño de la muestra requerida (Madigan et al., 2015). La posibilidad de amplificar secuencias de DNA in vitro de manera específica, mediante la PCR, provocó el auge de estudios en el genoma de los seres vivos gracias a los diferentes métodos de secuenciación. A partir de esta base se han desarrollado un grupo de técnicas conocidas como “secuenciación de próxima generación” (del inglés, *Next-Generation Sequencing*, NGS). Estas técnicas suplen algunos de los inconvenientes que plantea la

técnica original de PCR, y permiten que en un solo análisis se puedan detectar miles o incluso cientos de miles de variantes genéticas, mientras que en la metodología tradicional las pruebas son específicas para un único microorganismo y una mutación o sección determinada del genoma. Este término, que a veces se subdivide en secuenciación de segunda y tercera generación, hace referencia a las técnicas de secuenciación de alta eficiencia (del inglés, High Through-put Sequencing, HTS) y de secuenciación masivamente paralela (Alekseyev et al., 2018). Los análisis masivos de secuenciación han posibilitado el desarrollo de la metagenómica, es decir el estudio de la genómica ambiental en la que se pueden encontrar DNA o RNA procedente de organismos que no han sido previamente aislados o identificados. Mediante ellos es posible conocer las secuencias que componen el metagenoma de un ambiente, el contenido total de genes de los organismos que se encuentran en él (Madigan et al., 2015).

Mediante el estudio de la metagenómica es posible conocer las interacciones entre especies de un mismo ambiente, lo que resulta de interés en comunidades microbianas responsables de la alteración, ya que influye en la velocidad y la forma en la que se alteran los alimentos. Si bien no suele ser posible ensamblar genomas de organismos completos en ambientes fértiles, como es el pescado, sí que es posible identificar unidades taxonómicas operacionales (del inglés, *Operational Taxonomic Units*, OTUs). La bioinformática permite contabilizar el número de secuencias con la misma OTU que se ha amplificado generando una estimación de la cantidad de bacterias de un grupo taxonómico se encuentra dentro de la misma muestra (Ercolini, 2013).

Las secuencias del gen 16S rRNA es el marcador genético más utilizado para identificar partes de las comunidades microbianas, así como para estudiar la filogenia y la taxonomía de las bacterias. Entre las razones por las que se utiliza de manera tan habitual se encuentran: su presencia en prácticamente todas las bacterias, el hecho de que la función del gen 16S rRNA no ha cambiado a lo largo del tiempo, lo que sugiere que es menos susceptible de sufrir mutaciones aleatorias que otras secciones y que su longitud es de alrededor de 1500 pares de bases (Janda y Abbott, 2007). La secuencia completa del gen conserva secciones que han permanecido inalteradas a lo largo del

tiempo y otras variables, por lo que es útil para diferentes aplicaciones (Madigan et al., 2015).

Una de las aplicaciones más interesantes de las NGS en el ámbito alimentario, es el estudio de la evolución del microbioma de los alimentos durante el proceso de alteración. Conocer la flora dominante y subdominante en el producto en cada momento del proceso de alteración, puede facilitar la comprensión de estos procesos y ayudar a predecir la vida útil de estos productos. Desde que se han comenzado a aplicar estas técnicas en alimentos, la evolución de la microflora durante el proceso de deterioro se ha estudiado en bacalao y salmón, aunque es llamativa la ausencia de estudios de este tipo en merluza, dada su relevancia a nivel mundial. En estos estudios ya se ha destacado la dominancia de *Photobacterium phosphoreum* en las etapas de alteración en los ambientes de envases en atmósferas modificadas ricas en CO<sub>2</sub>. Los estudios de la metagenómica en alimentos además ayuda a secundar las sospechas acerca de los grupos y especies microbianos que conforman los SSO y a conocer más acerca de ellos (Macé et al., 2012; Janda y Abbott 2007; Kergourlay et al., 2015).

## **2. Justificación y objetivos**

Este trabajo de fin de grado se encuentra enmarcado dentro del proyecto “Sistema de procesado eco-innovador basado en tecnología por ultrasonidos que mejora la conservación de productos de la pesca (aspectos técnicos y microbiológicos)” cuyo principal objetivo es la prolongación de la vida útil del pescado envasado en atmósfera modificada. Entre las herramientas que se están desarrollando para alcanzar este objetivo se encuentra la puesta a punto de modelos predictivos, que permitirían optimizar la gestión de los recursos disponibles, identificar lotes “potencialmente” problemáticos que rechazar y/o implementar sistemas de pago en función de la calidad del producto.

A día de hoy se dispone de cuatro grupos de métodos para evaluar y predecir la calidad del pescado: métodos sensoriales, métodos bioquímicos y químicos, métodos físicos y métodos microbiológicos. Estos últimos se consideran los más útiles para predecir la vida útil del pescado porque su crecimiento y metabolismo son la causa de la alteración del pescado. No obstante, las técnicas microbiológicas clásicas presentan algunos

problemas (como su lentitud en la obtención de resultados). Dado que las técnicas microbiológicas moleculares suplen los inconvenientes de las técnicas clásicas, y concretamente, la qPCR permite obtener resultados en un breve periodo de tiempo, se plantearon los siguientes objetivos para este trabajo:

- Poner a punto una técnica qPCR apropiada para la cuantificación de *P. phosphoreum*.
- Verificar la utilidad de dicha técnica para la cuantificación de *P. phosphoreum* en filetes de merluza.
- Evaluar la utilidad de la qPCR para predecir la vida útil de la merluza mediante el uso de ecuaciones previamente desarrolladas a través de un estudio de vida útil en merluza envasada en atmósfera modificada rica en CO<sub>2</sub>.
- Comparar el modelo basándose en datos procedentes de recuentos bacterianos frente a los obtenidos mediante qPCR.
- Optimizar la metodología de extracción del material genético para realizar un estudio metagenómico de la microbiota presente en el momento de la alteración de la merluza envasada en atmósferas modificadas.

### **3. Material y métodos**

#### **3.1. Materia prima y condiciones de envasado y almacenamiento**

La materia prima que se utilizó para obtener las curvas de calibración, las curvas de crecimiento y la puesta a punto de los métodos de extracción, fueron merluzas (*Merluccius merluccius*), del Mar Cantábrico (zona FAO 27) proporcionadas por la empresa Scanfisk S.L. (con sede en Zaragoza). Este mismo producto también fue utilizado en el estudio de vida útil junto con merluza del Cabo (*Merluccius paradoxus*), procedente de la costa de Sudáfrica (zona FAO 47) que suministró la misma empresa.

Los filetes enteros, con un peso aproximado de 400 a 600 g cada uno, se porcionaron y envasaron en bandejas (LINPAC PackagingSpain, Vegafriosa, Ref: 05234, España) (aprox. 200g/bandeja) en una atmósfera modificada de 50% N<sub>2</sub>/ 50% CO<sub>2</sub> realizada en una envasadora-termselladora (ULMA, modelo SMART-40, ULMA, Oñate, España). Esta composición es la que utiliza actualmente la empresa para la comercialización de

este producto, ya que se ha verificado en estudios anteriores su capacidad para prolongar su vida útil.

Las bandejas se conservaron en cámaras refrigeradas a 1,4 y 7°C y para el estudio de vida útil además se almacenaron simulando las condiciones de iluminación (14 horas diarias) que se dan en los expositores de los supermercados.

### 3.2. Cepas microbianas y obtención de cultivos

En la tabla 3.1. se detallan los microorganismos utilizados en este estudio. Todos ellos proceden de la colección de cepas del Departamento de Patología Animal y de la del Grupo de Nuevas Tecnologías de los Alimentos, ambos pertenecientes a la Universidad de Zaragoza. En todos los casos se corresponden con cepas aisladas a partir de producto fresco salvo en las obtenidas de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) y de la alemana (DSMZ). Dichos cultivos se mantuvieron almacenados en congelación (a -80 °C) hasta su uso.

| Espece microbiana                   | Cepa/Colección   |
|-------------------------------------|--|
| <i>Photobacterium phosphoreum</i>   | CECT 4192  |
| <i>Photobacterium kishitani</i>     | CECT 4172  |
| <i>Photobacterium iliopiscarium</i> | DSMZ 9896  |
| <i>Photobacterium spp.</i>          | 20 cepas (aisladas de merluza) Departamento de Tecnología de los Alimentos |
| <i>Photobacterium damsela</i>       | CECT 626   |
| <i>Photobacterium leiognathi</i>    | CECT 4191  |
| <i>Aeromonas salmonicida</i>        | Colección del Departamento de Patología animal                             |
| <i>Edwardsiella tarda</i>           | Colección del Departamento de Patología animal                             |
| <i>Yersinia ruckery</i>             | Colección del Departamento de Patología animal                             |
| <i>Renibacterium salmoninarum</i>   | Colección del Departamento de Patología animal                             |
| <i>Listonella anguillarum</i>       | Colección del Departamento de Patología animal                             |
| <i>Lactococcus garveae</i>          | Colección del Departamento de Patología animal                             |
| <i>Streptococcus parauberis</i>     | Colección del Departamento de Patología animal                             |
| <i>Flexibacter maritimum</i>        | Colección del Departamento de Patología animal                             |

Tabla 3.1. Cepas microbianas utilizadas para el diseño de cebadores y el estudio de inclusividad y exclusividad de estos.

Los cultivos de *Photobacterium phosphoreum* que se utilizaron para la puesta a punto de las técnicas, obtención de rectas de calibración y el dopaje de la merluza para determinados estudios, se obtuvieron tras inocular botes de 50 mL de caldo LH (previamente esterilizados en autoclave) con un asa de siembra a partir de un criovial. Una vez inoculados estos botes se incubaron durante 3 días a 15 °C, lo que resultó en cultivos en fase estacionaria de crecimiento con aproximadamente  $10^8$  UFC/mL.

