



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS APLICADAS

**Estudio de propiedades elásticas de nanofibras
adhesivas de diatomeas *Nitzschia* spp**

Tesis que presenta

Ana Iris Peña Maldonado

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias Aplicadas

En la opción de

Ciencia de Materiales

Director de la Tesis:

Dr. Braulio Gutiérrez Medina

San Luis Potosí, S.L.P., Diciembre de 2011



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis **Estudio de propiedades elásticas de nanofibras adhesivas de diatomeas *Nitzschias spp*** presentada para obtener el Grado de Maestro(a) en Ciencias Aplicadas en la opción de Ciencia de Materiales fue elaborada por **Ana Iris Peña Maldonado** y aprobada el **20 de Diciembre de 2011** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Materiales Avanzados del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Braulio Gutiérrez Medina
(Director de la tesis)

Dra. Jessica Viridiana García Meza
(Comité tutorial)

Dr. José Luis Sánchez Llamazares
(Comité tutorial)

Dr. Haret-Codratan Rosu Barbus
(Comité tutorial)



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en la División de Materiales Avanzados del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Braulio Gutiérrez Medina.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología 289445 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

Durante la escritura del trabajo de tesis se recibió una beca por parte del proyecto *Análisis del mecanismo molecular del complejo fotosensible BLR utilizando pinzas ópticas de alta resolución*, a cargo del Dr. Braulio Gutiérrez Medina.

A lo largo de este trabajo se contó con la colaboración del Laboratorio Nacional de Investigaciones en Nanociencias y Nanotecnología (LINAN), donde fue posible obtener las imágenes de microscopía electrónica.



IPICYT

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 004 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias Aplicadas en la opción de Ciencia de Materiales está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 20 días del mes de diciembre del año 2011, se reunió a las 11:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. José Luis Sánchez Llamazares	Presidente	IPICYT
Dra. Jessica Viridiana García Meza	Secretario	UASLP
Dr. Braulio Gutiérrez Medina	Sinodal	IPICYT
Dr. Haret-Codratian Rosu Barbus	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS APLICADAS
EN LA OPCION DE CIENCIA DE MATERIALES**

sustentó la C.

Ana Iris Peña Maldonado

sobre la Tesis intitulada:

Estudio de propiedades elásticas de nanofibras adhesivas de diatomeas Nitzschia spp.

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Braulio Gutiérrez Medina

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 13:00 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 20 días del mes de diciembre de 2011.

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado

Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



A Homero que ha estado junto a mi y a mi sueño, siempre apoyándome, siempre caminando a mi par. Gracias por tu dedicación, tu paciencia y sobre todo tu amor. **TE AMO!!!**.

A mi madre, mi adorada viejita y mi hermano que han estado ahí junto a mi siempre al pendiente a pesar de la distancia. Gracias por todo el amor incondicional y las lagrimas derramadas. Los adoro!!!

A la familia de mi esposo, de la que solo he recibido cariño y un gran apoyo durante este largo proceso. Gracias!!!

Y por ultimo a mis amigas, que han llevado este proceso junto a mi, gracias por dejarme compartir parte de mi vida con ustedes...

Agradecimientos

A Braulio por su paciencia, su dedicación, todo lo que me ha enseñado, pero sobre todo por su excelente trabajo como asesor, no cualquiera tiene ese don.

A mis compañeras de laboratorio Sara y Noemi, por las buenas criticas, las risas, las enseñanzas, las fiestas que me regalaron, GRACIAS!!!

Al Dr. Sergio Casas, Mayte, Edith y a Isabel que siempre tiene una sonrisa que regalar y a todos los alumnos del laboratorio de Genómica Funcional, del IPICYT, que siempre tienen la disposición de ayudar y guiar.

A la Dra. Viridiana García Meza y a sus alumnas Yadiralia y Nubia por haberme enseñado a tratar con estas pequeñas algas, mientras me abrieron las puertas de su laboratorio en el Instituto de Metalurgia de la UASLP.

Y por último y no por ello menos importante, a los técnicos del área de microcopia, a Edgar y Gladis por haberme enseñado lo poco que ahora se sabe sobre microscopía electrónica, gracias!!!!.

Índice general

Constancia de aprobación de la tesis	III
Créditos Institucionales	V
Copia del acta del examen	VII
Dedicatoria	IX
Agradecimientos	XI
Índice general	XIV
Índice de cuadros	XV
Índice de figuras	XVIII
Resumen	XIX
Abstract	XX
1. Introducción	1
1.1. Motivación	2
1.2. Objetivos	3
2. Diatomeas	5
2.1. Introducción	5
2.2. Principales características	7
2.2.1. Morfología de la diatomea	8
2.2.2. Pared celular: Frústula	10
2.2.3. Reproducción	15
2.3. Adhesión y Motilidad	19
2.3.1. Adhesión	20
2.3.2. Motilidad	21
2.3.3. Modelo de adhesión y desplazamiento de las diatomeas	22
2.4. Análisis del mucílago por diversas técnicas	23
2.4.1. Mucílago	23
2.4.2. AFM: Propiedades elásticas del mucílago.	27

3. Pinzas Ópticas	33
3.1. Introducción	33
3.2. ¿Qué es una pinza óptica?	33
3.3. Principios básicos de una pinza óptica	36
3.3.1. Régimen de rayos	37
3.3.2. Régimen de Rayleigh	37
3.4. Las pinzas como un resorte	39
3.5. Rigidez en las pinzas ópticas	40
3.5.1. Equipartición de la energía	41
3.5.2. Stokes	42
3.5.3. Espectro de potencias	43
3.6. Nuestro sistema de pinzas ópticas	43
3.6.1. Láser infrarrojo y su trayectoria	45
3.6.2. Microscopio invertido	45
3.6.3. Fotodetector de posición	47
3.7. Calibración	49
3.7.1. Desplazamiento de la esfera: conversión V vs. nm	49
3.7.2. Rigidez de la trampa	52
4. Metodología experimental	55
4.1. Selección y cultivo de diatomeas	55
4.1.1. Condiciones de un cultivo	55
4.1.2. Medio Woods Hole	56
4.1.3. Cultivo funcional	58
4.2. Análisis de la interacción rafe-esfera, mucílago-esfera	62
4.2.1. Materiales y equipo	63
4.2.2. Microscopía y videomicroscopía	64
4.3. Sistema de pinzas ópticas: Preparando el ensayo	66
4.3.1. Medición del ensayo	68
4.3.2. Extras	70
5. Resultados, análisis y conclusiones	73
5.1. Microscopía y videomicroscopía	73
5.2. Análisis del ensayo	82
5.2.1. Modelo de análisis	82
5.2.2. Curvas fuerza vs extensión	83
5.3. Resultados y conclusiones	89
5.4. Conclusiones	91
5.5. Perspectivas a futuro	91
Bibliografía	93

Índice de cuadros

3.1. Calibración del FDP. Coeficientes de transformación de V_x , V_y para el desplazamiento de la platina en nm.	52
3.2. Calibración para la rigidez de nuestro sistema de pinzas ópticas.	53
4.1. Macronutrientes	56
4.2. Stock 6, Micronutrientes	57
4.3. Stock 7	57
4.4. Stock 8, Vitaminas	57
4.5. Stock 9, Silicatos.	58

Índice de figuras

2.1. Diatomeas de Haeckel	6
2.2. Diatomeas de Haeckel	7
2.3. Estructura	9
2.4. Cloroplastos	10
2.5. Frústula	11
2.6. Frústula	12
2.7. Patrones ornamentales	13
2.8. Caracterización de la frústula	14
2.9. Rafe	15
2.10. Reproducción celular	16
2.11. Reproducción asexual	17
2.12. Reproducción sexual	18
2.13. Fibras poliméricas extracelulares	20
2.14. Mucilago	21
2.15. Complejo de adhesión	23
2.16. Micrografías de transmisión	24
2.17. Rastros fluorescentes	25
2.18. Nanofibras adhesivas	26
2.19. fig:Mucílago	27
2.20. Cantilever con diatomea	28
2.21. Medición de longitudes	29
2.22. Desdoblamiento de proteínas modulares	30
3.1. Esquema básico de un sistema de pinzas ópticas.	34
3.2. Configuraciones de una pinza óptica.	35
3.3. Fuerzas de dispersión y gradiente ejercidas a la partícula.	36
3.4. Cambio de momento y óptica de rayos.	38
3.5. Desplazamiento de la esfera del centro del haz.	39
3.6. Resorte simple.	40
3.7. Movimiento Browniano de una esfera.	41
3.8. Esquema básico del sistema de pinzas ópticas.	44
3.9. Esquema del microscopio.	46
3.10. Fotodetector.	48
3.11. Gráfica de voltaje vs. posición en z	50
3.12. Barrido del láser para x y y	51

4.1. Pozos de cultivo	59
4.2. Cultivos	60
4.3. Viales	61
4.4. Canal	62
4.5. Vista general	64
4.6. Acercamiento	65
4.7. Señal del FDP vs. posición de la platina.	70
4.8. En busca del mucílago	71
5.1. Morfología diatomea	73
5.2. Interacción rafe-esfera	75
5.3. Interacción de 3 esferas	76
5.4. Esferas sobre el rafe.	77
5.5. Unión diatomea-esfera	78
5.6. Aglomerados de nanofibras	79
5.7. Mucilago de una diatomea fría.	80
5.8. Muestras frías	81
5.9. Muestras frías	81
5.10. Traza fuerza vs posición de la platina.	85
5.11. Traza fuerza vs extensión.	85
5.12. Geometría del ensayo.	86
5.13. Ajuste al modelo de cadena libremente articulada.	87
5.14. Longitud de contorno.	88
5.15. Longitud de persistencia.	88

Resumen

Se llevó a cabo un estudio de las propiedades elásticas del biopolímero secretado por diatomeas *Nitzschia* spp. Este biopolímero, conformado por nanofibras adhesivas, es liberado a través de una hendidura presente en la pared celular de sílice (frústula) que presentan las diatomeas, y es utilizado para la adherencia y desplazamiento sobre superficies. El trabajo de esta Tesis inició con el crecimiento celular, seguido de evaluaciones de motilidad de las diatomeas (por medio de microscopía óptica) y de una caracterización morfológica de la frústula (utilizando microscopía electrónica de barrido -MEB- de alta resolución). Asimismo, se estudió en detalle la interacción del biopolímero con partículas micrométricas de plástico, por medio de microscopía óptica, videomicroscopía y MEB en diferentes modos de operación. Una vez confirmada la interacción biopolímero-micropartículas se procedió a analizar las propiedades elásticas de las nanofibras por medio de un sistema de micromanipulación por láser conocido como pinzas ópticas, el cual permite aplicar y ejercer fuerzas del orden de piconewtons así como medir desplazamientos subnanométricos. Se analizaron curvas de fuerza-extensión para 56 nanofibras diferentes, obteniendo parámetros elásticos tales como la longitud de contorno (L_c) y la longitud de persistencia (L_p). Concluimos que las fibras tienen un módulo elástico similar al del plástico o al de moléculas de ADN. El estudio de este biopolímero a través de nuestro sistema resulta novedoso, ya que nos permitió manipular las fibras sin desplegar las proteínas que las conforman, ofreciendo una ventaja respecto a estudios previos realizados con microscopía de fuerza atómica (AFM). Este trabajo es relevante para las áreas tanto de biomateriales como de la biología celular de las diatomeas.

