

Implementación de Técnicas Ópticas y Espectroscópicas para la Identificación de Microorganismos

Yuliana María Arango Escudero
Estudiante de Maestría en Microbiología y Bioanálisis

Asesor
Andrés Felipe Villa Restrepo, MSc., PhD.

Escuela de Microbiología
Universidad de Antioquia
Medellín, Antioquia, Colombia
2017

Introducción

Los microorganismos constituyen un componente esencial de la biota terrestre; son extraordinariamente diversos y habitan en numerosos ambientes con condiciones ideales para su crecimiento (Torsvik *et al.*, 2002), e incluso en ambientes inhóspitos para otras formas de vida (Horner-Devine *et al.*, 2004; Roane *et al.*, 2009). Los microorganismos catalizan transformaciones en los ciclos biogeoquímicos de la biosfera, transformando componentes de la atmósfera de la tierra y formando una parte esencial de la diversidad genética de la vida (Whitman *et al.*, 1998), que los hace piezas clave para el funcionamiento de los sistemas biológicos y mantenimiento de la vida sobre el planeta (Montaño Arias *et al.*, 2010).

La extensa distribución de los microorganismos implica que han desarrollado diferentes mecanismos fisiológicos y una habilidad única de adaptación a diversos ambientes, aún en condiciones de escasez de nutrientes (oligotrofia), cambios extremos de temperatura, pH, presión, radiación, entre otros (Roane *et al.*, 2009). De esta manera, se puede asociar su extraordinaria diversidad con su abundancia y distribución en los diferentes ambientes, y les confiere importancia a nivel clínico, ambiental, industrial y biotecnológico, haciendo necesaria su caracterización, clasificación e identificación (Karlsson *et al.*, 2015).

A pesar de ser un componente crucial en los procesos de la vida en la tierra, solo cerca de 4,500 especies de microorganismos han sido caracterizadas, dejando la mayor parte de la diversidad de los microorganismos sin explorar (Wintzingerode *et al.*, 1997; Torsvik *et al.*, 2002; Martínez-Romero, 2004) y aunque hay un gran avance en las técnicas de identificación microbiana, una de las dificultades que se presentan al estudiar esta diversidad radica en que los microorganismos aún no estudiados poseen condiciones nutricionales estrictas que no han sido replicadas en el laboratorio, dificultando su aislamiento e identificación (Cavalier-Smith, 2004), lo que resalta en la limitación que tienen los métodos de cultivo actuales para el estudio de la composición de las comunidades microbianas.

Si bien, los métodos de cultivo permiten realizar una descripción morfológica (tamaño, forma y color) de las colonias que crecen en placas de *petri*, junto a las características microscópicas de las células individuales mostrando si los cultivos son axénicos o no, estas estrategias no llegan a clasificar adecuadamente las especies de microorganismos (Busse *et al.*, 1996). Sin embargo, existe una variedad de pruebas fenotípicas, bioquímicas y enzimáticas que, complementarias a las primeras, han sido implementadas en la caracterización e identificación rápida de microorganismos patógenos y no patógenos, tales como *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas* spp., *Alcaligenes* spp., miembros de *Enterobacteriaceae* y *Vibrionaceae* (Bosshard *et al.*, 2006; Croci *et al.*, 2007; Awong-Taylor *et al.*, 2008), entre otros.

La diversidad microbiana se puede estimar en términos de variabilidad estructural, funcional, metabólica y genómica de los microorganismos (Montaño *et al.*, 2010), los cuales a su vez son la base de técnicas y procedimientos que permiten identificarlos y clasificarlos, buscando que las metodologías de caracterización se puedan implementar a distintas áreas, como la clínica, industrial, ambiental y biotecnológica. Hoy en día, se cuenta con una variedad de técnicas bioquímicas y genéticas para la clasificación de microorganismos (Busse *et al.*, 1996; Emerson *et al.*, 2008; Fernández-Olmos *et al.*, 2010). Sin embargo, las limitaciones de las técnicas existentes, hacen necesario la búsqueda, estandarización e implementación de nuevas estrategias para la identificación de los microorganismos.

Pruebas de Identificación Bioquímica

Como se describió anteriormente, los métodos convencionales para la identificación y clasificación microbiana están basados en las características fenotípicas y metabólicas de los microorganismos observadas a través de técnicas de cultivo y aislamiento (Bou *et al.*, 2011). La caracterización bioquímica, nutricional y fisiológica de los microorganismos puede ser establecida por distintas pruebas, como por ejemplo, la prueba indol, el metabolismo oxidación-fermentación, la identificación por presencia o ausencia de la enzima citocromo oxidasa o catalasa, entre otras, con el fin de describir fenotípicamente los microorganismos y clasificarlos taxonómicamente (Claus, 1993; Busse *et al.*, 1996; Fernández-Olmos *et al.*, 2010). Sin embargo, la implementación de estas técnicas requiere entre 18 a 24 horas para el aislamiento, sumado a otras 24 o 48 horas más para su identificación por medio de las diferentes pruebas bioquímicas disponibles (Cherkaoui *et al.*, 2010), haciendo que estas pruebas sean laboriosas, demandantes en tiempo y en ocasiones, difíciles de estandarizar. Actualmente, la comercialización de *kits* manuales y sistemas automatizados, ha permitido conocer y delimitar los rasgos fenotípicos importantes y así, identificarlos y clasificarlos (Busse *et al.*, 1996), puesto que su realización, lectura y costo es más accesible.

Aun así, los medios de cultivo sólo han permitido estudiar a aquellos microorganismos que pueden crecer en éstos, permitiendo su identificación y caracterización, pero lamentablemente, es una limitante para el crecimiento de algunos microorganismos bajo condiciones artificiales. Bosshard y colaboradores (2006) aislaron bacilos Gram negativos aerobios no fermentadores de muestras clínicas con el fin de identificarlos por medio de dos métodos bioquímicos: API 20 NE (manual) y VITEK 2 (automatizado). Los resultados mostraron que de 107 microorganismos aislados, las pruebas bioquímicas lograron identificar casi el 60 % de ellos (65 por API 20 NE y 58 por VITEK 2) a nivel de género y especie pero, aunque la prueba manual tuvo mayor éxito que la automatizada (50 % vs 40 %, respectivamente), es clara la limitación que tienen estas pruebas para la identificación microbiana, debido a que el 40 % de los aislados no pudieron ser identificados ni clasificados.

En general, se puede observar que las pruebas de identificación microbiana se orientan principalmente a los microorganismos de importancia clínica, limitando un poco la identificación de microorganismos del área industrial y ambiental, si se tiene en cuenta que la diversidad microbiana de un suelo es subestimada con la implementación de métodos de cultivo. Esto representa una gran limitación para la caracterización de esta microbiota. Aun así, la implementación de pruebas bioquímicas ha resultado ser una alternativa para el estudio de estas comunidades que, según los resultados de O'Hara y colaboradores (2003) y Croci y colaboradores (2007), poseen una alta precisión (90% en pruebas API 20E y Vitek y 86% en pruebas de Alsina, respectivamente). Sin embargo, otros como Colodner y colaboradores (2004) no lograron identificar diferentes especies de *Vibrio* spp. con la prueba Neg Combo 20 y API 20 NE. Por tanto, se ha podido afirmar que los sistemas de identificación microbiana basados en pruebas bioquímicas no son confiables para aislados de matrices ambientales debido a la diversidad microbiana que hay en estos ambientes y la dificultad del aislamiento, además de que las bases de datos disponibles poseen muy poca información sobre estos organismos (Awong-Taylor *et al.*, 2008).

Otros estudios también han resaltado la limitada disponibilidad de bases de datos que faciliten la correlación de los resultados con otros, como uno de los principales problemas de los sistemas de identificación bioquímica, lo cual dificulta aún más los análisis de identificación por medio de estas técnicas (Odumeru *et al.*, 1999; Bosshard *et al.*, 2006).

Aunque una ventaja de las pruebas bioquímicas es que pueden ser empleadas en diversas áreas de la microbiología, facilitando la identificación de microorganismos, incluso de aquellos que son transmitidos por alimentos, esta ventaja no cambia los resultados de sensibilidad y especificidad que tienen estas pruebas. Así lo demuestran los resultados de Odumeru y colaboradores (1999) quienes, al comparar cinco sistemas automatizados de identificación microbiana (Sistema MicroLog, Sistema MIS, Sistema VITEK, Sistema MicroScan WalkAway 40 y Sistema Replianalyzer), diseñados especialmente para identificar microorganismos que se transmiten por alimentos, encontraron una especificidad muy variable entre éstos que oscilaba entre 32.5 a 100% y una sensibilidad desde 42.5 a 100%. Estos resultados demuestran que las pruebas de identificación bioquímica tienen limitaciones importantes, para la identificación de los microorganismos, y mucho más, si se considera que una característica bioquímica puede variar entre especies de un mismo género (y esto pasa también entre cepas de una misma especie) (Melin *et al.*, 2004; Preisner *et al.*, 2007).

Como ya se ha resaltado, los microorganismos constituyen el componente principal de la biodiversidad, por lo tanto se requiere de herramientas apropiadas para su identificación, debido a las desventajas que poseen las pruebas bioquímicas

(Guerrero *et al.*, 2002). Estas limitaciones han podido ser resueltas en gran medida con el uso de otros métodos de identificación microbiana disponibles en la actualidad, como son las pruebas moleculares, que han mostrado ser más específicas, sensibles y útiles para evaluar la diversidad y poder identificar y clasificar los microorganismos (Mondaca *et al.*, 2010) de una manera rápida y sin necesidad de cultivar; además existen muchas bases de datos que permiten hacer relaciones filogenéticas más precisas (Bosshard *et al.*, 2006). No obstante esta técnica tienen limitaciones, como por ejemplo, que son dispendiosas, costosas (Preisner *et al.*, 2007) y requieren de personal calificado, además no determinan la viabilidad de los microorganismos (Awong-Taylor *et al.*, 2008).

Pruebas de identificación molecular

El surgimiento de la biología molecular ha revolucionado nuestra manera de ver los microorganismos, clasificarlos y establecer relaciones filogenéticas entre procariotas y a su vez, entre organismos eucariotas (Martínez-Romero, 2004). Gracias al potencial que tienen las técnicas de identificación molecular se ha reconocido la existencia de microorganismos que no son cultivables y que están presentes en diversas muestras (suelo, agua, plantas, entre otras), de los cuales no es posible recrear sus condiciones naturales de crecimiento en el laboratorio (Martínez-Romero, 2004), representando un reto para los microbiólogos.

Aun así, el éxito de las pruebas de identificación molecular se basa en la información genética de los organismos, especialmente en la secuencia del gen que codifica la subunidad 16S del ARN ribosomal (ARNr 16S) (Busse *et al.*, 1996; Woo *et al.*, 2008), ya que contiene regiones en su secuencia altamente conservadas que hacen que cualquier variación en esta secuencia, sea útil para la identificación y clasificación filogenética de los organismos, incluso para diferenciar entre especies cercanamente relacionadas. Basado en este principio, Bosshard y colaboradores (2006) compararon los resultados de sus análisis bioquímicos descritos previamente, con los obtenidos de la secuenciación del gen ARNr 16S, logrando una mayor precisión en la identificación de estos aislados clínicos, puesto que se identificaron los 107 aislados tanto a nivel de género como de especie. Existen en la actualidad muchos reportes con resultados similares a éstos (Busse *et al.*, 1996; Collado *et al.*, 2007; Albuquerque *et al.*, 2009; Sibley *et al.*, 2012; Das *et al.*, 2014; Lacumin *et al.*, 2015;). Todos estos reportes demuestran que el análisis del gen ARNr 16S ha jugado un papel esencial en la identificación precisa de aislados bacterianos y en el descubrimiento de nuevas bacterias (Woo *et al.*, 2008), incluso de aquellos que tienen perfiles fenotípicos inusuales, crecimiento lento y no cultivables.

Existen múltiples técnicas que permiten analizar la secuencia del ARNr 16S, entre ellas están: los microarreglos de ARN, Polimorfismo de Longitud en los Fragmentos de Restricción del rDNA/rRNA (RFLP), *Análisis Espacial Intergénico Ribosómico Automatizado* (ARISA), *Electroforesis en Gel de Gradiente Desnaturalizante*

(DGGE), entre muchas otras (Peccia *et al.*, 2006; Malik *et al.*, 2008). Marty y colaboradores (2012), empleando la técnica RFLP, encontraron especies de *Lactobacillus sakei* y *L. curvatus* como la población microbiana dominante en productos cárnicos suizos fermentados y algunas especies de *Staphylococcus*, como *S. equorum*, *S. warneri*, *S. saprophyticus*, *S. epidermis*, *S. xylosus* y *S. aureus* que eran frecuentes durante distintos procesos de maduración de la carne evaluada. Esto permitió discriminar entre especies y reconocer los microorganismos predominantes en las distintas etapas de maduración de la carne, llegando a identificar bacterias patógenas.

Por otra parte, la técnica DGGE permite describir la estructura de la comunidad microbiana y su diversidad en muestras ambientales. Así lo demostraron Quing y colaboradores (2007), los cuales identificaron una comunidad de bacterias resistentes a cadmio presentes en sitios contaminados con zinc y posteriormente, por análisis de secuencias, identificaron la presencia de *Bacillus cereus* y *Enterobacter cloacae* como microorganismos dominantes en estas muestras.

Al comparar la identificación de microorganismos por secuenciación del gen ARNr 16S con los análisis bioquímicos, encontramos mayores beneficios con la primera, ya que no está restringida a un grupo específico de microorganismos y, además, se cuenta con múltiples bases de datos que permiten tener una mayor capacidad de identificación microbiana (Bosshard *et al.*, 2006), hasta el punto que las especies nuevas aún no descritas, se pueden asignar a un grupo de microorganismos relacionados. Es importante mencionar, que los resultados que se obtienen de este análisis, no dependen de la interpretación individual del analista, como sí podría suceder con los resultados de las pruebas bioquímicas.

Aunque es evidente la alta sensibilidad y especificidad de las pruebas de identificación molecular en la identificación de microorganismos bajo condiciones dependientes e independientes de cultivo, es importante mencionar que estas técnicas presentan limitaciones, por ejemplo, son dispendiosas por los procedimientos a realizar y costosas por los requerimientos de varios reactivos y componentes, además se ve limitada al momento de identificar microorganismos desconocidos y que no estén en bases de datos. Además, la transferencia horizontal de genes ha cuestionado la utilidad de la secuenciación del gen ARNr 16S, ya que, si la transferencia horizontal de éste permanece en la naturaleza, se generan variaciones por mutación que se verán reflejadas en la secuencia del genoma bacteriano, la cual causará inconvenientes a la hora de identificar los aislados (Das *et al.*, 2014). Por tal razón, ampliar el panorama de nuevas metodologías para una identificación rápida y confiable que, a su vez, complementen la trascendencia que ha tenido la biología molecular, nos lleva a mirar otros ámbitos de la ciencia.

Estrategias complementarias de identificación microbiana

En la mayoría de las pruebas que emplean análisis de las secuencias de ADN y ARN se pueden generar resultados falsos negativos y falsos positivos, ya sea por una contaminación de la muestra o por la presencia de inhibidores que podrían alterar los resultados (Vaneechoutte *et al.*, 1997; Erukhimovitch *et al.*, 2005). Por consiguiente, se han empleado estrategias que complementan la identificación y caracterización microbiana basadas en la composición química y la morfología de los microorganismos (Szalontai *et al.*, 2000; Beekes *et al.*, 2007; Bae *et al.*, 2011; Lewis *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2015). Estos estudios han demostrado un alto grado de sensibilidad, rapidez, bajo costo y simplicidad al momento de identificar los microorganismos (Erukhimovitch *et al.*, 2005), proporcionando información cualitativa y cuantitativa sobre la muestra estudiada para su identificación.

- **Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FT-IR)**

Entre las estrategias de identificación microbiana basados en la composición química de los microorganismos se encuentra la espectroscopia infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR) (Preisner *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2015). La espectroscopia FT-IR permite obtener espectros que dan información acerca de los componentes fundamentales de la membrana de los microorganismos como son los lípidos, proteínas y polisacáridos, para así identificarlos según el perfil espectral particular (Melin, 2004; Preisner *et al.*, 2007).

Esta técnica espectroscópica mide la respuesta del espectro electromagnético entre $4000 - 900 \text{ cm}^{-1}$ (Mondaca *et al.*, 2010), asociado a las vibraciones moleculares de los diferentes grupos funcionales presentes en la membrana celular (Sockalingum *et al.*, 2002; Sandt *et al.*, 2003). Es un método considerado promisorio para la identificación de género y especie microbiana (Kümmerle *et al.*, 1998; Kirschner *et al.*, 2001; Sockalingum *et al.*, 2002), ofreciendo dentro de las ventajas ser una alternativa rápida y confiable.

Descripción de la estructura (composición) de la membrana celular

Es necesario conocer la composición y la estructura química para entender el espectro FT-IR de las células microbianas. El nivel más simple de los sistemas biológicos está compuesto de lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y carbohidratos (Maquelin *et al.*, 2002). Entre bacterias y levaduras, la composición y la estructura química de cada grupo varían considerablemente, como se ve en la tabla 1.

Tabla 1. Composición molecular general de bacterias y levaduras. Tomada y modificada de Maquelin *et al.*, 2002.

Características	Bacterias	Levaduras
Diámetro (um)	~1	~10
Tiempo de generación (h)	0.2 - 10	2 - 10
Proteínas (% w/w)	40 - 60	40 - 50
Lípidos (% w/w)	10 - 15	5 - 20
Carbohidratos (% w/w)	10 - 20	10 - 25
DNA (% w/w)	2 - 4	1 - 3
RNA (% w/w)	5 - 15	3 - 10

Los componentes de la envoltura (pared) celular han mostrado ser constituyentes que tienen un fuerte efecto en el espectro infrarrojo. La envoltura celular de bacterias es una estructura compleja de múltiples capas que sirve para proteger el citoplasma bacteriano del ambiente impredecible y hostil en el que se encuentren (Silhavy *et al.*, 2010). La gran mayoría de las bacterias se encuentran en dos categorías principales que se basa en la diferencia estructural de la composición de la envoltura: Gram negativa y Gram positiva (figura 1).

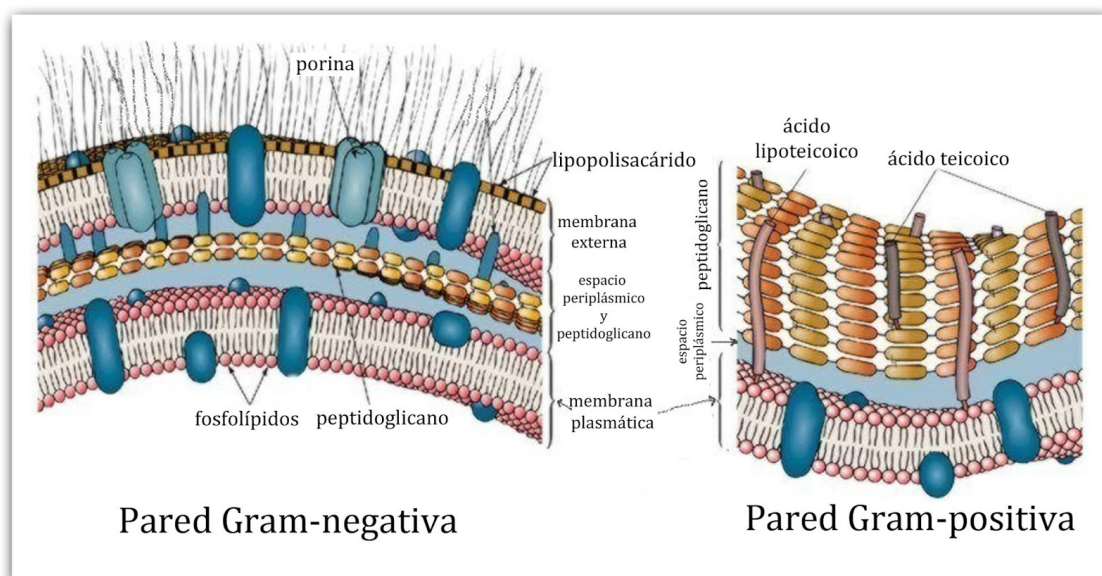


Figura 1. Esquema de la pared celular de bacterias Gram positivas y Gram negativas.

<http://www.escuelapedia.com/identificacion-de-bacterias-gram-positivas-y-gram-negativas/>

Tanto en bacterias Gram negativas como en Gram positivas, la envoltura celular se compone de una membrana citoplasmática y una capa de peptidoglicano, además de una membrana externa que poseen solo los Gram negativos, como se ve en la figura 1 (Maquelin *et al.*, 2002; Silhavy *et al.*, 2010; Álvarez Ordóñez *et al.*, 2002).

La membrana citoplasmática es una estructura laminar, delgada (entre 5 a 10 nm de espesor), flexible y fluida que mantiene la integridad de la célula, formada por lípidos y proteínas. Esta membrana constituye la barrera que separa el interior de las células con el exterior, por tanto es selectiva. La capa de peptidoglicano es una red rígida, de alto peso molecular que tiene como función dar forma y proteger a la célula de un rompimiento osmótico. Esta capa es mucho más gruesa y rígida en bacterias Gram positivas que en Gram negativas y está formada por cadenas lineales de polisacáridos. En bacterias Gram positivas, la pared celular contiene polímeros adicionales, como el ácido teicoico unido covalentemente al peptidoglicano. Este ácido es una macromolécula que contiene glicerol o ribitol que consiste en un esqueleto de fosfato con cadenas laterales variables (Álvarez Ordóñez *et al.*, 2002; Maquelin *et al.*, 2002) que une las distintas capas entre sí.

En las bacterias Gram negativas hay una membrana externa adicional al peptidoglicano, y al ser una bicapa lipídica asimétrica, contiene fosfolípidos en la capa interna (de composición similar a los encontrados en la membrana citoplasmática) y en la capa externa están los lipopolisacáridos (LPS) y varias proteínas formadoras de poro (porinas), siendo ésta una barrera permeable que protege a las células contra sales biliares y degradación por medio de enzimas digestivas (Maquelin *et al.*, 2002). En levaduras, las proteínas, lípidos y polisacáridos que componen la membrana, la pared celular y las cápsulas, son de importancia en la taxonomía y filogenia de estos organismos. En el caso de sus membranas, las levaduras tienen lípidos y pigmentos (que no están presentes en procariontes) como son: esteroides, esfingolípidos, ergosterinas melaninas y algunos glicolípidos. La pared celular se compone de un complejo de polisacáridos y glicoproteínas, como glucosa, manosa, galactosa, xilosa, *N*-acetil-*D*-glucosamina y ácido urónico y el principal polisacárido de reserva es el glicógeno presente en citoplasma y nucleoplasma y su contenido depende del estado fisiológico de las células (Maquelin *et al.*, 2002).

Entonces, la espectroscopia FT-IR puede proporcionar información adicional de datos fenotípicos y genotípicos para establecer una clasificación taxonómica. El espectro FT-IR constituye una imagen de la composición química total, los compuestos y estructuras especialmente de la pared celular tienen una mayor influencia en el espectro (Álvarez Ordóñez *et al.*, 2002). Así, el espectro FT-IR de cada microorganismo se considera una “huella dactilar” única de señales características del mismo, que pueden ser luego analizados con el potencial de encontrar señales particulares a cada microorganismo que permita su identificación y diferenciación con otros (Zeroual *et al.*, 1994; Erukhimovitch *et al.*, 2005).

