



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y
DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.**

**“CARACTERIZACIÓN ESPECTRAL E
IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS DEL
GENERO CLOSTRIDIUM MEDIANTE
ESPARCIMIENTO RAMAN”.**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRO EN CIENCIA Y
TECNOLOGÍA EN LA ESPECIALIDAD
DE INGENIERÍA AMBIENTAL**

PRESENTA

IBT. DEYADIRA BERENICE GUZMÁN OTHÓN

GUADALAJARA, JAL. FEBRERO 2018



Dedicatoria

*Esta tesis está dedicada con todo mi amor para mi madre
Catalina por todo su apoyo incondicional amor y
esfuerzo durante toda mi vida gracias mamá eres el mayor
ejemplo. Te amo.*

Agradecimientos

Agradexo el haber encontrado un amigo casi familia, antes que un Director de tesis que eso fue lo más bonito que me llevo de este Centro de investigación. Muchas gracias por ser ese apoyo en todo el tiempo que estuve en mi maestría, todos deberían tener un director de tesis tan lindo como usted y el cual nos inspiré hacer siempre más y más principalmente enamorarnos de las cosas que hacemos y nos gustan como un niño. Gracias Doctor Jesus.

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	6
ÍNDICE DE FIGURAS	7
RESUMEN	¡Error! Marcador no definido.
1 INTRODUCCION	¡Error! Marcador no definido.
1.1 Bacterias	¡Error! Marcador no definido.1
1.2 Microorganismos responsables del reciclaje natural..	¡Error! Marcador no definido.1
1.3 Microorganismos productores de H2	¡Error! Marcador no definido.2
1.4 Industria tequilera en México	¡Error! Marcador no definido.4
1.5 Identificación de bacterias.....	¡Error! Marcador no definido.5
1.6 Metodos microbiologicos tradicionales.....	¡Error! Marcador no definido.5
1.7 Métodos genómicos (basados en ácidos nucleicos) ...	¡Error! Marcador no definido.6
1.8 Metodos espectroscópicos	16
1.9 Superficie amplificada de espectroscopia Raman.....	18
1.10 Componente química	18
1.11 Componente electromagnética.....	19
1.12 Vibraciones moleculares y grado de libertad	19
1.13 Antecedentes de estudios previos	20
1.14 Estructuras químicas y composición de las células microbianas.....	21
1.15 Espectroscopia Raman	23
1.16 Descripción del efecto Raman	24
1.17 Ruidos en espectroscopia Raman	26
1.18 Ruido de disparo.....	27
1.19 Ruido generado por la muestra	27
1.20 Ruido generado por la instrumentación	28
1.21 Ruido computacional	28
1.22 Ruido generado por fuentes externas.....	28
2 JUSTIFICACION	¡Error! Marcador no definido.1
3 HIPOTESIS Y OBJETIVOS	¡Error! Marcador no definido.
3.1 Hipotesis	¡Error! Marcador no definido.2

3.2	Objetivo general	¡Error! Marcador no definido.2
3.3	Objetivos particulares.....	¡Error! Marcador no definido.2
4	METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	¡Error! Marcador no definido.3
4.1	Bacterias.	¡Error! Marcador no definido.3
4.2	Activación de cepas ATCC.....	¡Error! Marcador no definido.3
4.3	Preparación de bacterias para medición con espectroscopia Raman. ¡Error! Marcador no definido.3	
4.4	Cantidad total de la suspensión.....	¡Error! Marcador no definido.3
4.5	Preparación de nanoparticulas de plata.....	¡Error! Marcador no definido.4
4.6	Sustratos Klarite	¡Error! Marcador no definido.4
4.7	Arreglo experimental	¡Error! Marcador no definido.5
4.7.1	Espectroscopia Raman	¡Error! Marcador no definido.5
4.7.2	Microscopia Raman	¡Error! Marcador no definido.6
4.7.3	Análisis de espectros Raman	37
4.7.4	Pre procesamiento de datos para el análisis estadístico	37
4.7.5	Corrección de la línea base y normalización	39
4.7.6	Suavizado	40
4.7.7	Variación normal estandar	40
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	42
6	CONCLUSIONES	59
7	REFERENCIAS	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Bandas Raman Observadas en Espectros de Células Bacterianas Individuales y Asignación Tentativa.....	22
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de Jablonski.....	25
Figura 2. Tipos de ruidos en espectroscopia Raman.....	29
Figura 3. Bandas Raman y fluorescencia de fondo.....	30
Figura 4. Arreglo experimental Raman.....	
Figura 5. Microscopio Raman.....	
Figura 6. Espectros Raman sin procesar de la cepa <i>C. Beijerinckii</i> con dilución 1:1 y usando sustrato comercia Klarite.....	
Figura 7. Espectros Raman sin procesar de la cepa <i>C. Pasteurianum</i> con dilución 1:1 y 1:100 en un sustrato comercial CaF ₂	
Figura 8. Espectros Raman sin procesar de la cepa <i>C. Beijerinckii</i> con dilución 1:1 y 1:100 en sustrato comercial Caf ₂	
Figura 9. Espectro Raman sin procesar de la cepa <i>C. Pasteurianum</i> con dilución 1:1 y 1:100 en un sustrato comercial CaF ₂	
Figura 10. Corrección de la fluorescencia de fondo del espectro Raman de <i>C. Beijerinckii</i> ...	
Figura 11. Corrección de la fluorescencia de fondo del espectro Raman de <i>C. Pasteurianum</i>	
Figura 12. Espectros Raman si procesar de <i>C. pasteurianum</i> en 3 diferentes diluciones.	
Figura 13. Corrección de la fluorescencia de fondo de la dilución 1:10 de <i>C. pasteurianum</i> .	
Figura 14. Corrección de la fluorescencia de fondo de la dilución 1:100 de <i>C. pasteurianum</i> .	
Figura 15. Corrección de la fluorescencia de fondo de la dilución 1:1 de <i>C. pasteurianum</i> .	

Figura 16. Espectro de *Clostridium pasteurianum* tomado con microscopio Raman en un sustrato comercial con mezcla de oro y plata de oceanoptics en diferentes puntos de la muestra los cuales muestran homogeneidad.

Figura 17. Espectro de *Clostridium beijerinckii* tomado con microscopio Raman en un sustrato comercial con mezcla de oro y plata de oceanoptics en diferentes puntos de la muestra los cuales muestran homogeneidad.

Figura 18. Espectro de *Clostridium pasteurianum* tomado con microscopio Raman con objetivo de 40X en un sustrato comercial con mezcla de oro y plata Klarite® en diferentes puntos de la muestra los cuales muestran homogeneidad las bandas Raman.....

Figura 19. Espectro de *Clostridium beijerinckii* tomado con microscopio Raman con objetivo de 80X en un sustrato comercial con mezcla de oro y plata Klarite® en diferentes puntos de la muestra los cuales muestran homogeneidad las bandas Raman y un espectro del sustrato comercial Klarite.....

Figura 20. Espectro de *Clostridium pasteurianum* tomado con microscopio Raman con objetivo de 80X y un objetivo de 40 X en un sustrato comercial con mezcla de oro y plata Klarite® en diferentes puntos de la muestra los cuales muestran homogeneidad las bandas Raman en los dos diferentes objetivos.....

Figura 21. Espectro de *Clostridium pasteurianum* tomado con microscopio Raman con objetivo de 80x (con corrección de línea base y eliminación de fluorescencia) en un sustrato comercial con mezcla de oro y plata Klarite en diferentes puntos de la muestra los cuales muestran homogeneidad las bandas Raman.....

Figura 22. Espectros de *Clostridium beijerinckii* y *Clostridium pasteurianum* tomado con microscopio Raman con objetivo de 80X en un sustrato comercial con mezcla de oro y plata Klarite®

Figura 23. Espectro de *Clostridium beijerinckii* tomado con microscopio Raman con objetivo de 80X en un sustrato comercial con mezcla de oro y plata Klarite®.....

Figura 24. Espectro de *Clostridium pasteurianum* tomado con microscopio Raman con objetivo de 80X en un sustrato comercial con mezcla de oro y plata Klarite®.....

RESUMEN

Durante el proceso de acidogénesis de vinazas tequileras los microorganismos identificados y estudiados que se han encontrado en mayor cantidad pertenecen al género *Clostridium*. *Clostridium pasteurianum* y *Clostridium beijerinckii*, son reconocidos como unos de los mayores productores de hidrógeno y presentan oportunidad de optimizar los procesos destinados a la producción de diferentes metabolitos (butanol, ácidos grasos volátiles, hidrógeno, disolventes). Nuestro objetivo es utilizar la técnica más adecuada de la espectroscopia Raman para caracterizar estas especies de *Clostridium*. Los mejores resultados se obtuvieron al utilizar un microscopio Raman y el Esparcimiento Raman de Superficie Amplificada (SERS). Suspensiones celulares de *C. pasteurianum* se colocaron sobre un sustrato comercial (Klarite®) activo con nanopartículas de oro. Los espectros Raman de células individuales se obtuvieron utilizando un microscopio Raman IDRaman micro (Ocean Optics, Dunedin, FL, USA). El haz del láser se enfocó en las células individuales a través del objetivo del microscopio. Se obtuvieron espectros con buena relación señal / ruido. Las dos diferentes bacterias mostraron diferentes espectros. Varios componentes celulares pudieron ser detectados y variados en cantidad de acuerdo a las intensidades de los picos Raman. En comparación con otros métodos para el análisis de células individuales, este método es mucho más rápido, y se obtiene una gran cantidad de información química de las células individuales de una manera no destructiva y no invasiva. Se utilizó un método polinomial de ajuste de curvas para sustraer la fluorescencia de fondo subyacente en los espectros Raman originales. La microscopia Raman mostró ser un método adecuado para estudiar las dos bacterias del género *Clostridium*.

1. INTRODUCCION

1.1 Bacterias

Las bacterias son organismos procarióticos unicelulares que tienen una única molécula de ADN representando el núcleo sin membrana que delimita el núcleo. Las bacterias están extendidas por todas partes alrededor de nosotros, en el aire, el agua, la comida, el suelo y en todos los cuerpos vivos. A pesar de que la palabra bacteria está conectada con enfermedades infecciosas; la gran mayoría de las bacterias no afectan la salud humana a través de una interacción con nuestro sistema inmunológico. En realidad, algunos de ellos son importantes para la vida humana, la industria alimentaria, la agricultura y la biotecnología. Por ejemplo, ciertos tipos de bacterias como *Escherichia coli* son esenciales para la digestión de los alimentos, algunos se utilizan para preparar y conservar los alimentos, mientras que otros llamados descomponedores son responsables de la descomposición de los desechos. Dado que las bacterias tienen un impacto significativo en nuestra vida de diferentes maneras, debemos pensar en cómo podemos detectar y caracterizar estos microorganismos y controlar sus actividades para evitar sus amenazas. [1]

1.2 Microorganismos responsables del reciclaje natural

Los microorganismos son responsables para el reciclaje natural de un número de elementos químicos presentes en la biosfera. El reciclaje, se produce en una escala masiva y es particularmente importante en lo que se refiere a nitrógeno, carbono, azufre, oxígeno, e hidrógeno. Se utilizan estos elementos, de una forma u otra, en los procesos biosintéticos y bioenergéticos, tanto aeróbico y microorganismos anaerobios. [2]

La eficiencia en la degradación de la materia orgánica dentro de algunos ecosistemas anaerobios, depende de las interacciones metabólicas entre los microorganismos que lo habitan. El hidrogeno junto con el CO₂, son reutilizados por las bacterias acetogénicas, metanogénicas y sulfato-reductoras, constituyéndose en recicladores finales de este producto de fermentación. [2]

Existen 3 grupos microbianos que han sido estudiados en la producción de hidrógeno, el primer grupo consiste en las cianobacterias, que son bacterias autótrofas y descomponen directamente el agua en hidrógeno y en oxígeno en la presencia de energía de la luz, en la fotosíntesis. El segundo y tercer grupo de bacterias son heterótrofos y necesitan de sustratos orgánicos como fuente de carbono para la producción de hidrogeno. Estos organismos son capaces de producir hidrógeno en condiciones anaerobias, tanto con presencia de luz como en ausencia de energía de la luz ^[22]. Los tres grupos bacterianos que reciclan el hidrogeno, difieren en sus vías metabólicas, las bacterias metanogénicas lo utilizan para reducir el CO₂ y metano, las bacterias sulfato-reductoras lo usan para reducir sulfatos y producir sulfuros y las bacterias acetogénicas reducen CO₂ y producen acetato. [3]

1.3 Microorganismos productores de H₂

Los microorganismos que producen hidrógeno en un proceso de fermentación anaerobia se pueden clasificar principalmente en dos categorías, los anaerobios fermentativos (o bacterias entéricas, por ejemplo., *Escherichia coli*, *Enterobacter* y *Citrobacter*), y anaerobias estrictas (*Clostridios*, *Methylotraphs*, Bacterias metanogénicas, bacterias del rumen). Estos microbios pueden coexistir en un entorno de cultivo mixto y su abundancia se rige por la competitividad relativa de los sustratos disponibles y las condiciones ambientales. [3]

A causa del agotamiento de las fuentes de energía derivadas del petróleo y a la búsqueda de tecnologías más limpias es de interés mundial la investigación y desarrollo de combustibles renovables. Entre éstos el hidrógeno promete ser la base de la futura matriz energética ya que su utilización no genera problemas de emisión de gases de efecto invernadero. Una de las formas de producir hidrógeno es utilizando bacterias anaeróbicas que fermentan sustratos ricos en carbohidratos dando como productos finales H₂, CO₂ y ácidos grasos volátiles. Mediante este proceso es posible obtener un producto con valor agregado a partir de materia orgánica de desechos (por ejemplo, de efluentes industriales ricos en carbohidratos). [4]

Los sistemas biológicos producen H_2 de diversas maneras, entre ellas están la biofotólisis directa, biofotólisis indirecta, foto-fermentaciones y fermentaciones. Las fermentaciones para la producción de H_2 pueden ser llevadas a cabo por una variedad de microorganismos, tanto en cultivos puros como mixtos. Estas fermentaciones permiten la producción de Bio- H_2 mediante procesos relativamente sencillos, a partir de un amplio rango de sustratos potencialmente utilizables, entre ellos destacan los desechos orgánicos de diversas fuentes. [4]

En los sistemas anaerobios de tratamiento de aguas y bajo ciertas condiciones hidráulicas, este consorcio se agrega en lo que se conoce como lodos granulares. Esta agregación ofrece ventajas en la operación en estos sistemas de tratamiento, los polímeros orgánicos son hidrolizados hasta monómeros gracias a la acción de bacterias fermentativas, las cuales también fermentan a los monómeros dando como productos una mezcla de ácidos orgánicos de bajo peso molecular y alcoholes, para después ser oxidados hasta convertirse en ácido acético, por la acción de bacterias acetogénicas que a la par producen H_2 , en un proceso denominado acetogénesis o acidogénesis [23]. El hidrogeno se puede producir en forma sustentable por bacterias anaeróbicas que crecen en la oscuridad con sustratos ricos en carbohidratos dando como productos finales H_2 , CO_2 y ácidos grasos volátiles. Se ha encontrado que la mayoría de bacterias productoras de hidrógeno pertenecen al género *Clostridium*. Pero aún tenemos un gran desafío para poder diseñar sistemas eficientes y sustentables de producción de hidrógeno por fermentación oscura es por lo tanto manipular la cadena anaeróbica de manera de favorecer los procesos de producción de hidrógeno y eliminar a los consumidores de hidrógeno, así como a aquellos microorganismos que compiten por el sustrato. [5]

Debido a la degradación ambiental que sufre nuestro planeta a nivel mundial, causada por el uso intensivo de combustibles fósiles como el carbón, gasolina, petróleo, entre otros, se busca reemplazar a dichos combustibles de una manera gradual, con fuentes de energía renovables sostenibles.

A causa de la creciente crisis energética, el creciente costo del combustible y preocupaciones ambientales que se han venido generando, es importante la exploración de fuentes alternativas de

energía. El hidrógeno es un portador de energía alternativa, el cual puede ser productor de energía renovable a partir de materias primas nacionales, como los desechos orgánicos, azúcares derivados de biomasa y aguas residuales. [5]

Recientemente se ha observado que existe la posibilidad de emplear procesos anaerobios para la producción de hidrógeno, sin llegar a la transformación de la materia orgánica hasta la producción de metano. [6]

En la actualidad el hidrógeno es considerado como una solución para reducir el uso de los combustibles fósiles, utilizando un combustible con el cual se puedan eliminar las emisiones de contaminantes a la atmósfera. Este combustible no contribuye a la generación de efecto invernadero, ya que, al utilizarlo en pilas de combustible para generar electricidad, solo se producen agua y calor como subproductos, y no se generan gases de efecto invernadero. Además, presenta un alto poder calorífico (122 kJ/g), el valor energético de un kg de hidrógeno es equivalente al de 2.4 kg de metano o 2.75 veces más alto que el de los hidrocarburos. [4,5]

1.4 Industria tequilera en México

Debido a las exigencias de sostenibilidad, la producción de tequila es una de las actividades en donde se necesita adaptar sus tecnologías de producción para reducir el impacto industrial.

