Application Note AN-RS-047

Identificación fenotípica rápida de microorganismos con Raman

Un método simple y no destructivo para el análisis bacteriano.

Los microorganismos se encuentran entre las formas de vida más diversas de la Tierra. Presentan características únicas y desempenan papeles cruciales en los ciclos ecológicos de nutrientes y materiales. Los microorganismos son esenciales para la producción de alimentos, incluidos el yogur y las bebidas alcohólicas, y en la remediación de contaminantes ambientales. Además, la modificación genética de microorganismos facilita la producción de productos valiosos como la insulina. Dada su importancia, muchos países mantienen repositorios especializados como la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) y la Colección Suiza de Microorganismos (SCM) para preservar y acumular microorganismos.

Tradicionalmente, la identificación de microorganismos como las bacterias implicaba secuenciar su composición genética. Este costoso proceso requiere capacitación y equipo especializados. Sin embargo, la espectroscopia Raman es una herramienta potencial para identificar bacterias y detectar metabolitos producidos por el cultivo, proporcionando información sobre los bioprocesos y la función en un ecosistema. La cartera de productos Raman de laboratorio de Metrohm incluye opciones para la interrogación Raman de 785 nm y 1064 nm de cultivos bacterianos.

INTRODUCCIÓN

La espectroscopia Raman se utiliza en microbiología por su potencial para identificar bacterias y monitorear metabolitos. Todos los organismos vivos de la Tierra están compuestos de carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, fósforo, azufre y otros oligoelementos. Estos elementos se unen para formar ADN, lípidos, aminoácidos y otras biomoléculas. La composición de estas biomoléculas varía entre organismos. Algunas bacterias almacenan metabolitos (por ejemplo, polifosfato y glucógeno) dependiendo de las condiciones ambientales. Los espectros Raman de las bacterias reflejan estas diferencias químicas, lo que permite su identificación y dilucidar sus funciones en los bioprocesos.

EXPERIMENTO

El medio de cultivo agar caldo de lisogenia (LB) se preparó disolviendo polvo de LB y polvo de agar en agua desionizada siguiendo las especificaciones del fabricante (Sigma-Aldrich). Después de esterilizar en autoclave, la mezcla se vertió en placas Petri de vidrio esterilizadas y se enfrió. Una vez que el agar LB se solidificó, se presionaron los dedos sobre la superficie para transferir las bacterias al medio. Luego, la placa de Petri se incubó a temperatura ambiente hasta que se observaron colonias bacterianas.

La placa de Petri se colocó en un portasondas BAC150B y un microscopio de video BAC151C, y se recolectaron espectros Raman de las colonias y los medios de cultivo (Figura 1). Los parámetros de adquisición y configuración del instrumento se resumen en Tabla 1.

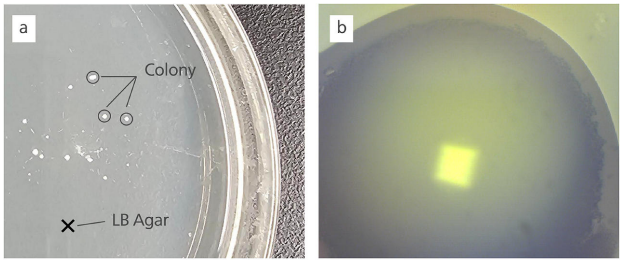
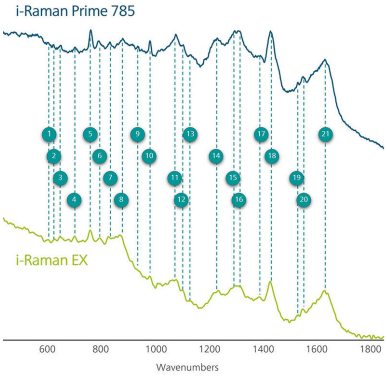


Figure 1. Colonias bacterianas formadas en agar LB (a), con una vista ampliada de una colonia bajo el objetivo BAC151C + 50x (b).

Tabla 1 Configuración del instrumento utilizado en este estudio Configuración del instrumento y parámetros experimentales utilizados en este estudio. * Los parámetros de adquisición varían según las características de la colonia.