El análisis realizado por espectroscopia FT-IR tiene el potencial de proporcionar resultados rápidos y alcanzar altos valores de especificidad y sensibilidad, por lo que esta técnica es capaz de identificar y caracterizar distintas muestras biológicas según su composición química (Aguar *et al.*, 2015), basándose en la interacción que

tiene la radiación infrarroja con la membrana, en donde esta radiación infrarroja es absorbida cuando su frecuencia (energía⁻¹) es igual a la del modo vibracional. Estas vibraciones moleculares son únicas para el tipo y disposición espacial de los átomos en una muestra; por ello es que el espectro se asocia a una huella digital de la estructura irradiada (Aguiar *et al.*, 2015).

La espectroscopia FT-IR estudia el efecto de la interacción entre la materia y la energía radiada en el rango de infrarrojo (13.000 a 10 cm⁻¹) del espectro electromagnético y este efecto es evaluado al medirse la absorción de varias frecuencias de Infrarrojo (IR) por una muestra situada en la trayectoria de un haz de ondas electromagnéticas con dichas componentes espectrales de IR (Álvarez *et al.*, 2012). Sin embargo, el rango de frecuencias vibracionales más útiles para el análisis de la mayoría de las moléculas, corresponde al espectro medio del IR (MIR), entre 4.000 y 400 cm⁻¹. Entonces, cuando el haz de la radiación IR pasa a través de una muestra, la radiación puede ser absorbida o transmitida, dependiendo de la frecuencia vibracional y estructura de las moléculas que hacen parte de la muestra, la cual excita ciertos grupos moleculares produciendo vibraciones (Álvarez *et al.*, 2012) (figura 2).

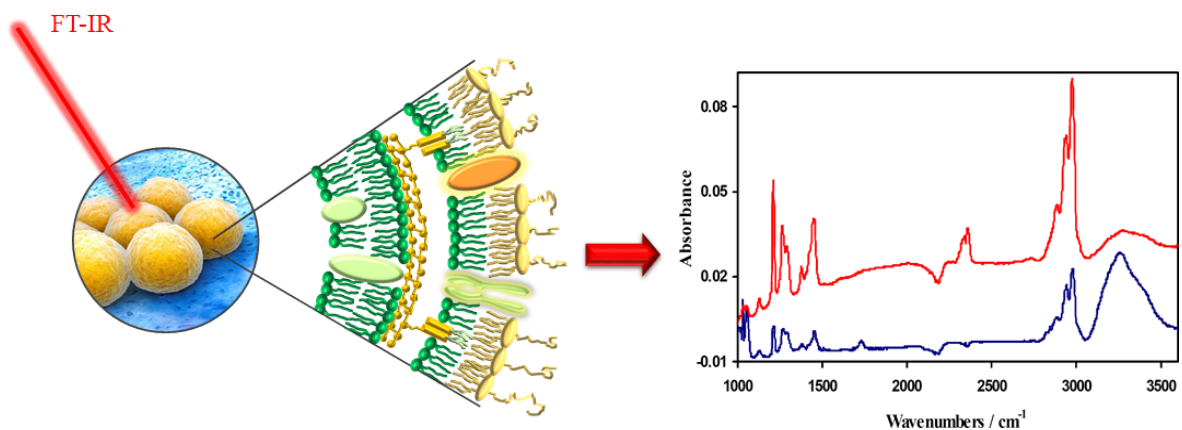


Figura 2. Esquema de la interacción de la radiación IR con una muestra biológica, la cual es absorbida por la estructura molecular de la membrana celular, produciéndose un espectro que caracteriza la composición química general.

La espectroscopia infrarroja ha mostrado ser una técnica rápida, sensible y versátil en la identificación, diferenciación y caracterización de microorganismos, incluso a nivel de especie, de una manera simple y económica en comparación con otras técnicas espectroscópicas (Melin, 2004). Es así como Filip y colaboradores (2004) logran identificar con esta técnica bacterias de importancia clínica como *Bacillus subtilis* cuando es cultivada en diferentes medios; de la misma forma, Melin y colaboradores (2004) diferenciaron distintos géneros de la clase *Mollicutes*: *Acholeplasma*, *Mycoplasma* y *Ureaplasma*, permitiendo una clasificación de especies relacionadas de *Ureaplasma* (*U. urealyticum* y *U. parvum*) y entre cepas de una especie (*M. pneumoniae*) (Figura 3). En tanto, Zeroual y colaboradores (1994)

mostraron que bajo distintas condiciones de crecimiento, *Bradyrhizobium japonicum* genera cambios estructurales en los componentes de su pared celular (peptidoglicano), que se ven reflejados en las bandas de absorción, mostrando que las huellas espectrales son lo suficientemente específicas para cada microorganismo como para permitir distinguir entre la diversidad de especies analizadas.

Estos resultados dan cuenta de la importancia que tiene la espectroscopia FT-IR en la evaluación de los cambios moleculares, que permiten una identificación específica de los microorganismos según su composición de membrana. Este enfoque pone a la espectroscopia FT-IR a la vanguardia de las nuevas técnicas promisorias para la detección, identificación y clasificación taxonómica rápida de microorganismos a nivel de serotipo, cepa, especie o género (Sockalingum *et al.*, 1998; Melin *et al.*, 2004; Preisner *et al.*, 2007).

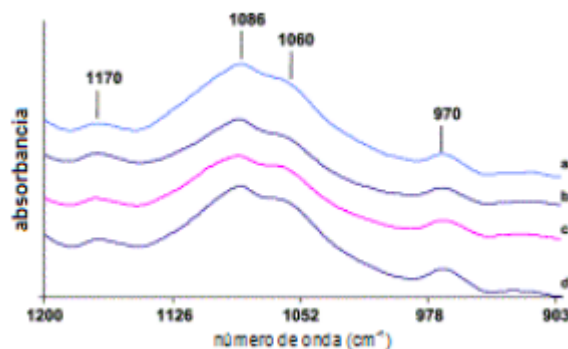


Figura 3. Espectro infrarrojo de distintas especies de *Mycoplasma*. **a.** *M. genitalium*; **b.** *M. penetrans*; **c.** *M. pneumoniae* FH; **d.** *M. pneumoniae* M129. Tomada y modificada de Melin *et al.*, 2004.

● Difracción de la luz

Desde otra perspectiva biofísica para la identificación microbiana, se presenta un modelo óptico de dispersión de la luz, utilizado en diversos campos, desde la agricultura hasta aplicaciones clínicas, que ha permitido la clasificación de muestras biológicas a nivel de género y especie (Robinson *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2015). Este método óptico basado en iluminación láser, identifica de manera rápida y sin destruir la muestra, colonias bacterianas que crecen en medio de cultivo, analizando patrones de dispersión de las colonias, los cuales permiten distinguir entre especies por las características físicas y de contorno de cada colonia (superficie, tamaño, forma, índice de refracción), por la composición química de la superficie celular y la estructura radial observada en algunas cepas y especies (Bae *et al.*, 2007 y 2011; Banada *et al.*, 2007; He *et al.*, 2015). La aplicación de ésta técnica ha demostrado ser un método de bajo costo, no destructivo, sencillo y reproducible para la identificación y caracterización de microorganismos.

En algunas áreas de la microbiología, es de sumo interés entender las características morfológicas de las colonias bacterianas, por ejemplo en

identificación taxonómica y diagnóstico, análisis de cepas mutantes en estudios genéticos y como control de calidad en alimentos, ya que con estas técnicas de registro óptico de las colonias se puede ver la respuesta que tienen los microorganismos frente a los factores ambientales a los que se presentan (Bae *et al.*, 2011).

Una colonia bacteriana es el resultado de una multiplicación exponencial de una simple célula en la superficie de un medio sólido formando una estructura en forma de cúpula, que se ve favorecida por una serie de factores ambientales, tales como la nutrición, disponibilidad de oxígeno, humedad y movilidad, proporcionadas por un medio de cultivo sólido (Bae *et al.*, 2011). Ésta es iluminada con un rayo láser (luz coherente) y el patrón de la luz dispersada o difractada que se genera de una colonia depende de las propiedades ya mencionadas (índice de refracción, forma, tamaño y composición química de la colonia) propias de ésta, lo que produce patrones reproducibles asociados a propiedades que se mantengan invariantes (Banada *et al.*, 2007).

La difracción de la luz es un fenómeno que se basa en la desviación de las ondas electromagnéticas cuando ésta se encuentra con un obstáculo o hay un cambio en el medio. El efecto de este fenómeno se hace más notable cuando el tamaño de los obstáculos es comparable con la longitud de onda. Uno de los fenómenos de difracción es la *difracción de Fresnel* en donde los rayos incidentes sobre el obstáculo se observan en un punto del espacio cerca de éste. Un ejemplo particular de la difracción se observa cuando la luz de una fuente coherente pasa a través de una abertura circular pequeña generando, en lugar de la proyección geométrica de la forma de la abertura, un disco difuso circular conocido como *disco de Airy*, rodeado de anillos circulares concéntricos mucho más tenues. En este sentido, puede decirse que la geometría o morfología de la estructura por la que pasa la luz es la que determina el *patrón de difracción o scattering* (es la luz que sufre un cambio de propagación por las dimensiones finitas del medio) (Beléndez Vásquez, 2000). La figura 4 muestra ejemplos de patrones de difracción que se generan al pasar un rayo de luz a través de una (A) abertura circular mostrando el patrón de Airy, (B) una abertura con estructura, como es el caso de un diafragma segmentado y (C) una estructura con geometría, como una estrella de Siemens, la cual se asemeja a la estructura y patrón de difracción asociado a la morfología de una colonia microbiana.

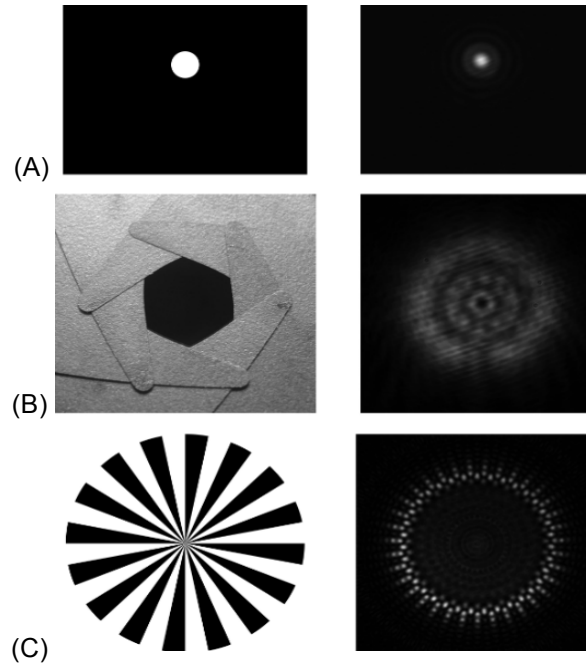


Figura 4. Ejemplos experimentales de diferentes patrones de difracción generados al iluminar (A) una abertura circular, (B) diafragma segmentado y (C) estrella se Siemens.

Teniendo en cuenta esta propiedad de difracción o dispersión de la luz, se puede entender que las colonias que forman los microorganismos en medios de cultivo sólido y que presentan morfologías o estructuras geométricas particulares, al ser iluminadas con un rayo de luz láser, éste muestre como resultado una dispersión de dicho rayo, que dependerá de las características físicas de cada colonia, generando los denominados “*patrones de difracción*”, que son únicos para cada tipo de colonia (Robinson *et al.*, 2011; Arango *et al.*, 2013).

Los patrones generados por la difracción de la luz de una colonia desconocida, se puede comparar con bases de datos de patrones previamente obtenidos de colonias de bacterias conocidas para lograr de esta manera una identificación y reconocimiento de los microorganismos (Robinson *et al.*, 2011). Estudios previos han mostrado el potencial de esta metodología en diversas áreas de la microbiología: clínica y salud pública, biotecnológica, alimentaria, bioseguridad y ambiental (Robinson *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2015), pudiendo identificar colonias bacterianas de *Bacillus cereus* y otros *Bacillus* spp. (Banada *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2015), aislados de *Campylobacter* spp. (He *et al.*, 2015), *Listeria monocytogenes* y otras especies de *Listeria* (Banada *et al.*, 2007 y 2009), así como también *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Lactococcus lactis* y *Aeromonas hydrophila* (Banada *et al.*, 2009), por medio de la difracción de la luz generada por las colonias de estos microorganismos (Figura 5).

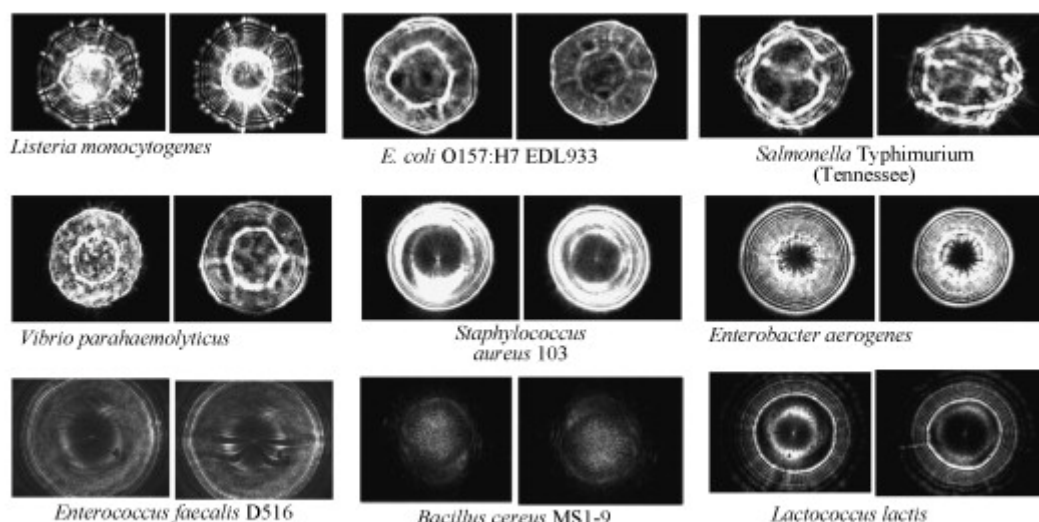


Figura 5. Imágenes de dispersión de colonias de especies representativas de los géneros de *Listeria*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Vibrio*, *Staphylococcus*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Bacillus* y *Lactococcus*. (Tomado de Banada *et al.* (2009).

En esta investigación, para lograr la captura de las imágenes de los patrones difractivos bacterianos y su posterior análisis, se implementó un montaje óptico, que se denominó “*Difractoscopio*”, el cual permite identificar las especies de bacterias que crecen sobre la superficie del agar en el que crecen, como se describe en el anexo 1.

Las colonias bacterianas son estructuras tridimensionales y no es fácil distinguir la arquitectura interior del exterior a simple vista. Pero, si ocurren cambios, por más pequeños que sean, interferirá en la difracción del rayo de luz que atraviese la colonia y este permitirá diferenciar una colonia bacteriana de otra por análisis de imágenes del patrón de difracción (Arango *et al.*, 2013). Por consiguiente, el surgimiento de este tipo de técnicas son potencialmente complementarias a las comúnmente empleadas para identificar y caracterizar microorganismos y por tanto tienen numerosas aplicaciones prácticas, además de ser fundamental en resolver preguntas de sistemática bacteriana, taxonomía y evolución. La rápida identificación y discriminación de microorganismos tiene un mayor impacto en la salud pública, la biotecnología y la ingeniería genética, como por ejemplo, identificar organismos indicadores de la calidad de agua, patógenos en alimentos y muestras clínicas, agentes biológicos nocivos (virus, bacterias y otras toxinas) (Robinson *et al.*, 2011), entre otros. Entonces, la implementación de técnicas físico-químicas, como la espectroscopía de FT-IR y la difracción de la luz, se unen al campo de la microbiología a modo de complementar las estrategias actuales de identificación microbiana, aportando soluciones a los distintos problemas a los que nos enfrentamos los microbiólogos a la hora de identificar microorganismos. En la tabla 2 puede verse algunas de las características más relevantes de las pruebas usadas para la identificación de microorganismos, de las que más arriba explicamos (ELS: Dispersión de Luz Elástica, PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa (como

herramienta genética/molecular), Prueba bioquímica (ejemplo, pruebas API), técnicas de análisis espectrales (por ejemplo, FT-IR)).

En conclusión, el estudio de los microorganismos nos permite, como microbiólogos, aprender del entorno en el que viven, el estado de su ecosistema, la abundancia o presencia en ambientes y por tanto, reconocerlos como parte importante en estos hábitats y para esto, es fundamental contar con herramientas de identificación rápidas, precisas y sensibles, las cuales, gracias a los avances en el conocimiento del mundo biológico, van precedidos de alguna innovación tecnológica que permite medir u observar un sistema en particular, realizar planteamientos experimentales de carácter novedoso que antes parecían imposibles de lograr. De aquí surge el interés por implementar el uso de los patrones difractivos de luz y espectroscopia infrarroja para la identificación rápida y confiable de microorganismos. Para lograr las evaluaciones de éstos métodos, se propone: (1) Analizar los patrones de difracción de la luz de colonias de microorganismos, (2) Obtener los perfiles vibracionales de microorganismos mediante espectroscopia infrarroja y (3) Evaluar la capacidad de los perfiles vibracionales y patrones difractivos para la identificación de microorganismos mediante el análisis de pruebas de ciegos.

Tabla 2. Comparación de características entre las diferentes técnicas de identificación de microorganismos comúnmente usadas. Tomada y modificada de Robinson *et al*, 2011.

Características	Prueba bioquímica	PCR	Análisis espectrales	ELS
Bajo costo				✓
Automatización		✓		✓
Exactitud/Reproducibilidad de datos	Varía según ensayo		✓	✓
De amplio uso	✓	✓		✓
Amplificación de muestra necesaria	✓	✓		✓
Velocidad		✓	✓	✓
Facilidad de uso	✓		✓	✓
Solo identificación de células vivas	✓			✓
Capacidad de tratar muestras complejas				✓
Identificación por perfil protéico			✓	
Identificación por DNA/RNA		✓		
Identificación por morfología	✓			✓

Materiales y Métodos

Aislamiento de microorganismos

Microorganismos de referencia. Se seleccionaron 9 microorganismos entre bacterias y levaduras, con el objetivo de abarcar su afinidad tintorial (Gram positivos y Gram negativos) y la distinta morfología celular (cocos y bacilos); pertenecientes a la colección de cepas de la Escuela de Microbiología y del grupo de Biotransformación de la Universidad de Antioquia, previamente caracterizados por métodos bioquímicos y moleculares (tabla 3).

Tabla 3. Microorganismos seleccionados para medición de colonias por técnica de dispersión de la luz y espectroscopia FT-IR.

Microorganismos	Tinción Gram	Características microscópicas	% de Identidad molecular
<i>Escherichia coli</i>	Gram -	Bacilo móvil con flagelos peritricos. Miden entre 0,5 µm ancho - 3 µm largo. No forma esporas.	99,85% relacionado con <i>Escherichia coli</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram +	Coco inmóvil (0,5 -1 µm diámetro) agrupados en racimos o tétradas. No forma esporas.	100% relacionado con <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Gram -	Bacilo recto, corto, casi cocoide. Flagelos peritricos, no formador de esporas. Mide 1,2-3,0 µm largo y 0,6-1,0 µm ancho.	99,85% relacionado con <i>Enterobacter aerogenes</i>
<i>Bacillus cereus</i>	Gram +	Bacilo recto con extremos redondeados, agrupados en cadenas. Bacilo formador de esporas (intraesporas) terminales. Flagelos peritricos.	99,9% relacionado con <i>Bacillus cereus</i>
<i>Lactococcus lactis</i>	Gram +	Cocos (ovoide) agrupados en pares y cadenas cortas, de longitud de 0,5 -1,5 µm. Sin esporas y flagelo.	Identificación realizada por el grupo de Biotransformación, Escuela de Microbiología.
<i>Streptococcus infantarius</i>	Gram +	Cocos agrupados en pares o cadenas cortas, de 0,8 a 1,2 µm. No esporulado ni motil.	Identificación realizada por el grupo de Biotransformación, Escuela de Microbiología.
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Gram +	Bacilo con extremos redondeados o cocobacilos no formadores de esporas.	Identificación realizada por el grupo de Biotransformación, Escuela de Microbiología.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NA	Levadura ovalada, globosas a elipsoidales, con gemación multilateral, formando cadenas cortas. Puede presentar pseudomicelio con crecimiento de pseudohifas cortas.	98% relacionada con <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Rhodotorula sp.</i>	NA	Levadura ovalada y elongada, en ocasiones forma pseudohifas.	NA

Caracterización bioquímica y molecular de los microorganismos de estudio

Caracterización bioquímica. Con el fin de evaluar los resultados obtenidos por las técnicas espectroscópica y óptica (Basado en protocolo ISO 16140; Langton *et al.*, 2002), algunas cepas de estudio se caracterizaron con las pruebas bioquímicas API 20E y 20NE (realizadas sólo para aquellas cepas bacterianas que cumplieran con tener características de forma bacilar y Gram negativas) (Crocchi *et al.*, 2007) siguiendo las instrucciones del fabricante (BioMérieux, France).

Caracterización molecular. El procedimiento de extracción del ADN de bacterias, amplificación mediante PCR y posterior secuenciación del gen ARNr 16S (según protocolo descrito por Drancourt *et al.*, 2000 y Dunbar *et al.*, 1999) se realizó por el *El Servicio Integral de Apoyo a la Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades Infecciosas -EPIMOL*, adjunto a la Escuela de Microbiología de la Universidad de Antioquia (ver tabla 3).

Preparación previa de los cultivos de microorganismos

Inoculación y siembra de microorganismos. Los microorganismos seleccionados se sembraron inicialmente (primer pase) en medios de cultivo con agar M17 y MRS para bacterias ácido lácticas, medio agar YM para levaduras y agar LB para el resto de las bacterias. Se incubaron durante 24 horas a 37 °C las bacterias y hasta 48 horas a 30°C las levaduras y bacterias ácido lácticas. Posteriormente, se inocularon de nuevo en medios agar (segundo pase) durante 24 y 48 horas. A partir de estos aislamientos axénicos, se realizaron distintos procedimientos para el análisis espectroscópico y de dispersión de luz.

Espectroscopia FT-IR

Preparación de la muestra. A partir de los cultivos de bacterias y levaduras previamente inoculados (sección *Inoculación y siembra*), se removió, teniendo cuidado de no arrastrar medio de cultivo, una muestra de colonias (entre 1 a 3 colonias aproximadamente) que se suspendieron en 10 µL de agua destilada estéril. Posteriormente, estas suspensiones se sonicaron entre 10 a 40 segundos para homogenizar la suspensión de células; todo el proceso de preparación de las muestras se encuentra resumido en la figura 6.

Medición de microorganismos. De la suspensión de células previamente preparada, se tomaron 3 µL y se dispensaron sobre el cristal de diamante del dispositivo de Reflectancia Total Atenuada (ATR) del espectrómetro FT-IR Tensor II (Bruker, Germany), acoplado con un detector de Mercurio Cadmio Telurio (MCT). El exceso de agua en las muestras se eliminó por evaporación con corriente de nitrógeno para minimizar el contenido de agua proveniente de las muestras. Los espectros de los diferentes microorganismos se obtuvieron en un rango de número de onda de 4000 -

400 cm^{-1} a temperatura ambiente. Para el registro de los espectros se tomaron 64 scans con una resolución espectral de 4 cm^{-1} .

