

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

INFORME DE

TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN

EVALUACIÓN DE ESPECTROS RAMAN DEL ADN GENÓMICO Y  
PERFIL PROTEICO DE DOS BACTERIAS DE IMPORTANCIA  
BIOMÉDICA MEDIANTE LA METODOLOGÍA SERS

Centro de Investigación en Biotecnología y Laboratorio de Microscopía  
Raman

Esteban Solís Campos

Cartago, Noviembre 2017

# EVALUACIÓN DE ESPECTROS RAMAN DEL ADN GENÓMICO Y PERFIL PROTEICO DE DOS BACTERIAS DE IMPORTANCIA BIOMÉDICA MEDIANTE LA METODOLOGÍA SERS

Esteban Solís Campos\*

## RESUMEN

Anualmente, alrededor de 420 000 personas mueren a nivel mundial por consumir alimentos contaminados, lo cual repercute en la necesidad de desarrollar métodos de detección de microorganismos patógenos que sean rápidos, reproducibles y baratos. La espectroscopía Raman destaca como una técnica capaz de cumplir con estas características, por lo cual esta investigación buscó obtener espectros Raman del ADN genómico y proteínas de *Salmonella enterica* y *Klebsiella pneumoniae*, bacterias relacionadas con intoxicaciones por alimentos y propagación de enfermedades nosocomiales, respectivamente. Se utilizó la metodología SERS, donde se monitorearon dos agentes reductores ( $\text{NaBH}_4$  y citrato) y un estabilizante (citrato) para la síntesis de AgNPs. Alternativamente, se optimizó la extracción del ADN genómico y se realizaron diluciones hasta 1:64, las cuales fueron sometidas a SERS. Para el análisis de proteínas totales, se probaron los métodos de extracción con fenol saturado y TRIzol; y se evaluaron los extractos del mejor por medio de SERS. De esta manera, se eligió la síntesis de AgNPs reducidas con  $\text{NaBH}_4$  y estabilizadas con citrato, bajo la proporción molar 1:4:0,1 ( $\text{AgNO}_3$ : $\text{NaBH}_4$ :citrato); con partículas esféricas de 65 nm de diámetro y  $\lambda_{\text{máx}}$  en 387-391 nm. El ADN evidenció las señales típicas de las bases nitrogenadas, fosfato y desoxirribosa en SERS, cuyas concentraciones óptimas en la detección estuvieron entre los 34,4 ng/ $\mu\text{L}$  y 235,1 ng/ $\mu\text{L}$ . En cuanto a la extracción de proteínas, se seleccionó la extracción fenólica por evidenciar una pureza significativamente mayor ( $p > 0,05$ ). Se pudieron caracterizar más de diez señales características de los modos vibracionales de las proteínas por medio de SERS, a pesar de las bajas intensidades obtenidas.

\*INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN, Escuela de Biología. Ingeniería en Biotecnología. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica, 2017.

EVALUACIÓN DE ESPECTROS RAMAN DEL ADN GENÓMICO Y  
PERFIL PROTEICO DE DOS BACTERIAS DE IMPORTANCIA  
BIOMÉDICA MEDIANTE LA METODOLOGÍA SERS

Informe presentado a la Escuela de Biología del  
Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial  
para optar al título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología

**Miembros del Tribunal**

*Laura M Rojas*

\_\_\_\_\_  
Laura Rojas Rojas, MSc.

Profesora asesora externa, ITCR

*Silvia Arce*

\_\_\_\_\_  
Silvia Arce Solano, Licda.

Profesora asesora interna, ITCR

*Erick Hernández Carvajal*

\_\_\_\_\_  
Erick Hernández Carvajal, PhD.

Lector, ITCR

## **DEDICATORIA**

A todas las personas que de alguna u otra forma contribuyeron en mi desarrollo integral, quienes depositaron su confianza en mí y quienes me hicieron pasar momentos agradables a lo largo del camino.

## AGRADECIMIENTOS

El autor desea hacer constancia de su agradecimiento a las siguientes personas y organismos, por su colaboración en el presente trabajo:

A mi profesora asesora externa Laura Rojas Rojas, MSc. Por aportar de su extraordinario conocimiento científico y liderazgo que permitieron la realización de este proyecto. Por siempre estar pendiente y dispuesta a ayudar. Porque confió en este trabajo y depositó su energía para que todo saliera de la mejor manera.

A mi profesora asesora interna Silvia Arce Solano, Ing. Porque su confianza en mí suscitó mis ganas de ser cada vez mejor. Por siempre escuchar y ayudarme con los problemas enfrentados día tras día durante este trabajo. Por ser una científica y persona extraordinaria y convertirse en un ejemplo profesional para mi vida.

Al profesor Erick Hernández Carvajal, PhD. Por su profunda y valiosa contribución a mi crecimiento personal y profesional durante los dos años en los cuales trabajé como asistente del proyecto VIE.

Al profesor Dionisio Gutiérrez Fallas, PhD. Por permitirme trabajar en el proyecto VIE y por su constante cordialidad y disposición a ayudarme con las mediciones de este trabajo.

A mis compañeros asistentes del proyecto: Elizabeth Leiva Mata y Paulo Roldán Quirós. Por permitirme trabajar en un verdadero equipo, sólido y colaborativo. Con especial cariño y nostalgia.

Al profesor Ricardo Coy Herrera, MSc. Por colaborar en el desarrollo experimental de este trabajo y por siempre haber estado dispuesto a ayudarme con mis dilemas científicos a lo largo de mi carrera profesional.

Al Centro de Investigación en Biotecnología (CIB). Por colaborar con algunos de los reactivos que permitieron el desarrollo de este proyecto. Por facilitar sus instalaciones para llevar a cabo la mayoría de los experimentos. Por hacerme crecer como científico y persona semana tras semana a lo largo de este trabajo y toda mi carrera profesional. Y por permitirme trabajar al lado de personas extraordinarias, que me contagiaron de su pasión por la Biotecnología y las ganas de ser mejor cada día.

Al Laboratorio de Microscopía Raman. Por permitirme realizar las mediciones de las muestras de mi proyecto de graduación y enseñarme a trabajar en equipo a lo largo de mis dos años como asistente.

Al Centro de Investigación y de Servicios Químicos y Microbiológicos (CEQIATEC). Por colaborar con algunos de los reactivos que permitieron el desarrollo de este proyecto. Por facilitar sus instalaciones para llevar a cabo algunos de los experimentos. Por hacerme crecer como científico y persona a lo largo de este trabajo y los últimos 3 años de mi carrera profesional. En especial a la coordinadora Noemy Quirós Bustos.

Al Laboratorio Institucional de Microscopía (LIM). Por ayudarme con las mediciones de nanopartículas en el Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM).

A la Proveduría de la Escuela de Química de la Universidad de Costa Rica. Por colaborar con algunos reactivos que facilitaron la realización de los experimentos de este trabajo.

Al Laboratorio de Investigación y Tecnología de Polímeros (POLIUNA) de la Universidad Nacional de Costa Rica. Por permitirme realizar las mediciones de tamaño de las nanopartículas en el Zetasizer.

# ÍNDICE GENERAL

RESUMEN .....	II
DEDICATORIA.....	IV
AGRADECIMIENTOS .....	V
ÍNDICE GENERAL.....	VII
ÍNDICE DE CUADROS .....	XI
ÍNDICE DE FIGURAS .....	XII
ÍNDICE DE ANEXOS .....	XIV
ÍNDICE DE APÉNDICES.....	XV
ABREVIATURAS.....	XVI
INTRODUCCIÓN .....	1
REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
Enterobacterias.....	3
<i>Klebsiella</i> .....	3
<i>Salmonella</i> .....	3
Caracterización Gram .....	4
Identificación genotípica.....	5
Otras técnicas en la identificación de bacterias .....	7
Espectroscopía Raman.....	8
Técnica Raman convencional.....	8
Metodología <i>Surface-Enhanced Raman Scattering</i> .....	8
Importancia de la caracterización de biomoléculas por SERS en Costa Rica ...	13
OBJETIVOS .....	14
GENERAL.....	14
ESPECÍFICOS.....	14

MATERIALES Y MÉTODOS .....	15
Obtención, cultivo y almacenamiento de bacterias .....	15
Extracciones y análisis de ADN .....	15
Preparación de las bacterias .....	15
Extracción de ADN genómico bacteriano .....	15
Evaluación de la pureza y concentración.....	16
Electroforesis en gel de agarosa .....	16
Extracciones y análisis de proteínas.....	16
Preparación de las bacterias .....	16
Evaluación de la pureza y concentración.....	17
SDS-PAGE de proteínas .....	17
Electroforesis en gel de agarosa .....	18
Identificación de dos bacterias.....	18
Caracterización Gram.....	18
Identificación fenotípica .....	18
Identificación genotípica .....	19
Síntesis de nanopartículas de plata .....	22
Preparación de disoluciones.....	22
Métodos de síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs) .....	22
Medición de actividad SERS en las suspensiones de AgNPs preparadas .....	23
Selección y caracterización de las AgNPs.....	23
Obtención de espectros SERS de ADN genómico bacteriano.....	24
Prueba de diferentes condiciones para la extracción de ADN genómico .....	25
Extracción de ADN genómico para las mediciones SERS.....	25
Preparación de las diluciones de ADN genómico .....	25

Obtención de espectros SERS del ADN genómico extraído y sus diluciones	25
Análisis estadístico .....	25
Obtención de espectros de proteínas bacterianas .....	26
Obtención de reactivos y preparación de disoluciones .....	26
Evaluación de diferentes métodos de extracción para la obtención de proteínas bacterianas .....	27
Extracción de proteínas bacterianas para las mediciones SERS .....	28
Obtención de espectros SERS de proteínas bacterianas .....	28
Análisis estadístico .....	29
Evaluación de los espectros SERS.....	29
Recolección de datos y construcción de los espectros.....	29
Caracterización de las señales en los espectros .....	29
RESULTADOS.....	30
Identificación de dos bacterias.....	30
Síntesis de nanopartículas de plata .....	34
Obtención y evaluación de espectros SERS de ADN genómico bacteriano .....	37
Obtención y evaluación de espectros de proteínas bacterianas .....	43
DISCUSIÓN .....	49
Identificación genotípica y fenotípica de las bacterias .....	49
Síntesis de AgNPs .....	51
Extracción de ADN genómico bacteriano para mediciones SERS.....	52
Obtención y evaluación de espectros SERS de ADN genómico bacteriano .....	53
Evaluación de los métodos de extracción de proteínas bacterianas.....	58
Obtención y evaluación de espectros SERS de proteínas bacterianas .....	60
CONCLUSIONES.....	65

RECOMENDACIONES .....	67
REFERENCIAS.....	68
ANEXOS .....	76
APÉNDICES.....	85

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Núm.</b>	<b>Título</b>	<b>Pág.</b>
1	Perfil térmico utilizado en la amplificación de la región genómica “ADNr-16S” por PCR.	20
2	Distribución volumétrica de cada reactivo en las reacciones de amplificación del gen “16S SSU rRNA” por PCR.	20
3	Tratamientos con ARNasa realizados para las pruebas de extracción de ADN genómico de las bacterias en estudio.	25
4	Cuantificación de pureza y concentración del ADN genómico extraído para la identificación genotípica de dos bacterias.	31
5	Resultados del alineamiento local realizado a partir de las secuencias consenso amplificadas por cada imprimador para las dos bacterias en estudio.	32
6	Concentración y pureza del ADN genómico extraído en los diferentes tratamientos con ARNasa.	37
7	Concentración y pureza del ADN genómico extraído para las mediciones SERS.	38
8	Concentración de proteínas en los métodos de extracción probados (1A=1 mg/mL).	42
9	Concentración de ADN de doble banda y pureza en los métodos de extracción de proteínas.	43
10	Rendimiento (ng) de proteínas totales extraídas con fenol saturado de las dos bacterias en estudio (1A=1 mg/mL).	44
11	Concentración de ADN de doble banda y pureza en las extracciones de proteínas con fenol saturado de las dos bacterias en estudio.	45

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Núm.</b>	<b>Título</b>	<b>Pág.</b>
A	Mapas de las regiones hipervariables del gen ADNr-16S y su ARN.	6
1	Caracterización Gram de las dos bacterias en estudio.	30
2	Electroforesis del ADN genómico extraído de las dos bacterias en estudio y la amplificación del gen ADNr-16S.	31
3	Representación de los electroferogramas obtenidos en la secuenciación de las dos bacterias en estudio.	32
4	Dendrogramas basados en secuencias parciales del gen ADNr 16S de 11 bacterias.	33
5	Espectros SERS obtenidos en la prueba de selección del método de síntesis de AgNPs.	34
6	Micrografías TEM de las AgNPs sintetizadas por el método de NaBH <sub>4</sub> con citrato como estabilizante (1:4:0,1).	35
7	Curva de sensibilidad UV-vis para las diluciones de las AgNPs seleccionadas (1:4:0,1).	36
8	Electroforesis de la matriz de condiciones experimentales para el ADN genómico extraído de dos bacterias.	36
9	Electroforesis del ADN genómico extraído de dos bacterias por triplicado, incubado en ARNasa por 60 min a 37°C.	37
10	Comportamiento teórico y experimental de la concentración de las diluciones de ADN genómico (ng/μL) de las dos bacterias en estudio.	38
11	Comportamiento experimental de la relación de absorbancia A260/A280 en las diluciones de ADN genómico versus la relación óptima (1,8).	39
12	Electroforesis del ADN genómico extraído y sus respectivas diluciones.	39

13	Código de barras de las frecuencias esperadas en un espectro SERS de ADN genómico.	40
14	Espectros SERS del ADN genómico de <i>K. pneumoniae</i> y <i>S. enterica</i> con las AgNPs 1:4:0,1.	40
15	Espectros SERS de las diluciones del ADN genómico de las dos bacterias en estudio.	41
16	SDS-PAGE de los 2 métodos de extracción de proteínas evaluados.	42
17	Electroforesis de agarosa (1,5% m/v) de los 3 métodos de extracción de proteínas evaluados. Tinción con GelRed™.	43
18	SDS-PAGE de la extracción de proteínas totales con fenol saturado para las mediciones SERS.	44
19	Electroforesis de agarosa (1,5% m/v) de la extracción de proteínas totales con fenol saturado para las mediciones SERS. Tinción con GelRed™.	45
20	Código de barras de las frecuencias esperadas en un espectro SERS de proteínas.	46
21	Espectros SERS de los botones de proteínas extraídos de <i>K. pneumoniae</i> y <i>S. enterica</i> con las AgNPs 1:4:0,1.	46
22	Espectros SERS de los botones de proteínas y ADN genómico de <i>K. pneumoniae</i> y <i>S. enterica</i> , comparados con el de las AgNPs 1:4:0,1.	47

## ÍNDICE DE ANEXOS

Núm.	Título	Pág.
1	Distribución volumétrica para las reacciones de síntesis de AgNPs por el método de NaBH <sub>4</sub> con citrato como estabilizante.	75
2	Rangos de frecuencia seleccionados y su intensidad relativa para la construcción del código de barras de ADN.	75
3	Rangos de frecuencia seleccionados y su intensidad relativa para la construcción del código de barras de proteínas.	76
4	Alineamiento múltiple para la construcción de los dendrogramas.	76
5	Similaridad y distancia estadística con la base de datos GEN III de las especies probables en la identificación fenotípica de las dos bacterias en estudio.	77
6	Espectros Raman obtenidos en los métodos de síntesis de AgNPs por reducción con NaBH <sub>4</sub> y NaBH <sub>4</sub> con citrato estabilizante.	78
7	Distribución de tamaños de partículas obtenidos para las mediciones de las muestras en el zetasizer.	78
8	Concentración y pureza de las muestras de ADN en los tres tratamientos con ARNasa.	80
9	Concentración y pureza en las muestras de ADN para las mediciones SERS.	81
10	Concentración y pureza en las diluciones de ADN de <i>Klebsiella pneumoniae</i> para las mediciones SERS.	82
11	Concentración y pureza en las diluciones de ADN de <i>Salmonella enterica</i> para las mediciones SERS.	82

## ÍNDICE DE APÉNDICES

<b>Núm.</b>	<b>Título</b>	<b>Pág.</b>
1	Distribución volumétrica en la preparación de los geles de poliacrilamida, separador y de montaje.	84
2	Composición del buffer de carga (5X, con reductor) para las extracciones de proteínas.	84
3	Composición del buffer de extracción de proteínas (pH=8,5).	84
4	Composición del buffer de rehidratación de proteínas totales e insolubles.	84
5	Composición del buffer de rehidratación de proteínas solubles.	84
6	Conjunto global de señales correspondientes a los modos vibracionales del ADN en Raman.	85
7	Conjunto global de señales correspondientes a los modos vibracionales de proteínas Raman.	87

## ABREVIATURAS

SERS: Surface-Enhanced Raman Spectroscopy

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ARN: Ácido Ribonucleico

AgNPs: Nanopartículas de plata

MNPs: Nanopartículas metálicas

NaBH<sub>4</sub>: Borohidruro de sodio

WHO: World Health Organization u Organización Mundial de Salud

VIE: Vicerrectoría de Investigación y Extensión del Instituto Tecnológico de Costa Rica

BAM: Manual de Bacteriología Analítica

PFGE: Electroforesis en Gel de Campo Pulsado

ADNr-16S: ADN ribosomal 16S

EMBL: Laboratorio Europeo de Biología Molecular

DDBJ: DNA Data Bank of Japan o Banco de datos de ADN de Japón

ELISA: Ensayos Inmunoabsorbentes Ligados a Enzimas

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>: Carbonato de sodio

LSPR: Resonancia de Plasmones Localizados en la Superficie

UV: Ultravioleta

2D: dos dimensiones

MALDI-TOF: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight

EM: Electromagnetic Enhancement o Incremento Electromagnético

AgNO<sub>3</sub>: nitrato de plata

PPH: Proyecto de Proteoma Humano

SDS-PAGE: Dodecilsulfato de sodio-Electroforesis en Gel de Poliacrilamida

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

ACS: Sociedad Química Americana

TAE: Tris-Acetato-EDTA

NaCl: Cloruro de sodio

dNTPs: desoxinucleótidos trifosfato libres

NCBI: Centro Nacional para la Información Biotecnológica

SIM: Similaridad estadística en Biología

DIST: Distancia estadística en Biología

KOH: Hidróxido de potasio

HNO<sub>3</sub>: Ácido nítrico

NaOH: Hidróxido de sodio

TEM: Microscopía de Transmisión Electrónica

DDL: Dispersión Dinámica de la Luz

BPE: 1,2-di (4-piridil) etileno

KCl: Cloruro de potasio

HCl: Ácido clorhídrico

EDTA: Ácido etilendiaminotetracético

PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

DTT: Ditioneitol

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ : Fosfato diácido de sodio dihidratado

R6G: Rodamina 6G

C (aislado): Citosina

-C-: átomo de Carbono enlazado a otro antes o después del guión

-N-: átomo de Nitrógeno enlazado a otro antes o después del guión

A: Adenina

T: Timina

G: Guanina

dC: desoxicitidina

dA: desoxiadenosina

dT: desoxitimidina

dG: desoxiguanidina

$\text{PO}_2$ : fosfato en el ADN

$\text{CH}_2$ : grupo metileno

$\text{C}=\text{O}$ : grupo carbonilo

R: resto de la cadena de carbonos

-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>: ión amonio

-COO<sup>-</sup>: ión carboxilato

-SH: grupo tiol

I<sup>-</sup>: ión yoduro

Trp: Triptófano

Tyr: Tirosina

Arg: Arginina

Lys: Lisina

His: Histidina

Phe: Fenilalanina

Gly: Glicina

S-S: puente disulfuro

ASB: Albúmina de Suero Bovino

IgG: Inmunoglobulina G

Cps: cuentas por segundo

Los símbolos que acompañan a magnitudes numéricas, no presentes en esta lista, están basados en el Sistema Internacional de Unidades (S.I.)

## INTRODUCCIÓN

La detección de microorganismos influyentes en el área biomédica, como *Escherichia coli*, *Legionella pneumophila* y *Salmonella typhimurium*; es de gran importancia para la seguridad alimenticia y salud humana. Gran cantidad de enfermedades fatales son causadas debido a infecciones transmitidas por contaminación microbiológica de agua de consumo y alimentos; es por esta razón, que la detección rápida y sensible podría ayudar a prevenir enfermedades asociadas a patógenos microbianos (Zhou et al., 2014). Un objetivo importante para la medicina, genética y en ciencias forenses; es la caracterización de biomoléculas como los ácidos nucleicos y las proteínas por métodos específicos y diferenciales (Morla, Álvarez y Guerrini, 2016).

La espectroscopía Raman es una herramienta capaz de realizar huellas digitales para la rápida identificación de microorganismos y analitos biológicos (Wang y Yu, 2015). También, constituye una gran fuente de información estructural (Muntean, Leopold, Halmagyi y Valimareanu, 2011), la cual se ha utilizado para detectar diferencialmente moléculas de ADN, ARN, proteínas y lípidos (Lu et al., 2015). Li y Xu (2014), citan diversos estudios que reportan detección y caracterización de micro ARN, proteínas, células animales, células bacterianas; sin la necesidad de utilizar sondas específicas.

La técnica Raman convencional requiere altas concentraciones de muestra con muy poca fluorescencia (Lahr, Wallace y Vikesland, 2015). Las moléculas biológicas por lo general presentan poca dispersión Raman y mucha fluorescencia, lo cual limita la cantidad de información que se puede obtener de ellas (Muntean, Leopold, Halmagyi y Valimareanu, 2013). Sin embargo, la metodología SERS o *Surface-Enhanced Raman Scattering*, utiliza nanopartículas de metales nobles como sustrato activo a Raman y ligando del analito, posibilitando no solo la detección de bajas concentraciones del material a analizar, sino que puede incrementar la señal de las moléculas biológicas, evitando que la fluorescencia interfiera en la caracterización (Lahr et al., 2015).

SERS ha despertado gran interés por el estudio de los ácidos nucleicos (Torres-Núñez, Faulds, Graham, Alvarez y Guerrini, 2016). Mediante esta técnica se ha podido detectar y caracterizar ADN simple y doble banda, así como oligonucleótidos de ARN y ADN; utilizando nanopartículas de plata (AgNPs) sintetizadas por el método químico de reducción con  $\text{NaBH}_4$ . Se ha confirmado la especificidad de estas AgNPs por el ADN de doble banda, en comparación con el de banda simple; así como también se reporta que las mismas podrían ser utilizadas para la detección selectiva de diferentes grupos de bacterias Gram-negativas y positivas (Pramanik, Chatterjee, Saha, Devi y Kumar, 2016). Utilizando este tipo de sustratos SERS (AgNPs), también es posible detectar biomoléculas *in vivo* e *in vitro* con alta confiabilidad (Jiang et al., 2013).

Los estudios proteómicos por SERS se han ido desarrollando paralelamente a las investigaciones con ADN. Las proteínas desarrollan funciones vitales para los sistemas biológicos (Xu et al., 2014), ya que son compuestos fundamentales en el desarrollo

catalítico y selectivo de los procesos celulares en los organismos (Han, Zhao y Ozaki, 2009). Por medio de la metodología SERS es posible obtener espectros que representan una huella digital intrínseca de las sustancias y mezclas proteicas, con alta sensibilidad (Xu et al., 2014) y gran rendimiento (Chen, Cai, Ruan y Zhao, 2013). Los métodos libres de etiquetas o *label-free* se basan en la interacción *in situ* de las AgNPs con las vibraciones de las moléculas en estudio (Yu, Chu y Cheng, 2006) y pueden ser utilizados para detectar este tipo de muestras, permitiendo un estudio completo y dinámico de las mismas (Xu et al., 2014). Así, podrá analizarse la información vibracional proteica propiamente, lo cual es adecuado para las mezclas de proteínas (Chen et al., 2013).

Dada esta necesidad, en el 2016, el grupo de investigación coordinado por el Dr. Dionisio Gutiérrez de la Escuela de Física del Instituto Tecnológico de Costa Rica, inició el proyecto VIE: “Evaluación e identificación de microorganismos de importancia biomédica mediante espectroscopía Raman”, adscrito a la Escuela de Física. Los resultados actuales de este proyecto han permitido identificar preliminarmente 3 tipos diferentes de bacterias. Asimismo, a partir de estos resultados se evidenció la necesidad de complementar la información caracterizando algunas de las señales obtenidas en los espectros de identificación bacteriana. En este trabajo final de graduación se buscó obtener los espectros Raman del ADN genómico y perfil proteico de dos de las bacterias estudiadas mediante la metodología SERS. Además, para determinar la identidad bacteriana de los espectros generados, se realizó una caracterización Gram, fenotípica y genotípica.

# REVISIÓN DE LITERATURA

## Enterobacterias

La familia *Enterobacteriaceae* representa una gran cantidad de bacterias Gram-negativas que usualmente viven como saprófitos en el tubo digestivo de algunos mamíferos, entre ellos los humanos; aunque también pueden encontrarse en el suelo, agua y plantas (Guentzel, 1996; Puerta-García y Mateos-Rodríguez, 2010). *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Serratia*, *Citrobacter* y *Proteus*, son los géneros más importantes de esta familia (Guentzel, 1996).

Las enterobacterias constituyen una de las principales causas del incremento de infecciones en los hospitales. Las vías de transmisión más comunes son consecuencia del uso de técnicas invasivas; como los catéteres intravenosos, endoscopias, intervenciones quirúrgicas, empleo de inmunosupresores, entre otras (Puerta-García et al., 2010). *Klebsiella* y *Salmonella* son géneros altamente conocidos por ser responsables en problemas de salud a nivel mundial; sin embargo, son un número limitado de especies y serovariedades las causantes de la mayoría de las infecciones (Guentzel, 1996).

### Klebsiella

El género *Klebsiella* está constituido por el patógeno principal *K. pneumoniae*, además de otras especies como *K. oxytoca* y *K. granulomatis* (Puerta-García et al., 2010). Dicho género se ha caracterizado como la segunda causa más importante de bacteriemia por Gram-negativos, después de *E. coli* (Boye y Hansen, 2003; Puerta-García et al., 2010). En los laboratorios de microbiología, solo *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* y *K. mobilis* (*Enterobacter aerogenes*) suelen ser reportadas como especies de frecuencia clínica (Boye y Hansen, 2003).

*Klebsiella pneumoniae* es un patógeno oportunista, el cual afecta principalmente a personas con el sistema inmune debilitado y tiende a causar infecciones nosocomiales (Boye y Hansen, 2003; Li, Zhao, Liu, Chen y Zhou, 2014). Según los autores, los serotipos hipervirulentos de esta especie pueden causar infecciones a poblaciones enteras con amenazas de muerte, abscesos hepáticos (Guentzel, 1996; Puerta-García et al., 2010), meningitis, fascitis necrosante, endoftalmítis y neumonía grave (Puerta-García et al., 2010; Li y Xu, 2014). *K. pneumoniae* también suele presentarse como la causa de infecciones en el tracto urinario (Boye y Hansen, 2003).

### Salmonella

*Salmonella* es de las bacterias más importantes para el área clínica debido a su alta relación con enfermedades causadas por alimentos contaminados (Boye y Hansen, 2003). Según Hellberg et al. (2012), existen dos especies principales para este género: *S. enterica* y *S.*

*bongori*, las cuales contienen más de 2 500 serotipos divididos en 6 subespecies, conocidas como *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*.

Las especies de *Salmonella* se presentan como organismos flagelados y anaerobios facultativos, usualmente caracterizados por los antígenos O, H y Vi. Existen más de 1800 serovariedades conocidas. Cuando alguna serovariedad patogénica se ingiere a través de la comida, sobrevive a la barrera ácida del estómago e invade la mucosa del intestino, donde produce toxinas. Al invadir las células epiteliales intestinales, estimula la liberación de citoquinas pro-inflamatorias, donde, la respuesta inflamatoria provocada causa diarrea y podría desencadenar la formación de úlceras y destrucción de la mucosa (Giannella, 1996).

Según la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2017), alrededor de 420 000 personas mueren por causa de intoxicación con alimentos anualmente. De acuerdo con la organización, *Salmonella* ha presentado el mayor porcentaje de estas muertes por causa de diarreas, donde se han asociado 175 000 muertes anuales para el sureste asiático, 32 000 en África, cerca de 26 000 en la región este del Mediterráneo, 8550 en América y casi 2000 para Europa.

De acuerdo con Hellberg et al. (2012), la FDA realiza pruebas rutinarias para determinar la presencia de *S. enterica* mediante procedimientos basados en el capítulo cinco del Manual de Bacteriología Analítica (BAM). La metodología descrita involucra dos días de enriquecimiento bacteriano, seguidos de tres a cinco días de aislamiento, y pruebas bioquímicas y serológicas de confirmación. Muchas veces, para confirmar los aislamientos realizan electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), lo cual puede tardar de dos a cuatro semanas. Aunque dichos métodos son efectivos, requieren de mucho tiempo para obtener resultados confiables, lo cual retrasa el progreso de investigaciones sobre brotes relacionados con alimentos.

### **Caracterización Gram**

La tinción de Gram es una técnica inventada por el científico danés Hans Christian Gram en 1884 (Coico, 2005; Sutton, 2006; Peck y Badrick, 2017), la cual constituye uno de los métodos empíricos más comunes para iniciar la caracterización de una bacteria (Sutton, 2006). Dicho método está basado en propiedades físicas y químicas de las paredes celulares bacterianas, permitiendo diferenciarlas en dos grandes grupos: Gram-negativas o Gram-positivas (Coico, 2005; Sutton, 2006).

Las bacterias tienen una pared celular hecha de una sustancia llamada peptidoglucano, la cual promueve rigidez celular y protección osmótica frente a los cambios ambientales. Las bacterias Gram-positivas están cubiertas por una pared gruesa, con el peptidoglucano distribuido como las hebras de una malla; mientras que las Gram-negativas poseen una pared más delgada, rodeada por una bicapa fosfolipídica (Sutton, 2006).

De acuerdo con Sutton (2006), para caracterizar a una bacteria por tinción Gram, se utilizan métodos basados en la tinción de la pared. Para lograrlo, primero se tiñe con cristal violeta, el cual es un compuesto lo suficientemente pequeño como para penetrar la pared de ambos tipos celulares. Sin embargo, cuando se añade Lugol, cuya composición está basada en yodo ( $I_2-I^-$ ), se forma el complejo yodo-tinte que existe con dificultad en las bacterias Gram-negativas. El proceso de decoloración con solventes orgánicos, como el etanol o la acetona, elimina el tinte de las paredes Gram-negativas. Es el grosor de la pared celular en las bacterias Gram-positivas que permite retener dicho complejo y así, diferenciarlas del otro grupo (Sutton, 2006). Para que las Gram-negativas se puedan observar bajo el microscopio, se realiza una contratinción con otro tinte (e.g. safranina).

### **Identificación genotípica**

La identificación rápida y precisa de las bacterias a nivel de género y especie se ha vuelto de gran importancia para los estudios de ecología microbiana, principalmente en el ámbito de la salud humana (Ceuppens et al., 2017). Usualmente, dicha identificación se realiza por los métodos fenotípicos tradicionales; como la fermentación y asimilación de azúcares, análisis de morfología y tinción. No obstante, todos son sujetos a variación y dependientes de la forma de interpretación (Bosshard, Abels, Zbinden, Bottger y Altwegg, 2003).

Actualmente, la identificación genotípica se ha vuelto la alternativa y/o complemento de los métodos fenotípicos a nivel mundial. Esta técnica involucra la caracterización de un blanco filogenéticamente informativo, como lo es la subunidad ribosomal 16S (Bosshard et al., 2003). El gen que codifica para esta subunidad se denomina ADNr-16S y es del tipo *housekeeping*, generalmente conservado a nivel del dominio bacteriano. No obstante, contiene ciertas regiones hipervariables que presentan diferencias en la mayoría de los organismos, algunas veces a nivel de especie o subespecie (Hellberg et al., 2012).

Normalmente, se diseñan imprimadores de amplio espectro que reconocen las secuencias conservadas que flanquean el ADNr-16S, con el fin de amplificar las regiones especie-específicas variables entre organismos (Bosshard et al., 2003). Aunque la amplificación de ADNr-16S no ha sido destinada a la descripción a nivel de especie, ha demostrado lograrlo para algunos patógenos humanos, incluso para los aún no caracterizados (Ceuppens et al., 2017).

Para el análisis de la información obtenida a partir de la secuenciación de ADNr 16S, se requiere realizar agrupamientos de datos y alineamientos con otras secuencias referencia en las bases de datos (Ceuppens et al., 2017). Un aspecto importante sobre la secuenciación del gen ADNr-16S, es la calidad de las fuentes de información pública, como GenBank, EMBL y DDBJ, ya que muchas secuencias pueden ingresar, independientemente de su calidad. Es por esta razón, que es importante determinar la confiabilidad del estudio con el cual se están realizando los alineamientos de datos (Bosshard et al., 2003).

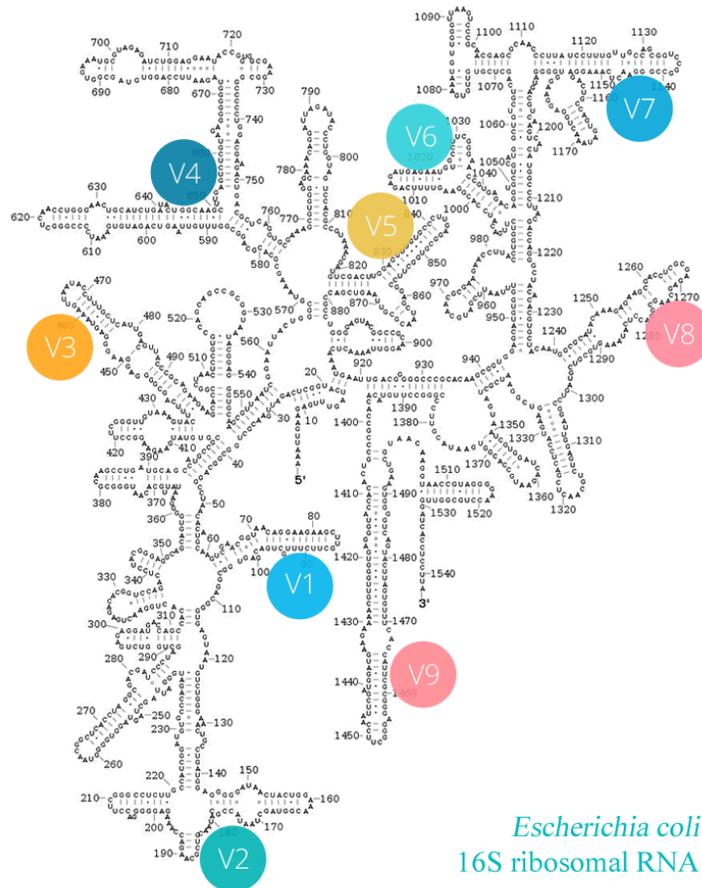
Según Ceuppens et al. (2017), el fragmento completo del ADNr-16S corresponde a aproximadamente 1500 pb, compuesto por nueve regiones hipervariables. Sin embargo,

solo un fragmento de aproximadamente 200-500 pb es usualmente secuenciado. De acuerdo con Clarridge (2004), las primeras 500 pb funcionan bastante bien para diferenciar a las enterobacterias, como sustituto del gen completo.

