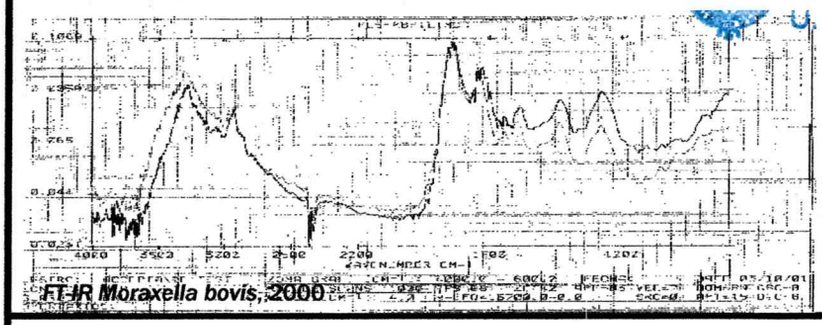
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA, FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS,
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



FT-IR Moraxella bovis, 2000

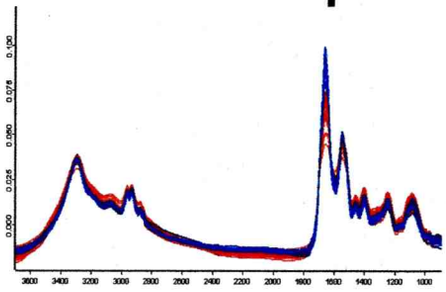
CARACTERIZACIÓN, DIFERENCIACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS POR ESPECTROSCOPÍA INFRARROJA - TRANSFORMADA DE FOURIER

TESIS DOCTORAL

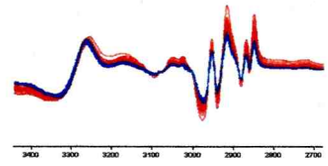
ALEJANDRA BOSCH

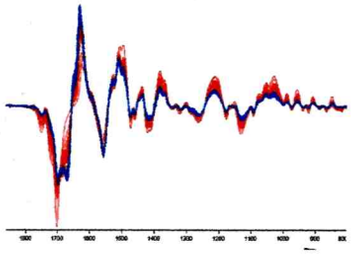
DIRECTOR: OSVALDO M. YANTORNO

SEPTIEMBRE 2005



FT-IT Moraxella bovis, 2004





El presente trabajo, para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI) "Dr. Rodolfo J. J. Ertola", bajo la dirección del Dr. Osvaldo M. Yantorno.

A mis hijas, Juliana y Manuela,
a Osvaldo,
a mis padres, El Capo y Rosita,
a mis hermanas, Silvia, Adriana y Liliana

Mi reconocimiento y agradecimiento,

A la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC-PBA), por las becas y cargos otorgados que permitieron el desarrollo del presente trabajo de Tesis.

Al CINDEFI por haberme permitido realizar este trabajo de Tesis Doctoral

Al CEQUINOR por haberme posibilitado el uso de los espectrómetros en las primeras etapas de mi trabajo

Mi agradecimiento,

A las personas aquí nombradas que de alguna u otra forma colaboraron para que este trabajo se concretara

Julio Figari

Cecilia Rebuffo

Diego Serra

Claudia Prieto

José Cúneo

Analía Abraham

Alejandro Miñan

Andrea Bernier

María Eugenia Rodríguez

Tato Cavalito

Celeste Diaz

Cecilia Tangorra

Diana Venturini

Laurita y Yanina

Mirian Berges

Susana Stoichevich

y a todos mis compañeros del CINDEFI!

Mi agradecimiento en particular por la formación académica y apoyo brindado,

Osvaldo Yantorno, Dieter Naumann, Juergen Schmitt, Peter Lasch, Maren Stamble, Mareike Wenning

Mi agradecimiento a los miembros del jurado

Parte de los resultados presentados en el presente trabajo han sido publicados:

1. Molecular characterization by infrared spectroscopy of Bordetella pertussis growing as biofilm.
Alejandra Bosch, N. Massa, A. Donolo and O. Yantorno. 2000
Physica Status Solidi (b) 220: 635-640.

2. Whole-bacterial cell enzyme-linked immunosorbent assay for cell-bond Moraxela bovis pili
Prieto, C., M. E. Rodríguez, **A. Bosch**, F. Chirdo, and O. Yantorno. 2003
Veterinay Microbiology, 91: 147-168.

3. Characterization of *Bordetella pertussis* growing as biofilm by chemical analysis and FT-IR spectroscopy
Bosch, Alejandra; Serra, Diego; Prieto, Claudia; Schmitt, Juergen, Naumann Dieter and Yantorno, Osvaldo.
Aceptado para su publicación en Applied Microbiology and Biotechnology, Septiembre 2005

Se han presentado las siguientes conferencias internacionales:

1. *Characterization of Lactobacillus spp. isolated from kefir grains by FT-IR spectroscopy*
Bosch Alejandra, Marina Golowczyc, Analía Abraham, Graciela De Antoni and Osvaldo Yantorno
Workshop: FT-IR Spectroscopy in Microbiological and Medical Diagnostic, llevado a cabo en el Robert Koch Institute, Berlin, Alemania desde el 24 al 26 de Octubre de 2002

2. *Development of a new technique for the detection of Moraxella bovis piliated cells using spectroscopic markers of type IV pili.*
Alejandra Bosch, Claudia Prieto, José Cúneo, Diego Serra, Dieter Naumann and Osvaldo Yantorno.
5th Workshop on "FT-IR Spectroscopy in Microbiological and Medical Diagnostic" 21 y 22 de Octubre de 2004, Robert Koch Institute, Berlin, Germany.

3. *Diferentiation and identification of Lactobacillus spp. by vibrational Spectroscopy techniques* Conferencia dictada en el Instituto de microbiología, Abteilung Mikrobiologie entralinstitt für Ernahrungs und Lebensmittel forshung (ZIEL) de la Universidad Tecnológica de Munich, Freising, Alemania.
Alejandra Bosch, Analía Abraham, Graciela De Antoni and Osvaldo Yantorno. 28 de octubre 2004.

PROLOGO

En los últimos 20 años se ha visto un importante crecimiento en el empleo de técnicas físicas rápidas, sensibles y de alta precisión para el análisis microbiológico. Entre ellas se podrían mencionar la espectrometría de masas (MS), la espectroscopía molecular (Fluorescencia, Infrarrojo y Raman), y la aplicación de tecnologías de laser y citometría de flujo. Estas tecnologías han avanzado paralelamente al desarrollo de técnicas de genética molecular. Todas ellas, en conjunto, permitirán en un futuro cercano llevar a cabo una caracterización molecular microbiana completa, sensible y específica.

*El espectro infrarrojo (IR) de una célula microbiana intacta es considerado como una señal altamente específica que constituye una verdadera huella dactilar (**fingerprint**) que puede ser utilizada para: (1) diferenciar, clasificar e identificar poblaciones microbianas (a nivel de especies y cepas); (2) detectar componentes intracelulares "in situ" como cuerpos de inclusión, materiales de reserva y endoesporas, pilis, flagelos; (3) monitorear el crecimiento de microorganismos creciendo en medio líquido, sólido y en biofilm y procesos biotecnológicos en general; (4) caracterizar y cuantificar metabolitos producidos durante un cultivo; (5) analizar comparativamente diferentes estados fisiológicos de una misma población y (6) estudiar interacciones droga-células. La información necesaria para llevar a cabo estos estudios microbianos se encuentra distribuida a través de toda la región infrarroja (IR) del espectro electromagnético: IR cercano (NIR), medio (MIR) y lejano (FIR). Las bandas anchas típicas y los complejos contornos espectrales que caracterizan a los espectros de microorganismos, células, tejidos, y fluidos biológicos pueden ser sistemáticamente analizados aplicando técnicas de aumento de resolución (deconvolución y derivadas), diferencias espectrales, métodos de reconocimiento de patterns como análisis factorial y análisis de clusters, y redes neuronales artificiales (ANNs). La cuantificación de componentes celulares también puede llevarse a cabo a través de diversas técnicas: convencionales basadas en la ley de Lambert y Beer, como el cálculo de áreas o alturas de bandas espectrales o bien las basadas en técnicas de análisis multivariante cuantitativo, las cuales tienen en cuenta el pattern de todo el espectro o de su derivada. Aplicaciones adicionales de la espectroscopia infrarroja se han podido llevar a cabo con la aparición de la microcopia óptica acoplada a la espectrometría, que ha permitido obtener espectros infrarrojos de microcolonias (menos de 10^3 bacterias) provenientes de poblaciones puras o mixtas. Por medio de la utilización de un controlador digital del espacio x-y, y técnicas de mapeo y video se han podido detectar, diferenciar e identificar microorganismos en menos de 8 horas.*

En los últimos años se han combinado las dos espectroscopias vibracionales, (IR y Raman), lo cual junto con el desarrollo de software específicos para reconocimiento de patterns han abierto un amplio camino en la investigación de materiales biológicos

INDICE

CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN A LA ESPECTROSCOPÍA INFRARROJA – TRANSFORMADA DE FOURIER

1. INTRODUCCIÓN 1
1.1. FUNDAMENTOS 1
1.2. TECNOLOGÍA DE LA ESPECTROSCOPÍA INFRARROJA
ESPECTRÓMETROS FT-IR 14
1.3. ESPECTROSCOPÍA FT-IR EN MATERIALES BIOLÓGICOS COMPLEJOS 18
1.4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL APLICADA EN FT-IR 30
1.5. MUESTREO DE CÉLULAS MICROBIANAS Y ADQUISICIÓN DE DATOS 40
1.6. TRATAMIENTO DE LOS DATOS 42
1.7. APLICACIONES 57
1.8. OBJETIVOS GENERALES 59
1.9 REFERENCIAS 61

CAPÍTULO II OPTIMIZACIÓN DE LAS ETAPAS INVOLUCRADAS EN LA TOMA DE ESPECTROS POR FT-IR CONTROL DE CALIDAD ESPECTRAL Y ROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN

1. INTRODUCCIÓN 69
2. OBJETIVOS 70
3. OPTIMIZACIÓN DE ETAPAS INVOLUCRADAS E LA TOMA DE ESPECTROS Y POSTERIOR TRATAMIENTO 71
4. CONCLUSIONES 98
5. REFERENCIAS 99

CAPÍTULO III DIFERENCIACIÓN, CLASIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LACTOBACILOS POR ESPECTROSCOPÍA INFRARROJA

4.1. INTRODUCCIÓN 101
4.2. OBJETIVO 103
4.3. DESCRIPCIÓN DE LA MCROFLORA DE LOS GRÁNULOS DE KEFIR 104
4.4. MÉTODOS 106
4.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 110

4.6. CONCLUSIONES 130
4.7. REFERENCIAS 131

CAPITULO IV APLICACIÓN DE ESPECTROSCOPÍA INFRARROJA – TRANSFORMADA DE FOURIER Y ANÁLISIS MULTIVARIANTE AL MEJORAMIENTO DE LA CALIDAD DE LA VACUNA QUERATOCONJUNTIVITIS INFECCIOSA BOVINA

1.INTRODUCCIÓN 138
2. OBJETIVOS 146
1. DESARROLLO DE UNA TÉCNICA BASADA EN ESPECTROSCOPÍA INFRARROJA Y ANÁLISIS MULTIVARIANTE PARA LA DETECCIÓN DEL NIVEL DE PILIACIÓN EN *MORAXELLA BOVIS* 147
1.1. MATERIALES Y MÉTODOS 147
1.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 149
1.3. CONCLUSIONES 161
2 ESTUDIOS DE DIVERSIDAD DE AISLAMIENTOS LOCALES DE *MORAXELL A BOVIS* 162
1. MATERIALES Y MÉTODOS 162
2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 164
3. REFERENCIAS 172

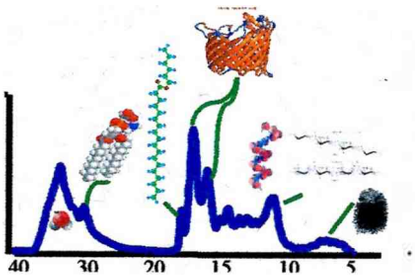
CAPÍTULO 5 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE CULTIVOS EN BIOFILM POR MÉTODOS BIOQUÍMICOS Y ESPECTROSCÓPICO

1. INTRODUCCIÓN 176
2. OBJETIVOS 184
3. MATERIALES Y MÉTODOS 186
4. RESULTADOS 193
5. DISCUSIÓN 207
6. BIBLIOGRAFÍA 213

CONCLUSIONES GENERALES 220

CAPÍTULO 1

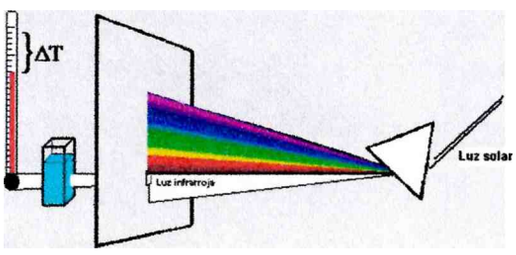
INTRODUCCIÓN
A LA ESPECTROSCOPÍA INFRARROJA – TRANSFORMADA DE FOURIER



1. FUNDAMENTOS

1.1. Origen de la espectroscopía infrarroja

La espectroscopía infrarroja tiene sus orígenes en los trabajos de Isaac Newton (1642-1727) quien realizó un experimento en el que hizo pasar en un cuarto oscuro, un haz de luz a través de un prisma, demostrando así que la luz blanca está compuesta por *diferentes colores*, desde el violeta al rojo. En el año 1800, el astrónomo Friedrich Wilhelm Herschel analizó la existencia de otros componentes de la luz blanca fuera de la región visible. Herschel estudió la capacidad de calentamiento derivada de cada color utilizando un termómetro con bulbos especiales (ennegrecidos). Además, cuando midió la temperatura en la zona del espectro más inmediata a la zona visible notó cierto tipo de *radiación invisible*. Encontró que dicha zona poseía una capacidad de calentamiento mucho mayor a las restantes. Herschel concluyó entonces que hay un tipo diferente de luz más allá de la porción roja del espectro, la cual no es visible al ojo humano. Este tipo de luz comenzó a ser conocida como luz infrarroja (debajo del rojo). En sus experimentos interpuso entre el prisma y el termómetro una celda conteniendo agua y observó que la temperatura medida era menor que la medida sin la celda, de modo que el agua debía haber absorbido parcialmente la radiación (**Fig. 1**).



Friedrich Wilhelm Herschel
(1738 - 1822)

Fig. 1 Experiencia de Friedrich Herschel que dió origen a la espectroscopía infrarroja. Tomado de Abrams, Charles B. 1993.

Herschel observó también que dependiendo de cómo era rotado el prisma (la región del espectro considerada variaba) la temperatura medida se modificaba. Este fue el inicio de la espectroscopía infrarroja. **La espectroscopía infrarroja mide la luz infrarroja que es absorbida por una sustancia. Esta absorción depende de la longitud de onda de la luz incidente.**

1.2. Radiación electromagnética

La naturaleza de la radiación ha sido interpretada por la teoría clásica de Maxwell (Tu 1982). De acuerdo a esta teoría ésta puede ser descripta como una combinación de un campo eléctrico (vector eléctrico **E**) y un campo magnético (vector magnético **H**), oscilando cada uno en un plano y perpendiculares entre sí y a la dirección de propagación, lo que se conoce como **radiación electromagnética**. La amplitud del vector eléctrico cambia a través del tiempo en forma de una onda sinusoidal como se muestra en la **Fig. 2**.

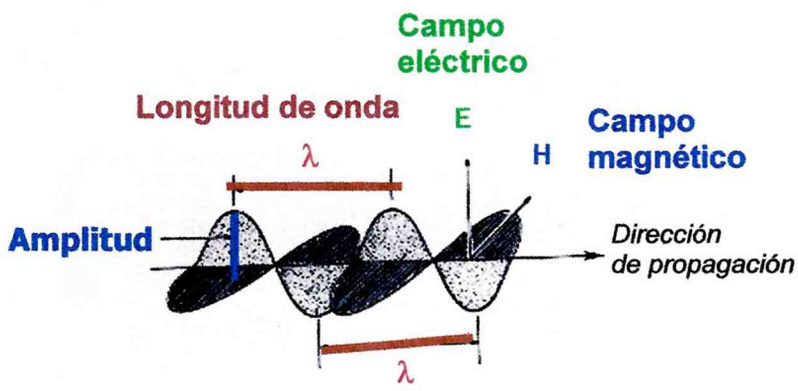


Fig. 2 Características de la onda electromagnética

La velocidad de propagación de dicha radiación es constante para todas las regiones del espectro y es conocida como **velocidad de la luz** (***c*** = $2{,}997952 \times 10^8$ $m.s^{-1}$). El campo eléctrico puede ser caracterizado por su **longitud de onda** (λ), definida como la longitud de un ciclo de oscilación o la distancia entre dos máximos de la onda sinusoidal y por la **frecuencia** (ν) que es el número de ciclos que pasan por un punto en un segundo. Ambas están relacionadas por la siguiente expresión:

$$\nu = c/\lambda$$

En espectroscopía infrarroja otro parámetro comúnmente utilizado es el **número de onda** (η) expresado en cm^{-1}. El mismo representa el número de ondas presentes en una distancia de 1 cm y está dado por la siguiente relación:

$$\eta = 1/\lambda = \nu/c$$

Expresar la relación en función del número de onda tiene la ventaja particular que éste es lineal con la energía.

Muchas experiencias realizadas durante el siglo XIX demostraron no ser consistentes con la teoría clásica donde la materia podía interaccionar con la energía de manera continua. Planck, Einstein y Bohr postularon que la radiación electromagnética puede ser interpretada como un flujo de partículas (*cuantos*) para la cual su **energía (E)** es proporcional a la frecuencia y está dada por la siguiente ecuación:

$$E = h.\nu$$

Donde **h** es la constante de Plank (**h** = $6{,}626 \times 10^{34}$) y ν es equivalente a la frecuencia de la teoría clásica. Finalmente fue Broglie en 1924 quien unifica la teoría electromagnética y la de los cuantos, demostrando la doble naturaleza de la luz, ondulatoria y corpuscular (Smith 1999).

Así como la radiación infrarroja pude ser evidenciada por cambios térmicos en la materia, también existen otros tipos de radiación más allá de la visible e infrarroja que pueden ser "visualizadas" utilizando otros sistemas de detección. Estas distintas radiaciones que se ilustran en la **Fig. 3,** pueden interactuar con la materia dando lugar a diferentes efectos. Los distintos tipos de radiación viajan a la misma velocidad pero con diferente longitud de onda o frecuencia ($c = \nu.\lambda$). **Las ondas de radio** fueron descriptas por Heinrich Hertz, quien en el año 1887, consiguió detectar ondas de radio con una longitud de onda del orden del metro capaces atravesar las nubes, la niebla y las paredes. **Las microondas** poseen longitud de onda entre 30 cm a 1 mm. Se usan en radares y otros sistemas de comunicación, así como en el análisis de la estructura atómica y molecular. **La región visible** es la más estrecha pero la más importante, ya que la retina es sensible a las radiaciones de estas frecuencias. La **radiación ultravioleta** posee longitudes de onda que se extienden entre 10 y 400 nm, con energía del orden de la energía de activación de muchas reacciones químicas. Los **Rayos X** constituyen la radiación que se produce luego de la aceleración de electrones y el posterior choque de los mismos contra una placa metálica. Los **Rayos Gamma** se localizan en la parte del espectro que tiene las longitudes de onda mas

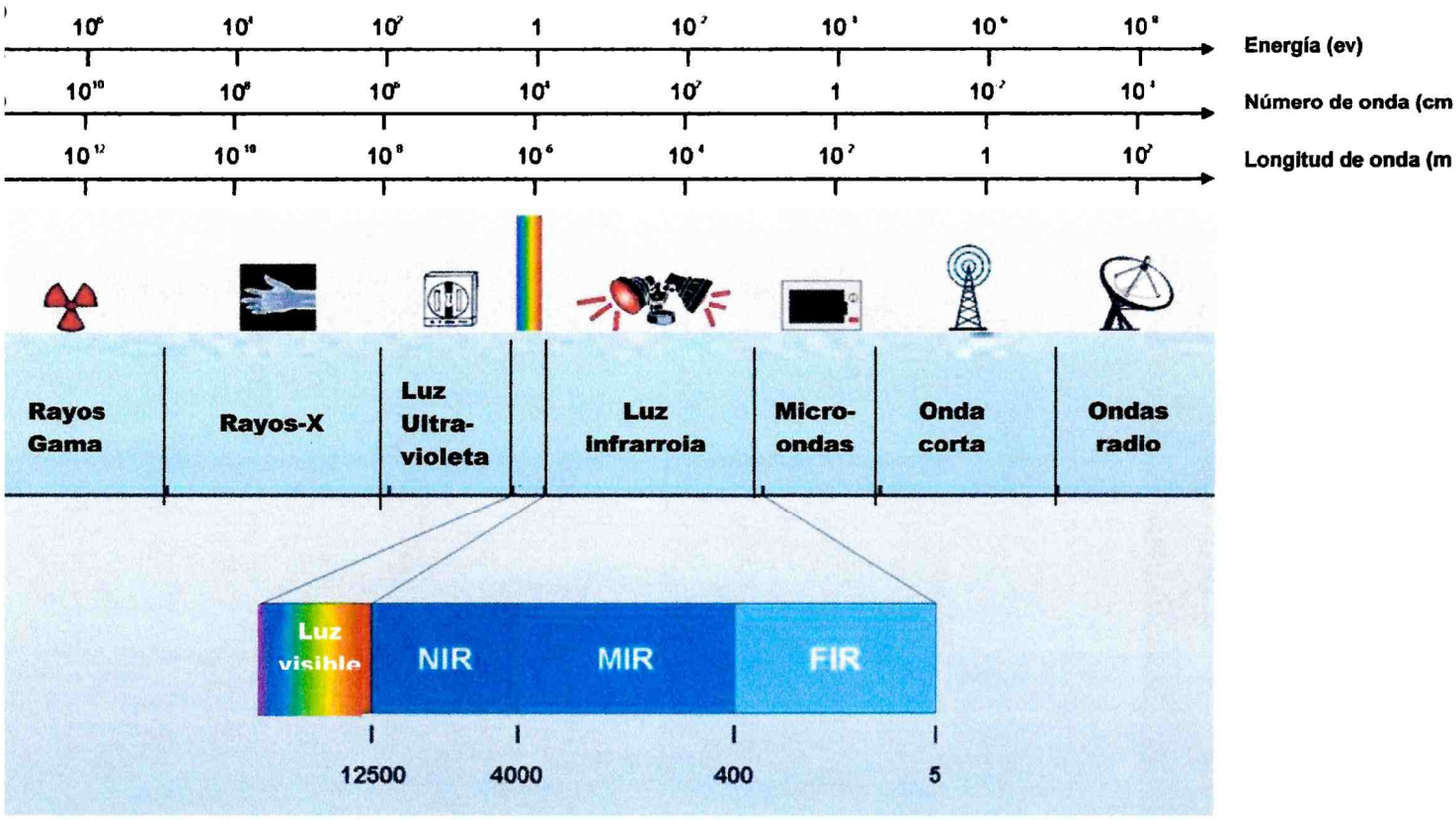


Fig.3 Espectro electromagnético

pequeñas, entre 10 y 0.01 nm. Se producen en los procesos nucleares, por ejemplo, cuando se desintegran las sustancias radioactivas.

1.3. Interacción de la radiación electromagnética con la materia

Cuando la materia es expuesta a la radiación electromagnética, ésta pude ser absorbida, transmitida, reflejada, dispersada, o generar como consecuencia de la absorción procesos fotoquímicos o fotoluminiscencia. Este último término es utilizado para designar diferentes efectos como fluorescencia, fosforescencia y dispersión Raman (**Fig. 4**). Cuando la luz incidente interactúa con la materia y es **absorbida** surge lo que se conoce como **espectroscopía de absorción**, que puede ser ultravioleta (UV), visible (V), o espectroscopía de absorción infrarroja (IR), según la energía de la luz incidente.

La espectroscopia infrarroja se basa entonces, en la absorción de luz infrarroja (4000 a 400 cm^{-1}) por parte de las moléculas. Esta absorción produce la excitación de los estados vibracionales, estiramientos y balanceos y estados rotacionales de las moléculas, los cuales poseen una frecuencia de vibración en el rango infrarrojo del espectro electromagnético. Debido a que el material biológico se estudia por lo general en suspensión, en fase líquida, o en polvos (liofilizados), el material se encuentra siempre en fase condensada, por lo que sólo los estados vibracionales serán los excitados por la radiación IR (Naumann 2000).

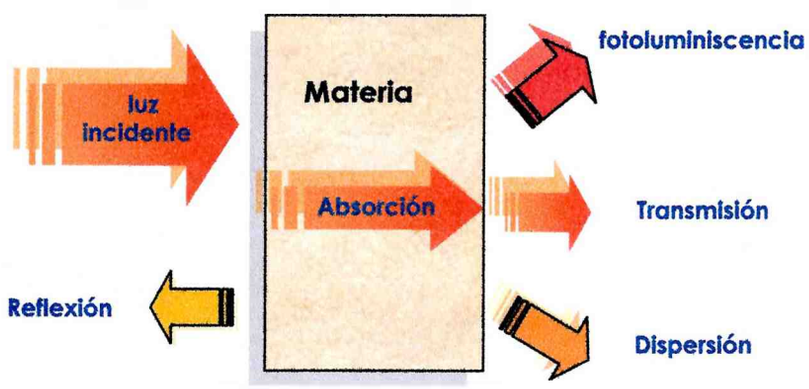


Fig. 4. Interacción de la radiación electromagnética con la materia.
Tomado de Naumann, conferencia La Plata, Noviembre 2003

Por lo tanto la mayoría de los espectros de las muestras en estudio presentarán las vibraciones correspondientes a los estiramientos, que ocurren a alta energía y las vibraciones correspondientes al balanceo de los enlaces que se producen a baja energía (**Fig. 5**).

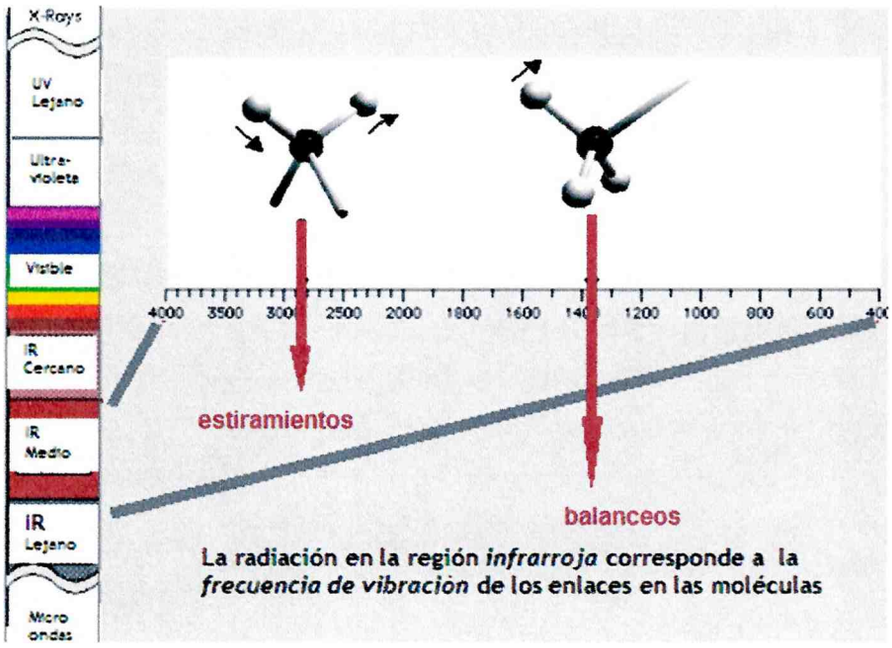


Fig. 5 Rangos de frecuencias de vibración en la región infrarroja para la mayoría de las moléculas. Tomada de Charles B. Abranms. Perkin Elmer, Argentina (Abrams 1993).

1.4 Origen de las bandas de absorción. Interpretación teórica

Las moléculas consisten en átomos, conectados por enlaces elásticos. Debido a la naturaleza elástica de estos enlaces entre los átomos ocurren movimientos periódicos. En una molécula, cada átomo pude moverse independientemente a lo largo de cada uno de los ejes de un sistema de coordenadas Cartesiano, de modo que cada átomo tendrá *tres grados de libertad* de movimiento (x, y, z). Si la molécula está constituida por N átomos, tendrá 3N grados de libertad de movimiento. Los grados de libertad traslacionales (3), involucran el movimiento simultáneo en la misma dirección paralela a los ejes de un sistema Cartesiano y no involucra un cambio en las distancias relativas entre los átomos. Existen otros tres, que tampoco involucran un cambio en la distancia relativa de los átomos y constituyen los grados de libertad rotacionales. Los otros movimientos restantes (3N-6) constituyen los movimientos en los cuales se modifica la distancia relativa entre los átomos: la longitud del enlace químico y el ángulo entre ellos. Todas las vibraciones de una **molécula ideal** resultan de la superposición de 3N-6 modos de vibración no interactivos entre sí para moléculas no lineales y 3N-5 para moléculas lineales.

La interpretación más sencilla de una molécula vibrando consiste en considerarla como dos átomos unidos por un resorte. La fuerza necesaria para separarlos una distancia **x** de la posición de equilibrio es proporcional a la constante de fuerza del

resorte, que constituye una medida de la fuerza del enlace, regida por la ley de Hook, a las masas ***m*** y su aceleración.

La **mecánica clásica** aproxima este modelo de movimiento de los átomos al de un **simple oscilador armónico**, donde los átomos son partículas de determinada masa que pueden vibrar con cualquier amplitud, es decir que el oscilador podría poseer un dado contenido energético. De este modo la vibración de una molécula biatómica puede ser descripta como dos masas m_1 y m_2 conectadas por un resorte de constante ***k***. La frecuencia de vibración ν es proporcional a la constante del resorte e inversamente proporcional a las masas:

$$\nu = \frac{1}{2\pi}\sqrt{\frac{k}{m}} \qquad ; \qquad m = m_1 \cdot m_2 / (m_1 + m_2)$$

Cuando el resorte es estirado y luego liberado vibrará con una engría (E) igual a:

$$E = \frac{1}{2} k x_{max}^2$$

El modelo permite entonces a los átomos vibrar a **cualquier energía total**, lo cual **no es cierto** para las moléculas.

La **mecánica cuántica** predice la misma relación que la mecánica clásica, entre la frecuencia de vibración entre dos átomos, sus masas y su constante ***k***, sin embargo, la mecánica cuántica predice que la molécula solo puede existir en **determinados niveles energéticos** (**n**). En el caso del potencial armónico, estos estados energéticos son equidistantes y cumplen con la siguiente ecuación:

$$E_n = (n + ½)\, h \cdot \nu \qquad n = 0,1,2,3...$$

En el modelo de un oscilador armónico cuántico las transiciones sólo pueden ocurrir desde un nivel energético dado hasta el inmediato superior o inferior ($\Delta n = \pm 1$). Sin embargo un espectro es un poco más complejo que esta descripción. Una de las razones es que en realidad las moléculas no constituyen osciladores armónicos sino **anarmónicos,** ya que si se apartan lo suficiente el enlace se rompe. En el potencial anarmónico la distancia entre los niveles energéticos decrece a medida que aumenta la energía. Los niveles de energía están igualmente espaciados sólo en la región donde el potencial anarmónico se asemeja al potencial armónico (solo el primer nivel). En este modelo, más real que los descriptos previamente, también se permiten

transiciones vibracionales a niveles superiores de energía a los que se les llama **sobretonos** y poseen una energía **cercana a 2hν** para la transición 0→ 2 pero de muy baja intensidad. La **Fig. 6a** muestra un esquema de la absorción producida bajo un modelo de un oscilador anarmónico cuántico. La última limitación que completa el modelo es que la molécula debe tener un dipolo que debe cambiar cuando ocurre la transición (**Fig. 6b**). El cuadro indicado en la **Fig. 6c** representa un resumen de la teoría vibracional.

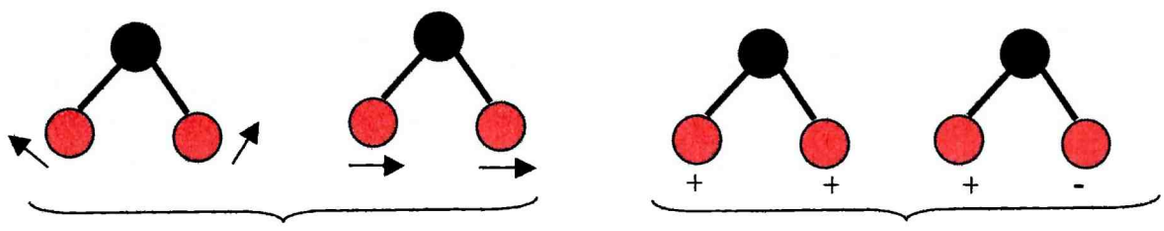
En resumen, las interacciones de la radiación con la materia pueden ser estudiadas en términos de cambios en los dipolos de las moléculas asociados a vibraciones y rotaciones. Las frecuencias de vibración dependerán de la constante de fuerza de los enlaces entre los átomos y las masas de los mismos. Las vibraciones pueden ser debidas a cambios en la longitud del enlace (estiramiento) o cambios en el ángulo de enlace (balanceo), siempre conservando el centro de masas:

Cambios en la longitud del enlace: ***Estiramiento***

simétrico *antisimétrico*

Cambios en el ángulo de enlace: ***Balanceo***

Deformación *rocking* *Wagging* *Twisting*



Movimientos en el plano Movimientos fuera del plano

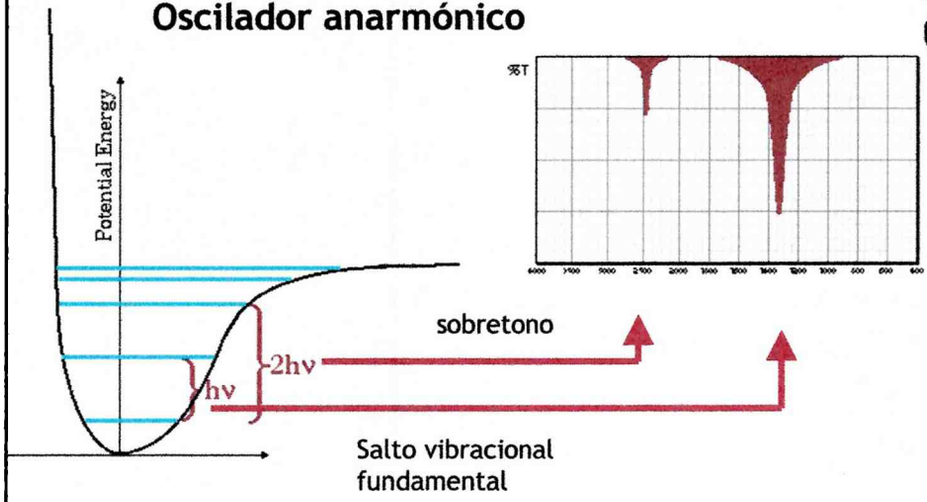
1.5. Observación de las vibraciones moleculares

De acuerdo a la mecánica cuántica las moléculas pueden tomar una cantidad determinada de energía ($h\nu_s$) para alcanzar el primer estado vibracional excitado. Una

Fig 7. Oscilador anarmónico cuántico. Teoría vibracional.

(a)

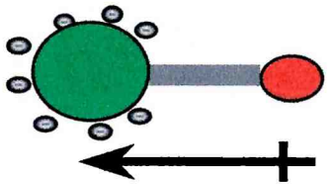
Oscilador anarmónico



La banda debida al **sobretono** aparece a una frecuencia casi del doble de la frecuencia fundametal y de menor intensidad. A menudo puede ser tan débil que no se ve

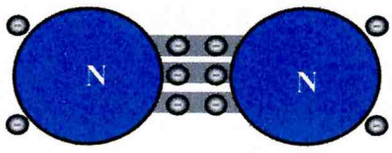
(b) **Cambios en el momento dipolar**

Para absorber luz infrarroja el dipolo de la molécula debe cambiar cuando ocurre la transición



Momento dipolar

El N_2 no presenta cambios en el momento dipolar a lo largo de la coordenada de vibración, por lo que no absorbe luz infrarroja



(c) **Resumen de la t eoría Vibracional**

- La frecuencia de vibración está relacionada con la constante de fuerza ***k*** y la masa relativa por la siguiente ecuación:

$$\nu = \frac{1}{2\pi}\sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

$$\mu = \frac{m_1 \cdot m_2}{m_1 + m_2}$$

- La molécula puede poseer solo **cuantos** de energía , dados por la fórmula

En= (n+1/2) h n=0,1,2,3...

- Las moléculas absorben **luz infrarroja** a una energía igual a **h (fundamental)** y a **2h (sobretono)**

- Para absorber luz infrarroja las moléculas deben poseer un **dipolo oscilante.**

molécula irradiada con un espectro continuo de radiación IR puede absorber la luz de esta energía. El espectro de la radiación remanente mostrará una banda de absorción a $h\nu_s$. De modo que el espectro IR de una muestra se obtiene escaneando la intensidad de la radiación infrarroja antes y después del pasaje del rayo IR a través de la muestra. Esto se representa mediante un gráfico de $T= I_s/I_r$ en función del número de onda, donde T es la ***transmitancia***, e ***Is*** y ***Ir*** las intensidades del rayo después y antes de atravesar la muestra. En muchos casos la ***absorbancia (A)*** es usada en lugar de la transmitancia (A=-logT), ya que para un número de onda dado, de acuerdo a la ley de Beer, resulta directamente proporcional a la concentración de la muestra. ***El espectro IR de la mayoría de los materiales consiste entonces, en un gran número de picos o bandas de absorción. Estas bandas se originan por la interacción (intercambio energético) entre cuantos discretos de energía y movimientos mecánicos (modos vibracionales y rotacionales) de moléculas, los cuales son excitados por la absorción de radiación IR.***

La luz infrarroja es una luz de relativamente baja energía, de modo que al producirse una absorción IR en las moléculas los niveles cuánticos vibracionales o rotacionales se excitan a un nivel cuántico vibracional o rotacional mayor pero no a un nivel quántico electrónico mayor. La **Fig. 7** muestra este proceso (Tu 1982)

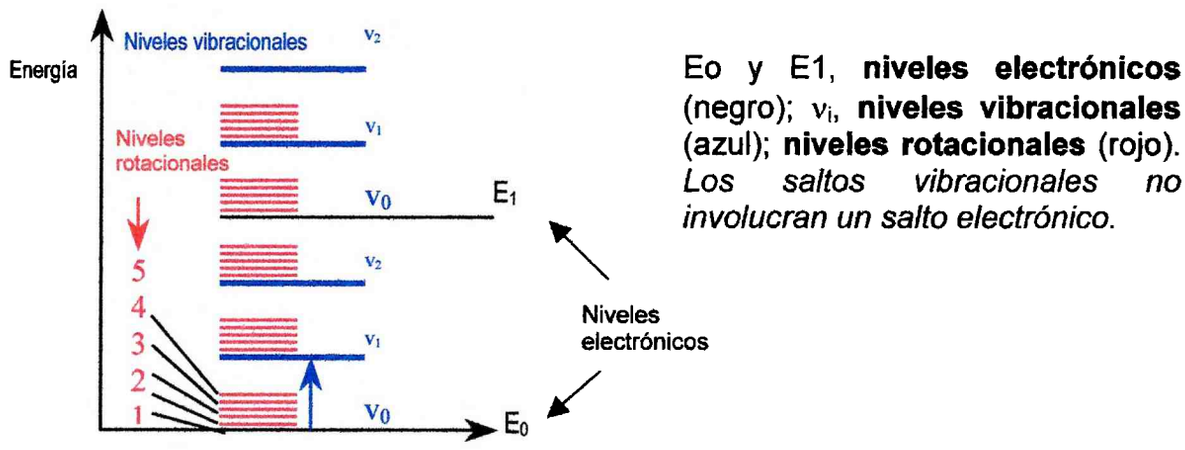


Fig 7. Niveles energéticos en una molécula.

Para una molécula sencilla como la del agua, las bandas observadas pueden ser interpretadas como provenientes de las 3 vibraciones indicadas en la **Fig. 8**.

Cada uno de los modos normales de vibración está asociado a una variación de energía potencial y consecuentemente a un conjunto de niveles energéticos.

1.6 Interpretación de los estados vibracionales en moléculas poli-atómicas complejas

Como se mencionó previamente, una molécula poli-atómica puede tener distintos modos vibracionales activos, de modo que es posible a través de radiación IR excitar dos o más vibraciones al mismo tiempo (Smith 1999). Para una molécula poli- atómica un poco más compleja que el H_2O, observaremos un total de **3N-6** modos normales de vibración. Si tomamos como ejemplo al pentano (C_5H_{12}), deberíamos considerar para el análisis 45 modos de vibración normales lo cual, aunque ya ha sido realizado en trabajos químicos, resulta muy complicado. Sin embargo podríamos simplificar este análisis asumiendo que **cada grupo funcional en la molécula puede ser tratado independientemente.**

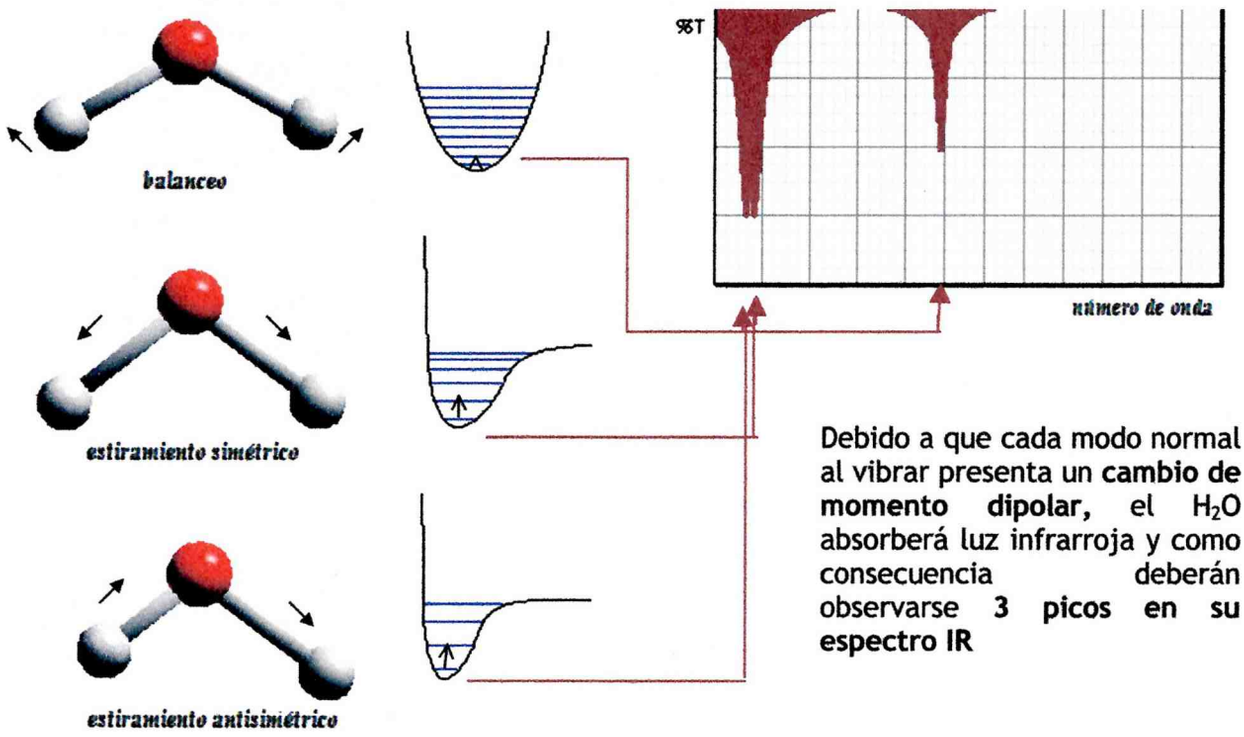


Fig. 8 Bandas de absorción vibracional para la molécula de H_2O

En el ejemplo del n-pentano, podríamos asumir que estamos en la presencia de dos grupos funcionales: metilos (CH_3) y metilenos (CH_2) (**Fig. 9**).

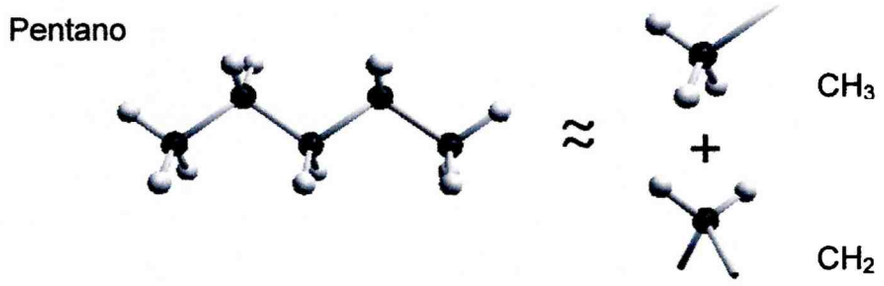


Fig. 9 Esquema simplificado de la molécula del pentano que permite la interpretación de las bandas espectrales obtenidas. El modelo simplificado para el pentano asume que esta molécula puede ser tratada como constituida por dos grupos funcionales: metilo (CH_3) y metileno (CH_2). Cada grupo funcional en la molécula puede considerarse independientemente. Tomado de Abrams, Charles B. 1993.

Cada grupo funcional tiene un conjunto propio de frecuencias de vibración que corresponden a sus modos normales de vibración. Bajo esta consideración el espectro del pentano sería la suma de los picos debido a ambos grupos funcionales tomados independientemente sin considerar dónde se encuentre el grupo dentro de la molécula (**Fig. 10**).

Los picos que se encuentran a número de onda mayor a 1400 cm^{-1} (**Fig. 10a y c**) corresponden a los estiramientos simétricos y antisimétricos y a los balanceos de los enlaces C-H correspondientes al $-CH_3$ y $>CH_2$. Las bandas a número de onda menor a 1400 cm^{-1} son parte de la denominada ***región de huella dactilar*** (***fingerprint***) (**Fig. 10b y c**). Las bandas observadas en esta región dependen de la estructura global de la molécula, más que a estiramientos o balanceos de un enlace químico. El dibujo (***pattern***) en esta región es **ESPECÍFICO** para cada molécula, por lo que permite la **comparación con espectros de referencia** para identificar o discriminar entre moléculas muy similares. La **Fig. 10c** muestra el espectro total IR de la molécula de pentano.

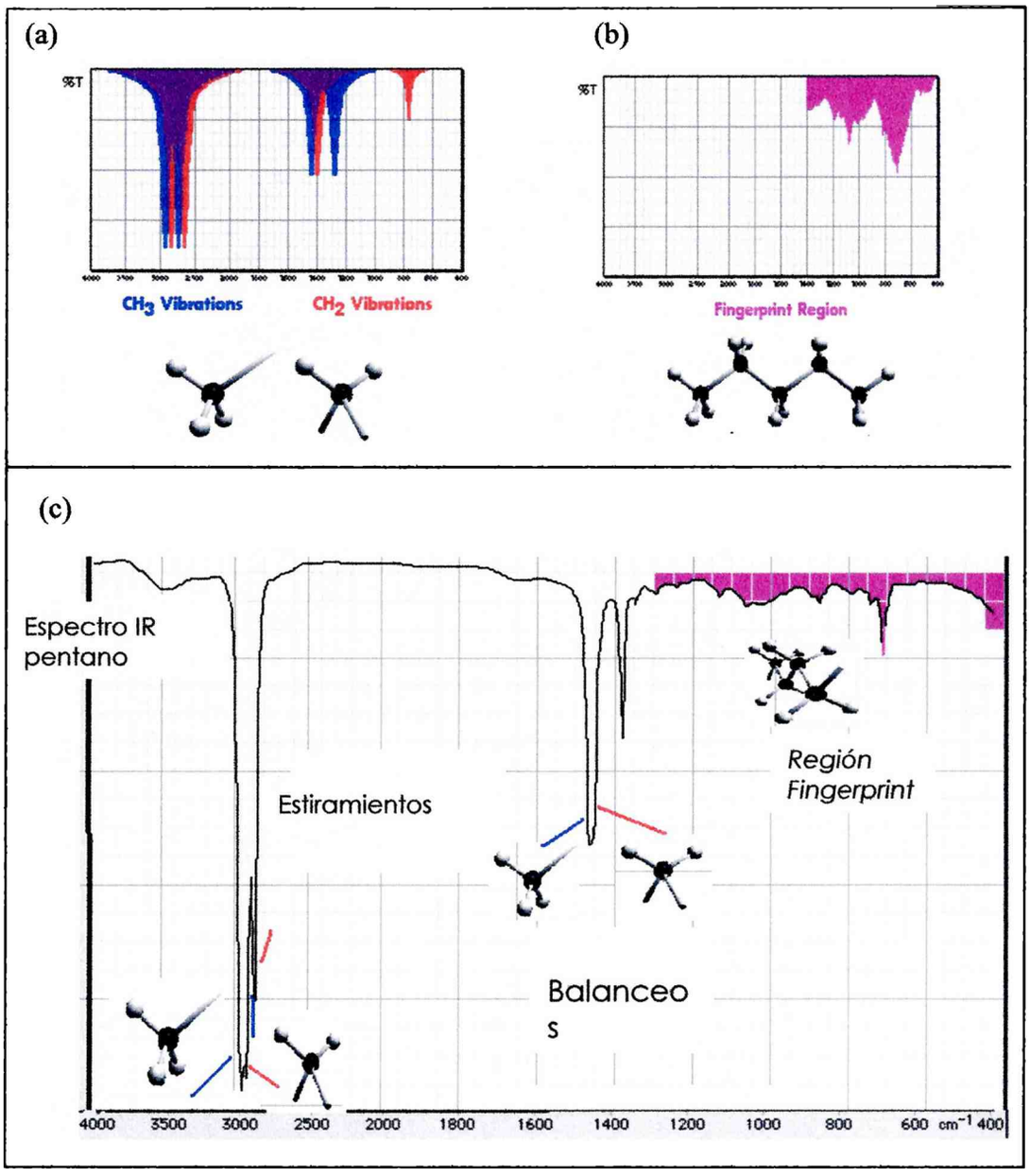


Fig. 10 Interpretación del espectro IR de la molécula de pentano. Tomado de Charles B. Abrams,1993.

1.7. Intensidad y ancho de banda

Hasta aquí hemos analizado el origen de algunas bandas de absorción IR encontradas en diferentes moléculas, sin tener en cuenta la intensidad o el ancho de las mismas. Existen dos causas principales que dan origen a la diferente **intensidad** de bandas. Una es la **concentración del componente en la muestra** y la otra es la **magnitud del cambio en el momento dipolar del grupo funcional** que dio origen a dicha

banda en la muestra (Smith 1999). La relación que tiene en cuenta ambas causas es la **ley de Beer**

$$A = \varepsilon\, l\, c,$$

donde **A** representa la absorbancia, la cual es medida por el alto o por el área de la banda, **l** constituye el paso óptico que por lo general tiene un valor del orden de los micrones para muestras sólidas y líquidas. La concentración (**c**) pude ser medida en moles.l^{-1}, ppm, % (p/p), o cualquier otro tipo de unidad de concentración. Finalmente, la absortividad molar (ε,) es un parámetro proporcional al cambio en el momento dipolar y representa, para una muestra dada a un determinado número de onda, una ***constante invariante***, como lo es el punto de fusión, de ebullición o el peso molecular. Además de la posición y la intensidad, otro importante parámetro a tener cuenta en la caracterización de una banda o pico es su ancho de banda.

En el estudio de muestras condensadas (sólidas o líquidas), que serán las analizadas en este trabajo, los diferentes grupos funcionales en las moléculas dan origen a diferentes anchos de banda. El ancho de una banda en un espectro infrarrojo está determinado por el número de **entornos químicos** presentes en la molécula. Éstos están relacionados con **la fuerza de las interacciones intermoleculares**. Un ejemplo de un fuerte enlace intermolecular es el enlace o puente de H. Cuando un puente de H está presente, la banda de absorción correspondiente a los grupos funcionales involucrados es ancha. Este tipo de interacción afecta la estructura electrónica, y por lo tanto la constante de fuerza de los enlaces de una molécula. Esta constante de fuerza es la que determina a qué frecuencia se producirá la absorción de luz IR.

Una de las principales razones por la cual es posible observar un aumento en el ancho de bandas es el caso de que exista superposición de picos (Smith 1999). Podría suceder que dos o más grupos funcionales provenientes de una o más moléculas tengan su banda de absorción a un número de onda similar o muy cercano, esto producirá un aumento en el ancho de banda debido a la superposición de picos. Esta superposición de bandas es observada en los espectros IR de material de origen biológico.

2. TECNOLOGÍA DE LA ESPECTROSCOPIA INFRARROJA: EL ESPECTRÓMETRO INFRARROJO CON TRANSFORMADA DE FOURIER.

El fundamento principal que da origen a la espectroscopia contemporánea, se basa en la construcción de un **interferograma.** El mismo se origina por la interferencia de la radiación entre dos rayos y constituye una señal producida en función del cambio de

paso óptico entre dos rayos, ocasionado por el desplazamiento de un espejo móvil. Los parámetros obtenidos son luego inter-convertidos por el algoritmo matemático de la *Transformada de Fourier* (Stuart B).

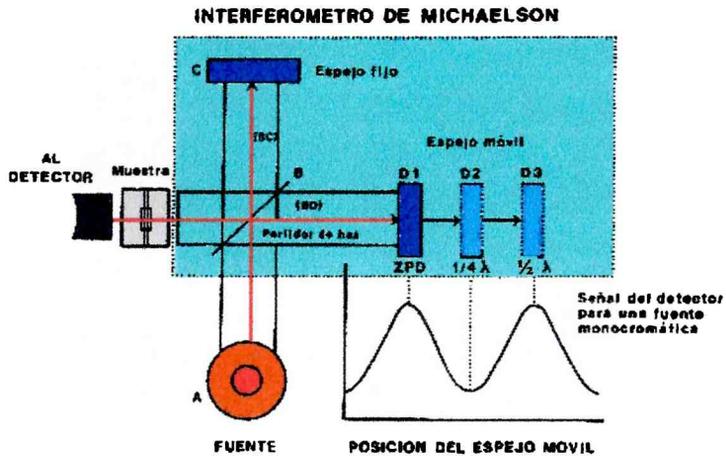
Los principales componentes de un espectrómetro FT-IR se muestran en la **Fig. 11a.** La radiación emergente de una fuente de luz, pasa a través del interferómetro y luego por la muestra para posteriormente alcanzar al detector. Una vez amplificada dicha señal, los datos son digitalizados por un convertor analógico-digital y luego transferido a una computadora para llevar a cabo la transformada de Fourier.

El interferómetro más ampliamente utilizado es el llamado **interferómetro de Michaelson (Fig. 11b (i))**. El mismo consiste en dos espejos ubicados perpendicularmente entre si, uno fijo (C) y otro móvil (D), y de un bifurcador de rayos (***bean splitter***) de KBr cubierto con Germanio (materiales transparentes al IR medio) que divide el rayo IR en dos partes. Si un haz monocromático de longitud de onda λ pasa a través de un *bean splitter* ideal, el 50% de la radiación se transmitirá a uno de los espejos y el 50% será transmitida al otro espejo. Los dos rayos serán reflejados por los respectivos espejos, retornarán al *beam splitter* donde se recombinarán e interferirán. Desde allí el rayo pasará a través del bifurcador (denominado rayo transmitido) y atravesará la muestra para luego alcanzar al detector. Si el espejo móvil sufre un pequeño desplazamiento se producirá una diferencia en el camino óptico respecto al rayo que refleja en el espejo fijo. De este modo, al moverse el espejo móvil (D) **(Fig. 11b (i))**, los dos haces que convergen en el *bean splitter* estarán fuera de fase y la señal que llega al detector decrecerá. Cuando el espejo se ha movido hasta ¼ de longitud de onda (D2) los haces convergentes tienen un desfasaje, entonces la interferencia es destructiva y la señal que llega al detector es cero. El movimiento del espejo dará entonces, máximos en los caminos ópticos de longitud de onda ½ λ (D3) y mínima en ¼ λ de distancia (D2). La distancia recorrida por el espejo móvil, se llama *diferencia de camino óptico* o *retraso*. El movimiento del espejo ocurre a velocidad constante. Cuando las diferencias en los caminos ópticos son de una distancia (n+1/2) λ, los dos rayos interferirán constructivamente y la señal que llega al detector será máxima. **(Fig. 11b (ii))**.

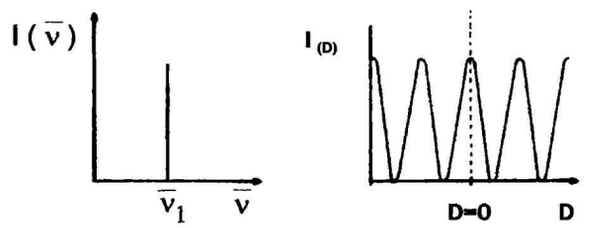
(a)

(b)

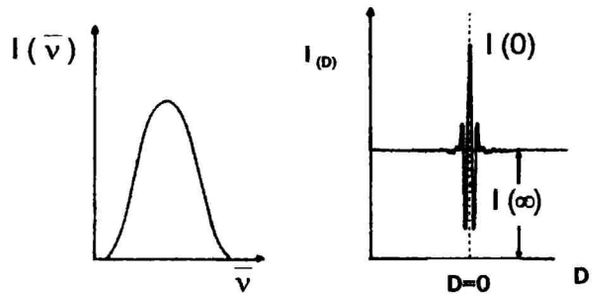
(i)



(ii)

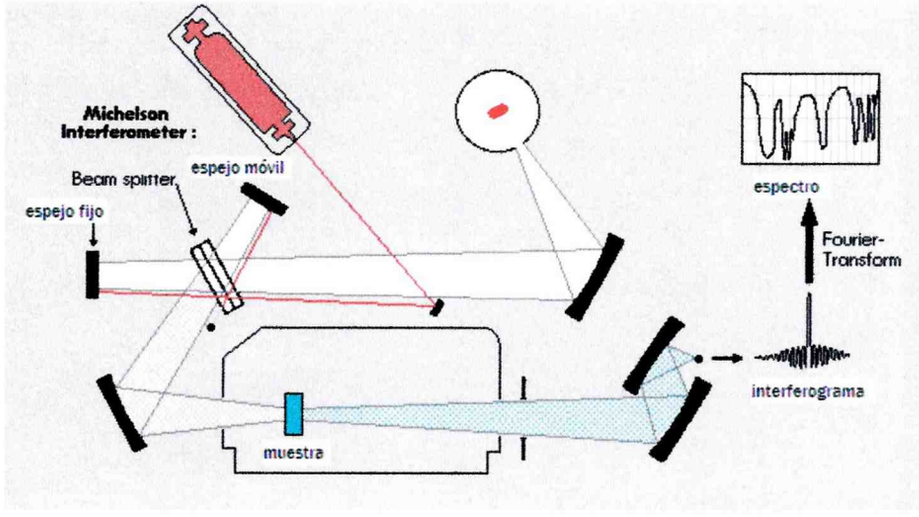


(iii)



Tomado de Naumann, D. 2000

(c)



Tomado de Abrams, Charles B., 1993

Fig. 11. Espectrómetro IR con transformada de Fourier

(a) Esquema de los principales componentes de un espectrómetro FT-IR; (b) Componentes y principios que rigen el funcionamiento del interferómetro de Michaelson: (i) Principales componentes del instrumento: fuente de luz IR, bifurcador de la luz (*beam splitter*), espejo fijo y móvil, detector y muestra. (ii) Fuente de luz de una sola frecuencia modulada a una señal sinusoidal que será observada por el detector. (iii) Fuente de Nernst (todas las frecuencias) es transformada en un *interferograma*; (c) esquema completo de un interferómetro FT-IR.

Si una fuente de luz blanca atraviesa el *beam splitter* todas las señales moduladas se superponen. La representación de la intensidad de esta onda frente a la distancia recorrida por el espejo es lo que se llama *interferograma* (**Fig. 11b (iii)**). La principal característica del interferograma proveniente de una luz blanca es que todos los datos puntuales de una señal contienen información de toda la región IR espectral. El detector está permanentemente observando todas las frecuencias al mismo tiempo.

El interferograma luego de ser registrado es amplificado y digitalizado por el convertor A/D, computarizado, y finalmente transformado a un espectro por técnica rápida de transformada de Fourier (**Fig.11c**). De modo que el auxilio informático, en el caso de FT-IR es indispensable. Sin entrar en un estudio exhaustivo sobre la conversión de un "pattern" de interferencia en un espectro, la transformada de Fourier consiste en un modo matemático de clasificar las frecuencias individuales para lograr la representación final de un espectro (número de onda vs. Absorbancia).

La esencia del tratamiento matemático de la transformada se basa en dos ecuaciones interconvertibles, denominadas ***el par Transformada de Fourier***. La primera muestra la variación en energía ($I_{(\delta)}$) en función de la diferencia de paso óptico y la segunda, muestra la variación de intensidad ($B_{(v)}$) de la fuente a las distintas frecuencias:

El par transformada de Fourier

$$\begin{cases} I(\delta) = \int_{-\infty}^{\infty} B(v) \cos 2\pi v\, \delta \,.\, dv \\ B(v) = \int_{-\infty}^{\infty} I(\delta) \cos 2\pi v\, \delta \,.\, d\delta \end{cases}$$

Respecto a las fuentes de IR utilizadas, la fuente de Nerst o de Globar son las más comúnmente empleadas y respecto a los detectores existen deferentes tipos los cuales se caracterizan por su diferente sensibilidad, por la región del IR en la cual

pueden ser utilizados, por la potencia de la fuente, etc. Los dos tipos de detectores más comúnmente utilizados para el estudio de muestras de origen biológico en la región de IR media son los detectores para interferómetros de barrido rápido: los llamados **MCT** (mercurio-cadmio-telurio) y los piroeléctricos **DTGS** (sulfato de triglicina deuterado) que se utilizan con interferómetros de menor velocidad de barrido. La **Tabla 1** resume las principales características de ambos tipos de detectores y en la **Fig. 12** se comparan sus sensibilidades relativas en función de la región espectral.

Tabla 1. Principales características de los detectores utilizados en la región IR media

Tipo de detector	*Región del espectro (cm^{-1})*	*Rango potencia de luz incidente (mW)*	*Características*
DTGS	14000-200	1-20	• Responden en toda la región espectral • Respuesta constante en toda la región • Sensible a cambios de T inducida por la radiación IR • Trabajan a T ambiente
MCT	5000-800, 5005-500 5000,400	0.01-0.2 0.04-0.4 0.04-0.4	• Son semiconductores • Responden a frecuencias mayores a 800, 500 o 400 (según el *"bandgap"* del detector) • Trabajan a bajas temperaturas. Requieren de N_2 líquido para su enfriamiento. • Se utilizan cuando la señal es muy baja, ej: microespectroscopía.

Tal como se indica en la **Fig. 12** el detector del tipo DTGS posee una sensibilidad constante en todo el rango espectral IR, incluyendo el IR cercano, mientras que los MTC tienen una aplicación más restringida aunque su sensibilidad es mucho mayor.

3. ESPECTROSCOPÍA FT-IR EN MATERIALES BIOLÓGICOS COMPLEJOS

Es posible obtener espectros IR de cualquier tipo de materiales biológicos tales como:

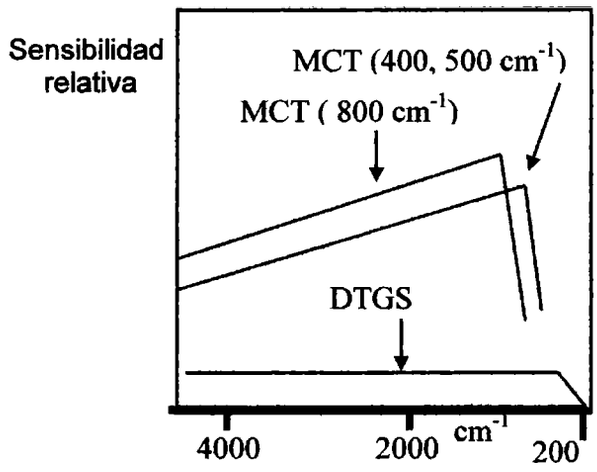


Fig. 12 Detectores FTIR

Comparación de las sensibilidades relativas de los detectores más utilizados en IR medio para el análisis de muestras biológicas

células procariotas y eucariotas, tejidos y fluidos biológicos. Cualquiera sea el sistema en estudio, para su interpretación debemos tener una idea sobre su tamaño, composición y estructura química. En modelos de interpretación muy sencilla todos los sistemas biológicos están compuestos por agua, ácidos nucleicos, lípidos, proteínas y carbohidratos. La **Tabla 2** muestra un resumen de la composición y las principales características de las células procariotas (bacterias) y eucariotas (levaduras y células animales) a tener en cuenta para analizar un sistema biológico (Naumann, D., 2000).

Para llevar a cabo la interpretación y análisis espectral de tejidos es importante tener presente que para células normales la relación RNA/DNA es de aproximadamente 5, que el contenido de ácidos nucleicos, en base a biomasa seca, es como mínimo de un 25 %, que el contenido en proteínas es del orden del 50-60 % y que el resto corresponde a otros componentes como carbohidratos, lípidos y otros componentes de bajo peso molecular (**Tabla 2**). También es importante resaltar que en el citoplasma de las células animales (humanas) la concentración proteica es sumamente alta (100mM), lo mismo que la concentración promedio del DNA en el núcleo, lo que indicaría que los componentes en la célula no se encuentra en solución, sino en una fase semejante a un gel (*gel-like phase*). También debe notarse que en los materiales biológicos, tanto en células procariotas, eucariotas, en tejidos y en fluidos, existe una gran variabilidad temporal y espacial en la composición química. Los cambios

temporales en células dependen entre otros factores de la edad de las células y del tipo y condición de cultivo.

Tabla 2. Composición y características promedio halladas en células procariotas y eucariotas

Tamaño y Composición [c]	*Bacterias*	*Levaduras* [a]	*Células animales* [b]
Radio (μm)	~1	~10	10-100
Volumen (μm³)	~1	~100	>10.000
Tiempo de generación (h)	0.2-10	2-10	~20
Pares de bases de ADN	~$4x10^6$	~$20x10^6$	500-$5.000x10^6$
Número de genes	~4.000	~20.000	>50.000
Tamaño de los ribosomas	70 S	80S	80S
ARN % (p/p)	5-15	30-10	10-20
ADN % (p/p)	2-4	1-3	5
Proteínas % (p/p)	40-60	40-50	~60
Lípidos % (p/p)	10-15	5-20	10-15
Carbohidratos % (p/p)	10-20	20-25	6-8

Si el espectro IR del pentano, constituido tan solo por 5 átomos de C y 12 átomos de H resultaba complejo (45 modos vibracionales), ¿qué podríamos esperar para un sistema biológico cuya composición y estructura se resume en la **Tabla 2**?.

Como se mencionó previamente, debido a que las muestras de los sistemas biológicos se encuentran en fase condensada (sólido, líquido o suspensiones), los modos vibracionales son los más importante y los que darán origen a las bandas de absorción en la región del infrarrojo medio (entre 700 y 4000 cm^{-1}). La **Fig. 13** muestra espectros IR de diferentes materiales biológicos: células animales (cerebro de ratón), bacterias (*Staphylococcus aureus*) y un fluido biológico (líquido sinovial). Tal como puede observarse en dicha figura los tres espectros si bien son diferentes, por estar constituidos por las mismas macromoléculas, poseen una forma similar.

Del mismo modo que se analizó el espectro IR del pentano, podríamos hacer una primera aproximación a una interpretación de los espectros de la **Fig. 13.** Las bandas de absorción observadas entre 4000 y 1400 cm^{-1} provienen principalmente de estados vibracionales fundamentales y pueden ser generalmente asignados a estiramientos y balanceos de grupos funcionales en particular. A números de onda menores

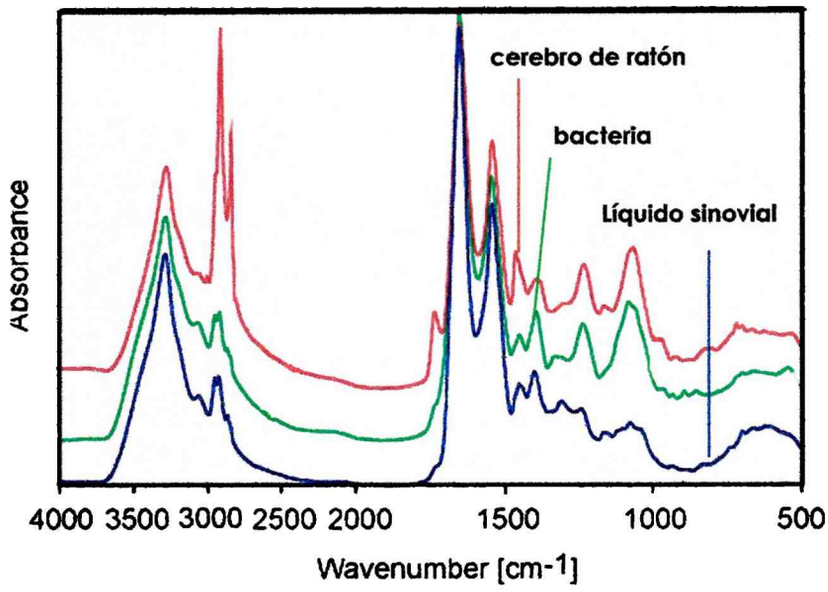


Fig. 13 Espectros IR obtenidos de diferente material biológico: Muestra de tejido: células obtenidas de cerebro de ratón ——. Muestra microbiana: suspensión de *Staphylococcus aureus.* ——. Fluido biológico: líquido sinovial aspirado de un paciente con artritis reumatoidea ——. Todos los espectros fueron medidos en forma de film seco sobre una celda de ZnSe. (Tomado de Naumann 2001).

a 1400 cm^{-1} se pueden encontrar bandas debidas principalmente a balanceo de enlaces, bandas que no resultan de modos vibracionales localizados, sino más bien de acoplamiento de bandas vibracionales o de movimientos del "***esqueleto***" de las moléculas, los cuales son muy difíciles de de interpretar o describir.

A fin de simplificar la interpretación de los espectros de materiales biológicos, diversos grupos de trabajo han realizado estudios que permiten llevar a cabo la asignación de bandas a diferentes grupos funcionales. Los primeros estudios para realizar una correlación espectro-estructura se hicieron comparando los espectros producidos por **las macromoléculas que constituyen los componentes principales** de todo material biológico: lípidos, DNA, proteínas y carbohidratos (Li-Vien y col. 1991;) Diem y col 1999). En una primera aproximación, se superpusieron espectros de cuatro macromoléculas purificadas (fosfatidilcolina, DNA, hemoglobina y glucógenos), tomándolas como representantes de dichos constituyentes. Así, se le pudo asignar a cada banda ancha de un espectro IR, su correspondiente componente macromolecular presente en los materiales biológicos (**Fig. 14**).

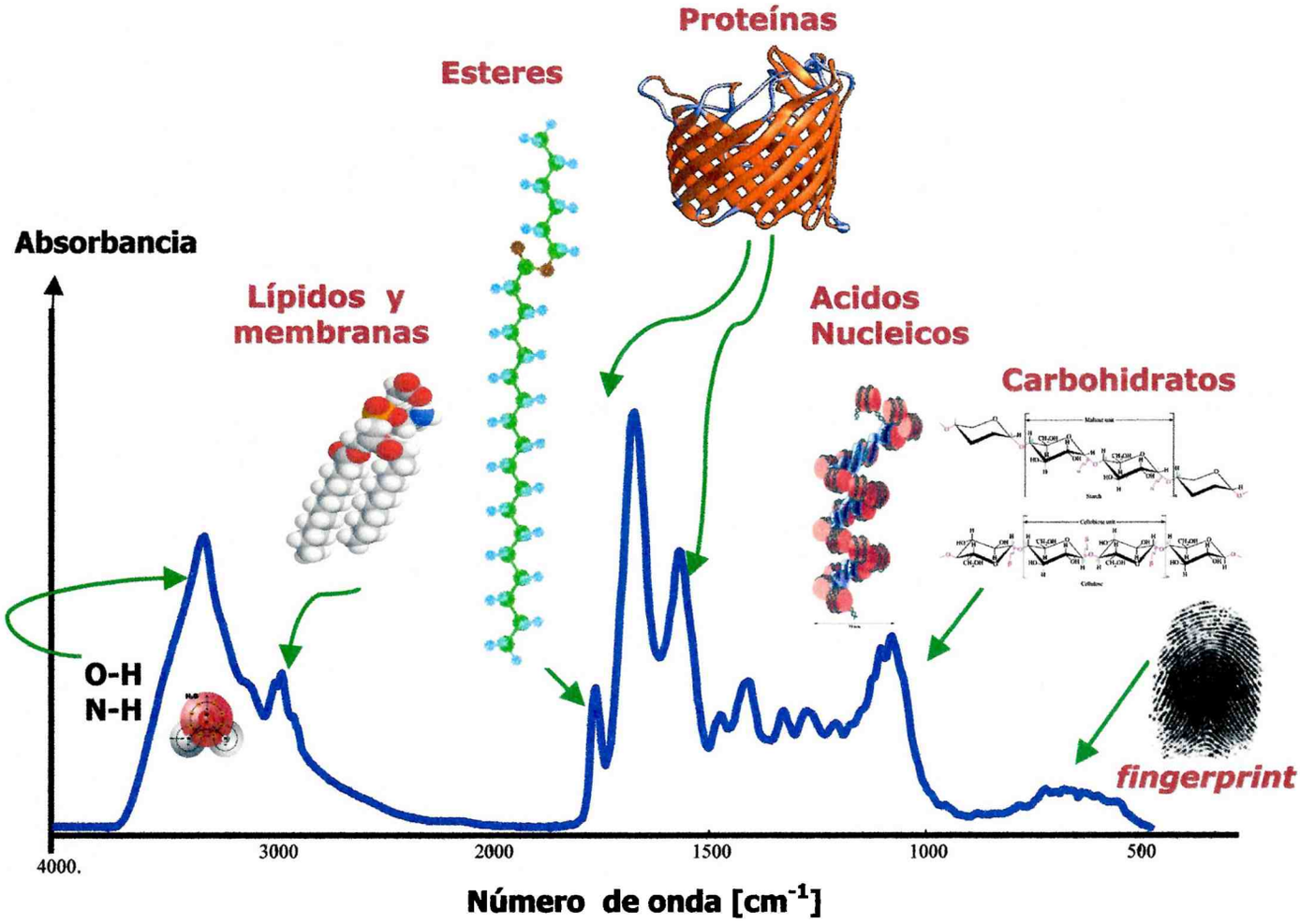


Fig. 14 Asignación de las bandas espectrales a las principales macromoléculas constituyentes del material biológico. Espectro FT-IR de un film de una suspensión de *B. pertussis* en celda de ZnSe.

Estos fueron los primeros estudios que indicaron que el espectro FT- IR, en particular de una bacteria, representaba un fenotipo que contenía información sobre las biomoléculas de la pared celular, membranas plasmáticas, citoplasma, polímeros intracelulares. Así se pudo establecer que un espectro constituye una representación del fenotipo, que resulta altamente específico y reproducible bajo las mismas condiciones de operación.

Posteriormente se vio que la asignación de picos o frecuencias de absorción a una determinada estructura o grupo funcional, se trataba ciertamente de una tarea muy compleja debido a que el ancho de las bandas hacía dicha asignación muy difícil y

ambigua. Sin embargo, se aplicaron sobre los espectros técnicas de aumento de resolución como son la derivada segunda o la deconvolución (se discutirán posteriormente) que permitieron distinguir mejor los picos que componen las bandas anchas de los espectros de materiales biológicos complejos. Aplicando estas técnicas es posible diferenciar de un espectro con aproximadamente 10–15 bandas anchas un total de 50-70 componentes. La **Tabla 3** resume estas asignaciones tentativas de las principales bandas indicando la referencia bibliográfica respectiva de la cual fue tomada la información. La utilización de la derivada segunda ha permitido llevar a cabo no sólo la **asignación de bandas a grupos funcionales** (Tabla 3), **sino también saber la composición química de los materiales en estudio, en muchos casos conocer los estados conformacionales de algunas macromoléculas y diversos tipos de interacciones y materiales intra e intermoleculares presentes en los mismos** (Naumann 2000, referencias Tabla 3) .