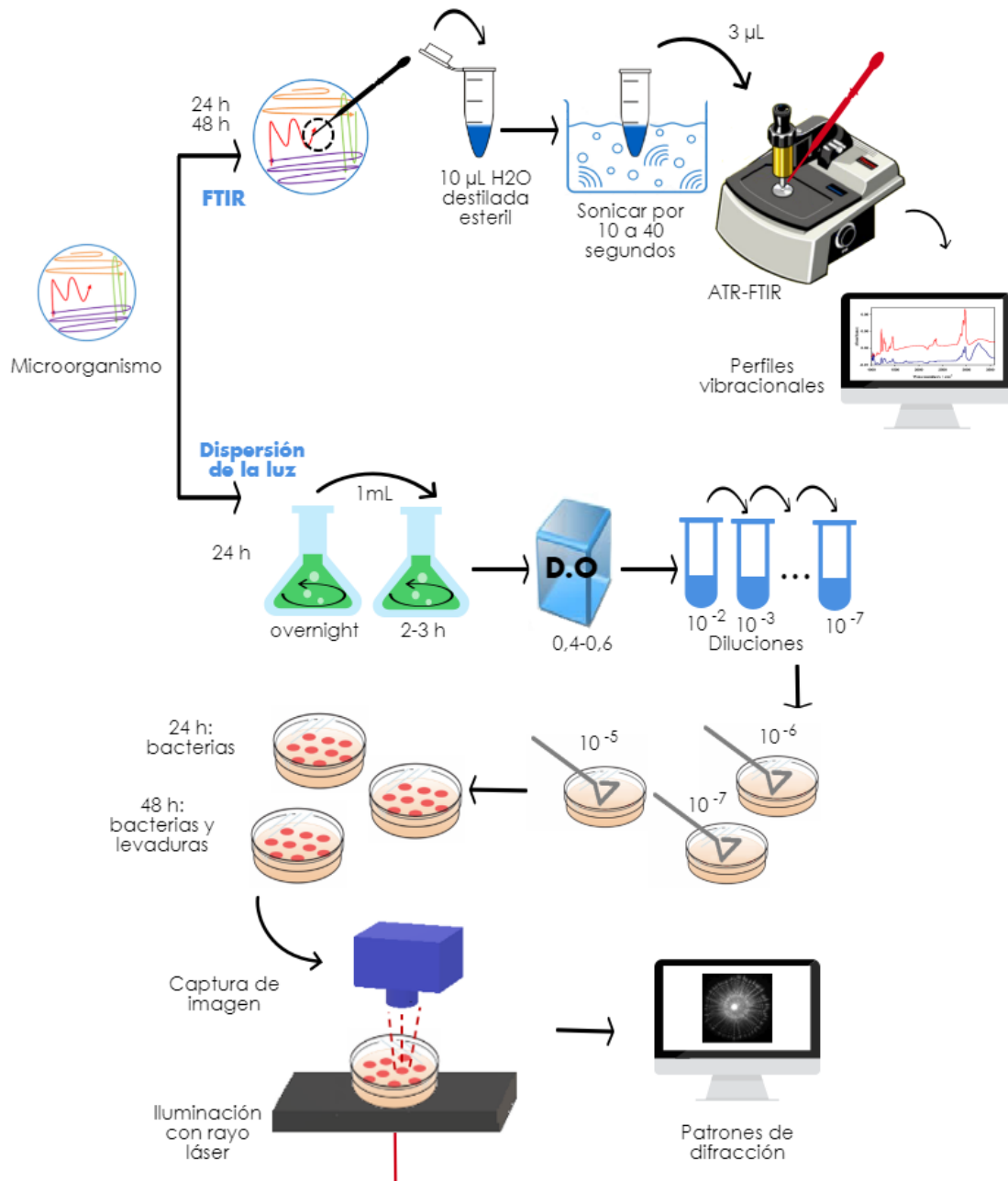


Figura 6. Esquema representativo de la preparación de los cultivos microbianos en colonias aisladas para la captura de imágenes por la técnica de la dispersión de la luz y espectroscopía FT-IR.

Análisis de espectros. Los perfiles vibracionales (espectros) generados fueron analizados por deconvolución en base a la segunda derivada del espectro, a cada espectro se le realizó la corrección de agua y dióxido de carbono. En caso de ser necesario, se realizó un suavizado de 13 a 21 puntos y ajuste de la línea base. Para todos los sectores del espectro compuesto por múltiples bandas se hizo necesario un procedimiento de ajuste de curva (*curve fitting*) por el método de mínimos

cuadrados usando bandas Gausianas y Lorentzianas (Galichet *et al.*, 2001), el cual permite descomponer en vibraciones individuales que pueden ser analizadas de forma particular. Los análisis se realizaron a través del software OPUS versión 7.5 (Bruker Optics GmbH, Germany).

Ventanas espectrales. Todos los espectros se compararon usando una preselección de cinco ventanas espectrales en el rango de 4000 - 400 cm^{-1} (ver figura 7), considerando su información específica y su poder discriminatorio, propuesta por Naumann y colaboradores (1991) (Álvarez Ordóñez *et al.*, 2002; Helm *et al.*, 1991):

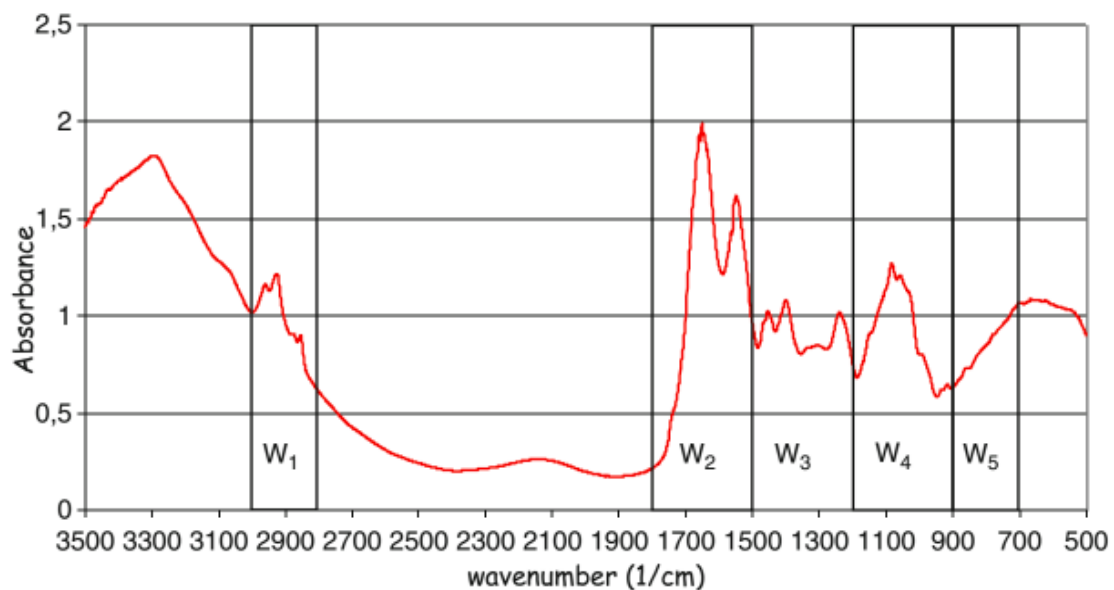


Figura 7. Espectro FTIR representativo (de 3500 - 500 cm^{-1}) de una muestra bacteriana. El espectro contiene cinco ventanas espectrales informativas: **W₁**: región de ácidos grasos (3000 - 2800 cm^{-1}), **W₂**: región amida (1800 - 1500 cm^{-1}), **W₃**: región mezcla (1500 - 1200 cm^{-1}), **W₄**: región de polisacáridos (1200 - 900 cm^{-1}) y **W₅**: región huella dactilar (900 - 700 cm^{-1}). Tomado de Álvarez Ordóñez *et al.* (2002).

1. La ventana entre 3000 - 2800 cm^{-1} (**W₁**: Región ácidos grasos) refleja la presencia de las vibraciones de estiramiento C - H de los grupos funcionales -CH₃, >CH₂ y ≡CH, los cuales son abundantes en los componentes de ácidos grasos de las membranas y en cadenas laterales de algunos aminoácidos.
2. La ventana entre 1800 - 1500 cm^{-1} (**W₂**: Región amida) está dominada por las bandas (muy intensas) producidas por los grupos amida I y amida II pertenecientes a proteínas y péptidos. Las bandas cerca a 1740 cm^{-1} son dadas por las vibraciones de estiramiento >C=O de los grupos funcionales ester en los lípidos. En esta región también puede ocurrir la absorción de ácidos nucleicos debido al estiramiento de >C=O, >C=N y >C=C< de la estructura heterocíclica del DNA o RNA.

3. La ventana entre 1500 - 1200 cm^{-1} (W_3 : Región mezclada) es una región espectral influenciada por los modos de flexión de los grupos $>\text{CH}_2$ y $-\text{CH}_3$ en proteínas, ácidos grasos y compuestos que contienen fosfatos.
4. La ventana entre 1200 - 900 cm^{-1} (W_4 : Región polisacáridos) revela la vibración de estiramiento simétrico de los grupos PO_2^- en ácidos nucleicos y el estiramiento de C-O-C y C-O-P, que muestra la presencia de carbohidratos y polisacáridos en la pared celular y también la influencia de ácidos nucleicos.
5. Finalmente, la ventana entre 900 - 700 cm^{-1} (W_5 : Región huella dactilar) muestra algunos patrones espectrales específicos de vibraciones de anillos de aminoácidos aromáticos (tirosina, triptófano, fenilalanina) y nucleótidos además de patrones no asignados a componentes celulares o a grupos funcionales.

Tabla 4. Algunas bandas asignadas frecuentemente encontradas en el espectro infrarrojo microbiano. Tomado de Álvarez Ordóñez *et al.* (2002).

Spectral window	Frequency (cm^{-1})	Assignment
w_1	3,500	O-H stretching of hydroxyl groups
	3,200	N-H stretching (amide A) of proteins
	2,955	C-H stretching (asymmetric) of $-\text{CH}_3$ in fatty acids
	2,959–2,852	CH, CH_2 , CH_3 in fatty acids
	2,930	C-H stretching (asymmetric) of $>\text{CH}_2$
	2,918	C-H stretching (asymmetric) of $>\text{CH}_2$ in fatty acids
	2,898	C-H stretching of C-H in methine groups
	2,870	C-H stretching (symmetric) of $-\text{CH}_3$
w_2	2,850	C-H stretching (symmetric) of $>\text{CH}_2$ in fatty acids
	1,740	$>\text{C}=\text{O}$ stretching of esters
	1,715	$>\text{C}=\text{O}$ stretching of carbonic acid
	1,680–1,715	$>\text{C}=\text{O}$ in nucleic acids
	1,695, 1,685, 1,675	Amide I from β -turns of proteins
	1,655–1,637	Amide I bands, of α -helical structures and β -pleated sheet structures
	1,548	Amide II band
	1,550–1,520	Amide II band
w_3	1,515	“Tyrosine” band
	1,468	C-H deformation of $>\text{CH}_2$
	1,400	C=O stretching (symmetric) of COO^-
w_4	1,310–1,240	Amide III band components of proteins
	1,250–1,220, 1,084–1,088	P=O stretching (asymmetric) of PO_2^- phosphodiester
	1,200–900	C–O–C, C–O of ring vibrations of carbohydrates
w_5	1,090–1,085	P=O stretching (symmetric) of $>\text{PO}_2$
	720	C-H rocking of $>\text{CH}_2$
	900–600	“Fingerprint” region

En la tabla 4 se muestran las asignaciones vibracionales que se han asignado a las bandas más frecuentes en un espectro IR microbiano, en donde las frecuencias

corresponden a grupos funcionales presentes en las membranas. Esta tabla permite comparar las vibraciones obtenidas por FT-IR de muestras de microorganismos.

Técnica Dispersión de la luz

Estandarización del medio de cultivo. Para los análisis de dispersión de la luz, se analizó el grosor del medio de cultivo, agregando 15 y 20 mL de agar, además del material de la caja de *Petri* (plástico y vidrio) que mejor permitiera la difracción de la luz.

Preparación de la muestra. A partir de las colonias previamente aisladas en la sección *inoculación y siembra* (segundo pase), se tomó una colonia de cada microorganismo y se inoculó en caldo de cultivo LB, YM, MRS y M17 según sea el caso. Se incubó toda la noche (cultivo *overnight* entre 18 a 20 horas aproximadamente) en agitación continua, a temperatura de 37°C. Se inoculó 1 mL de cada caldo de cultivo en un nuevo caldo de medio estéril y se incubó entre 2 y 3 horas en agitación constante a 37°C. Durante este tiempo, los cultivos alcanzaron una absorbancia óptica entre 0,4 - 0,6 y a partir de éste cultivo se realizaron diluciones seriadas (hasta 10^{-7}), según previa estandarización. Las últimas diluciones del cultivo se sembraron en superficie, entre 10 a 20 μ L, con asa digralsky en las placas de agar de LB, YM, MRS y M17 con el fin de obtener entre 10 a 30 colonias individuales por placa. Se incubaron a 37°C por 24 y 48 horas para bacterias y 30°C a 48 horas para levaduras y bacterias ácido lácticas (ver figura 6).

Medición colonias de microorganismos. Las colonias aisladas de bacterias y levaduras en los medios de cultivos, después de 24 y 48 horas de crecimiento, se iluminaron de manera individual con un haz de luz (rayo láser) coherente de frente de onda plano de entre 1 y 2 mm de diámetro, de 633 nm de longitud de onda (rojo). La alineación entre dicho haz de iluminación y la posición de cada colonia se obtuvo ubicando la respectiva caja de *Petri* en un microposicionador mecánico que permitió el desplazamiento horizontal en el plano XY. Los patrones de difracción de la luz de cada colonia se capturaron con una cámara digital CMOS monocromática modelo DCC 1545D (Thorlabs Inc., Newton, USA) como es descrito en el Anexo 1, tomando una imagen por cada colonia, obteniendo un promedio de 20 imágenes por caja (ver figura 6).

Análisis de patrones de difracción. Con el propósito de determinar el análisis cuantitativo de los patrones de difracción de cada colonia, de cada imagen tomada, se realizaron tres procesos. En el primer proceso, la idea general es convertir la imagen en un conjunto de números que represente unívocamente dicha imagen y que luego ese conjunto de números pueda ser usado para distinguir, categorizar, segregar y agrupar los diferentes patrones de difracción obtenidos para las colonias estudiadas. Para este primer proceso se decidió realizar un *análisis de textura*, la

cual genera una *lista de parámetros de textura* basado en un método de binarización con el algoritmo SFTA (Análisis de Texturas Fractal basado en Segmentación, por sus siglas en inglés) desarrollado por Alceu Ferraz Costa y colaboradores (2012, 2013) (Universidad de Sao Paulo, Brasil), el cual se basa en descomponer cada imagen que originalmente está en una escala de 255 niveles de grises, convirtiéndolas en un conjunto de imágenes binarias; a partir de estas imágenes binarias se calcula el número de píxeles blancos (A: área), el promedio de píxeles (P: blancos y negros) y la dimensión fractale (DF) de la imagen, construyendo de esta forma la lista de parámetros numéricos que va a representar la imagen original de difracción (Costa *et al.*, 2012, 2013). Un ejemplo de este proceso se representa en la figura 8, la cual muestra una imagen de difracción de una colonia (presentada en colores falsos) fraccionada para ser procesada en 2 niveles de corte (parámetro $nb=2$), con lo cual se tienen 3 zonas de binarización, calculando para cada una los parámetros de DF, A y P. Este proceso de análisis de textura se realizó para diferentes niveles de corte nb ($nb=1,2,\dots,6$), que permitió tener diferentes conjuntos de números identificativos de cada imagen, cada uno con un número distinto de parámetros ($nb*6-3$). Para el ejemplo de la figura 8 se tiene un conjunto de 9 números asociados o identificativos del patrón de difracción de la colonia en estudio.

Posteriormente, en una segunda fase se *entrenó dos clasificadores de texturas: Naive Bayes Statistics* (prueba paramétrica y no paramétrica) y *Decision Tree* con la lista de parámetros obtenidos en la fase anterior (A, P y DF), lo que se hace para lograr catalogar por similitud o diferencias las imágenes de cada microorganismo analizado. Estos clasificadores son, en realidad, modelos estadísticos que se alimentan de todos los conjuntos de números (parámetros) extraídos del análisis de texturas que identifican a cada una de las imágenes de difracción de todas las colonias sembradas y procesadas para construir la base de datos de referencia de este estudio.

En la tercera fase, con el clasificador ya entrenado, se generó un *identificador*, el cual obtuvo una nueva lista de parámetros a partir del algoritmo SFTA al introducir una imagen de difracción sin identificar para que ésta pueda ser contrastada con la base de datos creada por los clasificadores en la fase anterior. Estos análisis de textura de las imágenes de las colonias de bacterias y levaduras obtenidas se procesaron utilizando el software Matlab (versión 2011, Matworks Inc.).

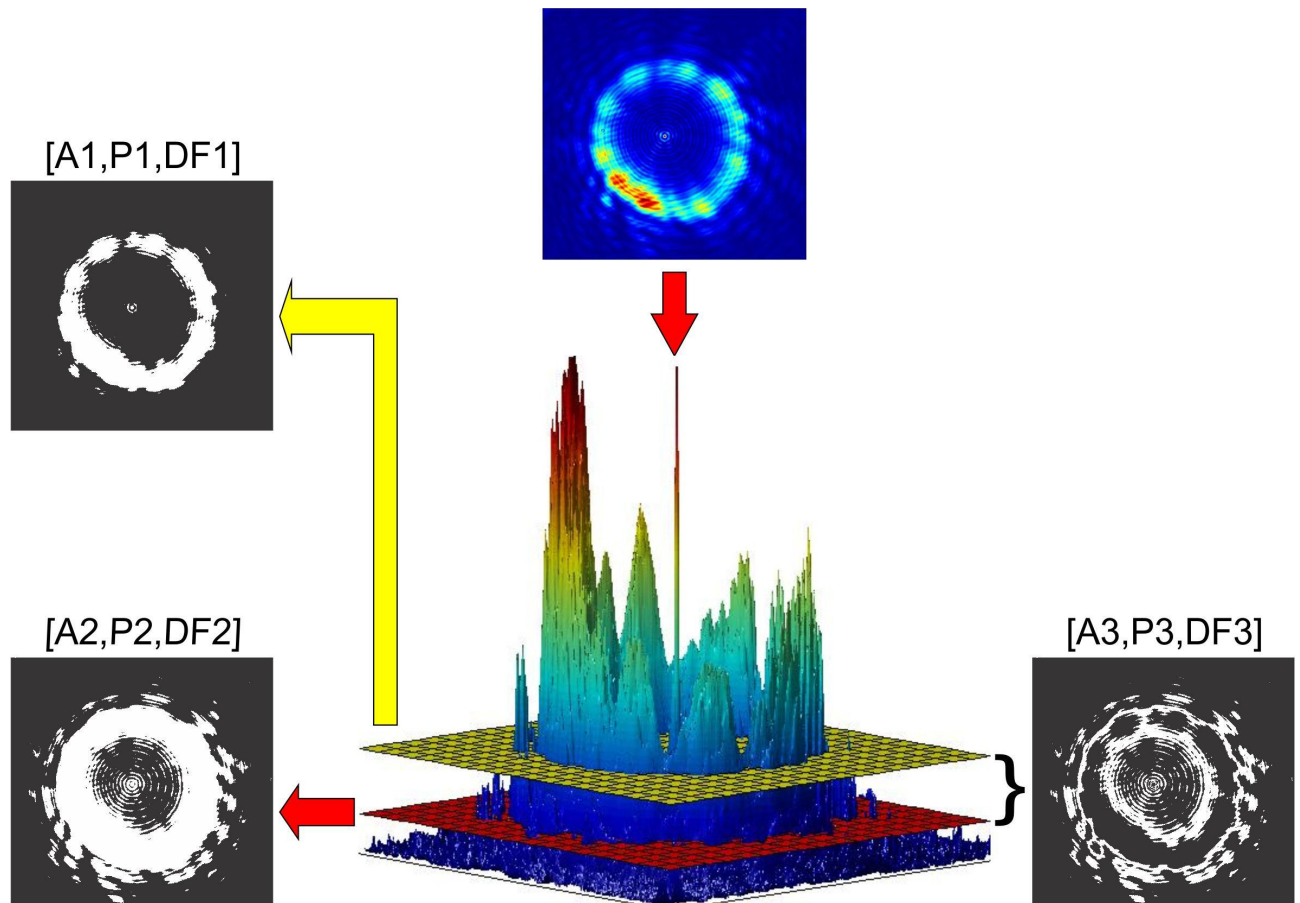


Figura 8. Representación tridimensional de una imagen de difracción típica de una colonia, la cual muestra los planos de los cortes en tres niveles ($nb=2$), para los cuales se realiza el proceso de binarización y posteriormente se sacan los parámetros de DF, P y A.

Prueba de ciego

Con el fin de corroborar los resultados obtenidos de los perfiles vibracionales por la técnica de espectroscopía FT-IR y los patrones de difracción por la técnica de dispersión de la luz de los microorganismos de estudio, se realizó una prueba de ciego en la que se tuvo en cuenta un total de 13 microorganismos, donde 10 de ellos pertenecían a los microorganismos ya analizados (base de datos) y los 3 microorganismos restantes eran desconocidos (no analizados en estudio). Éste procedimiento fue aleatorizado para los 13 microorganismos, tanto al tiempo de medición como de las repeticiones de cada microorganismo. Para dicha prueba, el proceso se realizó por una persona entrenada pero no vinculada al proyecto de investigación para garantizar un proceso ciego en la investigación y se llevó a cabo bajo las mismas condiciones de preparación de muestra y medición de microorganismos diseñado para cada técnica, descritos anteriormente.

Base de datos de patrones difractivos y biblioteca de espectros vibracionales

La base de datos se alimentó con las imágenes de los patrones difractivos y la biblioteca de FT-IR con los perfiles de espectros vibracionales obtenidos en este estudio. Se tuvo en cuenta características morfológicas de las colonias de microorganismos por análisis de imágenes según lo descrito por Rajwa y colaboradores (2008), Robinson y colaboradores (2011), Arango y colaboradores (2013), a través de los parámetros extraídos del análisis de textura (como ya fue descrito en la sección de Materiales y Métodos: *Análisis de patrones de difracción de la Técnica Dispersión de la luz*) y He y colaboradores (2015); y de las bandas de los espectros vibracionales caracterizados por las propiedades químicas de los compuestos orgánicos presentes en los microorganismos según Norris (1959), Erukhimovitch y colaboradores (2005) y Barth y colaboradores (2007). Finalmente se cuenta con un método de análisis de textura basado en la extracción de conjuntos de 3 parámetros (A, P y DF) para hacer la identificación óptica y de 3 regiones del espectro para hacer el análisis por el método de FT-IR.

Resultados

Caracterización microbiológica y molecular

Las bacterias ácido lácticas *L. lactis*, *S. infantarius*, *L. plantarum* y la levadura *S. cerevisiae* dadas por el grupo de Biotransformación de la Escuela de Microbiología ya contaban con su identificación bioquímica y molecular. En tanto, los resultados de la identificación molecular para todos los microorganismos nos permitieron confirmar con mas del 98% de similitud que estos aislados pertenecen al género y especie correspondiente, como muestra la tabla 5.

Tabla 5. Resultados de pruebas bioquímicas, tinción de Gram y molecular de los microorganismos de estudio.

Microorganismos	Tinción Gram	Prueba oxidasa	Prueba catalasa	Prueba API 20E (24h)	% de Identidad molecular
<i>Escherichia coli</i>	Bacilo, Gram negativo	negativo	positivo	<i>Escherichia coli</i> % ID 98,1	99,85% relacionado con <i>E. coli</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	Coco, Gram positivo	negativo	positivo	NA	100% relacionado con <i>S. aureus</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Bacilo, Gram negativo	negativo	positivo	<i>Enterobacter aerogenes</i> % ID 52,8	99,68% relacionado con <i>E. aerogenes</i>
<i>Bacillus cereus</i>	Bacilo, Gram positivo	negativo	positivo	NA	99,9% relacionado con <i>B. cereus</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NA	NA	NA	NA	98% relacionada con <i>S. cerevisiae</i>

Otras características tintoriales y bioquímicas están disponibles en las tablas 5 y 6, como resultados acordes con los rasgos fisiológicas de cada microorganismo. Con esta información podemos apreciar (tabla 5) como los resultados arrojados entre las pruebas bioquímicas y moleculares muestran discrepancia entre ellas, especialmente para *E. aerogenes*, donde la prueba bioquímica lo identificó con un 52,8% y la molecular con un 99,7% (tabla 5).

