

Artículo original

Producción de exopolisacárido y propiedades de la superficie celular en *Staphylococcus aureus* relacionados con alimentos

Jhoandry Rivera-Salazar*, Víctor Pico-Bracho, Isabel Mujica de Fernández, Velina Aranaga-Natera, Yolaimis La Paz-Delgado, Irene Zabala-Díaz.

Facultad Experimental de Ciencias, Departamento de Biología, Laboratorio de Genética Biología Molecular. Universidad del Zulia. Venezuela

Recibido 03 de octubre de 2023; aceptado 18 de diciembre de 2023

Resumen: El exopolisacárido producido por los microorganismos promueve la colonización e invasión de superficies, causando gran impacto en ambientes hospitalarios, veterinarios, industriales y comunitarios. Esta investigación plantea la caracterización de la producción de exopolisacárido y propiedades de la superficie celular en *Staphylococcus aureus* relacionados con alimentos. La producción de exopolisacárido se evaluó en agar rojo Congo y las propiedades de la superficie celular se determinaron por su habilidad para formar agregados espontáneos, autoagregados, o su inducción con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, y la capacidad de adherencia a solventes orgánicos. De 24 cepas de *S. aureus*, en 15 (62,5%) se detectaron fenotipos característicos de producción del exopolisacárido y en 9 (37,5%) no. La habilidad para formar agregados celulares en presencia de la sal de amonio fue del 87,5%. Se evidenció la capacidad para donar/aceptar electrones en niveles moderado a fuerte, independientemente de su habilidad para biosintetizar exopolisacárido. Las propiedades fisicoquímicas halladas en la superficie celular de *S. aureus* le confiere la potencial habilidad para colonizar e invadir superficies de contacto de múltiples naturalezas, por lo que la diseminación de estas cepas en el entorno médico, industrial y comunitario representa un problema de salud pública, ya que su control, una vez establecidas en estos ambientes, podría ser ineficaz.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus*, agregación celular, adherencia celular, biopelículas, solventes orgánicos

Exopolysaccharide production and cell surface properties in food-related *Staphylococcus aureus*

Abstract: The exopolysaccharide produced by microorganisms promotes invasion and colonization of surfaces, causing a great impact on hospital, veterinary, industrial and community environments. This research proposes the exopolysaccharide production characterization and cell surface properties in food-related *Staphylococcus aureus*. Exopolysaccharide production was evaluated on Congo red agar and cell surface properties were determined by its ability to form spontaneous aggregates, self-aggregates, or their induction with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, and adherence capability to organic solvents. Of 24 strains of *S. aureus*, 15 (62.5%) had characteristic phenotypes of exopolysaccharide production, while nine (37.5%) did not; additionally, the ability of cell aggregates formation in the presence of ammonium salt was 87.5%. The ability to donate/accept electrons at moderate to strong levels was evidenced, regardless of their capability to biosynthesize exopolysaccharide. The physicochemical properties found on the cell surface of *S. aureus* give it the potential ability to colonize and invade multiple natural contact surfaces, so the dissemination of these strains in the medical, industrial and community environment represents a public health problem, since their control, once established in these environments, could be ineffective.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, cellular aggregation, cellular adherence, biofilms, organic solvents.

* Correspondencia:

E-mail: jjriveras@fec.luz.edu.ve; jhoandriveras@gmail.com

Introducción

Las biopelículas son definidas como agrupaciones de

microorganismos que viven dentro de una matriz creada por ellas mismas, que se compone de sustancias poliméricas liberadas al medio [1].

La matriz de sustancias poliméricas extracelulares (EPS, por sus siglas en inglés *Extracellular Polymeric Substances*), en las que se hallan embebidos los microorganismos, están constituidas principalmente de polisacáridos; sin embargo, otras biomoléculas como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos también se hallan presentes en esta matriz [1].

La presencia de biopelículas en la naturaleza es ubicua y pueden hallarse tanto en ambientes bióticos como abióticos, por lo cual, ha tomado un gran interés en el ámbito clínico por su impacto en la salud relacionadas con el desarrollo de ciertas enfermedades infecciosas, así como la resistencia a los antimicrobianos, de igual manera en espacios para la cría o procesamiento de animales destinados al consumo y sus derivados, entre otros. Esto se traduce en importantes pérdidas económicas y humanas [2]. La adherencia bacteriana y su subsecuente formación de biopelículas ha sido reportada en materiales abióticos tales como: metal, vidrio, goma y plástico. De estos, por ejemplo, los materiales plásticos son ampliamente utilizados en la industria de alimentos (superficie de corte, empaques, tanques, etc.) y en el ámbito médico (catéter, prótesis, entre otros) [3-5].

La producción de biopelículas es un evento que ocurre posterior a la adherencia microbiana a superficies (bióticas o abióticas), siendo entonces un paso importante para iniciar eventos infecciosos o colonizantes; además, este fenómeno se ha visto fuertemente asociado con las variables fisicoquímicas del entorno, la superficie celular y la superficie de contacto con la que ésta llega a interactuar [3]. La importancia que se le ha otorgado actualmente a las biopelículas en las áreas de la medicina, ciencias ambientales e industrial se debe al hecho de ser uno de los factores de virulencia de mayor relevancia en microorganismos como *Staphylococcus aureus* y *S. epidermidis* [6-8], siendo este un factor de virulencia que actúa como mecanismo de supervivencia, evadiendo las defensas del hospedador y proporcionándole a la bacteria protección bajo un microambiente en el cual la misma puede multiplicarse y adquirir mecanismos de resistencia a los antibióticos [6].

