



Título del artículo.

**Participación de la enzima lipasa en el crecimiento de *Staphylococcus aureus* en queso fresco en presencia de consorcios microbianos.**

Título del artículo en idioma inglés.

**Participation of lipase enzyme in growth of *Staphylococcus aureus* in fresh cheese when presence of microbial consortia.**

Autores.

**Roberto Adame-Gómez  
Uriel Noyola-Baños  
Natividad Castro-Alarcón  
Jeiry Toribio-Jiménez  
Arturo Ramírez Peralta**

Referencia bibliográfica:

MLA

Adame-Gómez, Roberto, Uriel Noyola-Baños, Natividad Castro-Alarcón, Jeiry Toribio-Jiménez, Arturo Ramírez Peralta. "Evaluación morfológica de diferentes genotipos silvestres y cultivadas de *Carica papaya L.* en el estado de Guerrero, México". *Tlamati 11.2* (2020): 24-28. Print.

APA

Adame-Gómez, R., Noyola-Baños, U., Castro-Alarcón, N., Toribio-Jiménez, J. y Arturo Ramírez Peralta. (2020). Participación de la enzima lipasa en el crecimiento de *Staphylococcus aureus* en queso fresco en presencia de consorcios microbianos. *Tlamati*, 11(2), 24-28.

---

ISSN Revista impresa: 2007-2066.

ISSN Revista digital: En trámite

Publicado el 31 de diciembre del 2020

© 2020 Universidad Autónoma de Guerrero

Dirección General de Posgrado e Investigación

Dirección de Investigación

*TLAMATI*, es una publicación trimestral de la Dirección de Investigación de la Universidad Autónoma de Guerrero. El contenido de los artículos es responsabilidad exclusiva de los autores y no refleja de manera alguna el punto de vista de la Dirección de Investigación de la UAGro. Se autoriza la reproducción total o parcial de los artículos previa cita de nuestra publicación.



## Participación de la enzima lipasa en el crecimiento de *Staphylococcus aureus* en queso fresco en presencia de consorcios microbianos

Roberto Adame-Gómez<sup>1</sup>  
 Uriel Noyola-Baños<sup>1</sup>  
 Natividad Castro-Alarcón<sup>2</sup>  
 Jeiry Toribio-Jiménez<sup>2</sup>  
 Arturo Ramírez Peralta<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma de Guerrero, Laboratorio de Investigación en Patometabolismo Microbiano. Lazaro Cárdenas 88. CU Sur. C. P. 39010 Chilpancingo, Guerrero, México

<sup>2</sup>Universidad Autónoma de Guerrero, Laboratorio de Investigación en Microbiología. Lazaro Cárdenas 88. CU Sur. C. P. 39010. Chilpancingo, Guerrero, México

\*Autor de correspondencia  
[arturoramirez@uagro.mx](mailto:arturoramirez@uagro.mx)

### Resumen

*Staphylococcus aureus* es el principal microorganismo causante de intoxicaciones alimentarias asociado a productos lácteos, debido a que la leche cruda ha sido reconocida como uno de los principales vehículos de intoxicación, ya que la fabricación de quesos a escala artesanal con leche sin pasteurizar, puede constituir un elevado riesgo de contaminación con bacterias patógenas como *S. aureus*. El objetivo de este estudio fue el de evaluar la participación de la enzima lipasa en el crecimiento de *S. aureus* en quesos frescos, realizando la elaboración de quesos estériles inoculándolos de manera artificial con una cepa lipolítica y una cepa no lipolítica de *S. aureus* y consorcios bacterianos en temperatura de incubación de 25°C y 37°C, para su posterior recuento de UFC en agar sal y manitol. En este estudio se pudo observar que la enzima lipasa producida por *S. aureus*, ayuda en su crecimiento en ambas matrices alimenticias (queso fresco y Cotija), sin importar la temperatura de incubación a la que estos quesos son expuestos, aun en presencia de consorcios, siendo esta enzima uno de los más importantes factores de virulencia que *S. aureus* puede segregar.