A continuación, se pueden observar los mapas del ADNr y ARNr 16S, con las posiciones de sus respectivas regiones hipervariables (figura A).



1



2

**Figura A.** Mapas de las regiones hipervariables del gen ADNr-16S y su ARN. 1: Mapa lineal del gen (ChunLab Inc., 2017). Rojo: Regiones hipervariables. Azul: Regiones conservadas. Verde: Imprimadores forward utilizados para amplificar las regiones subyacentes. Anaranjado:

Imprimadores reverse. **2:** Mapa bidimensional del ARN producido por el gen de *Escherichia coli* (Era7 Information Technologies, 2016).

Las regiones V1 y V2 poseen la mayor precisión de todo el gen ADNr-16S; desafortunadamente, solo ha permitido clasificar muy pocas secuencias a nivel de género (Guo, Ju, Cai y Zhang, 2013). Según Ceuppens et al. (2017), los genomas de referencia pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* difieren solo en 1-38 pb en las primeras 500 pb del gen (V1, V2 y V3). Aunado a esto, V1, V2, V3 y V6; suelen ser poco funcionales para la determinación de la identidad de las enterobacterias (Chakravorty, Helb, Burday, Connell y Alland, 2007; Guo et al., 2013). Por ejemplo, se ha demostrado que secuenciar de V1 a V3 no funciona como mecanismo para diferenciar a *Salmonella* de otras bacterias estrechamente relacionadas (Ceuppens et al., 2017).

Para identificar bacterias por ADNr-16S, además de seleccionar adecuadamente las regiones hipervariables que permitan establecer diferencias entre organismos, se debe tomar en cuenta que existe heterogeneidad intragenómica o polimorfismo intracelular (Hellberg et al., 2012). Este fenómeno quiere decir que dicho gen suele tener de 1-15 copias dentro de cada genoma bacteriano donde, en algunas ocasiones, dichas copias muestran variabilidad. Sin embargo, Hellberg et al. (2012) mencionan que dicha heterogeneidad está ligada solo a ciertas regiones hipervariables, relacionadas con hélices específicas de la estructura secundaria de su ARN.

Un estudio realizado sobre 110 especies bacterianas demostró que V2, V3 y V6 fueron las regiones con mayor cantidad de polimorfismos intracelulares (Chakravorty et al., 2007). Por otro lado, la mayoría de las heterogeneidades encontradas en *Salmonella*, por Hellberg et al. (2012), se encontraron en V3, V6 y V7, de acuerdo con un mapa basado en numeraciones para *E. coli*. No obstante, la secuenciación del gen ADNr-16S de *S. enterica* ha permitido su diferenciación más allá del nivel de especie, aun cuando ha sido reportada con heterogeneidad intragenómica, asignada a 7 copias del gen (Hellberg et al., 2012).

A pesar de las dificultades técnicas que caracterizan a la identificación por ADNr-16S, se han reportado diferencias entre cepas de bacterias relacionadas con brotes clínicos importantes (Clarridge, 2004; Sacchi et al., 2005). Ninguna de las nueve regiones mencionadas anteriormente posee los suficientes polimorfismos para establecer diferencias taxonómicas por sí misma, razón por la cual debe seleccionarse un conjunto o fragmento estratégico de mayor tamaño (Kumar, Brooker, Dowd y Camerlengo, 2011). La categoría taxonómica con la cual se puede atribuir identidad al organismo en estudio depende en cuán bien, dicho fragmento, cubra la plasticidad bacteriana de las especies en estudio.

### **Otras técnicas en la identificación de bacterias**

Desde el siglo XX, se estandarizaron y optimizaron diversos métodos para la detección de microorganismos (e.g. platingo diferencial), los cuales permitieron alcanzar resultados

confiables en el campo de la patología microbiana. Sin embargo, dichos métodos requieren de mucho tiempo para la obtención de resultados (Zhou et al., 2014). Actualmente, se utilizan otras técnicas más sensibles y rápidas; como la citometría de flujo, ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Zhou et al., 2014). No obstante, estas últimas presentan diversas limitantes de velocidad, especificidad, sensibilidad, costo, eficiencia, versatilidad o rendimiento, para la detección bacteriana rutinaria en muchas de las ocasiones (Driskell et al., 2005). La espectroscopía Raman se utiliza para obtener información estructural de alta calidad y se presenta como una alternativa producto de los problemas mencionados anteriormente (García y Moreno, 2008).

## **Espectroscopía Raman**

### Técnica Raman convencional

La técnica de Raman fue llamada así en honor al científico indio que descubrió su fundamento físico en 1928, Chandrasekhara Raman. Según García y Moreno (2008) y Sekhar, Movasaghi, Rehman y Rehman (2014); cuando un haz de luz incide sobre una muestra, parte de esa luz se reemite elásticamente y otra es dispersada inelásticamente; la sección dispersada puede tener una mayor o menor energía que los fotones incidentes, lo cual es característico de la interacción con las moléculas del analito. El espectro Raman obtenido, a partir de la dispersión inelástica de la luz incidente, es como la huella dactilar de cada sustancia o mezcla. La cantidad de luz dispersada es proporcional al cuadrado de la intensidad del campo eléctrico en la posición en la que se encuentra la molécula, y al tamaño de esta (García y Moreno, 2008). Por lo tanto, se puede decir que la medición de dispersión Raman está basada en la espectroscopía vibracional y rotacional de las moléculas del analito (Wang y Yu, 2015).

Entre las principales ventajas de utilizar Raman para la caracterización de biomoléculas, resalta su resistencia a factores externos, como la humedad y oxígeno ambiental (Jiang et al., 2013), la alta sensibilidad, selectividad intrínseca debido a la generación de huellas digitales, su rápida preparación y adquisición de datos de manera no destructiva (Wang y Yu, 2015) en ambientes acuosos (Zhou et al., 2014). Debido a la baja dispersión Raman que presenta el agua, es posible utilizar este disolvente en la técnica, lo cual es una ventaja en el manejo de muestras biológicas (Wang y Yu., 2015; Lu et al., 2015).

### Metodología Surface-Enhanced Raman Scattering

El fenómeno SERS fue observado por primera vez por Fleischmann, Hendra y McQuillan en 1974, quienes reportan espectros vibracionales intensos de piridina,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , ácido fórmico y formato de sodio; utilizando electrodos de plata y de cobre. El descubrimiento de que las señales de Raman pueden ser incrementadas por la metodología SERS, ha revolucionado el campo de la detección de biomoléculas y monitoreo de microorganismos y tejidos, incluso *in vivo* (Zhou et al., 2014). Por lo tanto, SERS ha sido de gran importancia para la investigación biofísica y biomédica a nivel mundial (Muntean et al., 2013; Wang y

Yu, 2015); debido a su alta selectividad, sensibilidad, especificidad (Zhang et al., 2011; Jiang et al., 2013; Li y Xu, 2014; Shi et al., 2015) y su menor susceptibilidad a errores por fotoblanqueo (Zhang et al., 2011), limitantes presentes en la técnica de Raman convencional.

El incremento SERS en un analito particular (razón aproximada de  $10^{-17}$ – $10^{-16}$  cm<sup>2</sup> por molécula), según Wang y Yu (2015), se logra utilizando sustratos de nanopartículas de metales nobles. Para la adecuada intensificación de las señales se requiere considerar dos aspectos importantes; primero, la longitud de onda del láser debe coincidir con la resonancia de plasmones localizados en la superficie (LSPR) del metal, y segundo, las moléculas del analito deben ser polarizables (Lahr et al., 2015). De lo contrario, no se llevará a cabo el fenómeno SERS deseado para la identificación del material en estudio.

Hay dos mecanismos atribuidos al efecto SERS, el incremento electromagnético (EM) y el mejoramiento químico (Li y Xu, 2014; Wang y Yu, 2015). El incremento EM es el predominante, debido a una interacción que es producto de la armonización entre la longitud de onda del láser incidente y los plasmones superficiales del metal. El mejoramiento químico ocurre por un aumento en la polarizabilidad del analito en el momento de adsorción a la superficie metálica; se genera un estado de acoplamiento electrónico resonante por la transferencia de carga, que desencadena el incremento en la resonancia Raman (Wang y Yu, 2015). Cuando ambos mecanismos son tomados en cuenta, se estima que el incremento Raman puede alcanzar el orden de  $10^{14}$  unidades (Kneipp y Kneipp 2006).

Entre los sustratos activos para SERS que presentan mejor ampliación en las señales de Raman, se encuentran las nanopartículas de plata y oro en dispersión coloidal (10-100 nm de diámetro). La utilización de estos sustratos minimiza la quema de la muestra por la pérdida de agua, permitiendo incrementar la señal Raman con láseres relativamente poderosos. Sin embargo, una limitante que posee SERS, es la aglomeración de la fase dispersa coloidal durante la síntesis de nanopartículas (Wang y Yu, 2015).

El estudio de materiales nanoestructurados de oro y de plata con biomoléculas, ha sido un campo activo en las aplicaciones de la ciencia de los últimos años. Investigaciones a nivel de ADN han revolucionado el desarrollo de biosensores para diagnósticos clínicos, detección de bacterias patogénicas, así como aplicaciones sobre el suministro de drogas. Este tipo de interacciones dependen estrictamente del tamaño, forma, y química de la superficie de las nanopartículas metálicas, como es el caso de la intercalación de AgNPs (tamaño 5-10 nm) con el ADN del timo de ternero, el cual genera un vínculo tan fuerte que incrementa la  $T_m$  (temperatura de fusión del ADN) y ocasiona un efecto hipercrómico en la absorción del ADN a 260 nm (Pramanik et al., 2016). Además; Park, Joo, Kim y Lee (2012) han observado una dependencia en el método de ensamblaje de unos conjugados entre ADN y nanocubos de plata; donde la distancia entre los componentes, la geometría de las nanopartículas y las propiedades ópticas de la mezcla están fuertemente relacionados (Pramanik et al., 2016).

Actualmente, se han desarrollado una gran cantidad de pruebas que buscan abordar diferentes retos en este campo. El desarrollo de diversos sustratos SERS, alcances estadísticos, así como experimentos sobre afinidad biomolécula-sustrato SERS (Torres et al., 2016). Por ejemplo, se han realizado estudios de optimización en la interacción del sustrato metálico con la muestra en estudio, ya que la química de la superficie metálica define la afinidad por la molécula objetivo, tanto como sus características estructurales después de la adsorción (Guerrini et al., 2007).

Las AgNPs han cobrado importancia desde diversas vertientes en el campo de la biomedicina (Shi et al., 2015), entre ellas los estudios con actividad biocida y el aprovechamiento de las propiedades plasmónicas en la región visible del espectro EM (Wan et al., 2012). Sin embargo, existe cierta tendencia de aglomeración de AgNPs cuando son sintetizadas con agentes reductores fuertes, como el  $\text{NaBH}_4$ , resultando en experimentos sumamente variables. Panikkanvalappil y colaboradores solucionaron este problema, utilizando el ión citrato como agente estabilizante (Panikkanvalappil, Mahmoud, Mackey y El-Sayed, 2013; Panikkanvalappil, Mackey y El-Sayed, 2013); de esta manera, los experimentos se vuelven reproducibles para la detección de ADN por SERS (Torres et al., 2016).

De acuerdo con Wan et al. (2012), entre los alcances más comunes en el campo de la síntesis de AgNPs, existe el método de Lee-Meisel; que se basa en la reducción de  $\text{AgNO}_3$  en una solución acuosa de citrato en ebullición (Lee y Meisel, 1982). El ión citrato se utiliza estratégicamente debido a su compatibilidad con las biomoléculas, facilidad de ser sustituido con otros ligandos y la generación de capas delgadas de recubrimiento en las AgNPs, asegurando un incremento seguro y efectivo de las señales de Raman. La desventaja de este método es que el tamaño de las nanopartículas posee un rango alto, de 60 a 200 nm de diámetro. Se han reportado métodos con variación de pH en las condiciones de reacción, que han permitido reducir este rango a 50-70 nm, con morfología *quasi*-esférica (Wan et al., 2012).

La utilización de agentes estabilizantes puede ser sustituida por modificaciones químicas en la superficie metálica, entre ellas la utilización polímeros cargados positivamente, como lo son la poli-Lisina y polietilenimina (Torres et al., 2016). El esqueleto de azúcar-fosfato del ADN se une directamente con las nanopartículas cargadas positivamente, por medio de interacciones electrostáticas (Kabir y Kumar, 2013); provocando la formación de aglomeraciones semi-esféricas o cúmulos llamados *clusters* en la fase dispersa del coloide. Sin embargo, el espesor polimérico decrece proporcionalmente la sensibilidad SERS y puede comprometer la distinción de señales en los espectros Raman, por lo que se recomienda la utilización de coberturas de nanopartículas con moléculas más pequeñas cargadas positivamente, como la espermina (Torres et al., 2016).

## *Caracterización de ADN por SERS*

La capacidad de almacenar y transmitir la información genética en los organismos vivos deriva en que el ADN es un heteropolímero. La composición de dicha molécula está basada en residuos o unidades monoméricas, donde estarán presentes un grupo fosfato, un 2'-desoxi-azúcar (ribosa) y una base nitrogenada. Esta última, es la responsable de la obtención de un código cuaternario en el ADN, ya que existen cuatro formas químicas: adenina (A), guanina (G), citosina (C) y timina (T) (Mathews, Van Holde, Appling y Anthony-Cahill, 2013).

Entre los retos que posee la metodología SERS para la detección de ADN, están el grado de afinidad de la molécula al sustrato plasmónico, así como las propiedades dadas en el complejo una vez sintetizado (Torres et al., 2016). Los nanomateriales plasmónicos han sido un blanco para la exploración de estas sustancias biológicas, mediante la exploración de sus particulares propiedades ópticas potenciadas por la resonancia de plasmones superficiales (LSPR) (Fong y Yung, 2013). Debido a la baja proporción de ADN obtenido en una extracción rutinaria, las técnicas ultrasensibles de SERS representan un campo de metodologías clave, ya que son fáciles de utilizar, rápidas y baratas (Morla et al., 2016).

La caracterización de los ácidos nucleicos se ha vuelto uno de los alcances más importantes en las aplicaciones de la ciencia (Pinheiro, Han, Shih y Yan, 2011). Además, la alta sensibilidad y la riqueza de información estructural en la detección que ofrece la metodología SERS, se ha vuelto una herramienta potencial para el diseño de biosensores de ADN por métodos directos e indirectos (Fong y Yung, 2013; Vo-Dinh et al., 2013).

Para caracterizar los espectros SERS del ADN, Morla et al. (2016) han identificado 4 grandes regiones en las cuales se pueden clasificar las vibraciones del ADN, como se describen a continuación:

- **500-820  $\text{cm}^{-1}$** : Modos vibracionales de los anillos de residuos de purinas y pirimidinas (A, G, T, C).
- **820-1150  $\text{cm}^{-1}$** : Vibraciones de la red azúcar-fosfato. Por ejemplo: Banda intensa de estiramiento simétrico del  $\text{PO}_2^-$  a 1089  $\text{cm}^{-1}$ .
- **1150-1600  $\text{cm}^{-1}$** : Vibraciones coplanares de los anillos aromáticos de las bases nitrogenadas. Corresponde a un patrón complejo de muchas funciones superpuestas.
- **1600-1750  $\text{cm}^{-1}$** : Superposición de los modos de estiramiento del grupo carbonilo.

En el campo de la bioquímica, la interacción y los modos vibracionales del ADN son importantes para definir mecanismos biológicos. Algunas veces se han encontrado

asignaciones en la modificación de algún componente específico de la estructura básica del ADN, donde los espectros Raman la reconocen (Muntean et al., 2011). Según los autores, el intervalo espectral de 600-800  $\text{cm}^{-1}$  representa una región clave en la caracterización de los modos vibracionales del ADN, tanto así que combinada con los modos vibracionales de la desoxirribosa y el fosfato podría ser suficiente para la caracterización del ADN en estudio.

Por otra parte, el ADN promueve la agregación de las AgNPs, dejando la necesidad de otros agentes aglomerantes. De esta manera, crea un sándwich formando los denominados *hot spots* que permiten la intensificación de la señal Raman (Guerrini et al., 2014). Las intensidades altas se deben a los fuertes campos electromagnéticos generados en estos espacios (Lu et al., 2015), donde el ADN se encuentra a unos nanómetros cerca de la superficie de las MNPs (nanopartículas metálicas) (Muntean et al., 2013). Dicha agregación es independiente de la secuencia del ADN, permitiendo la formación de *clusters* estables en el tiempo (Muntean et al., 2011; Guerrini et al., 2014). Morla et al. (2016) mencionan que la detección de ADN por SERS es independiente de su tamaño, conformación y secuencia nucleotídica (Morla et al., 2016).

Para entender la razón por la cual se dan las descritas interacciones entre el ADN y las AgNPs que permiten el incremento SERS, primero hay tener clara la orientación espacial a nivel atómico. La molécula de ADN genómico está compuesta por hélices de doble banda, donde la desoxirribosa y los grupos fosfato están conectados alternadamente mediante enlaces fosfodiéster en el exterior de la molécula. En contraste, las bases nitrogenadas son las responsables de unir cada banda desde el interior, volviéndolas relativamente menos accesibles al contacto con el exterior (Lu et al., 2015). Las señales SERS de la desoxirribosa suelen ser de los picos con mayores intensidades, debido a que pueden entrar fácilmente en contacto con las AgNPs (Lu et al., 2015). Aunque los grupos fosfato son los que se encuentran más expuestos, su carga negativa impide que la interacción electrostática sea muy fuerte con las AgNPs (cargadas negativamente), produciendo intensidades medias (Guerrini et al., 2014; Lu et al., 2015).

### *Caracterización de proteínas por SERS*

Gran parte de la información en el ADN se expresa finalmente con la producción de las proteínas, moléculas responsables de una gran cantidad de reacciones bioquímicas en los organismos vivos. Las proteínas son heteropolímeros compuestos por unidades de aminoácidos, los cuales se combinan de múltiples maneras para formarlas. La unidad monomérica del aminoácido es una estructura quiral constituida por un carbono  $\alpha$  enlazado a un grupo amino ( $\text{NH}_x$ ), otro carboxilo ( $\text{COO}^-$ ), un átomo de hidrógeno y una cadena lateral. Dicha cadena lateral es la que confiere diferencias químicas entre los aminoácidos; donde puede haber cortas, largas, hidrofóbicas, hidrofílicas, con cargas parciales, netas, entre otras características (Mathews et al., 2013). De esta manera, tanto los aminoácidos presentes en una proteína, como su estructura secundaria podrían brindar información estructural diferencial (Xu et al., 2014).

Para comprender a los sistemas biológicos adecuadamente, también es necesario estudiar la forma en que las proteínas funcionan en el metabolismo. De esta manera, estudios como el Proyecto del Proteoma Humano (PPH) han buscado clasificar a las proteínas humanas por su estructura y su función. Paralelamente, han evolucionado metodologías de caracterización de proteínas en las áreas de separación y purificación (e.g. SDS-PAGE, HPLC), digestión enzimática, análisis por espectrometría de masas, espectroscopía de ultravioleta/visible, RMN, entre otras. En este campo, los métodos basados en SERS tienen grandes ventajas en términos de foto-estabilidad, y capacidad de detección múltiple, también son mucho más sensibles que los métodos basados en quimioluminiscencia (Han et al., 2009).

Las proteínas son macromoléculas cuya adsorción a sustratos SERS difiere en gran medida de las moléculas orgánicas pequeñas; por lo tanto, es muy importante preparar la muestra de manera homogénea y estable para evitar degradación de las mismas por reacciones químicas o interacciones físicas con el metal. Diversos grupos de investigación que estudian una misma proteína han obtenido espectros sustancialmente diferentes, debido a las distintas formas de preparación de la muestra, así como su desnaturalización frente a la superficie metálica (Chen et al., 2013). No obstante, Xu et al. (2014) reportan preparaciones de AgNPs cubiertas con ión yoduro donde se evita esta interacción, obteniendo espectros reproducibles de identificación de sustancias y mezclas proteicas.

### **Importancia de la caracterización de biomoléculas por SERS en Costa Rica**

A través de la historia, ha sido un reto para la comunidad científica obtener resultados SERS repetibles y reproducibles. La agregación de nanopartículas, la diferencia de tamaño en coloides metálicos y la distribución heterogénea de las moléculas en las superficies metálicas; constituyen factores que afectan la reproducibilidad de estos experimentos, ya que están sujetos al error por manipulación humana (Wang y Yu, 2015).

Actualmente, surge la necesidad de desarrollar nuevos métodos de detección de microorganismos que involucren plataformas reproducibles, específicas, sensibles, baratas, eficientes, versátiles, con alto rendimiento, pero sobre todo rápidas; con el objetivo de prevenir a tiempo infecciones o intoxicaciones transmitidas por contaminación microbiológica. La caracterización SERS de ADN y proteínas utilizando nanopartículas de plata, puede convertirse en una herramienta para la rápida identificación de microorganismos en alimentos, aguas, y otros ambientes en Costa Rica, ya que nuestro país cuenta con los fondos y el conocimiento técnico necesarios.

## OBJETIVOS

### GENERAL

Obtener espectros Raman del ADN genómico y perfil proteico bacteriano mediante la metodología de espectroscopía *Surface-Enhanced Raman Scattering* (SERS).

### ESPECÍFICOS

- I- Extraer y purificar el ADN genómico y perfil proteico de dos bacterias de importancia biomédica.
- II- Medir la dispersión Raman de las muestras del ADN genómico y perfil proteico utilizando la metodología SERS.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## Obtención, cultivo y almacenamiento de bacterias

Las bacterias *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella enterica* fueron proporcionadas por el Laboratorio de Microbiología del Centro de Investigación y de Servicios Químicos y Microbiológicos (CEQIATEC), Cartago, Costa Rica. Durante este trabajo, se les dio mantenimiento una vez al mes, realizando subcultivos en placas con medio semi-sólido compuesto de caldo nutritivo (8 g/L, PhytoTechnology Laboratories®) y agar (15 g/L, Difco™), se incubaron a 37°C durante 24 h y, posteriormente, se almacenaron a temperatura ambiente hasta el siguiente subcultivo. Para cada ensayo de extracción de ADN o proteínas, se aisló una colonia por el método de rayado en caldo nutritivo más agar y se incubó a 37°C por 24 h.

## Extracciones y análisis de ADN

Todas las extracciones de ADN genómico realizadas en este trabajo se llevaron a cabo mediante una adaptación del protocolo de purificación de ADN genómico de bacterias Gram-negativas de Promega Corporation (2017), utilizando los reactivos proveídos por el kit.

### Preparación de las bacterias

Se tomó una colonia (~5 mm de diámetro) de cada bacteria de interés y se cultivó en caldo nutritivo (8 g/L). Se incubaron a 37°C y 220 rpm por 16 h. Posteriormente, se homogeneizaron dichos cultivos utilizando un vórtex (Premiere®) y se añadieron alícuotas de 1 mL a tubos para microcentrífuga (2 mL para la identificación genotípica). Se centrifugaron a 16 000 g por 10 min y 4°C, se descartó el sobrenadante y se realizaron dos lavados de botón con agua libre de nucleasas, centrifugando bajo las mismas condiciones.

### Extracción de ADN genómico bacteriano

Se añadieron 600 µL de Solución de Lisis Nuclear a cada botón bacteriano previamente lavado y se suspendió completamente mediante pipeteo suave. Se incubó a 80°C por 5 min para la lisis celular y luego se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se agregaron 3 µL de Solución de ARNasa y se invirtió el tubo 5 veces para mezclar. Se incubó a 37°C durante diferentes tiempos, como se observará más adelante, y luego se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se adicionaron 200 µL de Solución de Precipitación de Proteínas y se mezcló utilizando vórtex vigoroso por 20 s. Posteriormente, se incubó en hielo por 5 min y se centrifugó a 16000 g por 3 min. Se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio y se volvió a centrifugar (para evitar el arrastre del botón). Lentamente, se transfirió el sobrenadante a un tubo con 600 µL de isopropanol ACS (EM Science®, Merck KGaA) a temperatura ambiente, se mezcló por inversión hasta observar una masa de ADN. Se centrifugó a 16000

g por 2 min, se eliminó el sobrenadante y se escurrió el tubo con la ayuda de un papel absorbente. Luego se agregaron 600  $\mu\text{L}$  de etanol 70% (v/v) (preparado con agua tipo 1 a  $17,9 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$  y etanol absoluto EMSURE™, Merck KGaA) y se invirtió cada tubo dos veces para lavar el botón. Se centrifugó a 16000 g por 2 min y se aspiró el sobrenadante, se drenó el tubo con la ayuda de un papel toalla y cada botón se secó durante 25 min mediante exposición al aire en cámara de flujo laminar. Se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas (Solución de Rehidratación de ADN para la identificación genotípica) y se incubó a  $65^\circ\text{C}$  por 1 h, golpeando constantemente el tubo, para favorecer la mezcla de su contenido. Finalmente, las extracciones se almacenaron a  $4^\circ\text{C}$  hasta su utilización.

#### Evaluación de la pureza y concentración

Para la evaluación de la pureza (A260/A280) y cuantificación de la concentración en  $\text{ng}/\mu\text{L}$  (A260) de cada ADN extraído se midió por triplicado en un espectrofotómetro NanoDrop™ Lite.

#### Electroforesis en gel de agarosa

Las muestras de ADN fueron sometidas a un análisis electroforético, para ello se preparó un gel de agarosa al 1,5 % (m/v) (2% m/v para el gel de PCR) en buffer Tris-Acetato-EDTA (TAE, Promega Co.) con 0,02  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de GelRed™. Para la preparación de las muestras, se mezclaron 3  $\mu\text{L}$  de buffer de carga 10X (invitrogen™) con 5  $\mu\text{L}$  de la suspensión con ADN extraído y se homogeneizaron por medio de pipeteo. Se preparó una mezcla de marcador de peso molecular 1 kb Plus (GeneRuler™), conteniendo 1  $\mu\text{L}$  del mismo (0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), 2  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas y 2  $\mu\text{L}$  de buffer de carga 10X (invitrogen™). Adicionalmente, se preparó una mezcla de 5  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas (Solución de Rehidratación de ADN para la identificación genotípica) y 3  $\mu\text{L}$  de buffer de carga, como control negativo de la extracción. Se montaron las muestras en los pocillos del gel (3  $\mu\text{L}$  de marcador de peso molecular y 5  $\mu\text{L}$  de ADN) y se llevó a cabo una corrida electroforética a 80 V y 500 mA durante 1 h. Finalmente, se colocó el gel sobre el transiluminador de luz ultravioleta, se observó y fotografió el gel. Se analizó la presencia de bandas delgadas, únicas e intensas en cada pocillo, como prueba de integridad del ADN; así como la poca migración del ADN genómico debido a su alto peso molecular o migración cercana a las 1500 pb para los productos de PCR.

#### **Extracciones y análisis de proteínas**

Los procedimientos descritos a continuación se realizaron tanto para las muestras de proteínas obtenidas en la evaluación de los diferentes métodos de extracción, como para el método seleccionado para las mediciones SERS.

#### Preparación de las bacterias

Para preparar las células sometidas a las extracciones de proteínas, se tomó una colonia de aproximadamente 5 mm de diámetro de cada bacteria de interés y se cultivó en caldo

nutritivo (15 mL en tubo de 50 mL). Se incubó a 37°C y 220 rpm por 16 h. Posteriormente, se homogeneizó el cultivo utilizando un vórtex (Premiere®) y se añadió una alícuota de 1 mL a un tubo para microcentrífuga. Se centrifugó a 6 000 g por 10 min y 4°C, se descartó el sobrenadante y se realizaron dos lavados con 1 mL de tris 50 mM (pH=7,5) bajo las mismas condiciones de centrifugación. Finalmente, se descartó el sobrenadante y se almacenaron los botones de células a -20°C hasta su utilización.

### Evaluación de la pureza y concentración

Para la cuantificación de la concentración en ng/μL de cada procedimiento de extracción de proteínas se midió por triplicado en un espectrofotómetro NanoDrop™ Lite, utilizando la función patrón de 1A= 1 mg/mL (A280). Además, se cuantificó la presencia de ADN en los extractos mediante la evaluación de la pureza (A260/A280) y concentración (ng/μL) de ADN de doble banda, también por triplicado.

### SDS-PAGE de proteínas

#### *Preparación del gel de poliacrilamida*

Para el análisis electroforético de las proteínas, se preparó un gel de poliacrilamida al 12%, compuesto por una fase de montaje y otra separadora, cuyos detalles volumétricos se muestran en el apéndice 1. En cuanto a la elaboración del gel, primero se preparó la separadora y se dejó solidificar con una película delgada de alcohol isoamílico (Merck KGaA) en el extremo superior. Posteriormente, se decantó el alcohol, se lavó la superficie del gel con agua y se añadió la de montaje. Se colocó el peine y se dejó solidificar.

#### *Preparación de las muestras y corrida electroforética*

Para la preparación de las muestras, 10 μL de las mezclas de proteínas obtenidas de la extracción se homogeneizaron con 3 μL de buffer de carga (apéndice 2). Adicionalmente, se preparó como control positivo una mezcla de 5 μL de suspensión bacteriana (1 colonia de bacteria en 25 μL de NaCl 0,85% m/v) en 3 μL buffer de carga y, como control negativo de la extracción, 10 μL de Solución de Rehidratación de proteínas y 3 μL de buffer de carga. Posteriormente, se incubaron a 95°C por 15 min y se centrifugaron en modo *short* por 10 s. Se montaron las muestras en los pocillos del gel (3 μL de marcador de peso molecular Novex® Sharp Standard, 5 μL de bacteria y 10 μL de muestras de proteínas y control negativo) y se llevó a cabo una corrida electroforética de 25 min a 90 V y 90 min a 120 V, respectivamente. Se analizó la presencia de múltiples bandas a lo largo del gel separador, como prueba de la presencia de proteínas totales en un rango grande de pesos moleculares.

#### *Tinción y destinción del gel*

Para teñir el gel después de la electroforesis, se sumergió durante 45 min en una solución de azul de Coomassie 0,25% (m/v) (Sigma®), etanol 50% (v/v) y ácido acético glacial (ACS,

Fermont) al 10% (v/v). Se decantó la solución de tinción y se lavó el gel con agua. Posteriormente, se sumergió por 1,5 h en una primera solución de destinción (etanol 50% v/v y ácido acético glacial 10% v/v). Se decantó la solución de destinción 1, se lavó el gel y se sumergió por aproximadamente 20 h en una segunda solución de destinción (etanol 7% v/v y ácido acético glacial 10% v/v). Finalmente, se lavó el gel y se fotografió.

#### Electroforesis en gel de agarosa

Adicionalmente, se realizó una electroforesis de agarosa al 1,5 % (m/v) en buffer TAE, bajo las mismas condiciones descritas anteriormente, con la modificación de que se montaron 10 µL de las muestras de proteínas y control negativo en los pocillos del gel, con el fin de visualizar la ausencia o presencia de ADN de doble banda (impureza).

### **Identificación de dos bacterias**

#### Caracterización Gram

Este procedimiento se llevó a cabo en el Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) del Instituto Tecnológico de Costa Rica.

Se realizó una tinción Gram para cada bacteria, siguiendo el protocolo recomendado por Sutton (2006). En breve, se realizó una suspensión de una colonia en 1 mL de solución salina hipotónica (NaCl al 0,85% m/v), luego se añadieron 10 µL de dicha suspensión sobre un portaobjetos y se secó al aire. Una vez seca la gota, se fijó a la llama y se tiñó con cristal violeta por 1 min; posteriormente, se lavó con agua y se añadió Lugol por 1 min. Se lavó con agua y se decoloró con una solución de acetona:etanol (1:1). Finalmente, se agregó safranina por 1 min y se lavó con agua. Cada tinción se observó al microscopio con el objetivo de 100X y se fotografió.

#### Identificación fenotípica

Se siguió la metodología del sistema de identificación microbiana Biolog (GEN III MicroPlate™) con algunas modificaciones. Este procedimiento se llevó a cabo en el laboratorio de microbiología del CEQIATEC, Instituto Tecnológico de Costa Rica.

#### *Reacción del Biolog*

Se suspendieron 2 colonias frescas de cada bacteria en la solución comercial IF-B y se inocularon 130 µL de dicha suspensión en cada uno de los 96 pocillos de las microplacas con reacciones Biolog (GEN III MicroPlate™), donde se probaron 71 reacciones de utilización de fuentes de carbono, 23 de sensibilidad química y dos controles, uno positivo y otro negativo. Se incubó a 37°C por 32 h.

### *Obtención e interpretación de resultados*

Los resultados de la identificación fenotípica se obtuvieron utilizando el lector de placas Biolog y el software OmniLog® Data Collection (Biolog, 2013), donde se analizó la absorbancia de las muestras que, según cada reacción, producían un viraje de color morado al ser positivas. Se utilizó como blanco la suspensión bacteriana respectiva. Cada medición fue calibrada de manera que la microplaca poseía un control negativo (A1) y otro positivo (A10), ambos inoculados con suspensión bacteriana. El software interpretó los resultados de las 71 reacciones de utilización de fuentes de carbono como positivos de acuerdo con la aparición de un color morado homogéneo, respecto al control negativo. Los pocillos similares al control negativo se interpretaron como negativos y aquellos con color morado tenue o pequeñas manchas como *borderline*. Los pocillos de las reacciones de sensibilidad química fueron comparados contra el control positivo, aquellos con absorbancia menor a la mitad que la de dicho control se consideraron como negativos, mientras que absorbancias más cercanas como positivas. Finalmente, se obtuvieron los resultados de la comparación con la base de datos de GEN III que realizó el software y se analizaron los valores de SIM, DIST, tipo de organismo y especie.

### Identificación genotípica

Este procedimiento se llevó a cabo en el Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) del Instituto Tecnológico de Costa Rica.

### *Extracción de ADN*

Se realizó la extracción de ADN genómico a cada botón previamente lavado, incubando 1 h en ARNasa en el momento respectivo. Dicho procedimiento se realizó por duplicado para cada bacteria.

### *Amplificación de la región genómica de ADN<sub>r</sub>-16S por PCR*

Este procedimiento se adaptó del protocolo recomendado por Promega Co. (2016), tomando en cuenta las sugerencias de algunos autores (Govindarajan, Kwon y Weon, 2007; Kuncham et al., 2017; Gilbert et al., 2017).

Se programó el termociclador Veriti™ para realizar 35 ciclos utilizando el perfil térmico mostrado en el cuadro 1. Dicho perfil está basado en lo recomendado por Promega Co. (2016) para el buffer de reacción utilizado y por la base de datos de New England Biolabs (2017).