En México principalmente en el estado de Jalisco, la industria del tequila es conocida mundialmente, debido a su incremento continuo, el cual brinda importantes beneficios económicos e ingresos a la industria. Una fábrica típica de tequila produce de 7 a 10 L de vinazas por litro de tequila a 55°G.L. En el año 2015 las fábricas de tequila generaron alrededor de 248.3 millones de litros de tequila. Estas aguas residuales con pH menor a 3.9 y una demanda biológica de oxígeno de 25 a 60 g L⁻¹, representan para la industria del tequila un grave problema de tratamiento [6].

Las vinazas son el residuo líquido que permanece en el fondo del alambique después de la destilación del mosto fermentado del agave y son generadas en altas cantidades por las industrias tequileras. [7]

Se han encontrado hallazgos relevantes para el campo de la biotecnología desde acido-génesis producida por una vía fermentativa por vinazas de tequila hasta identificación de microorganismos. En el 2015, se reportó que los microorganismos ácido-tolerantes identificados en la acidogénesis de vinazas de tequila fueron asociados exclusivamente al género *Clostridium*. [8,9].

Por muchas décadas, las técnicas tradicionales para identificar y caracterizar bacterias han sido, las técnicas microbiológicas y biología molecular las cuales han sido bien estudiadas y aplicadas con éxito. Sin embargo, son métodos destructivos, laboriosos, de altos costos y producen residuos de contaminantes químicos, por lo que carecen de factibilidad para su utilización no destructiva y no invasiva en bacterias. Debido a estas limitaciones, y con la introducción del láser que ha impulsado todo el campo de la espectroscopia, se han desarrollado nuevas técnicas espectroscópicas tales como la Fluorescencia Inducida por Láser (LIF: por sus siglas en inglés) y la espectroscopia Raman, como herramientas muy útiles en el análisis de microorganismos para la identificación no destructiva de una gran variedad de bacterias.

1.5 Identificación de bacterias

La detección y la identificación de bacterias son de gran importancia en la medicina clínica, la inocuidad de los alimentos y el control de la contaminación del agua. Se han establecido muchos métodos para la identificación bacteriana. [10]

1.6 Métodos microbiológicos tradicionales

Los métodos tradicionales de identificación bacteriana dependen del cultivo de bacterias de una cultura pura. Mediante la determinación de la respuesta de las bacterias a las condiciones de crecimiento ambiental tales como los medios nutricionales requeridos o el valor de pH de los medios y comparando sus características con organismos conocidos. La muestra se cultiva a menudo en medios de nutrición de agar diferentes y luego se realiza una medición de recuento viable contando el número de colonias visibles en cada medio. Para identificar las bacterias, muchas otras pruebas se

realizan a menudo tales como la reacción de tinción de Gram, las pruebas de morfología y las pruebas de motilidad. Estas medidas consumen mucho tiempo (pueden tardar algunos días en depender del tiempo necesario para cultivar la muestra) y laboriosas con una exactitud limitada ya que las bacterias que no se cultivan no se cuentan. [10]

1.7 Métodos genómicos (basados en ácidos nucleicos)

En estas técnicas, la clasificación de bacterias se basa en la búsqueda de similitudes entre el ADN de dos bacterias diferentes (hibridación ADN-ADN) o mediante la determinación de las secuencias de nucleótidos bacterianos y su comparación con secuencias conocidas en una base de datos; estos procesos se llaman análisis de secuencia de ADN ribosomal (16S rDNA) y ribosomal ARN (16S rRNA). La hibridación ADN-ADN se utiliza principalmente para la clasificación de bacterias a nivel de especie, [11] donde la relación entre los organismos se determina por el grado de su hibridación de ADN. Dos cepas diferentes caerán en la misma especie si su valor de hibridación es más del 70% [9].

También se ha utilizado un proceso denominado reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para caracterizar bacterias copiando una secuencia de nucleótidos de ADN de millones de copias en horas. [11]. La PCR es útil para detectar bacterias que son difíciles de cultivar in vitro. Este método no es tan lento, pero requiere muchos procesos previos.

1.8 Métodos espectroscópicos

Nuevos enfoques de la identificación bacteriana se han considerado recientemente debido a la aumentando las necesidades de identificación rápida y precisa de bacterias (sin mucho trabajo y sin la necesidad de un especialista). La espectrometría de masas (MS) ha sido exitosa en la comparación inter-cepas de varias muestras de bacterias clínicas²⁷. También se ha utilizado la técnica de espectrometría de masas de tiempo de vuelo de desorción / ionización asistida por matriz (MALDI-TOF-MS) identificación de bacterias. [12] Esta técnica proporciona mediciones altamente

reproducibles sin trabajo laborioso, pero es un método destructivo y costoso. Recientemente, la espectroscopia de rotura inducida por láser (LIBS) se ha utilizado para la identificación y clasificación bacteriana rápida y para estudiar la actividad metabólica de las bacterias [12]. Similar a la espectroscopia Raman, LIBS es una espectroscopia láser totalmente óptica que puede proporcionar una huella digital única de bacterias basado en sus composiciones atómicas.

Las técnicas espectroscópicas de vibración, infrarrojo (IR) y espectroscopia Raman (RS), se han utilizado ampliamente para identificar muestras bacterianas mediante una cuidadosa investigación de los modos vibratorios de las moléculas en las bacterias. Recientemente, se ha aceptado la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) para la caracterización de microorganismos en la que una luz infrarroja es absorbida por la muestra bacteriana cuando su frecuencia coincide con la frecuencia vibratoria natural de las moléculas de muestra. [12]

La radiación absorbida puede ser detectada y transformada en un espectro usando la matemática transformada de Fourier. Este proceso ocurrirá sólo si hay un cambio neto en el momento dipolar de las moléculas. La espectroscopia Raman se utiliza para caracterizar las bacterias a través de la interacción de la luz coherente y las moléculas de la muestra. Esta interacción es diferente de la de la espectroscopia IR. En Raman, un haz intenso de láser en la región visible o infrarroja o ultravioleta se centra en la muestra y se detecta el haz de esparcimiento para obtener información valiosa sobre los modos de vibración de las moléculas de la muestra. [13] En general, estos métodos son no invasivos y no destructivos y se ha demostrado que proporcionan una rica información de bacterias en el nivel de cepa con menos tiempo y mínimo esfuerzo.

La espectroscopia Raman basada en láser presenta una alternativa rápida, libre de reactivos y no destructiva para el análisis de sistemas de biología celular y, en particular, de células vivas individuales. La espectroscopia vibracional moderna se ha convertido en una poderosa herramienta para la investigación biomédica. [14] La extensión de las tecnologías de microsonda y fibra óptica a la espectroscopía, así como las mejoras en la tecnología del filtros ópticos y la sensibilidad del

detector, han facilitado la aplicación generalizada de la espectroscopía vibracional al estudio de muestras biológicas (proteínas, células y tejidos).

1.9 Superficie amplificada de espectroscopia Raman (SERS por sus siglas en inglés)

La espectroscopia Raman es más adecuada para el estudio de células, ya que los espectros de medios acuosos demuestran sólo una mínima interferencia del agua. Sin embargo tiene una señal muy baja y cuando se tienen bajas concentraciones en las muestras es necesario aumentar el límite de detección y para esto se puede aplicar la técnica de superficie amplificada de espectroscopia Raman (SERS por sus siglas en inglés) esta es una poderosa técnica de espectroscopia vibracional que permite detectar la estructura molecular de analitos a muy bajas concentraciones mediante la amplificación de campos electromagnéticos por medio de la excitación de plasmones de superficie localizados. Las señales Raman se pueden mejorar en más de un millón de veces cuando las moléculas se unen a nanoestructuras metálicas (típicamente Au, Ag, Cu, Pt o Pd), que permiten que el esparcimiento Raman tenga lugar en campos ópticos locales de estas estructuras Debido a "mejora del campo electromagnético" y "mejora química" de las señales [13,14]. Esta técnica ha evolucionado desde la detección de sustancias en sistemas sobre superficies metálicas rugosas hasta estudios mucho más sofisticados que permiten la detección de moléculas individuales lo que permite que pueda ser utilizada como una herramienta de diagnóstico in situ o para la detección de sustancias y compuestos de cualquier tipo empleando un sustrato SERS o bien el empleo de nanoestructuras metálicas [14].

1. 10 Componente química

La componente química se llama de esta manera porque cuando una molécula esta químicamente unida a un metal sus niveles electrónicos pueden verse modificados por dicha unión, haciendo que las transiciones electrónicas sean distintas a las esperadas para una molécula aislada, y por lo tanto puedan aparecer resonancias Raman para energías donde no se esperaban [12].

1.11 Componente electromagnética

La amplificación electromagnética se basa en que cuando la energía del fotón incidente (o saliente) coincide con la energía de algún plasmón, el campo eléctrico aumenta en las cercanías de la superficie del metal. El aumento del campo eléctrico es equivalente a un aumento en la cantidad de fotones, aumentando de esta manera el número de interacciones Raman y en consecuencia aumentando la intensidad Raman. [13]

1.12 Vibraciones moleculares y grados de libertad

Dentro de los diversos grados de libertad que presenta una molécula, elemento o átomo están los grados de libertad relacionados a las vibraciones, dichas vibraciones en la mayoría de los casos son características específicas y únicas de la molécula. Esto se debe a las diversas posibilidades existentes entre los posibles enlaces que componen la molécula, así como la estructura cristalina en caso de materiales con un grado alto de simetría. Uno de los ejemplos característicos de los tipos de vibraciones lo entrega la molécula de H₂O, en esta se presentan cinco grupos fundamentales de vibración: simétrico, anti-simétrico y balanceo en el plano y tijereteo en plano. Esta característica vibracional de las moléculas y materiales, así como sus otros grados de libertad, permite definir la energía total del sistema como la suma de la energía vibracional (referente a los modos vibracionales), energía rotacional y energía electrónica. En este orden de ideas, cuando un fotón viaja a través de un material cabe la posibilidad de que este interactúe con dicho material a través de un proceso de absorción o esparcimiento, en donde este último proceso puede ser elástico o inelástico. Así que en la dispersión puede no haber transferencia de energía neta entre el fotón y el material y la longitud de onda se mantendrá fija, mientras por otro lado existe transferencia de energía neta entre el fotón y el material y se genera un cambio en la longitud de onda de la luz respecto a la que entro; esto sucede para la dispersión elástica e inelástica respectivamente.

1.13 Antecedentes de estudios previos

En otro trabajo que fue realizado para obtener una identificación de microorganismos por medio de Espectroscopia micro-Raman, en el cual nos dan a conocer que, las técnicas más comunes que se utilizan para la evaluación morfológica en combinación con pruebas específicas tradicionales para conocer la capacidad de los microorganismos para crecer en diferentes medios pueden tomar hasta 72 horas lo cual es un proceso largo, lo cual es un problema para la ciencia médica y biológica y también en números procesos industriales. Ya que la identificación se debe realizar en un corto tiempo y con menos esfuerzo para la reproducción de microorganismos (una sola célula), lo cual nos daría un resultado más rápido y preciso. Las técnicas espectroscópicas vibracional como IR espectroscopia en combinación con técnicas quimiométricas y Raman, permiten una identificación específica y rápida de microorganismos [13].

Huang et al. Han llevado a cabo un análisis microscópico de Raman de células microbianas individuales y demostraron la utilidad de este enfoque en la discriminación de especies de bacterias.50 En su estudio utilizaron siete especies diferentes de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Los espectros Raman obtenidos de las siete especies de bacterias parecen tener características similares con algunas diferencias en la intensidad de algunos picos. Con el fin de averiguar si la espectroscopia Raman podría discriminar entre los siete espectros, se utilizaron las técnicas estadísticas multivariantes de PCA, DFA y HCA. Se observó que la espectroscopia Raman tiene el potencial de discriminar entre aquellas especies de bacterias usando solamente su espectro Raman de célula única que representa una "huella espectral". [14]

Dragana, 2014 evaluó el uso de Raman micro espectroscopia en células bacterianas individuales, combinados con la quimiometría para clasificación y la identificación de las especies de Legionella relacionados con enfermedades humanas y otros patógenos acuáticos comunes. Con el fin de desarrollar un esquema de identificación rápida para diversas especies de Legionella patogénicas en función de Raman micro-espectroscopia, nos muestra que la identificación de microorganismos por

medio de enfoques espectroscópicos como espectroscopia vibracional o la masa, son utilizadas bastante en la actualidad con información confiable. Existen otros métodos espectroscópicos como MALDI-TOF-MS e IR, requieren de una gran cantidad de masa de células y cultivo en condiciones controladas. Por el contrario, con las técnicas de espectroscopia Raman, ofrecen posibilidad de identificar bacterias en el nivel de una sola célula mediante el análisis de las huellas digitales espectroscópicas que son únicas de cada célula bacteriana [18].

Jarvis y Goodacre utilizaron espectroscopia Raman de superficie mejorada (SERS) para una rápida diferenciación entre las bacterias que causan infecciones del tracto urinario (UTI). Se aislaron las bacterias de las IU y se cultivaron durante 16 horas en una base de agar sangre LabM, plata coloidal y manchada en un sustrato CaF₂ hasta que se secó para estar listo para las mediciones SERS. PCA seguido de DFA se utilizaron repetidamente para analizar los datos SERS. Para mejorar la discriminación entre los grupos, también se utilizó HCA. [19,20]

1.14 Estructuras químicas y composición de las células microbianas

Los espectros Raman proporcionan una gran cantidad de información sobre la composición química de una célula, la cual puede ser usada para identificar confiablemente principales macromoléculas, tales como ácidos nucleicos, proteínas, carbohidratos y lípidos. Se ha reportado que al utilizar un microscopio Raman confocal y usando excitación a 632.8 nm. Se obtuvieron espectros Raman convencionales de células bacterianas individuales de la bacteria anaerobia *Clostridium beijerinckii*. Tales espectros dan una visión global de todos los componentes principales de la célula a la vez, varias bandas interesantes aparecen en el espectro. Algunas atribuciones tentativas se enumeran en detalle en la Tabla 1. La mayoría de las bandas corresponden a grupos funcionales en los constituyentes principales de una célula microbiana, proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos. Algunos son más específicos para los compuestos moleculares más pequeños, como la banda muy característica de la fenilalanina a 1001 cm⁻¹, que está presente en todas las muestras que contienen proteínas, y la glucosa (407 cm⁻¹). Por lo tanto, los espectros Raman obtenidos contienen

información multidimensional sobre la presencia y abundancia relativa de todos los componentes celulares principales, sin agregar reactivos químicos para marcar específicamente estos componentes [22].

Tabla 1. Bandas Raman Observadas en Espectros de Células Bacterianas Individuales y Asignación Tentativa

band or band range (cm ⁻¹)	assigned to ^a
407	skeletal modes of carbohydrates (glucose)
481	skeletal modes of carbohydrates (starch)
530–540	δ (C–O–C) glycosidic ring
550 range	glass background
778–782	nucleic acids (cytidine, uracil)
810–820	nucleic acids (C–O–P–O–C in RNA backbone)
830, 850	tyrosine (in proteins)
1004	phenylalanine (in proteins)
1030–1130	carbohydrates, mainly –C–C– (skeletal), C–O, δ (C–O–H)
1100 range	glass background
~1130	=C–C= (unsatd fatty acids in lipids)
1249	N–H, C–N
1220–1290	amide III random
~1320	protein (amide III); δ(CH)
~1450	δ(CH ₂)
1573	C=C; δ (N–H) and ν (C–N) (amide II)
1660–1670	amide I

^a ν, stretching vibration; δ, deformation vibration. ^b Our measurements.

1.15 Espectroscopia Raman

La espectroscopia Raman es ampliamente utilizada en estudios biológicos. Esta técnica posee características que son sustentables en el estudio de microorganismos, además de proveer información detallada acerca de la composición y estructura química de las bacterias, también, debido a que las vibraciones moleculares son directamente influenciadas por el microambiente de los grupos funcionales, el espectro vibracional provee información de las interacciones moleculares. Por lo tanto,

este tipo de información se puede obtener de manera completamente no invasiva tal que el espectro Raman puede ser tomado directamente de muestras sin abrir.