Tabla 6. Descripción de las colonias en medio agar de los microorganismos seleccionados para medición de colonias por técnica de dispersión de la luz y espectroscopía FT-IR.

Microorganismos	Medio agar	Características colonia
<i>Escherichia coli</i>	Luria-Bertani (LB)	Colonias redondas con borde liso-continuo, superficie suave y aspecto húmedo, brillantes, traslúcidas.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Luria -Bertani (LB)	Colonias redondas, lisas y de tamaño pequeño a mediano (puntiformes), de color blanco (en ocasiones presenta color amarillo), cremosas y brillantes.
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Luria-Bertani (LB)	Colonias blancas a traslúcidas, lisas, redondas, convexas, de aspecto mucoide.
<i>Bacillus cereus</i>	Luria-Bertani (LB)	Colonias grandes, planas, de forma circular a irregular, con bordes lobulados (ondulado), su apariencia parece ser seca, color mate.
<i>Lactococcus lactis</i>	M17	Colonia redonda de color blanco, entre 1 a 2 mm de diámetro, de aspecto cremoso, con superficie convexa a compacta y bordes enteros (características generales de las BAL).
<i>Streptococcus infantarius</i>	MRS	Colonia pequeña, redonda de color blanco, entre 1 a 2 mm de diámetro, de aspecto cremoso, con superficie convexa y bordes enteros (características generales de las BAL).
<i>Lactobacillus plantarum</i>	MRS	Colonia pequeña, redonda de color blanco a beige opaca, puntiforme, entre 1 a 2 mm de diámetro, de aspecto cremoso, con superficie convexa y bordes enteros y consistencia húmeda suave (características generales de las BAL).
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Yeast Mold (YM)	Colonias esféricas, convexas, lisas, húmedas, cremosas y opacas, con colores que van desde el blanco a color crema.
<i>Rhodotorula sp.</i>	Yeast Mold (YM)	Colonias esféricas de color rojo o rosa coral-naranja (pigmentos carotenoides), suave, lisas, húmedas y en ocasiones de aspecto mucoide.

Identificación por espectroscopia FT-IR

Los espectros FT-IR de los 9 microorganismos evaluados, entre bacterias y levaduras, se registraron en la región de 4000 a 400 cm^{-1} del espectro IR en dos tiempos de crecimiento: 24 y 48 horas. Dado que los espectros contienen la información de todos los componentes celulares: pared celular, membranas, lípidos,

proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos, etc., existe una enorme complejidad de señales que se reflejan en el número, posición, intensidad y amplitud de bandas (Naumann *et al.*, 1988). De manera general, los espectros de las bacterias presentan una forma similar entre ellos, sin embargo, si se observa en detalle hay variaciones importantes entre microorganismos en la región espectral de 1180 - 950 cm^{-1} de cada uno de los espectros (hace parte de la ventana espectral W_4), por lo que nos enfocaremos en esta ventana en particular (ver anexo 2, figuras 21 a 29).

Los microorganismos se agruparon de acuerdo al criterio de clasificación microbiológica por la composición de la pared celular para bacterias: **Gram negativos** y **Gram positivos** y otra agrupación para **levaduras**. En las figuras 9 y 10 se muestran los espectros de las bacterias Gram negativas: ***E. aerogenes*** y ***E. coli*** a las 24 y 48 horas respectivamente. A nivel general, los espectros IR de estas bacterias en los dos tiempos medidos no muestran cambios muy significativos (en intensidad y bandas), exceptuando una de las cepas de *E. aerogenes*, la cual mostró una banda a 1056 cm^{-1} , después de realizar el *Curve Fitting* en la región entre 1180 - 950 cm^{-1} con un error residual de 0.002060, en el espectro correspondiente a 48 horas.

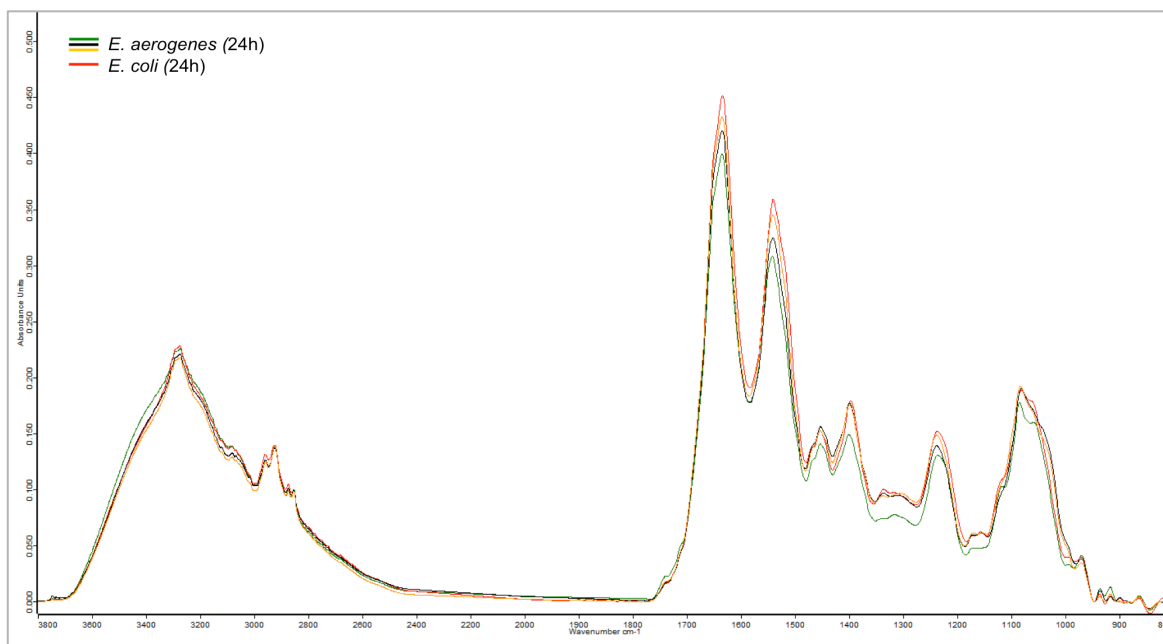


Figura 9. Espectros de bacterias Gram negativas registrados a las 24 horas de crecimiento.

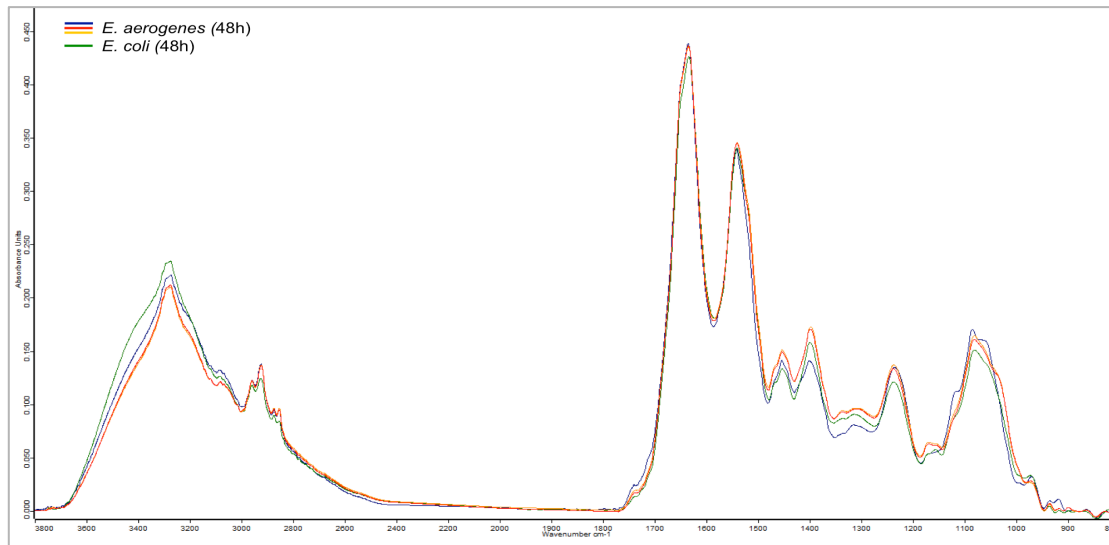


Figura 10. Espectros de bacterias Gram negativas registrados a las 48 horas de crecimiento.

En las bacterias Gram positivas: *B. cereus* y *S. aureus*, los espectros a 24 y 48 horas (figuras 11 y 12 respectivamente) muestran que hay diferencias en la forma del espectro y las bandas características de ambos microorganismos en la región $1180 - 950 \text{ cm}^{-1}$. A las 48 horas se muestra una variación notoria en la forma del espectro de *S. aureus* respecto al espectro generado a las 24 horas (*Curve Fitting* con un error residual de 0.00158) mostrando que la banda a 1053 cm^{-1} aumentó su intensidad, mientras que *B. cereus* mantuvo la forma del pico en esa misma región en ambos tiempos medidos.

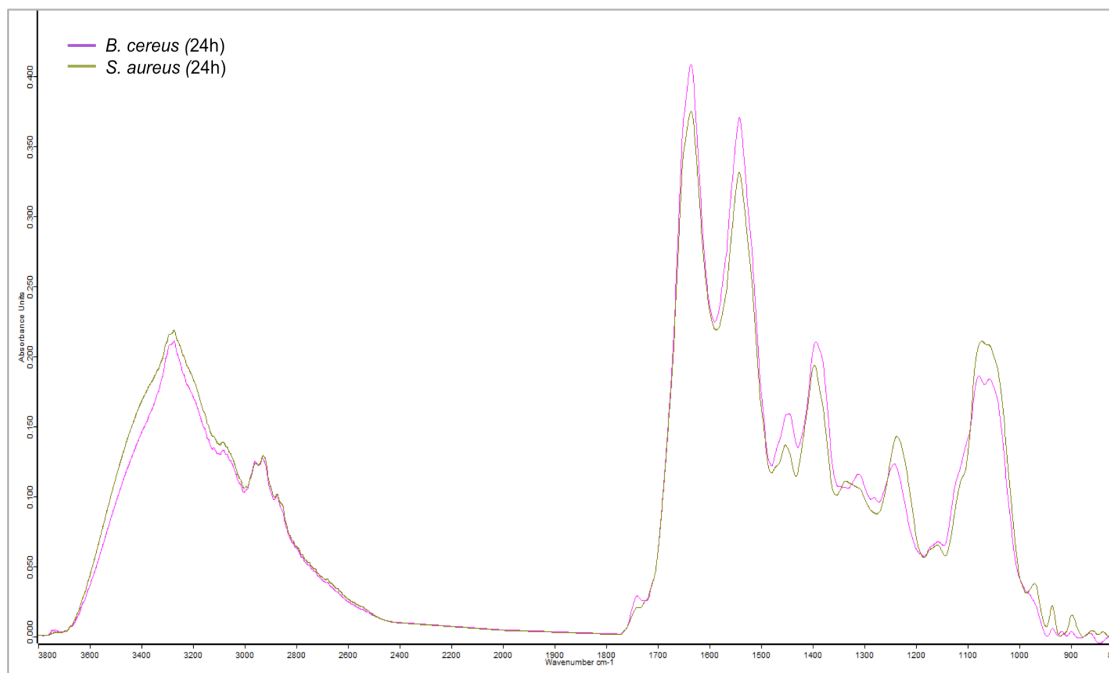


Figura 11. Espectros de bacterias Gram positivas (*B. cereus* y *S. aureus*) registrados a las 24 horas de crecimiento.

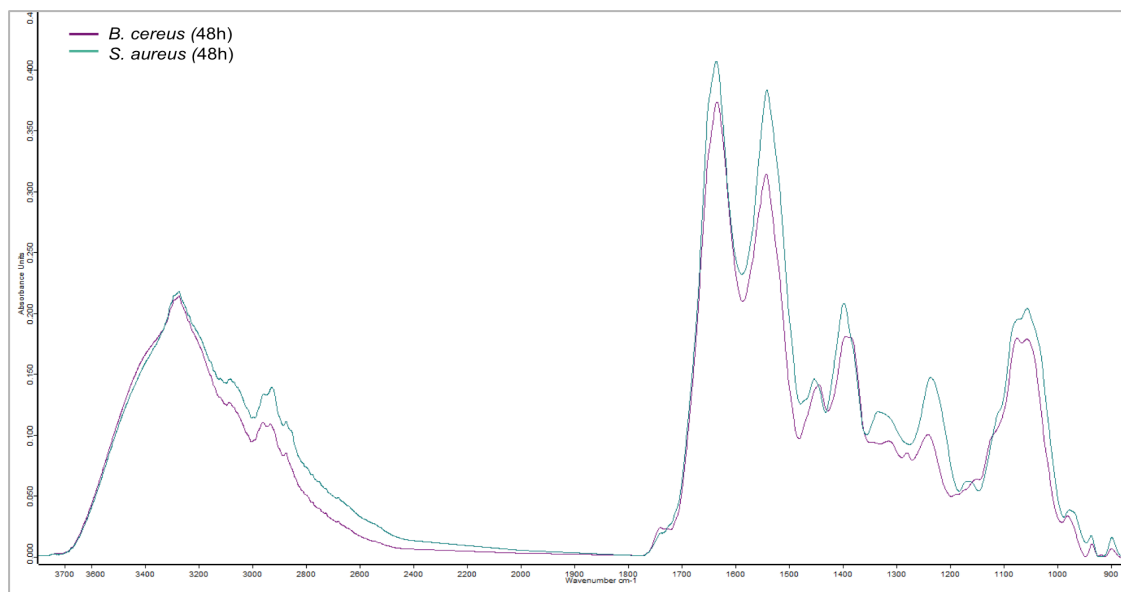


Figura 12. Espectros de bacterias Gram positivas (*B. cereus* y *S. aureus*) registrados a las 48 horas de crecimiento.

Para las bacterias ácido lácticas (Gram positivas) medidas a las 48 horas, los espectros correspondientes a *L. lactis* 25-2 y 34-3 son muy similares, sin embargo, para la cepa *L. lactis* 25-2 la banda 1053 cm^{-1} genera una señal más intensa (*Curve Fitting* con un error residual de 0.001277), como se observa en la figura 26 del anexo 2. Los espectros de *S. infantarius* 31-2, 46-3 y 51-3 si bien tienen una tendencia espectral similar entre ellos, la cepa *S. infantarius* 31-2 mostró en la región $1180 - 950\text{ cm}^{-1}$ diferencias importantes en la intensidad de los picos de las bandas, en comparación con las otras dos cepas (ver anexo 2, figura 27), ya que en ésta hay una banda a $933,7\text{ cm}^{-1}$ que no está presente en las otras dos cepas, además de su banda más intensa a 1057 cm^{-1} . Por tanto, la cepa *S. infantarius* 51-3 tiene una banda particular a $986,9\text{ cm}^{-1}$, mientras que *S. infantarius* 46-3 presenta una banda en $944,5\text{ cm}^{-1}$ y su banda más intensa está localizada a 1052 cm^{-1} .

A diferencia de los anteriores microorganismos, los espectros de las bacterias ácido lácticas, *L. plantarum* 60-1, 62-1, 64-1 y 66-1 muestran tres bandas características a 1075 , 1032 y 990 cm^{-1} (ver anexo 2 figura 28). La figura 13 muestra los espectros de las bacterias gram positivas *B. cereus* y *S. aureus*, *L. lactis* 25-2 y 34-3, *S. infantarius* 31-2, 46-3 y 51-3, *L. plantarum* 60-1, 62-1, 64-1 y 66-1 a las 48 horas, observándose diferencias que pueden ser utilizadas para la identificación de estas especies bacterianas en la región espectral $1180 - 950\text{ cm}^{-1}$. Al igual que en las bacterias, de manera general, los espectros de las levaduras *S. cerevisiae* y *Rhodotorula* sp. presentan forma similar entre ellas, además de una leve semejanza a los espectros de bacterias, sin embargo, en la región espectral $1180 - 950\text{ cm}^{-1}$ también se presentan variaciones entre levaduras, además que estas bandas son más intensas para las levaduras que para bacterias, como se ve en la figura 14.

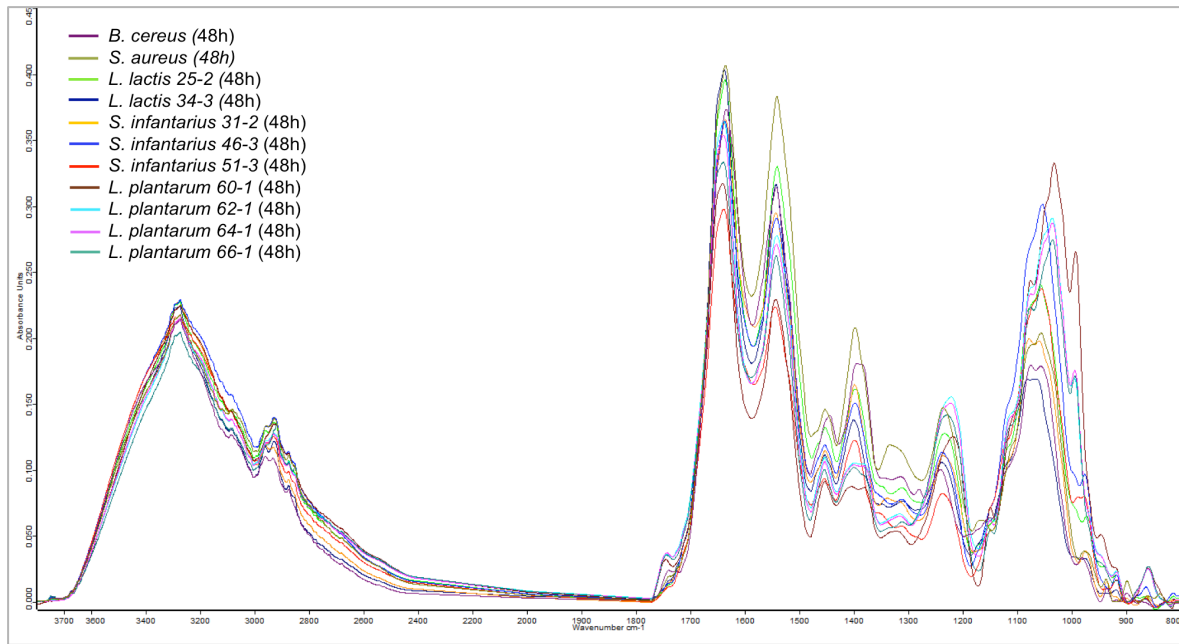


Figura 13. Espectros de bacterias Gram positivas (*B. cereus*, *S. aureus*, *L. lactis* 25-2 y 34-3, *S. infantarius* 31-2, 46-3 y 51-3, *L. plantarum* 60-1, 62-1, 64-1 y 66-1) a las 48 horas de crecimiento.

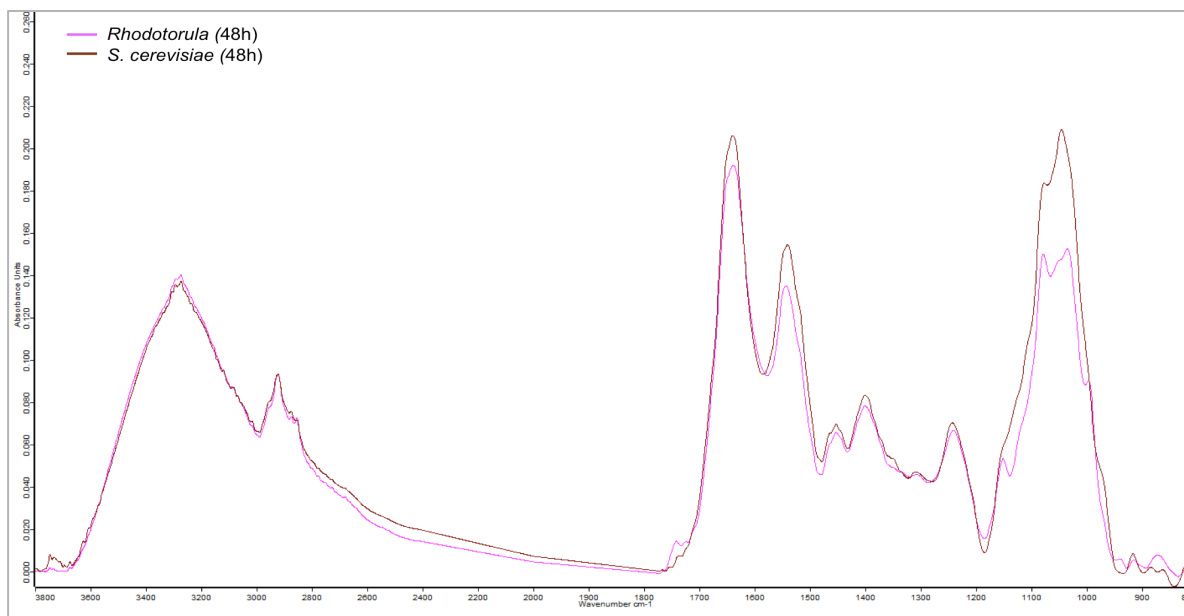


Figura 14. Espectros de levaduras *S. cerevisiae* y *Rhodotorula* sp. registrados a las 48 horas de crecimiento.

El espectro de *S. cerevisiae* presenta una banda intensa en 1044 cm^{-1} y otra con menor intensidad en 1080 cm^{-1} . Mientras que para *Rhodotorula* sp. las mismas bandas presentan una menor intensidad a 1029 y 1078 cm^{-1} , además se presentan dos bandas adicionales ubicadas a 990 y 1148 cm^{-1} . Esto permite ver diferencias entre los espectros de levaduras.

Identificación por Dispersión de la luz

Para los análisis de dispersión de la luz fue necesario estandarizar el volumen del medio de cultivo y el material de la caja de petri, ya que éstos presentan un efecto significativo en la difracción de la luz láser. La caja de petri de plástico y un volumen de 15 mL de agar presentaron menor interferencia en el paso de la luz con patrones más diferenciados de cada colonia en comparación con la caja petri de vidrio y un volumen de agar de 20 ml.