Algunas especies bacterianas forman biopelículas en determinadas superficies del cuerpo humano, lo cual les ayuda a protegerse de la respuesta inmunitaria y de los agentes antimicrobianos. Las biopelículas son más resistentes a los antimicrobianos debido a la penetración limitada, menor eficacia y mayor intercambio de genes de resistencia, además, pueden formarse células persistentes, las cuales sobreviven al tratamiento antimicrobiano y adquieren mecanismos de resistencia [7].

Desde tiempos inmemorables la preservación y seguridad de alimentos inocuos ha sido necesaria para nuestra supervivencia, ya que estos constituyen la principal fuente de nutrientes en seres humanos y animales que, además, pueden llegar a ser un medio de cultivo idóneo para el crecimiento y proliferación de diversos microorganismos, y en muchos casos pueden, incluso, desencadenar toxiinfecciones alimentarias cuando la

microbiota asociada supera los límites considerados como inocuos para los comensales [3,6].

El desarrollo de biopelículas por parte de *S. aureus* se ve reforzado por diversos métodos de procesamiento que se encuentran en la industria alimentaria, como temperaturas subóptimas desinfección inadecuada de materiales y equipos o una combinación de sal y glucosa, e incluso, se ha demostrado la transcripción de genes implicados en la formación de biopelículas y de virulencia en este patógeno tales como: proteínas superficiales, proteasas, polisacáridos capsulares y otros que se regulan positivamente en presencia de concentraciones subletales de varios detergentes comunes utilizados en la industria alimentaria [6].

Las bacterias formadoras de biopelículas en los distintos ambientes representan un arduo desafío para el control (o erradicación) del agente microbiano, ya que la extensa matriz del polímero representa una barrera para la difusión de los agentes antimicrobianos, lo cual retrasa o impide que antibióticos o detergentes alcancen las células diana, por lo cual los microorganismos pueden hacerse resistentes a las terapias con antibióticos y/o desinfectantes [7-9]. Según el panel de la autoridad europea de seguridad alimentaria sobre peligros biológicos, en la Unión Europea para el año 2015 se reportaron 434 brotes de intoxicación alimentaria por *S. aureus* [10] y para el 2016, el Centro de Control de Enfermedades de los Estados Unidos informó 241 994 casos de este tipo de intoxicación alimentaria con 1067 hospitalizaciones y 6 muertes [11].

Todo lo antes señalado justifica la importancia de conocer las habilidades fisiológicas y las propiedades de la superficie celular de potenciales agentes microbianos que pueden, en cualquier momento, formar biopelículas, ya que el conocimiento de éstos puede proporcionar elementos claves para desarrollar estrategias de control o erradicación en cualquier ámbito al cual éstos se asocian.

Materiales y métodos

Origen y conservación de las cepas bacterianas estudiadas: las cepas de *S. aureus* (n=24) evaluadas en esta investigación fueron aisladas en estudios previos [5,6,12] a partir de: manipuladores de alimentos (8 cepas), leches crudas (3 cepas) y quesos artesanales (13 cepas); las mismas se conservaron congeladas a -20 °C en caldo nutritivo con glicerol al 20% p/v.

Confirmación taxonómica de la especie bacteriana estudiada: la confirmación de las cepas estudiadas de *S. aureus* se llevó a cabo mediante amplificación del gen *nuc* por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) [13]. Para ello, cada una de las cepas fueron recuperadas en 1,5 mL de caldo infusión cerebro-corazón (Merck, Alemania) a 36 ± 2 °C entre 18 a 20 h en incubadora estática (Lab-Mermet, USA). La biomasa se cosechó y se verificó su pureza mediante tinción de Gram; se lavó en microtubos de 2 mL

de capacidad mediante tres ciclos de centrifugación (3500g) y resuspensión celular con buffer TE (Tris-HCl, 10 mM; EDTA, 1 mM; pH: 7,5); la suspensión celular obtenida fue sometida durante 17 min a un baño de agua en ebullición. Los restos celulares post tratamiento térmico fueron retirados de la suspensión al centrifugar a 3500 g; el contenido del microtubo y el sobrenadante se decantó a otro tubo estéril para ser almacenado a -20 °C hasta el momento de realizar las PCR. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador (Applied Biosystems, Modelo PCR 2720, USA) bajo las condiciones que señala Ramesh *et al.* [13].

Producción de exopolisacárido (EPS) por las cepas de *S. aureus*: se adoptó el método de sembrado de las cepas bacterianas en placas de Petri con agar rojo Congo (ARC), descrito por Freeman *et al.*, [14] y modificado por Rivera *et al.* [6], el cual contiene en su composición por cada litro: 50 g de glucosa; 36 g de caldo infusión cerebro-corazón, 12 g de agar-agar. Las placas de ARC inoculadas se incubaron durante una semana a 36 ± 2 °C haciendo observaciones cada 24 h. Criterio de interpretación del ensayo: las cepas que se consideraron productoras de exopolisacárido fueron aquellas cuyas características fueron rugosas con coloración negra; las colonias rojas y lisas fueron consideradas como negativas para la producción de exopolisacárido [14].

