

# Caracterización de microorganismos de importancia médica mediante espectroscopía Raman

## Characterization of microorganisms of medical importance by Raman spectroscopy

Esteban Solís-Campos<sup>1</sup>, Laura Rojas-Rojas<sup>2</sup>, Erick Hernández-Carvajal<sup>3</sup>, Ernesto Montero-Zeledón<sup>4</sup>, Dionisio Gutiérrez-Fallas<sup>5</sup>

Fecha de recepción: 29 de mayo, 2025

Fecha de aprobación: 26 de setiembre, 2025

Solís-Campos, E; Rojas-Rojas, L; Hernández-Carvajal, E; Montero-Zeledón, E; Gutiérrez-Fallas, D. Caracterización de microorganismos de importancia médica mediante espectroscopía Raman. *Tecnología en Marcha*. Vol. 39 Nº 2. Abril-Junio, 2026. Pág. 20-36.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v39i2.7973>

- 1 Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.  
 [e.esolis.c@gmail.com](mailto:e.esolis.c@gmail.com)  
 <https://orcid.org/0000-0001-5497-3201>
- 2 Laboratorio de Espectroscopía Molecular, Imagen y Color, Escuela de Física, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.  
 [laurarojas@tec.ac.cr](mailto:laurarojas@tec.ac.cr)  
 <https://orcid.org/0000-0002-1096-7659>
- 3 Centro de Investigación en Biotecnología (CIB), Escuela de Biología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.  
 [erhernandez@itcr.ac.cr](mailto:erhernandez@itcr.ac.cr)  
 <https://orcid.org/0000-0002-5585-9125>
- 4 Laboratorio de Espectroscopía Molecular, Imagen y Color, Escuela de Física, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.  
 [emontero@tec.ac.cr](mailto:emontero@tec.ac.cr)  
 <https://orcid.org/0000-0002-4545-5805>
- 5 Laboratorio de Espectroscopía Molecular, Imagen y Color, Escuela de Física. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.  
 [digutierrez2008@gmail.com](mailto:digutierrez2008@gmail.com)  
 <https://orcid.org/0000-0001-7190-8858>



## Palabras clave

Espectroscopía Raman; SERS; nanopartículas; identificación; bacterias; proteínas.

## Resumen

La identificación rápida y confiable de microorganismos de importancia médica continúa siendo un desafío en el diagnóstico clínico. En este estudio se utilizó espectroscopía Raman, combinada con la técnica SERS (Surface Enhanced Raman Spectroscopy), como herramienta complementaria para la caracterización de bacterias y proteínas. Se analizaron tres especies bacterianas (*Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica* y *Bacillus pumilus*), cuya identidad fue confirmada mediante secuenciación del gen ADN<sub>r</sub>-16S, obteniéndose coberturas del 100 % y porcentajes de identidad entre 99 % y 100 %. En este estudio se optimizaron protocolos de síntesis de nanopartículas de plata y oro sintetizadas *ex situ* e *in situ*, evaluando el efecto del agente reductor, el pH y el tiempo de incubación. Las nanopartículas sintetizadas por el método *ex situ* y a pH 9 generaron espectros con mayor definición y menor interferencia de fluorescencia. Los espectros Raman obtenidos mostraron picos característicos asociadas a proteínas, ácidos nucleicos y componentes de la membrana celular bacteriana, en concordancia con la literatura. Los resultados demuestran que la metodología implementada permite obtener espectros reproducibles y diferenciables entre especies bacterianas, así como identificar picos estructurales en proteínas recombinantes. La espectroscopía Raman con SERS se confirma como una técnica rápida y complementaria para el análisis de material biológico de interés biomédico.

## Keywords

Raman spectroscopy; SERS; nanoparticles; identification; characterization; bacteria; protein.

## Abstract

Rapid and reliable identification of medically relevant microorganisms remains a challenge in clinical diagnostics. In this study, Raman spectroscopy combined with Surface Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) was evaluated as a complementary tool for the characterization of bacteria and proteins. Three bacterial species (*Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica*, and *Bacillus pumilus*) were analyzed. Silver and gold nanoparticles were synthesized using *ex situ* and *in situ* approaches, evaluating the effects of reducing agent, pH, and incubation time. Nanoparticles synthesized *ex situ* at pH 9 produced spectra with improved band definition and reduced fluorescence interference. The Raman spectra exhibited characteristic bands associated with proteins, nucleic acids, and bacterial cell wall components, consistent with previous reports. These results demonstrate that the implemented methodology enables reproducible spectral profiling and differentiation among bacterial species, as well as structural characterization of recombinant proteins. Raman spectroscopy combined with SERS is confirmed as a rapid and complementary technique for the analysis of biologically relevant material.

## Introducción

Según la Organización Mundial de la Salud [1], [2], anualmente, 600 millones de personas se enferman por consumir alimentos contaminados, de las que cerca de 420 000 mueren, lo que, en términos económicos, representa una pérdida de productividad cercana a los 95 000 millones de dólares anuales. En Costa Rica, de acuerdo con los datos de Vigilancia de la Salud, anualmente se atiende un promedio de 312 000 episodios de diarrea, de los cuales mueren alrededor de

75 personas [2]. Una gran cantidad de estos casos son provocados por bacterias del género *Salmonella*, uno de los más importantes en el área clínica. También es preocupante que Costa Rica reporte varios casos de infección y muerte por propagación nosocomial de *Klebsiella pneumoniae*, resistente a antibióticos  $\beta$ -lactámicos [3]. Esta problemática vuelve fundamental la detección oportuna de cepas sospechosas y su confirmación, con el fin de que se tomen las medidas terapéuticas apropiadas para el manejo de los pacientes [4] [5]. Los procesos de identificación bacteriana en el área clínica siguen siendo complejos y lentos a nivel mundial [6]. La detección convencional está basada en métodos fenotípicos [7], los cuales requieren, como mínimo, 24-72 h para tener los resultados [8], [9], [10]. En contraste, los métodos genéticos (p. ej. PCR y secuenciación), proteicos (p. ej. espectrometría de masas) e inmunológicos (p. ej. ELISA) han logrado posicionarse como una alternativa relativamente rápida [11], sin embargo, involucran procedimientos complejos y necesitan de personal altamente calificado, limitando su extensión en el diagnóstico de enfermedades en zonas menos preparadas, o en la identificación de enfermedades emergentes que requieran una baja relación costo/eficiencia [8], [9]. Un sistema ideal de detección bacteriana debe cumplir con una serie de análisis en tiempo real, altamente sensibles, efectivos, baratos y fáciles de operar; con el fin de identificar los microorganismos causantes y tratar las infecciones e intoxicaciones a tiempo [8], [12], [13]. Los métodos de espectroscopía vibracional, como la Espectroscopía Raman, proporcionan información de la que es posible generar “huellas moleculares” bacterianas, cumpliendo con la mayoría de los criterios mencionados anteriormente. Si se cuenta con el equipo, ya sea un microscopio Raman con Transformada de Fourier, Raman FT (se pueden obtener espectros directamente) o un sistema Raman Dispersivo, que regularmente requiere el uso de la técnica SERS para el análisis de muestras biológicas, son herramientas de alta sensibilidad, de fácil preparación de las muestras, pero también de rápida y económica obtención de los espectros, lo que constituye una alternativa para la detección e identificación de microorganismos o sus estructuras, por medios tradicionales, de muestras obtenidas en la práctica diaria [12]. Por medio del uso de sistemas ópticos con láseres colimados sobre superficies muy pequeñas, la técnica SERS amplifica la señal Raman del material biológico mediante fenómenos de resonancia que ocurren con electrones sobre algunos puntos específicos (llamados puntos calientes) en sustratos metálicos o nanopartículas (NPs) de metales nobles, como oro o plata en dispersión coloidal [14]. Utilizando NPs recubiertas con  $\text{SiO}_2$ , también se han obtenido espectros de las bacterias: *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *B. anthracis* Sterne, *B. thuringiensis*, *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* [15]. Con SERS se ha progresado en la habilidad de distinguir rápidamente entre especies y cepas, con información de alta calidad. Zhou y colaboradores [16] lograron diferenciar tres cepas de *E. coli* entre sí y de *Staphylococcus epidermidis* por medio de los espectros obtenidos con la síntesis *in situ* de AgNPs. Particularmente, las AgNPs han aumentado su importancia desde diversas vertientes en el campo de la biomedicina [17], entre ellas, los estudios con actividad biocida y el aprovechamiento de las propiedades plasmónicas en la región visible del espectro electromagnético [18]. De acuerdo con Wan y colaboradores [18], en el campo de la síntesis de AgNPs, el método de Lee-Meisel es uno de los más utilizados, el cual se basa en la reducción de la plata con  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$  (ácido cítrico) a partir de una disolución acuosa de  $\text{AgNO}_3$  (nitrato de plata) [19]. Alternativamente, se pueden formar AgNPs con reductores fuertes, como  $\text{NaBH}_4$  (borohidruro de sodio) [20] o  $\text{NH}_2\text{OH}$  (hidroxilamina) [16]. La caracterización de microorganismos de origen biológico permitiría establecer protocolos para utilizar estas novedosas técnicas como complemento de las técnicas tradicionales.