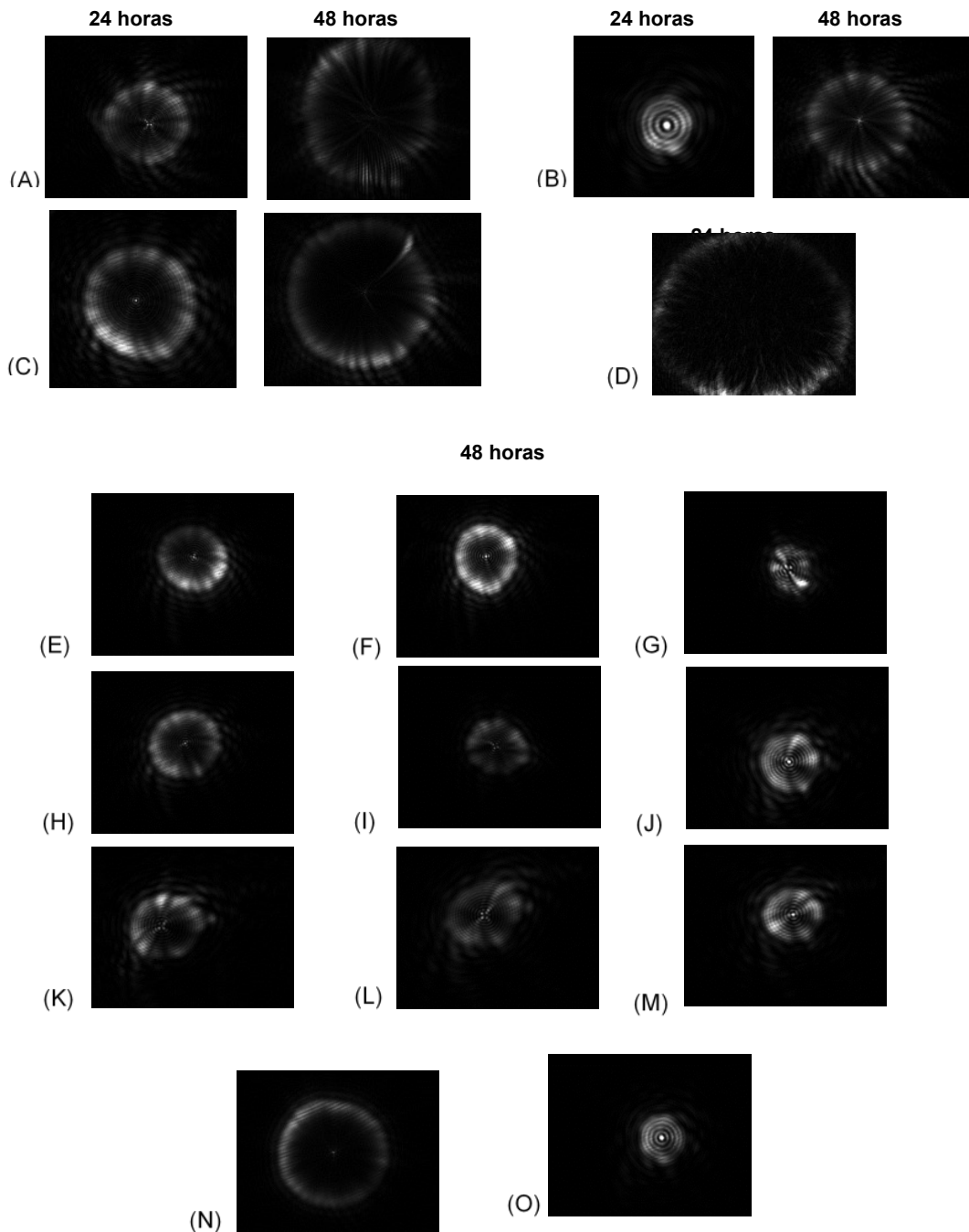


Figura 15. Imágenes representativas de patrones de difracción a 24 y 48 horas de: (A) *E. coli*; (B) *S. aureus*; (C) *E. aerogenes*; (D) *B. cereus*; y a 48 horas (E) *L. lactis* 25-2; (F) *L. lactis* 34-3; (G) *S. infantarius* 31-2; (H) *S. infantarius* 46-3; (I) *S. infantarius* 51-3; (J) *L. plantarum* 60-1; (K) *L. plantarum* 62-1; (L) *L. plantarum* 64-1; (M) *L. plantarum* 66-1; (N) *S. cerevisiae* y (O) *Rhodotorula* sp.

En cada caja de petri, se obtuvieron en promedio entre 10 a 40 colonias y se tomaban alrededor de 30 imágenes por microorganismo. Los patrones de difracción representativos de las bacterias *E. coli*, *S.aureus*, *E. aerogenes*, *B. cereus*, *L. lactis*, *S. infantarius*, *L. plantarum* y las levaduras *S. cerevisiae* y *Rhodotorula* sp. medidos a las 24 y 48 horas (según el caso) se muestran en la figura 15. Al comparar los patrones de dispersión de estos microorganismos puede observarse bajo un análisis visual que los patrones son similares entre ellos por estas características en común: punto central brillante, anillos concéntricos (patrón de Airy), radios radiales y puntos difusivos con varios ángulos medios (Banada *et al.*, 2007), según el método de clasificación *Naive Bayes Statistics* para buscar similitudes, como se explicó en la sección de Materiales y Métodos -*Análisis de patrones de difracción*.

El patrón de dispersión de la mayoría de las colonias medidas de cada microorganismo muestra una serie de patrones circulares, con un anillo (o punto) más brillante en el centro, además de estructuras radiales que se extienden hacia fuera. La forma, tamaño, estructura y color de la colonia bacteriana dependen no solo de las especies de bacteria, sino también de varios factores ambientales como condiciones de crecimiento, tales como: tipo de medio de nutriente, temperatura y humedad en la superficie de los medios, entre otros. La composición química del medio nutritivo ha mostrado que tiene un efecto en el metabolismo de los microorganismos y por ende, éste afecta la forma de la colonia bacteriana, además que influye significativamente en las propiedades de transmisión (Buzalewicz *et al.*, 2011). Todos estos parámetros son tomados en consideración en el procedimiento de identificación de especies bacterianas; algo similar sucede al medirse los microorganismos en FT-IR, puesto que se sabe que al cambiar o variar sus condiciones de cultivo se ven reflejados en variaciones de los espectros.

Para el análisis de las imágenes de difracción se utilizó el software Matlab con el fin de generar la información de textura de cada imagen tomada de cada colonia de todos los microorganismos y así crear las bases de datos. Estas bases de datos se hicieron en dos tiempos: 24 y 48 horas, y se tuvo en consideración los 9 microorganismos (y cepas respectivas) de la tabla 3, además de un microorganismo aislado de suelo, de textura cremosa y coloración rosa (nombrado como "Rosada", no identificado), como lo muestra la **base de datos 1 y 3** (24 horas) y **2 y 4** (48 horas) descritas en la tabla 7. Las bases de datos 3 y 4 se crearon con la misma información de las bases de datos 1 y 2, con la única diferencia de que las distintas cepas de *L. lactis*, *L. plantarum* y *S. infantarius* se unieron bajo un solo nombre, con el fin de analizar la posible falta de discriminación de la técnica para distinguir dichas cepas y de este modo intentar la disminución en el error en la identificación de microorganismos.

Tabla 7. Microorganismos seleccionados para la creación de las bases de datos a 24 y 48 horas. Las bases de datos 3 y 4 es la unión de las cepas de *L. lactis*, *L. plantarum* y *S. infantarius* en un solo nombre.

Base Datos 1: 24 horas	Base Datos 2: 48 horas	Base Datos 3: 24 horas	Base Datos 4: 48 horas
<i>E. aerogenes</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>E. aerogenes</i>
<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
<i>L. lactis</i> 25-2	<i>L. lactis</i> 25-2	<i>L. lactis</i>	<i>L. lactis</i>
<i>L. lactis</i> 34-3	<i>L. lactis</i> 34-3	<i>S. Infantarius</i>	<i>S. Infantarius</i>
<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> (2)	<i>Rhodotorula</i> sp.	<i>Rhodotorula</i> sp.
<i>Rhodotorula</i> sp.	<i>Rhodotorula</i> sp.	Rosada	Rosada
<i>L. plantarum</i> 60-1	<i>L. plantarum</i> 60-1	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>
<i>L. plantarum</i> 62-1	<i>L. plantarum</i> 62-1	<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>
<i>L. plantarum</i> 64-1	<i>L. plantarum</i> 64-1	<i>B. cereus</i> (15h)	<i>S. cerevisiae</i> (48h)
<i>L. plantarum</i> 66-1	<i>L. plantarum</i> 66-1		<i>S. cerevisiae</i> (72h)
Rosada	Rosada		
<i>B. cereus</i> (15h)	<i>S. Infantarius</i> 46-3		
<i>S. Infantarius</i> 46-3	<i>S. Infantarius</i> 51-3		
<i>S. Infantarius</i> 51-3	<i>S. Infantarius</i> 31-3		
	<i>S. cerevisiae</i> (48h)		
	<i>S. cerevisiae</i> (72h)		

Es importante anotar que las colonias de *B. cereus* a las 48 horas tienen un radio mayor al que la cámara CMOS puede abarcar, por tanto, no hay mediciones de los patrones de difracción de este microorganismo en este tiempo. Además, la levadura *S. cerevisiae* solo muestra colonias más definidas después de 48 horas, por tanto a las 24 horas no hay patrones de difracción de las colonias de este microorganismo. Así mismo, hay que tener en cuenta que las bacterias ácido lácticas (*L. lactis*, *L. plantarum* y *S. infantarius*) han mostrado mejor formación de colonias luego de 48 horas, por tanto solo se tendrá en cuenta este tiempo para el análisis de las mismas (sin importar que a las 24 horas hayan registros en las bases de datos).

Además de las bases de datos 1 a 4 ya descritas, se crearon otras bases de datos a partir de las primeras, en las cuales se retiraron (ya que aumentaban el ruido en la identificación) y se adicionaron a la lista otros microorganismos previamente medidos (tabla 8 y 9), con el fin de ver qué predictor o predictores del clasificador (o sistemas de clasificación) presentaba(n) menor error cuando se identificaban las imágenes.

Para la creación de las distintas bases de datos se requirió inicialmente la **construcción del clasificador de texturas** a partir de las *listas de parámetros de textura* previamente obtenidas para cada imagen (listas de nb*6-3 parámetros, con nb=1,2,...,6, como se explicó en la sección de *Análisis de patrones de difracción* en Materiales y métodos), empleando para ello dos *clasificadores de textura*, *Naive*

Bayes Statistics (Paramétrica y No Paramétrica) y Decision Tree, para todas las bases de datos creadas (1 a 12), con el fin de tener las herramientas necesarias para proceder a identificar las imágenes de cada microorganismo.

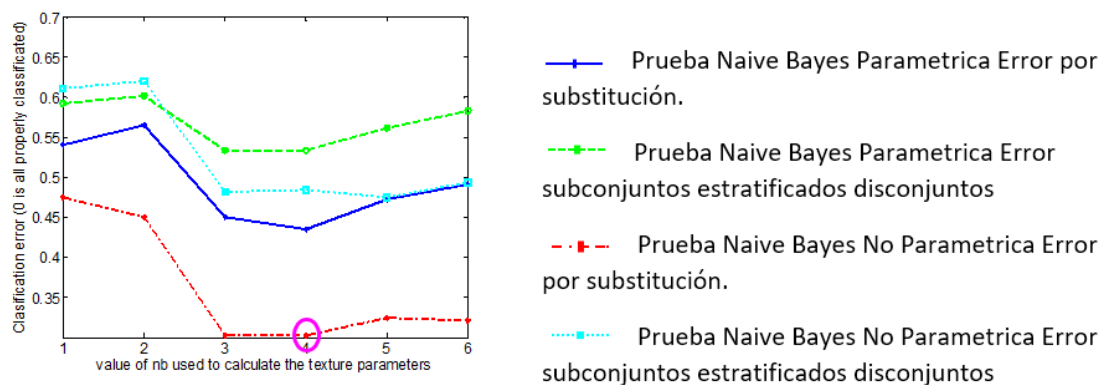
Tabla 8. Microorganismos seleccionados para la creación de las bases de datos 5 a 8 a 24 y 48 horas, de la cual se retiró de las bases de datos 1 a 4 el microorganismo *E. aerogenes*.

Sin <i>E. aerogenes</i>			
Base Datos 5: 24 horas	Base Datos 6: 48 horas	Base Datos 7: 24 horas	Base Datos 8: 48 horas
<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
<i>L. lactis</i> 25-2	<i>L. lactis</i> 25-2	<i>L. lactis</i>	<i>L. lactis</i>
<i>L. lactis</i> 34-3	<i>L. lactis</i> 34-3	<i>S. Infantarius</i>	<i>S. Infantarius</i>
<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Rhodotorula</i> sp.	<i>Rhodotorula</i> sp.
<i>Rhodotorula</i> sp.	<i>Rhodotorula</i> sp.	Rosada	Rosada
<i>L. plantarum</i> 60-1	<i>L. plantarum</i> 60-1	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>
<i>L. plantarum</i> 62-1	<i>L. plantarum</i> 62-1	<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>
<i>L. plantarum</i> 64-1	<i>L. plantarum</i> 64-1	<i>B. cereus</i> (15h)	<i>S. cerevisiae</i> (48h)
<i>L. plantarum</i> 66-1	<i>L. plantarum</i> 66-1		<i>S. cerevisiae</i> (72h)
Rosada	Rosada		
<i>B. cereus</i> (15h)	<i>S. Infantarius</i> 46-3		
<i>S. Infantarius</i> 46-3	<i>S. Infantarius</i> 51-3		
<i>S. Infantarius</i> 51-3	<i>S. Infantarius</i> 31-2		
	<i>S. cerevisiae</i> (48h)		
	<i>S. cerevisiae</i> (72h)		

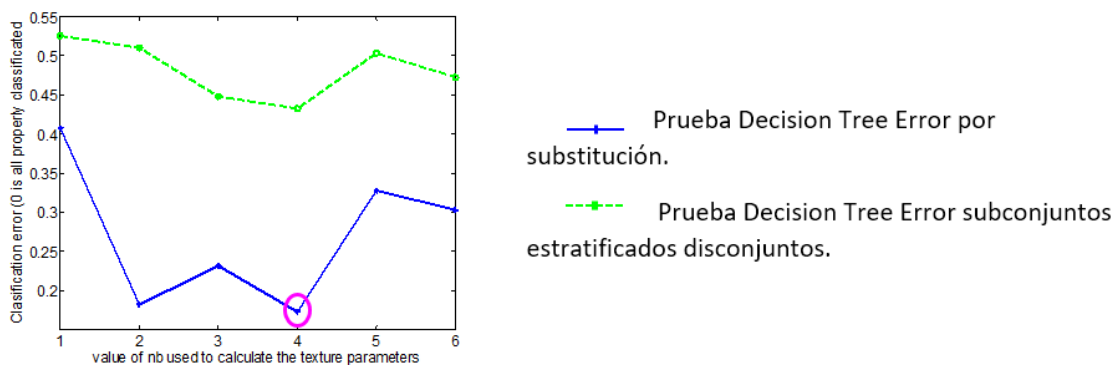
Tabla 9. Microorganismos seleccionados para la creación de las bases de datos 9 a 12 a 24 y 48 horas, de la cual se adicionaron a las bases de datos 1 a 4 los microorganismos *L. monocytogenes* (24 y 48horas), *B. subtilis* (sólo 24 horas), *A. baumannii* (sólo 24 horas) y *C. albicans* (sólo 48horas).

Incorporación de microorganismos			
Base Datos 9: 24 horas	Base Datos 10: 48 horas	Base Datos 11: 24 horas	Base Datos 12: 48 horas
<i>E. aerogenes</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>E. aerogenes</i>
<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
<i>L. lactis</i> 25-2	<i>L. lactis</i> 25-2	<i>L. lactis</i>	<i>L. lactis</i>
<i>L. lactis</i> 34-3	<i>L. lactis</i> 34-3	<i>S. Infantarius</i>	<i>S. Infantarius</i>
<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Rhodotorula</i> sp.	<i>Rhodotorulasp.</i>
<i>Rhodotorula</i> sp.	<i>Rhodotorula</i> sp.	Rosada	Rosada
<i>L. plantarum</i> 60-1	<i>L. plantarum</i> 60-1	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>
<i>L. plantarum</i> 62-1	<i>L. plantarum</i> 62-1	<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>
<i>L. plantarum</i> 64-1	<i>L. plantarum</i> 64-1	<i>B. cereus</i> (15h)	<i>S. cerevisiae</i> (48h)
<i>L. plantarum</i> 66-1	<i>L. plantarum</i> 66-1	<i>B. subtilis</i>	<i>S. cerevisiae</i> (72h)
Rosada	Rosada	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>
<i>B. cereus</i> (15h)	<i>S. Infantarius</i> 31-2	<i>A. baumannii</i>	<i>C. albicans</i> (48h)
<i>S. Infantarius</i> 46-3	<i>S. Infantarius</i> 46-3		<i>C. albicans</i> (72h)
<i>S. Infantarius</i> 51-3	<i>S. Infantarius</i> 51-3		
<i>B. subtilis</i>	<i>S. cerevisiae</i> (48h)		
<i>A. baumannii</i>	<i>S. cerevisiae</i> (72h)		
<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>		
	<i>C. albicans</i> (48h)		
	<i>C. albicans</i> (72h)		

Una vez se construyeron los clasificadores (entrenar el clasificador), se **probaron los predictores** en cada base de datos y para cada nb se hizo una identificación, mostrando la eficiencia (o error cometido) al hacer la identificación, evaluando dos tipos de errores: uno de ellos, llamado *error por sustitución*, introduce en el clasificador uno a uno los conjuntos de parámetros de las imágenes de referencia como si fueran “desconocidas” para ver si el clasificador logra o no identificarla correctamente. El otro error, llamado *subconjuntos estratificados disconjuntos*, se basa en sacar conjuntos aleatorios de 10 imágenes extraídas de la base de datos completa, para usarlas como imágenes “desconocidas”, para posteriormente re-entrenar el clasificador con las imágenes restantes y finalmente hacer el proceso de identificación del subconjunto extraído, repitiendo este proceso hasta completar todas las posibles combinaciones de subconjuntos de 10 imágenes extraídas de la base de datos completa. Entonces, en la clasificación de estos errores de cada una de las bases de datos y para cada nb (1 a 6), este procesamiento generó gráficas que muestran los errores descritos, los cuales detallan de manera global el comportamiento o la eficiencia del método de clasificación para cada nb particular. Un ejemplo de esto se ve en la figura 16. El detalle de los porcentajes de error generados para cada tipo de clasificador usado (Naive Bayes paramétrico y no paramétrico, y Decision Tree), considerando los dos tipos de errores descritos y los resultados para cada nb (y para todas las bases de datos) se muestran en el Anexo 3, tablas 13, 14, 15 y 16.



(1) Base de Datos 1: Clasificador de textura Naive Bayes No Paramétrico – Paramétrico



(2) Base de Datos 1: Clasificador de textura Decision Tree

Gráficas de errores globales - Base de Datos 1: (1) Naive Bayes y (2) Decision Tree.

		Base Datos 1: 24 horas	
prueba	error	nb con menor error	%error
No Paramétrica	error por substitución	4	30,25%
D. Tree	error por substitución	4	17,28%

(A) **Base de datos 1:** 24 horas – Gráficas de errores globales: (1) Naive Bayes No Paramétrica y (2) Decision Tree.

		Base Datos 2: 48 horas	
prueba	error	nb con menor error	%error
No Paramétrica	error por substitución	6	44,22%
D. Tree	error por substitución	2	40,6%

(B) **Base de datos 2:** 48 horas – Gráficas de errores globales: (3) Naive Bayes No Paramétrica y (4) Decision Tree.

		Base Datos 5: 24 horas	
prueba	error	nb con menor error	%error
No Paramétrica	error por substitución	4	16,67%
D. Tree	error por substitución	4	20,42%

(C) **Base de datos 5:** 24 horas – Gráficas de errores globales: (5) Naive Bayes No Paramétrica y (6) Decision Tree.

		Base Datos 6: 48 horas	
prueba	error	nb con menor error	%error
No Paramétrica	error por substitución	6	43,02%
D. Tree	error por substitución	5	30,54%

(D) **Base de datos 6:** 48 horas – Gráficas de errores globales: (7) Naive Bayes No Paramétrica y (8) Decision Tree.

		Base Datos 9: 24 horas	
prueba	error	nb con menor error	%error
No Paramétrica	error por substitución	4	39,91%
D. Tree	error por substitución	6	24,94%

(E) **Base de datos 9:** 24 horas – Gráficas de errores globales: (9) Naive Bayes No Paramétrica y (10) Decision Tree.

		Base Datos 10: 48 horas	
prueba	error	nb con menor error	%error
No Paramétrica	error por substitución	6	47,89%
D. Tree	error por substitución	3	40,73%

(F) **Base de datos 10:** 48 horas – Gráficas de errores globales: (11) Naive Bayes No Paramétrica y (12) Decision Tree.

		Base Datos 3: 24 horas	
prueba	error	nb con menor error	%error
No Paramétrica	error por substitución	6	25,62%
D. Tree	error por substitución	4	9,26%

(G) **Base de datos 3:** 24 horas – Gráficas de errores globales: (13) Naive Bayes No Paramétrica y (14) Decision Tree.

		Base Datos 4: 48 horas	
prueba	error	nb con menor error	%error
No Paramétrica	error por substitución	6	37,62%
D. Tree	error por substitución	4	28,55%

(H) **Base de datos 4:** 48 horas – Gráficas de errores globales: (15) Naive Bayes No Paramétrica y (16) Decision Tree.

		Base Datos 7: 24 horas	
prueba	error	nb con menor error	%error
No Paramétrica	error por substitución	5	10%
D. Tree	error por substitución	4	10,83%

(I) **Base de datos 7:** 24 horas – Gráficas de errores globales: (17) Naive Bayes No Paramétrica y (18) Decision Tree.

		Base Datos 8: 48 horas	
prueba	error	nb con menor error	%error
No Paramétrica	error por substitución	6	35,57%
D. Tree	error por substitución	6	20,67%

(J) **Base de datos 8:** 48 horas – Gráficas de errores globales: (19) Naive Bayes No Paramétrica y (20) Decision Tree.

		Base Datos 11: 24 horas	
prueba	error	nb con menor error	%error
No Paramétrica	error por substitución	5	35,6%
D. Tree	error por substitución	4	18,14%

(K) **Base de datos 11:** 24 horas – Gráficas de errores globales: (21) Naive Bayes No Paramétrica y (22) Decision Tree.

		Base Datos 12: 48 horas	
prueba	error	nb con menor error	%error
No Paramétrica	error por substitución	6	43,54%
D. Tree	error por substitución	5	31,74%

(L) **Base de datos 12:** 48 horas – Gráficas de errores globales: (23) Naive Bayes No Paramétrica y (24) Decision Tree.

Figura 16. Gráfica típica de % error vs nb para probar los métodos de identificación en una base de datos (para el ejemplo se tomó la **base de datos 1**), en la que se muestran los errores globales para cada predictor del clasificador (Naive Bayes Paramétrico y No Paramétrico, y Decision Tree) y tipo de error (*error por substitución* y *subconjuntos estratificados disconjuntos*).

Las tablas (A) a (L) son el resumen de las gráficas generadas en cada base de datos 1 a 12 respectivamente, mostrando el nb que menor error presenta para cada una de las bases de datos.

Estas tablas muestran, en general, que los dos mejores predictores: No Paramétrico y Decision tree son aquellos que presentaron menor nivel de error (todas con error por substitución) por debajo del 50% a la hora de probar el clasificador para identificar las imágenes propias de la base de datos, con un nb entre 4 a 6 (la mayoría está entre estos valores), es decir, que entre 21 y 33 parámetros son apropiados para identificar las imágenes de microorganismos y presentarse menor error al momento de identificarlas. Dentro de éstos resultados, la Base de Datos 3 muestra que hay menos error cuando se identifican las imágenes de las colonias bajo el predictor Decision Tree; mientras que con el predictor No Paramétrico la Base de Datos 7 muestra el error mas bajo al momento de identificar las imágenes.

Adicional a esto, y ligado a la información anterior, la clasificación de estos errores también generó *matrices de confusión* para cada predictor (Paramétrico, No Paramétrico y Decision Tree) y para cada nb, donde muestra al detalle la cantidad de veces con la que se **identifica cada microorganismo** y con quién se equivoca en la identificación de cada uno. Por tanto, las matrices que mostraron menor error para el nb al que corresponde (igual a las tablas resumen (A) a (L) de la figura 16) se muestran en el Anexo 4, tablas 17 a 32.

De estas matrices de confusión, se puede decir que las Bases de Datos presentaron, de manera global, entre 56,35% y 85,15% de asertividad al momento

de identificar las imágenes de los microorganismos bajo el predictor No Paramétrico con 21, 27 y 33 parámetros de texturas (nb 4, 5 y 6), siendo a su vez, un porcentaje de asertividad muy similar al del predictor Decision Tree que está entre 57,7% y 88,3% de asertividad en la identificación empleando 9 a 33 parámetros de texturas (nb 2 a 6), como se ve en el Anexo 4. Si bien, estos porcentajes superan el 50 % de aciertos en la identificación, puede notarse, en general, que a las 24 horas la identificación es mayor y más eficiente que a las 48 horas, presentando errores mas bajos (ver tablas resumen (A) a (L) de la figura 16 y matrices de confusión Anexo 4).