Propiedades de la superficie celular de las cepas de *S. aureus*: La superficie celular se evaluó mediante interacción específica célula-célula [15-17] y mediante la adherencia de las cepas a solventes orgánicos [18-19]:

- Ensayos de agregación espontánea (A_E): La agregación espontánea de las cepas de *S. aureus* se evaluó siguiendo las recomendaciones de Del Re *et al.* [17]. En tal sentido, las cepas fueron reactivadas en caldo nutritivo (Merck, Alemania) suplementado con 0,5% p/v de D-glucosa (HiMedia, India) en incubadora estática (Lab-Mermet, USA) a 35 ± 2 °C durante 18-20 h. Transcurrido el tiempo de incubación, los cultivos se agitaron levemente durante 10 s. en vortex (MyLab, USA) y se observaron a contraluz. Interpretación: las cepas que formaron agregados celulares fueron interpretadas como positivas por agregarse de forma espontánea, mientras que la persistencia de una turbidez uniforme en todo el caldo nutritivo se interpretó como negativa
- Ensayos de autoagregación (A_A): se llevó a cabo según lo señalado por Mattos-Guaraldi *et al.* [16]. Para esto, la biomasa de las cepas obtenida en caldo nutritivo antes descrita fue separada por centrifugación a 3000 g durante 3,5 min a temperatura ambiente; inmediatamente el *pellet* celular fue lavado tres veces con 0,01 M fosfato bufferado – 0,15 M NaCl (PBS, pH:

6,8) y, finalmente, resuspendido en el mismo PBS. Alícuotas de 50 µL de esta suspensión bacteriana fueron colocadas sobre láminas portaobjetos y a contraluz se rotó manualmente la gota durante 1 min a temperatura ambiente. Interpretación: las cepas que presentaron aglutinaciones fueron consideradas positivas para la autoagregación celular; las suspensiones bacterianas que mantuvieron turbidez homogénea fueron consideradas negativas.

- Ensayos de agregación en presencia de sal (A_S): se evaluó siguiendo lo propuesto por Ljungh *et al.* [15] y Mattos-Guaraldi *et al.* [16]. Inicialmente se prepararon soluciones de (NH₄)₂SO₄ en concentraciones que abarcaban desde 0,03 M hasta 4,0 M; individualmente, de cada una de las disoluciones de esta sal se dispensaron 50 µL en portaobjetos sobre los cuales se agregaron 50 µL del cultivo bacteriano cosechado en PBS. Interpretación: la más baja concentración que indujo visiblemente la formación de agregados celulares fue considerada para denotar el grado de hidrofobicidad de la superficie celular de las cepas, y se consideraron los siguientes niveles: Fuerte: 0,0 < 1,0 M; Moderado: 1,0 < 2,0 M; Débil: 2,0 < 4,0 M y No hidrofóbico: ≥ 4 M.
- Ensayos de adherencia bacteriana a solventes orgánicos (AB_{SO}): La afinidad de *S. aureus* por los solventes orgánicos xileno (apolar), cloroformo (polar ácido) y dietil éter (polar básico) se evaluó siguiendo la metodología de Bellon-Fontaine *et al.* [18] y Kos *et al.* [19]. Consistió en mezclar 3 mL de la suspensión bacteriana cosechada en PBS con 1 mL del solvente a evaluar. La mezcla fue agitada en vortex por 1 min y se dejó reposar durante 15 min. hasta separarse en dos fases claramente observables; a la fase acuosa le fue medida la absorbancia a 600 nm en espectrofotómetro (Spectronic, modelo 20D+, USA). La afinidad de las cepas a los diferentes solventes fue expresada usando la ecuación:

$$v-AB_{SO} (\%) = (1 - A_{15 \text{ min.}} / A_{0 \text{ min.}}) \times 100$$

Donde;

A_{0 min.}: Absorbancia inicial del cultivo, antes de agregar el solvente.

A_{15 min.}: Absorbancia del cultivo tiempo después de agregar el solvente.

Interpretación: los valores AB_{SO} fueron categorizados arbitrariamente como niveles de adherencia bajo el criterio que se establece a continuación: Fuerte: ≥ 50 %; Moderada: $\geq 20\%$ - $< 50\%$; Débil: > 0 - $< 20\%$ y Nulo: $\approx 0\%$.

Análisis estadístico: todos los datos fueron expresados como la media de tres experimentos independientes y analizados estadísticamente mediante la Prueba de Múltiples Rangos y el método empleado para discriminar

entre las medias fue el de Diferencia Mínima Significativa (LSD) de Fisher, con un nivel de significancia al 95%, llevado a cabo en el paquete estadístico STATGRAPHIC Centurion XVI para Windows.

Resultados

La denominación del género y especie de las cepas estudiadas mediante el análisis molecular, basado en la amplificación del gen *nuc*, cuyo tamaño molecular era de 482 pb, que codifica para una nucleasa termoestable, confirmó que las 24 cepas eran *S. aureus*; además, se pudo observar al término de las 24-48 h la aparición de colonias productoras de EPS en 15/24 cepas (62,5%), las cuales se caracterizaban por poseer en su morfología una coloración negra con textura rugosa cuando fueron sometidas a crecimiento sobre las placas con ARC (Figura 1A), mientras que 9/24 cepas (37,5%) resultaron incapaces de mostrar tales fenotipos, aún tras su extensión de incubación durante una semana (Figura 1B; tabla 1).



Figura 1. A. Aspecto colonial de cepa de *S. aureus* productora de exopolisacárido. B. Aspecto colonial de cepa de *S. aureus* no productora de exopolisacárido. Crecimiento en agar rojo Congo.