## Metodología

### Crecimiento bacteriano

#### *Obtención, cultivo y almacenamiento de bacterias*

Las bacterias *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella enterica* fueron proporcionadas por el Laboratorio de Microbiología del Centro de Investigación y de Servicios Químicos y Microbiológicos (CEQIATEC), Costa Rica. Por su parte, la *Bacillus pumilus* se obtuvo del Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigación en Biotecnología (CIB), Costa Rica. Durante todo el proyecto, se ejecutaron procedimientos de preservación de las cepas, realizando subcultivos en placas con medio semi-sólido compuesto de caldo nutritivo (8 g/L, PhytoTechnology Laboratories®) y agar (15 g/L, Difco™), se incubaron a 37 °C durante 24 h y, posteriormente, se almacenaron a temperatura ambiente o bajo refrigeración (4 °C) hasta el siguiente subcultivo.

#### *Pre-cultivo y cultivo de bacterias*

Se realizó un aislamiento por rayado de las bacterias *K. pneumoniae*, *S. enterica* y *B. pumilus* en placas de agar nutritivo y se incubó a 37 °C por 24 h. Posteriormente, se aisló una colonia (2 mm - 5 mm diámetro) y se pre-cultivó en caldo nutritivo a 37 °C, con agitación por 18 h para cada cepa bacteriana. A partir de los pre-cultivos homogenizados se tomó 1,5 mL y, por triplicado, se inoculó en 13,5 mL de caldo nutritivo, se incubó a 37 °C y agitación por 3 h. Para determinar la concentración de las bacterias, se realizaron diluciones seriadas a razón de  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  y  $10^{-8}$  en solución salina (0,85 % m/v NaCl), a partir de las cuales, mediante un proceso de incubación, conteo de las unidades formadoras de colonias y correlación se obtuvieron las concentraciones.

#### *Preparación de las muestras bacterianas para la medición en Raman*

Los cultivos obtenidos se homogenizaron utilizando un vórtex por 5 s y se centrifugaron a 5000 rpm por 10 min a 4 °C. Los precipitados bacterianos se lavaron dos veces con agua ultrapura, se descartó el sobrenadante y se almacenaron a 4 °C hasta su medición con espectroscopía Raman.

### Caracterización bioquímica y genética de las cepas bacterianas

#### *Identificación bioquímica mediante ensayos Gram y Biolog*

Se realizaron tinciones de Gram para cada bacteria, siguiendo el protocolo recomendado por Sutton [21]. Adicionalmente, se realizaron pruebas Biolog, para determinar la especie bacteriana.

Los resultados de la identificación fenotípica se obtuvieron utilizando el lector de placas Biolog y el software OmniLog® Data Collection. Finalmente, se obtuvieron los resultados de la comparación con la base de datos de GEN III y se analizaron los valores de SIM, DIST, tipo de organismo y especie.

#### *Identificación genotípica mediante secuenciación de la región genómica de la subunidad 16S ribosomal (ADNr-16S)*

La extracción de ADN se realizó a partir del cultivo de una colonia de cada bacteria de interés. Se incubó a 37 °C con agitación por 16 h. Los cultivos homogenizados se centrifugaron en recipientes de 2 mL a 15000 rpm por 10 min y a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se realizaron dos lavados del precipitado bacteriano con agua libre de nucleasas, centrifugando bajo las

mismas condiciones. Posteriormente, se realizó la extracción de ADN genómico siguiendo el protocolo de purificación para bacterias Gram negativas [22], incubando 1 h en ARNasa en el momento respectivo. Dicho procedimiento se realizó por duplicado para cada bacteria. Posteriormente, mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se amplificó la región génica codificante de la subunidad 16S ribosomal (ADNr-16S). Este procedimiento se adaptó del protocolo recomendado por [23], tomando en cuenta las sugerencias de algunos autores [23], [24], [25]. Para amplificar el gen ADNr-16S de cada bacteria, se prepararon mezclas de los siguientes reactivos: imprimadores universales 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492r (5'-TACGGYTACCTTGTACGACTT-3'), desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) libres, amortiguador de reacción y agua libre de nucleasas. Una vez que el termociclador alcanzó la temperatura de calentamiento inicial (95 °C), se añadieron la polimerasa y la muestra de ADN genómico. Se programó el termociclador Veriti™ para realizar 35 ciclos con el siguiente perfil térmico: calentamiento inicial y desnaturalización a 95 °C por 1 min, alineamiento a 52 °C por 30 s y extensión a 72 °C por 90 s. Dicho perfil está basado en lo recomendado por [22] para el amortiguador de reacción utilizado y por la base de datos de N. E. Biolabs [26]. Una vez confirmados y cuantificados los productos de PCR se enviaron 15 µL por muestra a la empresa Psomagen Maryland (E.U.A), para obtener la secuencia nucleotídica de los ADNr-16S de cada bacteria. Las secuencias amplificadas por duplicado de cada imprimador se analizaron por separado, se realizó un alineamiento global entre las repeticiones de los fragmentos seleccionados con la herramienta Clustal Omega [27], obteniendo una secuencia consenso por cada imprimador. Posteriormente, se realizó un alineamiento local de cada secuencia consenso con la base de datos de GenBank, disponible en el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) de Estados Unidos [28]. Se analizaron los valores de *query cover*, *E value* y porcentaje de identidad para identificar el organismo al que pertenecía cada fragmento alineado.

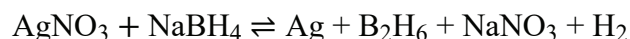
### Preparación y caracterización de las proteínas

Se utilizaron conectores del factor VIII y trombina, proteínas que son importantes en los mecanismos que conducen a la formación de coágulos. El procedimiento de preparación contempla la clonación de los conectores FVIIIa1 y FVIIIa3, la transformación de cepas de *E. coli* BL21(DE3) pLys S. Luego de un proceso de selección e incubación se extrajeron las proteínas sobre expresadas en *E. coli* mediante lisis celular por congelación/descongelación y la respectiva purificación. La autenticidad y pureza de los fragmentos recombinantes purificados se comprobó con el análisis de alícuotas de las proteínas purificadas mediante espectrometría de masas (MALDI TOF/TOF). Se evaluó la masa de cada uno de los fragmentos recombinantes sin digerir (masa total) y digeridos con las endoproteinasas Asp-N o tripsina (Roche- Diagnostics), según correspondía.