**Palabras clave:** *Staphylococcus aureus*, productos lácteos, lipasa

### Abstract

*Staphylococcus aureus* is the main microorganism that causes food poisoning, mainly associated to dairy products. Due to the fact that raw milk has been recognized as one of the main vehicles of poisoning related to manufacture of artisan-scale cheeses with unpasteurized milk, this method may constitute a high risk of contamination with pathogenic bacteria such as *S. aureus*. Objective of this study was an evaluation of contribution of lipase enzyme in growth of *S. aureus* in fresh cheese. Processing sterile fresh cheese and to inoculate it in artificial way with a not lipolytic and lipolytic strain of *S. aureus*, and strains of bacterial consortia in incubation temperatures of 25 °C and 37 °C, this for its

### Como citar el artículo:

Adame-Gómez, R., Noyola-Baños, U., Castro-Alarcón, N., Toribio-Jiménez, J. y Arturo Ramírez Peralta. (2020). Participación de la enzima lipasa en el crecimiento de *Staphylococcus aureus* en queso fresco en presencia de consorcios microbianos. *Tlamati*, 11(2), 24-28.

later UFC count in salt agar and mannitol. In this study was possible to observe how enzyme lipase produced by *S. aureus* helps in its growth in both food environments (Fresh and *Cotija*'s cheeses) regardless of temperature of incubation to which these cheeses are exposed, even in the presence of consortia. Enzyme lipase is one of the most important virulence factors that *S. aureus* can secrete.

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*, dairy products, lipase

## Introducción

La leche y sus derivados, son los principales alimentos que pueden transmitir agentes etiológicos productores de enfermedades o intoxicaciones alimentarias. La leche cruda ha sido reconocida como uno de los principales vehículos de transmisión de enfermedades, por lo que la fabricación de quesos a escala artesanal con leche sin pasteurizar, puede constituir un elevado riesgo de contaminación con bacterias patógenas (Martínez, Villoch, Ribot y Ponce, 2013). En cuanto a la pasteurización de la leche, es considerada una de las intervenciones de la salud pública más eficientes, esta debería eliminar eficazmente los microorganismos patógenos existentes en la leche; sin embargo, el queso puede contaminarse con agentes patógenos durante su elaboración por contacto con equipos contaminados o por mala manipulación. Los factores que influyen en la supervivencia de los patógenos en los quesos son: la acidez, los conservadores, la temperatura, la microbiota competidora, la actividad del agua y la concentración de sal (Gould, Mungai y Behrvesh, 2014).

*Staphylococcus aureus* es reconocido como el principal agente causante de la intoxicación alimentaria que resulta de la ingestión de alimentos que contienen una o más toxinas. La leche y los productos lácteos como los quesos y la crema, han sido involucrados en varios brotes en todo el mundo. Además, *S. aureus* es causa común de enfermedades de la ubre en vacas lecheras (Tetili, Bendali, Perrier y Sadoun, 2017). En Chilpancingo Guerrero, México, se determinó la presencia de *S. aureus* en diferentes tipos de queso artesanal. De un total de 78 muestras de quesos sin pasteurizar analizadas, 44 fueron positivas para *S. aureus* (Adame-Gómez, Toribio-Jiménez, Vences-Velázquez, Rodríguez-Bataz, Santiago Dionisio y Ramírez-Peralta, 2018). El entorno de la planta de procesamiento y los trabajadores pueden constituir fuentes de contaminación graves de *S. aureus* durante la fabricación del queso, incluso cuando está presente en niveles bajos en la leche, puede alcanzar más de 5 log UFC/g durante las primeras etapas de la fabricación del queso. Además, se ha descrito que el 25% de las cepas de *S. aureus* aisladas de los alimentos, producen enterotoxinas estables al calor (Tetili et al., 2017).

*S. aureus* tiene la capacidad de producir lipasas que se caracterizan por su función principal de degradar los triglicéridos para liberar ácidos grasos, a esta actividad se le conoce como lipólisis que es la hidrólisis del éster presente entre los ácidos grasos y el glicerol por la enzima lipasa.

El queso fresco comparte casi las mismas propiedades nutricionales con la leche; a excepción de la lactosa, los otros componentes se encuentran con un alto nivel de nutrientes como el calcio, magnesio, selenio, riboflavina, vitaminas B12 y ácido pantoico (Ramírez-López,

2012). Entre los principales componentes del queso fresco encontramos proteínas, cenizas, grasas con valores de 24,08%, de proteína con 18,82% y de humedad con 53,2% (Guerrero, Valerio y Baldeón-Chamorro, 2015). Por la composición del queso, la producción de lipasa por parte de *S. aureus* podría favorecer el crecimiento en esta matriz alimentaria. Por lo cual, el objetivo de este estudio fue evaluar el crecimiento en queso fresco de una cepa no lipolítica y una cepa lipolítica en presencia o no de consorcios microbianos.