Entre las cepas de *S. aureus* productoras de EPS fue común observar en las placas con ARC que la morfología típica era más acentuada en la zona inicial de inoculación con respecto a las zonas donde comienzan a observarse las colonias aisladas, en la cual la tonalidad tendía a un color rojizo oscuro. Se conoce además que muchas cepas de *S. aureus* luego de su adherencia desarrollan el poder de formar biopelículas y dentro de ella experimentan diversos mecanismos de transferencia genética; esto aumenta la diseminación de genes que confieren caracteres como la asimilación de ciertos compuestos y resistencia a agentes antimicrobianos [2].

Tabla 1. Producción de exopolisacáridos e interacciones específicas célula-célula de las cepas de *S. aureus*.

Cepa	EPS	A _E	A _A
M22J-006	Positivo	Negativo	Negativo
M03A-001	Positivo	Negativo	Negativo
M03A-005	Positivo	Negativo	Negativo
MStp-002	Positivo	Negativo	Negativo
MStp-016	Positivo	Negativo	Negativo
MStp-019	Positivo	Positivo	Negativo
MStp-003	Positivo	Negativo	Negativo
MStp-009	Positivo	Negativo	Negativo
CM-120	Positivo	Negativo	Negativo
CM-014	Positivo	Negativo	Negativo
CM-225	Positivo	Negativo	Negativo
Bio-005	Negativo	Negativo	Negativo
Bio-006	Negativo	Negativo	Negativo
Bio-007	Positivo	Negativo	Negativo
Bio-008	Negativo	Negativo	Negativo
Bio-009	Negativo	Negativo	Negativo
Bio-010	Positivo	Negativo	Negativo
Bio-011	Positivo	Negativo	Negativo
Bio-012	Negativo	Negativo	Negativo
Bio-017	Negativo	Negativo	Negativo
Bio-020	Negativo	Positivo	Negativo
Bio-023	Negativo	Positivo	Negativo
Bio-024	Positivo	Negativo	Negativo
Bio-025	Negativo	Negativo	Negativo

EPS: Exopolisacárido; A_E: Agregación espontánea; A_A: Autoagregación.

Los resultados obtenidos en los ensayos donde se evaluó la habilidad de las cepas de *S. aureus* para interaccionar de forma específica, se demostró que el 12,5% (3/24) de las cepas fueron capaces de formar agregados celulares de manera espontánea, mientras que el resto no manifestó esta característica agregativa en las mismas condiciones de crecimiento. Por otro lado, se encontró que el 100% de las cepas estudiadas no manifestó capacidad autoagregativa (Tabla 1). Según los criterios de interpretación que proponen algunos investigadores, las cepas de *S. aureus* que particularmente tienen habilidad agregativa espontánea se caracterizan por poseer un fuerte grado de hidrofobicidad sobre su superficie celular, contrario a lo que ocurre con la superficie celular de las cepas que no forman agregación espontánea o autoagregativa, cuyo carácter no es hidrofóbico [16,20,21]

En los ensayos de agregación en presencia de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se observó que el 87,5% (21/24) de las cepas de *S. aureus* manifestaron poder agregativo a partir de concentraciones que oscilaban entre los 0,03 - 1,00 mol * L⁻¹ (Tabla 2). Según los criterios que señalan Mattos-Guaraldi *et al.* [16] y Krepsky *et al.* [21], este rango de concentración de sal que promovió la agregación celular en las cepas del presente estudio, caracteriza la superficie celular bacteriana con un grado de hidrofobicidad fuerte. En el resto de las cepas, la agregación celular se manifestó en el 8,3% (2/24) cuando fueron expuestas a

Tabla 2. Agregación celular en presencia de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Cepa	Concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (mol * L ⁻¹)											
	4	3	2,5	2	1,5	1	0,5	0,25	0,12	0,06	0,03	0,00
M22J-006	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	-
M03A-001	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	-
M03A-005	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	-
MStp-002	+	<+>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MStp-016	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	-
MStp-019	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	-
MStp-003	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	-
MStp-009	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	-
CM-120	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	-
CM-014	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	-	-
CM-225	+	+	+	+	+	+	+	(+)	-	-	-	-
Bio-005	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	-
Bio-006	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	-
Bio-007	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	-
Bio-008	+	+	+	[+]	-	-	-	-	-	-	-	-
Bio-009	+	+	+	+	+	(+)	-	-	-	-	-	-
Bio-010	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	-
Bio-011	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	-
Bio-012	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	-
Bio-017	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	-
Bio-020	+	+	+	[+]	-	-	-	-	-	-	-	-
Bio-023	+	+	+	+	+	(+)	-	-	-	-	-	-
Bio-024	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	-
Bio-025	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	-

Leyenda: Formación de agregado celular: +; Ausencia de agregado celular: -; El grado de hidrofobicidad de la superficie celular de los *S. aureus* se señala como: Hidrofobicidad fuerte:(+); Hidrofobicidad moderada: [+]; Hidrofobicidad débil <+>. Agregación celular en presencia de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

concentraciones iguales o superiores a los 2 mol * L⁻¹ de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y sólo el 4,2% (1/24) lo hicieron a partir de 3 mol * L⁻¹ (Tabla 2). De estos dos grupos, el primero se consideran cepas con superficie celular con hidrofobicidad moderada y el segundo con nivel de hidrofobicidad débil.

Cuando se agruparon las cepas por su capacidad para sintetizar exopolisacárido y se procedió a comparar sus respectivos valores promedios de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, no se observaron diferencias significativas en el procedimiento LSD de Fisher. Sin embargo, algunos valores alrededor de la media si muestran diferencias notables (Figura 2A).