Palabras clave: diatomeas, nanofibras adhesivas, pinzas ópticas, biomateriales.

Abstract

We conducted a study on the elastic properties of a biopolymer secreted by diatoms *Nitzschia* spp. This biopolymer, formed by adhesive nanofibers, is released through a slit present in the silica-made cell wall (frustule) of diatoms, and is used during diatom adhesion and movement on surfaces. The work of this thesis began with the growing of cells, followed by evaluations of diatoms motility (using light microscopy) and a morphological characterization of the frustules (using high-resolution scanning electron microscopy -SEM-). We also studied in detail the interaction of the biopolymer with micron-sized plastic particles using optical microscopy, videomicroscopy and SEM in different modes of operation. Once the interaction biopolymer-microparticles was confirmed, we proceeded to analyze the elastic properties of the nanofibers by means of a laser-based micromanipulation system known as optical tweezers, which allows the application of forces on the order of piconewtons as well as the measurement of subnanometric displacements. We analyzed force-extension curves for 36 different nanofibers, obtaining elastic parameters such as the contour length (L_c) and the persistence length (L_p). We conclude that the fibers have an elastic modulus similar to plastic or DNA molecules. The study of this biopolymer using our system is novel because it allowed us to manipulate the fibers without unfolding the proteins that constitute them -an advantage over previous studies based on atomic force microscopy (AFM). This work is relevant both for the area of biomaterials as well as for the cell biology of diatoms.

Keywords: diatoms, adhesive nanofibers, optical tweezers, biomaterials.

Capítulo 1

Introducción

A lo largo de la historia de la humanidad múltiples descubrimientos y desarrollos tecnológicos han marcado su entorno. El siglo XX probablemente se ha caracterizado por los grandes avances científicos y tecnológicos que se dieron con un crecimiento exponencial, prueba de ello entre muchos otros miles son la televisión, teléfonos celulares, hasta las grandes supercomputadoras, teorías como la relatividad, etc. A lo largo del siglo XX el empuje de la ciencia llevó a la creación de múltiples desarrollos tecnológicos, la mayoría, si no es que todos, tienen como sus principales bases teóricas la física, la química y la matemática; sin embargo, muchos de estos desarrollos han podido tener estos grandes avances gracias y en gran medida al notable desarrollo de los materiales. Como ejemplo de ello no podemos dejar de recordar la notable y rápida transformación que ha sufrido la electrónica, desde los bulbos de finales de los años 50's hasta ahora con el advenimiento de los microchips.

Dada esta pequeña introducción, de los desarrollos generales o más visibles, paso con los desarrollos que no son tan evidentes como lo pueden ser los *Microscopios Electrónicos de Transmisión (TEM)* o los *Microscopios Electrónicos de Barrido (MEB)*, etc. Herramientas desarrolladas en el siglo pasado y que se han convertido en caballitos de batalla en diversas (si no es que todas) las ciencias. En este ámbito no sólo la física se ha podido ver beneficiada gracias a estos desarrollos, ya que a la par se han podido ir haciendo adaptaciones para áreas como la biología, la nanotecnología, materiales, por mencionar solo algunas. Hago este énfasis debido a que una de estas herramientas poco conocida, pero con un potencial muy amplio, es el caso de las *Pinzas Ópticas*. Herramienta capaz de atrapar y manipular objetos microscópicos a través de un láser. Desarrolladas a mediados de los años 80's y pensadas en un inicio solo para el atrapamiento o manipulación de átomos, es actualmente una poderosa herramienta para la micro- y nanotecnología. De principios 100% físicos, se ha convertido en una herramienta indispensable para estudios tan diversos como pueden ser: los estudios de motores moleculares, el estudio de átomos, así como de propiedades elásticas de polímeros, como es el caso del ADN.

Actualmente el IPICYT cuenta con un sistema *Pinzas Ópticas*, que ha sido desarrollado prácticamente a la par de este trabajo [48, 49], probablemente el único sistema de estas características y para fines biofísicos presente en el país. Con la capacidad de atrapar y manipular objetos biológicos, sin que estos sufran daño, somos capaces de tener una resolución

subnanométrica al medir desplazamientos, así como de aplicar y percibir fuerzas de algunas cuantas docenas de pN (10^{-12} N).

Pero, ¿para qué tener un sistema que nos permite manipular sólo una cosa a la vez? En el caso de la biología, este tipo de sistemas permite el estudio individual de las moléculas de interés, ya que por lo general los estudios se llevan a cabo en masa, es decir con un número muy elevado de moléculas, lo que genera efectos de cooperatividad, sólo por dar un ejemplo. Pero en el caso particular de nuestro trabajo la pregunta sería *¿por qué utilizar este tipo de sistemas y no un microscopio de fuerza atómica?*. La respuesta es relativamente sencilla y es precisamente por el interés que ese tiene de hacer mediciones de moléculas individuales, así como el rango de fuerzas que se pueden aplicar con este sistema.

1.1. Motivación

Actualmente existe una gran número de estudios de Microscopía de Fuerza Atómica (AFM), los cuales revelan datos tan interesantes (como mostrar que la capacidad de adherencia de una diatomea es similar a una cinta scotch [19], así como morfología); sin embargo, los estudios por medio de pinzas ópticas son prácticamente nulos. Otro punto a favor de el estudio por medio de un sistema de *pinzas ópticas*, es que la fuerza que es posible aplicar con este tipo de sistemas es mucho menor con respecto a un microscopio AFM, y con niveles de ruido en las señales mucho menores. Es decir, hablamos de que con un sistema de *Pinzas Ópticas* es posible ejercer fuerzas de algunos pN, mientras con el AFM se ejercen fuerzas de algunos cientos de pN, por este motivo es que creemos que el estudio del biopolímero de las diatomeas a través de un sistema con la capacidad de manipulación de objetos individuales como las *pinzas ópticas*, aunado a el rango de fuerzas que puede ejercer, hacen de ésta, una herramienta que permitirá estudiar las propiedades elásticas del biopolímero, con una mejor perspectiva de estudiar fibras individuales, así como ejercer fuerzas que sean capaces de estirar las fibras del biopolímero, esto sin desdoblarse las proteínas constituyentes de las nanofibras, como sucede con los estudios de AFM actuales.

Pero ¿cuál ha sido la motivación de este trabajo?. Actualmente las diatomeas (algas microscópicas) han llamado la atención gracias a su característica pared celular externa con inclusiones de silicio, así como a su papel fundamental en la producción de biomasa. Sin embargo, existe otro factor que ha despertado el interés en éstas y es la producción de un biopolímero que les permite adherirse a un sustrato. Este biopolímero es el centro de atención cuando se habla de *Marine Biofouling*, ya que representa pérdidas millonarias en el área marítima. El *Marine Biofouling* es caracterizado por la colonización de superficies que se encuentran sumergidas en agua. Estas colonias compuestas por diversos tipos de organismos pueden llegar a descomponer con una mayor velocidad las estructuras sumergidas, así como menguar la capacidad de deslizamiento de un barco debido a una gruesa capa de *biofouling*; esto representan pérdidas económicas debido a que la fricción de la superficie aumenta, a la par que aumenta el consumo de combustibles [22].

Pero como todo, esto tiene un lado positivo de la moneda, ya que el estudio de este tipo de biopolímeros podría ayudar en un futuro al desarrollo de adhesivos suaves, así como al desarrollo de adhesivos sumergibles en agua.

1.2. Objetivos

De una manera muy concreta y directa explicaré los objetivos del presente trabajo.

1. Obtención de un cultivo celular funcional de la diatomea *Nitzschia* spp. Con un cultivo funcional, nos referimos a un cultivo lo mas axénico posible y con las condiciones necesarias para que las diatomeas presenten un buen desplazamiento (necesario para la generación del biopolímero).
2. Caracterización de la interacción del biopolímero de la diatomea con las esferas micrométricas, así como la interacción del rafe ¹ y las esferas ² por medio de microscopia óptica, videomicroscopía y microscopia electrónica de barrido.
3. Aprendizaje de la técnica de micromanipulación conocida como *pinzas ópticas*.
4. Caracterización de las propiedades elásticas del biopolímero, esto por medio de la obtención de curvas fuerza-extensión, a las cuales se les hace un ajuste que permite conocer parámetros como son la Longitud de contorno, Longitud de persistencia, parámetros que en el capítulo de Análisis, resultados y conclusiones se detallarán.