Tabla 3. Asignación de bandas frecuentemente encontradas en espectros de material biológico (principalmente en bacterias)

Ventanas espectrales	Frecuencia (cm^{-1})	Asignación [a]	Referencia [b]
4.000-3.000	3.500 3.400	O-H estr grupos oxidrilos O-H estr del H2O	I,ii,iii
	3.200	N-H estr (amida A) de proteínas	i, ii,Schmitt
W1, **Ácidos grasos** **3000-2800 cm^{-1}**	2,960 2.930 2.875 2.855	C-H vib. de grupos funcionales $-CH_3$ y $>CH_2$ presentes en cadenas largas de ácidos grasos (fosfolípidos) C-H estr (asim) de $-CH_3$ en cadenas de ácidos grasos C-H estr (asim) de $>CH_2$ C-H estr (sim) de $-CH_3$ C-H Estr. (sim) de $>CH_2$ en cadenas de ácidos grasos	2, 4, 7, 8, 10, 13,i, ii
W2 **Región de Proteínas** **1800-1500 cm^{-1}** **Amida I y II**	1.745-1.730	>C=O estr de ésters y ácidos grasos	Nivens 1992, Schmitt, 1, 2, 4, 5, 8, 9, 10,12, i, ii
	1.715	>C=O estr, ester y de ácido carbónico COOH	I,ii
	1715-1680	>C=O estr de ácidos nucleicos	I,ii
	1695. 1685. 1675 1.650 1.637	**Amida I**, >C=O estry C-N balanceo de enlace amida de proteínas y péptidos Componentes resultantes de hoja β- plegada antiparalela y β-turns Componentes estructura de hélice-α Componente de estructura hoja β- plegada	i,ii, 4, 8, 11
	1.627-1.615	>C=O estr (asim) COO^-	1, 5, 7, 9,15,12, 14
	1.565	N-acetil ester	
	1.548	**Amida II,** N-H balanceo, C-N estr de proteínas y péptidos	Nivens,2, 5, 8, i,ii, iii, 11
	1515	Banda de Tirosina	i, ii,
W3 **Región Mixta** **1500-1300 cm^{-1}** **·oteínas, ác. grasos, compuestos con fosfato)**	1.460-1.450	C-H balanceo de CH_2 y CH_3	Nivens y Schmitt, i, ii
	1.400-1.410	>C=O estr (sim) de COO^- C-O balanceo del ion COO^-	5, 7, 8, 9, 10, 11, 15, 12, 14, Nivens y Schmitt
	1.75	COO^- estr sim	12
	1.315	>C-O ester de ácidos urónicos	1,7,8 no se su de esta lista de ref.
	1.310-1.240	**Amida III**, bandas correspondiente a componentes de proteínas	Nivens, i,ii
	1260	C-O-C estr de ésteres	12, 14
	1.250 - 1.220	Bandas superpuestas típicas de >P=O est r(asim) en fosfodiésters, fosfatos libres y monoéster de fosfatos. P=O estr (asim) de $>PO_2^-$ fosfodiester de los grupos funcionales del DNA/RNA, estructura de polisacáridos, fosfolípidos, carbohidratos conteniendo P.	8, 11, 13, 16,i,ii,
W4 **Región de polisacáridos** **1200-900 cm^{-1}**	1.200 – 900 1.114 1085	C-OH estiram C-O-C, C-O, C-O-H deformaciones del anillo de carbohidratos (oligo, polisacáridos, alginato) C-O-P, P-O-P en polisacáridos de pared celular. P=O estr (sim) of $> PO_2^-$.	2, 4, 6, 7, 8, 16, 15, 14 Nivens, i
	900-800	Región del C anomérico de polisacáridos	6, 9, 14
W5 **Fingerprint** **900 – 600 cm^{-1}**	720	C-H *rocking* de$>CH_2$ metileno	8
	900 - 600	" region del *fingerprint* "	8, 4

[a] estr= estiramiento, sim = simétrico, asim = asimétrico

[b] (i) Maquelin 2003 (ii) Naumann 2000 iii(1) Batsoulis 2004; (2) Beech 1999; (3) Fett 1995; (4) Helm 1991; (5) Helm and Naumann 1995; (6) Kacuráková 2000; (7) Moreno 2000; (8) Naumann 1998; (9) Navarini 1997; (10) Nichols 1985; (11) Nivens 1995; (14) Nivens 2001; (13) Schmitt and Flemming 1998; (14) Synytsya 2003; (15) van der Mei 1989; (16) Zeroual 1994.

Para facilitar la interpretación de los espectros de materiales biológicos se puede hacer una división de los mismos en lo que se denominan **ventanas espectrales (W_i):** La **Fig. 15** muestra un espectro microbiano típico deshidratado en forma de film sobre una celda de ZnSe en el cual se indican dichas ventanas espectrales y las correspondientes asignaciones a macromoléculas y grupos funcionales más importantes.

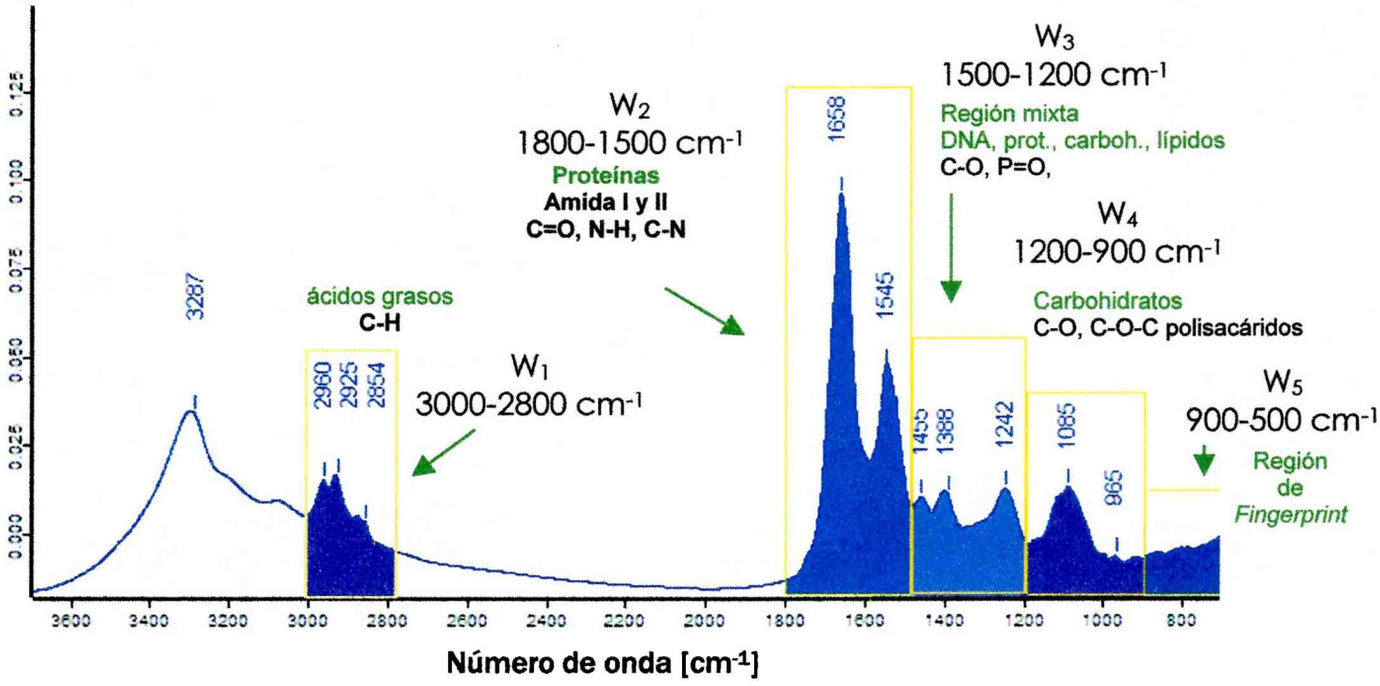


Fig. 15 Asignación de los principales grupos funcionales y macromoléculas encontrados en espectros FT-IR de microorganismos. Se tomó como ejemplo un espectro de un film de *B. pertussis* sobre una celda de ZnSe. Se indican las cinco ventanas espectrales (**W_1** a **W_5**) en las que es posible dividir un espectro IR para su análisis.

La derivada segunda de un espectro FT-IR muestra un mínimo por cada máximo existente dentro de la envolvente, por lo que al multiplicarla por (–1) dichos mínimos se transforman en máximos (Stuart y Ando 1997; Smith 1999). La **Fig. 16** muestra, en cada ventana espectral, el espectro representado en la figura anterior, su segunda derivada multiplicada por (–1) y se indica la asignación de bandas o frecuencia de absorción de los principales grupos funcionales presentes en las células. Dicha figura fue construida considerando los diferentes estudios sistemáticos realizados por diferentes autores, todos ellos basados en el estudio comparativo con sustancias puras (referencias de tabla 3) :

Fig. 16 ventanas espectrales

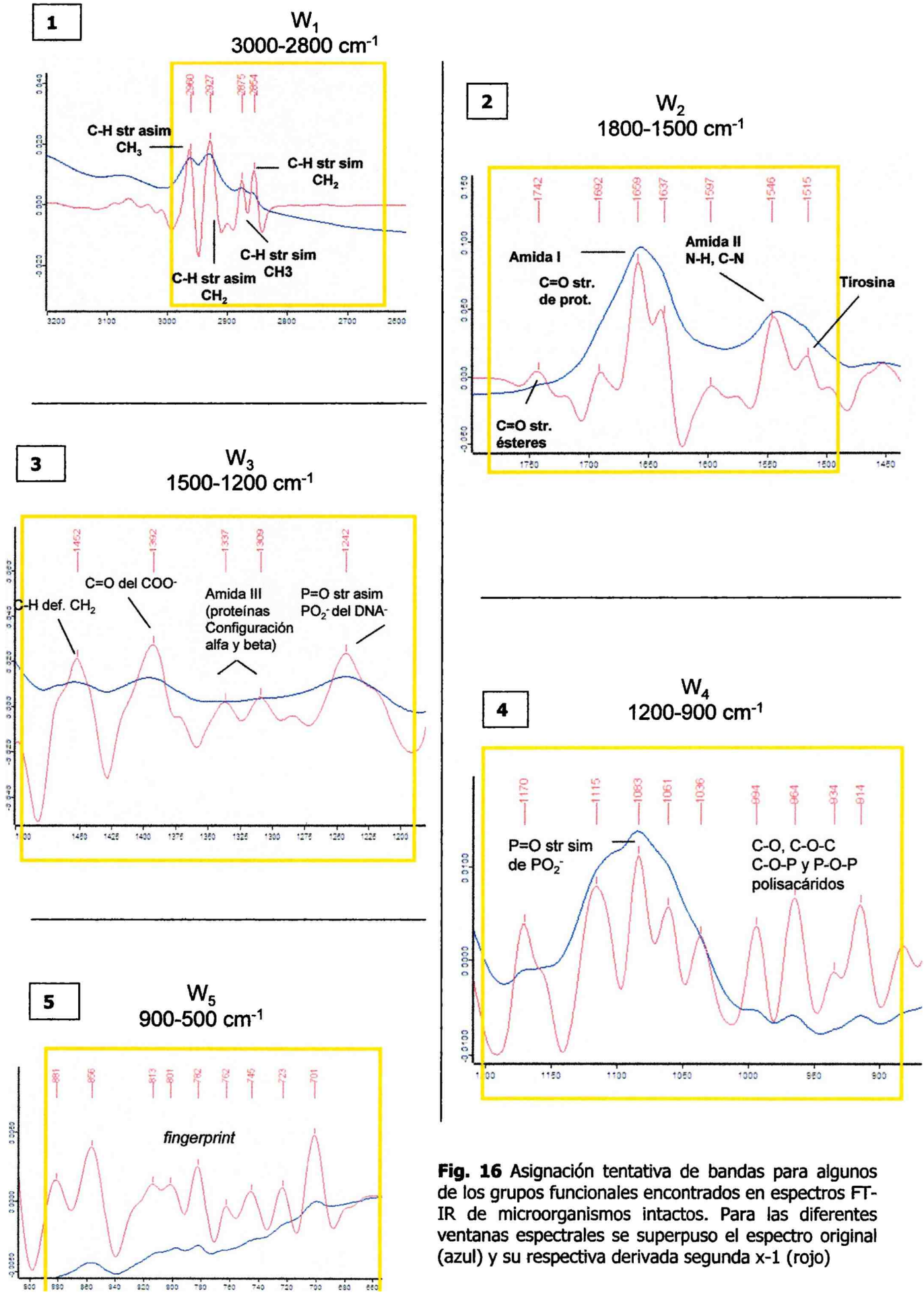


Fig. 16 Asignación tentativa de bandas para algunos de los grupos funcionales encontrados en espectros FT-IR de microorganismos intactos. Para las diferentes ventanas espectrales se superpuso el espectro original (azul) y su respectiva derivada segunda x-1 (rojo)

1. La región entre 4000 y 3100 cm^{-1}, está dominada principalmente por una banda muy ancha debida al grupo O-H (3400 cm-1) y a la absorción de dos modos vibracionales del estiramiento de N-H, denominados Amida A y B, 3300 y 3030 cm^{-1}, respectivamente.
2. La región 3100 a 2800 cm^{-1}, $\mathbf{W_1}$, exhibe las vibraciones correspondientes a los estiramientos y balanceos de C-H en los grupos funcionales CH_3 y CH_2. Aunque dicha región es atribuida por lo general a la absorción de las cadenas de ácidos grasos de membranas y a fosfolípidos, también se le puede atribuir a vibraciones de algunas cadenas laterales de aminoácidos y carbohidratos (Maquelin 2002, Naumann 2001). Es posible extraer alguna información complementaria de estos grupos funcionales observando las vibraciones correspondientes al balanceo del enlace C-H que se encuentra entre 1470 y 1350 cm^{-1}
3. La región $\mathbf{W_2}$, entre 1800 y 1500 cm^{-1}, es la región denominada Amida I y II. En particular la región **Amida I** (1700-1600 cm^{-1}) es la banda más intensa en los espectros de microorganismos y es sensible a estados conformacionales. Dicha banda es indicativa de la estructura secundaria del ***pool*** de proteínas que conforman el microorganismo, es decir de la composición porcentual en estructura alfa hélice o hoja beta del total de las proteínas. En esta ventana se observa la banda correspondiente al estiramiento del grupo >C=O de ésteres (~1740 cm^{-1}) presente en lípidos y otras moléculas, también, aunque de mucha menor intensidad, las bandas debidas los estiramientos de los enlaces >C=O, >C=N, >C=C< presentes en las bases heterocíclicas de los ácidos nucleicos, ADN y ARN (Parker 1983; Li-Vien 1991). Es asimismo, muy característica la presencia en esta región de las vibraciones correspondientes a las cadenas laterales de los aminoácidos fenilalanina (1498 cm^{-1}) y tirosina (1516 cm^{-1}), así como también las del aspartato y del glutamato (1585 y 1570 cm^{-1}, respectivamente).
4. La región correspondiente a la $\mathbf{W_3}$, entre 1300 y 1500 cm^{-1} es la que se denomina **región mixta**, ya que involucra grupos funcionales presentes en lípidos, proteínas carbohidratos y ácidos nucleicos. En la región de mayor energía de esta ventana, cercana a 1450-1460 cm^{-1} se encuentran, como se mencionó previamente, los estados vibracionales de balanceo del C-H correspondientes al CH_2 y CH_3. En 1400 cm^{-1} se posible observar una banda típica correspondiente al estiramiento simétrico del $-COO^-$. Este grupo funcional puede ser indicativo de la presencia de carbohidratos ácidos, así como también

a ácidos grasos libres, o cadenas laterales de aminoácidos. Por último en la zona de menor energía de esta ventana, cercana a 1240 cm^{-1}, se encuentra una banda ancha debido al estiramiento asimétrico del enlace >P=O, que constituye una superposición de bandas típicas que podrían provenir de fosfodiésteres, monoésteres, y fosfatos libres (**Fig. 16**). Dependiendo del material biológico considerado, aplicando técnicas de aumento de resolución en esta región pueden discriminarse entre dos y cuatro bandas débiles: 1) las provenientes del grupo funcional fosfodiéster del AND y ARN -presente en prácticamente todo espectro de células- 2) las frecuencias de estiramientos >P=O debidas a la presencia de estos grupos en fosfolípidos, 3) las debidas a carbohidratos que contienen P, 4) en bacterias Gram-positivas las debidas a ácidos teicoicos y lipoteicoicos.

5. La región espectral $\mathbf{W_4}$, entre 1200 y 900 cm^{-1}, es generalmente dominada por el estiramiento simétrico del grupo PO_2^- correspondiente a ácidos nucleicos (1080 cm^{-1}) y por una secuencia compleja de picos debidos principalmente a un fuerte acoplamiento de los estiramientos C-C y C-O y de las deformaciones C-O-C y C-O-H de diversos oligo y polisacáridos (Naumann 2001)
6. El intervalo de frecuencias entre 900 y 650 cm^{-1}, $\mathbf{W_5}$, región de fingerprint, exhibe una gran variedad de picos de muy baja intensidad, pero extremadamente característicos. Esta región puede contener también bandas muy débiles de vibraciones de anillos aromáticos de fenilalanina, tirosina, triptofano y de varios nucleótidos. En esta región resulta muy poco probable poder efectuar una asignación de determinados grupos funcionales a frecuencias de vibración, aquí se encuentran las bandas correspondientes a movimientos de las macromoléculas. Solo se puede asignar con certeza el pico correspondiente a 720 cm^{-1} por tratarse de una frecuencia de vibración característica de los modos vibracionales de torsión del $>CH_2$ de ácidos grasos.

La mayoría de los estudios de composición química por métodos vibracionales de muestras "multicomponentes" como son las provenientes de material biológico complejo, se basan en asignarle a los picos observados (u obtenidos por derivada segunda) los grupos funcionales correspondientes. Este tipo de estudio tiene en cuenta la información disponible en bibliografía (semejante a la descripta en la **Tabla 3** y en las **Fig. 15 y 16**). Sin embargo, es común encontrar en otro tipo de estudios no de composición química, sino de estructura secundaria o terciaria de macromoléculas, las características de sólo ciertas bandas espectrales. Estas bandas específicas tienen la propiedad de ser sensibles a cambios estructurales, a diferentes interacciones intra e

intermoleculares, incluyendo el puente de H, interacción lípido-lípido y diferentes estados conformacionales tales como los de la estructura secundaria de proteínas dentro de la banda Amida I (**Tabla 4**) o estado de orden en las membranas (Naumann 2001; Fabian 2002).

4. METODOLOGÍAS EXPERIMETALES PARA FT- IR. TÉCNICAS DE MEDIDAS INFRARROJAS PARA MUESTRAS MICROBIANAS.

La principal ventaja de la espectroscopia IR es que es aplicable a prácticamente cualquier tipo de material biológico y en cualquier estado físico (soluciones, líquidos viscosos, suspensiones, sólidos no homogéneos, polvos, etc.). También es posible medir espectros IR de una muestra sometida a diferentes condiciones fisicoquímicas como variaciones de temperatura, presión, estado de dispersión y pH. **Otra característica destacable de la espectroscopía IR es que permite realizar mediciones sobre muestras intactas, hidratadas o deshidratadas.** Se suman a estas ventajas la posibilidad de realizar estudios de caracterización, clasificación e identificación de organismos a muy bajo costo (debido a que la técnica no requiere consumibles) y en muy breve lapso de tiempo, debido a que la preparación es rápida y sencilla de llevar a cabo.

En general las muestras biológicas provenientes de microorganismos no se comportan idealmente como los compuestos puros. Los principales aspectos que deben tenerse en cuenta cuando se estudian muestras microbianas son:

1. Las bandas espectrales obtenidas no deben ser ni muy débiles ni muy intensas para evitar falta de linealidad en el detector.
2. Las muestras deben tener una concentración tal que se cumpla la ley de Lambert y Beer.
3. En caso de que dos o más espectros estén siendo comparados, sus absorbancias IR no deben ser muy diferentes
4. La relación señal/ruido debe ser suficientemente alta.
5. Las muestras una vez preparadas y secas deben tener un aspecto de film transparente y homogéneo (se detallará más adelante la forma de obtener un film de estas características). La heterogeneidad (irregularidades, formación de grumos) de las mismas produce una dispersión difusa (*scattering*) en la superficie de la muestra que provoca desplazamientos de la línea de base.

4.1 MEDIDAS POR ABSORBANCIA / TRANSMITANCIA (A/T).

La gran mayoría de los estudios microbianos realizados por IR se llevan a cabo utilizando la técnica de Absorbancia/ Transmitancia (A/T). Las mismas se realizan sobre muestras líquidas, soluciones y films dispuestos sobre ventanas o celdas transparentes a la radiación IR (Naumann y col 1991a; Naumann y col 1991b; (Bruker Optics 1999).

Debido a que el agua está presente en prácticamente la totalidad de las muestras biológicas los materiales ópticos que constituyen estas ventanas deben ser además de transparentes a la radiación IR, insolubles en agua. Los más comúnmente utilizados son CaF_2, BaF_2, ZnSe, ZnS, KRS-5, Ge o Si, entre ellos difieren en el índice de refracción, la zona del espectro IR donde son transparentes y la solubilidad en agua. La **Fig. 17** muestra las características en transmitancia y los rangos en los que pueden ser utilizados los materiales más comúnmente empleados en IR medio.

i) Medidas por A/T utilizando celdas no descartables de materiales transparentes al IR

Las diferentes compañías de desarrollo de equipamiento IR poseen distintos dispositivos para registrar medidas A/T. La más sencilla, consiste en un porta-celda al cual se le puede introducir una sola celda de cualquiera de los materiales indicados previamente.

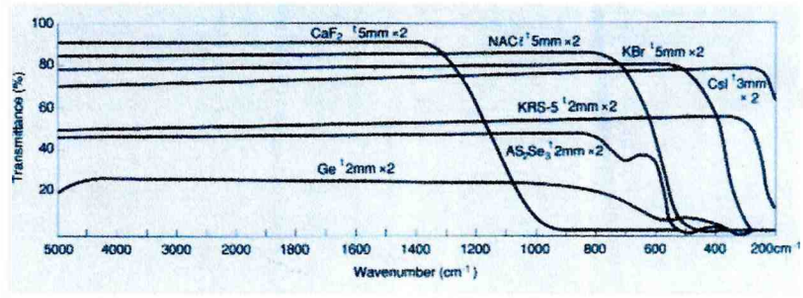


Fig. 17 Espectro de Transmitancia obtenido para los materiales normalmente utilizados en la construcción de celdas aptas para el IR medio (4000-400 cm^{-1}).

Existe otro sistema muy utilizado en particular en la caracterización microbiana, que consiste en un porta-celda que contiene multi-celdas (15 celdas) de ZnSe desarrollado por Bruker Optics, Alemania, controlado por computadora capaz de realizar 15 mediciones programadas de un volumen de suspensión bacteriana menor a 100 μl (**Fig. 18a**) (Helm y col 1991; Naumann y col 1991a; Bruker Optics 1993; Bruker Optics

1999; Naumann 2001). En este tipo de sistemas se prepara la suspensión bacteriana a una concentración adecuada, se deposita un volumen sobre la celda y se seca al vacío hasta obtener un film homogéneo sobre la ventana. Esta última condición es de suma importancia cuando los espectros son utilizados en la caracterización e identificación de microorganismos. Este sistema demostró ser sumamente versátil y ha sido aplicado en la caracterización, diferenciación e identificación de bacterias, levaduras y hongos en los últimos 15 años. Se han estudiado mediante esta técnica diferentes cepas de *Lactobacillus* (Curk 1994; Amiel 2000; Oust y col 2004), *Actinomyces* (Haag 1998), Clostridium. Del mismo modo se han diferenciado especies de levaduras (Kummerle y col. 1998) y deferentes especies del género *Enterococcus*, algunas de aplicación en la industria de los alimentos y otras especies importantes por su alta patogenicidad (Guibet y col. 2003) Los sistemas más modernos, disponen de un tipo de celda que utiliza otra tecnología totalmente diferente, de especial aplicación en la identificación microbiana y que permite programar 96 o 384 lecturas según el diseño de la multi-celda, utilizando un volumen de suspensión bacteriana menor a 20 μl (**Fig. 18b**) (Boese y Piry 2004; Bruker Optics 2004). En estos sistemas de micro-placas la identificación microbiana se realiza de manera totalmente automatizada. Sin embargo, recientemente se ha desarrollado un dispositivo para la identificación bacteriana basada en estampados sobre microarrays (*printing microarrays*) (Mossoba y col. 2004) Esta tecnología consiste en la impresión de bacterias intactas en pequeños pozos (150 μm de diámetro) sobre un material transparente al IR y sobre porciones de agar. Esta tecnología de deposición por contacto involucra el uso de una aguja que permite dispensar gotas de suspensiones bacterianas del orden del nanolitro (nL) .

También se puede disponer de un tipo similar de celda, que se indica en la **Fig. 18**, pero en la que las ventanas no son planas sino que consisten en un hueco que permite realizar medidas por A/T en muestras biológicas totalmente hidratadas, soluciones acuosas, suspensiones o geles. ***ii) Medidas por A/T utilizando celdas descartables de materiales transparentes o parcialmente transparentes al IR***

En base a las experiencias realizadas sobre celdas de ZnSe, se ha desarrollado un procedimiento semi-cuantitativo que facilita en muchas casos la obtención de una gran cantidad de espectros de manera sencilla y con gran reproducibilidad (Mossoba y col. 2002). El mismo se basa en la utilización de membranas descartables, las cuales se formulan con diferentes sustratos, transparentes o parcialmente transparentes al IR-medio. Por lo general estos sustratos poseen bandas de absorción en regiones muy estrechas del espectro, que producen una mínima interferencia y que puede ser

posteriormente eliminada por procedimientos matemáticos. Las más comúnmente utilizadas son las membranas de PTFE y las de Polietileno (PE).

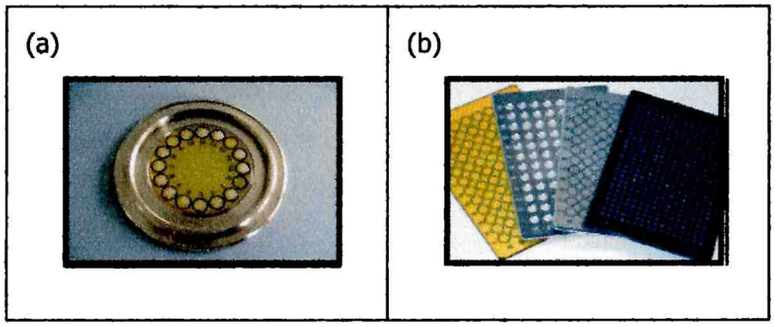


Fig. 18 Sistemas de multi-celdas computarizados. **(a)** para registro de 15 muestras y **(b)** para muestreo desde 96 a 384 muestras. Aptas para medidas FT-IR por A/T de films secos obtenidos con suspensiones de muestras biológicas. (Fuente: Dr. Dieter Naumann, Workshop de Espectroscopía Vibracional, La Plata, Noviembre 2004).

ii) Medidas por A/T utilizando celdas descartables de materiales transparentes o parcialmente transparentes al IR

En base a las experiencias realizadas sobre celdas de ZnSe, se ha desarrollado un procedimiento semi-cuantitativo que facilita en muchas casos la obtención de una gran cantidad de espectros de manera sencilla y con gran reproducibilidad (Mossoba y col. 2002). El mismo se basa en la utilización de membranas descartables, las cuales se formulan con diferentes sustratos, transparentes o parcialmente transparentes al IR-medio. Por lo general estos sustratos poseen bandas de absorción en regiones muy estrechas del espectro, que producen una mínima interferencia y que puede ser posteriormente eliminada por procedimientos matemáticos. Las más comúnmente utilizadas son las membranas de PTFE y las de Polietileno (PE).

La suspensión bacteriana (de concentración semejante a la utilizada en celdas de ZnSe) es depositada sobre las membranas, llamadas DOF (disposal optical films), a la cual se adhiere por secado. Estas membranas poseen la ventaja, respecto a las celdas de ZnSe que por lo general los organismos quedan dispuestos en forma de film perfectamente adheridos, el film formado sobre la membrana, no se quiebra ni se levanta, como suele suceder en algunos casos con las celdas de ZnSe.

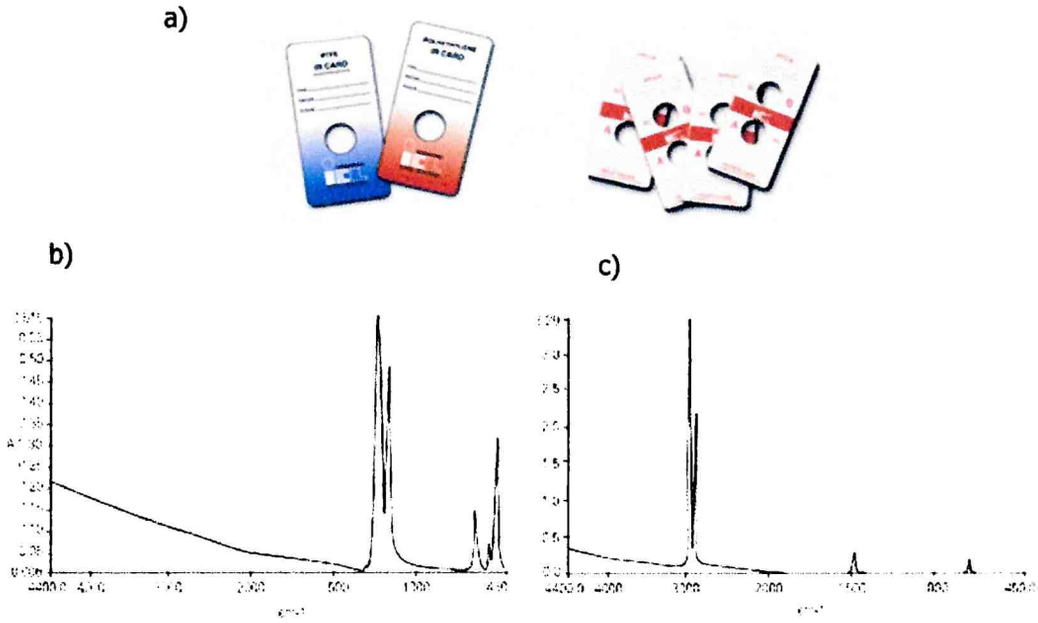


Fig. 19 Celdas DOF formuladas con diferentes componentes. **(a)** Tarjetas de tamaño universal (de 2" x 4") de PTFE y polietileno (PE). Se disponen de manera vertical en el porta-celdas un espectrómetro FT-IR. La muestra se deposita sobre los films y se seca en pocos segundos. Espectro IR **(b)** de la celda de PTFE y **(c)** de la celda de polietileno. En el espectro IR-medio de estos sustratos presentan bandas características que pueden ser anuladas luego de realizada la medida por procedimientos matemáticos. Real Crystal ®, ICL con licencia 3M®.

Las celdas descartables de PE, en particular, han sido aplicadas con éxito en la clasificación microbiana. Se han realizado estudios de identificación de diferentes organismos como *E. coli, Pseudomonas aeruginosa, Bacillus cereus* y *Listeria innocua* (Mossoba y col. 2002)

iii) Medidas por A/T formulando pellets o pastillas

La utilización de celdas del tipo de las mencionadas en los puntos anteriores requiere la formación de films transparentes y homogéneos sobre las celdas. Sin embargo existen muchos casos donde la preparación de la muestra puede tener problemas, como es el caso de microorganismos que se agruman o crecen formado *pellets*, o bien producen poseen algún tipo de carbohidrato capsular lo que provoca la formación de *films* no homogéneos sobre las celdas IR. Este es el caso de organismos tales como hongos filamentosos, o microorganismos muy hidrófobos o que tienden a agregarse en suspensiones acuosas o que poseen pilis o alguna estructura celular que produce la coagregación de los mismos. En estos casos se recurre a una técnica muy utilizada en la espectroscopía clásica de compuestos químicos que es la formulación de pastillas,

obtenidas mezclando la muestra problema liofilizada con alguno de los materiales transparentes a la radiación IR como los indicados en la **Fig. 17**. Dentro del ellos los más utilizados son CsI, KBr y CaF_2. El material biológico liofilizado se mezcla en mortero de ágata con el material transparente al IR en una proporción (1:50 en peso). Con esta mezcla pulverizada al tamaño de partícula semejante a un talco, se formulan pastillas bajo vacío a una presión menor a 10.000 $Kg.cm^{-2}$.

La factibilidad de utilizar esta técnica tanto para estudios fisiológicos como de tipificación ha sido ampliamente demostrada en diferentes microorganismos como *Candida, Hansenula, Kluyveromyces, Pichia* y *Saccharomyces* (Bruker Optics 1993). También ha podido ser utilizada para la clasificación y diferenciación de microorganismos a nivel de cepa (van der Mei y col. 1989), o en el monitoreo de procesos de hongos y levaduras analizando las diferentes fases de crecimiento (Bruker Optics 1993).

4.2. MEDIDAS POR REFRACTANCIA ATENUADA TOTAL (ATR).

En el caso de las mediciones por Refractancia Atenuada Total (ATR) la muestra no se ubica en el camino de la propagación de la radiación IR como el caso de A/T, sino que la radiación se pone en contacto con la superficie de un prisma sobre el cual se produce una reflexión múltiple, de manera que la radiación IR sufre una reflexión total dentro del cristal se va reflejando en el cristal y en la muestra sucesivamente (**Fig. 20**). Los elementos utilizados para producir la reflexión (elementos de reflexión interna, IRE) están constituidos por materiales de muy baja solubilidad en H_2O y elevado índice de reflexión. Los más utilizados son de ZnSe y Ge (**Fig. 17**) (Schmitt y Flemming 1998).

El grado de penetración de la onda electromagnética sobre la muestra está definido por la relación existente entre los índice de refracción de la celda (n_2) y de la muestra (n_1) y por el ángulo de incidencia α. Por lo general dicha penetración se encuentra en el orden de los micrómetros. Los espectros obtenidos son por lo general de muy baja intensidad, sin embargo ésta puede ser mejorada aumentado el número de reflexiones internas. Con un ángulo de incidencia de 45 ° se pueden lograr 25 reflexiones internas (Naumann 2000; Nichols y col. 1985; Stuart y Ando 1997).

Al igual que la técnica A/T, en ATR existen también celdas de diferente diseño que permiten analizar muestras líquidas y sólidas. También existen sistemas diseñados para operar las celdas bajo un flujo continuo de una solución, lo que permite un monitoreo continuo de los cambios producidos en el tiempo del material que se encuentra en contacto con la celda (Stuart y Ando 1997).

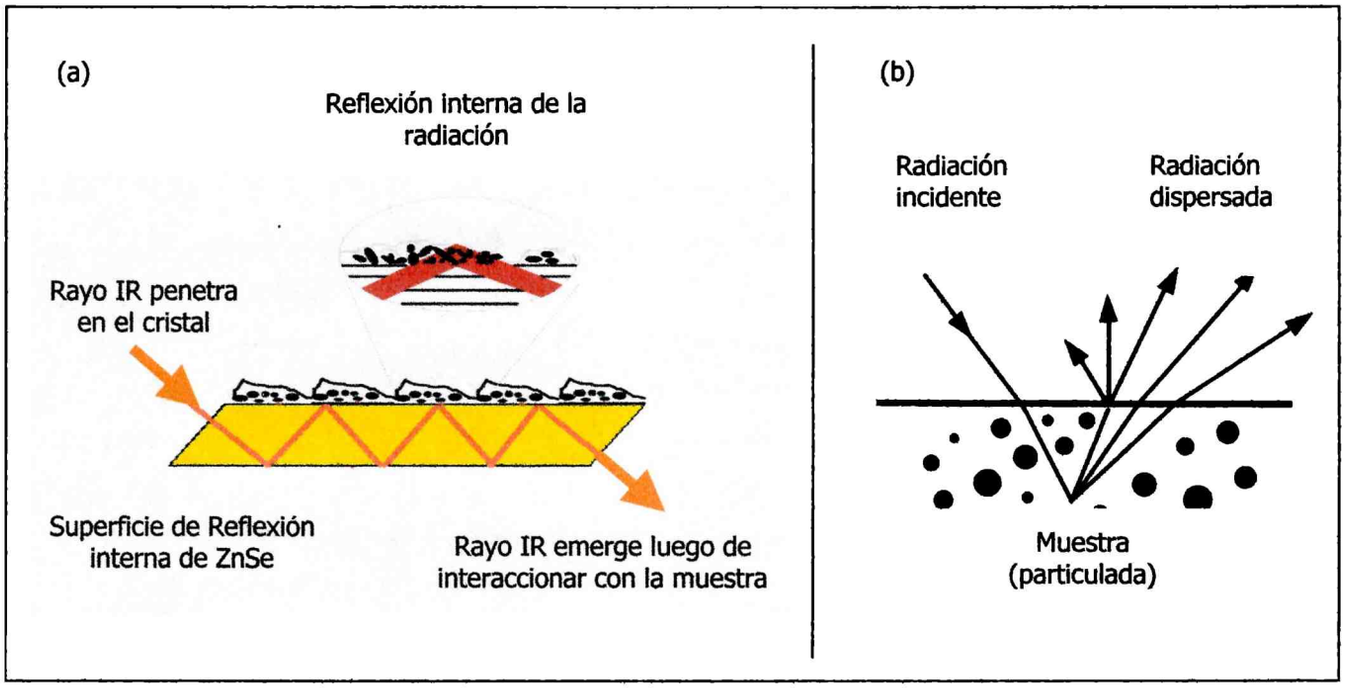


Fig. 20 Mediciones por refractancia atenuada total (ATR) y refractancia difusa (RD). **(a)** Celda de ZnSe o Ge. Descripción del camino óptico **(b)** Recorrido de la radiación IR característico para partículas sólidas. Tomado de Schmitt 1998.

En la técnica ATR / FT-IR el espectrómetro IR provee la radiación que es reflejada dentro del IRE. Bajo ciertas condiciones en las cuales el medio externo posee menor índice reflexión que el IRE la reflexión genera un campo de radiación en el medio fuera del elemento, denominado *campo evanescente.* La intensidad de la radiación en este campo disminuye exponencialmente a medida que aumenta la distancia hacia afuera del cristal, llegando a ser nula a una distancia aproximada a 1 μm del IRE. De modo que todo material que se encuentre dentro del campo evanescente absorberá la radiación IR, produciendo un espectro de absorbancia. Las moléculas que se encuentren fuera de dicho campo, a una distancia mayor a 1 μm, NO SON DETECTADAS POR LA RADIACIÓN. De modo que esta técnica provee información espectral solo de la porción de material que se encuentra en contacto con la celda (Nivens 1995; Schmitt y Flemming 1998). Este tipo de metodología se utiliza cuando se quieren analizar muestras muy gruesas, opacas, no solubles en agua, espesas, pastosas, en polvo, o cuando solo la superficie de las mismas interesa ser analizada. Es posible estudiar sistemas acuosos (sobrenadantes de cultivo, suspensiones) además de dispersiones, polvos y liofilizados. Al igual que la técnica A/T esta metodología ha permitido realizar estudios de diferenciación e identificación de

microorganismos. Goodacre y colaboradores (Goodacre y col. 1996; Goodacre y col. 1998) demostraron que la técnica resulta confiable para la identificación a nivel de especie en *Enterococcus* y *Streptococcus*. Bouhedja *et al* posteriormente aplicaron las técnicas de ATR para estudios de identificación a nivel de cepa con *Saccharomyces* (Bouhedja y col. 1997b),así como también para discriminar entre cepas resistentes a beta-lactámicos (Bouhedja y col. 1997a). Este mismo grupo continuó trabajando en la identificación de microorganismos, (Sockalingum y col. 1998), y también en búsqueda de marcadores fenotípicos que permitieran determinar mecanismos implicados en la resistencia a antibióticos (Sockalingum y col. 1997). Sin embargo, una de las aplicaciones más recientes de esta metodología ha sido el estudio de microorganismos en biofilms. En los últimos 10 años se han diseñando distintos tipos reactores en base a celdas de ATR que han permitido el estudio tanto de las células en biofilms (Donlan y col. 2004; Nivens y col. 2001; Nivens 1995; Schmitt y Flemming 1998) de exopolímeros producidos en tal condición de crecimiento (Nivens y col. 2001) e incluso estudiar la penetración de antibióticos al interior de la matriz del biofilm (Suci y col. 2001). En la actualidad existen reactores (FT-IR – ATR) constituidos por IRE de Germanio que permiten monitorear un cultivo en biofilm de manera continua *in situ* sin destrucción de la arquitectura tridimensional del mismo ((Donlan y col. 2004; Sarkisova y col. 2005).

4.3 MEDIDAS POR REFRACTANCIA DIFUSA (RD)

En contraposición a lo que ocurre con ATR, en la técnica de refractancia difusa la luz que incide y penetra directamente en una o más partículas es reflejada en todas las direcciones, la óptica colecta luego la radiación dispersada y la dirige al detector (**Fig. 20b**). Esta metodología, conocida como DRIFT ha sido utilizada satisfactoriamente cuando todas las técnicas tradicionales han fallado, en particular para el estudio de polvos como liofilizados de microorganismos (Bruker Optics 1999; Goodacre y col. 1998; Nichols y col. 1985) o biopolímeros bacterianos (Nichols y col. 1985). Además al igual que ATR, esta metodología ha sido ampliamente utilizada para el estudio de cultivos en biofilms, con muestras obtenidas por raspado de superficies soporte.

4.4 MICROESPECTROSCOPÍA

La microespectrometría (ME) combina la espectroscopía FT-IR y la microscopía para obtener como resultado un instrumento sumamente versátil en el que al análisis microscópico de las muestras se le suma la adquisición de información respecto a la composición química de la misma. La microespectroscopía FT-IR es una técnica que posee una alta capacidad de diferenciación para el estudio de organismos,

permitiendo detectar, enumerar, diferenciar y diagnosticar la presencia de microorganismos en menos de un día de trabajo.

El microscopio se sitúa en el compartimiento donde se disponen las muestras en un espectrómetro FT-IR convencional (**Fig. 21**). La radiación es focalizada en la muestra que se encuentra apoyada sobre una platina *x-y*. El microscopio contiene además objetivos y oculares de vidrio que permiten la visualización de la muestra como en un microscopio convencional. La microespectroscopía puede llevarse a cabo tanto en modo A/T como ATR (Stuart y Ando 1997). Esta tecnología permite obtener espectros de microcolonias constituidas por no más de cientos de células, obtenidas después de 6 a 10 horas de crecimiento en medio sólido, dependiendo del microorganismo en particular. Naumann y colaboradores (1998) han desarrollado un sistema que permite estampar las microcolonias obtenidas en medio sólido sobre celdas transparentes al IR (ZnSe, BaF_2 o CaF_2) (**Fig. 21a**). Esta transferencia de microcolonias a las celdas IR, permite **la posterior detección, enumeración y diferenciación de microcolonias, aún en cultivos mixtos.** Respecto a la identificación de bacterias, todas los sistemas de clasificación desarrollados para macroespectroscopía FT-IR se han confirmado y aún ampliado por ME A/T (Choo-Smith y col. 2001).

Se ha empleado esta técnica para la identificación y caracterización de patógenos Gram positivos y Gram negativos (Kirschner y col. 2001; Maquelin y col. 2002b; Naumann 2000), así como también en levaduras (Wenning y col. 2002)y otros organismos aislados de alimentos como *Listeria* spp. (Rebuffo y col. 2004). Desde que se ha implementado esta tecnología, el aislamiento de los organismos a estudiar ya no resulta necesario debido a que en una misma caja de Petri se pueden tener microcolonias lo suficientemente separadas como para que el análisis espectral, empleando el microscopio, no requiera nuevos aislamientos. Esto permite la identificación de microorganismos de muestras de alimentos, aguas y muestras de origen clínico, con la ventaja adicional de lograr resultados de identificación en pocas horas (**Fig. 21b**). ((Ngo Thi y col. 2000; Wenning y col. 2002).

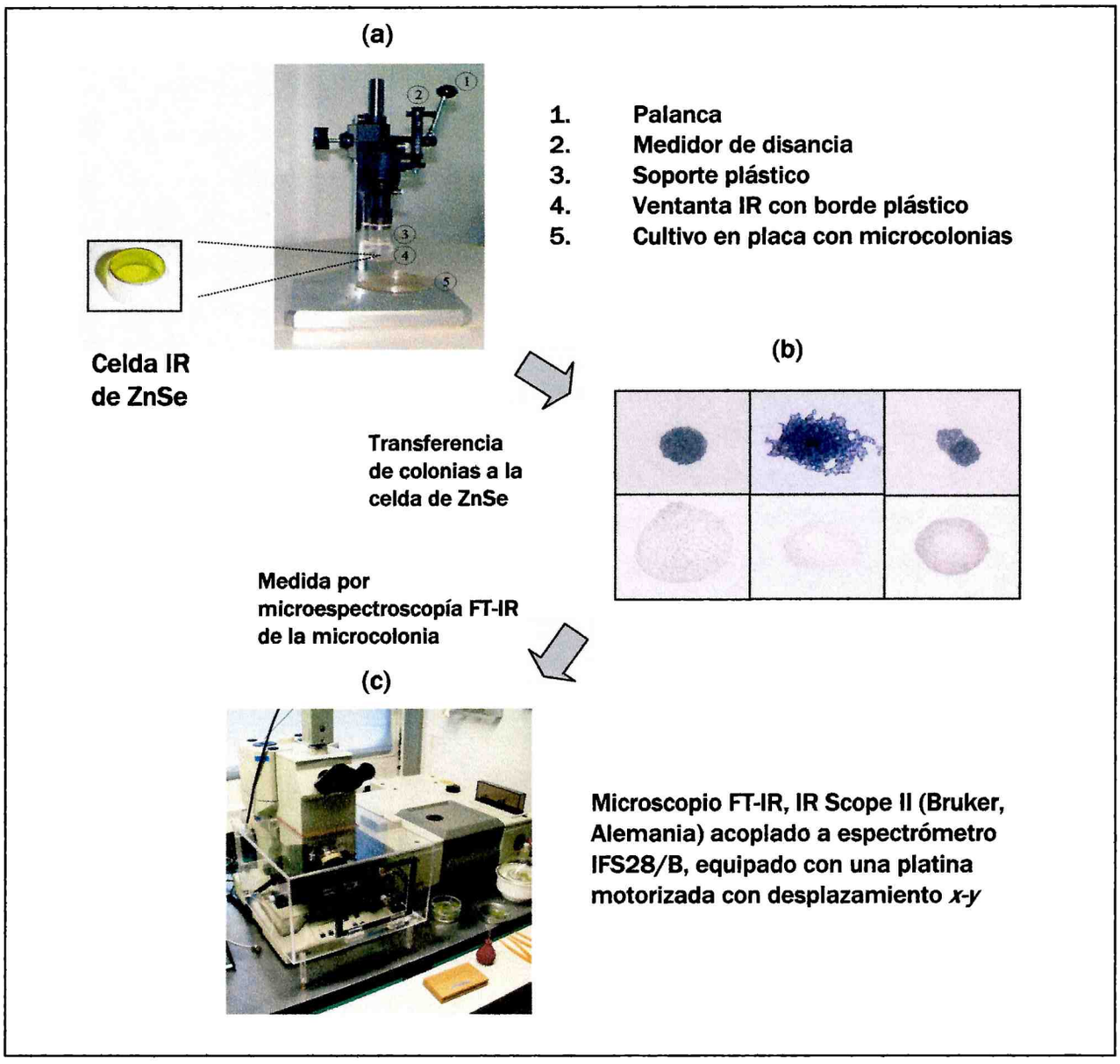


Fig. 21 Microespectroscopía FT-IR: Esquema de los elementos necesarios para llevar a cabo la microespectroscopía en la caracterización e identificación microbiana. **(a)** Dispositivo para transferir las colonias del medio sólido a la celda infrarroja (stamping device, Tomado de (Ngo Thi, et al. 1998). **(b)** Micrografías de microcolonias típicas mixtas y puras transferidas a la celdas de ZnSe (Comunicación personal, Wenning, M. en el Workshop de espectroscopía vibracional, La Plata, Noviembre 2004). **(c)** FT-IR microscope IR ScopeII. Tomado de Conferencia dictada por Dr. Dieter Naumann en el Workshop de espectroscopía vibracional, La Plata, Noviembre 2004)

Esta metodología se ha aplicado a la identificación rápida de patógenos bacterianos y fúngicos en cultivos sobre medios con sangre (Erukhimovithch y col. 2005; Maquelin y col. 2003). Asimismo se han tipificado cepas de *Candida albicans y C. dubliniensis* (Sandt y col. 2003; Tintelnot y col. 2000); obtenidas de pacientes de unidades de terapia intensiva, pudiendo ser aplicado a estudios epidemiológicos. La micoespectroscopía FT-IR permite diferenciar organismos hasta nivel de cepa, lo que ha permitido el diagnóstico de infecciones cruzadas en brotes hospitalarios dentro de unidades de terapia intensiva (Sandt y col. 2003) La **Fig. 21** muestra los principales pasos involucrados en la clasificación e identificación de microorganismos por microespectroscopía.

4.5 MICROESPECTROSCOPIA POR REFRACTANCIA TOTAL ATENUADA (ME-ATR)

Si bien la ME ha podido ser aplicada en la gran mayoría de los organismos, tanto Gram positivos como Gram negativos, permitiendo acortar los tiempos de medida y de diagnóstico, se vio que para el caso en que los microorganismos formen microcolonias gruesas y espesas, que exceden los 25 μm de diámetro, los espectros obtenidos por ME estampando las colonias en celdas de ZnSe, no contaban con la calidad deseada para realizar un análisis de clasificación o identificación. Para estos casos comenzó a utilizarse desde el año 2000 la técnica de ME / ATR. Estas medidas se llevan a cabo poniendo en contacto la microcolonia con un elemento altamente refringente como el Germanio. El fundamento es el mismo que para el caso de las medidas por ATR donde el rayo incidente que sale del microscopio es guiado hacia la muestra por el objetivo de Germanio y es totalmente reflejado en la interfase con la muestra (**Fig. 20a**). En las sucesivas reflexiones, el rayo penetra en la muestra a una profundidad menor a 1 μm. El espectro (a) de la **Fig. 22** representa el espectro obtenido por ME A/T de una microcolonia de *Candida albicans* estampada sobre una celda de ZnSe mientras que el espectro (b) fue registrado por ME ATR (tomada de Orsini y colaboradores (Orsini y col. 2000). Las medidas por ME ATR, logran aumentar significativamente la relación señal ruido de los espectros obtenidos cuando las microcolonias son poco heterogéneas y no permiten ser estudiadas por ME de transmisón

5 MUESTREO DE CELULAS MICROBIANAS Y ADQUISICIÓN DE DATOS

El empleo de espectroscopia vibracional para la identificación y caracterización de microorganismos requiere de procedimientos de estandarización para el cultivo, y la

preparación de las muestras muy rígidos, así como también un estricto control en los parámetros de adquisición de los espectros. La espectroscopia FT-IR es una técnica sumamente sensible a cambios en la composición química de la muestra, por lo que aún pequeñas modificaciones en la composición de las células se traduce en importantes efectos en el espectro resultante.

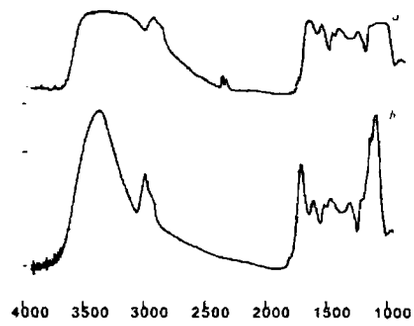


Fig. 22 Espectro FT-IR de una microcolonia de *Candida albicans*. **(a)** espectro obtenido estampando la microcolonia en una celda de ZnSe y posteriormente medida por A/T (espesor aproximado de 25 μm). **(b)** Espectro obtenido de la medida directa de la microcolonia por ME ATR. (tomada de Orsini y col 2000).

En un procedimiento de caracterización o identificación microbiana resulta de ***crítica importancia*** controlar todos estos procedimientos de estandarización, o bien seguir pasos de estandarización preestablecidos a fin de obtener reproducibilidad en los resultados. Desde los inicios de la aplicación de la espectroscopía FTIR en la caracterización microbiana ha sido reconocida y estudiada de qué manera la composición química de las células depende de las condiciones del cultivo (Helm y col. 1991a; Naumann 2000; Oust y col. 2004; van der Mei y col. 1993). La caracterización e identificación de microorganismos ***sólo será absolutamente confiable*** si la preparación y condiciones de medida fueron rigurosamente controladas: el muestreo, que comprende cultivo de los microorganismos, el procedimiento empleado en la toma de muestra (modo y momento de la de toma de muestra), el tratamiento de dicha muestra (disposición y forma de secado), la técnica de medida y los parámetros de adquisición de los espectros son algunos de los puntos más críticos a tener en cuenta. Dentro de ellos, la etapa inicial que consiste en la toma de muestra es considerada la etapa más crítica en el proceso de identificación (Bruker Optics 1999; Maquelin y col. 2002b; Naumann 2000). Esto es debido a que la expresión fenotípica de un organismo dependerá del medio de cultivo empleado, el pH, la temperatura y la etapa del ciclo celular. Respecto al medio de cultivo no sólo su composición sino también el

tratamiento al cual ha sido sometido (tiempo de esterilización, temperatura de esterilización) pueden condicionar un fenotipo. Además, cambios aún muy pequeños en la concentración de los componentes medios o en la formulación de los mismos son de importancia, por lo que deben tenerse en cuenta la partida de medio de cultivo utilizado o la marca del mismo. También diferencias en la temperatura de incubación pueden tener efecto sobre la estructura y/o expresión del organismo. En general, cuando la temperatura aumenta unos grados pueden ocurrir también cambios no sólo en la velocidad a la que ocurren los procesos metabólicos sino que también en la composición de la membrana citoplasmática (puede aumentar el % de ácidos grasos saturados en los lípidos). Respecto a los tiempos de incubación, debido a que los microorganismos crecen a diferentes velocidades no es posible establecer tiempos fijos de incubación para todos los sistemas, pero una vez que se ha seleccionado el tiempo apropiado, que puede ser inicio de fase exponencial, fase exponencial o inicio de fase estacionaria, éste debe ser estrictamente controlado.

A pesar de no existir un procedimiento único para responder a todos los requerimientos de estandarización, la necesidad de compartir, intercambiar resultados entre diferentes laboratorios y construir base de datos de referencia para la identificación de microorganismos ha hecho que se publicaran protocolos de estandarización. Estos protocolos desarrollados para medidas A/T incluyen la estandarización del cultivo, la adquisición y los procedimientos de evaluación (Helm y col. 1991b; Helm y col. 1991a; Maquelin y col. 2000; Naumann y col. 1991). La tendencia general es tratar de seguir las pautas de dicha metodología de manera de poder compartir los espectros entre laboratorios o construir base de datos validadas para la identificación en análisis de rutina, de microorganismos aislados en diferentes laboratorios. En el siguiente capítulo se hará una descripción detallada de dicho procedimiento a fin de obtener espectros de manera altamente reproducibles con la posibilidad de ser desafiados contra bibliotecas internacionales o compartidos por otros laboratorios (**Esquema 3, capítulo 2**).

6. TRATAMIENTO DE LOS DATOS Y TÉCNICAS DE EVALUACIÓN

Los espectros IR proporcionan una gran cantidad de información sobre de las propiedades físicas y químicas de las moléculas o las muestras estudiadas. Sin embargo no siempre resulta sencillo extraer y analizar dicha información. La **quemometría** es la aplicación de métodos estadísticos y/o matemáticos a los

espectros para poder obtener de manera eficiente la información contenida en los mismos.

Desde hace más de 40 años que se realizan análisis cualitativos y cuantitativos sobre espectros IR. Sin embargo, dichos análisis han consistido en emplear CALIBRACIONES UNIVARIADAS. Estos procedimientos, que aún son utilizados en química orgánica e inorgánica, consisten en asignar una propiedad de una variable (ej. concentración de glucosa) a una banda o pico del espectro (frecuencia, altura o área de una banda). Con el empleo de los métodos univariantes resulta difícil para los espectroscopistas obtener resultados en muestras complejas, donde la variable que se desea estudiar está representada por más de una señal, posee bandas anchas y superpuestas con otras, y más aún cuando se desean analizar varias variables simultáneamente. Recién a fines de los años '80, con el desarrollo de los primeros espectrómetros con transformada de Fourier, que permitieron obtener espectros con alta relación señal:ruido, y con mayor sensibilidad, el análisis quemométrico MULTIVARIANTE comienza a ser factible. Estos métodos permiten analizar simultáneamente varios parámetros para describir una o varias variables **simultáneamente,** lo que los hace de gran utilidad para realizar estudios de caracterización, identificación y cuantificación de muestras biológicas.

Análisis univariantes: analizan los sistemas de una única variable (Ej. concentración de glucosa) a la que se le asigna una característica de la banda seleccionada (frecuencia, altura, o área); o varias variables (Ej. glucosa, ácido pirúvico, ácido acético) siempre que estén representadas por bandas independientes, no superpuestas.

Análisis multivariantes: obtienen información a partir de espectros de materiales complejos, donde las distintas variables a analizar presentan superposición de bandas. Permiten la utilización de más de una banda o señal para describir una o más variables.

6.1 Análisis univariantes

El análisis univariante a pesar de su sencillez, es de gran utilidad en el estudio de muestras de origen biológico y en particular en estudios de expresión fenotípica de microorganismos. El mismo puede ser aplicado a la caracterización y/o cuantificación

de componentes celulares particulares como lo son la formación de endoesporas, componentes de reserva (como glucógeno o poli-hidroxi-alcanoatos), formación de cápsulas (constituidas por carbohidratos, glucosamina u otros componentes), cuantificación de carbohidratos, lípidos y proteínas. Asimismo ha sido empleado en el monitoreo de bioprocesos permitiendo identificar algún producto formado tanto en las células, como en el sobrenadante (consumo de sustratos o producción de metabolitos) ((Nivens y col. 2001; Shuster y col. 1999; Tseng y col. 1996).

Estos análisis se basan en primera instancia, en identificar dentro del espectro cuáles son los picos asociados a la variable que se desea estudiar. Luego seleccionar entre ellos, los que no presenten superposición con otras bandas y finalmente elegir alguna característica del pico seleccionado (altura o área) para caracterizar o cuantificar la variable (Kacurakova 2000, Irudayaraj y Tewari 2003). En los sistemas de multicomponetes, como es el caso del material biológico, este método por lo general no puede ser aplicado, ya que no es común encontrar señales asociadas a componentes del sistema en estudio que estén completamente separadas del resto de las señales. Sólo existen algunas excepciones como el caso del polihidroxibutirato (PHB) que posee aproximadamente 11 señales distribuidas en todo el espectro IR, entre las que se destaca una banda típica bien definida, no superpuesta con otras, asociada al estiramiento del grupo éster en 1735 cm^{-1} ((Helm 1995; Maquelin y col. 2002b; Naumann 2000) que permite la cuantificación del contenido de PHB en las células. Asimismo, es posible detectar y cuantificar la presencia de endoesporas en microorganismos ya que las mismas poseen una serie de señales que se superponen con las bandas anchas asociadas al estiramiento N-H, en el rango 3600 - 3000 cm^{-1}, otras en la región Amida I y Amida II en 1616 y 1570 cm^{-1} respectivamente (superpuestas con las señales características de proteínas), pero sin embargo, muestran un pequeño pico, asignado al contenido de dipicolinato de calcio de las esporas en 1279 cm^{-1}, que no se superpone con las señales correspondientes a otros componentes celulares (Goodacre y col. 2000; Helm 1995; Perkins y col. 2005). Cuando la banda de absorción en estudio presenta tales características, el tratamiento matemático consiste en emplear la ley de Lambert y Beer para relacionar a la altura, área o ancho de banda con la concentración de la variable en estudio.

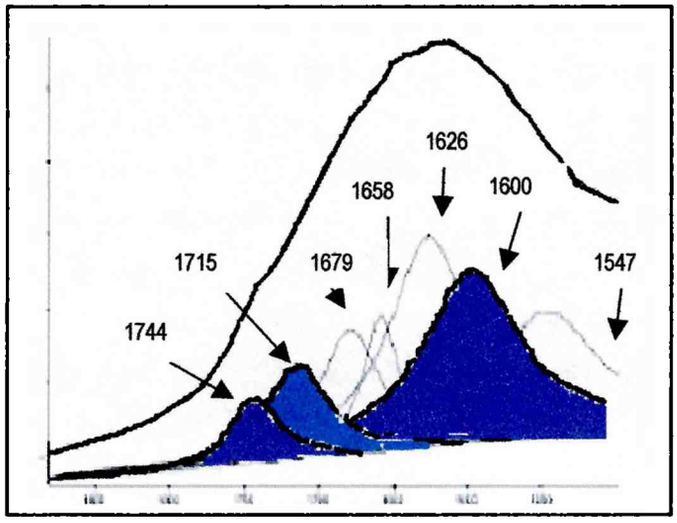
Debido a la complejidad de su composición, esta situación no es la más comúnmente encontrada en los sistemas biológicos. Sin embargo existen algunos recursos matemáticos para realizar análisis univariantes cuando existe superposición de bandas. Esta metodología denominada de DECONVOLUCIÓN Y FITEO es ampliamente utilizada en el estudio conformacional de proteínas o en la evaluación y cuantificación de macromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, y

carbohidratos) (Bosch y col. 2000; Grube y col. 1999) y otros componentes celulares (endoesporas, plihidroxialganoatos, cápsulas) en muestras de origen biológico (Batsoulis y col. 2004; Beech y col. 1999; Cheung y col. 2000; Monsoor y col. 2001).

6.1.1 Caracterización y cuantificación de componentes por deconvolución, fiteo y cálculo de áreas integradas (DFAI)

A pesar que desde los inicios la espectroscopía IR no fue muy utilizada para cuantificar componentes en una mezcla, se han desarrollado diferentes herramientas matemáticas e informáticas a lo largo del tiempo, que han permitido la aplicación de la Ley de Lambert y Beer en el análisis y cuantificación de muestras de tipo multi-componentes (Stuart y Ando 1997). Actualmente los software de aplicación en espectroscopía IR (Bruker Optics, Grams, Galactic, y otros) poseen una serie de operaciones que permiten el análisis cuali y cuantitativo así como también la interpretación y localización de picos espectrales de bandas anchas compuestas por varios componentes, a través del proceso de análisis denominado deconvolución y fiteo (*deconvolution anlysis and curve-fitting*). La mayoría de los software realizan este procedimiento a través de un ANÁLISIS DE DECONVOLUCIÓN Y FITEO POR CUADRADOS MÍNIMOS. Este análisis consiste en descomponer las bandas anchas en bandas más pequeñas, que por lo general tienen el aspecto de una Gaussiana o Lorentziana o una mezcla de ambas. Estas bandas deben cumplir el requisito que la suma de los cuadrados de la diferencia entre banda original y la banda generada por la suma de las componentes propuestas debe ser mínima. El procedimiento de deconvolución, fiteo y cálculo de áreas integradas (DFAI), se lleva a cabo por una serie de procedimientos que se detallarán en el **Esquema 4 del capítulo 2**. Brevemente, los pasos para la evaluación cuantitativa por DFAI consisten en la **normalización** del espectro, la **corrección de la línea de base** y la obtención de los picos que componen la banda ancha que se desea analizar. Para cada uno de los picos encontrados se propone la existencia de una banda del tipo Gausianas o Lorentzianas. Luego a través del ***FITEO*** (ajuste sucesivo) se optimizan las alturas y anchos de banda de cada una de ellas hasta obtener parámetros estadísticos ótpimos para el ajuste. El procedimiento del fiteo se detiene cuando se alcanza el máximo valor de chi^2 ($> 10^4$), la mejor correlación (R^2) y el mínimo error estándar. Una vez obtenidas las mejores Gaussianas o Lorentzianas que componen la banda ancha en estudio, el mismo software calcula las áreas correspondientes, denominadas **áreas integradas**. De las bandas componentes obtenidas por fiteo se seleccionan las que corresponden al analito que se desea cuantificar y su área integrada se relaciona por la ley de Lambert y Beer con la concentración (Galactic 1999; Stuart y Ando 1997).

Batsoulis y colaboradores han aplicado el procedimiento DFAI para la determinación de la concentración de ácido urónico en diferentes aislados comerciales de hemicelulosa (Batsoulis y col. 2004). A partir de espectros de ácido urónico puro determinaron tres picos de absorción características en la región 1850 – 1500 cm^{-1}: 1745, 1715 y 1600 cm^{-1} atribuidas a los grupos éster y carboxilato (**Fig. 23**).



El contenido de ácido urónico % por FT-IT (DRIFT) fue calculado utilizando la suma de las tres áreas integradas correspondientes a las bandas coloradas en azul

	Uronic acids content (%)	
Samples	Spectrophotometric method*	DRIFTS*
1	13.3 ± 0.3	12.4 ± 0.4
2	1.7 ± 0.1	2.1 ± 0.2
3	6.7 ± 0.2	7.4 ± 0.3
4	14.3 ± 0.2	15.1 ± 0.4

Fig. 23. Cálculo del contenido en peso de ácido urónico en 4 preparados comerciales de hemicelulosa. Deconvolución y fiteo de la región 1850 – 1500cm^{-1}. En azul se indican la bandas que se utilizaron para el cálculo del % en peso de ácido urónico en la muestra por el método DFAI. En la tabla se compara el valor obtenido para cuatro preparados de hemicelulosa por método químico y por espectroscopía IR (DRIFT). Tomado de Batsoulis 2004.

Sin embargo cuando se quiso cuantificar el ácido urónico presente en las muestras biológicas fue necesario el empleo de la técnica de deconvolución y fiteo ya que estas bandas se encontraban incluidas dentro de la banda Amida I superpuestas con las bandas atribuidas a otros componentes como agua, cetonas y proteínas. Este procedimiento permitió establecer la existencia de 7 bandas dentro de Amida I, que fueron sometidas tal como se indica en la **Fig. 23** a la técnica DFAI. Las bandas

indicadas en azul fueron asociadas al contenido de ácido urónico. Una vez estimadas las áreas de dichas bandas y a través de una calibración realizada previamente con ácido urónico puro se pudo establecer el contenido de ácido en los 4 preparados comerciales. En la tabla de la **Fig. 23** se compara el contenido de ácido urónico (% peso / peso) obtenido por métodos químicos (reacción con m-hidroxidifenilo, MHDP) con el obtenido por espectroscopía IR (DRIFT)).

El método de DFAI es ampliamente utilizado en la determinación de la **estructura secundaria de proteínas**, aplicado sobre las bandas de Amida I y Amida III que contienen información sobre los estiramientos correspondientes a >C=O, -N-H, -C-N- característico de proteínas (Fabian y and Mäntele 2002; Kaiden y col. 1987; Ma y col. 2001; McLean y col. 1989; Pelton y and McLean 2000; Surewicz y col. 1993; van de Weert y col. 2001; Vecchio y col. 1999). El estudio de estructura secundaria y cambios conformacionales de proteínas ante variaciones de parámetros externos a través de estos métodos, constituye un tema sumamente amplio y complejo, que hace que dentro de la espectroscpía aplicada a los sistemas biológicos constituya una temática con especialistas dedicados a tal fin.

6.2. Análisis multivariantes.

Los métodos multivariantes emplean más de una señal espectral para caracterizar una variable. Se utilizan cuando la banda de absorción de un componente presenta superposición con otras bandas o cuando se desea cuantificar múltiples propiedades o variables simultáneamente (Irudayaraj y Tewari 2003). Los métodos multivariantes también pueden ser aplicados cuando no se puede determinar puntualmente una o más señales espectrales que representen una variable, sino que ésta está representadas por un conjunto de señales, que se conoce como el *pattern*, el patrón, la forma, el aspecto, el dibujo, de los espectros en una región, en varias regiones, o más aún, en todo el rango espectral. De modo que para llevar a cabo una cuantificación, caracterización o identificación basada en un análisis multivariante, muchas veces no es necesario identificar bandas, intensidades, o frecuencias de las propiedades que se desean estudiar (Bruker Optics 1999; Figueras 2000; Naumann 2000). Estos métodos asumen que es posible observar modificaciones sistemáticas en el *pattern* de los espectros, que son consecuencia de las variaciones de las variables que se desean estudiar. Los análisis basados en el reconocimiento de *patterns* se llevan a cabo sobre los espectros o sus derivadas normalizadas, consideradas como verdaderas huellas dactilares o *fingerprint* de las muestras a analizar.

Debido a su complejidad espectral, las muestras biológicas requieren de métodos sofisticados para su caracterización, diferenciación, clasificación y cuantificación. El

hecho que la espectroscopía FT-IR está siendo utilizada actualmente en estudios de rutina, en análisis microbiológico y en medicina, hace que se le exija a los métodos de estudio confiabilidad, reproducibilidad y robustez. Esto sumado al hecho que para llegar a un resultado de estas características es necesario analizar simultáneamente cientos de espectros, hace que el uso de técnicas multivariantes sea cada vez más necesario (Naumann 2001; Schmitt y Udelhoven 2001). Los métodos mutlivariantes pueden ser aplicados para diferentes propósitos:

1- Calibración: Desarrollar un modelo para predecir una propiedad de interés basada en otras determinaciones: determinación de la concentración de uno o más componentes en muestras biológicas por regresión de componente principal (PCR) o cuadrados mínimos parciales (PLS).

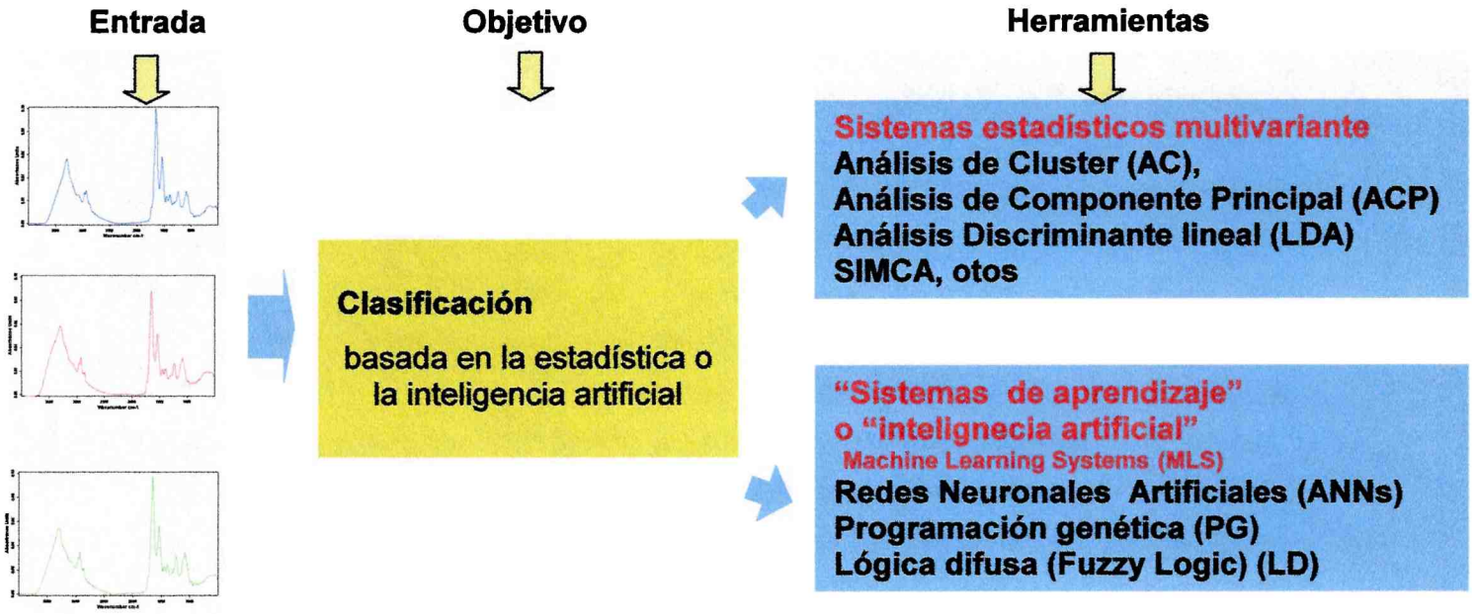
2- Clasificación: Encontrar una distribución de los datos. Se aplica particularmente en clasificación e identificación de microorganismos, pudiendo diferenciar en muchos casos hasta nivel de cepa.

3- Predicción: Predecir, a través de la aplicación de PCR y PLS (cuadrados mínimos parciales) propiedades físicas o químicas del material biológico.

Actualmente existe una gran cantidad de técnicas multivariantes, que involucran una amplia gama de metodologías para el pre-tratamiento, evaluación y representación de los datos. Estas técnicas permiten el análisis directo y la interpretación de la estructura e interrelación de una "nube de datos". Los métodos multivariantes pueden clasificarse teniendo en cuenta el fundamento de su aplicación en aquellos basados en **la estadística** y los que se fundamentan en **la inteligencia artificial** (Naumann 2001; Schmitt y Udelhoven 2001) (**Esquema 1**).

Las áreas de **estadística multivariante** e **inteligencia artificial** a pesar de superponerse en cierto modo, ya que los dos campos se fundamentan en el análisis de *patterns* y estudian un importante número de datos, se diferencian en que la inteligencia artificial se basa en la implementación de algoritmos computacionales complejos. Los métodos conocidos como "sistemas de aprendizaje" (**Machine Learning Systems, MLS)** consisten en el desarrollo de técnicas que permiten a las computadoras "aprender". Más específicamente, son métodos que *crean programas computacionales basados en el análisis del set de datos*. En los últimos años han tenido una amplia gama de aplicaciones en distintos campos como biología, medicina, bioquímica (Ellis y col. 2002; Ellis y col. 2005; Goodacre y col. 2000), estudios de mercado y justicia: el diagnóstico médico, en la determinación de la probabilidad de muerte en hospitales (Trujillanoa y col. 2001), en la clasificación de las secuencias de ADN (Boufounos, P. et al., 2004), en el reconocimiento de voz y escritura (Rabiner 1989)en análisis y control del stock en los mercados.

Esquema 1. Herramientas para el tratamiento de los datos espectrales



Los tres métodos mencionados en el **Esquema 1** basados en el "aprendizaje", se diferencian entre sí en la manera de "aprender" y la manera de expresar los resultados. Las **redes neuronales** artificiales (RNA) consisten en sistemas de *adaptación propia* constituidas por unidades de procesamientos sencillas que tienen la capacidad natural de clasificar o encasillar los datos experimentales y hacerlos disponibles para una aplicación práctica. Las RNA son sistemas de cálculo que se asemejan a las redes neuronales biológicas al utilizar nodos (neuronas) interconectados. Estos nodos reciben la información, realizan operaciones sobre los datos y transmiten sus resultados a otros nodos. En los sistemas de RNA el conocimiento es adquirido por la red por un proceso de aprendizaje y luego la fuerte conexión entre los neurones guarda esa información adquirida (Dayhoff y DeLeo 2001; Ozaki y Murayama 2001). Los datos deben ser particionados en por lo menos dos grupos, uno se utilizará para el "entrenamiento" o " aprendizaje" y el otro grupo de datos es necesario para "asegurar" o validar la confiabilidad de los resultados (Schmitt y Udelhoven 2001; Zupan y Gasteiger 1999). A pesar de ser una metodología excelente para la identificación y caracterización de aislamientos bacterianos desconocidos, la información que el sistema utiliza para obtener dicho resultado por lo general no es de fácil acceso. En general los software capaces de desarrollar redes a partir de datos experimentales, lo hacen funcionando como sistemas de tipo "caja negra", por lo cual es difícil obtener datos en términos químicos. Sin embargo en el

año 2000 Juergen Schmitt dearrolló un software (NeuroDeveloper) que permite acceder a las variables que hicieron posible establecer la clasificación buscada.

El sistema de **Programación genética (PG)** es un método automático para crear un programa computacional de trabajo que parte del estamento más complejo del problema, del nivel más alto: "qué se necesita hacer" y automáticamente crea un programa computacional para resolver el problema (Goodacre y col. 2000).La **Lógica Difusa (LD)**, por su parte, se basa in la incorporación de una regla básica sencilla como controlador de la solución: si "X e Y entonces Z", de modo que no intenta modelar el sistema matemáticamente, se basa más en el razonamiento empírico que en el entendimiento.

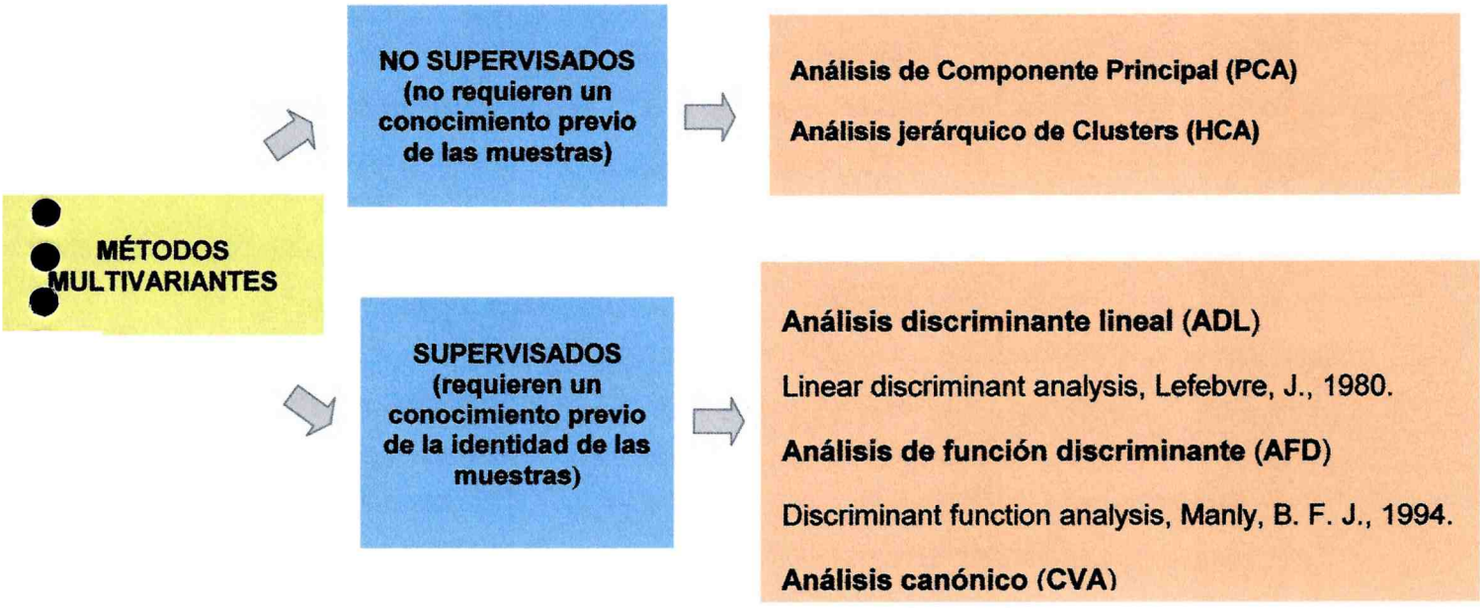
Las técnicas quemométricas utilizadas en espectroscopía, también pueden ser clasificadas sobre la base del conocimiento previo que se requiere sobre las muestras a analizar. De acuerdo a este esquema de clasificación las técnicas multivariantes pueden ser **no supervisadas,** o también denominadas **técnicas de clasificación objetivas,** que analizan los grupos naturales que existen en el conjunto de datos y las técnicas **supervisadas** que requieren un conocimiento previo sobre la identidad de las muestras (Mariey y col. 2001; Naumann 2000) **(Esquema 2).**

6.2.1 Métodos multivariantes no supervisados

Los métodos no supervisados, también llamados **métodos exploratorios, o de clasificación objetiva**, describen la estructura de los datos espectrales sin un conocimiento previo de la identidad de las muestras. Están basados en criterios objetivos de pertenencia a un grupo en el conjunto de datos. Un ejemplo de este tipo sería efectuar un análisis de heterogeneidad en una población de microorganismos: establecer el grado de diversidad en un conjunto de aislamientos, por ejemplo hospitalarios o de una región del país, determinar si los mismos son similares o no desde el punto de vista de su expresión fenotípica. Estos métodos tratan de encontrar estructuras de grupos intrínsecas dentro del conjunto de datos sin la necesidad de una asignación o partición previa de los iguales.