Bajo el mismo procedimiento LSD de Fisher se evidenciaron diferencias significativas en el valor promedio de sal que promovió la agregación entre las cepas de *S. aureus* que, a su vez, manifestaron o no agregación espontánea, así como en los intervalos alrededor de la media general para cada uno de estos dos grupos de cepas (Figura 2B).

Acerca de los valores de adherencia ($v\text{-AB}_{50}$) de los *S. aureus* a solventes orgánicos (Tabla 3), se agruparon por niveles de adherencia arbitraria para cada uno de ellos, como se observa en la figura 2C, en la cual se pudo apreciar que el mayor porcentaje de las cepas se adhirió de forma débil al xileno (41,7%) seguida de las que lo hicieron de forma moderada (33,3%), y en menor proporción las que lo hicieron con carácter fuerte (25%).

Cuando se analizaron los $v\text{-AB}_{50}$ al cloroformo se pudo apreciar que la mayor proporción de las cepas de *S. aureus* lo hizo de forma moderada (37,5%), mientras que la adherencia fuerte se registró en un 29,2 % de las cepas, al igual que la adherencia débil (29,2%); sólo una cepa (4%) no mostró adherencia al cloroformo.

Para el caso de adherencia al dietil-éter, la mayor proporción de las cepas de *S. aureus* lo hizo de forma moderada (62,5%), seguida de fuerte (29,2%), y la menor proporción manifestó adherencia de forma débil (8%).

Los resultados obtenidos ponen en evidencia algunas propiedades de la superficie de *S. aureus* estudiadas, como, por ejemplo, la adherencia al xileno (solvente apolar) que muestra el carácter hidrofóbico/hidrofílico de la superficie celular de las cepas, la cual resulta de la expresión de proteínas y polisacáridos sobre ésta [22,23].

Por su parte, la afinidad al cloroformo (solvente ácido) describe la propiedad de la superficie celular de estas cepas para donar electrones, y esto se le atribuye a la presencia de grupos elementales en sus superficies celulares tales como: carboxilos (COO^-), fosfatos (PO_4^{2-}) y aminos (NH_2) [18,19,23]. En cambio, la afinidad al dietil-éter (solvente básico) es indicio de la propiedad de la superficie celular para aceptar electrones [23].

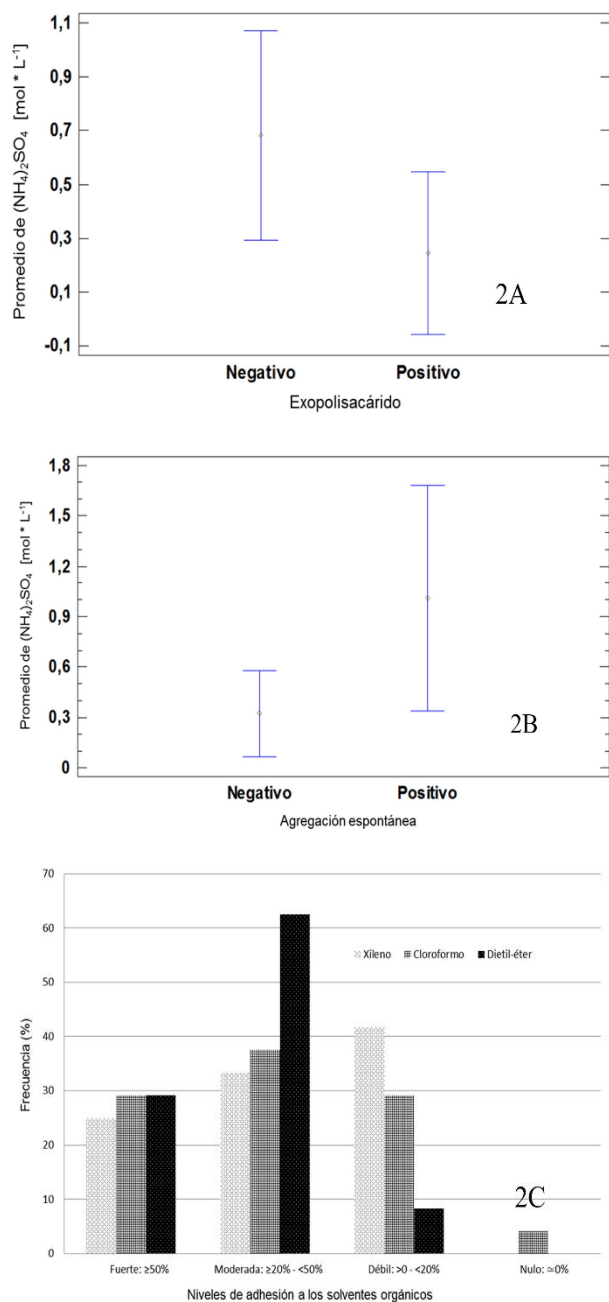


Figura 2. A Comparación de la media de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e intervalos a su alrededor para las cepas de *S. aureus* que sintetizaron o no exopolisacárido, basados en el procedimiento LSD de Fisher al 95% de confianza. B. Comparación de la media de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e intervalos a su alrededor para las cepas de *S. aureus* que manifestaron o no agregación espontánea, basados en el procedimiento LSD de Fisher al 95% de confianza. C. Niveles de adhesión de los *S. aureus* a los solventes orgánicos.