El segundo y tercer capítulos de este trabajo nos permiten conocer acerca del microorganismo a estudiar, es decir las diatomeas, así como del sistema con el que vamos a llevar a cabo las mediciones, *pinzas ópticas*. En el cuarto capítulo se presenta todo el desarrollo experimental, protocolos, así como la explicación de cómo es que se llevaron a cabo las mediciones. Por último, el quinto capítulo nos proporciona de manera concisa el modelo con el cual se obtiene los parámetros de nuestro interés, así como los resultados experimentales y las conclusiones.

¹Hendidura colocada en el centro de la diatomea por donde la diatomeas es capaz de exudar el mucílago.

²Estas esferas sirven como manijas para la caracterización del mucílago por medio de las *Pinzas Ópticas*.

Capítulo 2

Diatomeas

2.1. Introducción

Las diatomeas o *Bacillariophyceae*, pertenecen al Reino Protista¹. Son microalgas fotosintéticas y eucariontes presentes en prácticamente todo nuestro entorno, forman parte del fitoplancton marino, así como cuencas de agua continentales, también se pueden encontrar en suelos con alta humedad. Las hay planctónicas, es decir flotando libremente, y bentónicas, sujetas al sustrato, en tierra con condiciones de mucha humedad. Algunas especies son capaces de adaptarse a entornos extremos de temperatura (termófilas) y a altas concentraciones salinas. Las diatomeas son las responsables de entre el 20 – 25 % de la producción primaria del planeta [1], es decir, la producción de moléculas orgánicas a partir de dióxido de carbono.

Una característica muy importante y fascinante es su pared celular exterior, rígida, denominada *frústula*, que se encuentra formada mayoritariamente de silicio amorfo (SiO_2). Actualmente la frústula de las diatomeas es objeto de estudio en ciencias como la biotecnología y las nanociencias debido a sus particulares características, como son su conformación (SiO_2) y por otro lado, los patrones ornamentales tan complejos que presentan, patrones que se encuentran en escalas micro y nanométricas, con un grado de regularidad muy alto [2]. Esta última característica es de interés en el diseño de cristales fotónicos² [3].

Se cree que las diatomeas se originaron mediante endosimbiosis secundaria, es decir, una célula eucariota no fotosintética adquirió un cloroplasto al fagocitar y mantener como endosimbionte a una célula eucariota fotosintética, probablemente una alga roja [7]. Actualmente se calcula debe haber más de 100,000 especies distintas de diatomeas, siendo las eucariotas más abundantes en el medio acuático, así como las fotosintetizadoras acuáticas más importantes [1].

Los primeros registros de diatomeas observadas datan de aproximadamente 1700 – 1710,

¹Reino que incluye a todos aquellos organismos eucariontes que no pueden clasificarse dentro de alguno de los otros tres reinos eucarióticos: Fungi (hongos), Animalia (animales) o Plantae (plantas).

²Material estructurado de forma que su función dieléctrica varíe periódicamente en el espacio; Por lo general son nanoestructuras ópticas periódicas que están diseñadas para afectar el movimiento de los fotones de un modo similar al que la periodicidad de un cristal semiconductor afecta al movimiento de los electrones.

cuando por medio de los primeros microscopios se podían observar lo que denominaban “raíces y maleza acuática”, definiéndolas en aquel momento como plantas. Hacia finales del siglo *XVIII* surgen lo que se puede considerar como las primeras clasificaciones, sin embargo son clasificadas como animales. No es sino hasta mediados del siglo *XIX* que Ehrenberg³ las clasifica como algas [2].

Ya sea por su característica frústula con sus extrañas y caprichosas formas (Figura 2.1), o para su clasificación, las diatomeas han sido recurrentemente estudiadas a lo largo de la historia.

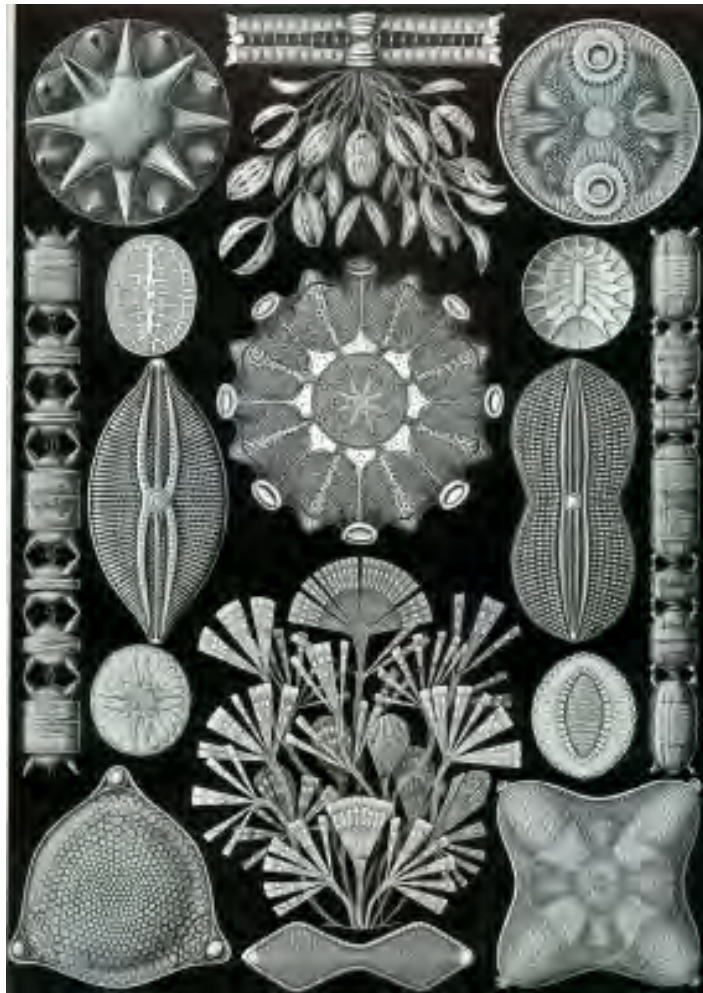


Figura 2.1: Diatomeas de Haeckel. Dibujos de diferentes tipos de diatomeas, algunas se muestran en arreglos de colonias y otras de manera individual. Realizados por Ernst Haeckel³ presentes en “*Kunstformen der Natur*” (Obras de arte de la Naturaleza) entre 1899 y 1919 [8].

En la actualidad, las diatomeas son empleadas para un sinnúmero de aplicaciones, por ejem-

³Christian Gottfried Ehrenberg (1795 – 1876); Naturalista, zoólogo, botánico, anatomista, geólogo, y microscopista alemán; autoridad en la descripción y taxonomía en zoología y en la clasificación científica de los vegetales.

plo: los restos de diatomeas sirven para estudiar factores medioambientales pasados; son indicadores naturales de cambios en el pH atribuidos a lluvia ácida. Su uso se ha venido desarrollando en la industria gracias a su fina estructura y su característica frústula de silicio amorfo inerte, encontrándose presentes en la industria del maquillaje y la farmacéutica. La tierra de diatomeas (frústulas sin materia orgánica) son un pesticida natural. Hasta hace apenas un par de décadas, se ha potencializado el interés científico en las diatomeas, ya sea por sus posibles aplicaciones en el campo de la farmacéutica, por el impacto que generan en un cuerpo de agua, o por su característica frústula con sus patrones asociados, entre otras muchas [1, 2, 4, 5, 6].

2.2. Principales características

Las diatomeas se clasifican de manera general de acuerdo a la forma de la frústula, pueden ser diatomeas céntricas o pennadas (o pennales), como se muestra en la Figura 2.2. En general, las diatomeas suelen ser microscópicas, aunque las hay de hasta 2 milímetros de longitud; las podemos encontrar de manera individual o agrupadas en colonias formando largas cintas, estrellas, abanicos, etc. . . , o unidas a algún otro tipo de algas o fitoplancton.

Se suelen presentar tanto en las capas superficiales del agua como en los sedimentos de aguas poco profundas. Debido a su pesada pared celular, suelen hundirse con facilidad, aunque algunas especies regulan su flotabilidad gracias a los lípidos intracelulares.

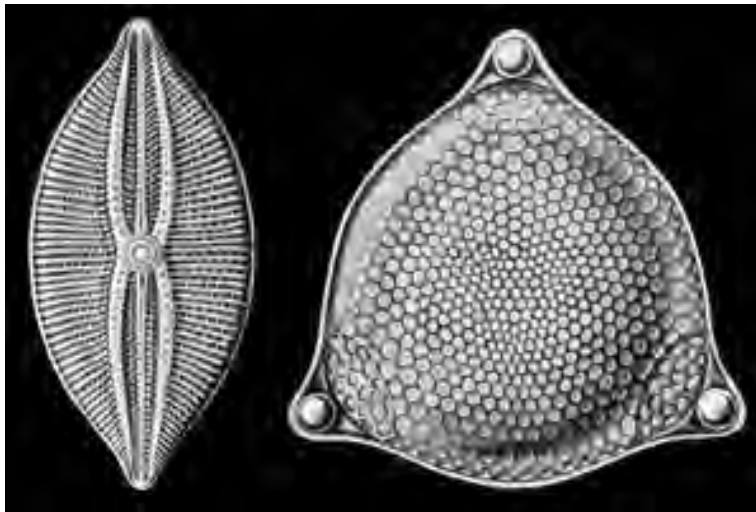


Figura 2.2: Diatomeas de Haeckel. De lado izquierdo se muestra un dibujo de una diatomea pennada, con el rafe (hendidura central) y sus patrones ornamentales; del lado derecho se muestra el dibujo de una diatomea céntrica, diferenciándose por su forma circular, patrones ornamentales de simetría radial y la ausencia de rafe. Dibujos de Ernst Haeckel, presentes en “*Kunstformen der Natur*” [9].

Diatomeas céntricas

Presentan una clara simetría radial, ordenada en relación a uno o varios puntos centrales en la valva (parte superficial de la frústula), de manera que encontramos diatomeas con frústulas circulares, triangulares (Figura 2.2) o poligonales. Al contrario de las diatomeas pennales, las diatomeas centrales nunca presentan rafe, y por consecuencia son diatomeas inmóviles por lo general. Algunas presentan espinas y apéndices externos, que les permiten mantenerse en flotación.