**Cuadro 1.** Perfil térmico utilizado en la amplificación de la región genómica “ADNr-16S” por PCR.

<b>Paso</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo (s)</b>
Calentamiento inicial	95	300
Desnaturalización	95	30
Alineamiento	52	30
Extensión (60 s por kb, England Biolabs, 2017)	72	90
Extensión final	72	300
Almacenamiento	4	∞

Para amplificar el gen ADNr-16S de ambas bacterias, primero se mezclaron los siguientes reactivos: imprimadores universales 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492r (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'), desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) libres, buffer de reacción y agua libre de nucleasas. Una vez que el termociclador estuvo cerca de alcanzar la temperatura de calentamiento inicial (95°C), se añadieron la polimerasa y la muestra de ADN genómico. Los volúmenes añadidos de cada reactivo se muestran en el cuadro 2.

**Cuadro 2.** Distribución volumétrica de cada reactivo en las reacciones de amplificación del gen “16S SSU rRNA” por PCR.

<b>Componente</b>	<b>Marca</b>	<b>Concentración inicial</b>	<b>Alícuota (µL) en 50 µL de reacción</b>	<b>Concentración en la reacción</b>
Imprimador <i>Forward 27f</i>	IDT®	10 µM	2,0	0,4 µM
Imprimador <i>Reverse 1492r</i>	IDT®	10 µM	2,0	0,4 µM
dNTPs	Thermo Scientific™	2 mM	5,0	0,2 mM
Polimerasa	GoTaq®, Promega Co.	5 U/µL	0,6	0,06 U/µL
Buffer de reacción	GoTaq®, Promega Co.	5X	10,0	1X
Agua libre de nucleasas	PHENIX Research Products	-	27,4	-

Muestra de ADN extraído	-	K1: 304,7 ng/μL, K2: 764,1 ng/μL, S1: 328,6 ng/μL, S2: 541,6 ng/μL.	3,0	K1: 914,1 ng/50 μL, K2: 2292,3 ng/50 μL. S1: 985,8 ng/50 μL, S2: 1624,8 ng/50 μL.
----------------------------	---	--	-----	--

---

### *Secuenciación de las muestras de ADN amplificado*

Una vez confirmados los productos de PCR en la posición electroforética correcta y con la pureza y concentración adecuadas, se enviaron a secuenciar 15 μL por muestra a la empresa Maryland (EE. UU.).

### *Análisis bioinformático de la secuenciación*

Los resultados de la secuenciación directa fueron recibidos por correo electrónico y se observaron en el programa FinchTV. Las secuencias amplificadas por cada imprimador se analizaron por separado, escogiendo regiones con las señales mejor definidas. Como cada amplificación se hizo por duplicado, se realizó un alineamiento global entre las repeticiones de los fragmentos seleccionados con la herramienta Clustal Omega (EMBL-EBI, 2017, <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), obteniendo una secuencia consenso por cada imprimador. Posteriormente, se realizó un alineamiento local de cada secuencia consenso con la base de datos de GenBank, disponible en el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) de Estados Unidos (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Se analizaron los valores de *query cover*, *E value* y porcentaje de identidad para identificar el organismo al que pertenecía cada fragmento alineado.

### *Construcción de árboles filogenéticos*

Se construyeron dos dendrogramas mediante el alineamiento múltiple de las secuencias amplificadas por los imprimadores (27f y 1492r). Cada secuencia utilizada fue ajustada en tamaño con respecto a la de *Klebsiella*, utilizando alineamientos Clustal Omega. Se incluyeron un total de 11 secuencias correspondientes a fragmentos de ADNr 16S; dos de las cuales correspondieron a los fragmentos amplificados de las bacterias en estudio. La tercera representó a *Bacillus pumilus*, bacteria con la cual el proyecto VIE en el cual se está desarrollando este trabajo, está haciendo investigaciones. Las otras 8 secuencias correspondieron a bacterias presentes en la base de datos del EMBL (ENA: <https://www.ebi.ac.uk/ena/>); entre ellas *Bacillus pumilus* y 7 Enterobacteriaceas importantes desde el punto de vista clínico (Puerta-García y Mateos-Rodríguez, 2010); *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*, *Yersinia pestis*, *Proteus mirabilis* y *Shigella dysenterii*.

El alineamiento múltiple para el dendrograma fue llevado a cabo en la herramienta MAFFT (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) (PAM20/K=2). El algoritmo utilizado para la

generación del dendrograma fue el de estimación por máxima verosimilitud (EMV), se utilizó el método de NJ (Neighbor-Joining) y el modelo de sustitución de Jukes-Cantor. La robustez del árbol obtenido fue probada con un Bootstrap de 100 y fue visualizado con la aplicación web Phylo.io (2016).

### **Síntesis de nanopartículas de plata**

Este procedimiento se llevó a cabo en el laboratorio de microbiología del CEQIATEC, Instituto Tecnológico de Costa Rica.

#### Preparación de disoluciones

Toda la cristalería utilizada fue sometida a un proceso de saponificación con una solución de KOH al 5% (m/v) en etanol 95% (v/v) por 15 min. Después de la síntesis de AgNPs, la cristalería implicada se lavó con una solución de recuperación de metales ( $\text{HNO}_3$  10% v/v), sumergiéndose en la misma durante 16 h aproximadamente.

Para los procedimientos de síntesis de AgNPs, las disoluciones preparadas se realizaron con agua tipo 1 ( $17,9 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ ) previamente hervida y enfriada; las cuales fueron:  $\text{NaBH}_4$  0,02 M; citrato de sodio 7 mM, 10% (m/v) y 0,25% (m/v);  $\text{AgNO}_3$  0,02 M y 0,1 M; NaOH 5 M y  $\text{HNO}_3$  1 M.

La disolución de  $\text{HNO}_3$  1 M se valoró por triplicado con un patrón de NaOH ( $5,00 \pm 0,04$ ) M y se determinó su concentración exacta. También se realizó una valoración de la disolución de citrato de sodio 7 mM utilizando el  $\text{HNO}_3$  1 M, con el objetivo de encontrar el volumen de ácido requerido para obtener un pH aproximado de 6,1 al final de la fase de nucleación en el método de Lee-Meisel (AgNPs esféricas y 69 nm de diámetro, Dong et al., 2009).

#### Métodos de síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs)

Se probaron 10 métodos de síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs). Posteriormente, para las pruebas SERS de ADN y proteínas se seleccionó solamente uno. Las AgNPs de dicho método se caracterizaron por medio de espectroscopía UV-visible, TEM y DDL. Todas las síntesis se realizaron en oscuridad.

#### *Síntesis de AgNPs por el método de reducción con $\text{NaBH}_4$*

Una mezcla de 8,5 mL de agua tipo 1 ( $17,9 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ ) y 500  $\mu\text{L}$  de  $\text{AgNO}_3$  0,02 mol/L se agitó por 20 min. Posteriormente, se añadió 1 mL de  $\text{NaBH}_4$  0,02 mol/L, para alcanzar la relación molar 1:2 de  $\text{AgNO}_3:\text{NaBH}_4$ , y se dejó en agitación durante 3 min. Posteriormente, se dejó reposar en oscuridad y refrigeración por 16 h, para conseguir el equilibrio de la mezcla. Transcurrido el tiempo de reposo, se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se almacenó en refrigeración y oscuridad hasta su utilización. Se descartó el sedimento.

### *Síntesis de AgNPs por el método de Lee-Meisel (con cambio de pH)*

Este procedimiento fue basado en la síntesis de AgNPs realizada por Dong et al. (2009). En un balón de fondo redondo cubierto con papel aluminio, se añadieron 95 mL de una disolución de citrato de sodio 7 mM y ajustó el pH a 8,3; utilizando una disolución de NaOH ( $5,00 \pm 0,07$ ) mol/L y de acuerdo con la valoración básica realizada previamente. Se llevó a ebullición, luego se agregaron 5 mL de  $\text{AgNO}_3$  0,02 mol/L y se acopló un sistema de destilación vertical, para evitar la pérdida de agua por evaporación. La mezcla se agitó bajo la misma temperatura por 3 min (fin de la fase de nucleación) y se ajustó el pH a 6,1 con  $\text{HNO}_3$  1 mol/L, de acuerdo con la valoración ácida realizada previamente. Posteriormente, la mezcla continuó en agitación bajo la misma temperatura durante 32 min más (fase de crecimiento). Se tomaron alícuotas de 5 mL a los 25, 30 y 35 min de tiempo total de reacción. Dichas alícuotas se almacenaron en refrigeración y oscuridad hasta su utilización.

### *Síntesis de AgNPs por el método de reducción con $\text{NaBH}_4$ recubiertas con el ión citrato*

Se probaron 8 síntesis de diferentes proporciones molares utilizando este método, en el anexo 1 se muestra su distribución. Las 8 mezclas de agua tipo 1 ( $17,9 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ ), citrato de sodio al 0,25% (m/v) y  $\text{AgNO}_3$  0,02 mol/L se agitaron por 5 min. Posteriormente, se añadió el  $\text{NaBH}_4$  0,02 mol/L, para alcanzar la relación molar correspondiente, y se dejó en agitación durante 2 min. Finalmente, se sumergieron en un baño ultrasónico por 10 min y se dejó reposar en oscuridad y refrigeración por 16 h, para conseguir el equilibrio de la mezcla. Transcurrido el tiempo de reposo, se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se almacenó en refrigeración y oscuridad hasta su utilización.

### Medición de actividad SERS en las suspensiones de AgNPs preparadas

Por cada reacción de síntesis AgNPs, se colocaron 2,5  $\mu\text{L}$  de disolución reveladora de actividad SERS BPE (1,2-di (4-piridil) etileno, Sigma-Aldrich®) en un portaobjetos limpio y se mezclaron con 2,5  $\mu\text{L}$  de suspensión nanopartículas. Se tomó una alícuota de 0,5  $\mu\text{L}$  de dicha mezcla y se transfirió a otro portaobjetos limpio, se dejó secar a temperatura ambiente y oscuridad. Posteriormente, se colocó en el microscopio Raman (Raman confocal-DXR™ ThermoScientific™) y se enfocó el lente sobre los bordes de la gota. Finalmente, se realizó la medición SERS con el láser de He-Ne de 633 nm, objetivo de 50X, 1 mW de potencia, 8 mediciones del *background* y 8 exposiciones de 5 s.

### Selección y caracterización de las AgNPs

Primeramente, se seleccionaron los 3 mejores métodos de síntesis mediante la observación de los espectros Raman de la sustancia BPE. La forma de hacerlo se basó en la obtención de un mayor número de cuentas, presencia de las señales en la frecuencia correcta ( $\text{cm}^{-1}$ ) y mejor definición del espectro. Posteriormente, se midió la actividad SERS de cada uno con una muestra de ADN de *Klebsiella pneumoniae* y se determinó final la selección del

mejor método utilizando los criterios mencionados anteriormente. Dicho método se caracterizó utilizando las 3 técnicas descritas a continuación.

#### *Espectroscopía de ultravioleta-visible*

Se realizó una curva de sensibilidad mediante la medición de absorbancia por medio de un barrido desde 350 nm hasta 700 nm a un grupo de diluciones desde 1:2 hasta 1:128 (en agua destilada). Para dichas mediciones se utilizó el espectrofotómetro Evolution 220 (Thermo Scientific™). Se determinó la tendencia matemática del comportamiento de la absorbancia máxima ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) con respecto a las diluciones realizadas, utilizando la  $\lambda_{\text{máx}}$  promedio de las diluciones. Este procedimiento se llevó a cabo en el laboratorio de microscopía Raman, Instituto Tecnológico de Costa Rica.

#### *Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM)*

Las muestras de AgNPs a analizar fueron centrifugadas a 4500 rpm por 30 min (20°C). El botón se suspendió en agua tipo 1 y se sumergieron los tubos en un baño ultrasónico (40 kHz) por 5 s.

Se analizó la morfología de las AgNPs sintetizadas mediante la observación de 2  $\mu\text{L}$  de muestra dejados secar sobre rejillas de Cu recubiertas con una película de 10 nm de carbón. Las mediciones se realizaron en un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-2100, utilizando un voltaje de aceleración de 200 kV. Este procedimiento se llevó a cabo en el Laboratorio Institucional de Microscopía (LIM) del Instituto Tecnológico de Costa Rica.

#### *Dispersión Dinámica de Luz (DDL)*

Este procedimiento se realizó para los 3 mejores métodos de síntesis. Las muestras se diluyeron con agua destilada a razón de 1:30 y se determinó la distribución de tamaño de las nanopartículas utilizando el equipo Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern Instruments) a 25°C. Las mediciones se realizaron en el Laboratorio de Investigación y Tecnología de Polímeros (POLIUNA), Universidad Nacional de Costa Rica.

Cada muestra medida obtuvo una distribución de tamaño promedio producto de 10 mediciones internas en el equipo. Los resultados fueron observados y promediados utilizando el software de Malvern.

#### **Obtención de espectros SERS de ADN genómico bacteriano**

Para las extracciones de ADN genómico de las dos bacterias en estudio, se probaron 3 tratamientos con el fin de determinar la mejor condición de extracción; de acuerdo con la pureza, concentración e integridad del ADN extraído. A continuación, se muestra el procedimiento que describe la realización de dichos tratamientos, la selección de la mejor

condición de extracción para cada bacteria, la preparación de diluciones de ADN y su medición SERS.

#### Prueba de diferentes condiciones para la extracción de ADN genómico

Se realizó la extracción de ADN genómico a cada botón previamente lavado, en la cual se probaron los 3 tratamientos que se observan en el cuadro 3.

**Cuadro 3.** Tratamientos con ARNasa realizados para las pruebas de extracción de ADN genómico de las bacterias en estudio.

Tratamiento*	Tiempo de incubación a 37°C (min)
K-1 y S-1	20
K-2 y S-2	40
K-3 y S-3	60

\*K: *Klebsiella pneumoniae*; S: *Salmonella enterica*.

#### Extracción de ADN genómico para las mediciones SERS

Se realizó la extracción de ADN genómico a cada botón previamente lavado, seleccionando la mejor condición de incubación en ARNasa determinada en el procedimiento anterior. Se hizo por triplicado para cada bacteria.

#### Preparación de las diluciones de ADN genómico

Se mezclaron 20 µL de la suspensión del ADN extraído en un tubo con 20 µL de agua libre de nucleasas (dilución 1:2). Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas hasta obtener las razones 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 y 1:64; con respecto al ADN inicial.

#### Obtención de espectros SERS del ADN genómico extraído y sus diluciones

Por cada muestra de ADN extraído y diluido, se colocaron 2,5 µL en un portaobjetos limpio y se mezclaron mediante pipeteo con 2,5 µL de la suspensión de nanopartículas seleccionada anteriormente. Se tomó una alícuota de 0,5 µL de dicha mezcla, se transfirió a otro portaobjetos limpio y se dejó secar a temperatura ambiente y oscuridad. Posteriormente, se colocó en el microscopio Raman (Raman confocal-DXR™ ThermoScientific™) y se enfocó el lente sobre los bordes de la gota. Finalmente, se realizó la medición SERS con el láser de He-Ne de 633 nm, objetivo de 50X, 0,2 mW de potencia, 15 mediciones del *background* y 15 exposiciones de 3 s.

#### Análisis estadístico

Los resultados de A260/A280 del ADN obtenido en los tratamientos con ARNasa fueron analizados con el software estadístico InfoStat. Para cada muestra, se evaluó la normalidad con la prueba de Shapiro-Wilks modificada para confirmar que las muestras no se

comportaban de manera normal (varianza no homogénea). En este caso, se procedió a realizar un análisis de varianza no paramétrica por medio de la prueba de Kruskal-Wallis. Se estableció como  $H_0$  (Hipótesis nula) la ausencia de diferencia significativa entre las muestras a comparar, donde se utilizó como criterio la magnitud de la probabilidad ( $p$ ). Con  $p > 0,05$  se aceptó la  $H_0$ , mientras que valores de  $p < 0,05$  rechazaron la  $H_0$  y aceptaron una  $H_a$  (Hipótesis alternativa), hubo diferencia significativa.

## **Obtención de espectros de proteínas bacterianas**

### Obtención de reactivos y preparación de disoluciones

Todas las disoluciones acuosas se prepararon con agua tipo 1 ( $17,9 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ ), los ajustes de pH se realizaron con HCl 1 M (preparado con agua destilada y HCl  $\geq 37\%$  grado reactivo A.C.S., Sigma-Aldrich®) y se midieron con pH-metro (Mettler Toledo™ FiveEasy Plus™). Todos los reactivos líquidos y las disoluciones preparadas se almacenaron a  $4^\circ\text{C}$  hasta su utilización, aquellas sustancias o mezclas que lo requirieron se almacenaron en oscuridad.

Se preparó un buffer de extracción (pH=8,5) cuya composición se puede observar en el apéndice 3. También se preparó una disolución para lavar los botones bacterianos previamente a la extracción de proteínas, compuesta de tris 50 mM a pH=7,5. Además, se preparó una solución de precipitación de proteínas compuesta por 100 mM de acetato de amonio (Merck KGaA) en metanol (grado técnico, Gamma®) súper frío. También otra de 0,2% (m/v) de DTT en acetona (99,5%, Gamma®). Para rehidratar los botones de proteínas totales e insolubles obtenidos, se preparó un buffer de extracción con sales compuestas y urea (apéndice 4); mientras que para recuperar la fracción soluble se preparó uno cuya composición fue basada solo en sales (apéndice 5).

Para obtener una solución de fenol saturado en tris (requerida para la extracción de proteínas con fenol), se hicieron disoluciones de tris a 0,1 M y 0,5 M; ambas ajustadas a pH=8,0 con HCl 1 M. Además, para almacenar dicho fenol saturado (pH=8,0) hasta su utilización, se preparó una solución de tris 0,1 M con 0,2% (v/v) de  $\beta$ -mercaptoetanol. Ahora bien, para saturar el fenol propiamente, se midió la masa correspondiente del reactivo (Merck KGaA) y se fundió en un baño maría a  $65^\circ\text{C}$ . Luego se añadió 8-hidroxiquinolina (Sigma®) hasta alcanzar una concentración de 0,1% (m/v) y se mezcló mediante agitación. Bajo condiciones de oscuridad, se añadió un volumen de tris 0,5 M (pH=8,0) y se mezcló durante 1 h. Luego se dejó que las fases se separaran por 30 min en reposo. Se removió casi toda la fase acuosa, dejando una película delgada de  $\sim 1 \text{ cm}$ , y se añadió un volumen de tris 0,1 M (pH=8,0). Se mezcló durante 1 h y luego se volvió a dejar en reposo hasta remover la fase acuosa. Se repitió este procedimiento (lavados con tris 0,1 M) hasta que la fase fenólica alcanzara un pH de 8,0; midiendo el pH con papel indicador entre cada cambio de fase acuosa. Después de 7 lavados con tris, se ajustó el pH utilizando NaOH 5M. Finalmente, se añadió un volumen, equivalente a la fase fenólica restante, de solución de tris 0,1 M con 0,2% (v/v) de  $\beta$ -mercaptoetanol y se almacenó a  $4^\circ\text{C}$  hasta su utilización (máximo 15 días).

## Evaluación de diferentes métodos de extracción para la obtención de proteínas bacterianas

Se probaron 2 métodos de extracción de proteínas totales sobre una de las bacterias (*Klebsiella pneumoniae*), con el objetivo de seleccionar el que resultara con mejor rendimiento y pureza. A continuación, se presenta la metodología utilizada para probar dichas condiciones, la selección del mejor método y sus mediciones SERS.

Todos los reactivos y disoluciones en cada paso de las siguientes extracciones estuvieron a 4°C hasta el momento que fueron añadidos. Se trabajó en un baño de hielo, excepto en los pasos que se indica lo contrario.

### *Fenol saturado*

Este método se llevó a cabo por duplicado mediante una adaptación del protocolo de Alam y Ghosh (2014).

Al botón previamente lavado, se añadieron 600 µL de buffer de extracción y se suspendió completamente mediante pipeteo suave. Luego se lisaron las células suspendidas mediante 2 min de sonicación, utilizando un baño ultrasónico de 40 kHz con agua destilada refrigerada. Se incubó en hielo durante 20 min, mezclando 5 s en vórtex cada 2 min. Posteriormente, se añadió un volumen de fenol saturado y se mezcló mediante pipeteo suave. Se volvió a incubar en hielo durante 20 min, mezclando 5 s en vórtex cada 2 min. Se centrifugó a 12000 rpm por 10 min (4°C) y se transfirió la fase fenólica (arriba) a un tubo nuevo. Se añadió un volumen de buffer de extracción y se mezcló mediante pipeteo suave. Se incubó en hielo por 5 min, invirtiendo cada tubo cinco veces por minuto. Después se centrifugó a 12000 rpm por 5 min (4°C), se transfirió la fase fenólica a un tubo nuevo y se añadieron 4 volúmenes de solución de precipitación de proteínas. Se incubó durante 20 h a -20°C para precipitar las proteínas. Posteriormente, se centrifugó a 12000 rpm por 10 min (4°C) y se descartó el sobrenadante. Se lavó el botón bajo las mismas condiciones de centrifugación en el siguiente orden: dos veces con Solución de Precipitación (-20°C), una vez con metanol (-20°C), tres veces con solución de DTT en acetona (-20°C) y una vez en acetona (99,8% J.T.Baker™). Entre cada lavado con DTT en acetona, se incubaron los tubos a -20°C por 30 min. Se secó el botón mediante exposición a flujo de aire estéril por 25 min y, finalmente, uno de los botones se suspendió en 100 µL de solución de rehidratación de proteínas totales e insolubles. Al otro se le agregó 100 µL de solución de rehidratación para la fracción soluble, se aplicó vórtex por 20 s, se centrifugó a 12 000 g por 5 min (4°C) y se guardó el sobrenadante en otro tubo (fracción soluble). El botón restante se suspendió en 100 µL de buffer de rehidratación para proteínas totales e insolubles.

## *TRIZol*

Este método se llevó a cabo por duplicado mediante una adaptación del protocolo de Malafaia et al. (2015).

Al botón previamente lavado, se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de TRIZol® (Life Technologies™) y se suspendió completamente mediante pipeteo. Se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de cloroformo (ACS, Gamma®) y se agitó vigorosamente durante 15 s utilizando un vórtex. La mezcla se incubó a 25°C por 5 min y luego se centrifugó a 12 000 g por 15 min a 4°C. Posteriormente, se removió la fase acuosa y se añadieron, mediante pipeteo, 300  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto (EMSURE™, Merck KGaA) para resuspender el precipitado de ADN presente en la interfase. Se centrifugó a 8000 g por 5 min (4°C) y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo, el cual fue mezclado con 1500  $\mu\text{L}$  de isopropanol (ACS, EM Science®, Merck KGaA) para precipitar a las proteínas. Dicha mezcla se incubó a 25°C por 20 min para favorecer la precipitación proteica. Después se centrifugó a 12 000 g por 10 min a 4°C y el botón obtenido se lavó con etanol 95% (v/v) bajo las mismas condiciones de centrifugación. Se decantó el sobrenadante de etanol con ayuda de un papel absorbente y se dejó secar el botón durante 25 min mediante exposición al aire en cámara de flujo laminar. Finalmente, se suspendieron los botones como se describió en el procedimiento de fenol saturado.

### Extracción de proteínas bacterianas para las mediciones SERS

De acuerdo con los resultados del análisis electroforético de las extracciones de proteínas, se seleccionó el método que presentara la mayor cantidad e intensidad de bandas proteicas y se repitió la extracción (seis repeticiones por bacteria). Posteriormente, tres repeticiones del botón de proteínas se suspendieron en el buffer de rehidratación de proteínas totales y se analizaron en electroforesis y NanoDrop™ Lite como se menciona en las consideraciones generales, mientras que los otros tres botones no se suspendieron y se almacenaron a 4°C hasta su análisis en SERS.

### Obtención de espectros SERS de proteínas bacterianas

Se añadieron 2  $\mu\text{L}$  de suspensión de AgNPs a cada botón de botón de proteínas almacenado a 4°C y, con la ayuda de una punta de micropipeta, se removió de las paredes mezclando vigorosamente. Se añadió 1  $\mu\text{L}$  de dicha mezcla en un portaobjetos limpio y se dejó secar a temperatura ambiente y oscuridad. Posteriormente, se colocó en el microscopio Raman (Raman confocal-DXR™ ThermoScientific™) y se enfocó el lente sobre los bordes de la gota. Finalmente, se realizó la medición SERS con el láser de He-Ne de 633 nm, objetivo de 50X, 0,2 mW de potencia, 15 mediciones del *background* y 15 exposiciones de 3 s.

### Análisis estadístico

Los resultados de A260/A280 y [ADN]/[Proteína] fueron sometidos a un análisis de varianza, de la misma forma en que se describió para los tratamientos con ARNasa en las extracciones de ADN genómico.

### **Evaluación de los espectros SERS**

#### Recolección de datos y construcción de los espectros

Los datos numéricos de los espectros se obtuvieron en documentos de Excel, los cuales fueron promediados y graficados. Los espectros de ADN y proteínas fueron comparados entre las bacterias; las diluciones de ADN se graficaron juntas para la determinación de una posible tendencia.

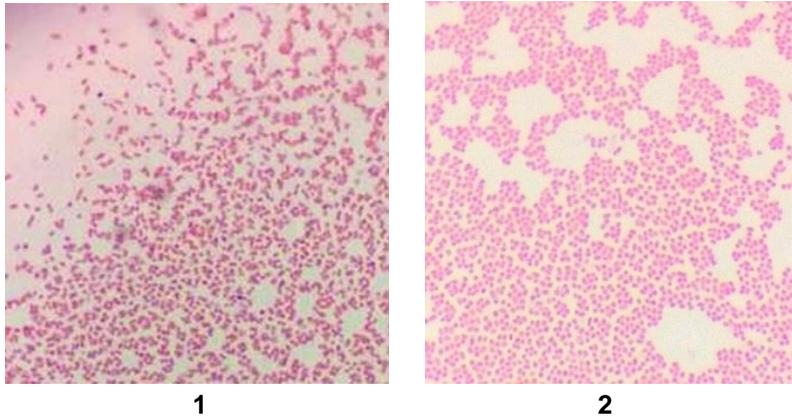
#### Caracterización de las señales en los espectros

Se construyeron dos códigos de barras (ADN y proteínas) representando las frecuencias obtenidas por otras investigaciones y sus intensidades relativas (anexos 2 y 3). De acuerdo con los espectros observados en la literatura, se establecieron tres intensidades: alta, media y baja. Dichas señales recomendadas por la literatura fueron filtradas desde un conjunto grande de modos vibracionales (apéndices 6 y 7).

# RESULTADOS

## Identificación de dos bacterias

Se confirmó la caracterización Gram de ambas bacterias, donde se observó que son organismos Gram-negativos (figura 1).



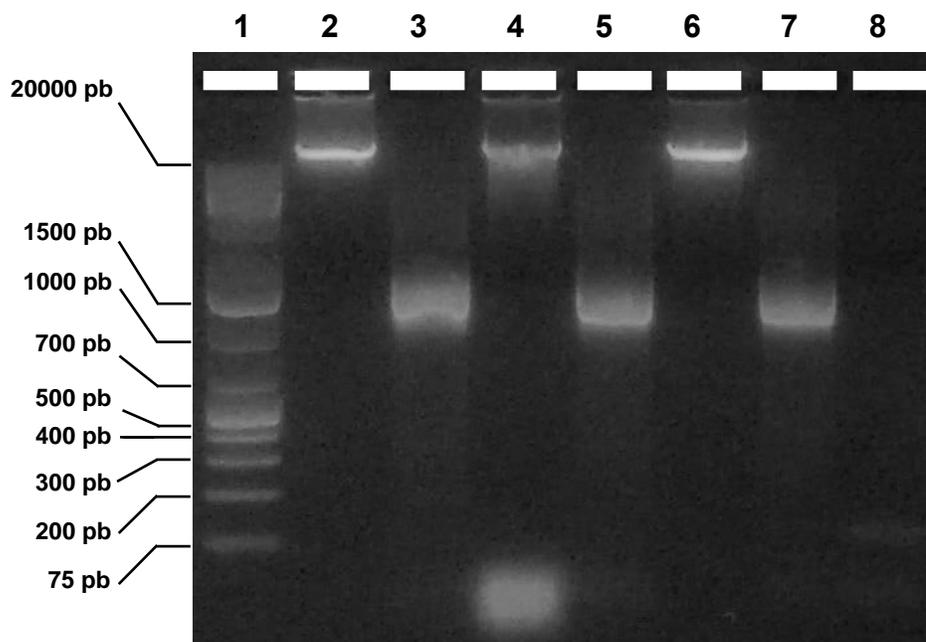
**Figura 1.** Caracterización Gram de las dos bacterias en estudio, A: 100X. **1:** *Klebsiella pneumoniae* y **2:** *Salmonella enterica*.

No se pudo determinar con certeza la identidad de las bacterias por el método fenotípico Biolog, debido a que los valores asignados por el software no representaron la suficiente confiabilidad estadística (anexo 5). Para ambas bacterias, las especies probables pertenecieron a más de un género, SIM fue  $<0.50$  y DIST superó el grado de tolerancia (5.0).

En cuanto a la identificación genotípica, fue posible observar una electroforesis de ADN genómico con bandas delgadas, intensas y de alto peso molecular (figura 2), como se espera de un ADN de alta calidad y concentración (cuadro 4). Aunado a esto, para la extracción de *Salmonella* se observó una única banda en la electroforesis; no obstante, *Klebsiella* mostró la presencia de una segunda banda de un tamaño menor a 75 pb, de acuerdo con la migración observada en el marcador de peso molecular 1 kb Plus (GeneRuler™). Para la amplificación de la región genómica ADN<sub>r</sub>-16S, se observó la presencia del fragmento esperado de 1500 pb aproximadamente (figura 2). No se observó la presencia de ADN de doble banda en el control negativo.

**Cuadro 4.** Cuantificación de pureza y concentración del ADN genómico extraído para la identificación genotípica de dos bacterias.

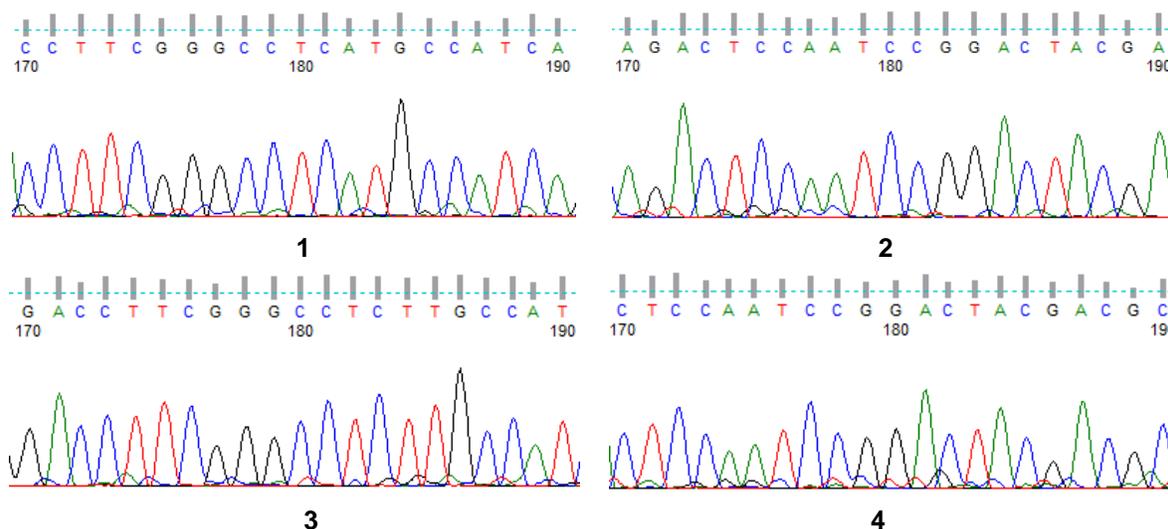
Muestra de ADN	Repetición	[ng/μL]	A260/A280
X	1	764,1	1,81
	2	304,7	1,89
Y	1	328,6	1,88
	2	541,6	1,88



**Figura 2.** Electroforesis del ADN genómico extraído de las dos bacterias en estudio y la amplificación del gen ADNr-16S, agarosa al 1,5% (m/v). **1:** Marcador de masa molecular 1 kb Plus (GeneRuler™); **2:** ADN genómico de *Bacillus pumilus*; **3:** amplificación del gen ADNr-16S de *Bacillus pumilus*. **4:** ADN genómico de *Klebsiella pneumoniae*; **5:** amplificación del gen ADNr-16S de *Klebsiella pneumoniae*; **6:** ADN genómico de *Salmonella enterica*; **7:** amplificación del gen ADNr-16S de *Salmonella enterica*; **8:** Control negativo de la PCR.

Los productos de PCR secuenciados por la empresa Macrogen (Maryland, EE. UU.) permitieron la obtención de electroferogramas relativamente limpios en una región que resuelve secuencias de aproximadamente 400-500 pb, donde, para ambos imprimadores

se distingue bien cada señal (nucleótido) correspondiente a la separación por electroforesis (figura 3). Dichos fragmentos fueron los utilizados para el análisis bioinformático.



**Figura 3.** Representación de los electroferogramas obtenidos en la secuenciación de las dos bacterias en estudio, observados en FinchTV. **1:** amplicón generado por 27f en *Klebsiella*; **2:** amplicón generado por 1492r en *Klebsiella*; **3:** amplicón generado por 27f en *Salmonella* y **4:** amplicón generado por 1492r en *Salmonella*.

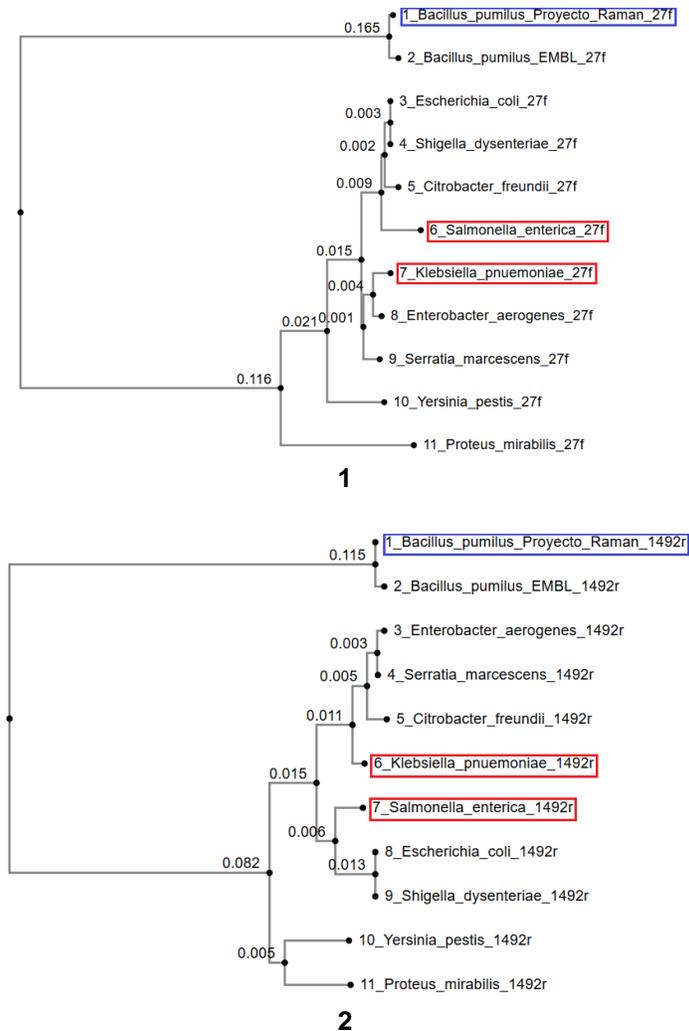
Los resultados del alineamiento local de las secuencias consenso (obtenidas mediante el alineamiento global) demuestran la identidad de cada bacteria con porcentajes y coberturas del 100% (cuadro 5). Los números de accesión mostrados representan los alineamientos con mejor puntaje según el algoritmo.