Las medias de los v-AB_{SO} entre las cepas de *S. aureus* evaluadas (Figura 3A) no evidenciaron diferencias significativas entre ellas, incluso puede notarse como los intervalos alrededor de la media general de los valores AB_{SO} se solapan entre sí en la mayor parte de los casos entre el xileno y el cloroformo, y apenas se encontraron diferencias significativas en valores rangos alrededor de la media de dietil-éter cuando se compararon con los del

xileno y cloroformo. Al compararse los v-AB_{SO} en función de la habilidad de las cepas para producir exopolisacárido no se hallaron diferencias significativas en ninguno de los casos (Figuras 3B-3D).

Tabla 3. Adherencia de las cepas de *S. aureus* a los solventes orgánicos.

Cepa	Xileno v-AB _{SO} (%)	Cloroformo v-AB _{SO} (%)	Dietil-éter v-AB _{SO} (%)
M22J-006	83,77 ± 0,00	94,79 ± 0,00	55,89 ± 33,1
M03A-001	13,23 ± 0,40	50,09 ± 8,60	28,67 ± 14,4
M03A-005	23,13 ± 0,00	37,27 ± 5,30	23,19 ± 27,6
MStp-002	31,49 ± 0,01	00,00 ± 0,00	21,43 ± 1,30
MStp-016	06,08 ± 0,00	17,09 ± 9,50	49,55 ± 0,00
MStp-019	10,45 ± 0,00	16,40 ± 0,00	39,46 ± 0,00
MStp-003	48,15 ± 46,8	60,62 ± 51,2	62,70 ± 0,00
MStp-009	04,67 ± 0,00	29,01 ± 6,70	20,37 ± 7,30
CM-120	51,79 ± 30,3	79,69 ± 8,30	57,90 ± 20,6
CM-014	28,05 ± 23,5	41,31 ± 26,0	35,09 ± 20,1
CM-225	28,49 ± 7,00	04,96 ± 7,00	20,40 ± 0,00
Bio-005	92,76 ± 0,00	98,06 ± 0,00	70,28 ± 22,0
Bio-006	01,01 ± 0,00	24,49 ± 9,30	14,54 ± 12,9
Bio-007	33,33 ± 0,00	14,69 ± 1,20	52,77 ± 47,9
Bio-008	42,78 ± 26,4	31,01 ± 27,7	39,44 ± 10,7
Bio-009	17,70 ± 25,9	21,44 ± 22,1	22,54 ± 7,50
Bio-010	39,16 ± 31,3	02,18 ± 0,80	51,99 ± 0,00
Bio-011	16,76 ± 32,5	11,77 ± 14,3	20,52 ± 12,6
Bio-012	04,73 ± 41,4	03,71 ± 3,10	53,15 ± 19,9
Bio-017	23,25 ± 22,2	26,28 ± 35,2	39,10 ± 2,70
Bio-020	56,01 ± 58,4	57,80 ± 14,0	33,00 ± 12,6
Bio-023	54,95 ± 0,00	29,73 ± 0,00	08,11 ± 41,4
Bio-024	59,78 ± 16,8	53,32 ± 29,3	47,02 ± 43,1
Bio-025	30,08 ± 6,00	47,58 ± 7,30	46,18 ± 0,00

Leyenda: v-AB_{SO} (%): Valores porcentuales de absorbancia a los solventes orgánicos.

En este sentido, sobre la pared celular de *S. aureus* se pueden señalar dos componentes principales: el ácido lipoteicoico, cuya parte hidrofóbica juega un papel en la adherencia, y el peptidoglicano, que en su parte covalente se une a los componentes microbianos de superficie, proteínas con función adhesina [4].

Otras propiedades sobre la superficie celular de las cepas de *S. aureus* tales como un carácter donador/aceptor de electrones y la presencia de un mucopolisacárido, indudablemente lo habilitan para poder adherirse a diferentes tipos de superficies bióticas y abióticas. Resulta importante estudiar las condiciones ambientales como la temperatura, pH, nutrientes, fuerza iónica, entre otras, que puedan tener influencia sobre las características de sus superficies celulares y las propias de las superficies de contacto (carga e hidrofobicidad), como lo han señalado Bonaventura *et al.* [24].

La real importancia de los resultados hallados en esta investigación es que las cepas de *S. aureus*, provenientes de fuentes directas e indirectas de alimentos, puedan adherirse y colonizar tanto superficies abióticas como bióticas (catéteres, epitelio y mucosas) y logren causar infecciones severas tales como: septicemia, abscesos,

conjuntivitis entre otros [23,25].

