

Espectroscopía Raman Intensificada por Superficie (SERS) en la identificación de microorganismos que producen biodeterioro: Patrimonio edificado con arquitectura en tierra, Vale Histórico Paulista (São Paulo, Brasil)

Alejandra T. Fazio^{1,a}, Mónica Mamián López^{2b}, Marcia L. A. Temperini^{2c} Dalva Lúcia Araújo de Faria^{2d}

¹ Laboratorio de Micología Experimental, InMiBo UBA-CONICET, DBBE, FCEyN, UBA, Piso 4°, Pab II, Lab 9, Int. Güiraldes 2620. Ciudad Universitaria., C1428EHA, Buenos Aires, Argentina

² Laboratório de Espectroscopia Molecular, Departamento de Química Fundamental, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 748. Butantã, 05508-000, São Paulo, Brasil

^afazio.alejandra@gmail.com, ^bmonikml@gmail.com, ^cmlatemp@iq.usp.br, ^ddlafaria@iq.usp.br

Palabras clave: biodeterioro, hongos, arquitectura en tierra, SERS

RESUMEN

El objetivo de este trabajo es presentar resultados obtenidos mediante análisis por espectroscopía Raman intensificada por superficie (SERS) como herramienta novedosa para la identificación taxonómica de hongos a partir de *biofilms* formados en paredes de arquitectura en tierra (“pau-a-pique”, “taipa de pilão”, y adobe), en edificaciones históricas del Vale Histórico de São Paulo, representativas del período colonial brasileño, Con el objetivo de abrir la posibilidad de clasificación de hongos mediante SERS, se seleccionaron colonias puras que fueron previamente aislados de las paredes de tierra e identificados por taxonomía clásica y biología molecular. Los géneros estudiados fueron: *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Neurospora*, *Fusarium* y *Penicillium*. Las colonias fueron cultivadas en PDA sólido. Se realizaron extractos en acetato de etilo que fueron mezclados con nanopartículas de oro en suspensión coloidal. Se observaron bandas características de grupos funcionales en la región entre 600 y 1800 cm⁻¹ que presentaron diferencias para cada género. Análisis estadísticos de PCA y HCA mostraron relaciones que permitieron hacer asociaciones por género. Este trabajo es el primer reporte de comunidades microbianas a partir de paredes hechas con técnicas de arquitectura en tierra con el uso de Espectroscopía SERS.

INTRODUCCIÓN

Los hongos filamentosos tienen un importante papel en biotecnología, y también como agentes de biodeterioro.

Las metodologías utilizadas para la identificación de hongos en un principio eran sólo a nivel biológico, como la taxonomía clásica, mediante la observación de las características morfológicas macro y microscópicas. Más tarde, comenzaron los estudios de identificación mediante biología molecular por secuenciamento de los pares de bases de DNA de los hongos, y, más recientemente, fueron introducidas herramientas químicas, como cromatografía en fase gaseosa (GC), cromatografía gasosa-espectrometría de masa (GC-MS) [1], espectroscopia de infrarrojo (IR), de tal forma que las señales químicas puedan ser utilizadas como marcadores quimiotaxonómicos [1].

Por otro lado, gracias a la utilización de métodos de alta resolución espacial, podrían llevarse a cabo por ejemplo, estudios de espectroquímica del citoplasma, lo cual podría contribuir para la elucidación de la estructura y la función en los procesos de crecimiento de las hifas. En ese sentido, Prusinkiewicz junto a otros autores [2], utilizaron infrarrojo, espectroscopia Raman, y espectroscopia Raman intensificada por superficie (SERS), para obtener informaciones sobre la bioquímica de *Aspergillus nidulans* y *Curvularia protuberata*. Los autores crearon nanopartículas de oro (AuNPs) a través de la adición de cloruro de oro (HAuCl₄) al medio de cultivo líquido que contenía colonias de *A. nidulans* [2].