## Material y métodos

### Elaboración de queso estéril.

Para la elaboración de quesos frescos, se procedió a calentar la leche en un microondas hasta el punto de ebullición. Para la coagulación se le adicionó vinagre al 5% (v/v). Una vez coagulada la leche, se filtró a través de gasas estériles para desechar el suero y obtener queso fresco, el cual se mantuvo envuelto en papel aluminio previamente esterilizado. El total de queso fresco se pesó en una balanza de precisión (Ohaus corporation, USA) y posteriormente se le adicionó NaCl al 1% (p/p), por último se distribuyó en porciones de 10 g y se mantuvo en refrigeración por menos de 5 días (Flores-Gavilán y Talavera-Alarcón, 2017).

### Determinación microbiológica del producto

Se determinó la inocuidad de los quesos frescos con la finalidad de que estuvieran libres de microorganismos que podrían competir por los nutrientes del medio y afectar el crecimiento de *S. aureus* y enmascarar el resultado final, iniciando con la preparación de las diluciones de acuerdo a la NOM-110-SSA1-1994, para lo cual se procesaron 10 g de queso fresco y se adicionaron 90 mL de solución salina al 0.85% para homogenizar un minuto en licuadora. Para

Tabla 1. Curva de crecimiento de las cepas de *S. aureus* S002 y S295

Tiempo	S002 Lipolítica	S295 No lipolítica	p
T0	5.83 ± 0.75	4.83 ± 2.4	0.06
T4	6 ± 6.63	6.66 ± 0.81	0.01*
T8	7.3 ± 1.0	7.5 ± 0.54	0.92
T12	9 ± 0.89	7.5 ± 0.54	0.00*
T24	8.1 ± 0.40	6.6 ± 0.36	0.16

T: representan el tiempo en horas. <sup>§</sup>Los datos se presentan en media y desviación estándar. Prueba de t de Student. Las diferencias estadísticamente significativas son marcadas con asterisco ( $p=0.05$ ).