Prueba de ciegos

La biblioteca y las Bases de Datos creadas a partir de los espectros vibracionales y patrones de difracción (parámetros de texturas) de los microorganismos medidos a 24 y 48 horas, fueron aplicadas finalmente para identificar los microorganismos “desconocidos” de la *prueba de ciegos*.

En la tabla 10 se muestran los resultados que generó la biblioteca en la identificación de los microorganismos “desconocidos” a las 24 y 48 horas por **espectroscopía FT-IR**, donde la mayoría de estos microorganismos se lograron identificar con un porcentaje superior al 92% de manera correcta con los espectros pertenecientes a la biblioteca; sin embargo, cepas de *S. infantarius*, una colonia de *L. lactis*, *P. fluorescens* y *B. subtilis* no lograron corresponder a una identificación asertiva, teniendo así porcentajes superiores a 82%. Por otra parte, aquellos “desconocidos” que no tenían un espectro en la biblioteca presentaron confusiones en la identificación con porcentajes superiores al 80%, ya que ésta hace posibles acercamientos a los espectros y regiones seleccionadas de la biblioteca encontrando una relación con algún espectro conocido.

Tabla 10. Resultados de la identificación de microorganismos “desconocidos” usando la *biblioteca de espectros FT-IR* de microorganismos de referencia.

Muestra “desconocida” (ciego)	Tiempo	% Hit Quality	Microorganismo identificado (“desconocido”) por biblioteca FT-IR	Microorganismo original
24	24 h	94,9%	<i>B. cereus</i>	<i>B. cereus</i>
	48 h	95,0%		
41	24 h	94,5%	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>
	48 h	95,5%		
92	24 h	94,9%	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>
	48 h	95,2%		
83	24 h	94,9%	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>
	48 h	95,4%		
77	48 h	95,3%	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
112	24 h	97,4%	<i>A. baumannii</i>	<i>E. coli</i>
		96,9%	<i>E. coli</i>	
	48 h	97,6%	<i>E. coli</i>	
		97,1%	<i>E. coli</i>	
99	24 h	93,8%	Colonia Rosada	Colonia Rosada
	48 h	96,9%		
11	24 h	97,0%	<i>E. aerogenes</i>	<i>E. aerogenes</i>
	48 h	97,3%		
30	24 h	92,5%	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
	48 h	93,7%		
39	24 h	96,0%	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
	48 h	96,1%		
75	24 h	91,5%	<i>B. subtilis</i>	<i>P. oleovorans</i>
	48 h	90,0%	<i>B. cereus</i>	
149	24 h	95,2%	<i>A. baumannii</i>	<i>P. oleovorans</i>
	48 h	95,9%	<i>E. aerogenes</i>	
7	24 h	82,5%	<i>B. subtilis</i>	<i>W. eutropha</i>
	48 h	82,2%		
78	24 h	81,9%	<i>B. subtilis</i>	<i>W. eutropha</i>

	48 h	81,8%		
8	72 h	82,8%	<i>C. albicans</i>	<i>S. infantarius (31-2)</i>
9	72 h	92,7%	<i>L. lactis (34-3)</i>	<i>L. lactis (34-3)</i>
29	72 h	97,1%	<i>L. lactis (34-3)</i>	<i>L. lactis (34-3)</i>
21	72 h	92,8%	<i>S. Infantarius</i>	<i>L. lactis (34-3)</i>
28	24 h	87,3%	<i>B. subtilis</i>	<i>Sinorhizobium</i>
	48 h	87,2%		
45	24 h	88,0%	<i>B. subtilis</i>	<i>Sinorhizobium</i>
	48 h	89,5%		
65	24 h	87,5%	<i>B. subtilis</i>	<i>Sinorhizobium</i>
	48 h	89,6%		
66	24 h	90,0%	<i>E. coli</i>	<i>Sinorhizobium</i>
	48 h	91,6%	<i>B. subtilis</i>	
42	24 h	95,0%	<i>E. aerogenes</i>	<i>P. fluorescens</i>
	48 h	96,3%	<i>E. coli</i>	
133	24 h	95,4%	<i>E. coli</i>	<i>P. fluorescens</i>
	48 h	95,6%		
80	24 h	91,2%	<i>L. monocytogenes</i>	<i>B. subtilis</i>
	48 h	92,4%		
108	24 h	92,3%	<i>L. monocytogenes</i>	<i>B. subtilis</i>
		91,6%	<i>S. Infantarius (31-2)</i>	
	48 h	91,8%	<i>S. aureus</i>	

Por otro lado, las bases de datos de los patrones difractivos (obtenidos por **Difracción de la luz**) a 24 horas (Base Datos 1, 3, 5, 7, 9, 11) mostraron menos errores al momento de identificar cada imagen (como se describió anteriormente) y son usadas para la identificación de los microorganismos “desconocidos”, al igual que las bases de datos 2 y 4 a 48 horas. Los 13 microorganismos de la prueba de ciegos se enumeraron aleatoriamente con el fin de medir entre 2 y 3 veces cada uno de los microorganismos “desconocidos” (por colonias) a 24 y 48 horas. Para esto, el procesamiento de identificación por texturas arrojó gráficos de barras para cada microorganismo “desconocido” introducido en cada una de las bases de datos (elegidas anteriormente) mostrando, en porcentaje, la asertividad de identificación entre uno o varios microorganismos que el clasificador entrega como resultado. Los porcentajes de aciertos en la identificación para cada microorganismo “desconocido”

que son dados por las gráficas de barras bajo el nb que presenta menor error para cada predictor (como se determinó en la figura 16), se muestran en el anexo 5, tablas 33 y 34.

Un ejemplo de estas gráficas de barras se muestra en la figura 17, donde el microorganismo 136 se clasificó en la base de datos 1 (24 horas, empleando sus parámetros de textura) y es identificado 100% como *E. aerogenes* con el predictor Naive Bayes No Paramétrico (nb=4) y con un 93,3% de asertividad bajo el predictor Decision Tree (nb=4), también como *E. aerogenes*.

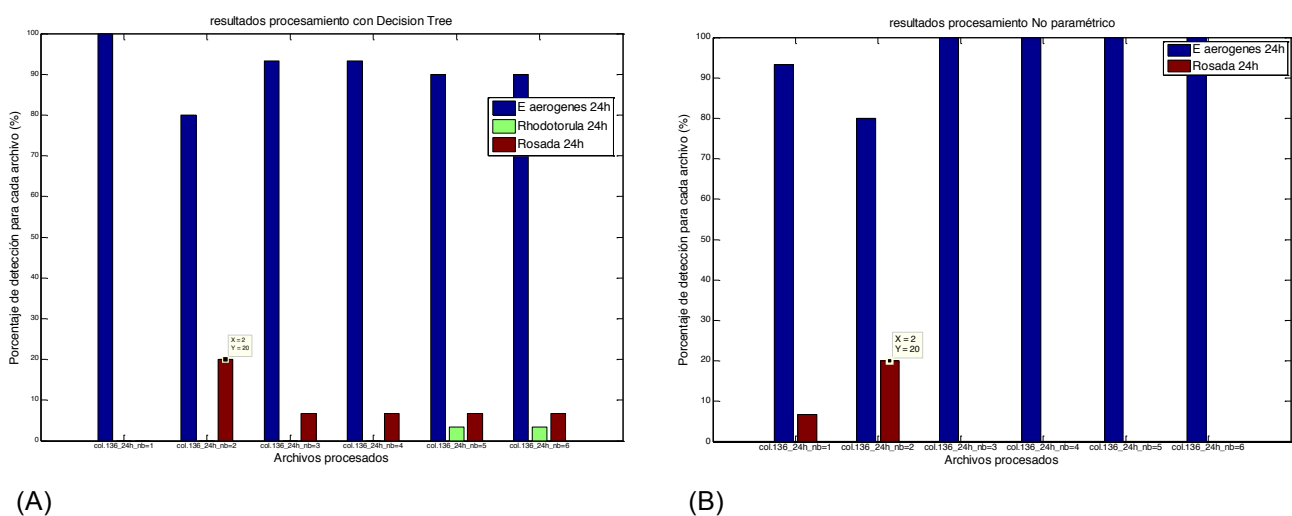


Figura 17. Gráficas de barras: muestran el porcentaje de asertividad en la identificación del microorganismo 136 (24 horas) al usar la Base de Datos 1 con (A) Predictor Decision Tree, nb=4 y (B) Predictor No Paramétrico, nb=4.

Discusión

Si bien, las pruebas bioquímicas (como los sistemas API) son buenas herramientas frecuentemente utilizadas para la identificación de microorganismos en el laboratorio, éstas deben considerarse complementarias, ya que su precisión es más baja que las pruebas moleculares y conlleva a posibles errores en la identificación; además, estas herramientas son más empleadas para aislamientos clínicos y son pocos los estudios que las comparan con otros métodos para la identificación bacteriana en muestras ambientales, como los métodos moleculares que implican la secuenciación del 16S rRNA (Awong-Taylor *et al.*, 2007).

Como lo han propuesto varios autores, la **espectroscopía FT-IR** es una técnica promisoriosa que ha tomado fuerza para la identificación de microorganismos a nivel de especie, además de que hay reportes de que tiene el potencial de diferenciar

entre cepas de una misma especie (Sandt *et al.*, 2003), ya que da información sobre la composición molecular y química de las células, que son únicas por sus diferencias taxonómicas existentes (Álvarez-Ordóñez *et al.*, 2012). Así, la pared celular de bacterias se compone de macromoléculas (ácidos nucleicos, carbohidratos, proteínas, lípidos, polisacáridos, etc.) y polímeros que poseen grupos funcionales: carboxilo (-COOH), hidroxilo (-OH), fosfato (PO_4^{3-}) y amida (-CONH₂), las cuales presentan bandas vibracionales en distintas regiones del espectro infrarrojo generando un espectro de absorción que incluye la información molecular completa y específica para esa célula (Wenning *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2004).

Los espectros FT-IR de microorganismos son reproducibles (patrones de huella dactilar) y aunque muestran contornos amplios y complejos, debido al ambiente acuoso de las muestras, el análisis se basa en evaluar parámetros como la posición de las bandas. Se ha demostrado que existe una fuerte relación entre los componentes de la pared celular y el espectro IR (Santos *et al.*, 2010; Álvarez-Ordóñez *et al.*, 2012), factor diferencial entre microorganismos Gram positivos y Gram negativos (Ngo-Thi *et al.*, 2006).

Entonces, al hablar de células **Gram positivas**, la presencia de los ácidos teicoicos, covalentemente unidos al peptidoglicano por el ácido murámico a través del enlace fosfodiéster del ribitol o el glicerol (carbohidratos), es detectada por análisis FT-IR, diferenciando así de las células con pared celular **Gram negativa** (sin ácidos teicoicos), las cuales manifiestan la presencia de los tipos de azúcares y la organización del lipopolisacárido (LPS) y otras estructuras antigénicas (Álvarez-Ordóñez *et al.*, 2012) por FT-IR, y es la membrana externa adicional de las bacterias Gram negativas la que ha mostrado ser responsable de una buena discriminación espectroscópica entre ambos grupos bacterianos (Schäwe *et al.*, 2011).

A primera vista, los espectros entre bacterias muestran similitud, sin embargo, para cada cepa, los espectros tienen diferencias específicas a lo largo del rango espectral de $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$. Al observar cada una de las ventanas espectrales analizadas (figura 7), éstas mostraron pequeñas diferencias, especialmente en la región de $1180 - 920 \text{ cm}^{-1}$ (W_4) donde se pueden atribuir los cambios al contenido de polisacáridos, lo que permite diferenciar entre bacterias (Gram negativas y Gram positivas) y levaduras, tal como lo reportan otros autores (Sandt *et al.*, 2003; Schäwe *et al.*, 2011; Buchl *et al.*, 2010).

Las diferencias en cada espectro se hacen evidentes al hacer los análisis con el procedimiento de ajuste de curva (*curve fitting*), como se explicó en la sección de *Análisis de espectros* de Materiales y métodos. En todos los espectros IR de los microorganismos analizados, tanto de bacterias como de levaduras (Anexo 2, figuras 21 a 29), se pudo observar una señal de intensidad fuerte alrededor de la región $3000 - 3700 \text{ cm}^{-1}$ (W_1), la cual está relacionada con el estiramiento del grupo -OH relacionado al contenido de agua presente en las muestras. Otras dos bandas

intensas en la región entre $1800 - 1500 \text{ cm}^{-1}$ (W_2) corresponden al grupo amida (grupos funcionales más comunes en el esqueleto de proteínas, donde la banda alrededor de 1630 cm^{-1} muestra el estiramiento de $\text{C} = \text{O}$ relacionada a la amida I y en la banda alrededor de 1540 cm^{-1} corresponde a la flexión $\text{N} - \text{H}$ (acoplada a $\text{C} - \text{N}$) de la amida II. Estas bandas presentaron variaciones mínimas en posición e intensidad entre 24 y 48 horas en cada microorganismo debido al cambio conformacional de las proteínas (Jiang *et al.*, 2004; Ghosh *et al.*, 2015; Grasso *et al.*, 2009) en el estiramiento $\text{C} = \text{O}$ y a las vibraciones de deformación plana NH de los grupos funcionales amida secundarios de proteínas (Ngo-Thi *et al.*, 2006).

En los espectros de bacterias Gram positivas, como ***B. cereus*** (Anexo 2, figura 25), se observaron bandas ubicadas en la región $1180 - 920 \text{ cm}^{-1}$ que dan información de la variación en la estructura bioquímica celular, la cual es dominada por vibraciones complejas del anillo de carbohidratos (polisacáridos) C-O-C , C-O y los estiramientos de las moléculas fosforiladas P-O-P , C-O-P en fosfolípidos, fosfoésteres y las cadenas DNA/RNA , además del estiramiento simétrico de PO_2^- (Grasso *et al.*, 2009). Si bien, los lípidos se caracterizan por presentar una banda dominante en 1170 cm^{-1} para *B. cereus*, tal como lo reporta Grasso y colaboradores (2009), en este estudio se encontró una banda débil a 1169 cm^{-1} y otra adyacente más amplia en 1154 cm^{-1} (24 horas y 1150 cm^{-1} a las 48 horas), asociada con la vibración de estiramiento del grupo C-O en los ésteres y la vibración por flexión de los grupos CH_2 relacionados a los grupos acilo. La absorción en 1238 cm^{-1} y 1078 cm^{-1} está asociada a las vibraciones de estiramiento asimétricas y simétricas respectivamente de los grupos fosfodiéster PO_2^- de los fosfolípidos. La banda a 1099 cm^{-1} puede asociarse con el estiramiento C-N de las aminas y la banda 1058 cm^{-1} corresponde al estiramiento del grupo CO . Además, es importante resaltar que alrededor de esta región hay otras frecuencias de estiramiento del doble enlace P=O asociada a los carbohidratos que contiene fósforo, como son los ácidos teicoicos (también perteneciente a la banda 1238 cm^{-1}) que es el componente de la pared celular de *B. cereus* y otras bacterias Gram positivas (Ghosh *et al.*, 2015; Grasso *et al.*, 2009). Entonces, al analizar los espectros a 24 y 48 horas (figura 25-anexo 2), es evidente que el tiempo de crecimiento no influye significativamente en el cambio de la composición química de la pared celular de este microorganismo Gram positivo, ya que el espectro es el mismo en los dos tiempos.

En las bacterias Gram negativas, como ***E. coli*** y ***E. aerogenes*** (Anexo 2, figuras 21, 23 y 24), la región espectral de $1200-900 \text{ cm}^{-1}$ (similar a las bacterias Gram positivas) tiene la mayoría de bandas en polisacáridos, además de fosfolípidos y lipopolisacáridos en mayor cantidad. En los espectros de estas bacterias Gram negativas se pudo observar una banda intensa alrededor de 1080 cm^{-1} y otra en 1230 cm^{-1} mostrando la vibración de estiramiento simétrica y asimétrica de P=O del enlace fosfodiéster de los fosfolípidos del esqueleto de los ácidos nucleicos (DNA y RNA), la banda 1170 cm^{-1} puede ser asignada a la vibración de estiramiento asimétrica de CO-O-C de proteínas, y además, la banda 1058 cm^{-1} también está

presente y menos intensa en ambos microorganismos, donde ocurren las vibraciones de estiramiento asignadas a C-O-C, C-O, C-C de la capa de peptidoglicano de la pared celular y lipopolisacáridos de la capa externa, componente único de pared celular de bacterias Gram negativas (Sundaram *et al.*, 2012; Quilès *et al.*, 2010; San-Blas *et al.*, 2012).

De acuerdo a los resultados obtenidos, los espectros IR de los microorganismos evaluados muestran tener bandas similares entre las dos agrupaciones (Gram negativa, Gram positiva), sin embargo, hay variaciones particulares entre microorganismos que, al verlas más detalladamente, se deben a pequeños cambios generados en la composición de la pared celular y a la expresión de las proteínas (Ngo-Thi *et al.*, 2006). Así, la pared celular de Gram positivas al estar compuesta por peptidoglicanos y ácidos teicoicos muestran bandas más fuertes correspondientes a los carbohidratos (en rango aproximado de $1180 - 920 \text{ cm}^{-1}$) y fosfatos ($\sim 1215 \text{ cm}^{-1}$ de los ácidos teicoicos) principalmente; en cambio, las bacterias Gram negativas solo tienen peptidoglicanos (Jiang *et al.*, 2004), haciendo que las bandas en esta región sean menos intensas (ver espectros de Gram negativas (figuras 9 y 10) y Gram positivas (figuras 11 y 13)).

Las levaduras también han mostrado ser identificadas y diferenciadas de manera exitosa por espectroscopia FT-IR (Ngo-Thi *et al.*, 2006). De manera similar a los espectros de bacterias, existe una buena similitud entre los espectros de las levaduras aquí analizadas: ***S. cerevisiae*** y ***Rhodotorula sp.***, sin embargo, todavía se pueden encontrar parámetros específicos para cada una de ellas (figura 14). Para ***S. cerevisiae*** y otras levaduras, la pared celular es una estructura rígida y resistente que representa entre el 15 y el 30 % del peso seco de la célula y entre el 25 a 50% del volumen total, lo que constituye una gran inversión por parte de la célula, que se compone, en especial, de polisacáridos como manoproteínas y β -glucanos (representa entre 85-90% de la masa seca de la pared celular), además de quitina (solo entre el 1-3%) y lípidos (entre 2-5%). Estas proporciones si bien están presentes en todas las levaduras, varían según la especie (Klis, 1994; Nguyen *et al.*, 1998). En *S. cerevisiae*, el mayor componente de la membrana interna es el complejo $\beta(1\rightarrow3)$ glucano-quitina y las manoproteínas como polipéptidos glicosilados N y O que hacen parte de la superficie externa de la pared evitando la permeabilidad de solutos. Éstas dos membranas, interna y externa, se unen por los $\beta(1\rightarrow6)$ glucanos enlazando los componentes (Galichet *et al.*, 2001).

La región de polisacáridos ($1180 - 920 \text{ cm}^{-1}$) en *S. cerevisiae* refleja principalmente la absorción de azúcares que están en la pared celular, además de la presencia de mananos y β -glucanos. La banda presente a 996 cm^{-1} pertenece a $\beta(1\rightarrow6)$ glucanos, mientras que en 1029 cm^{-1} están los $\beta(1\rightarrow4)$ glucanos y en $1080, 1104, 1140 \text{ cm}^{-1}$ están los $\beta(1\rightarrow3)$ glucanos. Por tanto, los mananos se encuentran en las bandas $809, 972$ y 1044 cm^{-1} . Al igual que *S. cerevisiae*, ***Rhodotorula sp.*** contiene manoproteínas y β -glucanos en mayor proporción en su pared celular, además de

quitina y lípidos. La banda en la posición 807 cm^{-1} refleja la presencia de mananos similar a la posición en la que se presenta en *S. cerevisiae* (809 cm^{-1}), ya que según Michell y colaboradores (1970), el manano extracelular es lineal y contiene residuos de manopiranosos con enlaces β -1,3 y β -1,4 para la especie *Rhodotorula glutinis*, en cambio el manano presente en *S. cerevisiae* es ramificado con una cadena principal de unidades de manosa unidas por enlaces α -1,6 que a su vez son unidas a cadenas laterales con uniones α -1,2 y α -1,3.

Entonces, de manera global se puede ver que los espectros entre bacterias y levaduras muestran diferencias en los valores de absorbancia, siendo mayores para levaduras, variedad que también ha sido reportada por Ngo-Thi y colaboradores (2006). Por tanto, estas identificaciones permitieron crear una *biblioteca de espectros* FT-IR de microorganismos de referencia a 24 y 48 horas de crecimiento (software OPUS), con el fin de poder identificar espectros de microorganismos “desconocidos” (usados en la prueba de ciegos).

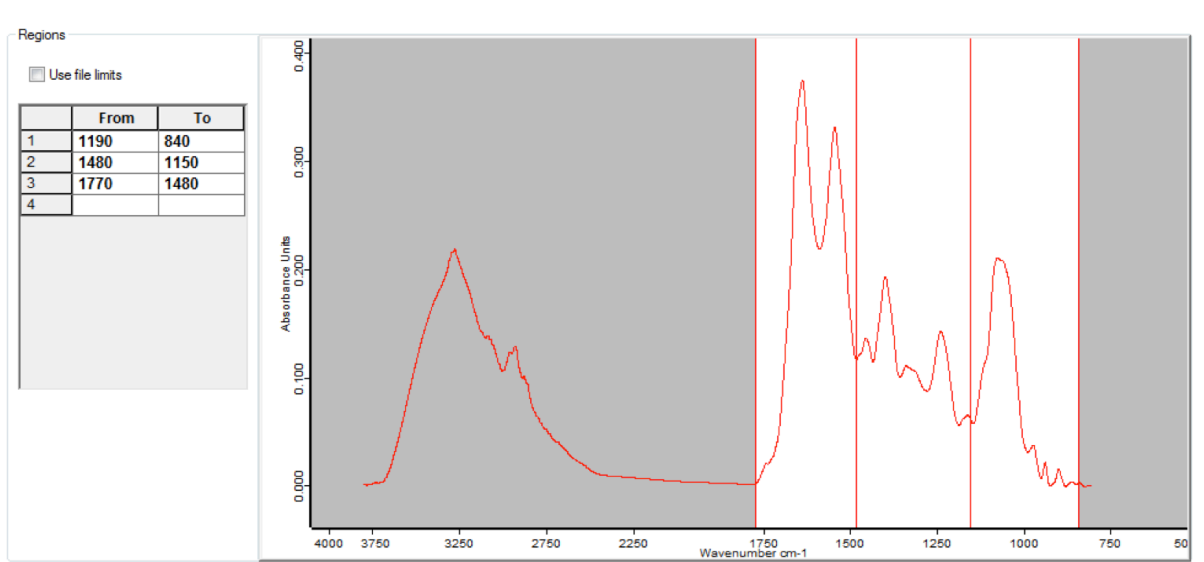


Figura 18. Selección de tres regiones en el espectro de la *biblioteca de espectros* FT-IR de microorganismos de referencia para la identificación de microorganismos “desconocidos”.

