

DISCRIMINACIÓN E IDENTIFICACIÓN RÁPIDA DE BACTERIAS EMPLEANDO TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS Y ANÁLISIS MULTIVARIADO.

Edwin Barrios Caballero¹, Kevin Ramírez Olivero¹, Nataly Julieth Galán Freyle^{2*}, María Auxiliadora Badillo Vilorio³.

¹ Estudiante programa de Microbiología, Facultad Ciencias Básicas y Biomédicas, Universidad Simón Bolívar.

² PhD. Profesor investigador, Facultad Ciencias Básicas y Biomédicas, Grupo de Investigación en Genética, Universidad Simón Bolívar.

³ M.Sc. Profesor investigador programa de Microbiología, Facultad Ciencias Básicas y Biomédicas, Grupo Bio-organizaciones. Universidad Simón Bolívar.

*Correspondencia: nataly.galan@unisimonbolivar.edu.co

Resumen.

La detección y discriminación rápida de bacterias por medio de técnicas que empleen menos tiempo es una necesidad en el sector productivo e industrial, principalmente la industria farmacéutica y de alimentos, que requieren disminuir considerablemente el tiempo en la validación de los procesos de limpieza, para ello es indispensable la identificación de los diferentes tipos de bacterias presentes en las superficies metálicas de los contenedores de producción para evitar cualquier tipo de contaminación en sus productos. El objetivo de este trabajo fue evaluar la espectroscopia UV-Vis e Infrarroja como método analítico costo-efectivo y alternativo para la rápida discriminación e identificación de diferentes bacterias depositadas en superficie metálica, para posibles aplicaciones industriales. Inicialmente se seleccionaron 17 cepas de bacterias con características diferenciales en cuanto a estructuras como pared celular, membrana y/o capsulas y características taxonómicas, se acondicionaron los inóculos bacterianos y se procedió a realizar los análisis espectroscópicos en superficie metálica a partir de técnicas alternativas como la espectroscopia FT-IR con cristal de ATR y la espectroscopia UV-Vis, finalmente se aplicaron herramientas estadísticas para la discriminación de microorganismos como el análisis multivariado. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que un volumen de 1 uL depositados es una placa de aluminio, es suficiente para detectar las señales espectroscópicas de diferentes géneros de bacterias. Se concluyó, que los mejores modelos de discriminación fueron los desarrollados por espectroscopia FT-IR y la causa de la separación entre las clases, es la alteración en la estructura secundaria de las proteínas de las membranas de las bacterias cuando éstas interactúan con la radiación infrarroja, generando unos espectros específicos y característicos de cada bacteria.

Palabras Claves: Espectroscopía infrarroja, Espectroscopía UV-Visible, PCA Análisis de componentes principales, Bacterias.



Referencias Bibliográficas.

1. García P, Allende F, Legarraga P, Huilcaman M, Solari S. Identificación bacteriana basada en el espectro de masas de proteínas: Una nueva mirada a la microbiología del siglo XXI. *Rev Chil Infectol.* junio de 2012;29(3):263-72.
2. Garip S, Gozen AC, Severcan F. Use of Fourier transform infrared spectroscopy for rapid comparative analysis of *Bacillus* and *Micrococcus* isolates. *Food Chem.* abril de 2009;113(4):1301-7.
3. Bava L ines nieto Ana Silvia Donolo Amadeo Javier, Osvaldo Miguel Yantorno. Empleo de espectroscopia infrarroja- transformada de Fourier para diferenciar bacterias de importancia clínica [Internet]. *scielo.org.* 2004 [citado 23 de mayo de 2017]. Disponible en: <http://www.scielo.org.ar/pdf/abcl/v38n3/v38n3a03.pdf>
4. LUIS E. NIETO BARAJAS. Análisis Multivariados [Internet]. ITAM. [citado 23 de mayo de 2017]. Disponible en: http://allman.rhon.itam.mx/~lnieto/index_archivos/Modulo61.pdf
5. Oliveira AC de, Silva RS, Díaz MEP, Iquiapaza RA. Bacterial Resistance and Mortality in an Intensive Care Unit. *Rev Lat Am Enfermagem.* diciembre de 2010;18(6):1152-60.
6. Holmes B, Willcox WR, Lapage SP. Identification of Enterobacteriaceae by the API 20E system. *J Clin Pathol.* enero de 1978;31(1):22-30.
7. Pantoja G, Cristina B, González P, Andrea C. Validación del método de PCR en tiempo real para la determinación cualitativa de *Salmonella* spp. En agua potable y agua de mar, barranquilla, 2014-2015. [Internet]. 2016 [citado 14 de septiembre de 2018]. Disponible en: <http://bonga.unisimon.edu.co/handle/123456789/1517>
8. H. A. Videla. Biocorrosion and biofouling of metals and alloys of industrial usage. Present state of the art at the beginning of the new millennium - 1140 [Internet]. *Revista de Metalurgia.* 2003 [citado 23 de mayo de 2017]. Disponible en: <http://revistademetalurgia.revistas.csic.es/index.php/revistademetalurgia/article/viewFile/1128/1140>
9. Amaranto Natera D, Gutiérrez J, Luz D, Sánchez Polo D. Análisis de homologías de secuencias de los genes *aprA* Y *dsrA* implicados en el proceso de sulfato reducción.