Instrumento	Porta sonda (BAC150B)	Microscopio de vídeo (BAC151C)
i-Raman Prime 785	BAC102-785HT	Objetivo 50x
i-Raman EX	BAC102-1064HT	Objetivo 50x
Software BWSpec		
Parámetros de adquisición*		
Potencia del láser (%)	30–100	
Tiempo de integración	3–60 segundos	
Promedios	3–5	

ESPECTROS RAMAN DE COLONIAS BACTERIANAS



Position	cm-1	Assignments
1	622	Phenylalanine
2	642	Tyrosine
3	669	Guanine
4	723	Adenine
5	781	Guanine, cytosine, citric acid
6	811	Tyrosine
7	854	Tryptophan δ-ring
8	903	COC stretch
9	957	CN Stretch
10	1002	Phenylalanine
11	1101	Carbohydrate
12	1128	=C-C= unsaturated fatty acid
13	1156	Tyrosine
14	1253	Amide III
15	1321	Amide III
16	1337	Adenine
17	1419	COO- symmetric stretch
18	1454	CH2 bending (lipids)
19	1554	Tryptophan
20	1572	EPS
21	1654	Amide I

Figure 2. Espectros Raman de una colonia bacteriana formada en agar LB medidos utilizando i-Raman Prime 785 (línea verde azulado) y i-Raman EX (línea verde). Los picos Raman que corresponden a las características informadas están marcados con líneas de puntos y asignados en la tabla de la derecha [1].

Espectros Raman de la colonia bacteriana (Figura 2) contenía picos que representaban varios aminoácidos (1001, 1156 y 1654 cm^{-1}) y ADN (723, 669 y 1337 cm^{-1}). Estas características, comúnmente observadas en bacterias, confirman el éxito de i-Raman Prime 785 en el análisis microbiano [1].

La excitación Raman a 785 nm proporcionó picos más fuertes y nítidos que la excitación a 1064 nm. Esto se atribuye al mayor poder de dispersión del láser de 785 nm y a la mejor resolución del detector CCD de silicio en comparación con el detector de matriz InGaAs con una menor densidad de píxeles. Sin embargo, la excitación de 1064 nm puede mitigar la fluorescencia asociada con sustratos de colores oscuros, como el agar chocolate o el agar sangre.

DIFERENCIACIÓN DE BACTERIAS

Bacterias con dos morfologías distintas (blanca y amarilla) se formaron en el agar LB, lo que sugiere que son organismos diferentes (Figura 3). Los espectros Raman de estas dos bacterias fueron marcadamente diferentes, y las bacterias amarillas mostraron picos asociados con pigmentos de colores que se encuentran comúnmente en plantas y microorganismos [1].

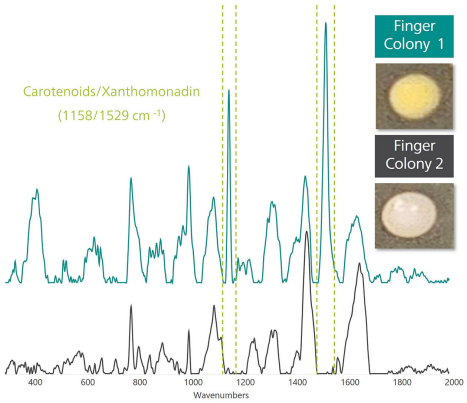


Figure 3. Espectros Raman de colonias bacterianas amarillas (línea verde azulado) y blancas (línea gris) formadas en el agar LB. Los espectros están corregidos desde la línea base. Los picos Raman que se muestran dentro de las líneas punteadas pueden estar asociados con el color amarillo de esa colonia en particular.

El análisis de componentes principales (PCA) puede ser adecuado para diferenciar bacterias con características fenotípicas distintas en pequenas comunidades bacterianas, como en este experimento (Figura 4). Sin embargo, los investigadores suelen desarrollar algoritmos de aprendizaje automático para detectar diferencias sutiles en picos menores para una caracterización más detallada.

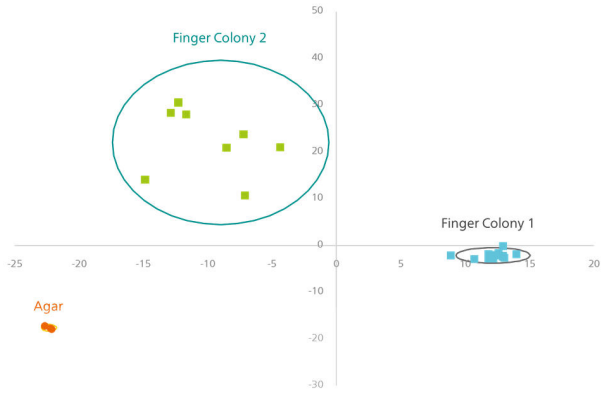


Figure 4. Gráfico de PCA de los espectros Raman recolectados de colonias blancas y amarillas formadas en agar LB. Elipse de confianza 0,95.