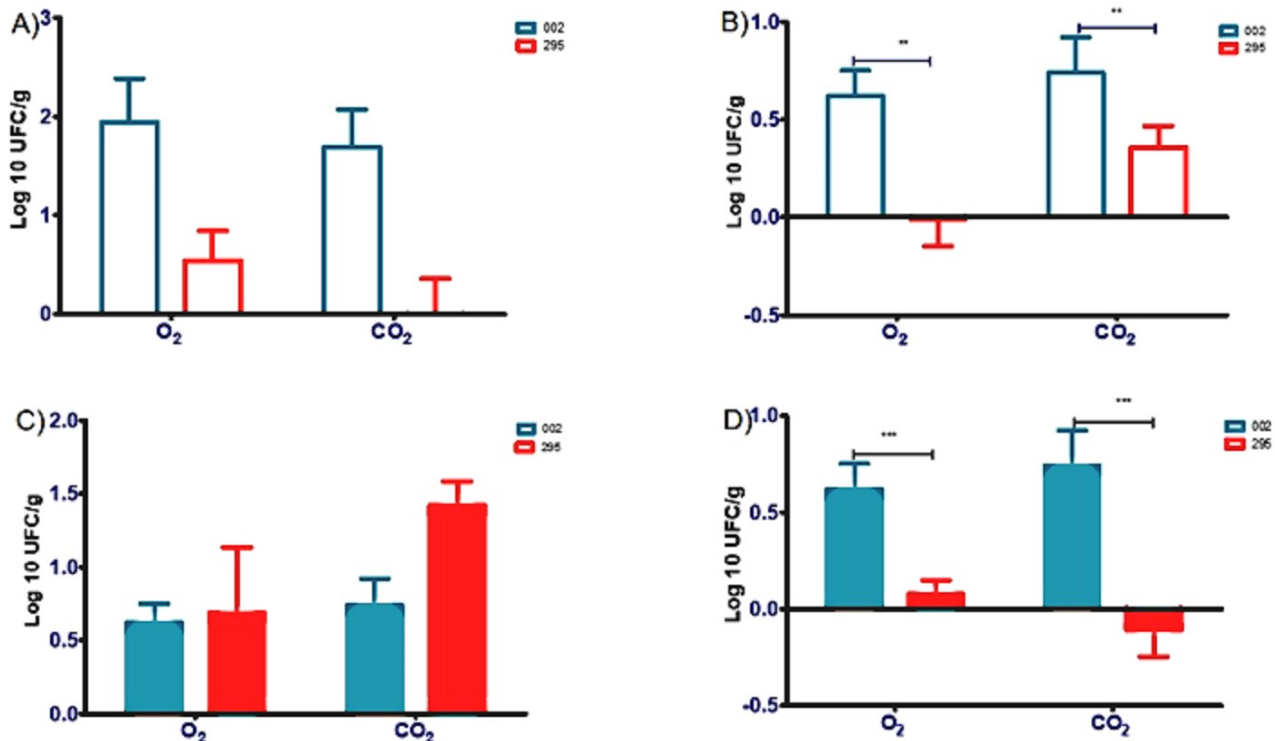


Figura 1. Comparación de crecimiento de una cepa lipolítica contra una no lipolítica de *S. aureus* en queso fresco en diferentes condiciones ambientales. Se grafica la diferencia de crecimiento de la inoculación artificial en quesos frescos con O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>. Las barras de color azul representan la cepa lipolítica y las barras de color rojo representan la cepa no lipolítica de *S. aureus* A) 37°C sin consorcio B) 25°C sin consorcio C) 37°C con consorcio. D) 25°C con consorcio. Prueba de *t* student. Las diferencias estadísticamente significativas son marcadas con asterisco;  $p=0.05^*$ ,  $p=0.001^{**}$ ,  $p=0.0001^{***}$ .

este análisis microbiológico se utilizó la dilución  $10^{-1}$ , de la cual se colocaron 100  $\mu\text{L}$  en placas de agar sal y manitol, McConkey y Sabouraud. La dispersión del inóculo fue por estría en V y se incubaron por 24 h a 37 °C. La ausencia de UFC indicaba la esterilidad del queso, por lo cual se tendrían las condiciones experimentales óptimas en el modelo para ser inoculado con las cepas enterotoxigénica y lipolítica de *S. aureus* así como de consorcios bacterianos que en este caso se utilizó *Bacillus cereus* y *Morganella morganii*.

#### Curva de crecimiento

Para valorar si las cepas presentaban un estrés metabólico al tener un perfil bioquímico o de virulencia distinto y que este resultado fuera atribuido a esta condición y no a la matriz alimentaria o las condiciones ambientales usadas (temperatura y disposición de oxígeno), se comparó el crecimiento de las tres cepas en un medio y condiciones óptimas. Para lo cual, cada una de las cepas utilizadas *S. aureus* lipolítico (S002) y *S. aureus* no lipolítico (S295), se inició con la activación de las mismas en agar yema de huevo por estría cruzada, posteriormente se incubó la placa a 37 °C durante 24 h, de la cual se tomó de 2-3 UFC para ajustar a la escala de McFarland al 0.5 en 900  $\mu\text{L}$  de solución salina estéril. Posteriormente, se inoculó 100  $\mu\text{L}$  de la suspensión bacteriana en caldo BHI. De la que se hicieron diluciones seriadas, tomando 100  $\mu\text{L}$  de la suspensión en

caldo BHI y se transfirió a un tubo con 900  $\mu\text{L}$  de solución salina. De este tubo se tomó 100  $\mu\text{L}$  de la suspensión y se transfirió al segundo tubo con solución salina y se homogenizó. Este mismo procedimiento se repitió hasta conseguir una dilución  $10^{-6}$  desechando los últimos 100  $\mu\text{L}$ . Se tomó 100  $\mu\text{L}$  de suspensión bacteriana de las diluciones  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  y se transfirió en una placa de agar cuenta estándar por estría en “V” y se incubó a 37°C durante 24 h. A esta primera siembra en placa se le llamó tiempo cero (T0); el tubo de BHI con suspensión bacteriana se incubó a 37°C y cada 4 h se realizó diluciones seriadas hasta que el caldo cumplió con un tiempo de incubación de 12 h, utilizando de igual manera las diluciones  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  para hacer la siembra en placas de agar cuenta estándar. Pasadas las 24 h (T24) de incubación del caldo BHI con suspensión bacteriana, se realizaron nuevamente diluciones seriadas y la siembra en placa. Se incubó a 37°C durante 24 h en placas de agar cuenta estándar, para después realizar el conteo de UFC de cada tiempo.