Diatomeas pennales

Las diatomeas pennales se dividen en dos grupos: diatomeas pennales sin rafe o pseudo-rafe y con rafe. La estructura de la frústula es de forma lineal u oval. Presentan una simetría bilateral y alargada, organizada de acuerdo a una línea central. Por lo general cuentan con dos cloroplastos⁴. Presentan una fisura a lo largo del eje longitudinal, denominada rafe o pseudorafe, la cual está directamente relacionada con la capacidad de adherencia y desplazamiento sobre diversos sustratos que presentan las diatomeas.

Aquí es de suma importancia mencionar que dada la naturaleza del trabajo de tesis a desarrollar, las diatomeas a las que nos enfocamos son diatomeas que presentan la capacidad de desplazarse, por lo tanto son diatomeas pennadas que presentan rafe.

2.2.1. Morfología de la diatomea

Las diatomeas, como cualquier célula eucariota, presentan núcleo y mitocondria. Están formadas por una pared celular denominada *frústula*, compuesta fundamentalmente de pectina⁵ con SiO₂ soluble. Requieren de nutrientes como la cobalamina (vitamina B12) y/o tiamina (vitamina B1). Son células fotosintéticas, tienen clorofila, cloroplastos, pigmentos accesorios (como β-caroteno), sustancias de reserva como gotas lipídicas e hidratos de carbono que les sirven como reservas nutritivas y también para flotar en el agua; entre otros (Figura 2.3).

- El núcleo normalmente está situado cerca del centro de la diatomea, generalmente es esférico o lenticular (forma parecida a la semilla de la lenteja).
- Las mitocondrias se encargan de proveer la energía para la actividad celular, esto por medio de la síntesis del “*adenosín trifosfato*” (ATP)⁶.
- El citoplasma es un plasma incoloro que se encuentra en la parte interna de la pared celular y la frústula. Este alberga los orgánulos celulares y contribuye al movimiento de estos.

⁴Orgánulos celulares eucarióticos ocupados de la fotosíntesis, propios de las plantas y algas

⁵Mezcla de polímeros ácidos y neutros muy ramificados. Determinan la porosidad de la pared, y por tanto la disponibilidad de enzimas. Las pectinas también proporcionan superficies cargadas que regulan el pH y el balance iónico.

⁶Nucleótido fundamental en la obtención de energía celular, se produce durante la fotosíntesis y la respiración celular; es consumido por numerosos procesos químicos, generando una respuesta mecánica.

- El estroma es un armazón o entramado de un órgano, esto es su matriz extracelular. Dentro de este se encuentran el ADN plastidial y los ribosomas plastidiales; se realizan procesos de la fotosíntesis.

El estroma es homólogo al citoplasma de las cianobacterias, de las que derivan evolutivamente los plastos

- El espacio periplasmático es el compartimento que rodea al citoplasma, de gran importancia en la alimentación que se da por diferencias de composición química, concentración osmótica y carga eléctrica.
- Los cloroplastos son los encargados de la fotosíntesis.
- Las gotas de aceite son azúcar y almidón en forma globular. Situados en el citoplasma, varían en forma y tamaño; En algunos casos regulan la flotabilidad de las diatomeas.

Cabe mencionar que el plásmido se encuentra separado del citoplasma por cuatro membranas, como se muestra en la Figura 2.3, esto como resultado de su evolución [1].

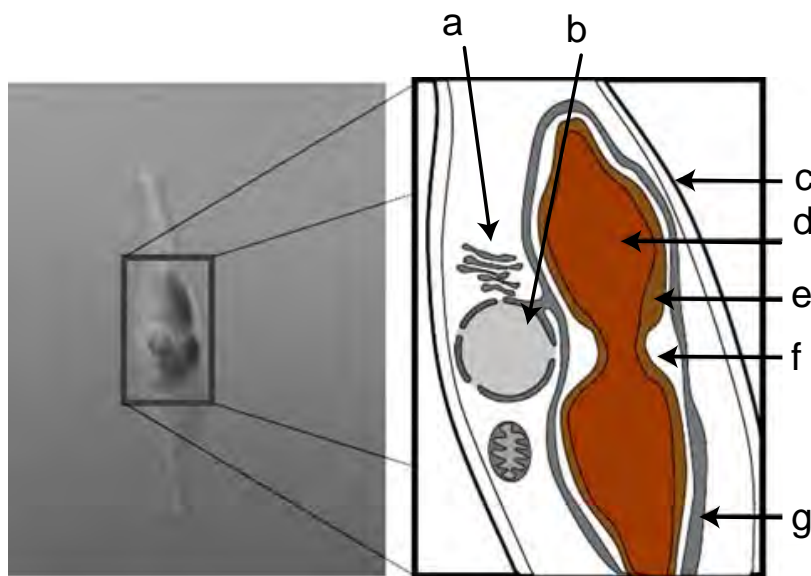


Figura 2.3: Morfología de las diatomeas. En esta figura se señalan las principales parte de las diatomeas; a) Mitocondria; b) Núcleo; c) Pared de silicio o frústula; d) Estroma; e) Espacio intramembranal; f) Compartimento periplastidal; g) Cloroplasto. Imagen modificada de [1].

Los cloroplastos pueden ser de colores amarillo-verdoso o marrón oscuro. Son los encargados de la fotosíntesis, están envueltos en una doble membrana concéntrica donde se localizan los pigmentos accesorios⁷ y la clorofila. Los cloroplastos pueden acomodarse de diversas maneras dentro de la célula, de acuerdo a las diferentes simetrías que presentan las diatomeas, como se muestra en la figura 2.4. La clasificación de los cloroplasto es:

⁷Son capaces de absorber energía luminosa y pasarla a la clorofila. Estos pigmentos permiten a las algas vivir en una mayor variedad de lugares.

1. Discoidales (*Coscinodiscus*): Presentes en diatomeas circulares, tienen una configuración redonda.
2. Estrellados (*Striatella*): Son plástidos ligeramente alargados.
3. Formando dos estructuras aplanadas axilares periféricas (*Pinnularia*): Plástidos con una configuración elongada presentes en las orillas de diatomeas alargadas.
4. Forma de H (*Gomphonema*): Son dos plástidos ubicados en las orillas de las diatomeas, forman una H al estar unidos por el centro.

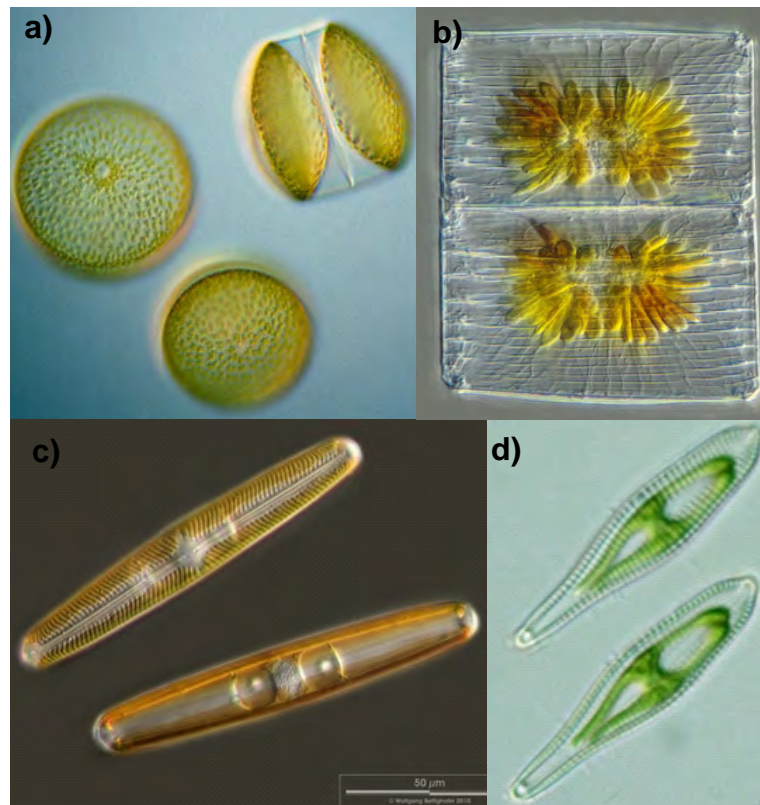


Figura 2.4: Cloroplastos. En esta figura se muestran los 4 ejemplos representativos de diatomeas y los diferentes arreglos de los cloroplastos. Los cloroplastos son notorios a través de la pared celular gracias a su coloración verdosa o café. a) *Coscinodiscus*, b) *Striatella*, c) *Pinnularia*, d) *Gomphonema*. Arreglo de micrografías tomadas de [34].

2.2.2. Pared celular: Frústula

Como se menciona en la sección 2.1, una de las particularidades más llamativas e importantes de las diatomeas es su pared celular exterior, o *frústula*. Elaborada principalmente en base a silicio amorfo (SiO_2), celulosa, y pectinas; Llega a constituir hasta $\approx 95\%$ del peso total de la célula.

La frústula concede a las diatomeas una mayor resistencia tanto a la acción de los ácidos y bases fuertes como al ataque enzimático de otros microorganismos, esto gracias a que el sílice es inerte.