### Síntesis de nanopartículas

#### *Síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs)*

Las AgNPs se sintetizaron por medio de la reducción de iones Ag<sup>+</sup> (0,02 M) con una disolución de borohidruro de sodio (NaBH<sub>4</sub>), según la ecuación:



El proceso de reducción se realizó con dos métodos principales: *in situ* y *ex situ*. El método *in situ*, corresponde a una reducción de los iones de plata en la mezcla acuosa de Ag<sup>+</sup> y bacterias, mientras que en el método *ex situ*, la reducción de los iones plata, se realiza aparte

del concentrado bacteriano [19]. Cada uno de los métodos de síntesis de AgNPs, descritos anteriormente, se realizó con seis diferentes valores de pH (7, 8, 9, 10, 11 y 12) en el agente reductor y con cuatro diferentes proporciones molares (1:1, 1:2, 1:3 y 1:4), por triplicado.

#### *Síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs) ex situ*

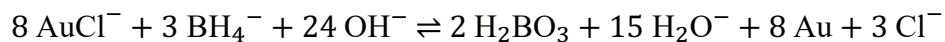
Las reacciones de síntesis se llevaron a cabo en tubos cónicos para microcentrífuga. Por medio de *vórtex*, se mezclaron durante 10 s los volúmenes requeridos de agua ultrapura y  $\text{AgNO}_3$ , luego se añadió la cantidad de  $\text{NaBH}_4$  (0,02 M) para lograr la relación molar de interés. Inmediatamente, se mezcló por medio de *vórtex* hasta observar un cambio de coloración (amarillo oscuro, café o verde musgo). Finalmente, se añadió 1 mL de la suspensión de AgNPs recientemente sintetizadas al concentrado bacteriano y se mezcló en *vórtex* durante 10 s.

#### *Síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs) in situ*

Este procedimiento es muy similar al anterior; no obstante, en la primera mezcla están presentes el precipitado bacteriano, el volumen de agua y  $\text{AgNO}_3$ , los cuales se mezclan hasta homogenizar la suspensión, incubándose por 5 min a temperatura ambiente, para promover la interacción de los iones  $\text{Ag}^+$  con las bacterias. Posteriormente, se añadió el  $\text{NaBH}_4$  con el mismo procedimiento que en el método *ex situ*.

#### *Síntesis de nanopartículas de oro (AuNPs)*

Las AuNPs se sintetizaron por medio de la reducción de los iones  $\text{AuCl}_4^-$  (0,02 M) con una disolución de  $\text{NaBH}_4$  y citrato de sodio como estabilizante, según la ecuación de la reacción:



Para llevar a cabo el proceso de reducción se evaluó el método *ex situ*, tal y como se describió para la síntesis de AgNPs. Se probaron seis diferentes valores de pH (7, 8, 9, 10, 11 y 12) en el agente reductor por triplicado, concluyendo que la mejor proporción molar  $\text{AuCl}_4^-:\text{NaBH}_4$  en las mezclas de síntesis es 1:1,5. En todas las reducciones se añadió 0,05 % (m/v) de citrato de sodio como agente estabilizante.

#### *Síntesis de nanopartículas de oro (AuNPs) ex situ*

Las reacciones de síntesis se llevaron a cabo en tubos para microcentrífuga. Por medio de *vórtex*, se mezclaron durante 10 s los volúmenes requeridos de agua ultra pura,  $\text{HAuCl}_4$  y citrato de sodio. Se dejó reposar por 5 min, luego se añadió la cantidad correspondiente de  $\text{NaBH}_4$  (0,02 M) para lograr la relación molar de interés e inmediatamente se mezcló por medio de *vórtex* hasta observar un cambio de coloración (desde rosado pálido, hasta morado oscuro). Finalmente, se añadió 0,5 mL de la suspensión de AuNPs, recientemente sintetizadas, al concentrado bacteriano, mezclándose en *vórtex* durante 10 s.

### **Preparación de las muestras para la obtención de los espectros Raman**

Las muestras preparadas se colocaron sobre portaobjetos de vidrio previamente incubados por 30 min en alcohol al 90 %, colocados en baño ultrasónico en acetona (20 min) y posteriormente enjuagados con agua destilada. Se realizaron pruebas de cultivo de bacterias en los portaobjetos que confirmaron la ausencia de contaminación previa. Finalmente, los espectros se obtuvieron con un microscopio dispersivo Raman confocal, modelo DXR de Thermo Scientific, con detector del tipo CCD, equipado con láseres de diodos con longitud de onda de 532 nm (Potencia máxima de 10 mW) y 780 nm ( $P_{\text{máx}} = 24 \text{ mW}$ ) y un láser de gas de He-Ne de 633 nm ( $P_{\text{máx}} = 8 \text{ mW}$ ); con potencias que varían en pasos de 0,1 mW hasta su valor máximo.

## Resultados

### Identificación de las cepas bacterianas

Las cepas bacterianas *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica* y *Bacillus pumilus* fueron cultivadas y concentradas siguiendo los protocolos descritos en la metodología. A partir del conteo en placa se obtuvieron concentraciones finales de  $(1,24 \pm 0,04) \times 10^9$  UFC/mL para *Klebsiella pneumoniae*,  $(1,07 \pm 0,19) \times 10^9$  UFC/mL para *Salmonella enterica* y  $(4,55 \pm 0,55) \times 10^8$  UFC/mL para *Bacillus pumilus*, las cuales se utilizaron en las mediciones Raman posteriores.

La identificación fenotípica mediante tinción de Gram confirmó que *K. pneumoniae* y *S. enterica* corresponden a bacterias Gram negativas, mientras que *B. pumilus* es Gram positiva. Los ensayos bioquímicos Biolog permitieron evaluar el metabolismo de 71 sustratos como fuente de carbono y 23 condiciones de sensibilidad química de las cepas bacterianas. Sin embargo, los valores de similitud (SIM < 0,50) y distancia (DIST > 5,0) obtenidos no permitieron discriminar entre los géneros de interés y otros géneros evolutivamente cercanos, ver Cuadro 1.

**Cuadro 1.** Similitud y distancia estadística con la base de datos GEN III de las especies probables en la identificación bioquímica de las 3 cepas bacterianas en estudio mediante Biolog.

Muestra en estudio	SIM (Biolog)	DIST (Biolog)	Especies probables (Biolog)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,302	6,578	<i>Klebsiella</i> sp.; <i>K. oxytoca</i> ; <i>K. pneumoniae</i> ss <i>pneumoniae</i>
<i>Salmonella enterica</i>	0,162	8,000	<i>Salmonella enterica</i> (gp1) ST typhimurium; <i>Salmonella enterica</i> (gp1).
<i>Bacillus pumilus</i>	0,157	11,490	<i>Bacillus pseudomycooides</i>

La identificación definitiva se realizó mediante la secuenciación del gen de la subunidad 16S ribosomal. El alineamiento local de las secuencias mostró coberturas del 100 %, valores de error iguales a cero y porcentajes de identidad del 100 % para *K. pneumoniae* y *S. enterica*, y del 99 % para *B. pumilus*, ver Cuadro 2. Estos resultados confirmaron la identidad taxonómica de las tres cepas bacterianas utilizadas en el estudio.