La espectroscopia Raman es una técnica fotónica de alta resolución que proporciona en pocos segundos información química y estructural de casi cualquier material ya sea compuesto orgánico o inorgánico permitiéndole a si su identificación. La espectroscopia Raman está basada en el fenómeno de esparcimiento inelástico [21]. Esta es una de las técnicas más utilizadas en química en la identificación de moléculas. En esta técnica se usa una fuente monocromática de radiación para producir esparcimiento elástico e inelástico de una muestra.

La radiación incidente interactúa con la materia y polariza (cambios de energía) los orbitales de las moléculas o átomos de la muestra, esta radiación crea un nuevo estado llamado estado virtual. Como este nivel de energía no es un estado estable, se re-mite un fotón rápidamente. En este proceso se presenta dos tipos de esparcimiento, esparcimiento elástico conocida como el esparcimiento Rayleigh y esparcimiento inelástico conocido como esparcimiento Raman. [22] El proceso más probable es el esparcimiento Rayleigh y no cambia de energía de la radiación remitida. Una pequeña parte de la radiación re-emitida a diferente energía es debido al esparcimiento inelástico, dicha radiación es conocida como esparcimiento Raman. En este caso, el proceso de esparcimiento induce movimiento molecular y, con esto, se puede presentar un intercambio de energía de fotón a molécula o átomo y viceversa. El esparcimiento Raman es un proceso débil y solo de 1 de 10⁶ fotones incidentes son esparcidos de forma inelástica. [23]

1.16 Descripción del efecto Raman

El análisis mediante espectroscopia Raman se basa en hacer incidir un haz de luz monocromática de frecuencia ν_0 sobre una muestra cuyas características moleculares se desean determinar, y examinar la luz esparcida por dicha muestra. [25] La mayor parte de la luz esparcida presenta la misma

frecuencia que la luz incidente pero una fracción muy pequeña presenta un cambio en frecuencia, resultado de la interacción de la luz con la materia. La luz que mantiene la misma frecuencia ν_0 que la luz incidente se conoce como esparcimiento Rayleigh y no aporta ninguna información sobre la composición de la muestra analizada. La luz esparcida que presenta frecuencias distintas a la de radiación incidente se le conoce como esparcimiento Raman, y es la que proporciona información sobre la composición molecular de la muestra. Las nuevas frecuencias $+\nu_r$ y $-\nu_r$, son las frecuencias Raman, características de la naturaleza química y el estado físico de la muestra e independientes de la radiación incidente. [26]

Las variaciones de frecuencia observadas en el fenómeno de esparcimiento Raman, son equivalentes a vibraciones de energía. Los iones y átomos enlazados, químicamente para formar moléculas y redes cristalinas, están sometidos a constantes movimientos vibracionales y rotacionales. Como podemos observar en la siguiente figura de un diagrama energético en el que cada estado de energía se representa por una línea horizontal y se le conoce como diagrama de Jablonski. [27]

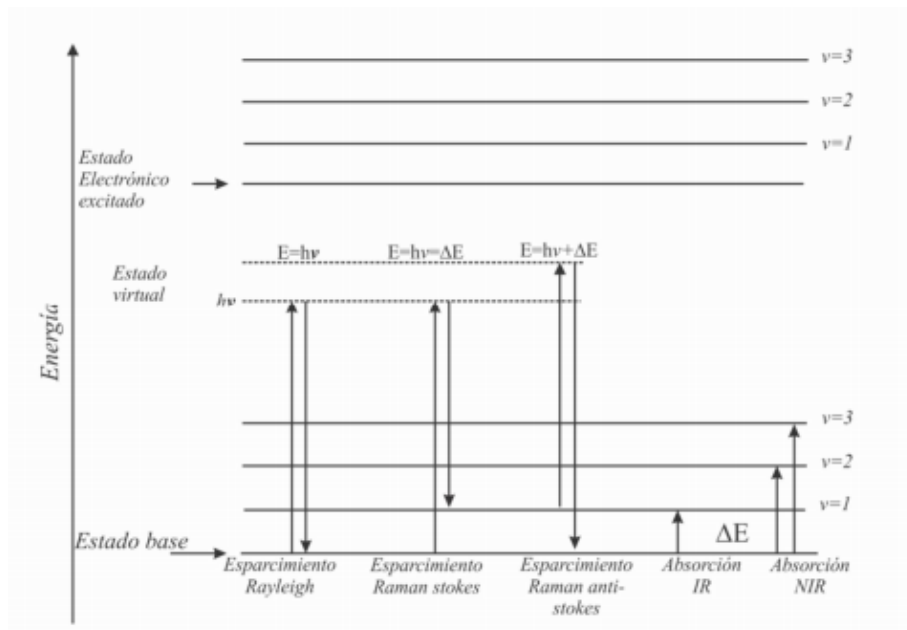


Figura 1. Diagrama de Jablonski

Los diferentes tipos de frecuencia que se observan en la figura anterior son debido al fenómeno de esparcimiento Raman, y son equivalentes a variaciones de energía. A cada tipo de movimientos vibracionales y rotacionales de una molécula corresponde a un valor determinado de la energía molecular. En la figura se muestra un diagrama energético en donde se representa cada estado de energía con una línea horizontal. [28]

Si la interacción fotón-molécula es un fotón esparcido a la misma frecuencia que el fotón incidente, es un choque elástico ya que ni el fotón ni tampoco la molécula sufren variaciones en su estado energético, la molécula regresa al nivel de energía que tenía antes del choque y el fotón esparcido tiene la misma frecuencia que el incidente, a lo que se le llama esparcimiento Rayleigh.

Si la interacción fotón-molécula es un fotón esparcido a una frecuencia diferente del incidente, es un choque inelástico, donde hay una transferencia de energía entre el fotón y la molécula, se dan dos casos:

Si el fotón esparcido tiene una frecuencia menor a la del incidente, se produce una transferencia de energía del fotón a la molécula y después salta a un estado de energía no permitido, vuelve a uno permitido mayor al que tenía inicialmente, se le llama esparcimiento Raman Stokes;

En cambio sí el fotón esparcido tiene una frecuencia mayor a la de incidente, se produce una transferencia de energía de la molécula al fotón, la molécula inicialmente antes del choque no se encontraba en su estado vibracional fundamental si no que, estaba en uno de mayor energía y después del choque paso a este estado; se le conoce como esparcimiento Raman anti-Stokes.

El espectro Raman está formado por una banda principal o Rayleigh y dos series de bandas secundarias correspondientes a las bandas Raman Stokes y anti-Stokes, que están situadas simétricamente a ambos lados de la banda Rayleigh. (29]

1.17 Ruidos en espectroscopia Raman.

La calidad de la información que puede ser extraída del espectro Raman, depende no solo de la señal Raman, sino que también del ruido. Uno de los problemas inherentes a la adquisición de cualquier señal es el ruido presente en la medición, en el caso de la obtención de espectros Raman los ruidos más habituales pueden ser clasificados en cinco grupos: ruido de disparo, ruido generado por la muestra, ruido por la instrumentación, ruido computacional y ruido generado por fuentes externas (30).

El ruido es la información indeseada debido a la electrónica del instrumento, la respuesta sin conexión lógica y eventos aleatorios. De tal manera que el ruido es tan solo un nombre que adjudicamos a aquellas señales que no nos interesan.

1.18 Ruido de disparo (Shot noise)

El ruido de disparo es una fuente de ruido inevitable en la medición de espectros Raman, es causado por la naturaleza de la luz, si la intensidad de la luz, en fotones por segundo es repetidamente medida por un perfecto detector libre de ruido, la desviación estándar de número de fotones por segundo detectados será igual a la raíz cuadrada de este número de fotones. [30]

Es un tipo de ruido electrónico que tiene lugar cuando el número de finito de partículas que transportan energía, tales como los electrones en un circuito electrónico o los fotones en un dispositivo óptico, es suficientemente pequeño para dar lugar a la aparición de fluctuaciones estadísticas apreciables en una medición. .

1.19 Ruido generado por la muestra

El ruido generado por la muestra incluye emisiones ópticas que no son deseadas y generadas por la propia muestra como es el caso de la fluorescencia, fenómeno que se produce si, al incidir un fotón sobre una molécula, este es absorbido y la molécula pasa un estado electrónico excitado pero de menor energía liberando un fotón de frecuencia más baja que el incidente (46). En la toma de espectros Raman la fluorescencia suele presentarse en forma de una suave curvatura de la línea de base y puede alcanzar una intensidad que llegue a enmascarar por completo la intensidad de las bandas Raman. Este ruido también presenta cambios de intensidad Raman debido a las variantes de concentración.

1.20 Ruido generado por la instrumentación

El ruido generado por la instrumentación es a causa de los ruidos introducidos por el detector como el ruido térmico, el ruido de lectura que es dependiente de la eficiencia cuántica del detector con la longitud de onda.

1.21 Ruido computacional

El ruido computacional es introducido en el proceso de la digitalización de la señal de salida del detector.

1.22 Ruido generado por fuentes externas

El ruido generado por fuentes externas es ajeno al equipo Raman o a la muestra. Es causado por alguna fuente de luz externa que contamina la señal en algún punto del equipo de medición. El resultado de esto es un pico muy estrecho y de gran intensidad en el espectro de esparcimiento raman. Estos picos ocurren infrecuentemente, en tiempo aleatorio y posiciones también aleatorias del espectro Raman.

De todos los tipos de ruido que podemos encontrar al analizar un espectro Raman, los más comunes son el ruido de disparo, el ruido cósmico y la fluorescencia.[31]

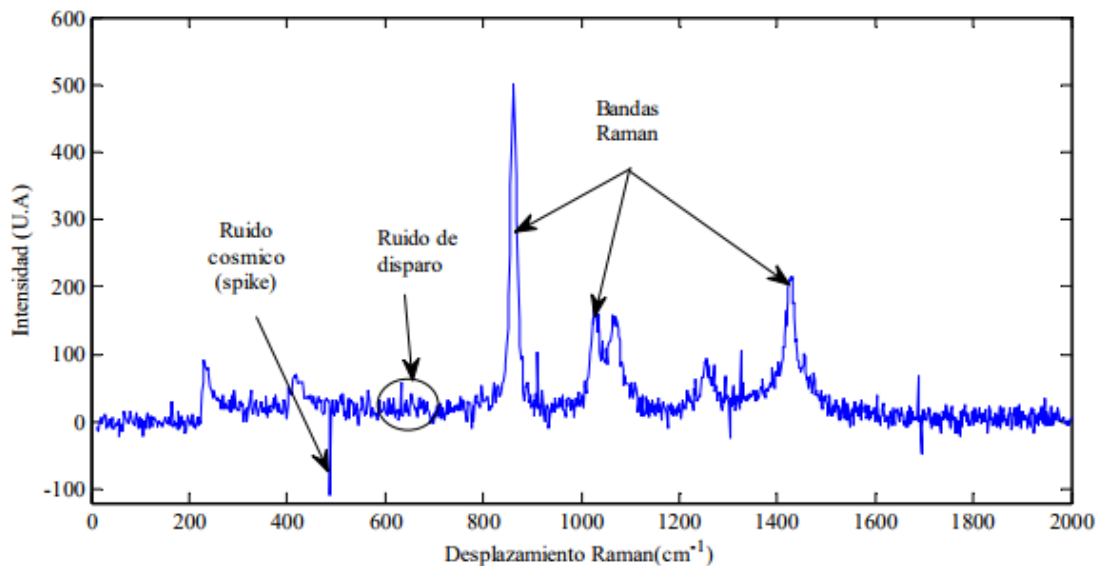


Figura 2. Tipos de ruidos en espectroscopia Raman

La utilización de la espectroscopia Raman, nos sirve para identificar compuestos o m.o dentro de una muestra, está basada en la localización de la posición de los picos o bandas Raman y la intensidad de ellos. El ruido presente en los espectros Raman dificultan esta identificación por eso es muy útil reducirlo por técnicas matemáticas sin que nos quiten información de la muestra.

Los procesos de esparcimiento Raman y de fluorescencia no están relacionados. En la fluorescencia la molécula absorbe completamente al fotón incidente y pasa a un estado excitado, y transcurre un tiempo de (vida media) cuando la molécula sufre una nueva transición al estado electrónico inferior re-emitiendo radiación normalmente de una longitud de onda superior a la que se absorbió. Por otra parte en el efecto Raman, el fotón nunca resulta absorbido, si no que perturba a la molécula y le induce

a que sufra un cambio de transición, en este proceso la molécula excitada nunca alcanza un estado excitado como situación intermedia y por tanto no es posible que permanezca el tiempo (tiempo de vida del estado excitado) necesario para que pueda tener lugar la colisión que la inhiba. El estado que alcanza la molécula en el proceso de esparcimiento Raman es un estado virtual, que no necesariamente coincide con ningún estado propio de la molécula. En la siguiente figura se puede observar un ejemplo de las bandas Raman y la fluorescencia. [32]

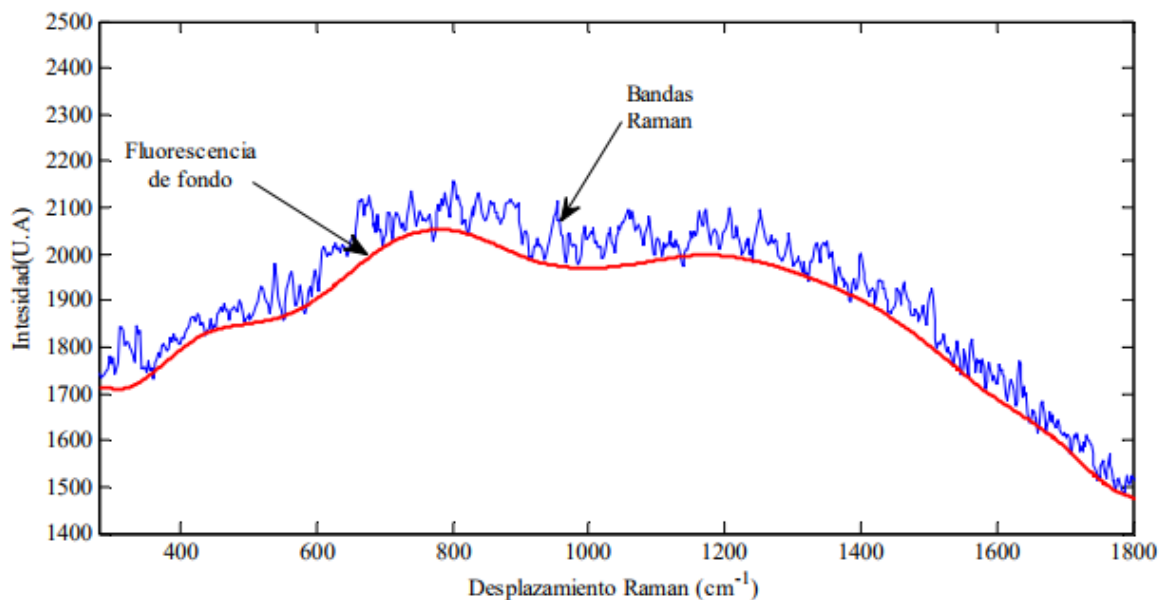


Figura 3. Bandas Raman y fluorescencia de fondo.

2. JUSTIFICACIÓN

La posibilidad de adquirir los espectros adecuados de células individuales en cuestión de segundos, con una alta especificidad de la señal de Raman, son las características que lo hacen más importante a este método, ya que podemos omitir la etapa de un cultivo de microorganismos (bacterias) completo, se puede ahorrar tiempo, lo cual lo hace un factor importante en muchos campos de aplicación. No solo porque las mediciones se pueden llevar a cabo ya sea en células individuales de un cultivo axénico o mezcla. Una ventaja adicional de espectroscopia Raman es que la muestra en general no es destruida y puede quedar disponible para investigaciones adicionales [2].

La espectroscopia Raman ha demostrado ser muy eficaz en la determinación de la estructura de moléculas biológicas [4,5].

Las preguntas que pretendemos responder mediante el desarrollo de este proyecto son: 1) ¿Qué influencia tienen las bacterias bajo estudio en las intensidades y forma de los espectros Raman? 2) ¿Cómo interpretar espectros relativamente anchos debidos a mezclas de compuestos y bacterias? 3) ¿Cómo evitar o eliminar la fluorescencia de fondo en las mediciones Raman? 4) ¿Cómo aplicar Raman para la caracterización e identificación no destructiva de bacterias? Como parte de las actividades experimentales para responder las preguntas del presente proyecto se desarrollarán las siguientes acciones: Se caracterizaran bacterias que han sido reportadas en Vinazas de tequila. Estas bacterias serán caracterizadas espectralmente (Raman) y se obtendrá la matriz excitación-emisión de Raman característica de cada bacteria, para una vez así conocer los microorganismos presentes en las vinazas de tequila y conocer aplicaciones futuras producidas por dichos microorganismos.

3. HIPOTESIS Y OBJETIVO

3.1 Hipótesis

Será posible caracterizar e identificar por medio del esparcimiento Raman las bacterias anaerobias del genero *Clostridium*.