### **3.3. Análisis microbiológicos de merluza**

Para la cuantificación de los grupos microbianos de relevancia, se obtuvieron muestras de 25 g de merluza a partir de los filetes envasados. Estas muestras se sumergieron en 225 mL de agua de peptona tamponada (APT; Oxoid, Hampshire, England) con un 0,85% de NaCl (Panreac, Barcelona, España) y se homogeneizaron en un Stomacher 400 Circulator (Seward, Worthing, Reino Unido) durante 30 segundos. A partir de este homogeneizado se realizaron las diluciones decimales correspondientes en APT + 0,85% de NaCl y se sembraron las placas (previamente preparadas) mediante homogeneización en superficie utilizando asas de Drigalsky estériles, salvo en el caso del recuento de flora ácido láctica que se llevó a cabo mediante homogeneización en masa y con la adición de una doble capa de agar. Antes de realizar las siembras se conservaron 6 mL de cada una de las muestras para realizar los análisis de biología molecular.

Una vez sembradas, las placas se incubaron en las condiciones que se describen en la tabla 3.2. para la cuantificación de los diferentes grupos microbianos. La tabla incluye la temperatura y tiempo de incubación, así como el tipo de atmósfera (aeróbica o anaeróbica) y de siembra (en superficie o en masa).



| Agar                              | Temperatura (°C) | Tiempo(h:horas; d:días) | Atmósfera    | Tipo de siembra | Microorganismos recuperados           |
|-----------------------------------|------------------|-------------------------|--------------|-----------------|---------------------------------------|
| Plate Count Agar <sup>1</sup>     | 37               | 48 h                    | Aerobiosis   | Superficie      | Aerobios mesófilos                    |
| LH Agar <sup>2</sup>              | 7                | 10-12 d                 | Anaerobiosis | Superficie      | Anaerobios psicrótrofos               |
| VRBG Agar <sup>3</sup>            | 37               | 48 h                    | Aerobiosis   | Superficie      | Enterobacterias                       |
| Elliker Caldo <sup>4</sup> + Agar | 25               | 24-48 h                 | Anaerobiosis | Masa            | Streptococcus y Lactobacilos          |
| Agar Hierro (Lyngby) <sup>5</sup> | 25               | 3-4 d                   | Aerobiosis   | Superficie      | <i>Shewanella</i>                     |
| GSP <sup>6</sup>                  | 25               | 24-48 h                 | Aerobiosis   | Superficie      | <i>Aeromonas</i> y <i>Pseudomonas</i> |
| LH Agar                           | 7                | 10-12 d                 | Anaerobiosis | Superficie      | <i>Photobacterium</i>                 |

<sup>1</sup>(Oxid, Basingstoke, Inglaterra) <sup>2</sup>Broekaert et al., 2011. <sup>3</sup>Violeta Rojo y Bilis Glucosa Agar (VRBG) (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra). <sup>4</sup>Elliker Caldo (Sigma-Aldrich, Madrid, España). <sup>5</sup>Agar Hierro (Lyngby) (Conda, Madrid, España). <sup>6</sup>Glutamate Starch Phenol Red Agar (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) + Penicilina G (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania).

Tabla 3.2. Medios de cultivo y condiciones para la determinación de los distintos grupos microbianos.

### 3.4. Modelización de las gráficas de crecimiento microobiano

El modelo utilizado para describir el crecimiento microbiano en función del tiempo fue el de Baranyi (Baranyi y Roberts, 1995). Para ello se utilizó la herramienta DMFit 3.5 (disponible en <https://www.combase.cc/index.php/en/8-category-en-gb/21-tools>), una extensión del programa Excel (Microsoft, Seattle, EE.UU.).

Las ecuaciones que definen este modelo son:

$$Y(t) = Y_0 + \mu_{max}A(t) - \ln \left( 1 + \frac{e^{\mu_{max}A(t)} - 1}{e^{(Y_{end}-Y_0)}} \right)$$

$$A(t) = t + \frac{1}{\mu_{max}} \ln(e^{-\mu_{max}t} + e^{-\mu_{max}\lambda} - e^{-\mu_{max}(t+\lambda)})$$

Donde  $Y_{end}$ = Máximo recuento alcanzado;  $Y_0$ = Recuento inicial;  $\mu_{max}$ = Velocidad máxima de crecimiento, y  $\lambda$  = Parámetro de caracterización de la fase lag.

### **3.5. Determinación de la concentración de trimetilamina (TMA)**

Para llevar a cabo la determinación de TMA se tomaron 25 g limpios de los filetes de pescado sin piel ni espinas. Sobre esta muestra se añadieron 50 mL de tricloroacético al 7,5% p/v. La mezcla se trituró con un Ultra-turrax (T 25 Basic, IKA WERKE, Staufen, Alemania) para posteriormente ser filtrado a vacío. En este punto las muestras, que se recogían en los momentos predeterminados se congelaron a -80 °C para ser procesados de forma conjunta posteriormente. Una vez descongeladas las muestras se alicuotaron 4 mL del filtrado al que se le añadió 1 mL de formaldehído al 20% p/p, 10 mL de tolueno y 2 mL de solución de carbonato potásico al 100% p/v. Se añadió sulfato de sodio (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) para evitar la captación de agua ambiental por parte del tolueno, altamente higroscópico. Para realizar una extracción en seco se separó la capa orgánica con la que se continuará el proceso. Se añadieron 5 mL de la solución de ácido pícrico al 0,02% que colorea la solución y posteriormente se realizó la medida de la absorbancia. Para conocer la concentración de TMA en las muestras en primer lugar fue necesario elaborar una recta de calibración con concentraciones conocidas de TMA (Sigma Aldrich, San Luis, EE.UU.) y siguiendo los mismos pasos.

### **3.6. Evaluación sensorial**

La evaluación sensorial de la merluza a lo largo del almacenamiento en atmósferas modificadas se llevó a cabo por el Grupo de Calidad y Tecnología de la Carne del Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos de la Universidad de Zaragoza y consistió en la ejecución de tres análisis específicos descritos a continuación:

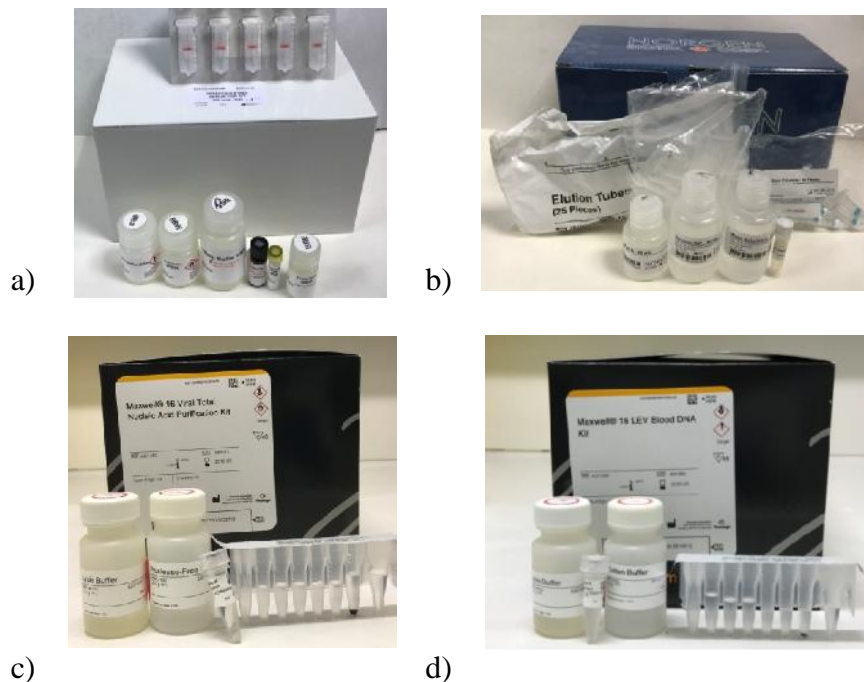
- Método del Índice de Calidad (QIM) para filetes frescos (Abaroa et al., 2008 - adaptado). Se evaluó la frescura visual de filetes de bacalao mediante los siguientes parámetros: firmeza muscular, olor en zona muscular, grado de deshidratación en las zonas de corte, presencia de marcas o moratones, aspecto de la piel, elasticidad de la piel, y acuosidad del músculo.
- Índice de Calidad (IC) TORRY para pescado cocinado (Seafish, 2010). Se tuvieron en cuenta tres aspectos básicos: olor, sabor y textura.

- Perfil de textura (PTS) (Seafish, 2010). evaluándose tres descriptores primarios (acuosidad, firmeza y elasticidad) y cuatro descriptores secundarios (fibrosidad, suavidad (uniformidad de la muestra)), dureza (tenacidad en boca) y succulencia (jugosidad del pescado).

### 3.7. Métodos moleculares

#### 3.7.1. Aislamiento y purificación de DNA

Existen diferentes kits comerciales para la extracción de los ácidos nucleicos. En este estudio se evaluaron varios de ellos, dos de ellos manuales y dos semiautomáticos aprovechando la disponibilidad del equipo de extracción Maxwell 16 (Promega, Madison, EE.UU.). Los kits de extracción de ácidos nucleicos que se evaluaron fueron: Speedtools DNA Extraction Kit (Biotools, Madrid, España), PCR Purification Kit (Norgen Biotek Corporation, Canadá), Maxwell 16 Lev Blood DNA Kit (Promega, Madison, EE.UU.) y Maxwell 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit (Promega, Madison, EE.UU.) (Figura 3.1.).



**Figura 3.1.** Kits de extracción de ácidos nucleicos: a) Speedtools DNA Extraction Kit (Biotools); b) PCR Purification Kit (Norgen); c) Maxwell 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit (Promega); d) Maxwell 16 Lev Blood DNA Kit (Promega).