Para una identificación más precisa se realizó una secuenciación del gen 16S ribosomal. Los resultados del alineamiento de las secuencias consenso obtenidas del gen 16S, generados mediante alineamiento global (ClustalO), demostraron la identidad de cada bacteria con porcentajes y coberturas de prácticamente el 100 %. Este procedimiento permitió identificar las bacterias Gram negativas de *Klebsiella pneumoniae* (K) y *Salmonella enterica* (S), y la Gram positiva de *Bacillus pumilus* (B) (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Resultados del alineamiento local realizado a partir de las secuencias consenso amplificadas del 16S ribosomal para cada imprimador de las cepas bacterianas en estudio.

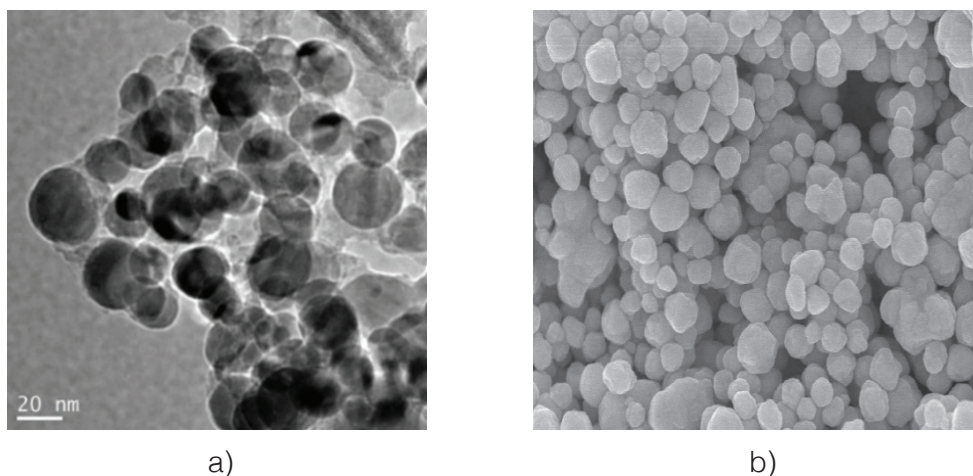
Muestra	Imprimador	Tamaño de la secuencia consenso (pb)	Región del 16S abarcada <sup>1</sup>	Cobertura (%)	Valor de Error	Identidad (%)	Identidad de la bacteria	Número de accesión
K	27f	350	V1, V2 y V3 <sup>2</sup>	100	0	100	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KY417867.1
	1492r	600	V6, V7, V8 y V9	100	0	100	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KY417867.1
S	27f	350	V1, V2 y V3 <sup>2</sup>	100	0	100	<i>Salmonella enterica</i>	LT795114.1
	1492r	500	V6 <sup>2</sup> , V7, V8 y V9	100	0	100	<i>Salmonella enterica</i>	LT795114.1
B	27f	350	V1, V2 y V3 <sup>2</sup>	100	0	99	<i>Bacillus pumilus</i>	KY508344.1
	1492r	500	V6, V7, V8 y V9	100	0	99	<i>Bacillus pumilus</i>	KY508344.1

<sup>1</sup>Basadas en una numeración realizada para *E. coli* [29], [30]. <sup>2</sup>Secuenciación parcial.

### Síntesis y caracterización de nanopartículas

Se evaluaron metodologías de síntesis de nanopartículas metálicas de plata y oro mediante procedimientos *ex situ* e *in situ* para la optimización de los parámetros de la medición, como son: tiempo de exposición, número de exposiciones, longitud de onda del láser, selección del valor de la apertura y del lente objetivo del microscopio. A partir de estas pruebas se determinó que la metodología *ex situ* permitió obtener espectros con mayor definición de picos y menor interferencia por fluorescencia.

La formación de nanopartículas de plata se confirmó visualmente mediante el cambio de color de las suspensiones coloidales durante el proceso de síntesis. Las AgNPs sintetizadas mediante reducción con citrato de sodio presentaron morfología aproximadamente esférica y diámetros en el rango de 20 a 50 nm (Figura 1a). El tamaño y color de las nanopartículas de plata se corresponden con lo reportado en la literatura [31]. En contraste, las nanopartículas obtenidas mediante reducción con borohidruro de sodio mostraron una mayor heterogeneidad en tamaño y forma, asociada a un proceso de nucleación rápida a temperatura ambiente (Figura 1b) [32].

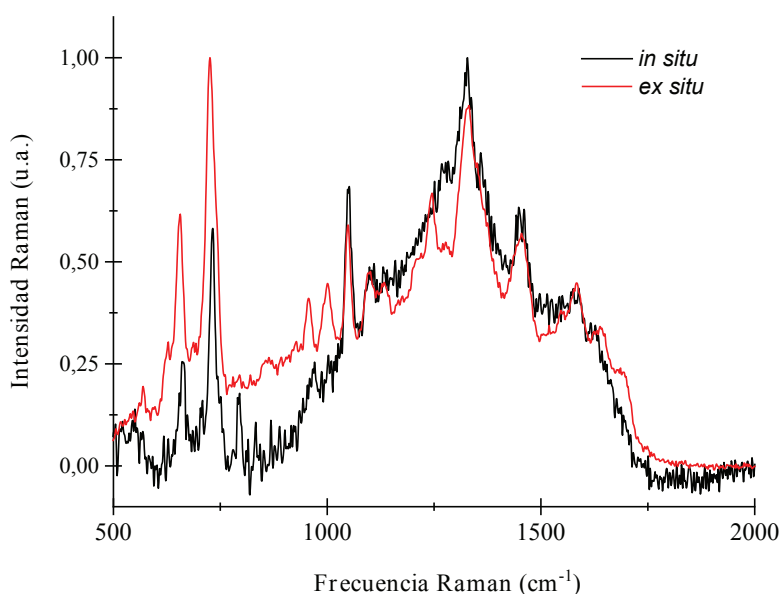


**Figura 1.** Micrografía de las nanopartículas de plata sintetizadas por reducción de  $\text{AgNO}_3$  con (a) citrato de sodio y (b) con borohidruro de sodio. Ambas micrografías tienen la misma escala.

Las nanopartículas incubadas durante 45 min mostraron el mejor desempeño en la técnica SERS, evidenciado por un aumento en la intensidad relativa de las señales Raman obtenidas con el compuesto patrón 1,2-di(4-piridil) etileno [33]. Por esta razón, dichas condiciones se utilizaron en las mediciones posteriores del material biológico.

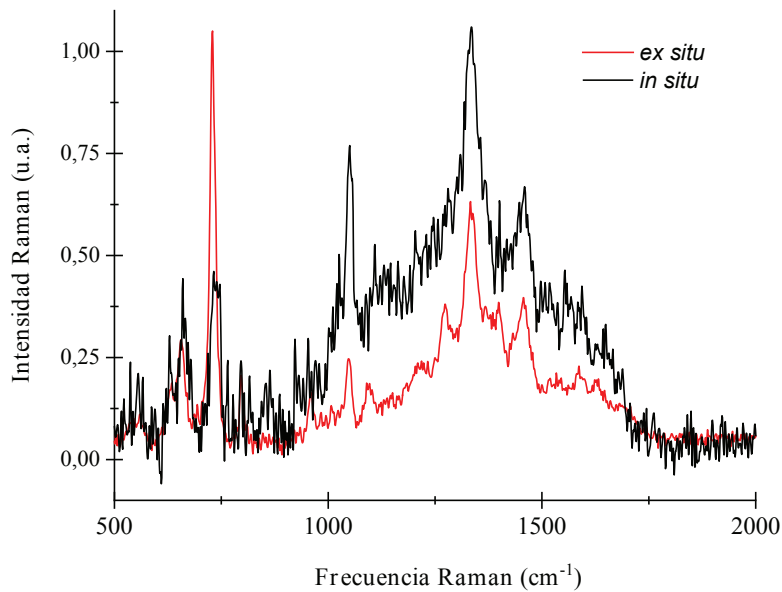
#### Adaptación e implementación de la metodología para la evaluación e identificación de material biológico mediante espectroscopía Raman.