En la dispersión o efecto Raman, la interacción del fotón con la energía $h\nu_0$ conduce a una transición de la molécula a un estado virtual o no estacionario, y su retorno a un estado vibracional excitado del estado electrónico fundamental. Debido a que ese estado es inelástico, la diferencia de la energía de los fotones incidentes y dispersados equivale a las frecuencias vibracionales de la molécula [3]. Aunque la dispersión inelástica sea un proceso que ocurre con baja posibilidad (envuelve aproximadamente 1 de cada 10⁸ fotones dispersos), la espectroscopia Raman como técnica ofrece varias características atractivas como una alta especificidad y simplicidad, tanto en la manipulación de la muestra, como en la adquisición de los espectros.

Existen pocos trabajos sobre la identificación de microorganismos utilizando métodos espectroscópicos. En ese sentido, la microscopia Raman es un método analítico no destructivo útil para obtener informaciones detalladas sobre la composición molecular de factores biológicos de las muestras. En el trabajo de [4], los autores utilizaron la espectroscopia Raman para coleccionar espectros de basidiosporas de micromicetes de diferentes géneros de Basidiomycetes, en los cuales los espectros consiguieron diferenciar los taxones para la composición de lípidos y proteínas. Mediante el uso de análisis por discriminación lineal, aproximadamente 90% de los espectros, pudieron ser atribuidos al género correcto, aunque no se logró una identificación a nivel de especie.

La aplicación de la microespectroscopia Raman (RMS) como herramienta para una rápida caracterización e identificación de esporas individuales a partir de varias especies de micromicetes fue demostrada en el trabajo de [5]. Esa metodología requiere una mínima preparación de la muestra, y pequeños volúmenes de muestra para su análisis. Por eso, la misma, es apropiada para preservar la integridad de las muestras, en cuanto que proporciona una resolución espacial en escala micrométrica, la cual es necesaria para la caracterización de células individuales. En ese trabajo los autores utilizaron un método basado en RMS para compilar una biblioteca de referencia de espectros Raman de varias especies de micromicetes típicamente asociados a ambientes interiores húmedos. La biblioteca de referencia espectral generada fue utilizada para identificar esporas individuales de micromicetes a través de la comparación directa de los espectros Raman de esporas con las señales espectrales de referencia de la biblioteca. Por otra parte, los distintos perfiles espectrales de los espectros Raman proporcionaron una visión detallada sobre la composición química global de las esporas.

Por otro lado, la principal propiedad del efecto SERS (espectroscopia Raman de Superficie) es la intensificación electromagnética generada por la excitación de los plasmons de resonancia de superficie SPR. Dicho efecto ocurre cuando el campo eléctrico de la luz incidente interacciona con una superficie nanoestructurada causando el desplazamiento de electrones libres, de esa forma, la carga no compensada sobre la superficie, lleva a la polarización, generando una oscilación de una gran cantidad de electrones en frecuencias que son conocidas como resonancia de plasmon de superficie

localizada, LSPR. El aumento en la magnitud del campo eletromagnético local producido por esa resonancia, amplifica la señal Raman.

Los métodos exploratórios multivariados, como el análisis de componentes principales, PCA (*Principal component analysis*) o Análisis de Agrupamiento Hierárquico, HCA (*Hierarchical Cluster Analysis*), están entre los métodos más importantes utilizados con el objetivo de visualizar la estructura de los datos, encontrar similitudes y tendencias entre muestras, detectar muestras anómalas a través de una reducción de dimensionalidades del conjunto de datos [6].