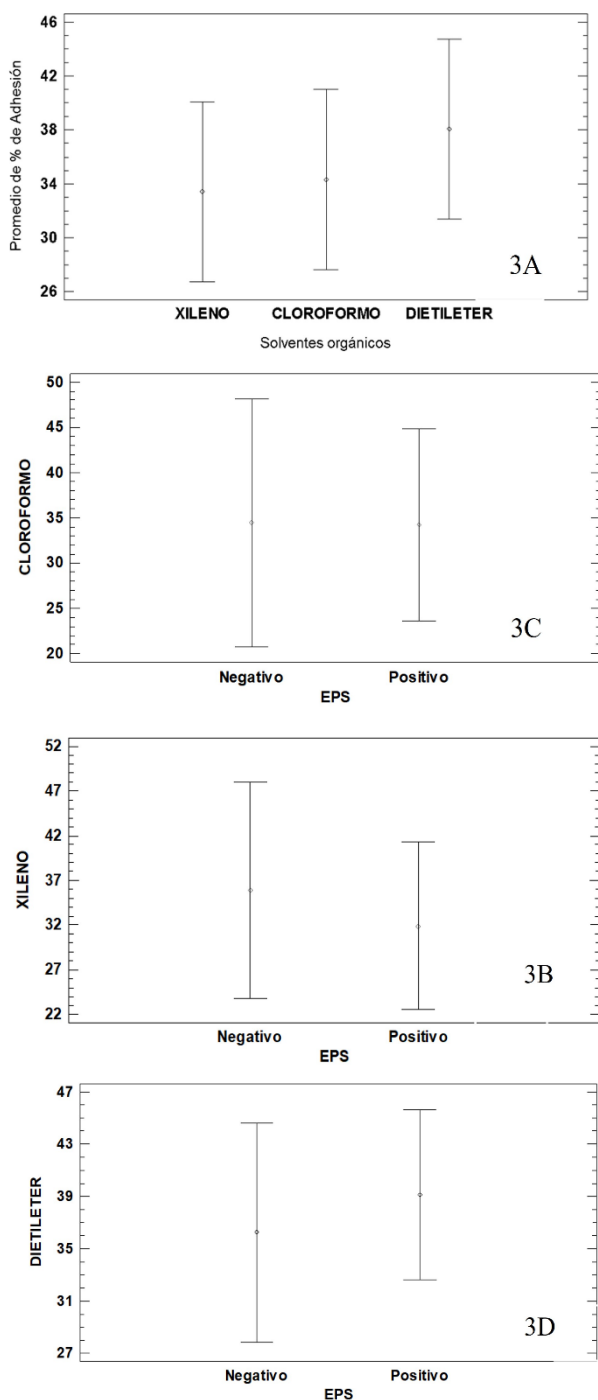


Figura 3. A. Comparación de la media del porcentaje de adhesión a los solventes orgánicos y sus intervalos a su alrededor para las cepas de *S. aureus*. B a D. Comparación de medias de adhesión a los solventes orgánicos entre las cepas, agrupadas por su habilidad para producir exopolisacárido, análisis basado en el procedimiento LSD de Fisher al 95% de confianza.

Finalmente, es importante señalar que cepas como las estudiadas en esta investigación son preocupantes en el ámbito de la industria alimentaria, por los caracteres de su superficie celular que las habilita para adherirse a superficies de distinta naturaleza como acero inoxidable,

plástico, vidrio y otros que comúnmente se utilizan en la industria, por lo cual, la adherencia se ve favorecida cuando la energía superficial de la bacteria es mayor a la del medio. Caso contrario, cuando un sustrato posee baja energía superficial éste es más bien hidrofóbico y para favorecer la adherencia microbiana es necesario que la energía superficial del microorganismo sea aún menor que la del sustrato [26].

Conclusiones

Entre los *S. aureus* estudiados se observaron cepas con y sin capacidad para producir exopolisacárido, de las cuales ninguna de ellas fue capaz de formar autoagregados celulares, y apenas algunas de estas manifestaron habilidad para formar agregados celulares específicos de forma espontánea.

La hidrofobicidad de la superficie celular de las cepas quedó fuertemente manifiesta cuando fueron expuestas al sulfato de amonio y al xileno, al promover la agregación celular específica y la afinidad por el solvente orgánico, respectivamente. Los elevados niveles de adhesión de los *S. aureus* a los solventes orgánicos evaluados (ácido y básico) definieron la propiedad de la superficie celular de las cepas para donar/aceptar electrones, siendo esta una propiedad fisicoquímica que les confiere la potencial habilidad para la colonización e invasión de superficies de contacto bien sea bióticas o abióticas de múltiples naturalezas.

No se observaron diferencias entre las propiedades de la superficie celular de los *S. aureus* productores de exopolisacárido con respecto a las cepas que no mostraron capacidad para biosintetizarlas. Por lo cual, los *S. aureus* estudiados representan un riesgo significativo para las industrias procesadoras de alimentos, ya que se hace evidente su habilidad fisiológica para invadir superficies de contacto, y a su vez complica el aseguramiento de alimentos libres de microorganismos perjudiciales para la salud.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún tipo de conflicto de interés.

Financiamiento

El estudio no recibió financiamiento.

Referencias

- Gupta P, Sarkar S, Das BI, Bhattacharjee S, Tribedi YP. Biofilm, pathogenesis and prevention -a journey to break the wall: a review. Arch Microbiol. 2016; 198:1-15. DOI:10.1007/s00203-015-1148-6