3.2 Objetivo general

Desarrollar un método óptico en tiempo real por medio de la espectroscopia Raman, para identificar y caracterizar bacterias anaerobias.

3.3 Objetivos particulares

- Obtener suspensiones de cepas de control ATCC (*Clostridium pasteurianum*, *Clostridium beijerinckii*).
- Caracterizar espectralmente con una de las técnicas de espectroscopia Raman (Tradicional, microscopia y/o SERS), las bacterias anaerobias *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium beijerinckii*.
- Identificar bandas o picos característicos de cada bacteria estudiada.
- Identificar dichas bacterias en el consorcio de vinazas tequileras.

4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

4.1 Bacterias anaerobias

Se trabajó con dos tipos de bacterias anaerobias *C. pasteurianum* ATCC 6013 y *C. beijerinckii* ATCC 8260, las cuales se adquirieron de la Organización mundial de recursos biológicos y estándares ATCC.

4.2 Activación de cepas ATCC

Para la activación de las cepas ATCC se utilizó una cámara de anaerobiosis, medio de cultivo clostridial reforzado, y bolsas para producir anaerobiosis.

Primero se prepararon alícuotas de medio TSB + 15% de glicerol para criopreservación. Y a la par se prepararon alícuotas de medio de leche descremada para criopreservación.

Se activaron los dos tipos de cepas en las alícuotas para preservar a -80°C , seguido de esto a las 24 horas se inocularon en medio solido de clostridial reforzado, para estudiar su morfología, seguido de tinción Gram, y tinción de esporas.

4.3 Preparación de bacterias para medición con espectroscopia Raman.

Una vez pasado el tiempo de incubación de 24 horas para los dos tipos de cepas ATCC, en medio liquido clostridial reforzado, se hicieron 3 lavado con agua inyectable y se re suspendió en agua inyectable para tomar una muestra en suspensión para posteriormente colocar $0.1\mu\text{l}$ en un sustrato comercial Klarite y medir con un microscopio Raman.

4.4 Cantidad total de la suspensión

Se diseñó un experimento para determinar la cantidad total de bacterias que se encontraban en la suspensión haciendo una dilución en serie de 1:1 hasta $1:1 \times 10^6$ y se tomaron las últimas dos diluciones de donde se tomó 1 μ l y se colocó en un porta objetos para observar al microscopio después de teñir con cristal violeta, y saber cuántas bacterias aproximadamente se iban a colocar en el sustrato comercial Klarite.

Se colocaron las primeras diluciones de 1:1, 1:10 y 1:100 donde se encontraban aproximadamente 3.5×10^5 ; 3.5×10^4 y 3.5×10^3 bacterias respectivamente en 0.1 μ l.

4.5 Preparación de nanopartículas de plata

Se disolvieron 0,017 g de nitrato de plata en 90 ml de agua. En un recipiente separado, se disolvieron 0,017 g de clorhidrato de hidroxilamina en 10 ml de agua, seguido de la adición de 1,150 ml de solución de hidróxido sódico al 1%. La solución de hidroxilamina / hidróxido de sodio se añadió entonces rápidamente a la solución de nitrato de plata bajo agitación vigorosa. Después de unos segundos, se produjo una solución coloidal de color gris pardo, que se agitó adicionalmente durante 10 minutos. Se encontró que el pH del coloide de plata, medido inmediatamente después de la preparación, era de 8. También se observó una ligera disminución del pH, es decir, al medir el tiempo, el pH fue de 7,5 [8].

4.6 Sustratos Klarite®

Los sustratos de Klarite (Renishaw Diagnostics) proporcionan una solución única para el análisis molecular a nivel de trazas utilizando la Espectroscopia Raman amplificada de Superficie (SERS). Los sustratos SERS de Klarite consisten en pirámides grabadas de 1,5 μ m de diámetro con oro rugoso (tamaño característico \sim 20 nm) depositadas sobre las paredes internas de la pirámide usando un

método controlado y reproducible. La uniformidad de las características superficiales tienen un impacto significativo en la reproducibilidad de las mediciones [12].

4.7 Arreglo experimental

4.7.1 Espectroscopia Raman

Las muestras de las bacterias *C. pasteurianum* y *C. beijerinckii* se analizaron por espectroscopia Raman, usando un espectrómetro QE65 y un NirQuest (Ocean Optics Inc., Dunedin FL), configurados para mediciones Raman. Dos láseres de 785 y 1064 nm y con potencias de salida máxima de 400 y 500 mW respectivamente, sirvieron como fuentes de excitación. Se utilizaron dos sondas Raman de fibra óptica (RPB785 y RPB1064, InPhotonics, Norwood, MA, EE.UU.) para enfocar el láser y adquirir señales Raman. Los espectrómetros fueron precalibrados por el fabricante. Los espectros Raman se obtuvieron con un tiempo de integración de 10 y 30 s colocando la punta de la fibra óptica a una distancia de 7 mm de los viales de vidrio (Fig.1).



Figura 4. Arreglo experimental Raman

4.7.2 Microscopia Raman

Los espectros Raman de las bacterias estudiadas fueron obtenidos usando un microscopio Raman (IDRaman, Ocean Optics Inc., Dunedin FL), el espectrómetro está acoplado a un microscopio óptico equipado con iluminación de reflexión (Fig.2), optimizado para mediciones de alta sensibilidad. La excitación del esparcimiento Raman es con un láser de longitud de onda de 785 nm y con potencia de salida máxima de 70 mW. El haz del láser fue enfocado sobre las células individuales por medio de objetivos de 40X y 80X. Los espectros Raman de células individuales se pudieron registrar con buena relación señal/ruido con tiempos de integración de 5 a 30 s.



Figura 5. Microscopio Raman

4.7.3 Análisis de espectros Raman

La auto fluorescencia de materiales biológicos es un reto importante para las aplicaciones de espectroscopia Raman. Se han desarrollado diversos métodos matemáticos para eliminar la fluorescencia de fondo subyacente en espectros Raman, tales como ajuste polinomial, transformada de Fourier y derivadas. El método de ajuste polinomial ha sido ampliamente utilizado porque es simple, rápido y efectivo. La base de este método es que los espectros de fluorescencia generalmente pueden ser modelados por funciones polinomiales de diferentes grados. En este estudio, se utilizó un método de ajuste de curva polinómico para corregir el fondo de fluorescencia en los espectros Raman de los cultivos. El método de ajuste de curvas anteriormente mencionado con polinomios de tercer y quinto orden se aplicó a todos los espectros Raman para la eliminación del fondo de fluorescencia. La línea base ajustada fue restada del espectro original para generar el espectro Raman con un fondo

casi plano. La corrección de fluorescencia es un paso importante para el análisis espectral Raman y la clasificación. El espectro de Raman libre de fluorescencia formó una base para la identificación de células individuales utilizando un método de comparación espectral. Se utilizaron los mismos procedimientos para corregir los espectros de las mediciones con fibra óptica y con microscopio Raman. Los procedimientos descritos anteriormente se ejecutaron utilizando MATLAB (MathWorks, Natick, MA, EUA).

4.7.4 Pre procesamiento de datos para el análisis estadístico

El pre-procesado de los datos es un paso fundamental antes de aplicar cualquier técnica sobre los datos. El empleo de métodos de pre-procesado está ampliamente extendido en aplicaciones espectroscópicas como NIR o Raman, para la corrección de las variaciones aleatorias y sistemáticas del espectro debidas a efectos físicos (esparcimiento de la luz, ruido, derivas, desplazamientos, etc.) y otras variaciones espectrales no relacionadas con las propiedades estudiadas. En muestras líquidas, como en nuestro caso la turbidez, otros compuestos del medio de cultivo, son relevantes y deben ser considerados antes de la etapa de procesado de los datos. Los datos espectrales presentan diferentes cocientes señal/ruido dependiendo del modo de medida de la muestra a analizar y de las condiciones de medida. Las técnicas de corrección de señal eliminan el ruido presente, minimizando las contribuciones de variables físicas que incorporan información irrelevante en los espectros, logrando una mejor interpretación de los datos, construyendo de esta forma modelos más simples y robustos

El procesamiento de datos de los espectros incluyó la corrección de la línea de base y la normalización de los espectros de Raman. Como se discutió anteriormente, los espectros de muestras biológicas sufren de un fondo enorme (visible en la Figura 3) debido a la fluorescencia. Muchas técnicas de hardware se desarrollaron para resolver este problema, pero recientemente el desarrollo de rutinas de software han hecho matemáticamente procedimientos basados en corregir el fondo mucho más fácil y más barato. Para este propósito se utilizaron diferentes algoritmos numéricos. [32,33]

Uno de los algoritmos más significativos y precisos utiliza un ajuste polinómico para aproximar el perfil del fondo y lo resta sin ninguna pérdida de las firmas espectrales. Se eligió un robusto método automatizado utilizando un programa Matlab personalizado utilizando un método minmax adaptativo para eliminar el fondo de cada espectro y normalizar los datos espectrales mediante el ajuste de la intensidad máxima a uno. El procedimiento de sustracción de fondo en este método se basa en la relación de fluorescencia a señal (F/S) donde un polinomios múltiples con diferentes órdenes tienen se ha utilizado para adaptarse a todas las relaciones F/S en lugar de un único ajuste polinomial adaptado por otros métodos comparables. La relación F/S se calcula dividiendo la fluorescencia máxima por la señal Raman máxima. Cao et al., denominado este método "el método minmax adaptativo" ya que el proceso de sustracción se lleva a cabo en dos pasos algorítmicos. La parte adaptativa se refiere a la primera etapa en la que se realizaron dos ajustes polinómicos diferentes (limitados y sin restricciones) con dos órdenes diferentes que se adaptaron en base a la relación F/S con el valor RMS más bajo. El minmax relacionado con el segundo paso donde "min" significa tomar el punto mínimo entre el espectro y el ajuste polinomial para evitar que los datos se sobreajuste y "máx" significan tomar el valor máximo entre todo el accesorio para evitar un ajuste insuficiente de los datos. Se utilizó un programa Matlab para el procesamiento de datos en el que se determinaron los parámetros de ajuste adaptativo (tales como los pedidos polinómicos de ajuste). Entonces se realizó un ajuste polinómico de cuarto orden para estimar la relación F/S del espectro que determinó el orden de los cuatro polinomios que se utilizaron para obtener el mejor ajuste final para la resta. Después del proceso de sustracción, el programa también normalizó el espectro procesado de 0-1 estableciendo la intensidad máxima en. El factor más importante que influye en la calidad de los datos es la reproducibilidad de las mediciones. Las características espectrales de las células dependen inevitablemente de un número de factores tales como el ciclo celular, las condiciones de crecimiento, la preparación de muestras, el muestreo, etc., que tienen que ser controlados y estandarizados para obtener resultados reproducibles.

4.7.5 Corrección de la línea base y normalización

La corrección de la línea base es uno de los métodos empleados habitualmente para eliminar el efecto de nivel de la línea base. Para ello se emplean uno a varios puntos del espectro para los que no existan variaciones significativas y se lleva a cabo la sustracción de este valor a cada punto de la señal. La corrección de la línea base simplemente mueve el espectro hacia abajo mediante la eliminación de la línea base.

La normalización se emplea para la corrección de diferencias en las intensidades, debido a factores sin interés en la estimación de la composición química como el esparcimiento de la luz, las variaciones en la penetración de la radiación o el tamaño de la muestra. El fin de la normalización es asignar el mismo peso a cada señal mediante la corrección de dichas diferencias de intensidades globales, convirtiendo cada una de las filas de la matriz de datos en un vector normalizado de la longitud unitaria dividiendo cada valor por la raíz cuadrada de la suma de los valores al cuadrado. [33]

4.7.6 Suavizado (smoothing)

La relación señal-ruido en espectros Raman puede ser baja debido a las bajas intensidades del esparcimiento de una muestra a señales bajas en regiones espectrales específicas provocadas por fallas del detector. La técnica más utilizada es la propuesta por Savitzky-Golay [33]. Este método se basa en que, para un pequeño intervalo de longitudes de onda se puede ajustar un polinomio de grado adecuado. Los nuevos valores tras el ajuste son un mejor estima que los valores medidos ya que se ha eliminado parte del ruido que los afectaba. [34]

El cálculo de derivadas permite acentuar las diferencias existentes en los datos espectrales. Tanto la primera derivada como la segunda derivada se utilizan a menudo para el tratamiento de los datos.

Una desventaja del uso de las derivadas es que disminuyen el valor de la relación señal-ruido, por esta razón, se recomienda realizar el suavizado de la señal Raman antes de la diferenciación de datos.

4.7.7 Variación Normal Estándar (SNV)

Al utilizar espectroscopia Raman para monitorear los cambios en cualquier sustancia química real, tal como en una situación de control de procesos las pendientes de fondo pueden variar de un espectro a otro. Generalmente, nos interesa el cambio de las intensidades de las bandas y nos los cambios de las pendientes de la línea base. [34]

En la transformación SNV cada espectro es centrado y escalado dividiendo por su desviación típica, como se refleja en la siguiente ecuación:

$$X_{ij}^{SNV} = \frac{X_{ij} - \bar{x}}{S_i}$$

Donde X_{ij}^{SNV} es el elemento del espectro transformado, X_{ij} corresponde al espectro original i a la longitud de onda m , \bar{x} es la media del espectro i y S_i la desviación estándar de los valores de absorbancia de cada muestra. Cada espectro tratado de esta manera tiene media 0 y varianza igual a 1 y es, por tanto, independiente de los valores originales. [35,36]

Al aplicar la transformación SNV se asume que los efectos multiplicativos de la señal son uniformes en todo el rango espectral por lo que en caso de no ser así se pueden introducir errores.

5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Espectroscopia Raman excitación 785

Los espectros Raman con fuente de excitación de 785 nm, de las dos bacterias ATCC, sin lavado, diluidas en agua inyectable y sin nanopartículas son mostrados en las figuras 3 y 4, estos espectros mostraron picos muy anchos y ninguno bien definido, lo cual puede ser debido a la baja cantidad de células individuales.

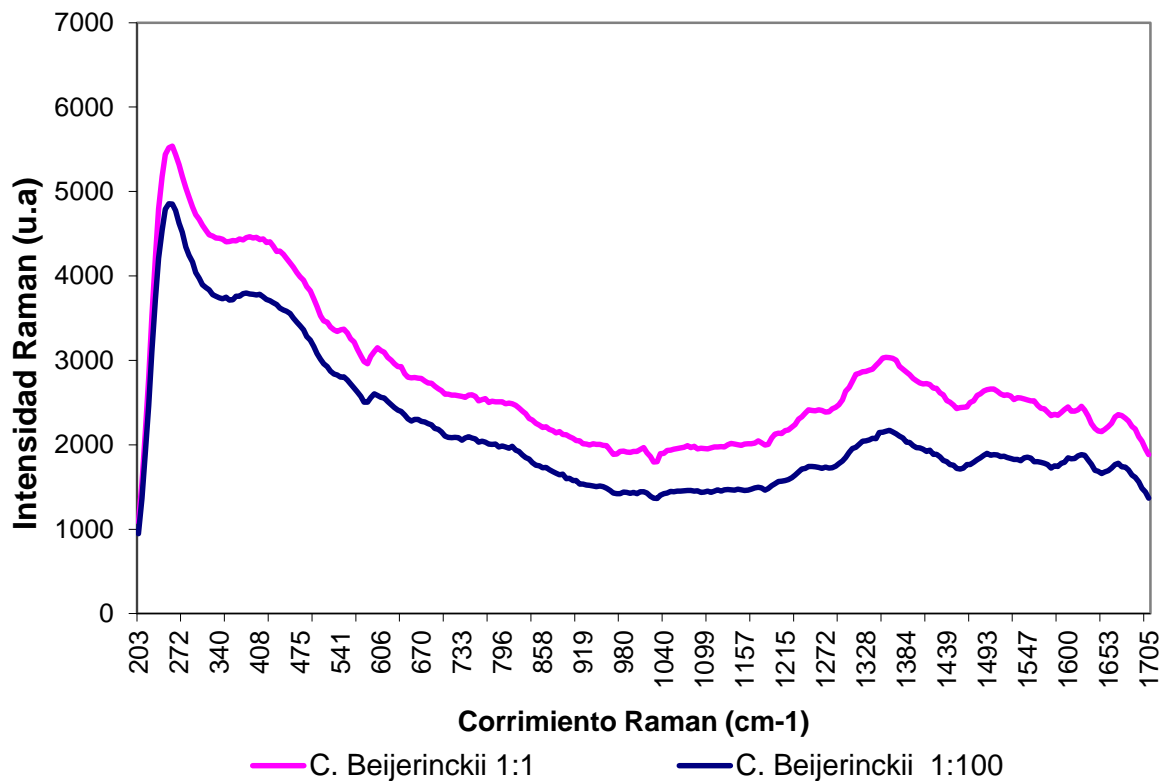


Figura 6. Espectros Raman sin procesar de la cepa *C. Beijerinckii* con dilución 1:1 y 1:100 usando en un sustrato comercial CaF₂.