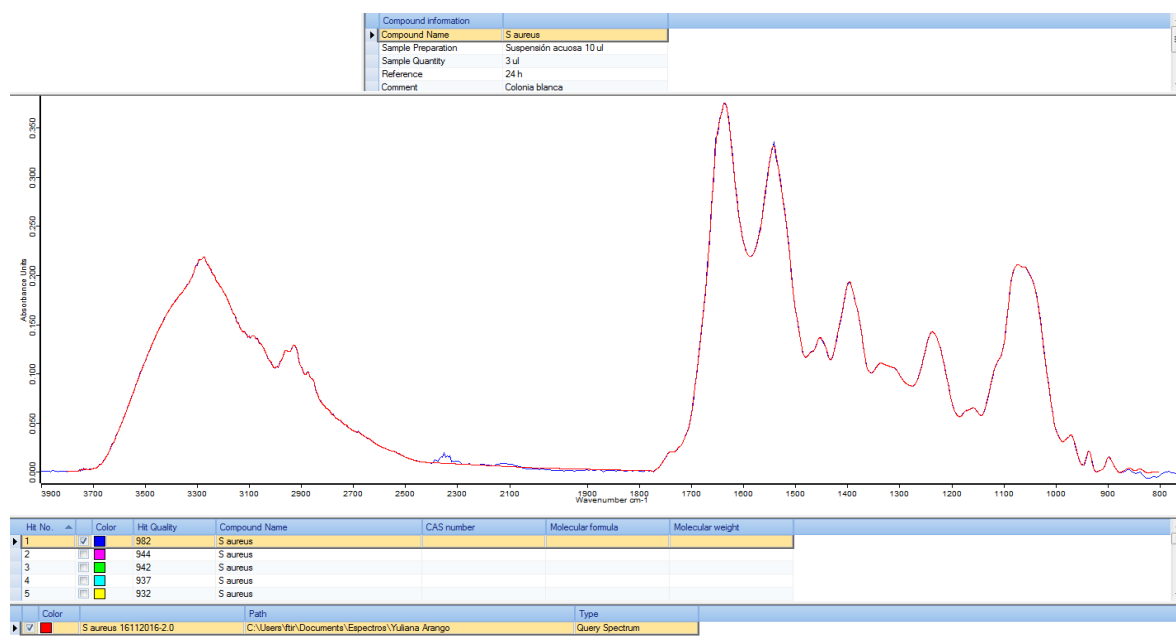


Figura 19. Ejemplo de la lista de resultados generado por la *biblioteca de espectros* FT-IR creada para la identificación de microorganismos desconocidos, resaltando la primera línea con el valor del HQ mas alto.

Para la identificación y análisis de espectros de microorganismos “desconocidos” (uso de la biblioteca) se restringió la búsqueda en 3 regiones: $1770 - 1480 \text{ cm}^{-1}$, $1480 - 1150 \text{ cm}^{-1}$ y $1190 - 840 \text{ cm}^{-1}$, ya que éstas muestran las mayores diferencias entre espectros (figura 18). Los resultados de la identificación se mostraron en una lista de los espectros más similares basados en la calidad de impacto -HQ: Hit Quality- (Grangeteau *et al.*, 2016) como un valor de 0 a 1000 de identidad. Sólo el primer resultado en estas listas se registró como la identificación a la que pertenece el espectro desconocido, como muestra la figura 19.

Con relación a esta biblioteca de espectros de referencia, se puede lograr identificar exitosamente espectros “desconocidos”, hasta con un porcentaje del cien por ciento (Sandt *et al.*, 2003; Mariey *et al.*, 2001), siempre y cuando la cepa o especie desconocida esté incluida en la biblioteca, pero llega a ser imprecisa cuando no pertenece a ésta. Entonces, la composición de la biblioteca de espectros FT-IR debe ser una característica fundamental para mejorar la fiabilidad de los resultados que se espera tener, por lo que se al incluir más cepas de la misma especie, la identificación se hace más asertiva y confiable, además de que es una técnica de fácil manejo y alta capacidad de diferenciación, considerándose como una técnica físico-química que iguala otros métodos rutinarios para la identificación de microorganismos. Por tanto, es muy importante tener en cuenta que los espectros FT-IR son influenciados por la variación de siembra, temperatura y tiempo de incubación, así como la composición del medio de cultivo en el que crecen, por lo

que la reproducibilidad de los espectros FT-IR debe hacerse bajo las mismas condiciones.

Por otra parte, la tecnología de **Difracción óptica** se ha usado en la última década para la identificación de células bacterianas que crecen en medio de cultivo, pero con un éxito limitado debido a problemas asociados con la disposición de crecimiento de las células en un medio.

El patrón del anillo de Airy de una abertura circular es una característica básica del fenómeno de difracción. Entonces, cuando millones de células bacterianas forman una colonia, ésta forma una “abertura biológica” o “lente biológico” con diferentes coeficientes de transmisión para el agar y la colonia (Banada *et al.*, 2007). Además, diferentes microorganismos producen colonias de diferentes perfiles que son responsables de diferentes propiedades de enfoque de la luz (Suchwalko *et al.* 2014) afectando la convergencia del campo óptico difractado y la dimensión espacial de los patrones de difracción capturados, influyendo en algunas características importantes para el proceso de clasificación de bacterias. Sin embargo, las colonias bacterianas son plano convexas semitransparentes, contrario a la lente clásica, y por tanto la transmisión de la luz a través de la colonia será limitada.

Los análisis con el software Matlab de las colonias de los microorganismos medidos mostraron patrones de dispersión similares en unos casos y en otros, patrones notablemente distintos. Los porcentajes de error al comparar las bases de datos 1 y 3 (24 horas), 2 y 4 (48 horas), 1 y 5 (24 horas), 2 y 6 (48 horas), 3 y 7 (24 horas), 4 y 8 (48 horas) mostraron que al sacar de éstas a *E. aerogenes* (introduce ruido en la identificación) el error al momento de identificar disminuye, así como al unificar en un solo nombre las distintas cepas ácido lácticas. Sin embargo, no ocurre lo mismo cuando se comparan los porcentajes de error de las bases de datos 1 y 9 (24 horas), 2 y 10 (48 horas), 3 y 11 (24 horas), 4 y 12 (48 horas), 5 y 9 (24 horas), 6 y 10 (48 horas), 7 y 11 (24 horas), 8 y 12 (48 horas), puesto que aumenta el error al incorporar otros microorganismos a las Bases de datos (ver tablas 17 a 32 del Anexo 4).

Adicionalmente, para identificar los microorganismos “desconocidos” usando los patrones ópticos, se utilizaron las Bases de Datos **1, 3, 5, 7, 9, 11** a 24 horas y **2 y 4** a 48 horas como microorganismos de referencia que permitieran dar una identificación a éstos, tal como se describió en *Resultados*. En las tablas 11 y 12 se muestran los resultados, de forma binaria (1= identificó como el microorganismo original; 0= no identificó como el microorganismo original) para todos los microorganismos “desconocidos”, estos resultados se recopilaron de las tablas 33 y 34 del anexo 5.

Estas tablas resumen muestran que los microorganismos “desconocidos” con patrones de difracción de referencia en las Bases de Datos permiten la identificación

de al menos un microorganismo (dentro de las replicas y /o trélicas hechas) de manera correcta, mientras que, aquellos “desconocidos” que no tienen patrones de referencia en las Bases de Datos, si bien el clasificador busca la manera de identificar y asociar a uno o varios patrones de difracción que se le asemeje, similar a lo que ocurre con la *biblioteca de espectros* FT-IR, no hay identificación.

Y al comparar la totalidad de la identificación de aciertos entre las dos tablas resumen (tabla 11 y 12), se puede ver que no hay diferencias muy significativas entre ellas, es decir, que al usar tanto las bases de datos que tienen la diferenciación de las cepas de *L. lactis*, *S. infantarius* y *L. plantarum* (Base de datos 1, 2) como las que se une bajo un nombre a estos microorganismos (Base de datos 3, 4), las que se retira de éstas *E. aerogenes* (Base datos 5 y 7) y a las que se le incorporan otros microorganismos (Base de datos 9, 11), el error en la identificación no es muy significativo entre ellos. Sin embargo, en las bases de datos de 48 horas se logró tener mas identificaciones que en las bases de datos a 24 horas, posiblemente se deba a que en este tiempo de crecimiento existan más colonias a las cuales puedan medirse los patrones de difracción.

Tabla 11. Recopilación de los resultados generados en la identificación de microorganismos “desconocidos” (caracterización binaria: 1=identificó, 0= no identificó) para las bases de datos 1, 2, 5 y 9 como patrones de referencia.

Base Datos 1 – 2 – 5 - 9		24 horas : 1_BD_24h_16mo	48 horas : 2_BD_48h_16mo	24 horas : 5_BD_24h_16mo	24 horas : 9_BD_24h_16mo
microorganismo original	Predictor				
<i>S. aureus</i>	No Paramétrica	1	4	1	0
	D. tree	0	7	0	0
	Total	1	11	1	0
Rosada	No Paramétrica	2	2	2	2
	D. tree	2	2	2	2
	Total	4	4	4	4
<i>B. cereus</i>	No Paramétrica	2	-	2	1
	D. tree	2	-	2	1
	Total	4	0	4	2
<i>W. eutropha</i>	No Paramétrica	0	0	0	0
	D. tree	0	0	0	0
	Total	0	0	0	0
<i>C1. P. fluorescens</i>	No Paramétrica	0	0	0	0
	D. tree	0	0	0	0
	Total	0	0	0	0
<i>P. oleovorans</i>	No Paramétrica	0	0	0	0
	D. tree	0	0	0	0
	Total	0	0	0	0
<i>S. cerevisiae</i>	No Paramétrica	0	0	0	0
	D. tree	0	2	0	0
	Total	0	2	0	0
C3. <i>Sinorhizobium</i>	No Paramétrica	0	0	0	0
	D. tree	0	0	0	0
	Total	0	0	0	0
<i>E. coli</i>	No Paramétrica	1	1	1	1
	D. tree	3	1	0	0
	Total	4	2	1	1
<i>E. aerogenes</i>	No Paramétrica	7	0	2	6
	D. tree	7	2	1	7
	Total	14	2	3	13
<i>L. lactis 34-3</i>	No Paramétrica	-	4	-	-
	D. tree	-	6	-	-
	Total	0	10	0	0
C2 <i>B. subtilis</i>	No Paramétrica	-	0	-	-
	D. tree	-	0	-	-
	Total	0	0	0	0
<i>S. Infantarius 31-2</i>	No Paramétrica	-	2	-	-
	D. tree	-	2	-	-
	Total	0	4	0	0
Totales		27	35	13	20

Tabla 12. Recopilación de los resultados generados en la identificación de microorganismos “desconocidos” (caracterización binaria: 1=identificó, 0= no identificó) para las bases de datos 3, 4, 7 y 11 como patrones de referencia.

Base Datos 3 – 4 – 7 - 11		24 horas : 3_BD_24h_10m o	48 horas : 4_BD_48h_16mo	24 horas : 7_BD_24h_16m o	24 horas : 11_BD_24h_16m o
microorganismo original	Predictor				
<i>S. aureus</i>	No Paramétrica	0	4	0	0
	D. tree	2	7	0	0
	Total	2	11	0	0
Rosada	No Paramétrica	2	2	2	2
	D. tree	2	2	2	2
	Total	4	4	4	4
<i>B. cereus</i>	No Paramétrica	2	-	2	1
	D. tree	2	-	2	1
	Total	4	0	4	2
<i>W. eutropha</i>	No Paramétrica	0	0	0	0
	D. tree	0	0	0	0
	Total	0	0	0	0
C1. <i>P. fluorescens</i>	No Paramétrica	0	0	0	0
	D. tree	0	0	0	0
	Total	0	0	0	0
<i>P. oleovorans</i>	No Paramétrica	0	0	0	0
	D. tree	0	0	0	0
	Total	0	0	0	0
<i>S. cerevisiae</i>	No Paramétrica	0	2	0	0
	D. tree	0	2	0	0
	Total	0	4	0	0
C3. <i>Sinorhizobium</i>	No Paramétrica	0	0	0	0
	D. tree	0	0	0	0
	Total	0	0	0	0
<i>E. coli</i>	No Paramétrica	1	1	1	0
	D. tree	3	0	0	0
	Total	4	1	1	0
<i>E. aerogenes</i>	No Paramétrica	7	0	0	6
	D. tree	7	1	0	7
	Total	14	1	0	13
<i>L. lactis 34-3</i>	No Paramétrica	-	4	-	-
	D. tree	-	6	-	-
	Total	0	10	0	0
C2 <i>B. subtilis</i>	No Paramétrica	-	0	-	-
	D. tree	-	0	-	-
	Total	0	0	0	0
<i>S. Infantarius 31-2</i>	No Paramétrica	-	2	-	-
	D. tree	-	2	-	-
	Total	0	4	0	0
Totales		28	35	9	19

Este método de identificación de colonias es rápido, simple sin la necesidad de uso de reactivos y sensible a cambios en el crecimiento de colonias que se forman en la superficie del agar; además soluciona aquellos problemas que se relacionan con la detección y diferenciación de bacterias vivas y muertas que le conciernen a los sistemas de identificación relacionados con el ADN y anticuerpos, al igual que con la reducción en tiempo (minutos comparado con horas) para la detección rápida (Banada *et al.*, 2007).

Como describió Buzalewicz y colaboradores (2011), la morfología de las colonias bacterianas que crecen a bajas temperaturas no son iguales en el caso de las colonias expuestas a condiciones de temperatura superior, observándose cambios en las imágenes de difracción. Por tanto, la temperatura de incubación debe ser considerada en el análisis de los patrones de difracción de las colonias bacterianas y por tanto, debería ser un punto a estandarizar, al igual que el medio de cultivo, si estos patrones de difracción son usados para caracterizar o identificar especies bacterianas. De igual manera, las condiciones de cultivo pueden afectar las propiedades morfológicas de las colonias y sus consecuentes patrones de difracción.

Conclusiones

Aunque hay una amplia variedad de técnicas útiles que permiten identificar y caracterizar los microorganismos, hoy en día se buscan herramientas que sean fáciles, rápidas, no invasivas y sencillas de implementar en la identificación. Los nuevos enfoques fenotípicos basados en técnicas de espectroscopía de absorción infrarroja FT-IR (Maquelin *et al.*, 2002) y de dispersión de la luz han sido usados para identificar microorganismos en distintos ámbitos de estudio como alternativas potenciales a los métodos convencionales.

La espectroscopía FT-IR ha mostrado ser una herramienta exitosa y de gran aporte en la identificación y caracterización de microorganismos, diferenciar entre Gram negativos y Gram positivos, mostrando grandes ventajas cuando se compara con las técnicas convencionales y moleculares, ya que reduce el tiempo en la identificación y en el material empleado, además de mostrar ser una buena técnica de identificación y alto potencial de discriminación con la creación de la *biblioteca de espectros* FT-IR, con el fin de identificar microorganismos "desconocidos" siempre y cuando hayan suficientes espectros que permitan la diferenciación e identificación.

En cuanto a entender los espectros, de manera global no permiten ver la diferenciación entre microorganismos, por lo que al considerar las agrupaciones de bacterias -Gram positivos, Gram negativos- junto a levaduras se posibilita ver la diversidad entre ellos, si bien aquí se abarcaron distintos géneros de microorganismos, esas características individuales dieron información de la diferenciación a nivel especie.

El método de difracción ha mostrado ser una técnica rápida, confiable, no invasiva, sensible y específica para diferenciar colonias de microorganismos y es aplicada a estudios de microorganismos en industria, ambiente y al área la clínica por ser altamente sencilla y sensible. Los resultados generados mostraron que esta técnica es una buena herramienta en identificación de microorganismos “desconocidos”, sin embargo, es importante que las bases de datos que se creen tengan mayor cantidad y diversidad de patrones de difracción que permitan diferenciar e identificar en un mayor rango a los microorganismos.

Aunque ambas técnicas mostraron buenos resultados en la identificación de microorganismos “desconocidos”, la preparación de las muestras para obtener colonias aisladas presentó mayores inconvenientes, además del cuidado del agar al momento de la siembra y generarse mayores contaminaciones, generando dificultades al momento de tomar los patrones de difracción de las colonias.

Entonces, es muy importante tener presente que, para el análisis de espectros FT-IR al igual que para la obtención de los patrones de dispersión, la preparación de la muestra es un factor que influye en la variación de los resultados.

Perspectivas futuras y recomendaciones

Las ventajas que ofrecen estas metodologías en la identificación de microorganismos hace necesaria la estandarización de ellas en cada una de las matrices ambientales, de donde se quiere identificar los microorganismos, lo cual, le aportaría mayor aplicabilidad a estas técnicas en los procesos de identificación y abriría el abanico de posibilidades de usos. Por lo anterior, deben mantenerse constantes los procedimientos de cultivo, preparación y registro estrictamente estandarizados (medio de cultivo, temperatura y tiempo de incubación, entre otros), para así permitir la alta reproducibilidad de las identificaciones de espectros y patrones de microorganismos “desconocidos” bajo las mismas condiciones y evitar las contaminaciones que afectan las mediciones en ambas técnicas.

A partir de los resultados obtenidos en este proyecto, se hace necesario incluir nuevas y más mediciones para obtener mayor diversidad en los espectros vibracionales y en los patrones de difracción, con lo cual se podría, más adelante, construir estas bibliotecas de espectros FT-IR y bases de datos de patrones de difracción que permita diferenciar una variedad de microorganismos. También, para darle mayor aplicación de este trabajo y a esas bases de datos, se podría generar aplicaciones tecnológicas (dispositivos móviles) que permitan una mayor facilidad y acceso a la información generada por estas bases de datos, que contribuyan finalmente en una identificación rápida de los microorganismos.

Bibliografía

- Aguiar, J. C.; Mittmann, J.; Ferreira, I.; Ferreira-Strixino, J.; Raniero, L.** (2015). Differentiation of *Leishmania* species by FT-IR spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 142: 80–85.
- Álvarez Ordóñez, A.; Prieto, M.** (2012). Fourier Transform Infrared Spectroscopy in Food Microbiology. SpringerBriefs in Food, Health and Nutrition. *Springer*.
- Albuquerque, P., Mendes, M. V., Santos, C. L., Moradas-Ferreira, P., Tavares, F.** (2009). DNA signature-based approaches for bacterial detection and identification. *Science of the Total Environment*, 407 (12), 3641-3651.
- Amiali, N. M., Mulvey, M. R., Sedman, J., Louie, M., Simor, A. E., Ismail, A. A.** (2007). Rapid identification of coagulase-negative staphylococci by Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of Microbiological Methods* 68, 236–242.
- Amiel, C., Mariey, L., Curk-Daubié, M.C., Pichon, P., Travert, J.** (2000). Potentiality of Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) for discrimination and identification of dairy Lactic acid bacteria. *Lait* 80, 445–459.
- Arango, G., Ramirez, C., Vargas, L. G., Muñoz, L. M., Pérez, J. C.** (2013). Uso de patrones de difracción de luz láser y análisis de imágenes para diferenciación de tres tipos de colonias bacterianas. *Dyna*, 80 (177), 69-74.
- Arivalagan, P., Singaraj, D., Haridass, V., Kaliannan, T.** (2014). Removal of cadmium from aqueous solution by batch studies using *Bacillus cereus*. *Ecological Engineering*, 71, 728-735.
- Arrondo, J. L. R., Muga, A., Castresana, J., Goñi, F. M.** (1993). Quantitative studies of the structure of proteins in solution by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 59 (1), 23-56.
- Awong-Taylor, J., Craven, K. S., Griffiths, L., Bass, C., Muscarella, M.** (2008). Comparison of biochemical and molecular methods for the identification of bacterial isolates associated with failed loggerhead sea turtle eggs. *Journal of Applied Microbiology*, 104 (5), 1244-1251.
- Bae, E., Banada, P. P., Huff, K., Bhunia, A. K., Robinson, J. P., Hirleman, E. D.** (2007). Biophysical modeling of forward scattering from bacterial colonies using scalar diffraction theory. *Applied Optics*, 46 (17), 3639-3648.

Bae, E., Aroonual, A., Bhunia, A. K., & Hirleman, E. D. (2011). On the sensitivity of forward scattering patterns from bacterial colonies to media composition. *Journal of biophotonics*, 4 (4), 236-243.

Banada, P. P., Guo, S., Bayraktar, B., Bae, E., Rajwa, B., Robinson, J. P., Bhunia, A. K. (2007). Optical forward-scattering for detection of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species. *Biosensors and Bioelectronics*, 22 (8), 1664-1671.

Banada, P. P., Huff, K., Bae, E., Rajwa, B., Aroonual, A., Bayraktar, B., Bhunia, A. K. (2009). Label-free detection of multiple bacterial pathogens using light-scattering sensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 24 (6), 1685-1692.

Barth, A. (2007). Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1767(9), 1073-1101.

Beekes, M., Lasch, P., Naumann, D. (2007). Analytical applications of Fourier transform-infrared (FT-IR) spectroscopy in microbiology and prion research. *Veterinary Microbiology*, 123 (4), 305-319.

Beléndez Vásquez, A. (2000). Tema 14-Difracción. Departamento de Física, Ingeniería de Sistemas y Teoría de la Señal. Universidad de Alicante, España.

Bosch, A., Miñán, A., Vescina C., Degrossi, J., Gatti, B., Montanaro, P. et al. (2008). Fourier Transform Infrared Spectroscopy for Rapid Identification of Nonfermenting Gram-Negative Bacteria Isolated from Sputum Samples from Cystic Fibrosis Patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 2535-2546.

Bosshard, P. P., Zbinden, R., Abels, S., Böddinghaus, B., Altwegg, M., Böttger, E. C. (2006). 16S rRNA gene sequencing versus the API 20 NE system and the VITEK 2 ID-GNB card for identification of nonfermenting Gram-negative bacteria in the clinical laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, 44 (4), 1359-1366.

Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29 (8), 601-608.

Braiman, M. S., Rothschild, K. J. (1988). Fourier transform infrared techniques for probing membrane protein structure. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*, 17 (1), 541-570.

Buchl, N.R., Hutzler, M., Mietke-Hofmann, H., Wenning, M., Scherer, S. (2010). Differentiation of probiotic and environmental *Saccharomyces cerevisiae* strains in animal feed. *Journal of Applied Microbiology* 109, 783–791.

Burgula, Y., Khali, D., Kim, S., Krishnan, S.S, Cousin, M.A., Gore, J.P., Reuhs, B.L., Mauer, L.J. (2007). Review Of Mid-Infrared Fourier Transform-Infrared Spectroscopy Applications For Bacterial Detection. *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology*, 15,146–175.

Busse, H. J., Denner, E. B., Lubitz, W. (1996). Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. *Journal of Biotechnology*, 47 (1), 3-38.

Buzalewicz, I., Wieliczko, A., & Podbielska, H. (2011). Influence of various growth conditions on Fresnel diffraction patterns of bacteria colonies examined in the optical system with converging spherical wave illumination. *Optics express*, 19 (22), 21768-21785.

Calle, R. (1996). Juridical and sociocultural problems on the definition of a law concerning property, usage and access to genetic resources in Colombia. *Journal of Ethnopharmacology*, 51 (1), 127-146.

Camaró Sala, M. L., Catalá Cuenca, V., Gimeno Cardona,C., Martínez García, R., Olmos Martínez, P. (2013). Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos. Procedimientos en Microbiología Clínica. *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 48, 1-26.

Cavalier-Smith, T. (2004). Only six kingdoms of life. *The Royal Society*, 271, 1251-1262.

Cherkaoui, A.; Hibbs, J.; Emonet, S.; Tangomo, M.; Girard, M.; Francois, P.; Schrenzel, J. (2010). Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level. *Journal of Clinical Microbiology*, 48 (4), 1169–1175.

Claus, H. (1993). Optimal selection of biochemical tests to identify microbial species. *Zentralblatt Für Bakteriologie*, 278 (4), 522-528.