El PCA es un método que reduce la dimensionalidad del conjunto de datos mediante la representación en un sistema nuevo de ejes, llamados componentes principales (PC), siendo posible visualizar tendencias de los datos. Originalmente, las muestras son puntos localizados en un espacio n-dimensional, donde n corresponde al número de variables. Cuando la dimensionalidad es reducida, las muestras son puntos localizados en espacios de PCs bi- o tridimensionales. En términos matemáticos, las señales de las muestras están contenidas en una matriz X, que se descompone en el producto de dos matrices llamadas de **puntuaciones (T)** y **pesos (P)**, como en la Ecuación 1:

$$(1) \quad \mathbf{X} = \mathbf{TP}^t + \mathbf{E}$$

Donde las puntuaciones representan las coordenadas de las muestras en el sistema de ejes de los PCs y cada PC es una combinación lineal de las variables originales, y los coeficientes de la combinación se llaman pesos. Matemáticamente los pesos representan cuanto contribuye cada variable para un determinado PC, y permite identificar cuáles son responsables por las diferencias entre las muestras. Para una visión adecuada de los agrupamientos, es importante que el número de PCs escogido sea el que captura el mayor porcentaje de varianza de los datos

En HCA se evalúa la distancia entre las muestras en un grupo, usando un gráfico llamado dendrograma. Esa evaluación puede realizarse a través de diferentes métodos, entre los más utilizados están: distancia Euclideana, de Mahalannobis, o de Manhattan. El dendrograma se construye después con esos valores de las distancias estadísticas.

El objetivo de este trabajo es presentar la adquisición de señales espectrales SERS para intentar identificar diferentes grupos de hongos mediante la caracterización de señales químicas obtenidas a partir de extractos de colonias de diferentes especies de micromicetes colectados y aislados de las fazendas hechas con arquitectura en tierra del Vale Histórico do Paraíba (São Paulo, Brasil).

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos de los hongos analizados

Las cepas utilizadas para los análisis fueron colonias de hongos aisladas a partir de sustratos de arquitectura en tierra, colectados en paredes de “fazendas” del Vale Histórico do Paraíba. Las especies habían sido identificadas previamente mediante taxonomía clásica y por biología molecular [7].

También se realizaron pruebas exponiendo la superficie de las hifas del micelio de las colonias de hongos en el microscopio Raman.

Las colonias aisladas fueron crecidas y conservadas en medio PDA (Agar papa dextrosa).

Preparación de las muestras

Para el primer ensayo de las colonias mediante SERS se procedió de la siguiente manera: a partir de las colonias puras se transfirieron pequeñas porciones de micelio a

nuevas placas de Petri conteniendo medio PDA y se realizó una primera colecta de micelio a partir de colonias con dos días de crecimiento para tener cepas inmaduras, en las cuales todavía no se habían formado conidios. Para el segundo ensayo, fueron colectadas colonias maduras de una semana de crecimiento donde ya había formación de conidios (Figura 3).

Para la extracción de las colonias, en una primera etapa se realizaron ensayos con una mezcla de agua: alcohol 80% respectivamente para a extração de substancias, pero no se lograron resultados óptimos. En una segunda etapa, los micelios de los micromicetes (crecidos en medio de cultivo PDA) fueron raspados y colocados en tubos eppendorf con acetato de etilo.

Los estudios de espectroscopia Raman intensificada por superficie fueron realizados en el Laboratorio de Espectroscopia Molecular del Instituto de química del Departamento de Química Fundamental de la Universidad de São Paulo.

Para la adquisición de los espectros SERS se utilizaron nanopartículas de oro (AuNPs) en suspensión, sintetizadas siguiendo o método modificado de Lee-Meisel (Lee, Meisel, 1982). Se precedió a concentrar el coloide por centrifugación hasta reducir el 90% del volumen. Luego, el coloide concentrado y las muestras se depositaron en volúmenes de 10 y 5 μL respectivamente, esperando el secado de solvente luego de cada deposición.

Los espectros fueron adquiridos usando un Microscópio Raman Renishaw inVia Reflex con laser en 785 nm, 5% de la potencia máxima, y con una lente de corta distancia de 50x (N.A. 0.75). Cada espectro fue colectado con una acumulación de 10 segundos cada uno.

Procesamiento de datos

El procesamiento de los datos fue realizado con el programa Matlab Versión 7.8. Para el pre-procesamiento de los espectros fueron aplicados los métodos de normalización, filtro de suavización Savitzky-Golay (ventana de 5 puntos), y derivada primera.