**Cuadro 5.** Resultados del alineamiento local realizado a partir de las secuencias consenso amplificadas por cada imprimador para las dos bacterias en estudio.

Muestra	Imprimador	Tamaño de la secuencia consenso (pb)	Región del 16S abarcada <sup>1</sup>	Query cover (%)	Error value	% identidad	Identidad de la bacteria	Número de accesión
K	27f	350	V1, V2 y V3 <sup>2</sup>	100	0	100	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KY417867.1,
	1492r	600	V6, V7, V8 y V9	100	0	100	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KY417867.1.
S	27f	350	V1, V2 y V3 <sup>2</sup>	100	0	100	<i>Salmonella enterica</i>	LT795114.1
	1492r	500	V6 <sup>2</sup> , V7, V8 y V9	100	0	100	<i>Salmonella enterica</i>	LT795114.1

<sup>1</sup>Basadas en una numeración realizada para *E. coli* (Hellberg et al., 2012; Yang, Wang y Qian, 2016). <sup>2</sup>Secuenciación parcial.

En los dendrogramas construidos para cada imprimador, se obtuvo una visible separación filogenética entre los organismos en estudio y los encontrados en la base de datos del EMBL (figura 4). En ambos dendrogramas se puede observar la cercanía entre el *Bacillus pumilus* del proyecto VIE y la secuencia del EMBL, así como su relación filogenética distante con respecto a las otras bacterias, pertenecientes a la familia de *Enterobacteriaceae*. La identificación genotípica permitió separar filogenéticamente a las dos bacterias en estudio entre sí, así como de otras 7 estrechamente relacionadas en el ámbito clínico. En el anexo 4 se puede observar un extracto del alineamiento múltiple realizado para la construcción de los dendrogramas.

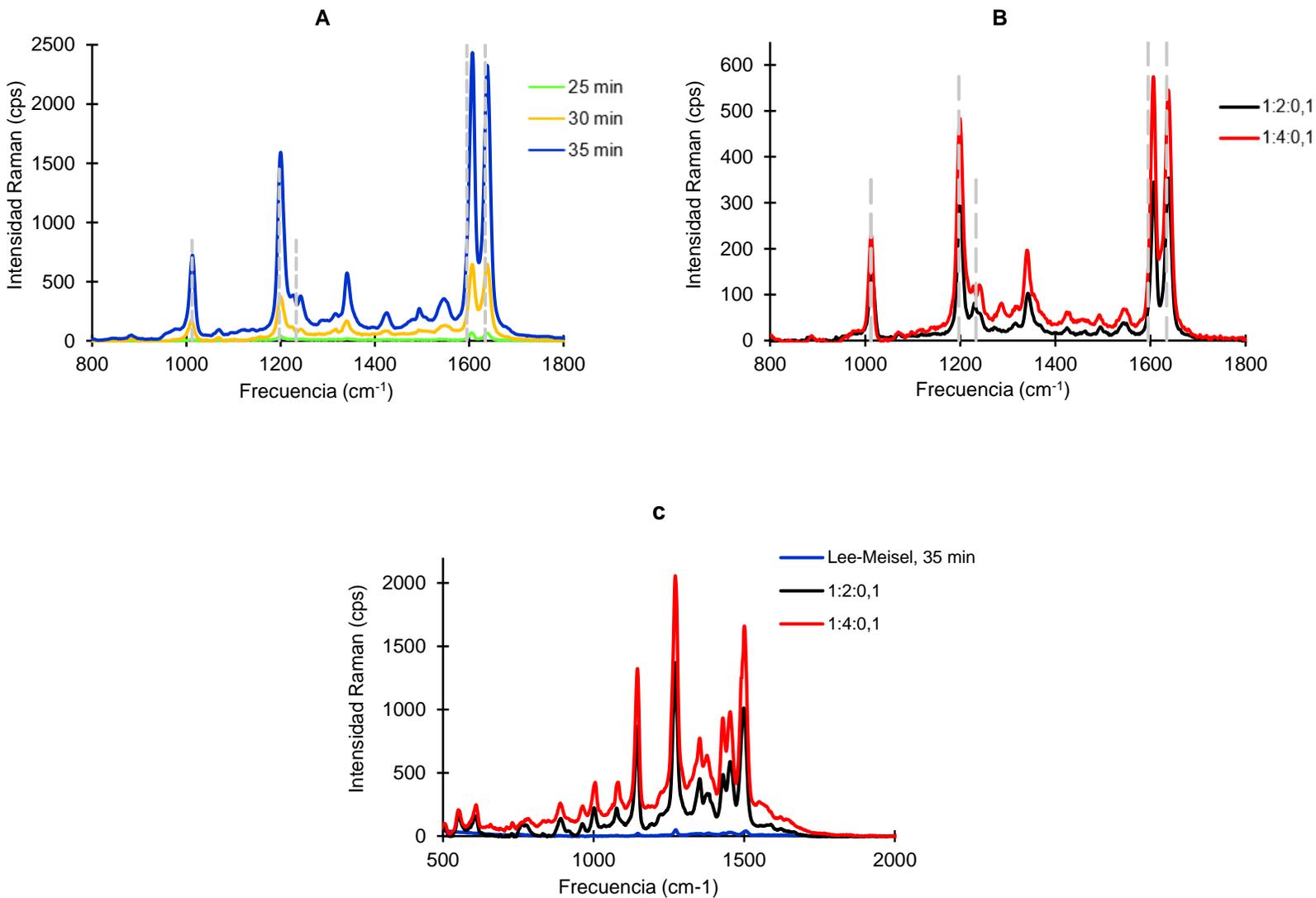


**Figura 4.** Dendrogramas basados en secuencias parciales del gen ADNr 16S de 11 bacterias, 350 pb en 27f (V1-V3) y 507 pb en 1492r (V6-V9). Bootstrap de 100 réplicas. Dos de las secuencias fueron determinadas en estudio (cuadros rojos), 1 obtenida del proyecto VIE (cuadro azul) y 8 de la base de datos EMBL. **1:** dendrograma de las secuencias amplificadas con 27f. **2:** 1492r.

## **Síntesis de nanopartículas de plata**

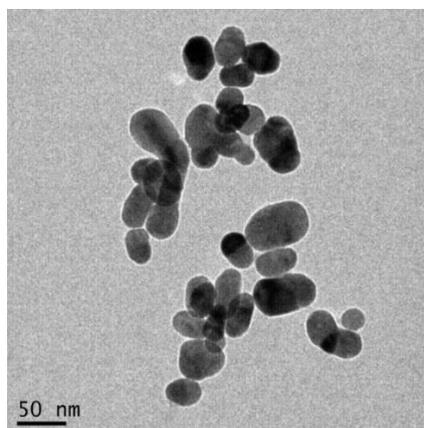
En cuanto a la síntesis de AgNPs, los métodos de reducción con  $\text{NaBH}_4$  y citrato como estabilizante, demostraron espectros poco definidos del BPE bajo la proporción molar 0,01 de citrato. Este comportamiento se observó para las dos proporciones de  $\text{NaBH}_4$  (2 y 4). Para 0,05 de citrato, tanto la definición del espectro como el número de cuentas por segundo (cps) aumentaron con respecto a 0,01. Proporciones molares de 0,5 de citrato fueron suficientes para inhibir un incremento SERS de las AgNPs sobre el BPE, generando espectros con baja definición en su huella digital y bajo número de cuentas (anexo 6). De manera general, se pudo observar que los espectros SERS obtenidos con las proporciones 1:2:0,1 y 1:4:0,1 obtuvieron la mejor definición y el mayor número de cuentas (figura 5B).

La síntesis de AgNPs por el método de Lee-Meisel (cambio de pH) evidenció la mayor intensidad Raman (cps) de todos los métodos probados (figura 5A). Se observó que conforme aumentó el tiempo de reacción desde los 25 a los 35 min, incrementó la intensidad de las señales del BPE. En este caso, los tres mejores métodos de síntesis fueron Lee-Meisel (35 min), 1:4:0,1 y 1:2:0,1; en orden descendente. Sin embargo, los espectros del ADN genómico (figura 5C) cambiaron dicho orden a 1:4:0,1 > 1:2:0,1 > Lee-Meisel; por tanto, 1:4:0,1 resultó ser el elegido para la generación de espectros SERS de ADN y proteínas en este proyecto.



**Figura 5.** Espectros SERS obtenidos en la prueba de selección del método de síntesis de AgNPs. **A:** espectros del BPE con AgNPs sintetizadas por Lee-Meisel a los 25, 30 y 35 min de reacción; **B:** BPE con AgNPs sintetizadas con  $\text{NaBH}_4$  y citrato como estabilizante bajo las proporciones molares  $\text{AgNO}_3:\text{NaBH}_4:\text{citrato}$  de 1:2:0,1 y 1:4:0,1; **C:** espectros de ADN genómico de *Klebsiella pneumoniae* ( $110,9 \pm 0,1$  ng/ $\mu\text{L}$ ) utilizando los métodos de síntesis de Lee-Meisel (35 min) y  $\text{NaBH}_4$  con citrato como estabilizante a las proporciones molares 1:2:0,1 y 1:4:0,1. Las líneas punteadas grises en **A** y **B** representan los cinco principales modos vibraciones del BPE con un láser de 633 nm (Zhuang, Shi, Chen y Zuo, 2011; Olivares-Amaya et al., 2012).

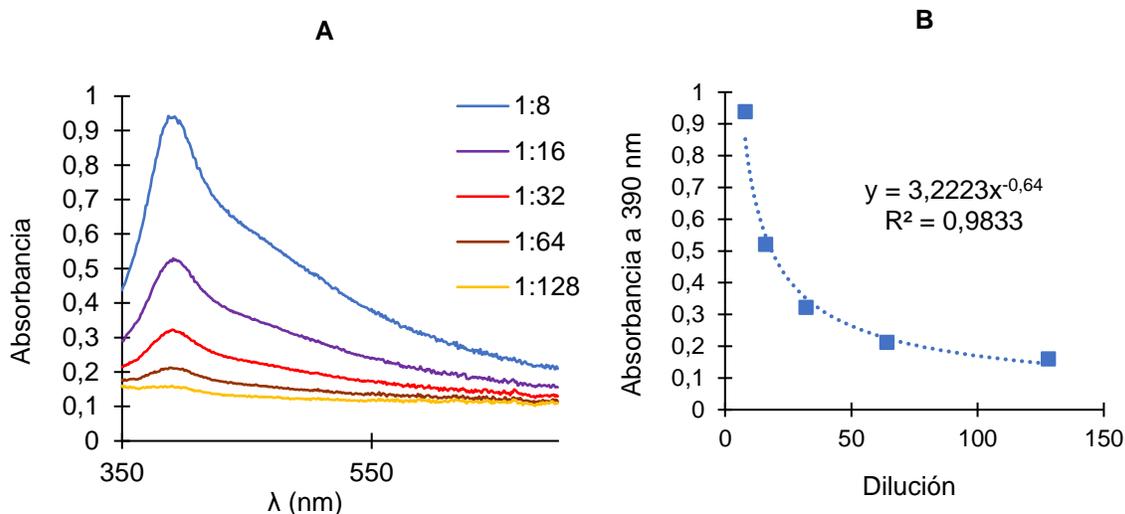
La micrografía del TEM demostró una morfología más o menos esférica para las AgNPs seleccionadas (1:4:0,1) (figura 6).



**Figura 6.** Micrografías TEM de las AgNPs sintetizadas por el método de NaBH<sub>4</sub> con citrato como estabilizante (1:4:0,1).

La distribución de tamaño determinada por el zetasizer estableció que las AgNPs seleccionadas poseían un  $(67,8 \pm 2,7)$  % de partículas de  $(65,40 \pm 2,32)$  nm de diámetro. En el anexo 7 se pueden observar los datos de cada repetición y los porcentajes de abundancia correspondientes, así como los tamaños obtenidos para los otros métodos.

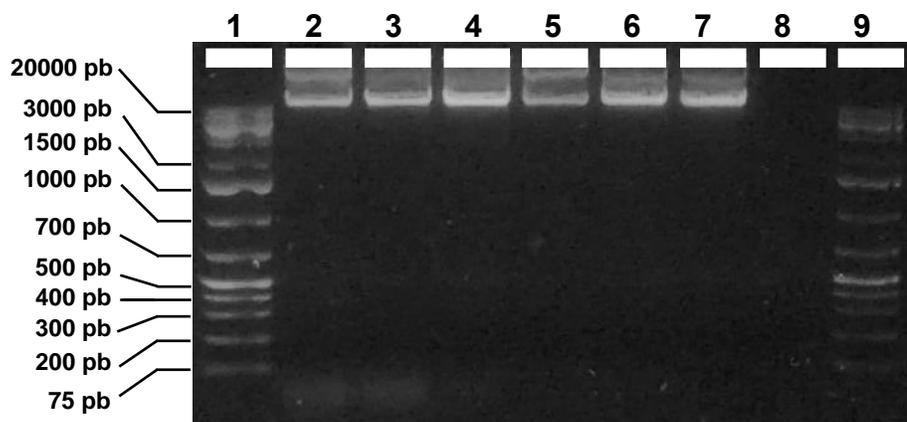
Se observó que la mezcla de AgNPs 1:4:0,1 presentó su  $\lambda_{\text{máx}}$  a los 387-391 nm, mediante la caracterización por espectrofotometría de UV-visible. Se obtuvo una tendencia ( $y=3,2223x^{-0,64}$ ) a disminuir en la absorbancia (figura 7) conforme se iba diluyendo la muestra, utilizando 390 nm como longitud de onda de comparación.



**Figura 7.** Curva de sensibilidad UV-vis para las diluciones de las AgNPs seleccionadas (1:4:0,1). **A:** Absorbancia en 350-700 nm; **B:** Relación de la absorbancia a 390 nm en función de la dilución (cuadrado), la línea punteada representa la tendencia potencial.

### Obtención y evaluación de espectros SERS de ADN genómico bacteriano

Los tres tratamientos en las extracciones de ADN genómico de las bacterias, evaluados mediante electroforesis en gel de agarosa, mostraron patrones de bandas delgadas, intensas y de alto peso molecular (figura 8). K-1 y K-2, además presentaron una banda de un tamaño menor a 75 pb, mientras que K-3, S-2 y S-3 solamente de alto peso molecular (>20 kpb). No se observó la presencia de ADN de doble banda en el control negativo.



**Figura 8.** Electroforesis de los tratamientos en la extracción de ADN genómico de las dos bacterias, agarosa al 1,5% (m/v). **1 y 9:** Marcador de peso molecular; **2, 3 y 4:** *Klebsiella pneumoniae*; **5, 6 y 7:** *Salmonella enterica*; **2 y 5:** 20 min en incubación con ARNasa; **3 y 6:** 40 min en ARNasa; **4 y 7:** 60 min en ARNasa; **8:** Control negativo de la extracción de ADN.

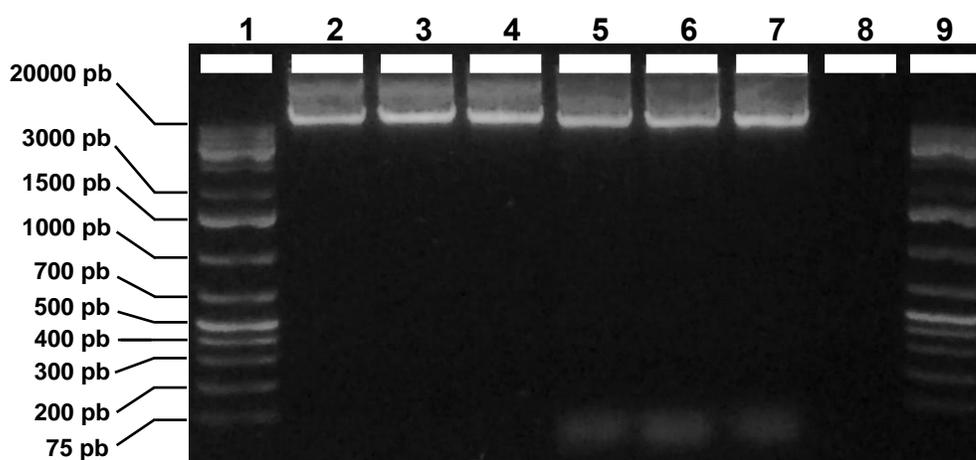
En el cuadro 6 se puede contemplar la concentración del ADN obtenida en los tres tratamientos. También se observa que la relación A260/A280 tendió a bajar cuando se trató por 60 min con ARNasa a las extracciones de *Salmonella* ( $p=0,1000$ ); por otro lado, para *Klebsiella* se obtuvo que no hubo diferencia significativa (para A260/A280) entre incubar a 20 o a 60 min con dicha enzima ( $p=0,036$ ). La relación A260/A280 fue sometida a un análisis de varianza no paramétrica (Kruskal-Wallis) entre los tratamientos de cada bacteria, ya que las muestras K-1 y S-1 no fueron estadísticamente normales ( $p<0,0001$ ).

**Cuadro 6.** Concentración y pureza del ADN genómico extraído en los diferentes tratamientos con ARNasa.

Tratamiento	[ng/ $\mu$ L]*	A260/A280*
K-1	296,8 $\pm$ 1,7	1,83 $\pm$ 0,01 <sup>ab</sup>
K-2	239,0 $\pm$ 0,6	1,86 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>
K-3	165,3 $\pm$ 2,2	1,76 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
S-1	70,4 $\pm$ 0,4	1,86 $\pm$ 0,00 <sup>1</sup>
S-2	104,2 $\pm$ 0,2	1,84 $\pm$ 0,01 <sup>12</sup>
S-3	116,4 $\pm$ 1,9	1,82 $\pm$ 0,01 <sup>2</sup>

\*Desviación estándar calculada para 3 mediciones de una muestra (anexo 8). <sup>ab</sup> y <sup>12</sup>: los A/260/A280 con la misma letra o número no son significativamente diferentes ( $p>0,05$ ).

Se seleccionaron los tratamientos K-3 y S-3 para las extracciones de ADN genómico a medir en SERS. Las tres repeticiones mostraron electroforesis con bandas delgadas, intensas y de alto peso molecular (figura 9). El ADN de *K. pneumoniae*, exhibió además una banda de bajo peso molecular (<75 pb). No se observó la presencia de ADN de doble banda en el control negativo. Las concentraciones y relaciones A260/A280 obtenidas fueron mayores (cuadro 7) a lo esperado para ambas bacterias (cuadro 6).



**Figura 9.** Electroforesis del ADN genómico extraído de dos bacterias por triplicado, incubado en ARNasa por 60 min a 37°C, agarosa al 1,5% (m/v). **1 y 9:** Marcador de masa molecular GeneRuler™

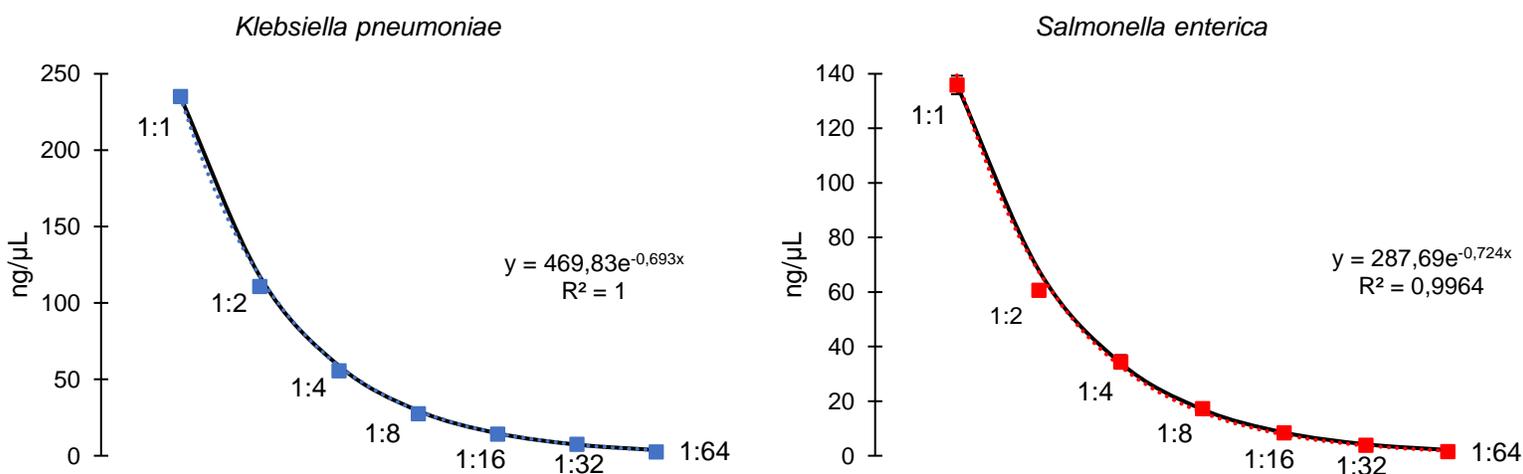
1 kb Plus; **2, 3 y 4**: ADN genómico de *Klebsiella pneumoniae*; **5, 6 y 7**: ADN genómico de *Salmonella enterica*. **8**: Control negativo de la extracción de ADN genómico.

**Cuadro 7.** Concentración y pureza del ADN genómico extraído para las mediciones SERS.

Muestra de ADN	[ng/μL]*	A260/A280*
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	254,38±21,72	1,87±0,01
<i>Salmonella enterica</i>	141,90±5,85	1,84±0,01

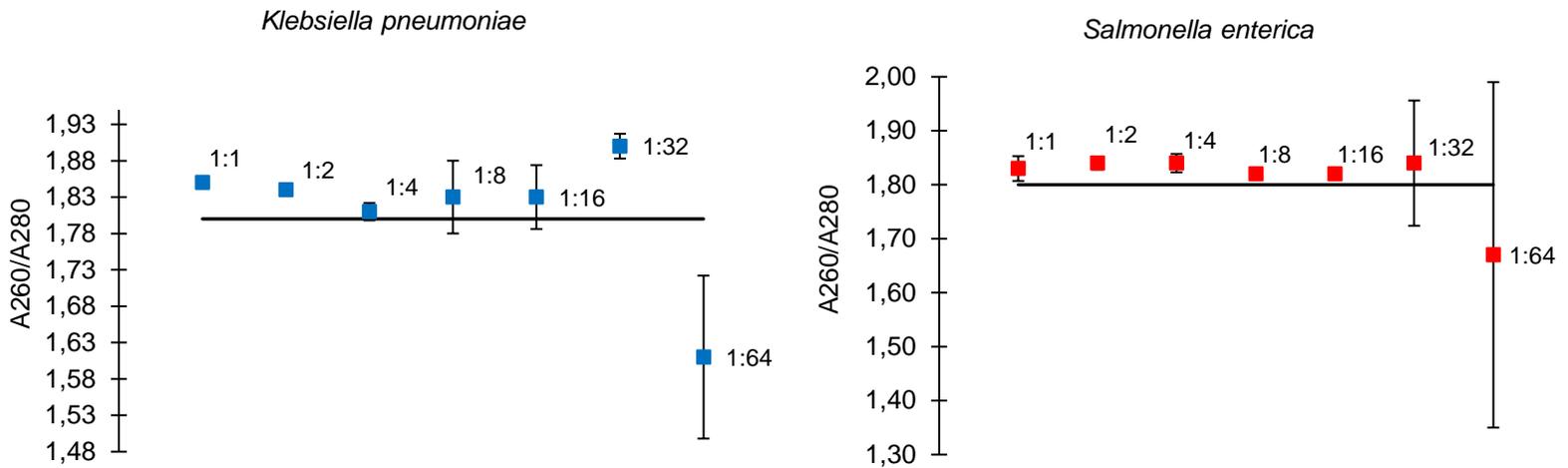
\*Desviación estándar calculada para una población de 3 repeticiones.

Las concentraciones de las muestras seleccionadas para las diluciones fueron (235,1±2,4) ng/μL y (135,9±3,4) ng/μL para *K. pneumoniae* y *S. enterica*, respectivamente (anexo 9). En la figura 10 se puede observar que los valores de concentración obtenidos fueron comparados con una curva teórica calculada a partir de la concentración inicial. Se determinaron las ecuaciones de tendencia que describen el comportamiento del cambio en la concentración conforme se diluye la muestra de ADN. Las concentraciones de cada punto y sus repeticiones se pueden observar en el anexo 9.



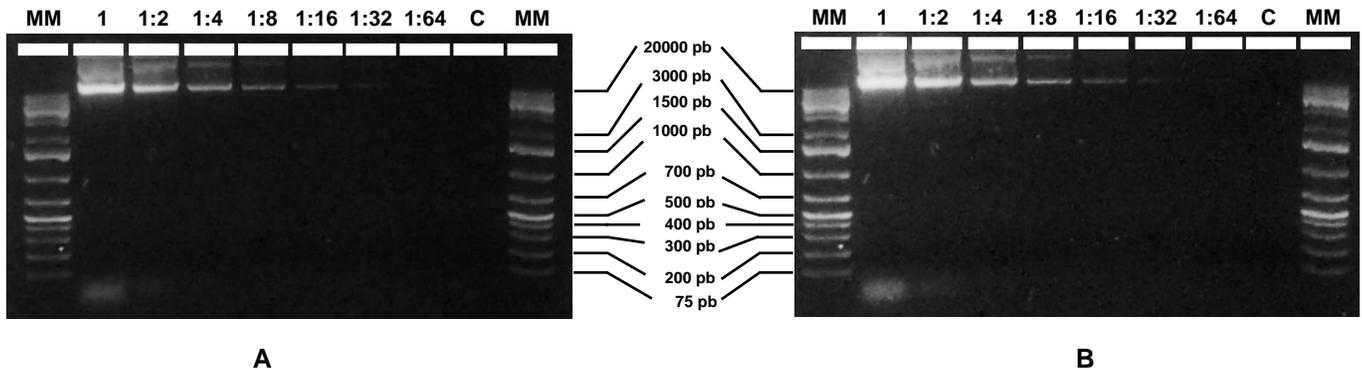
**Figura 10.** Comportamiento teórico y experimental de la concentración de las diluciones de ADN genómico (ng/μL) de las dos bacterias en estudio. **Curvas teóricas calculadas:** negro sólido. **Valores experimentales:** azul y rojo sólido. **Curvas de tendencia:** punteadas.

En la figura 11 se puede observar el comportamiento de la relación A260/A280 en las diluciones de ADN para cada bacteria. Los anexos 10 y 11 revelan que para la dilución 1:64, A260/A280 disminuyó significativamente con respecto a la muestra sin diluir en ambas bacterias ( $p=0,1000$ ). Este resultado se demostró mediante un análisis de varianza no paramétrica, ya que las muestras utilizadas para las diluciones no fueron estadísticamente normales ( $p<0,0001$ ).



**Figura 11.** Comportamiento experimental de la relación de absorbancia A260/A280 en las diluciones de ADN genómico versus la relación óptima (1,8). **Valores experimentales:** azul y rojo sólido. **Valor esperado (1,80):** línea negra sólida.

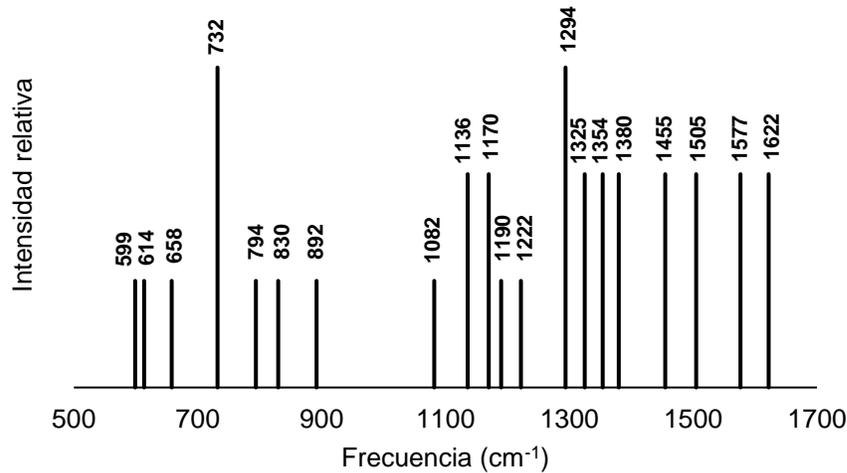
La electroforesis de las diluciones muestra cómo la intensidad de la banda de ADN genómico concentrado desaparece gradualmente hacia 1:64 (figura 12). Todas las diluciones exhibieron la presencia de ADN de alto peso molecular (>20 kpb) y no se observó presencia de ADN de doble banda en el control negativo.



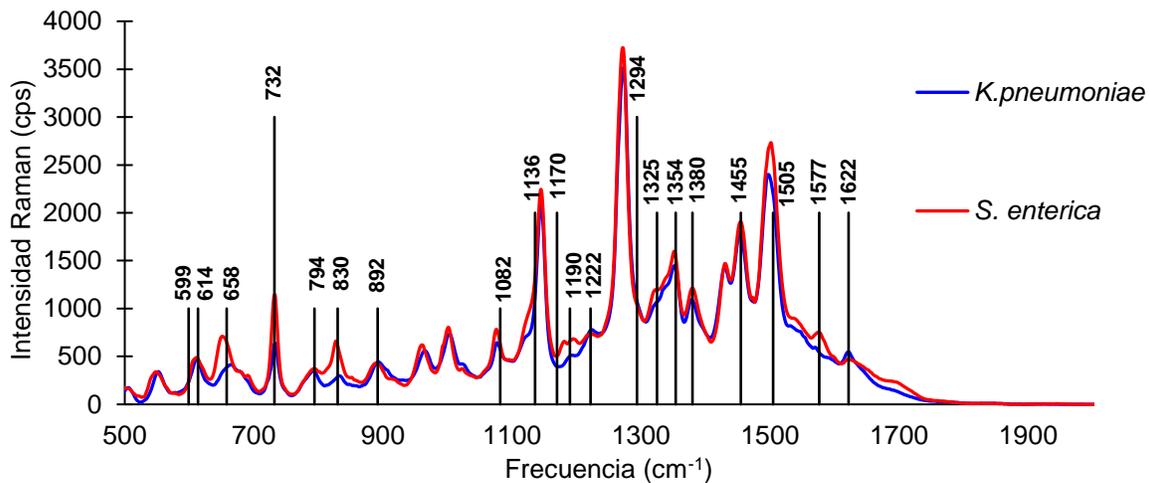
**Figura 12.** Electroforesis del ADN genómico extraído y sus respectivas diluciones, agarosa al 1,5% (m/v). **A:** *Klebsiella pneumoniae*; **B:** *Salmonella enterica*; **MM:** Marcador de masa molecular GeneRuler™ 1 kb Plus; **1:** ADN genómico; **de 1:2 a 1:64:** Diluciones del ADN en agua libre de nucleasas; **C:** Control negativo de las diluciones (agua libre de nucleasas).

Para el análisis de los espectros SERS del ADN genómico de ambas bacterias, se construyó un código de barras con las frecuencias e intensidades relativas esperadas por la literatura (anexo 2). Dicho código evidencia la presencia de 20 señales características en la mayoría de los espectros SERS de ADN (figura 13). En cuanto a la obtención de los espectros SERS propiamente, en la figura 14 se pueden observar las vibraciones obtenidas

para el ADN genómico de *K. pneumoniae* y *S. enterica*, así como en comparación con el código de barras superpuesto en el gráfico.



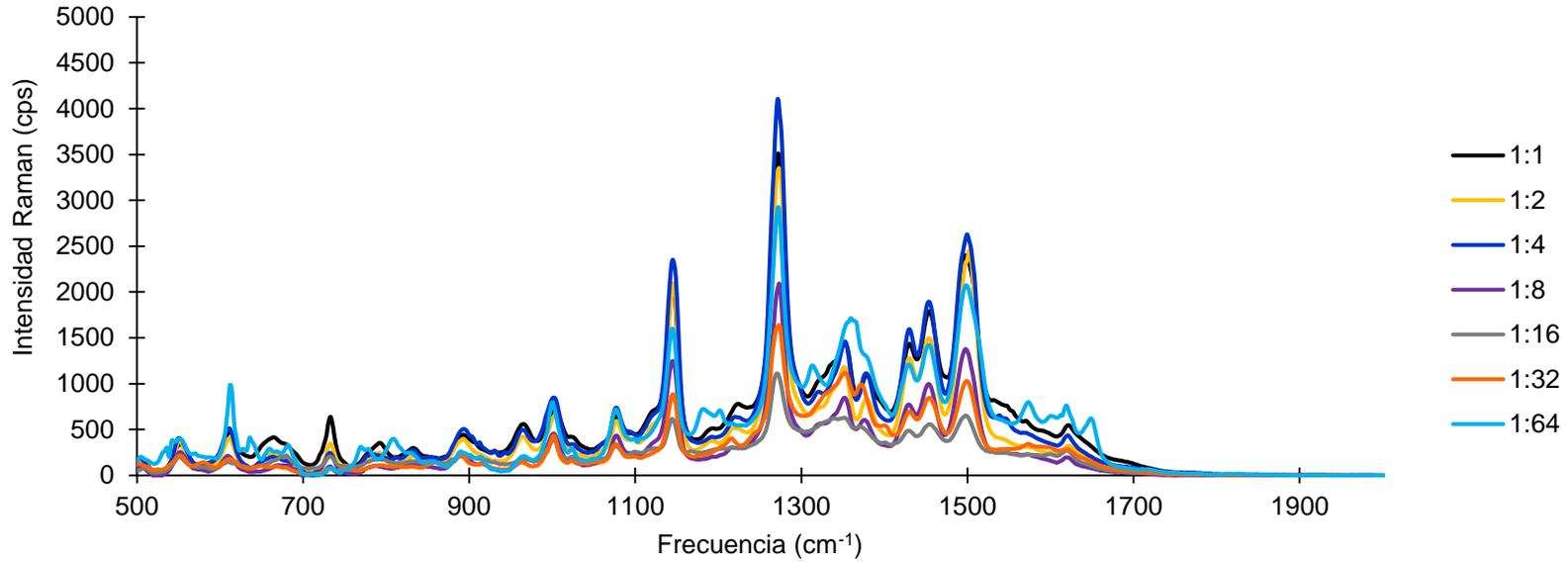
**Figura 13.** Código de barras de las frecuencias esperadas en un espectro SERS de ADN genómico. Datos obtenidos del anexo 2.