Todos los kits de extracción se basan en el mismo fundamento. Concretamente el protocolo de los kits de extracción manual detalla los siguientes pasos:

En primer lugar se añade el tampón de lisis que contiene sales y detergente que potenciará el lisado de las células ayudado por una incubación a 70 °C durante un periodo de 10 a 20 minutos. Al mismo tiempo se añade Proteinasa K que contribuye a digerir las proteínas presentes en la muestra. Posteriormente se añade etanol al 96% que producirá que el DNA quede en suspensión. Se transfiere esta solución a las columnas que incluyen todos los kits y centrifugando durante el tiempo y a la velocidad indicada por el protocolo del kit utilizado para que el contenido atraviese la membrana quedando el material genético retenido en la sílica como consecuencia de la diferencia de cargas. Seguidamente se realizan lavados del DNA fijado en la columna añadiendo soluciones incluidas en los kits y centrifugando entre ellos. Opcionalmente se realiza una centrifugación de mayor intensidad para inducir el secado de la membrana por evaporación del etanol que pueda quedar en ella y que puede interferir en procesos posteriores. Para finalizar se añade el tampón de elución, que redisuelve el DNA ligado a la columna y que arrastrará en una última centrifugación, este quedará en solución, y será recogido en un vial plástico.

Los principios aplicados en el kit semiautomático son los mismos. En primer lugar se realiza la digestión mediante la adición sobre la muestra del tampón de lisis así como la proteinasa K y manteniendo la mezcla a 70 °C durante 10 – 20 minutos. Esta primera etapa se produce de la misma forma que para los kits manuales, a partir de aquí, los principios son los mismos, pero se aplican de diferente forma. El kit ofrece cartuchos en los que se encuentran separados en pocillos individuales el etanol y todos los líquidos para los lavados. Cada cartucho contiene un pocillo en el que se encuentran las esferas de sílice magnetizadas y otro vacío en el que se fija el émbolo que protege el equipo (Figura 3.2.). El sistema se basa en la electrificación de la cámara para que las esferas magnetizadas queden adheridas a las púas del peine, que se encuentra en el interior del equipo (Figura 3.3.), y que se mueve permitiendo que las esferas sean introducidas en cada uno de los pocillos donde se producen los lavados mediante agitación cuando cambia la polaridad de la cámara. El último paso es la elución en otro tampón no iónico

que provoca la disolución de los ácidos nucleicos y su separación de las esferas de sílice, y por tanto se consigue su concentración en un volumen final de 100  $\mu\text{L}$ .



**Figura 3.2.** Distribución del cartucho de Maxwell 16 Lev Blood DNA Purification Kit. **Figura 3.3.** Equipo de extracción Maxwell 16 (Promega, Madrid, España).

### 3.7.2. Cuantificación del DNA extraído y comprobación de su calidad

La cantidad y calidad del DNA extraído se determinó mediante un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Massachusetts, EE.UU.). Los parámetros utilizados fueron la ratio de las absorbancias a 260 y 230 nm y la ratio de absorbancias entre 260 y 280 nm. La medida a 260 nm determina la cantidad de ácidos nucleicos íntegros así como los nucleótidos libres. La primera relación de absorbancias es indicativa de la presencia de carbohidratos en la muestra, de fenol o glicógeno usado para la precipitación durante la extracción. La ratio de absorbancias 260/280 refleja la pureza del DNA ya que las proteínas presentan un máximo de absorbancia próximo a los 280 nm. Se consideraron como óptimos para ambas ratios valores alrededor de 1,9 - 2.

### 3.7.3. Amplificación y cuantificación del DNA mediante qPCR

La reacción enzimática de amplificación tiene lugar en un pocillo de 90  $\mu\text{L}$  de capacidad, si bien el volumen total de la reacción es de 23,05  $\mu\text{L}$ . Este volumen es el resultante de la mezcla de todos los reactivos necesarios para que tenga lugar la reacción. En estos ensayos se utilizó la enzima Taq polimerasa combinada con los nucleótidos así como con otros reactivos en el kit GoTaq qPCR Master Mix (Promega, Madison, EE.UU.) (Figura 3.4.). El protocolo indica la adición de: 10  $\mu\text{L}$  de Nuclease-Free Water, 10  $\mu\text{L}$  GoTaq qPCR Master Mix, 0,4  $\mu\text{L}$  de cada uno de los cebadores (la pareja de cebadores sumarán 0,8  $\mu\text{L}$ ) y 2,25  $\mu\text{L}$  de la muestra. Los cebadores elegidos para desarrollar los

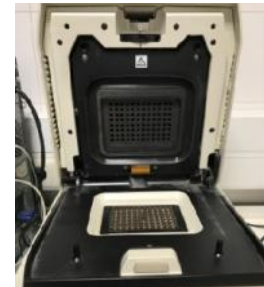
ensayos fueron MO 627,628, PP 3,4 y Actina, siendo su secuencia obtenida en el caso del primero de la bibliografía (Macé et al., 2013) y en el de las dos últimas parejas diseñada por el Doctor Nabil Halaihel del Departamento de Patología Animal de la Universidad de Zaragoza. La amplificación del DNA extraído se realizó con un termociclador CFX Connect Real-Time System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EE.UU.) (Figura 3.5.). Este equipo permite programar los ciclos de temperaturas requeridos para que tenga lugar la reacción de amplificación y finalmente la determinación de la temperatura de disociación ( $T_m$ ). Los ciclos (Figura 3.6.) se programaron en función del tamaño de los fragmentos a amplificar, ya que se debe ajustar para que permita una elongación suficiente y específica.



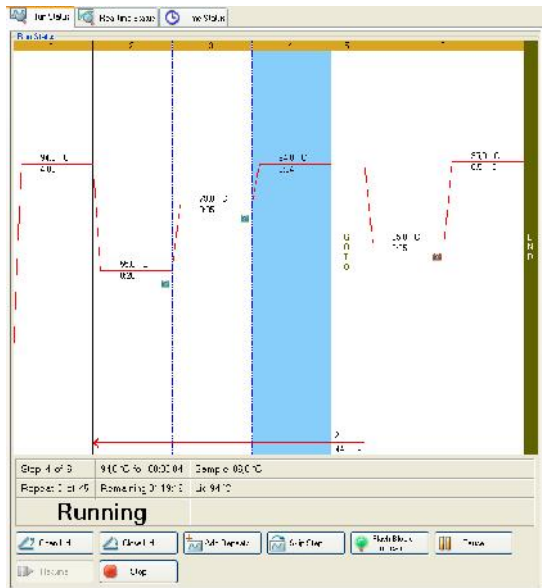
**Figura 3.4.** Kit de reactivos para qPCR GoTaq qPCR Master Mix (Promega, Madison, EE.UU.).



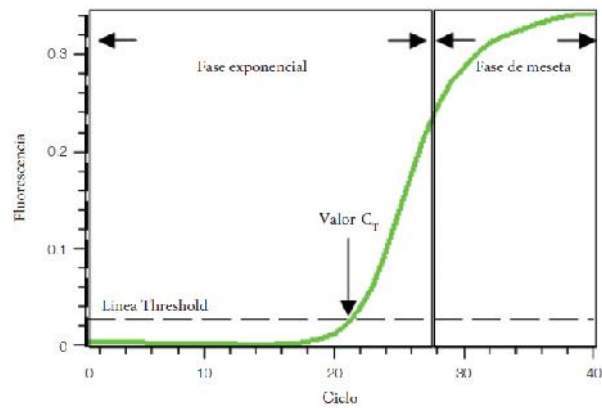
**Figura 3.5.** Termociclador a tiempo real CFX Connect Real-Time System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EE.UU.).



Los termocicladores de la PCR en tiempo real están conectados a un ordenador con un software específico (Bio-Rad CFX Manager 2.1) para el procesado y análisis de resultados. El resultado de la PCR en tiempo real se visualiza en un gráfico de amplificación (Figura 3.7.). En él se expresa la fluorescencia leída por el termociclador en el eje de las ordenadas y el número de ciclos de la PCR en el eje de las abscisas. En este gráfico es posible establecer un valor de fluorescencia umbral que se representa en el gráfico con una recta horizontal (línea Threshold o Umbral). Así mismo, el punto de intersección de una curva de amplificación con el umbral se denomina valor  $C_t$  (Threshold Cycle). Este parámetro indica el ciclo en el que la fluorescencia alcanza el valor umbral y es el que se utiliza para cuantificar la concentración de DNA pues cuanto más DNA inicial tenga la muestra, menor será el número de ciclos de replicación necesarios para alcanzar dicho valor umbral. Si la eficiencia de la reacción es óptima, cada vez que se diluye una muestra 10 veces el valor de  $C_t$  aumenta 3,321 ciclos.

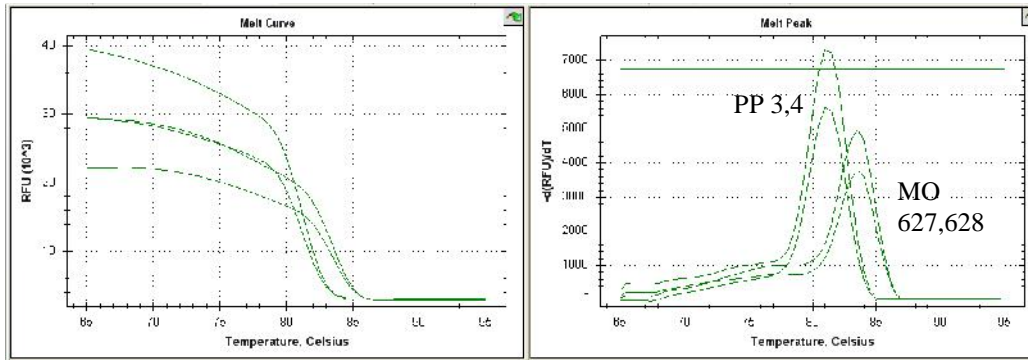


**Figura 3.6.** Relación de ciclos de tiempo y temperatura programados para la cuantificación de DNA en el termociclador.