#### Inoculación artificial.

Para la inoculación artificial se prepararon suspensiones bacterianas de la cepa enterotoxigénica y lipolítica de *S. aureus*, así como de los controles no enterotoxigénicos y no lipolíticos; tomando de 2 a 3 UFC e inoculándose en un tubo con solución salina al 0.8%, posteriormente se comparó la turbidez con el patrón 0.5 de McFarland hasta

que se ajustó a esta escala. Del tubo ajustado al 0.5 de McFarland, se inocularon 100 µL en 10 g de queso fresco y estos fueron incubados a 25 °C y 37 °C con presencia de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>. Para lograr la presencia de CO<sub>2</sub> se incubaron en un recipiente hermético con una vela encendida en su interior; la llama consumía parte del oxígeno existente y se sustituía por CO<sub>2</sub>. Cuando se incluían los consorcios, se inoculaba 100 µL de la escala ajustada de McFarland de *S. aureus*, *B. cereus* y *M. organii*. El tiempo de incubación fue de 10 h. De los quesos que se inoculaban a las diferentes condiciones se tomaba uno por tipo de queso y se procesó inmediatamente después de hacer la inoculación, al cual se le llamaba tiempo cero, con el fin de conocer con que cantidad de microorganismo se inoculaba e iniciaba.

#### Identificación y cuenta viable de *S. aureus*.

Después del tiempo de incubación, se procesaron los quesos pesando 10 g de la muestra y se colocó en un vaso papillero con 90 mL de solución salina al 0.8% para después homogenizar por un minuto en licuadora. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-3</sup>, de las diluciones 10<sup>-2</sup> y 10<sup>-3</sup> se tomaron 100 µL y se transfirieron en agar Sal y manitol y se dispersaron por estría en "V". Las placas se incubaron a 37°C durante 24 h, transcurrido este tiempo se contaron las colonias típicas para *S. aureus* en agar sal y manitol.

#### Análisis estadístico

Se realizó una base de datos con los resultados obtenidos en el programa estadístico STATA versión 12, los resultados fueron ajustados de acuerdo a los tiempos ceros de cada inoculación, convirtiéndose a la escala logarítmica, algunos resultados quedaron como números negativos, debido a que a cada placa inoculada se le restaba el número de UFC del tiempo cero, observando una disminución del crecimiento al momento de realizar la resta. Los resultados fueron comparados con la prueba estadística de t de student cuando el número de grupos a comparar era dos. Las gráficas fueron realizadas en el programa Graph Prism versión 5.0

#### Resultados

A las dos cepas se le realizó una cinética de crecimiento microbiano, con la finalidad de determinar si el crecimiento era diferencial en condiciones *In vitro*, considerando que si este era diferencial podría enmascarar el efecto de la matriz alimentaria sobre el crecimiento. De acuerdo a la tabla 1 se observa que a partir de las 8 horas a las 12 h existe un crecimiento similar para el conteo de UFC y de acuerdo a las medias obtenidas de la cepa S002 (7.3 ± 1.0) de la S295 (7.5 ± .54) no existe diferencia significativa en el crecimiento entre estas cepas. Considerando este tiempo, para la inoculación de las cepas en el modelo de estudio.

Se comparó el crecimiento de la cepa lipolítica (barra color azul en la figura 1, denominada como S002) y la cepa no lipolítica (barra color rojo en la figura 1, denominada como S295) en queso fresco, donde se observó un mayor crecimiento en la S002 en queso fresco con O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> a temperatura de 25°C en presencia de consorcios en relación a la S295 (p=0.0001) (fig. 1, D).

#### Discusión

El queso es un ambiente complejo, constituido principalmente por agua, proteínas, grasas, minerales y un ecosistema microbiano dinámico caracterizado por la presencia de una gran variedad de bacterias, levaduras y mohos (Fleurot, Aigle, Fleurot, Darrigo, Hennekinne y Gruss, 2014), por lo cual el queso es un medio enriquecido donde las proteínas y grasas que este contiene lo hace un medio óptimo para el crecimiento de *S. aureus*.