Otra aplicación de los métodos multivariantes no supervisados, de gran utilidad en diagnóstico médico y microbiología, es el desarrollo de modelos de clasificación. Para llevar a cabo estos estudios debe contarse con cierta información previa sobre las muestras, es decir que cada espectro debe estar asociado a un dato cualitativo, debe estar previamente caracterizado con algún criterio que permite asignarle pertenencia a un grupo. Cuando se aplican estos métodos a la caracterización o identificación de microorganismos, por ejemplo, deben incluirse en el esquema de análisis, espectros

Esquema 2. Clasificación de los métodos multivariantes de acuerdo al conocimiento previo que es necesario tener de la identidad de las muestras



de muestras perfectamente caracterizadas por otras técnicas (bioquímicas o de biología molecular), cada espectro incluido en el análisis debe ser formalmente asignado a una clase (género, especie o cepa). Posteriormente espectros de muestras desconocidas son desafiados a estos esquemas de clasificación y se evalúa el grado de pertenencia a alguna de las clases previamente definidas (Mariey y col. 2001; Naumann 2000; Schmitt y Udelhoven 2001).

6.2.1.1. Análisis factorial

El objetivo del análisis factorial (AF) es extraer la información esencial de un grupo de datos amplio y diverso, alcanzar la **reducción** de los mismos y facilitar el establecimiento de un patrón de agrupación (Everitt y Holford 2005; Ozaki y Murayama 2001). La técnica, al igual que cualquier análisis estadístico multivariante consiste en representar el objeto, en este caso el espectro IR, en primer instancia como puntos en un espacio hiper-dimensional de tantas dimensiones como propiedades (en nuestro caso todos los valores de absorbancias a una frecuencia determinada). Luego esta matriz es comprimida por análisis factorial. Para construir una base reducida se utilizan software especialmente diseñados para tal fin. La **Fig. 24** muestra un esquema de cómo se procede en un análisis de componente principal.

Construcción de la base reducida:

a) **Datos originales**: Espectros IR que constituyen la BASE DE DATOS PRIMARIOS. Aproximadamente 3500 coordenadas por espectro.

b) **Pre-tratamientos de la base de datos**

i) Rango espectral : Se selecciona el rango espectral de interés

ii) Filtración: obtención de las derivadas primera o segunda

iii) Normalización: Los espectros son normalizados, por ejemplo, mediante un pico dado o una normalización vectorial.

c) **Factorización por Análisis de Componente Principal (ACP)**

El objetivo de este paso es hallar, por un análisis específico de **vectores y valores propios** *"eigenvector / eigenvalue"*, un nuevo sistema de coordenadas de varianzas pesadas (*variance-weighted coordinate system*) que se adapta a la estructura característica que posee la nube de datos. Los vectores ortogonales de este nuevo sistema de coordenadas, "vectores propios" (*eigenvectors*), representan la estructura de la información característica de los datos de origen. De este modo, los espectros IR ya no son representados por sus absorbancias o frecuencias, sino por nuevas coordenadas, **sistemas de coordenadas de varianzas pesadas,** que contienen las propiedades específicas del todo el conjunto de datos. En general los primeros "eigenvectors", del 2 al 24 de este nuevo sistema de coordenadas representa, en cantidades decrecientes, más del 99 % de la varianza entre los espectros (Everitt y Holford 2005; Maquelin y col. 2002b; Naumann 2000). En otras palabras el ACP hace una transformación en la cual muchas dimensiones originales son trasformadas a otro sistema con menores dimensiones. Las dimensiones de estas nuevas coordenadas axiales, llamadas **factores**, son seleccionadas para expresar las mayores varianzas.

El procedimiento logra descomponer la matriz de los datos en una parte estructural y otra parte asociada al ruido, de modo que se logra contar con un número reducido de dimensiones sin disminuir la varianza entre ellos (Amiel y col. 2001; Mariey y col. 2001; Ozaki y Murayama 2001). Así a través de un análisis de este tipo, los espectros IR originales (con 2000 a 4000 valores de absorbancia) pueden ser representados en un sistema de coordenadas nuevo de solo 2 a 12 vectores propios.

El procedimiento logra descomponer la matriz de los datos en una parte estructural y otra parte asociada al ruido, de modo que se logra contar con un número reducido de dimensiones sin disminuir la varianza entre ellos (Mariey y col. 2001; Ozaki y Murayama 2001). Así a través de un análisis de este tipo, los espectros IR originales (con 2000 a 4000 valores de absorbancia) pueden ser representados en un sistema de coordenadas nuevo de solo 2 a 12 vectores propios

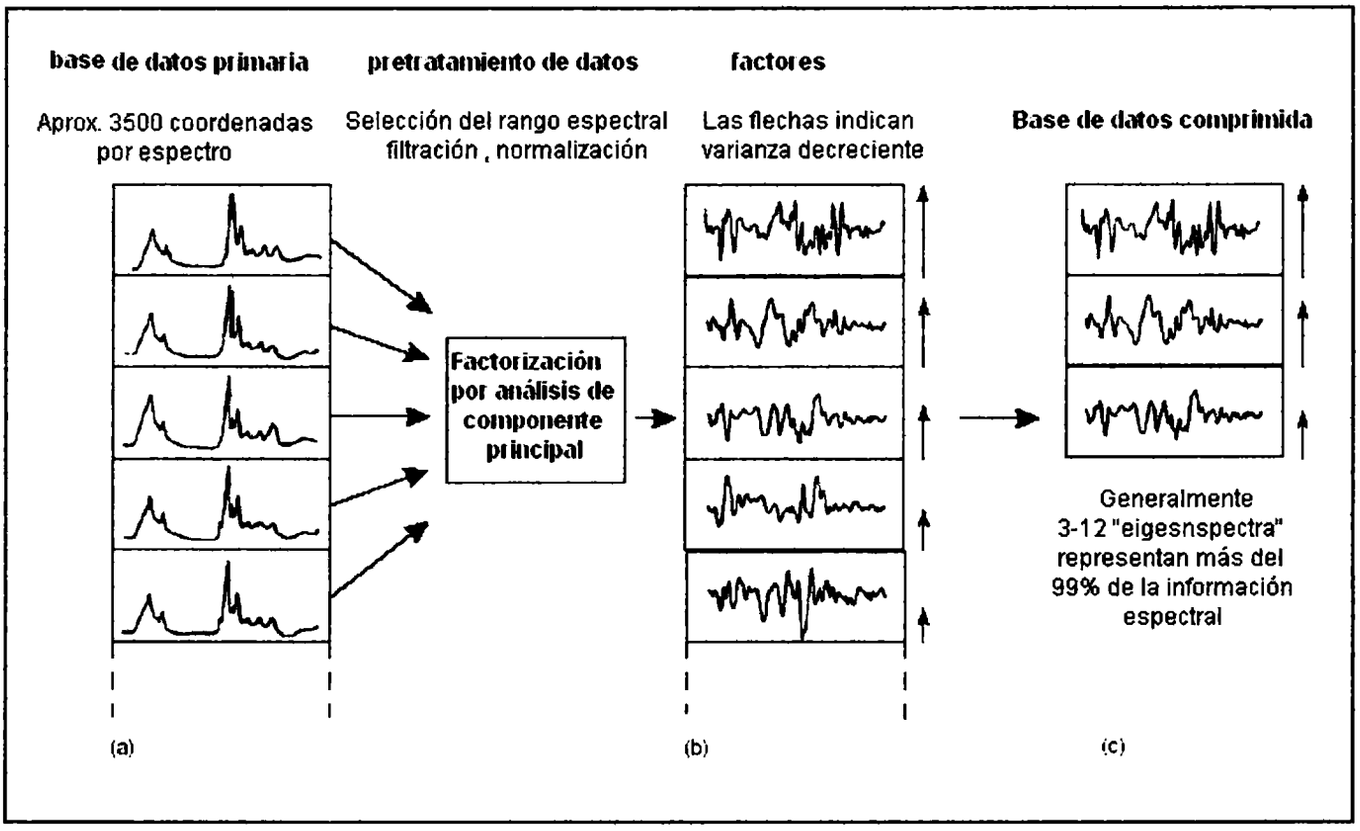


Fig. 24 Representación esquemática de la compresión de datos por análisis factorial. (a) Representa la base de datos primaria. Estos espectros son sometidos a un pre-tratamiento: derivada, selección de los rangos espectrales donde se desea trabajar, normalización. (b) La *varianza pesada* es obtenida como consecuencia del análisis factorial. El tamaño de las flechas indica la disminución de la varianza. (c) Se obtiene la compresión de los datos dado que los primeros (por lo general desde el 2do al 12vo) "eigenspectra" generalmente describen más del 99 % de la varianza dentro de un grupo de datos. Tomado de Naumann 2000.

La **Fig. 25** muestra lo que se denomina mapa de análisis de componente principal (mapa ACP) calculado de un conjunto de aproximadamente 140 espectros de organismos Gram positivos y Gram negativos correspondientes a 13 especies diferentes. El mismo fue construido por una proyección bidimensional de vectores propios (1 y 2) que permiten a simple vista observar la estructura intrínseca de todo el conjunto de datos (Naumann 2000). Esta representación muestra que en el conjunto de espectros que se analiza se diferencian en dos nubes difusas que representan dos

grandes categorías correspondientes a los organismos Gram-positivos y Gram-negativos.

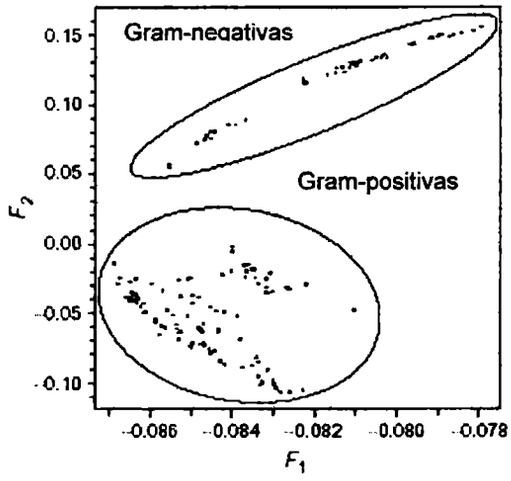


Fig. 25 Mapa de análisis de componente principal (ACP) calculado a partir de un conjunto de 143 espectros pretratados. La proyección de los datos fueron utilizados los factores F1 y F2. Tomado de Naumann 2000

6.2.1.2 Análisis de clusters (AC).

El análisis de cluster es un método estadístico multivariantes de clasificación no supervisado, que intenta encontrar una agrupación intrínseca dentro de los datos sin la necesidad de llevar a cabo ninguna asignación previa de clases, particionamiento de los datos, entrenamiento, o *test* previo de los datos (Everitt y Holford 2005). El objetivo principal del análisis de cluster es establecer similitudes y disimilitudes entre organismos y mostrar dichas diferencias mediante un dendrograma que agrupa en clusters los organismos más semejantes. Los dendrogramas constituyen entonces, representaciones gráficas de un proceso de agrupamiento o "*clustering*".

El objetivo del análisis de cluster es clasificar los objetos, como por ejemplo describir su estructura e interrelaciones intrínsecas de un dado conjunto de **n** objetos (espectros) donde cada uno de ellos se encuentra definido por múltiples propiedades. Los diferentes métodos de clasificación utilizan algoritmos de clasificación que se basan en la **medida de distancias espectrales** para calcular la **similitud entre los objetos**. Las medidas de distancia más comúnmente utilizadas son el coeficiente producto momento de correlación de Pearson, la distancia Euclideana y la distancia Mahalonobiana. Con estos coeficientes o distancias se construye una matriz que describe la disimilitud o similitud de todos los objetos contra todos los objetos (matriz de n x n). Estas matrices se utilizan para particionar los mismos en grupos, clases o

clusters (Bruker Optik GmbH 2000; Kansiz y col. 1999; Mariey y col. 2001). El objetivo es lograr que la varianza intra-clase sea la menor posible, mientras que la varianza Inter.-clase sea máxima. Todos los objetos pertenecientes a un *cluster* poseen la mayor similitud posible, mientras que los que pertenecen a distintos cluster son lo más diferente posible (Naumann 2000; Spath 1980). Para la construcción de los clusters existen también numerosos métodos, aunque los más utilizados son el algoritmo de Ward (Ward 1963) y los métodos basados en la agrupación de pares de datos mediante la media aritmética (UPGMA), también llamada "average linkage" (Spath 1980).

Los métodos **estadísticos multivariantes no supervisados** son operados generalmente para mostrar similitudes, heterogeneidad o diversidad entre organismos del mismo género o especie. También es posible identificar organismos incluyendo en el análisis muestras perfectamente caracterizadas. La **identificación de una muestra desconocida** se realiza calculando la distancia entre su espectro y los incluidos en el modelo. El procedimiento detallado para realizar un análisis de cluster se describe en el **Capítulo 4**. Brevemente consiste en encontrar las principales ventanas o rangos o frecuencias espectrales que permiten diferenciar los grupos de espectros que son analizados. En esos rangos o frecuencias espectrales establecidas se calcula el coeficiente de Pearson, o se realiza un estudio de componente principal, para establecer la disimilitud entre los grupos o espectros comparados, para finalmente construir un dendrograma que muestre dichas diferencias o disimilitudes. La **Fig. 26** muestra comparativamente los dos métodos estadísticos multivariantes descriptos aplicados a la tipificación de aislados *de E. coli* altamente relacionados.

6.2.2 Métodos multivariantes supervisados

Las técnicas quemométricas denominadas supervisadas requieren un conocimiento previo sobre la identidad de las muestras, cada espectro debe *a priori* ser formalmente asignado a una clase definida. Con este conjunto de muestras perfectamente identificadas y caracterizadas se **entrena** un modelo que luego puede predecir la identidad de muestras desconocidas (Maquelin y col. 2002a; Naumann 2000).

El propósito en cada caso es formar combinaciones lineales de los datos con diferente peso para minimizar la varianza dentro de un grupo y maximizar la varianza entre grupos. La distancia entre grupos, medida por la distancia Mahalanobis, caracteriza la partición obtenida (Lefebvre 1980).

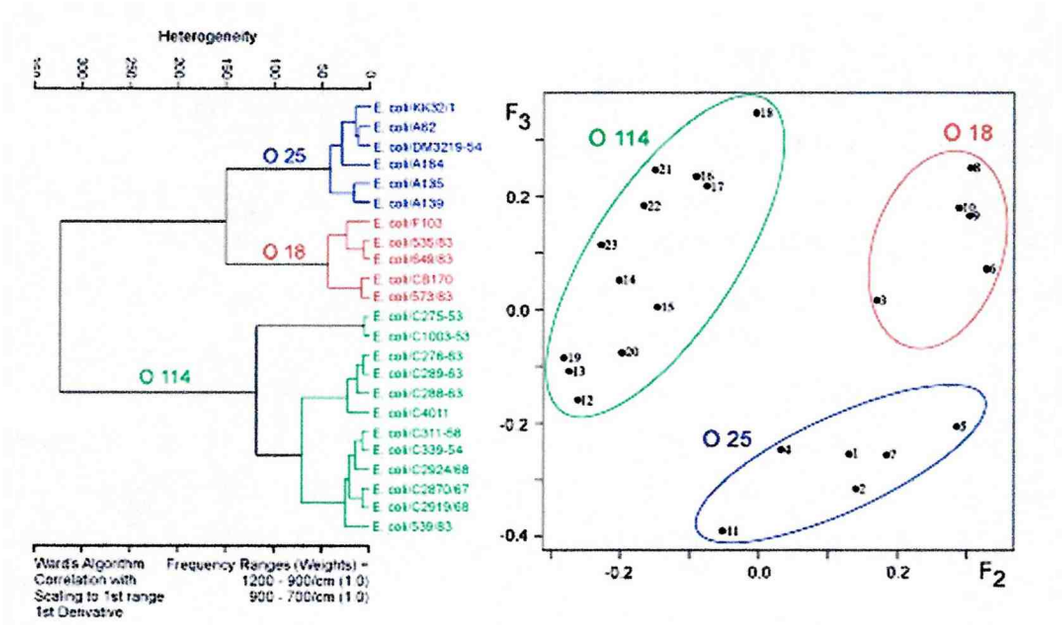


Fig. 26 Tipificación de aislados de *E. coli* utilizando dos métodos estadísticos multivarianes, (a) Análisis de componente principal (ACP) y (b) Análisis de cluster (AC). Tomado de Naumann, D., Conferencia: *Vibrational Spectroscopy in Microbiology: Concepts and Overview,* dictada en el marco *del International Worshop on Vibrational Spectroscopy Applied to Microbiology and Biomedical Research,* La Plata, Noviembre, 2004.

Estos métodos son validados a través de diferentes *tests*. Debido a que los mismos requieren de un test de validación, para realizarlo es necesario contar con un número de datos tal que permita separar los mismos en dos grupos: un grupo de **entrenamiento** que se utiliza para elaborar el método y un grupo de ***testeo*** que se emplea para validarlo.

Respecto a las redes neuronales artificiales, las mismas constituyen uno de los procedimientos más utilizados dentro de los sistemas supervisados de entrenamiento propio. Se definen como sistemas no lineales, flexibles y con gran capacidad de generalización.

Goodacre,R., et al, ((Goodacre y col. 1996; Goodacre y col. 1998)) mostraron la superioridad de las RNA comparadas con los métodos no supervisados, ACP y AC

para la discriminación e identificación de varias especies bacterianas así como también para la caracterización de endoesporas en diferentes especies de *Bacillus* (Goodacre 2000). Del mismo modo Schmitt, J., et al. (1998) aplicaron un sistema jerárquico que permitió la separación de 6 géneros de bacterias y posteriormente, Tintelnott, K. , et al. (2000) lograron desarrollar un método basado en RNA para identificar dos especies de *Candida dubliniensis* y *C. albicans.*

7 APLICACIONES

La gran cantidad de ventajas que posee la espectroscopía FT-IR, entre las que se destacan la rapidez de la metodología para la obtención de resultados comparada con las técnicas convencionales; la amplia aplicabilidad a diversos tipos de muestras (sólidas, líquidas, suspensiones); la gran especificidad para diferenciar composición molecular entre distintos materiales y su alta sensibilidad en la detección de grupos funcionales, hace a esta técnica sumamente atractiva y de amplia aplicación en distintas áreas. Asimismo, debido a que la espectroscopía IR requiere de una pequeña cantidad de consumibles y los sistemas computacionales que necesitan ser aplicados no requieren de un hardware específico el costo de la aplicación de esta metodología es reducido si se cuenta con el equipo correspondiente. Se debe reconocer en este sentido que la inversión inicial puede resultar importante, pero que la misma es compensada ampliamente durante la vida útil del equipo.

La posibilidad de crear bases de datos espectrales que pueden ser compartidas e intercambiadas entre los diferentes laboratorios nacionales e internacionales es una de sus principales ventajas. Existen universalmente bases de datos espectrales de proteínas que son utilizadas para determinar estados conformacionales en las mismas (Fabian 2002; Kneipp 2003), bibliotecas espectrales de microorganismos relacionados con la salud y con la industria alimenticia (Wenning 2002; Maquelin y col. 2003; Udelhoven, T. y col. 2003). En el área microbiológica, especialmente en el tema de salud, se ha demostrado la capacidad de la técnica para realizar estudios epidemiológicos con gran eficiencia, para la detección de cadenas de infección (Sockalingum y col. 2002), así como también para el control en el mantenimiento de colecciones de microorganismos. También ha sido reportada la aplicación a las industrias de la alimentación, las farmacéuticas y estudios de calidad de aguas (Sommer, A. J. 2000; Masuch, R. y Moss, D. A., 2003). En el monitoreo y control de los procesos biotecnológicos constituye una técnica alternativa a los procedimientos químicos convencionales (Tseng, y col. 1996; Yeung, K. S. y col. 1998, Shuster, K.,

1999), que permite obtener, en tiempos reales, información del fenotipo de las poblaciones en crecimiento.

El desarrollo de nuevos espectrómetros de alta tecnología, sumado a las estrategias de evaluación de los espectros obtenidos, ha hecho posible el análisis sobre muestras biológicas como virus, células animales y vegetales y aún en el estudio de tejidos, y fluidos biológicos que por otras metodologías no resulta posible analizar (Millery col. 2002; Schmitt y col 2002; Diem y col. 2004; Miljkovic y col. 2004, Diem y col. 2004; Wood y col. 2004; Romeo y col 2004). El **Esquema 3** muestra las aplicaciones de la espectroscopía FT-IR en estudio de sistemas biológicos.

Las investigaciones sobre la complementariedad de FT-IR con otras técnicas como FT-NIR y FT-Raman, y el desarrollo de nuevos sistemas de computación para el análisis de reconocimiento de *patterns,* abre caminos impensados en las aplicaciones biológicas y biomédicas.

Esquema 3. Aplicaciones de espectroscopía Infrarroja en el estudio de material biológico

Análisis de estructura-función en moléculas biológicas
folding/misfolding en proteínas,
interacciónreceptor-ligando,
reacciones)

Caracterización de células intactas
microorganismos, plantas, células animales

Caracterización de cultivos en biofilms
Análisis de células y exopolímeros

Monitoreo de bioprocesos

Caracterización de tejidos: imágenes de cortes de tejidos basadas en microespectroscopía IR
Diferentes formas de cancer (Ej. melanoma, cancer de colon)
Diferentes formas de desórdenes neurológicos
(Ej: esclerosis múltiple, Alzheimer, enfermedades producidas por priones)

Análisis de fluidos biológicos
Ej: sangre, suero, orina, líquido sinovial,
líquido amniótico, etc)

8 OBJETIVOS

8.1. Objetivos generales de este trabajo

1. **Iniciar una nueva línea de investigación, no desarrollada en nuestro país, la cual pudiese ser aplicada a la caracterización molecular de organismos de interés biotecnológico.** Debido a que en los inicios del trabajo el CINDEFI no contaba con todo equipamiento necesario para realizar los mismos, en una primera se debieron establecer conexiones con físicos de nuestra Facultad que disponían del equipamiento y manejaban el mismo en temas aplicados a la química inorgánica. Esto se realizó en el marco de un PICT conjunto entre CEQUINOR, Dr. Nestor E. Massa y CINDEFI, Dr. Osvaldo Yantorno.

2. **Capacitarme en un campo multidisciplinario,** donde era esencial disponer de conocimientos de física, química e informática, que serían luego aplicados al área biológica.

3. **Avanzar en el conocimiento de la adquisición de espectros y tratamiento de la información contenida en los mismos.** En este punto el objetivo fue lograr alcanzar las normas de estandarización internacionales respecto a la toma de muestra, análisis de la calidad espectral y empleo de distintos software para el tratamiento de la información contenida en los espectros. Esto incluyó la adquisición de los software, el aprendizaje y entrenamiento en su manejo tanto para el registro de los espectros como para su análisis. Es importante resaltar que al inicio de esta Tesis no se conocía en nuestro país ninguna de estas herramientas de análisis.

4. Alcanzados los conocimientos mínimos se comenzó con el estudio de las diferentes aplicaciones de la espectroscopía FT-IR en la caracterización molecular microbiana:
    i. Diferenciar, clasificar e identificar poblaciones microbianas de interés biotecnológico (alimentos, salud humana y animal) hasta el nivel de especie y cepas
    ii. Detectar, caracterizar y cuantificar la expresión de componentes celulares tales como pilis y cápsulas

iii. Monitorear el crecimiento de microorganismos en cultivos líquidos y en biofilm

iv. Caracterización de biopolímeros producidos por microorganismos crecidos en biofilms

Para llevar a cabo estos estudios fue necesario estudiar y desarrollar las diferentes metodologías para el análisis espectral: análisis convencionales basados en la ley de Lambert y Beer, como el cálculo de áreas o alturas de bandas espectrales, técnicas basadas en el análisis multivariante de reconocimiento de *patterns* como análisis factorial y análisis de clusters, redes neuronales artificiales y técnicas multivariantes cuantitativas.

Todos estos estudios fueron ampliados y complementados con otras metodologías como microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía electrónica por transmisión (MET), análisis químicos (proteínas, carbohidratos), caracterizaciones fisicoquímicas y bioquímicas (hidrofobicidad, electroforesis de proteína de membrana externa –OMP- y de lipopolisacáridos –LPS-, y espectrometría de masas de células enteras (MALDI-TOF).

5. Construir las bases para la creación de una línea de investigación en el laboratorio sobre espectroscopía IR para la caracterización molecular microbiana, a través de la formación de nuevos recursos humanos y la incorporación de nuevo instrumental.

Reference List

1. Abrams, Ch. B. 1993. IR Tutor. [V 1.0]USA, Columbia University in collaboration with Perkin Elmer.

2. Amiel, C., Mariey, L., Denis, C., Pichon, P., and Travert, J. 2001. FT-IR spectroscopy and taxonomic purpose: Contribution to the classification of lactic acid bacteria. Lait 81, 249-255

3. Batsoulis, A. N., Nacos, M. K., Pappas, C. S., Tarantilis, P. A., Mavromoustakos, T., and Polissiou, M. G. 2004. Determination of uronic acids in isolates hemicelluloses from kenaf using DRIFT and curve -fitting deconvolution method. App.Spectrosc. 58, 199-202

4. Beech I, Hanjagsit L, Kalaji M, Neal AL, Zinkevich V. 1999. Chemical and structural characterization of exopolymers produced by *Pseudomonas* sp. NCIMB 2021 in continuous culture. Microbiol 145:1491-1497.

5. Boese M, Piry A. 2004. FT-IR analyzer for routine microbiology. Workshop FT-IR Spectroscopy in Microbiological and Medical Diagnostic, Robert Koch-Institute, Berlin Octubre 21-2213.

6. Bosch, A., Massa, N. E., Donolo, A. S., and Yantorno, O. 2000. Molecular characterisation by infrared spectroscopy of *Bordetella pertussis* growing in biofilm. Physica Status Solidi 220, 635-640

7. Bouhedja W, Sockalingum GD, Pina P, Allouch P, Bloy C, Labia R, Millot jM, Manfait M. 1997a. ATR-FTIR spectroscopic investigation of *E. coli* transconjugants beta-lactams-resistance phenotype. FEBS Lett 412:39-42.

8. Bouhedja W, Sockalingum GD, Pina P, Gainvors A, Belarbi A, Millot jM, Manfait M. 1997b. Spectroscopy of biological molecules: Modern Trends. The Netherlands: Kluwer Academic Publistars.

9. Bruker Optics. 1993. Sample Preparation, Measurement and Evaluation of the FT-IR Spectra of Microorganisms. Ettlingen, Germany: Bruker Optik GmbH.

10. Bruker Optics. 1999. Identification of bacteria by FT-IR spectroscopy. Bio-Medical.FT-IR/NIR/Raman 2, 1-15

11. Bruker Optics. 2004. Identification Yeast and Bacteria in Food. Bruker Optics, Billerica MA 01821, USA.

12. Bruker Optik GmbH. 2000. Spectroscopic Software, Opus NT, Ident. 1[3]Germany, Bruker.

13. Cheung HY, Sun SQ, Sreedhar B, Ching WM, Tanner PA. 2000. Alterations in extracellular substances during the biofilm development of Pseudomonas aeruginosa on aluminum plates. J Appl Microbiol 89:100-106.

14. Choo-Smith LP, Maquelin K, van Vreeswijk T, Bruining HA, Puppels GJ, Ngo Thi NA, Kirschner C, Naumann D, Ami D, Villa AM, Orsini F, Doglia SM, Lamfarraj H, Sockalingum GD, Manfait M, Allouch P, Endtz HP. 2001. Investigating microbial (micro)colony heterogeneity by vibrational spectroscopy. Appl Environ Microbiol 67:1461-1469.

15. Dayhoff, J. E. and DeLeo, J. M. 2001. . Artificial neural networks. Opening the black box. Cancer 91, 1615-1635

16. Donlan RM, Piede JA, Heyes CD, Sanii L, Murga R, Edmonds P, El Sayed I, El Sayed MA. 2004. Model system for growing and quantifying Streptococcus pneumoniae biofilms in situ and in real time. Appl Environ Microbiol 70:4980-4988.

17. Ellis, D. I., Broadhurst, D., Kell, D., Rowland, J., and Goodacre, R. 2002. Rapid and Quantitative detection of the microbial spoilage of meat by FT-IR and machine learning. Appl Environ Microbiol 68[6], 2822-2828

18. Ellis, D. I., Broadhurst, D., Kell, D., Rowland, J., and Goodacre, R. 2005. Rapid and Quantitative detection of the microbial spoilage of meat by FT-IR and machine learning. Appl Environ Microbiol 68[6], 2822-2828

19. Erukhimovithch, V., Pavlov, V., Talyshinsky, M., Souprun, Y., and Huleihel, M. 2005. FTIR microscopy as a method for identification of bacterial and fungal infections. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis 37, 1105-1108

20. Everitt, B. S. and Holford, T. R. 2005. Multivariate statistica methods. Statistical Methods in Medical Research 14, 253-280

21. Fabian H, and Mäntele W. 2002. Infrared Spectroscopy of Proteins. In: Chalmers JM, Griffiths PR, editors. Handbook of Vibrational Spectroscopy. John Wiley and Sons Ltd.p 3399-3425.

22. Figueras, S. M. 2000. Introducción al Análisis Multivariante <http://www.5campus.com/leccion/anamul> 5campus.com, Estadística

23. Galactic. 1999. Grams / 32. [version 5.2], Galactic Industries corporation.

24. Goodacre, R., Shann, B., Gilbert, R. J., Timmins, E. M., McGovern, A. C., Alsberg, B. K., Kell, D. B., and Logan, N. A. 2000. Detection of the dipicolinic acid biomarker in Bacillus spores using Curie-point pyrolysis mass spectrometry and Fourier transform infrared spectrocopy . Anal Chem 72[1], 119-127

25. Goodacre, R., Timmins, E., Rooney, P., Rowland, J., and Kell, D. 1996. Rapid identification of *Streptococcus* and *Enterococcus* species using diffuse reflectance-absorbance Fourier transform infared spectroscopy and artificial neural networks. FEMS Microbiol.Lett. 140, 233-239

26. Goodacre R, Timmins EM, Burton R, Kaderbhai N, Woodward AM, Kell DB, Rooney PJ. 1998. Rapid identification of urinary tract infection bacteria using hyperspectral whole-organism fingerprinting and artificial neural networks. Microbiology 144 (Pt 5):1157-1170.

27. Grube, M., Zagraba, E., Gromozova, E., and Fomina, M. 1999. Comparative investigation of the macromolecular composition of mycelia forms Thielavia terrestris by infrared spectroscopy. Vibrational Spectrosc. 19, 301-306

28. Guibet, F., Amiel, C., Cadot, P., Cordevant, C., Desmonts, M. H., Lange, M., Marecat, A., Travert, J., Denis, C., and Mariey, L. 2003. Discrimination and classification of *Enterococci* by Forurier Transform infrared (FT-IR) spectroscopy. Vibrational Spectrosc. 33, 133-142

29. Helm D, Labischinski H, Naumann D. 1991a. Elaboration of procedure for identication of bacteria using Fourier-Transform IR spectral libraries: a stepwise correlation approach. J Microbiol Meth 14:127-142.

30. Helm, D., Labischinsky, H., Schallehn, G., and Naumann, D. 1991b. Classificaton and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy. J.Gen.Microbiol. 137, 69-79

31. Helm, D. a. D. N. 1995. Identification of some bacterial cell components by FT-IR spectroscopy. FEMS Microbiol Lett 126, 75-80

32. Kaiden, K., Matsui, T., and Tanaka, S. 1987. A study of the Amide III band by FT-IR spectrometry of the secondary structure of albumn and myoglobin. App.Spectrosc. 41[2], 180-184

33. Kansiz, M., Heraud, P., Wood, B., Burden, F., Beardell, J., and McNaughton, D. 1999. Fourier Transform Infrared microspectroscopy and chemometrics as a tool for the discrimination of cyanobacterial strains. Pytochemistry 52, 407-417

34. Kirschner, C., Pina, P., Maquelin, K., Ngo Thi, N. A., Choo-Smith, L. P., Sockalingum, G. D., Sandt, C., Ami, D., Orsini, F., Doglia, S. M., Allouch, P., Manfait, M., Puppels, G., and Naumann, D. 2001. Classification and identification of Enterococci: A comparative phenotypic, genotypic and vibrational spectroscopic study. J.Clin.Microbiol. 39: 1763-1770

35. Kummerle M, Scherer S, Seiler H. 1998. Rapid and reliable identification of food-borne yeasts by Fourier-transform infrared spectroscopy. Appl Environ Microbiol 64:2207-2214.

36. Lefebvre J. 1980. Introduction Aux Analyses Statistiques multidimensionless. Paris: Masson.

37. Li-Vien D, Colthup NB, Fateley WG, Grasselli JG. 1991. The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules. Boston: Academic Press.

38. Ma C-Y, Rout MK, Mock W-Y. 2001. Study of oat globulin conformation by Fourie Transform infrared spectroscopy. J Agriculture Food Chemistry 49:3328-3334.

39. Maquelin, K., Choo-Smith, L. P., Endtz, H. P., Bruining, H. A., and Puppels, G. J. 2002a. Rapid Idetnifcation of Candida species by confocalRaman Microspectroscopy. Journal of Clinical Mcrobiology 40[2], 594-600

40. Maquelin K, Choo-Smith LP, Kirschner C, Ngo Thi NA, Naumann D, Puppels G. 2002b. Vibrational Spectroscopic Studies of Microorganisms. In: Chalmers JM, Griffiths PR, editors. Handbook of Vibrational Spectroscopy. Chichester: John Wiley & Sons Ltd.p 1-27.

41. Maquelin, K., Choo-Smith, L. P., van Vreeswijk, T., Endtz, H. P., Smith, B., Bennett, R., Bruining, H. A., and Puppels, G. 2000. Raman Spectroscopic method for idetnification of clinically relevant micoorganisms growing on solid culture medium. Anal Chem 72, 12-19

42. Maquelin K, Kirschner C, Choo-Smith LP, Ngo-Thi NA, van Vreeswijk T, Stammler M, Endtz HP, Bruining HA, Naumann D, Puppels GJ. 2003.

Prospective study of the performance of vibrational spectroscopies for rapid identification of bacterial and fungal pathogens recovered from blood cultures. J Clin Microbiol 41:324-329.

43. Mariey, L., Signolle, J. P., Amiel, C., and Travert, J. 2001. Discrimination, classification, identification of microorganisms using FTIR spectroscopy and chemometrics. Vibrational Spectrosc. 26, 151-159

44. McLean RJ, Nickel JC, Beveridge TJ, Costerton JW. 1989. Observations of the ultrastructure of infected kidney stones. J Med Microbiol 29:1-7.

45. Monsoor, M. A., Klapathy, U., and Proctor, A. 2001. Improved method for determination of pectin degree of esterification by DRIFT spectroscopy. J.Agriculture Food Chemistry 49, 2756-2760

46. Mossoba, M., Khambaty, F., and Fry, F. 2002. Novel Application of a Disposable Optical Film to the Analysis of Bacterial Strains: A Chemometric Classification of Mid-infrared Spectra. App.Spectrosc. 56[6], 732-736

47. Mossoba MM, Al-Khaldi SF, Kirkwood J, Deman J, Ismail AA, Fry FS. 2004. Printing microarrays of bacteria for identifcation by IR. Workshop FT-IR Spectroscopy in Microbiological and Medical Diagnostic, Robert Koch-Institute, Berlin Octubre 21-228.

48. Naumann D, Helm D, Labischinski H. 1991. Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy. Nature 351:81-82.

49. Naumann D. 2000. Infrared Spectroscopy in Microbiology. Chichester: Jhon Wiley & Sons Ltd. 29 p.

50. Naumann, D. 2001. FT-IR and FT-NIR Raman Spectroscopy in Biomedical Research. Gremlich, Hans-Ulrich and Yang, Bing. [24], 323-377 USA, Marcel Dekker, Inc. Practical Spectroscopy.

51. Ngo Thi NA, Kirschner C, Naumann D. 2000. FT-IR microespectroscopy: A new tool in characterizing of microorganisms. In: Pupples GJ, editor. Biomedical spectroscopy: vibrational spectroscopy and other novel techniques. Proceeding of SPIE. Society of Photo-Optical Engineers, Belingham, Wash.p 36-44.

52. Nichols PD, Henson JM, Guckert JB, Nivens DE, White DC. 1985. Fourier transform-infrared spectroscopic methods for microbial ecology: analysis of bacteria, bacteria-polymer mixtures and biofilms. J Microbiol Methods 4:79-94.

53. Nivens DE, Ohman DE, Williams J, Franklin M. 2001. Role of Alginate and its O acetylation in formation of Pseudomonas aeurginosa microcolonies and biofilms. J Bacteriol 183:1047-1057.

54. Nivens, D. E. P. J. J. R. W. 1995. Continuous nondestructive monitoring of microbial biofilms: a review of analytical techniques. J.Ind.Microbiol. 15, 263-276

55. Orsini, F., Ami, D., Sala, G., Bellotti, M. G., and Doglia, S. 2000. FT-IR microspectroscopy for microbiological studies. Microbiol Methods 42[1], 17-27

56. Oust A, Moretro T, Kirschner C, Narvhus JA, Kohler A. 2004. FT-IR spectroscopy for identification of closely related lactobacilli. J Microbiol Methods 59:149-162.

57. Ozaki Y, Murayama K. 2001. Infrared and Raman Spectroscopy and chemometrics of biological materials. In: Germlich H-U, Yan B, editors. Infrared and Raman Spectroscopy of Biological Material. New York: Marcel Dekker, Inc.p 515-567.

58. Pelton JT, and McLean LR. 2000. Spectroscopy Methods for Analysis of Protein Secondary Structure. Analytical Biochemistry 277:167-176.

59. Perkins, D. L., Lovell, C. R., Bronk, B. V., Setlow, B., Setlow, P., and Myrick, M. L. 2005. Fourier Transform Infrared Reflectance Microspectroscopy Study of *Bacillus subtilis* Engineered without Dipicolinic Acid: The Contribution of Calcium Dipicolinate to the Mid-infrared Absorbance of *Bacillus subtilis* Endospores. Applied Spectroscopy 59[7], 893-896

60. Rabiner, L. R. 1989. A tutorial on hidden Markov modelsand selected applications in speech recognition. Proceedingsof the IEEE 77[2], 257-286

61. Rebuffo C, Seller H, Scherer S. 2004. Rapid identification of species of Listaria by FT-IR spectroscopy and artificial eural networks. Workshop FT-IR Spectroscopy in Microbiological and Medical Diagnostic, Robert Koch-Institute, Berlin Octubre 21-22.

62. Sandt, C., Sockalingum, G. D., Aubert, D., Lepan, H., Lepouse, C., Jaussaud, M., Leon, A., Pinon, J. M., Manfait, M., and Toubas, D. 2003. Use of Fourier-Transform Infrared Spectroscopy for Typing of *Candida albincas* strains isolated in intensive care units. Journal Clincal Microbilogy 41[3], 954-959

63. Sarkisova, S., Patrauchan, M. A., Berglund, D., Nivens, D. E., and Franklin, M. J. 2005. Calcium-Induced Virulence Factors Associated with the Extracellular Matrix of Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms . Journal of Bacteriology 187[13], 4327-4337

64. Schmitt J, Flemming H-C. 1998. FTIR-spectroscopy in microbial and material analysis. International Biodeterioration and Biodegradation 41:1-11.

65. Schmitt J, Udelhoven T. 2001. Use of Artificial Neural Networks in Biomedical Diagnosis. In: Gremlich H-U, Yang B, editors. Infrared and Raman Spectroscopy of Biological Material. New York: Marcel Deker, Inc.p 379-419.

66. Shuster, K. C., Mertens, F., and Gapes, J. R. 1999. FTIR spectroscopy applied to bacterial cells as a novel method for monitoring complex bioitechnological processes. Vibrational Spectrosc. 19, 467-477

67. Smith B. 1999. Infrared spectral interpretation. A systematic approach. Boca Raton, Folrida, USA: CRC Press LLC.

68. Sockalingum GD, Bouhedja W, Pina P, Allouch P, Bloy C, Manfait IVL. 1998. FT-IR spectroscopy as an emerging method for rapid characterization of microorganisms. Cell Mol Biol 44:261-269.

69. Sockalingum, G. D., Bouhedja, W., Pina, P., Allouch, P., Mandray, C., Labia, S., Millot, J., and Manfait, M. 1997. ATR-FTIR Spectroscopic Investigation of

Imipinem-Susceptible and -Resistant Pseudomonas aeruginosa Isogenic Strains. Biochem.Biophys.Res.Com. 232, 240-246

70. Spath H. 1980. Cluster Analysis Algorithms for Data Reduction and Classification of Objects. England, UK: Chichester.

71. Stuart B, Ando DJ. 1997. Biological Aplications of Inrared Spectroscopy.

72. Suci PA, Geesey GG, Tyler BJ. 2001. Integration of Raman microscopy, differential interference contrast microscopy, and attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy to investigate chlorhexidine spatial and temporal distribution in Candida albicans biofilms. J Microbiol Methods 46:193-208.

73. Surewicz, W. K., Mantsch, H. H., and Chapman, D. 1993. Biochemistry 32[2], 289-393

74. Tintelnot K, Haase G, Seibold M, Bergmann F, Staemmler M, Franz T, Naumann D. 2000. Evaluation of phenotypic markers for selection and identification of Candida dubliniensis. J Clin Microbiol 38:1599-1608.

75. Trujillanoa, J., Marchb, J., Badiaa, M., Rodrígueza, A., and Sorribasb, A. 2001. Application of artificial neural networks for risk stratification of hospital mortality. Cancer 91, 1639-1642

76. Tseng, D. Y., Vir, R., Traina, J. S., and Chalmers, J. J. 1996. A Fourier transorm infrared spectroscopic analysis of organic matter degradation in a bench-scale solid substrate fermentation (composting) system. Biothechnology and Bioengineering 52, 661-671

77. Tu AT. 1982. Raman spectroscopy in biology: Principles and applications. New York: Jhon Wilwy & Sons.

78. van de Weert, M., Haris, P. I., Hennink, W. E., and Crommelin, D. J. A. 2001. Analytical Biochemstry 297, 160-169

79. van der Mei, H., Noordmans, J., and Busscher, H. 1989. Molecular surface characterization of oral streptococci by Fourier transform infrared spectroscopy. Biochim.Biophys.Acta 991, 395-398

80. van der Mei HC, Naumann D, Busscher HJ. 1993. Grouping of oral streptococcal species using Fourier-transform infrared spectroscopy in comparison with classical microbiological identification. Arch Oral Biol 38:1013-1019.

81. Vecchio, G., Zambianchi, F., Zacchetti, P., Secundo, F., and Carrea, G. 1999. Fourier Transform infrared spectroscopy study of dehydrated lipases from *candida antarctica* B and *Pseudomonas cepacia*. Biotechnol Bioeng [32], 545-551

82. Ward JH. 1963. Hierarchical grouping to optimizc an objective function. Journal of the American Statistical Association 58:236-244.

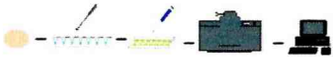
83. Wenning, M., Seiler, H., and Scherer, S. 2002. Fourier-Transform Infrered Microespctroscopy, a Novel and Rapid Tool for Idenification of Yeasts. Appl Environ Microbiol , 4717-4721

84. Zupan J, Gasteiger J. 1999. Neural Networks in Chemistry and Drug Design. Weinheim, Wiley-VCH.

CAPÍTULO 2

OPTIMIZACIÓN DE LAS ETAPAS INVOLUCRADAS EN LA TOMA DE ESPECTROS POR FT-IR.

CONTROL DE CALIDAD ESPECTRAL Y PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN



1 INTRODUCCIÓN

Como se indicó previamente (**sección 1.5, Capítulo 1**), pequeños cambios en la composición de la muestra, o en la toma de los espectros, producen un efecto significativo en el espectro resultante. La composición química de los microorganismos (proteínas, lípidos, carbohidratos, DNA), depende de un gran número de variables tales como el sistema de cultivo utilizado, la composición del medio de crecimiento, los tiempos de cultivo (el fenotipo de la población se modifica en las diferentes fases de crecimiento) y condiciones de incubación (pH, temperatura, etc). A pesar de no existir una respuesta simple y única para responder a todos los requerimientos de estandarización, la necesidad de lograr repetitividad y reproducibilidad, así como también de compartir resultados entre distintos laboratorios, y construir bases de datos de referencia de empleo mundial, ha hecho que se desarrollaran ***protocolos de estandarización que necesariamente deben ser cumplidos.*** Al respecto han sido publicados diversos protocolos que incluyen estandarización en el cultivo de los microorganismos, en la toma de muestra, así como también en el control de los parámetros de adquisición de los espectros (Bruker Optics 1993; Helm y col. 1991b; Naumann y col. 1991a); (Helm 1995). Sin embargo los esquemas de trabajo desarrollados y publicados se basan en la utilización de equipos de marca Bruker Optiks como los indicados en la **sección 1.4 del capítulo 1** y accesorios como celdas de ZnSe en su mayoría como las descriptas en la **Fig.18, Capítulo 1**. El **Esquema 1** indica el protocolo de trabajo desarrollado por el grupo del Dr. Dieter Naumann en el Robert Koch Institute y publicado por Bruker (Bruker Optics 1993). Si bien este protocolo es específico para un equipo Bruker, modelo IF/28, debe ajustarse en algunas de sus etapas para cada microorganismo en estudio, sobre todo en lo que se refiere a la obtención de cultivos puros, y la preparación de la muestra. Este modelo IF/28B, por su parte ofrece como accesorio , una rueda multi-celda indicada en el **Esquema 1** que permite realizar registros en tandas de 15 muestras.

1 Preparación y toma de muestra. Obtención de un sub-cultivo puro crecido bajo condiciones previamente estandarizadas de medio de cultivo, temperatura y tiempo de incubación (24 –72 h).

2 Preparación de una suspensión homogénea. Transferencia de una cantidad de microorganismos tomada con cuidado para no transferir medio de cultivo (una o dos anzadas tomadas con un anza de platino de 1mmm de diámetro) a 100 μl de H_20 destilada para obtener una suspensión homogénea. 80 μl la suspensión son transferidos a una multi-celda de ZnSe.

3 Obtención de un film transparente. Secado de la muestra al vacío en un desecador (suplementado con P_2O_5 o silicalel) aplicando un vacío moderado (25 Torr) para formar un film homogéneo y transparente.

4 Toma de espectros. La muestra seca se dispone en la cámara de lectura bajo una purga de aire seco. Los parámetros de lectura deben ser fijados y mantenidos constantes en todas la medidas. Las condiciones de lectura recomendadas son: $6cm^{-1}$ de resolución y 64 de escaneos, que aseguran una relación señal ruido de 3000:1.

Esquema 1. Protocolo para medidas FT-IR por transmisión.
(Tomado de Bruker Optics 1999).

Si se dispone de otro tipo de equipamiento muchos de los parámetros deben ser redefinidos.

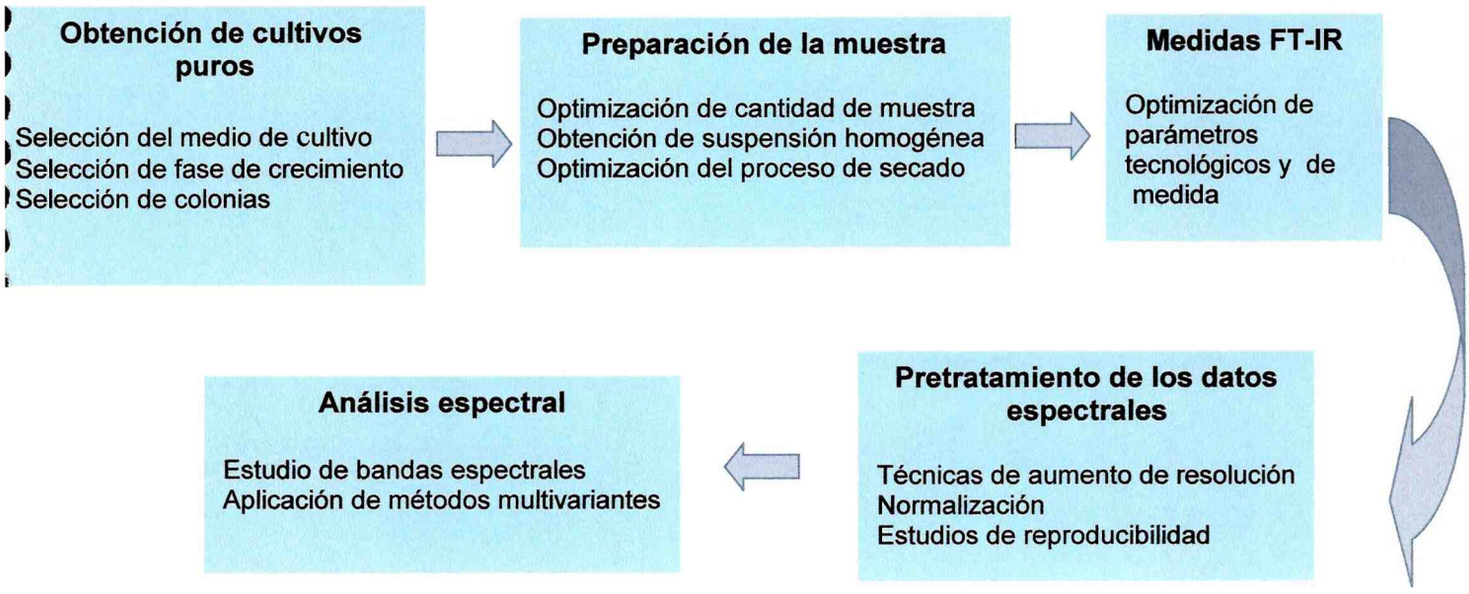
2 OBJETIVOS

Los principales objetivos son:

1) Establecer los parámetros de lectura adecuados para la toma de espectros en un espectrómetro Spectrum One de Perkin Elmer (adquirido por nuestro laboratorio).
2) Optimizar para los distintos organismos empleados en esta Tesis, las condiciones de adquisición de espectros que aseguren la obtención de resultados reproducibles.
3) Establecer estrategias que permitan minimizar problemas derivados de la presencia de vapor de agua durante las lecturas IR.

3 OPTIMIZACIÓN DE ETAPAS INVOLUCRADAS E LA TOMA DE ESPECTROS Y POSTERIOR TRATAMIENTO

Todas los análisis por FT-IR realizados en este trabajo involucraron una serie de pasos indicados en el **Esquema 2,** los cuales requirieron de una optimización y estudio de los diferentes parámetros que pueden llevar a variaciones en las lecturas.



Esquema 2. Etapas involucradas en la caracterización de microorganismos por espectroscopía FT-IR.

3.1. Cultivo de microorganismos

Esta primer etapa de la obtención de espectros FT-IR fue optimizada con un protocolo estricto y definido para cada uno de los microorganismos utilizados en este trabajo, de modo que el medio de cultivo utilizado, el tiempo y temperaturas de incubación seleccionadose indicará en los respectivos capítulos.

3.2 Preparación y toma de muestra

Todos los protocolos publicados consideran la preparación y toma de muestra como un paso esencial para lograr reproducibilidad en las medidas (Bruker Optics 1993; Bruker Optics 1999; Helm y col. 1991b; Helm 1995; Naumann 2000). Dentro de este paso, el proceso de **selección de los microogansimos** es determinante de la reproducibilidad obtenida. Para ello se siguió el protocolo recomendado por Bruker que consiste en agotar el inóculo en cuatro cuadrantes (**Fig. 1**) y de allí tomar los

microorganismos del tercer cuadrante (técnica del tercer cuadrante) que constituyen colonias aisladas.

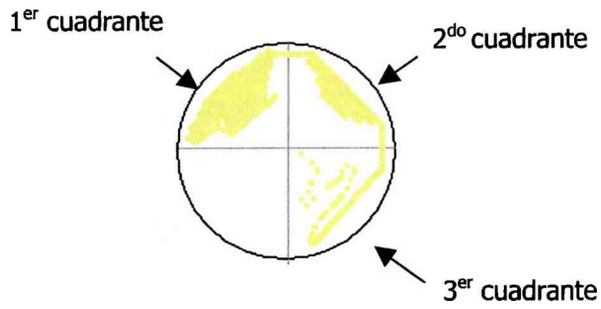
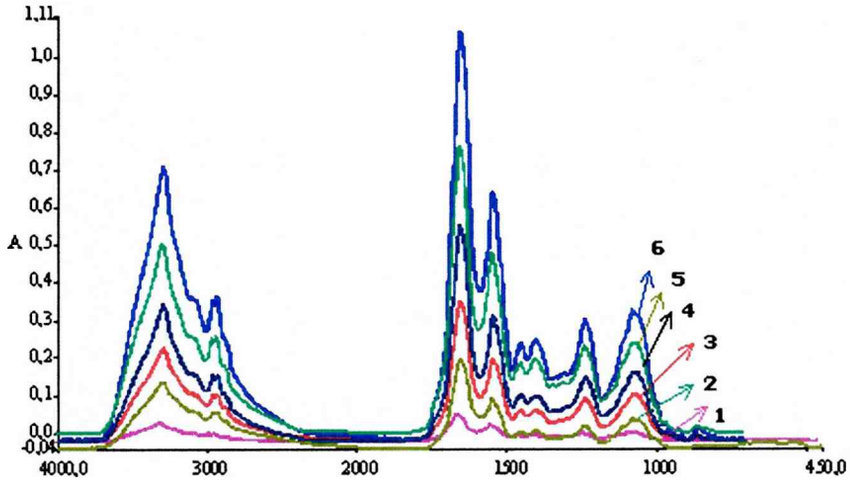


Fig. 1 Técnica del tercer cuadrante descripta por Helm y col. Tomado de Bruker 1995

Por lo general la cantidad de biomasa obtenida de colonias aisladas de un solo cuadrante no es suficiente para registrar el número de replicados necesarios, por lo que nosotros optamos por agotar en cada cuadrante una anzada y así obtener mayor número de colonias aisladas por caja de Petri.

Los protocolos internacionales recomiendan tomar una o dos anzadas de material biológico, suspender en 80 - 100 μl de H_20 y depositar en una de las celdas del sistema de multi-celda (**Esquema 1**). Nosotros disponemos, como se verá más delante de celdas más grandes (13 x 2 mm y 13 x 3 mm) que requieren una carga entre 100 y 120 μl.. Se llevó a cabo por lo tanto, una estandarización sobre la cantidad de biomasa a depositar en las celdas, para uno de los microorganismos utilizados a lo largo de todo el trabajo. Se obtuvo, para cada caso una curva de calibración de biomasa vs. absorbancia IR. De dicha gráfica se estimó para cada organismo, la cantidad de biomasa apropiada para trabajar en el intervalo donde la regresión fuera lineal, y asegurar así el cumplimiento de la ley de Lambert y Beer . Para ello se tomó con un anza de platino calibrada (1mm de diámetro) distintas cantidades de microorganismos y se dispusieron en 150 μl de H_2O. Se midió la DO a 650 nm (DO_{650}) de cada suspensión obtenida. Dichas suspensiones fueron transferidas a celdas de ZnSe las cuales se secaron y luego se registraron los espectros correspondientes. En los espectros obtenidos se calculó la altura del pico de mayor absorbancia (Amida I) y se construyó la correspondiente curva de calibración de Absorbancia IR vs. DO_{650}. La **Fig. 2** muestra la curva de calibración obtenida para el caso de una cepa de

Lactobacillus. La curva obtenida demostró que la utilización de una anzada bien cargada (DO_{650} = 8-10) constituye una cantidad de biomasa apropiada, ya que la absorbancia es alta (lo que asegura una buena relación señal:ruido) pero no hay saturación del detector. Se procedió del mismo modo para la calibración de biomasa necesaria en cada uno de los microorganismos estudiados.



Carga del anza	muestra	Do 625 nm	Abs IR (Amida I)
	1	1,8	0,05
	2	3,5	0,19
	3	5	0,34
	4	6,7	0,54
	5	9	0,74
	6	11,2	1,06

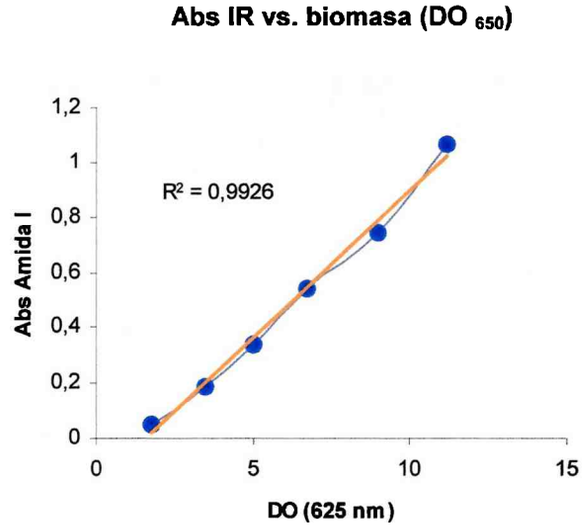


Fig.2 Curva de calibración biomasa vs. absorbancia IR para lactobacilos. La tabla indica la absorbancia obtenida cuando se cargan distintas cantidades de biomasa en el anza calibrada desde la punta del anza en la muestra 1, hasta el anza completa en la muestra 6.

La **Fig. 3** muestra la calibración de biomasa obtenida para *B. pertusiss*. Para este caso la toma de 1 anzada completa en 150 µl (DO = 8) no arrojó una señal tan intensa como el caso de lactobacilos, por lo que los procedimientos se llevaron a cabo utilizando 2 anzadas en 150 µl lo que daba como densidad óptica de trabajo apropiada entre DO_{650} 12 y 14. Así en las experiencias realizadas sobre cultivos sólidos de *B.*

pertussis se utilizaron 2 anzadas y cuando se analizaron los cultivos líquidos se llevó la suspensión de microorganismos a una DO_{650} ~ 13.

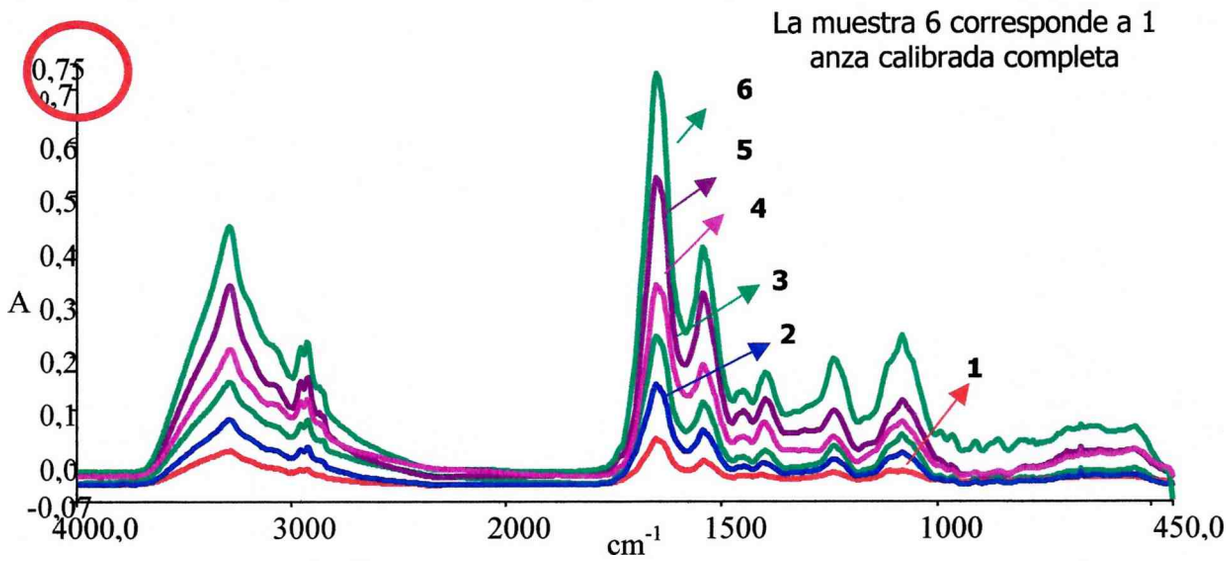


Fig. 3 Espectros IR de *B. pertussis* para distintas cantidades de biomasa. El espectro obtenido a partir de un anza completa de material alcanza 0.8 unidades de absorbancia. Para las cantidades de muestra indicadas para lactobacilos, solo entran en escala en la curva de calibración los 3 últimos espectros.

Este mismo procedimiento se llevó a cabo sobre los cultivos de *Moraxella bovis* donde dos anzadas en 150 μl dieron una DO_{650} ~ 12 y 13. Esta resultó una cantidad de biomasa óptima para trabajar dentro de los límites que exige la ley de Lambert y Beer.

Otro etapa importante del primer paso de la obtención de un espectro FT-IR es el grado de homogeneidad de la suspensión celular. Según las características de cubierta de las células como la presencia de cápsulas, flagelos, o componentes presentes en cubierta como pilis, las suspensiones celulares pueden formar agregados dando lugar sistemas no homogéneos. Teniendo en cuenta las características de cubierta y según provengan de diferentes sistemas de cultivo (sólido, líquido o de biofilm), las estrategias a adoptar fueron diferentes.

Para ciertos microorganismos, por ejemplo algunas cepas de *Lactobacillus*, hemos observado que debido a las características de la muestra no es posible aplicar directamente la suspensión bacteriana sobre la celda de ZnSe, ya que al secarla, el film formado queda con grumos o partículas en las cuales la luz IR se refleja, y el

espectro obtenido resulta totalmente distorsionado: la línea de base se eleva, se distorsiona y los picos, en particular el de Amida I, quedan totalmente deformados. **(Fig. 4)**.

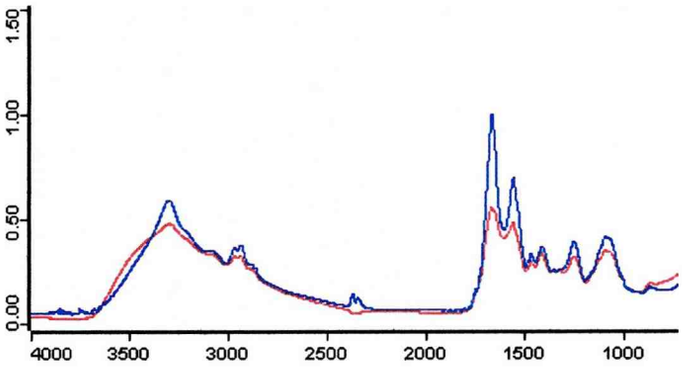


Fig. 4 Comparación de espectros de dos cepas de *Lactobacillus* de características diferentes: ___ espectro obtenido de una cepa que produce una suspensión homogénea. ___ Espectro correspondiente a una suspensión de una cepa de *Lactobacillus* cuya suspensión no es homogénea y forma grumos sobre la celda de ZnSe.

En estos casos fue necesario realizar un tratamiento de disgregación de grumos (vortexeando) antes de cargar la suspensión sobre la celda de ZnSe. Sin embargo esto no fue suficiente para determinadas muestras, donde fue necesario homogeneizar la suspensión aplicando, según el grado de agregación, una agitación más enérgica en vortex, o una sonicación en baño de agua por diferentes tiempos y a diferentes potencias, según el grado de agregación de los microorganismos.

Si bien la calidad del film obtenido está determinada, por la posibilidad de obtener suspensiones homogéneas, **la optimización del tiempo, la temperatura, la velocidad y el tipo de secado (estufa o al vacío) de las suspensiones sobre la celda de ZnSe son determinantes de la calidad del film**. Es de suma importancia reducir el tiempo de secado de manera de evitar la agregación de los microorganismos y la deformación del film. La obtención de un film adecuado resulta un desafío que requiere de un control experimental de una gran cantidad de parámetros (Bruker Optics 1999). La **Fig. 5** muestra la formación de un film normal y las posibles deformaciones que pueden producirse sobre los films generados sobre la celda debido al secado incorrecto. Por ello el sistema más recomendado es el secado al vacío a temperatura ambiente en un desecador conteniendo silica gel o pentóxido de fósforo similar al indicado en el **Esquema 1**.

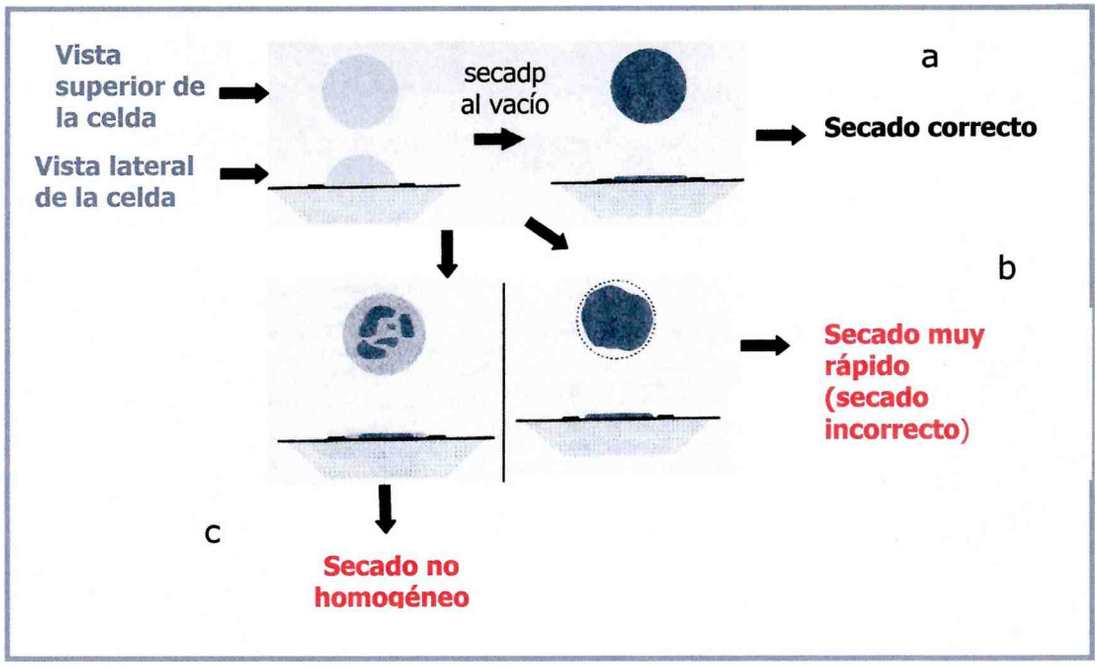


Fig. 5 Vista de frente y lateral de muestras que han sido secadas bajo diferentes condiciones. A) obtención de film transparente y homogéneo (secado correcto) b) secado al vacío de una suspensión de Lactobacilos (se levantan los bordes de la celda) c) Secado desparejo, no homogéneo

Sin embargo en particular en ciertos trabajos con lactobacilos esta forma de secado hacía que los films se despegaran de la celdas de ZnSe y el material se caia de la celda de lectura. Por esta razón hubo que buscar otras alternativas como un secado en estufa, teniendo que ajustar la temperatura y el tiempo de secado. Finalmente se estableció como óptimo un secado a 40 °C durante 45 minutos (**Fig. 6**).

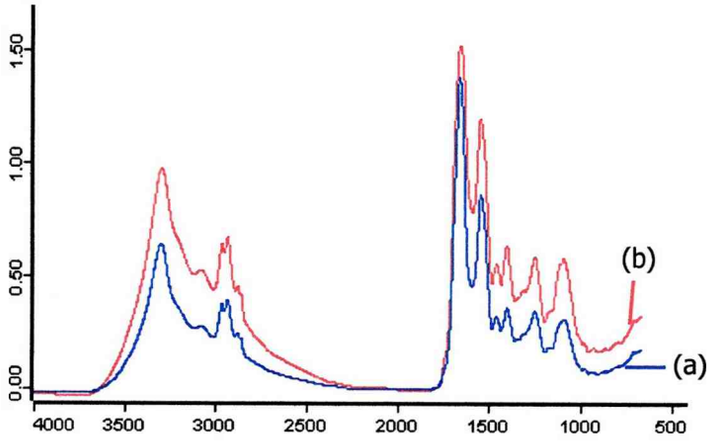


Fig. 6 Efecto del tipo de secado en la calidad del espectro obtenido en lactobacilos. a) secado estufa a 40 °C por 45 minutos (b) secado al vacío

En los casos de las lecturas de *B. pertussis* y *M. bovis* se ensayaron ambos métodos pero los mejores resultados fueron obtenidos con el secado al vacío a temperatura ambiente, que permitió un secado en menor tiempo y la obtención de un film homogéneo y transparente.

3.3 Toma de los espectros

3.3.1.Espectrómetro FT-IR

Las medidas fueron realizadas empleando diferentes espectrómetros: la mayor parte de ellas se realizaron en un espectrómetro Spectrum One de Perkin Elmer, (USA) incorporado al CINDEFI en el 2000. Sin embargo, también se utilizaron alternativamente dos espectrómetros Bruker instalados en el CEQUINOR-LANAIS-EFO, Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas: el 113v que permite realizar medidas al vacío y el espectrómetro IF66. También, en el marco de un proyecto de colaboración internacional con el grupo del Dr. Dieter Naumann del Robert Koch Institute de Berlín, se realizaron medidas en equipos Bruker IFS/28B con multi-celda y lecturas por micro-espectroscopia utilizando FT-IR Bruker IR scope II (**Fig. 21 y 21, Capítulo 1** respectivamente).

El modelo Spectrum One de Perkin Elmer, si bien reúne todas las condiciones para poder llevar a cabo la toma de espectros de alta calidad (en relación al ruido y el *fringing*), en su diseño original está conformado por un porta-celda que permite la lectura de 1 sola celda grande de 3 cm de diámetro por vez. Es tipo de dispositivo es adecuado para la mayoría de las aplicaciones, pero no resulta práctico para su aplicación en microbiología cuando se pretende leer varias muestras en forma rápida. Por esta razón en nuestro laboratorio, se diseñó una rueda de acero inoxidable (**Fig. 7**) que permite medir consecutivamente 15 muestras mediante un desplazamiento manual de la rueda cuya construcción se asemeja a la del espectrómetro indicado en el **Esquema 1.** Esta modificación fue realizada con el apoyo del Ing. José Cúneo.

3.3.2. Parámetros de toma de espectros.

Cinco parámetros debieron ser ajustados para la adquisición de los espectros FT-IR, de manera que el espectro obtenido tuviera la calidad exigida por las librerías espectrales internacionales: resolución, velocidad de medida, número de escaneos, intervalo de medida y vapor de agua. Todos los parámetros a excepción de la velocidad de medida y el número de escaneos una vez optimizados fueron aplicados para los registros de todos los espectros de microorganismos estudiados en este trabajo, independientemente del espectrómetro utilizado. Sin embargo la velocidad de

medida y número de escaneos depende del detector que posee el espectrómetro, por lo que se tuvo que ajustar en cada caso.

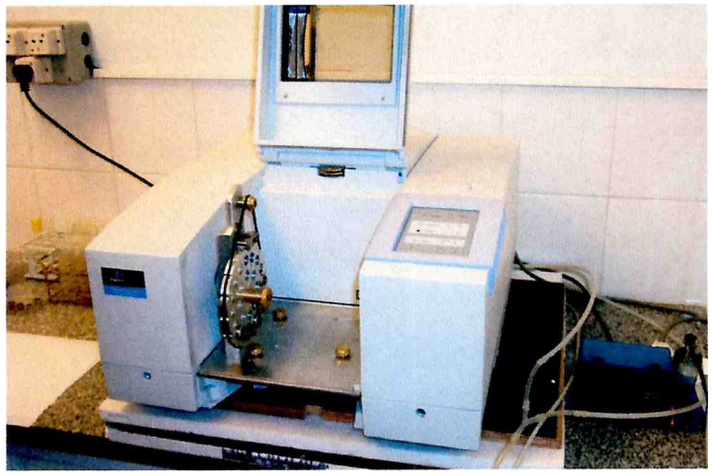


Fig. 7 Espectrómetro FT-IR Perkin Elmer, Espectrum One, con portacelda modificado para la lectura de 25 muestras.

i. Resolución

Los valores de resolución utilizados en las muestras de origen biológico, microorganismos, tejidos, fluidos, etc., varían en general entre 4 y 6 cm^{-1}. (Helm y col. 1991a; Naumann 2000). Valores superiores (12 cm^{-1}, por ejemplo) no permiten resolver los detalles importantes de los espectros. Con valores menores que 4 cm^{-1} es muy difícil extraer información debido a que las características propias de las bandas de los sistemas biológicos, en contraste con los compuestos orgánicos puros. Las bandas en estos sistemas son anchas, por lo que un aumento de resolución no se traduce en un aumento en la información obtenida. Si bien se realizaron ensayos con 4 y 6 cm^{-1} de resolución, **todos los espectros obtenidos en el presente trabajo fueron registrados con resolución 6 cm^{-1}.**

ii. Escaneos y velocidad de lectura

Los parámetros recomendados por Bruker (IF/28 o IR scpe II) son 28 escaneos y una velocidad de lectura de 1 cm/s. Sin embargo estos valores no fueron apropiados para el espectrómetro de Perkin Elmer. Se ensayaron diferentes números de escaneos a diferentes velocidades de manera de optimizar la relación señal:ruido. Se obtuvo finalmente como parámetros óptimos para dicho espectrómetro 64 escaneos a una velocidad de lectura de 0.2 cm/s. Para una misma muestra, realizar mayor número de escaneos no producía ningún aumento en la relación señal:ruido. Según el

microorganismo estudiado esta relación varió entre 200:1 y 300:1. La diferencia observada en el ajuste de estos parámetros (nº escaneos y resolución) para un espectrómetro Bruker o Perkin Elmer se debió a que este último espectrómetro posee un detector tipo DTGS, mientras que los espectrómetros Bruker (IF/28) poseen detector MCT, lo que permite velocidades de lectura mucho mayores (ambos tipos de detectores fueron descriptos en la **sección 1.2**, **Tabla 1** y **Fig.12** en el **Capítulo 1.** Sólo equipos Bruker más antiguos, como el IF/66 requirieron un número de escaneos mucho mayor (hasta 1000).

iii. Intervalo de medida

El intervalo de lectura empleado para todos los registros fue de 4000 a 650cm^{-1} que es el intervalo en el que las celdas de ZnSe poseen la máxima transparencia a la radiación IR (**Fig. 17, capítulo 1**) y los espectros IR de los microorganismos y sistemas biológicos presentan las principales bandas de estiramiento, balanceo y *fingerprint*.

iv. Vapor de agua

Ha sido ampliamente estudiada la interferencia que produce el H_2O en su estado condensado en los espectros IR, por la gran intensidad y ancho de las bandas debido al estiramiento O-H (**Fig. 8, Capítulo 1**), por lo cual el requerimiento de que las muestras a analizar se encuentren perfectamente secas resulta sumamente importante. Este requerimiento es aún mayor cuando las muestras son de origen biológico ya que la principal banda de estiramiento O-H se superpone con la región de Amida I. Sin embargo existe otra interferencia producida por el H_2O en su estado vapor debido a que sus diferentes **estados rotacionales** son sensibles a la radiación infrarroja. Para la mayoría de las aplicaciones de FT-IR en la industria farmacéutica o control de calidad (donde se analiza, el número de bandas presentes, la posición de las mismas, o el cálculo de áreas o alturas de determinadas bandas), el vapor de agua no constituye una interferencia importante. Tal como puede observarse en la **Fig. 8**, aún luego de realizar un blanco contra aire, los subsiguientes espectros registrados contienen bandas debido al estiramiento de CO_2 (de intensidad variable) y bandas debidas al vapor de H_2O con una intensidad entre 10^{-3} o 10^{-4} (dependiendo de la humedad ambiente). Esta intensidad no constituye una interferencia en los espectros con absorbancia en el orden 0.3 a 1.2 cuando son analizados como tales. Sin embargo cuando los espectros FT-IR son empleados para diferenciación o identificación microbiana, (donde es necesario trabajar con sus derivada primera o segunda), si bien las bandas de absorción debidas al CO_2 no interfieren porque en esa región (2365 – 2330 cm^{-1}) no se observan estiramientos ni balanceos de las macromoléculas, las bandas debidas al vapor de agua **deben ser eliminadas** no sólo por su superposicón

con las bandas de Amida I y II sino porque además tanto la **concentración** en el aire como la **posición** de sus picos **se modifican permanentemente**.

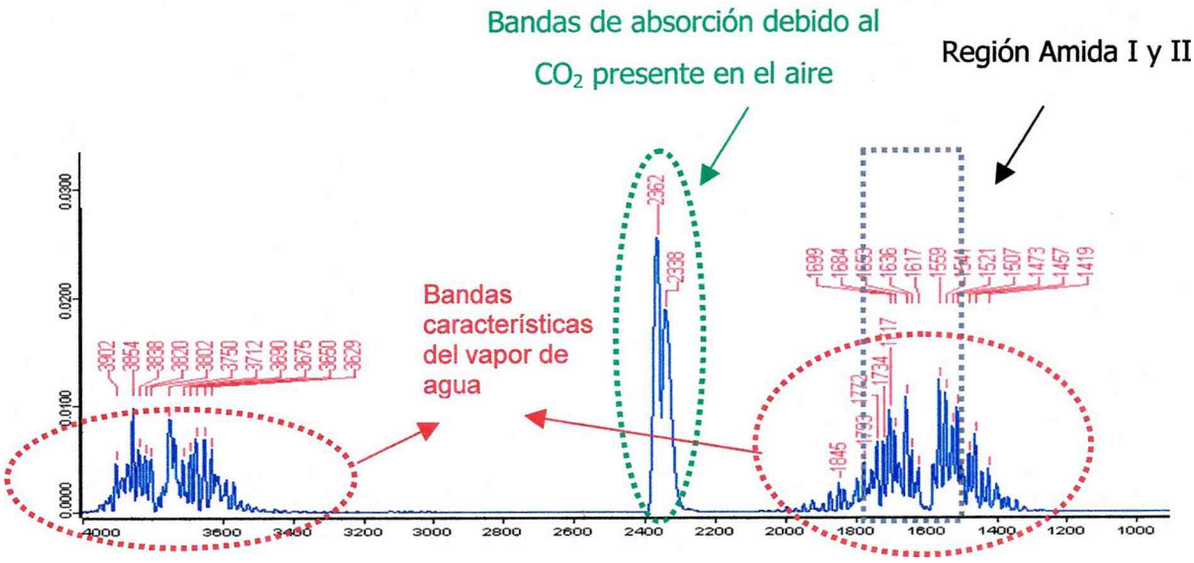


Fig. 8 Espectro FT-IR del aire. Las bandas indicadas con círculo rojo corresponden a estados rotacionales del vapor de agua y las bandas hincadas en la región verde a bandas vibracionales del CO_2 .