**Figura 3.7.** Esquema del gráfico de amplificación mostrado por el software de un termociclador (adaptado de <http://www.bio-rad.com/>).

Para distinguir los productos de amplificación que se forman durante la PCR en tiempo real, se programó al final de la reacción una curva de disociación en el software del equipo. Este procedimiento consiste en aumentar gradualmente la temperatura de la reacción hasta conseguir la total desnaturalización del DNA. La lectura de la fluorescencia durante este proceso permite analizar la temperatura de disociación de los fragmentos de DNA en función de su tamaño y composición relativa de los nucleótidos: adenina, citosina, guanina y timina. Mediante este proceso se obtiene la “curva de melting” o “curva de disociación”, en la que se observarán tantos picos como productos se han producido en la reacción. Esta  $T_m$  sirve para identificar si el producto formado tras los ciclos de amplificación es el específico de la reacción de amplificación deseada o no. El valor de  $T_m$  específico para cada uno de los cebadores se obtuvo a partir de controles positivos (Figura 3.8.).



**Figura 3.8.** Curva de disociación de los cebadores PP 3,4 y Mo 627,628 en muestras, y sus respectivas diluciones, positivas para *P. phosphoreum*. (Izquierda: curva de disociación; Derecha: pico de disociación.)

### 3.7.4. High throughput 16S rRNA sequencing

El análisis del metagenoma se externalizó a una empresa externa (Alquizvetek S.L.). No obstante, las muestras tuvieron que ser acondicionadas y preparadas para la secuenciación masiva del DNA microbiano presente en dichas muestras. Para la optimización de estos métodos se utilizaron técnicas descritas en este mismo apartado para analizar la concentración y calidad del DNA extraído. Por razones metodológicas para cada uno de los puntos experimentales para los que se realizó este tipo de análisis se procedió como se describe a continuación.

A partir del homogeneizado obtenido en stomacher (el mismo que se utilizó para las determinaciones microbiológicas) se tomaron 2 mL de cada réplica. Dado que se trabajó con tres réplicas, esto resultó en 6 mL cuyo DNA se extrajo conjuntamente. Este DNA es el que se envió a la empresa para su análisis.

## 4. Resultados y discusión

### 4.1. Puesta a punto de la qPCR

Los análisis de qPCR presentan una elevada especificidad y una sensibilidad variable en función de los cebadores utilizados, si bien es por lo general elevada. La sensibilidad cuando varía no produce un descenso de la especificidad tal como sucede en muchas técnicas de análisis ya que depende de la temperatura (Restrepo et al., 2012). Así, el objetivo de esta primera parte fue determinar la especificidad de los cebadores diseñador y la sensibilidad del análisis de qPCR para la cuantificación de *P. phosphoreum*.



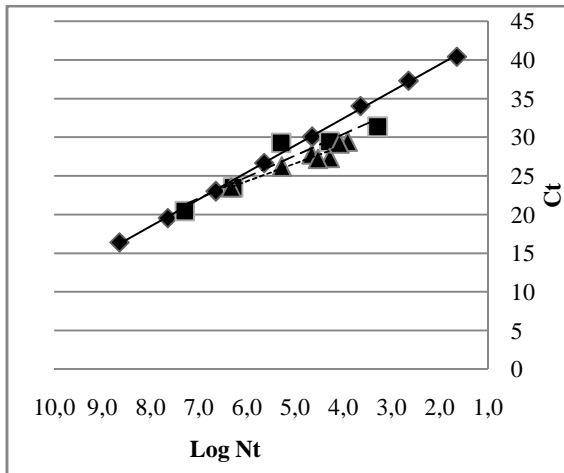
#### **4.1.1. Evaluación de los cebadores diseñados: estudios de inclusividad y exclusividad**

La sensibilidad de los cebadores utilizados para la qPCR se evaluó mediante la realización de pruebas sobre diferentes bacterias que se encuentran de manera habitual en los pescados marinos. Se aplicó el protocolo diseñado para todos los ensayos de ciclos de tiempo y temperatura para cada uno de los agentes y cada pareja de cebadores.

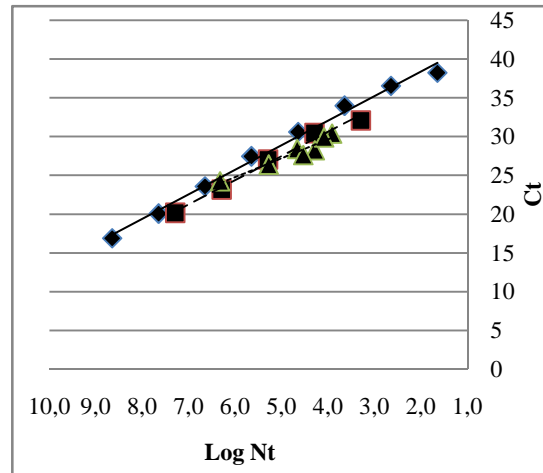
Los resultados obtenidos para ambos fueron idénticos (ver Anexo II). En ningún caso se detectaron como positivas muestras procedentes de microorganismos de otro género que no fuera *Photobacterium*, ni las de *P. damsela* que pertenece al lado 2 (para el que se sugiere la formación de otro género) (Urbanczyk, Ast y Dunlap, 2011). Para ambos cebadores sí fueron positivas tanto las muestras de *P. phosphoreum*, *P. iliopiscarium* y *P. kishitanii* como todas las cepas aisladas directamente de merluza (*Photobacterium spp.*).

#### **4.1.2. Sensibilidad y límites de cuantificación**

La evaluación de la sensibilidad de la técnica se desarrolló mediante la comparación de tres curvas de calibración. Estos ensayos se llevaron a cabo para relacionar la cantidad de microorganismos inoculados y el número de copias de DNA cuantificados mediante qPCR. De esta forma se obtuvieron dos gráficas (Figura 4.1. y 4.2.) a partir de las que se puede conocer la sensibilidad y los límites de cuantificación para cada una de las parejas de cebadores. A partir de la recta de regresión de estas curvas de calibración también se puede calcular la cantidad de microorganismos bien a través de la cantidad de copias de DNA o directamente de la Ct.



**Figura 4.1.** Relación entre Log Nt y Ct obtenida con el cebador PP 3,4 en: ◆ Agua de peptona tamponada (APT), ■ Hidrolizado de merluza y ▲ Filetes de merluza.



**Figura 4.2.** Relación entre Log Nt y Ct obtenida con el cebador MO 627,628 en: ◆ Agua de peptona tamponada (APT), ■ Hidrolizado de merluza y ▲ Filetes de merluza.

Estas rectas de calibración se obtuvieron en tres matrices diferentes: agua de peptona tamponada, hidrolizado de merluza y filetes de merluza. Esta comparación se llevó a cabo porque las diferentes matrices pueden condicionar la eficiencia de la extracción y/o influir en la reacción de la PCR en sí (Macé et. al, 2013). Como se puede observar en la figura, el rango de cuantificación en APT fue el más amplio, seguido por el hidrolizado de merluza y por último los filetes de merluza. A pesar de esta diferencia, las rectas de regresión obtenidas para las tres matrices fueron muy similares en un rango central que se correspondía a las muestras que presentaban entre 3,5 y 6,5 unidades logarítmicas de microorganismos. Las causas de este fenómeno pueden ser varias. Por un lado, hay que tener en cuenta la mayor complejidad del tejido muscular de la merluza que en comparación con el hidrolizado (filtrado previamente) y, por supuesto, frente al agua de peptona tamponada, lo que podría resultar en interferencias en la extracción y amplificación y que también podría conducir a una interferencia con la reacción de amplificación por una concentración elevada de DNA tanto bacteriano como eucariótico. También hay que señalar que las dificultades para “dopar” la merluza tanto en concentraciones bajas como elevadas podría contribuir también a este fenómeno. Las ecuaciones de la recta de regresión para cada una de las parejas de cebadores estudiadas y que se obtuvieron para la merluza dopada, que fueron las que se utilizaron para determinar la concentración de *P. phosphoreum* en los siguientes ensayos, quedan reflejados en la tabla 4.1.

| Cebador    | Ecuación de la recta                      | Coefficiente de determinación |
|------------|---|-------------------------------|
| PP 3,4     | $\text{Log Nt} = -2,309\text{Ct} + 38,15$ | $R^2 = 0,932$                 |
| MO 627,628 | $\text{Log Nt} = -2,421\text{Ct} + 39,31$ | $R^2 = 0,931$                 |

Tabla 4.1. Rectas de regresión y coeficientes de determinación para cada uno de los cebadores estudiados en merluza.

Ambas rectas de regresión presentaron valores  $R^2$  superiores a 0,9, indicativo de un buen ajuste de la recta a los datos experimentales.

#### 4.2. Obtención de curvas de crecimiento de *P. phosphoreum* en merluza mediante qPCR

El siguiente ensayo consistió en la obtención de curvas de crecimiento para *P. Phosphoreum* a diferentes temperaturas de conservación en refrigeración. Para ello, fue necesario, en primer lugar, eliminar la carga inicial de *P. phosphoreum* de la merluza, para lo que se sometieron a un tratamiento térmico de 45 °C durante 30 minutos de acuerdo a lo descrito por Dalgaard, Mejholm y Huss (1996). Posteriormente se inocularon filetes de unos 100 g con una suspensión de *P. phosphoreum* en APT + 0,85% NaCl una concentración de  $10^7$  UFC/mL. Los filetes se envasaron en las condiciones indicadas en material y métodos, y se conservaron a 1, 4 y 7 °C durante 21 días en el caso de las dos primeras temperaturas y 6 días en el caso de la última.