Uno de los datos más importantes de este estudio es el crecimiento diferencial observado entre la cepa lipolítica y no lipolítica en presencia de consorcios microbianos, indicando que la producción de esta enzima estaría favoreciendo la competencia de la cepa de *S. aureus* en presencia de otros microorganismos.

Considerando lo anterior, inferimos que la lipasa podría estar ocasionando inestabilidad o daño a la membrana de las bacterias del consorcio bacteriano, fundamentado con lo realizado por Nguyen, Luqman, Bitschar, Hertlein, Dick, Ohlsen, Bröker, Schitteck y Götz en el 2017, en el cual demuestran que en presencia de la lipasa, se aumentaba la producción de biofilm y sugieren que las lipasas de *S. aureus* favorecen la pérdida de DNA (uno de los principales componentes de la matriz del biofilm debido a que afecta la integridad de la membrana citoplasmática por degradación de fosfolípidos).

Los mismos autores también describen, que esta liberación de DNA extracelular aumenta cuando se adiciona trioleato al medio, sugiriendo que los ácidos grasos producidos por las lipasas también afectan la integridad y permeabilidad de la membrana citoplasmática (Nguyen et al., 2017). Infiriendo en este estudio, que la lipasa por si sola afecta la integridad de la membrana, pero que también metabolitos producidos por esta enzima potencian el daño a la membrana; características que en último punto estarían inhibiendo a los microorganismos presentes en el consorcio.

#### Referencias

- Adame-Gómez, R., Toribio-Jiménez, J., Vences-Velázquez, A., Rodríguez-Bataz, E., Santiago Dionisio, M.C. y Ramírez-Peralta, A., (2018). Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in Artisanal Cheeses in México. *International Journal of Microbiology*. doi.org/10.1155/2018/8760357.
- Fleurot, I. Aigle, M. Fleurot, R. Darrigo, C. Hennekinne, J.A. y Gruss, A. (2014). Following Pathogen Development and Gene Expression in a Food Ecosystem: the Case of a Staphylococcus aureus Isolate in Cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 80, 5106–5115.
- Flores Gávilan J. y Talavera Alarcón K. (2017). *Frecuencia de biotipos humanos y no humanos de Staphylococcus aureus en ubre de ganado bovino de Coyuca de Benitez y Chilpancingo de los Bravo, Guerrero*. (Tesis de licenciatura). Universidad Autónoma de Guerrero. Chilpancingo de los Bravo, Guerrero, México.
- Gould, L. H., Mungai, E. y Behravesch C. B. (2014). Outbreaks Attributed to Cheese: Differences Between Outbreaks Caused by Unpasteurized and Pasteurized Dairy Products, United States. *Foodborne Pathogens and Disease*, 11, 545–551.
- Guerrero-Ramos, C., Valerio, S. F. W. y Baldeón-Chamorro, E. O. (2015). Evaluación instrumental de la

- textura del queso elaborado con suero concentrado por ultrafiltración. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 81(3), 273–282.
- Martínez, A., Villoch, A. Ribot, A. y Ponce, P. (2013). Evaluación de la calidad e inocuidad de quesos frescos artesanales de tres regiones de una provincia de Cuba. *Revista de Salud Animal*, 35, 210–213.
- Nguyen, M. T., Luqman, A., Bitschar, K., Hertlein, T., Dick, J., Ohlsen, K., Bröker, B., Schitteck, B. y Götz, F. (2017). Staphylococcal (phospho) lipases promote biofilm formation and host cell invasion. *International Journal of Medical Microbiology*. doi: 10.1016 / j.ijmm.2017.
- Ramírez-López, C. y Vélez-Ruiz, J. F., (2012). *Quesos frescos: propiedades, métodos de determinación y factores que afectan su calidad*. Departamento de Ingeniería Química, Alimentos y Ambiental, 131-148.
- Tetili, F. Bendali, F. Perrier, J. y Sadoun, D. (2017). Anti-Staphylococcal Enterotoxinogenesis of *Lactococcus lactis* in Algerian Raw Milk Cheese. *Food Technology and Biotechnology*, 511–518, 518.doi.org/10.17113/ftb.55.04.17.5105.