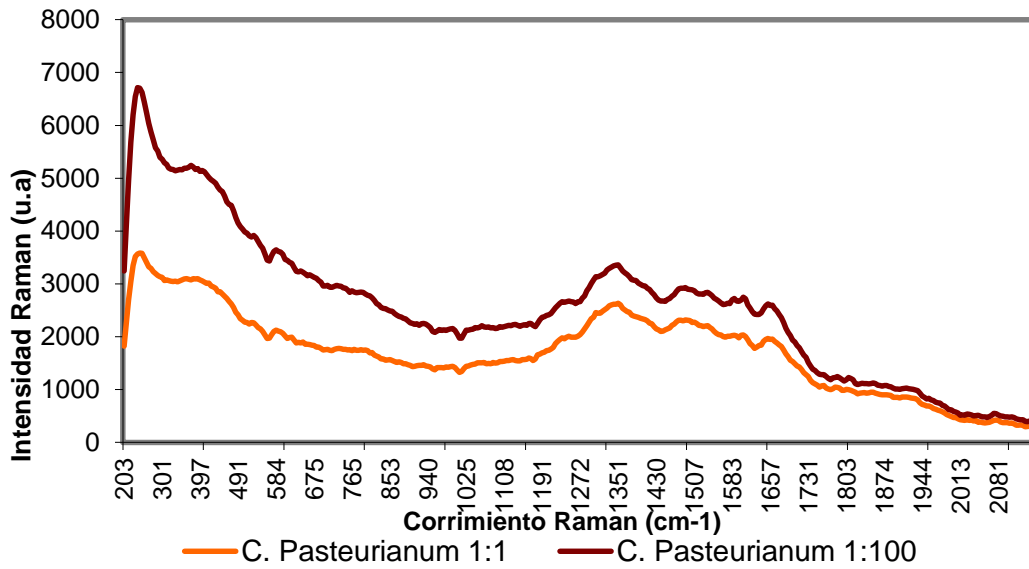


Figura 7. Espectros Raman sin procesar de la cepa *C. Pasteurianum* con dilución 1:1 y 1:100 en un sustrato comercial CaF2.

Espectroscopia Raman excitación 1064

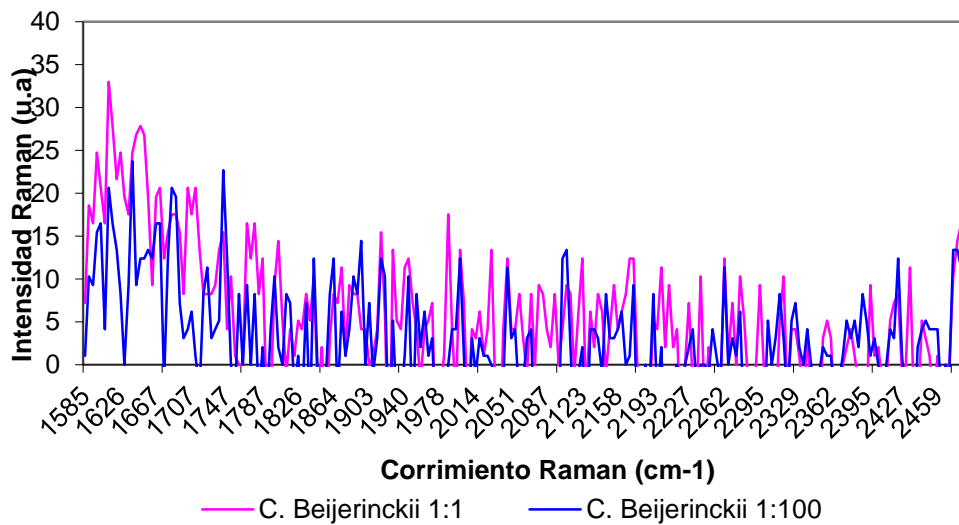


Figura 8. Espectros Raman sin procesar de la cepa *C. Beijerinckii* con dilución 1:1 y 1:100 en sustrato comercial Caf2.

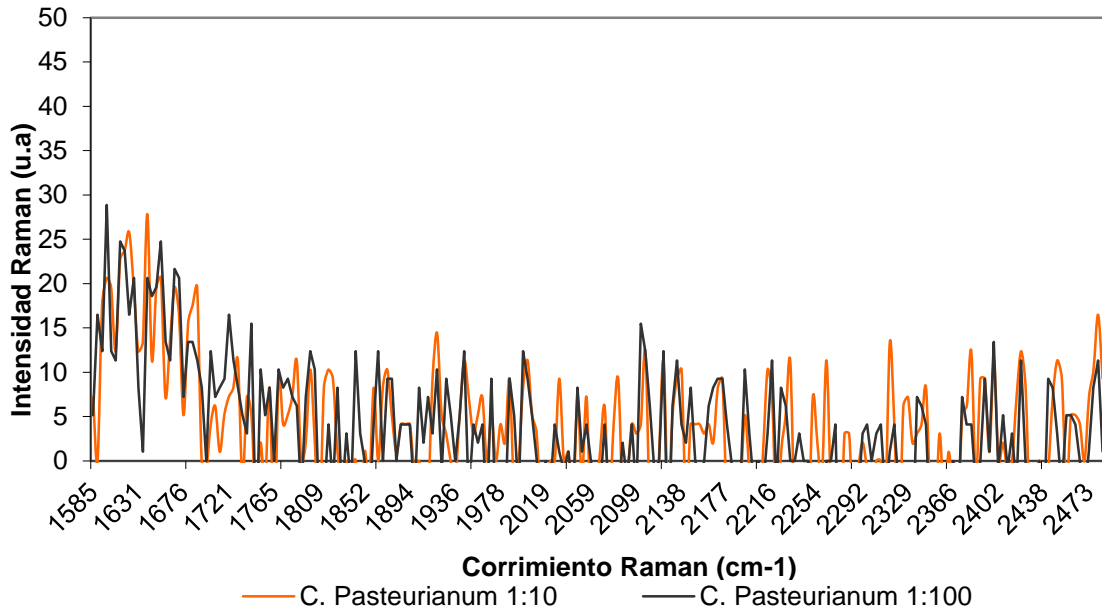


Figura 9. Espectro Raman sin procesar de la cepa *C. Pasteurianum* con dilución 1:1 y 1:100 en un sustrato comercial CaF2.

Las figuras 8 y 9 muestran los espectros Raman con fuente de excitación de 1064 nm de estas mismas dos bacterias ATCC con adición de nanopartículas de plata, estos espectros aunque muestran mas picos Raman definidos la relación señal/ruido es muy baja y no es viable identificar picos característicos de las bacterias.

Microscopio Raman excitación 785 con un objetivo de 40X y un sustrato comercial Klarite.

Para la obtención de los siguientes espectros Raman se utilizó el microscopio Raman (IDRaman) Con fuente de excitación de 785 nm, y un objetivo de microscopio de 40X, asedás de un sustrato comercial (Klarite®) para inducir la técnica SERS de las mismas dos bacterias sin lavado.

El funcionamiento del método de ajuste de curva polinomial se demuestra utilizando estos espectros. Los espectros originales, ajustados y corregidos de las dos bacterias se representan en la figuras 10 y 11. El método de ajuste produjo un buen ajuste para la autofluorescencia de fondo. La figura 12

muestra los espectros Raman corregidos, sin la fluorescencia de fondo. En estos espectros ya es posible identificar algunos picos Raman bien definidos en el intervalo de 750-1100 cm^{-1}

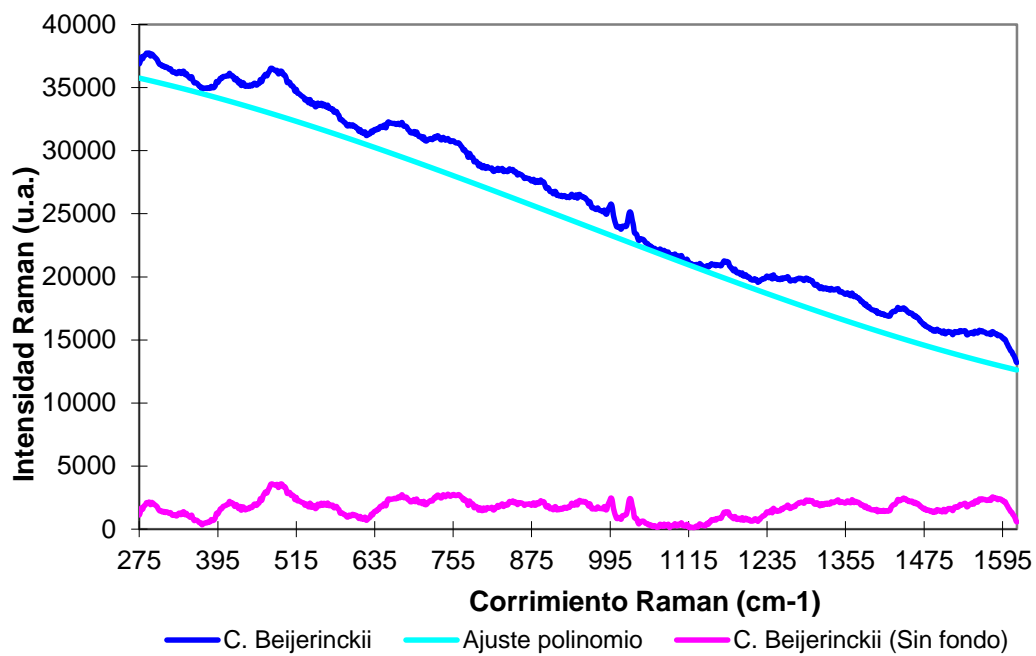


Figura 10. Corrección de la fluorescencia de fondo del espectro Raman de *C. Beijerinckii*

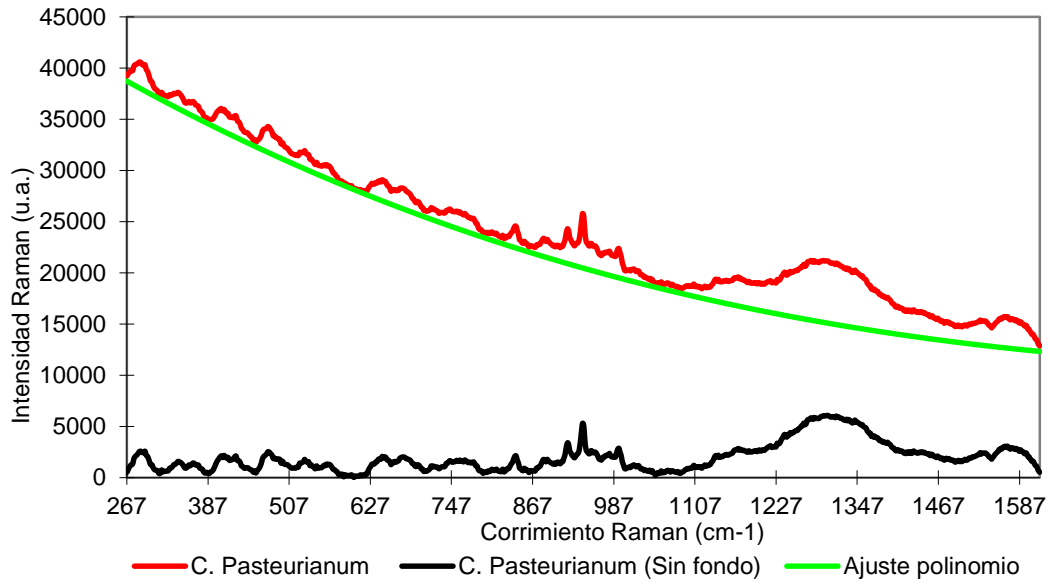


Figura 11. Corrección de la fluorescencia de fondo del espectro Raman de *C. Pasteurianum*.

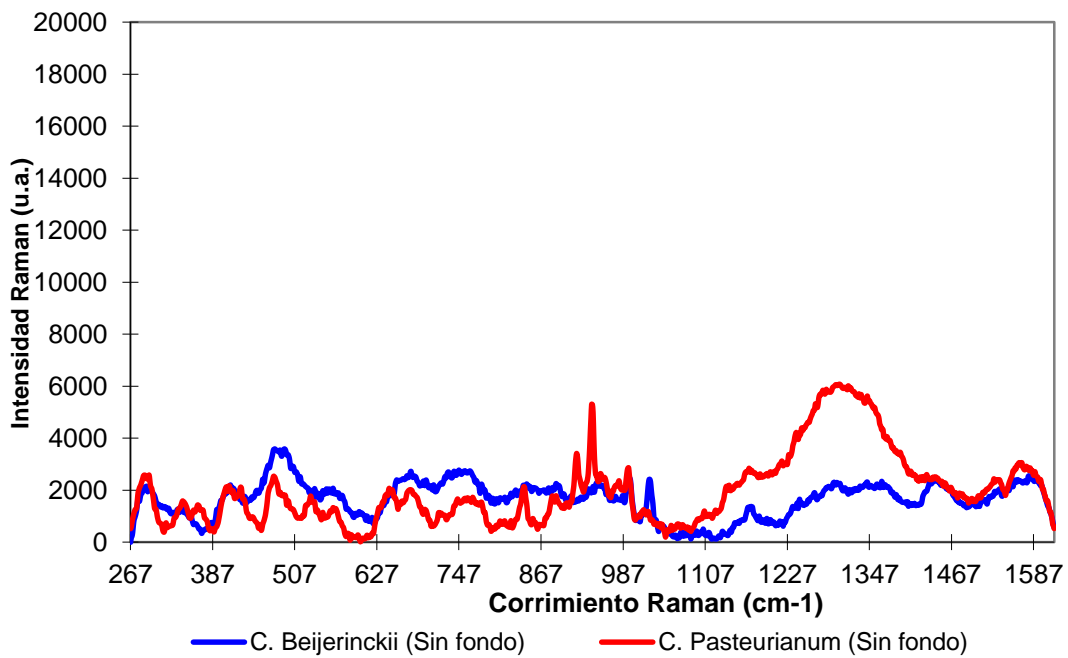


Figura 12. Espectros Raman corregidos de las cepas *Clostridium Beijerinckii* y *Clostridium Pasteurianum*.

Microscopio Raman excitación 785 con un objetivo de 80X y un sustrato comercial Klarite.

En las siguientes figuras (12-14) se muestran los espectros Raman de Espectros de *C. pasteurianum* en 3 diferentes diluciones con lavado y colocadas sobre un sustrato comercial (Klarite®) y obtenidos con un objetivo de 80X. La figura 10 muestra los espectros Raman sin procesar de las diluciones 1:1, 1:10 y 1:100 de *C. pasteurianum*. Claramente se ve que la dilución 1:1 muestra picos Raman muy bien definidos de esta bacteria.

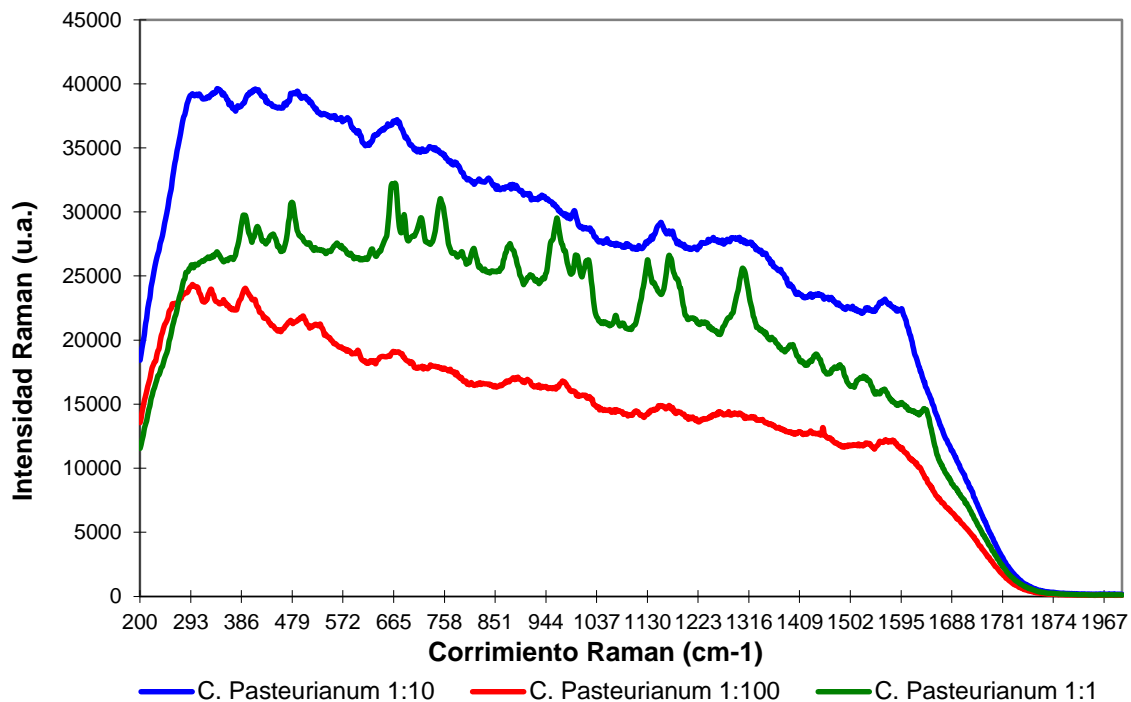


Figura 12. Espectros Raman si procesar de *C. pasteurianum* en 3 diferentes diluciones.