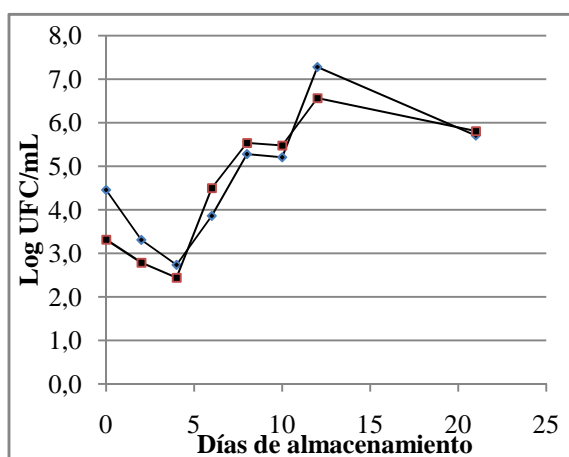


Figura 4.3. Curva de crecimiento de *P. phosphoreum* en merluzas conservadas a 1 °C. ◆ cebador PP 3,4; ■ cebador MO 627,628.

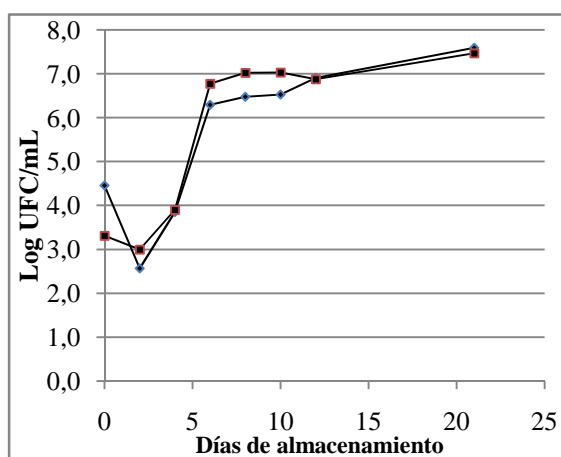
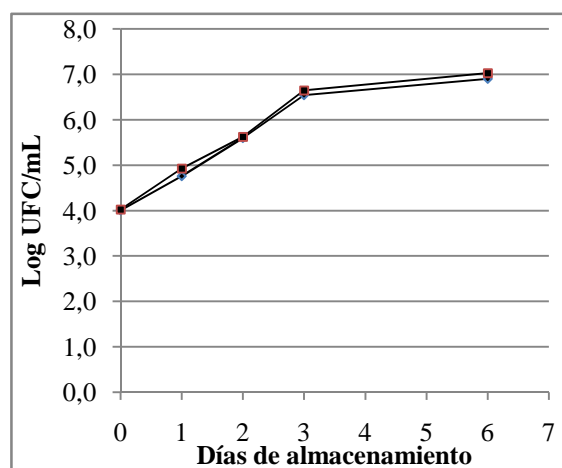


Figura 4.4. Curva de crecimiento de *P. phosphoreum* en merluzas conservadas a 4 °C. ◆ cebador PP 3,4; ■ cebador MO 627,628.



**Figura 4.5.** Curva de crecimiento de *P. phosphoreum* en merluzas conservadas a 7 °C. ◆ cebador PP 3,4; ■ cebador MO 627,628.

Las curvas de crecimiento obtenidas se muestran en las figuras 4.3., 4.4. y 4.5. Como se puede observar, ambas son muy similares independientemente de la pareja de cebadores utilizada. La velocidad máxima de crecimiento, determinada tras el ajuste de los valores experimentales al modelo de Baranyi (Baranyi y Roberts, 1996) según se describe en material y métodos, para cada una de las temperaturas y para cada pareja de cebadores se incluye en la tabla 4.2. Los valores fueron muy similares entre sí y, a su vez, muy parecidos a los determinados previamente mediante técnicas microbiológicas clásicas. Tan solo en el caso de las curvas de 1 °C fueron ligeramente superiores las calculadas a partir de los valores determinados por qPCR a los de recuentos en placas. Esto significa que la técnica desarrollada podría resultar útil para cuantificar el crecimiento de *P. phosphoreum* en muestras de pescado en condiciones reales.

| Temperatura | PP 3,4        | MO 627,628    | Recuento en placa* |
|-------------|---------------|---------------|--------------------|
| 1           | 0,691 ± 0,116 | 0,775 ± 0,134 | 0,472 ± 0,080      |
| 4           | 1,054 ± 0,062 | 1,109 ± 0,063 | 0,995 ± 0,050      |
| 7           | 1,830 ± 0,148 | 1,873 ± 0,156 | 1,600 ± 0,300      |

Tabla 4.2. Velocidades máximas de crecimiento determinadas mediante el modelo de Baranyi para cada temperatura de incubación y pareja de cebadores. Los valores determinados mediante recuento en placa se incluyen para poder establecer comparaciones.

\* Adriana Antunes (comunicación personal)

#### **4.3. Estudio de vida útil: cuantificación de *P. phosphoreum* en condiciones reales y evaluación de la utilidad de la técnica qPCR para predecir la vida útil de la merluza envasada en atmósferas modificadas**

De los resultados anteriores se deduce que la técnica qPCR puesta a punto permitiría cuantificar la concentración de *P. phosphoreum* en merluza. Por otra parte, el modelo predictivo, que previamente se ha desarrollado en el Grupo de Nuevas Tecnologías de Conservación de los Alimentos (Artaiz, 2016), permite conocer el tiempo necesario para que *P. phosphoreum* alcance una concentración determinada. No obstante, para que el modelo permita predecir la vida útil, es necesario conocer la concentración de microorganismos que produce la alteración en el pescado.

Para determinar esta concentración se llevó a cabo un estudio de vida útil en el que las bandejas de merluza se conservaron en condiciones similares a las que se dan en los lineales de los supermercados a tres temperaturas diferentes (1, 4 y 7 °C) en el caso de la merluza procedente de la costa cantábrica y a 4 °C en el caso de la merluza de El Cabo, según se describe en material y métodos. A partir de estas bandejas se tomaron muestras en diferentes momentos a las que se realizó una evaluación sensorial mediante un panel entrenado y los correspondientes análisis microbiológicos.

Asimismo, se determinó la concentración de TMA, como principal compuesto químico responsable de olores desagradables (Baixas-Nogueras et al., 2003).

Según el análisis estadístico de los resultados obtenidos en la evaluación de los tres parámetros sensoriales descritos en material y métodos, se determinaron como días de alteración de la merluza: 6, 3 y 2 para las temperaturas de conservación de 1,4 y 7 °C respectivamente. Se determinó del mismo modo el día 3 como momento de alteración en la réplica realizada con merluza procedente de El Cabo y tratada en las mismas condiciones, en una conservación de 4 °C. En esos días se determinaron las concentraciones microbianas mostradas en la tabla 4.3. En esta misma tabla se indican los valores de TMA para cada uno de estos días y cada una de las temperaturas.

| Temperatura de conservación | Día de alteración | Recuentos en placa Log UFC/g |             |             |             |             |             | TMA (mg/100 g) |
|-----------------------------|-------------------|------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|----------------|
|                             |                   | AM                           | ANP         | Photo       | Pseud       | Shewa       | LAB         |                |
| 1 °C                        | 6                 | 3,86 ± 0,33                  | 6,65 ± 0,38 | 5,77 ± 1,10 | 2,98 ± 0,72 | 5,44 ± 0,64 | 3,85 ± 0,04 | 7,69 ± 0,74    |
| 4 °C                        | 3                 | 2,48 ± 0,31                  | 6,39 ± 0,28 | 5,81 ± 0,40 | 3,26 ± 0,24 | 5,25 ± 0,59 | 4,02 ± 0,04 | 8,04 ± 1,30    |
| 4 °C R                      | 3                 | 4,63 ± 0,42                  | 7,45 ± 0,11 | 7,08 ± 0,40 | 5,14 ± 0,50 | 7,04 ± 0,38 | 3,75 ± 0,11 | 10,11 ± 0,34   |
| 7 °C                        | 2                 | 3,74 ± 0,59                  | 7,01 ± 0,22 | 6,47 ± 0,20 | 3,81 ± 0,40 | 5,71 ± 1,15 | 4,34 ± 0,56 | 8,29 ± 0,37    |

Tabla 4.3. Recuentos microbiológicos y cuantificación de TMA en los días de alteración de las merluzas a diferentes temperaturas de conservación. AM: aerobios mesófilos; ANP: anaerobios psicrótrofos; Photo: *Photobacterium phosphoreum*; Pseud: *pseudomonas*; Shewa: *Shewanella spp.*; LAB: Bacterias ácido-lácticas.

Se observa como la población mayoritaria es la de anaerobios psicrótrofos, grupo que incluye *Photobacterium* y *Shewanella*. En segundo lugar en los recuentos se encuentra *Photobacterium phosphoreum* ratificando la importancia de esta especie en los productos de la pesca como ya proponían algunos autores como Dalgaard (1996). Si bien la diferencia con los recuentos de *Shewanella spp.* no es muy grande, la relevancia de este radica en su elevada capacidad para producir TMA. En todos los casos, salvo en la réplica de la merluza de El Cabo, la concentración es superior a los 5 mg/100 g recomendados por Burgess (1979). Viendo los recuentos microbiológicos de este agente de alteración en el momento en el que se determinó la depreciación organoléptica, se estableció como concentración final de *P. phosphoreum* en la merluza en el momento de la alteración las 6,6 unidades logarítmicas por gramo de tejido.

Por tanto, al aplicar el modelo predictivo, la vida útil del pescado se calculó como el tiempo que tarda la concentración de *P. phosphoreum*, determinada mediante qPCR, en alcanzar el valor de  $10^6$  UFC/g.