Como se discutirá posteriormente los valores de la señal de vapor de agua admitidos para realizar una identificación de microorganismos debe estar comprendida entre 10^{-5} y 10^{-6} en la región de Amida I. En nuestro trabajo se han ensayado 4 formas diferentes de alcanzar dichos valores: **i)** Utilizando un "filtro " que sólo lo tiene disponible el espectrómetro de Perkin Elmer , **ii)** registrando los espectros bajo una purga de N_2 seco (grado cromatografico), **iii)** restando a los espectros registrados el vapor de agua presente en el momento de efectuar la medida **iv)** realizando las lecturas bajo una purga de aire seco.

iv a) Eliminación del vapor de agua mediante la utilización de "filtros"

El espectrómetro Perkin Elmer Spectrum One posee una opción de eliminación de las bandas debidas al CO_2 y al vapor de H_2O, que consiste en la substracción de tales bandas mediante una resta algebraica entre el espectro registrado y el espectro teórico del vapor de agua y CO_2. Si bien esta métodología constituye una manera muy eficiente de quitarle a cada espectro registrado las señales correspondientes a ambos componentes del aire, hemos comprobado que este método no puede ser utilizado cuando los espectros son empleados para la diferenciación o identificación de microorganismos. Es sabido que el espectro del vapor de agua además de mostrar

modificaciones permanentes en su intensidad, sufre modificaciones en la posición de sus bandas en unas pocas décimas (< ± 0.5). Es decir que la posición de sus picos puede variar de un día a otro o de un momento a otro. En la **Tabla 1** se indican los valores de las bandas más características en espectros de vapor de agua registrados diferentes días dentro de un mismo mes. Como se mencionó previamente el software resta siempre el mismo espectro teórico del vapor de agua lo que puede producir distorsión o desplazamiento de las bandas del espectro resultante. Hemos registrado espectros de una misma muestra de *Bacillus thuringiensis* con el "filtro" activado y desactivado" y los hemos confrontado contra una librería internacional desarrollada por el Robert Koch Intitute. Los resultados nos han demostrado que los espectros a los cuales el software les sustrajo el vapor de agua utilizando el espectro teórico (con los filtros del espectrómetro activados) no fueron reconocidos por la biblioteca, mientras que en los que no se utilizó dicho filtro los mismos fueron identificados correctamente.

Tabla 1. Variación en la posición de las principales bandas rotacionales del vapor de agua correspondientes a medidas realizadas a lo largo del un mes

6-09-02	12-09-02	19-09-02	27-09-02	30-09-02
1716.9	1717.2	1717.2	1717.1	1717.0
1733.4	1733.9	1733.9	1733.7	1733.4
1772.2	1772.0	1772.0	1772.1	1771.9
1792.4	1792.5	1792.5	1792.4	1792.4
1844.7	1844.5	1844.5	1844.5	1844.8

No obstante estos resultados, hemos podido comprobar a lo largo de nuestra experiencia con el espectrómetro Spectrum One, que dichos "filtros" son de gran utilidad cuando se quieren realizar medidas cuali o cuantitativas que no impliquen la utilización de la derivada primera o segunda de los espectros o en el estudio de polímeros como los exopolisacáridos obtenido de cultivos en biofilm de *Bordetella pertussis.* También permiten obtener excelentes espectros sin interferencias cuando se realizan medidas por ATR.

iv b) Registro de espectros bajo purga de N_2 seco (grado cromatográfico)

Se ensayó la purga de la cámara de lectura con N_2 de calidad cromatográfica (provisto por AGA), pero los niveles de agua obtenidos en los espectros no fueron los aceptables ($>10^{-4}$) además aparecían nuevas bandas en la región 3000 – 2800 cm^{-1}, debido probablemente a impurezas presentes en dichos gases (resultados no mostrados). Se ensayó la purga con diferentes tubos de N_2 pero finalmente se descartó.

iv c) Sustracción del espectro del vapor de agua presente en el momento de registrada la medida

El Dr. Peter Lasch del Robert Koch Institute desarrolló un software (**WV MACRO**) que funciona bajo OPUS 3.0 de Bruker Optics, que permite restar a un espectro registrado en condiciones de humedad ambiente, el vapor de H_2O presente en el momento de la lectura. Para utilizar dicho software se registró, antes y después de registradas las medidas del día, un espectro del aire. Dicho espectro se obtiene haciendo un blanco con una celda vacía (sin muestra) y luego sobre ese mismo blanco se realiza una medida. Si bien el espectro resultante debería tener una absorbancia nula, se observan bandas debido al CO_2 y al vapor del agua porque estos dos componentes se encuentran en permanente cambio. Una vez registrado el espectro del aire (**vh**) se obtuvo la posición de las 5 bandas indicadas en la **Tabla 1** y se cargaron (incluyendo el primer decimal) en el software (WV MACRO) junto con la tanda de espectros que se deseaba corregir (por ejemplo la lista de espectros mencionados en la **Fig. 9** como lb.). Al ejecutar el software, el mismo multiplica el espectro del vapor de agua (*vh.1*) por un factor (F) tal que en la región donde se encuentran esas 5 bandas, la diferencia en el valor de absorbancia de cada espectro menos **F X Abs de vh.1 = 0**. Esa diferencia debe anularse porque en dicha región las macromoléculas constituyentes de los sistemas biológicos no registran absorción. El software crea para cada espectro, un espectro nuevo que lo denomina con el nombre original al que le agrega una letra k (**lbk**.). La **Fig. 9** constituye el esquema utilizado para restar el vapor de agua de los espectros a través del software WV MACRO. La **Fig. 10** muestra uno de los espectros de la lista indicada en la **Fig. 9** (el espectro lb.93) y su derivada segunda antes y después de la corrección del vapor de agua.

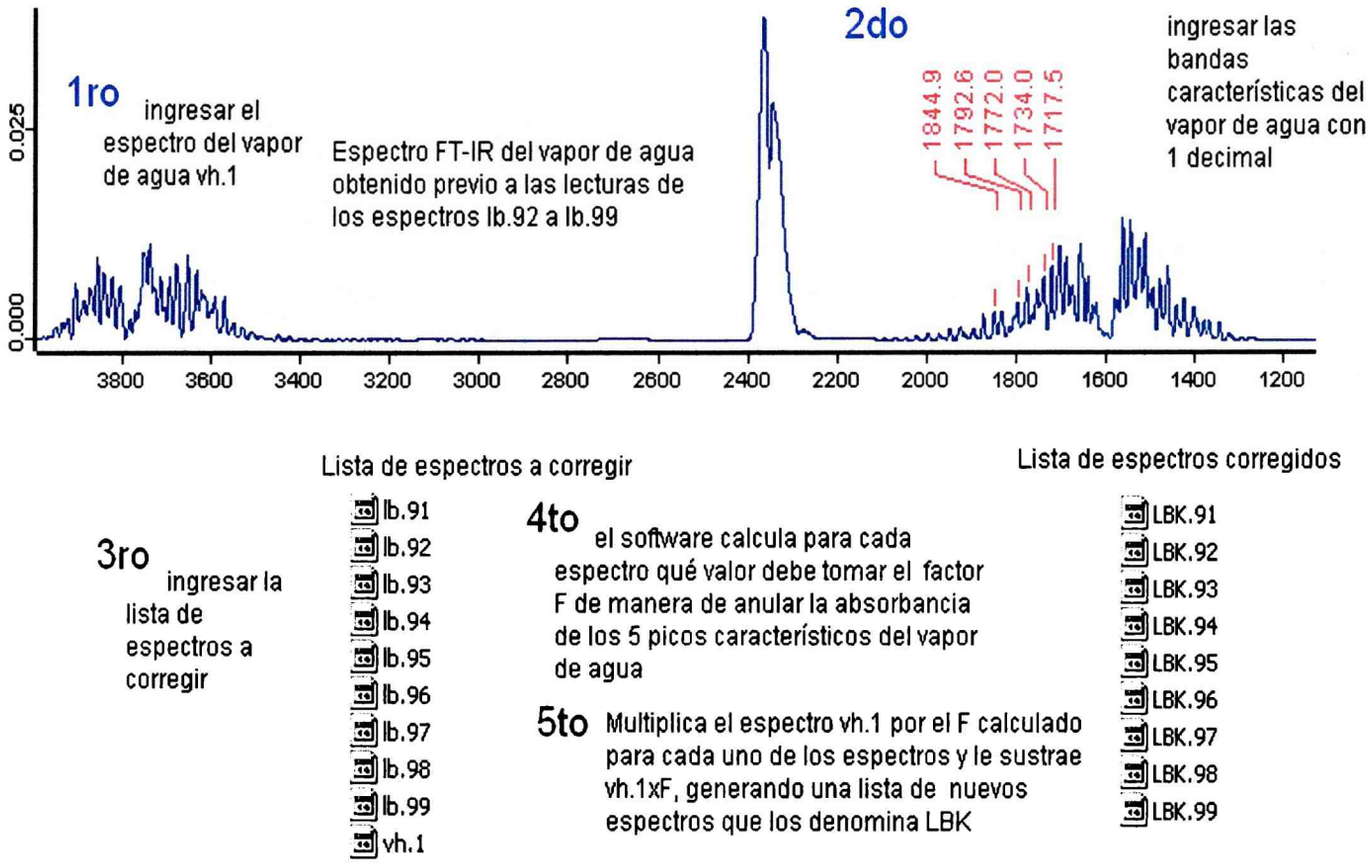


Fig. 9. Procedimiento para la corrección de vapor de agua por el software MACRO WV

iv d) Registro de espectros en corriente de aire seco

Dentro de todos los modos ensayados para remover el vapor de agua de los espectros y obtener señales de las bandas rotacionales del vapor de agua menores a 10^{-4}, la utilización de una corriente de aire seco que purga continuamente tanto la cámara de lectura como el espectrómetro fue la más eficiente. El equipamiento de secado utilizado es un sistema de adsorción fría que trabaja con aire comprimido, modelo HLB, que

Consiste en dos tubos rellenos con un tamiz molecular A4 el cual trabaja con un aire de salida que contiene 0.11g/m^3 de humedad.

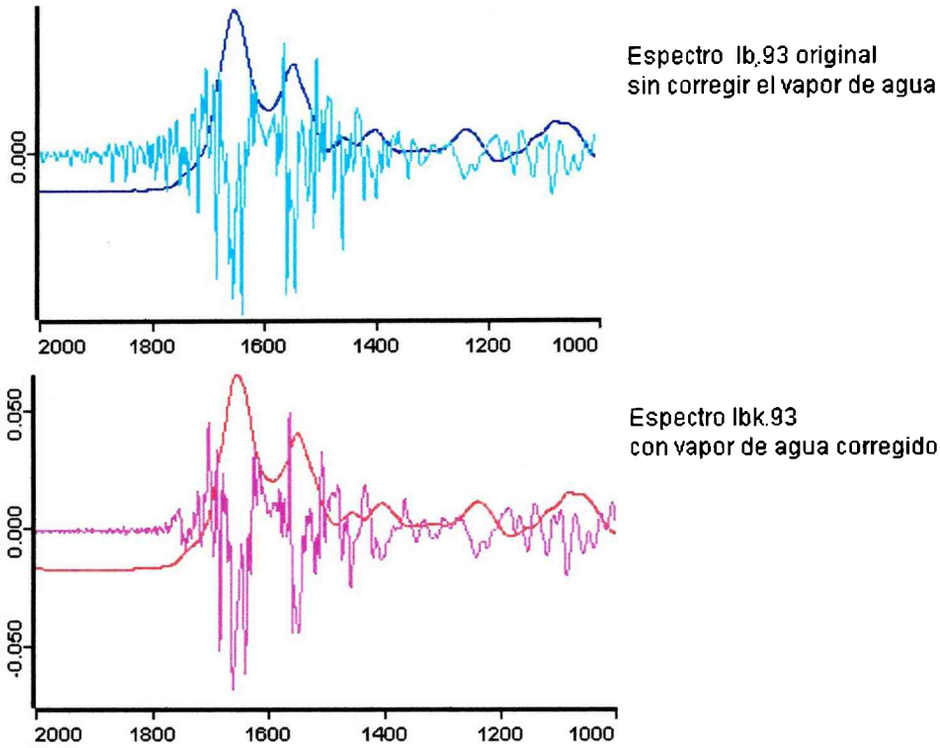


Fig. 10 Espectro obtenido de un lactobacilo y su derivada segunda antes (lb.93) y después de la corrección del vapor de agua (lbk.93) utilizando el software WV MACRO

Dichos tubos funcionan alternativamente en ciclos de 300 / 600 segundos (ciclado electrónico) permitiendo el secado por temperatura del tubo que no está siendo utilizado. Se optimizó la presión de trabajo en 7 bar. a la entrada de los desecadores y el caudal del aire de ingreso al espectrómetro en 8 L/h, lo que requiere un tiempo de espera para la saturación de la cámara de lectura de 0.5 h. Los espectros registrados bajo estas condiciones dan señales en la región 2000 – 1840 cm^{-1} menores a 10^{-5}.
Teneniendo en cuenta todas las optimizaciones hasta aquí descriptas, respecto a la toma de muestra y registro de espectros, el **Esquema 3** representa la metodología optimizada.

3.3.3. Medidas por reflexión total atenuada (ATR)

En este tipo de lectura la muestra se pone en contacto con una superficie transparente al IR (en nuestro caso de ZnSe) con un alto índice de refracción. La radiación IR refleja sucesivamente sobre la porción de la muestra que se encuentra directamente sobre el

prisma penetrando sólo unos micrómetros en el interior de la misma para rebotar nuevamente para la próxima reflexión. Nuestro laboratorio dispone de dos celdas para ATR diferentes, una es un plato plano para polvos y otra una cámara que carga aproximadamente 100 µl de líquido. Dichas celdas fueron utilizadas para medir espectros de material liofilizado como exopolisacáridos purificados de cultivos en biofilm de *B. pertussis,* como se describirá posteriormente en el **capítulo 5**. Esta metodología no fue utilizada para el registro de espectros de bacterias debido a la baja relación señal:ruido que se obtiene, que no hace posible realizar análisis de los espectros a nivel de sus derivadas primeras o segundas.

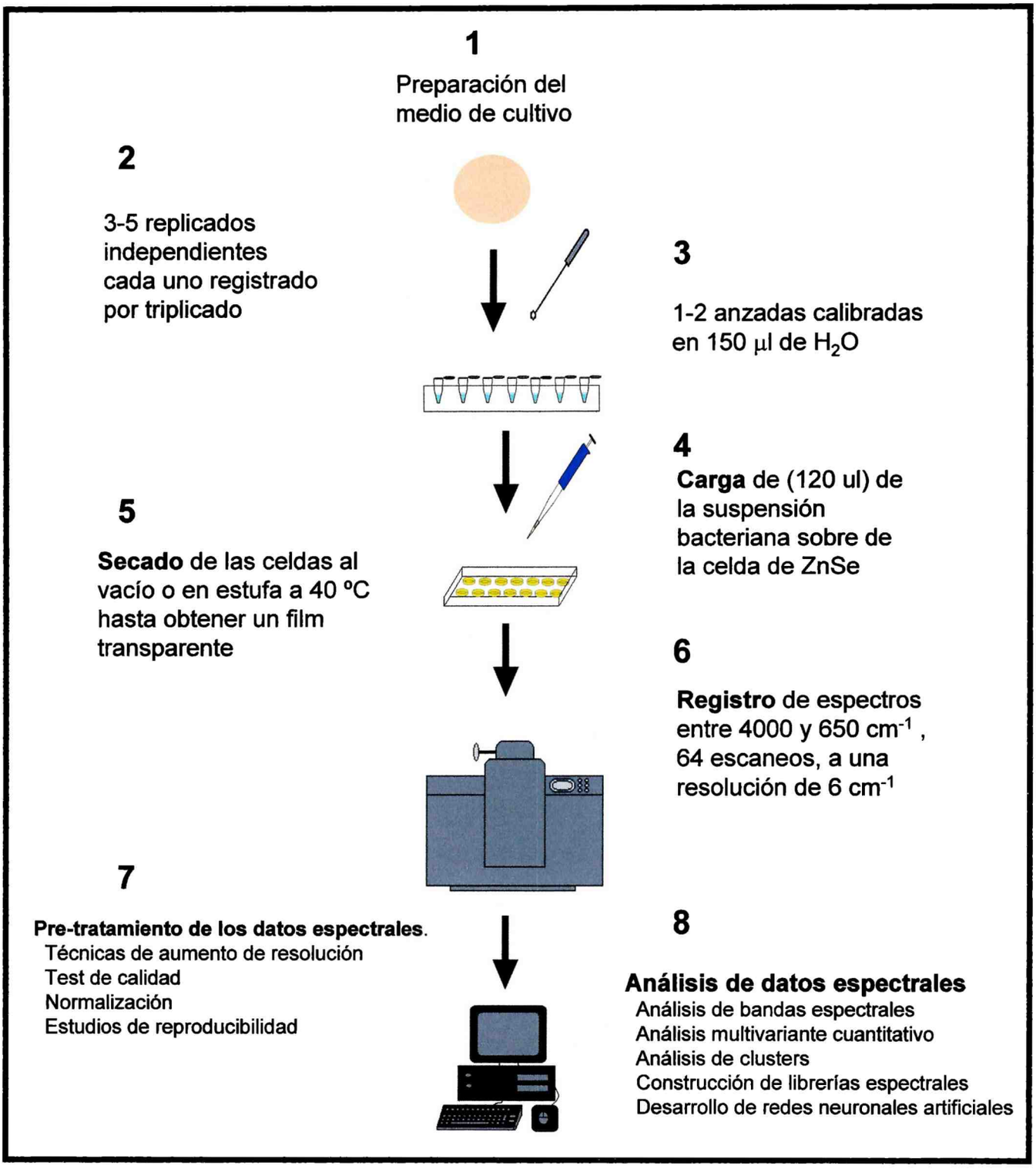
3.3.4. Exigencias de calidad sobre los espectros

Los principales parámetros a ser considerados para el registro de espectros infrarrojos son: (1) **La intensidad de la señal** en la banda de mayor absorbancia de un espectro debe estar comprendida en el rango de 0,345 a 1,355. Aunque este rango como se mencionó previamente debe ajustarse para cada caso teniendo en cuenta el cumplimiento de la Ley de Lambert y Beer. (2) **El ruido** debe mínimo, de manera que la relación señal:ruido registrada en la región de proteínas y carbohidratos sea suficientemente alta para permitir la aplicación de técnicas de aumento de resolución (deconvolución y derivadas 1ra y 2da). (3) **El vapor de agua** debe disminuirse al máximo. Todos estos parámetros de calidad son evaluados por el software OPUS 4.0, a través de una de sus rutinas denominadas Quality – test. Quality-Test. Este test de calidad espectral fue desarrollado por el Dr. Dieter Naumann, conjuntamente con la empresa Bruker Optics y en el mismo se establecieron los parámetros indicados en la **Tabla 2** como los aceptables, aunque también muchas veces es necesario establecer uno para cada sistema en estudio.

Tabla 2 Test de Calidad espectral (QT)

Parámetro	*1800 1600 (proteínas)*	*1200 960 (Carb. Hid)*	*2100 2000*	*1847 1837*	*2200 2000*
Δ A mínima Δ A máxima	**0.354 1.245**				
Ruido máximo			**0.00015**		
Señal / ruido	**200**	**40**			
Vapor agua				**0.0003**	
Señal/ Vapor agua	**100**	**20**			
Fringes					**5x10-3**

Esquema 3 Procedimiento optimizado para la preparación de muestras microbianas y registro de espectros FT-IR



Una vez registrado un espectro, es necesario calcular su derivada primera y segunda. Luego, sin ningún tratamiento previo (normalización o corrección de línea de base) debe ser analizado por el test de calidad. El cálculo de los parámetros mencionados se realiza del siguiente modo:

(1) Variación de absorbancia máxima y mínima entre 1800 y 1600 cm^{-1} (ΔA)

Región Amida I. Esta región es donde la mayoría de las muestras biológicas tienen el máximo de absorbancia, por lo cual se toma para analizar si la cantidad de muestra utilizada fue la correcta. Se ha demostrado que la absorbancia IR cumple la Ley de Lambert y Beer **entre 0.345 y 1.245** unidades de absorbancia para la mayoría de las muestras biológicas. Para evaluar este parámetro se calcula la diferencia entre el máximo y el mínimo de absorbancia registrados en el espectro (Δ absorbancia). Es el único parámetro que se mide sobre el espectro sin derivar.

(2) Cálculo del ruido (*r*)

Se calcula la diferencia entre el máximo y mínimo valor de la 1er derivada de los espectros en la región 2100 a 2000 cm^{-1}. Se elige este intervalo para calcular el ruido porque en él no se registran absorbancias asociadas a componentes delmicroorganismos o macromoléculas. Dicha diferencia debe ser ***< 1.5x10^{-4}.***

(3) Relación señal / ruido

Este parámetro se evalúa sobre la derivada primera de los espectros

Señal S_1: la diferencia entre el máximo y el mínimo valor de la derivada primera entre 1800 cm^{-1} y 1600 cm^{-1} (enlace peptídico)

Señal S_2: la diferencia entre el máximo y el mínimo valor de la derivada primera entre 1200 cm^{-1} y 960 cm^{-1} (carbohidratos)

Luego se calcula la relación entre los respectivos valores de S_1 y S_2 y el valor del ruido *(r)* obtenido según el punto (2). Estas relaciones deben ser **mayores que 200 y 40** respectivamente. Aunque esto debe ajustarse para cada microorganismo.

(4) Vapor de agua

La contribución del vapor de agua en los espectros se evalúa en el intervalo 1847 y 1837 cm^{-1} de manera de incluir el pico de 1844 cm^{-1}. Se utiliza también la primer derivada de los espectros y se calcula la amplitud de la misma en ese intervalo donde la diferencia entre el máximo y mínimo debe ser **< 3x10^{-4}.**

(5) Relación señal / vapor de agua *(S/va)*

Con estas relaciones se compara la relación de las señales debidas a las proteínas y carbohidratos con la absorbancia debida al vapor de agua. S_1/va y S_2/va deben superar el valor de 100 y 20 respectivamente, aunque estos valores también deben ajustarse para cada microorganismo.

(6) Fringing

Consiste en una desviación sinusoidal de la línea de base provocada en general por problemas eléctricos, dependiendo su valor del modelo del espectrómetro utilizado. El mismo se mide a través de la amplitud de la derivada primera en el intervalo 2200-2000 cm^{-1} y debe ser **< $5x10^{-4}$**.

En la **Tabla 3** se indican los resultados del un test de calidad obtenido para el espectro lbk.98 mencionado previamente (**Figs. 9 y 10**). En la Tabla se indican los valores máximos y mínimos admitidos por el test de calidad mencionados en la Tabla 2 (*min* y *max*) y los valores medidos para el espectro analizado (*measured*). El resultado de la evaluación del test de calidad puede ser ***QT=0***, que indica que alguno de los parámetros no se ajusta a los requerimientos del test, o **QT=1** que indica que el espectro ha cumplido con todos los requisitos de calidad.

Tabla 3. Test de calidad espectral, realizado por el software Bruker V. 4.0 para un espectro (lb.98) de una cepa de lactobacilo

Quality Test Report	Values		
Test result ok/not ok [1/0]:	1		
	min	max	measured
Absorption (X-Range 1):	0.300000	1.850000	0.850683
Noise (X-Range 4):	0.000000	0.000150	0.000038
Signal/Noise (X-Range 2):	200.000000	0.000000	771.370927
Signal/Noise (X-Range 3):	40.000000	0.000000	325.347424
Water Vapour (X-Range 5):	0.000000	0.000300	0.000059
Signal/Water (X-Range 2):	100.000000	0.000000	497.108475
Signal/Water (X-Range 3):	20.000000	0.000000	209.669507
Fringes (X-Range 6):	0.000000	0.000500	0.000016

Sobre la base de la experiencia adquirida podemos afirmar que los parámetros de mayor influencia sobre la calidad de un espectro y la reproducibilidad de los mismos son los relacionados con el crecimiento celular (el tiempo y temperatura de incubación) y la obtención de un film homogéneo y transparente. Estos producen mayor efecto sobre la calidad y la reproducibilidad que los relacionados con la adquisición y registro de espectros (resolución, número de escaneso, etc). En la **Tabla 4** se indica en una escala de 1 a 5 la influencia de los principales parámetros sobre la calidad y reproducibilidad espectral y el grado de influencia de cada uno de ellos.

Tabla 4. Grado de influencia de los parámetros que influyen en la calidad y reproducibilidad espectral (escala de 1 a 5).

Parámetro	*Grado de influencia*
Medio de cultivo	4
Tiempo de incubación	5
Control de Temperatura (dentro de un rango de ± 5)	2
Secado del film	5
Técnica de distribución y volumen de la muestra	2
Control de vapor de agua en la cámara de lectura	5
Espectrómetro o tipo de espectrómetro	1

3.4. Pre-tratamiento de los datos espectrales

Previo al estudio de caracterización y/o identificación, los espectros registrados deben someterse a una serie de análisis. Para llevar a cabo dichos análisis existen en el mercado una serie de software de uso exclusivo para el análisis espectral. De modo que antes de comenzar con todos los estudios debimos entrenarnos en la utilización de los software. El software más ampliamente usado en el estudio de clasificación e identificación de microorganismos es el OPUS, en sus diferentes versiones. En el año 2000 fue cedido a nuestro laboratorio por Dr. Dieter Naumann la primera versión de dicho software (V 3.0) y fuimos entrenados por una investigadora de su laboratorio (Maren Stämbler), en el pre-tratamiento de los datos espectrales, el análisis de clusters y la construcción de librerías espectrales. Este software funciona solamente bajo sistema operativo OS/2, de modo que requirió la adaptación de nuestros sistemas informáticos y el aprendizaje del mismo. Posteriormente hemos recibido las sucesivas versiones de dicho software para windows NT y luego la versión V 4.5 que funciona bajo windows xp. Estas últimas versiones del software de Bruker, además del paquete IDENT, utilizado para trabajos de diferenciación e identificación contiene el paquete QUANT, que permite realizar análisis multivariantes cuantitativos. Los Drs. Dieter Nauman y Juergen Schmitt, nos han entrenado en los años sucesivos para el mejor aprovechamiento de estos software.

En el trascurso de nuestros estudios hemos adquirido también el software *Grams* 3.0 (Galactic) el cual tiene como principal aplicación el cálculo de áreas o alturas para llevar a cabo la cuantificación de componentes celulares cuyas bandas de absorción

se encuentran solapadas por otras, por lo que requieren un tratamiento previo de fiteo y deconvolución (**capítulo 1, sección 6.1**),

El último software que fue incorporado al laboratorio fue el NeuroDeveloper (Synthon-Analytics, Alemania), desarrollado por el Dr. Juergen Schmitt, quien personalmente nos ha entrenado para su utilización. Este software tiene como principal aplicación realizar análisis de clasificación, identificación y cuantificación en base a la construcción de redes neuronales artificiales.
Tal como lo indica el **Esquema 2**, previo al análisis de los espectros es necesario llevar a cabo un pre-tratamiento de los mismos que consiste en:

Aumento de resolución
Normalización
Estudio de reproducibilidad

3.4.1. Aumento de resolución

Como ya se mencionó los espectros IR de los microorganismos en particular y en general de cualquier muestra biológica, poseen información de la totalidad de la composición química de la célula. De modo que debido a la gran cantidad de componentes celulares los espectros constituyen una superposición de bandas dando como resultado unas pocas bandas anchas. Esto hace sumamente difícil el entendimiento y análisis de la información contenida en ellos. Para poder aumentar la resolución de dichas bandas al menos parcialmente, existen dos alternativas, o bien buscar los picos que las conforman a través de la derivada segunda o aplicar la deconvolución de los espectros (**Capítulo 1, Sección 1.3**). La **Fig. 11** muestra a modo de ejemplo sobre un espectro de *B. pertussis* la metodología utilizada para obtener mayor información a través de estas técnicas de aumento de resolución. Para obtener los picos que componen una banda para estudios de cuantificación se aplicó la derivada segunda (**Fig. 11a**) o la deconvolución (**Fig. 11b**), aunque la derivada segunda fue el método preferido. En dicha figura es posible observar la posición de los picos (indicados en rojo) que componen las bandas de Amida I y II en un espectro de *B.pertussis* cultivada en medo líquido utilizando ambos métodos.

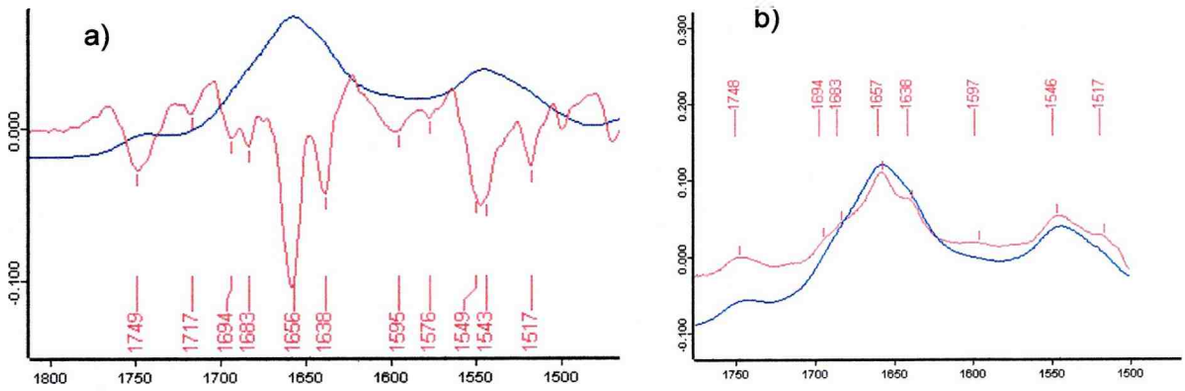


Fig 11. Aumento de resolución aplicada sobre bandas Amida I y II de un espectro de un cultivo líquido de *B. pertussis*. En azul se indica el espectro original en la región 1800 – 1500 cm-1 y en rojo se indica a) derivada segunda y b) deconvolución

Estos métodos fueron utilizados en el cálculo de áreas o alturas para cuantificar algún componente celular como el caso de carbohidratos, proteínas y lípidos en los estudios comparativos de cultivos de *B. pertusiss* (capítulo 5). Para realizar estos cálculos se aplicó el método de la segunda derivada para localizar los picos componentes de una banda, luego se realizó un fiteo para obtener las Lorenzianas o Gausianas que componen dichas bandas para finalmente calcular el área integrada (método DFAI), tal como se mencionó previamente (**Capítulo , sección 6.1.1**).

Para los estudios de clasificación e identificación donde se desea analizar diferencias entre espectros para asociarlas a diferencias entre especies o cepas microbianas, por lo general dichas diferencias no pueden ser observadas a través de los espectros como tales sino que se observan a nivel de su derivada primera o segunda. En general en estudios de clasificación realizados en este trabajo la derivada primera fue la seleccionada para diferenciar tanto a nivel de cepa como de especie.

3.4.2 Normalización

Si bien como norma primordial de trabajo se establece que cuando se están comparando una serie de espectros, todos ellos deben ser registrados para la misma cantidad de muestra, la normalización es siempre necesaria para compensar posibles errores. Sin embargo es posible llevar a cabo diferentes tipos de normalización según la aplicación. De todas ellas, en este trabajo se realizaron principalmente dos tipos de normalización:

a) **Máxima:** Se utiliza cuando se desea en una serie de espectros igualar la absorbancia de alguna banda en particular. Por ejemplo cuando se necesitó igualar los espectros a una misma cantidad de carbohidratos, se igualó la absorbancia en la región 1200-900 cm^{-1}, si se buscó igualarlos en proteínas se llevó a la misma absorbancia Amida I o Amida II (1600-1500 cm^{-1}, es la región preferida). En particular el software de Bruker para realizar este procedimiento extiende la variable **y** en la posición seleccionada a un valor de 2 unidades de absorbancia. La **Fig. 12a** muestra una normalización máxima realizada en Amida II para una serie de espectros de *B. pertussis* registrados con igual cantidad de biomasa (2 anzadas en 120 μl).

b) **Vectorial:** Esta normalización se puede realizar sobre uno o varios espectros simultáneamente. De todos los software disponibles solo el OPUS posee el algoritmo para hacerlo. Primero calcula el valor promedio de ***y*** del espectro considerado. Este valor de ***y promedio*** es restado al espectro, de modo que el centro del mismo es llevado a **y = 0**. Luego calcula la **suma de los cuadrados de todos los valores de y** para luego dividir el espectro por la raíz cuadrada de dicha suma. En la **Fig. 12b** se indican los mismos espectros de la figura anterior pero normalizados vectorialmente en todo el rango espectral (4000-650 cm^{-1}). Esto mismo puede realizarse en la zona de carbohidratos

3.4.3. Reproducibilidad

Una vez optimizados todos los parámetros descriptos en cuanto a la toma de muestra y las medidas de los espectros, de manera que los mismos superen el QT, antes de someterlos a cualquier análisis de caracterización y/o identificación, se analizó la reproducibilidad obtenida. A fin de **cuantificar de alguna manera la reproducibilidad** a lo largo de los ensayos, se consideraron los **niveles de reproducibilidad** que definen el límite del poder de discriminación de la técnica. En este trabajo se utilizaron los parámetros que describen los niveles de reproducibilidad definidos por Helm, Naumann y sus colaboradores (Helm y col. 1991a; Naumann y col. 1991b), los cuales proporcionan la varianza normal del sistema en estudio:

- **RL_1** define la reproducibilidad dentro de distintas alícuotas de una misma muestra de un aislamiento determinado: **$RL_1 < 10$**
- **RL_2** describe la reproducibilidad dentro de muestras independientes de un determinado aislamiento crecidas en las mismas condiciones y obtenidas en un período de tiempo de 6 meses: **$RL_2 < 25$**

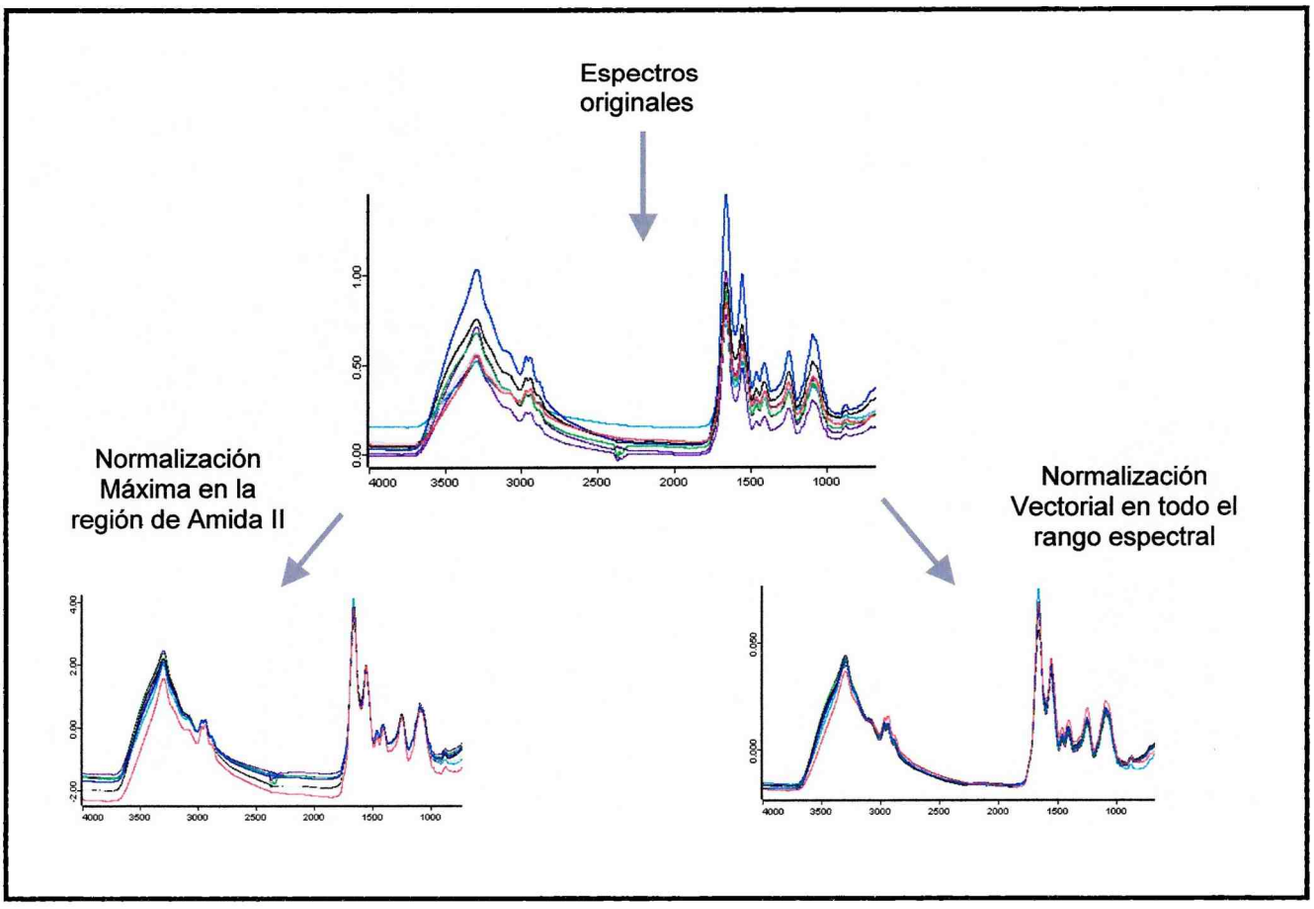


Fig. 12 Normalización de 8 espectros de un cultivo de *B. pertussis*. Todos ellos fueron registrados utilizando 2 anzadas de biomasa en 150 µl de agua. A) Normalización máxima en la región de proteínas (Amida II) y B) Normalización vectorial en todo el rango espectral (4000 – 650 cm-1)

Para darles valores cuantitativos a los límites de reproducibilidad, se utilizó un parámetro objetivo que describe y compara las medidas, denominado coeficiente de correlación de Pearson (r_{y1y2}). Este constituye la correlación entre pares de espectros y se calcula a través de la ecuación:

$$r_{y_1y_2} = \frac{\sum_{i=1}^{n} y_{1i}y_{2i} - n\overline{y_1}\,\overline{y_2}}{\sqrt{\sum_{i=1}^{n} y_{1i}^2 - n\overline{y_1^2}}\sqrt{\sum_{i=1}^{n} y_{2i}^2 - n\overline{y_2^2}}}$$

Donde y_{1i} y y_{2i} son los valores de las absorbancias individuales de dos espectros a ser comparados; n representa el número de puntos en la región donde se realiza el cálculo y y_1 e y_2 representan el valor de la media aritmética entre y_1 y y_2.

Este coeficiente de correlación se calculó para cada uno de los pares de espectros utilizando la primer derivada en la región 1200 – 900 cm^{-1}, obteniéndose una matriz de coeficientes de correlación. Con esta matriz se construyó un dendrograma aplicando el algoritmo *Av. Linkage.* Los valores de fusión obtenidos para el dendrograma generado correspondieron a las distancias espectrales. En dichos dendrogramas RL_1 representó la distancia espectral máxima entre replicados de una misma alícuota y RL_2 la distancia espectral máxima entre replicados independientes.

3.5. Análisis de datos espectrales

Los estudios de clasificación, diferenciación e identificación, así como también los análisis cualitativos, cuantitativos se realizaron utilizando la serie de herramientas computacionales descriptas previamente:

El Spectrum (Perkin Elmer), es el software con el cual se registraron los espectros IR y se realizaron las determinaciones más sencillas como la posición de bandas o el cálculo de alturas o áreas de bandas no superpuestas

Grams 3.0 (Galactic), software especialmente diseñado para estudios de derivada, fiteos y cálculos de áreas integradas para análisis cuantitativo.

Opus, Bruker, Alemania: en diferentes versiones . *Opus 3.0* (versión para sistemas operativos OS/2), *Opus 3.1 y 4.5* (para windows NT) que incluyen el paquete IDENT (para análisis de clusters y contrucción de bibliotecas) y el paquete QUANT (para análisis multivariante cuantitativo PLS);

NeroDeveloper®,desarrollado por Synthon Analytics, Heildelberg, Alemania para la creación de redes neuronales artificiales aplicadas en la construcción de librerías y otras bases de datos.

Existen dos grandes alternativas para el estudio y análisis de los espectros:

i) Análisis de diferentes bandas espectrales.

ii) Análisis de reconocimiento de patterns.

3.5.1 Análisis de bandas espectrales.

Este tipo de análisis se llevó a cabo para el estudio de componentes celulares como la formación de cápsulas (constituidas por carbohidratos) en cultivos de *B. pertusiss* en biofilm (descripto en el capítulo 5). También se utilizó dicha metodología para realizar un estudio comparativo de composición macromolecular de *B.pertusis* creciendo bajo diferentes sistemas de cultivo Estos análisis se basaron en el método de búsqueda de picos característicos asociados al componente que se desea cuantificar aplicando el método de la derivada segunda, el fiteo y el cáclulo de las áreas integradas descripto

en la sección (6.1 del capítulo 1) Para realizar estos cálculos se aplicó el software Grams siguiendo las etapas indicadas en le **Esquema 4.**

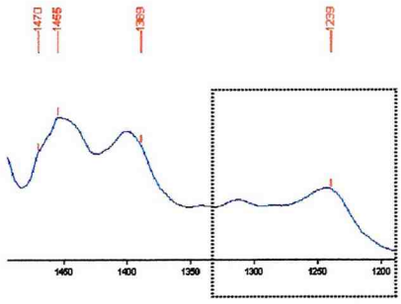
3.5. Quemometría. Aplicación de métodos multivariantes y estadísticos a la espectroscopía Vibracional

La aplicación de los diferentes métodos de análisis se detallará en cada capítulo, ya que depende del objetivo que se desea alcanzar. El Esquema 5 contiene un resumen de los diferentes métodos de análisis aplicados a lo largo del trabajo de tesis.

Esquema 4 Técnica de aumento de resolución, fiteo y cálculo de áreas integradas

1

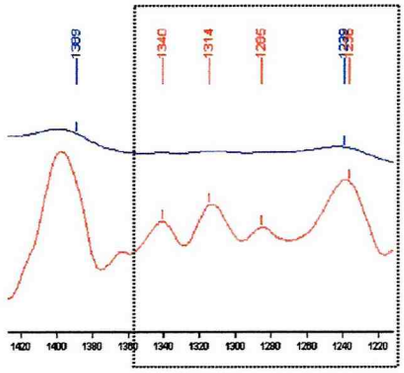
Espectros originales normalizados vectorialmente (OPUS)



2

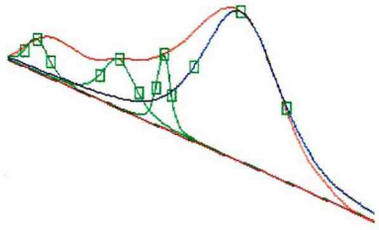
Derivada 2da x -1

Se analizan la posición de los picos (x) la altura (H) y el ancho de banda media (W) (GRAMS)



3

X, H, W, se toman como los parámetros iniciales para el fiteo



4 **Ajuste y cálculo de áreas integradas**

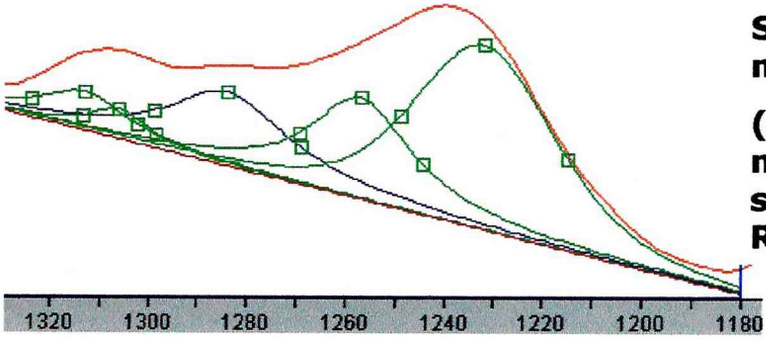
	Center X	Height	Width	Area
Mixed G+L	1311.7396	.0058785019	15.98573	.12431296
Mixed G+L	1284	.007163675	47.822875	.35979834
Mixed G+L	1262.8851	.0060196369	40.539867	.31671266
Mixed G+L	1239.2632	.030226257	35.893996	1.2109798

Solution:	Local Minimum
Reduced Chi ²:	304.047201
RMS Noise:	.0000511684
Corr. (R^2):	.994566682
Std. Error:	.00084155634

5

Se ajusta hasta obtener los mejores valores estadísticos

(alcanzar un mínimo o mínimo local, menor error std, Chi^2 > 10^4, mínimo valor RMS).



Quemometría

- ✓ Asegurada la calidad espectral (QT)
- ✓ Realizado el pre-tratamiento de los espectros
- ✓ Estudiada la reproducibilidad de los replicados (RL_1 y RL_2)

↓

Sobre la derivada 1ra

↓

Técnicas de reconocimiento de *patterns*

EL MÉTODOS MULTIVARIANTE a emplear depende del OBJETIVO

↓

Tratar de encontrar una agrupación intrínseca dentro de los datos espectrales

Describir la heterogeneidad de los datos

Se utilizan métodos exploratorios, o de clasificación objetiva

↓

Métodos no supervisados
Análisis de Cluster (AC)

↓

Capítulo 4
caracterización de aislados locales de *Moraxella bovis*

↓

Construir bases de datos espectrales

Requieren un conocimiento previo de la identidad de la muestra

↓

Análisis de Cluster (AC)

↓

Capítulo 4
Diferenciación e identificación de lactobacilos aislados de gránulos de kefir. Construcción de librerías espectrales

↓

Clasificación de poblaciones celulares piliadas y no piliadas y cuantificación del nivel de piliación

Crear programas computacionales basados en los datos experimentales

Se utilizan técnicas que permiten a las computadoras "aprender"

↓

Métodos supervisados

Redes Neuronales Artificiales (RNA) y Métodos Cuantitativos Multivariantes (PLS)

↓

Capítulo 3
Clasificación de poblaciones de células piliadas y no piliadas de *M. bovis (RNA) y cuantificación del nivel de piliación (PLS)*

4. CONCLUSIONES

1. A nivel personal y del grupo **se inició una nueva línea de investigación aplicada a la caracterización molecular de microorganismos de interés biotecnológico**. Esto implicó un trabajo inicial de interacción con profesionales de diferentes áreas (física, química, ingeniería) tanto de nuestra Facultad como de laboratorios internacionales. Se establecieron cooperaciones con institutos de investigación de nuestra ciudad como el CEQUINOR-LANAIS-EFO, y laboratorios internacionales como el laboratorio MIDAS dirigido por el Prof. Dr. Dieter Naumann del Robert Koch Institute de Berlín; el laboratorio de Tecnología de Alimentos de la Universidad de Munich, dirigido por el Dr. S. Scherer y la empresa biotecnológica Synthon-Analytics, Heidelberg, Alemania, dirigida por el Dr. Juergen Schmitt, especializada en el desarrollo de software de aplicación a la espectroscopía vibracional, Heidelberg, Alemania.
   Es importante resaltar que al inicio de mi trabajo de Tesis (5 años atrás) no contábamos con el equipamiento para el registro de espectros IR, ni con ninguna herramienta informática para el análisis de los mismos.

2. Dados los problemas que ocasiona la presencia de vapor de agua contenido en el aire en el análisis de los espectros de microorganismos se implementó un estudio sistemático sobre diferentes soluciones tendientes a eliminarlo. Se seleccionó finalmente **un sistema de barrido con aire seco de la cámara de lectura el cual resultó el más apropiado y permitió que los espectros superasen el valor de corte exigido por el test de calidad para este parámetro.**

3. Se establecieron, para cada uno de los microorganismos estudiados en el presente trabajo, **las condiciones operativas de muestreo tales como cantidad de muestra depositada sobre la celda, forma y tiempo de secado.**

4. Se avanzó en el conocimiento de la adquisición de espectros identificando los parámetros de lectura adecuados y se extendieron a otros espectrómetros diferentes al los modelos de Bruker. **Se estableció un protocolo de trabajo para cada uno de los equipos disponibles.**

5. Se instrumentó un estricto control de calidad espectral de modo que **los espectros obtenidos en nuestro laboratorio actualmente pueden ser empleados en bibliotecas espectrales internacionales**. Se avanzó en el conocimiento e implementación de varios software requeridos para el procesamiento de la información espectral.

5. Bibliografía

1. Bruker Optics. 1993. Sample Preparation, Measurement and Evaluation of the FT-IR Spectra of Microorganisms. Ettlingen, Germany. Bruker Optik GmbH.

2. Bruker Optics. 1999. Identification of bacteria by FT-IR spectroscopy. Bio-Medical.FT-IR/NIR/Raman 2, 1-15

3. Helm D, Labischinski H, Naumann D. 1991a. Elaboration of procedure for identication of bacteria using Fourier-Transform IR spectral libraries: a stepwise correlation approach. J Microbiol Meth 14:127-142.

4. Helm D, Labischinski H, Schallehn G, Naumann D. 1991b. Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy. J Gen Microbiol 137:69-79.

5. Helm, D. a. D. N. 1995. Identification of some bacterial cell components by FT-IR spectroscopy. FEMS Microbiol Lett 126, 75-80

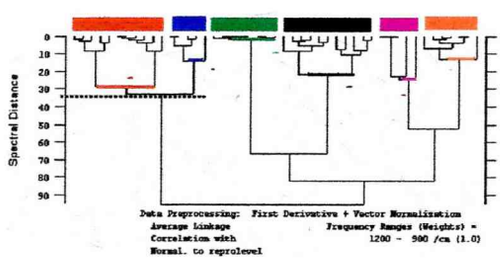
6. Naumann D, Helm D, Labischinski H. 1991a. Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy. Nature 351:81-82.

7. Naumann D. 2000. Infrared Spectroscopy in Microbiology. Chichester: Jhon Wiley & Sons Ltd.

8. Naumann D, Helm D, Labischinski H. 1991b. Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy. Nature 351:81-82.

CAPÍTULO 3

DIFERENCIACIÓN, CLASIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LACTOBACILOS POR ESPECTROSCOPÍA INFRARROJA



1. INTRODUCCIÓN

La caracterización microbiológica de muestras clínicas, alimentos y aguas, incluye la detección, enumeración y caracterización de las poblaciones microbianas presentes en dichas muestras. En la práctica existen diferentes técnicas de análisis para detectar, contar y diferenciar microorganismos. Estas técnicas incluyen el conteo de unidades formadoras de colonias, la medida de densidad óptica, la utilización de contadores de células, o separadores de tipos de células presentes, y la aplicación de un conjunto de técnicas de identificación por medio de las cuales es posible diferenciar los organismos e identificar a qué familia, género y especie pertenece cada aislamiento. Las metodologías de caracterización e identificación pueden ser fenotípicas o genotípicas. Las primeras son las utilizadas en los primeros pasos de una identificación y comprenden la microscopía clásica que permite distinguir cocos, bacilos, espirilos, etc.; las técnicas de tinción, con las cuales además de la diferenciación entre organismos Gram positivos y Gram negativos es posible evaluar la presencia de cápsulas y otros componentes celulares. Luego, la inspección de la morfología y características tintoriales de las colonias de los organismos cultivados en medio sólido es otro de los elementos empleados en la clasificación de los mismos . Basados en estas características morfológicas se realizan una serie de ensayos que permiten examinar el comportamiento bioquímico, fisiológico y nutricional de los organismos (a través de reacciones bioquímicas o enzimáticas) que llevan a su identificación. Tradicionalmente, las pruebas se desarrollan sobre cultivos en medio sólidos o líquidos que requieren diferentes tiempos de incubación, dependiendo de la prueba y el microorganismo en particular para poder obtener un resultado. Para lograr una identificación definitiva utilizando estas metodologías convencionales es necesario aplicar una gran cantidad de pruebas diferentes. Esta serie de pruebas requieren no menos de 3 a 4 días de trabajo, a partir de la obtención de cultivos puros. Estas demoras han llevado al desarrollo de sistemas automatizados de identificación que permiten reducir estos tiempos a 24 horas. (Stager y Davis 1992), describieron en este camino sistemas de identificación automatizados que se han ido incorporando gradualmente en los laboratorios de diagnóstico microbiológico durante dos décadas (1970 a 1990). Posteriormente, Miller y O´Hara, publicaron un manual de sistemas automatizados para la identificación de bacilos Gram negativos fermentativos y no fermentativos (Miller y col. 1989; Miller y O'Hara 1999; O'Hara y Miller 2002). A pesar que el tiempo requerido para la

identificación de los microorganismos por métodos fenotípicos automatizados (sistemas API) relativamente reducido, su costo es elevado, cuando no se cuenta con ellos, la batería de pruebas bioquímicas convencionales necesarias para alcanzar una identificación requiere de una gran cantidad de consumibles y tiempo de análisis. Otro factor a considerar es que muchas veces estos métodos producen falsas identificaciones.
Las técnicas de biología molecular constituyen la principal de metodología para alcanzar el diagnóstico microbiológico. Estas se encuentran ampliamente desarrolladas (Pfaller 2001; Sakallah 2000). La mayoría de ellas analizan una secuencia específica de ADN (especie –específica) que permite la identificación o demuestra la presencia de genes de resistencia a antibióticos (Clark y col. 1999). La principal ventaja de los métodos moleculares de diagnóstico son su alta sensibilidad y especificidad (Belgrader y col. 1999). Asimismo, para detectar la presencia de un microorganismo en una muestra, teóricamente se requiere sólo una copia del ADN bacteriano para realizar la identificación utilizando PCR. Debido a esta alta sensibilidad, es posible detectar organismos no cultivables o identificar organismos difíciles de cultivar (Relman 1999) Asimismo, es posible utilizando técnicas como la hibridización fluorescente *in situ* en la región conservada 16S rRNA (Amann y col. 2001) lograr la detección e identificación de microorganismos en matrices complejas. El inconveniente de estas técnicas reside en su alto costo y su dificultad de implementación en análisis de rutina.
Las técnicas espectroscópicas constituyen un conjunto de metodologías, radicalmente diferentes a las mencionadas previamente, que pueden ser aplicadas a la caracterización e identificación microbiana. Dentro de ellas las espectrometrías Py-MS (pirólisis y espectrometría de masas) y MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption ionization time of flight*) son ejemplos de las denominadas técnicas **espectroscópicas destructivas** que desde hace ya dos décadas han demostrado gran potencialidad para la identificación microbiana (Bright y col. 2002; Claydon y col. 1996; Goodacre y col. 1996a; Haag y col. 1998; Jones y col. 2003; Keys y col. 2004; Sanglier y col. 1992; Timmins y col. 1998). Las técnicas **espectroscópicas no destructivas** representadas por FT-IR y FT-Raman son aquellas en las cuales las células permanecen intactas durante su análisis.

La espectroscopía vibracional permite llevar a cabo una discriminación o clasificación basada en la composición química de células microbianas intactas, produciendo espectros complejos que constituyen un *fingerprint* bioquímico altamente reproducible y característico para distintos microorganismos. La potencialidad de la espectroscopía

infrarroja como una herramienta en diferenciación bacteriana fue reportada desde 1950 (Thomas y Greenstreet 1954), y revisada posteriormente con el advenimiento de los espectrómetros IR con transformada de Fourier por el grupo del Dr. Dieter Naumann en el Robert-Koch Institute de Berlín (Helm y col. 1991b; Naumann y col. 1988). Desde entonces, distintos grupos de investigación han demostrado la capacidad de la espectroscopía vibracional de proveer suficiente poder de resolución para distinguir células microbianas a distintos niveles taxonómicos aún a nivel de cepa. Esta técnica combina la rapidez con la sensibilidad y reproducibilidad (Sandt y col. 2003). Además es fácil de implementar, puede ser automatizada, permite el análisis rápido de relativamente pequeñas cantidades de muestra y no requiere reactivos o consumibles (Helm y col. 1991b; Maquelin y col. 2002; Maquelin y col. 2003; Schmitt y Udelhoven 2001). Esta metodología ha sido empleada con éxito, en la identificación y clasificación de microorganismos a nivel hospitalario, *Staphylococcus* (Helm y col. 1991b; Helm y col. 1991c; Ngo Thi y col. 2000), *Escherichia* (Helm y col. 1991c), *Bacillus, Streptococcus* (Goodacre y col. 1996b; Helm y col. 1991b; Helm y col. 1991a), *Enterococcus* (Goodacre y col. 1996b; Kirschner y col. 2001) *Clostridium, Legionella spp, , Listeria spp. Candida* (Maquelin y col. 2002; Naumann y col. 1991; Schmitt y Udelhoven 2001), así como también en alimentos (Maquelin y col. 2002; Schmitt y col. 2002; Wenning y col. 2002) y aguas (Masuch y Moss 2003; Sommer y Hardgrove 2000). Respecto a los antecedentes en la caracterización de Lactobacilos, FT-IR fue aplicada en la caracterización, diferenciación e identificación de bacterias lácticas contenidas en cervezas, quesos y carnes (Amiel y col. 2001; Curk y col. 1994; Oust y col. 2004b). Sin embargo esta técnica no ha sido aún aplicada en la diferenciación de lactobacilos aislados de gránulos de kefir.

2. OBJETIVOS

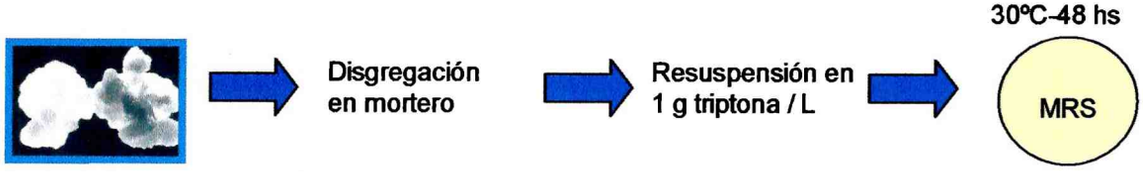
Desarrollar un método de *screening* para la caracterización e identificación rápida de lactobacilos presentes en gránlos de kefir, basado en la construcción de librerías espectrales. Se pretende disponer de una alternativa que permita reemplazar a los métodos bioquímicos clásicos prolongados y costosos, por una alternativa económica, rápida y sencilla. El objetivo es emplear la espectroscopía FT-IR combinada con análisis de cluster empleado como un método supervisado.

3. DESCRIPCIÓN DE LA MICROFLORA DE LOS GRÁNULOS DE KEFIR

El kefir constituye una leche fermentada en la cual los gránulos de kefir son utilizados como iniciadores (*starter*). Los gránulos son masas irregulares blanco amarillenta en las cuales poblaciones de levaduras y bacterias se encuentran contenidas dentro de una matriz de proteínas y polisacáridos. Su consumo es popular principalmente en ciertos países del este europeo como Rusia, Polonia, República Checa, Croacia, Alemania y Rumania. En nuestro país no se produce en forma industrial pero es elaborado en forma artesanal en gran cantidad de hogares y en comunidades de inmigrantes.

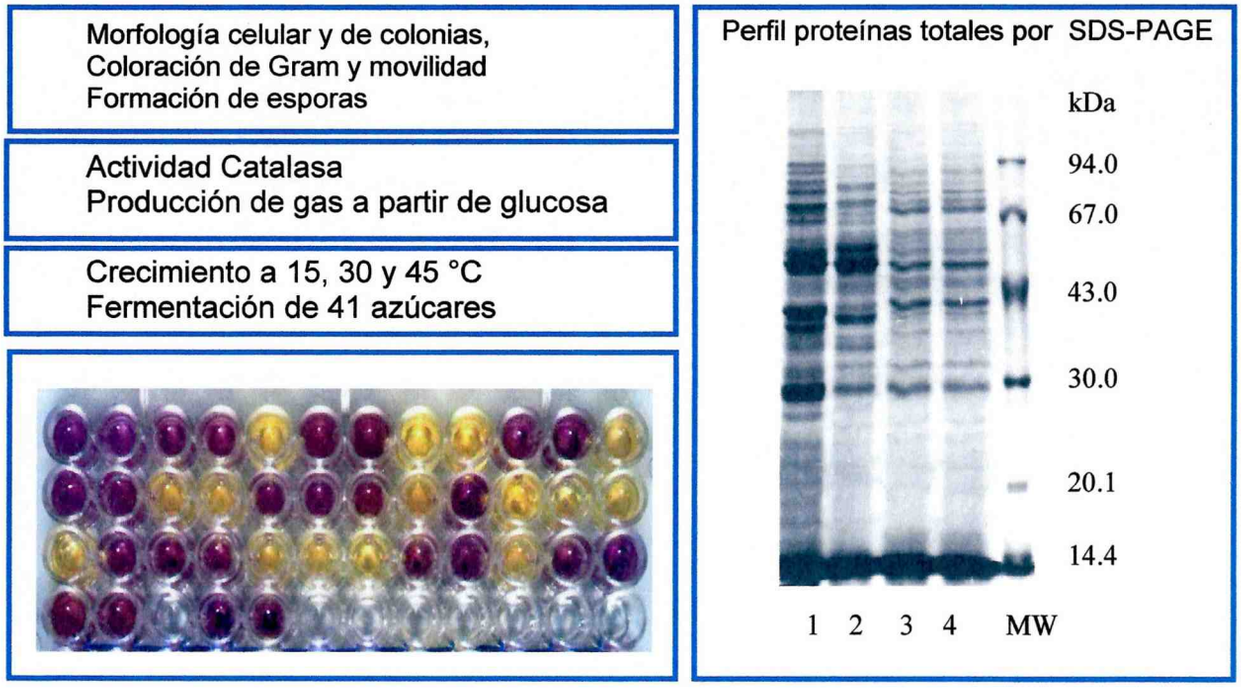
Desde hace mucho tiempo se han mencionado los beneficios sobre la salud que produce el consumo de productos lácteos fermentados. Sin embargo las bases científicas del empleo de los microorganismos probióticos (o alimentos que los contienen) han sido recientemente establecidas. Los microorganismos probióticos incluyen entre otros *Lactobacillus*, *Lactococus*, *Bididobacterium*. Algunos de ellos poseen efecto inhibitorio sobre el crecimiento de un amplio rango de patógenos intestinales del hombre y animales. La actividad antagónica involucra mecanismos tales como la liberación de peróxido de hidrógeno, producción de ácidos orgánicos, competencia por los nutrientes disponibles, excreción de metabolitos secundarios, etc. El consumo de kefir ha sido asociado a la longevidad de los pueblos caucásicos y se ha observado que causa beneficios digestivos. Ha sido usado empíricamente en el tratamiento de personal con desórdenes metabólicos, arterosclerosis, enfermedades alérgicas y tuberculosis. Se han estudiado también actividades antitumorales, la participación en la estimulación del sistema inmune, además de la actividad antibacteriana y antifúngica.

En el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA, CONICET, Facultad de Ciencias. Exactas, UNLP) se ha estudiado en los últimos años, la microflora contenida en gránulos de kefir obtenidos de diferentes orígenes. Para tal estudio se ha empleado la metodología desarrollada por Garrote y colaboradores (Garrote y col. 2001) para la disgregación de los gránulos y el posterior aislamiento de los diferentes microorganismos (**Esquema 1**).



Esquema 1. Esquema para el aislamiento de Lactobacilos de gránulos de kefir. Tomado de Garrote y col. 2001

Sobre dichos aislamientos se han empleado métodos fenotípicos de caracterización e identificación convencionales y se han utilizado los criterios del Manual Bergey para el análisis bacteriológico sistemático. Entre otras determinaciones, se han empleado estudios de morfología de colonias, tinción, movilidad, reacción de catalasa, producción de gas, fermentación en medios basales con 41 azúcares diferentes, perfiles de proteínas totales (**Esquema 2**). Estas determinaciones han permitido caracterizar la microflora de los diferentes gránulos, obteniendo para cada gránulo estudiado diferentes proporciones de los siguientes microorganismos: *Lactococcus lactis* subs. *Lactis, Lactobacillus* homofermentativos: *Lb. Plantarum*; *Lactobacillus* heterofermentativos: *Lb. kefir* y *Lb. parakefir*, Levaduras: *Saccharomyces,* Bacterias ácido acéticas: *Acetobacter*.



Esquema 2. Identificación de *Lactobacillus* aislados de gránulos de kefir por métodos bioquímicos y perfiles de proteínas totales por SDS-PAGE. Tomado de Garrote y col. 2001

La microflora de los gránulos de kefir depende del origen de los gránulos, de las condiciones de cultivo, forma de almacenamiento de los mismos y del proceso de elaboración. Respecto a los lactobacilos comúnmente encontrados dentro de la microflora de diferentes gránulos de kefir, datos provenientes de diferentes países han reportado la

presencia de los siguientes organismos: *Lactobacillus brevis* (Angulo y col. 1993; Marshall y col. 1984; Ottogalli y col. 1973; Rosi 1978a; Rosi 1978b), *Lactobacillus casei* (Angulo y col. 1993; Molska y col. 1983), *Lactobacillus kefir* (Angulo y col. 1993; Garrote y col. 2001; Kandler y Kunatha 1983; Marshall y col. 1984; Pintado y col. 1996); *Lactobacillus acidophilus* (Angulo y col. 1993; Marshall y col. 1984; Ottogalli y col. 1973); *Lactobacillus plantarum* (Garrote y col. 2001) *Lactobacillus kefiranofaciens* ((Fujisawa y col. 1988; Toba y col. 1991), *Lactobacillus kefirgranum* y *Lactobacillus parakefir* (Garrote y col. 2001; Takizawa y col. 1994).

4 . MÉTODOS

4. 1. Microorganismos y condiciones de cultivo

Se utilizó un total de 43 aislados de Lactobacilos provenientes de 4 gránulos de kefir pertenecientes a la colección del CIDCA (Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos, Argentina) denominados AGK1, AGK2, AGK3 y AGK4. (**Tabla 1**). Los mismos fueron agrupados de acuerdo a su capacidad de fermentar la glucosa en heterofermentativos (22 aislamientos) y homofermentativos (21 aislamientos). El género y especie de estas bacterias fue determinado por métodos bioquímicos y el perfil de proteínas totales obtenido por SDS-PAGE (Garrote y col. 2001).

Las cepas de referencia incluidas en el estudio (12) fueron seleccionadas teniendo en cuenta las especies de *Lactobacillus* previamente aislados e identificados por otros autores en diferentes gránulos de kefir (Angulo y col. 1993; Marshall y col. 1984; Simova y col. 2002).

Todas las bacterias fueron crecidas en medio sólido MRS (Biokar, Francia), a 30 °C por 48 ± 2 horas para los organismos homofermentativos y 72 ± 2 horas para los heterofermentativos. Tanto el medio de cultivo MRS como las condiciones de incubación fueron elegidas teniendo en cuenta que son las condiciones adoptadas para el cultivo de microorganismos pertenecientes al género Lactobacillus or los laboratorios internacionales. De modo que nuestros resultados podrían ser confrontados contra otras librerías espectrales internacionales

4.2. Esptroscopía FT-IR

4.2.1. Preparación de las muestras

Tabla 1. Cepas de referencia y aisladas de diferentes gránulos de kefir utilizadas en el trabajo

LACTOBACILOS	ESPECIE	CEPA
Heterofermentativas	*L. kefir*	JCM 5818 [2] 8310, 8314, 8315, 8317, 8319, 83110, 8111, 83113, 3115, 83116, 8321, 8322, 8325, 8326, 8328, 8332, 8335, 8343, 8344, 8345, 8347, 8348[5]
	L. parakefir	JCM 8573[2] 8319, 8328[4]
	L. brevis	JCM 1059[2]
Homofermentativas	*L. plantarum*	335[4] 337[4] DMSMZ 20174[1] 8310, 8314, 8315, 8317, 8319, 83110, 83111, 83113, 3115, 83116, 8323, 8324, 8327, 8329, 83210, 8331, 8333, 8334, 8336, 8337, 8338, 8331, 8333, 8334, 8336, 8337, 8338[5]
	L. acidophilus	DSMZ 20071[1] ATCC 314[3] ATCC515[3]
	Lb. kefirgranum	JCM 8572[2]
	Lb. casei	DSMZ 20011[1]
	Lb. kefiranofaciens	JCM 6985[2]

[1] DSMZ (Deustche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen Gmbh), Germany.

[2] JCM Japan Collection of Microorganisms, Institute of Physical and Chemical Research, Japón

[3] ATCC American Type Culture Collection

[4] Martino y col.

[5] Aislados de gránulos locales de kefir, identificados por pruebas bioquímicas y perfiles de proteínas totales (Garrrote y col. 2001)

La preparación de las muestras se realizó según se indicó en la **sección 2.2.3, Capítulo 2**. Los análisis se realizaron sobre no menos de tres replicados independientes (entre 3 y 8) estudiando entre 2 y 5 replicados en cada cultivo independiente

Separadamente se realizaron experiencias para estudiar el efecto de pequeñas variaciones en la temperatura de crecimiento (± 5 °C), en el tiempo de incubación (± 5 h) y en la marca del medio de cultivo MRS utilizado (Biokar, Francia o Difco, Detroit, MI 48232, EEUU). Estos cambios fueron realizados sobre las cepas de referencia heterofermentativas en cuatro experimentos independientes.

4.2.2. Toma de los espectros y pre-tratamiento de los datos

Para realizar la toma de los espectros se siguieron las condiciones optimizadas previamente de manera que los espectros registrados superaran el test de calidad y pudieran ser compartidos por laboratorios y librerías internacionales. Del mismo modo al indicado previamente se realizó el pretratamientoo de los espectros, verificación del test de calidad (QT=1), y normalización vectorial en todo el rango espectral (**Esquema 3, sección 2.2.4, Tabla 2, Capítulo 2**)

4.3. 3 Evaluación de los datos espectrales

Todos los datos fueron sujetos a un análisis jerárquico de cluster usando el software OPUS (V.4.0 Bruker Optiks, Alemania). Se cargaron en dicho software todos los replicados de los espectros de cada uno de los organismos a diferenciar. Se superpusieron sus respectivas derivadas primeras, asignándoles a cada clase un color diferente para facilitar la visualización. Se seleccionaron las ventanas espectrales que permitieron la discriminación entre los mismos. El criterio de selección tuvo en cuenta las regiones donde las diferencias entre espectros de una misma clase eran mínimas y las diferencias entre clases resultaban máximas. Las ventanas seleccionadas fueron utilizadas como datos de entrada, en algoritmos como *Normal to reprolevel* o *coeficiente de Pearson* (*saling to first ranges*), que permitieron la construcción de una matriz de distancias espectrales **(d)** o disimilitudes **(r)** respectivamente. Con dichas matrices se construyeron los respectivos dendrogramas los cuales representan árboles filogenéticos que derivan de la clasificación taxonómica. Para ello también fueron aplicados dos algoritmos diferentes: *Av. Linkage* y el algoritmo de *Ward.*

4.3.4 Cálculo del límite de reproducibilidad (RL_2) y del valor de corte de la distancia espectral (vcd)

Previo a la utilización de los espectros para la construcción de dendrogramas y bases de datos o librerías espectrales, se analizó la variabilidad que mostraban los organismos en estudio con relación a su expresión fenotípica, aun bajo condiciones de cultivo estandarizadas. Para ello se analizaron no menos de 15 espectros replicados de cada una de las cepas en estudio. A fin de darle un valor numérico a la reproducibilidad o variabilidad, se aplicó sobre los espectros replicados de cada especie la ecuación "*Normalization to reprolevel*" del software Opus 4.0, en el rango 1200-900 cm^{-1} (caracterizada por ser la zona más variable), con la cual se obtuvo una matriz de disimilitud espectral basada en distancias espectrales. Éstas fueron luego introducidas en el algoritmo de promedios ponderados ("Average Linkage") lo cual dio origen a un dendrograma que permitió visualizar el nivel de reproducibilidad de cada especie, o varianza normal de cada cepa, denominados LR_2 (**sección 2.2.4.3, Capítulo 2**) (Helm 1991, Naumann, D. 2000). Si en un juego de replicados de una determinada cepa algún espectro o pares de espectros aparecieran como "outliers" (con un valor de $RL_2 > 25$), esos espectros sólo serían descartados si se comprueba: i) nomenclatura incorrecta, ii) origen dudoso, iii) por observación del espectro se detectara absorción de alguna impureza, como arrastre de medio de cultivo, iv) el tiempo o temperatura de incubación no fueron las estandarizadas. Si al observar los espectros o sus historias en los registros no se encontrara ninguno de estos problemas, dichos espectros NO SE DESCARTARÏAN, SINO QUE SE TOMARÏA EL VALOR DE **RL_2** OBTENIDO COMO LA VARIANZA PROPIA DE ESA CEPA (aunque supere el valor de 25) (Naumann,2000).

El cálculo del valor de corte de la distancia espectral d (**vcd**) se efectuó construyendo un dendrograma similar a los obtenidos para reproducibilidad pero más amplio, es decir incluyendo todos los replicados de las cepas en estudio. En él se midió la distancia mínima necesaria para diferenciar dos especies. Este valor de corte **vcd** permite establecer en las librerías desarrolladas la correcta identificación de un aislado de Lactobacilos a nivel de especie. Cuando la distancia espectral entre el aislado y el primer hit de la lista de posibles candidatos es mayor que el **vcd** el aislado no puede ser identificado (Kummerle y col. 1998; Oberreuter y col. 2002)

4.3.5. Construcción de librerías espectrales. Identificación

La construcción de las librerías se realizó utilizando la derivada primera de todos los espectros de las cepas de referencia (**Tabla 1**), a las cuales previamente se les confirmó su identidad por métodos bioquímicos convencionales. Con el total de espectros se construyeron dos "carpetas": una denominada **carpeta de referencia** que contenía los espectros promedios (Av.sp) de cada una las cepas de referencia, y la segunda carpeta, denominada **carpeta de testeo** contenía aproximadamente un 30 % del total de los espectros de todas las especies. Los espectros contenidos en esta carpeta, a diferencia de los de la carpeta de referencia, contienen espectros individuales, tomados al azar entre los utilizados para el cálculo de los espectros promedio.

Las librerías espectrales que permitieron la identificación de los aislamientos de *Lactobacilos* obtenidos de gránulos de kefir se construyeron cargando en el paquete IDENT del software OPUS todos los espectros promedios de las cepas de referencia contenidos en la **carpeta de referencia**. Se incorporaron al software también las ventanas espectrales previamente optimizadas para la diferenciación entre las diferentes especies de *Lactobacilos*, es decir las ventanas espectrales que permitieron la correcta discriminación de los aislados de referencia en el análisis de cluster.

4.3.6. Validación. Cálculo del nivel de certeza de la librería. Identificación de una muestra desconocida

La validación se realizó confrontando cada uno de los replicados de los espectros contenidos en la **carpeta de testeo**, de cada cepa con las que se construyó la librería, contra toda la base de datos. Para ello se cargaron de a uno los espectros de la carpeta de testeo y se identificó a través de la librería correspondiente. Se obtuvo como resultado de dicha identificación una lista de los candidatos posibles, cada uno de ellos con su correspondiente distancia espectral (**d= Hit quality**). El resultado fue considerado como una **"correcta identificación"** a nivel de especie si la distancia obtenida para esa especie fue **d < vcd**; el resultado fue considerado como **"identificación incorrecta"** cuando el primer hit de la lista correspondió a la especie testeada pero con valor de **d > vcd** o cuando el primer hit de la lista tuvo una d < vcd, pero a una especie incorrecta. El mismo procedimiento se llevó a cabo con todos los replicados contenidos en la carpeta de testeo. El nivel de certeza fue establecido haciendo **un promedio** de las "identificaciones correctas" e "incorrectas" de los resultados obtenidos con todos los espectros contenidos en la **carpeta de testeo**.

Una vez establecido el nivel de certeza fue posible efectuar una identificación de una muestra desconocida. Se consideraron los aislados de kefir como desconocidos. Así los espectros de los aislados de kefir fueron confrontados contra los espectros de toda la base de datos (cepas de referencia). La identificación se expresó mediante una lista que contiene en orden decreciente las posibles especies, denominada **hit list,** la cual le asigna a cada una de las especies candidatas un valor de distancia **d**. Cuando la primera especie de la lista tenía una distancia menor al **dvc,** entonces el aislado desconocido se identificó como perteneciente a esa especie con el % de certeza determinado previamente.

4.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.5.1. Estudios de reproducibilidad

Los espectros FT-IR de una población microbiana son influenciados por variaciones en el cultivo de la misma (tiempo de crecimiento, temperatura de incubación, etc.) la preparación de las muestras, la forma y tiempo de secado. Sin embargo todos estos factores son eliminados en la estandarización del procedimiento. Los niveles de reproducibilidad fueron evaluados para las múltiples experiencias independientes realizadas con cada una de las cepas estudiadas. Los replicados (entre 15 y 30) de las medidas provenientes de colonias de cultivos puros independientes de cada cepa fueron inicialmente sometidas al pre-tratamiento correspondiente (derivadas, normalizadas vectorialmente, control de calidad). Los espectros que superaron el control de calidad fueron utilizados para el cálculo de la **varianza normal de cada cepa**. Para esto se tomaron los replicados, se calculó mediante el algoritmo *Normalization to reprolevel* las disimilitudes entre los mismos en la ventana 1200 - 900 cm^{-1} y se construyó un dendrograma mediante la técnica de *Average Linkage* (Bruker Optics 1993; Helm y col. 1991b). En general para todas las cepas, en estudio se obtuvieron niveles de fusión bajos (**LR_2**< 25). La **Fig. 1** muestra, a modo de ejemplo, la reproducibilidad encontrada en 3 aislamientos de Lactobacilos de kefir (8345, 8347 y 8344). Para la mayoría de las cepas la reproducibilidad obtenida fue semejante a los ejemplos indicados en esta figura. Sólo en algunos casos los replicados quedaron divididos en dos clustres, como los indicados en la **Fig. 2.** Para los replicados de *L. kefir* de la cepa de referencia, el clusters de la varianza de la distancia espectral mostró los espectros divididos en tres grupos pero la

Fig. 1 Estudio de Reproducibilidad para tres aislamientos de gránulos de kefir

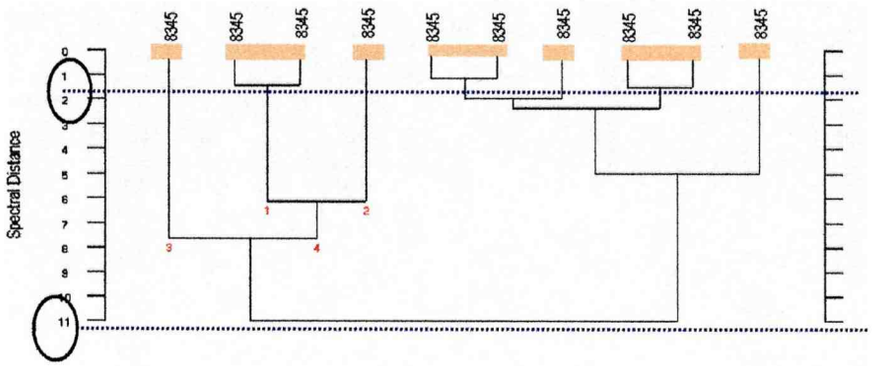
Indica una experiencia independiente

Los espectros que superaron el control de calidad fueron utilizados para calcular la varianza normal de cada cepa.