Los espectros originales, ajustados y corregidos 1:1, 1:10 y 1:100 de la diluciones *C. pasteurianum* se muestran en las figura 13-15. El polinomio que mejor se ajustó a la fluorescencia de fondo fue de quinto grado. La eliminación de la línea base de fluorescencia mejoró los picos Raman como se puede ver en los espectros corregidos.

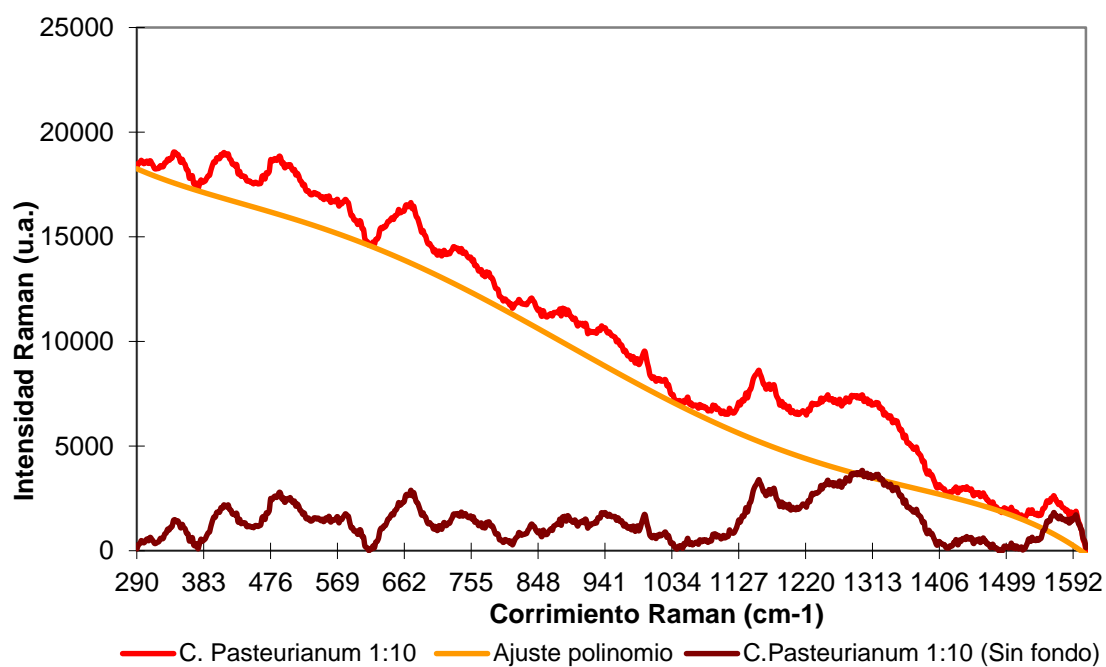


Figura 13. Corrección de la fluorescencia de fondo de la dilución 1:10 de *C. pasteurianum*.

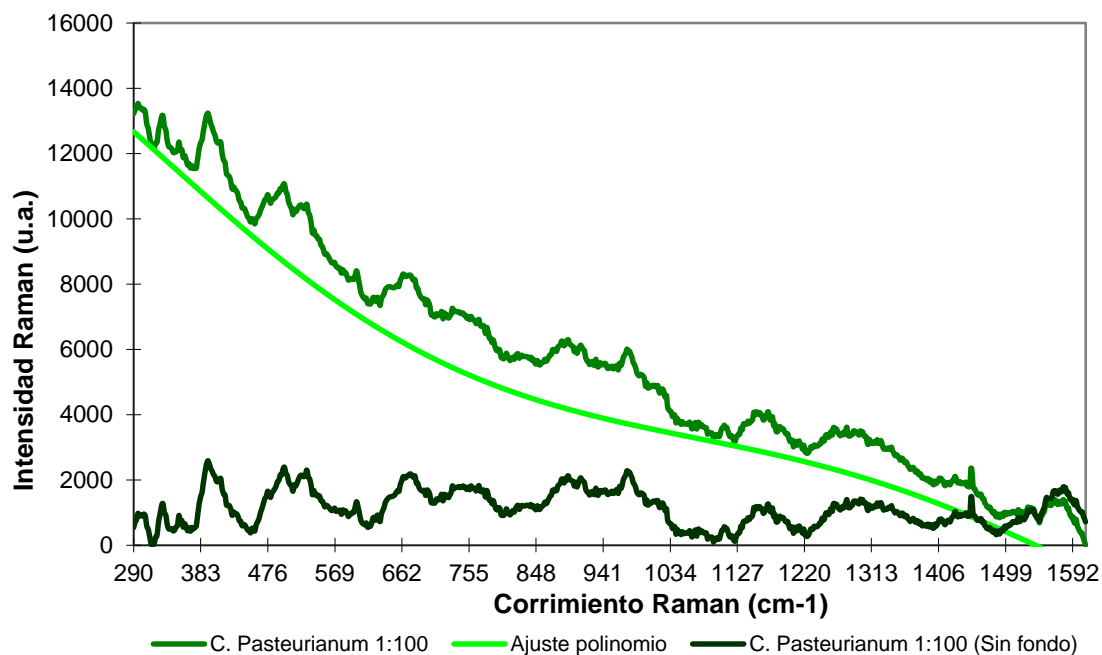


Figura 14. Corrección de la fluorescencia de fondo de la dilución 1:100 de *C. pasteurianum*.

En la figura 15 se muestra el espectro Raman corregido de la dilución 1:1 de *C. pasteurianum*, en este espectro se identificaron picos Raman a 390, 414, 444, 479, 663, 684, 714, 751, 791, 812, 879, 915, 964, 1002, 1085, 1131, 1169, 1213, 1230, 1306, 1397, 1441, 1484, 1529 y 1567 cm^{-1} . Algunas atribuciones tentativas de estos picos se enumeran en detalle en la Tabla 1. Las bandas coinciden con características reportadas en la literatura para células de la bacteria anaeróbica *Clostridium beijerinckii* [2000]. La mayoría de las bandas corresponden a grupos funcionales en los constituyentes principales de una célula microbiana, proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos.

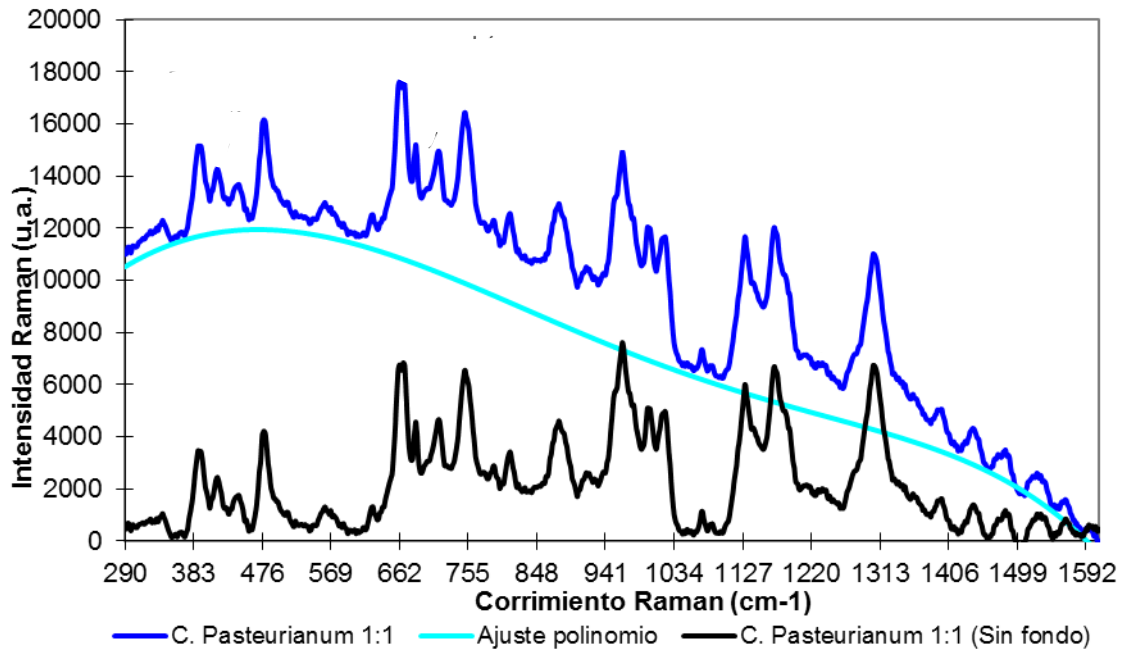


Figura 15. Corrección de la fluorescencia de fondo de la dilución 1:1 de *C. pasteurianum*.

Para obtener el mejor espectro para la detección de los picos Raman con mejor resolución buscaron diferentes métodos, con un objetivo de 40x a 80x y dos sustratos de dos marcas distintas Klarite y Oceanoptics. Ambos constaban de una combinación de coloides de oro y plata, para incrementar la señal Raman. Y observados en un microscopio Raman con distintos tiempos de integración y potencia de salida. Al utilizar los sustratos Klarite nos daban una mayor intensidad de alrededor de 20000 unidades arbitrarias (intensidad Raman), esto por la buena señal del sustrato y el acoplamiento de nanopartículas de plata/oro. Los sustratos obtenidos de Oceanoptics nos daban una intensidad más pequeña de alrededor de 7000 unidad arbitrarias (intensidad Raman) lo que nos afirma que estos sustratos tienen una menor ampliación en su señal Raman, pero no se podría decir con esto, que son menos útiles para la identificación por espectroscopia Raman, pues también nos dan muchos picos o bandas Raman para identificar compuestos dentro de las bacterias *Clostridium*, como se puede observar en las siguientes figuras.

Microscopio Raman excitación 785 con un objetivo de 80X y un sustrato comercial Oceanoptics.

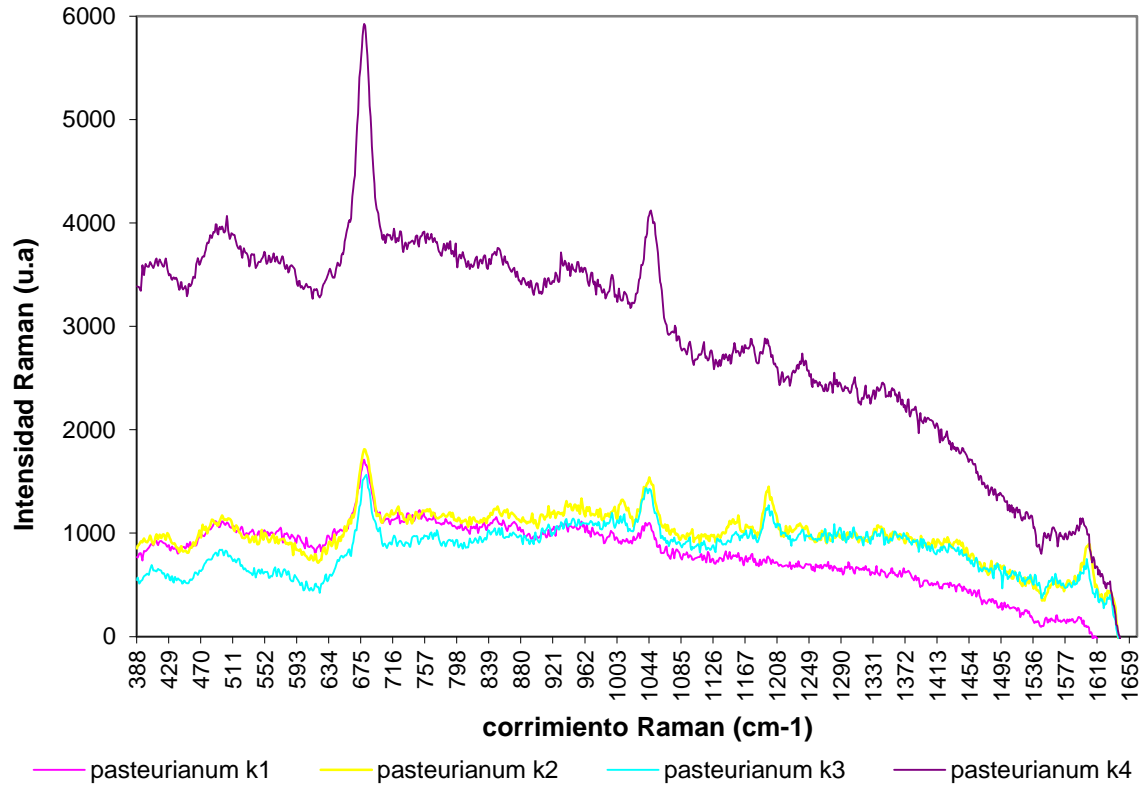


Figura 16. Espectro de *Clostridium pasteurianum* tomado con microscopio Raman en un sustrato comercial con mezcla de oro y plata de oceanoptics en diferentes puntos de la muestra los cuales muestran homogeneidad.

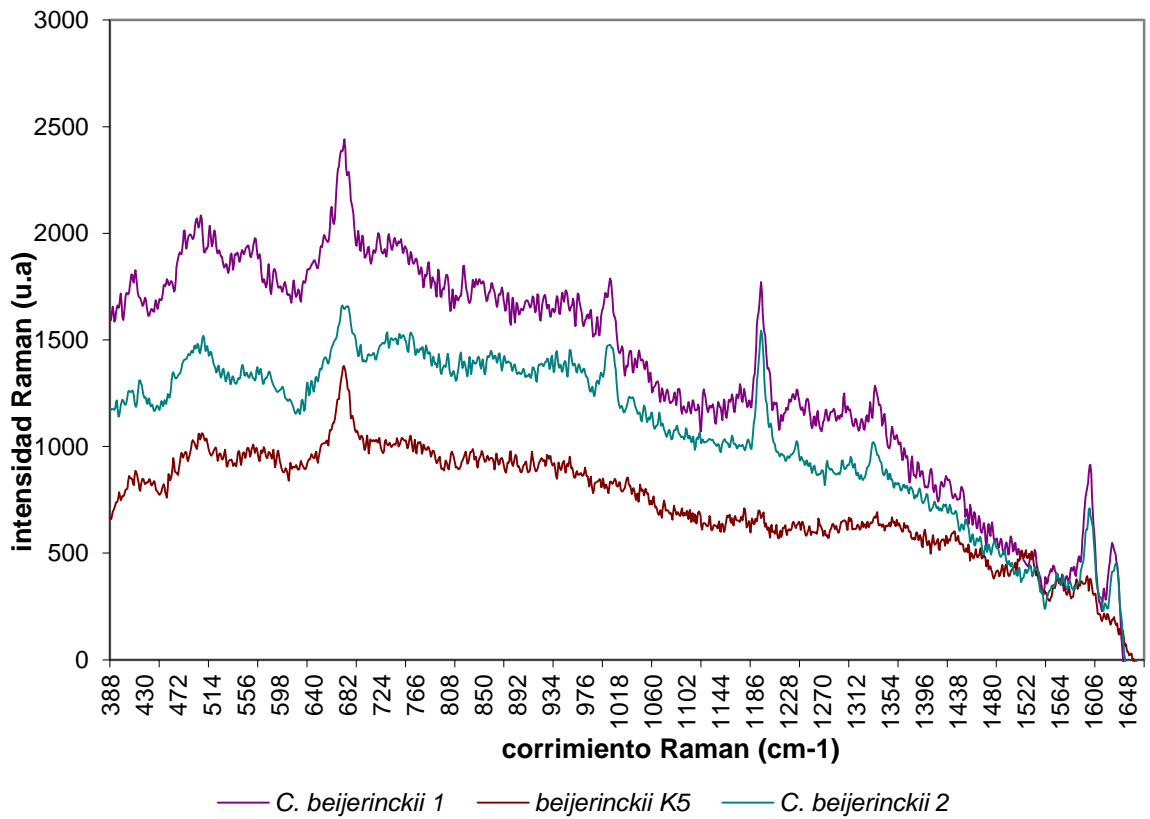


Figura 17. Espectro de *Clostridium beijerinckii* tomado con microscopio Raman en un sustrato comercial con mezcla de oro y plata de oceanoptics en diferentes puntos de la muestra los cuales muestran homogeneidad.