La concentración de microorganismos en el día inicio del estudio se determinaron mediante qPCR y fue independiente de la temperatura de conservación pues las muestras se evaluaron previo almacenamiento. Este dato se introdujo en el modelo predictivo de desarrollado por Artai (2016) obteniendo de este el tiempo necesario para alcanzar la concentración determinada en el momento de alteración de *P. phosphoreum*. Los datos de concentración inicial así como la predicción de la vida útil se muestran en

la tabla 4.4. comparados con los días de vida útil que se determinaron mediante análisis sensorial.

| Muestra  | Log UFC/g día 0 | Predicción de vida útil (días) | Días de vida útil sensorial |
|----------|-----------------|--------------------------------|-----------------------------|
| MC 1 °C  | 5,51 ± 0,43     | 1,94                           | 2                           |
| MC 4 °C  |                 | 3,59                           | 3                           |
| MC 7 °C  |                 | 6,29                           | 6                           |
| MEC 4 °C | 5,36 ± 1,53     | 4,04                           | 3                           |

Tabla 4.4. Comparación del día de vida útil predicho, utilizando el modelo y los datos de carga de *P. phosphoreum* determinados mediante qPCR, y los días de vida útil determinados por evaluación sensorial. MC: merluza del Cantábrico; MEC: merluza de El Cabo.

La predicción de la vida útil resultó muy similar a los días en los que se consideró alterado el pescado mediante el análisis sensorial. Esto implica que la predicción de vida útil mediante la determinación de la concentración inicial de *P. phosphoreum* en merluza envasada en atmósfera modificada rica en CO<sub>2</sub> por qPCR es válida pues se ajusta al tiempo real que el producto tarda en alterarse. El ajuste es muy aceptable teniendo en cuenta la variabilidad individual dentro del propio lote con el que se realizó el estudio.

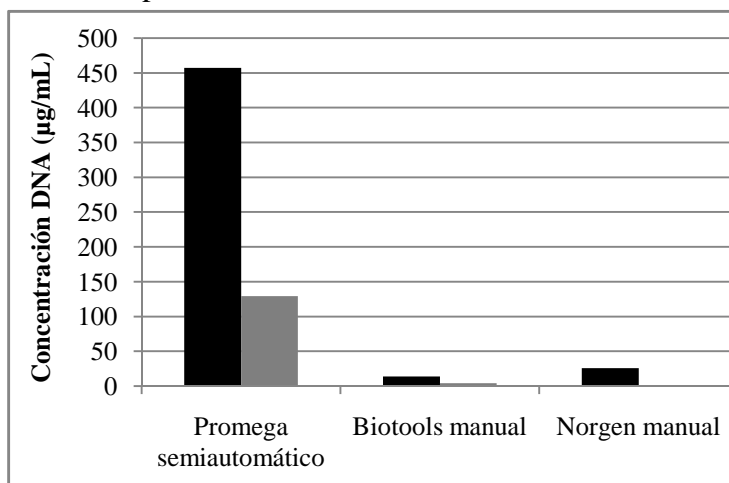
#### 4.4. Puesta a punto de la metodología para el estudio de la composición de la flora de la merluza en el momento de la alteración.

La última parte de este trabajo consistió en la puesta a punto de la metodología de extracción del DNA de las muestras de merluza de forma previa a su envío para la secuenciación masiva del mismo. Como ya se ha descrito en la introducción, este tipo de ensayos tienen una enorme utilidad en el campo de la microbiología alimentaria y, dentro del proyecto en el que se enmarca este trabajo, ayudarían a verificar los resultados obtenidos mediante métodos “cultivo-dependientes”. La necesidad de poner a punto la metodología de extracción de DNA para esta aplicación se hizo patente porque al aplicar el protocolo habitual para la extracción del DNA que se utilizaba para la realización de las qPCR de *P. phosphoreum* la concentración de DNA obtenida, si bien era de una pureza adecuada, era insuficiente para esta nueva aplicación. Así, siguiendo este protocolo la concentración de DNA purificado varió entre los 8,7 y 17,2 µg/mL (ver tabla Anexo II) lo que, dado que el volumen finalmente obtenido era de 50 µL, resultaba en una concentración como máximo de 0,86 µg.

Por ello, se tuvo que realizar una puesta a punto de la metodología de extracción del DNA para el estudio del microbioma en la merluza. Este proceso de optimización se realizó en las tres etapas siguientes.

#### 4.4.1. Comparación de kits de extracción

En primer lugar se trató de evaluar la eficiencia de extracción de diferentes kits comerciales. Se compararon dos kits de extracción de DNA manuales y uno de extracción semiautomática. Posteriormente se determinó la concentración y la pureza del DNA según se describe en material y métodos (medidas de absorbancia) y se realizó qPCR de *P. phosphoreum* y actina. El estudio se realizó por duplicado, por un lado la muestra fue constituida por merluza dopada con *P. phosphoreum* para asegurar la presencia del microorganismo en la muestra, y por otro lado, se prepararon muestras con merluza del mismo lote sin dopar. Se trabajó sobre la mejora de la eficiencia en la extracción puesto que las muestras de merluza se conservaron en congelación una vez diluidas 1/10 en APT y homogeneizadas en Stomacher, y esta dilución inicial ya no pudo ser corregida. En la Figura 4.6. se muestran los resultados del análisis de la concentración del DNA y no los de qPCR ya que el objetivo fue la preparación adecuada de las muestras para la secuenciación masiva.



**Figura 4.6.** Relación de la concentración del DNA y el método de extracción.

El kit semiautomático permitió además concentrar la muestra para eliminar parte del líquido de gobierno de la muestra, lo que no fue posible en los kits manuales, puesto que los filtros de sílica se saturarían. La diferencia en la eficacia de la extracción fue de hasta unas 10 veces, alcanzándose hasta concentraciones de DNA de 440 µg/mL. En base a este ensayo, se decidió trabajar con kits de extracción semiautomáticos.



#### 4.4.2. Evaluación de la eficiencia de los kits de extracción de DNA y de ácidos nucleicos totales

El equipo de extracción semiautomática permite la utilización de diferentes kits en función de la finalidad de la extracción. Se eligieron y compararon dos kits de extracción, uno con el que exclusivamente era posible la extracción del DNA y otro con el que se podía realizar la extracción de todos los ácidos nucleicos de una muestra. En paralelo también se testó hasta qué punto era posible concentrar la muestra inicial (mediante centrifugación; 15000 rpm, 5 minutos) sin que esto afectara a la eficiencia de la extracción (ni en cantidad ni en pureza).

| Cantidad inicial de muestra | Ácidos extraídos | Concentración DNA mg/mL | Abs 260/280 | Abs 260/230 | Ct PP 3,4 | Ct MO 627,628 | Ct Actina |
|-----------------------------|------------------|-------------------------|-------------|-------------|-----------|---------------|-----------|
| 0,1 mL                      | Totales          | 6,5                     | 1,624       | 0,722       | 24,75     | 21,93         | 37,34     |
|                             | DNA              | 15,2                    | 1,852       | 1,566       | 21,65     | 21,50         | -         |
| 0,4 mL                      | Totales          | 8,2                     | 1,577       | 0,845       | 18,45     | 19,44         | -         |
|                             | DNA              | 45,8                    | 1,967       | 1,967       | 17,56     | 18,04         | 36,60     |
| 1,6 mL                      | Totales          | 22,2                    | 1,621       | 1,461       | 16,95     | 16,45         | 37,86     |
|                             | DNA              | 241,0                   | 1,905       | 2,142       | 16,40     | 16,66         | 36,02     |
| 6 mL                        | Totales          | 45,2                    | 1,692       | 1,662       | 14,42     | -             | 36,27     |
|                             | DNA              | 544,7                   | 2,027       | 2,222       | 13,22     | 13,59         | 34,05     |

Tabla 4.5. Resultados de la medida de la concentración y la calidad del DNA extraído mediante dos kits semiautomáticos y de la qPCR de las mismas muestras concentrando diferentes cantidades de ellas.

Los resultados que se muestran en la tabla 4.5. indican que, para ambos kits de extracción la concentración de DNA purificada creció conforme aumentaba la cantidad inicial de muestra. Así mismo, se observa un descenso progresivo de la Ct de *P. phosphoreum* medida utilizando ambos cebadores mientras que la Ct de la actina se mantiene constante sufriendo pequeñas variaciones. Estos dos últimos datos son indicativos de que la centrifugación de la muestra conducía a un aumento en la concentración de DNA bacteriano, pero no del eucariótico (del pescado) lo cual es importante porque la presencia del tejido puede interferir y/o dificultar los estudios de secuenciación masiva. Finalmente resulta importante indicar que la concentración de DNA obtenida con el kit de DNA fue siempre superior a la obtenida con el kit de ácidos nucleicos totales y que la calidad del DNA extraído fue mejor en todos los casos en los que la extracción se realizó con el kit de DNA.

Por todo ello, el kit escogido para llevar a cabo la purificación del DNA para el estudio metagenómico de la microbiota de la merluza fue el kit semiautomático para DNA descrito en material y métodos.

#### **4.4.3. Optimización del protocolo de extracción**

Por último, se evaluó la posibilidad de la incorporación de una etapa de centrifugación a baja velocidad y durante poco tiempo (500 rpm, 1 minuto) de forma previa a la centrifugación a alta velocidad y durante más tiempo (15000 rpm, 5 minutos) con objetivo de precipitar el tejido del pescado y así limitar la contaminación de la muestra con DNA eucariótico.

Para estudiar este punto se llevaron a cabo dos experimentos, uno en la que se utilizó merluzas dopadas artificialmente con *Photobacterium* y otra en la que se utilizaron merluzas contaminadas de forma natural. Para todas las muestras se realizaron los mismos análisis, la determinación de la concentración y la calidad del DNA y ensayos de qPCR para *P. phosphoreum* y actina.