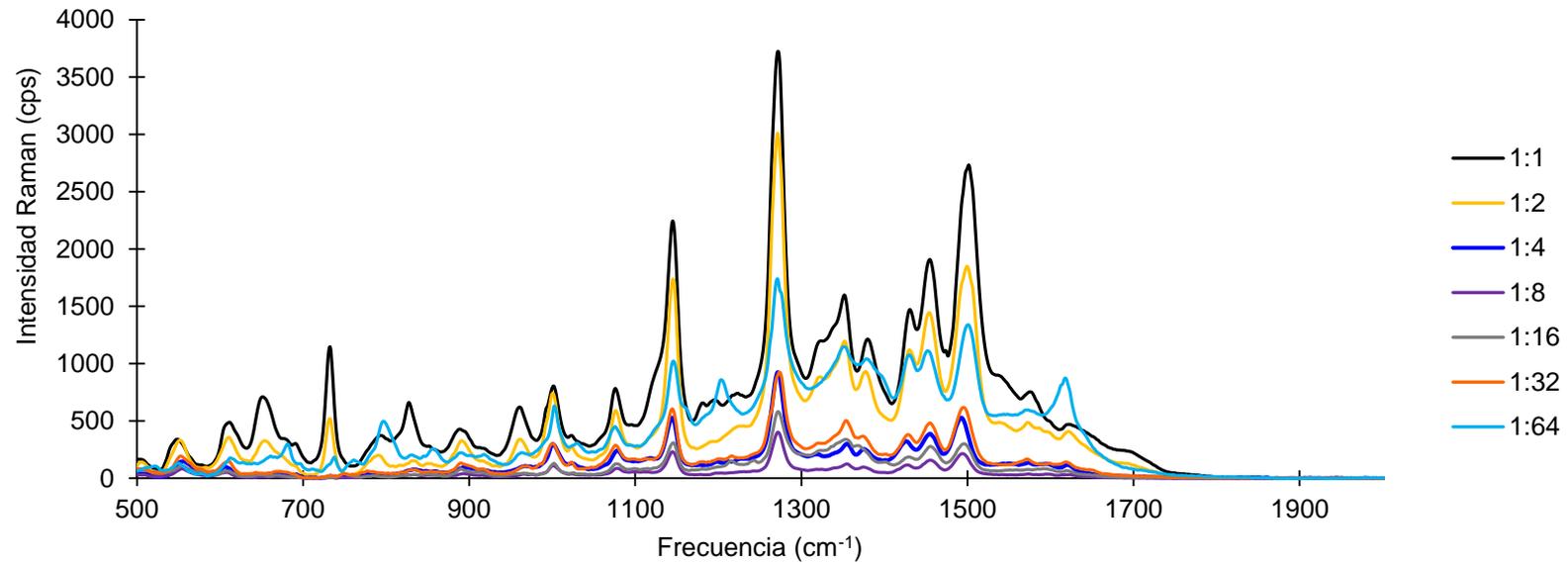
**Figura 14.** Espectros SERS del ADN genómico de *K. pneumoniae* y *S. enterica* con las AgNPs 1:4:0,1. **Líneas verticales negras:** código de barras de señales esperadas según anexo 2.

Las diluciones de ADN genómico evidencian la presencia del mismo patrón de bandas para casi todas las diluciones (figura 15). La variación observada fue principalmente en la intensidad Raman. Sin embargo, evidentemente no se obtuvo una tendencia exponencial, como sucedió con las concentraciones del ADN (figura 10). Es importante destacar, que la señal cercana a 732  $\text{cm}^{-1}$  (modos vibracionales de la adenina) sí parece disminuir en la intensidad conforme se va diluyendo la muestra, además también se va desplazando hacia la derecha del espectro, aún dentro del rango de frecuencias esperado según el anexo 2.

*Klebsiella pneumoniae*



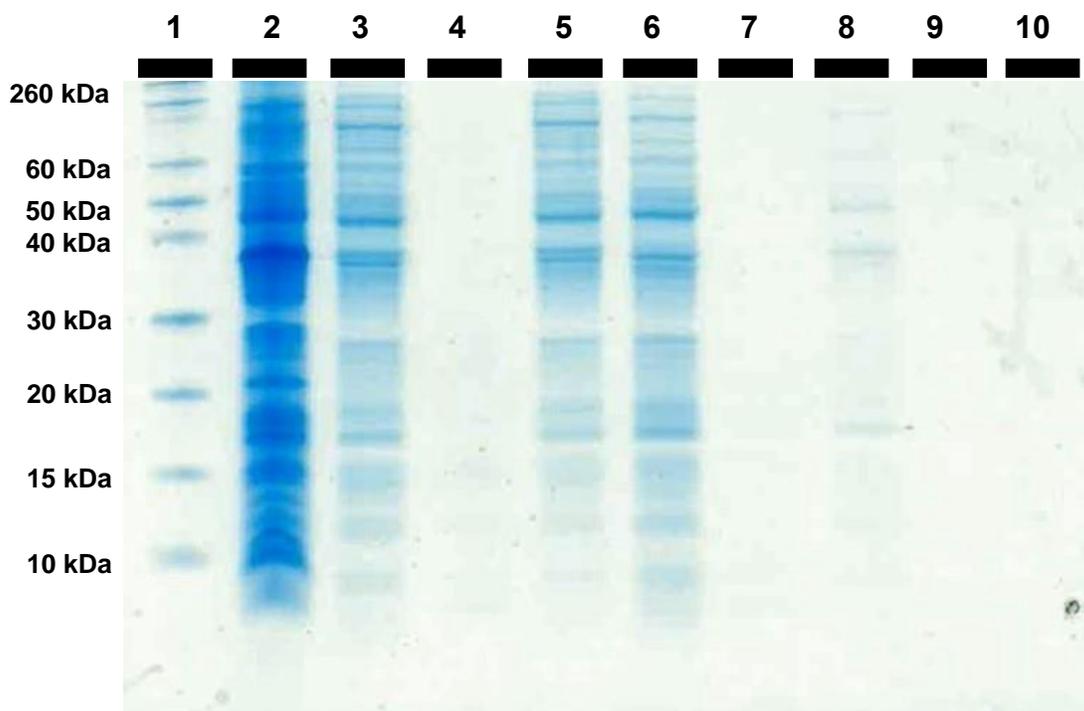
*Salmonella enterica*



**Figura 15.** Espectros SERS de las diluciones del ADN genómico de las dos bacterias en estudio. **Líneas verticales negras:** señales del código de barras seleccionadas para el análisis de varianza de la intensidad Raman.

## Obtención y evaluación de espectros de proteínas bacterianas

Los dos métodos de extracción evidenciaron la presencia de bandas de proteínas en todo el rango de pesos moleculares definidos por el marcador Novex® para las fracciones total e insoluble (figura 16). Para la fracción esperada de proteínas solubles no se observó un aporte considerable, a excepción de unas bandas tenues entre 3-15 kDa. No se observó la presencia de proteínas en ninguno de los controles negativos.



**Figura 16.** SDS-PAGE de los dos métodos de extracción de proteínas evaluados. Tinción con azul de Coomassie. **1:** Marcador de masa molecular Novex® Sharp Standard; **2:** suspensión bacteriana (*K. pneumoniae*). **3, 4 y 5:** Proteínas extraídas con fenol saturado; **6, 7 y 8:** proteínas extraídas con trizol; **3 y 6:** Proteínas totales; **4 y 7:** Proteínas solubles; **5 y 8:** Proteínas insolubles; **9:** control negativo de proteínas totales e insolubles. **10:** control negativo de proteínas solubles.

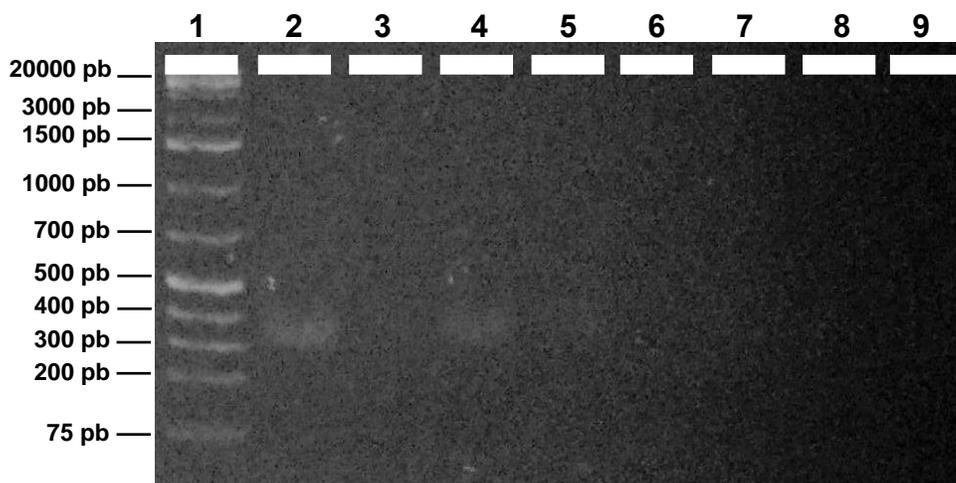
El cuadro 8 demuestra la concentración de proteínas obtenida por el método de cuantificación con NanoDrop™ Lite, utilizando el patrón 1A=1 mg/mL. Ambos métodos resultaron en concentraciones similares.

**Cuadro 8.** Concentración de proteínas en los métodos de extracción probados (1A=1 mg/mL).

Método de extracción	[ng/μL]*
Fenol	1332,7±23,5
Trizol	1504,0±26,9

\*Desviación estándar calculada para tres mediciones de una muestra.

En cuanto a la presencia de ADN de doble banda contaminante en las muestras de proteínas, se obtuvo la presencia de bandas tenues de aproximadamente 300-400 pb en las fracciones de proteínas totales e insolubles con fenol, y totales con trizol (figura 17).



**Figura 17.** Electroforesis de agarosa (1,5% m/v) de los 3 métodos de extracción de proteínas evaluados. Tinción con GelRed™. **1:** Marcador de peso molecular 1 kb Plus (GeneRuler™); **2, 3 y 4:** Proteínas extraídas con fenol saturado; **5, 6 y 7:** proteínas extraídas con trizol; **2 y 5:** Proteínas totales; **3 y 6:** Proteínas solubles; **4 y 7:** Proteínas insolubles; **8:** control negativo de proteínas totales e insolubles. **9:** control negativo de proteínas solubles.

En el cuadro 9 se pueden observar las concentraciones de ADN de doble banda obtenidas para los dos métodos de extracción. Fenol saturado presentó una concentración menor de ADN de doble banda que trizol; no obstante, su relación A260/A280 fue significativamente menor a la de trizol ( $p > 0,05$ ). También se puede notar que la relación entre la concentración de ADN sobre la de proteínas fue significativamente mayor para la extracción con trizol ( $p > 0,05$ ).

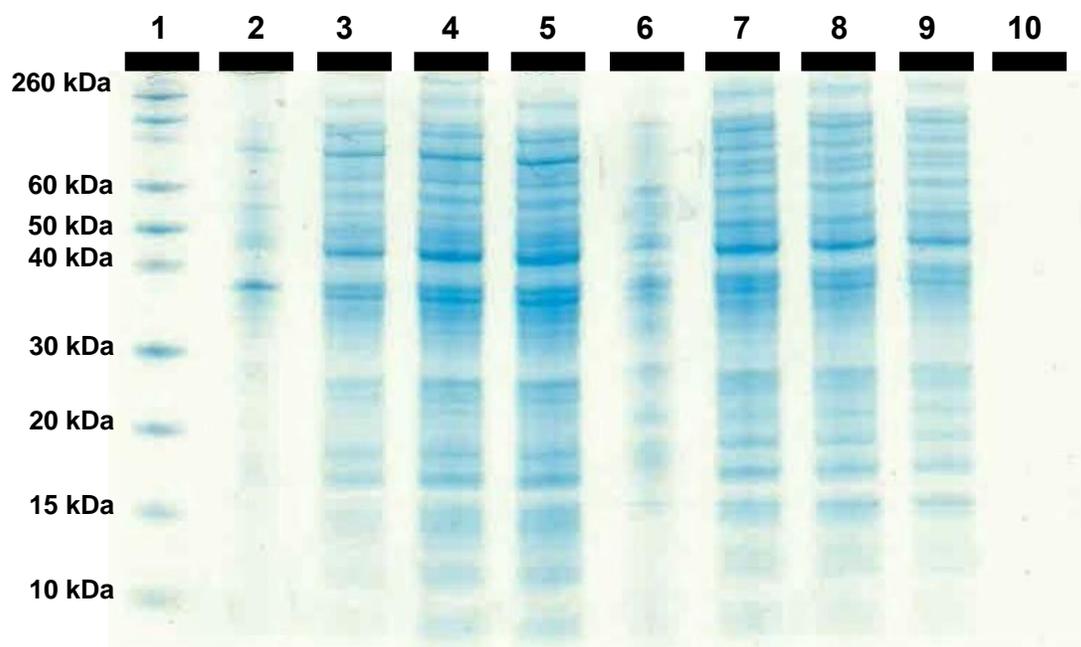
**Cuadro 9.** Concentración de ADN de doble banda y pureza en los métodos de extracción de proteínas.

Método de extracción	[ng/μL]*	A260/A280*	[ADN]/[Proteínas]*†
Fenol	47,1±0,2	0,68±0,01 <sup>a</sup>	0,0353±0,0005 <sup>a</sup>
Trizol	88,7±26,1	0,93±0,04 <sup>b</sup>	0,06±0,01 <sup>b</sup>

\*Desviación estándar calculada para tres mediciones de una muestra. †: ng/μL. a-b: valores con letras distintas en una misma columna fueron significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

Se decidió extraer las proteínas por el método de fenol saturado para las mediciones SERS. Además, no se efectuó la división de los perfiles de solubilidad de proteínas, debido a que

no hubo un aporte observable en la fracción de proteínas solubles. Se analizaron las proteínas totales como un primer acercamiento este proyecto. En la figura 18 se contempla la SDS-PAGE de las tres repeticiones de la extracción de proteínas totales con fenol para ambas bacterias. No se observó la presencia de proteínas en el control negativo.



**Figura 18.** SDS-PAGE de la extracción de proteínas totales con fenol saturado para las mediciones SERS. Tinción con azul de Coomassie. **1:** Marcador de masa molecular Novex® Sharp Standard; **2:** suspensión bacteriana de *K. pneumoniae*. **3, 4 y 5:** Repeticiones de la extracción de *K. pneumoniae*; **6:** suspensión bacteriana *S. enterica*; **7, 8 y 9:** Repeticiones de la extracción de *S. enterica*. **10:** control negativo.

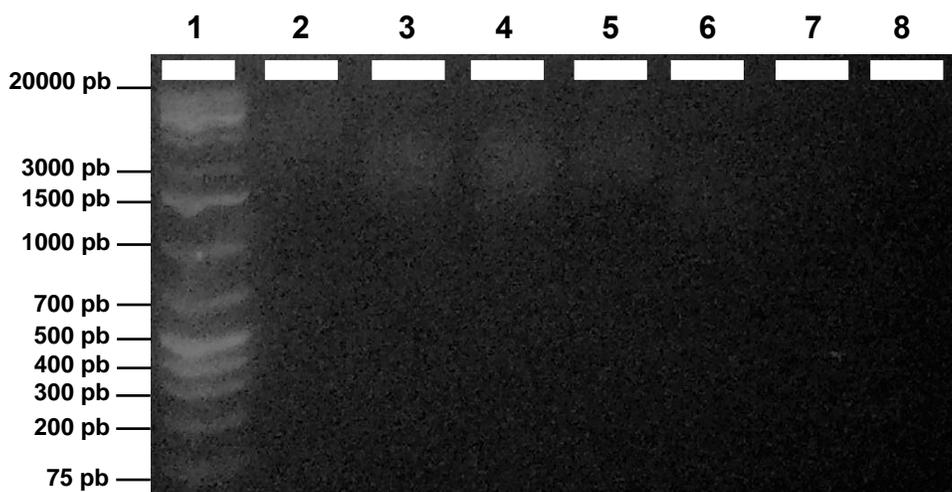
Debido a que las medidas SERS de proteínas se realizaron a partir de los botones obtenidos en la extracción, en el cuadro 10 se presenta el rendimiento de proteínas (en nanogramos) conseguido para ambas bacterias. Dicho rendimiento fue calculado a partir de la concentración obtenida en la cuantificación a 280 nm ( $1A=1 \text{ mg/mL}$ ).

**Cuadro 10.** Rendimiento (ng) de proteínas totales extraídas con fenol saturado de las dos bacterias en estudio ( $1A=1 \text{ mg/mL}$ ).

Bacteria	[ng/ $\mu\text{L}$ ]*	Rendimiento (mg)*
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1423,0 $\pm$ 421,3	0,14 $\pm$ 0,04
<i>Salmonella enterica</i>	991,1 $\pm$ 257,8	0,10 $\pm$ 0,03

\*Desviación estándar para una población de 3 repeticiones.

La electroforesis de agarosa demuestra la presencia de ADN contaminante en las muestras de proteínas de ambas bacterias (figura 19).



**Figura 19.** Electroforesis de agarosa (1,5% m/v) de la extracción de proteínas totales con fenol saturado para las mediciones SERS. Tinción con GelRed™. **1:** Marcador de peso molecular 1 kb Plus (GeneRuler™); **2, 3 y 4:** Repeticiones de la extracción de *K. pneumoniae*; **5, 6 y 7:** Repeticiones de la extracción de *S. enterica*. **8:** control negativo.

En el cuadro 11 se puede observar la cantidad (mg) de ADN de doble banda contaminante para las dos bacterias en la extracción de proteínas para SERS. Las relaciones entre la concentración de ADN sobre la de proteínas fueron similares entre las dos bacterias y a la obtenida en el cuadro 9.

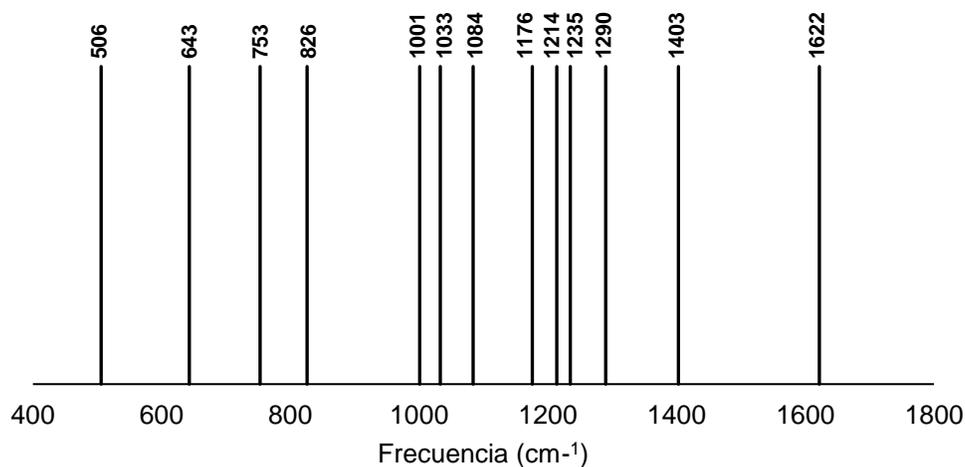
**Cuadro 11.** Concentración de ADN de doble banda y pureza en las extracciones de proteínas con fenol saturado de las dos bacterias en estudio.

Bacteria	[ng/μL]*	A260/A280*	mg ADN en el botón*	mg-ADN/mg-Proteínas*
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	49,3±15,6	0,69±0,02	0,005±0,002	0,04±0,02
<i>Salmonella enterica</i>	33,6±8,9	0,68±0,01	0,0034±0,0009	0,04±0,01

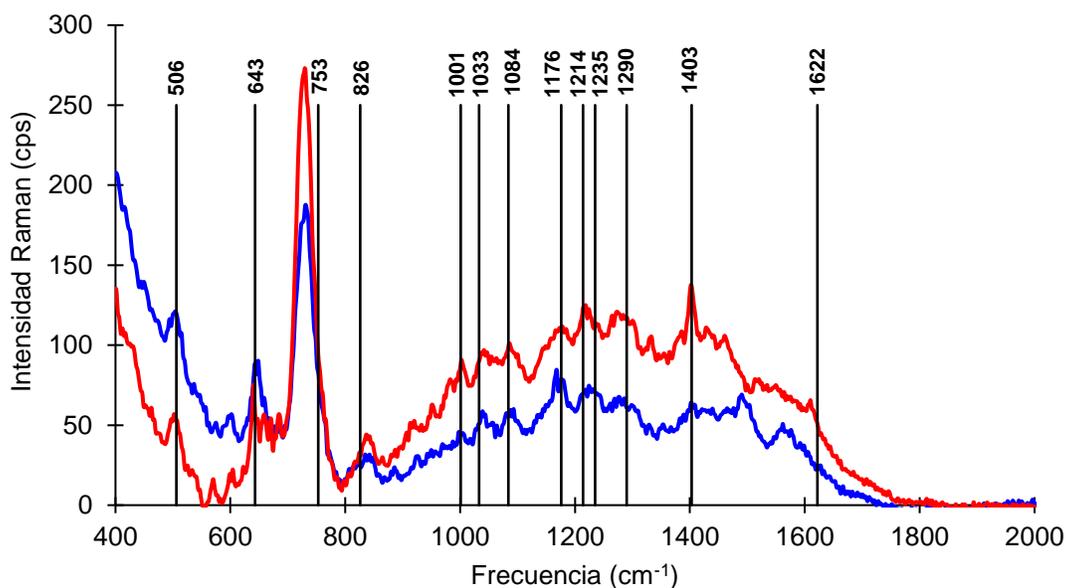
\*Desviación estándar calculada una población de 3 repeticiones.

Para el análisis de los espectros SERS de las proteínas totales, se construyó un código de barras con las frecuencias esperadas por la literatura (anexo 3). Dicho código evidencia la presencia de 13 señales características en la mayoría de los espectros SERS de proteínas (figura 20). En cuanto a la obtención de los espectros SERS propiamente, en la figura 21 se pueden observar las vibraciones obtenidas para el botón de proteínas/ADN de *K.*

*pneumoniae* y *S. enterica*, así como en comparación con el código de barras superpuesto en el gráfico.



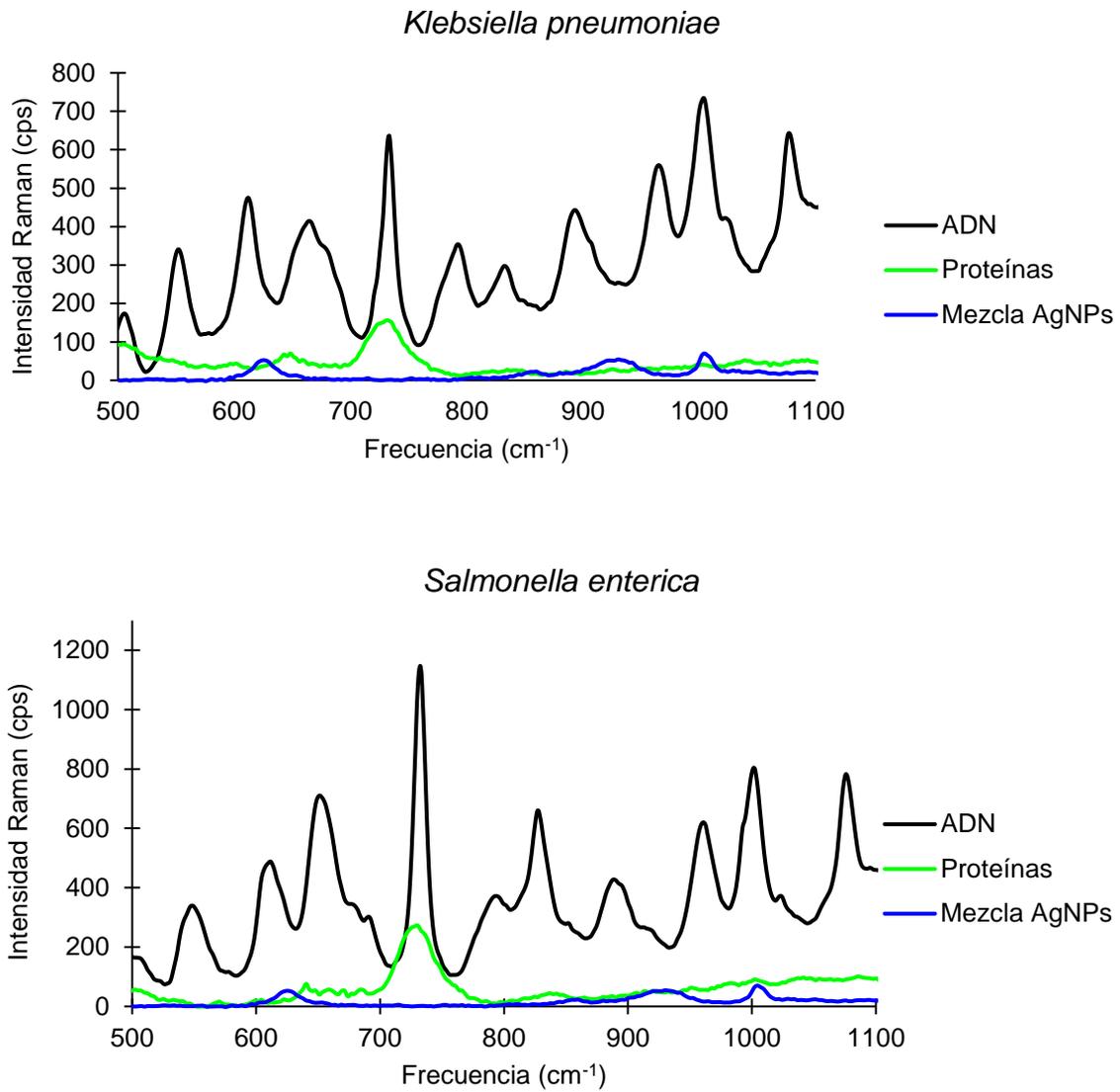
**Figura 20.** Código de barras de las frecuencias esperadas en un espectro SERS de proteínas. Datos obtenidos del anexo 3.



**Figura 21.** Espectros SERS de los botones de proteínas extraídos de *K. pneumoniae* y *S. enterica* con las AgNPs 1:4:0,1. **Líneas verticales negras:** código de barras de señales esperadas según anexo 3.

Finalmente, en la figura 22 se pueden contemplar los espectros de ADN genómico, proteínas y mezcla de AgNPs para ambas bacterias (región 500-1100 cm<sup>-1</sup>). Es evidente

que el ADN genómico y los botones de proteínas comparten la señal cercana a los 730  $\text{cm}^{-1}$ .



**Figura 22.** Espectros SERS de los botones de proteínas y ADN genómico de *K. pneumoniae* y *S. enterica*, comparados con el de las AgNPs 1:4:0,1.

## DISCUSIÓN

### Identificación genotípica y fenotípica de las bacterias

Estudios realizados sobre las bacterias *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella enterica* por Giannella (1996), Guentzel (1996) y Malt, Perrett, Humphrey y Jepson (2015), afirman que ambas son Gram-negativas; resultados consistentes con la caracterización realizada en este trabajo (figura 1). Dicha confirmación permitió extraer el ADN genómico utilizando el protocolo recomendado por Promega Corporation (2017) para este tipo de organismos.

En cuanto a la extracción de ADN genómico para la identificación genotípica de las bacterias, la presencia de bandas delgadas y de alto peso molecular (figura 2), así como los altos rendimientos y purezas obtenidos (cuadro 4), permitieron realizar la amplificación de la región genómica *ADNr-16S*. Las características anteriores corresponden a una molécula de ADN íntegra y potencial para realizar identificaciones de alta confiabilidad (Reddy y Raju, 2012). La presencia de la banda menor a 75 pb (figura 2) no afectó la identificación genotípica de *Klebsiella* (cuadro 5). Novogene Corporation (2017) menciona que esta banda es evidencia de contaminación por ARN degradado en los extractos.

Los fragmentos amplificados presentaron un tamaño adecuado para la caracterización de ambas bacterias (350 pb, 27f y 500-600 pb, 1492r) (cuadro 5). Ceuppens et al. (2017) afirman que fragmentos de 200-400 pb pueden servir para realizar una precisa caracterización taxonómica, siempre y cuando cubra la plasticidad genómica del contexto. Otras investigaciones han realizado identificaciones utilizando 400 pb (Bosshard, Abels, Zbinden, Bottger y Altwegg, 2003) o hasta menos de 200 pb (Wilck, Wu, Howe, Crouch y Edberg, 2001). Definitivamente, secuenciar fragmentos más pequeños de este gen constituye una alternativa más barata, fácil y con alta confiabilidad para el área clínica, comparada con el gen completo.

Investigaciones realizadas por Wragg, Randall y Whatmore (2014) sobre identificación de bacterias de interés veterinario con *ADNr 16S*, utilizan criterios que exigen un mínimo de 99% de igualdad en las secuencias alineadas para asignar identidad a nivel de especie. Boye y Hansen (2003) hablan más bien de un límite inferior de 97% para poder diferenciar las especies de *Klebsiella*. En este trabajo se obtuvieron valores de 100% de identidad y cobertura con las secuencias de las bases de datos, razón por la cual se tiene gran certeza en la asignación del género y especie para *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella enterica*.

El análisis bioinformático de la secuenciación de los conjuntos hipervariables V1-V2-V3 y V6-V7-V8-V9 permitió caracterizar genotípicamente a las dos bacterias en estudio (cuadro 5). Las regiones V1, V2, V3 y V6 funcionan muy bien para caracterizar el género de la mayoría de las bacterias (Ceuppens et al., 2017). Según Hellberg et al. (2012) la región V6 es la que suele presentar el mayor número de sitios polimórficos, luego V3, seguida por V1 y V7; todas secuenciadas en este trabajo.

En cuanto a la identificación por Biolog, no se obtuvieron los valores estadísticos de similitud y distancia (SIM y DIST, respectivamente) aceptados para determinar la identidad de las bacterias a nivel de género y especie (anexo 5). Para aceptar la identidad, todas las especies probables deben pertenecer al mismo género o al menos deben estar muy relacionadas, el SIM de la especie 1 debe ser  $> 0,50$  y cercano a 1 (cuanto más cercano a 1, mejor el emparejamiento) y DIST debe ser  $< 0,50$  (tolerancia hasta 5,0; mayores no se aceptan). De ser así, se selecciona la identidad 1, de lo contrario, la prueba de Biolog no es suficiente para asignar identidad al organismo (Biolog Inc., 2006). En este caso, todas las especies probables (para ambas bacterias) pertenecen a la familia de Enterobacterias (Puerta-García et al., 2010), por lo que la caracterización fenotípica concluye en este aspecto, según las observaciones del manual de equipo (Biolog Inc, 2006).

El manual del Biolog recomienda realizar otras pruebas para determinar con mayor confianza la caracterización de género y especie. Sin embargo, para el caso de *Klebsiella*, tres de las especies probables pertenecen a este género (excepto *Rahnella aqualitis*) y juntas suman 0,533 en SIM. Según el manual, cuando todas las especies probables suman más de 0,5 en SIM, es indicativo de que el organismo en estudio podría pertenecer al mismo género o se encuentra muy cerca filogenéticamente (Biolog Inc, 2006).

De acuerdo con lo anterior, el dendrograma construido en este trabajo muestra que *E. aerogenes* y *K. pneumoniae* comparten un ancestro común con una distancia evolutiva bastante corta, de acuerdo con el análisis de 350 pb (V1, V2 y V3) del ADNr 16S realizado (figura 4). Según Boye y Hansen (2003), *Enterobacter aerogenes* está altamente relacionada con el género *Klebsiella* desde el punto de vista filogenético y, como consecuencia, algunos científicos le han otorgado el sinónimo *Klebsiella mobilis*. No obstante, en este trabajo se obtuvieron diferencias suficientes para considerarlas como especies diferentes. Con respecto a los demás microorganismos en el dendrograma, es importante destacar que se obtuvieron dos grupos principales separados filogenéticamente, el de *Bacillus pumilus* (resultados del proyecto VIE y base de datos) y el de las enterobacterias, incluidas las secuencias del ADNr 16S de las bacterias en estudio. Como se observa en la figura 4, fue posible diferenciar a *Salmonella enterica* y *Klebsiella pneumoniae* entre sí y de las demás enterobacterias utilizando este método.

En los últimos años se ha preferido la identificación genotípica con ADNr 16S sobre la fenotípica, principalmente por su capacidad de describir especies poco caracterizadas, difíciles o imposibles de cultivar. Aunado a esto, la secuenciación del ADNr 16S ha demostrado tener un mayor porcentaje de exactitud en cuanto a la identificación bacteriana (90,6%) comparado con el Biolog (68,3%). Biolog es una técnica deficiente para identificar microorganismos fastidiosos (20,0%), donde ADNr 16S ha sido la alternativa (Morgan, Boyette, Goforth, Sperry y Greene, 2009). A pesar de todo, debido al tiempo que requiere la identificación por ADNr 16S, se vuelve un reto trasladar su eficiencia y exactitud a otras técnicas bioquímicas o biofísicas, por medio de procedimientos de laboratorio clínico más sencillos y rutinarios.

## Síntesis de AgNPs

Existe una correlación entre el tamaño óptimo de las MNPs y el máximo incremento SERS (Sant'Ana, Rocha, Santos, Zanchet y Temperini, 2009). La resonancia de plasmones superficiales (LSPR) incrementa gradualmente con el tamaño de las AgNPs esféricas hasta aproximadamente los 65 nm para un láser de 633 nm ( $\lambda$ ), donde, bajo estas condiciones se han obtenido espectros SERS con las mayores intensidades para la molécula R6G (He, Liang, Peng y Zhou, 2017). Por su parte; Cassar, Graham, Larmour, Wark y Faulds (2014) también demuestran que el incremento máximo de las señales SERS para moléculas como MGO, R6G y TP, se da con AgNPs de 65 nm.

Dicho incremento también depende de la longitud de onda a la que la muestra genere dispersión Raman (He et al., 2017). Por ejemplo, MGO absorbe a 621 nm; someter dicha molécula a un láser de longitud de onda similar (e.g. 633 nm) permite generar espectros SERS bien definidos para un amplio espectro de tamaños de AgNPs. Sin embargo, se recomienda utilizar nanopartículas cercanas a los (60-70) nm para aumentar la probabilidad de incrementar las señales cuando hay otras moléculas involucradas (He et al., 2017).