En las figuras 16 y 17 podemos observar diferentes espectros de *Clostridium pasteurianum* y *Clostridium beijerinckii* las cuales fueron tomadas en diferentes puntos de la misma muestra de las bacterias analizadas. En las dos figuras los espectros muestran los mismos picos o bandas Raman. Varias bandas interesantes aparecen en el espectro. Algunas atribuciones tentativas se enumeran en detalle en la Tabla 1. Las bandas características de coincidencia informadas en la literatura para muestras de mayor tamaño cantidades de biomasa bacteriana o sus componentes moleculares (Tabla 1). La mayoría de las bandas corresponden a grupos funcionales en el principal constituyentes de una célula microbiana, proteínas, carbohidratos, lípidos, y ácidos nucleicos.

Microscopio Raman excitación 785 con un objetivo de 40X y un sustrato comercial Klarite.

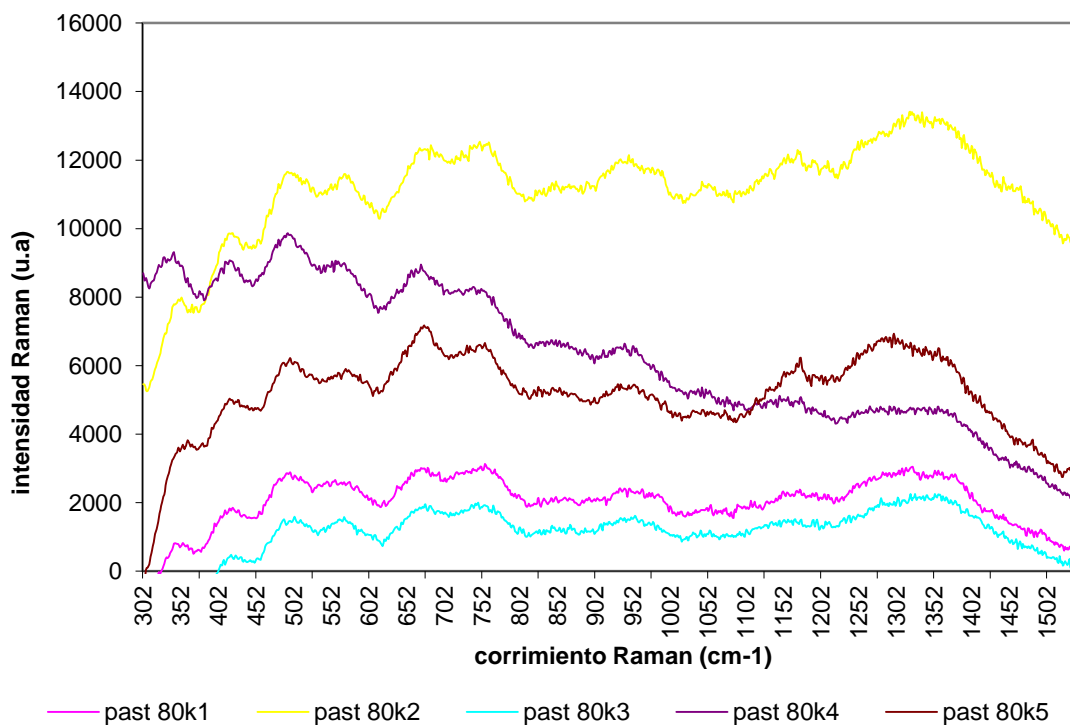


Figura 18. Espectro de *Clostridium pasteurianum* tomado con microscopio Raman con objetivo de 40X en un sustrato comercial con mezcla de oro y plata Klarite® en diferentes puntos de la muestra los cuales muestran homogeneidad las bandas Raman.

Microscopio Raman excitación 785 con un objetivo de 80X y un sustrato comercial Klarite.

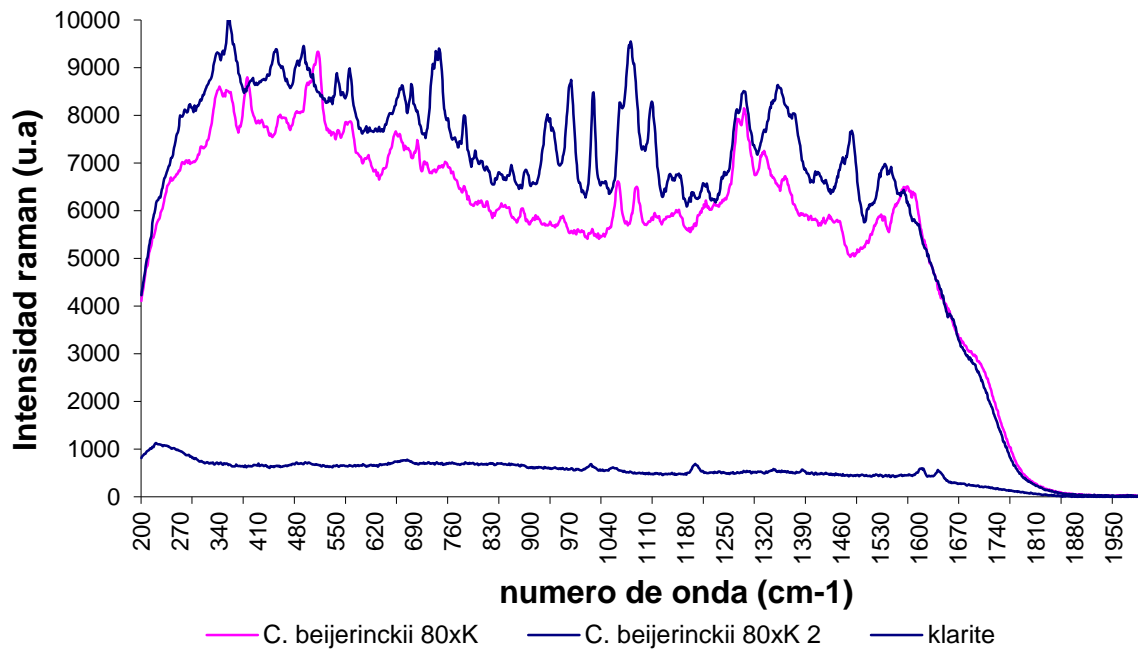


Figura 19. Espectro de *Clostridium beijerinckii* tomado con microscopio Raman con objetivo de 80X en un sustrato comercial con mezcla de oro y plata Klarite® en diferentes puntos de la muestra los cuales muestran homogeneidad las bandas Raman y un espectro del sustrato comercial Klarite.

En la figura 19 se muestra un espectro del sustrato comercial marca Klarite® el cual nos da el mínimo ruido, con lo que nos da una buena señal ruido, y podemos observar dos espectros de la misma bacteria *C. beijerinckii* tomada de dos diferentes partes de la muestra, en donde podemos observar homogeneidad en los picos Raman.

Microscopio Raman excitación 785 con un objetivo de 40X y 80X con sustrato comercial Klarite.

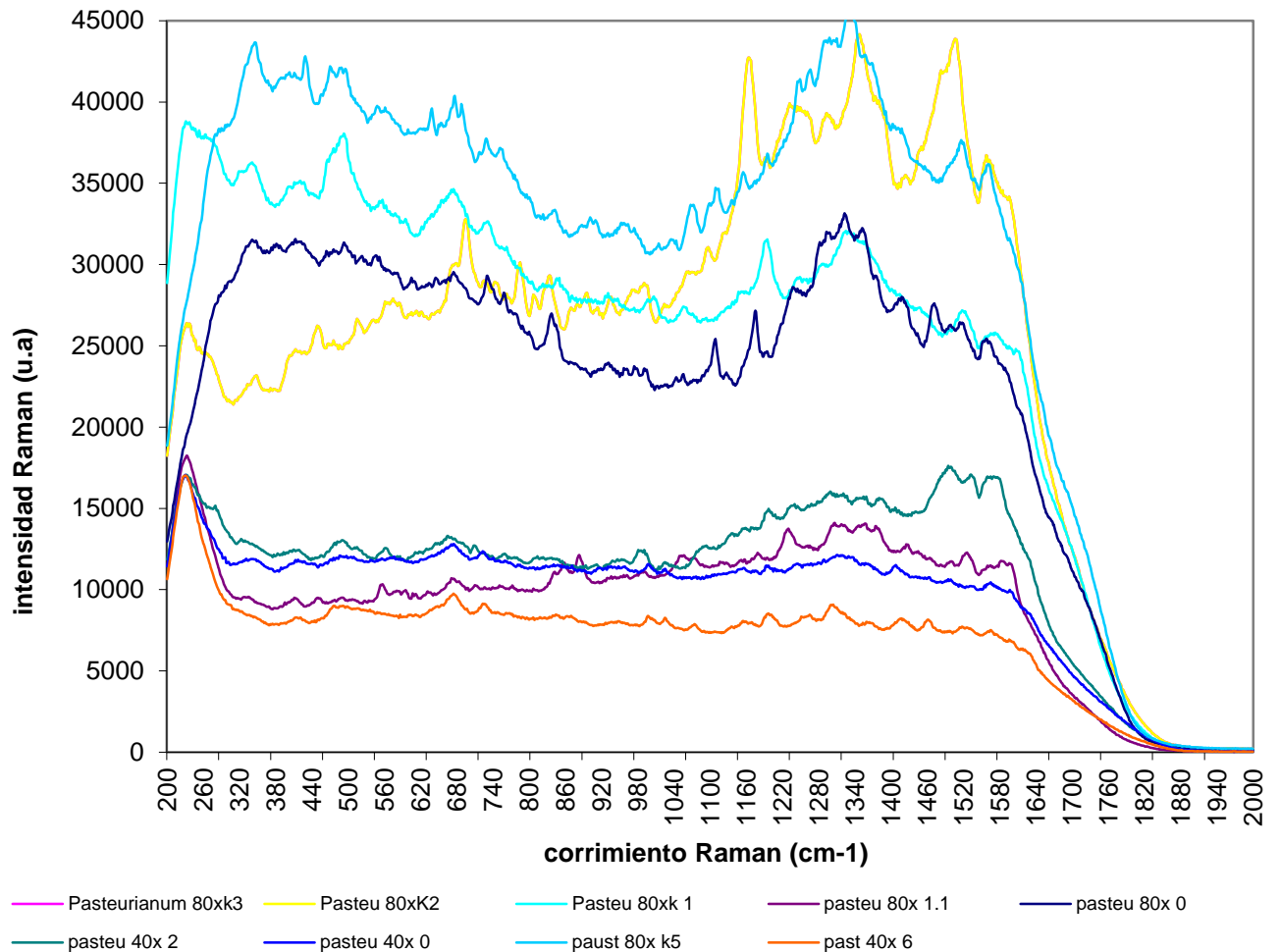


Figura 20. Espectro de *Clostridium pasteurianum* tomado con microscopio Raman con objetivo de 80X y un objetivo de 40 X en un sustrato comercial con mezcla de oro y plata Klarite® en diferentes puntos de la muestra los cuales muestran homogeneidad las bandas Raman en los dos diferentes objetivos.

La figura 20 nos muestra dos tipos de espectros uno tomado con un objetivo de 40X los cuales muestran homogeneidad entre ellos, las bandas o picos Raman se muestran en el mismo corrimiento, pero con una baja intensidad. En cambio los espectros tomados con un objetivo de 80X también muestran homogeneidad entre ellos pero con una mayor señal/ruido y mayor intensidad en sus bandas o picos Raman, lo cual nos dice que al aumentar el objetivo los resultados nos muestran una mejor señal.

Microscopio Raman excitación 785 con un objetivo de 80X y un sustrato comercial Klarite.

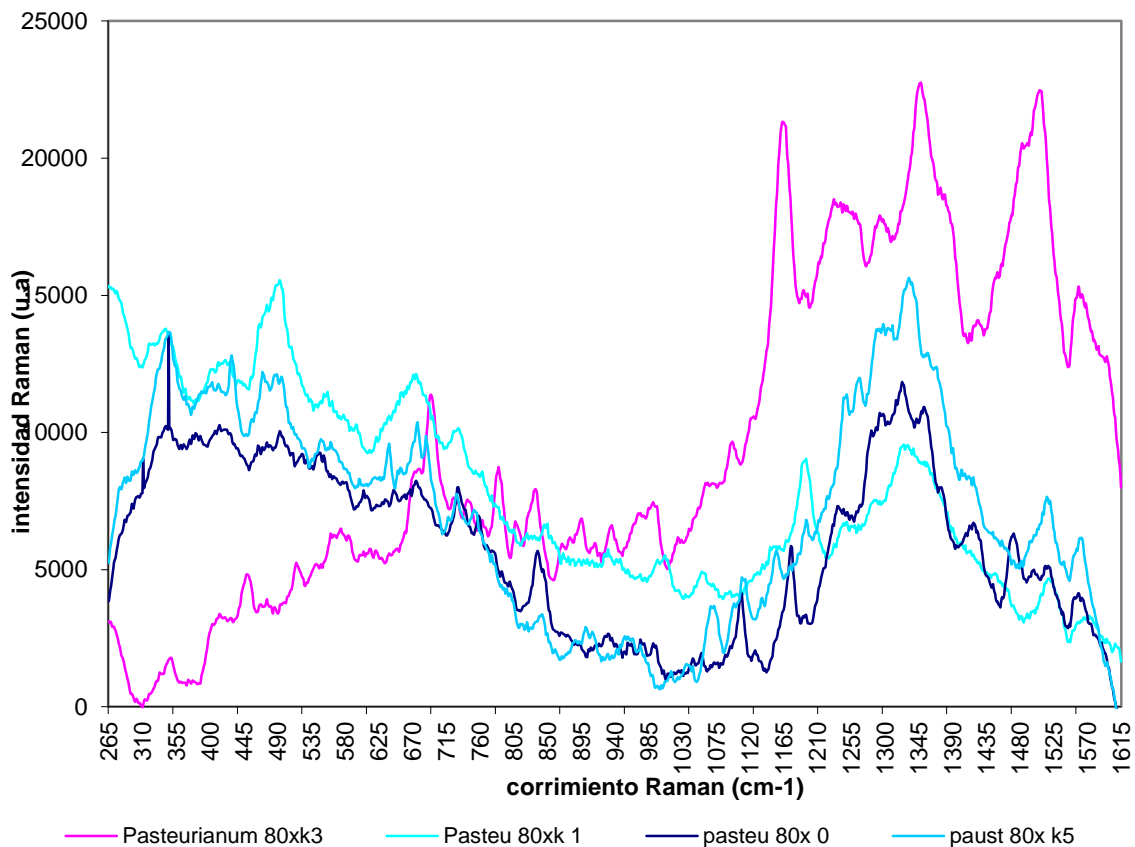


Figura 21. Espectro de *Clostridium pasteurianum* tomado con microscopio Raman con objetivo de 80x (con corrección de línea base y eliminación de fluorescencia) en un sustrato comercial con mezcla de oro y plata Klarite en diferentes puntos de la muestra los cuales muestran homogeneidad las bandas Raman.

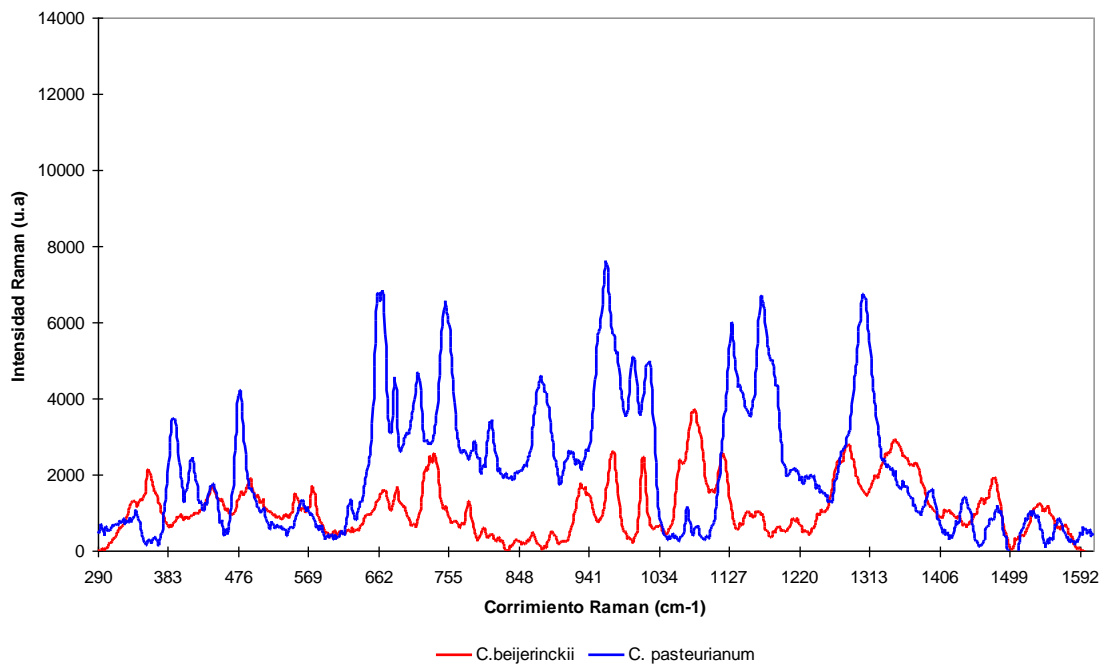


Figura 22. Espectros de *Clostridium beijerinckii* y *Clostridium pasteurianum* tomado con microscopio Raman con objetivo de 80X en un sustrato comercial con mezcla de oro y plata Klarite® .