Los espectros Raman de *K. pneumoniae*, *B. pumilus* y *S. enterica* se obtuvieron utilizando nanopartículas sintetizadas mediante metodologías *ex situ* e *in situ*. En el caso de *K. pneumoniae* y *B. pumilus*, ambos métodos produjeron espectros con posiciones de los picos similares; no obstante, los espectros obtenidos mediante el método *in situ* son menos definidos (Figuras 2 y 3).



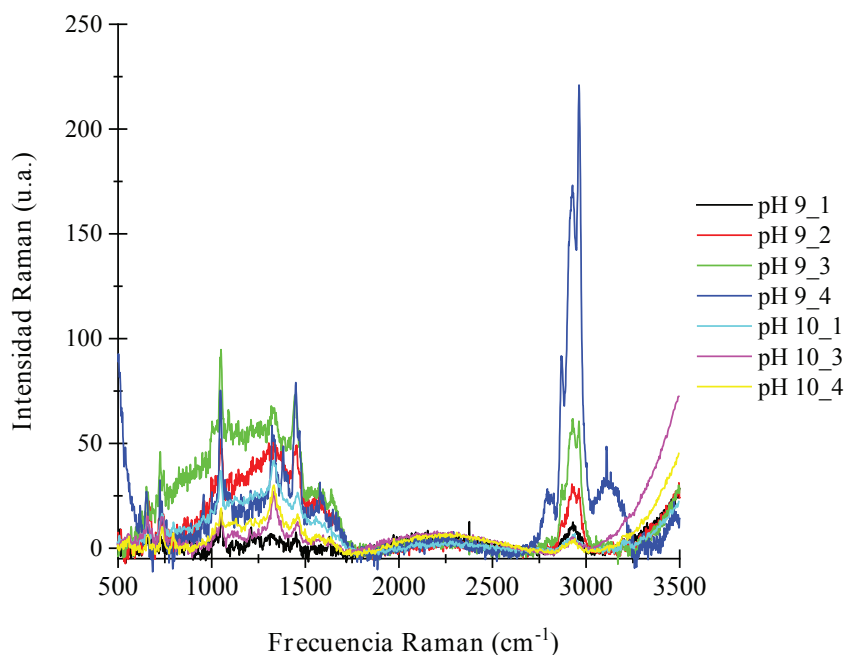
**Figura 2.** Espectro Raman de *Klebsiella pneumoniae* con nanopartículas obtenidas por medio de las metodologías *ex situ* (rojo) e *in situ* (negro).

Para *S. enterica* se observaron diferencias más notorias entre ambos métodos. Aunque la posición de los picos Raman se mantuvo constante, el método *ex situ* generó espectros con mayor definición y menor interferencia por fluorescencia, particularmente en la región cercana a  $700\text{ cm}^{-1}$  (Figura 4).



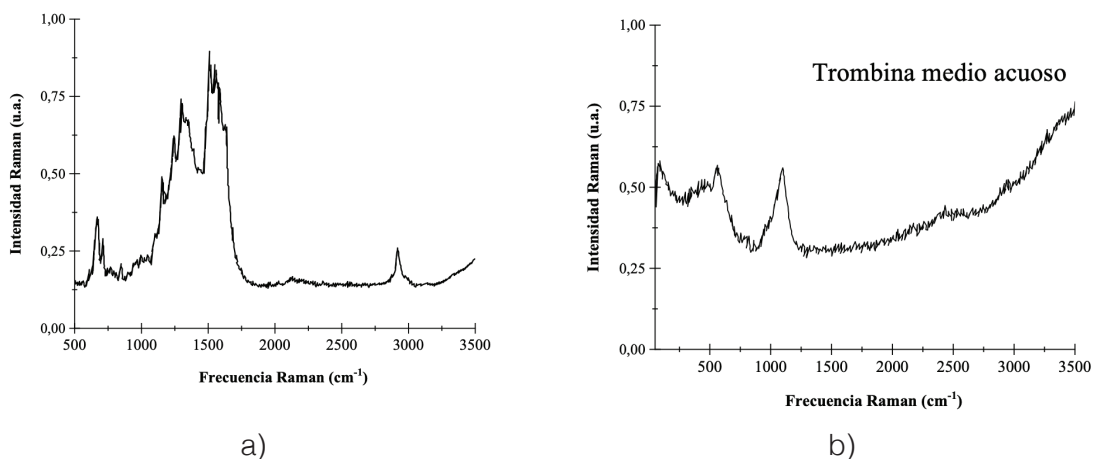
**Figura 4.** Espectro Raman de *Salmonella enterica* con nanopartículas generadas por medio de las metodologías *ex situ* (rojo) e *in situ* (negro).

Adicionalmente, se evaluó el efecto del pH de la solución reductora durante la síntesis de nanopartículas. Las mediciones realizadas en el rango de pH 9 a 12 mostraron que las nanopartículas sintetizadas a pH 9 produjeron los espectros Raman con mayor intensidad relativa y mejor definición de los picos (Figura 5). Por esta razón, este valor de pH fue seleccionado para las mediciones finales. Los espectros obtenidos son similares a los obtenidos por otros investigadores [33-34].



**Figura 5.** Espectro Raman de *Salmonella enterica* para diferentes valores de pH. Nótese que el espectro a pH 9,0 (azul) es el más definido.

La técnica SERS también se aplicó al análisis de proteínas recombinantes, incluyendo fragmentos del factor VIII y trombina. Se realizaron mediciones a diferentes concentraciones molares y utilizando nanopartículas de plata y oro con diámetros entre 50 y 70 nm. En las Figuras 6a y 6b se muestran ejemplos representativos de los espectros obtenidos para ambas proteínas, en los que se observan picos característicos asociadas a enlaces peptídicos y estructuras secundarias.

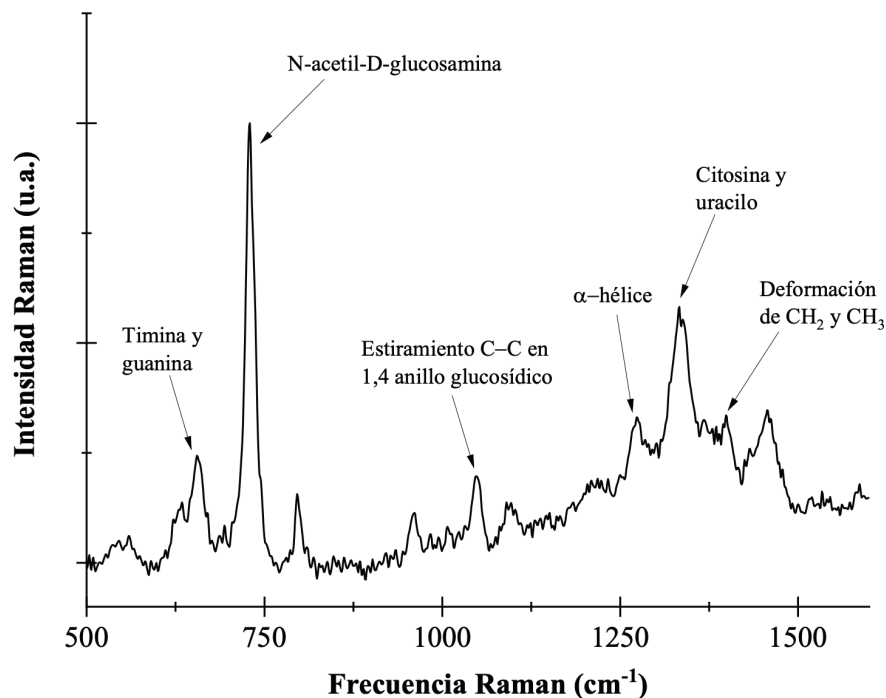


**Figura 6** a) Espectro Raman de la proteína F8a3 a una concentración de 0,5 M y b) espectro Raman de la Trombina utilizando nanopartículas de plata con longitud de onda del láser de 532 nm.