En este trabajo, las AgNPs sintetizadas por el método de reducción con  $\text{NaBH}_4$  (1:2) no mostraron la mejor actividad SERS en el BPE (anexo 6). Agnihotri, Mukherji y Mukherji (2014) mencionan que el método de reducción con exceso de  $\text{NaBH}_4$  resulta en la generación de AgNPs de tamaño pequeño, debido a la instantánea nucleación (reducción) de los iones  $\text{Ag}^+$  producida. Mehr, Khanjani y Vatani (2015) realizaron una síntesis similar y obtuvieron AgNPs de 47 nm de diámetro aproximadamente.

No es fácil obtener nanopartículas grandes utilizando el método de reducción con  $\text{NaBH}_4$  (Agnihotri et al., 2014). Los autores mencionan que por medio de la reducción con citrato de sodio (e.g. Lee-Meisel) es posible sintetizar partículas más grandes, pero este método suele producir una amplia distribución de tamaños. También aclaran que conseguir diámetros por encima de los 50 nm con una baja distribución, o sea, alto rendimiento, requiere de un buen control en las fases de nucleación y crecimiento de las AgNPs. Mezclar dos reductores como el citrato y el  $\text{NaBH}_4$  puede constituir la alternativa (Agnihotri et al., 2014), o reduciendo el pH al final de la fase de nucleación (Dong et al., 2009), como el método de Lee-Meisel con cambio de pH utilizado en este proyecto.

Al observar los espectros del BPE utilizando las AgNPs de los 3 mejores métodos en este estudio (figura 5, A y B), existe evidencia de la buena actividad SERS que presentaron las AgNPs obtenidas. Como lo mencionan Dong et al. (2009), alrededor de los 30 min de reducción por Lee-Meisel, con cambio de pH al finalizar la nucleación, se obtienen AgNPs esféricas de aproximadamente 69 nm. En este proyecto, se observó que a los 35 min se produjo un máximo incremento SERS (con un tamaño de  $74,68 \pm 4,57$  nm), dominante con respecto a todos los métodos de síntesis. Sin embargo, existen otros factores relacionados con la concentración que afectaron el cambio en el orden de prioridad con las pruebas de ADN (figura 5C), los cuales no van a ser discutidos para efectos de este trabajo.

Es importante destacar que los estudios mencionados anteriormente se han basado en AgNPs esféricas o de morfología similar, como las 1:4:0,1 seleccionadas para generar los espectros SERS de este trabajo (figura 6). El tamaño de estas AgNPs ( $65,40 \pm 2,32$  nm), también justifica la razón por la cual se obtuvieron espectros de altas intensidades para el ADN.

Alternativamente, Sant'Ana et al. (2009) han reportado un incremento máximo en SERS para AgNPs triangulares de (32-49) nm de diámetro, utilizando un láser de 570 nm. Evidentemente, en este caso surgen otras variables, como la morfología de las AgNPs y la  $\lambda$  del láser. Esto sugiere que la forma de sintetizar AgNPs está ligada a las condiciones con las cuales se van a tomar las medidas SERS.

La caracterización de las AgNPs 1:4:0,1 por UV-vis, evidenció un máximo de absorbancia entre los 387 y 391 nm (figura 7). Según González-Fuenzalida et al. (2016), las AgNPs esféricas suelen tener un máximo de absorbancia cercano a los 400 nm, congruente con los resultados de esta investigación.

En cuanto a las señales del BPE;  $1012\text{ cm}^{-1}$  (deformación del anillo aromático),  $1201\text{ cm}^{-1}$  (estiramiento de C-C y flexión C-H),  $1233\text{ cm}^{-1}$  (movimiento de tijera de C-H),  $1606\text{ cm}^{-1}$  (estiramiento del anillo aromático) y  $1634\text{ cm}^{-1}$  (estiramiento del etileno) coinciden con los resultados experimentales de Olivares-Amaya et al. (2012), quienes irradian con un láser de 633 nm. Dichos modos vibracionales constituyen los cinco principales para el BPE. Se observó que hubo un leve desplazamiento hacia frecuencias mayores en  $1606\text{ cm}^{-1}$  y  $1634\text{ cm}^{-1}$  para las 3 AgNPs seleccionadas (Figura 5, A y B); no obstante, Zhuang, Shi, Chen y Zuo (2011), también reportan espectros con estas posiciones y justifican dicho desplazamiento a la derecha con un rango de hasta  $13\text{ cm}^{-1}$ .

### **Extracción de ADN genómico bacteriano para mediciones SERS**

Los tres tratamientos con ARNasa en las extracciones de ADN genómico mostraron la presencia de bandas delgadas y de alto peso molecular (figuras 8, 9 y 12), así como altos rendimientos y pureza (cuadros 6 y 7). Como se mencionó anteriormente, dichos atributos corresponden a moléculas de ADN íntegras (Reddy y Raju, 2012). Para la selección del mejor método de extracción, no se analizó el rendimiento en concentración de ADN debido a que, como se observa en los cuadros 6 y 7, no parece representar una tendencia en función de los tratamientos; la diferencia entre el rendimiento del K-3 de la prueba de selección y el de las mediciones SERS es bastante alta.

Ahora bien, el factor de pureza sí puede correlacionarse con una eficiencia en la extracción de ADN genómico. La relación A260/A280 para el ADN de doble banda debe ser cercana a 1,8 para una extracción considerada como pura (Barbas, Burton, Scott y Silverman, 2001; Thermo Scientific, 2012; Tecan, 2014; Matlock, 2015). Se seleccionaron los tratamientos K-3 y S-3 para las extracciones de ADN a medir en SERS; K-3 debido a que no presentó la

banda de ADN degradado menor a 75 pb (figura 8) y mostró un valor de pureza bastante cercano a 1,80, mientras que S-3 por manifestar el valor más cercano a 1,80 de los tratamientos ( $p=0,1000$ ) (cuadro 6).

Las curvas de tendencia de construidas a partir de las concentraciones obtenidas en las diluciones (figura 10), se parecen a las curvas teóricas calculadas (comportamiento exponencial), con  $R^2=1$  y  $R^2=0,9964$  para la aproximación de *K. pneumoniae* y *S. enterica*, respectivamente. Con respecto a la pureza de las diluciones, se observó que hasta 1:32 (ambas bacterias) A260/A280 no representó un cambio considerable con respecto al valor esperado (figura 11); no obstante, para 1:64, A260/A280 disminuyó significativamente con respecto a la muestra sin diluir ( $p=0,1000$ ) (anexos 10 y 11).

Valores menores a 1,8 en la relación A260/A280 indican contaminación con proteínas o fenoles (A280) (Barbas et al., 2001; Thermo Scientific, 2012; Tecan, 2014; Matlock, 2015). Sin embargo, se han encontrado otras razones por las cuales A260/A280 tiende a bajar de 1,8; entre ellas las concentraciones muy bajas de ADN ( $<10$  ng/ $\mu$ L) o pequeños cambios en el pH (sobre representando  $\pm 0.2-0.3$  de A260/A280) (Matlock, 2015). Como se observa en los anexos 10 y 11, las concentraciones de las diluciones 1:64 son menores a 10 ng/ $\mu$ L, al mismo tiempo, sus magnitudes son menores al límite de detección del espectrofotómetro NanoDrop™ Lite (4,0 ng/ $\mu$ L) (Thermo Fisher Scientific Inc., 2012), donde se realizaron las mediciones.

### **Obtención y evaluación de espectros SERS de ADN genómico bacteriano**

La asignación de los modos vibracionales del ADN de doble banda para los espectros SERS fue basada en la comparación con 20 señales presentes en el código de barras construido (figura 13). Los espectros obtenidos para ambas bacterias evidencian la presencia de algunas de las bandas comunes en ADN. Entre las frecuencias congruentes con el código y mejor definidas están 599  $\text{cm}^{-1}$ , 614  $\text{cm}^{-1}$ , 658  $\text{cm}^{-1}$ , 732  $\text{cm}^{-1}$ , 794  $\text{cm}^{-1}$ , 830  $\text{cm}^{-1}$ , 892  $\text{cm}^{-1}$ , 1082  $\text{cm}^{-1}$ , 1136  $\text{cm}^{-1}$ , 1122  $\text{cm}^{-1}$ , 1354  $\text{cm}^{-1}$ , 1380  $\text{cm}^{-1}$ , 1455  $\text{cm}^{-1}$  y 1505  $\text{cm}^{-1}$  (figura 14).

La señal en 599  $\text{cm}^{-1}$  representa la flexión del anillo de citosina (C) en cadenas de ADN de simple banda, dicha característica indica la presencia de ADN degradado (Morla et al., 2016), de lo cual podría decirse que no hay un aporte observable en los espectros obtenidos para ambas bacterias (figura 14). Por su parte, Muntean et al. (2015) y Dina et al. (2016), indican que la señal cerca de 614  $\text{cm}^{-1}$  se asigna como los modos vibracionales del conformero C3'-endo-anti de la desoxirribosa. En la figura 14 se puede contemplar que la intensidad de dicha señal se aproxima a la esperada.

De igual manera, en los espectros se distinguen los modos vibracionales de respiración del anillo aromático de la guanina (G) (658  $\text{cm}^{-1}$ ) y adenina (A) (732  $\text{cm}^{-1}$ ) en las frecuencias correctas (Lu et al., 2015; Morla et al., 2016). Para la adenina, se tiene que específicamente en la vibración participan C2-N1-C6 y C4-N9-C8 (Lu et al., 2015).

La respiración de los anillos de citosina (C) y timina (T) pueden asignarse a la frecuencia de  $794\text{ cm}^{-1}$  (Morla et al., 2016). Por su parte, Muntean et al. (2011) reportan que el intervalo de esta señal puede ser  $793\text{-}805\text{ cm}^{-1}$ , como producto de las vibraciones de los confórmeros endo-anti del nucleósido dC, mezclada con la respiración del anillo dC y el esqueleto azúcar-fosfato. En este trabajo se observó la presencia de dicha señal; sin embargo, la intensidad en ambas bacterias fue baja.

Las señales para la región  $829\text{-}943\text{ cm}^{-1}$ , con intensidades medias o bajas, proporcionan información sobre diferentes formas vibracionales de la desoxirribosa y su interacción con las AgNPs utilizadas (Muntean et al., 2011; Muntean et al., 2015; Dina et al., 2016). Por su parte, Lu et al. (2015) resaltan que una señal en  $835\text{ cm}^{-1}$  podría indicar el estiramiento simétrico del  $\text{PO}_2^-$  en la conformación B del ADN, aunque si se desplaza hacia la izquierda (cerca de  $814\text{ cm}^{-1}$ ) podría referirse al mismo movimiento molecular en el confórmero A. Con la información en el espectro del ADN de ambas bacterias (figura 14), podría suponerse que la señal de  $835\text{ cm}^{-1}$  se encuentra traslapada con la dispersión del azúcar y que el ADN analizado estuvo en su conformación B.

Las señales que identifican a la adenina y desoxirribosa se han reportado como sitios activos de ADN en los espectros SERS-AgNPs. La dispersión de la adenina cerca de  $732\text{ cm}^{-1}$  ha demostrado ser el pico prominente en muchos espectros de ADN genómico (Barhoumi, Zhang, Tam y Halas, 2008; Guerrini et al., 2014; Lu et al., 2015; Xu et al., 2015; Morla et al., 2016; Girel et al., 2016). No obstante, Lim et al. (2011), Jiang et al. (2012), Muntean et al. (2011), Pramanik et al. (2016), Muntean, et al. (2013), Muntean et al. (2015) y Dina et al. (2016) no obtienen esta característica en sus espectros, y la  $726\text{ cm}^{-1}$  apenas puede detectarse. En este trabajo, los espectros de ADN de *K. pneumoniae* y *S. enterica* no evidencian que  $732\text{ cm}^{-1}$  sea un pico prominente (figura 14); aunque si se analiza la región de  $500\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$ , siendo el pico de mayor intensidad, lo que en este caso coincide con lo reportado en la literatura.

Cerca de  $1082\text{ cm}^{-1}$  se obtuvo una señal con la intensidad esperada. Dicha frecuencia representa el estiramiento simétrico de los grupos  $\text{PO}_2^-$  que interconectan a los nucleósidos (Morla et al., 2016), la cual es independiente de la composición y secuencia de las bases nitrogenadas (Muntean et al., 2011).

Según Morla et al. (2016), el rango del espectro entre  $1150\text{ cm}^{-1}$  y  $1160\text{ cm}^{-1}$  corresponde a la mayoría de vibraciones coplanares de las bases nitrogenadas en forma traslapada. Normalmente se espera un conjunto de señales o una banda gruesa, donde no puede asignarse un modo vibracional específico con seguridad (Muntean et al., 2011). Los autores mencionan que esta región puede ser sensible al apilamiento de las bases nitrogenadas, donde algunas veces ocasiona el hipocromismo Raman, fenómeno relacionado con la disminución en la absorbancia (Berg, Tymoczko y Stryer, 2007). Para los espectros obtenidos en este trabajo, dentro de la región mencionada anteriormente se distinguen claramente las señales de ADN cercanas a  $1136\text{ cm}^{-1}$ ,  $1222\text{ cm}^{-1}$ ,  $1354\text{ cm}^{-1}$ ,  $1380\text{ cm}^{-1}$ ,  $1455\text{ cm}^{-1}$  y  $1505\text{ cm}^{-1}$ .

Picos cerca de  $1136\text{ cm}^{-1}$  han sido caracterizados como vibraciones del nucleósido dA (Muntean et al., 2011; Muntean et al., 2013), específicamente de estiramientos en C8–N9, N9–H y deformación en C8–H (Dina et al., 2016). De acuerdo con el anexo 2, no se encontró literatura que reportase un desplazamiento hasta  $1143\text{ cm}^{-1}$  de esta señal, por lo que no se puede afirmar con seguridad su identidad.

El incremento en  $1222\text{ cm}^{-1}$  apenas puede notarse en el espectro (figura 14). Dicha señal podría corresponder a la dispersión de baja intensidad característica de los estiramientos coplanares de la citosina y adenina observados por Girel et al. (2016) utilizando un láser de 633 nm. Por otro lado, las vibraciones observadas en la frecuencia de  $1294\text{ cm}^{-1}$  se han caracterizado por presentar intensidades altas, tal y como se observa en la señal desplazada a la izquierda (figura 14). No se ha encontrado literatura que justifique dicho desplazamiento, pero podría creerse que se debe al estiramiento del esqueleto  $\text{PO}_2^-$  (Pramanik et al., 2016).

La presencia de vibraciones de adenina libre en  $1323\text{ cm}^{-1}$  son indicadores de ADN degradado (Muntean et al., 2011); afortunadamente, dicha señal no se observa en los espectros de las bacterias en estudio (figura 14), a excepción de la dilución 1:64 de *K. pneumoniae*. (figura 15).

Se tiene que para la banda observada en  $1354\text{ cm}^{-1}$ , las vibraciones correspondientes pertenecen a los nucleósidos dA y dT (Muntean et al., 2013). Dina et al. (2016) mencionan que, en realidad, este pico relativamente conservado en la frecuencia significa estiramientos C-N de dT, dA y dG; además constituye uno de los principales marcadores de ADN genómico para los autores, a pesar de encontrarse en una zona riesgosa de caracterizar.

Muntean et al. (2011), Muntean et al. (2013) y Girel et al. (2016) están de acuerdo con que la señal cercana a  $1380\text{ cm}^{-1}$  identifica a modos vibracionales de A, T y G. Por su parte, Muntean et al. (2011), Muntean et al. (2015), Dina et al. (2016) coinciden en que la señal de  $1455\text{ cm}^{-1}$  describe la vibración del grupo metileno ( $\text{CH}_2$ ) en la desoxirribosa.

Dina et al. (2016) también encuentran que cerca de  $1510\text{ cm}^{-1}$  ( $1505\text{ cm}^{-1}$ , figura 14) hay una contribución de una banda intensa proveniente de la dispersión por la deformación del grupo amino de la adenina. Otra banda marcadora del ADN para los autores es la que está situada en  $1577\text{ cm}^{-1}$  (residuos dG y dA), presente principalmente en el espectro de *S. enterica*, no así para *K. pneumoniae*, como se observa en los espectros de este trabajo. Finalmente,  $1622\text{ cm}^{-1}$  contribuye con información sobre vibraciones de dT(C=O) (Muntean et al., 2011; Dina et al., 2016) o de manera general, como la combinación de formas de estiramiento del grupo carbonilo (Guerrini et al., 2014).

Los espectros SERS promediados demostraron un alto rendimiento y calidad en la ubicación de sus señales, ancho de las bandas, e intensidades relativas; principalmente en la región  $500\text{-}1150\text{ cm}^{-1}$ . Dichos espectros son realmente representaciones de los modos

vibracionales del ADN, pero con bajas intensidades en las regiones que suelen utilizarse para caracterizar. Morla et al. (2016) atribuyen una dependencia de las intensidades relativas en señales de ADN con el tiempo de incubación a secar la muestra. Los autores recomiendan incubar la mezcla del coloide de AgNPs con el ADN durante 3 horas para permitir una óptima interacción entre la molécula y el metal (Morla et al., 2016); en este trabajo, las mezclas de ADN-AgNPs no fueron incubadas y se dejaron secar inmediatamente.

Muntean et al. (2011) mencionan que la citosina y las AgNPs tienen un modo de interacción bastante fuerte, esto debido a los electrones exocíclicos potenciales a coordinar con los orbitales electrofílicos de la Ag, lo que explica la baja definición de dicha señal en el espectro de ADN de las bacterias (figura 14). Normalmente, no se observan muchos modos vibracionales de la T, esto debido a la carencia de este grupo amino exocíclico. Los autores también aclaran que otras investigaciones han observado esta misma interacción con la A. Debido a la estructura química de la G, es posible que esto también suceda.

De manera general, se observó que algunas veces es frecuente encontrar ligeros cambios en la posición de los picos esperados en el espectro, esto puede deberse a la interacción específica con las AgNPs utilizadas, donde puede haber bandas importantes ausentes debido a dicha interacción (Muntean et al., 2011). Muntean et al. (2013) mencionan que esta interacción es una redistribución de los electrones en el resto de la estructura involucrada en el apareamiento con la superficie metálica. Wei y Zu (2007) describen que este cambio más bien puede relacionarse con la deficiente comunicación atribuida al complejo ADN-AgNPs, debido a la baja interacción entre los puentes de hidrógeno (para el caso de las bases nitrogenadas), dependiente de la orientación molecular superficial (modo de adsorción).

Pramanik et al. (2016) demuestran que, en la ausencia de sales, los espectros SERS del ADN bacteriano-AgNPs suelen presentar bandas de bajas intensidades. Los autores han utilizado NaCl 0,01 M en las mezclas ADN-AgNPs para obtener mejores espectros SERS; dicha adición reduce la barrera repulsiva de carga entre las AgNPs y los grupos  $\text{PO}_2^-$ . Algunos picos aparecen con mayores intensidades y, algunas veces en posiciones un poco diferentes a las esperadas por la nueva interacción entre el ADN-AgNPs.

A diferencia de los espectros obtenidos en este trabajo (figura 14 y 15), mediante la estrategia de adición de NaCl a la suspensión de AgNPs, la adenina ( $732\text{ cm}^{-1}$ ) se vuelve prominente, se observa claramente  $802\text{ cm}^{-1}$  por la respiración del anillo C, se visualiza un pico agudo en  $1004$  asignado al estiramiento del enlace C-N entre el azúcar y la base nitrogenada, y  $1294\text{ cm}^{-1}$  se vigoriza por el estiramiento del esqueleto  $\text{PO}_2^-$  (Pramanik et al., 2016). Estas características demuestran la dependencia de los espectros Raman de ADN bien definidos y la aparición de señales importantes con la presencia de sales.

Por otra parte, el ADN promueve la agregación de las AgNPs, dejando la necesidad de otros agentes aglomerantes. De esta manera, crea un sándwich formando los denominados

*hot spots* que permiten la intensificación de la señal Raman (Guerrini et al., 2014). Las intensidades altas se deben a los fuertes campos electromagnéticos generados en estos espacios (Lu et al., 2015), donde el ADN se encuentra a unos nanómetros cerca de la superficie de las MNPs (nanopartículas metálicas) (Muntean et al., 2013). Dicha agregación es independiente de la secuencia del ADN, permitiendo la formación de *clusters* estables en el tiempo (Muntean et al., 2011; Guerrini et al., 2014). Morla et al. (2016) mencionan que la detección de ADN por SERS es independiente de su tamaño, conformación y secuencia nucleotídica (Morla et al., 2016).

Para entender la razón por la cual se dan las descritas interacciones entre el ADN y las AgNPs que permiten el incremento SERS, primero hay tener clara la orientación espacial a nivel atómico. La molécula de ADN genómico está compuesta por hélices de doble banda, donde la desoxirribosa y los grupos fosfato están conectados alternadamente mediante enlaces fosfodiéster en el exterior de la molécula. En contraste, las bases nitrogenadas son las responsables de unir cada banda desde el interior, volviéndolas relativamente menos accesibles al contacto con el exterior (Lu et al., 2015). Las señales SERS de la desoxirribosa suelen ser de los picos con mayores intensidades, debido a que pueden entrar fácilmente en contacto con las AgNPs (Lu et al., 2015). Aunque los grupos fosfato son los que se encuentran más expuestos, su carga negativa impide que la interacción electrostática sea muy fuerte con las AgNPs (cargadas negativamente), produciendo intensidades medias (Guerrini et al., 2014; Lu et al., 2015).

Se demostró que las AgNPs utilizadas en este trabajo funcionaron para detectar las señales principales del ADN de dos bacterias Gram-negativas. Sin embargo, las intensidades de las regiones más comunes de caracterización fueron bajas, aunque sí fue posible detectar las señales características de los modos vibracionales del ADN de doble banda. Este método de detección y caracterización fue rápido, barato, flexible y sencillo de aplicar a las muestras de ADN.

Además, se demostró la aplicación de SERS como técnica rápida y sensible en la caracterización de ADN. Se pudieron detectar señales características de la biomolécula a nivel de pocos nanogramos para las dos bacterias en estudio sin modificaciones en los espectros. Se puede observar que hasta para las muestras diluidas a razón de 1:32 se pudo definir el mismo patrón espectral (figura 15).

Para futuros análisis de ADN, según lo obtenido en este proyecto, se recomienda utilizar concentraciones de ADN entre los 34,4 ng/μL y 235,1 ng/μL debido a su buena definición en el espectro (figura 15; anexos 13, 14 y 15). En caso de contar con concentraciones más bajas, es preferible no realizar los ensayos cuando sean menores a 4 ng/μL. Además, es importante destacar que para las primeras diluciones fue sumamente sencillo enfocar el microscopio Raman sobre la gota analizada, ya que el ADN está tan concentrado que los *hot spots* son abundantes. Diluciones menores o iguales a 1:16 requirieron de más tiempo para encontrar una zona que permitiera obtener un espectro definido.

## **Evaluación de los métodos de extracción de proteínas bacterianas**

Actualmente, encontrar una técnica capaz de obtener altos rendimientos de proteínas totales constituye un desafío para la comunidad científica (Fodor et al., 2017). En este estudio, se han comparado dos métodos ampliamente utilizados alrededor del mundo para extraer proteínas totales en estudios proteómicos (fenol saturado y trizol), con el fin de lograr el mayor rendimiento y diversidad posibles.

Este trabajo evidenció la necesidad de utilizar un criterio matemático para seleccionar el mejor método de extracción de proteínas. Los dos métodos evaluados no demostraron diferencias cualitativas en cuanto a la concentración de proteínas totales por medio de la técnica SDS-PAGE. No obstante, la determinación de la concentración de proteínas y ADN a 280 nm y 260 nm, respectivamente; permitieron concluir que el método de fenol saturado permitió obtener extractos de proteínas menos contaminados con ADN ( $p > 0,05$ ; cuadro 9).

Se ha sugerido que la observación de una serie de bandas definidas en una electroforesis de proteínas, se debe principalmente a que la forma aniónica del tinte azul de Coomassie, el sulfonato, interacciona con los aminoácidos básicos, específicamente en el orden Arg > Lys, His, Tyr. Además, como segunda fuerza de atracción en magnitud, las entidades aromáticas de ambos actores (Trp, Phe y Tyr para las proteínas) llevan a cabo asociaciones de van der Waals (Georgiou, Grintzalis, Zervoudakis y Papapostolou, 2008; Chevalier, 2010). Según De Moreno, Smith y Smith (1986), el medio debe estar ligeramente ácido, con el fin de que la especie  $R-NH_3^+$  también desarrolle interacción por atracciones electrostáticas con el tinte en su forma aniónica. Este tinte ha sido un compuesto clave para la PAGE de los últimos años, siendo capaz de permitir la visualización de los geles en el rango de luz visible, fácil de operar, barato y más compatible con los métodos de cuantificación que las tinciones con  $AgNO_3$  (Dong, Wang, Wang y Zhang, 2011).

Las proteínas exhiben una mayor diversidad química con respecto a los ácidos nucleicos. En algunas ocasiones, se ha estandarizado su evaluación mediante la medición de la absorbancia a una longitud de onda específica, la cual permita correlacionar algunos de sus componentes estructurales, relativamente conservados, con la concentración. Para este trabajo, la absorbancia de las proteínas se midió a 280 nm, donde la misma es dominada por el Trp, Tyr y los puentes disulfuro (Porterfield y Zlotnick, 2010; Thermo Fisher Scientific Inc., 2012; Johnson, 2012). En relación con su absorbancia, la determinación de la concentración estuvo basada en la ley de Beer-Lambert ( $c=A/\epsilon \cdot l$ ) (Thermo Fisher Scientific Inc., 2012).

La medición a 280 nm, en el NanoDrop™ Lite, no requiere de una curva de estandarización para medir la concentración; sin embargo, las muestras proteicas deben estar sumamente puras para evitar falsos positivos (Thermo Fisher Scientific Inc., 2012; Johnson, 2012). En una extracción de proteínas relativamente pura, es usual encontrar valores de  $A_{260}/A_{280}$  cercanos a 0,6 (Thermo Fisher Scientific Inc., 2012). A favor de la extracción fenólica, dicha relación fue bastante cercana al valor mencionado anteriormente (valor obtenido:

0,68±0,01); además, fue significativamente más baja ( $p>0,05$ ) que la obtenida con trizol (cuadro 9).

Para obtener una cuantificación de absorbancia exitosa, es importante someter el producto final de una extracción proteica a una serie de lavados. Dichos lavados se realizan con el fin de eliminar sustancias contaminantes capaces de absorber a 280 nm, dependiendo del tipo de extracción seleccionado. Entre las sustancias contaminantes están los compuestos fenólicos y aromáticos en general, detergentes, cofactores, pigmentos, algunos agentes reductores y los ácidos nucleicos (en baja proporción) (Mitchell, 2009). En este trabajo, se realizaron siete lavados al botón de proteínas obtenido en la extracción con fenol, mientras que para trizol solamente un lavado con etanol al 95% v/v. Los resultados demuestran que la intensidad en las bandas de la SDS-PAGE entre ambos métodos es muy similar, lo cual es congruente con la semejanza entre las concentraciones medidas (cuadro 8); sin embargo, el aumento de concentración para la extracción con trizol podría atribuirse a la presencia de otras sustancias contaminantes. Por otro lado, la extracción con fenol saturado fue adaptada de un protocolo para la utilización de unos extractos en ensayos de electroforesis en 2D y MALDI-TOF (Alam et al., 2014), por lo cual se asume, y se confirma con los resultados de este trabajo (cuadro 8), que el procedimiento realizado por los autores se llevó a cabo con el objetivo de obtener muestras de alta pureza.

Lee y Lo (2008) han obtenido éxito en las extracciones de proteínas de dinoflagelados con trizol, capaces de llevar a cabo estudios proteómicos. Tan et al. (2009) han reportado varios estudios de auge con métodos muy similares al de trizol utilizado en este proyecto. Alternativamente, en este trabajo se obtuvieron bandas más intensas en la SDS-PAGE de trizol (figura 16) que las obtenidas por Malafaia et al. (2015). Algunos autores sugieren que los procesos de extracción de proteínas deben ser optimizados para cada organismo y condiciones en estudio (Malafaia et al., 2015; Fodor et al., 2017). Además, es importante destacar que el cuidado en la precipitación proteica con isopropanol debe ser crucial, ya que, según los resultados obtenidos (cuadro 9) es bastante difícil separar el complejo solubilizado de ADN-proteínas.

El procedimiento de extracción de proteínas por medio de fenol saturado ha sido adaptado de Alam et al. (2014). Los autores han obtenido bandas de proteínas (en SDS-PAGE) con intensidades similares a las observadas en las figuras 16 y 18. Los perfiles de proteínas totales bacterianas extraídas, ha posibilitado realizar estudios proteómicos y ha demostrado la presencia de proteínas de membrana externa, interna, periplasma y citosólicas, mediante estudios con electroforesis en 2D y MALDI-TOF. Este tipo de extracción permitió obtener altos rendimientos para bacterias como *Tetrathlobacter kashmirensis*, *Pseudaminobacter salicylatoxidans*, *Escherichia coli* y *Mycobacterium smegmatis*.

Durante la preparación del fenol en esta investigación, no se logró ajustar el pH a 8,0 mediante los lavados con tris (pH=8,0). A pesar de esto, el ajuste con NaOH, después de los lavados correspondientes con tris evidenció un alto rendimiento de proteínas, tal y como se observa en las SDS-PAGE realizadas (figuras 16 y 18). Por su parte, Faurobert, Pelpoir

y Chaib (2007) reportan procedimientos de extracción de proteínas con alto rendimiento bajo un pH fenólico en el rango 6,6-7,9. No obstante, hay que considerar que cuanto mayor sea el pH en este rango, menor la contaminación con ADN, ya que las fuerzas de repulsión reducen la probabilidad de su migración hacia la fase fenólica cargada negativamente.

Otros factores que favorecieron la obtención de proteínas con fenol saturado están relacionados con la composición del buffer de extracción. Dicha solución ha sido una estrategia científica altamente expandida alrededor del mundo. La alta concentración de sacarosa permite que dicho buffer sea más denso que la fase fenólica y que, de esta manera, sea más fácil la remoción de la fase orgánica, disminuyendo la posibilidad de arrastrar otras moléculas por contacto con la fase acuosa (Faurobert et al., 2007).

La lisis celular es uno de los principales factores que afectan el rendimiento de una extracción de proteínas bacterianas. Fodor et al. (2017) reconocen que este tipo de extracción depende fuertemente de la eficiencia de dicha lisis, lo cual es demostrado en la cantidad y calidad de bandas en SDS-PAGE. Los autores también mencionan que existe una gran variedad de técnicas asociadas a la lisis, entre ellas el choque osmótico y vibración ultrasónica (usados en este trabajo), que permiten obtener diferentes perfiles proteicos dependiendo de los intereses de la investigación. Ahora bien, las SDS-PAGE para las mediciones SERS (figuras 16 y 18) realizadas en este trabajo evidenciaron bandas intensas, teñidas exitosamente con el azul de Coomassie. También se puede observar que dicha intensidad de las bandas fue consistente con las concentraciones obtenidas (cuadros 9 y 10).

### **Obtención y evaluación de espectros SERS de proteínas bacterianas**

La asignación de los modos vibracionales de las proteínas para los espectros SERS fue basada en la comparación con 13 señales presentes en el código de barras construido (figura 20). Los espectros obtenidos para ambas bacterias evidenciaron la presencia de algunas de las bandas comunes en proteínas. Entre las frecuencias mejor definidas y congruentes con el código están las cercanas a  $506\text{ cm}^{-1}$ ,  $643\text{ cm}^{-1}$ ,  $826\text{ cm}^{-1}$ ,  $1001\text{ cm}^{-1}$ ,  $1084\text{ cm}^{-1}$ ,  $1176\text{ cm}^{-1}$ ,  $1214\text{-}1235\text{ cm}^{-1}$  y  $1403\text{ cm}^{-1}$  (figura 21).

Los espectros SERS promediados demostraron la presencia de algunas señales de proteínas en la frecuencia correcta. Además, se asemejan a las contribuciones vibracionales proteicas mencionadas por Mandair y Morris (2015), así como a la definición de bandas obtenida por Han et al. (2008), Han et al. (2009) y Negri, Sarver, Schiavone, Dovichi y Schultz (2015). No obstante, se debe resaltar que los espectros de este trabajo obtuvieron intensidades muy bajas, lo cual impidió dar una caracterización confiable de las señales. Por otro lado, sí se puede asegurar con certeza que las muestras medidas correspondían a un extracto de proteínas totales bacterianas (con una leve presencia de ADN contaminante), según puede observar en los resultados del cuadro 10 y la figura 18.

La concentración de las proteínas no parece ser un factor que impidiera resolver adecuadamente los espectros, ya que Xu et al. (2014) reportan límites de detección en 3 ng/ $\mu$ L para la lisozima. Como se observa en el cuadro 10, las concentraciones de las proteínas para *K. pneumoniae* y *S. enterica* fueron mucho mayores (casi 500 veces). Es posible que una de las razones por las cuales se obtuvieron espectros con intensidades bajas en las proteínas, al igual que para los espectros de ADN, sea por el reducido tiempo de incubación con las AgNPs antes de secar las muestras (Morla et al., 2016).

Si la mezcla de AgNPs-proteínas no se realiza adecuadamente, el efecto SERS no se lleva a cabo y las señales son débiles, donde usualmente son opacadas por la fluorescencia de la muestra (Huang et al., 2015). Las superficies metálicas rugosas y las muestras coloidales secas no han permitido obtener espectros SERS consistentes a raíz de la irreproducible interacción proteína-metal. Debido a la heterogeneidad estructural de las proteínas, la orientación en la que se encuentren a la hora de la mezcla es crucial para definir sus espectros SERS (Han et al., 2009).

Los espectros SERS de proteínas dependen de la posición y la distancia de los grupos funcionales con respecto a la superficie metálica. Algunas veces, las regiones proteicas que se encuentran lejos de la superficie metálica provocan espectros con señales ausentes. Este fenómeno podría interpretarse como un falso negativo si se trata de definir la presencia de alguna vibración importante (Yang, Gu, Qian, Li y Zhang, 2011).

Espectros SERS de péptidos grandes o proteínas, como la insulina (~11 kDa), suelen carecer de picos asignables a la dispersión de la amida I (extremo N-terminal de la estructura primaria de las proteínas); mientras que péptidos pequeños como penta-Gly (~0,078 kDa) han demostrado señales intensas para esta vibración. Los péptidos cortos también muestran señales de dispersión intensas para estiramientos de CH<sub>2</sub> y C-C (Nguyen, Peters y Schultz, 2017). En el espectro de *Salmonella enterica* fue posible observar un pico pequeño cerca de 1622 cm<sup>-1</sup> (figura 21), asignado como la vibración de amida I. Dado que las proteínas grandes tienen cadenas laterales muy voluminosas, esto provoca que tanto el enlace peptídico como el extremo N-terminal se ubiquen lejos de la superficie metálica (Nguyen et al., 2017). Kurouski, Postiglione, Deckert-Gaudig, Deckert y Lednev (2013) han correlacionado la ausencia o debilidad de la señal de amida I con el tamaño de las cadenas laterales de los aminoácidos.