Los espectros fueron estudiados utilizando métodos de análisis exploratorio como PCA y HCA.

Tabla 1. Especies de hongos analizadas

Especies	Sustrato
<i>Aspergillus carbonarius</i>	Taipa de pilão
<i>Trichoderma atroviride</i>	Taipa de pilão
<i>Fusarium equiseti</i>	Taipa de pilão
<i>Trichoderma aff. atroviride</i>	Taipa de pilão
<i>Penicillium aff. flavigenum</i>	Taipa de pilão
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Taipa de pilão
<i>Aspergillus parasiticus</i>	Taipa de pilão
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Taipa de pilão
<i>Trichoderma koningiopsis</i>	Pau-a-pique
<i>Neurospora sitophila</i>	Pau-a-pique
<i>Trichoderma harzianum</i>	Pau-a-pique
<i>Fusarium aff. incarnatum</i>	Adobe
<i>Cladosporium uredinicola</i>	Adobe

RESULTADOS

Los ensayos realizados exponiendo la superficie de las hifas del micelio de las colonias de hongos en el microscopio Raman, no mostraron buenas señales espectrales. Uno de los problemas fue el calentamiento de la muestra. Se intentó también la obtención de señales mediante ensayos de inoculación de los hongos en medio de cultivo PDA con el agregado de coloide, pero, a pesar de haber logrado crecimiento de los mismos en dicho medio, no se logró obtener señales espectrales de las colonias.

Por el contrario, los resultados mostraron que mediante la sensibilidad de SERS se logró alcanzar el objetivo establecido:

Espectros SERS por género

Como se muestra en la Fig. 1 y Fig. 2, todos los espectros tienen una banda común en la región próxima de 730 cm^{-1} , que estaría asociada a bases nitrogenadas del DNA, más probablemente a la adenina, que se caracteriza por la mayor afinidad con el oro nanoestructurado. También se observan bandas próximas de 1000 y 1600 cm^{-1} , características de anillos aromáticos. La región entre 1000 e 1600 cm^{-1} presenta diferencias para cada género y atribuciones aproximadas basadas en la literatura [2, 8], que pueden ser consideradas de acuerdo con la Tabla 2.