## Discusión

Los espectros Raman obtenidos para bacterias y proteínas corresponden a la superposición de las contribuciones vibracionales de sus principales componentes bioquímicos, incluyendo proteínas, ácidos nucleicos y lípidos [34]. En el caso de las bacterias, esta combinación genera un perfil espectral característico que puede considerarse una “huella dactilar” de cada especie [35].

Los picos observados en la región comprendida entre 600 y 1500  $\text{cm}^{-1}$  de la figura 7 coinciden con asignaciones previamente reportadas en la literatura para microorganismos de interés biomédico [36], [37]. Por ejemplo, las vibraciones cercanas a 650  $\text{cm}^{-1}$  y 1324  $\text{cm}^{-1}$  se asocian a bases nitrogenadas presentes en ácidos nucleicos, mientras que el pico alrededor de 730  $\text{cm}^{-1}$  se relaciona con componentes de la membrana celular bacteriana. Estas asignaciones concuerdan con la composición promedio del peso seco bacteriano, dominada por proteínas y ácidos nucleicos reportadas por [34] y [37].

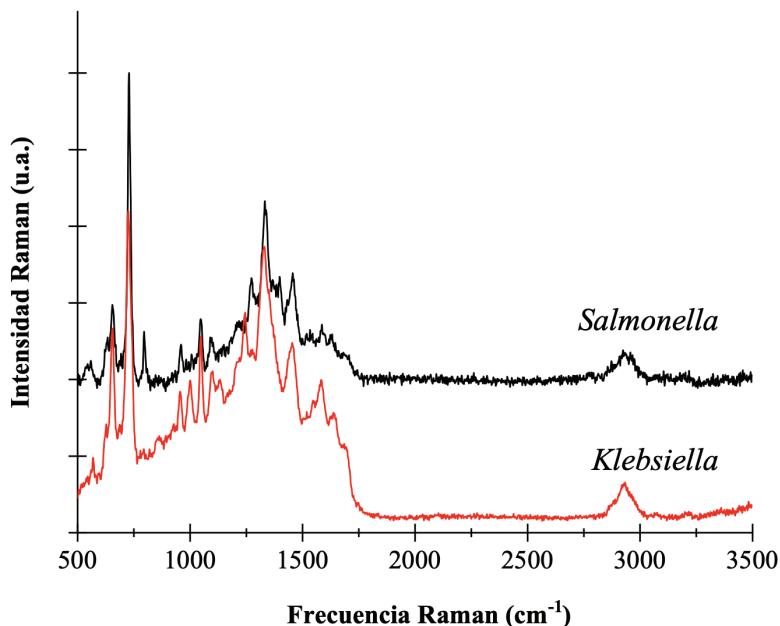


**Figura 7.** Identificación de algunas de las vibraciones Raman en el espectro de *Salmonella enterica*.

La comparación entre las metodologías de síntesis de nanopartículas mostró que el enfoque *ex situ* produce espectros con mejor definición y menor interferencia por fluorescencia, en concordancia con estudios previos que destacan la importancia del control del tamaño y la distribución de las nanopartículas para maximizar el efecto SERS. En particular, el desempeño superior observado a pH 9 sugiere que este parámetro influye directamente en la formación de nanopartículas con propiedades plasmónicas más favorables.

Aunque los espectros de las diferentes bacterias presentan similitudes en las posiciones de los picos Raman, el perfil global de cada espectro es heterogéneo [38], [39]. [40] Esta heterogeneidad permite diferenciar entre especies bacterianas cuando se analizan las intensidades relativas y la presencia de picos específicos, tal como se observa al comparar

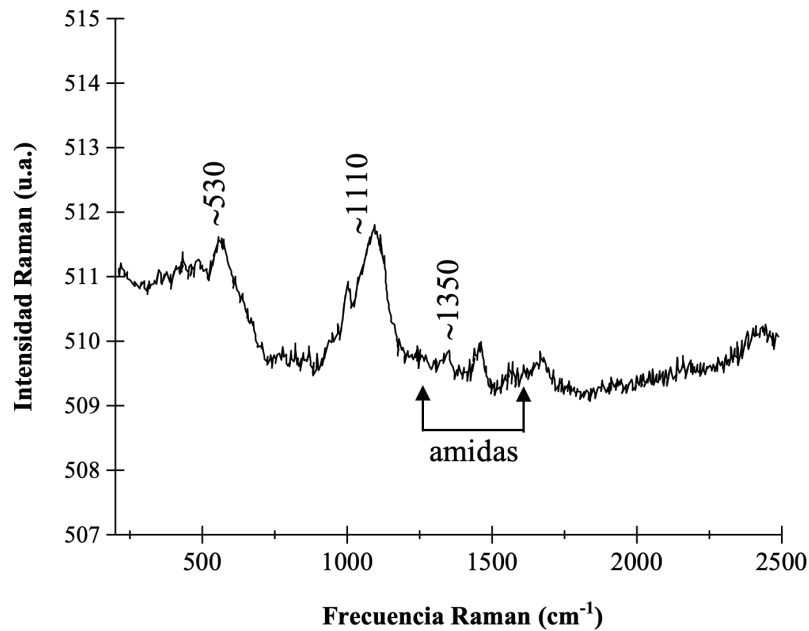
los espectros de *K. pneumoniae* y *S. enterica* (Figuras 2–4). Estos resultados son consistentes con reportes previos y respaldan el uso de la espectroscopía Raman como herramienta complementaria para la identificación bacteriana, ver figura 8.



**Figura 8.** Espectro Raman característico de las frecuencias presentes en las bacterias *Salmonella enterica* y *Klebsiella pneumoniae*.

En el análisis de proteínas, ver figura 9, los picos observados en los rangos asociados a enlaces disulfuro, aminoácidos específicos y vibraciones de amidas confirman la capacidad de la técnica SERS para detectar estructuras moleculares relevantes en biomoléculas [39] [41] [42]. La obtención de estos espectros demuestra la versatilidad de la metodología implementada y su potencial aplicación en estudios de proteínas específicas.

Entre las limitaciones del estudio se encuentra la variabilidad inherente a la distribución de nanopartículas sobre la muestra y la influencia de la fluorescencia en ciertas regiones espectrales. No obstante, los resultados obtenidos evidencian que, mediante una adecuada optimización de los parámetros de síntesis y medición, es posible obtener espectros reproducibles y con suficiente información estructural.