Han et al. (2009) han logrado aglomerar los complejos AgNP-proteína mediante la adición de iones sulfato a la solución, con el objetivo de socavar el problema de la ausencia de señales. Los resultados con este método han evidenciado la presencia de los picos de amida I (1661 cm<sup>-1</sup>), amida III (1235 cm<sup>-1</sup>) y aminoácidos con residuos aromáticos como Phe (1005 cm<sup>-1</sup>), Trp (1557, 1342, 508 cm<sup>-1</sup>) y Tyr (856 cm<sup>-1</sup>). Se recomienda ver el apéndice 7 para comparar dichos resultados con todas las señales posibles en cada tipo de vibración, definidas con los artículos consultados.

López-Ramírez et al. (2004) han reportado que las mayores contribuciones vibracionales para sus espectros de proteínas pertenecen a las bandas del grupo tiol (-SH), amonio (-NH<sub>x</sub>) y carboxilato (COO<sup>-</sup>). También reportan que las AgNPs presentan una afinidad particularmente alta a los átomos de azufre, por lo cual dicha señal suele verse desplazada en el espectro y con intensidades altas. Para los espectros de este trabajo, es evidente la elevación del pico cerca de esta zona (figura 21) en ambas bacterias, se cree que se debe a la dispersión Raman de los puentes disulfuro.

Para la señal de 643 cm<sup>-1</sup> observada en la figura 21, Han et al. (2009) han atribuido las vibraciones de la Tyr en su caracterización de dos glucoproteínas (ribonucleasa B y avidina). Keskin et al. (2013) también asignan dicha señal a la Tyr. Por otro lado, la frecuencia 826 cm<sup>-1</sup> podría interpretarse también como aporte de Tyr, según observaciones de Han et al. (2008) en la albúmina de suero bovino (ASB).

El pico cercano a 1001 cm<sup>-1</sup> ha sido caracterizado como Phe en espectros de lisozima (Han et al., 2009), ASB (Han et al., 2008), transferina sérica humana (Keskin et al., 2013) y en mezclas proteicas de saliva humana (Feng et al., 2015). Xu et al. (2014) atribuyen dicha señal a una combinación de la dispersión en Trp y Phe, para la lisozima.

Señales cerca de 1084 cm<sup>-1</sup> pueden confundirse con los estiramientos simétricos de los grupos PO<sub>2</sub><sup>-</sup> en el ADN (Morla et al., 2016). Sin embargo, se ha señalado como estiramientos del enlace C-N en las proteínas de saliva humana (Feng et al., 2015).

1176 cm<sup>-1</sup> ha correspondido a Tyr en ASB (Han et al., 2008) y transferina sérica humana (Keskin et al., 2013). Nguyen et al. (2017) han caracterizado la señal ubicada justamente a la izquierda de la barra de 1176 cm<sup>-1</sup> (figura 21) como vibraciones de Lys en una catalasa acuosa.

Espectros de lisozima mencionan que las vibraciones cercanas a 1214-1235 cm<sup>-1</sup> corresponden a amidas III (Xu et al., 2014). Otros estudios han demostrado que cerca de 1233 cm<sup>-1</sup> son amidas III como componentes de estructuras α-hélice (Han et al., 2009). Nguyen et al. (2017) destacan que 1239 cm<sup>-1</sup> se ha definido como amida III de láminas β en antígenos IgG. En los espectros de *K. pneumoniae* y *S. enterica* (figura 21) se puede observar que dicha señal se presenta un tanto gruesa, abarcando todo el intervalo mencionado anteriormente, por lo cual podría creerse que los dos tipos de amida III coexistieron en la muestra; sin embargo, se requeriría de un espectro mejor definido para realizar ese tipo de aseveración.

Alternativamente, Han et al. (2008) describen la señal de 1206-1214 cm<sup>-1</sup> como producto de vibraciones de Phe o Tyr en ASB, y 1403 cm<sup>-1</sup> como una banda débil del estiramiento del ión -COO<sup>-</sup>, la cual es observada concretamente en el espectro de *Salmonella enterica* (figura 21).

El pico prominente en los espectros de proteínas ( $\sim 727\text{ cm}^{-1}$ ) podría ser producto de un desplazamiento de la señal  $753\text{ cm}^{-1}$  (Trp, anexo 3) o bien, la respiración del anillo aromático de la adenina del ADN presente en la muestra. Como se observa en el cuadro 11, los extractos proteicos presentan una evidente absorbancia a  $260\text{ nm}$ , típica de las bases nitrogenadas en el ADN. Aunado a esto, dicho ADN está degradado (figura 19), por lo cual la fracción presente de adenina libre tiene gran probabilidad de vibrar con altas intensidades (Morla et al., 2016).

En cuanto a la calidad de los espectros SERS, se ha observado que las proteínas que poseen cromóforos (iones metálicos) quelatados (e.g. Hemoglobina y citocromo c) suelen obtener espectros SERS bastante definidos. Alternativamente, las que no poseen cromóforos han sido sumamente difíciles de analizar por SERS, ya que sus señales no difieren en gran medida con los obtenidos por la técnica de Raman convencional (Xu et al., 2014).

Por otra parte, Xu et al. (2014) mencionan que los espectros de proteínas utilizando AgNPs recubiertas con el ión yoduro ( $\text{I}^-$ ) constituyen una alternativa de caracterización SERS mucho más confiable. Esto se debe a varias razones, entre ellas la variación con el tiempo que presentan los espectros obtenidos con AgNPs sin dicho recubrimiento, debido a las interacciones fuertes entre Ag y proteínas. El método con  $\text{I}^-$  ayuda a reducir la interacción atómica de proteína-Ag y así, preserva la estructura nativa de las proteínas (Xu et al., 2014).

Es importante destacar que las proteínas son las que permiten la formación de los *hot spots*, debido a su papel como agente aglomerante, agentes como  $\text{I}^-$  solamente competirán por la superficie metálica, generando fuerzas de repulsión entre las partículas (Xu et al., 2014). Por otro lado, Han et al. (2009) mencionan que los iones yoduro pueden adherirse tan fuerte a la superficie metálica hasta reducir la interacción con las proteínas y, al mismo tiempo, impedir la formación de dichos los *hot spots*.

Todos los trabajos sobre SERS de proteínas mencionados anteriormente, han sido basados en proteínas individuales o mezclas simples solubles en agua. Actualmente, no existen investigaciones que realicen estudios a nivel de proteínas totales o insolubles en agua con AgNPs coloidales. Los métodos más cercanos a evaluaciones proteómicas por medio de SERS, con este tipo de sustratos metálicos, tampoco han logrado establecer protocolos de detección rutinarios y suficientemente sensibles (Huang et al., 2015). Es por esta razón, que la investigación a nivel de las proteínas totales realizada en este trabajo requiere afinarse, en busca de mejorar la interacción de todas las proteínas con las superficies metálicas. Esto se podría conseguir aplicando un tiempo de incubación antes de permitir el secado de las gotas, implementando métodos de solubilización libres de degradación proteica y con agentes poco interferentes en los espectros, y/o cambiando el método de síntesis de AgNPs buscando mejorar su interacción con las proteínas. De esta manera, se esperaría mejorar las intensidades del espectro.

Según Han et al. (2008), muchos estudios proteómicos combinan las técnicas electroforéticas y de espectrometría de masas para caracterizar a las proteínas de los organismos en estudio. Otras veces, los fragmentos separados por electroforesis son transferidos a una membrana de nitrocelulosa para ser analizados individualmente por métodos inmunológicos (Western Blot). Por su parte, se ha reportado que SERS es lo suficientemente sensible como para diferenciar dos tipos de insulina debido a un cambio en un par de aminoácidos, así como para detectar la unión de antígeno-anticuerpo. De esta manera, mezclar la separación por electroforesis, membranas de nitrocelulosa y la caracterización SERS de dichas membranas con AgNPs coloidales, han permitido a Han et al. (2008) establecer un método potencial para el análisis de las proteínas totales y los patrones de expresión en los organismos, que definen su proteoma.

## CONCLUSIONES

- Las bacterias en estudio son Gram-negativas y, se identificaron como *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella enterica*, mediante la secuenciación de los subconjuntos de las regiones hipervariables V1-V3 (350 pb) y V6-V9 (600 pb) del gen ADNr-16S.
- El método fenotípico del Biolog no funciona para determinar la identidad de las bacterias en estudio a nivel de especie. La identificación genotípica por medio del gen ADNr-16S, ofrece una alternativa más precisa.
- Los métodos de síntesis de AgNPs que evidenciaron la mejor actividad SERS en BPE fueron en el de Lee-Meisel, 1:4:0,1 y 1:2:0,1 al utilizar el láser de 633 nm.
- Las AgNPs sintetizadas por Lee-Meisel, demostraron mejor actividad SERS para el BPE conforme se aumentó el tiempo de reacción: 25 min < 30 min < 35 min.
- Las AgNPs sintetizadas por el método 1:4:0,1 (AgNO<sub>3</sub>:NaBH<sub>4</sub>:citrato), demostraron la mejor actividad SERS para el ADN genómico de *Klebsiella pneumoniae*. Además, revelaron un máximo de absorbancia en el rango 387-391 nm, con morfología esférica y un diámetro de 65 nm.
- Se lograron caracterizar las señales obtenidas en el BPE: 1012 cm<sup>-1</sup> (deformación del anillo aromático), 1201 cm<sup>-1</sup> (estiramiento de C-C y flexión C-H), 1233 cm<sup>-1</sup> (movimiento de tijera de C-H), 1606 cm<sup>-1</sup> (estiramiento del anillo aromático) y 1634 cm<sup>-1</sup> (estiramiento del etileno).
- En la extracción de ADN genómico, los tratamientos con ARNasa no evidenciaron diferencias a nivel del análisis electroforético; no obstante, la relación A260/A280 reveló que los 60 min de incubación resultaron con extractos de ADN significativamente más puros (p>0,05).
- Para ambas bacterias, la dilución 1:64 del ADN genómico presentó una pureza significativamente menor con respecto a la muestra sin diluir.
- Los espectros SERS promediados del ADN genómico demostraron una alta consistencia en la ubicación de sus señales, ancho de las bandas, e intensidades relativas. Para la región de la huella digital (500-1150 cm<sup>-1</sup>), la intensidad de la señal de respiración de anillo de A fue mayor que en las demás bases nitrogenadas, como se esperaba de acuerdo con la literatura.
- Se pudieron detectar las señales características del ADN a nivel de pocos nanogramos (>10 ng/μL) para las dos bacterias en estudio, sin modificaciones en los espectros.
- Se determinó que con concentraciones de ADN entre los 34,4 ng/μL y 235,1 ng/μL, se lograron espectros SERS bien definidos. Además, dicho rango fue el óptimo en cuanto a la facilidad de obtención de los mismos, lo que se podría traducir en términos de reproducibilidad. Concentraciones menores a 4 ng/μL presentaron espectros con señales modificadas y muy difíciles de reproducir.

- Los modos vibracionales del ADN en los espectros SERS de este trabajo corresponden a: 599  $\text{cm}^{-1}$  (G), 614  $\text{cm}^{-1}$  (desoxirribosa), 658  $\text{cm}^{-1}$  (dA y dG), 732  $\text{cm}^{-1}$  (A), 794  $\text{cm}^{-1}$  (C+T, esqueleto de azúcar- $\text{PO}_2^-$ ), 830  $\text{cm}^{-1}$  (desoxirribosa), 892  $\text{cm}^{-1}$  (desoxirribosa), 1082  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{PO}_2^-$ ), 1136  $\text{cm}^{-1}$  (dA), 1122  $\text{cm}^{-1}$  (dA), 1354  $\text{cm}^{-1}$  (dT, dG, dA), 1380  $\text{cm}^{-1}$  (dT, dG, dA), 1455  $\text{cm}^{-1}$  (desoxirribosa) y 1505  $\text{cm}^{-1}$  (dA).
- En cuanto a la extracción de proteínas, la SDS-PAGE demostró la presencia de bandas definidas en todo el rango de pesos moleculares según la migración del marcador Novex®; sin embargo, dicha técnica no funcionó para discriminar entre los dos métodos de extracción probados.
- La evaluación de la relación A260/A280, en los extractos de proteínas, reveló que la extracción fenólica obtuvo una pureza proteica significativamente mayor que la extracción con trizol ( $p > 0,05$ ). Por lo tanto, ajustar el pH a 8,0 con NaOH en la disolución de tris-fenol, permitió obtener extractos proteicos con relaciones de pureza aceptadas por la literatura.
- Las proteínas medidas en SERS correspondían a perfiles de proteínas totales bacterianas, con absorbancia definida en 280 nm y patrones de bandas característicos en la SDS-PAGE. Dichos extractos contenían una leve presencia de ADN contaminante.
- Los espectros SERS de proteínas totales obtenidos en este trabajo, presentaron intensidades bajas; sin embargo, fueron semejantes a los reportados en la literatura.
- Los modos vibracionales de las proteínas encontrados en estos espectros fueron los siguientes: 506  $\text{cm}^{-1}$  (Puente S-S), 643  $\text{cm}^{-1}$  (Phe), 826  $\text{cm}^{-1}$  (Tyr), 1001  $\text{cm}^{-1}$  (Phe, Trp), 1084  $\text{cm}^{-1}$  (C-N) 1176  $\text{cm}^{-1}$  (C-H), 1214-1235  $\text{cm}^{-1}$  (Phe y amida III) y 1403  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{COO}^-$ ). Para *Salmonella enterica* fue posible observar un pico pequeño cerca de 1622  $\text{cm}^{-1}$ , asignado como la vibración de amida I. También se encontró la presencia de la señal de ADN en 727  $\text{cm}^{-1}$ , la cual es posible que represente la vibración de A, por la leve contaminación con ADN.

## RECOMENDACIONES

- Se recomienda secuenciar fragmentos de 350-600 pb del gen ADN<sub>r</sub>-16S (V1-V3 o V6-V9) para identificar a las especies de *Klebsiella* y *Salmonella*.
- Incubar los complejos de ADN-AgNPs y proteínas-AgNPs por un tiempo aproximado de 3 h (mínimo 1 h), esperando aumentar las intensidades de las señales en la huella digital, según lo observado por Morla et al. (2016).
- Añadir, a los complejos ADN-AgNPs, una concentración final cercana a 0,01 M de NaCl, para aumentar la definición de las señales en 732 cm<sup>-1</sup>, 802 cm<sup>-1</sup>, 1004 cm<sup>-1</sup> y 1294 cm<sup>-1</sup>, según lo observado por Pramanik et al. (2016).
- Agregar iones sulfato a los complejos proteínas-AgNPs, para socavar el problema de la ausencia de señales. Los resultados con este método han evidenciado la presencia de los picos de amida I (1661 cm<sup>-1</sup>), amida III (1235 cm<sup>-1</sup>) y aminoácidos con residuos aromáticos como Phe (1005 cm<sup>-1</sup>), Trp (1557, 1342, 508 cm<sup>-1</sup>) y Tyr (856 cm<sup>-1</sup>).
- Probar el método de recubrimiento de AgNPs con el ión I<sup>-</sup>, buscando reducir la interacción atómica de proteína-Ag y así, preservar la estructura nativa de las proteínas.
- Estudiar y optimizar la síntesis de AgNPs adecuada al contexto de la interacción con proteínas, implementar métodos de solubilización libres de degradación proteica y con agentes poco interferentes en los espectros SERS.
- Para el análisis de proteínas totales con SERS, mezclar la separación por electroforesis y membranas de nitrocelulosa con las AgNPs coloidales, para estudiar los perfiles proteicos de acuerdo con el peso molecular y/o punto isoeléctrico de las proteínas.

## REFERENCIAS

- Agnihotri, S., Mukherji, S. y Mukherji, S. (2014). Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. *RSC Advances*, 4, 3974 y 3975. doi: 10.1039/C3RA44507K.
- Alam, M. y Ghosh, W. (2014). Optimization of a phenol extraction-based protein preparation method amenable to downstream 2DE and MALDI-MS based analysis of bacterial proteomes. *Proteomics*, 14, 216, 217, 219 y 220. doi: 10.1002/pmic.201300146.
- Barbas, C., Burton, D., Scott, J. y Silverman, G. (2001). Quantitation of DNA and RNA. Recuperado de: <http://cshprotocols.cshlp.org/content/2007/11/pdb.ip47.full>.
- Barhoumi, A., Zhang, D., Tam, F. y Halas, N. (2008). Surface-enhanced Raman spectroscopy of DNA. *Journal of the American Chemical Society*, 130(16). doi: 10.1021/ja800023j.
- Berg, J., Tymoczko, J., y Stryer, L. (2007). *Bioquímica* [Biochemistry] (J. Macarulla Trad.). (6th ed.). Barcelona, España: Reverté S.A.
- Biolog, Inc. (2006). OmniLog® ID System User Guide. Recuperado de: [http://www.ecologiemiobiennelyon.fr/IMG/pdf/OmniLog\\_ID\\_User\\_Guide.pdf](http://www.ecologiemiobiennelyon.fr/IMG/pdf/OmniLog_ID_User_Guide.pdf).
- Bosshard, P., Abels, R., Zbinden, E., Bottger, C. y Altwegg, M. (2003). Ribosomal DNA sequencing for identification of aerobic gram-positive rods in the clinical laboratory (an 18-month evaluation). *Journal of Clinical Microbiology*. 41, 4134-4137.
- Boye, K. y Hansen, D. (2003). Sequencing of 16S rDNA of *Klebsiella*: taxonomic relations within the genus and to other Enterobacteriaceae. *International Journal of Medical Microbiology*, 292, 496-498, 500 y 501.
- Bravo, A., González, C. y Le Borgne, S. (2012). Manual de prácticas de laboratorio de Biología Molecular. *Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa*. Recuperado de: [http://www.cua.uam.mx/pdfs/conoce/libroselec/Manual\\_de\\_Prcticas\\_de\\_BM.pdf](http://www.cua.uam.mx/pdfs/conoce/libroselec/Manual_de_Prcticas_de_BM.pdf).
- Cassar, R., Graham, D., Larmour, I., Wark, A. y Faulds, K. (2014). Synthesis of size tunable monodispersed silver nanoparticles and the effect of size on SERS enhancement. *Vibrational Spectroscopy*, 71, 45 y 46. doi: 10.1016/j.vibspec.2014.01.004.
- Ceuppens, S., De Coninck D., Botteldoorn, N., Van Nieuwerburgh, F. y Uyttendaele, M. (2017). Microbial community profiling of fresh basil and pitfalls in taxonomic assignment of enterobacterial pathogenic species based upon 16S rRNA amplicon sequencing. *International Journal of Food Microbiology*, 257. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.016.
- Chakravorty, S., Helb, D., Burday, M., Connell, N., Alland, D. (2007). A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 69, 338 y 339.
- Chen, L., Cai, L., Ruan, W. y Zhao, B. (2013). Surface-enhanced raman spectroscopy (SERS): Protein application. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, 3. doi:0.1002/9780470027318.a9277.
- Chevalier, F. (2010). Standard Dyes for Total Protein Staining in Gel-Based Proteomic Analysis. *Materials*, 3, 4784 y 4785. doi: 10.3390/ma3104784.
- ChunLab, Inc. (2017). 16S rRNA and 16S rRNA Gene Recuperado de: <http://help.bioiplug.com/16s-rrna-and-16s-rrna-gene/>.

- Clarridge, J. (2004). Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(4). doi: 10.1128/CMR.17.4.840-862.2004.
- Coico, R. (2005). Gram Staining. *Current Protocols in Microbiology*. doi: 10.1002/9780471729259.mca03cs00.
- De Moreno, M., Smith, J. y Smith, R. (1986). Mechanism Studies of Coomassie Blue and Silver Staining of Proteins. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 75(9), 907 y 910.
- Dina, N., Muntean, C., Leopold, N., Fălămaș, A., Halmagyi, A. y Coste, A. (2016). Structural Changes Induced in Grapevine (*Vitis vinifera* L.) DNA by Femtosecond IR Laser Pulses: A Surface-Enhanced Raman Spectroscopic Study. *Nanomaterials*, 6(6). doi: 10.3390/nano6060096.
- Dong, X., Ji, X., Wu, H., Zhao, L., Li, J., Yang, W. (2009). Shape Control of Silver Nanoparticles by Stepwise Citrate Reduction. *Journal of Physical Chemistry*, 113, 6573-6576. doi: 10.1021/jp900775b.
- Dong, W., Wang, T., Wang, F., Zhang, J. (2011). Simple, Time-Saving Dye Staining of Proteins for Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis Using Coomassie Blue. *PLoS ONE*, 6(8). doi: 10.1371/journal.pone.0022394.
- Driskell, J., Kwarta, K., Lipert, R., Porter, M., Neill, J. y Ridpath, J. (2005). Low-level detection of viral pathogens by a surface-enhanced Raman scattering based immunoassay. *Analytical Chemistry*. 2005, 77, 6147-6154.
- Era7 Information Technologies (2016). Full-length 16S taxonomic profiling with PacBio. Recuperado de: <https://era7bioinformatics.com/en/page.cfm?id=2716&title=full-lenght-16s-taxonomic-profiling-with-pacbio>.
- Faurobert, M., Pelpoir, E. y Chaib, J. (2007). Phenol extraction of proteins for proteomic studies of recalcitrant plant tissues. *Methods in Molecular Biology*, 355, 9-13. doi: 10.1385/1-59745-227-0:9.
- Feng, S., Huang, S., Lin, D., Chen, G., Xu, Y., Li, Y., Huang, Z., Pan, J., Chen, R. y Zeng, H. (2015). Surface-enhanced Raman spectroscopy of saliva proteins for the non invasive differentiation of benign and malignant breast tumors. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 541 y 544. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4298339/>.
- Fleischmann, M., Hendra, P. y McQuillan, A. (1974). Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. *Chemical Physics Letters*, 26, 163–164.
- Fodor, I., Valasek, A., Urbán, P., Kovács, M., Fekete, C. y Kerepesi, I. (2017). A comparative study on optimisation of protein extraction methods for *Saccharomonospora azurea*. *Acta Biologica Szegediensis*, 61(1), 45-48.
- Fong, K. y Yung, L. (2013). Localized Surface Plasmon Resonance: A Unique Property of Plasmonic Nanoparticles for Nucleic Acid Detection. *Nanoscale*, 5, 12069-12071.
- García, F. y Moreno, L. (2008). Plasmones superficiales. *Investigación y Ciencia*, 72-73.
- Georgiou, C., Grintzalis, K., Zervoudakis, G. y Papapostolou, I. (2008). Mechanism of Coomassie brilliant blue G-250 binding to proteins: a hydrophobic assay for nanogram quantities of proteins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391, 393. doi: 10.1007/s00216-008-1996-x.
- Giannella, R. (1996). *Salmonella*. Baron, S. (Ed.), Medical microbiology (4 ed.). Galveston, Texas: The University of Texas Medical Branch at Galveston. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8435/>.
- Gilbert, E., Yucebay, F., Malczynski, M., Smith, D., Esterly, J., Qi, C., Postelnick, M., McLaughlin, M. (2017). Use of Organism Identification by 16S Ribosomal RNA Polymerase Chain Reaction to

- Shorten Antimicrobial Length of Therapy. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 88(2), 2,3,6 y 7.
- Girel, K., Yantcevich, E., Arzumanyan, G., Doroshkevich, N. y Bandarenka, H. (2016). Detection of DNA molecules by SERS spectroscopy with silvered porous silicon as an active substrate. *Physica Status Solidi A*, 213(11), 2913-2914. doi: 10.1002/pssa.201600432.
- González, D., Palacios, N., Gallego, G. y Tohme, J. (1995). Protocolos para Marcadores Moleculares. Unidad de Investigación en Biotecnología, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. 70 pp.
- González-Fuenzalida, R., Moliner-Martínez, Y., Molins-Legua, C., Parada-Artigues, V., Verdú-Andrés, J. y Campins-Falco, P. (2016). New Tools for Characterizing Metallic Nanoparticles: AgNPs, A Case Study. *Analytical Chemistry*, 88, 1486. doi: 10.1021/acs.analchem.5b04751.
- Govindarajan, M., Kwon, S., Weon, H. (2007). Isolation, molecular characterization and growth-promoting activities of endophytic sugarcane diazotroph *Klebsiella* sp. GR9. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(7), 999 y 1003.
- Guentzel, M. (1996). *Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Citrobacter, and Proteus*. Baron, S. (Ed.), Medical microbiology (4 ed.). Galveston, Texas: The University of Texas Medical Branch at Galveston. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8035/>.
- Guerrini, L., Jurasekova, Z., Domingo, C., Perez, M., Leyton, P., Campos, M., Garcia, J. y Sanchez, S. (2007). Importance of metal-adsorbate interactions for the surface-enhanced Raman scattering of molecules adsorbed on plasmonic nanoparticles. *Plasmonics*, 2 (3), 147-156.
- Guerrini, L., Krpetic, Z., van Lierop, D., Alvarez-Puebla, R. y Graham, D. (2014). Direct Surface-Enhanced Raman Scattering Analysis of DNA Duplexes. *Angewandte Chemie International Edition*, 53, 1-6.
- Guo, F., Ju, F., Cai, L. y Zhang, T. (2013). Taxonomic precision of different hypervariable regions of 16S rRNA gene and annotation methods for functional bacterial groups in biological wastewater treatment. *PLoS One*, 8, e76185.
- Han, X., Huang, G., Zhao, B. y Ozaki, Y. (2009a). Label-Free Highly Sensitive Detection of Proteins in Aqueous Solutions Using Surface-Enhanced Raman Scattering. *Analytical Chemistry*, 81, 3330-3332. doi: 10.1021/ac900395x.
- Han, X., Jia, H., Wang, Y., Lu., Wang, C., Xu., W., Zhao, B. y Ozaki, Y. (2008). Analytical Technique for Label-Free Multi-Protein Detection Based on Western Blot and Surface-Enhanced Raman Scattering. *Analytical Chemistry*, 80, 2799-2803. doi: 10.1021/ac702390u.
- Han, X., Zhao, B. y Ozaki, Y. (2009b). Surface-enhanced raman scattering for protein detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 394, 1719-1722. doi:10.1007/s00216-009-2702-3.
- He, R., Liang, R., Peng, P. y Zhou, N. (2017). Effect of the size of silver nanoparticles on SERS signal Enhancement. *Journal of Nanoparticle Research*, 19(267), 1, 4-7. doi: 10.1007/s11051-017-3953-0.
- Hernández, E. (2013). *Estudios de estructura y función de las interacciones de la trombina con sustratos fisiológicos*. Disponible en Dipòsit Digital de la Universitat de Barcelona.
- Hellberg, R., Haney, C., Shen, Y., Cheng, C., Williams-Hill, D. y Martin, D. (2012). Development of a custom 16S rRNA gene library for the identification and molecular subtyping of *Salmonella enterica*. *Journal of Microbiological Methods*, 91, 448, 449 y 459. doi: 10.1016/j.mimet.2012.09.018.

- Huang, Y., Gu, J., Xiang, G., Xu, J., Fu, S. y Gong, H. (2015). Detection of total protein in milk using phosphomolybdic acid-mediated surface-enhanced Raman spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy*, 47, 277 y 278. doi: 10.1002/jrs.4812.
- Jiang, X., Jiang, Z., Xu, T., Su, S., Zhong, Y., Peng, F., Su, Y. y He, Y. (2013). Surface-enhanced raman scattering-based sensing in vitro: Facile and label-free detection of apoptotic cells at the single-cell level. *Analytical Chemistry*, 85, 2809-2810.
- Johnson, M. (2012). Protein Quantitation. *Materials and Methods*, 12(115). doi: 10.13070/mm.en.2.115.
- Kabir, A. y Kumar, G. (2013) Binding of the Biogenic Polyamines to Deoxyribonucleic Acids of Varying Base Composition: Base Specificity and the Associated Energetics of the Interaction. *PLoS ONE*, 8(7).
- Kattar, M., Chavez, J., Limaye, A., Rassoulilian-Barrett, S., Yarfitz, S., Carlson, L., Houze, Y., Swanzy, S., Wood, B. y Cookson, B. (2001). Application of 16S rRNA gene sequencing to identify *Bordetella hinzii* as the causative agent of fatal septicemia. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(2).
- Keskin, S., Efeoglu, E., Kececi, K. y Culha, M. (2013). Label-free detection of proteins in ternary mixtures using surface-enhanced Raman scattering and protein melting profiles. *Journal of Biomedical Optics*, 18(3), 037007-6. doi: 10.1117/1.JBO.18.3.037007.
- Kneipp, K. y Kneipp, H. (2006). Single molecule Raman scattering. *Applied Spectroscopy*. 60, 322A–34A.
- Kumar, P., Brooker, M., Dowd, S., Camerlengo, T. (2011). Target region selection is a critical determinant of community fingerprints generated by 16S pyrosequencing. *PLoS One*, 6, e20956.
- Kuncham, R., Sivaprakasam, T., Kumar, P., Sreenath, P., Nayak, R., Thayumanavan, T., Subba, G. (2017). Bacterial fauna associating with chironomid larvae from lakes of Bengaluru city, India - A 16s rRNA gene based identification. *Genomics Data*, 12, 46.
- Kurouski, D., Postiglione, T., Deckert-Gaudig, T., Deckert, V. y Lednev, I. (2013). Amide I vibrational mode suppression in surface (SERS) and tip (TERS) enhanced Raman spectra of protein specimens. *Analyst*, 138(6), 1672–1673.
- Lahr, R., Wallace, G. y Vikesland, P. (2015). Raman characterization of nanoparticle transport in Microfluidic paper-based analytical devices ( $\mu$ PADs). *ACS Applied Materials & Interfaces*, 7(17), 9139-9140. doi:10.1021/acsami.5b01192.
- Laing, S., Gracie, K. y Faulds, K. (2016). Multiplex *in vitro* detection using SERS. *Chemical Society Reviews*, 45(7). doi: 10.1039/C5CS00644A.
- Lee, F. y Lo, S. (2008). The use of Trizol reagent (phenol/guanidine isothiocyanate) for producing high quality two-dimensional gel electrophoretograms (2-DE) of dinoflagellates. *Journal of Microbiological Methods*, 73, 31 y 32.
- Lee, P. y Meisel, D. (1982). Adsorption and surface-enhanced raman of dyes on silver and gold sols. *Journal of Physical Chemistry*, 86, 3391-3392.
- Li, H. y Xu, D. (2014). Silver nanoparticles as labels for applications in bioassays. *Trends in Analytical Chemistry*, 61, 6772.
- Li, B., Zhao, Y., Lui, C., Chen, Z. y Zhou, D. (2014). Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. *Future Microbiology*, 9(9), 1071. doi: 10.2217/fmb.14.48.
- López-Ramírez, M., Arenas, J., Otero, J. y Castro, J. (2004). Surface-enhanced Raman scattering of D-penicillamine on silver colloids. *Journal of Raman Spectroscopy*, 35(5), 393 y 394.

- Lu, Q., Lang, T., Fan, S., Chen, W., Zang, D., Chen, J. y Shi, M. (2015). Analysis of genomic DNAs from nine rosaceae species using surface-enhanced raman scattering. *Applied Spectroscopy*, 69(12) doi:10.1366/14-07552.
- Malafaia, C., Guerra, M., Silva, T., Paiva, P., Souza, E., Correia, M. y Silva, M. (2015). Selection of a protein solubilization method suitable for phytopathogenic bacteria: a proteomics approach. *Proteome Science*, 13(5), 2-4. doi: 10.1186/s12953-015-0062-9.
- Malt, L., Perrett, C., Humphrey, S. y Jepson, M. (2015). Applications of Microscopy in Salmonella Research. Schatten, H. y Eisenstark, A. (Eds.), *Salmonella Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology*, 1225, 165-167. doi:10.1007/978-1-4939-1625-2\_12.
- Mandair, G. y Morris, M. (2015). Contributions of Raman spectroscopy to the understanding of bone strength. *BoneKey Reports*, 4(620), 2. doi: 10.1038/bonekey.2014.115.
- Mathews, C., Van Holde, K., Appling, D. y Anthony-Cahill, S. (2013) Bioquímica (4 ed). PEARSON EDUCACIÓN, S.A. Madrid, España.
- Matlock, B. (2015). Assessment of Nucleic Acid Purity. Thermo Fisher Scientific Inc. Recuperado de: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/TN52646-E-0215M-NucleicAcid.pdf>.
- Mehr, F., Khanjani, M. y Vatani, P. (2015). Synthesis of Nano-Ag particles using Sodium Borohydride. *Oriental Journal of Chemistry*, 31(3), 1832. doi: 10.13005/ojc/31036.
- Mitchell, B. (2009). Nucleic acid and protein quantitation methods. Turner Biosystems. Recuperado de: <https://www.promega.com/-/media/files/products-and-services/instruments/detection/tbs-technical-support-docs/dna-rna-080409.pdf?la=en>.
- Morgan, M., Boyette, M., Goforth, C., Sperry, K. y Greene, S. (2009). Comparison of the Biolog OmniLog Identification System and 16S ribosomal RNA gene sequencing for accuracy in identification of atypical bacteria of clinical origin. *Journal of Microbiological Methods*, 79, 336, 337, 339 y 342.
- Morla, J., Alvarez, R. y Guerrini, L. (2016). Direct quantification of DNA base composition by surface-enhanced ramanscattering spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 7(15) doi:10.1021/acs.jpcclett.6b01424.
- Muntean, C., Leopold, N., Halmagyi, A. y Valimareanu, S. (2011). Surface-enhanced Raman spectroscopy of genomic DNA from *in vitro* grown plant species. *Journal of Raman Spectroscopy*, 42, 1925-1926. doi: 10.1002/jrs.2941.
- Muntean, C., Leopold, N., Halmagyi, A. y Valimareanu, S. (2013). Surface-enhanced Raman scattering assessment of DNA from leaf tissues adsorbed on silver colloidal nanoparticles. *Journal of Raman Spectroscopy*, 44(6), 817, 818 y 821. doi: 10.1002/jrs.4265.
- Muntean, C., Leopold, N., Tripon, C., Coste, A. y Halmagyi, A. (2015). Surface-enhanced Raman spectroscopy of genomic DNA from *in vitro* grown tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars before and after plant cryopreservation. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 144, 108-112. doi: doi: 10.1016/j.saa.2015.02.085.
- Negri, P., Sarver, S., Schiavone, N., Dovichi, N. y Schultz, Z. (2015). Online SERS detection and characterization of eight biologically-active peptides separated by capillary zone electrophoresis. *Analyst*, 140, 1517 y 1520. doi: 10.1039/c4an01980f.
- New England Biolabs (2017). PCR Protocol for *Taq* DNA Polymerase with Standard *Taq* Buffer (M0273). Recuperado de: <https://www.neb.com/protocols/1/01/01/taq-dna-polymerase-with-standard-taq-buffer-m0273>.