2. Moreno X, Ventura M, Panizo M, Garcés M. Determinación de biopelículas en aislados bacterianos y fúngicos por los métodos semicuantitativo de microtitulación con cristal violeta y cualitativo de agar con rojo Congo. *Biomédica*. 2023; 43 (Supl.1):77-88. DOI:10.7705/biomedica.6732
3. Camargo A, Woodward J, Call D, Nero L. *Listeria monocytogenes* in food-processing facilities, food contamination, and human listeriosis: the brazilian scenario. *Foodborne Pathog Dis*. 2017; 14:623–36. DOI:10.1089/fpd.2016.2274
4. Mc Carthy H, Rudkin J, Black N, Gallagher L, O'Neill E, O'Gara J. Methicillin resistance and the biofilm phenotype in *Staphylococcus aureus*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2015; 28:1. DOI:10.3389/fcimb.2015.00001
5. Valero-Leal K, Rivera J, Briñez W, Paz A, Piña W, Ávila Y, Colina G. Capacidad de formación de biopelícula y limo en *Staphylococcus* que causan mastitis subclínica bovina en el estado Zulia-Venezuela. *Kasmera*. 2017; 45:24-32. <https://www.redalyc.org/journal/3730/373061522004/373061522004.pdf>
6. Rivera J, Aranaga V, Reyes G, Vega O, Ciancio L, Atencio L, Zabala I. Adherencia y formación de biopelícula sobre superficies abióticas lisas en *Staphylococcus* spp. aislados de quesos artesanales e industriales. *Bol Centro Invest Biol*. 2018; 52:38-55. <https://produccioncientificaluz.org/index.php/boletin/article/view/25230/30591>
7. Avila-Roo Y, Ginestre-Perez M, Castellano-Tolosa M, Escobar-Velázquez F, Briceño-Peñalosa A, Valero-Leal K, Rincon-Villalobos G, Rivera-Salazar J. Biopelícula en *Staphylococcus aureus* sensibles y resistentes a metilina. *Kasmera*. 2019; 47:38-43. <https://www.redalyc.org/journal/3730/373061540007/html/>
8. Fagerlund A, Langsrud S, Heir E, Mikkelsen M. I, Møretrø T. Biofilm matrix composition affects the susceptibility of food associated staphylococci to cleaning and disinfection agents. *Front Microbiol*. 2016; 7:1-15. DOI:10.3389/fmicb.2016.00856
9. Namvar A E, Asghari B, Ezzatifar F, Azizi G, Lari R. Detection of the intercellular adhesion gene cluster (ica) in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *GMS Hyg Infect Control*. 2013; 8:Doc03. DOI:10.3205/dgkh000203
10. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Public health risks associated with Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) as a food-borne pathogen. *EFSA J*. 2015; 13:1-88. DOI:10.2903/j.efsa.2015.4330
11. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2018. Estimates of foodborne illness in the United States. <https://www.cdc.gov/foodborneburden/index.html>
12. Mujica I, Zabala I, Rivera J. Acción de desinfectantes sobre la producción de biopelículas de cepas de *Staphylococcus aureus* provenientes de manipuladores de alimentos. *Observador del Conocimiento*. 2022; 1:143-53. DOI:10.5281/zenodo.6968847
13. Ramesh A, Padmapriya B, Chrashekar Varadaraj A. Application of a convenient DNA extraction method and multiplex PCR for the direct detection of *Staphylococcus aureus* and *Yersinia enterocolitica* in milk samples. *Mol Cell Probes*. 2002; 16:307-14. DOI:10.1006/mcpr.2002.0428
14. Freeman D, Falkiner F, Keane C. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol*. 1989; 42:872-4. <https://jcp.bmj.com/content/jclinpath/42/8/872.full.pdf>
15. Ljungh A, Hjertén S, Wadström T. High surface hydrophobicity of auto aggregating *Staphylococcus aureus* strains isolated from human infections studied with the salt aggregation test. *Infect Immun*. 1985; 47:522-6. DOI:10.1128/iai.47.2.522-526.1985
16. Mattos-Guaraldi A, Formiga L, Andrade A. Cell surface hydrophobicity of sucrose fermenting and nonfermenting *Corynebacterium diptheriae* strains evaluated by different methods. *Curr Microbiol*. 1999; 38:37-42. DOI:10.1007/PL00006769
17. Del Re B, Sgorbati B, Miglioli M, Palenzona D. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longun*. *Lett Appl Microbiol*. 2000; 31:438-42. DOI:10.1046/j.1365-2672.2000.00845.x
18. Bellon-Fontaine M, Rault J, Van Oss C. Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cell. *Colloids Surf B*. 1996; 7:47-53. DOI:10.1016/0927-7765(96)01272-6 .
19. Kos B, Suskovic J, Vukovic S, Simpraga M, Frec, J, Matosic S. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M29. *J Appl Microbiol*. 2003; 94:981-7. DOI:10.1046/j.1365-2672.2003.01915.x .
20. Lee K, Yee K. A comparison of three methods for assaying hydrophobicity of pathogenic vibrios. *Lett Appl Microbiol*. 1996; 23:343-6. DOI:10.1111/j.1472-765X.1996.tb00204.x
21. Krepsky N, Rocha R, Ferreira A, Casado U, Costa E, Silva F, et al. Cell surface hydrophobicity and slime production of *Staphylococcus epidermidis* Brazilian isolates. *Curr Microbiol*. 2003; 46:280-6. DOI:10.1007/s00284-002-3868-5
22. Chauviere G, Coconnier M, Kerneis S, Darfeuille-Michaud A. Competitive exclusion of diarrheagenic *Escherichia coli* (ETEC) from human enterocyte-like

- Caco-2 cells by heat-killed *Lactobacillus*. FEMS Microbiol Lett. 1992; 70:213-7. DOI:10.1016/0378-1097(92)90700-X .
23. Xu H, Jeong H, Lee H, Ahn J. Assessment of cell surface properties and adhesion potential of selected probiotic strains. Lett Appl Microbiol. 2009; 49:434-42. DOI:10.1111/j.1472-765X.2009.02684.x
24. Bonaventura G, Piccolomini R, Paludi D, D'Orio V, Vergara A, Conter M, Ianeieri A. Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell Surface hydrophobicity. J Appl Microbiol. 2008; 104:1552-61. DOI:10.1111/j.1365-2672.2007.03688.x
25. Lebeaux D, Ashwini C, Olaya R, Christopher B. From in vitro to in vivo models of bacterial biofilm-related infection. Pathogens. 2013; 2:288-356. DOI:10.3390/pathogens2020288
26. Chmielewski R, Frank J. Biofilm formation and control in food processing facilities. Compr Rev Food Sci Food Saf. 2003; 2:22-32. DOI:10.1111/j.1541-4337.2003.tb00012.x