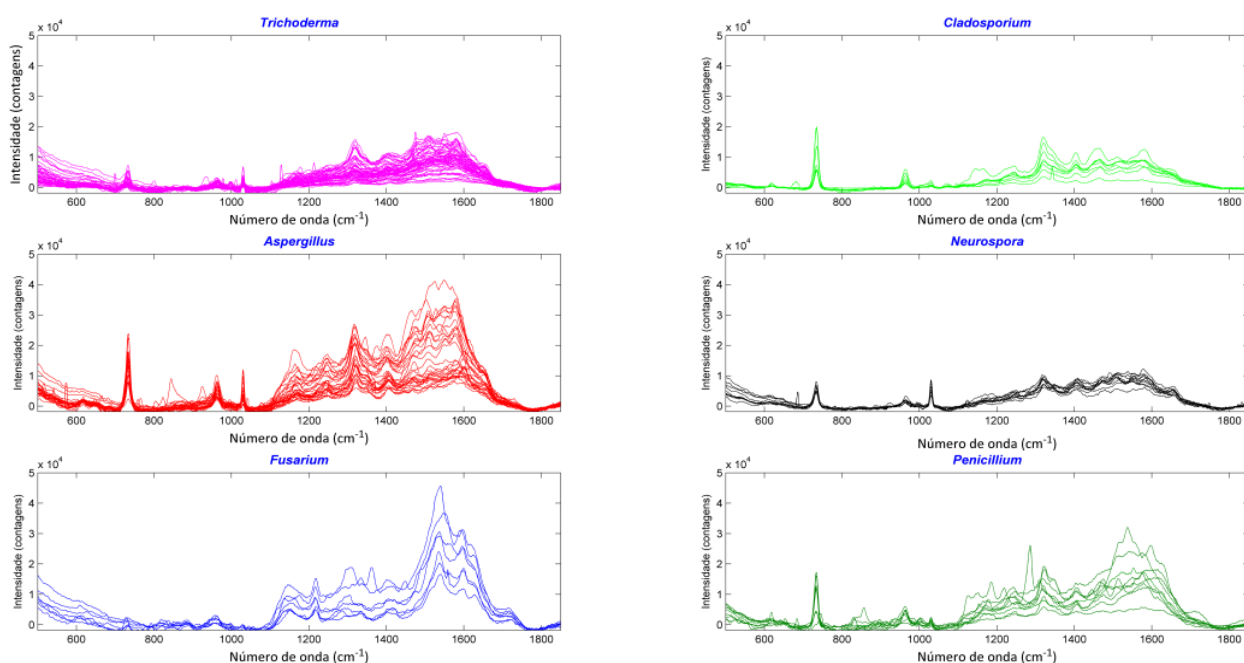


Figura 1 Espectros SERS de micromicetes clasificados por género.

Tabla 2. Atribuciones de señales espectrales basadas en la literatura

Posición / cm^{-1}	Atribución tentativa
610	COO- deformación
735	Estiramiento simétrico del anillo aromático, bases nitrogenadas del DNA, C-S de proteínas
815	Deformación angular P-O de fosfatos
880	vC-C sacaridos
905	Lípidos

943, 955, 976	$\nu\text{C-C}$, $\nu\text{C-C-N}$, $\nu\text{C-COO}^-$, $\nu\text{C-C}$ de azúcares y lípidos
990	CH_2 rocking
1005	Estiramiento del grupo fenil (fenilalanina), carbohidratos
1050	$\nu\text{C-O}$, $\nu\text{C-C}$, de açúcares e lipídios, deformação C-H
1130-1200	$\nu\text{C-O}$, $\nu\text{C-C}$, de açúcares e lipídios
1215-1235	Estiramento de anel, deformação CC-H
1245	Amidas terciarias
1270-1400	Deformação angular CH_2 (de purinas)
1420	ν simétrico COO^-
1430-1450	Deformação CH_2 e CH_3
1540-1590	Deformação angular N-H, estiramiento C=C y C=N
1600	$\nu\text{C=C}$ (de lípidos)

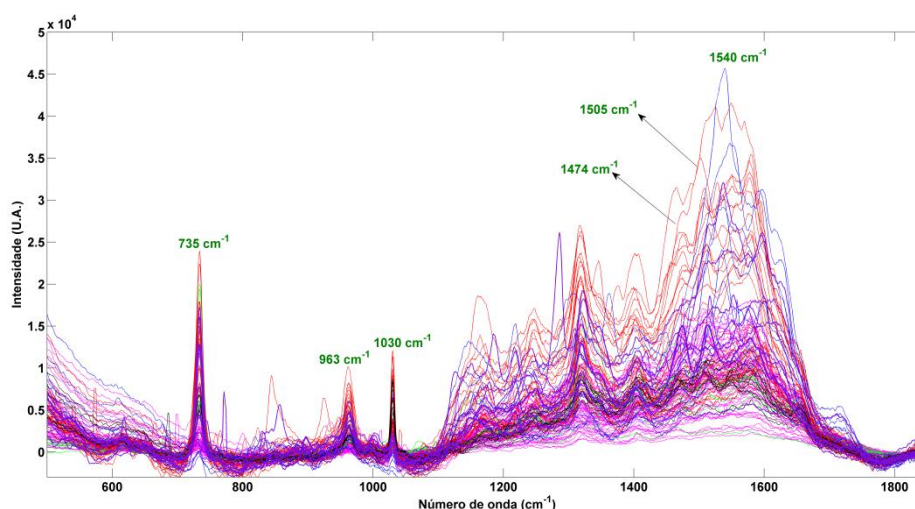


Figura 2. Espectros SERS de los micromicetes *Trichoderma* (violeta), *Cladosporium* (verde), *Aspergillus* (rojo), *Neurospora* (negro), *Fusarium* (azul), y *Penicillium* (rojo).