El primer ensayo, en el que se utilizaron merluzas contaminadas de forma natural, generó los resultados presentados en la tabla 4.6. En ella se puede observar que la centrifugación no produjo ninguna mejora notable en el proceso de extracción, obteniéndose concentraciones y calidades de DNA muy similares. Asimismo, la concentración de DNA bacteriano (estimada mediante la qPCR de *P. phosphoreum*) fue muy parecida independientemente de si las muestras eran sometidas o no a la centrifugación previa y, lo que resultó más sorprendente, tampoco se observaron diferencias en la Ct de la actina (se esperaba que subiera, por la precipitación de tejido). Esto es probablemente debido a que las muestras que se procesan han sido previamente homogeneizadas en el stomacher, lo que sería suficiente para romper una gran proporción de células musculares del pescado.

| Cantidad concentrada         | Concentración DNA $\mu\text{g/mL}$ | Abs 260/280 | Abs 260/230 | Ct PP 3,4 | Ct MO 627,628 | Ct Actina |
|------------------------------|------------------------------------|-------------|-------------|-----------|---------------|-----------|
| 1,6 mL Normal                | 120,3                              | 2,029       | 2,216       | 15,34     | 15,63         | 34,76     |
| 1,6 mL Centrifugación previa | 125,6                              | 2,023       | 2,220       | 15,68     | 16,03         | 34,39     |
| 4,8 mL Normal                | 567,8                              | 2,026       | 2,338       | 14,76     | 14,34         | 32,78     |
| 4,8 mL Centrifugación previa | 503,4                              | 2,064       | 2,364       | 14,23     | 15,04         | 33,36     |

Tabla 4.6. Concentración y calidad del DNA y qPCR de *P. phosphoreum* y actina para diferentes protocolos de preparación de la misma muestra.

En el segundo ensayo, se realizó el mismo ensayo para merluza dopada con una suspensión de *P. phosphoreum* de concentración aproximada de 8 unidades logarítmicas y sin dopar. De ellas se obtuvieron los resultados de las Figuras 4.7. y 4.8.

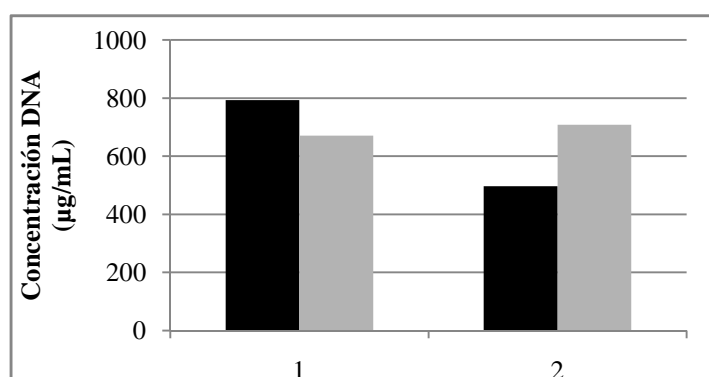


Figura 4.7. Concentración de DNA en diferentes cantidades de extracción de las muestras de ■: merluza sin dopar y ■: merluza dopada. 1: 1,6 mL; 2: 1,6 mL con centrifugación previa.

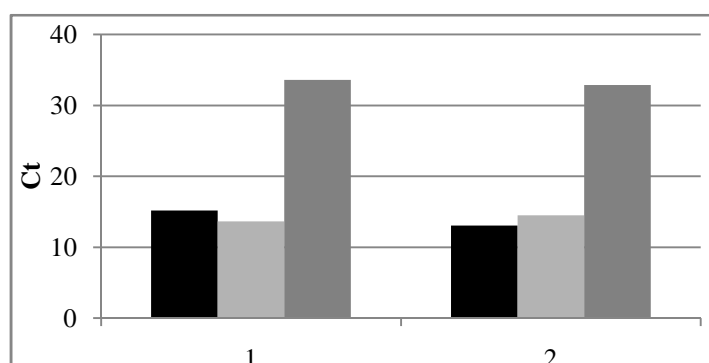


Figura 4.8. Resultado de la qPCR con el cebador PP 3,4 y de la actina de las diferentes cantidades de extracción de las muestras de ■: merluza sin dopar, ■: merluza dopada y ■: actina merluza sin dopar. 1: 1,6 mL; 2: 1,6 mL con centrifugación previa.

Mediante este ensayo se verificaron los resultados obtenidos en la primera réplica. Así mismo, se comprobó que la Ct de actina experimentaba la misma variación leve que en

el primer ensayo y que por tanto, la concentración de DNA no aumentaba como consecuencia de una extracción más eficiente del DNA del pescado.

En base a todos los ensayos realizados se concluyó que el método de extracción más apropiado para el envío de muestras para la realización de un estudio del metagenoma era la concentración de la mayor cantidad de muestra disponible mediante una centrifugación intensa (15000 rpm durante 5 minutos) tras la cual se realice la resuspensión del pellet en 200  $\mu$ L de Nuclease-Free Water. Esta sería la muestra que se sometería a una extracción mediante el sistema semiautomático con el kit de extracción Maxwell 16 LEV Blood DNA, que sólo conserva el DNA de la muestra.

## **5. Conclusiones**

El ensayo de qPCR puesto a punto en este trabajo es un método rápido, efectivo, preciso y lo suficientemente sensible para la cuantificación de la concentración de *P. phosphoreum* en los filetes de merluza envasados en atmósfera modificada de 50% CO<sub>2</sub> y 50% N<sub>2</sub>, a temperaturas de 1, 4 y 7 °C.

La cuantificación mediante qPCR de la carga inicial de *P. phosphoreum* resultó aplicable para la predicción de la vida útil de la merluza mediante el uso del modelo desarrollado por Artaiz (2016).

Se ha puesto a punto un protocolo de extracción de DNA bacteriano purificado a partir de filetes de merluza que permite obtener cantidad suficiente de material genético para desarrollar estudios del metagenoma del producto en el momento de la alteración.

## **6. Conclusions**

The qPCR assay set up in this work is a fast, effective, precise and enough sensitive method for the quantification of the concentration of *P. phosphoreum* in hake fillets packed in MAP of 50% CO<sub>2</sub> and 50% N<sub>2</sub>, and at different temperatures.

The quantification of the load of *P. phosphoreum* using qPCR was applicable for the prediction of the shelf-life of hake using the model developed by Artaiz (2016).

A protocol for the extraction of purified bacterial DNA from hake fillets has been developed that allows starting studies of the metagenome of the product at the moment of the alteration.

## **7. Valoración**

Realizar un trabajo de fin de grado de tipo “experimental” me ha permitido aumentar mi experiencia en el laboratorio, en la planta piloto y en la realización de revisiones bibliográficas. Considero que el trabajo de este tipo es un factor fundamental a la hora de completar la formación universitaria y creo que la posibilidad de desarrollar un proyecto de manera individual como este ofrece una experiencia difícil de obtener de otra forma. Así mismo, plasmar los resultados y extraer unas conclusiones finales creo que me ha ayudado a mejorar la capacidad de redacción y revisión de cara al futuro laboral y académico.

El desarrollo de este proyecto de manera individual me ha permitido trabajar de manera autónoma y me ha facilitado una organización personal más ordenada y cómoda, así como me ha planteado el reto de hacerlo de la manera más eficiente posible. Asimismo, el hacerlo bajo la dirección de dos profesores de diferentes Departamentos me ha enseñado la importancia del trabajo en colaboración y sus dificultades. Considero que ha estimulado mi capacidad creativa así como despertado mi curiosidad científica que, en mi caso, me empuja a interesarme por la investigación de cara al futuro.

## 8. Bibliografía

1. Alekseyev, Y.O., Fazeli, R., Yang, S., Barsan, R., Maher, T., Miller, N.S. y Remick, D. (2018) “A Next-Generation Sequencing Primer—How Does It Work and What Can It Do?”. *Academic Pathology*. 5 DOI: 10.1177/2374289518766521
2. Artaiz, A. (2016) *Mejora de la conservación de los productos de la pesca mediante el desarrollo de modelos predictivos y la aplicación de nuevas tecnologías de conservación de los alimentos*. Trabajo fin de máster. Universidad de Zaragoza.
3. Baixas-Nogueras, S., Bover-Cid, S., Veciana-Nogués, M.T. y Vidal-Carou, M.C. (2003) “Suitability of Volatile Amines as Freshness Indexes for Iced Mediterranean Hake”. *Journal of food science*. 68 (5) pp: 1607-1610.
4. Baranyi, J. y Roberts, T. A. (1995) “Mathematics of predictive food microbiology”. *International Journal of Food Microbiology*. 26 (2) pp: 199-218.
5. Bourgeois, C.M., Mescle J.F. y Zucca, J. (Coords.) (1994) *Microbiología alimentaria*. Zaragoza: Acribia S.A.
6. Budding, A. E. (2016) *Culture free microbiology: A new approach to rapid eubacterial molecular diagnostics and clinical microbiota characterization*. PhD. Vrije Universiteit Amsterdam. Disponible en: <https://research.vu.nl/en/publications/culture-free-microbiology-a-new-approach-to-rapid-eubacterial-mol> [Consultado 15-05-2018].
7. Budsberg, K.J., Wimpee, C.F. y Braddock, J.F. (2003) “Isolation and Identification of *Photobacterium phosphoreum* from an Unexpected Niche: Migrating Salmon”. *Applied and Environmental Microbiology*. 69 (11) pp: 6938-6942. DOI: 10.1128/AEM.69.11.6938-6942.2003
8. Burgess G. (1979) *El pescado y las industrias derivadas de la pesca*. Zaragoza: Acribia S.A.
9. CEPESCA 2017: Informe del sector pesquero español 2017. Consultado 07/05/2018. <http://www.cepesca.es/download-doc/181833>
10. Dalgaard, P., Mejholm, O. y Huss, H. (1996) “Conductance method for quantitative determination of *Photobacterium phosphoreum* in fish products” *Journal of Applied Bacteriology*. 81 pp: 57-64. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1996.tb03282.x