NOTA DE PRUEBA DE CAMPO

- El uso de placas Petri de vidrio evita las contribuciones espectrales del plástico.
- Los espectros Raman de las colonias pueden cambiar después del almacenamiento a baja temperatura y el cultivo prolongado.
- Se utiliza un microscopio de vídeo con excitación láser de 1064 nm para visualizar el punto láser.

CONCLUSIÓN

La espectroscopia Raman se puede utilizar para adquirir espectros de colonias bacterianas directamente de medios de cultivo sólidos. Los espectros Raman recopilados con excitación de 785 nm proporcionan una mayor resolución, mientras que la excitación a 1064 nm reduce la fluorescencia de los medios de cultivo.

Las colonias bacterianas simples se pueden diferenciar utilizando modelos PCA, pero se pueden utilizar algoritmos avanzados de aprendizaje automático para caracterizar comunidades microbianas más complejas.

Los usuarios pueden exportar fácilmente los archivos espectrales de los instrumentos i-Raman para un análisis posterior utilizando el software BWSpec u otras herramientas de aprendizaje automático más avanzadas.

REFERENCIAS

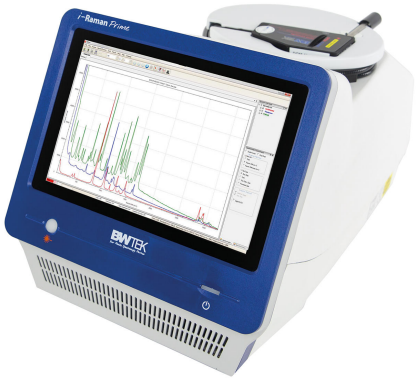
1. Paret, M. L.; Sharma, S. K.; Green, L. Metal. Caracterización bioquímica de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas asociadas a plantas con espectroscopia Micro-Raman. *Espectroscopia de aplicaciones* 2010, *64* (4), 433–441. DOI:10.1366/000370210791114293

CONTACT

Metrohm México
Calle. Xicoténcatl #181, Col Del Carmen, Alcaldía Coyoacán.
04100. Ciudad de México
México

info@metrohm.mx

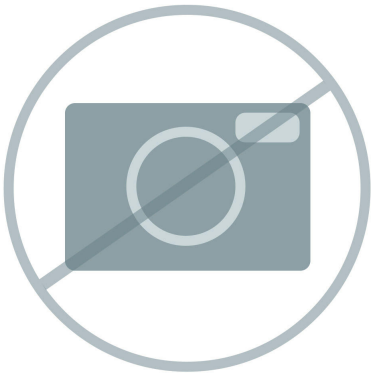
CONFIGURACIÓN



Espectrómetro Raman portátil i-Raman Prime 785S

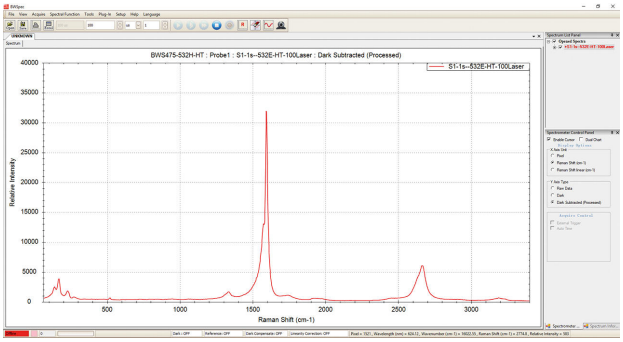
El i-Raman® Prime 785S es un sistema Raman de alto rendimiento, bajo nivel de ruido y totalmente integrado, con ordenador tipo tableta y sonda de fibra óptica incorporados. Este espectrómetro Raman portátil utiliza un detector equipado con una matriz de CCD con alta eficiencia cuántica, congelación termoeléctrica (-25 °C) y alto rango dinámico para proporcionar análisis Raman en el ámbito de investigación, incluidas la cuantificación e identificación en tiempo real. El alto rendimiento proporciona espectros Raman con una excelente relación senal/ruido, lo que permite la medida de procesos rápidos e incluso de las senales Raman más débiles para poder detectar también sutiles diferencias en las muestras.