Sobre los replicados se aplicó el algoritmo *Normalization to reprolevel* para el cálculo de las disimilitudes entre los mismos en la ventana 1200 - 900 cm^{-1}

Se construyó un dendrograma mediante la técnica del *Average Linkage* que permitió, a través del dendrograma obtenido visualizar el nivel de reproducibilidad entre replicados de una misma experiencia y replicados de experiencias diferentes (independientes), denominados LR_1 y LR_2 respectivamente.

aislamiento 8345

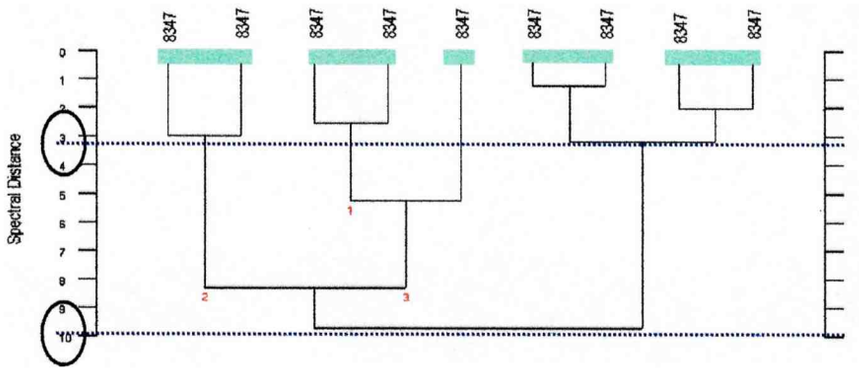


7 replicados independientes

$RL_1 < 2$

$RL_2 < 11$

aislamiento 8347

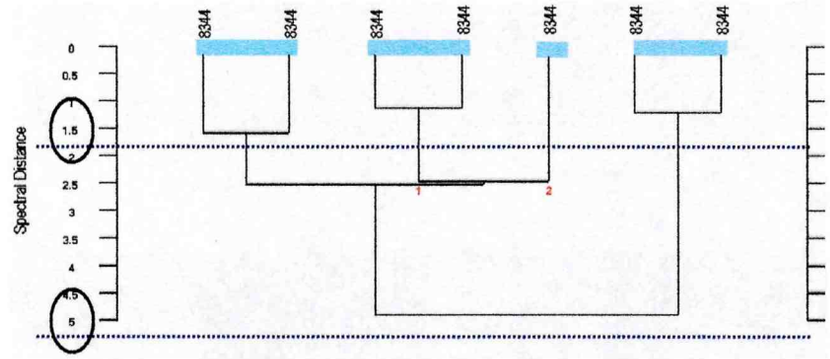


5 replicados independientes

$RL_1 < 3$

$RL_2 < 10$

aislamiento 8344



5 replicados independientes

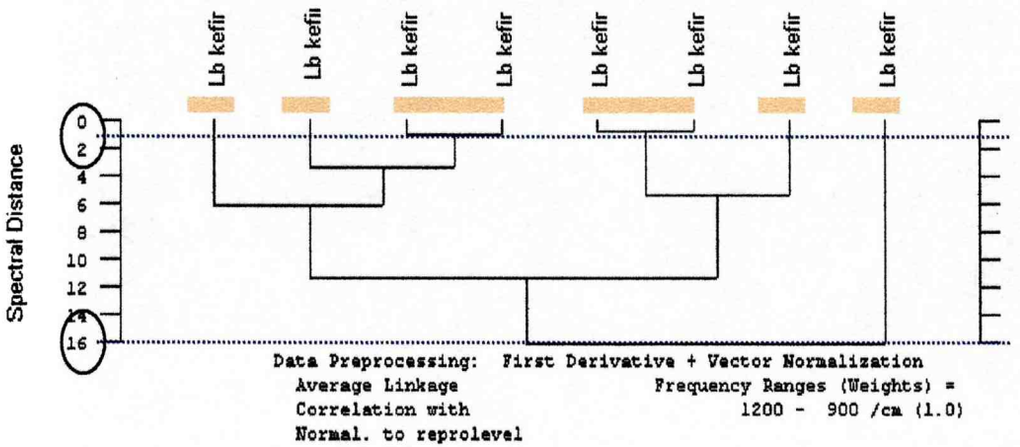
$RL_1 < 1, 5$

$RL_2 < 5$

Fig. 2 Estudio de Reproducibilidad eliminación de "outliers"

Cepa de referencia *L. kefir*

Indica una experiencia independiente



$RL_1 < 2$

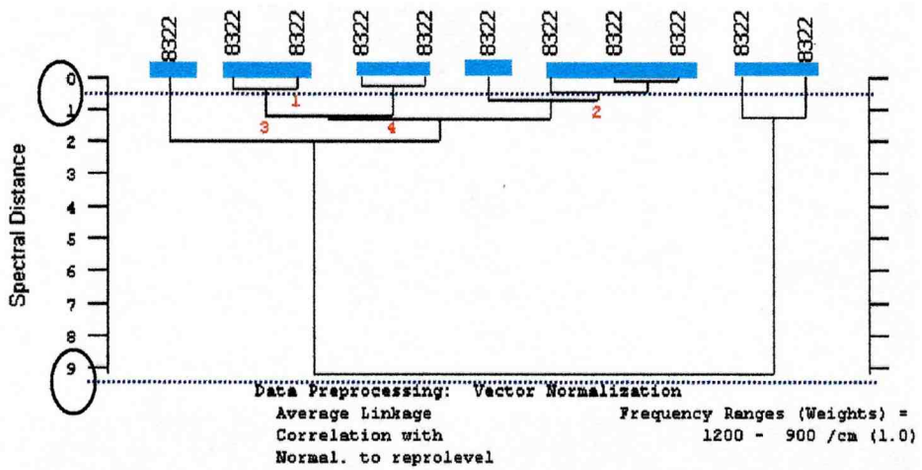
$RL_2 < 16$

6 replicados independientes

Uno de los replicados independientes está más separados, pero a una distancia espectral < 25

NO SE DESCARTÓ NINGÚN REPLICADO

aislamiento 8322



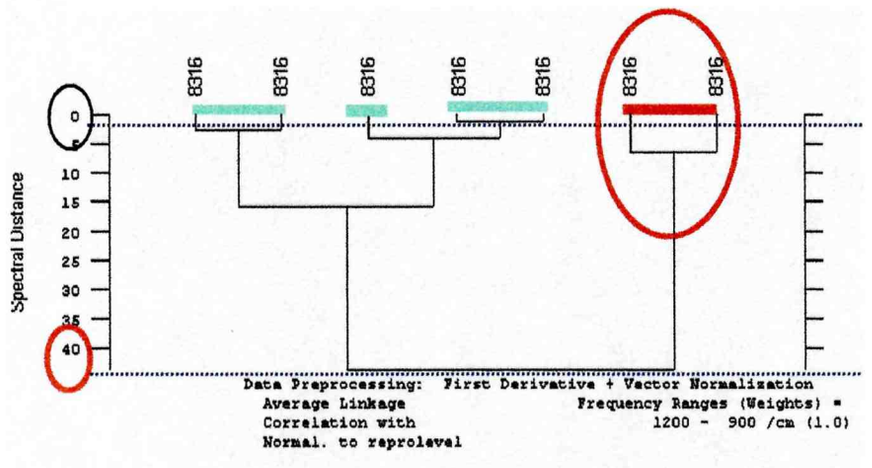
6 replicados independientes

$RL_1 < 0.5$; $RL_2 < 9$

Dos replicados de una misma experiencia están más separados, pero a una distancia espectral < 25

NO SE DESCARTÓ NINGÚN REPLICADO

aislamiento 8316



4 replicados independientes

$RL_1 < 0, 5$

$RL_2 > 40$

Dos replicados de una misma experiencia están más separados, pero a una distancia espectral > 25

SE DESCARARON AMBOS REPLICADOS

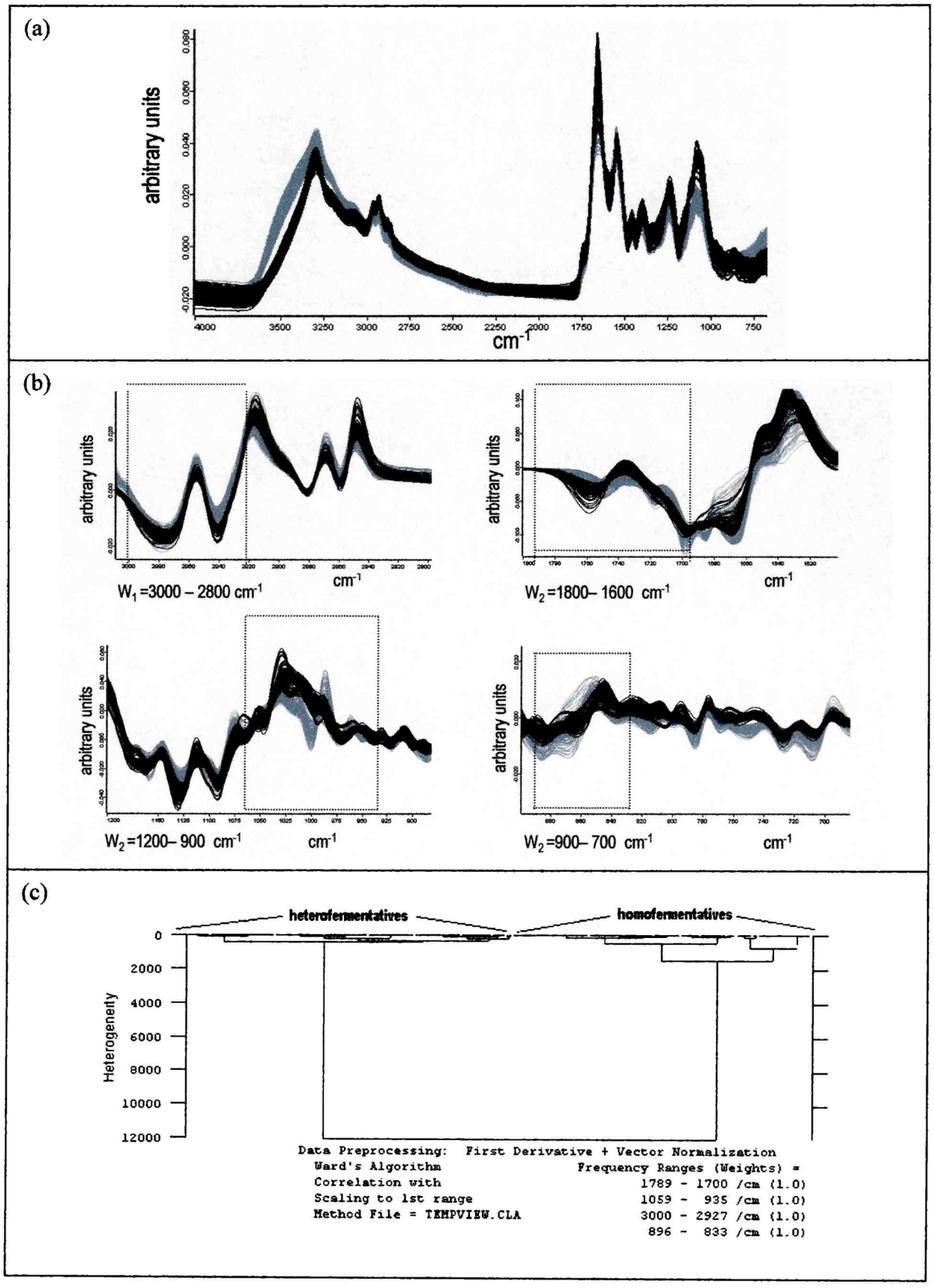
distancia espectral entre ellos fue menor a 16. Lo mismo ocurrió para el caso de la cepa 8322 en la que los espectros correspondientes a uno de los replicados independientes parecieran comportarse como "ourlier", sin embargo los mismos fueron incluidos en el análisis ya que la distancia espectral fue < 25. No así con los espectros de la cepa 8316 indicados con un círculo rojo, que debieron ser descartados del análisis ya que ambos replicados correspondieron a un mismo experimento independiente y se pudo demostrar que este comportamiento se debió a la presencia de señales adicionales en el espectro que correspondían al medio de cultivo que seguramente había sido arrastrado en la toma de muestra. **El mismo análisis se realizó con los espectros correspondientes a los 43 aislamientos y las cepas de referencias utilizadas.**

4.5.2 Espectros FT-IR A/T de Lactobacilos aislados de gránulos de kefir

En la **Fig. 3a** se muestran cerca de 300 espectros de absorción adquiridos de las cepas de referencia y los 43 aislamientos de *Lactobacillus* obtenidos de los 4 gránulos de kefir indicados en la **Tabla 1**. Los espectros mostraron dos tipos de contornos claramente distinguibles los cuales correspondieron a los organismos homofermentativos y heterofermentativos. Estas diferencias se hicieron más importantes cuando se aplicó uno de los métodos de aumento de resolución espectral como la derivada 1ra. Del espectro total (4000–650 cm^{-1}) las principales diferencias entre homo y heterofermentativos pudieron ser observadas en cuatro ventanas espectrales (**Fig. 3b**):

La región 3000-2800 cm^{-1} (W_1), dominada por el estiramiento -C-H característico de ácidos grasos y membranas debido a la presencia de los grupos $-CH_3$ y $>CH_2$; la ventana 1800-1600 cm^{-1} (W_2) que incluye las regiones características de ésteres y Amida I; la región 1200-900 cm^{-1} (W_3) conocida como la región polisacarídica y la región 900-700 cm^{-1} (W_4), que constituye la zona del verdadero *fringerprint* "true fingerprint region" (estas ventanas fueron descriptas detalladamente en la introducción). Se seleccionaron 4 sub-rangos, dentro de estas ventanas considerados como los que contribuían de manera más representativa al agrupamiento de los espectros en dos clusters bien distintivos. La información contenida en estas 4 ventanas espectrales (tomadas todas con un peso igual a 1) fue utilizada como entrada para el cálculo de las distancias espectrales y posterior análisis de cluster. El dendrograma obtenido muestra los dos clusters bien diferenciados (heterogeneidad mayor a 12.000) que claramente dividen los espectros correspondientes a organismos homo de los heterofermentativos (**Fig. 3c**). Por lo tanto a través de la

Fig. 3 Diferenciación de aislamientos heterofermentativos y homofermentativos



espectroscopía FT-IR fue posible evidenciar un número de características espectrales diferentes significativas entre ambos tipos de *Lactobacillus* que permitieron la separación de los espectros de los organismos en estudio en dos clusters bien distinguibles.

Basándonos en estos resultados, se decidió aplicar un sistema de clasificación jerárquica para la diferenciación e identificación de bacterias aisladas de gránulos de kefir tomando la diferenciación entre aislamientos correspondientes a organismos homofermentativos y heterofermentativos en un primer nivel dentro del esquema de clasificación. Es importante resaltar que una estrategia similar debió ser empleada para diferenciar estas dos poblaciones cuando se aplicaron los métodos bioquímicos (Garrote y col. 2001). Los autores encontraron que los dendrogramas que permitieron la identificación de los aislamientos sólo podían ser construidos si realizaban una previa diferenciación entre en organismos hetero y homofermentativos.

4.5.3 Diferenciación entre especies de Lactobacilos heteroferrmentativos

Para evaluar la capacidad de la espectroscopía IR para diferenciar *Lactobacillus* heterofermentativos a nivel de especie, comenzamos a estudiar si las diferencias en la expresión fenotípica mostrada por cepas de referencia correspondientes a diferentes especies, eran capaces de ser distinguibles mediante FT-IR. Se analizó el comportamiento de diversas especies de *Lactobacillus* descriptas por otros autores como características de gránulos de kefir (**Tabla 1**) (Angulo y col. 1993; Takizawa y col. 1994; Takizawa y col. 1998).

En una primera etapa de los experimentos todas las medidas fueron realizadas bajo estrictas condiciones estandarizadas, como se describe en materiales y métodos. Fueron analizados sólo los espectros registrados para bacterias crecidas utilizando el medio MRS Biokard, a la misma temperatura (30 ± 2 °C) y durante el mismo lapso de tiempo de incubación (72 ± 2 h). La **Fig. 4** muestra un análisis de los espectros y las correspondientes derivadas 1^{ras} normalizadas vectorialmente en todo en todo el rango espectral. Se analizó el *pattern*, tratando de encontrar las regiones que contuvieran la máxima discriminación, es decir donde la variación entre los replicados de cada especie fuera mínima y la diferencia entre las diferentes especies fuera máxima. De este modo se pudieron seleccionar 4 ventanas espectrales diferentes (todas de peso =1) (1780-1720,

500-1200, 2950-2930 y 900-700 cm^{-1}), que contribuían a la máxima separación entre las especies.

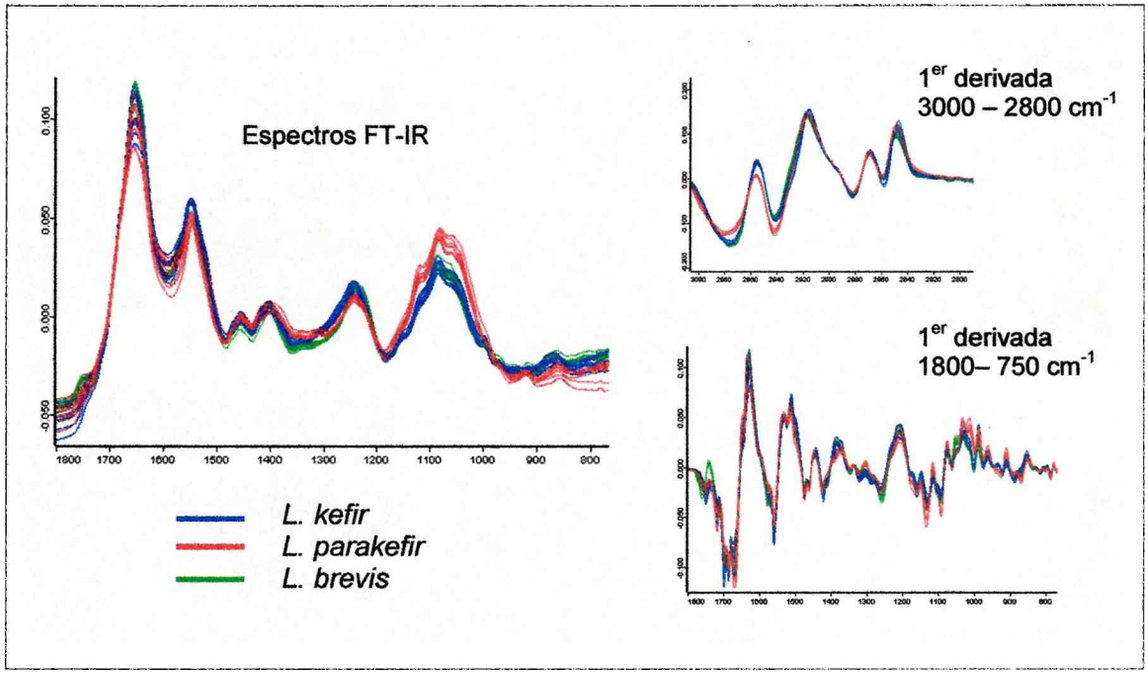
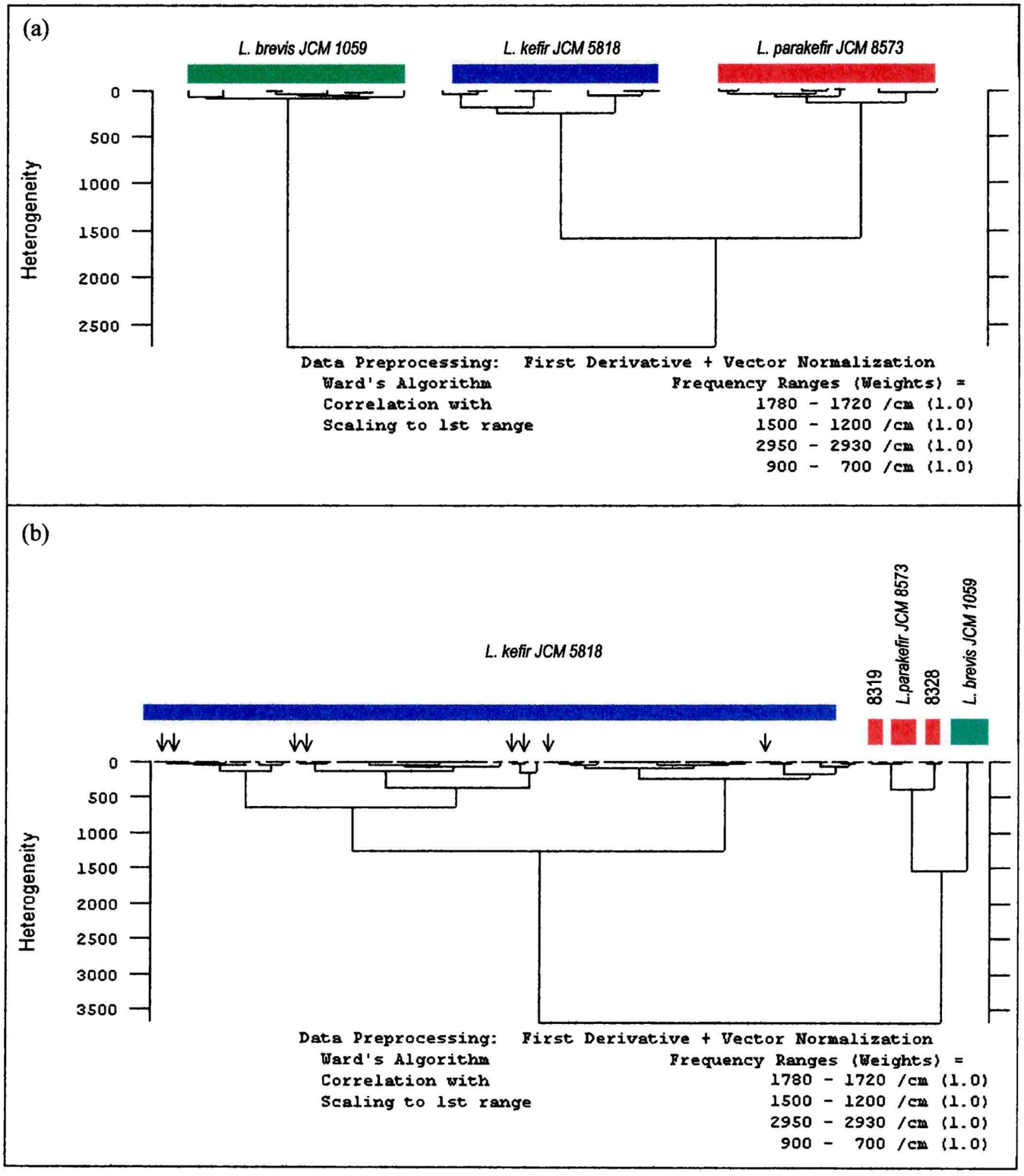


Fig. 4 Espectros FT-IR (a) y derivadas primeras (b y c) de las cepas de referencia de Lactobacilos heterofermentativos

El dendrograma obtenido aplicando el algoritmo de Ward en estas ventanas espectrales (**Fig. 5a**) mostró que los espectros de *L. brevis* se agruparon separados de los de *L. kefir* y *L. parakefir*. Esto está de acuerdo a las características principalmente de pared descritas para estas tres especies de *Lactobacillus* .

Una vez obtenido el modelo que permitió la separación de las cepas de referencia se incluyeron en el mismo análisis los espectros correspondientes a los aislamientos de los Lactobacilos heterofermentativos provenientes de los gránulos de kefir. La **Fig. 5b** muestra el análisis de cluster que incluyó tanto las cepas de referencia como los aislamientos de kefir. Tal como se observa en la figura, donde se indica con flechas los espectros correspondientes a las cepas de referencia, todos los espectros fueron agrupados con la

Fig. 5 Diferenciación de Lactobacillus heterformentativos

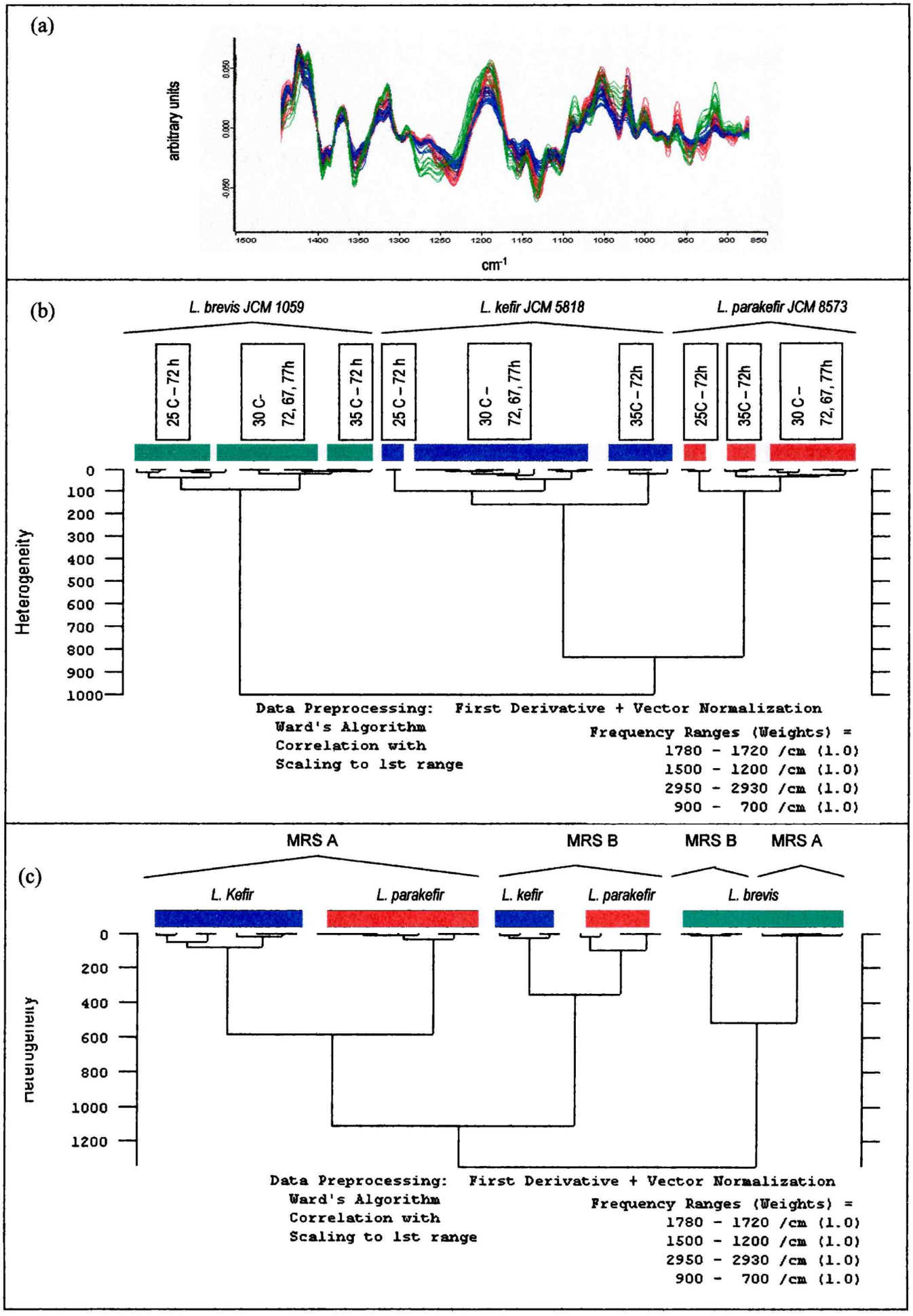


cepa de referencia de *L. kefir*. Sólo dos aislados (CIDCA 8319 y 8328) agruparon con los espectros correspondientes a la cepa de referencia *L. parakefir*. Los análisis previos realizados sobre la base de fermentación de azúcares y perfil de proteínas totales (Garrote y col. 2001) identificaron del mismo modo, 20 Lactobacilos heterofermentative como *L. kefir* y dos mismos aislados como *L.. parakefir*

4.5.4 Efecto de la variación de las condiciones de cultivo en la identificación de lactobacilos heterofermentativos

Debido a que la composición celular depende de las condiciones de cultivo, la importancia de la utilización de procedimientos altamente estandarizados cuando se aplican las técnicas de espectroscopía vibracional en la caracterización, diferenciación e identificación de microorganismos (Helm y col. 1991a; Oust y col. 2004a; van der Mei y col. 1993) ha sido ampliamente estudiada. La robustez del modelo de FT-IR desarrollado en este trabajo para la diferenciación a nivel de especie fue evaluada estudiando pequeñas variaciones en las condiciones de cultivo. A pesar que en un proceso de identificación todos los parámetros de estandarización deben ser cuidadosamente ajustados en todas las muestras, la heterogeneidad debida a cambios involuntarios en las condiciones de cultivo muchas veces no pueden ser totalmente eliminados. Se evaluaron los cambios que se producen en el espectro FT-IR de las tres cepas de referencia, como consecuencia de variaciones en la temperatura de incubación (25, 30 y 35 °C) y el tiempo de incubación (67, 72 y 77 h). La **Fig. 6a** muestra la primera derivada de los espectros de las cepas de referencia crecidas a diferentes tiempos y temperaturas de cultivos en la ventana 1500–850 cm^{-1}, donde se observaron los cambios más importantes en el fenotipo de otros organismos. Es importante notar que esta región espectral también fue utilizada en reportes previos para estudiar la reproducibilidad y diferenciación de *lactobacillus* homofermentativos (Oust y col. 2004a; Oust y col. 2004b) and 2004b). El *pattern* espectral de la 1ra derivada mostró para cada una de las especies estudiadas diferente grado de heterogeneidad espectral bajo las diferentes condiciones de cultivo. De hecho, la expresión fenotípica de las especies *L. kefir* y *L. parakefir* fueron más afectadas cuando se varió el tiempo y la temperatura. Sin embargo, cuando se aplicó un análisis de cluster en las ventanas utilizadas para la diferenciación de *Lactobacillus*, (1780-1720, 1500-1200, 2950-2930 y 900-700 cm^{-1}), a pesar de que cada especie fue agrupada de acuerdo a la temperatura de cultivo, las mismas fueron correctamente agrupadas y las especies correctamente diferenciadas (**Fig. 6b**). Estos resultados están de acuerdo a resultados

Fig. 6 Efecto de las condiciones de cultivo en la diferenciación de *Lactobacillus* heterofermentativos a nivel de especie.



previos obtenidos para la clasificación de Lactobacilos homofermentativos (Oust y col. 2004a) en los cuales se ha demostrado que pequeñas variaciones en el tiempo y temperatura de cultivo, si bien producen una disminución de la reproducibilidad de los espectros FT-IR, no afectan la diferenciación entre los lactobacilos heterofermentativos ensayados a nivel de especie. De modo que el modelo desarrollado para la diferenciación de Lactobacilos puede ser aplicado como un método potencial para la rápida identificación de Lactobacilos heterofermentativos de gránulos de kefir a nivel de especie y es suficientemente robusto contra pequeños cambios en el tiempo y la temperatura de cultivo. En contraste con estos resultados la separación entre especies heterofermentativas se ve afectada cuando las cepas de referencia fueron cultivadas en medios de cultivo de diferente marca (Difco o Biokar). Cuando se aplicó el AC a las derivadas primeras de las cepas de referencia en las ventanas optimizadas para la diferenciación de Lactobacilos heterofermentativos, se observó que todos los espectros *L. brevis* se agruparon independientemente de la marca de medio de cultivo utilizado, sin embargo *L. kefir* and *L. parakefir* no pudieron ser diferenciados (**Fig. 6c**). Los cambios producidos en la expresión fenotípica de estas dos especies fue tan significativa que sus espectros se agruparon principalmente de acuerdo al medio de cultivo en el cual fueron crecidos y no de acuerdo a la especie. La susceptibilidad de FT-IR frente a los cambios en la marca del medio de cultivo utilizado fue ensayada previamente en *Lactobacilli* homofermentativos (*L. sakei*, *L. plantarum* y *L. curvatus*) (Oust y col. 2004a), en diferentes cepas de *Listeria monocytogenes* strains (Lefter y col. 1997) y en *Streptococci* orales también a nivel de cepa (van der Mei y col. 1996). A diferencia de esos estudios que mostraron que el cultivo de los microorganismos en los diferentes tipos o marcas de medio de cultivo eran mínimas o prácticamente nulas, nuestros datos mostraron que la marca del medio de cultivo utilizado afecta significativamente la diferenciación de *Lactobacillus* heterofermentativos en particular aquellos que por FT-IR fueron diferenciados por una distancia espectral pequeña (*L. kefir* y *L.. parakefir*).

4.5.5 Diferenciación de especies de Lactobacilos homofermentativos

Al igual que lo realizado con los *Lactobacillus* hetrofermentativos, se estudió la capacidad de la espectroscopía FT-IR para diferenciar e identificar las especies de *Lactobacillus* homofermentativos presentes en gránulos de kefir. Para ellos se analizaron las derivadas primeras de los espectros de las cepas de referencia mencionadas en la **Tabla**

1. Estas especies fueron seleccionadas como se mencionó, teniendo en cuenta los organismos previamente encontradas en otros gránulos de kefir (Angulo y col. 1993; Marshall y col. 1984; Angulo, 1993; Marshal, 1993; **Takisawa, 1998).** Se estudió el perfil de las derivadas primeras de los correspondientes espectros en todo rango espectral (4000 – 760 cm^{-1}). Dentro de este rango se encontraron sub-regiones donde se observaron las diferencias más importantes entre las especies (**Fig. 7**).

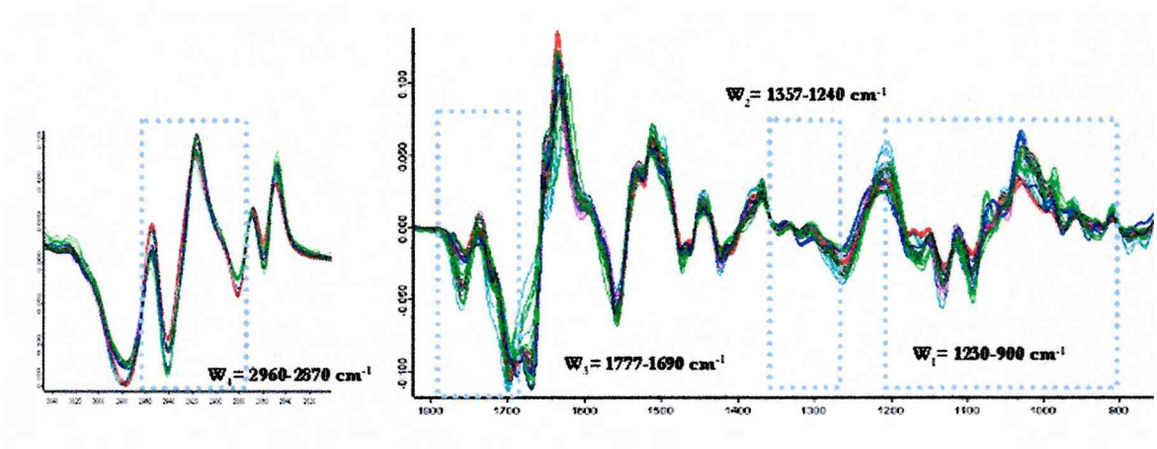


Fig. 7 Derivada primera de espectros FT-IR de las cepas de referencia de lactobacilos homofermentativos, indicando las ventanas espectrales que contribuyen a la diferenciación entre las especies.

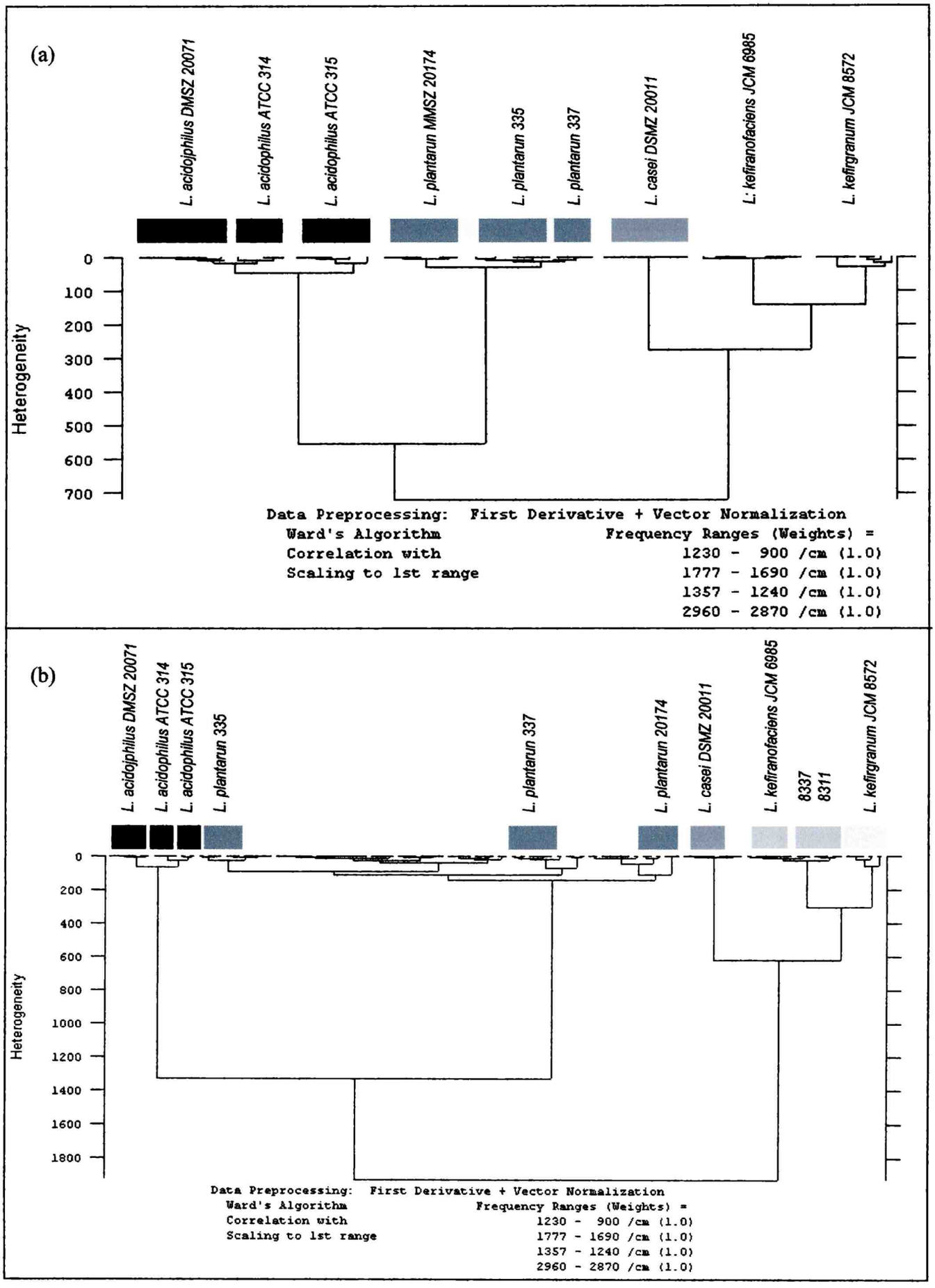
La ventana 1200-900 cm^{-1}, asignada la las vibraciones de carbohidratos, y la ventana de esteres lipídicos (1800 – 1700 cm^{-1}), caracterizadas por la absorción del grupo funcional C=O, fueron las regiones espectrales donde se encontraron las máximas diferencias entre las especies en estudio. Adicionalmente la región típicamente asignada a lípidos y la conocida como "región mixta" (3000-2800 y 1500-1200 cm^{-1}) si bien muestran diferencias diferenciación entre las especies mencionadas, tuvieron menos peso en la separación entre estas especies. En base a estas ventanas seleccionadas se desarrolló un modelo de diferenciación para estas bacterias homofermentativas calculando en cuatro regiones espectrales, 1230-900, 1777-1690, 1357-1240 y 2960-2870 cm^{-1}, el coeficiente de correlación de Pearson y el algoritmo de Ward (**Fig. 8a**). Con este modelo se obtuvieron dos grandes clusters. Uno contiene las tres cepas de *L. plantarum* y las tres de *L. acidophilus* y el otro cluster agrupa *L. casei, L. kefirgranum* y *L. kefiranofaciens.* Estas dos últimas especies se encuentran separadas por una pequeña distancia espectral, lo que es

consistente con el hecho que *L. kefirgranum* ha sido recientemente reclasificado como una subespecie de *L kefiranofaciens* (Vancanney. 2004). Es importante resaltar que las tres cepas de *L. acidophilus* y las *tres de L. plantarum* ensayadas en este trabajo fueron diferenciadas pero clasificadas en sus clusters respectivos.

Cuando los 22 aislamientos de Lactobacilos homofermentativos aislados de gránulos locales de kefir fueron testeados en el modelo desarrollado, los aislados 8337 y 8311, fueron agrupados en el cluster de *L. kefiranofaciens*, mientras que los otros aislados fueron agrupados con *L. plantarum*, (**Fig. 8b**). Respecto al dendrograma obtenido por métodos bioquímicos y perfil de proteínas éste agrupó todos los aislados homofermentativos de kefir con *L. plantarum*, obteniendo para los aislamientos 8337 y 8311 los mayores % de disimilitud.

El grupo de investigación en espectroscopía infrarroja del Robert Koch Institute de Berlín, Alemania (Curk y col, 1994), en sus inicios y el grupo de Normandía han aplicado técnicas de identificación de *Lactobacillus* basados en espectroscopía FT-IR combinada con análisis multivariante. Respecto a este último grupo C. Amiel y L. Mariey han dedicado los últimos 5 años al desarrollo de métodos de clasificación de Lactobacillus, basados en FT-IR. En el año 2000 publicaron sus primeros estudios en la diferenciación de bacterias ácido lácticas como *Lactobacillus*, *Lactococcus*, y otros (Amiel y col. 2000). Posteriormente dedicaron sus investigaciones a la diferenciación de *Lactobacillus* homofermentativos como *L. paracasei, L. casei , L. zeae y L. rhamnousus* (Amiel y col. 2001). Para estas especies la región espectral que fue encontrada como relevante para su discriminación y diferenciación fue la ventana 1400 – 720 cm^{-1}. En nuestros estudios sin embargo, fueron cuatro las ventanas halladas como críticas para establecer la diferenciación de las 5 especies de Lactobacilos homofermentativos mencionadas en la **Tabla 1** y las mismas se encontraron distribuidas a lo largo del todo el rango espectral (**Fig. 7**). Otro grupo importante que ha comenzado recientemente estudios de clasificación de *Lactobacillus* homofermentativos, en particular es el de Astrid Oust y Achmin Kohler , en Noruega, desde el año 2003 dedican sus investigaciones a la identificación de lactobacilos aislados en particular de carnes y embutidos. Oust y colaboradores desarrollaron una técnica de identificación sumamente robusta basada en la combinación de FT-IR y regresión de cuadrados mínimos parciales (Partial Least Squeares, PLSR) que consiste en una técnica multivariante supervisada que permite la identificación de tres *Lactobacillus* muy relacionados como son el *L. sakei, L. curvatus* y *L. planturum* a nivel de especie (Oust y col. 2004a; Oust y col. 2004b). También ensayaron en los trabajos

Fig. 8 Diferenciación de *Lactobacillus* homofermentativos



otro tipo de técnica multivariante como es el análisis de cluster y el método SIMCA (soft independent modelling of class analogy) y KNN (k-nearest neighbour). Confrontaron con estos métodos las mismas especies mencionadas anteriormente y demostraron que dichos métodos permitían una correcta identificación a nivel de especie. Nosotros encontramos, sin embargo que para la diferenciación de las especies presentes en los gránulos de kefir la combinación de dos técnicas muy sencillas y disponibles en el software del Bruker (OPUS 4.0) como son el coeficiente de Pearson (*scaling to first range*) y el algoritmo de Ward eran eficientes para la diferenciación de las mismas.

4.5.6. Construcción de librerías basadas en el análisis de cluster

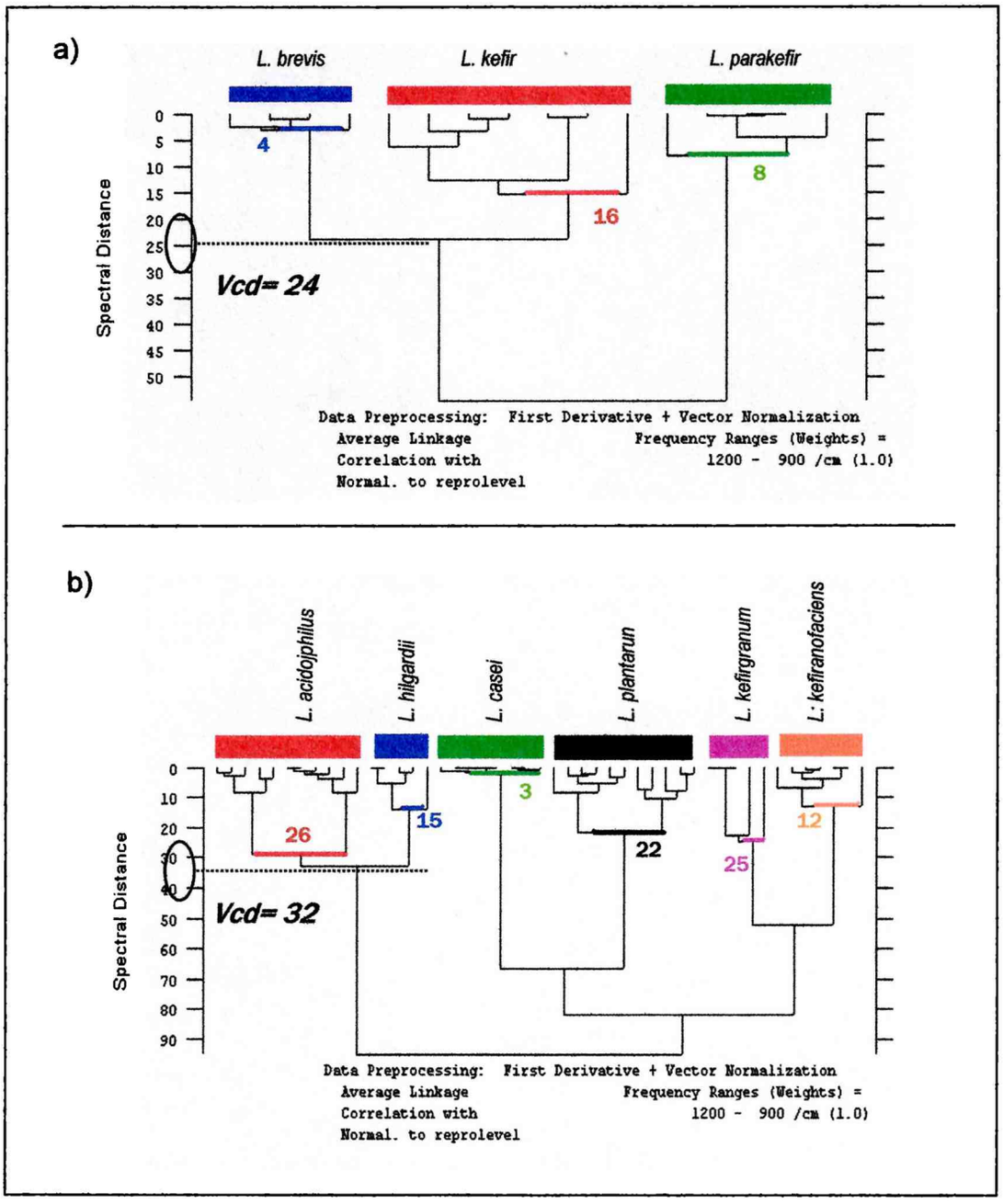
Habiendo establecido que la espectroscopía IR permite la diferenciación de las diferentes especies de *Lactobacilos* se construyeron dos librerías espectrales, una para la identificación de *Lactobacillus* heterofermentativos y otra para la identificación de homofermentativos. Ambas librerías o base de datos espectrales permitieron la identificación de aislados obtenidos de gránulos de kefir con la correspondiente determinación de su grado de certeza. Es decir a diferencia del análisis de cluster, **la librería permite darle un peso estadístico a la identificación**

4.5.6.1 Cálculo de la distancia espectral de corte (vcd) para Lactobacilos hetero y homofermentativas

La **Fig. 9** muestra el dendrograma obtenido para *Lactobacilli* hetero y homofermentativos que permite el cálculo de la distancia de valor de corte (**vcd**). La figura indica para cada caso la reproducibilidad obtenida dentro de cada especie y la distancia mínima necesaria para diferenciar dos especies. En el caso de las heterofermentativas corresponde al valor de distancia necesario para diferenciar *L. kefir* de *L. brevis*, y toma un valor de **vdc = 24 (Fig. 9a)**. Para el caso de las homofermentativas se indica la distancia mínima para distinguir las diferentes cepas y la distancia de valor de corte **vcd = 32 (Fig. 9b).** Estos valores fueron utilizados en las correspondientes librerías para realizar la validación de las mismas y la identificación de un aislado desconocido de "correcta identificación" (Kummerle y col. 1998; Oberreuter y col. 2002)

4.5.6.2. Desarrollo de librerías espectrales para Lactobacilos hetrofermentativos y homofermentativos.

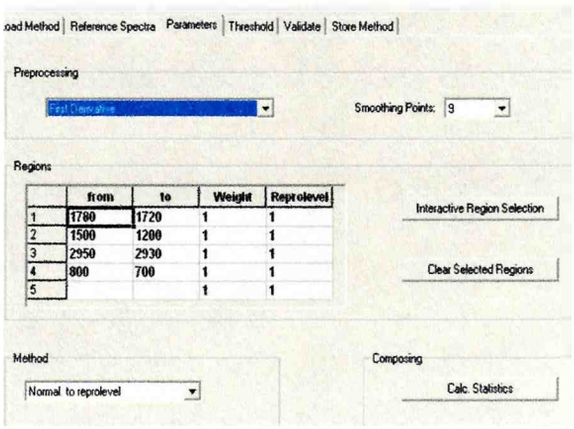
Fig. 9 Cálculo de la distancia de valor de corte (**vcd**) para (a) lactobacilos heterofermentativos, **vdc= 24** y (b) homofermentativos, **vcd=32.**



i. Construcción

La **Fig. 10** muestra las ventanas del paquete IDENT del software OPUS, que fueron cargadas con los diferentes parámetros para ambas librerías. Las operaciones indicadas en la figura fueron ejecutadas y así las bases de datos quedaron establecidas y preparadas para admitir el ingreso de cualquier nueva especie que se desee adicionar. Sin embargo es importante resaltar que antes de adicionar cualquier especie o cepa a la librería es necesario realizar un minucioso control sobre la identificación de los organismos ingresados a la base de datos. En particular para obtener la mayor certeza se recomienda que dicha identificación sea realizada en base a criterios de biología molecular.

Librería de *Lactobacilli* heterofermentativos



Librería de *Lactobacilli* homofermentativos

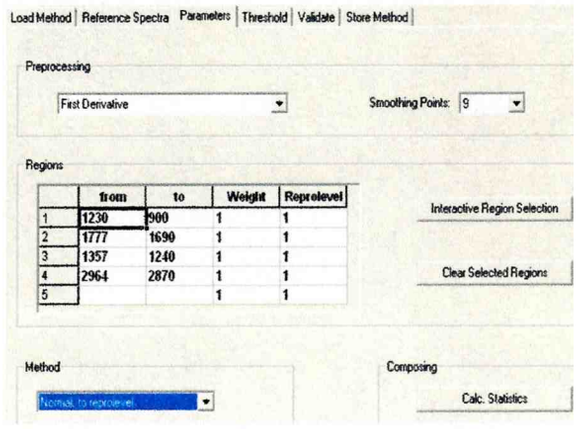


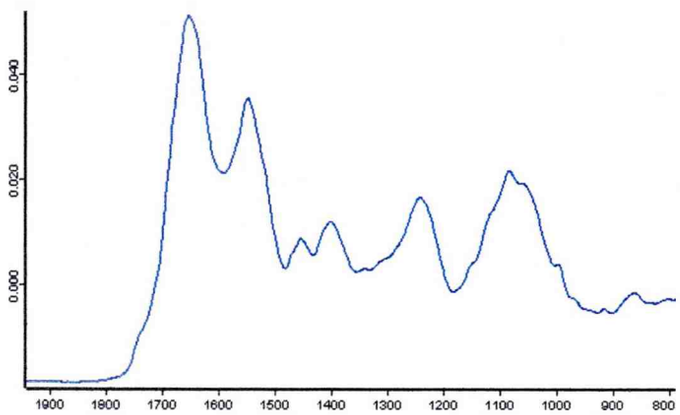
Fig. 10 Parámetros ingresados para la construcción de las librerías espectrales

ii. Validación interna

Se desafiaron ambas bases de datos con sus respectivas **carpetas de testeo**, conteniendo 15 espectros en el caso de las heteroferementativas y 50 en el caso de las homofermentativas. A modo de ejemplo la **Fig. 11** muestra el resultado de la validación obtenida con uno de los espectros replicados de la cepa de referencia *L. kefir JCM* 5818 en su correspondiente librería de *Lactobacilli* heterofermentativos. La tabla mostrada en dicha figura contiene en una columna enumerados en orden decreciente (de 1 a 3) los posibles candidatos (posibles especies) para ese espectro que está siendo testeado; en otra columna el valor de **la distancia espectral** calculado para cada una de las especies. Se observa que el primer candidato corresponde a *L. kefir* con una distancia de 7.83. Por ser este valor **menor al vdc** calculado previamente, se puede afirmar que se trata de una

identificación correcta. El mismo procedimiento se realizó con los 14 espectros restantes contenidos en la carpeta de testeo. Los resultados obtenidos arrojaron para la librería de *Lactobacilos* heterofermentativos un **93.3 % de certeza** (1 errado en 15 testeados) El mismo procedimiento se realizó con la librería de homofermentativos. Se desafiaron los 50 espectros de la carpeta de testeo contra la librería y se obtuvieron 48 identificaciones correctas, lo que arroja un % de **certeza para esta librería de un 96%.**

Los valores de % de correcta identificación pueden ser mejorados cuanto mayor número de cepas se incluyan de cada especie. Se ha definido una regla de oro para este tipo de identificación: *"cuanto mayor número de cepas de cada especie, la identificación a nivel de especie tendrá un mayor % de certeza" (Oberreuter y col., 2002).*



Hit No.	Hit Quality	Group
1	7.839878	L. kefir
2	95.683979	L. parakefir
3	236.425821	L. brevis

Fig. 11 Validación interna. Validación obtenida con uno de los espectros replicados de la cepa de referencia *L. kefir* 5818 en la librería de *Lactobacillus* heterofermentativos.

iii. Validación externa

El potencial de estas librerías pudo ser testeado confrontándolas con los espectros obtenidos de los 45 aislamientos de gránulos de kefir, que no fueron utilizados en la construcción de las respectivas librerías y además sus respectivas identidades habían sido determinadas previamente por métodos bioquímicos convencionales.

Los espectros obtenidos de los aislamientos de gránulos de kefir fueron primeramente diferenciados en homo y heterofermentativos aplicando el modelo descrito en la **Fig. 3** para luego ser desafiados contra la librería correspondiente. Para cada uno de ellos se obtuvo una tabla similar a la presentada en la validación interna que indicaba: el ***Hit list***

que correspondió un orden decreciente del candidato más probable (nº1, implica que es la especie más probable y el nº 3 la menos probable), luego el **Hit quality** que corresponde a la distancia espectral d, y por último la columna **Group** de la tabla correspondía a la especie asignada para ese espectro. Los 5 primeros ejemplos fueron correctamente identificados con 93.3 % de certeza, ya que el primer candidato de la lista (hit list) tuvo un valor menor a la distancia espectral de corte (**< dvc 24**). El último ejemplo fue **la única identificación incorrecta de los aislados de kefir obtenida por parte de la librería**, por tener una distancia de corte sumamente elevada (> 24), por lo que no pudo ser identificado mediante este procedimiento. Para el resto de los aislados obtenidos de los gránulos de kefir la identificación bioquímica coincidió con la de correspondiente librería. Como era de esperar la librería identificó los aislados 8337 y 8311 como *L.. kefiranofaciens.*

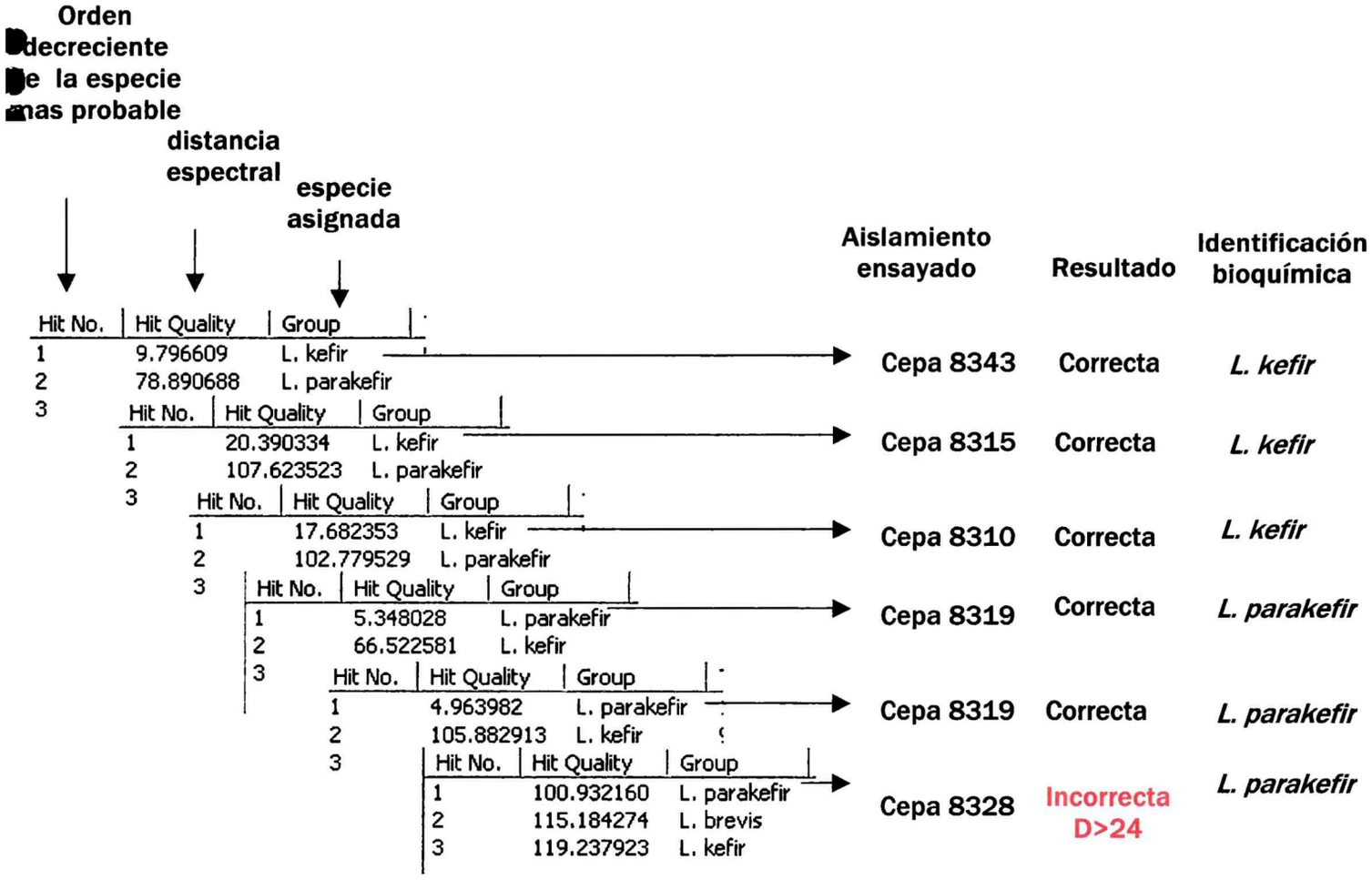


Fig. 12 Validación externa. Resultados de identificación obtenidos para 6 aislamientos de *Lactobacillus* heterofermentativos de gránulos de kefir identificados por métodos bioquímicos convencionales.

Las ventajas que presenta la identificación a través de las librerías respecto a los dendrogramas es que en primer lugar las librerías permiten expresar los resultado con **un grado de certeza**, mientras que los **dendrogramas carecen de estadística**. En segundo lugar resulta muy sencillo el agregado de nuevas especies a estas bases de datos, lo cual permite una actualización permanente.

Respecto a la identificación por métodos bioquímicos, uno de **los principales aspectos** que deben considerarse es que, aplicando la metodología desarrollada, la identificación de un aislado desconocido puede realizarse en **menos de 3 horas de obtenido el cultivo**. Este tiempo total de identificación fue calculado teniendo en cuenta:

15 minutos para la preparación de la muestra

1 hora de secado

1 hora (máximo) hasta establecer una corriente de aire seco en la cámara de lectura

15 minutos de lectura y pre-procesamiento del espectro obtenido

2, 5 horas para obtener un resultado con 96 a 99 % de certeza

Desde el punto de vista económico también es posible estimar el costo por análisis de la identificación por FT-IR, aun amortizando el valor del equipamiento y las celdas, y el medio de cultivo no da más de $ 8. Este valor es mucho menor al que puede resultar una identificación bioquímica, que además del API puede requerir el ensayo de 3 a 5 enzimas y también resulta menor o similar al obtenido para una identificación por biología molecular.

De modo que los métodos basados en espectroscopía FT-IR, constituyen una alternativa rápida, económica y sencilla respecto a los métodos convencionales. La identificación de los aislados está solamente limitada por calidad de la base de datos, la cual puede ser permanentemente mejorada mediante el agregado de mayor número de especies y cepas dentro de cada especie.

4.6 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

1. En primer lugar podemos concluir que el esquema de clasificación e identificación propuesto para los aislamientos provenientes de gránulos de kefir por espectroscopía FT-IR fue comparable al esquema de clasificación obtenido por Garrote y colaboradores aplicando métodos bioquímicos y proteínas totales (Garrote y col. 2001). Es interesante notar cómo las dos metodologías fenotípicas (FT-IR y métodos bioquímicos) requieren una previa diferenciación entre Lactobacilos homo y heterofermentativos.

2. Diferentes especies de *Lactobacillus* fueron aisladas de alimentos como cervezas, quesos blandos, carne, embutidos, caracterizadas e identificadas por la combinación de FT-IR con diferentes métodos estadísticos multivariantes. En este trabajo nosotros demostramos que estas metodologías también constituyen una herramienta para la diferenciación e identificación de *Lactobacillus* presentes en los gránulos de kefir, que la estrategia propuesta es poderosa, rápida (menos de 3 horas una vez obtenido el cultivo), sencilla y económica.

3. Se ha logrado la construcción de dos librerías espectrales, una para heterofermentativos, con un % de identificación correcta del 93.3 % y una librería para homofermentativos con un 96 % de identificaciones correctas. Sin embargo, este trabajo está siendo enriquecido ampliando la misma, es decir se están incluyendo nuevas cepas de cada una de las especies, así como también incorporando espectros de nuevas especies, de modo de hacer las librerías más robustas y mejorar sus % de correcta identificación.

4.7. BIBLIOGRAFÍA
Reference List

1. Amann, R., Fuchs, B. M., and Behrens, S. 2001. The identification of microrganisms by fluorescence in situ hybridisation. Curr Opin Biotechnol 12, 231-236

2. Amiel, C., Mariey, L., Curk-Daubie, M.-C., Pichon, P., and Travert, J. 2000. Potentiality of Fourier Transform Infrered spectroscopy (FT-IR) for discimination an identification of dairy lactic acid bacteria. Lait 80, 445-459

3. Amiel, C., Mariey, L., Denis, C., Pichon, P., and Travert, J. 2001. FT-IR spectroscopy and taxonomic purpose: Contribution to the classification of lactic acid bacteria. Lait 81, 249-255

4. Angulo, L., Lopez, E., and Lema, C. 1993. Microflora present in kefir grains of the Galician Region (North-West of Spain). Journal of Dairy Research. [60], 263-267

5. Belgrader, P., Bennett, K. W., Hadley, D., Richards, J., Stratton, P., Mariella, R. J., and Milanovich, F. 1999. PCR detection of bacteria in seven minutes. Science 274, 610-614

6. Bright JJ, Claydon MA, Soufian M, Gordon DB. 2002. Rapid typing of bacteria using matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry and pattern recognition software. J Microbiol Methods 48:127-138.

7. Bruker Optics. 1993. Sample Preparation, Measurement and Evaluation of the FT-IR Spectra of Microorganisms. Ettlingen, Germany: Bruker Optik GmbH.

8. Clark, N. C., Olsvik, O., Swenson, J. M., Spiegel, C. A., and Tenover, F. C. 1999. Detection of a spectromycin/spectromycin adenyltransferase gene (*aadA*) in *Enterococcus* feacalis. Antimicrob Agents Chemother 43, 157-160

9. Claydon MA, Davey SN, Edwards-Jones V, Gordon DB. 1996. The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. Nat Biotechnol 14:1584-1586.

10. Curk, M. C., Peledan, F., and Hubert, J. C. 1994. Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy for identifying Lactobacillus species. FEMS Microbiol Lett 123[3], 241-248

11. Fujisawa, T., Adachi, S., Toba, T., Arihara, K., and Mitsuoka, T. 1988. *Lactobacillus kefiranofaciens* sp. nov. Isolated from kefir grains. International Journal of Systematic Bacteriology 38, 12-14

12. Garrote, G., Abraham, A., and De Antoni, G. 2001. Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. Journal of Dairy Research. 68, 639-652

13. Goodacre R, Hiom SJ, Cheeseman SL, Murdoch D, Weightman AJ, Wade WG. 1996a. Identification and discrimination of oral asaccharolytic Eubacterium spp. by pyrolysis mass spectrometry and artificial neural networks. Curr Microbiol 32:77-84.

14. Goodacre, R., Timmins, E., Rooney, P., Rowland, J., and Kell, D. 1996b. Rapid identification of *Streptococcus* and *Enterococcus* species using diffuse reflectance-absorbance Fourier transform infared spectroscopy and artificial neural networks. FEMS Microbiol.Lett. 140, 233-239

15. Haag AM, Taylor SN, Johnston KH, Cole RB. 1998. Rapid identification and speciation of Haemophilus bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. J Mass Spectrom 33:750-756.

16. Helm D, Labischinski H, Naumann D. 1991a. Elaboration of procedure for identication of bacteria using Fourier-Transform IR spectral libraries: a stepwise correlation approach. J Microbiol Meth 14:127-142.

17. Helm D, Labischinski H, Schallehn G, Naumann D. 1991b. Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy. J Gen Microbiol 137:69-79.

18. Helm, D., Labischinsky, H., Schallehn, G., and Naumann, D. 1991c. Classificaton and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy. J.Gen.Microbiol. 137, 69-79

19. Jones JJ, Stump MJ, Fleming RC, Lay JO, Jr., Wilkins CL. 2003. Investigation of MALDI-TOF and FT-MS techniques for analysis of Escherichia coli whole cells. Anal Chem 75:1340-1347.

20. Kandler, O. and Kunatha, P. 1983.
1 *Lactobacillus kefir* sp. Nov., a component of the microflora of kefir. Systematic Applied Microbiology 4, -286

21. Keys CJ, Dare DJ, Sutton H, Wells G, Lunt M, McKenna T, McDowall M, Shah HN. 2004. Compilation of a MALDI-TOF mass spectral database for the rapid screening and characterisation of bacteria implicated in human infectious diseases. Infect Genet Evol 4:221-242.

22. Kirschner, C., Maquelin, K., Pina, P., Ngo Thi, N. A., Choo-Smith, L. P., Sockalingum, G. D., Sandt, C., Ami, D., Orsini, F., Doglia, S. M., Allouch, P., Manfait, M., Puppels, G. J., and Naumann, D. 2001. Classification and Identification of Enterococci: a Comparative Phenotypic, Genotypic, and Vibrational Spectroscopy Study. J.Clin.Microbiol. 39[5], 1763-1770

23. Kummerle M, Scherer S, Seiler H. 1998. Rapid and reliable identification of food-borne yeasts by Fourier-transform infrared spectroscopy. Appl Environ Microbiol 64:2207-2214.

24. Lefter, D., Hirst, D., Holt, C., and Williams, A. G. 1997. Effect of sampling procedure and strain variation in Listeria monocytogenes on the discrimiantion of species in the genus Listeria by Fourier transform infrered spectroscopy and cononical variates analysis. FEMS Microbiol Lett 147, 45-50

25. Maquelin K, Choo-Smith LP, Kirschner C, Ngo Thi NA, Naumann D, Puppels G. 2002. Vibrational Spectroscopic Studies of Microorganisms. In: Chalmers JM,

Griffiths PR, editors. Handbook of Vibrational Spectroscopy. Chichester: John Wiley & Sons Ltd.p 1-27.

26. Maquelin K, Kirschner C, Choo-Smith LP, Ngo-Thi NA, van Vreeswijk T, Stammler M, Endtz HP, Bruining HA, Naumann D, Puppels GJ. 2003. Prospective study of the performance of vibrational spectroscopies for rapid identification of bacterial and fungal pathogens recovered from blood cultures. J Clin Microbiol 41:324-329.

27. Marshall, V. M., Cole, W., and Brooker, B. E. 1984. Observations on the structure of kefir grains and the distribution of the microflora. Journal of Applied Bacteriology [57], 491-497

28. Masuch, R. and Moss, D. A. 2003. Stopped flow apparatus for tiem-resolved FT-IR difference spectroscopy of biological macromolecules in H_{2O}. App.Spectrosc. 57[11], 1407-1417

29. Miller JF, Mekalanos JJ, Falkow S. 1989. Coordinate regulation and sensory transduction in the control of bacterial virulence. Science 243:916-922.

30. Miller JM, O'Hara CM. 1999. Manual of Clinical Microbiology. Washibgton, DC: ASM Press. 201 p.

31. Molska, I., Moniuszco, I., Komorowas, K., and Merilanen, V. 1983. Characteristics of bacilli of *Lactobacillus casei* species appearing in kefir grains. Acta Alimentaria Polónica IX[80], 88

32. Naumann D, Fijala V, Labischinski H, Giesbrecht P. 1988. The rapid differentiation and identification of pathogenic bacteria using Fourier Transform infrared spectroscopic and multivariate statistical analysis. Journal of Molecular Structure 174:165-170.

33. Naumann D, Helm D, Labischinski H. 1991. Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy. Nature 351:81-82.

34. Ngo Thi NA, Kirschner C, Naumann D. 2000. FT-IR microespectroscopy: A new tool in characterizing of microorganisms. In: Pupples GJ, editor. Biomedical spectroscopy: vibrational spectroscopy and other novel techniques. Proceeding of SPIE. Society of Photo-Optical Engineers, Belingham, Wash.p 36-44.

35. O'Hara, C. M. and Miller, J. M. 2002. Ability of the MicroScan Rapid Gram-Negative ID Type 3 Panel To Identify Nonenteric Glucose-Fermenting and Nonfermenting Gram-Negative Bacilli . Journal of Clinical Microbiology 40[10], 3750-3752

36. Oberreuter H, Seiler H, Scherer S. 2002. Identification of coryneform bacteria and related taxa by Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy. Int J Syst Evol Microbiol 52:91-100.

37. Ottogalli, G., Galli, A., Resmini, P., and Volonerio, G. 1973. Composizione Microbiologique, chimica ed ultraestructtura dei granuli di Kefir. Annali di Microbiologia ed Enzimologia. [23], 109-121

38. Oust A, Moretro T, Kirschner C, Narvhus JA, Kohler A. 2004a. Evaluation of the robustness of FT-IR spectra of lactobacilli towards changes in the bacterial growth conditions. FEMS Microbiol Lett 239:111-116.

39. Oust A, Moretro T, Kirschner C, Narvhus JA, Kohler A. 2004b. FT-IR spectroscopy for identification of closely related lactobacilli. J Microbiol Methods 59:149-162.

40. Pfaller, M. A. 2001. Molecular approaches to diagnosing and managing infectious diseaces: precticality and costs. Emerg Infect Dis 7, 312-318

41. Pintado, M. E., Lopes da Silva, J. A., Fernandes, P. B., and Malcata, F. X. y. J. T. A. 1996. Microbiological and rheological studies on portuguese kefir grains. International Journal of Food Science and Technology 31, 15-26

42. Relman, D. A. 1999. The search for unrecognized pathogens. Science 284, 1308-1310

43. Rosi, J. 1978a. *I microorganismi del kefir: Gli Acetobatteri.* Sienza e Tecnica Lattiero Casearia. [29], 221-227

44. Rosi, J. 1978b. Microorganismi del kefir: I Lieviti. Sienza e Tecnica Lattiero-Casearia [29], 59-67

45. Sakallah, S. A. 2000. Molecular dignostics of infectious diseases: state of the technology. Biotechnol Annu Rev 6, 141-161

46. Sandt C, Sockalingum GD, Aubert D, Lepan H, Lepouse C, Jaussaud M, Leon A, Pinon JM, Manfait M, Toubas D. 2003. Use of Fourier-transform infrared spectroscopy for typing of Candida albicans strains isolated in intensive care units. J Clin Microbiol 41:954-959.

47. Sanglier JJ, Whitehead D, Saddler GS, Ferguson EV, Goodfellow M. 1992. Pyrolysis mass spectrometry as a method for the classification, identification and selection of actinomycetes. Gene 115:235-242.

48. Schmitt, J., Beekes, M., Brauer, A., Udelhoven, T., Lasch, P., and Naumann, D. 2002. Identification of Scrapie Infection from Blood Serum by Fourier Transform Infrared spectroscopy. Anal.Chem. 74, 3865-3868

49. Schmitt J, Udelhoven T. 2001. Use of Artificial Neural Networks in Biomedical Diagnosis. In: Gremlich H-U, Yang B, editors. Infrared and Raman Spectroscopy of Biological Material. New York: Marcel Deker, Inc.p 379-419.

50. Simova, E., Beshkova, D., Angelov, A., Hristozova, T. S., Frengolva, G., and Spasov, Z. 2002. Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 28, 1-6

51. Sommer, A. J. and Hardgrove, M. 2000. Attenuated total internal reflection infrared microscopy for the analysis of trace solutes in aqueous solutions. Vibrational Spectrosc. 24, 93-100

52. Stager, C. E. and Davis, J. R. 1992. Automated systems for identification of microorganisms. Clin Microbiol Rev 5[3], 302-327

53. Takizawa, S., Kojima, S., Tamura, S., Fujinagasa, S., Benno, Y., and Nakase, T. 1994. *Lactobacillus kefirgranum* sp. nov. and *Lactobacillus parakefir* sp. nov., Two New Species from Kefir Grains. International Journal of Systematic Bacteriology 44 , 435-439

54. Takizawa, S., Kojima, S., Tamura, S., Fujinagasa, S., Benno, Y., and Nakase, T. 1998. The composition of the lactobacillus flora in kefir grains. Systematic Applied of Microbiology 21, 121-127

55. Thomas, L. C. and Greenstreet, J. E. S. 1954. The identification of microorganisms by infrared spectrophotometry. Spectrochim. Acta 6 , 302-319

56. Timmins, E., Howell, S., Alsberg, B., Noble, W., and Goodacre, R. 1998. Rapid Differentiation of Closely Related Candida Species and Strains by Pyrolysis-Mass Spectrometry and Fourier Transform-Infrared Spectroscopy. J.Clin.Microbiol. 36[2], 367-374

57. Toba, T., Uemura, H., Mukai, T., Fujii, T., Itoh, T., and Adachi, S. 1991. A new fermented milk using capsular polysaccharide-producing *Lactobacillus kefiranofaciens* isolated from kefir grains. Journal of Dairy Research 58, 497-502

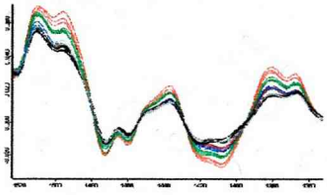
58. van der Mei HC, Naumann D, Busscher H. 1996. Grouping of oral streptococcal species using Fourier-transform infrared spectroscopy in comparison with classical microbiological identification. Arch Oral Biol 38:1013-1019.

59. van der Mei HC, Naumann D, Busscher HJ. 1993. Grouping of oral streptococcal species using Fourier-transform infrared spectroscopy in comparison with classical microbiological identification. Arch Oral Biol 38:1013-1019.