[Internet]. 2016 [citado 14 de septiembre de 2018]. Disponible en: <http://bonga.unisimon.edu.co/handle/123456789/1513>

10. Patricia S. Guiamet SGG de S. Inhibición de la adherencia bacteriana a superficies metálicas por cubiertas de origen biológico [Internet]. 2003 [citado 23 de mayo de 2017]. Disponible en: http://www.fcnym.unlp.edu.ar/uploads/docs/rmlp_tyd_2003_n43.pdf

11. Ábalos C. Adhesión bacteriana a biomateriales. Av En Odontoestomatol. febrero de 2005;21(1):347-53.

12. OMS | Una atención más limpia es una atención más segura [Internet]. WHO. [citado 29 de julio de 2017]. Disponible en: <http://www.who.int/gpsc/background/es/>

13. Mowafak Nassani, Ph.D. untitled - Cleaning Validation in the Pharmaceutical Industry_0.pdf [Internet]. [citado 26 de julio de 2017]. Disponible en: http://www.ivtnetwork.com/sites/default/files/Cleaning%20Validation%20in%20the%20Pharmaceutical%20Industry_0.pdf

14. Lopera Marriaga B, Muñoz Mejía G, Vides Fabregas A. Validación secundaria del método de detección microbiológico de Salmonella spp en alimentos para el laboratorio de investigación en microbiología de la Universidad Simón Bolívar- Barranquilla Colombia. [Internet]. 2016 [citado 14 de septiembre de 2018]. Disponible en: <http://bonga.unisimon.edu.co/handle/123456789/1519>

15. Mollinedo Patzi MA, Gonzáles Villalobos C. Bacterias Gram Negativas. Rev Actual Clínica Investiga. /;2609.

16. Binkley CE, Cinti S, Simeone DM, Colletti LM. Bacillus Anthracis as an Agent of Bioterrorism. Ann Surg. julio de 2002;236(1):9-16.

17. Jaime R. Torres R. CGTV. Bioterrorismo. La experiencia con el ántrax [Internet]. [citado 23 de mayo de 2017]. Disponible en: http://vitae.ucv.ve/pdfs/VITAE_3002.pdf

18. MICROBIOLOGÍA FORENSE - 991 [Internet]. [citado 29 de julio de 2017]. Disponible en: <http://revistareduca.es/index.php/biologia/article/viewFile/983/991>

19. Madigan, M. T., Martinko, J. M., y Parker, J. Brock Biología de los Microorganismos. 10a edición. Prentice-Hall. Madrid, 2003. Madigan, M. T., Martinko, J. M., y Parker, J. Brock Biología de los Microorganismos. 10a edición. Prentice-Hall. Madrid, 2003. Universidad de

Navarra [Internet]. 2005 [citado 22 de julio de 2017]. Disponible en: http://www.unav.es/microbiol/microbio/pagina_5.html

20. J. L. López-Hontangas FJC y MS. Técnicas de identificación [Internet]. [citado 24 de mayo de 2017]. Disponible en: <http://media.axon.es/pdf/65248.pdf>

21. Holmes B, Willcox WR, Lapage SP. Identification of Enterobacteriaceae by the API 20E system. J Clin Pathol. enero de 1978;31(1):22-30.