La frústula puede presentar simetría bilateral o radial; consiste de dos vistas, una vista interna de naturaleza orgánica y una vista externa de naturaleza silícica. Está formada por dos mitades desiguales que encajan una en la otra cual caja de Petri, recibiendo el nombre de “semitecas”. La semiteca superior se denomina “epiteca” y la inferior, “hipoteca”, la cual encaja por dentro de la epiteca (2.5)

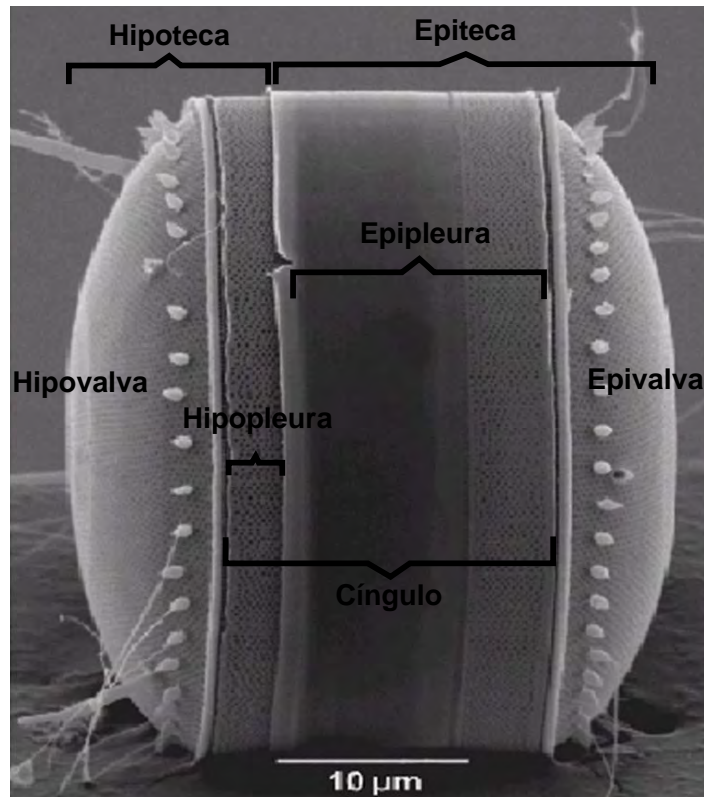


Figura 2.5: Frústula. Vista pleural de una diatomea céntrica, muy probablemente en fase de reproducción sexual debido a que las valvas no se encuentran planas. En esta figura se muestra de manera clara la estructura valvar de las diatomeas.

Las semitecas constan de dos regiones delimitadas: una región plana denominada valva, específicamente epivalva e hipovalva; Y una sección lateral o bordes denominados pleuras, existiendo una epipleura y una hipopleura, como se muestra en la Figura 2.5.

Al observar una diatomea por la epivalva o hipovalva obtendremos una vista valvar. Al observarlas por el plano de la pleura obtendremos una vista pleural de la diatomea, como se puede observar en las Figuras 2.5 y 2.6

Las bandas de cintura son una serie de tiras superpuestas de silíceo que rodean a las célu-

las para formar los lados; proporcionan superposición entre las dos semitecas conformando lo que se conoce como cingulo, que se encuentra dividido en epicingulo e hipocingulo.

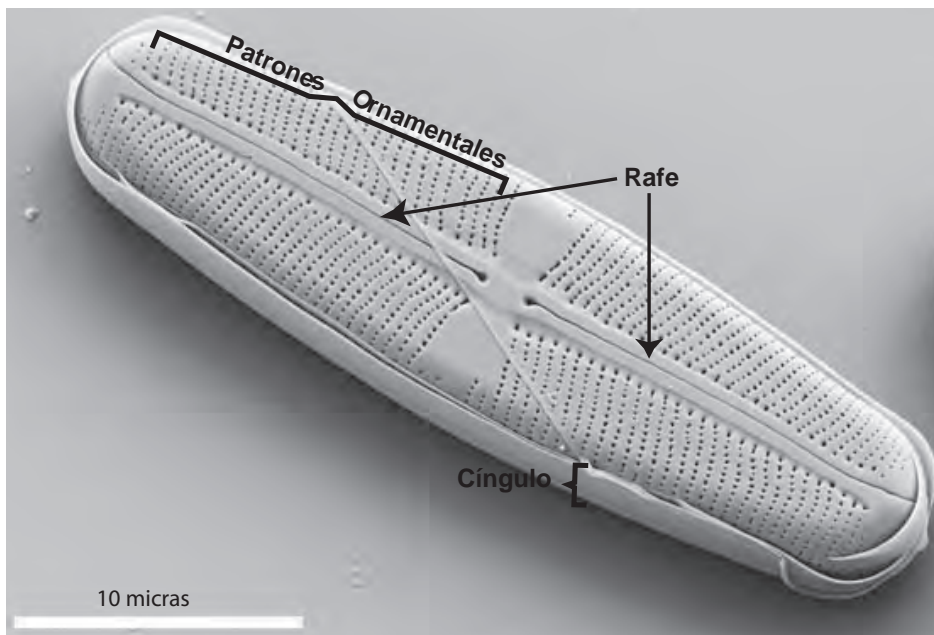


Figura 2.6: Frústula Vista valvar de la diatomea pennada *Sellaphora*. A lo largo de su línea media se encuentra el rafe. Desde este punto las líneas de los poros o estrías se extienden más o menos perpendicular. Las estrías están separadas por costillas estrechas de sílice [13].

Estructura valvar

Las frústulas presentan patrones ornamentales elaborados por poros o areolas y estrías; normalmente estas ornamentaciones presentes en las valvas solo son claramente definidas a través del microscopio electrónico debido a su tamaño nanométrico, como se puede observar en la Figura 2.7.

Probablemente el papel principal de estos arreglo de poros, generalmente alineados en filas, es la comunicación con el exterior. Por este medio las diatomeas interactúan con el entorno que les rodea, siendo capaces de absorber nutrientes, respirar y expulsar lo que no les es de utilidad.

Por otro lado, la clasificación de las diatomeas, como ya sabemos, se ha definido tradicionalmente considerando los finos patrones ornamentales que presentan las frústulas, y aunque en algunos casos es posible hacer algunas vagas observaciones de estos mediante un microscopio óptico, una identificación de géneros o especies necesitan la ayuda de la microscopía de TEM MEB y en algunos casos, AFM. Mediante estas técnicas es posible conocer a detalle los patrones ornamentales de la diatomea, como se muestra en la Figura 2.8, así como las distancias y tamaños involucrados. Actualmente este tipo de análisis de la frústula es muy

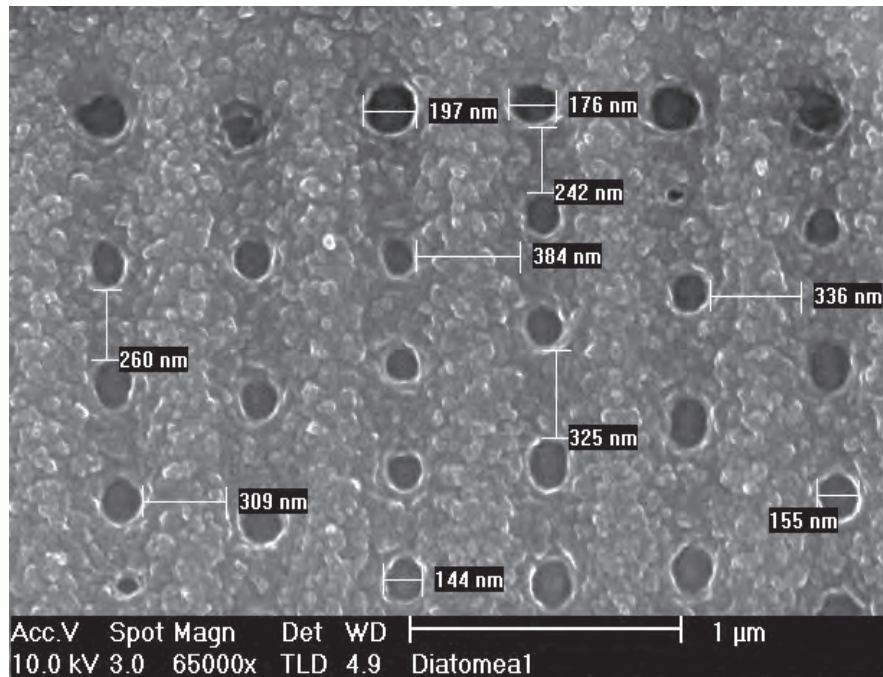


Figura 2.7: Patrones ornamentales. Vista valvar de una diatomea *Nitzschia* sp. donde se muestra el arreglo de poros característico de este tipo de diatomeas, así como su característico tamaño nanométrico y la separación entre éstos. Micrografía tomada en el LINAN-IPICYT con microscopía de barrido (Philips FEI XL-30 SFEG).

socorrido debido a el creciente interés de la nanotecnología en la fabricación de nuevos materiales nanoestructurados, ligeros, con una alta resistencia, etc. Una información más amplia puede encontrarse en las referencias [30, 33]).

En la Figura 2.8 se pueden observar diversos patrones ornamentales.

El rafe

Es una elongada fisura presente en la valva (Figuras 2.6, 2.9), probablemente es el resultado de la evolución de algunas diatomeas y por ende, su capacidad de adhesión. Pudo haber surgido esta necesidad al encontrarse en un entorno acuoso con fuertes corrientes, corriendo el riesgo de dispersarse y no poder sobrevivir. Otro posible escenario es la competencia por lugares que presenten una buena cantidad de luz solar para poder llevar a cabo la fotosíntesis.

El rafe es un órgano que puede ser recto, ondulado o sigmoideo, a través del cual el movimiento ondulatorio del plasma en el interior de la célula se transmite al exterior [2]. Reacciona sobre un sustrato y desliza a la diatomea, es decir su función principal es la adhesión y deslizamiento de la célula sobre un sustrato, aunque en esto profundizaremos en la Sección 2.3.