60. Wenning, M., Seiler, H., and Scherer, S. 2002. Fourier-Transform Infrered Microespctroscopy, a Novel and Rapid Tool for Idenification of Yeasts. Appl Environ Microbiol , 4717-4721

CAPÍTULO 4

APLICACIÓN DE ESPECTROSCOPÍA INFRARROJA – TRANSFORMADA DE FOURIER Y ANÁLISIS MULTIVARIANTE AL MEJORAMIENTO DE LA CALIDAD DE LA VACUNA CONTRA QUERATOCONJUNTIVITIS INFECCIOSA BOVINA



1.INTRODUCCIÓN

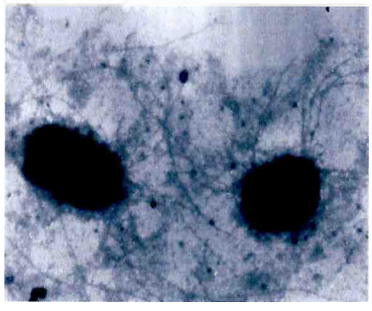
1.1. La enfermedad

La queratoconjuntivitis infecciosa bovina (QIB) es una enfermedad infectocontagiosa, que ataca principalmente al ganado bovino y ovino de distintas razas y edades. Su agente causal es *Moraxella bovis* (Aikman y col. 1985; Punch y Slatter 1984). Es una enfermedad de distribución mundial, aunque la mayor incidencia parece encontrarse en el norte, centro y sur de América, Europa, India, Sudáfrica y Australia. Si bien la QIB presenta una tasa de mortandad reducida, ocasiona al sector ganadero un fuerte impacto económico. Ello se debe a los costos asociados a los tratamientos prolongados con antibióticos que resultan muy costosos, a pérdidas de peso por problemas de visión en los animales afectados (Lepper y Barton 1987) y en el caso de animales productores de leche, a una disminución de su producción (hasta un 25 %). La enfermedad se puedetransmitir de un animal a otro por medio de las secreciones de los ojos. Sin embargo los principales transmisores o propagadores de la enfermedad son los insectos (tábanos, moscas, mosquitos, etc) ya que al posarse sobre los ojos de los animales enfermos, se ponen en contacto con el agente etiológico al que luego transmiten a los animales sanos (Pugh y McDonald 1986).

La mejor protección contra la queratoconjuntivitis es **la prevención**. *M. bovis* es un organismo de amplia distribución en la naturaleza, lo cual hace muy difícil su erradicación. De modo que la prevención se basa en tratar de eliminar los vectores, de los cuales el más importante es la mosca de la cara (M. autumnalis), y en la vacunación.

La queratoconjuntivitis es reconocida como una de las patologías de interés prioritario para el sector de producción ganadera por lo que desarrollar una vacuna adecuada contra la enfermedad resulta un desafío de interés general para un país que basa gran parte de sus ingresos en la producción bovina.

1.2. Moraxella bovis



Moraxella bovis, es un organismo Gram negativo, no móvil, que se presenta en general en forma de cocobacilos, predominantemente en pares o cadenas cortas (Manual Bergey´s, 9th edition, 1986). Puede tener o no pilis, es un organismo aerobio estricto que no forma esporas ni presenta flagelos.

Este organismo crece en agar tripticase soja (ATS) suplementado con 7 % de sangre de caballo desfibrinada (ATSs), a 37°C, produciendo hemólisis. Morfológicamente se pueden observar **tres tipos de colonias en agar sangre** (**Fig.1**): piliadas, no piliadas e intermedias (Bovre y Froholm 1972). **Las colonias piliadas (Fig. 1a)** son rugosas, pequeñas (1-2 mm de diámetro), secas, tienen un borde bien demarcado, presentan doble halo el cual es observado con lupa binocular, tienden a fragmentarse cuando son tomadas con un ansa y corroen el agar. Las zonas de corrosión, que se ven como depresiones o surcos que quedan en la superficie del agar cuando las colonias piliadas son removidas con el ansa, son del mismo diámetro que la colonia correspondiente (Ruehl et al, 1988). **Las colonias no piliadas** (**Fig. 1b**) son lisas, más grandes que las piliadas (2-4 mm de diámetro), mucosas, sin doble halo y no corroen el agar. Cuando se ven en placas de agar sangre estas colonias tienen una textura característica granular (Pedersen, 1970; Sandhu et al, 1974; Simpson et al, 1976; Wilcox, 1970). Las colonias piliadas al ser resuspendidas en medio líquido y PBS muestran autoaglutinación celular mientras que las no piliadas no (**Fig. 1c**)

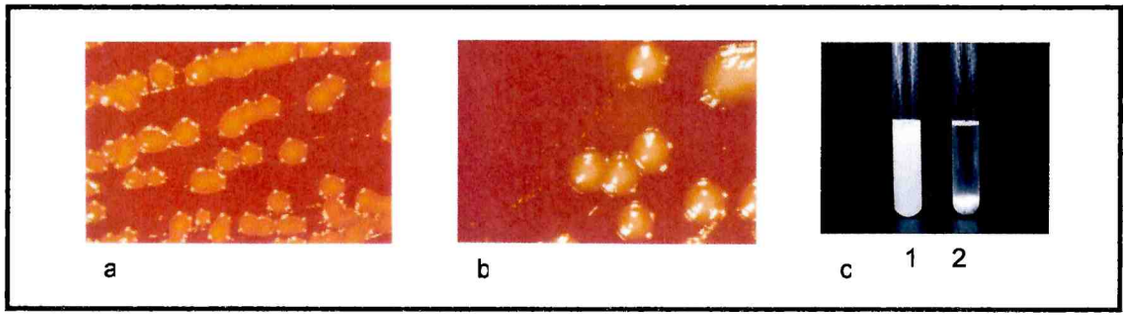


Fig. 1. Colonias de *M. bovis* en agar sangre tripticase soja (TSAS) a) piliadas (P^+) b) no piliadas (P^-). c) Suspensión celular de *M. bovis* ren PBS: 1, (P^-); 2, (P^+).

La aplicación del colorante cristal violeta (cv) sobre colonias crecidas en medio sólido, permite observar que las colonias piliadas toman el colorante (**Fig. 2a**), en tanto que las no piliadas no lo hacen, permaneciendo de color blanco (**Fig. 2b**). **Las colonias intermedias** toman el color violeta en el borde, en tanto que el centro de las mismas permanece de color blanco. En este caso y de acuerdo a lo observado por Bovre y Froholm (1972), estas colonias son mixtas, formadas por bacterias piliadas que se disponen en los bordes y bacterias no piliadas que se agrupan hacia el centro de la colonia (**Fig. 2c**). Las colonias, luego del tratamiento con cristal violeta se mantienen viables por 4 minutos, pudiendo en ese lapso de tiempo ser subcultivadas. Cuando se

subcultiva una colonia teñida con cv en placas de agar sangre, las colonias resultantes mantienen el fenotipo piliado. Por lo tanto la tinción con cv permite la rápida selección fenotípica de las colonias para subcultivar con una característica definida (Schurig y col. 1984). Esto es esencial en la etapa de inicio del proceso de producción de vacunas.

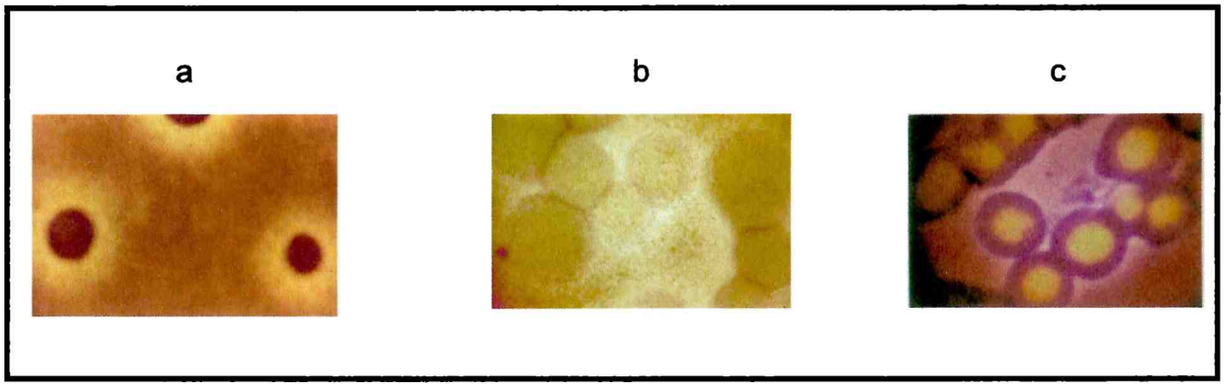


Fig. 2. Colonias de *M. bovis* en agar sangre, coloreadas con cristal violeta: a), piliadas; b), no piliadas; c), intermedias

1.3. Factores de virulencia de *Moraxella bovis*

M. bovis expresa fundamentalmente dos factores de virulencia, una citotoxina (Beard y Moore 1994) y pilis (Ruehl y col. 1993). Los pilis son proteínas de superficie cuya función es la adhesión, permitiendo la fijación de la bacteria a receptores específicos de las células epiteliales de la córnea y conjuntiva. La citotoxina (citolisina/hemolisina) es una proteína formadora de poros perteneciente a la familia de toxinas tipo RTX (repeticiones en la estructura de la toxina), que promueve la formación de úlceras corneales por medio de lisis de células epiteliales corneales y neutrófilos del hospedador, resultando en la liberación, dentro del estroma de la córnea, de enzimas de degradación derivadas de los neutrófilos (Rogers y col. 1987; Kagonyera y col. 1988, 1989).

El pili de *M. bovis* está clasificado como pili tipo IV (Ottow 1975), también llamado fimbria tipo IV. Este tipo de pili se distingue de otros tipos por su ubicación polar, su rol en la movilidad bacteriana y por las secuencias conservadas de su subunidad y de las proteínas de ensamble entre subunidades.

Los pilis tipo IV son apéndices que emanan de la superficie de varias bacterias gram negativas, incluyendo especies patogénicas para animales y plantas: *Moraxella bovis, Neisseria meningitidis, Neisseria gonorrhoeae, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella enterica, Vibrio cholerae, Dichelobacter nodosus,*

***Escherichia coli enteropatogénica* (EPEC) *y E. coli enterotoxigénica* (ETEC), *Actinobacillus pleuropneumoniae, Aeromonas veronii* biovar sobria, *Aeromonas caviae, Eikenella corrodens, Legionella pneumophila* (Tennent and Mattick, 1994).**

Los pilis tipo IV son homopolímeros, compuestos por un tipo de subunidad proteica llamada pilina que se repite entre 1000 y 3000 veces en cada pili. Esta subunidad es muy conservada (Manning y Meyer, 1997). Las subunidades de fimbrias pueden contener de 145 a 160 aminoácidos (aa) y muestran un alto grado de similitud estructural (Dalrymple y Mattick, 1987). La estructura cristalina de la subunidad de pili tipo IV de *N. gonorrhoeae* ha sido determinada por Parge y colaboradores (1995) (**Fig. 3**). Esta estructura cristalina revela conformaciones α-β con un enrollamiento α_1-helicoidal N- terminal bastante largo (residuos 2 a 54), que da a la molécula en general una forma de cucharón. Otros elementos estructurales son los siguientes: i) un lazo que contiene una unión a un disacárido (residuos 55 a 77), con N-acetilglucosamina-α(1,3)-O galactosa situado en la posición Ser-63, ii) dos horquillas β que forman las cuatro hojas β-plegadas antiparalelas (residuos 78 a 93 y 103 a 122), iii) un lazo de conexión β_2-β_3, y iv) una región que contiene un puente disulfuro (residuos 121 a 158), la cual a pesar de su naturaleza hipervariable, aparece como una horquilla-β regular (β_5-β_6) seguida por un lazo de conexión.

Como ha sido descripto las cepas piliadas de *M. bovis* son patogénicas, mientras que las cepas no piliadas no lo son (Jackman y Rosenbusch, 1984; Annuar y Wilcox, 1985; Chandler y col. 1985; Moore y Rutter, 1989). Esto se puede deber, al menos en parte, a la habilidad de la bacteria piliada para translocarse a través de la superficie epitelial mediante un movimiento denominado twitching motility (Depiazzi and Richards, 1985). Concomitantemente con su rol en la colonización del hospedador, los pilis tipo IV son también importantes antígenos inmunoprotectores y exhiben considerable variación estructural y serológica, lo cual se asume ampliamente que es el resultado de presión inmunológica por parte del hospedador (Lehr y col. 1985; Lepper y Hermans, 1986; Moore y Rutter, 1987; Ruehl y col 1988).

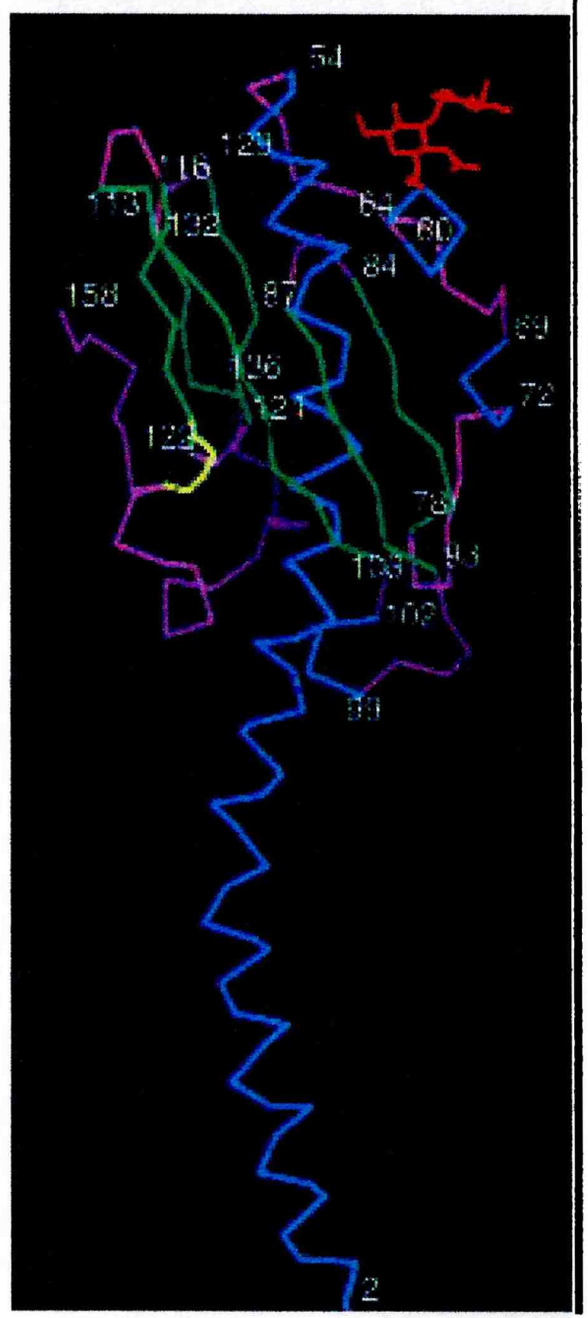
1.4 Variación antigénica del pili tipo IV

Se ha demostrado que la composición antigénica de las proteínas piliares permite caracterizar a las cepas de *M. bovis* en serogrupos, no existiendo una reacción inmunológica cruzada entre los mismos (Lepper y Hermans 1986). A estas diferencias antigénicas se atribuye, al menos en parte, el bajo nivel de protección de las vacunas actuales. A los efectos de analizar estas diferencias se estableció un sistema unificado

Estructura del pili tipo IV

- ✔ 1000-4000 nm largo, 60 A-diam.
- ✔ Formado por una asociación ordenada de miles de subunidades idénticas de pilina
- ✔ Cadena hidrofóbica larga, N -termnal en conformación α1 hélice (residuos 2-54)
- ✔ Un loop desde r55 - 77 conteniendo un disacárido en el rSer 63. Enlace covalente unido mediante el O, de N-acetyl glucosamine- α1,3 galactosa (GlcNAc-α1,3-Gal)
- ✔ Hoja -β central (78-93, 103-122)
- ✔ conexión loop β2-β3 (94-102)
- ✔ región S-S (121-158)

. tomada de Parge y colaboradores, 1995



para la caracterización serológica de los diversos serovares piliares de *M. bovis*, utilizando principalmente la técnica de aglutinación en placa y otras complementarias en casos dudosos tales como ELISA y TCIE (tandem crossed immunoelectrophoresis) (Moore y Rutter, 1987). Empleando este sistema, Moore y Lepper, en 1991, en un estudio sobre aislamientos de *M. bovis* de distintos países, lograron clasificarlos como pertenecientes a **7 distintos serogrupos**, designados con letras de A a G, de acuerdo a su tipo antigénico piliar.

1.5. ¿Por qué las vacunas disponibles comercialmente poseen bajo nivel de protección?

Actualmente las vacunas elaboradas por los laboratorios nacionales e internacionales contienen bacterinas formuladas con una cepa en el caso de Bioqueratogen (Lab. Biogénesis; Piliguard Querato, Lab. Schering) o más cepas en el caso de Piliguard Querato 1 trivalente oleosa (Lab. Schering-Plough). Existen también algunas vacunas combinadas con el virus de IBR (virus de Rinotraqueítis Infecciosa Bovina) como las vacunas PolivacQuerato (Lab. San Jorge Bagó) o la vacuna anti IBR con bacterina de *Moraxella bovis*, Centro de Diagnóstico Veterinario.

A pesar de la variedad de vacunas existentes en le mercado, el nivel de protección otorgado por todas ellas, estimado en ensayos a campo, resulta de sólo un 40 a 60%. La bibliografía internacional reporta niveles de protección con tasas muy variables pero por lo general son muy bajas. Se citan así tasas de protección, que varían entre un 16% y 65%. Todo esto es indicativo de que aún no se dispone a nivel mundial de un inmunógeno efectivo para el control de esta enfermedad.

En primer lugar, para la producción de *M. bovis,* la industria **emplea fermentadores clásicos, agitados mecánicamente**, donde los microorganismos crecen en medios de cultivo tradicionales, ricos en nutrientes. El sistema de cultivo empleado es el batch, donde la población microbiana alcanza en fase exponencial la máxima velocidad específica de crecimiento. Estas **condiciones de crecimiento distan mucho de ser las que presenta la población en su entorno natural, donde expresa todo su potencial de virulencia.** *In vivo*, una de las principales limitaciones al crecimiento es el bajo nivel de hierro disponible, el desarrollo celular se lleva a cabo previa adhesión a la superficie de la córnea donde la población crece a velocidades de crecimiento submáximas. Esto implica que a nivel industrial, se está produciendo una población microbiana en condiciones totalmente diferentes a las que la misma encuentra *in vivo*. **Por lo tanto, las características fenotípicas de la población con la que se fabrica**

la vacuna podrían llegar a diferir marcadamente de la población que se intenta combatir.

Producto de consultas realizadas por nuestro grupo de Vacunas Bacterianas del CINDEFI con empresas productoras de vacunas de uso veterinario (San Jorge-BAGO, Bayer División Veterinaria, MED-VET- La Plata) nuestro laboratorio, decidió iniciar un proyecto de investigación orientado al estudio de las causas que podrían ocasionar el bajo nivel de protección de las vacunas disponibles como etapa previa para lograr mejorar las mismas. Para ello se encaró el estudio de 3 aspectos principales:

Los primeros estudios realizados en nuestro laboratorio han permitido constatar, que vacunas fabricadas en Argentina, a partir del desarrollo de microorganismos en reactores agitados, **carecen prácticamente de células piliadas y hemolisina**. Además se comprobó, por una técnica de ELISA desarrollada por la Dra. Prieto (Prieto y col. 2003), que la piliación así como también la actividad hemolítica caen rápidamente en cultivos líquidos en el laboratorio (**Fig. 4**). Estos resultados podrían estar explicando el bajo nivel de protección de las formulaciones que se están empleando: carecen de pilis, uno de los inmunógenos más importantes.

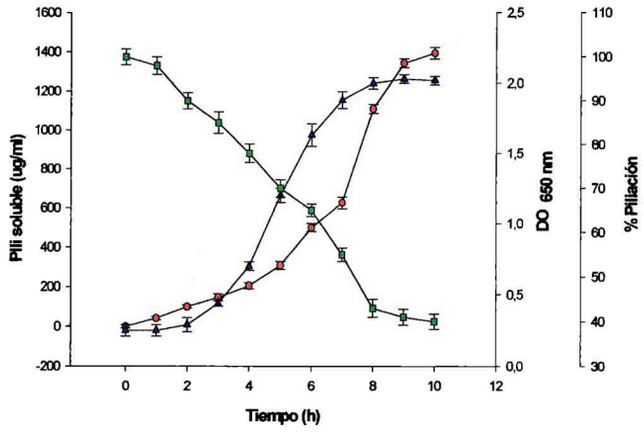


Fig. 4. Concentración de pili en sobrenadante (●) y nivel de piliación celular (□), durante el crecimiento de *M. bovis* (□) en biorreactor agitado. Los resultados son el promedio de cuatro experimentos independientes ± los errores estándar de la media. (Tomado de Prieto y col. 2003)

La Dra. Claudia Prieto, en su trabajo de Tesis Doctoral (Prieto 2004), estudió las **causas de pérdida de piliación celular en cultivos líquidos**, estableciendo que las mismas se asociaban fundamentalmente a un efecto de *shear* hidromecánico,

consecuencia de las condiciones de aeración y agitación mantenidas durante el cultivo.

Otro elemento a tener en cuenta en la producción de vacunas, se refiere al tema de selección de las cepas a emplear en la formulación, La presencia de cepas antigénicamente heterogéneas (Punch and Slatter, 1984) puede determinar que las vacunas no sean efectivas, principalmente cuando las mismas se preparan con cepas provenientes de otra región o país distinto en las cuales se aplicarán, siendo por lo tanto recomendable que las vacunas incluyan cepas regionales representativas del área geográfica en la que van a ser empleadas (Paolicchi et al, 1991). En nuestro país en particular, los fabricantes de vacunas si bien formulaban las mismas con organismos aislados de diferentes regiones geográficas del país, no sabían si fenotípicamente eran iguales o diferentes.
En nuestro laboratorio se decidió encarar esta problemática para lo cual se realizaron **estudios sobre las características fenotípicas de la población microbiana prevalente en distintas regiones de nuestro país.** Se estudió así una población de 60 aislamientos locales de microorganismos aislados de animales de diferentes regiones del país. Se analizó su grado de diversidad en base a estudios de *fingerprints* de ADN y análisis de la expresión de componentes de cubierta celular como proteínas de membrana externa y lipopolisacáridos (Prieto 2004; Prieto y col. 1999) . Estos estudios continúan sobre nuevos aislamientos.

Otra problemática a nivel de producción de vacunas lo constituían el hecho de que no se disponía de métodos de **análisis de piliación para poder evaluar la expresión y estabilidad de este factor de virulencia no sólo durante un cultivo sino también en productos finales como vacunas**. Consecuentemente, el Servicio Nacional de Sanidad Animal (SENASA) no analizaba si las vacunas contra QIB estaban formuladas con células piliadas o no piliadas, situación que continúa al presente. En vista de esta situación se desarrolló una técnica de ELISA que permitió la cuantificación del grado de piliación de suspensiones celulares de *M. bovis* (Prieto y col. 2003). Esta metodología si bien es específica y permitió establecer el nivel de piliación de suspensiones celulares, dato con anterioridad no conocido, como la técnica en sí consume un tiempo excesivo y demanda un costo importante de reactivos. Si bien no se desconoce el valor de esta metodología es evidente que su implementación no resulta apropiada a los fines de control y monitoreo de procesos. Teniendo en cuenta estas limitaciones decidimos estudiar si la espectroscopía IR podía ser una metodología apropiada para determinar niveles de piliación celular en *M. bovis.*

2. OBJETIVOS

1. Desarrollar empleando espectroscopía infrarroja y el análisis multivariante una técnica alternativa rápida para la detección de piliación celular en *M. bovis*

Buscar marcadores espectroscópicos de pili tipo IV que permitan distinguir entre poblaciones piliadas y no piliadas, **independientemente del serotipo de pili.**
Desarrollar métodos multivariantes cuantitativos que ofrezcan una alternativa para determinar **del grado de piliación** de suspensiones celulares de *M. bovis* .

2. Analizar mediante espectroscopía infrarroja el grado de diversidad en organismos de M. bovis aislados de distintas regiones de nuestro país.

   a) Establecer si la diferencia fenotípica encontrada para la población de aislados locales de *M. bovis,* que permitió su clasificación por métodos tales como perfiles de LPS, PME y *fingerpinting* de ADN (PCR), podía manifestarse en estudios FT-IR.
   b) Establecer correlaciones entre los resultados de la clasificación derivada de la aplicación de métodos fisicoquímicos (FT-IR), con los agrupamientos resultantes del empleo de ADN, PME y LPS.

1. DESARROLLO DE UNA TÉCNICA BASADA EN ESPECTROSCOPÍA INFRARROJA Y ANÁLISIS MULTIVARIANTE PARA LA DETECCIÓN DEL NIVEL DE PILIACIÓN EN *MORAXELLA BOVIS*

1.1. MATERIALES Y MÉTODOS

1.1.1.Microorganismos y condiciones de cultivo

Para este estudio se emplearon en una primera etapa, **células piliadas y no piliadas** de *M. bovis* 1194-03. Se seleccionaron colonias piliadas y no piliadas de medio sólido, en base a sus características morfológicas. Ambas formas se mantuvieron a –70°C en caldo Tripticas soja (TSB) con 20% de glicerol. Luego se incorporaron al estudio los aislamientos B27 y Ce3a correspondientes a los serotipos C y G respectivamente.

1.1.2. Purificación de pilis

Los pilis fueron purificados en base a un procedimiento descrito previamente por Lepper y Hermans (1986) con modificaciones realizadas por Prieto y colaboradores (2003). Brevemente el procedimiento de extracción de pili consiste en remover los mismos mecánicamente a través de un shereado mecánico de las bacterias usando un agitador tipo vortex (MS2 Minishaker, IKA Works, Wilmington, NC, USA) operado a máxima potencia, empleando 3 pulsos de 5 min cada uno. Las células bacterianas fueron posteriormente removidas por centrifugación a 10000 x g por 10 min. El sobrenadante resultante fue filtrado a través de una membrana de policarbonato de tamaño de poro de 0,22 µm (MSI, Westboro, MA, USA) y luego sujeto a ultracentrifugación durante 2 h a 100.000 x g (40 K). Después de 3 pasos secuenciales de ultracentrifugación el pellet es resuspendido en 0,5 ml de agua destilada estéril y la concentración final de proteína evaluada mediante el método de Lowry (Lowry et al., 1951). La pureza de la suspensión de pili fue determinada durante cada etapa del proceso de purificación por electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 15% (p/v) (Laemmli, 1970) y tinción con plata (Wray et al., 1981). Además, la suspensión final se evaluó por microscopía electrónica de transmisión (TEM).

1.1.3. ELISA para la cuantificación de pili unido a célula (bact-ELISA) y soluble (sol-ELISA).

El nivel de piliación de células enteras de *M. bovis* y la presencia de pili en sobrenadante de cultivo fue determinada mediante técnicas inmunológicas desarrolladas en nuestro laboratorio; bact-ELISA (para pili unido a células) y sol. ELISA (para pili soluble en sobrenadante) que fueron desarrollado por Prieto y colaboradores (2003) adaptando el método descripto por Chirdo y colaboradores (1995).

1.1.4.Espectroscopía FTIR

1.1.4.1. Células enteras

Se registraron espectros a partir de colonias seleccionadas, de medio sólido como piliadas, no piliadas y piliadas sometidas a la acción de shear, para extrer el pili de manera mecánica. Para tomar la muestra y los los espectros se siguió con la metodología decripta en el **Capítulo 2.**

1.1.4.2. Pili purificado

Se prepararon 50 ul de una solución de pili purificado (10 mg/ml) para tomar su espectro utilizando un microespectrómetro, ya que esta metodología requiere menor cantidad de muestra. Las medidas se realizaron sobre 3 purificaciones independientes de pili, en se realizó en el Instittute Robert Koch de Berlin con un microespectrómetro IR SCOPE II de Bruker similar al mostrado en la **Fig. 21, Capítulo1**.

1.1.4.3. Análisis de los datos espectrales

1. Análisis de cluter: Los datos espectrales fueron sometidos a un análisis de cluster, del mismo modo que se realizó en capítulos anteriores.

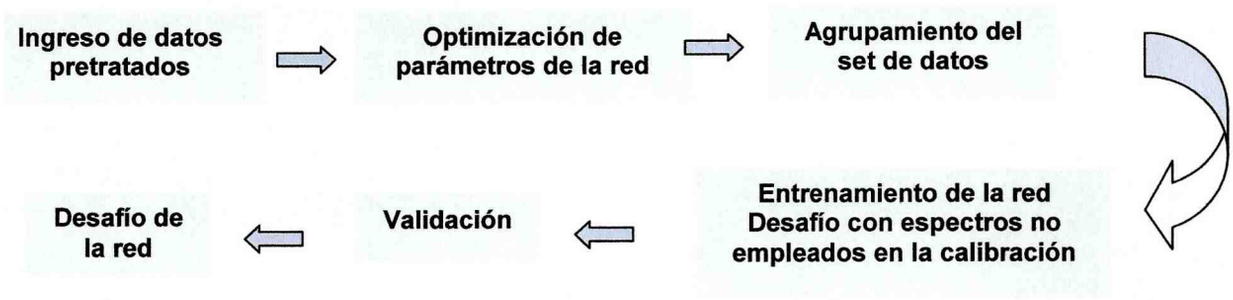
2. Redes Neuronales artificiales:

Diseño y Entrenamiento de Redes Neuronales Artificiales (ANNs).

Este tipo de análisis permitió establecer un sistema de clasificación jerárquico entrenado específicamente para la diferenciación entre poblaciones piliadas (clase 1) de no piliadas (clase 2) en una primera instancia y luego en un segundo nivel los espectros que pertenecían a la clase (1) entraron en un segundo nivel de clasificación de la red para obener su % de piliación..

Para los análisis se empleó el software Neurodeveloper, Sybthob Analytics. De cada uno de las redes desarrolladas se optimizaron una serie de parámetros propios de las redes. El esquema de trabajo para el entrenamiento y validación de las redes utilizado se detalla en el esquema 1:

Esquema 1. Entrenamiento y validación de una RNA



Datos de ingreso: Los datos de ingreso constituyen los espectros pretratados tomados de poblaciones cuyo fenotipo (p+ o p-) era conocido por otras metodologías, característica de colonia, ELISA, mmicroscopía electrónica. Se ingresan las derivadas primera o segunda, normalizadas

Optimización de parámetros de la red neuronal: optimación del número de niveles jerárquicos de la red, del número de capas escondidas de la red neuronal (topografía de la red), de las funciones a utilizar: multilayer perceptrons (MLPs) y radial basis functions networks (RBFs), etc.

Agrupamiento del set de datos: Dentro del pool de datos espectrales se seleccionaron 60-75% de los espectros **como grupo de entrenamiento** y el resto para llevar a cabo la validación.

Validación de las ANNs: La clasificación obtenida fue validada mediante dos técnicas: "winner takes all" (WTA) y la regla 402040 con las que cuenta el software.

Desafío de la base construida: Desafiar la base de datos, con otros espectros vibracionales, de fenotipo conocido, no utilizados en el set de datos de construcción y validación de la red.

1.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el objeto de establecer si mediante espectroscopía infrarroja era posible distinguir poblaciones piliadas de no piliadas de *M. bovis*, se obtuvieron espectros de células provenientes de colonias seleccionadas de medio sólido, por sus características morfológicas como piliadas y no piliadas.

Se comenzó el trabajo empleando la cepa **1194-03 de *M. bovis*** de la cual teníamos el antisuero correspondiente para la cuantificación de piliación mediante una técnica de ELISA. Esta cepa correspondía al **serotipo piliar A.** Las suspensiones celulares seleccionadas de medio sólido fueron chequeadas por microscopía electrónica y mediante un análisis de ELISA. Ambas pruebas permitieron confirmar el tipo de población analizada. La figura **Fig. 5**. muestra aproximadamente 30 espectros de cada una de las poblaciones. Si bien los espectros muestran diferencias, al aumentar el poder de resolución, mediante el empleo de la derivada 1ra **(Fig. 5 b y c)** las diferencias entre células piliadas y no piliadas fueron resaltadas. A partir del estudio comparativo fue posible establecer que había deferencias prácticamente a lo largo de todo el rango espectral (300-2800 y 1800-700 cm^{-1}).

Con el objeto de establecer si las diferencias observadas entre poblaciones p+ y p- eran debidas a la presencia de pilis y no a algún otro componente celular, se decidió eliminar los pilis presentes en una población de células piliadas mediante acción mecánica y analizar el especto de las células resultantes. Se utilizó entonces un vortex a alta velocidad, empleando el mismo procedimiento que se había descrito en un trabajo previo (Prieto y colab. 2003) como técnica de extracción de pilis. Se comprobó la ausencia de pilis en la población shereada por microscopía electrónica y técnica de ELISA. En la **Fig. 6** se muestra la superposición de las derivadas primeras de los correspondientes espectros de las poblaciones p+, p- y p+ sometidas a shear. **En la figura se pude observar que el espectro de las células shereadas se asemeja al de las no piliadas, lo cual nos permitió confirmar que las diferencias encontradas se debían a la presencia de pilis**. Dentro de todo el rango espectral indicado previamente se buscaron las zonas que tuvieran la máxima contribución para lograr una separación de las poblaciones. La **Fig. 7** indica las ventanas seleccionadas como marcadores de la presencia de pilis: **V_1= 1697 – 1682 cm^{-1}, dentro de Amida I, V_2= 1416 - 1411 cm^{-1}y V_3=1383 - 1377 cm^{-1}**, las dos últimas ubicadas en la zona mixta del espectro FT-IR.

Se analizó luego el espectro del pili purificado y se comprobó que su derivada primeratenía una contribución al menos en dos de las tres ventanas seleccionadas (**Fig. 8**).

Fig. 5 Espectros FT-IR de poblaciones p+ y p- de *M. bovis*

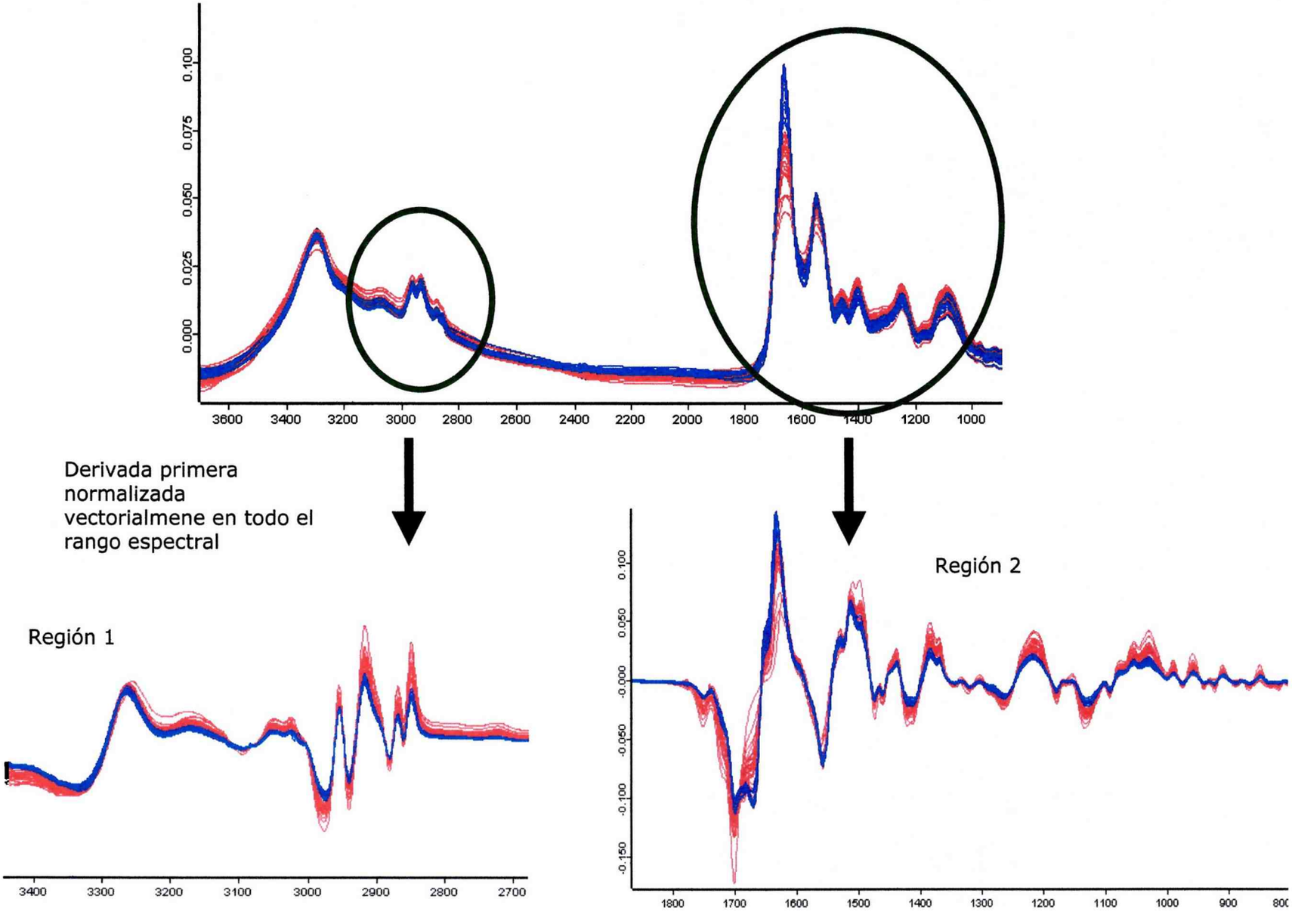


Fig. 6 Selección de las ventanas espectrales que permiten la diferenciación entre los fenotipos pilado y no pilado

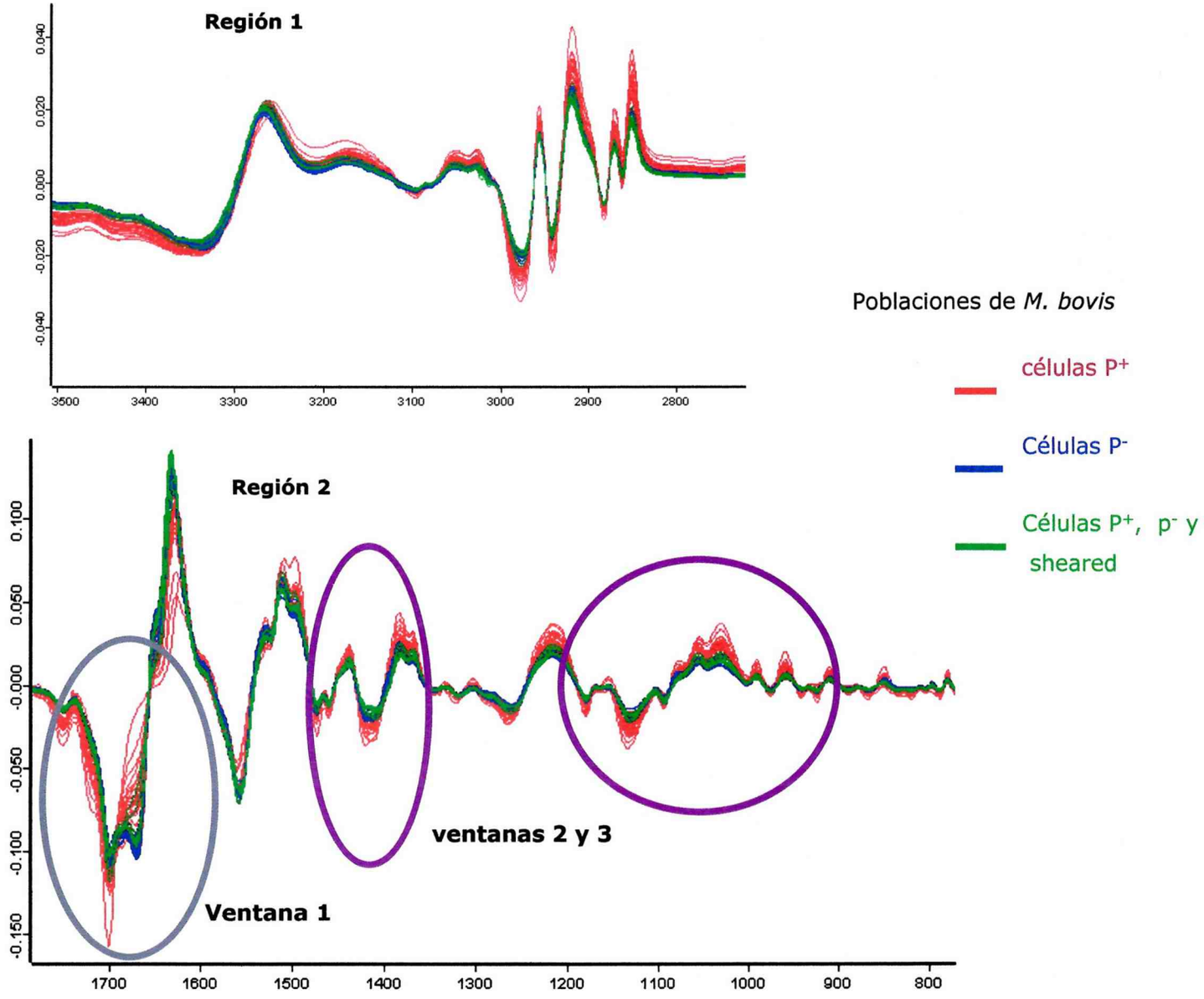
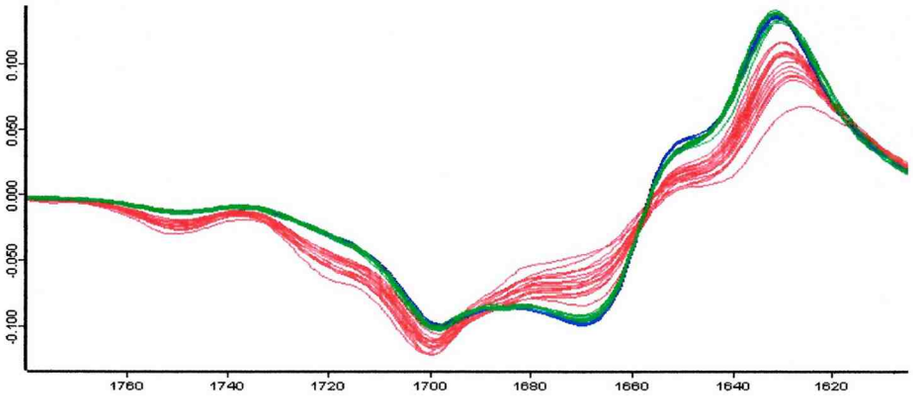


Fig. 7 Marcadores espectroscoópicos de pili tipo IV en células de *M. bovis*

Ventana 1 = 1697-1682 cm^{-1}



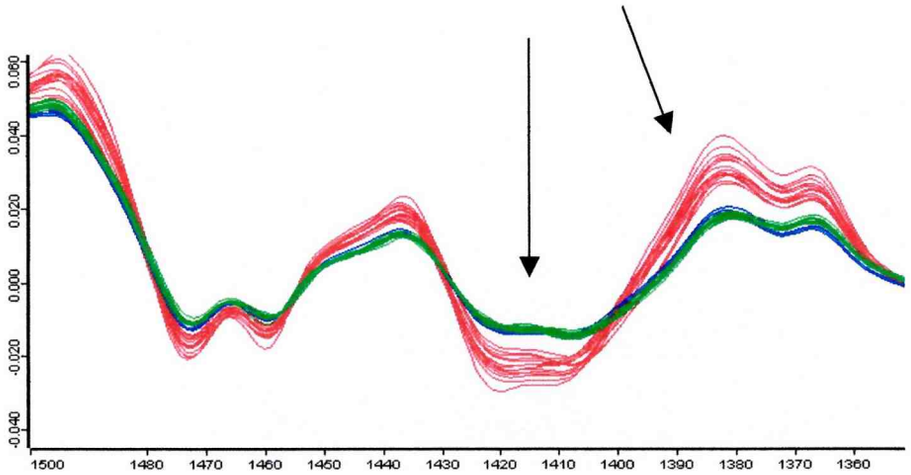
células piliadas

Células no piliadas

Células piliadas y no piliadas shereadas

Ventana 2 y 3 = 1416-1411 y 383-1377 cm^{-1}

Se seleccionaron las ventanas espectrales que contribuían a la máxima diferenciación entre aislados piliados y no piliados.



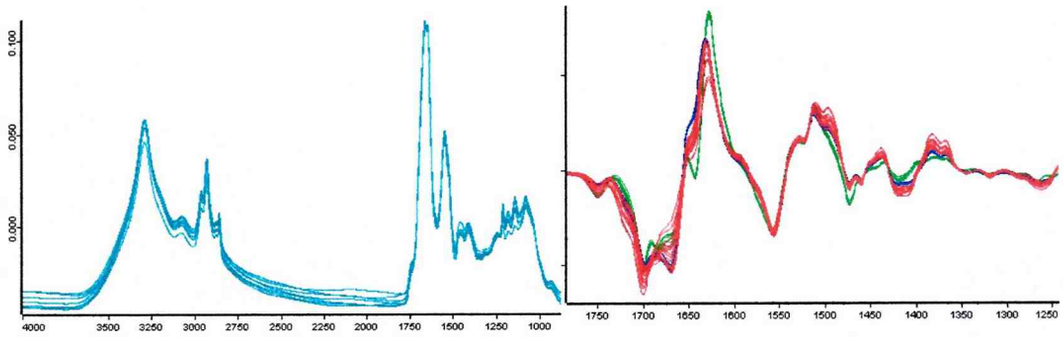


Fig. 8 (a) Espectro FT-IR de pili purificado. (b) Superposición de las derivadas primeras de los espectros correspondientes a poblaciones piliadas (rojo) y no piliadas (azul).

Si bien los espectros presentaban claras diferencias entre las dos poblaciones, y dichas diferencias pudieron ser asignadas a bandas de absorción presentes en preparacones de pili purificado, una pregunta que nos hicimos fue si podíamos **llegar a determinar con precisión la naturaleza química de las diferencias entre poblaciones p+ y p-.** Del análisis detallado de los picos presentes en las ventanas seleccionadas, teniendo en cuenta datos bibliográficos sobre absorción de grupos funcionales, del conocimiento de la estructura del pili tipo IV y de la composición química de una pilina (**Fig. 3),** pudimos asociar cada una de las regiones elegidas a alguna estructura o característica del pili:

Ventana 1, 1697-1682 cm^{-1} no correspondería a ningún grupo funcional del pili sino a una deformación que ocurre en la banda de Amida I debido a la agregación de las céluas piliadas. Cuando el nivel de piliación de las células es muy alto las mismas se agregan (**Fig. 1**) y esto produce fillms no homogéneos sobre las celdas de ZnSe. De modo que la diferencia observada en amida I (achatamiento de la banda) entre poblaciones piliadas y no piliadas se debe a la deformación que produce en los espectros la agregación celular, fenómeno descrito previamente (**Capítulo 2, Fig. 4**)

En la Ventanas II y III se observan las bandas típicas de los grupos **N-acetilo** (1414 y 1380 cm^{-1}) Del análisis de la composición química de la subunidad del pili, se comprueba que a nivel del residuo **Serina 63 se encuentra unido un disacárido que está constituido por un residuo N-acetil glucosamina unido a una Galactosa.** Por lo tanto lo que en principio estábamos detectando como diferencia entre ambas poblaciones era precisamente la presencia cuantitativa de este grupo (**Fig. 3**). Un pili está constituido por 1000 a 3000 subunidades de pilina, por lo cual tendremos esa misma cantidad de grupos N-acetilo de diferencia por cada uno de los pili , y una célula piliada puede tener de 10 a 20 pilis.

Si las ventanas espectrales seleccionadas correspondían realmente a los grupos funcionales indicados o a la formación de agregados en las suspensiones muy piliadas, estos marcadores deberían ser **independientes del serotipo de pili considerado**. Se trabajó entonces con tres aislamientos de *M. bovis*, 1194-03, B27 y Ce3a, pertenecientes a tres serotipos de pili diferentes A, C y G. Para ello colonias piliadas y no piliadas cada serotipo piliar fueron seleccionadas a partir de cultivos en medio sólido. Adicionalmente y siguiendo la estrategia descripta anteriormente, parte de las células piliadas fueron shereadas para eliminar los pilis de la superficie. La **Fig. 9** muestra la superposición de espectros obtenidos con los tres tipos de poblaciones. La figura muestra cómo **las derivadas de los correspondientes espectros se diferencian por sus fenotipos piliado o no piliado y no por el serotipo al cual pertenecen**. Este resultado tiene un gran significado tecnológico ya que podía significar que habíamos seleccionado marcadores espectrales de piliación no descriptos al presente, sobre la presencia de pili tipo IV. Decidimos extender entonces nuestros estudios tratando de establecer en que medida los marcadores seleccionados permitían establecer diferencias entre las distintas poblaciones. Se estudiaron las diferencias espectrales entre las poblaciones seleccionadas mediante la construcción de un dendrograma en los que se utilizaron las ventanas espectrales previamente seleccionadas. El análisis de cluster realizado, tal como se muestra en la **Fig. 10** permitió establecer claras separaciones entre poblaciones piliadas y no piliadas (incluyendo las shereadas) independientemente del serotipo piliar considerado.

Los resultados obtenidos permitieron establecer que mediante FT-IR combinada con análisis multivariante es posible diferenciar poblaciones piliadas de no piliadas. Sin embargo, si bien este resultado resultaba muy alentador como para ser empleado en evaluación de suspensiones celulares integrantes de vacunas y en control final de procesos, es evidente que la piliación en cultivos en medio líquido de *M. bovis* se pierde gradualmente, como se determinó por la técnica de ELISA.

El próximo paso fue entonces tratar de establecer hasta que punto nuestro metología podía discriminar el nivel de piliación celular. ¿Podía establecer diferencias tipo si-no o su discriminación era mayor?. Las figuras que se obtenían cuando se superponían las derivadas primeras de espectros de diferentes % de piliación demostraron que existía alguna correlación entre el pattern del espectro y el % de piliación **(Fig. 11).** Las características del perfil de la derivada primera de los espectros de células con distinto porcentaje de piliación presentaron variaciones que indicabron un agrupamiento en

Fig. 9 Aislamientos de *M. bovis* 1194-03, B27 y Ce3a, con tres serotipos diferentes A, C y G, respectivamente

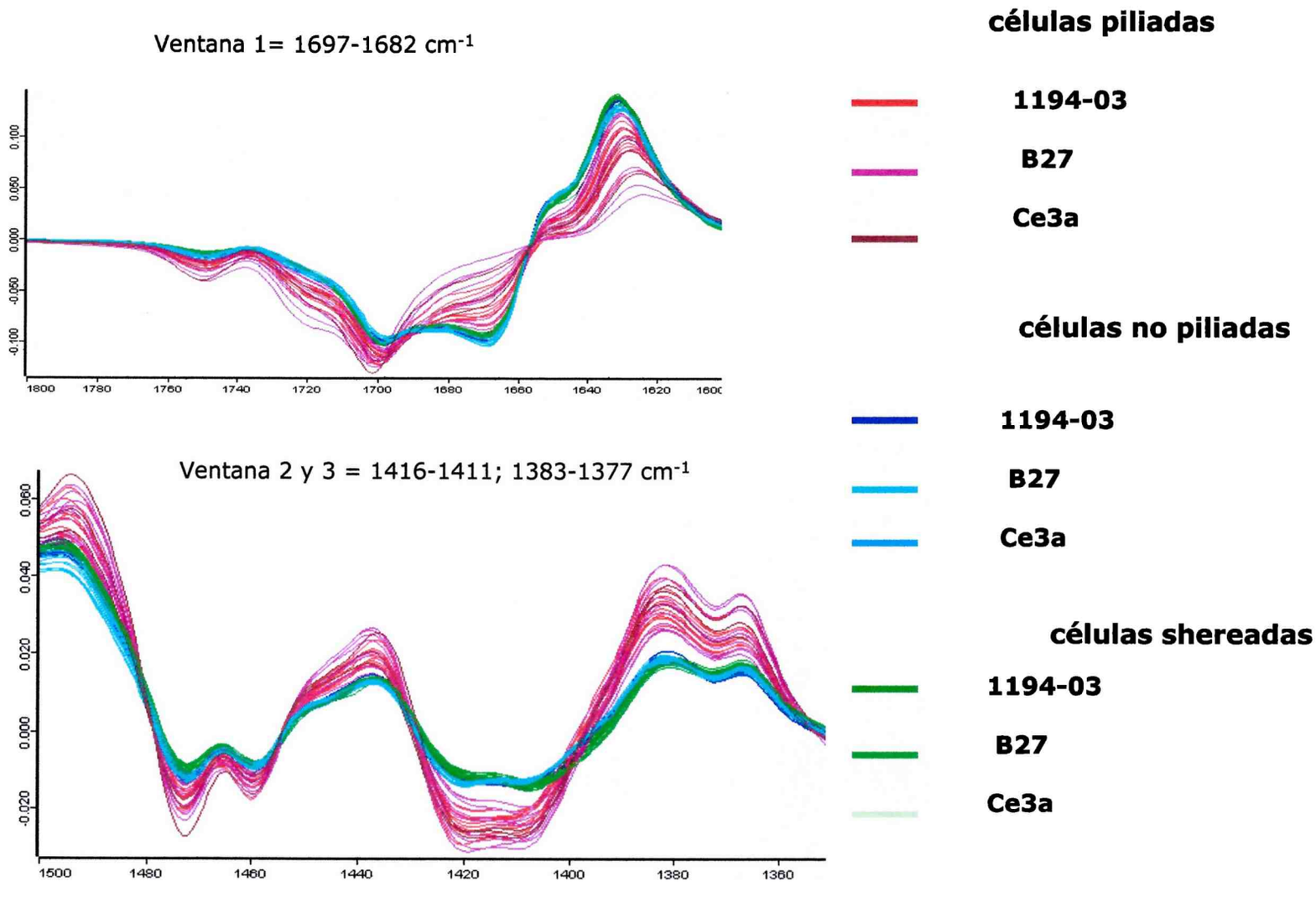
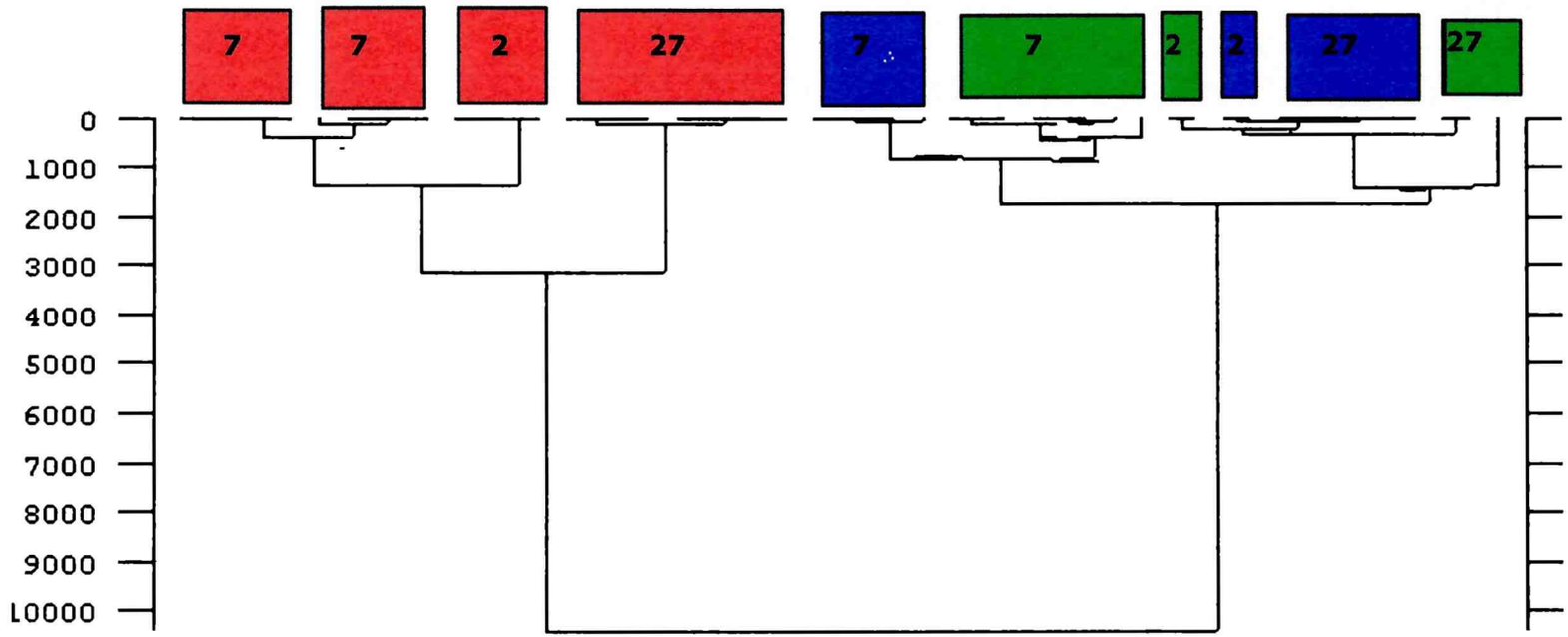


Fig. 10 Análisis de cluster de *M. bovis* 1194-03 (7), B27 (2) y Ce3a (27), serotipos A, C y G respectivamente. Permite discriminar poblaciones en piliadas de no piliadas independientemente del serotipo de pili



Data Preprocessing: First Derivative + Vector Normalization
Ward's Algorithm
Correlation with
Scaling to 1st range
Method File = NS(7y2 p_np_sh).CLA
Date:

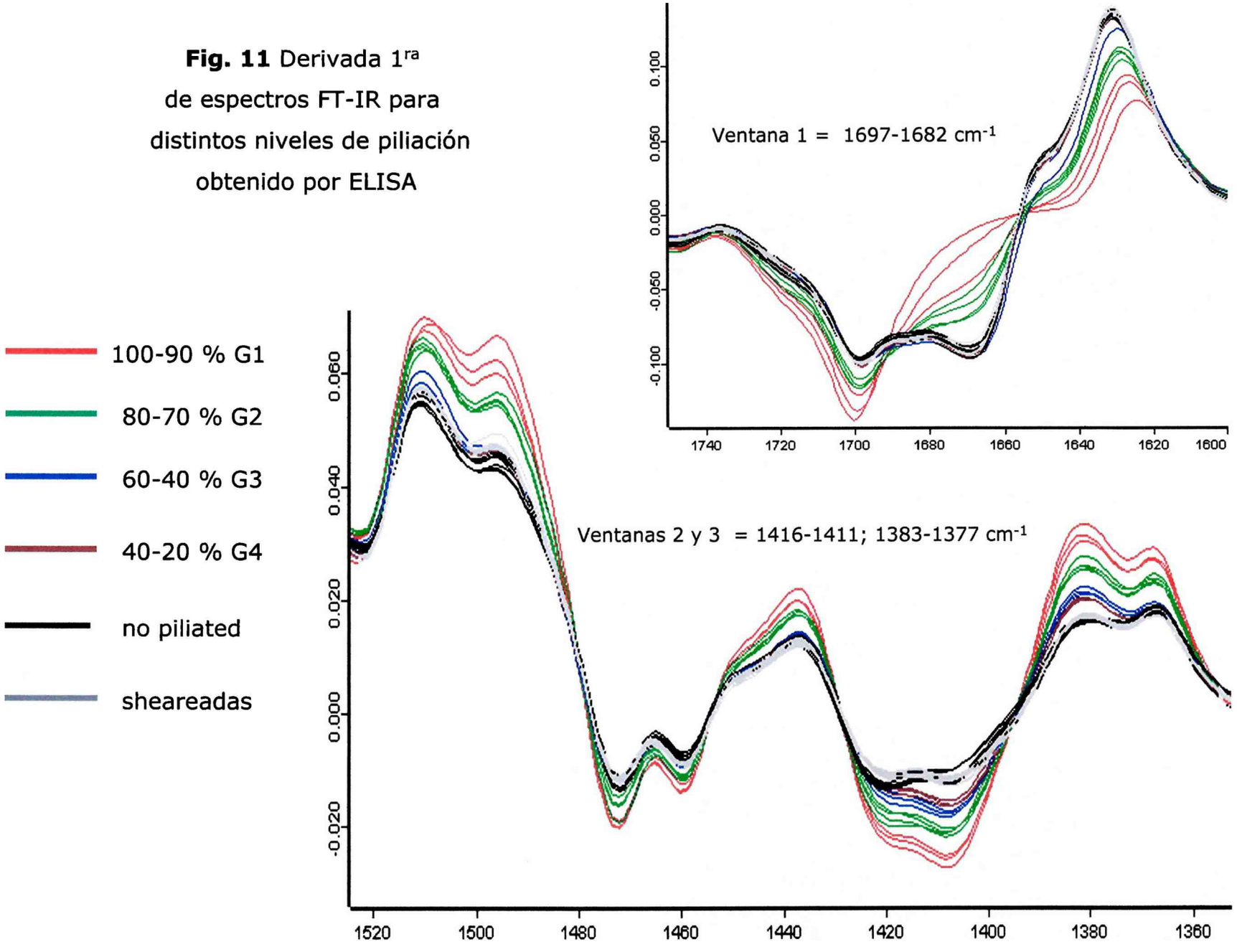
Frequency Ranges (Weights) =
1416 - 1411 /cm (1.0)
1383 - 1377 /cm (1.0)
1697 - 1682 /cm (1.0)
17/01/2004

fenotipo piliado

fenotipo no piliado

células shereada

Fig. 11 Derivada 1ra de espectros FT-IR para distintos niveles de piliación obtenido por ELISA



rangos rangos de nivel de piliación: **G1** = 100-90 %, **G2** = 80-70 %, **G3**= 60-40%, **G4** = 40 –20% y no piliado y shereado.

Se encararon entonces dos tipos de análisis multivariantes cuantitativos:

i. **PLS (Parcial Leat Squares)**
ii. **Redes neuronales artificiales (RNA)**

i. PLS.: para poder establecer el nivel de piliación de una suspensión bacteriana se requiere de una calibración previa con espectros de distintos % de piliación obtenido por ELISA. Para ello se utilizaron los espectros indicados en la **Fig 11**. La regresión se realiza en todo el rango espectral, y el software "busca" cúales son los rangos espectrales en los que existe una correlación lineal (**Esquema 2**). Una vez obtenida la calibración se debe llevar a cabo una validación con espectros de % de piliación conocido que no han sido utilizados para la calibración.

Esquema 2: Análisis multivariante

Calibración del sistema

↓

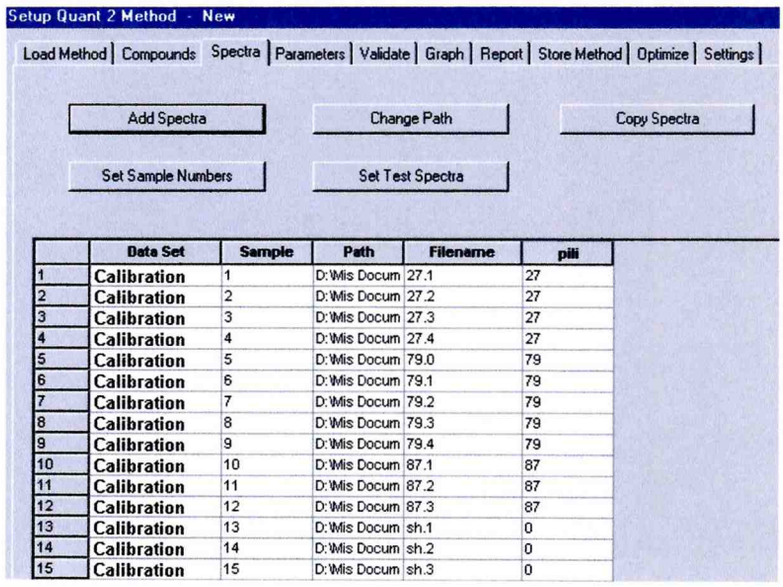
Se cargan las dos matrices: espectros y % pili (ELISA)

↓

Regresión

↓

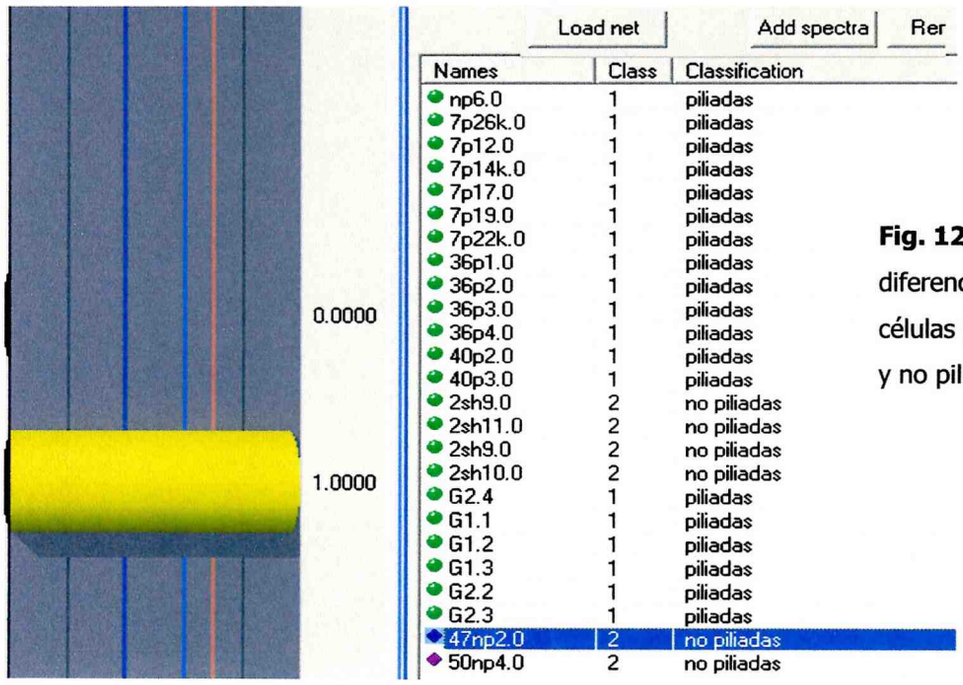
Validación →



	Data Set	Sample	Path	Filename	pili
1	Calibration	1	D:\Mis Docum	27.1	27
2	Calibration	2	D:\Mis Docum	27.2	27
3	Calibration	3	D:\Mis Docum	27.3	27
4	Calibration	4	D:\Mis Docum	27.4	27
5	Calibration	5	D:\Mis Docum	79.0	79
6	Calibration	6	D:\Mis Docum	79.1	79
7	Calibration	7	D:\Mis Docum	79.2	79
8	Calibration	8	D:\Mis Docum	79.3	79
9	Calibration	9	D:\Mis Docum	79.4	79
10	Calibration	10	D:\Mis Docum	87.1	87
11	Calibration	11	D:\Mis Docum	87.2	87
12	Calibration	12	D:\Mis Docum	87.3	87
13	Calibration	13	D:\Mis Docum	sh.1	0
14	Calibration	14	D:\Mis Docum	sh.2	0
15	Calibration	15	D:\Mis Docum	sh.3	0

Si bien hasta el momento hemos podido incorporar pocos datos a los dos sistemas, las correlaciones obtenidas son aceptables. Para el caso del PLS obtuvimos una correlación de 0.79 y un % de validación de 70 %.

ii- RNA: Este es un sistema de análisis en niveles. Primero se entrenó una red neuronal que solo diferenciaba piliadas de no piliadas. Este primer nivel jerárquico de la diferenciación tuvo un % de validación de un 95 % (**Fig. 12**). Luego con los espectros de organismos piliados se entrenó otra red que permitíoa la clasificación en 5 grupos según el rango de % de piliacion. Esta etapa, que al igual que el PLS estuvo limitada por el número de muestras, arrojó resultados con % de correcta identificación de un 71 %.



Names	Class	Classification
np6.0	1	piliadas
7p26k.0	1	piliadas
7p12.0	1	piliadas
7p14k.0	1	piliadas
7p17.0	1	piliadas
7p19.0	1	piliadas
7p22k.0	1	piliadas
36p1.0	1	piliadas
36p2.0	1	piliadas
36p3.0	1	piliadas
36p4.0	1	piliadas
40p2.0	1	piliadas
40p3.0	1	piliadas
2sh9.0	2	no piliadas
2sh11.0	2	no piliadas
2sh9.0	2	no piliadas
2sh10.0	2	no piliadas
G2.4	1	piliadas
G1.1	1	piliadas
G1.2	1	piliadas
G1.3	1	piliadas
G2.2	1	piliadas
G2.3	1	piliadas
47np2.0	2	no piliadas
50np4.0	2	no piliadas

Fig. 12 Primer nivel de diferenciación entre células piliadas (clase 1) y no piliadas (clase 2)

Ambos valores son bajos, pero los mismos serán mejorados en la medida que incorporamos nuevos espectros. Todas estas correlaciones se realizan confrontando los datos provenientes de las técnicas espectroscópicas con la técnica de ELISA.

1.3. CONCLUSIONES

1. Se pudieron seleccionar marcadores espectrales para la presencia del pili de *M. bovis*.

2. Se pudo comprobar mediante análisis de cluster que es posible discriminar poblaciones piliadas de no piliadas empleando como ventanas espectrales las regiones: V_1= 1697 – 1682 cm^{-1}, V2 = 1416 - 1411 cm^{-1} y V_3=1383 - 1377 cm^{-1}

3. Los marcadores seleccionados sobre la base de trabajos realizados con una cepa de *M. bovis* la cual presente un serotipo tipo A de pilina pudieron ser extendidos a otros serotipos de pili, lo cual demostró el carácter general de los mismos.

4. Se estableció que dos de los marcadores espectrales seleccionados corresponden a la región de absorción del grupo N-acetilo y a una deformación de la señal por la agregación de las células piliadas.

5. Análisis preliminares empleando técnicas multivariantes cuantitativas (PLS y RNA) mostraron que sería posible determinar mediante las mismas el nivel de piliación celular en *M. bovis*. Estos resultados dadas la reducida cantidad de muestras que incluyeron no superaron el nivel de certeza del 80%. La inclusión de mayor cantidad de datos, que se está realizando en momentos de la presentación de este trabajo contribuirá a otorgar mayor exactitud a los modelos desarrollados.

2. ESTUDIOS DE DIVERSIDAD DE AISLAMIENTOS LOCALES DE *MORAXELLA BOVIS*

En los trabajos previos realizados en nuestro laboratorio sobre 60 aislamientos de *M. bovis* provenientes de distintos lugares de Argentina se pudo determinar la existencia de 15 subgrupos distintos en base a un análisis de fingerprints de ADN, perfiles de PME y de LPS (Prieto y col 1999). Sin embargo este esquema de clasificación es complejo, requiere de gran cantidad de insumos y demanda excesivo tiempo. Por esta razón se decidió investigar si la técnica de FT-IR podía ser utilizada alternativamente para facilitar la caracterización e identificación de estos y de posteriores aislamientos.
Los métodos bioquímicos permitieron agrupar los 60 aislamientos de *M. bovis* en 15 subgrupos derivados de **3 tipos de LPS 3 perfiles distintos de PME** y **5 perfiles diferentes de ADN**. A fin de verificar si estas diferencias bioquímicas se correspondían con la respuesta espectral de cada organismo, se tomó una muestra de 10 aislamientos de *Moraxella bovis* (de los 60 existentes en el laboratorio) seleccionados de manera de abarincluircar distintos serotipos de pili(A y G) y cepas de distintas regiones (Córdoba, Pcia de Bs. As. y San Luis).

1. MATERIALES Y MÉTODOS

1.1. Aislamientos bacterianos y condiciones de crecimiento

Se analizaron en este estudio: 1 cepa de *M.bovis* proveniente de la Colección del Instituto Pasteur (CIP,Paris) *M.bovis* ehi 70.39, y 10 aislamientos locales de *M. bovis* (**Tabla 1**). Los aislamientos fueron gentilmente cedidos por el Dr. Gustavo Zielinski del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) de Marcos Juárez, Córdoba, Argentina y fueron obtenidos de ganado con síntomas de QIB, entre 1993 y 1995. Los aislamientos fueron caracterizados como *M.bovis* por tests morfológicos, culturales y bioquímicos (Manual Bergey, 1994) en dicha institución. Cuatro de ellos fueron serotipificados en su tipo de pili por el grupo de la Dra. J. L. Tennent, (Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Parkville, Vic., Australia). Las bacterias fueron mantenidas liofilizadas y cultivadas en agar triptica soja conteniendo 7% (v/v) de sangre de caballo desfibrinada (TSAB, Merck, Alemania). Todas las bacterias fueron además mantenidas a –70ºC en glicerol al 20% en caldo infusión cerebro corazón (BHI, Merck).

Subsequentemente, las bacterias fueron cultivadas en TSAB e incubadas toda la noche a 37°C.

Tabla 1. Aislamientos regionales y cepas de referencia empleadas en este estudio

Procedencia	Fecha de aislamiento	Designación
Córdoba	Marzo-93	Ce3a (G)*, Jp6,
	Noviembre-94	1194-03 (A)*, 1194-04
	Enero-95	195-136
	Febrero-95	295-175
	Marzo-95	395 11
Buenos Aires (Balcarce)	D	B1 (G)*, B27 (C)*
San Luis	Abril-95	CH 1
Paris (CIP)[a]	D	ehi 70.39

*indica el serotipo

D = fecha desconocida

[a] cepa de referencia

1.2. Análisis de los datos espectrales

Se utilizaron dos estrategias de estudio de los espectros:

1) Por análisis de diferentes ventanas espectrales empleando el software Spectrum de Perkin Elmer. Este cuenta con una rutina muy sencilla de realizar que consiste en una comparación ("compare") entre pares de espectros, en un intervalo de frecuencias indicado, dando un % de similitud entre ellos (R). ES importante resaltar que NO COMPARA LAS DERIVADAS DE LOS MISMOS, SINO LOS ESPECTROS A/T. Para realizar esta comparación el software resuelve el siguiente algoritmo:

$$\text{Correlation} = \frac{\sum w_i A_i B_i}{(\sum w_i A_i A_i)^{1/2} \times (\sum w_i B_i B_i)^{1/2}}$$

Donde Ai y Bi son los valores de absorbancia de los espectros A y B a las frecuencias i,

Previo a esta comparación todos los espectros fueron normalizados mediante una "normalización máxima" (descripta en el **Capítulo 2**) con respecto al estiramiento C-H a 2930 cm^{-1}, por ser ésta la zona más conservada. La comparación de dos espectros **iguales a un valor de correlación de 1**, y la de **dos espectros totalmente diferentes da 0**. La comparación se realizó en las 5 ventanas espectrales características (Wi) indicadas en el **capítulo 1, Fig. 15 y 16.**

2) Análisis multivariante empleando análisis de cluster construido a través del coeficiente de Pearson y el algoritmo de Ward, empleado en la diferenciación de especies de Lactobacillus (**Capítulo 3**), pero aquí se analizó si es capaz de resolver la heterogeneidad a nivel de cepas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Estudios en base a los espectros A/T en las distintas ventanas espectrales

El primer estudio realizado consistió en un análisis comparativo en las 5 ventanas espectrales de los espectros A/T de las diferentes cepas. La **Fig. 1** muestra 5 de las 10 cepas analizadas. La **Tabla 2** presenta los coeficientes de correlación entre pares de aislamientos calculados para cada ventana (W_1-W_5). El resultado esperado era que cuando se compararan dos cepas que diferían en sus PME, la ventana que debía mostrar la máxima disimilitud (indicada en celeste) debería ser Amida I o II (W_2). Lo mismo cuando se comparan dos que solo diferían en el LPS, la principal diferencia esperada era en la ventana correspondiente a CH (W_1) (indicada en amarillo) y las que pertenecían distinto grupo respecto al agrupamiento por ADN se esperaba una menor correlación, mayor disimilitud, en la ventana mixta (W_3), indicada en rojo. Si bien en alguno de los casos esto se cumplía, en la mayoría se vió que la zona que arrojaba las máximas disimilitudes, independientemnte del grupo que se estaba considerando era la zona del fingerprint (W_5). De modo que la espectroscopía IR detectaba diferencias entre organismos pero no existía correlación con la agrupación obtenida por métodos bioquímicos y genéticos, lo cual estaría indicando que el espectro IR representa en conjunto toda la composición molecular de las bacterias y no es posible analizarlo solo por ventanas independientes.

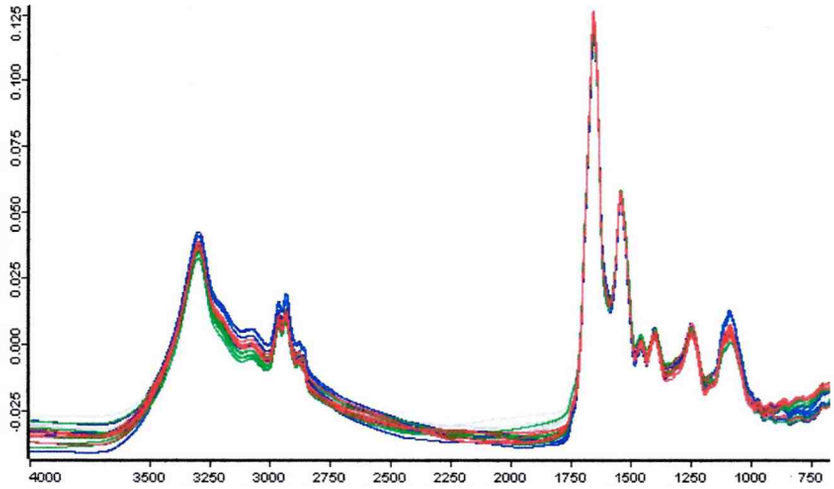


Fig 5 Espectros A/T correspondiente a 5 aislamientos locales de *M bovis:* Ce3a, Jp6, 1194-03, CH1, ehi70.39

Tabla 2. Coeficientes de correlación entre pares de aislamientos

Microorganismos comparados	Tipo de Caract. Bioqca.			Difieren en	Coeficiente de correlación				
	ADN	PME	LPS		Global	W1	W2	W3	W4
Mb 1194 03 Mb 1194 03	1 1	2 2	1 1	-	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Mb 1194 03 Mb B27	1 1	2 2	1 1	-	0.935	0.996	0.991	0.977	0.903
Mb ehi Mb CH1	3 5	3 3	2 2	ADN	0.973	0.998	0.992	0.935	0.717
Mb 1194 03 Mb B1	1 1	2 2	1 2	LPS	0.949	0.997	0.985	0.932	0.858
Mb B19 Mb B1	1 1	1 2	2 2	PME	0.894	0.980	0.834	0.992	0.982
Mb B27 Mb CH1	1 5	2 3	1 2	ADN/PME / LPS	0.936	0.994	0.985	0.944	0.713
Moraxella bovis *Bordetella pertussis*				GÉNERO	0.695	0.925	0.697	0.821	0.589

De los resultados obtenidos en este estudio se puede inferir que la comparación de espectros es adecuada para diferenciar bacterias de distinto género. Sin embargo, no fue posible establecer correlaciones con los otros métodos (ADN, protínas y lípidos).