**Figura 9.** Espectro Raman de la Trombina utilizando AgNP's y un láser de 532 nm.

## Conclusiones y recomendaciones

En este estudio se implementó y verificó la utilidad de un protocolo experimental para la obtención de espectros Raman de bacterias y proteínas mediante la técnica SERS. La identidad de las cepas bacterianas fue confirmada mediante secuenciación del gen ADN<sub>r</sub>-16S, lo que permite la identificación biológica de las muestras analizadas.

La síntesis de nanopartículas metálicas de oro y de plata para la implementación de la técnica SERS demostró ser un factor crítico en la calidad de los espectros obtenidos. La síntesis *ex situ*, particularmente a pH 9, permitió obtener señales más definidas y con menor interferencia de fluorescencia en comparación con la síntesis *in situ*. Esto evidencia la importancia del control de las condiciones de síntesis para mejorar la reproducibilidad y la definición de la señal Raman. Asimismo, los tamaños de las nanopartículas se controlaron mejor mediante la síntesis *ex situ*, lo que a su vez resultó ser más conveniente en el análisis de bacterias mediante SERS.

Los espectros bacterianos mostraron picos característicos asociados a proteínas, ácidos nucleicos y componentes estructurales de la membrana celular. Aunque las tres especies bacterianas presentan similitudes en la región espectral 600–1500 cm<sup>-1</sup>, el perfil global permitió diferenciarlas mediante la intensidad relativa de los picos.

En el caso de las proteínas, la técnica permitió identificar vibraciones asociadas a enlaces disulfuro y modos amida, confirmando la capacidad del método para caracterizar estructuras biomoleculares en medio acuoso.

En conjunto, los resultados confirman que la espectroscopía Raman+SERS constituye una herramienta rápida, reproducible y complementaria a los métodos convencionales de identificación microbiológica. Su implementación abre posibilidades para futuras aplicaciones en diagnóstico, monitoreo estructural y estudios de biomateriales.

## Agradecimientos

Agradecemos a la Vicerrectoría de Investigación y Extensión del TEC por el apoyo y financiamiento del proyecto, código 1450017. Agradecemos al LANOTEC y al Laboratorio Institucional de Microscopía del TEC, por la colaboración con las imágenes de microscopía electrónica, así como la colaboración del Dr. Juan Teodomiro López Navarrete, Departamento de Químico Física, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, por sus recomendaciones y sugerencias para la implementación de la técnica de espectroscopía Raman en el TEC. Finalmente, queremos reconocer la colaboración del CEQIATEC y el CIB por brindarnos las cepas de bacterias utilizadas en el estudio y especialmente, al Laboratorio de Espectroscopía Molecular, Imagen y Color (LEMIC) de la Escuela de Física, por facilitar los equipos de algunas de las técnicas y por el equipamiento requerido durante esta investigación.

## Referencias

- [1] WHO, WHO's first ever global estimates of foodborne diseases find children under 5 account for almost one third of deaths, 2018.
- [2] Ministerio de Salud, «Sitio oficial Ministerio de Salud,» 2018. [En línea]. Available: [https://www.ministeriodesalud.go.cr/index.php/servicios-capacitadores-ms/doc\\_details/758-instalacion-de-funcionamiento-de-instalaciones-tipo-iii](https://www.ministeriodesalud.go.cr/index.php/servicios-capacitadores-ms/doc_details/758-instalacion-de-funcionamiento-de-instalaciones-tipo-iii).
- [3] K. Boye y D. S. Hansen, «Sequencing of 16S rDNA of Klebsiella: taxonomic relations within the genus and to other Enterobacteriaceae,» *Int J Med Microbiol*, vol. 292, nº Feb, pp. 496-498, 500-501, 2003.
- [4] INCIENSA, «Informe de vigilancia basada en laboratorio: Segundo caso importado de infección por enterobacteria carbapenemasa tipo Metalobetalactamasa New Delhi (MBL-NDM) positiva en Costa Rica,» Ministerio de Salud, Costa Rica, 2014.
- [5] INCIENSA, «Alerta: Confirmación de aislamientos de Klebsiella pneumoniae portadora de carbapenemasa de tipo KPC en cuatro pacientes internados en un hospital nacional de Costa Rica, enero 2016,» Ministerio de Salud, Costa Rica, 2016.
- [6] Y. Cheong, Y. J. Kim, H. Kang, S. Choi y H. J. Lee, «Rapid label-free identification of Klebsiella pneumoniae antibiotic resistant strains by the drop-coating deposition surface-enhanced Raman scattering method,» *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, vol. 183, nº Ag., p. 53, 2017.
- [7] W. T. Fan, T. T. Qin, R. R. Bi, H. Q. Kang, P. Ma y B. Gu, «Performance of the matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry system for rapid identification of streptococci: a review,» *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, vol. 36, nº 6, pp. 1005-1006, Jun 2017.
- [8] W. Gao, B. Li, R. Yao, Z. Li, X. Wang, X. Dong, H. Qu, Q. Li, N. Li, H. Chi, B. Zhou y Z. Xia, «Intuitive Label-Free SERS Detection of Bacteria Using Aptamer-Based in Situ Ag Nanoparticles Synthesis,» *Anal. Chem.*, vol. 89, nº 18, Sep 2017.
- [9] J. Li, C. Wang, H. Kang, L. Shao, L. Hu, R. Xiao, S. Wang y B. Gu, «Label-free identification carbapenem-resistant Escherichia coli based on surface-enhanced resonance Raman scattering,» *RSC Adv*, vol. 8, nº 9, p. 4761, 2018.
- [10] G. Dubourg, B. Lamy y R. Ruimy, «Rapid phenotypic methods to improve the diagnosis of bacterial bloodstream: meeting the challenge to reduce the time to result,» *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 24, nº 9, 2018.
- [11] C. Wang, J. Wang, M. Li, X. Qu, K. Zhang, Z. Rong, R. Xiao y S. Wang, «A rapid SERS method for label-free bacteria detection using polyethylenimine-modified Au-coated magnetic microspheres and Au@Ag nanoparticles,» *Analyst*, vol. 141, nº 22, pp. 6226-6238, 2016.
- [12] Y. Liu, H. Zhou, Z. Hu, G. Yu, D. Yang y J. Zhao, «Label and label-free based surface-enhanced Raman scattering for pathogen bacteria detection: A review,» *Biosens Bioelectron*, vol. 94, nº 131, pp. 131-140, Ag 2017.
- [13] N. E. Dina, H. Zhou, A. Colnita, N. Leopold, T. Szoke-Nagy, C. Coman y C. Haisch, «Rapid single-cell detection and identification of pathogens by using surface-enhanced Raman spectroscopy,» *Analyst*, vol. 142, nº 10, May 2017.
- [14] C. Wang y C. Yu, «Analytical characterization using surface-enhanced raman scattering (SERS) and microfluidic sampling,» *Nanotechnology*, vol. 26, nº 9, 2015.