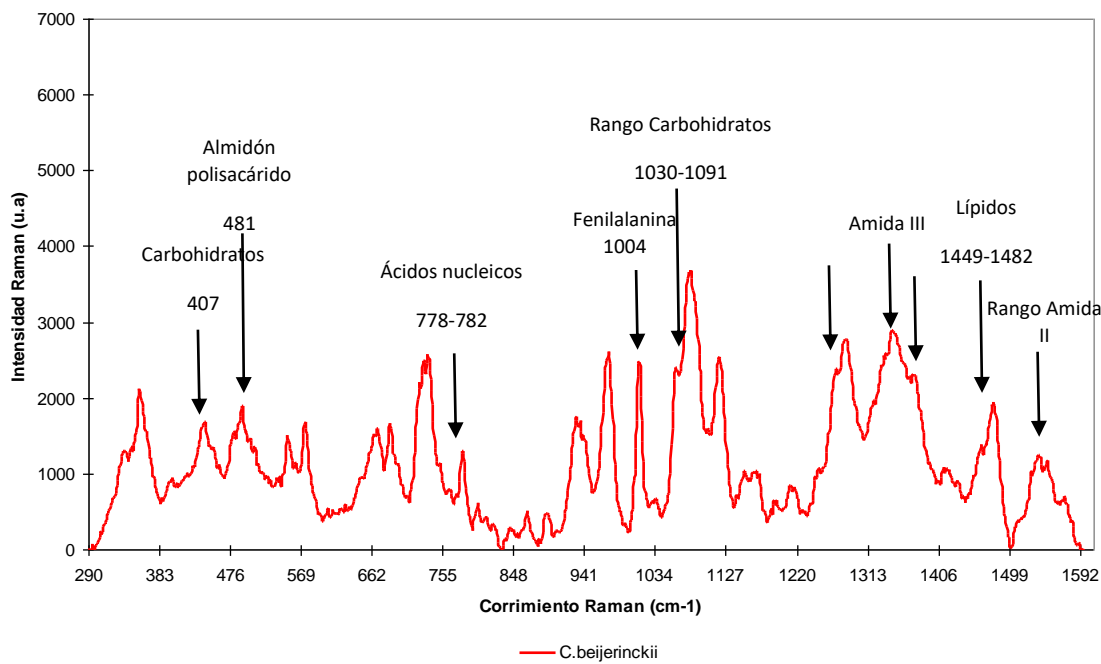


Figura 23. Espectro de *Clostridium beijerinckii* tomado con microscopio Raman con objetivo de 80X en un sustrato comercial con mezcla de oro y plata Klarite®.

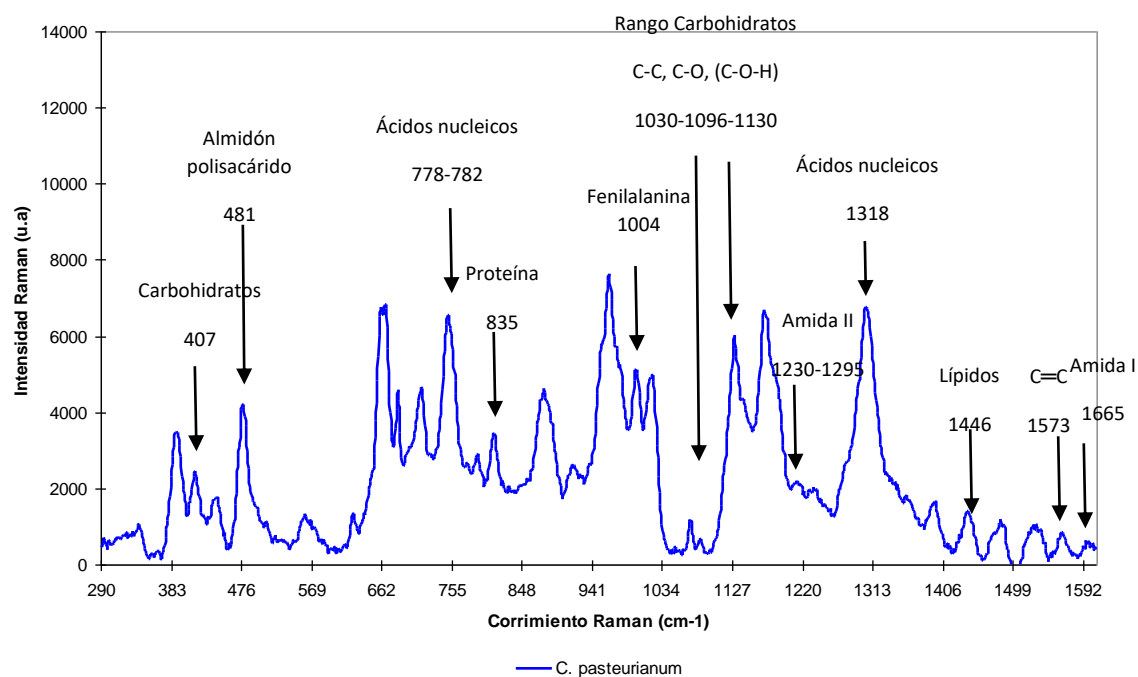


Figura 24. Espectro de *Clostridium pasteurianum* tomado con microscopio Raman con objetivo de 80X en un sustrato comercial con mezcla de oro y plata Klarite®.

6. CONCLUSIONES

Se probaron diferentes métodos, con espectroscopia Raman con dos fibras bifurcadas y una longitud de onda de 785 nm y 1064 nm, 400 mW y 500 mW respectivamente, con muestra líquida y seca de las dos diferentes cepas del género *Clostridium*. Se agregaron nanopartículas a las diferentes muestras, las cuales se prepararon en el laboratorio. Se utilizó también un microscopio Raman con una longitud de onda de 785 nm y una potencia máxima de 70 mW, el cual primero se puso una muestra de las células de *Clostridium pasteurianum* seguido de *Clostridium beijerinckii* por separado en un vidrio porta objetos, un vidrio de un sustrato de CaF_2 , y un sustrato de la marca Klarite y uno de la marca Oceanoptics. Para observar cual era el mejor material y el mejor método para el análisis mediante espectroscopia Raman.

En base a los resultados obtenidos, se puede concluir que la mejor técnica para la identificación de bacterias *Clostridium pasteurianum* y *Clostridium beijerinckii*, es la combinación de la técnica SERS con la microscopia Raman, ya que proporciona información espectral de grupos funcionales de los constituyentes principales de células microbiana, tales como, proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos.

El objetivo principal de este estudio fue para evaluar si las heterogeneidades y las distribuciones en la composición química de las células individuales de las dos diferentes cepas en un cultivo podrían ser detectadas. Para este objetivo, se analizó una muestra en la que las células se diferenciaron visiblemente (Figura 15 y 16). Algunas células todavía eran bastante pequeñas y con forma de vara; otros fueron agrandados y habían acumulado el polisacárido de almacenamiento granulosa. De hecho, algunos de los espectros mostraron el pico de granulosa característico a 481 cm^{-1} (espectros 1-3), mientras que otros no. En comparación, más características de la granulosa tipo almidón en células diferenciadas se puede encontrar en 941 cm^{-1} y en la región de $1080\text{-}1130\text{ cm}^{-1}$. En la otra mano, un

pico en la región de hidratos de carbono a 1050 cm^{-1} permanece bastante constante, lo que sugiere que este es un componente constitutivo, posiblemente desde la pared de la celda. Las células con poca o ninguna granulosa mostraron un pico de fenilalanina más alto a 1005 cm^{-1} y un poco más región pronunciada de amida III ($1220\text{-}1290\text{ cm}^{-1}$), lo que indica un mayor contenido de proteína relativa. Además, el pico alrededor de 1450 cm^{-1} (atribuido a las vibraciones de flexión de CH_2 , principalmente de los lípidos y aminoácidos de cadena larga) varía considerablemente en intensidad en diferentes celdas. Por lo tanto, se puede concluir que la composición química del único las células bacterianas pueden ser evaluadas por microscopía Raman con la ayuda de un sustrato comercial compuesto por nanopartículas de oro y plata, las diferencias en la composición de las células dentro de un cultivo la muestra puede ser detectada.

CRONOGRAMA

CUATRIMESTRE ACTIVIDAD	1 sep-dic 2015	2 ene-abr 2016	3 may-ag 2016	4 sep- dic 2016	5 ene- abr 2017	6 may-ag 2017	7 sep- dic 2017
Revisión bibliográfica							
Elaboración del protocolo							
Desarrollo de algoritmos y correlación del método tradicional y el método óptico							
Validación del método óptico para la caracterización de B. anaerobias							
Análisis de resultados							
Elaboración y envío del 1er manuscrito							
Defensa de la Tesis							

BIBLIOGRAFIA

1. Khanal, Samir Kumar. *Anaerobic Biotechnology for Bioenergy Production: Principles and Applications*. Ames, IA: Wiley-Blackwell, 2008. Ljungdahl, Lars G., Michael W. Adams, Larry L. Barton, James G. Ferry, and Michael K. Johnson. "Anaerobes in the Recycling of Elements in the Biosphere." *Biochemistry and Physiology of Anaerobic Bacteria*. Ed. Spring. 17-20.
2. Miramontes-Carrillo, J. M., A. J. Ibarra, R. M. Ramirez, and A. F. Ibarra. "Poblaciones Bacterianas Utilizadoras De Hidrógeno Presentes En El Tracto Gastrointestinal Del Avestruz (*Struthio Camelus* Var. *Domesticus*)." *Avances En Investigación Agropecuaria* 3rd ser. 12 (2008): 43-54
3. Castello, Elena, Veronica Perna, Claudia Etchebehere, and Liliana Borzacconi. "Producción de biohidrógeno a partir de residuos orgánicos." 2 Laboratorio De Ecología Microbiana (LEM) Instituto De Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE) MEC.45-50.
4. Buitron, G., and C. Carvajal. "Producción De Hidrógeno a Partir De Aguas Residuales." *Revista Digital Universitaria. UNAM*, 10 (2009).
5. González, C. & Durán, J. E. Producción de hidrógeno a partir del tratamiento anaerobio de vinazas en un reactor UASB. *Tecnol.* 27, 3–12 (2014).
6. Mejía, Alba Ayde Romero, Jorge Adrian Vásquez, and Armando Lugo González. "Bacterias, Fuente De Energía Para El Futuro." *RT Revista Tecnura* 16.32 (2012): 117.
7. Iñiguez, G., N. Acosta, L. Martinez, and J. Parra. "Utilización de subproductos de la industria tequilera. parte 7. compostaje de bagazo de agave y vinazas tequileras." *Revista Internacional De Contaminación Ambiental* 21 (2005): 37-50. Universidad Nacional Autónoma de México.

8. . López-López, Alberto, et al. “Tequila vinasses: generation and full scale treatment processes.” *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, vol. 9, no. 2, 2010, pp. 109–116.
9. Marino-Marmolejo, E N, et al. “Tequila vinasses acidogenesis in a UASB reactor with Clostridium predominance.” *SpringerPlus*, vol. 4, no. 1, 2015.
10. Basualdo Juan A.; Coto Celia E. & de Torres Ramón A (2006). *Microbiología Biomédica*. 2ª Edición. Editorial Atlante. España.
11. Catasús LI y Matías-Guiu X (1997). *Técnicas moleculares para la obtención de DNA y reacción en cadena de la polimerasa*. Servicio de Anatomía Patológica, Hospital de la Santana Creu i Sant Pau, Barcelona. Vol. 30, N°2.
12. K, Maquelin, et al.”Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy.” *Journal of Microbiological Methods*. Vol. 51, no. 3, 2002, pp. 255-271.
13. Pahlow, Susanne, Susann Meisel, Dana Cialla-May, Karina Weber, Petra Rösch, and Jürgen Popp. "Isolation and Identification of Bacteria by Means of Raman Spectroscopy." *Advanced Drug Delivery Reviews* 89 (2015): 105-20.
14. Kong, Kenny, et al. “Raman spectroscopy for medical diagnostics — From in-Vitro biofluid assays to in-Vivo cancer detection.” *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 89, 2015, pp. 121–134.
15. Schuster, K. Christian, et al. “Multidimensional Information on the Chemical Composition of Single Bacterial Cells by Confocal Raman Microspectroscopy.” *Analytical Chemistry*, vol. 72, no. 22, 2000, pp. 5529–5534.
16. Página web: www.renishaw.com
17. Hermelink A, Brauer A, Lasch P, Naumann D. Phenotypic heterogeneity within microbial populations at the single-cell level investigated by confocal Raman microspectroscopy. *Analyst* 134, 1149–1153 (2009).

18. Dragana K, Bernd K, Petra R. Identification of water pathogens by Raman microspectroscopy. Elsevier. Volume 48, 2014, pp 179-189.
19. Kneipp, Janina, et al. "SERS—a single-Molecule and nanoscale tool for bioanalytics." *Chemical Society Reviews*, vol. 37, no. 5, 2008, p. 1052.
20. He, Lili, et al. "Detecting single Bacillus spores by surface enhanced Raman spectroscopy." *Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety*, vol. 2, no. 4, 2008, pp. 247–253.
21. Iwan W. schie. *Methods and Applications of Raman Microspectroscopy to Single-Cell Analysis*. center for biophotonics, science, and technology, University of California–Davis, Sacramento, Ca, 95817, Usa. 2012.
22. Glasstone, Samuel. "Quantum Chemistry (Eyring, Henry; Walter, John; Kimball, George E.)." *Journal of Chemical Education*, vol. 21, no. 8, 1944, pp. 415.
23. Leopold, Nicolae, and Bernhard Lendl. "A New Method for Fast Preparation of Highly Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Active Silver Colloids at Room Temperature by Reduction of Silver Nitrate with Hydroxylamine Hydrochloride." *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 107, no. 24, 2003, pp. 5723–5727
24. Kneipp, Janina, et al. "SERS—a single-Molecule and nanoscale tool for bioanalytics." *Chemical Society Reviews*, vol. 37, no. 5, 2008, p. 1052.
25. Massart, D.L., Vandeginste, L.M., Buydens, M.C. *Chemometrics: A textbook*. Elsevier Science Publisher, 23, 395-397 (1988).
26. Otto, A. Surface-enhanced raman scattering: 'classical' and 'chemical' origins. *Topics in Applied Physics*, 54, 289-418.
27. Richard, G. Brereton. *Chemometrics, Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant*. John Wiley & Sons. Ltd (2002)
28. E. Smith and G. Dent, *Modern Raman Spectroscopy: A Practical Approach*, 1st ed., Wiley (2005).

29. D. A. Long, *The Raman Effect: A Unified Treatment of the Theory of Raman Scattering by Molecules*, 1st ed., Wiley (2001).
30. J. R. Ferraro, *Introductory Raman Spectroscopy*, Second Edition, 2nd ed., Academic Press (2002).
31. R. Sarpeshkar, T. Delbruck, and C. A. Mead, "White noise in MOS transistors and resistors," *IEEE Circuits and Devices Magazine* 9(6), 23–29 (1993) .
32. R. L. McCreery, *Raman Spectroscopy for Chemical Analysis*, 1st ed., Wiley-Interscience (2000).
33. C. A. Lieber and A. Mahadevan-Jansen, "Automated Method for Subtraction of Fluorescence from Biological Raman Spectra," *Appl. Spectrosc.* 57(11), 1363–1367 (2003).
34. Bouveresse, E., *Maintenance and Transfer of Multivariate Calibration Models Based on Near-Infrared Spectroscopy*, doctoral thesis, Vrije Universiteit Brussel (1997).
35. Savitzky, A., Golay, M.J.E. Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedure. *Anal. Chem.*, 36: 1627-1639 (1964).
36. Massart, D.L., Vandeginste, L.M., Buydens, M.C. *Chemometrics: A textbook*. Elsevier Science Publisher, 23, 395-397 (1988).
37. Richard, G. Brereton. *Chemometrics, Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant*. John Wiley & Sons. Ltd (2002)