Análisis exploratorio. Reconocimiento de patrones.

Los análisis exploratorios realizados con PCA y HCA ya mostraron algunas tendencias que permiten hacer asociaciones por género. Los puntos de las componentes principales PC1 y 2 de la Fig. 3 explican ca. 70% de la varianza de los datos. La PC2 mostró una clara separación de los géneros *Fusarium* y *Cladosporium*, mientras que *Aspergillus* y *Trichoderma* estaban separados por la PC1. A pesar de que los géneros *Penicillium* y *Neurospora* no pudieron ser diferenciados por ninguna de las dos PCs, hubo una similitud entre las muestras de *Penicillium* con *Aspergillus* que podría estar asociada con que ambos géneros tienen producción de aflatoxinas.

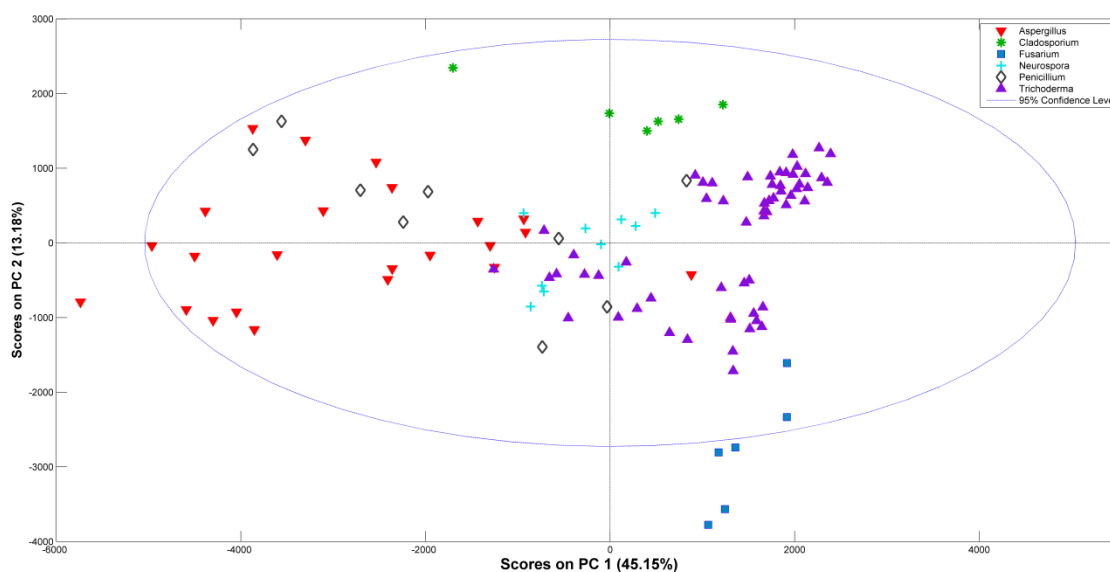


Figura 3. Gráfico de escores da PC1 vs. PC2 dos espectros SERS de seis gêneros de microfungos.

Para fazer uma comparação mais precisa, se necessitariam os espectros SERS de por lo menos algunos de los compuestos principales para cada género, lo cual resulta difícil por la escasa literatura relacionada con SERS en esta área, y tampoco contábamos con los compuestos patrones para hacer comparaciones. Por eso resulta difícil hacer una atribución más específica.

Por otro lado, el objetivo del trabajo era abrir una posibilidad de clasificación de los hongos mediante la técnica de SERS.

CONCLUSIONES

Los resultados mostraron que la técnica SERS, a diferencia de Raman, permitió obtener señales espectrales características para cada género analizado. Esto pudo deberse a que la Espectroscopia Raman de Superficie consiste en un proceso de intensificación de la sección de choque de dispersión Raman, que es observado cuando las moléculas están próximas de una superficie metálica nano-estructurada (oro o plata por ejemplo), o entre sus uniones, generando la amplificación de las señales en factores de hasta $10^8 - 10^{12}$. Es decir que esta técnica tiene la ventaja de alcanzar varios órdenes de grandeza más sensible que la espectroscopia Raman convencional lo cual favoreció la obtención de señales espectrales.