- [15] W. R. Premasiri, D. T. K. Moir, N. Kreiger, G. 2. Jones y L. D. Ziegler, «Characterization of the Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) of Bacteria,» *J Phys Chem B*, vol. 109, nº 1, pp. 312-313, 319, 2005.
- [16] H. Zhou, D. Yang, N. P. Ivleva, N. E. Mircescu, R. Niessner y C. Haisch, «SERS Detection of Bacteria in Water by In Situ Coating with Ag Nanoparticles,» *Anal Chem*, vol. 86, nº 3, pp. 1529-1530, 2014.
- [17] M. Shi, J. Zheng, Y. Tan, G. Tan, J. Li, Y. Li, X. Li, Z. Zhou y R. Yang, «Ultrasensitive detection of single nucleotide polymorphism in human mitochondrial DNA utilizing ion-mediated cascade Surface Enhanced Raman Spectroscopy amplification,» *Anal Chem*, vol. 87, nº 5, pp. 2734-2740, 2015.
- [18] Y. Wan, Z. Guo, X. Jiang, K. Fang, X. Lu, Y. Zhang y N. Gu, «Quasi-spherical silver nanoparticles: Aqueous synthesis and size control by the seed-mediated Lee–Meisel method,» *J Colloid Interface Sci*, vol. 394, pp. 263-264, 2013.
- [19] P. C. Lee y D. Meisel, «Adsorption and Surface-Enhanced Raman of Dyes on Silver and Gold Sols,» *Journal of Physical Chemistry*, vol. 86, pp. 3391-3395, 1982.
- [20] S. Panikkanvalapil, M. A. Mohamoud, M. A. Mackey y E. S. M. A., «Surface-Enhanced Raman Spectroscopy for RealTime Monitoring of Reactive Oxygen Species-Induced DNA Damage and Its Prevention by Platinum Nanoparticles,» *ACS Nano*, vol. 7, nº 9, pp. 7524-7526, 2013.
- [21] S. Sutton, «The Gram Stain,» 2006. [En línea]. Available: <http://www.microbiol.org/resources/monographswhite-papers/the-gram-stain/>.
- [22] Promega Coporation, «Wizard (R) Genomic DNA Purification Kit. Technical Manual,» Promega, Madison WI, USA, 2023.
- [23] M. Govindarajan, S. Kwon y H. Weon, «Isolation, molecular characterization and growthpromoting activities of endophytic sugarcane diazotroph klebsiella sp. GR9,» *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 23, nº 7, p. 999 y 1003, 2007.
- [24] E. Gilbert, F. Yucebay, M. Malczynski, D. Smith, J. Esterly, C. Qi, M. Postelnick y M. McLaughlin, «Use of Organism Identification by 16S Ribosomal RNA Polymerase Chain Reaction to Shorten Antimicrobial Length of Therapy,» *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, vol. 88, nº 2, pp. 2,3,6 y 7, 2017.
- [25] R. Kuncham, T. Sivaprakasam, P. Kumar, P. Sreenath, R. Nayak, T. Thayumanayan y G. Subba, «Bacterial fauna associating with chironomid larvae from lakes of Bengaluru city, India - A 16s rRNA gene based identification,» *Genomics Data*, vol. 12, p. 46, 2017.
- [26] N. E. Biolabs, «PCR Protocol for Taq DNA Polymerase with Standard Taq Buffer (M0273),» 2017. [En línea]. Available: : <https://www.neb.com/protocols/1/01/01/taq-dna-polymerase-with-standard-taq-buffer-m0273>.
- [27] European Informatics Institute, «Clustal Omega Multiple Sequence Alignment,» 2018.
- [28] National Center of Biotechnology Information, «Basic Local Alignment Search Tool».
- [29] R. S. Hellberg, C. J. Haney, Y. Shen, C.-M. Cheng, D. M. Williams-Hill y W. B. Martin, «Development of a custom 16S rRNA gene library for the identification and molecular subtyping of Salmonella enterica,» *J Microbiol Methods*, vol. 91, pp. 448-449, 459, 2012.
- [30] B. Yang, Y. Wang y P.-Y. Qian, «Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis,» *BMC Bioinformatics*, vol. 17, nº 135, p. 3, 2016.
- [31] S. D. Solomon, M. Bahadory, A. V. Jeyarajasingam, S. A. Rutkowsky y C. Boritz, «Synthesis and Study of Silver Nanoparticles,» *Journal of Chemical education*, vol. 84, nº 2, pp. 322-325, 2007.
- [32] K. C. Song, S. M. Lee, T. S. Park y B. S. Lee, «Preparation of colloidal silver nanoparticles by chemical reduction method,» *Korean Journal Chemistry Engineering*, vol. 26, nº 1, pp. 153-155, 2009.
- [33] H. Guo, B. Xing, L. C. Hamlet, A. Chica y L. He, «Surface-enhanced Raman scattering detection of silver nanoparticles in environmental and biological samples,» *Science of the Total Environment*, pp. 246-252, 2016.
- [34] V. Ciobota, E. M. Burkhardt, W. Schumacher, P. Rösch, K. Küsel y J. Popp, «The influence of intracellular storage material on bacterial identification by means of Raman spectroscopy,» *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 397, pp. 2929-2937, 2010.
- [35] W. Huang, M. Li, R. M. Jarvis, R. Goodacre y S. A. Banwart, «Shining lighth on the microbial world: The application of Raman microspectroscopy,» *Advance Applied Microbiology*, vol. 70, pp. 153-186, 2010.
- [36] X. Lu, H. Al-Qadiri, M. Lin y B. Rasco, «Application of Mid-infrared and Raman Spectroscopy to the Study of Bacteria,» *Food and Bioprocess Technology*, vol. 4, pp. 919-935, 2011.
- [37] R. M. Jarvis y R. Goodacre, «Characterisation and identification of bacteria using SERS,» *The Royal Society of Chemistry*, vol. 37, pp. 931-936, 2008.

- [38] A. Sengupta, M. Mujacic y E. J. Davis, «Detection of bacteria by surface-enhanced Raman spectroscopy,» *Anal Bioanal Chem*, vol. 386, pp. 1379-1386, 2006.
- [39] J. Sundaram, B. Park, A. Hinton, K. Lawrence y Y. Kwon, «Detection and differentiation of salmonella serotypes using surface enhanced Raman scattering (SERS) technique,» *Food Measure*, vol. 7, pp. 1-12, 2013.
- [40] H. M. Al-Qadiri , M. Lin, A. Cavinato y B. Rasco, «Fourier transform infrared spectroscopy, detection and identification of Escherichia coli O157:H7 and Alicyclobacillus strains in apple juice.,» *International Journal of Food Microbiology*, vol. 111, n° 1, pp. 73-80, 2006.
- [41] T. Yang, X. Li y J. Lin, «Spectral analysis of human saliva for detection of lung cancer using surface-enhanced Raman spectroscopy,» *J Biomed Optics*, 2012.
- [42] K. Virkler y I. Lednev, «Raman spectroscopic signature of blood and its potential application to forensic body fluid identification,» *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, pp. 525-534, 2009.
- [43] K. M. Hamasha, *Raman Spectroscopy for the Microbiological Characterization and Identification of Medically Relevant Bacteria*, Wayne State University Detroit, MI, 2011, pp. 41-46 and 82.
- [44] M. Kahraman, M. M. Yazici, F. Sahin, O. Bayrak y M. Culha, «Reproducible Surface-Enhanced Raman Scattering Spectra of Bacteria on Aggregated Silver Nanoparticles,» *Applied Spectroscopy*, vol. 61, n° 5, pp. 479-485, 2007.
- [45] R. X. He, R. Liang, P. Peng y Y. N. Zhou, «Effect of the size of silver nanoparticles on SERS signal enhancement,» *J Nanopart Res*, vol. 19, n° 267, 2017.

### Declaración sobre uso de Inteligencia Artificial (IA)

Para la revisión gramatical y ortográfica de este artículo, empleamos la herramienta de IA *ChatGPT*. Esta nos permitió identificar errores y mejorar la fluidez del texto. No obstante, realizamos una revisión final para garantizar que el artículo cumpliera con los estándares de calidad de la revista. Además, utilizamos la misma herramienta de IA para traducir el resumen de este artículo del español al inglés. La herramienta nos ayudó a agilizar el proceso de traducción, pero realizamos una revisión exhaustiva para asegurar la calidad y precisión de las traducciones.