Generalmente el rafe presenta un espaciamiento en el centro y en los dos extremos, denominados nódulo central y nódulos terminales (Figura 2.9). Algunas especies poseen un

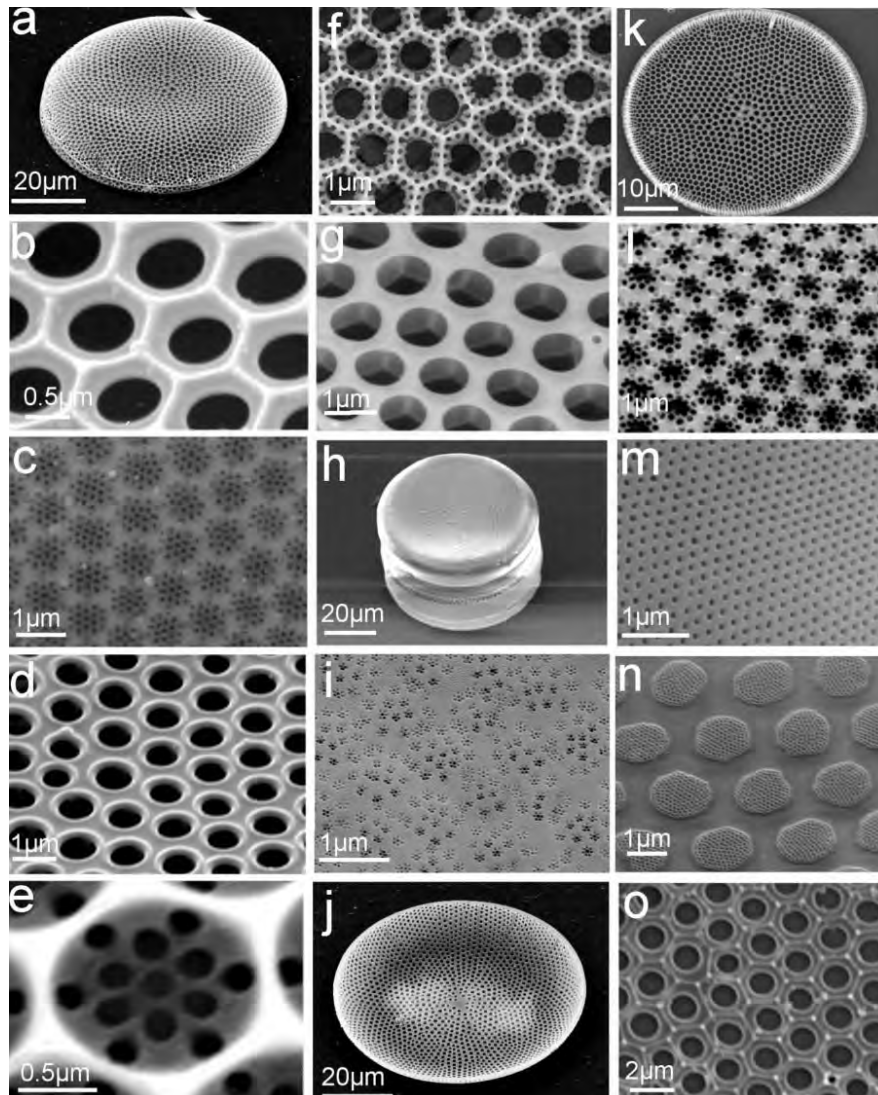


Figura 2.8: Caracterización de la frústula. Imágenes SEM de frústulas de tres especies de diatomeas marinas céntricas (*Coscinodiscus* sp. (A-f, i, j, l, m, o), *T. eccentrica* (g, k, n) y una especie no identificada (h). a) Frústula (lado externo de la diatomea); b) Estructuras de la areola (superficie interna de la diatomea); c) Superficie “cribrum” (segunda capa porosa); d) Poros (superficie interna); e) Superficie “cribrum” con mayor detalle (capa porosa central); f) Estructuras de la areola (superficie interna); g) Capa externa porosa; h) Especie no identificada; i) Superficie “cribellum” (capa externa); j) Frústula su conjunto (parte interna de diatomeas); k) Frústula (parte interna de la diatomea); l) Superficie “cribrum” (etapa avanzadas de formación); m) Bandas de cintura; n) Capa interna porosa; o) Estructuras de areolas en la etapa inicial de formación. [33].

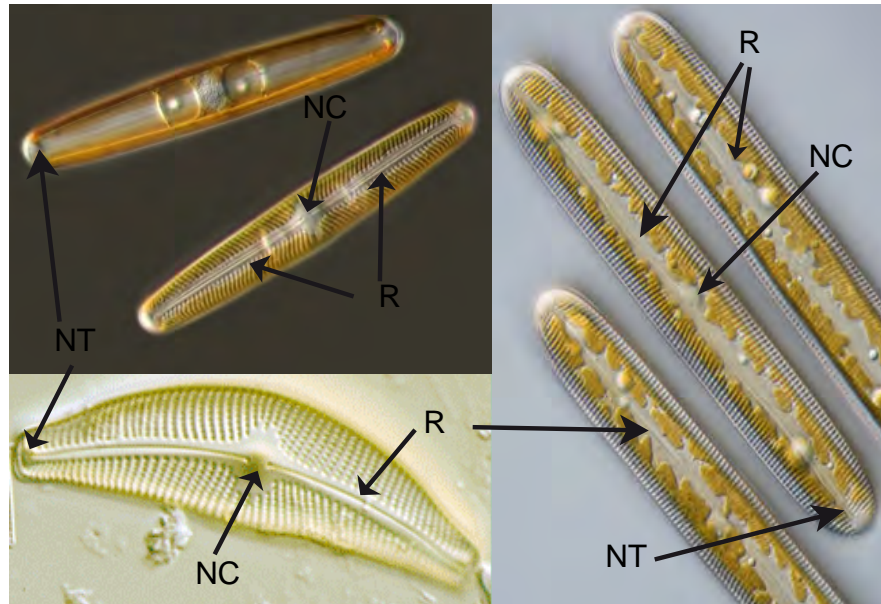


Figura 2.9: Rafe. La imagen muestra tres tipos diferentes de diatomeas penadas y rafídeas. Los tres tipos de diatomeas presentan un rafe, nódulos centrales y nódulos terminales. NT= Nódulo terminal; NC= Nódulo central; R= Rafe. Micrografías tomadas de [35]

pseudorafe que es una área solida de silicio, es decir sin hendidura, sin poros que corre a lo largo de la diatomea.

Cuando el rafe se encuentra en ambas valvas, las diatomeas se denominan birráfidas. Las diatomeas monorrafídeas son aquellas que solo presentan un rafe. Otra característica del rafe es que aunque corre de lado a lado de la diatomea, no necesariamente tiene que estar ubicado en el centro de la valva; en algunos casos se encuentra en el margen de la misma (rafe subcentral).

2.2.3. Reproducción

La reproducción de las diatomeas (y por ende, el crecimiento en la densidad de un cultivo celular) es dependiente directamente de la presencia de sílice y la existencia de nutrientes. Las diatomeas presentan dos tipos de reproducción, la “*asexual*” que se lleva a cabo por medio de bipartición de las células o división celular, y la reproducción “*sexual*”, llevada a cabo por la combinación de gametos. Ambos procesos se muestra en la Figura 2.10.

Por otro lado, la división celular de las diatomeas implica la formación de las valvas por medio de un complejo proceso de deposición de sílice, es decir, las valvas solo pueden formarse por medio de la división celular y para ello se necesita de un complicado sistema de deposición de silicio (aún sin entender por completo), llevado a cabo por medio de una vesícula especializada conocida como “*vesícula de deposición de sílice*”, (*SDV*). Es por este motivo que en esta sección se explica a grandes rasgos el proceso de la reproducción,

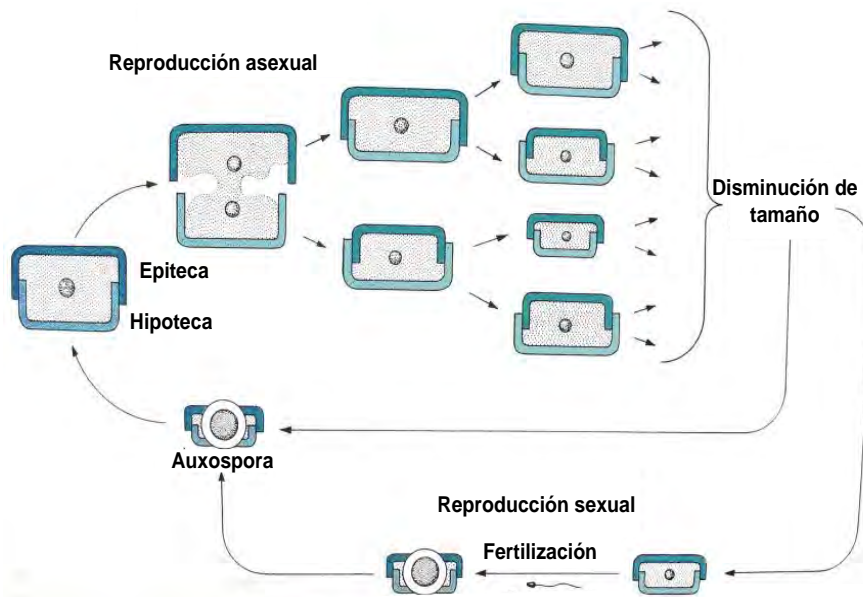


Figura 2.10: Reproducción celular. En esta imagen se muestra el ciclo de reproducción de las diatomeas, donde a partir de una célula madre se generan dos células hijas, las cuales disminuyen en tamaño hasta el punto en el que es necesaria la reproducción sexual, esto por medio de gametos, generando una auxospora. La reproducción sexual genera una diatomea de dimensión estándar [12].

la deposición del silicio y la formación de las valvas de manera ligada, pues son procesos dependientes entre sí.

Reproducción asexual

En la reproducción asexual una célula madre se divide en un plano paralelo a las valvas, dando paso a dos células hijas idénticas. La diatomea sufre un reajuste intracelular que lleva a la duplicación de los componentes celulares. Una vez duplicados los componentes, la epiteca se separa de la hipoteca, manteniendo en cada una contenido citoplasmático que les permite generar células hijas.

Por medio de la vesícula SDV se comienza la formación de la valva faltante, siendo éstas siempre las hipovalvas, ya que ambas valvas madres tendrán el papel de epivalvas. En este punto es interesante mencionar que las diatomeas solo crecen en una dirección, ya que la mayor parte de los elementos son adicionados a la sección cingular de la hipoteca.