Los análisis exploratorios de las colonias por espectroscopia SERS realizados con PCA y HCA mostraron algunas tendencias que permiten hacer asociaciones por género. El presente trabajo muestra el potencial de la espectroscopia SERS como un método alternativo y rápido de discriminación entre géneros de hongos e inclusive especies.

Con respecto al análisis de hongos con Espectroscopia Raman de Superficie (SERS), nuestro trabajo es innovador, ya que es la primera vez que se realiza un análisis de extracción de los metabolitos solubles en un solvente orgánico, en este caso acetato de etilo.

Los ensayos realizados de algunas colonias cultivadas en placas de Petri con medio PDA sólido con AuNPs en diferentes diluciones, a pesar que hubo crecimiento de las colonias, cuando fueron testeadas con espectroscopia Raman no se consiguieron señales

significativas, probablemente porque las condiciones de dilución no garantizaban la formación de regiones de alta intensificación (*hotspots*), dependientes de la distancia interpartículas.

Este trabajo abre una nueva línea de investigación con el objetivo de desarrollar métodos para un mejor control de formación de, así como protocolos para una imagen latente SERS de AuNPs para especies de hongos todavía no estudiados.

En un futuro próximo, se espera que la técnica SERS nos permita evaluar los factores críticos para el crecimiento y reproducción de los hongos. Eso va a permitirnos entender mejor las respuestas de los hongos para diversos ambientes.

Las semejanzas y diferencias entre las actividades metabólicas van a ser clave para encontrar mejores estrategias de control. Así, la metodología SERS podrá ser una importante herramienta en el área de la microbiología ambiental.

Estos estudios lograron demostrar el aporte de la espectroscopia SERS como una herramienta nueva en la diferenciación de géneros de hongos filamentosos que producen biodeterioro del patrimonio cultural.

REFERENCIAS

- [1] De Gussem K, Vandenabeele P, Verbeken A, Moens L. (2007). Chemotaxonomical identification of spores of macrofungi: possibilities of Raman spectroscopy. *Anal Bioanal Chem* 387: 2823–2832 DOI 10.1007/s00216-007-1150-1.
- [2] Prusinkiewicz MA, Farazkhorasani F, Dynes JJ, Wang J, Gough KM, Kaminskyj SGW. (2012). Proof-of-principle for SERS imaging of *Aspergillus nidulans* hyphae using in vivo synthesis of gold nanoparticles. *Analyst*. 137, 4934.
- [3] Long D. A. (2002). The Raman Effect. Chichester, UK, Wiley. 624pp.
- [4] De Gussem K, Vandenabeele P, Verbeken A, Moens L. (2007). Chemotaxonomical Identification of Spores of Macrofungi: Possibilities of Raman Spectroscopy. *Anal Bioanal Chem*. 387:2823-2832.
- [5] Ghosal S, Macher JM, Ahmed K. (2012). Raman Microspectroscopy-Based Identification of Individual Fungal Spores as Potential Indicators of Indoor Contamination and Moisture-Related Building Damage.
- [6] Wu W, Massart DL, de Jong S. (1997). The kernel PCA algorithms for wide data. Part I: Theory and algorithms. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 36: 165-172.
- [7] Fazio A T, Cavicchioli A, Penna D S.A, Chambergo F S., de Faria D L.A. (2015). Towards a better comprehension of biodeterioration in earthen architecture: Study of fungi colonization on historic wall surfaces in Brazil. *J Cult Herit.* 16: 934–938
- [8] Szeghalmi A, Kaminskyj SGW, Roesch P, Popp J, Gough KM. (2007). Time Fluctuations and Imaging in the SERS Spectra of Fungal Hypha Grown on Nanostructured Substrates. *J Phys. Chem. B* 111: 12916-12924