22. Arderiu XF. Bioquímica clínica y patología molecular. Reverte; 1997. 604 p.

23. Microsoft Word - ANEXOS.doc - PR-F-Anexos.pdf [Internet]. [citado 27 de julio de 2017]. Disponible en: <http://ocw.uc3m.es/ingenieria-quimica/quimica-ii/practicas-1/PR-F-Anexos.pdf>

24. El espectro electromagnetico y sus aplicaciones - espectro_electromagnetico.pdf [Internet]. [citado 27 de julio de 2017]. Disponible en: http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/16746/1/espectro_electromagnetico.pdf

25. García M del CS. Técnico especialista en laboratorio de atención primaria del instituto catalán de la salud. Temario volumen i. MAD-Eduforma; 2006. 431 p.

26. BÁRBARA JESÚS PRUNEDA DE LA FUENTE. - tesis_bpruneda.pdf [Internet]. capítulo 2: Descripción de las técnicas utilizadas. [citado 7 de octubre de 2017]. Disponible en: http://fisica.usach.cl/sites/fisica/files/tesis_bpruneda.pdf

27. Johana Paola Bonett Jiménez. Uso de la espectroscopía de reflectancia difusa (MIR) para la determinación de las propiedades químicas en suelos agrícolas de Colombia [Internet]. [citado 24 de mayo de 2017]. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/45658/1/25785983.2013.pdf>

28. Itenge T., Hickford JG., Forrest RH., McKenzie G., Frampton C. Improving the quality of wool through the use of gene markers. South Afr J Anim Sci [Internet]. 21 de octubre de 2010 [citado 24 de mayo de 2017];39(1). Disponible en: <http://www.ajol.info/index.php/sajas/article/view/61191>

29. Maquelin K, Choo-Smith L-P, Endtz HP, Bruining HA, Puppels GJ. Rapid Identification of Candida Species by Confocal Raman Microspectroscopy. J Clin Microbiol. 1 de febrero de 2002;40(2):594-600.

30. Infrared spectroscopy of proteins [Internet]. [citado 12 de octubre de 2017]. Disponible en: <http://sci-hub.cc/http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005272807001375?via%3Dihub>
31. . John Wiley & Son. «Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy». In: Encyclopedia of Life Sciences (ELS) - molecular structure chemical FTIR.pdf [Internet]. [citado 24 de mayo de 2017]. Disponible en: <file:///C:/Users/Usuario/AppData/Roaming/Zotero/Zotero/Profiles/3irqpqln.default/zotero/storage/UHEBKQUK/molecular%20structure%20chemical%20FTIR.pdf>
32. Harz M, Rösch P, Popp J. Vibrational spectroscopy—A powerful tool for the rapid identification of microbial cells at the single-cell level. Cytometry A. 1 de febrero de 2009;75A(2):104-13.
33. James R Schott. Principles of Multivariate Analysis: A User's Perspective. [citado 24 de mayo de 2017]; Disponible en: <http://sci-hub.cc/10.1198/jasa.2002.s479>
34. Jolliffe. Jolliffe I. Principal Component Analysis (2ed., Springer, 2002)(518s)_MVsa_.pdf [Internet]. 2da ed. [citado 24 de mayo de 2017]. Disponible en: [http://cda.psych.uiuc.edu/statistical_learning_course/Jolliffe%20I.%20Principal%20Component%20Analysis%20\(2ed.,%20Springer,%202002\)\(518s\)_MVsa_.pdf](http://cda.psych.uiuc.edu/statistical_learning_course/Jolliffe%20I.%20Principal%20Component%20Analysis%20(2ed.,%20Springer,%202002)(518s)_MVsa_.pdf)
35. Beaton CRCFD, Hervé Abdi. An ExPosition of Multivariate Analysis with the Singular Value Decomposition in R [Internet]. [citado 24 de mayo de 2017]. Disponible en: <https://www.utdallas.edu/~herve/abdi-bca2013-Exposition.pdf>
36. Monfreda M, Gobbi L, Grippa A. Blends of olive oil and seeds oils: characterisation and olive oil quantification using fatty acids composition and chemometric tools. Part II. Food Chem. 15 de febrero de 2014;145:584-92.
37. Maleki MR, Mouazen AM, Ramon H, De Baerdemaeker J. Multiplicative Scatter Correction during On-line Measurement with Near Infrared Spectroscopy. Biosyst Eng. marzo de 2007;96(3):427-33.
38. LabCognition. Multiplicative Scatter Correction details - EN [Internet]. Analytical Software GmbH &co.KG. [citado 27 de mayo de 2017]. Disponible en: http://www.labcognition.com/onlinehelp/en/multiplicative_scatter_correction.htm.