Una vez formadas las valvas faltantes la diatomea se termina de separar, permitiendo el crecimiento unidireccional de la célula por medio de las bandas de cintura, como se puede observar en la Figura 2.11.

Debido a la diferencia de tamaño de las valvas, siempre obtendremos una diatomea con el tamaño de la célula madre y la segunda diatomea con un menor tamaño, lo que nos lleva a una reducción progresiva del tamaño de los individuos como se muestra en la Figura 2.10; es en este punto donde interviene la reproducción sexual.

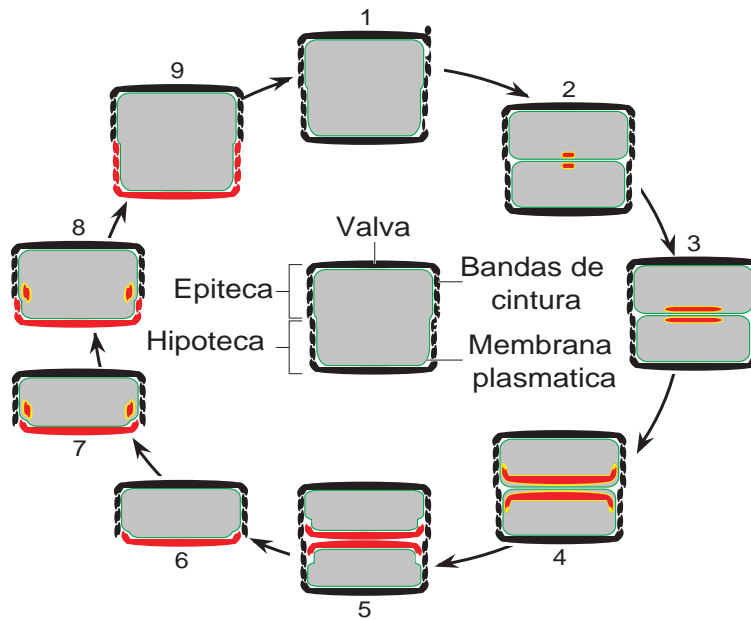


Figura 2.11: Reproducción asexual. Al centro de la imagen se muestra la estructura de las diatomeas y al rededor el ciclo celular. El área gris representa el protoplasma, la línea verde representa la membrana plasmática. Las células dispuestas circularmente muestran las diferentes etapas del ciclo celular: (1) Poco antes de la división celular, la pared celular contiene el número máximo de bandas de cintura; (2) inmediatamente después de la citocinesis, nuevo biosílice (rojo) se forma en cada célula hija dentro de la vesícula SDV (amarillo); (3) la vesícula SDVs se expande debido al depósito de sílice; (4) en la etapa final del desarrollo de la vesícula SDV, cada SDV contiene una valva completamente desarrollada; (5) las valvas recién formadas son depositadas en la superficie de cada uno de los protoplastos por medio de exocitosis; (6) las células hijas se separan por completo; (7, 8) la expansión de los protoplastos en la interfase requieren de la síntesis de sílice nuevo (rojo), siendo depositado en las bandas de cintura (amarillo); cada banda de cintura se sintetiza en una SDV por separado, siendo añadida después de la exocitosis a la valva (hipovalva) recién formada; (9) después de la síntesis de la banda de cintura final (banda pleural) se detiene la expansión celular y la replicación del ADN, es iniciada nuevamente [10].

Un punto interesante de mencionar es que el patrón de la frústula, es decir, las estrías y areolas (poros), no sufren modificaciones a través de las generaciones [10, 11].

Reproducción sexual

La reproducción sexual es de suma importancia, ya que resuelve el problema de la disminución de tamaño (generado con la reproducción asexual) a lo largo de las generaciones, este tipo de reproducción restablece el tamaño original de las diatomeas y contribuye a la variabilidad genética, esto ya que permite la recombinación genética de los individuos.

Durante este proceso se producen divisiones meióticas⁸, durante las cuales los gametos se despojan de sus paredes celulares y tras fusionarse forman una auxospora o cigoto. Este aumento de tamaño en un tiempo relativamente corto (horas o días), restableciendo el tamaño característico de las valvas y mostrando los patrones representativos de cada especie [10, 11].

En la Figura 2.12 se muestra una serie de micrografías de dos diatomeas en proceso de intercambio de gametos para la reproducción sexual.



Figura 2.12: Reproducción sexual. Dos células intercambian gametos por medio de una pequeña hendidura, con el fin de que ocurra la fertilización. Los gametos masculinos y femeninos entran en contacto (1 y 2), fusionándose; (3) El contenido del gameto masculino se traslada al gameto femenino (diatomea de la izquierda). Ya formada la auxospora, ésta crecerá hasta restablecer el tamaño característico de esta diatomea. Imagen modificada de [18].

Deposición de silicio

El sílice es el elemento mas abundante en la Tierra después del oxígeno, siendo para las diatomeas una necesidad absoluta para la división celular. Se sabe que normalmente el número de células es proporcional a la cantidad de dióxido de silicio existente, siempre y cuando los demás nutrientes no sean limitantes.

⁸Tipo de división celular que origina cuatro núcleos haploides, es decir, una copia de la información genética a partir de un núcleo diploide, doble copia completa de la información genética.

El proceso de deposición de sílice aún no se conoce con mucho detalle, sin embargo es conocido que el ácido silícico, presente en el medio, no mantiene una concentración constante durante el ciclo celular, ya que durante la formación de valvas y bandas de cintura, éste es absorbido muy rápidamente. Se sabe que en ausencia de silicio se inhiben procesos celulares tales como la división celular y síntesis de ADN. Otro dato interesante es que la mitocondria se encuentra íntimamente ligada con la deposición de silicio, sin embargo existe un interesante debate al respecto, ya que no se conoce a fondo el mecanismo de depósito de silicio.

También se sabe que la cantidad de silicio y sus variaciones en el agua es determinante para la existencia de unas u otras especies de diatomeas, pues la capacidad para utilizar la sílice disuelta en el agua varía de una especie a otra.

El proceso de deposición de silicio aparentemente más viable es en el que el silicio soluble entra a la célula, siendo transportado hasta la SDV donde es polimerizado produciendo depósitos de silicio amorfo hidratado, $SiO_2 \cdot nH_2O$. Se cree que esta polimerización pudiera suceder por tres posibles causas:

1. Cambios en el pH o en la concentración del $Si(OH)_4$.
2. Uniones a sitios específicos en la membrana del SDV por enlaces de hidrógeno o interacciones iónicas.
3. Condensación de grupos hidróxilos.

Es conocido que la vesícula SDV se adapta en apariencia y estructura al componente de la frústula que esté formando, y que crece a medida que el silicio es polimerizado. Generalmente comienza a formar la valva desde el centro hacia el exterior de la célula para más tarde expulsarla; sin embargo este proceso no es muy claro aún [2].

2.3. Adhesión y Motilidad

Antes de entrar de lleno en esta sección les presentare algunos conceptos que estaremos utilizando frecuentemente:

- Substancias poliméricas extracelulares (EPS): Polímeros biológicos secretados por diversos organismos. Son utilizados para el anclamiento sobre diversas superficies, así como protección. En el caso de las diatomeas se sabe que están formados por agregados de nanofibras adhesivas (NFA).
- Nanofibras adhesivas (NFA): Fibras que permiten la adhesión de las diatomeas a diversos sustratos. Conformados principalmente por glicoproteínas.
- Mucilago: Agregado de nanofibras exudado por las diatomeas rafeas; tiene la capacidad de adherirse a la superficie por la cual se haya deslizado la diatomea.

Se sabe que por medio del rafe las diatomeas pennadas son capaces de expulsar biopolímero mucilaginoso conocido como sustancias poliméricas extracelulares (EPS) o nanofibras adhesivas (NFA) (Figura 2.13). Estas nanofibras les permiten adherirse y deslizarse a través de un sustrato [14, 15].

Es conocido que las NFA están formadas de glicoproteínas [15, 16], pero su estructura fina es desconocida hasta ahora. Se han estudiado algunas de sus propiedades mecánicas mediante experimentos de microscopia de AFM [15, 16, 19, 20], y se han llevado a cabo estudios sobre la composición del mucílago y el proceso de expulsión.

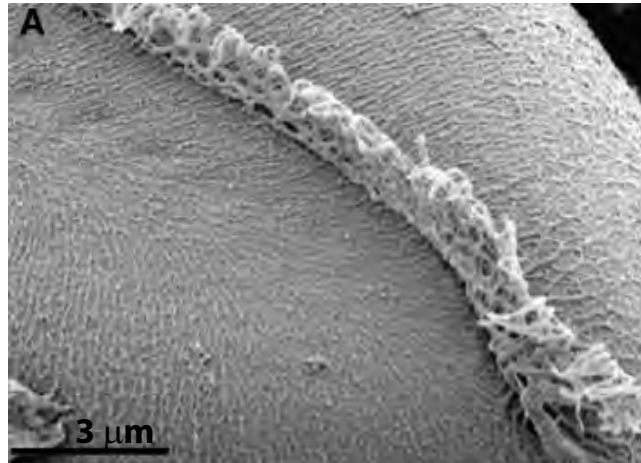


Figura 2.13: Fibras poliméricas extracelulares. Imagen SEM de una célula fija e invertida (*Pinnularia viridis*). Los filamentos del mucílago adhesivo sobresalen del rafe, siendo estos los que tienen la capacidad de adherirse a una superficie. Se sabe que las nanofibras tienen de 50 a 100 nm de diámetro. [21].

2.3.1. Adhesión

¿Por que las diatomeas se adhieren a los sustratos, de que les sirve estar adheridas y que consecuencias tienen este tipo de colonias cuando se adhieren a estructuras artificiales?. Estas son algunas de las preguntas que se pueden hacer respecto a la adherencias de diversos organismos, en particular el caso de las diatomeas que es de nuestro interés.