- Nguyen, A., Peters, E y Schultz, Z. (2017). Bioanalytical applications of surface-enhanced Raman spectroscopy: de novo molecular identification. *Reviews in Analytical Chemistry*, ISSN (Online), 8-11. doi: 10.1515/revac-2016-0037.
- Novogene Corporation (2017). Sample Preparation and Shipping. Recuperado de: <https://en.novogene.com/support/sample-preparation/>.
- Olivares-Amaya, R., Rappoport, D., Munoz, P., Peng, P., Mazur, E. y Aspuru-Guzik, A. (2012). Can Mixed-Metal Surfaces Provide an Additional Enhancement to SERS? *Journal of Physical Chemistry*, 116, 15570 y 15571. doi: 10.1021/jp302597v.
- Panikkanvalappil, S., Mackey, M. y El-Sayed, M. (2013). Probing the Unique Dehydration-Induced Structural Modifications in Cancer Cell DNA Using Surface Enhanced Raman Spectroscopy. *Journal of the Analytical Chemistry Society*, 135 (12), 4815–4819. doi: 10.1021/ja400187b.
- Panikkanvalappil, S., Mahmoud, M., Mackey, M. y El-Sayed, M. (2013). Surface-Enhanced Raman Spectroscopy for RealTime Monitoring of Reactive Oxygen Species-Induced DNA Damage and Its Prevention by Platinum Nanoparticles. *ACS Nano*, 7(9), 7524–7526. doi: 10.1021/nn403722x.
- Park, H., Joo, J., Kim, H. y Lee, J. (2012). Shape-Dependent Reversible Assembly Properties of Polyvalent DNA-Silver Nanocube Conjugates. *Journal of Physical Chemistry C*, 116, 2278-2284.
- Peck, M. y Badrick, T. (2017). A review of contemporary practice and proficiency with Gram staining in anatomical pathology laboratories. *Journal of Histotechnology*, 40(2), 1. doi: 10.1080/01478885.2017.1327474.
- Pinheiro, A., Han, D., Shih, W. y Yan, H. (2011). Challenges and Opportunities for Structural DNA Nanotechnology. *Nature Nanotechnology*, 6, 771-772.
- Porterfield, J. y Zlotnick, A. (2010). A simple and general method for determining the protein and nucleic acid content of viruses by UV absorbance. *Virology*, 407(2). doi: 10.1016/j.virol.2010.08.015.
- Pramanik, S., Chatterjee, S., Saha, A., Devi, P. y Kumar, G. (2016). Unraveling the interaction of silver nanoparticles with mammalian and bacterial DNA. *Journal of Physical Chemistry B*, 120(24), 5313-5321. doi:10.1021/acs.jpcc.6b01586.
- Promega Corporation (2016). GoTaq® DNA Polymerase. Usage Information. Recuperado de: <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/product-information-heets/g/gotaq-dna-polymerase-m300.pdf>.
- Promega Corporation (2017). Wizard® Genomic DNA Purification Kit. Technical Manual. Madison WI, E.E.U.U.
- Puerta- García, A. y Mateos-Rodríguez, F. (2010). Enterobacterias. *Medicine*, 10(51), 3426 y 3429.
- Reddy, P. y Raju, N. (2012). Gel-electrophoresis and its applications. En S. Magdeldin (Ed.), *Gel electrophoresis - principles and basics* (pp. 20, 21) Intech Open Science. doi:10.5772/38479. Recuperado de: <https://www.intechopen.com/books/gel-electrophoresis-principles-and-basics/gel-electrophoresis-and-its-applications>.
- Sacchi, C., Alber, D., Dull, P., Mothershed, E., Whitney, A., Barnett, G., Popovic, T. y Mayer, L. (2005). High level of sequence diversity in the 16S rRNA genes of *Haemophilus influenzae* isolates is useful for molecular subtyping. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 3741 y 3742.
- Sant'Ana, Rocha, Santos, Zanchet y Temperini (2009). Size-dependent SERS enhancement of colloidal silver nanoplates: the case of 2-amino-5-nitropyridine. *Journal of Raman Spectroscopy*, 40, 183, 184, 188 y 189. doi: 10.1002/jrs.2103.
- Sekhar, A., Movasaghi, Z., Rehman, S. y Rehman, I. (2014). Raman spectroscopy of biological tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*, 4-5. doi:10.1080/05704928.2014.923902.

- Shi, M., Zheng, J., Tan, Y., Tan, G., Li, J., Li, Y., Li, X., Zhou, Z. y Yang, R. (2015). Ultrasensitive detection of single nucleotide polymorphism in human mitochondrial DNA utilizing ion-mediated cascade SurfaceEnhanced raman spectroscopy Amplification. *Analytical Chemistry*, 87(5), 2734-2735.
- Sutton, S. (2006). The Gram Stain. Recuperado de: <http://www.microbiol.org/resources/monographswhite-papers/the-gram-stain/>.
- Tan, S. y Yiap, B. (2009). DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 8. doi: 10.1155/2009/574398.
- Tecan (2014). High throughput DNA quantification and quality checks for low volume samples. Recuperado de: [https://www.ozyme.fr/gammes/tec/pdf/tec\\_dna\\_quantification\\_note\\_appli.pdf](https://www.ozyme.fr/gammes/tec/pdf/tec_dna_quantification_note_appli.pdf).
- Thermo Fisher Scientific Inc. (2012). NanoDrop Lite. Thermo Scientific NanoDrop Products, User Guide. Recuperado de: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/User-Guide-2752-NanoDrop-Lite-UG.pdf>.
- Thermo Scientific (2012). Interpretation of Nucleic Acid 260/280 Ratios. T123 – Technical Bulletin. Recuperado de: [http://www.mgp.cz/files/nanodrop/manualy/pomer\\_cistoty.pdf](http://www.mgp.cz/files/nanodrop/manualy/pomer_cistoty.pdf).
- Torres-Nuñez, A., Faulds, K., Graham, D., Alvarez-Puebla, R. y Guerrini, L. (2016). Silver Colloids as Plasmonic Substrates for Direct Label-free Surface-enhanced Raman Scattering Analysis of DNA. *Analyst*, 141, 1-13. doi:10.1039/C6AN00911E.
- Vo-Dinh, T., Fales, A., Griffin, G., Khoury, C., Liu, Y., Ngo, H., Norton, S., Register, J., Wang, H. y Yuan, H. (2013). Plasmonic Nanoprobes: From Chemical Sensing to Medical Diagnostics and Therapy. *Nanoscale*, 5, 10138-10140.
- Wan, Y., Guo, Z., Jiang, X., Fang, K., Lu, X., Zhang, Y., y Gu, N. (2012). Quasi-spherical silver nanoparticles: Aqueous synthesis and size control by the seed-mediated Lee–Meisel method. *Journal of Colloid and Interface Science*, 394(2013), 263264.
- Wang, C. y Yu, C. (2015). Analytical characterization using surface-enhanced raman scattering (SERS) and microfluidic sampling. *Nanotechnology*, 26 (9) doi:10.1088/0957-4484/26/9/092001.
- WHO (2017). WHO's first ever global estimates of foodborne diseases find children under 5 account for almost one third of deaths. Recuperado de: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/foodborne-disease-estimates/en/>.
- Wilck, M., Wu, Y., Howe, J., Crouch, J. y Edberg, S. (2001). Endocarditis caused by culture-negative organisms visible by Brown and Brenn staining: utility of PCR and DNA sequencing for diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(5).
- Wragg, P., Randall, L. y Whatmore, A. (2014). Comparison of Biolog GEN III MicroStation semi-automated bacterial identification system with matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and 16S ribosomal RNA gene sequencing for the identification of bacteria of veterinary interest. *Journal of Microbiological Methods*, 105, 17 y 20.
- Xu, L., Zong, C., Zheng, X., Hu, P., Feng, J. y Ren, B. (2014). Label-free detection of native proteins by surface-enhanced raman spectroscopy using iodide-modified nanoparticles. *Analytical Chemistry*, 86, 2238-2244. doi:10.1021/ac403974n.
- Xu, L., Lei, Z., Li, J., Zong, C., Yang, C. y Ren, B. (2015). Label-free Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Detection of DNA with Single-base Sensitivity. *Journal of the American Chemical Society*, 137(15), 5152–5153. doi: 10.1021/jacs.5b01426.
- Yang, X., Gu, C., Qian, F., Li, Y. y Zhang, J. (2011). Highly Sensitive Detection of Proteins and Bacteria in Aqueous Solution Using Surface-Enhanced Raman Scattering and Optical Fibers. *Analytical Chemistry*, 83, 5889-5891. doi: 10.1021/ac200707t.

- Yang, B., Wang, Y. y Qian, P. (2016). Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics*, 17(135), 3. doi: 10.1186/s12859-016-0992-y.
- Yu, X., Xu, D. y Cheng, Q. (2006). Label-free detection methods for protein microarrays. *Proteomics*, 6, 5494. doi: 10.1002/pmic.200600216.
- Zhang, Z., Wen, Y., Ma, Y., Luo, J., Jiang, L. y Song, Y. (2011). Mixed DNA-functionalized nanoparticle probes for surface-enhanced Raman scattering-based multiplex DNA detection. *Chemical Communications*, 47, 7407. doi:10.1039/c1cc11062d.
- Zhou, H., Yang, D., Ivleva, N., Mircescu, N., Niessner, R. y Haisch, C. (2014). SERS Detection of Bacteria in Water by In Situ Coating with Ag Nanoparticles. *Analytical Chemistry*, 86(3), 1529-1530. doi: 10.1021/ac402935p
- Zhuang, Z., Shi, X., Chen, Y. y Zuo, M. (2011). Surface-enhanced Raman scattering of trans-1,2-bis(4-pyridyl)-ethylene on silver by theory calculations. *Spectrochimica Acta Part A*, 79, 1597. doi: 10.1016/j.saa.2011.05.017.

## ANEXOS

**Anexo 1.** Distribución volumétrica para las reacciones de síntesis de AgNPs por el método de NaBH<sub>4</sub> con citrato como estabilizante.

Proporción molar (AgNO <sub>3</sub> :NaBH <sub>4</sub> :Citrato)	Volumen total aproximado de reacción (mL)	Volumen de H <sub>2</sub> O	AgNO <sub>3</sub> 0,02 mol/L (μL)	Citrato de sodio 0,25% m/v (μL)	NaBH <sub>4</sub> 0,02 mol/L (μL)
1:2 :0,01	20	(16,00±0,05) mL + 979 μL	1000	21	2000
1:2:0,05	20	(16,00±0,05) mL + 895 μL	1000	105	2000
1:2:0,1	20	(16,00±0,05) mL + 795 μL	1000	205	2000
1:2:0,5	20	(15,00±0,05) mL + 970 μL	1000	1032	2000
1:4:0,01	20	(14,00±0,05) mL + 979 μL	1000	21	4000
1:4:0,05	20	(14,00±0,05) mL + 895 μL	1000	105	4000
1:4:0,1	20	(14,00±0,05) mL + 795 μL	1000	205	4000
1:4:0,5	20	(13,00±0,05) mL + 970 μL	1000	1032	4000

**Anexo 2.** Rangos de frecuencia seleccionados y su intensidad relativa para la construcción del código de barras de ADN. Esta información fue filtrada del apéndice 6.

Rango de frecuencia (cm <sup>-1</sup> )	Asignación vibracional	Intensidad relativa
599	G	baja
613-614	desoxirribosa	baja o media
625-658	dA y dG	media o baja
726-750	A	media o alta
784-802	C+T y esqueleto azúcar-PO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	media
829-943	desoxirribosa	media o baja
1082-1115	PO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	alta, media o baja
1088-1136	dA	baja
1170	dC	media
1170-1199	dA, dG	baja o media
1200-1250	A, C, T	baja o media
1294	PO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	alta
1325-1329	A	media
1354-1404	dT, dG, dA	alta o baja
1423-1464	desoxirribosa	media o baja
1505-1511	dA	media

1576-1577  
1622-1655

G  
dT, C=O, C=C

media  
media o alta

**Anexo 3.** Rangos de frecuencia seleccionados y su intensidad relativa para la construcción del código de barras de proteínas. Esta información fue filtrada del apéndice 7.

Frecuencias (cm <sup>-1</sup> )	Asignación vibracional
753	Trp
1004	
1508	
1549-1557	
1608	
643	Tyr
826	
1214	
1608	
643	Phe
1001	
1033	
1214	
935	Pro
1084	C-N
1622	Amida I
1235	Amida III
1290	
503-506	Puente S-S
1403	COO-
1176	CH

**Anexo 4.** Fragmento del alineamiento múltiple para la construcción de los dendrogramas. \* indica coincidencia nucleotídica entre todas las secuencias alineadas, - es un gap.

```

Bacillus_pumilus_Proyecto_Raman_1492r      -----CATCCTCTGACAACCCCTAGAGATAGGGCTTTNCCTTCGGGGACAGAGTGA
Bacillus_pumilus_1492r_BASEDATOS           CAGGTCCTTGACATCCTCTGACAACCCCTAGAGATAGGGCTTTCCCTTCGGGGACAGAGTGA
Escherichia_coli_1492r                     CTGGTCTTGACATCCACGGAAGTTTTTCAGAGATGAGAATGTGCCTTCGGGAACCGTGAGA
Shigella_dysenteriae_1492r                 CTGGTCTTGACATCCACGGAAGTTTTTCAGAGATGAGAATGTGCCTTCGGGAACCGTGAGA
Salmonella_enterica_1492r                  CTGGTCTTGACATCCACAGAAGAATCCAGAGATGGATTGTGCCTTCGGGAACCGTGAGA
Klebsiella_pneumoniae_1492r                CTGGTCTTGACATCCACAGAAGTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCGTGAGA
Citrobacter_freundii_1492r                  CTACTCTTGACATCCAGAGAAGTTAGCAGAGATGCTTTGGTGCCTTCGGGAACCGTGAGA
Enterobacter_aerogenes_1492r                CTACTCTTGACATCCAGAGAAGTTAGCAGAGATGCTTTGGTGCCTTCGGGAACCGTGAGA
Serratia_marcescens_1492r                   CTACTCTTGACATCCAGAGAAGTTNNCAGAGATGNNTTGGTGCCTTCGGGAACCGTGAGA
Yersinia_pestis_1492r                       CTACTCTTGACATCCACAGAATTTGGCAGAGATGCTAAAGTGCCTTCGGGAACCGTGAGA
Proteus_mirabilis_1492r                     CTACTCTTGACATCCACGGAATCCTTTAGAGATAGAGGAGTGCCTTCGGGAACCGTGAGA
*****  **      *          *          *          *          *          *

```

```

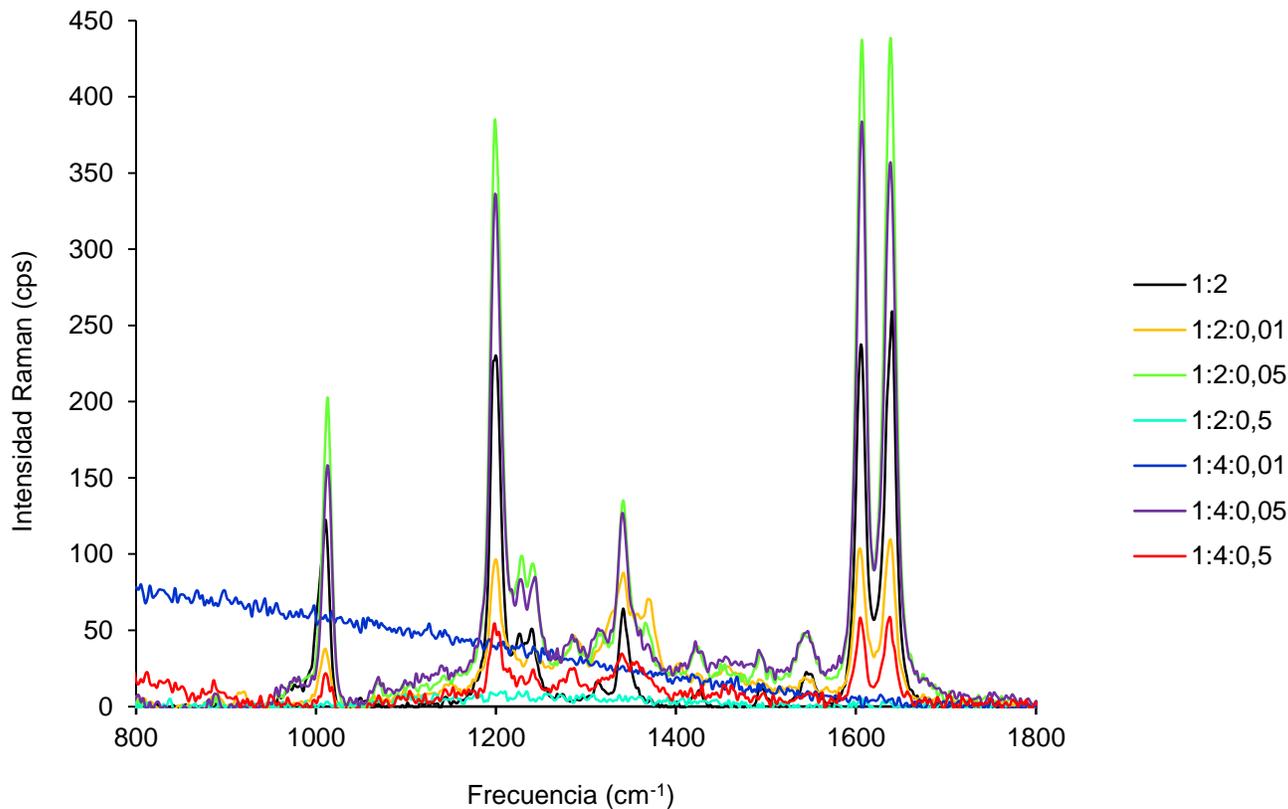
Bacillus_pumilus_Proyecto_Raman_27f      GGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTC AAGG
Bacillus_pumilus_27f_BASEDATOS           GGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTC AAGG
Proteus_mirabilis_27f                    GGATAACTACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAATGTCTACGGAC-----CAA A
Yersinia_pestis_27f                      GGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATGACCTCGCAAGAG-----CAA A
Serratia_marcescens_27f                  GGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGAC-----CAA A
Salmonella_enterica_27f                  GGATAACTACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGAC-----CAA A
Klebsiella_pneumoniae_27f                GGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAATGTCTGCAAGAC-----CAA A
Enterobacter_aerogenes_27f              GGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGAC-----CAA A
Citrobacter_freundii_27f                 GGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGAC-----CAA A
Escherichia_coli_27f                     GGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGAC-----CAA A
Shigella_dysenteriae_27f                 GGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGAC-----CAA A
***** * ***** * ***** * *

```

**Anexo 5.** Similaridad y distancia estadística con la base de datos GEN III de las especies probables en la identificación fenotípica de las dos bacterias en estudio.

Identidad por ADNr 16S	SIM (Biolog)	DIST (Biolog)	Especies probables (Biolog)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,302	6,578	<i>Klebsiella oxytoca</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,210	6,839	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ss <i>pneumoniae</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,076	7,528	<i>Rahnella aquatilis</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,021	8,399	<i>Enterobacter aerogenes</i> ( <i>Klebsiella mobilis</i> )
<i>Salmonella enterica</i>	0,162	8,000	<i>Raoultella planticola</i>
<i>Salmonella enterica</i>	0,135	8,129	<i>Salmonella enterica</i> (gp1) ST <i>typhimurium</i>
<i>Salmonella enterica</i>	0,130	8,155	<i>Salmonella enterica</i> (gp1)
<i>Salmonella enterica</i>	0,121	8,206	<i>Citrobacter freundii</i>

**Anexo 6.** Espectros Raman obtenidos en los métodos de síntesis de AgNPs por reducción con  $\text{NaBH}_4$  y  $\text{NaBH}_4$  con citrato estabilizante.



**Anexo 7.** Distribución de tamaños de partículas obtenidos para las mediciones de las muestras en el zetasizer.

Muestra de AgNPs	Pico	Medida	Porcentaje de abundancia	Diámetro de partículas (nm)
1:4:0,1	1	1	65,8	62,75
		2	67,4	64,91
		3	66,7	65,34
		4	67,5	67,04
		5	71,4	63,8
		6	66,8	66,31
		7	72,6	64,93
		8	69,5	63,13
		9	63,8	70,84
		10	66,1	64,95
	2	1	32,5	5,951
		2	32,6	5,705
		3	33,3	5,789
		4	32,5	5,697
		5	28,6	5,298
		6	33,2	5,667



	7	27,4	4,767
	8	30,5	5,218
	9	36,2	7,018
	10	33,9	6,079
	1	1,7	1,532
	2	0,0	0,000
	3	0,0	0,000
	4	0,0	0,000
3	5	0,0	0,000
	6	0,0	0,000
	7	0,0	0,000
	8	0,0	0,000
	9	0,0	0,000
	10	0,0	0,000
	1	62,6	59,24
	2	62,0	67,21
	3	64,2	63,33
	4	63,0	68,18
1	5	63,0	61,81
	6	62,5	64,98
	7	61,8	63,29
	8	59,0	65,87
	9	59,7	66,87
	10	62,1	62,66
	1	37,4	4,955
	2	38,0	5,675
	3	35,8	5,253
	4	37,0	4,974
2	5	34,3	5,349
	6	37,5	5,456
	7	34,7	5,403
	8	41,0	5,824
	9	40,3	5,899
	10	37,9	5,196
	1	0,0	0,000
	2	0,0	0,000
	3	0,0	0,000
	4	0,0	0,000
3	5	2,6	1,449
	6	0,0	0,000
	7	3,5	1,370
	8	0,0	0,000
	9	0,0	0,000

Lee-Meisel	1	10	0,0	0,000			
		1	85,7	71,07			
		2	83,8	84,06			
		3	87,4	68,98			
		4	87,7	70,72			
		5	76,3	70,90			
		6	84,8	78,17			
		7	83,8	73,97			
		8	83,3	77,24			
		9	81,4	74,73			
	10	81,6	76,97				
	2	1	11,9	5,524			
		2	8,5	4,076			
		3	12,6	5,504			
		4	11,1	4,570			
		5	12,9	21,23			
		6	8,8	4,333			
		7	16,2	6,271			
		8	12,3	6,483			
		9	11,3	5,262			
		10	8,8	4,725			
	3	1	2,4	4673			
		2	7,7	15,27			
		3	0,0	0,000			
		4	1,2	4600			
		5	10,8	4,714			
		6	6,4	10,42			
		7	0,0	0,000			
		8	3,0	4496			
		9	7,3	4460			
10		7,9	12,34				

**Anexo 8.** Concentración y pureza de las muestras de ADN en los tres tratamientos con ARNasa.

Muestra de ADN genómico	Repetición de la medición	[ng/μL]	Promedio [ng/μL]	Desviación estándar	A260/280	Promedio A260/A280	Desviación estándar
K-1	1	298,8	296,8	1,7	1,82	1,83	0,006
	2	295,5			1,83		
	3	296,2			1,83		
K-2	1	238,9	239,0	0,6	1,86	1,86	0,000
	2	239,6			1,86		
	3	238,4			1,86		
K-3	1	167,7	165,3	2,2	1,76	1,76	0,006

		2	163,3			1,75		
		3	164,9			1,76		
		1	70,8			1,86		
S-1		2	70,3	70,4	0,4	1,86	1,86	0,000
		3	70,1			1,86		
		1	104,1			1,85		
S-2		2	104,4	104,2	0,2	1,84	1,84	0,006
		3	104,1			1,84		
		1	114,3			1,81		
S-3		2	118,0	116,4	1,9	1,81	1,82	0,012
		3	116,9			1,83		
Control Negativo		-	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00	0,000

**Anexo 9.** Concentración y pureza en las muestras de ADN para las mediciones SERS.

Muestra de ADN genómico	Repetición de la extracción	Repetición de la medición	[ng/μL]	Promedio [ng/μL]	Desviación estándar	A260/280	Promedio A260/A280	Desviación estándar
		1	240,2			1,87		
K-3	1	2	243,5	243,3	3,0	1,87	1,87	0,006
		3	246,1			1,88		
		1	287,5			1,87		
K-3	2	2	281,3	284,7	3,2	1,87	1,87	0,000
		3	285,4			1,87		
		1	237,2			1,85		
K-3	3	2	232,5	235,1	2,4	1,86	1,85	0,006
		3	235,7			1,85		
		1	134,4			1,84		
S-3	1	2	133,5	135,9	3,4	1,84	1,83	0,023
		3	139,7			1,80		
		1	149,1			1,86		
S-3	2	2	151,1	149,8	1,1	1,85	1,86	0,006
		3	149,2			1,86		
		1	139,9			1,85		
S-3	3	2	139,4	140,0	0,6	1,85	1,85	0,006
		3	140,6			1,84		
Control Negativo	-	-	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00	0,000

**Anexo 10.** Concentración y pureza en las diluciones de ADN de *Klebsiella pneumoniae* para las mediciones SERS.

Muestra de ADN genómico	Dilución	Repetición de la medición	[ng/μL]	Promedio [ng/μL]	Desviación estándar	A260/280	Promedio A260/A280	Desviación estándar
K-3-3	1:2	1	110,8	110,9	0,1	1,84	1,84	0,006
		2	110,8			1,84		
		3	111,0			1,83		
K-3-3	1:4	1	54,4	55,7	1,5	1,80	1,81	0,012
		2	55,5			1,80		
		3	57,3			1,82		
K-3-3	1:8	1	27,1	27,6	1,3	1,78	1,83	0,050
		2	29,1			1,88		
		3	26,7			1,84		
K-3-3	1:16	1	13,8	14,3	0,5	1,85	1,83	0,044
		2	14,8			1,78		
		3	14,4			1,86		
K-3-3	1:32	1	6,8	7,5	0,7	1,88	1,90	0,017
		2	7,6			1,91		
		3	8,2			1,91		
K-3-3	1:64	1	2,6	2,6	0,3	1,65	1,61	0,112
		2	2,3			1,48		
		3	2,9			1,69		
Control Negativo	-	-	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00	0,000

**Anexo 11.** Concentración y pureza en las diluciones de ADN de *Salmonella enterica* para las mediciones SERS.

Muestra de ADN genómico	Dilución	Repetición de la medición	[ng/μL]	Promedio [ng/μL]	Desviación estándar	A260/280	Promedio A260/A280	Desviación estándar* (x2)
S-3-1	1:2	1	60,8	60,7	0,5	1,83	1,84	0,012
		2	60,2			1,85		
		3	61,2			1,85		
S-3-1	1:4	1	37,2	34,4	2,5	1,85	1,84	0,017
		2	32,6			1,85		
		3	33,4			1,82		
S-3-1	1:8	1	17,1	17,3	0,8	1,82	1,82	0,006
		2	16,6			1,82		
		3	18,1			1,83		
S-3-1	1:16	1	8,4	8,5	0,1	1,87	1,82	0,045

		2	8,6			1,78		
		3	8,4			1,82		
		1	4,1			1,95		
S-3-1	1:32	2	4,0	3,9	0,3	1,86	1,84	0,116
		3	3,6			1,72		
		1	1,2			2,03		
S-3-1	1:64	2	1,7	1,6	0,3	1,56	1,67	0,320
		3	1,8			1,42		
Control Negativo	-	-	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00	0,000

## APÉNDICES

**Apéndice 1.** Distribución volumétrica en la preparación de los geles de poliacrilamida, separador y de montaje.

Componente*	Volumen añadido para gel separador	Volumen añadido para gel de montaje
Agua destilada	0,35 mL	1,575 mL
Acrilamida:Bis-acrilamida, 29:1 al 40% (Sigma-Aldrich®)	1,80 mL	0,3 mL
Buffer Tris-SDS (3 M Tris-HCl y 0,3% SDS) pH=8,45	3,00 mL	1,125 mL
Glicerol 70% (v/v)	0,85 mL	-
APS 10% (m/v) (Peroxodisulfato de amonio, Ultra ≥98,0%, Fluka™)	26 µL	24 µL
TEMED (UltraPure™ ≥99%, Invitrogen™)	2,6 µL	2,4 µL

\*Los componentes se añadieron en el orden que aparecen en el cuadro. Fuente: Hernández (2013)

**Apéndice 2.** Composición del buffer de carga (5X, con reductor) para las extracciones de proteínas: 250 mM Tris-HCl (pH=6,8), 8% (m/v) SDS, 40% (v/v) glicerol, 200 mM DTT, 0,1% (m/v) azul de bromofenol. Fuente: Hernández (2013).

**Apéndice 3.** Composición del buffer de extracción de proteínas (pH=8,5), adaptado de Alam et al. (2014): 500 mM de tris (Trizma® base cristalino ≥99,9%, Sigma-Aldrich®), 50 mM de EDTA (bioUltra anhidro ≥99%, Sigma-Aldrich®), 100 mM de KCl (EM Science®, Merck KGaA), 1 mM de PMSF (0,1 M en etanol, Sigma-Aldrich®), 2% (v/v) de β-mercaptoetanol (≥99% (Sigma-Aldrich®) y 30% (m/v) de sacarosa.

**Apéndice 4.** Composición del buffer de rehidratación de proteínas totales e insolubles (Hernández, 2013): 7 M urea (ACS, PhytoTechnology Laboratories®); 6,25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (J.T.Baker™) y 37,5 mM NaCl (ACS, PhytoTechnology Laboratories®) a pH= 8,0.

**Apéndice 5.** Composición del buffer de rehidratación de proteínas solubles, adaptado de Hernández (2013): 6,25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (J.T.Baker™) y 37,5 mM NaCl (ACS, PhytoTechnology Laboratories®) a pH= 8,0.

**Apéndice 6.** Conjunto global de señales correspondientes a los modos vibracionales del ADN en Raman.

Este resumen de las señales encontradas en los espectros SERS del ADN, fue basado en las siguientes publicaciones científicas: Morla et al. (2016); Muntean et al. (2011); Muntean et al. (2013); Lu et al. (2015); Pramanik et al. (2016); Guerrini et al. (2014); Dina et al. (2016); Laing, Gracie y Faulds (2016); Girel et al. (2016); Xu et al. (2015); Muntean et al. (2015) y Barhoumi et al. (2008).

Rango de frecuencia (cm <sup>-1</sup> )	Modo (s) vibracional (es)	Asignación abreviada
405	flexión del nitrógeno exterior del anillo G	G
452	estiramiento desoxirribosa	desoxirribosa
612	dT	T
613	desoxirribosa (C3'-endo-anti)	desoxirribosa
620	Deformación anillo G	G
625-630	Estiramiento del enlace glicosídico (C1-N). Asociado a G y A. C1-N estiramiento del enlace glicosídico. También movimientos de tijera de C6-N7H-C8 y C4-N9-C8 de G.	A y G
658	Vibraciones de tijera de G en C6-N7H-C8 y C4-N9-C8 de C3	
675	dA	A
675-676	G	G
682	dG	dG
685	dG	
706	dA respiración de anillo	dA
714	A: vibración C2-N1-C6 y C4-N9-C8	A
721-723	dA	dA
726	desoxirribosa, C3' endo-anti	desoxirribosa
729-750	A	A
730-737	vibración de respiración A	
739-756	dT	dT
773	Confórmeros de dC (C2'-endo-anti)	dC
780	CH <sub>2</sub>	desoxirribosa
784-802	C y C+T	C+T
784-790	T	T
786	estiramiento del esqueleto PO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	PO <sub>2</sub> <sup>-</sup>
829	Conformación C2'-endo desoxirribosa	
874	CH <sub>2</sub>	
909	CH <sub>2</sub>	desoxirribosa
913-929	esqueleto desoxirribosa	
943	CH <sub>2</sub>	
980	estiramiento simétrico esqueleto	PO <sub>2</sub> <sup>-</sup>
1004	estiramiento N-C de los nucleósidos	dA, dT, dC, dG

1011	Fuerte. estiramiento de C4–O de la desoxirribosa y vibraciones de tijera de la citosina	desoxirribosa y C
1029-1030	C en N1–C6–N5	dA, dT, dC, dG
1082-1115	estiramiento simétrico PO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	PO <sub>2</sub> <sup>-</sup>
1088	dA	dA
1119-1136	dA (estiramiento C8–N9, N9–H; deformación C8–H)	dA
1128	desoxirribosa	desoxirribosa
1170	vibraciones del anillo dC	dC
1170-1186	dA y dG (estiramiento C5–C6)	dA y dG
1228	dC, dT	dC, dT
1240-1248	estiramiento de anillo A, C, T.	A, C, T
1272-1288	dC	dC
1294	estiramiento esqueleto PO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	PO <sub>2</sub> <sup>-</sup>
1296-1303	dA	dA
1300-1311	A y G (vibraciones del anillo)	A y G
1327-1329	A	A
1333	dG y dA	dG y dA
1336	estiramiento G	G
1354-1380	dT y dA	dT y dA
1363	dT, dA and dG (estiramientos del anillo)	dT, dA y dG
1381-1404	dT, dA y dG	dT, dA y dG
1421-1423	desoxirribosa C2'H <sub>2</sub> , vibración de tijera	desoxirribosa
1430	estiramiento A	A
1436-1450	dCH de la desoxirribosa	desoxirribosa
1460	CH <sub>2</sub>	
1477-1480	dT, dA y dC	dT, dA y dC
1480	dG	dG
1490	A, G	A, G
1505-1510	dA	dA
1510	A (deformación en NH <sub>2</sub> )	A
1545-1570	dG y dA	dG y dA
1574-1576	dG y dA (estiramientos del anillo)	dG y dA
1576	C=O de G	G
1584-1602	dG y dA	dG y dA
1623	carbonilo dT	dT
1640-1655	superposición de los modos de estiramiento del grupo carbonilo.	C=O
1649	dT(C=O)	dT

**Apéndice 7.** Conjunto global de señales correspondientes a los modos vibracionales de proteínas Raman.

Este resumen de las señales encontradas en los espectros SERS del ADN, fue basado en las siguientes publicaciones científicas: Xu et al. (2014); Han et al. (2009a); Han et al. (2008); Nguyen, Peters y Schultz (2017) y Feng et al., (2015).

Frecuencias (cm <sup>-1</sup> )	Asignación vibracional
508	Trp
539	
753	
754	
758	
760	
765	
1004	
1005	
1208	
1335	
1342	
1359	
1363	
1508, 1549-1557	
1608	
643	
826	
852	
854	
856	
1174	
1214	
1608	
621	Phe
643	
1000	
1001	
1002	
1003	
1004	
1005	

1032	
1033	
1036	
1055	
1207	
1214	
1508	
1583	
1617	
1508	His
935	Pro
1049	C-O y C-N
1084	C-N
1241	
1252	vibraciones de amida
1676	
1622	
1646	
1649	
1657	Amida I
1658	
1661	
1673	
1684	amida I (lámina beta)
1233	
1235	amida III
1290	
1239	amida III (lámina beta)
503, 506	S-S (puente disulfuro)
1403	COO-
1392	COOH
1121	NH <sub>3</sub> deformación
1313	
1442-1446	CH <sub>2</sub>
1176	CH