En base a estos resultados decidimos analizar los espectros de los aislamientos de *M. bovis* empleando una segunda alternativa que era por análisis de reconocimiento de patterns. En este caso utilizamos el software Opus que permite, como se estudió en capítulos anteriores, analizar las derivadas por diferentes métodos multivariantes.

2. Diferenciación de cepas por métodos multivariantes

2.1. Estudios de reproducibilidad

Tal como se indicó en los **Capítulos 2 y 3**, antes de realizar cualquier tratamiento multivariante, los espectros deben ser más de 25 espectros de cada una de las cepas a través de un análisis de cluster obtenido mediante el cálculo del algoritmo *Normalization to reprolevel* y el método de clasificación la unión promedio ("*average linkage*") en este caso usamos dos rangos 3400-2800 cm^{-1} y 1800-800 cm^{-1}. Debido a que *M. bovis* se puede presentar en fase piliada o no piliada, se analizaron ambos fenotipos separadamente. La **Fig. 5** representa el análisis de reproducibilidad de la cepa 1194-03 para los dos fenotipos en ambas ventanas. Los espectros replicados para las bacterias piliadas (indicadas en rojo en la figura) presentaron mayor heterogeneidad debido a la presencia de cantidades variables de pilis, en tanto que los espectros registrados a partir de bacterias no piliadas (indicadas en azul) se mostraron más homogéneos. El dendrograma obtenido en las dos ventanas espectrales, muestra la reproducibilidad espectral para las células piliadas, con un valor de **RL_2 = 25** (**Fig. 6**), y un valor de 10 para la distancia espectral de las células no piliadas (**Fig. 7**) Por esta razón, **para independizarnos de la heterogeneidad que trae aparejada la presencia de cantidades variables de pili es que se usaron para los análisis espectrales comparativos, células no piliadas,** La **Fig. 8** muestra la reproducibilidad de los fenotipos no piliados de 4 aislamietnos de *M, bovis*. Todos ellos dieron valores de varianza bajos, el máximo valor de RL_2 obtenido dentro de las 11 cepas estudiadas fue de 10 (RL_2<10), lo cual indica una muy buena reproducibilidad para continuar con la diferenciación entre los aislamientos.

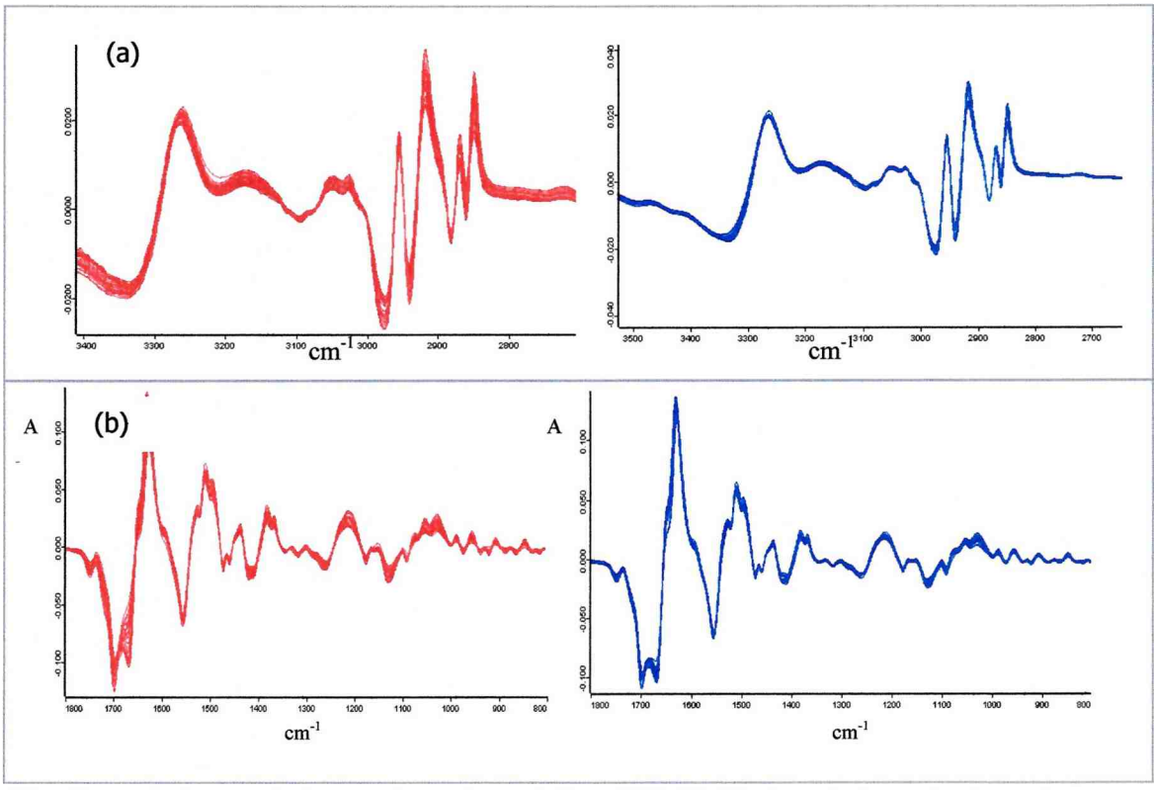


Fig. 5. Derivada 1ra de espectros de *M. bovis* 1194 03, piliados (-) y no piliados (-), (25 replicados de cada fenotipo) en las ventanas espectrales (a) 3400-2800 cm^{-1}. y (b) 1800 –800 cm^{-1}, comparación de la heterogeneidad en los espectros para los dos fenotipos

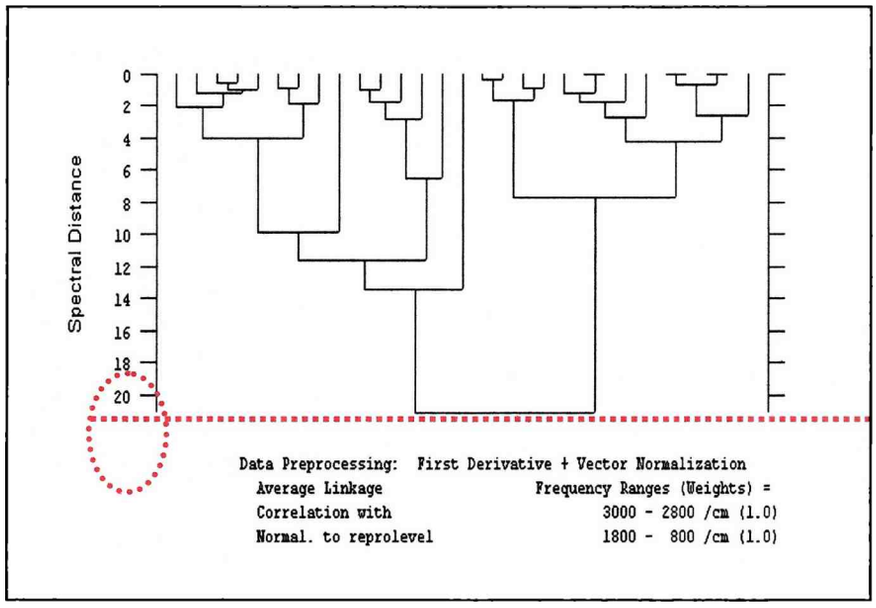


Fig. 6 Reproducibilidad obtenida para más de 30 replicados provenientes de 6 cultivos independientes del **fenotipo piliado** de *M. bovis* 1194-03 (RL_2= 25)

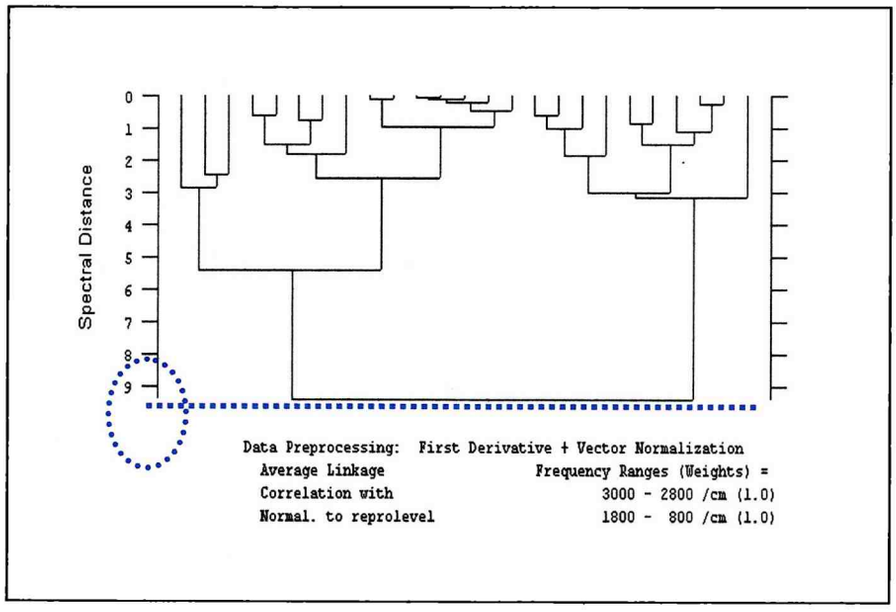


Fig. 7. Dendrograma que muestra la reproducibilidad de mas de 25 espectros obtenidos de 5 cultivos independientes del fenotipo **no piliado** de *M. bovis* 1194-03 (RL_2= 10).

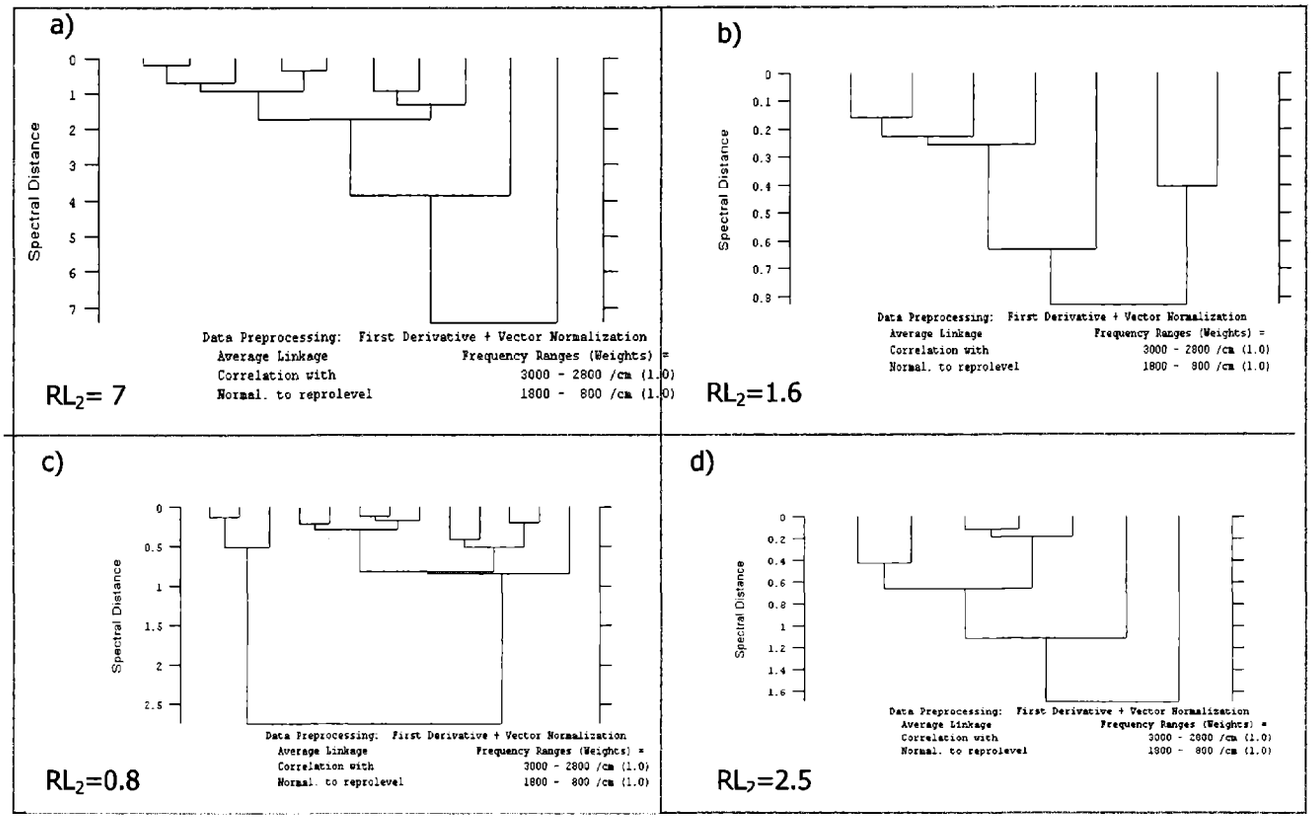


Fig. 8. Dendrograma de reproducibilidad con 4 aislamiento *M. bovis*, fenotipos no piliados, a) 195-175, b) Ce3a, c) 1194-04 y d) B27.

2.2.Diferenciación entre los aislamientos

La **Fig. 9** muestra las derivadas primeras de los 11 aislamientos de *M. bovis* analizados en sus fenotipo no piliados. Entre ellos se incluyó la cepa de referencia *M. bovis* ehi 70.39 de la Colección del Instituto Pasteur (CIP, París). Sobre estas derivadas realizando el mismo procedimiento aplicado para la diferenciación de lactobacilos, se buscaron las ventanas espectrales que mostraron la mayor diferenciación a nivel de su derivada primera. Las cuatro ventanas seleccionadas para establecer la diferenciación entre los aislamientos fueron: **a) 3020-2820 cm^{-1}, b) 1750-1400 cm^{-1}, c) 1500-1220 cm^{-1} y d) 1200-700 cm^{-1}.** En base a estos rangos espectrales se realizó el análisis de cluster aplicando el coeficinte de Pearson y el algoritmo de Ward para representar el correspondiente dendrograma (**Fig. 10**).

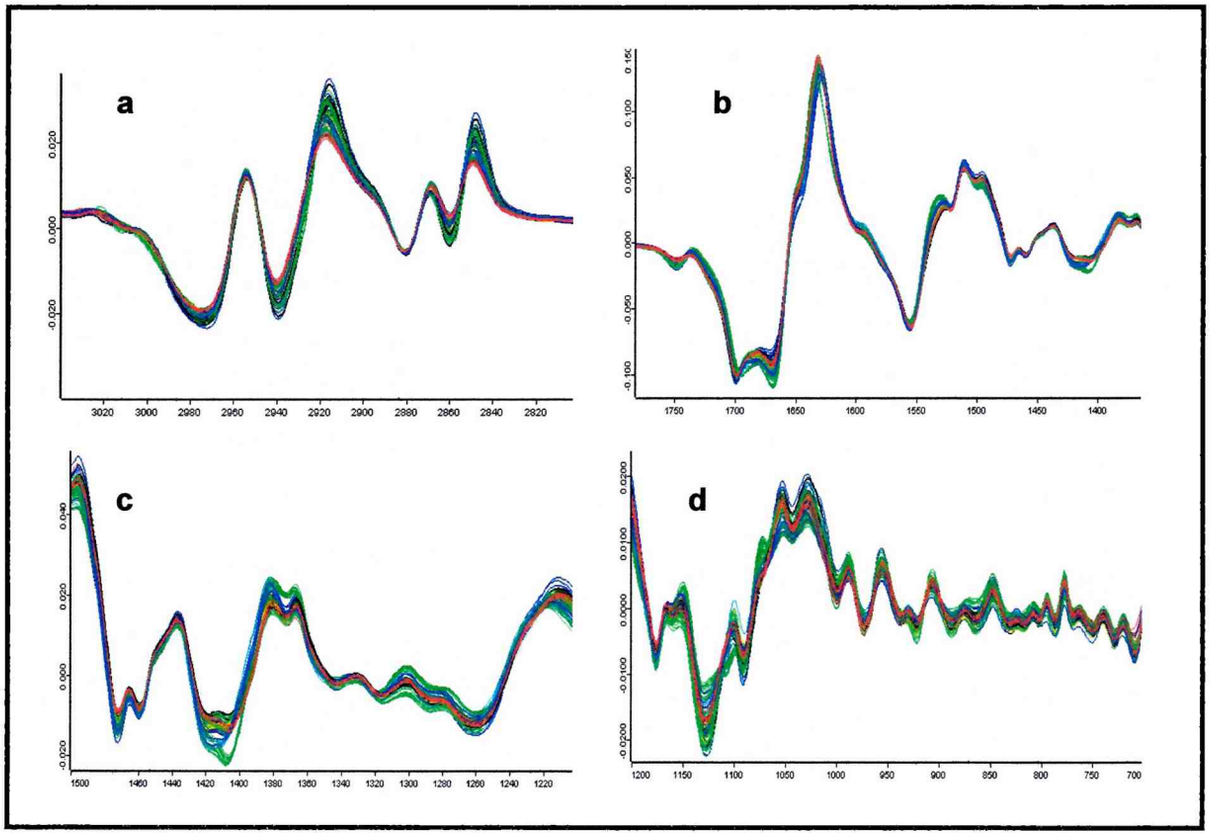


Fig. 9 Ventanas espectrales que mostraron la máxima discriminación en las derivada primera de los 11 aislamientos de *M. bovis* (fenotipos no piliados) analizados.: a) 3020-2820 cm^{-1}, b) 1750-1400 cm^{-1}, c) 1500-1220 cm^{-1} y d) 1200-700 cm^{-1}.

El dendrograma obtenido revela que FT-IR es capaz de discriminar los aislamientos de fenotipo no piliado *de M. bovis* a nivel de cepa. Además, la clasificación obtenida por FT-IR se correlacionó con el agrupamiento genético obtenido por PCR. En el extremo superior de la **Fig. 10** se señala el genotipo de los aislamientos de *M. bovis correspondiente a la clasificación realizada* por Prieto (Prieto 2004). Se observa que la técnica espectroscópica vibracional podría tener a su vez, mayor capacidad discriminatoria que la técnica genética, ya que aislamientos que tienen el mismo tipo de genotipo son agrupados en clusters separados por FTIR.

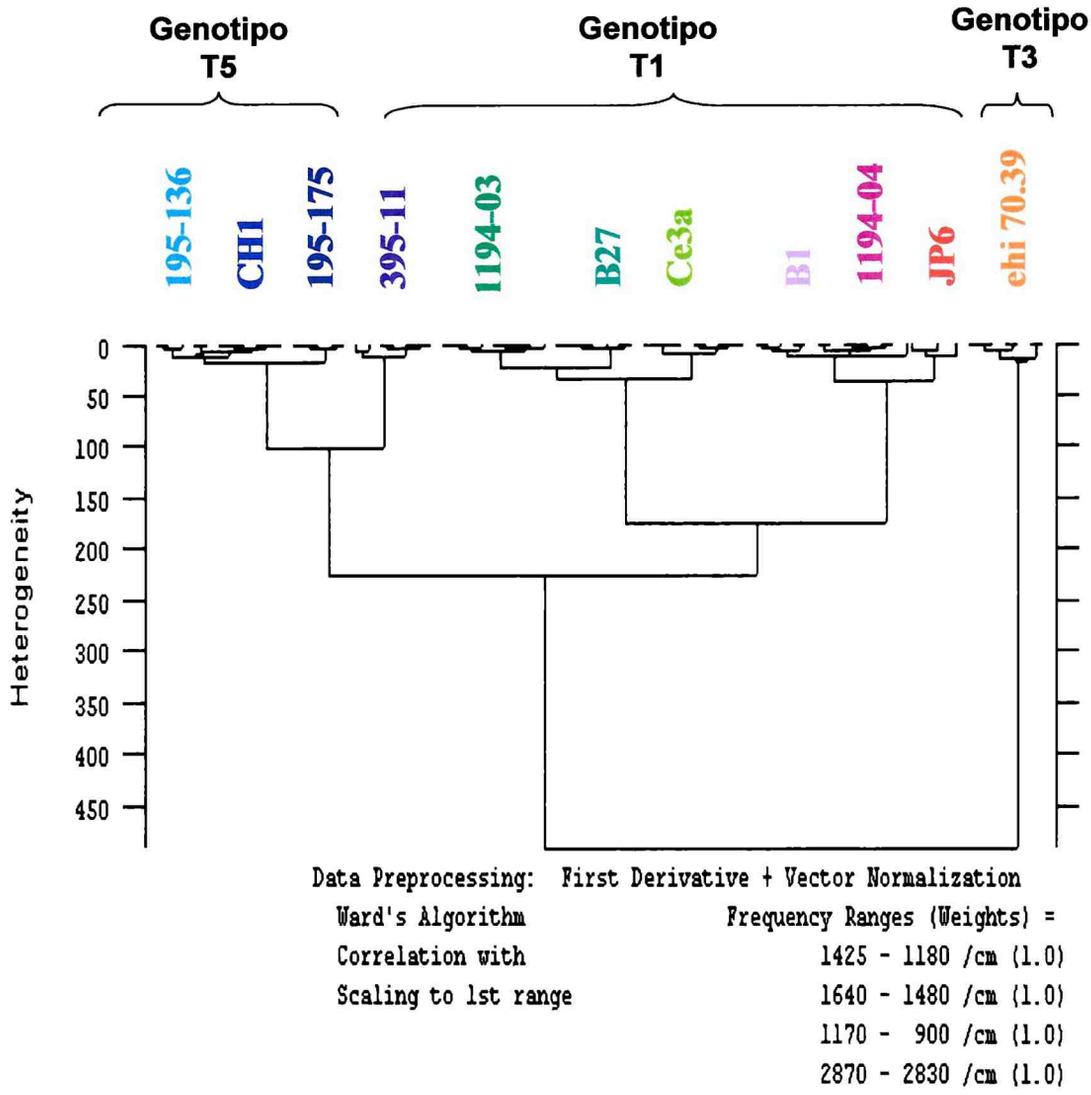


Fig. 10. Dendrograma de análisis jerárquico de cluster correspondiente a 11 aislamientos diferentes de *M. bovis* no piliadas. El análisis de cluster fue realizado utilizando las derivadas primeras, considerando los rangos espectrales 2870-2830, 1640-1480, 1425-1180 y 1170-900 cm^{-1}. Se aplicó el logaritmo de Ward y se usó el coeficiente de correlación de Pearson para el cálculo de la matriz de distancias. En el extremo superior se detallan los genotipos de los aislamientos determinados por PCR.

Estos resultados confirman que FT-IR es una herramienta de gran poder discriminatorio y apropiada para diferenciar aislamientos de *M. bovis* no piliados.

Una vez establecidas las bases para esta diferenciación a nivel de cepa, estamos incorporando el resto de las cepas que dispone el laboratorio tratando de obtener sus fenotipos no piliados e incorporarlos al esquema propuesto. Sin embargo, se está notando que de muchos aislados no es posible obtener el fenotipo piliado, aún creciéndolos en medio líquido, por lo que estamos tomando como estrategia independizarnos del fenotipo y hacer un pre-tratamiento a las suspensiones. Este tratamiento consiste en realizar un shereado por 3 minutos de las suspensiones bacterianas de DO_{650} 10, para extraer los pili por acción mecánica, luego centrifugar la suspensión, descartar el sobrenadante (que contiene los piii shereados) y realizar las medidas de los espectros sobre las células ahora sin piliación. Esta metodología está arrojando muy buenos resultados, mejorando la reproducibilidad, aún con valores menores de RL_2 a los obtenidos con células no piliadas.

3. BIBLIOGRAFÍA

1. Aikman, J.G., Allan, E.M. and Selman, I.E. 1985. Experimental production of infectious bovine keratoconjunctivitis. Vet. Rec. 7; 117 (10): 234-239.
2. Annuar, B.O. and Wilcox, G.E. 1985. Adherence of *Moraxella bovis* to cell cultures of bovine origin. Res. Vet. Sci. 39: 241-246.
3. Beard, M.K. and Moore, L.J. 1994. Reproduction of bovine keratoconjunctivitis with a purified hemolytic and cytotoxic fraction of *Moraxella bovis*. Vet. Microbiol. 42: 15-33.
4. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Ninth edition. Williams & Wilkins. 1986. Vol. 1: 296-302. Baltimore/London
5. Bovre, K. and Froholm, L.O. 1972. Variation of colony morphology reflecting fimbriation in *Moraxella bovis* and two reference strains of *M. nonliquefaciens*. Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B, 80, 629.
6. Chandler, R.L., Baptista, P.J.H., Turfrey, B. 1979. Studies on the pathogenicity of *Moraxella bovis* in relation of Infectious Bovine Keratoconjunctivitis. J. Comph. Path. 89: 441-448.

7. Dalrymple, B. and Mattick, J.S. 1987. An analysis of the organization and evolution of type 4 fimbrial (MePhe) subunits proteins. J. Mol. Evol. 25, 261.
8. Depiazzi, L.J. and Richards, R.B. 1985. Motility in relation to virulence of *Bacteroides nodosus*. Vet. Microbiol., 10: 107.
9. Jackman, S.H. and Rosenbusch, R.F. 1984. In vitro adherence of *Moraxella bovis* to intact corneal epithelium. Curr. Eye Res. 3: 1107-1112.
10. Kagonyera, G., George, L.W. and Munn, R. 1988. Light and electron microscopic changes in corneas of healthy and immunomodulated calves infected with *Moraxella bovis*. Am. J. Vet. Res. 49: 386-395.
11. Kagonyera, G., George, L.W. and Munn, R. 1989. Cytopathic effects of Moraxella bovis on cultured bovine neutrophils and corneal epithelial cells. Am. J. Vet. Res. 50, 10-17.
12. Lehr, C., Jayappa, H.G. and Goodnow, R.A. 1985. Serological and protective characterization of *Moraxella bovis* pili. Cornell Vet. 75, 484.
13. Lepper A. and Barton I. 1987. Infectious bovine keratoconjunctivitis: seasonal variation in cultural, biochemical and immunoreactive properties of *Moraxella bovis* isolated from the eyes of cattle. Aust. Vet. J.; 64: 33-39.
14. Lepper, A.W.D and Hermans, L.R. 1986. Characterisation and quantitation of pilus antigens of *Moraxella bovis* by ELISA. Aust. Vet. J., 63, 401-405.
15. Lepper, A.W.D., Atwell, J.L., Lehrbach, P.R., Schwartzkoff, C.L., Egerton, J.R. and Tennent, J.M. 1995. The protective efficacy of cloned *Moraxella bovis* pili in monovalent and multivalent vaccine formulations against experimentally induced infectious bovine keratoconjunctivitis (IBK). Vet. Microbiol. 129: 138 vol 45.
16. Lepper, A.W.D., Elleman, T.C., Hoyne, P.A., Lehrbach, P.R., Atwell, J.L., Schwartzkoff, C.L., Egerton, J.R. and Tennent, J.M. 1993. A *Moraxella bovis* pili vaccine produced by recombinant DNA technology for the prevention of Infectious Bovine Keratoconjunctivitis. Vet. Microb. 36: 175-183.
17. Moore, L.J. and Lepper, A.W.D. 1991. A unified serotyping scheme for *Moraxella bovis*. Vet. Microbiol. 29, 75-83.
18. Moore, L.J. and Rutter, J.M. 1987. Antigenic analysis of fimbrial proteins from Infecciosa Bovina (QIB). Rev. Med. Vet. 77: 19-23.
19. Ottow, J.C.G. 1975. Ecology, physiology and genetics of fimbriae and pili. Annu. Rev. Microbiol., 29, 79-108.
20. Paolicchi, F., Casaro, A.P., Altuna, A.M., Terzolo, H.R. 1991. Evaluación de una bacterina piliada contra Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina causada por *Moraxella bovis*. Rev. Arg. Prod. Anim. Vol. 11 2: 241-248.

21. Parge, H.E., Forest, K.T., ahickey, M.J., Christensen, D.A., Getzoff, E.D. and Tainer, J.A. 1995. Structure of the fibre-forming protein pilin at 2.6 Å resolution. Nature 378:32-38.

22. Pedersen, K.B. 1970. *Moraxella bovis* isolated from cattle with infectious keratoconjunctivitis. Acta Pathol. Microbiol. Scand. [B] 78: 429-434.

23. Pedersen, K.B., Froholm, L.O. and Bovre, K. 1972. Fimbriation and colony type of *Moraxella bovis* in relation to conjunctival colonisation and development of keratoconjunctivitis in cattle. Acta Pathol. Microbiol. Scand, Sect. B, 80, 911-918.

24. Prieto, C.I; Aguilar, M.O; Yantorno, O. M.1999. Analisis of lipopolisacharides, outer membrane proteins and DNA fingerprints reveal intraespecies diversity in Moraxella bovis isolated in Argentina. Vet microbial 70: 213-223

25. Prieto, C. I; Rodriguez, M. E.; Bosch, A. Chirdo, f. and Yantorno, O. M. 2003. Vet. Microbiol 91: 15557-168

26. Pugh, W.G., McDonald, T.J., Kopecky, K.E and Beall, C.W. 1980. Experimental Infectious Bovine Keratoconjunctivitis: effects of feeding colostrum from vaccinated cows on development of pinkeye in calves. Am. J. Vet. Res. 41:1611-1614.

27. Punch P. and Slatter D. 1984. A review of infectious bovine keratoconjunctivitis. Vet. Bull. ; 54: 193-257.

28. Rogers, D. G., Cheville, N. F., nad Pugh, G. W. 1987. Pathogenesis of corneal lesions caused by *Moraxella bovis* in gnotobiotic calves. Vet. Pathol. 24: 287-295.

29. Ruehl, W:W:, Marrs, C:F:, Fernandez, R., Falkow, S. and Schoolnik, G. 1988. Purification, characterization and pathogenicity of *Moraxella bovis* pili. J. Exp. Med. 168: 983-1002.

30. Sandhu, T.S., White, F.H. and Simpson, C.F. 1974. Association of pili with rough colony type of *Moraxella bovis*. Am. J. Vet. Res., 35, 437-439.

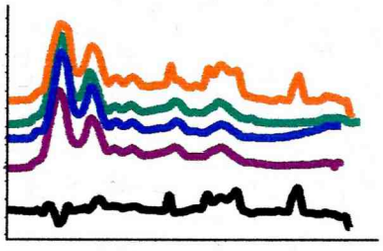
31. Schurig, G.G., Lightfoot, D.R., Troutt, H.F. and Finkler, B.J. 1984. Genotypic, phenotypic and biological characteristics of Moraxella bovis. Am. J. Vet. Res. Vol 45, Nº 1, 35-39.

32. Simpson, C.S., White, F.H. and Sandhu, T.S. 1976. The structure of pili (fimbriae) of *Moraxella bovis*. Can. J. Comp. Med. 40: 1-4.

33. Wilcox, G.E. 1970. An examination of *Moraxella* and related genera commonly isolated from the bovine eye.J. Comp. Pathol. 80: 65-74.

CAPÍTULO 5

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE CULTIVOS EN BIOFILM POR MÉTODOS BIOQUÍMICOS Y ESPECTROSCÓPICOS



1. INTRODUCCIÓN

1.1. Biofilms microbianos

Nuestra percepción de las bacterias como formas de vida unicelulares, está profundamente enraizada en el paradigma del cultivo puro. Desde que las bacterias pudieron ser diluidas a simples células y estudiadas en cultivos líquidos, este modo de crecimiento fue explotado y usado para estudiar muchas actividades bacterianas. Aunque esta forma tradicional de cultivar organismos ha sido la comúnmente empleada en microbiología y permitió conocer facetas importantes de la fisiología de los mismos, la concepción de células nadando libremente en medios líquidos (células planctónicas) en cultivos puros, dista mucho de representar la forma en que las bacterias existen en la naturaleza. Observaciones microscópicas directas y técnicas recuperativas cuantitativas en una amplia variedad de hábitat naturales ha establecido en forma inequívoca que la mayoría de los microbios viven y persisten adheridos a superficies dentro de ecosistemas estructurales denominados biofilms, y no como organismos flotando libremente en soluciones acuosas (Brown y Barrer, 1999; Costerton y col., 1987; Costerton y col., 1995; Costerton y col., 1999; Donlan y Costerton, 2002). Se debe resaltar, que aunque los microorganismos puedan tener una existencia independiente, como células planctónicas, un modo de vida interdependiente, en el cual ellos funcionen como una parte integral de una población o comunidad, es también posible y es en efecto más típico (Shirtliff y col., 2002).

Debido a que los biofilms bacterianos causan serios problemas en sistemas industriales de tratamiento de agua, los profesionales que manejan estos sistemas fueron los primeros en desarrollar técnicas de muestreo de bacterias adheridas a cañerías y métodos para controlar sus costosas acciones. Actualmente los biocidas usados para proteger instalaciones industriales son testeados de rutina para establecer su eficacia en destruir y controlar este tipo de poblaciones.

El consenso de que las bacterias crecen preferentemente dentro de matrices en sistemas industriales y naturales no fue inmediatamente aceptado en las áreas médicas y dentales, a pesar de la aceptación universal de que una placa dental es un tipo de biofilm. Sin embargo, con los avances de los nuevos métodos para la observación directa de biofilms, pronto se pudo constatar que los organismos que causan muchas infecciones crónicas y la colonización de aparatos médicos crecen formando este tipo de estructuras (Costerton y col., 1987; Costerton y col., 1999). En los últimos 20 años se ha producido un notable incremento en el número de publicaciones internacionales relacionadas con el estudio del comportamiento de microorganismos adheridos a superficies. Esto es una evidencia de que los microbiólogos han gradualmente incorporado, que esta forma de crecimiento representa la manera clásica en que los organismos se desarrollan en la naturaleza.

Las superficies sobre las que crecen poblaciones microbianas pueden ser tanto bióticas como abióticas. Ejemplos de esta forma de crecimiento se pueden observar en: a) **cañerías**, donde determinadas bacterias producen corrosión biológica; b) **tejidos**, donde los organismos adheridos pueden dar lugar a efectos benéficos (flora intestinal) o perjudiciales (procesos infecciosos como los descritos en otitis media, fibrosis quística (Lam y col., 1980), endocarditis bacteriana) (Fux y col., 2005); c) lodos en tratamiento de efluentes (Costerton y col., 1987; Costerton y col., 1999).

El desarrollo de una población adherida sobre determinada superficie (células sésiles) da lugar a la formación de un biofilm. La definición de biofilm ha evolucionado en los últimos 25 años. Costerton y colaboradores, en el Center for Biofilm Engineering, Montana State University, USA (uno de los centros de investigación más importantes a nivel mundial en esta temática), han definido a los biofilm microbianos como comunidades de microorganismos embebidas en una matriz polimérica extracelular (EPS) que ellos mismos producen (Donlan y Costerton, 2002). Estas matrices están constituidas por materiales altamente hidratados predominantemente aniónicos, donde prevalecen exopolisacáridos ácidos, aunque también se han detectado proteínas, lipopolisacáridos y ácidos nucleicos (Allison y Sutherland, 1987; Davies y col., 1993; Qadri y col., 1994; Sutherlan, 2001).

Como otros sistemas en desarrollo, la construcción de un biofilm requiere de una serie discreta y bien regulada de etapas. Mientras el exacto mecanismo molecular involucrado en este proceso puede diferir de un organismo a otro, las etapas de desarrollo de un biofilm parecen ser conservadas entre un amplio rango de microorganismos. Estas etapas incluyen: 1) adhesión de células a una superficie; 2) crecimiento y agregación de células en microcolonias; 3) maduración y mantenimiento de la arquitectura; 4) desprendimiento de células de la estructura para colonizar otros ambientes (Donlan y Costerton, 2002; Davey y O´Toole, 2000; van Loosdrecht y col., 1987,). La **Fig. 1** muestra el mecanismo de formación de biofilms descripto por Davey y O´Toole para la formación de biofilm de *Pseudomonas*.

Se ha demostrado que los agrupamientos de altas densidades microbianas en biofilms, caracterizados por gradientes en la concentración de oxígeno, nutrientes y productos metabólicos excretados por las células, dan lugar a que **las células sésiles, presentes en los mismos, exhiban fenotipos diferentes a los expresados en cultivos en medios líquidos y sólidos** (Becker y col., 2001; de Beer y col., 1994; Evans y col., 1994; Prigent-Combaret y col., 1999; Vandevivere y Kirchman, 1993). La adhesión y el crecimiento de células adherido a superficies así como las comunicaciones intercelulares, principalmente el contacto físico entre células (agregación celular), juegan un rol clave no sólo en la formación del biofilm sino que tienen una gran influencia en la expresión de genes que controlan la producción de componentes bacterianos necesarios para consolidar la adhesión y formación final del biofilm (Vandevivere y Kirchman, 1993, Voloshin y Kaprelyants, 2004).

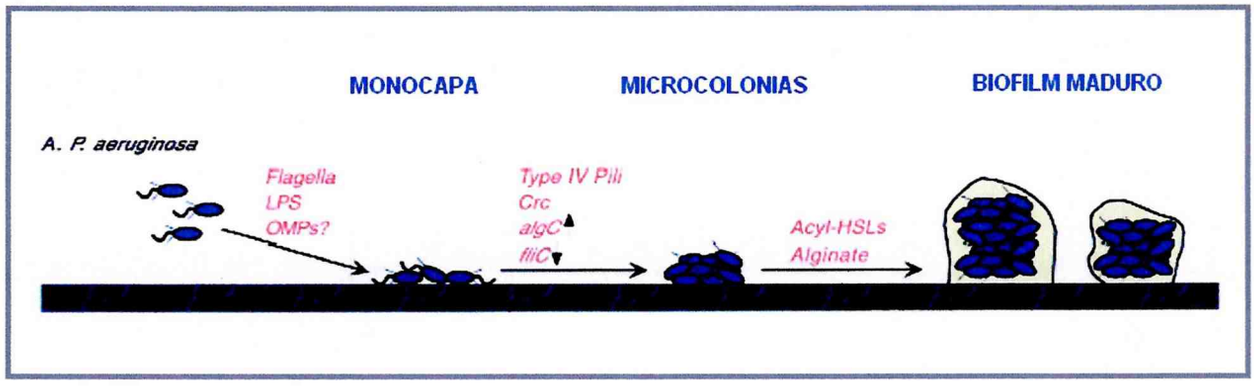


FIG. 1. Desarrollo de biofilms de *P. aeruginosa*. El esquema representa los principios que rigen las primeras etapas de formación de biofilms. **1ro** requiere un flagelo para que la bacteria alcance la proximidad de la superficie y LPS media **las primeras interacciones**, probablemente también proteínas de membranas externa (OMPs) cumplan algún rol. **2do** una vez que las bacterias se encuentran sobre la superficie en una monocapa, el *twiching motiliy* del pili tipo IV es requerido para que se produzca la **agregación de las células en microcolonias. 3ro** ocurren cambios en la expresión de genes, que incluye una desregulación positiva del gen de la biosíntesis de alginato y una desregulación negativa de la síntesis del flagelo. **El biofilm maduro** se forma con la producción de señales tipo *quorum sensing* (acyl-homoserin-lactonas), el alginato también podría jugar un papel estructural en este proceso. Tomado de Davey y O´Toole, 2000.

Por ejemplo en *Pseudomonas aeruginosa* se ha demostrado que los genes involucrados en la síntesis de alginato (*algC*) son des-regulados dentro de los primeros minutos de adhesión a una superficie sólida (Davies y Geesey, 1993; De Kievit y col., 2001; Uhlinger y White, 1983). Algunos trabajos con *Staphylococcus* spp. describen más de 45 genes des-regulados durante la formación del biofilm en relación a las mismas células crecidas en medios líquidos (Becker y col., 2001; Mack y col., 2000). Por lo tanto **en las nuevas definiciones de biofilm se deben tener en cuenta, no sólo características observables como adhesión irreversible a determinada superficie, formación de una matriz exopolimérica, sino también atributos fisiológicos como alterada velocidad de crecimiento, estructura de la construcción y el hecho de que en biofilm los organismos transcriben genes que las células planctónicas no expresan** (Cucarella y col., 2002; Hentzer y col., 2001).

La naturaleza de la estructura del biofilm y los atributos fisiológicos de las células sésiles confieren a estos organismos una resistencia característica a agentes antimicrobianos como antibióticos, desinfectantes y germicidas. Se han reportado en este sentido importantes

diferencias entre las **resistencia a antibióticos** de células sésiles y planctónicas. Los mecanismos responsables de la resistencia pueden ser uno o más de los siguientes:

- disminuida penetración del agente antimicrobiano a través de la matriz del biofilm;
- alterada velocidad de crecimiento de los organismos que integran el biofilm
- otros cambios fisiológicos debido al modo de crecimiento en biofilm (Ceri y col., 1999; Donlan y Costerton, 2002).

También se ha demostrado el incremento en la **resistencia a los mecanismos de defensa del hospedador** y que estos aspectos diferenciales constituyen la base de su persistencia en muchos ambientes y de muchas infecciones bacterianas crónicas (Brown y Williams, 1985; Cheng y col., 2001; Costerton 1985).

"Quórum sensing" es un mecanismo para regular la expresión de genes en respuesta a cambios en la densidad celular de una población bacteriana. En bacterias Gram-negativas autoinductores derivados de N-acil homoserin lactonas (HSL) parecen ser las moléculas señales más comunes. La acumulación continua en el entorno celular de estas moléculas asociada a una alta densidad de células, hace que en un momento se **alcance un "quórum" suficiente que lleva a la activación de genes específicos**. Este mecanismo ha sido implicado en la formación de biofilm.

Para las bacterias formar parte de la comunidad de un biofilm tiene entre otras ventajas:

- ✓ la facilidad de interacciones metabólicas debido a la proximidad física de las células
- ✓ el incremento de la transferencia horizontal de genes
- ✓ la protección contra predadores y estrés antimicrobiano.

Sin embargo, el modo de vida en biofilm tiene también sus desventajas.

- ✓ altas densidades celulares pueden resultar en severos gradientes dinámicos de nutrientes y productos metabólicos tóxicos.
- ✓ las bacterias pueden escapar de estas condiciones desfavorables abandonando el biofilm en busca de otras superficies.

1.2. Métodos de examinación y estudio de biofilms

Los métodos para examinar y caracterizar los biofilms han evolucionado en los últimos años. La **Tabla 1** resume los métodos más ampliamente utilizados:

Los primeros estudios se basaban en técnicas **microscópicas de escaneo electrónico (SEM).** Estas técnicas utilizan solventes (alcohol, acetona y xileno) para deshidratar gradualmente la muestra antes de su examinación, ya que el agua de hidratación no es compatible con el vacío usado para el haz de electrones (Donlan y Costerton, 2002). El proceso de deshidratación resulta en una significativa distorsión de la muestra y lleva a la

aparición de artefactos; la sustancia polimérica extracelular, la cual está constituida aproximadamente por un 95% de agua, aparecerá más como fibras que como una gruesa matriz gelatinosa rodeando las células (Karlyshev y col., 2001).

Tabla 1. Técnicas de observación de biofilms

TÉCNICA MICROSCÓPICA	CARACTERISTICA
Microscopía electrónica de barrido (SEM)	Deshidratación de la muestra (alcohol, acetona, xilenos)
Microscopía electrónica por transmisión (TEM)	Utilización de colorantes específicos de cápsulas o slimes (rojo de rutenio, azul de Alcian).
Microscopía de laser confocal (SCLM)	Menor grado de magnificación, permite observar los biofilms intactos.
SCLM + Epifluorescencia	Utilización de colorantes fluorescentes. DNA: DAPI, Naranja de acridina, Syto 9. Actividad celular: Ioduro de propidio (PI).Cepas marcadas con la proteína verde fluorescente (GFP). Lectinas marcadas con FITC.
Fuerza atómica	

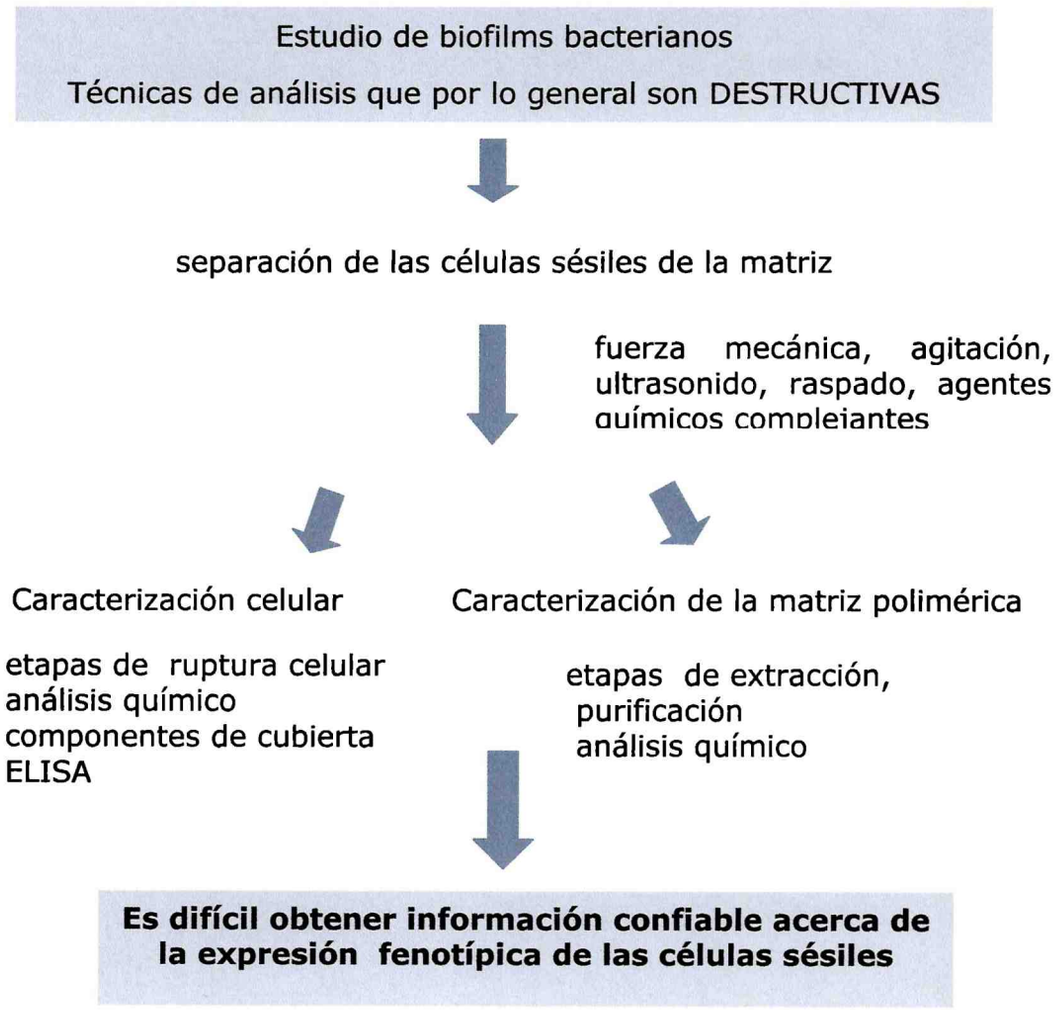
El uso de **microscopía electrónica de transmisión combinada con colorantes específicos (MT)** para polisacáridos, como rojo de Ruthenio, ha permitido a los investigadores identificar la naturaleza de las fibras extracelulares en biofilms y dilucidar mejor su asociación con las células. El microscopio electrónico ha sido usado para la observación y caracterización de biofilms sobre aparatos médicos y en infecciones humanas. Debido a sus excelentes propiedades de resolución el microscopio electrónico, a pesar de sus limitaciones, continua siendo una importante herramienta para el estudio de los biofilms (Karlyshev y col., 2001).

El desarrollo de la **microscopía de escaneo laser confocal (CLSM)** en la década del 80 proveyó a los investigadores con la habilidad de examinar los *biofilms in situ,* sin las limitaciones encontradas en la microscopía de escaneo electrónico, pero con menor magnificación. Esta técnica permite visualizar la matriz del biofilm inalterada e intacta. El uso

de CLSM combinada con fluorescencia, que significó otro avance en el estudio de la arquitectura de los biofilm, requiere que el organismo sea teñido con colorantes fluorescentes. Se emplean en la actualidad distintos tipos de colorantes que permiten cuantificar la biomasa celular y determinar la proporción de células viables (Swope y Flickinger, 1996). En el último tiempo la expresión de una proteína fluorescente verde, producida constitutivamente por las células mediante la inserción de un plásmido, ha permitido que los biofilms sean observados de manera no invasiva, sin fijación ni tinción.

Para estudiar químicamente un biofilm uno de los primeros pasos consiste en la remoción del biofilm o de los organismos asociados al biofilm desde el sustrato mediante algún tipo de fuerza mecánica tal como vortexeado o sonicación seguido por las etapas de análisis de células sésiles y mediciones. El procedimiento continúa con la determinación de células viables (**Esquema 1**). El "fenotipo biofilm" o la expresión de genes específicos y proteínas asociadas con el modo de vida en biofilm ha sido el foco de reciente investigación en biotecnología.

Esquema 1 Estudio de biofilms por métodos destructivos



El monitoreo de las características fenotípicas de una población en biofilm, así como en cualquier otro sistema de crecimiento, implica el análisis de células tomadas del sistema a distintos tiempos de proceso. Para estos estudios se emplean metodologías químicas y bioquímicas. Estos análisis fenotípicos (pruebas de ELISA, estudio de componentes de cubierta, etc), demandan tiempo, son costosos y no proporcionan información en tiempos reales. Como consecuencia en los procesos productivos en general, no es posible hacer, empleando las metodologías clásicas de análisis, acciones correctivas durante el desarrollo de los mismos.

En el estudio de biofilms es esencial poder disponer de técnicas que permitan evaluar el mismo en tiempos reales, sin tener que romper la estructura para separar células de la matriz. En el área de biotecnológica industrial, aún a nivel mundial, existe muy poco desarrollo de metodologías que permitan el monitoreo y eventual control de las características fenotípicas de las células durante su crecimiento (Nivens y col., 1995).

La mayoría de los métodos de estudio de biofilms in vitro están dirigidos a la cuantificación de biomasa y al estudio de composición química del mismo. Esto implica que la arquitectura tridimensional del mismo deba ser destruida y las células sésiles y el EPS analizados, como consecuencia, en forma separada. Estos procedimientos hacen que la información que se tiene acerca de la expresión fenotípica de los cultivos en biofilm diste mucho de ser la real. Sin embargo, avances importantes en el desarrollo de los métodos de análisis que se han implementado en los últimos tiempos, han colaborado al mejor entendimiento y caracterización de los biofilms.

En relación con la evolución de los métodos de análisis de biofilms, en los últimos 20 años se han comenzado a aplicar técnicas espectroscópicas vibracionales para el estudio y caracterización de las poblaciones sésiles adheridas a soportes, en especial para organismos de los géneros *Pseudomonas* y *Streptococcus*. Estas metodologías han permitido la **caracterización fisicoquímica del biofilm *in situ* y en tiempo real** (Naumann, 2000; Nichols y col., 1985; Nivens y col., 1995). Si bien se han desarrollados diversos diseños para estudiar los biofilms por espectroscopía vibracional *in situ,* todos ellos se basan en las medidas por ATR de los microorganismos adheridos sobre celdas de Germanio o ZnSe (transparentes al IR). La **Fig. 2**. representa un monitoreo de la formación de biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* sobre una superficie de ZnSe. En la Fig. 2b, se inica la aparición de las estructuras típicas del biofilm. Aumento de biomasa (Amida I y II), aumento de polisacáridos debido a la matriz exopolimérica y el aumento de azúcares ácidos por la presencia de ácidos urónicos en dichas matrices.

2. OBJETIVOS

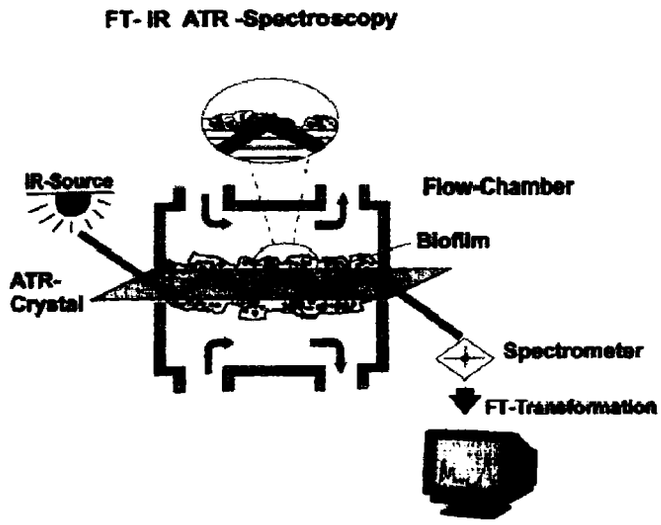
El objetivo base fue iniciar una línea de investigación sobre cultivos de organismos patógenos en biofilms, para lo cual fue necesario estudiar las diferentes formas de examinarlo y analizarlo. Los reslutados obtenidos a partir de estos aportarán un mejor entendimiento de la fisiología de estos agentes infecciosos en ambientes que aproximan mejor el crecimiento in-vivo.

Se seleccionó dentro de esta temática el cultivo de *B. petussis* (agente causal de la tos convulsa) debido a las siguientes razones:

1. el laboratorio tenía experiencia en el manejo de este organismo
2. se disponía de resultados obtenidos en cultivos en medios líquidos, operados tanto en sistema batch (Hozbor y col. 1993; Hozbor y col. 1999), como en continuo (Rodríguez y col. 1994), que permitirían comparar la respuesta fenotípica de las células planctónicas obtenidas en ambos sistemas con la que se obtendría al crecer la población en biofilms,
3. a pesar de que el principal agente etiológico de la tos convulsa, *Bordetella pertussis* coloniza el tracto respiratorio, los trabajos sobre expresión fenotípica de esta bacteria reportados por la bibliografía internacional se han hecho en medios líquidos. No existían al momento de iniciarse las investigaciones publicaciones sobre el crecimiento de *B. pertussis* en biofilms
4. Caracterizar mediante espectroscopía vibracional y métodos químicos el exopolímero producido por células crecidas adheridas a soportes abióticos

Bordetella pertussis y tos convulsa

En las dos últimas décadas varios países dentro de los considerados desarrollados, han reportado un importante incremento en la incidencia de tos convulsa, enfermedad causada principalmente por *Bordetella pertussis,* a pesar de que en los mismos se mantienen altas tasas de vacunación (Cherry y col. 1988). En estos países la transmisión de *B. pertussis* entre adultos es ahora frecuentemente observada, y la enfermedad es reconocida como una de las causas de tos crónica en adultos y de mortalidad infantil en niños menores de 3 años. En nuestro país, con menor cobertura de vacunación, esta situación es aún más crítica. Conjuntamente con el resurgimiento de la enfermedad, se ha detectado la aparición de cepas de *B. pertussis* antigénicamente diferentes de las empleadas en las vacunas tradicionales, las cuales podrían ser las causantes de los picos epidémicos. Si bien las vacunas elaboradas con células enteras, utilizadas en Argentina, son las más difundidas a nivel mundial, vacunas de distintos fabricantes pueden ser muy diferentes, como



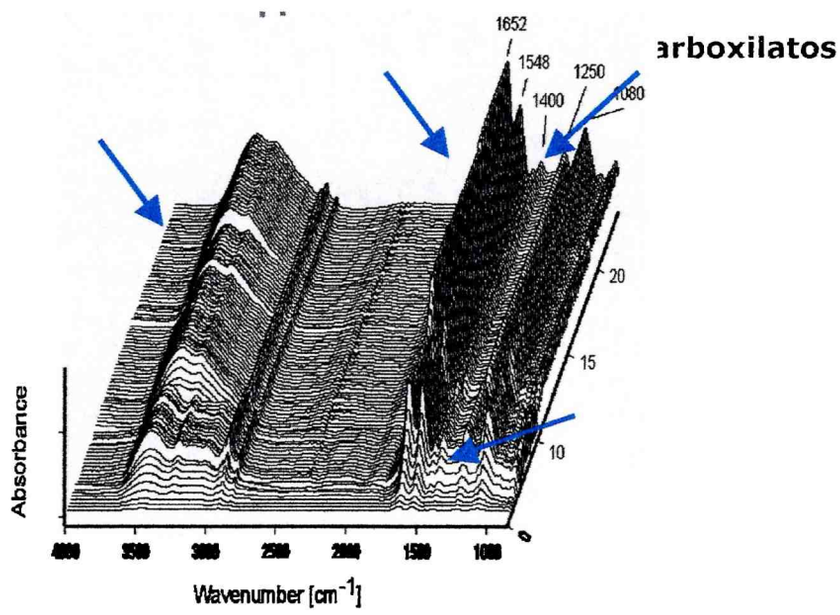


Fig. 2 Respuesta espectral ATR/FT-IR in situ de biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* creciendo sobre una superficie de ZnSe. a) Diseño de una cámara que permite el desarrollo en un sistema continuo. b) Espctros obtenidos a lo largo de 24 horas de incubación.

empleada. En nuestro País las vacunas de uso humano se importan en su tc los países proveedores Dinamarca, India, Francia, Canadá y Estados Unidos. factor, aún no considerado, pero que evidentemente podría tener una gran i eficacia de estas vacunas, se asocia con el procedimiento utilizado en la prc mismas. ***Las vacunas a células enteras se obtienen a partir del desarroll en medios líquidos, donde las células flotan libremente (células plan embargo es conocido que esta forma de crecimiento, en medios (limitaciones de nutrientes, donde las bacterias se reproducen a altas v(interacción entre ellas, dista mucho de ser la forma en que las células cr***

En el caso de *pertussis*, si bien este organismo crece adherido al epit(respiratorio superior, las investigaciones dirigidas a esclarecer los mecanismc la expresión de factores de virulencia y fisiología en general, se han hecl estudio de células cultivadas en medios líquidos (Amano y col., 1990; Belche Coote, 1991; Ewanowich y col., 1989; Graeff-Wohlleben y col., 1985). Por lc de gran interés estudiar la respuesta que adopta *B. pertussis* adherida empleando por ejemplo superficies abióticas como soporte, como una mane en el conocimiento de su comportamiento en el hospedador.

Los biofilms han sido implicados como la principal causa de los procesos infe(patogénesis de varias enfermedades (Costerton y col., 1987; Costerton el al. infecciones son raramente resueltas por el sistema inmune del hospedad células sésiles son resistentes a los mecanismos de defensa, lo cual persistencia. Muchas infecciones crónicas así como la persistencia de hospedadores humano y animal, han sido relacionadas con biofilms m crecimiento lento o no crecimiento (Donlan y Costerton, 2002). Por lo tan células crecidas en forma planctónica en condiciones convencionales, pueda para generar una respuesta inmune apropiada contra organismos que *in v* condiciones ambientales profundamente diferentes, puede ser muy errado.

El análisis de la expresión fenotípica de *B. pertussis* en biofilms res fundamental no solo para avanzar en el conocimiento de la fisiología empleando un modelo de crecimiento que representa mucho mejor el comp vivo, sino también para establecer si la expresión de factores de virulencia se en relación a los cultivos en batch.

Este trabajo tuvo entonces como principal objetivo avanzar en el conoc respuesta adaptativa del organismo al crecimiento en superficie materiales abióticos como modelo de estudio.

Los resultados de una investigación de estas características podrían s
base de conocimientos para poder proponer nuevas estrategias de
agentes. Además se podrá especular que incidencia puede te
comportamiento para el diseño de nuevas vacunas contra pertussis y la
mismas podrían proporcionar.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.- Microorganismos y condiciones de cultivo

Se utilizó *B. pertussis* cepa Tohama (8132) proveniente de la Colec
Pasteur de Paris, Francia (CIP). Cultivos stock fueron mantenidos en 1
% de casaminoácidos a –70 °C.

3.1.1.Cultivos en medio sólido.

Para iniciar cada proceso se sembraron placas con agar Borde
Laboratories, Detroit, MI, USA) suplementadas con 1 % (w/v) de Bac
Laboratories) y 14 % (v/v) de sangre de carnero desfibrinada (BGS
incubaron durante 72 h y se sub-cultivaron por otras 24 h a 36 °C.

3.1.2. Cultivos en medio líquido

I) Cultivos en sistema batch con la cepa Tohama se iniciaron a
cosechadas de placas BGS fueron transferidas a Erlenmeyers de 50
125 ml del medio químicamente definido de Stainer-Scholte (SS) (S
1971), en el cual el glutamato es el sustrato limitante del crecimiento
incubaron a 36°C en un shaker rotatorio a 160 rpm. Se tomaron mue
fases lag, log y estacionaria de crecimiento.

ii) **Cultivos limitados en oxígeno** fueron conducidos en frascos Erlenn
conteniendo 125 ml del medio SS, los cuales fueron incubados en un s
25 rpm durante 4 días. Para monitorear el cultivo se tomaron muestras c

iii) **Cultivos continuos** fueron llevados a cabo con la cepa salvaje en f
vidrio (LH Inceltech 210 Series, LH Fermentation Ltd., UK) de 4 L de cap
con electrodos para la medición y control de pH y porcentaje de oxígeno
volumen de trabajo de 700 ml del medio SS, como se describió en
(Rodríguez *y col.*, 1994, Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exac
reactores fueron monitoreados y controlados desde computadora. Se t
luego de al menos 10 generaciones a partir de que el estado estacionari

3.1.3. Cultivos en biofilm sobre superficies de polipropileno

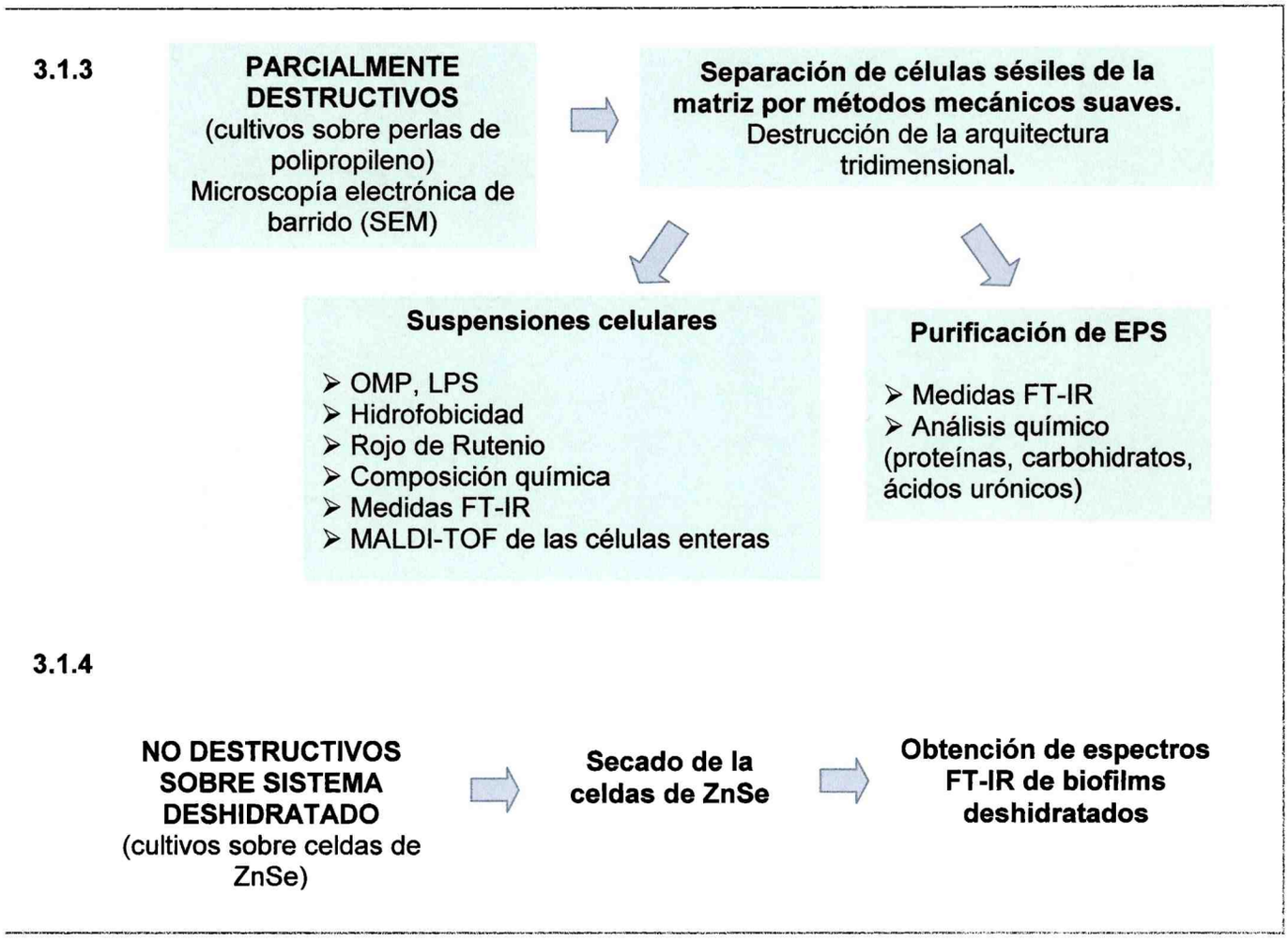
Para el cultivo en biofilms se emplearon columnas de vidrio de 5 cm de diám altura, conteniendo 150 g de perlas cilíndricas de polipropileno (4,2 mm de d de altura, con una densidad promedio de 0,901 fabricadas por la emp Argentina) (Bosch y col., 2000) **(Fig. 3)** Para iniciar cada proceso una su *pertussis* cepa Tohama (125 ml, OD_{650} = 1·0) crecida en medio SS por 1 asépticamente inoculada en cada columna e incubada por 5 h a temperatura permitir la adhesión de las bacterias al soporte. Luego de esta etapa, la sus células no adheridas fue drenada y cada columna cargada con 125 ml de m Los reactores fueron aireados a un caudal de aire de 0,1 L min^{-1}. La temperat a 36°C y cada 48 h el medio agotado fue reemplazado por medio fresco.
Los procesos fueron detenidos a diferentes períodos de tiempo hasta las 1 (24, 48, 72, 96, 120, 140 h). Cada proceso fue repetido al menos 4 veces.

Fig. 3 Columnas de vidrio de diámetro y 55 cm de altura, c 150 g de perlas cilíndricas de p (4,2 mm de diámetro y 2 mm de una densidad promedio de 0 reactores fueron aireados a un aire de 0,1 L min-1. La temp mantuvo a 36°C. Cada 48 h agotado fue reemplazado por me

3.1.4. Cultivos en biofilms *sobre celdas de ZnSe que permiten el análisis* NO DESTRUCTIVA

Este procedimiento consiste en preparar pequeños reactores (cámaras entradas y salidas para medio de cultivo) dentro de los cuales se disponen p vidrio o las ventanas de ZnSe (13 mm de diámetro). El soporte se cubre con de cultivo, se siembran las células provenientes de un cultivo líquid posteriormente cada reactor a 36 °C. Luego de 24 horas se recambia la mit cultivo y comienza la operación de agregado de medio fresco en forma cor horas se retira un soporte con los microorganismos adheridos, se enjuaga c 3 veces con H_2O destilada, se seca y sobre estos biofilms se realiza el estudi En la Figura 2 se describe el procedimiento empleado para la caracterizaci biofilms microbianos empleando métodos destructivos y no destructivos.

Fig. 4 Sistemas de análisis empleados para la caracterización de biofilms de *B. pertussis*



3.1.3.1.- Microscopía electrónica de barrido para análisis de biofilms

Esta técnica se aplicó en el caso de células crecidas en biofilm sobre perlas de polipropileno. Brevemente, se tomaron perlas sobre las cuales se habían formado los biofilms de *B. pertussis* (cultivos en reactores tipo columna con distintos tiempos de crecimiento). las cuales se lavaron cuidadosamente con el objeto de remover las células no adheridas. Luego las muestras fueron fijadas con glutaraldehído al 2.5% en PBS (pH 7.2) durante 3 horas a 4 °C. Posteriormente los biofilms fueron deshidratados mediante incubaciones de 15 minutos cada una en soluciones conteniendo diferentes porcentajes de alcohol (30, 50, 70 y 100 %). Este procedimiento se repitió en cada oportunidad. Finalmente las muestras fueron cubiertas con partículas de oro (fine coat-sputter JFP-1100 JEOL) y examinadas usando un microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM-T100, Museo de Ciencias Naturales de La Plata, Argentina).

3.1.3.2- Recuperación de células adheridas a soportes

Los cultivos en biofilm de *B. pertussis* creciendo sobre perlas de polipropileno contenidas e columnas aereadas, fueron monitoreados al cabo de 24, 48, 72, 96 y 120 h de crecimiento Las perlas de cada columna fueron cosechadas en su totalidad. Las mismas fueron lavada en primera instancia tres veces con agua destilada estéril para separar las células n adheridas. **Las células sésiles posteriormente se separaron de la matriz del biofilm po agitación mecánica. Las perlas se agitaron a 170 r.p.m. durante 15 min en buffer PB (pH 7,2) con KCl (0.27 M) a temperatura ambiente** (Figueroa y Silverstein, 1989). La perlas fueron posteriormente removidas y las **células sésiles cosechadas** po centrifugación a 3,000 g por 15 min a 4oC. Posteriormente las células fueron suspendida en agua destilada estéril. Sub-muestras de células fueron analizadas por FT-II spectroscopy y recuento de organismos viables. El resto de las células fueron congeladas -70°C a la espera de subsecuentes análisis. **Los sobrenadantes** obtenidos de esto procedimientos fueron filtrados con membranas de 0.22 µm. Tres volúmenes de alcohol d 95% fueron adicionados a los sobrenadantes conteniendo los exopolímeros y otro componentes de la matriz y posteriormente precipitados a 4 °C durante toda la noche. E pellet fue colectado por centrifugación (10,000 g, 15 min) y suspendido en agua destilad estéril. Este procedimiento se repitió dos veces, finalmente el **pellet conteniendo e exopolímero fue dializado y liofilizado**. Se purificó y caracterizó el exopolímero producid por métodos químicos y espectroscopía vibracional.

3.1.3.3- Espectroscopía infrarroja de células enteras

Espectros infrarrojos de células enteras fueron registrados empleando lo espectrofotómetro infrarrojo descriptos en el **Capítulo 2**: Brevemente, la células a estudia ya sea de medio líquido, sólido y biofilm, fueron lavadas y suspendidas en H_2O destilad estéril y la suspensión ajustada a una OD_{650nm}~12 (optimizado previamente, **Captítulo 2** El registro de los espectros también fue realizado como se indica en el **Esquema 3 capítulo 2**.

El análisis espectral se basó en el cálculo de áreas integradas para lo cual se procedió com se indica en el **Espquema 4 del Capítulo 2** mediante la aplicación del los software Grams 32 (Galactic Industries Corporation, USA), OPUS 4.1 (Bruker Optics, USA) y Perkin-Elme (Spectrum 3.0).

3.1.3.4- Extracción y análisis de lipopolisacáridos (LPS)

Para la extracción y análisis de LPS las suspensiones bacterianas fueron ajustadas a un misma DO_{650}. Los LPS fueron extraídos de los distintos tipos de células de *B. pertussi* (planctónicas, sésiles y células cosechadas de medio sólido), mediante el método descrit

por Valverde y colaboradores (Valverde y col., 1997), empleando EDTA / TEA / polimixina B. Una digestión proteica fue posteriormente llevada a cabo empleando proteina K (Merck) a una concentración final de 50 μg ml^{-1}; la digestión se realizó a 60 °C durante 1 h. Luego de esta etapa β-mercaptoetanol fue agregado y las muestras calentadas a 100 °C por 10 min y finalmente sonicadas por 15 min. Los LPS extraídos se analizaron mediante geles de Tricine-SDS-PAGE (Tricine-Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis), de acuerdo a la técnica descripta por Lesse y colaboradores (Lesse y colab., 1990). Después de la corrida electroforética por 5 h a 20 mA, las bandas fueron visualizadas por tinción con Plata de acuerdo a la técnica descripta por Hitchcock y Brown (1983).
Alternativamente, cuando se lo indica especialmente, los geles fueron primero tratados con una solución de Alcian blue, un colorante específico para tinción de carbohidratos de cápsula (Pelkonen y colaboradores.; 1988; Qadri y colab., 1994) y luego teñidos con Plata.

3.1.3.5- Extracción y análisis de proteínas de membrana externa (PME)

La extracción de PME se llevó a cabo ajustando el contenido de las células a analizar a los mismos valores de proteínas totales en todas las muestras. Las PME se obtuvieron de células de *B. petussis* por la técnica de Maagd y Lugtenberg (1986), con una solubilización diferencial de cubierta celular con Triton X-100 (Schnaitman, 1971). La separación de las PME se llevó a cabo por medio de SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Después de la corrida electroforética, Coomassie blue R250 (0·2 %, w/v) en metanol (40 %, v/v) y ácido acético (10 %, v/v) fue empleado en la visualización de bandas. Los pesos moleculares se estimaron corriendo en paralelo patrones de bajo peso molecular de Pharmacia Calibration Kit (Pharmacia Biotech).

3.1.3.6.- Determinación del contenido de proteínas totales

Fue estimado en los distintos tipos de células por el método de Lowry y col. (1951) empleando seroalbúmina bovina como estándar (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo).

3.1.3.7.- Determinación de carbohidratos

El contenido de carbohidratos neutros en células de *B. pertussis* fue determinado mediante el método de Dubois y colaboradores (1956). Los resultados se expresaron en base a glucosa total (mg mg^{-1}).

3.1.3.8.- Medidas de hidrofobicidad

La hidrofobicidad de células provenientes de distintas condiciones de cultivo fue obtenida mediante la adhesión de suspensiones bacterianas a hidrocarburos. Esto se determinó por

medio del coeficiente de remoción (K) el cual se obtuvo en cada caso empleando una estrategia cinética descripta por Doyle y Rosenberg (Doyle y Rosenberg 1995) empleando hexadecano como fase orgánica.

3.1.3.9.- Adsorción de Rojo de Rutenio

La adsorción de Rojo de Rutenio (RR) sobre las células provenientes de los distintos sistemas de cultivo, fue empleada como una medida semi-cuantitativa para determinar la presencia de polisacáridos ácidos sobre la superficie externa de las células, de acuerdo al método descrito por Figueroa y Silverstein (Figueroa y Silverstein, 1989).

3.1.3.10.- Determinación de ácidos urónicos

La determinación de ácidos urónicos se llevó a cabo de acuerdo al método descrito por Fazio y colaboradores (1982), empleando m-hydroxydiphenyl (MHDP) medido a 520 nm y usando ácido glucurónico como estandar.

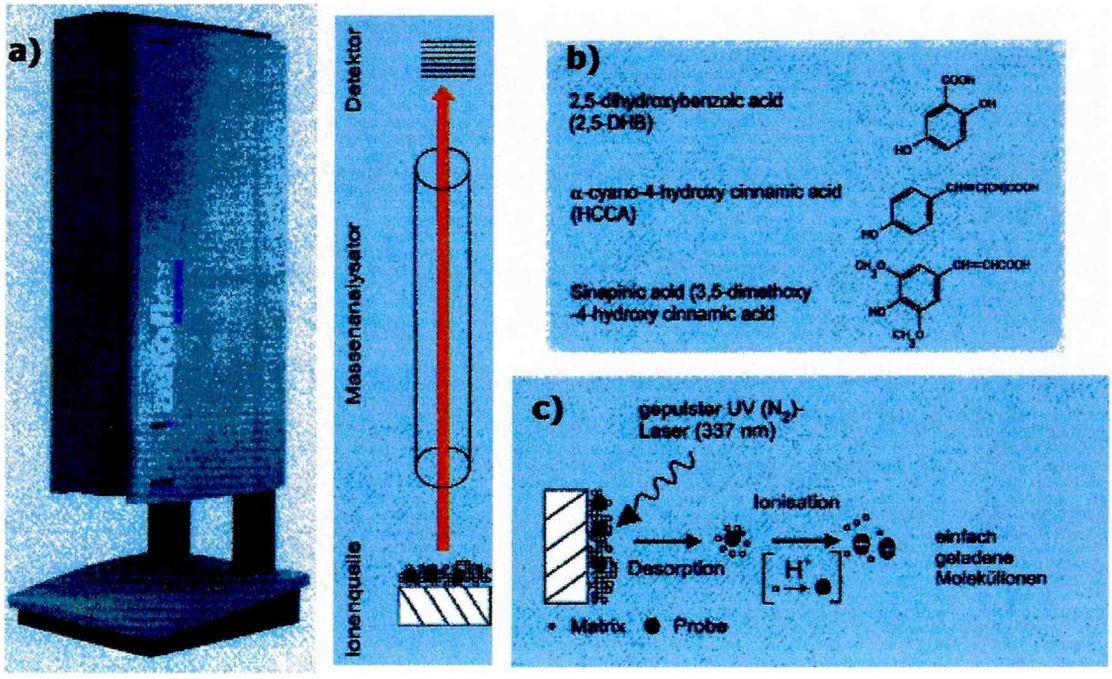
3.1.3.11.- Análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF de células totales

La caracterización microbiana por espectrometría de masas MALDI-TOF de células enteras fue llevada a cabo, mediante un convenio de cooperación, en el Robert Koch Institute de Berlin, Alemania. Para realizar este análisis se utilizó un espectrómetro MALDI-TOF Bruker Autoflex II, que dispone el mencionado laboratorio **(Fig. 5)**. Se tomaron suspensiones celulares correspondientes a diferentes sistemas de cultivo (sólido, líquido y biofilm de distintas horas de incubación) y se trataron las células recuperadas con ácido alfa ciano-4-hdroxicinámico (HCCa). Las muestra se dispusieron sobre el porta nuestra y se llevaron a sequedad. Sobre esta matriz se aplicó un láser N_2 pulsado (337 nm) produciendo la desorción de la muestra de la matriz luego de 300 disparos. Se compararon los espectros de masas obtenidos para cada caso con los obtenidos para muestras de proteínas patrones utilizadas como estándares. Los espectros de masas obtenidos fueron tratados matemáticamente y luego sometidos a análisis multivariante, utilizando el software Opus, tal como se mencionó para el caso de FT-IR.