El i-Raman Prime 785S tiene un diseno móvil y una combinación única de un amplio rango espectral y una alta resolución, de modo que permite realizar medidas desde 150 cm^{-1} hasta 3350 cm^{-1}. El i-Raman Prime puede funcionar con una batería recargable y, por lo tanto, es fácil de transportar. De este modo, pueden llevarse a cabo en cualquier lugar análisis Raman de gran precisión, elevado valor cuantitativo y alta calidad en el ámbito de investigación. El sistema está optimizado para el uso con nuestra tecnología STRaman® para el análisis a través de embalajes no transparentes.



Objetivo de microscopio de vídeo, 50 aumentos

Objetivo de microscopio, con corrección infinita, 50 aumentos, distancia de trabajo (mm) = 9.15, distancia focal (mm) = 4, apertura numérica (NA) = 0.55.
RML150A



Software BWSpec

BWSpec® es el software de espectroscopía general de B&W Tek para el control de aparatos y el registro de datos, lo que incluye el análisis y la tendencia de picos en tiempo real. BWSpec es el software operativo incluido con la compra de todos los sistemas Raman portátiles y los espectrómetros de B&W Tek. En su diseno se incluyen funciones para cubrir una amplia gama de aplicaciones y realizar medidas y cálculos complejos con tan solo pulsar un botón. Es compatible con múltiples formatos de datos y ofrece la opción de optimizar los parámetros de medida, como el tiempo de integración y el control de la potencia de salida del láser. Además del registro de datos y el tratamiento de datos, también incluye la sustracción automática de la capa oscura, suavizado de espectro, corrección de línea base, monitorización de picos y tendencias.

Espectrómetro Raman portátil i-Raman EX

El espectrómetro i-Raman® EX forma parte de la galardonada serie de espectrómetros Raman portátiles i-Raman con nuestro láser patentado CleanLaze® que proporciona 1064 nm de excitación láser. Mediante un detector de matriz InGaAs de alta sensibilidad con refrigeración termoeléctrica profunda, amplia gama de regulación y un diseno de espectrógrafo de alto rendimiento, este espectrómetro Raman portátil ofrece una elevada relación senal/ruido sin inducir autofluorescencia, lo que permite medir una extensa variedad de productos naturales, muestras biológicas (como cultivos celulares) y muestras coloreadas.

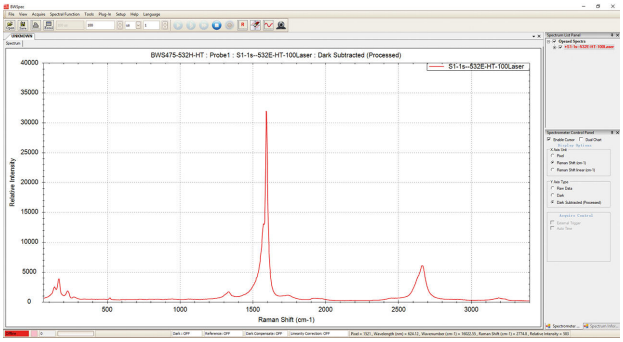
El espectrómetro i-Raman EX aporta una gama de cobertura espectral de 100 cm^{-1} a 2500 cm^{-1}, lo que le permite medir en toda la región de las huellas dactilares. El pequeno tamano del sistema, su diseno ligero y su bajo consumo de corriente garantizan la capacidad de análisis Raman apto para investigación en cualquier lugar. Para ampliar la capacidad de análisis, puede utilizarse con nuestro software patentado Vision, así como con el software de análisis multivariante BWIQ® y el software de identificación BWID®. Con el i-Raman EX, siempre tendrá una solución Raman de alta precisión para el análisis cualitativo y cuantitativo sin fluorescencia.

BWS485III

Objetivo de microscopio de vídeo, 50 aumentos

Objetivo de microscopio, con corrección infinita, 50 aumentos, distancia de trabajo (mm) = 9.15, distancia focal (mm) = 4, apertura numérica (NA) = 0.55.

RML150A



Software BWSpec

BWSpec® es el software de espectroscopía general de B&W Tek para el control de aparatos y el registro de datos, lo que incluye el análisis y la tendencia de picos en tiempo real. BWSpec es el software operativo incluido con la compra de todos los sistemas Raman portátiles y los espectrómetros de B&W Tek. En su diseno se incluyen funciones para cubrir una amplia gama de aplicaciones y realizar medidas y cálculos complejos con tan solo pulsar un botón. Es compatible con múltiples formatos de datos y ofrece la opción de optimizar los parámetros de medida, como el tiempo de integración y el control de la potencia de salida del láser. Además del registro de datos y el tratamiento de datos, también incluye la sustracción automática de la capa oscura, suavizado de espectro, corrección de línea base, monitorización de picos y tendencias.