Colodner, R., Raz, R., Meir, I., Lazarovich, T., Lerner, L., Kopelowitz, J., Bisharat, N. (2004). Identification of the emerging pathogen *Vibrio vulnificus* biotype 3 by commercially available phenotypic methods. *Journal of clinical microbiology*, 42 (9), 4137-4140.

Collado, M. C., Hernández, M. (2007). Identification and differentiation of *Lactobacillus*, *Streptococcus* and *Bifidobacterium* species in fermented milk products with bifidobacteria. *Microbiological Research*, 162 (1), 86-92.

Costa, A. F., Humpire-Mamani, G., Machado Traina, A. J. (2012). An Efficient Algorithm for Fractal Analysis of Textures. XXV SIBGRAPI Conference on Graphics, Patterns and Images, Department of Computer Science, University of Sao Paulo, USP, Sao Carlos Brazil.

Costa, A. (2013). PhD Student at University of São Paulo.

Croci, L., Suffredini, E., Cozzi, L., Toti, L., Ottaviani, D., Pruzzo, C., Serratore, P., Fischetti, R., Goffredo, E., Loffredo, G., Mioni, R. the *Vibrio parahaemolyticus* Working Group (2007). Comparison of different biochemical and molecular methods for the identification of *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Applied Microbiology*, 102 (1), 229-237.

Curk, M. C., Peladan, F., Hubert, J. C.(1994). Fourier Transform infrared (FTIR) spectroscopy for identifying *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Letters* 123, 241-248.

Das, S., Dash, H. R., Mangwani, N., Chakraborty, J., Kumari, S. (2014). Understanding molecular identification and polyphasic taxonomic approaches for genetic relatedness and phylogenetic relationships of microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 103, 80-100.

de Cartagena, Gaceta Oficial del Acuerdo (1996). Decisión Andina No. 391: Régimen Común sobre Acceso a los Recursos Genéticos. Artículo 2. *Año XII*, (213).

de Sousa Marques, A., Nunes de Melo, M. C., Cidral, T. A., Gomes de Lima, K. M. (2014). Feature selection strategies for identification of *Staphylococcus aureus* recovered in blood cultures using FT-IR spectroscopy successive projections algorithm for variable selection: A case study. *Journal of Microbiological Methods* 98, 26–30.

Drancourt, M., Bollet, C., Carlouz, A., Martelin, R., Gayral, J. P., Raoult, D. (2000). 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *Journal of clinical microbiology*, 38(10), 3623-3630.

Dunbar, J., Takala, S., Barns, S. M., Davis, J. A., Kuske, C. R. (1999). Levels of bacterial community diversity in four arid soils compared by cultivation and 16S rRNA gene cloning. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (4), 1662-1669.

Dziuba, B., Babuchowski, A., Nalecz, D., Niklewicz, M. (2007). Identification of lactic acid bacteria using FTIR spectroscopy and cluster analysis. *International Dairy Journal* 17, 183–189.

Emerson, D., Agulto, L., Liu, H., Liu, L. (2008). Identifying and characterizing bacteria in an era of genomics and proteomics. *BioScience*, 58 (10), 925-936.

Erukhimovitch, V.; Pavlov, V.; Talyshinsky, M.; Souprun, Y.; Mahmoud, H. (2005). FTIR microscopy as a method for identification of bacterial and fungal infections. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 37 (5), 1105-1108.

Fan, L. M., Ma, Z. Q., Liang, J. Q., Li, H. F., Wang, E. T., Wei, G. H. (2011). Characterization of a copper-resistant symbiotic bacterium isolated from *Medicago lupulina* growing in mine tailings. *Bioresource Technology*, 102 (2), 703-709.

Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., Valdezate, S. (2010). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Procedimientos en Microbiología Clínica. *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 37, 1-28.

Filip, Z.; Herrmann, S.; Kubat, J. (2004). FT-IR spectroscopic characteristics of differently cultivated *Bacillus subtilis*. *Microbiological Research*, 159 (3), 257-262.

Galichet, A., Sockalingum, G. D., Belarbi, A., & Manfait, M. (2001). FTIR spectroscopic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls: study of an anomalous strain exhibiting a pink-colored cell phenotype. *FEMS microbiology letters*, 197(2), 179-186.

Ghosh, S.B., Bhattacharya, K., Nayak, S., Mukherjee, P., Salaskar, D., Kale, S.P. (2015). Identification of different species of *Bacillus* isolated from Nisargruna Biogas Plant by FTIR, UV-Vis and NIR spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 148, 420-426.

Grangeteau, C., Gerhards, D., Terrat, S., Dequiedt, S., Alexandre, H., Guilloux-Benatier, M., von Wallbrun, C, Rousseaux, S. (2016). FT-IR spectroscopy: A powerful tool for studying the inter- and intraspecific biodiversity of cultivable non-*Saccharomyces* yeasts isolated from grape must. *Journal of Microbiological Methods*, 121, 50-58.

Grasso, E. M., Yousef, A. E., Rodriguez-Romo, L. A., Rodriguez-Saona, L. E. (2009). Rapid Differentiation of *Bacillus* Strains Using Hydrophobic Grid Membranes and Attenuated Total Reflectance Infrared Microspectroscopy. *Journal of Food Protection*, 72, 9, 1909-1915.

Guerrero, R., Berlanga, M. (2002). La ecología microbiana se hace mayor de edad. *Actualidad SEM*, 34, 22-25.

Gutiérrez Merma, A.; Rojas Hacha, R.; Torem, M. L. (2017). Cellular adaptation: culture conditions of *R. opacus* and bioflotation of apatite and quartz. *REM: Int. Eng. J., Ouro Preto*, 70 (1), 67-76

Haris, P. I., Chapman, D. (1993). Fourier transform infrared spectroscopy as a probe for the study of the structure of membrane proteins. *Biochemical Society Transactions*, 21 (1), 9-15.

He, Y., Reed, S., Bhunia, A. K., Gehring, A., Nguyen, L. H., Irwin, P. L. (2015). Rapid identification and classification of *Campylobacter* spp. using laser optical scattering technology. *Food Microbiology*, 47, 28-35.

Helm, D. Labischinski, H., Schallehn, G. Naumann, D. (1991). Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Journal of General Microbiology*, 137, 69-79.

Hernández, J.; Ortiz, R.; Walschburger, T.; Hurtado, A. (1992). Estado de la biodiversidad en Colombia. En HALFFTER, G. (compilador). La diversidad Biológica de Iberoamérica I. Primera Edición. *Instituto de Ecología. Xalapa (México)*. 40-42.

Herreros, H. (1991). Capítulo 38: Bioquímica de las membranas celulares. En: Bioquímica, Aspectos Estructurales y vías metabólicas. Editorial McGRAW HILL-Interamericana de España, España.

Hirleman, E. D., Bae, E. W., Huff, K., Banada, P., Bhunia, A. 2007. Light scattering endows bacterial colonies with unique fingerprints. SPIE Newsroom - *The International Society for Optical Engineering*.

Hirsch, P. R.; Mauchline, T. H.; Clark, I. M. (2010). Culture-independent molecular techniques for soil microbial ecology-Review. *Soil Biology and Biochemistry*, 42 (6), 878-887.

Horner-Devine, M. C., Carney, K. M., Bohannan, B. J. (2004). An ecological perspective on bacterial biodiversity. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 271 (1535), 113-122.

International Organization for Standardization. 2013. ISO 16140 Microbiology of food and animal feed – Method validation –. Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method. Disponible en: http://aplicacionesbiblioteca.udea.edu.co:2062/icontec_enormas_mobile/visor/HTML5.asp

International Standard. 2003. ISO 16140 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Protocol for the validation of alternative methods. First edition. Disponible en:

http://aplicacionesbiblioteca.udea.edu.co:2062/icontec_enormas_mobile/visor/HTML5.asp

Janssen, P. H. (2006). Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Applied and environmental microbiology*, 72 (3), 1719-1728.

Jiang, W., Saxena, A., Song, B., Ward, B. B., Beveridge, T. J., Myneni, S. C. B. (2004). Elucidation of Functional Groups on Gram-Positive and Gram-Negative Bacterial Surfaces Using Infrared Spectroscopy. *Langmuir*, 20 (26), 11433-11442.

Johler, S., Stephan, R., Althaus, D., Ehling-Schulz, M., Grunert, T. (2016). High-resolution subtyping of *Staphylococcus aureus* strains by means of Fourier-transform infrared spectroscopy. *Systematic and Applied Microbiology*, 39 (3), 189-194.

Kamau, E. C.; Fedder, B.; Winter, G. (2010). The Nagoya Protocol on access to genetic resources and benefit sharing: what is new and what are the implications for provider and user countries and the scientific community?. *Law & Development Journal (LEAD)*, 6, 3: 248-263.

Karlsson, R., Gonzales-Siles, L., Boulund, F., Svensson-Stadler, L., Skovbjerg, S., Karlsson, A., Moore, E. R. (2015). Proteotyping: Proteomic characterization, classification and identification of microorganisms—A prospectus. *Systematic and applied microbiology*, 38 (4), 246-257.

Kim, H., Doh, I. J., Bhunia, A. K., King, G. B., Bae, E. (2015). Scalar diffraction modeling of multispectral forward scatter patterns from bacterial colonies. *Optics express*, 23 (7), 8545-8554.

Kirschner, C., Maquelin, K., Pina, P., Thi, N. N., Choo-Smith, L. P., Sockalingum, G. D., Naumann, D. (2001). Classification and identification of enterococci: a comparative phenotypic, genotypic, and vibrational spectroscopic study. *Journal of clinical microbiology*, 39 (5), 1763-1770.

Klis, F. M. (1994). Review: Cell Wall Assembly in Yeast. *Yeast*, 10, 851-869.

Kümmerle, M., Scherer, S., Seiler, H. (1998). Rapid and reliable identification of food-borne yeasts by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Applied and environmental microbiology*, 64(6), 2207-2214.

Lacumin, L., Ginaldi, F., Manzano, M., Anastasi, V., Reale, A., Zotta, T. Comi, G. (2015). High resolution melting analysis (HRM) as a new tool for the identification of species belonging to the *Lactobacillus casei* group and comparison with species-specific PCRs and multiplex PCR. *Food Microbiology*, 46, 357-367.

Langton, S. D., Chevennement, R., Nagelkerke, N., Lombard, B. (2002). Analysing collaborative trials for qualitative microbiological methods: accordance and concordance. *International Journal of Food Microbiology*, 79 (3), 175-181.

Lee, D. C., Chapman, D. (1986). Infrared spectroscopic studies of biomembranes and model membranes. *Bioscience Reports*, 6 (3), 235-256.

Lewis, R. N., McElhaney, R. N. (2013). Membrane lipid phase transitions and phase organization studied by Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1828 (10), 2347-2358.

López-Hontangas, J. L., Castillo, F. J., Salavert, M. Capítulo 3: Técnicas de identificación. En: *Microbiología aplicada al paciente crítico*. 27-41.

Malik, S., Beer, M., Megharaj, M., Naidu, R. (2008). The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water. *Environment International*, 34 (2), 265-276.

Mantsch, H. H., McElhaney, R. N. (1991). Phospholipid phase transitions in model and biological membranes as studied by infrared spectroscopy. *Chemistry and Physics of Lipids*, 57 (2), 213-226.

Maquelin, K., Choo-Smith, L. P., Kirschner, C., Ngo-Thi, N. A., Naumann, D., Puppels, G. J. (2002). Vibrational spectroscopic studies of microorganisms. *Handbook of vibrational spectroscopy*, Vol 1, Ed. Wiley.

Martínez-Romero, E.; Martínez-Romero, J. C. (Edit). (2004). *Microbiología General*. En: Microbios en línea. Disponible en: <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap1/>

Mariey, L., Signolle, J.P., Amiel, C., Travert, J. (2001). Review: Discrimination, classification, identification of microorganisms using FTIR spectroscopy and chemometrics. *Vibrational Spectroscopy*, 26, 151-159.

Marty, E., Buchs, J., Eugster-Meier, E., Lacroix, C., Meile, L. (2012). Identification of staphylococci and dominant lactic acid bacteria in spontaneously fermented Swiss meat products using PCR-RFLP. *Food Microbiology*, 29 (2), 157-166.

Melin, A. M., Allery, A., Perromat, A., Bébéar, C., Déléris, G., de Barbeyrac, B. (2004). Fourier transform infrared spectroscopy as a new tool for characterization of mollicutes. *Journal of Microbiological Methods*, 56 (1), 73-82.

Michell, A. J., Sourfield, G. (1970). An assessment of infrared spectra as indicators of fungal cell wall composition. *Aust. J. biol. Sci.*, 23, 345-60.

Ministerio de Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible (2013). Decreto N° 1376 del 27 de Junio de 2013. "Por el cual se reglamenta el permiso de recolección de especímenes de especies silvestres de la diversidad biológica con fines de investigación científica no comercial". *Artículo 1, artículo 2 (parágrafo 2 y 6) y artículo 6*. República de Colombia.

Mondaca-Fernández, I., Moroyoqui, P. G., Cortés, J. D. J. B., Montenegro, M. M. M., Espinoza, L. C. (2010). Utilización de espectroscopia infrarroja FTIR para la detección de microorganismos. *Biociencias y Nanociencias. SINCO*.

Montaño Arias, N. M.; Sandoval Pérez, A. L.; Camargo Ricalde, S. L.; Sánchez Yáñez, Juan Manuel. (2010). Los microorganismos: pequeños gigantes. *Elementos*, 77, 15-23.

Naumann, D., Helm, D., Labischinski, H. (1991). Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy. *Nature*, 351 (6321), 81-82.

Naumann, D., Fijala, V., Labischinski, H., Giesbrecht, P. (1988). The Rapid Differentiation and Identification of Pathogenic Bacteria Using Fourier Transform Infrared Spectroscopic and Multivariate Statistical Analysis. *Journal of Molecular Structure*, 174: 165-170.

Ngo-Thi, N. A., Kirschner, C., Naumann, D. (2006). Characterization and identification of microorganisms by FT-IR microspectrometry. *Journal of Molecular Structure* 661-662, 371–380.

Nguyen, T. H., Fleet, G. H., Rogers, P. L. (1998). Composition of the cell walls of several yeast species. *Appl Microbiol Biotechnol*, 50: 206-212

Norris, K. P. (1959). Infra-red spectroscopy and its application to microbiology. *Journal of Hygiene*, 57(03), 326-345.

Oberreuter, H., Seiler, H., Scherer, S. (2002). Identification of coryneform bacteria and related taxa by Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 91–100.

Odumeru, J. A., Steele, M., Fruhner, L., Larkin, C., Jiang, J., Mann, E., McNab, W. B. (1999). Evaluation of accuracy and repeatability of identification of food-borne pathogens by automated bacterial identification systems. *Journal of Clinical Microbiology*, 37 (4), 944-949.

O'Hara, C. M., Sowers, E. G., Bopp, C. A., Duda, S. B., Strockbine, N. A. (2003). Accuracy of six commercially available systems for identification of members of the family *Vibrionaceae*. *Journal of clinical microbiology*, 41 (12), 5654-5659.

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2005). Manual de Seguridad en el Laboratorio. Tercera Edición. Organización Mundial de la Salud, Ginebra.

Orsini, F., Ami, D., Villa, A. M., Sala, G., Bellotti, M. G., Doglia, S. M. (2000). FT-IR microspectroscopy for microbiological studies. *Journal of microbiological methods*, 42(1), 17-27.

Oust, A., Moretro, T., Kirschner, C., Narvhus, J. A., Kohlerb, A. (2004). FT-IR spectroscopy for identification of closely related lactobacilli. *Journal of Microbiological Methods* 59, 149–162.

Pan, J., Ge, X., Liu, R., Tang, H. (2006). Characteristic features of *Bacillus cereus* cell surfaces with biosorption of Pb (II) ions by AFM and FT-IR. *Colloids and Surfaces B: biointerfaces*, 52 (1), 89-95.

Peccia, J., Hernandez, M. (2006). Incorporating polymerase chain reaction-based identification, population characterization, and quantification of microorganisms into aerosol science: a review. *Atmospheric Environment*, 40 (21), 3941-3961.

Preisner, O., Lopes, J. A., Guiomar, R., Machado, J., Menezes, J. C. (2007). Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy in bacteriology: towards a reference method for bacteria discrimination. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387 (5), 1739-1748.

Qing, H. U., Dou, M. N., Qi, H. Y., Xie, X. M., Zhuang, G. Q., Min, Y. A. N. G. (2007). Detection, isolation, and identification of cadmium-resistant bacteria based on PCR-DGGE. *Journal of Environmental Sciences*, 19 (9), 1114-1119.

Quilès, F., Humbert, F., Delille, A. (2010). Analysis of changes in attenuated total reflection FTIR fingerprints of *Pseudomonas fluorescens* from planktonic state to nascent biofilm state. *Spectrochimica Acta Part A*, 75, 610-616.

Rajwa, B., Bayraktar, B., Banada, P. P., Huff, K., Bae, E., Hirleman, E. D., Robinson, J. P. (2008, February). Phenotypic analysis of bacterial colonies using laser light scatter and pattern-recognition techniques. In *Biomedical Optics (BiOS) 2008* (pp. 68640S-68640S). International Society for Optics and Photonics.

Rappé, M. S., Giovannoni, S. J. (2003). The uncultured microbial majority. *Annual Reviews in Microbiology*, 57 (1), 369-394.

Roane, T. M.; Reynolds, K. A.; Maier, R. M.; Pepper, I. L. (2009). Chapter 2: Microorganisms. p. 9-35. En: Maier, R. M.; Pepper, I. L.; Gerba, C. P., Environmental Microbiology, Second Edition. Academic Press, San Diego, California (USA).

Robinson, J. P., Rajwa, B. P., Bae, E., Patsekin, V., Roumani, A. M., Bhunia, A. K., Hirleman, E. D. (2011). Using scattering to identify bacterial pathogens. *Optics and Photonics News OPN*, 22 (10), 20-27.

San-Blas, E., Cubillán, N., Guerra, M. Portillo, E., Esteves, I. (2012). Characterization of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* bacteria by Fourier Transform Mid-Infrared Spectroscopy with Attenuated Total Reflection (FT-IR/ATR). *Spectrochimica Acta Part A*, 93, 58-62.

Sandt, C., Sockalingum, G. D., Aubert, D., Lepad, H., Lepouse, C., Jaussaud, M., Toubas, D. (2003). Use of Fourier-transform infrared spectroscopy for typing of *Candida albicans* strains isolated in intensive care units. *Journal of clinical microbiology*, 41 (3), 954-959.

Santos, C., Fraga, M. E., Kozakiewicz, Z, Lima, N. (2010). Fourier transform infrared as a powerful technique for the identification and characterization of filamentous fungi and yeasts. *Research in Microbiology*, 161,168 -175.

Savic, D., Jokovic, N., Topisirovic , L. (2008). Multivariate statistical methods for discrimination of lactobacilli based on their FTIR spectra. *Dairy Sci. Technol.* 88, 273–290.

Schäwe, R., Fetzer, I., Tonniges, A., Hartig, C., Geyer, W., Harms, H.Chatzinotas, A. (2011). Evaluation of FT-IR spectroscopy as a tool to quantify bacteria in binary mixed cultures. *Journal of Microbiological Methods*, 86, 182-187.

Shapaval, V., Møretrø, T., Wold Åsli, A., Suso, H.P., Schmitt, J., Lillehaug, D., Kohler, A. (2017). A novel library-independent approach based on high-throughput cultivation in Bioscreen and fingerprinting by FTIR spectroscopy for microbial source tracking in food industry. *Letters in Applied Microbiology*, 64, 335-342.

Sibley, C. D., Peirano, G., Church, D. L. (2012). Molecular methods for pathogen and microbial community detection and characterization: current and potential application in diagnostic microbiology. *Infection, Genetics and Evolution*, 12 (3), 505-521.

Silhavy, T. J, Kahne, C., Walker, S. (2010). The Bacterial Cell Envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a000414.

Singh, A. K., Sun, X., Bai, X., Kim, H., Abdalhaseib, M. U., Bae, E., Bhunia, A. K. (2015). Label-free, non-invasive light scattering sensor for rapid screening of *Bacillus* colonies. *Journal of Microbiological Methods*, 109, 56-66.

Schmitt, J., Flemming, H. C. (1998). FTIR-spectroscopy in microbial and material analysis. *International Biodeterioration & Biodegradation* 41, 1-11.

Sockalingum, G. D., Bouhedja, W., Pina, P., Allouch, P., Bloy, C., Manfait, M. (1998). FT-IR spectroscopy as an emerging method for rapid characterization of microorganisms. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-Grand, France)*,44 (1), 261-269.

Sockalingum, G. D., Sandt, C., Toubas, D., Gomez, J., Pina, P., Beguinot, I., Manfait, M. (2002). FTIR characterization of *Candida* species: a study on some reference strains and pathogenic *C. albicans* isolates from HIV+ patients. *Vibrational spectroscopy*, 28 (1), 137-146.

Suchwałko, A., Buzalewicz, I., Podbielska, H. (2014). Bacteria identification in an optical system with optimized diffraction pattern registration condition supported by enhanced statistical analysis. *Optics express*, 22(21), 26312-26327.

Surewicz, W. K., Mantsch, H. H., Chapman, D. (1993). Determination of protein secondary structure by Fourier transform infrared spectroscopy: a critical assessment. *Biochemistry*, 32 (2), 389-394.

Sundaram, J., Park, B., Hinton, A., Chul Yoon, S., Windham, W. R., Lawrence, K. C. (2012). Classification and Structural Analysis of Live and Dead *Salmonella* Cells Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Principal Component Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60, 991-1004.

Szalontai, B., Nishiyama, Y., Gombos, Z., Murata, N. (2000). Membrane dynamics as seen by Fourier transform infrared spectroscopy in a *cyanobacterium*, *Synechocystis* PCC 6803: the effects of lipid unsaturation and the protein-to-lipid ratio. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1509 (1), 409-419.

Torsvik, V., Øvreås, L., Thingstad, T. F. (2002). Prokaryotic diversity-magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science*, 296 (5570), 1064-1066.

Vanechoutte, M., Van Eldere, J. (1997). The possibilities and limitations of nucleic acid amplification technology in diagnostic microbiology. *Journal of Medical Microbiology*, 46 (3), 188-194.

Wall, D. H.; Knox, M. A. (2014). Soil Biodiversity. Reference Module in *Earth Systems and Environmental Sciences*.

Ward, D. M.; Weller, R.; Bateson, M. M. (1990). 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature*, *345*, 63-65.

Wenning, M., Buchl, N. R., Scherer, S. (2010). Species and strain identification of lactic acid bacteria using FTIR spectroscopy and artificial neural networks. *Journal of Biophotonics*, *3*, No. 8–9, 493–505.

Wenning, M.; Scherer, S. (2013). Identification of microorganisms by FTIR spectroscopy: perspectives and limitations of the method. Mini-review. *Appl Microbiol Biotechnol*, *97*, 7111–7120.

Wenning, M., Breitenwiese, F., Konrad, R., Huber, I., Busch, U., Scherer, S. (2014). Identification and differentiation of food-related bacteria: A comparison of FTIR spectroscopy and MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of Microbiological Methods* *103*, 44–52.

Whitman, W. B. Coleman, D. C. Wiebe, W. J. (1998). Prokaryotes: The unseen majority. *PNAS*, *95*, 6578–6583.

Wintzingerode, F. V., Göbel, U. B., Stackebrandt, E. (1997). Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews*, *21* (3), 213-229.

Woo, P. C. Y.; Lau, S. K. P.; Teng, J. L. L.; Tse, H.; Yuen, K. Y. (2008). Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection*, *14* (10), 908-934.

Zeroual, W., Choisy, C., Doglia, S. M., Bobichon, H., Angiboust, J. F., Manfait, M. (1994). Monitoring of bacterial growth and structural analysis as probed by FT-IR spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, *1222* (2), 171-178.