3.1.3.12.- Caracterización del exopolímero producido en biofilm

Para la cuantificación de **proteínas** se empleó el método descrito por Lowry (Lowry y col. 1951) usando seroalbúmina bovina como estándar (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA).

Fig. 5 MALDI –TOF (desorción / ionización mediante láser asistida por matriz)



a) Espectrómetro Bruker modelo autoflex II b) Diferentes tipos de matrices que pueden ser utilizadas c) esquema del mecanismo de desorción / ionización

Ionozación por MALDI

*La suspensión celular se mezcla con **HCCA** en exceso sobre una superficie de metal de modo que ambos cocristalicen cuando evapora el solvente. Esta preparación es sometida a la acción de pulsos cortos del láser en alto vacío lo que provoca que la absorción de energía por parte de la matriz sea converida en energía de exitación y transferencia de H^+ a la muestra (ionización) dando lugar a especies por lo general monocargadas.. El área irradiada, de unas pocas micras, se calienta dando lugar a la desorción de las especies cargadas de la fase sólida a la fase gaseosa para dirigirse hacia el analizador de tiempo de vuelo (TOF, time of flight). Allí tras ser acelerados por un campo eléctrico en una región de alto vacío, se ordenan en función de su relación masa-carga.*

Los resultados se expresaron como μg de proteína mg biomasa^{-1}. El contenido total tanto de **carbohidratos neutros** en la muestra de exopolímero extraído de cultivos en biofilm fue determinado por el método del fenol-ácido sulfúrico (Dubois y col. 1956) usando D-Glucosa (glc) como estándar. Los resultados se expresaron como μg glc mg biomasa^{-1}. El contenido de **ácidos urónicos** fue evaluado fotométricamente empleando m-hydroxydiphenyl (MHDP) a 520 nm usando ácido glucurónico como estandar. El valor que se indica expresa el contenido total de grupos carboxílicos (urónicos) como unidades de galacturónicos (Blumenkrantz y Asboe-Hansen, 1973). Para el análisis de la matriz por **FT-IR** se liofilizó una solución del EPS (10 mg ml^{-1}), 100 μl fueron transferidos a un disco de ZnSe y secados al vacío. Espectros de absorbancia de FT-IR de los films de EPS fueron registrados usando los parámetros descriptos en la sección previa.

3.1.5.- Análisis estadísticos

Cuatro experimentos independientes de cada uno de los tres tipos de cultivos estudiados (biofilm, cultivos en sistema batch y cultivos en medio sólido) fueron realizados. Para los cultivos en biofilm se realizaron experiencias por cuadriplicado de cada tiempo de crecimiento. En todos los casos se obtuvieron los promedios y la desviación estándar de los distintos datos experimentales. Las diferencias en los valores medios de las determinaciones químicas y de los datos de FT-IR entre los distintos tipos de cultivos fueron analizadas por un one-way Analysis of Variance (ANOVA), seguido por el test Fisher's LSD a nivel del 5%.

4. RESULTADOS

4.1 Modelo propuesto

Partiendo del conocimiento que las bacterias que crecen adheridas a superficies constituyen agregados dentro de matrices poliméricas hidratadas, sintetizadas por ellas mismas, que estas comunidades de células sésiles exhiben alta resistencia a agentes antimicrobianos y a los mecanismos de defensa del hospedador y que éstos aspectos diferenciales constituyen la base de la persistencia de muchas infecciones bacterianas crónicas, se podría especular en el caso de *Bordetella pertussis*, que la multiplicación de esta bacteria en el hospedador adherida al epitelio del tracto respiratorio superior, también podría seguir un curso similar y traducirse en la formación de un biofilm. Si este fuera el caso se podría explicar la persistencia en el hospedador mediante un mecanismo de adaptación al crecimiento sobre superficies de una manera similar al de otros organismos patógenos que colonizan vías respiratorias.

La observación de muchos ambientes naturales ha demostrado que el crecimiento en biofilm constituye el modo normal de vida microbiano. Se impone entonces analizar bajo estos nuevos conceptos de crecimiento cuál es la respuesta adaptativa del agente patógeno, normalmente estudiado en medios líquidos, en condiciones muy distantes de las que encuentra en la naturaleza y en su hospedador. Por lo tanto, en este caso particular, donde no hay descriptos por la bibliografía internacional estudios de este tipo en *B. pertussis* creemos que la hipótesis de la que partimos justificó las investigaciones que se llevaron a cabo empleando metodologías de gran poder de resolución. Nuestra estrategia para encarar el problema de entender como se comportaba este organismo en cultivos adheridos a superficies pasaba por determinar en una primera etapa si la bacteria podía crecer adherida a soportes abióticos. El trabajo experimental demostró que esto es posible y además que la respuesta fenotípica en tales condiciones se modificaba en relación a la que presentaban en el mismo medio de cultivo células planctónicas. Evidentemente esta forma de crecimiento le otorga ventajas a *B. pertussis* para su persistencia en el hospedador. Una pregunta todavía sin respuesta, pero que resulta esencial en el control de estos procesos infecciosos es llegar a entender que estrategia puede llevar a frenar la formación de este tipo de crecimiento.
En la **Fig.6** se pueden observar imágenes obtenidas por microscopía de escaneo electrónico de poblaciones de *B. pertussis* adheridas a perlas de propileno.

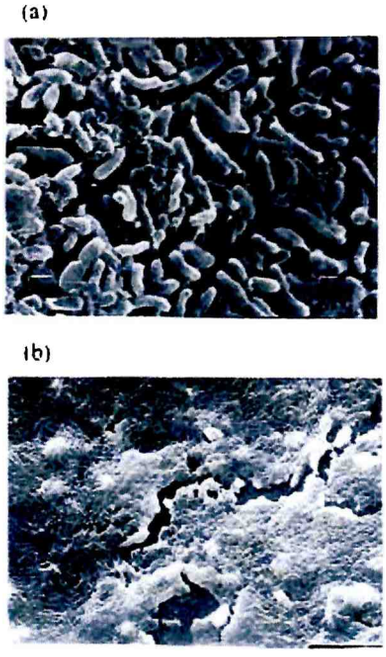


Fig. 6. Micrografía electrónica de barrido de *B. pertussis* crecido como biofilm sobre perlas de polipropileno (a) luego de 72 horas de incubación, (10·000 X); (b) después de 120 h de incubación (2·000 X).

Las fotografías corresponden a desarrollos obtenidos al cabo de 48 y 120 h de crecimiento. Conteos de células viables, determinados cada 24 durante 6 días de crecimiento, mostraron que la población de células sésiles se incrementa, en nuestras condiciones de cultivo, hasta las 120 h de proceso. A dicho tiempo el recuento de células viables obtenido a partir de las perlas de polipropileno fue de 2,8 x 10^8 UFC cm^{-2}. La velocidad específica de crecimiento (μ) de estas poblaciones, fue de 0,03 h^{-1}, un valor más de 2 veces menor que la máxima velocidad específica de crecimiento obtenida en poblaciones planctónicas crecidas en sistema batch en el mismo medio de crecimiento de Stainer-Scholte (μ_{max} 0,07 h^{-1}) (Rodríguez y col. 1994). Sin embargo, como los biofilms son estructuras no homogéneas donde normalmente se producen gradientes en la concentración de nutrientes, es lógico suponer que las células que crezcan en los diferentes entornos lo hagan a distinta velocidad de crecimiento (Costerton y col. 1995), con lo cual el valor determinado experimentalmente debe ser considerado como un promedio de la velocidad de crecimiento de la población en estudio.

4.2. Efecto del crecimiento adherido a superficie sobre las características fisicoquímicas de las células

El perfil proteínas de membrana externa de las células de biofilm fue comparado con el que presentan células crecidas en medio sólido y en medio líquido. La **Fig. 7** muestra los resultados obtenidos. Aunque las proteínas principales se encuentran presentes en las

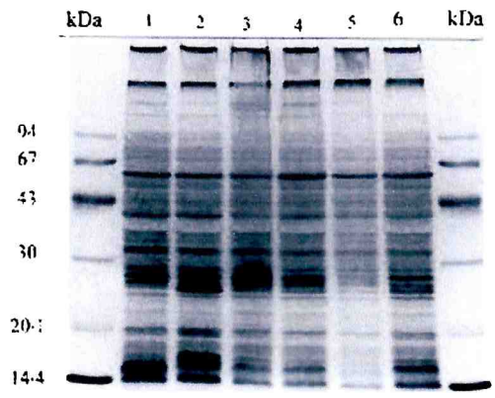


Fig. 7 Comparación de perfiles electroforéticos de proteínas de membrana externa (PME) de céluas de *B. pertussis* crecidas en medio sólido (calle 1), medio líquido (calle 2) y diferentes horas de crecimiento en biofilm 48, 72, 96 y 120 h (calles 3, 4, 5 y 6, respectivamente).

células cultivadas en los tres sistemas, se observaron diferencias en bandas de bajo peso molecular como las de 15-16 y 25-28 kDa y en la intensidad de las bandas ubicadas en la región de 30 a 14 kDa, especialmente entre células adheridas y planctónicas. Un reslutado similar se ha encontrado en los espectros de masas obtenidos por MALDI-TOF (**Fig. 8**). Los mismos muestran que las principales diferencias entre las células crecidas en biofilm y las cultivadas en medio líquido de fase expoonencial, se encuentra en la zona de baja masa/carga (m/z = 3674, 3910, 5663).

La comparación de la expresión de lipopolisacáridos entre los diferentes tipos de células, no mostró diferencias importantes entre los perfiles de las tres poblaciones en estudio (cultivos líquidos de fase exponencial, cultivos sólidos y diferentes horas de biofilm. En todos los casos las células mostraron un LPS tipo rugoso, típico para este organismo. (**Fig. 9a**), el cual consiste de dos bandas, una fuertemente teñida (LPS A) y otra menor de mayor velocidad de migración (LPS B). Estas bandas han sido previamente descriptas en la literatura de *B. pertussis* por el grupo de Peppler (1984). Sin embargo, cuando las mismas muestras fueron analizadas por Tricine-SDS-PAGE pero, en este caso, teñidas inicialmente con Alcian blue y luego con Plata, las células sésiles mostraron una banda adicional sobre el gel la cual fue asignada a la presencia de polisacáridos. Esta banda no fue observada en las muestras de LPS obtenidas de las células cosechadas de medio líquido o de colonias recuperadas de medio sólido, tratadas en todos los casos con idéntico procedimiento. (**Fig. 9b**).

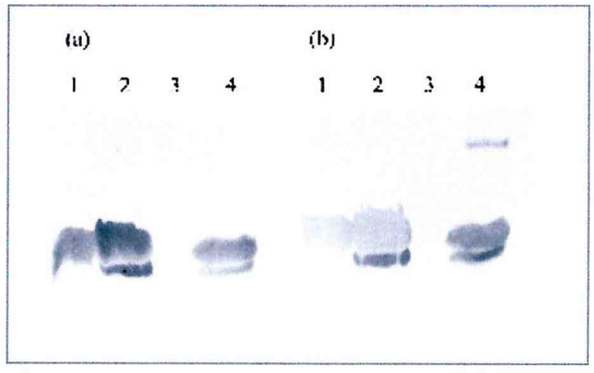


Fig. 9 Tricina-SDS-PAGE de preparaciones de LPS, (a) tinción con plata y (b) con Azul de Alzian y plata, de células de *B. pertussis* crecidas: 48 h en medio sólido (calle 1), 15 h en medio líquido (calle 2) y 120 h de crecimiento en biofilm (calle 4). La calle 3 contiene solo buffer de carga.

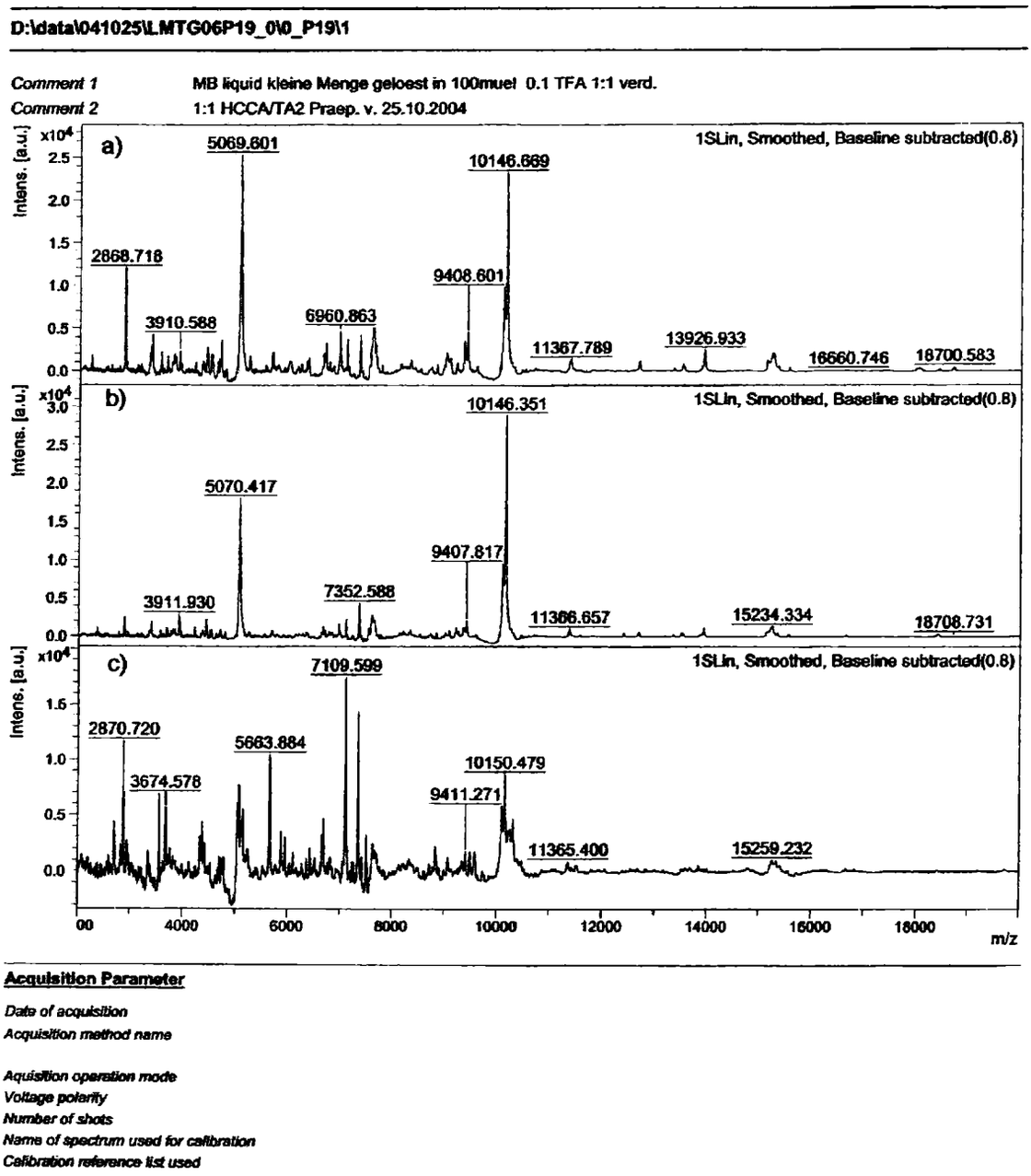


Fig. 8 Comparación del espectro de masas obtenido por MALDI-TOF de células enteras utilizando un espectrómetro Bruker modelo autoflex II a) Biofilms 96 horas b) biofilms 72 horas y c) células cosechadas de fase exponencial de cultivos batch. Se utilizó HCCA. como matriz.

La hidrofobicidad, una de las propiedades fisicoquímicas de la superficie celular más estudiadas, que puede cambiar como respuesta a las condiciones del entorno (van Loosdrecht y col. 1990), fue también analizada en los diferentes tipos de células de *B. pertussis,* calculando para cada población el "coeficiente de remoción" (K). La **Tabla 2** muestra diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$) entre los valores de hidrofobicidad de células planctónicas de diferentes fases de crecimiento de un cultivo batch y también entre los valores de células recuperadas de cultivo en medio sólido y biofilm. Además, es importante notar que entre todas las células estudiadas, las bacterias recuperadas de biofilm fueron las más hidrofílicas, mostrando valores del coeficiente K más de 10 veces menor que el que se obtiene para las células planctónicas y aproximadamente 6 veces menor que el obtenido de células de medio sólido. Para determinar si las mayores características hidrofílicas de las células sésiles podrían ser consecuencia de la presencia de un polímero extracelular depositado en mayor cantidad sobre la cubierta celular de las mismas, una muestra de esta población fue estudiada mediante una prueba semi-cuantitativa empleando Rojo de Ruthenio (RR), tal como había sido descrito en los trabajos de Figueroa y Silverstein (Figueroa y Silverstein 1989; Waller y col. 2004). Como se muestra en la **Tabla 2**, la adhesion del colorante RR sobre las células de biofilm resultó aproximadamente un 25 % ±3 % mayor que par alas células recuperadas de otros cultivos ensayados. Los resultados fueron significativamente mayores ($p<0.05$).

4.3 Diferenciación de células enteras por espectroscopía FT-IR

La composición bioquímica de las células de *B. pertussis* recuperadas de los cultivos en medio sólido, líquido y biofilm fue comparada empleando espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier. La **Fig. 10** muestra los espectros infrarrojos de células sésiles crecidas sobre perlas de polipropileno; células planctónicas crecidas a similar velocidad de crecimiento en el mismo medio SS (obtenidas en este caso de cultivo continuo); células provenientes de cultivos en sistema batch (fase exponencial de crecimiento) y células crecidas en modo planctónico limitadas en oxígeno. En esta figura el espectro designado como E, representa el espectro diferencia entre el correspondiente a las células sésiles y el de células obtenidas de cultivo continuo crecidas, como se mencionó, a igual velocidad específica de crecimiento. Los resultados presentados en la figura corresponden al rango espectral 1800–700 cm^{-1}. Para una mejor interpretación de la absorción de grupos funcionales en infrarrojo se remite a la **Tabla 3, Capítulo 1**, donde se presenta la asignación de bandas de absorción correspondientes a los grupos funcionales presentes en biomoléculas y que se mencionarán en este capítulo con su respectiva referencia bibliográfica. La región 1800–700 cm^{-1} incluye la absorción de dos de los principales componentes celulares: proteínas (1700 – 1480 cm^{-1}) y carbohidratos (1200 – 900 cm^{-1}).

Tabla 2. Características fisicoquímicas de células de *B. pertussis* tomadas de diferentes sistemas de cultivo y fases de crecimiento. Hidrofobicidad, medida por coeficiente de remoción, y % de adsorción de Rojo de Rutenio

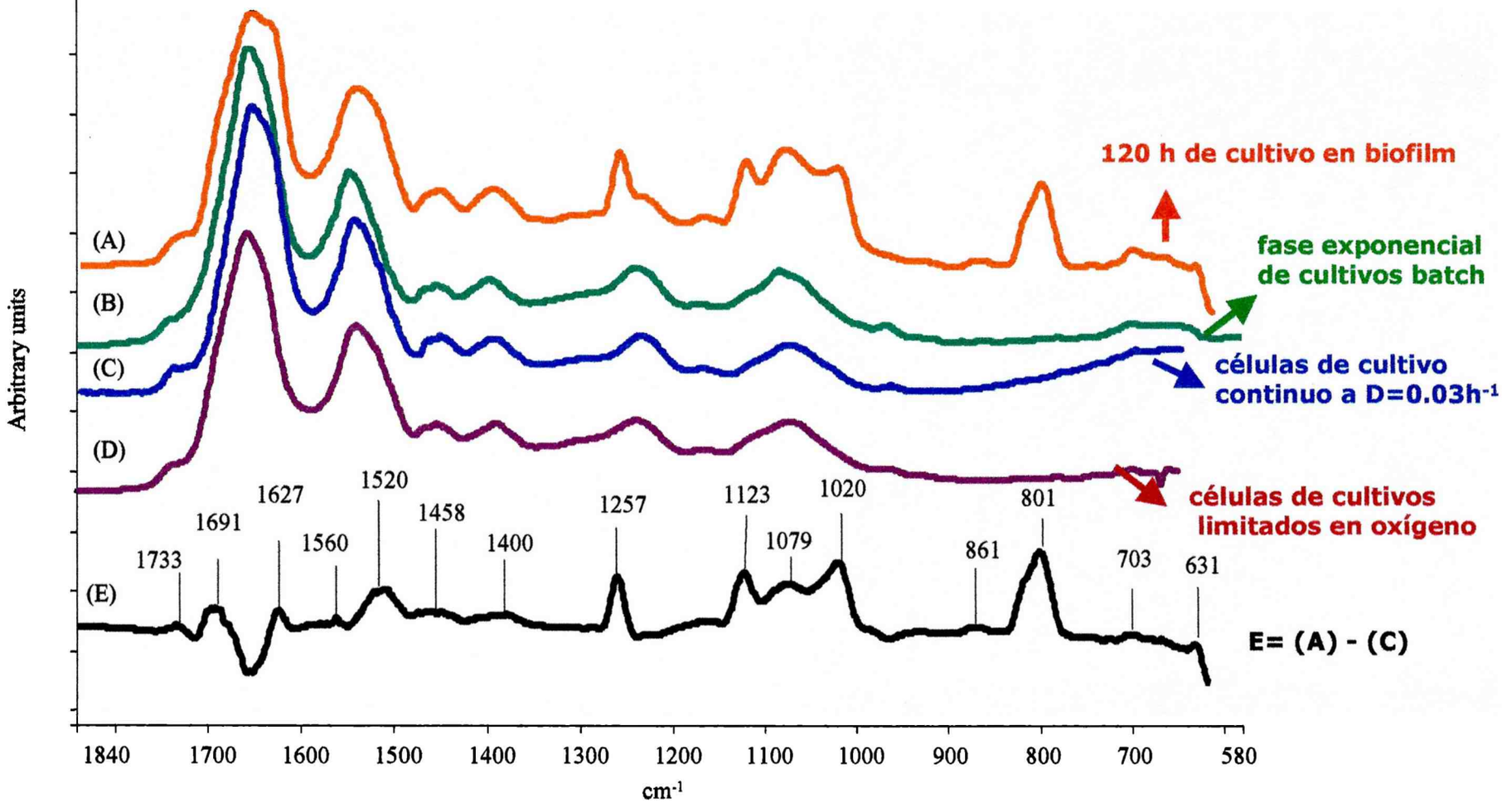
Sistema de cultivo	Fase de crecimietno	Coeficiente de remoción (K) x 10^2 [a]		Adsorción de Rojo de Rutenio % [a]	
Líquido	Lag	0.81 ± 0.02	A [c]	14.5 ± 0.4	A [c]
	Exponential-media	0.76 ± 0.03	B	16.1 ± 0.2	B
	Estacionaria	0.66 ± 0.02	C	12.3 ± 0.4	C
	Continuo [b]	0.80 ± 0.02	AB	14.1 ± 0.3	A
Medio sólido	Estacionaria	0.34 ± 0.03	D	16.3 ± 0.4	B
Biofilm	Exponencial	0.06 ± 0.05	E	25.5 ± 0.3	D

[a] Los datos corresponden a promedios y desviaciónes standard de cuatro replicados independientes

[b] Velocidad de dilución D= 0.03 h^{-1}, similar a la velocidad promedio de cultivos en biofilm.

[c] No se obsesrvan diferencias significativas entre valores medios tanto de coeficiente de remoción y % de adsorción, indicados por la misma letra. Las determinaciones estadísticas fueron realizadas por el test LSD de Fisher al nivel 5 % despúes de realizar un ANOVA en una dirección.

Fig. 10 Comparación de la expresión fenotípica de *B. pertussis* creciendo bajo distintos sistemas de cultivo



Tomando entonces en cuenta los datos de dicha Tabla, si analizamos en mayor detalle el espectro diferencia designado como **E** en la **Fig. 10**, podemos establecer que las modificaciones que presentan las células de biofilm con respecto a las células crecidas en condiciones similares de velocidad de crecimiento pero en forma planctónicas, corresponde a lo que la bibliografía designa como **marcadores espectrales de biofilm** (Helm y col. 1991; Nichols et al 1985): una banda a **1458 cm^{-1}**, tres bandas en la ventana dominada por vibraciones asignadas a carbohidratos (**1123, 1079 y 1020 cm^{-1}**), y otras dos bandas en la región 900-800 cm^{-1} (**860 y 800 cm^{-1}**), la cual es sensible a la configuración anomérica de carbohidratos (**Table 3, capítulo 1**). Otras diferencias se asocian con el incremento en la intensidad relativa de bandas correspondientes al estiramiento simétrico y anti-simétrico del ión carboxilato (1627 y 1405 cm^{-1} respectivamente), bandas asignadas a modos de absorción vibracional de ésteres (1733 y 1257 cm^{-1}), y bandas correspondientes a vibracones C-O-C del anillo de los monosacáridos, sugiriendo en conjunto un incremento en la producción de polisacáridos conteniendo ácidos urónicos por parte de las células del biofilm.

Diferencias similares con pequeños corrimientos fueron observados en los espectros resultantes de la substracción entre el espectro de las células de biofilm y el espectro de los otros tipos de células planctónicas mencionados en la **Fig. 10**. (datos no mostrados).

Una mayor caracterización fue realizada posteriormente analizando el espectro obtenido de poblaciones que crecieron directamente sobre las celdas de ZnSe (**Fig. 11A**). La remoción del biofilm de su soporte fue en este caso omitida y la medida del espectro resultante fue realizada de **manera no destructiva**, como fue sugerida previamente en los trabajos de Nivens y colaboradores (Nivens y col. 2001). Los espectros de biofilm bacterianos obtenidos *in situ* mostraron un hombro en la banda designada como Amide I (1629 cm^{-1}), correspondiente al estiramiento asimétrico del ión carboxilato, modificaciones en las bandas de 1372 y próxima a 1400 cm^{-1} (estiramiento simétrico del ión carboxilato), un hombro en la banda de absorción Amide II a 1516 cm^{-1}, y una amplia banda en la región 1200-900 cm^{-1} (región de polisacáridos). Es importante remarcar que las bandas de 1733 y 1260 cm^{-1} (**Fig 11A**) podrían indicar la presencia de grupos funcionales O-acetilos en células sésiles de *B. pertussis*. Estas últimas bandas fueron previamente reportadas en espectros de *P. aeuroginosa* como pertenecientes a componentes esenciales para la arquitectura del biofilm (Nivens y col. 2001).

4.4. Efecto de la adhesión sobre la composición macromolecular de la biomasa

Debido a que la composición macromolecular de la biomasa es un indicador integrado del estado fisiológico de los organismos, se decidió analizar si el modo de crecimiento en biofilm afectaba la composición de las células de *B. pertussis,* tomando como referencia la composición química de las células creciendo flotando libremente en el mismo medio de cultivo. Para este estudio se utilizó también la espectroscopía infrarroja de acuerdo a lo descrito en bibliografía (Grube y col. 1999).

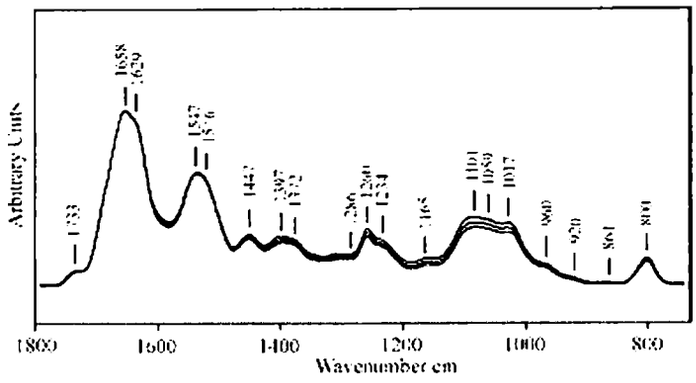


Fig 11 Espectro FT-IR de células deshidratadas *de B. pertussis medidas in situ* sobre las ventanas de ZnSe, por 5 días con recambio de medio cada 24 horas. Lavadas y secadas al vacío y su derivada 2da x(-1).

A fin de ampliar y complementar los reslutados obtenidos por FT-IR, se realizaron análisi químicos de todos los tipos de células y sus faes de crecimiento. Se pudieron detectar diferencias estadísticamente significativas entre las áreas de las bandas asignadas a las principales biomoléculas en los espectros IR provenientes de células de biofilm y de células planctónicas. Las áreas de las bandas asignadas a ácidos grasos, carbohidratos y proteínas fueron calculadas, previa normalización vectorial en todo el rango espectral, para cada tipo de célula de acuerdo a lo citado por el Dr. Dieter Naumann (Naumann 2000) y detallado en las **Figs. 15 y 16 del capítulo1**. **(Tabla 4)** El valor de la relación carbohidratos / proteínas para las células de biofilm fue entre 2,4 a 3,0 veces mayor comparado con el mismo valor obtenido para células planctónicas de distinta fase de crecimiento y 2,1 veces mayor que el obtenido con las células recuperadas de medio sólido. Cuando las mismas muestras fueron analizadas mediante métodos químicos los resultados obtenidos confirmaron los datos anteriores. La correspondiente relación para células de biofilm resultó con esta metodología entre 2,1 a 2,7 veces mayor comparada con las células planctónicas de distinta fase de crecimiento y aproximadamente 1,7 veces mayor comparada con las células crecidas en medio sólido. Adicionalmente, los espectros de las células sésiles

mostraron un valor 1,5 veces mayor para el area de la banda asignada a ácidos grasos en relación a la obtenida para otro tipo de células. Además, fue interesante comprobar que la relación para las áreas de las bandas asignadas a carbohidratos y ácidos grasos fue de 1,5 a 2,5 veces mayor en células de biofilm que para células obtenidas del crecimiento en medios líquido y sólico.

TABLE 3. Composición macromolecular de células de *B. pertussis* cultivadas bajo diferentes condiciones de cultivo por métodos químicos y FT-IR

Sistema de cultivo	Etapa de crecimiento	Espectroscopía FT-IR [a]				Análisis químico [b]		
		Ac. grasos C-H str of CH_2	Proteínas N-H b, N-C str	Carbohidratos C-O, C-C str, C-O-C def	Carbohidratos / proteínas	Proteínas µg /mg biomasa	Carbohidratos µg glc/mg biomasa	Carbohidratos/ Proteína µg /mg
Líquido	lag	8.1 (0.5)	115.2 (9.8)	62.5 (5.3)	0.54	593.2 (35.6)	58.7 (2.5)	99.0
	Exponencial	8.6 (0.6)	117.3 (9.0)	61.0 (5.2)	0.52	625.8 (37.1)	57.5 (2.4)	91.9
	Estacionaria	9.6 (0.6)	103.1 (8.6)	70.1 (6.3)	0.68	550.1 (33.0)	65.7 (2.8)	119.4
	Continuo [c]	11.2 (0.7)	95.0 (8.0)	59.0 (5.1)	0.62	521.3 (11.2)	55.3 (2.3)	106.1
Sólido	Estacionario	11.1 (1.7)	75.6 (6.3)	75.6 (6.8)	1.00	432.5 (25.5)	76.9 (3.8)	177.8
Biofilm[d]	Exponencial	18.4 (2.7)	71.5 (10.6)	210.0 (32.5)	2.94	420.7 (46.4)	188.3 (29.1)	447.6

[a]Area de las bandas de absorción asignadas a los principales componentes celulares (ácidos grasos: 2948- 2884 cm^{-1}; proteínas, Amida II: 1590-1478 cm^{-1} y carbohidratos : 1148-983 cm^{-1}). El cálculo de las áreas fu realizado por el mediante el cálculo de áreas integradas obtenidas por derivada 2da y fiteo. Sobre los espectros previamente normalizados vectorialmente.

str= estiramiento, b= balanceo, def= deformación.

[b] Proteinas y carbohidratos fueron determinadas como se indicó en métodos.

[c] velocidad de dilución D = 0.03, similar a la velocidad de crecimiento en el cultivo en biofilm.

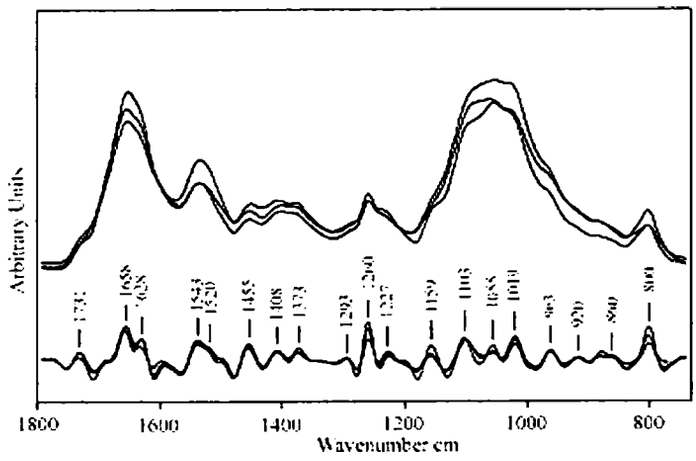
[d] Los datos fueron obtenidos luego de una agitación suave para remover las células (10 min. a 100 rpm).

Los valores indicados entre paréntesis corresponden a la desviación estándar

4.5. Análisis del exopolímero recuperado del biofilm

La metodología empleada para la recuperación de la sustancia polimérica extracelular permitió su aislamiento sólo de células de biofilm, arrojando resultados negativos cuando el mismo procedimiento se empleó con la misma cantidad de células planctónicas y células provenientes de colonias crecidas en medio sólido. Análisis químicos llevados a cabo con este exopolímeros mostraron que las células sésiles producen un exopolímero que contiene 45,6 ± 7,2 μg de carbohidratos neutros expresados como glucosa por mg de biomasa. Esta sustancia polimérica extracelular contenía 2% (p/p) de ácidos urónicos y 7,6% (p/p) de proteínas. Análisis electroforéticos mediante SDS-PAGE indicaron que el perfil de estas proteínas era similar a las que se encontraban en sobrenadante de medio de cultivo (datos no mostrados). La presencia de LPS en este exopolímero fue analizada mediante técnicas electroforéticas por Tricine-SDS-PAGE. Los geles fueron primero teñidos con azul Alcian y luego con Plata. Los análisis mostraron que esta sustancia contiene las mismas dos bandas de LPS expresados normalmente por las células sésiles (LPS A y LPS B) y una banda adicional asignada a polisacáridos similar a la encontrada en el análisis de las células de biofilm. Esta banda solo fue visualizada cuando los geles fueron teñidos con azul Ancian (resultado no mostrado). **Por lo tanto los componentes detectados en la matriz extacelular de *B. pertussis* (polisacáidos, ácidos urónicos, LPS y proteínas) resultan similares a los descriptos para otros exopolímeros que integran la matriz de bacterias gram-negativas creciendo adheridas a superficies** (Flemming y col. 2000; Sutherland 2001).

Espectros IR de muestras de esta matriz (3 replicados independientes) y sus correspondientes derivadas segundas son mostrados en la **Fig. 12**. Bandas típicamente aisgnadas a ácidos urónicos fueron observadas a 1628 cm^{-1}, 1408 cm^{-1}, 1373 cm^{-1}. Una importante banda localizada a 1260 cm^{-1} asociada a la presencia de grupos O-acetilos con una banda complementaria a 1731 cm^{-1} para el estiramiento >C=O carbonilo e intensas bandas en la región 1200 y 900 cm^{-1} asignadas a absorciones de anillos de carbohidratos C-O-C fueron también visualizadas. Adicionalmente dos bandas en la región 900 – 800 fueron asociadas a unions tipos glicosídicas en polisacáridos (**Tabla 3, Capítulo 1**). El espectro de la sustancia polimérica extracelular no sólo exhibió las típicas bandas asociadas a los biofilms, sino que mostró bandas relativamente intensas en la región de carbohidratos. Este comportamiento general ha sido previamente encontrado en espectros de exopolímeros



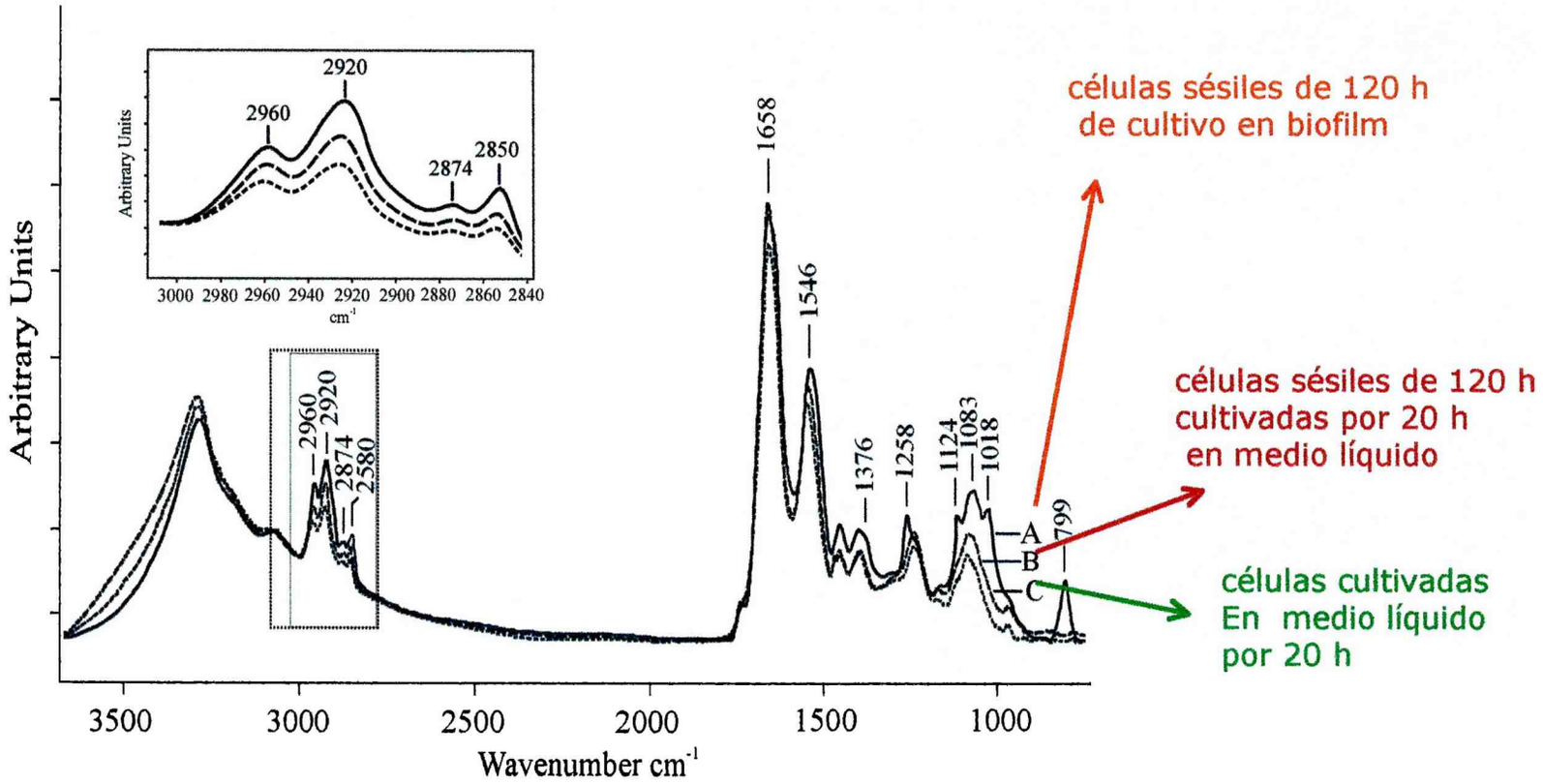
Tres replicados de espctros FT-IR y sus respectivas derivadas 2das (x-1) de suspensions de EPS recuperado de perlas de polipropileno luego de 120 h de cultivo. Se dispusieron 100 □l de una suspension de EPS en una ventana de ZnSe , se secó al vacio.

producidos por otras bacterias (Beech y col. 1999; Nivens y col. 2001, Nebenzahl y col. 2004). El contenido de LPS en esta matriz fue confirmado también por espectroscopía infrarroja como bandas características de ácidos grasos presentes en la region spectral entre 3000 y 2800 cm^{-1}, y por la presencia adicional de bandas a 720 cm^{-1} resultantes del modo de vibración rotacional del grupo $>CH_2$ presente en las cadenas de ácidos grasos.

4.6 Efectos del despegado sobre la expresión de exopolímeros

Una de las posibilidades que se tuvieron que descartar en cuanto a tratar de explicar el comportamiento de células sésiles de *B. pertussis* adherida a superficies, fue el aclarar si la mayor cantidad de exopolisacáridos producidos por la población adherida resultaba de la presencia de subpoblaciones de variantes mucoides que sobre expresan polisacáridos. Para chequear esta posibilidad células sésiles de 120 h de crecimiento fueron recuperadas de perlas de polipropileno mediante una agitación suave en frascos Erlenmeyers con solución salina. Las células fueron lavadas y luego usadas como inóculo de un medio SS líquido. Al cabo de 20 h de crecimiento de la población, ahora en forma planctónica (fase exponencial), una muestra de la misma fue analizada mediante espectroscopía infrarroja. El espectro IR obtenido a partir de estas células cosechadas de medio líquido se muestra en la **Fig. 13**. En esta Figura también se muestran los espectros obtenidos de células de 120 h de crecimiento en biofilm (espectro A) y el de células crecidas 20 h en medio líquido pero con las que se empleó un inóculo que no provenía de células adheridas sino que venía de medio líquido

Fig. 12 Reversión de la expresión de EPS en B. pertussis.



Los espectros fueron normalizados vectorialmlente todo el rango espectral

(espectro C). De la comparación de los distintos espectros es evidente que el área de las bandas relacionadas con la absorción de carbohidratos (1146 – 980 cm^{-1}) y ácidos grasos (2960 – 2800 cm^{-1}), disminuye significativamente cuando esta población sésile es crecida durante 20 h en medio líquido. Este ultimo espectro es muy similar al que presentan normalmente las células crecidas en medio líquido. Estos resultados estarían descartando que estemos en presencia de una población mucoide

5. DISCUSIÓN

Aunque si bien la incidencia de tos convulsa ha disminuido a nivel mundial como consecuencia de la introducción, desde el año 1950 de la vacunación masiva, la erradicación y control de esta enfermedad todavía está lejos de ser alcanzado (van Rie y Hethcote 2004). Las razones que permiten explicar un resurgimiento notorio de la enfermedad en los últimos 20 años son variadas. Entre las mismas uno podría especular sobre la eficacia de las vacunas corrientemente empleadas a nivel mundial, preparadas a partir de organismos que crecen en biorreactores flotando libremente en el medio de cultivo. ¿La respuesta inmunológica derivada de la administración de vacunas elaboradas con estos organismos resulta efectiva en el control de una enfermedad donde es perfectamente conocido que el organismo patógeno, al menos durante las primeras etapas de la infección, crece adherido al epitelio ciliado del tracto reepiratorio superior? (Cherry y col. 1988; Costerton y col., 2003). Está ampliamente documentado que el fenotipo que expresa un organismo depende de las condiciones de crecimiento y del ambiente que lo rodea. Las condiciones de crecimiento de *B. pertussis in vivo* son muy diferentes a las que normalmente se la hace crecer *in vitro*. En reactores las bacterias crece flotando libremente en el medio de cultivo, sin interaccionar entre si, sin limitaciones de nutrientes, alcanzando en fase exponencial su máxima velocidad de crecimiento. En el individuo que pretende colonizar la población crece adherida a un epitelio, con limitaciones nutritivas y bajo un ataque permanente de las defensas del hospedador. Se ha demostrado en el caso de *Pseudomonas aeruginosa* que su expresión fenotípica creciendo adherida a superficies es muy diferente a la que presenta la población en cultivos en medio líquido. Teniendo en cuenta estos antecedentes es que inicié este trabajo sobre la respuesta diferencial de *B. pertussis* adherida a superficies. Para el trabajo experimental se seleccionó una superficie abiótica neutra (sin cargas) como el polipropileno donde se comprobó que *B. pertussis* podía crecer adherida formando biofilm (Bosch y col. 2000). La idea ha sido trabajar sobre la expresión fenotípica de las células sésiles creciendo sobre esta superficie abiótica como un primer modelo experimental que trata de aproximar a las condiciones que encuentra el

patógeno en el hospedador. Con este objetivo se emplearon en los estudios métodos espectroscópicos vibracionales, que se habían mostrado apropiados para monitorear el fenotipo de cultivos en biofilm en otros organismos.

Con estas nuevas herramientas se comenzó a caracterizar el fenotipo de *B. pertussis* creciendo en biofilm. Como tanto los análisis espectrales preliminares como los químicos, mostraron diferencias entre fenotipos de células sésiles y planctónicas, se estudió si alguna condición de crecimiento inherente al tipo de cultivo en biofilm era la responsable de la respuesta fenotípica detectada en este sistema. Debido a que la matriz del biofilm impone una limitación a la difusión y disponibilidad de nutrientes, se analizó el fenotipo resultante del crecimiento en cultivos batch, con y sin limitación de O_2, para establecer si esta limitación podría asociarse al cambio fenotípico detectado en células sésiles.

Se estudió la cinética de crecimiento en biofilm y se calculó el valor de la velocidad específica de crecimiento. Posteriormente en cultivos continuos si determinó si el fenotipo de las células sésiles es consecuencia de una menor velocidad específica de crecimiento de células en biofilm. **Se pudo determinar por espectroscopía infrarroja la composición macromolecular en cada tipo de población y se reportó, por primera vez, que en biofilm *B. pertussis* sobreexpresa exopolisacáridos** La matriz de exopolímeros fue analizada también por FT-IR y análisis químicos.

En primer lugar se pudo comprobar **que *B. pertussis* adhiere a superficies abióticas** tales como vidrio y polipropileno (**Fig. 6**). Este proceso, como otros similares descriptos en otros organismos tiene una cinética característica que depende del organismo y de las características de la superficie con la que interactuarán las bacterias. En nuestro caso preferimos emplear polipropileno como soporte para el crecimiento en biofilm debido a que comprobamos que cuando la población era crecida sobre vidrio al remover las células sésiles se arrastraban silicatos que nos daban señales importantes en el infrarrojo. Por este motivo decidimos emplear polipropileno que no interfería en los estudios posteriores.

En nuestro modelo experimental establecimos que 5 h eran las requeridas para lograr alcanzar una apropiada adhesión de *B. pertussis* al soporte. Luego de este tiempo el número de células adheridas por cm^2 de superficie no se incrementa.

En trabajos previos realizados en nuestro laboratorio se había demostrado, trabajando en reactores operados en cultivo continuo, que el perfil de proteínas de membrana externa de *B. pertussis* no era afectado por la velocidad específica de crecimiento (Rodríguez y col. 1994). En tales trabajos el perfil de PME no se modificaba operando el cultivo a distintos valores de D (velocidad de dilución = μ velocidad específica de crecimiento, en estado estacionario). En este trabajo se buscó establecer si el perfil de PME de las células crecidas adheridas a superficies como biofilm presentaba diferencias en relación a su contraparte

células planctónicas, crecidas a igual velocidad de crecimiento pero en medios líquidos (μ= 0.03 h^{-1}) y células crecidas en medio sólido. Como se puede observar en la **Fig. 10** las células sésiles presentan diferencias en relación a las células planctónicas en particular en bandas de bajo peso molecular. Estos resultados sugieren una adaptación fenotípica de las células adheridas a este particular modo de crecimiento. Los resultados son también consistentes con las diferencias reportadas por otros autores en relación a diferencias en el perfil de PME expresadas por organismos como *E. coli* creciendo en biofilm (Prigent-Combaret y col. 1999).

En relación a la similitud en el perfil de LPS expresado tanto por células crecidas en biofilm como en medio líquido y en medio sólido (**Fig. 9**), estos resultados confirman la limitada variación en la expresión de lipopolisacáridos en *B. pertussis* reportada previamente, tanto a diferentes velocidades de crecimiento (Rodríguez y col. 1994) como en condiciones de modulación (Valverde y col. 1997). Nuestros datos son también comparables a los reportados para células de *P. aeruginosa* creciendo como biofilm, donde se ha reportado que la expresión de LPS no se modifica en células creciendo adheridas a superficie (De Kievit y col. 2001).

La presencia de una matriz extracelular alrededor de células sésiles de *B. pertussis* fue en principio detectada mediante microscopía electrónica de perlas de polipropileno, donde *B. pertussis* crecía en biofilms (**Fig 1**). A su vez empleando análisis químicos se pudo comprobar que esta matriz le otorgaba a las células sésiles menor hidrobobicidad en comparación a células planctónicas y células que habían crecido en medio sólido. El mayor carácter hidrofílico de las células del biofilm (determinado por el coeficiente de partición en ensayos de adhesión a ciclohexano) se correlacionó con una mayor adsorción del colorante Rojo de Rutenio por parte de las células sésiles (**Tabla 2**). Este colorante se adhiere a polisacáridos y el mismo ha sido empleado para poner de manifiesto la presencia de sustancia capsular en otros organismos. Todos estos resultados fueron posteriormente confirmados mediante el empleo de espectroscopía infrarroja.

Los estudios espectroscópicos comparativos entre células sésiles, planctónicas y obtenidas de medio sólido mostraron, tal como había sido reportado para otros organismos creciendo adheridos a superficies (Sutherland 1977; Davies y col. 1993), que las mayores diferencias entre los espectros de los diferentes tipos de células pueden ser asignadas a bandas de absorción que corresponden con una mayor expresión de polisacáridos (conteniendo ácidos urónicos) producidos por las células (**Figs. 10**).

La sobreexpresión de polisacáridos conteniendo ácidos urónicos puede constituir un elemento de gran importancia para la virulencia de estas poblaciones ya que ha sido descrito que la presencia de grupos carboxílicos, a través de sus interacciones, contribuye a estabilizar las uniones glicosídicas de los polisacáridos (Flemming y col.

2000; Fett y col. 1995). Como consecuencia de la presencia de este tipo de polisacárido alrededor de las células, la sobrevida de las mismas se vería favorecida a pHs ácidos, como el que las células encuentran dentro de los fagosomas donde serían ubicadas durante el ataque al hospedador. Es también importante remarcar que la producción de un exopolímero o de una cápsula conteniendo ácidos urónicos por bacterias que colonizan el tracto respiratorio u otros epitelios puede ayudar a las mismas a agregarse y a la adhesión a estos tejidos (Pace y col. 1997).

Ha sido descrito que la síntesis de exopolímeros en bacterias puede variar con la velocidad específica de crecimiento o con la fase de crecimiento (Weiser et al 2001; Uhlinger y White 1983). Aunque los mecanismos de activación de la síntesis de exopolímeros en células de *B. pertussis* creciendo adheridas a soportes no han sido todavía reportados, nuestros resultados, provenientes de experiencias de cultivos batch y continuo, sugieren que este efecto tendría lugar de manera independiente de los cambios de fase de crecimiento (cultivos en sistema batch) o velocidad de crecimiento. Los mayores niveles de producción de exopolisacáridos encontrados en células sésiles en relación a células planctónicas creciendo a similar velocidad están en acuerdo con los descriptos por Evans y colaboradores (Evans y col. 1994) y Vandevivere y Kirchman (Vandevivere y Kirchman 1993) para bacterias aisladas de suelos. La producción de exopolímeros puede también ser cambiar en función del tipo de nutriente limitante del crecimiento (Sutherland 2001) y como una respuesta a sustancias tóxicas tales como tolueno como se encontró en investigaciones ambientales de biofilm empleando FT-IR (Schmitt *y col.* 1995). Weiser y colaboradores (Weiser y col. 2001) reportaron que la expresión de polisacárido capsular en el caso de variantes fenotípicas de *S. pneumoniae* cambia en función de la disponibilidad de oxígeno. **En nuestro caso sin embargo, los análisis mediante espectroscopía infrarroja mostraron que *B. pertussis* creciendo en el medio SS bajo limitación de oxígeno no presentaba una mayor producción de exopolisacárido (Fig. 10).**

La mayor cantidad de exopolisacárido encontrado en las células sésiles de *B. pertussis* no debería ser asignada a la adhesión preferencial de una sub-población de variantes que difieren en la síntesis del exopolímero. En este trabajo, la inoculación de células sésiles en medio líquido resultó en una reducción en el contenido de exopolisacárido, al cabo de 20 h de crecimiento en forma planctónica, el nivel encontrado en esas células fue similar al que presentó una población cultivada directamente en medio líquido (**Fig. 13**). Por lo tanto, el comportamiento de *B. pertussis* adherida a una superficie representa una adaptación fisiológica y descarta la posibilidad que las células adheridas constituyan una sup-población de variantes hiper-productoras. La producción reversible de exopolisacárido es consistente con el hecho de que la síntesis de exopolímeros es un

proceso que requiere energía, el cual puede ser desregulado cuando esta producción no es requerida, como en el caso del crecimiento en forma planctónica (Costerton 1985).

El crecimiento bacteriano en biofilm puede alcanzar altas densidades. En otros agregados microbianos los sistemas de censar señales (quórum sensing) juegan un rol clave en las comunicaciones entre bacterias. Este hecho puede ser responsable del comportamiento fisiológico específico de este tipo de población (Donlan 2002). Aunque este mecanismo todavía no ha sido reportado para *B. pertussis*, la existencia de un sistema de señales de tipo "quorum-sensing" en estos cultivos de alta densidad (2,8 x 10^8 UFC cm^{-2}) podría explicar la expresión fenotípica de las células sésiles de *B. pertussis* en una forma dependiente de la población.

Ha sido reportado que el LPS tiene un rol importante en la patogénesis bacteriana de *B. pertussis* y es conocido que es una molécula altamente inmunogénica la cual tiene propiedades de endotoxina (Amano y col. 1990). Tomando en cuenta resultados previos de nuestro laboratorio (Hozbor y col. 1993), nosotros consideramos que la presencia de LPS y proteínas en la capa de **"slime" extracelular de las células de *B. pertussis* podría ser la consecuencia de un atrapamiento de estas moléculas las cuales son liberadas al exterior durante el crecimiento de la población, más que a una sobreexpresión de las mismas, como sería el caso de los exopolisacáridos.** La presencia de LPS en la matriz extracelular de las células sésiles ha sido también reportada para *Shigella dysentereae* type 1 (Qadri y col. 1994). Como conclusión de todos estos resultados la estructura del biofilm de *B. pertussis* podría estar constituída, como es en general aceptado en otros organismos (Mayer y col. 1999; Sutherland 2001), por una red básica de polisacáridos y otras moléculas, incluyendo productos celulares o factores de virulencia que en definitiva constituyen globalmente esta matriz. La estructura de gel de esta matriz podría a la vez funcionar como otro atributo o factor de virulencia. En *B. pertussis* así como en otras epecies bacteriana como como *Escherichia coli* (Yasuda y col. 1994), *Pasteurella multocida* (Chung et al 2001), *Shigella dysenteriae* (Qadri y col. 1994), *Staphylococcus epidermidis* (Shiau y Wu 1998) y *Pseudomonas aeruginosa* (Meluleni y col. 1995), **la matriz del biofilm podría contribuir a la patogénesis y jugar un rol en la evasión de los mecanismos de defensa inmune del hospedador (Brown y Williams 1985).** Los resultados mostrados en este capítulo mostrarían, que nuestro modelo de crecimiento en biofilm podría asociarse a los resultados reportados por Belcher y colaboradores (Belcher y col. 2000), quienes describen que *B. pertussis* induce la transcripción de genes de mucina por parte de células epiteliales. **Es interesante especular si el exopolímero y el mucus pueden actuar de manera conjunta en la infección por pertussis y en la persistencia de la enfermedad creando un microambiente favorable para la sobrevida bacteriana en términos de adquisición de nutrientes, localización de productos extracelulares y protección contra los fagotitos.**

Estas consideraciones deberían ser tenidas en cuenta en el desarrollo de nuevas estrategias destinadas a controlar esta infección bacteriana.

5. CONCLUSIONES

6. Objetivos del presente capítulo

Como ya se mencionó, se pretende determinar la respuesta fenotípica de las células sésiles y comparar la misma con la que expresan poblaciones planctónicas, para lo cual se trabajará cotejando espectros de ambas poblaciones. Los resultados de los estudios espectroscópicos se complementarán con análisis químicos.

El trabajo a llevar a cabo tiene como objetivos:

i) Monitorear y caracterizar la expresión fenotípica de *B. pertussis* durante el crecimiento adherida a soportes sólidos como biofilm, mediante el empleo de técnicas espectroscópicas

ii) Caracterizar mediante FT-IR el fenotipo de poblaciones obtenidas de cultivos en medios líquidos (células planctónicas) y sólidos

iii) Complementar los estudios fenotípicos provenientes de FT-IR, mediante la aplicación de métodos químicos que permitan establecer la similitud o diferencias en la expresión de componentes de cubierta celular en las distintas poblaciones: perfil de proteínas de membrana externa y de lipopolisacáridos, hidrofobicidad, adsorción de colorantes específicos para la presencia de carbohidratos

iv) Establecer si el comportamiento de la población adherida a soportes difiere del correspondiente al detectado en medios sólidos y líquidos como consecuencia de: a) cambios en la velocidad específica de crecimiento de las células sésiles en relación a las planctónicas, b) distinta disponibilidad de oxígeno en biofilm, c) selección de una población especial de características mucoides

Caracterizar mediante espectroscopía vibracional y métodos químicos la composición del exopolímero producido por células crecidas adheridas a soportes abióticos

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Allison, D.G., y I. W. Sutherland. 1987. The role of exopolysaccharides in adhesion of freshwater bacteria. *J Gen Microbiol* 133: 1319-1327.
2. Amano, K. I., K. Fukushi, y M. Watanabe. 1990. Biochemical y immunological comparison of lipopolysaccharides from *Bordetella* species. *J Gen Microbiol* 136: 481-487.
3. Becker, P., W. Hufnagle, G. Peters, y M. Herrmann. 2001. Detection of differential gene expression in biofilm-forming versus planktonic populations of *Staphylococcus aureus* using micro-representational-difference analysis. *Appl Environ Microbiol* 67: 2958-2965.
4. Beech, I., L. Hanjagsit, M. Kalaji, A. L. Neal, y V. Zinkevich. 1999. Chemical y structural characterization of exopolymers produced by *Pseudomonas* sp. NCIMB 2021 in continuous culture. *Microbiology* 145: 1491-1497.
5. Belcher, C. E., J. Drenkow, B. Kehoe, T. R.Gingeras, N. McNamara, H. Lemjabbar, C. Basbaum, y D. A. Relman. 2000. The transcriptional responses of respiratory epithelial cells to *Bordetella pertussis* reveal host defensive y pathogen counter-defensive strategies. *Proc Natl Acad Sci* USA 97: 13847-13852.
6. Blumenkrantz, N. y G. Asboe-Hansen. 1973. New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal Biochem* 54: 484-489.
7. *Bosch, A., N. Massa, A. Donolo, y O. Yantorno. 2000. Molecular characterization by infrared spectroscopy of* Bordetella pertussis *growing as biofilm. Phys Stat Sol (b) 220:* 635-640.
8. Brown, M. R. W. y J. Barker. 1999. Unexplored reservoirs of pathogenic bacteria: protozoa y biofilms. *Trends Microbiol* 7: 46-50.
9. Brown, M. R. W. y P. Williams. 1985. The influence of environment on envelope properties affecting survival of bacteria in infections. *Ann Rev Microbiol* 39: 527-556.
10. Ceri, H., M. E. Olson, C. Stremick, R. R. Read, D. Morck y A. Buret. 1999. The Calgary biofilm device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol* 37: 1771-1776.
11. Cherry, J. D., P. A. Brunell, G. S. Golden, y D. T. Karzon. 1988. Report of the task force on pertussis y pertussis immunization. *Pediatrics* 81: 939-984.
12. Chung, J. Y., I. Wilkie, J. D. Boyce, K. M. Townsend, A. J. Frost, M. Ghoddusi, y B. Adler. 2001. Role of capsule in the pathogenesis of fowl cholera caused by *Pasteurella multocida* serogroup A. *Infect Immun* 69: 2487-2492.
13. Coote, J. G.. 1991. Antigenic switching y pathogenicity: environmental effects on virulence gene expression in *Bordetella pertussis*. *J Gen Microbiol* 137: 2493-2503.

14. Costerton, J. W.. 1985. The role of bacterial exopolysaccharides in nature y disease. *Dev Ind Microbiol* 26: 249-261.
15. Costerton, J. W., K. J. Cheng, G. G. Geesey, T. I. Ladd, J. C. Nickel, M. Dasgupta, y T. J. Marie. 1987. Bacterial biofilms in nature y disease. *Annu Rev Microbiol* 41: 435 - 464.
16. Costerton, J. W., Z. Lewandowski, D. E. Caldwell, D. R. Korber, y H. M. Lappin-Scott. 1995. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 49: 711-745.
17. Costerton, J. W., P. S. Stewart, y E. P. Greenberg. 1999. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* 284: 1318-1322.
18. Cucarella, C., M. A. Tormo, E. Knecht, B. Amorena, I. Lasa, T. J. Foster y J. R. Penadés. 2002. Expression of the biofilm-associated protein interferes with host protein receptors of *Staphylococcus aureus* y alters the infective process. *Infect y Immun* 70: 3180-3186.
19. Davey, M. E and O´Toole, G. A. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. Microbiology and molecular biology reviews. 64: 4, 847-867.
20. Davies, D. G., A. M. Chakrabarty, y G. G. Geesey. 1993. Exopolysaccharide production in biofilms: substratum activation of alginate gene expression by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* 59: 1181-1186.
21. de Beer, D., Stoodley, P., Roe, F. y Lewandowski, Z. 1994. Effects of biofilm structures on oxygen distribution y mass transport. *Biotechnol Bioeng* 43: 1131-1138.
22. De Kievit, T. R., R. Gillis, S. Mark, C. Brown y B. H. Iglewski. 2001. Quorum–sensing genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: their role y expression patterns. *Appl Environ Microbiol* 67: 1865-1873.
23. Donlan, R. M. y Costerton, W. 2002. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 15: 167-193.
24. Doyle, R. J. y M. Rosenberg. 1995. *In* R. J. Doyle y I. Ofek (eds) Adhesion of Microbial Pathogens. Academic Press Inc., San Diego. *Methods in Enzymology* 253: 542-550.
25. Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, y F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars y related substances. *Anal Chem* 28: 350-356.
26. Evans, E., M. R. W. Brown, y P. Gilbert. 1994. Iron chelator, exopolysaccharide y protease production in *Staphylococcus epidermidis*: a comparative study of the effects of specific growth rate in biofilm y planktonic culture. *Microbiology* 140: 153-157.
27. Ewanowich, C. A., A. R. Melton, A. A. Weiss, R. K. Sherburne, y M. S. Peppler. 1989. Invasion of HeLa 229 cells by virulent *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 57: 2698-2704.
28. Fazio, S. A., D. J. Uhlinger, J. H. Parker, y D. C. White. 1982. Estimations of uronic acids a quantitative measures of extracellular y cell wall polysaccharide polymers from environmental samples. *Appl Environ Microbiol* 43: 1151-1159.

29. Fett, W. F., J. M. Wells, P. Cescutti, y C. Wijey. 1995. Identification of exopolysaccharides produced by fluorescent Pseudomonads associated with commercial mushroom (*Agaricus bisporus*) production. *Appl Environ Microbiol* 61: 513-517.
30. Figueroa, L. A. y J. A. Silverstein. 1989. Ruthenium Red adsorption method for measurement of extracellular polysaccharides in sludge flocs. *Biotechnol Bioeng* 33: 941-947.
31. Fux, C. A., J. W. Costerton, P. S. Stewart y P. Soodley. 2005. Survival strategies of infectious biofilms. *TRENS in Microbiol* 13: 34-40.
32. Graeff-Wohlleben, H., H. Deppisch, y R. Gross. 1995. Global regulatory mechanisms affect virulence gene expression in *Bordetella pertussis*. *Mol Gen Genet* 247: 86-94.
33. Hall-Stoodley, L. y P. Stoodley. 2005. Biofilm formation y dispersal y the transmission of human pathogens. *TRENDS in Microbiol* 13: 7-10.
34. Helm, D., H. Labischinski, G Schallehn, y D. Naumann. 1991. Classification y identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy. *J Gen Microbiol* 137: 69-79.
35. Helm, D. y D. Naumann. 1995. Identification of some bacterial cell components by FT-IR spectroscopy. *FEMS Microbiol Lett* 126: 75-80.
36. Hentzer, M., G. M. Teitzel, G. J. Balzer, A. Heydron, S. Molin, M. Givskov y M. R. Parsek. 2001. Alginate overproduction affects Pseudomonas aeruginosa biofilm structure y function. *J. Bacteriol.* 172: 942-948.
37. Hitchcock, P. y T. Brown. 1983. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. *J Bacteriol* 154: 269-277.
38. Hozbor, D., M. E. Rodríguez, A. Samo, A. Lagares, y O. Yantorno. 1993. Release of lipopolysaccharide during *Bordetella pertussis* growth. *Res Microbiol* 144: 201 – 209.
39. Hozbor, D., M. E. Rodríguez, J. Fenández, A. Lagares, N.Guiso, y O. Yantorno. 1999. Release of outer membrane vesicles from *Bordetella pertussis*. *Current Microbiol* 38: 273-278.
40. Kacuráková, M., P. Capek, V. Sasinková, N. Wellner, y A. Ebringerová. 2000. FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides y hemicelluloses. *Carbohydr Polym* 43:195-203.
41. Karlyshev, A. V., M. V. McCrossan, y B.W. Wren. 2001. Demonstration of polysaccharide capsule in *Campylobacter jejuni* using electron microscopy. *Infect Immun* 69: 5921-5924.
42. Khelef, N., C-M. Bachelet, B. B. Vargaftig, y N. Guiso. 1994. Characterization of murine lung inflammation after infection with parental *Bordetella pertussis* y mutants deficient in adhesins or toxins. *Infect Immun* 62: 2893-2900.

43. Laemmli. U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

44. Lam, J., R. Chan, K. Lam y J. W. Costerton. 1980. Production of mucoid microcolonies by *Pseudomonas aeruginosa* within infected lungs in cystic fibrosis. *Infect Immun* 28: 546-556.

45. Lesse, A. J., A. A. Campagnari, W. E. Bittner, y M. A. Apicella. 1990. Increased resolution of lipopolysaccharides y lipoligosaccharides utilising tricine-sodium dodecyl sufate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Immunol Met* 126: 109-117.

46. Lowry, O.H., N. J. Rosenbrough, A. L. Farr, y R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.

47. Mack, D., H. Rhode, S. Dobinsky, J. Riedewald, M. Nedelmann, J. K. M. Knobloch, H. A. Elsner, y H. H. Feucht. 2000. Identification of three essential regulatory gene loci governing expression of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin y biofilm formation. *Infect Immun* 68: 3799-3807.

48. Maagd, R. y B. Lugtenberg. 1986. Fractionation of *Rhizobium leguminosarum* cells into outer membrane, cytoplasmic membrane, periplasmic, y cytoplasmic components. *J Bacteriol* 167:1083-1085.

49. Martínez de Tejeda, G., J. F. Miller, y P. A. Cotter. 1996. Comparative analysis of the virulence control systems of *Bordetella pertussis* y *Bordetella bronchiseptica*. *Mol Microbiol* 22: 895-908.

50. Meltoni, A. R. y A. A. Weiss. 1993. Characterization of environmental regulators of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 61: 807-815.

51. Moreno, J., M. A. Vargas, J. M. Madiedo, J. Muñoz, J. Rivas, y M. G. Guerrero. 2000. Chemical y rheological properties of an extracellular polysaccharide produced by the cyanobacterium *Anabaena* sp. ATCC 33047. *Biotechnol Bioeng* 67: 283-290.

52. Naumann, D. 2000. Infrared spectroscopy in microbiology. In *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, pp. 102-131. Edited by R. A. Meyers. John Wiley y Sons Ltd, Chichester.

53. Navarini, L., M. Stredansky, M. Matulova, y C. Bertocchi. 1997. Production y characterization of an exopolysaccharide from *Rhizobium hedysari* HCNT 1. *Biotech Lett* 19: 1231-1234.

54. Nichols, P. D., J. M. Henson, J. B. Guckert, D. E. Nivens, y D. C. White. 1985. Fourier transform-infrared spectroscopic methods for microbial ecology: analysis of bacteria, bacteria-polymer mixtures y biofilms. *J Microbiol Met* 4: 79-94.

55. Nivens, D. E., R. J. Jr[2] Palmer, y D. C. White. 1995. Continuous nondestructive monitoring of microbial biofilm: a review of analytical techniques. *J Ind Microbiol* 15: 263-276.

56. Pelkonen, S., J. Hayrinen, y J. Finne. 1988. Polyacrylamide gel electrophoresis of the capsular polysaccharide of *Escherichia coli* K1 y other bacteria. *J Bacteriol* 170: 2646-2653.
57. Peppler, M. S.. 1984. Two physically y serologically distinct lipopolysaccharide profiles in strains of *Bordetella perussis* y their phenotype variants. *Infect Immun* 43:224-232.
58. Pérez, P. F., Y. Minnaard, E. A. Disalvo, y De G. L. Antoni. 1998. Surface properties of bifidobacterial strains of human origin. *Appl Environ Microbiol* 64: 21-26.
59. Prigent-Combaret, C., O. Vidal, C. Dorel, y P. Lejeune. 1999. Abiotic surface sensing y biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli. J Bacteriol* 181: 5993-6002.
60. Prugnola, A., B. Aricó, R. Manetti, R. Rappuoli, y V. Scarlato. 1995. Response of the *bvg* regulon of *Bordetella pertussis* to different temperatures y short-term temperature shifts. *Microbiology* 141: 2529-2534.
61. Qadri F., Md. A. Haque, A Hossain y M. J. Albert. 1994. Production of slime polysaccharides by *Shigella dysenteriae* Type 1. *Microbiol Immunol* 38: 11-18.
62. Reuhs B. L., R. W. Carlson, y J. S. Kim. 1993. *Rhizobium fredii* y *Rhizobium meliloti* produce 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid- containing polysaccharides that are structurally analogous to group II K antigens (capsular polysaccharides) found in *Escherichia coli. J Bacteriol* 175: 3570 –3579.
63. Rodríguez, M. E., D. F. Hozbor, A. L. Samo, R. Ertola, y O. M. Yantorno. 1994. Effect of dilution rate on the release of pertussis toxin y lipopolysaccharide of *Bordetella pertussis. J Ind Microbiol* 13: 273-278.
64. Schnaitman, C.. 1971. Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by Triton X-100. *J Bacteriol* 108: 545-552.
65. Shirtliff, M. E., J. T. Mader y A. K. Camper. 2002. Molecular interactions in biofilms. *Chem y Biol* 9: 859-871.
66. Stainer, D W. y M. J. Scholte. 1971. A simple chemically defined medium for production of phase I *Bordetella pertussis. J Gen Microbiol* 63: 211-220.
67. Sutherland, I. W.. 2001. Biofilm exopolysaccharides: a strong y sticky framework. *Microbiology* 147: 3-9.
68. Swope, K. L. y M. C. Flickinger. 1996. The use of confocal scanning laser microscopy y other tools to characterize *Escherichia coli* in high-cell-density synthetic biofilm. *Biotechnol y Bioeng* 52: 340-356.
69. Tuomanen, E. I. y J. O. Hendley. 1983. Adherence of *Bordetella pertussis* to human respiratory epithelial cells. *J Infect Dis* 148: 125-130.

70. Uhlinger, D. J. y D. C. White. 1983. Relationship between physiological status y formation of extracellular polysaccharide glycocalyx, *in Pseudomonas atlantica*. *Appl Environ Microbiol* 45: 64-70.

71. Väisänen, O. M., E. L. Nurmiaho-Lassila, S. A. Marmo, y M. Salkinoja-Salonen. S. 1994. Structure y composition of biological slimes on paper y board machines. *Appl Environ Microbiol* 60: 641-653.

72. Valverde, C., D. F. Hozbor, y A. Lagares. 1997. Rapid preparation of affinity-purified lipopolysaccharide samples for electrophoretic analysis. *BioTechniques* 22: 230-236.

73. van den Akker, W. M. R.. 1998. Lipopolysaccharide expression within the genus *Bordetella*: influence of temperature y phase variation. *Microbiology* 144: 1527-1535.

74. Van den Berg, D. J. C., G. W. Robijn, A. C. Janssen, M. L. F. Giuseppin, R. Vreeker, J. P. Kamerling, J. F. G. Vliegenthart, A. M. Ledeboer, y C. T. Verrips. 1995. Production of a novel extracellular polysaccharide by *Lactobacillus sake* 0-1 y characterization of the polysaccharide. *Appl Environm Microbiol* 61: 2840 – 2844.

75. van der Mei, H. C., P. Brokke, J. Dankert, J. Feijen, P. G. Rouxhet, y H. Busscher. J. 1989. Physicochemical surface properties of nonencapsulated y encapsulated coagulase-negative Staphylococci. *Appl Environ Microbiol* 55: 2806-2814.

76. Vandevivere, P. y D. L. Kirchman. 1993. Attachment stimulates exopolysaccharide synthesis by a bacterium. *Appl Environ Microbiol* 59:3280-3286.

77. van Loosdrecht, M. C. M., J. Lyklema, W. Norde, G. Schraa, y A. J. B. Zehnder. 1987. Electrophoretic mobility y hydrophobicity as a measure to predict the initial steps of bacterial adhesion. *Appl Environ Microbiol* 53: 1898-1901.

78. Vincent, P., P. Pignet, F. Talmont, L. Bozzi, B. Fournet, J. Guezennec, C. Jeanthon, y D. Prieur. 1994. Production y characterization of an exopolysaccharide excreted by a deep-sea hydrothermal vent bacterium isolated from the Polychaete Annelid *Alvinella pompejana*. *Appl Environ Microbiol* 60: 4134-4141.

79. Voloshin, S. A. y A. S. Kaprelyants. 2004. Cell-cell interations in bacterial populations. *Biochem* (Moscow) 69: 1268-1275.

80. Weiser, J. N., D. Bae, H. Epino, S. B. Gordon, M. Kapoor, L. A. Zenewcz y M. Shchepetov. 2001. Changes in availability of oxygen accentuate differences in capsular polysaccharide expression by phenotypic variants y clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 69: 5430-5439.

81. Weiss, A. A. y E. Hewlett. 1986. Virulence factors of *Bordetella pertussis*. *Annu Rev Microbiol* 40: 661-686.

82. Williams, A. G. y J. W. T. Wimpenny. 1980. Extracellular polysaccharide biosynthesis by *Pseudomonas* NCIB 11264. Studies on precursor-forming enzymes y factors affecting expolysaccharide production by washed suspensions. *J. Gen. Mirobiol* 116: 133-141.

83. Yuk, M. H., P. A. Cotter, y J. F. Miller. 1996. Genetic regulation of airway colonization by *Bordetella* species. *Am J Respir Crit Care Med* 154:S 150-S154.

84. Zeroual, W., C. Choisy, S. M. Doglia, H. Bobichon, J-F. Angiboust, y M. Manfait. 1994. Monitoring of bacterial growth y structural analysis as probed by FT-IR spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* 1222: 171-178.

CONCLUSIONES GENERALES

CONCLUSIONES GENERALES

La espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier es una técnica ampliamente utilizada a escala mundial en la caracterización de muestras inorgánicas y orgánicas. En el campo biológico en los últimos 25 años la cantidad de trabajos publicados se ha multiplicado a un ritmo sostenido acompañado por mejoras en la resolución de los sistemas de medidas y el desarrollo de nuevos software que han dado nuevas posibilidades a esta metodología.

A pesar de todo este avance a nivel mundial en Argentina todavía son muy escasos los grupos que trabajan empleando espectroscopía vibracional en el área microbiológica, epidemiológica, proteínas y diagnóstico de cáncer. En este sentido Brasil tiene grupos de investigación que trabajan sobre las aplicaciones de espectroscopía infrarroja y Raman en la diferenciación de células malignas.

Cuando se decidió empezar este trabajo nuestro nivel de incertidumbre, y el mío en particular, era muy grande. Hoy creo que el objetivo a alcanzar en ese momento ha sido ampliamente superado. Muchos contribuyeron en este camino, en especial la activa y permanente presencia de grupos de primera línea a nivel mundial resultó fundamental en cuanto al aporte científico y técnico que recibió el laboratorio. Los aportes del grupo del Dr. Dieter Nauman y del Dr, Juegen Schmitt son parte de este trabajo experimental. Con ellos hemos analizado y discutido largamente metodologías e interpretación de resultados. Creo y esto lo comparto con mi Director que sin sus aportes nuestros avances hubiesen sido mucho menores.

Se ha demostrado que la metodología puede ser aplicada en diversas áreas de la microbiología. La misma nos ha servido de herramienta de estudio y análisis de una gran diversidad de sistemas biológicos. Estos incluyeron:

1. El estudio de la expresión fenotípica de un organismo patógeno creciendo en biofilm, adherido a una superficie abiótica, y el análisis de la matriz polimérica producida en tales condiciones de cultivo. En este caso se demostró por espectroscopia IR y métodos químicos y bioquímicos que la diferente expresión fenotípica de las células sésiles en relación a sus contrapartes planctónicas, era una consecuencia de un proceso adaptativo al crecimiento adherido a superficie y no el resultado de una disminución de la velocidad específica de crecimiento de las células sésiles ni de una limitación de oxígeno
2. El desarrollo de una metodología basada en FT-IR y análisis multivariante que permite la determinación del nivel de piliación en Moraxella bovis. Se seleccionaron ventanas espectrales que permitieron diferenciar poblaciones por su grado de piliación independientemente del tipo de serología de pili de dicha población. Esta metodología fue confrontada con una técnica de ELISA mostrando muy buena correlación. Se está trabajando en modelos basados en la aplicación de redes neuronales artificiales y sistemas de caracterización cuantitativa tipo PLS que han dado resultados aceptables con un número reducido de datos. Se espera mejorar la robustez de estos sistemas con la incorporación de un mayor número de muestras
3. La construcción de una librería espectral que permite la discriminación e identificación de organismos aislados de gránulos de kefir. El sistema desarrollado fue confrontado con los métodos bioquímicos clásicos de caracterización resultando más rápido, económico y con un comparable nivel de certeza en cuanto a resultados obtenidos en el sistema en estudio.
4. El desarrollo de un sistema de diferenciación de poblaciones de M. bovis aisladas de animales de nuestro País que mostró un nivel de discriminación mayor que el resultante de la aplicación de métodos bioquímicos combinados con métodos moleculares.