11. Dalgaard, P., Mejholm, O., Christiansen, T.J. y Huss, H. (1997) “Importance of *Photobacterium phosphoreum* in relation to spoilage of modified atmosphere-package fish products”. *Letters in Applied Microbiology*. 24 pp: 373-378.
12. Ercolini, D. (2013) “High-Throughput Sequencing and Metagenomics: Moving Forward in the Culture-Independent Analysis of Food Microbial Ecology” *Applied and Environmental Microbiology*. 79 (10) pp: 3148-3155. DOI: 10.1128/AEM.00256-13
13. Frazier, W.C. y Westhoff, D.C. (1993). *Microbiología de los alimentos*. Zaragoza: Acribia S.A.
14. García, E., Gago, L. y Fernández, J.L. (2006) Informe de vigilancia tecnológica: tecnologías de envasado en atmósfera protectora. CEIM: dirección general de universidades e investigación.
15. García, M. R., Vilas, C., Herrera, J. R., Bernárdez, M., Balsa-Canto, E. y Alonso, A. (2015) “Quality and shelf-life prediction for retail fresh hake (*Merluccius merluccius*)”. *International Journal of Food Microbiology*. 208 pp: 65-74.
16. Gram, L. y Dalgaard, P. (2002). “Fish spoilage bacteria – Problems and solutions”. *Current Opinion in Biotechnology*. 13 pp: 262-266. DOI: 10.1016/S0958-1669(02)00309-9
17. Janda, J.M. y Abbott, S.L. (2007) “16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls”. *Journal of Clinical Microbiology*. pp: 2761-2764. DOI: 10.1128/JCM.01228-07
18. Jay, J.M., Loessner, M.J. y Golden, D.A. (2009). *Microbiología moderna de los alimentos*. Zaragoza: Acribia S.A.
19. Kergourlay, G., Taminiau, B., Daube, G. y Champomier, M.C. (2015) “Metagenomics insights into the dynamics of microbial communities in food” *International Journal of Food Microbiology*. 213 pp: 31-39.
20. Macé, E. S., Tai, S., Gilding E. K., Li, Y., Prentis, P. J., Bian, L., Campbell, B.C., Hu, W., Innes, D. J., Han, X., Cruickshank, A., Dai, C., Frère, Zhang, H., Hunt, C. H., Wang, X., Shatte, T., Wang, M., Su, Z., Li, J., Lin, X, Godwin, I. D., Jordan, D. R., Wang, J. (2013) “Whole-genome sequencing reveals untapped genetic potential in Africa’s indigenous cereal crop sorghum” *Nature communications*. 4 (2320) DOI: 10.1038/ncomms3320

21. Macé, S., Cornet, J., Chevalier, F., Cardinal, M., Pilet, M.F., Dousset, X. y Joffraud, J.J. (2012) “Characterisation of the spoilage microbiota in raw salmon (*Salmo salar*) steaks stored under vacuum or modified atmosphere packaging combining conventional methods and PCR-TTGE”. *Food Microbiology*. 30 (1) pp: 164-172.
22. Madigan, M.T., Martinko, J.M., Bender, K.S., Buckley, D.H. y Stahl, D.A. (2015) *Brock. Biología de los microorganismos*. (14ª ed.) Madrid: Pearson Educación S.A.
23. Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. El mercado de la merluza en España. 2017. (a)
24. Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. Informe del consumo de alimentos en España 2016. 2017. (b)
25. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. FAO. El pescado fresco: su calidad y cambios de su calidad. [Internet] Dinamarca. Huss H. (1998) Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/V7180S/v7180s00.htm#Contents>
26. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all. Rome. 2016.
27. Restrepo, J., Ortiz, L., Cardona, X. y Olivera, M. (2012). “Evaluación de la sensibilidad y especificidad del *Staphylococcus aureus* en leche de vacas afectadas por mastitis”. *Biosalud*. 11 (2) pp: 40-51.
28. Reynisson, E., Lauzon, H.L., Magnússon, H., Jónsdóttir, R., Ólafsdóttir, G., Marteinson, V. y Hreggviðsson, G.Ó. (2009) “Bacterial composition and succession during storage of North-Atlantic cod (*Gadus morhua*) at superchilled temperatures”. *BMC Microbiology*. 9 (250) DOI: 10.1186/1471-2180-9-250
29. Unión Europea. Reglamento (UE) nº 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 25 de octubre de 2011, sobre la información alimentaria facilitada al consumidor y por el que se modifican los Reglamentos (CE) no 1924/2006 y (CE) no 1925/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, y por el que se derogan la Directiva 87/250/CEE de la Comisión, la Directiva 90/496/CEE del Consejo, la Directiva 1999/10/CE de la Comisión, la Directiva 2000/13/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, las Directivas 2002/67/CE, y 2008/5/CE de la Comisión, y



el Reglamento (CE) no 608/2004 de la Comisión. Diario Oficial de la Unión Europea, 22 de noviembre de 2011 (L 304/18).

30. Urbanczyk H., Ast J. C. y Dunlap, P. V. (2011) “Phylogeny, genomics, and symbiosis of *Photobacterium*”. *FEMS Microbiology Reviews*. 35 (2) pp: 324-342  
DOI: 10.1111/j.1574-6976.2010.00250.x

## ANEXO I

| <b>Especie microbiana</b>   | <b>Cepa</b>                                    | <b>Resultado qPCR</b> |
|---|--|-----------------------|
| <i>Photobacterium phosphoreum</i>   | CECT 4192                                      | Positivo              |
| <i>Photobacterium kishitanii</i>  | CECT 4172                                      | Positivo              |
| <i>Photobacterium iliopiscarium</i>   | DSMZ 9896                                      | Positivo              |
| Colección de <i>Photobacterium spp.</i> del Departamento de Tecnología de los Alimentos | 20 (aislados de merluza)                       | Positivo              |
| <i>Photobacterium damsela</i>   | CECT 626                                       | Negativo              |
| <i>Photobacterium leiognathi</i>  | CECT 4191                                      | Negativo              |
| <i>Aeromonas salmonicida</i>  | Colección del Departamento de Patología animal | Negativo              |
| <i>Edwardsiella tarda</i>   | Colección del Departamento de Patología animal | Negativo              |
| <i>Yersinia ruckery</i>   | Colección del Departamento de Patología animal | Negativo              |
| <i>Renibacterium salmoninarum</i>   | Colección del Departamento de Patología animal | Negativo              |
| <i>Listonella anguillarum</i>   | Colección del Departamento de Patología animal | Negativo              |
| <i>Lactococcus garveae</i>  | Colección del Departamento de Patología animal | Negativo              |
| <i>Streptococcus parauberis</i>   | Colección del Departamento de Patología animal | Negativo              |
| <i>Flexibacter maritimum</i>  | Colección del Departamento de Patología animal | Negativo              |

*Cepas microbianas utilizadas para la evaluación de la sensibilidad de la qPCR.*

## ANEXO II

| Referencia  | [DNA] | CALIDAD DNA |           | qPCR      |           |               |
|-------------|-------|-------------|-----------|-----------|-----------|---------------|
|             | ~g/mL | A260/A230   | A260/A280 | Ct Actina | Ct PP 3,4 | Ct MO 627,628 |
| <b>0R1</b>  | 12,64 | 1,188       | 2,241     | 33,85     | 22,06     | 25,05         |
| <b>0R2</b>  | 15,89 | 0,761       | 1,787     | 34,56     | 29,07     | 31,75         |
| <b>0R3</b>  | 13,26 | 0,768       | 1,827     | 34,47     | 26,17     | 27,99         |
| <b>431R</b> | 16,98 | 0,850       | 1,891     | 34,24     | 20,25     | 22,71         |
| <b>432R</b> | 14,81 | 0,787       | 1,897     | 34,54     | 21,62     | 23,83         |
| <b>433R</b> | 14,40 | 0,783       | 1,946     | 33,58     | 22,63     | 25,22         |
| <b>0M1</b>  | 12,64 | 1,655       | 1,904     | 34,07     | 25,55     | 27,12         |
| <b>0M2</b>  | 13,09 | 1,618       | 1,847     | 33,50     | 24,37     | 25,04         |
| <b>0M3</b>  | 7,25  | 1,381       | 1,705     | 35,80     | 26,34     | 26,48         |
| <b>721</b>  | 8,71  | 1,298       | 1,805     | 34,08     | 22,53     | 22,71         |
| <b>722</b>  | 13,37 | 1,427       | 1,597     | 33,91     | 22,23     | 23,69         |
| <b>723</b>  | 17,23 | 1,535       | 1,867     | 33,98     | 22,55     | 23,13         |
| <b>431</b>  | 15,23 | 1,650       | 1,851     | 33,85     | 23,98     | 25,00         |
| <b>432</b>  | 11,84 | 1,511       | 1,731     | 34,00     | 22,97     | 24,83         |
| <b>433</b>  | 12,77 | 1,186       | 1,877     | 33,92     | 23,60     | 24,08         |
| <b>161</b>  | 12,04 | 1,497       | 1,993     | 34,09     | 24,48     | 26,35         |
| <b>162</b>  | 10,14 | 1,420       | 1,973     | 34,04     | 23,60     | 27,59         |
| <b>163</b>  | 14,55 | 1,074       | 1,927     | 34,69     | 24,37     | 27,07         |

*Concentración y calidad del DNA extraído para secuenciar masivamente. Cuantificación de DNA de las mismas para *P. phosphoreum* y actina.*

*REFERENCIA: primer dígito: temperatura de conservación; segundo dígito: día de almacenamiento; tercer dígito: número de réplica; R: merluza de El Cabo.*