Se sabe que la capacidad de adhesión a un sustrato puede proveer una estrategia para la supervivencia, crecimiento, una buena localización para la fotosíntesis, obtención de nutrientes y luz solar. Sin embargo en el caso de estructuras artificiales sumergidas en agua, como pueden ser barcos, puentes, postes, etc...estos mucilagos implican la adhesión de diversos organismos, lo cual representa una pérdida económica muy alta.

Para 2002 se calculaba que la marina de EEUU gastaba \approx \$1 billón de dolares por año en gastos de mantenimiento a barcos, debido a que los EPS se adhieren a los cascos de los barcos provocando el engrosamiento de las paredes y por lo tanto una mayor resistencia al desplazamiento, lo cual se traduce en un mayor gasto de combustible. A esto hay que añadir

los gastos que implica sacar el barco para poder despintar, limpiar y volver a pintar [22].

Lo anterior es una de las muchas justificaciones que existen para el estudio de estos biopolímeros, ya sea por el interés propio de la biología, o por las posibles aplicaciones que puedan tener.

Pero ¿cómo se da esta adhesión?. Las diatomeas pennadas con rafe tienden, gracias a los EPS, a estabilizarse y reorientarse en cuanto tienen contacto con un sustrato, es decir se adhieren a este. Algunas de estas diatomeas utilizan estas interacciones formadas por las nanofibras y el sustrato para generar un “deslizamiento”. Estas diatomeas tendrán las ventajas de poder ubicarse según las necesidades, ya sea en busca de nutrientes o para poder recibir mayor cantidad de luz.

Algunos otros tipos de diatomeas se adhieren al sustrato con la finalidad de formar colonias, aunque por lo general este tipo de diatomeas no se deslizan debido al arreglo de la colonia. Aquí es importante mencionar que algunos tipos de diatomeas forman sus colonias gracias a un tipo de mucílago que pueden segregar (para algunas especies) en los bordes de las diatomeas y con ello son capaces de adherirse entre ellas [23], tal como se puede observar en la Figura 2.14.

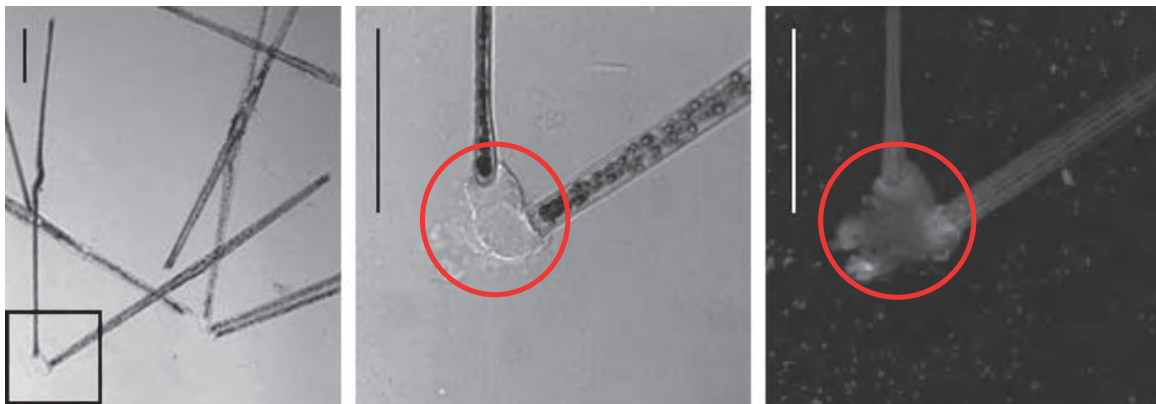


Figura 2.14: Mucilago. Micrografías de un microscopio óptico de barrido confocal. Las dos imágenes de la izquierda son de transmisión; la imagen de la derecha es de fluorescencia. Diatomeas vivas *Thalassiosira undulatum*. Las muestras fueron sometidas a un tñido con Concanavalin A-FITC⁹; con el objetivo de observar el mucílago. Las dos imágenes de la derecha son ampliaciones del recuadro presente en la primera imagen y los círculos rojos limitan el área del mucílago presente. Barras de escala = 50 micras. Imagen tomada de [16].

2.3.2. Motilidad

Actualmente se sabe que la motilidad de las diatomeas depende directamente de la adhesión que presentan a un sustrato, esto por medio de la secreción de las nanofibras (mucílago o EPS) a través del rafe. Una característica del deslizamiento de las diatomeas es su desplazamiento suave, como deslizándose, con períodos cortos de tiempo e intercalando movimientos

de reversa y descansos.

Se han encontrado velocidades que oscilan entre $0,2 - 25 \mu\text{m/s}$. La trayectoria seguida por la diatomea parece ir ligada a la forma del rafe, es decir si el rafe es curvo, la trayectoria tiende a ser curva. Se sabe que las condiciones de luz influyen en la intensidad del movimiento, es decir si la cantidad de luz que incide en la diatomea es mínima, la diatomea se va a deslizar menos que si la intensidad de luz incidente en la diatomea es mayor.

2.3.3. Modelo de adhesión y desplazamiento de las diatomeas

La mayoría de las teorías desarrolladas sobre la adhesión y la motilidad nos hablan acerca de la relación que se da entre el rafe y el sustrato, esto gracias a las nanofibras exudadas a través del rafe. También se incorpora la participación de los filamentos de actina (pertenecientes al citoesqueleto de la célula) unidos a la membrana plasmática a través de proteínas transmembranales. En esta sección se explicara el modelo más aceptado de adhesión de las diatomeas (para mayor detalle consulte la cita [29]).

La teoría del complejo de adhesión (AC) muy probablemente sea la mas aceptada; ésta sugiere que la fuerza necesaria para el deslizamiento de las diatomeas es generada por la interacción de filamentos de actina y estructuras transmembranales. Estas estructuras transmembranales tienen la capacidad de deslizarse libremente por el rafe, pero son capaces de fijarse al sustrato en su terminación exterior. Este modelo postula que la estructura transmembranal incluye la participación de ATPasa y proteínas.

La estructura transmembranal está conectada a los EPS, el cual tiene la capacidad de adherirse al sustrato. Por lo tanto, mientras las estructuras transmembranales se deslizan a través del rafe por medio de uniones débiles con los filamentos de actina, del otro lado, éstas se encuentran atadas al sustrato, provocando que la célula se deslice (en la Figura 2.13, se puede observar las fibras de EPS que provienen del rafe). Se cree que la débil unión entre las estructuras transmembranales y los filamentos de actina, es lo que permite que las EPS se “despeguen” de la diatomea, quedando adheridas al sustrato.

En este modelo se sugiere un complejo de adhesión (AC), el cual es un conjunto de moléculas conectoras que parten de los filamentos de actina, asociados a motores moleculares intracelulares. Por medio de proteínas asociadas a la actina, las cuales se encuentran a su vez asociadas con otras proteínas transmembranales el mucílago es secretado y anclado al sustrato, como se puede observar en la Figura 2.15. Se sabe que la miosina¹⁰ se encuentra involucrada en la generación de la fuerza necesaria para el deslizamiento.

Una de las características de la motilidad de las diatomeas es que mientras ellas van deslizándose, los EPS van siendo secretados desde el rafe, a la vez que los componentes del AC son ensamblados continuamente en la parte frontal de la célula (en relación al deslizamiento). De esta manera mientras la célula se desliza, los componentes del AC permanecen fijos

¹⁰Motor molecular asociado con las contracciones musculares.

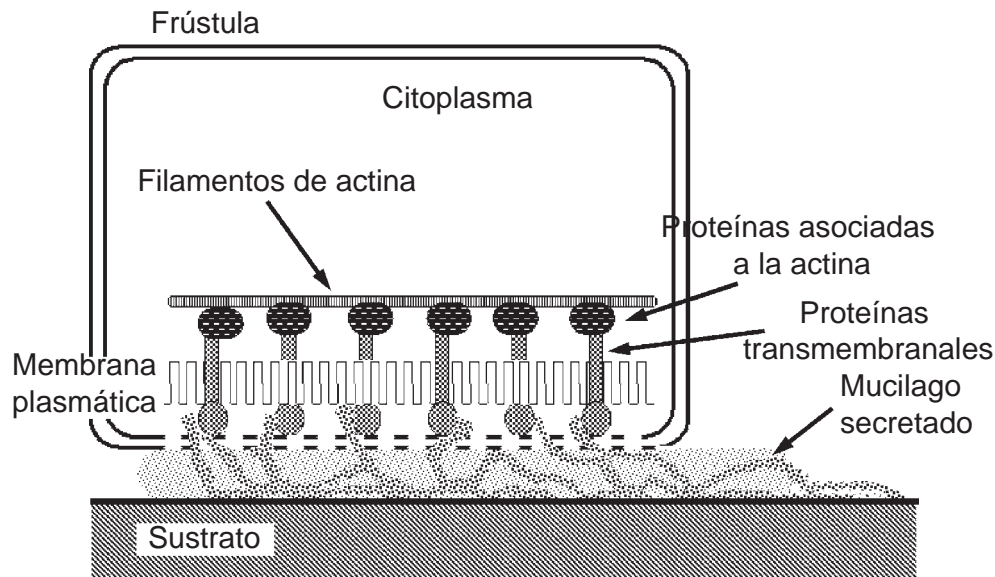


Figura 2.15: Complejo de adhesión. Se muestra un diagrama esquemático de una diatomea pennada detallando los componentes del complejo de adhesión. Se puede observar la existencia de una área entre el sustrato y la diatomea que es recubierta por el mucílago y como a través del rafe (líneas punteadas), es exudado. También se observan las proteínas transmembranales capaces de recorrer el rafe y las proteínas asociadas a los filamentos de actinas. Imagen modificada de [23].

en la membrana plasmática. Cuando los componentes del AC llegan a la sección posterior del rafe son secretados o soltados por la célula, lo que genera un rastro de EPS sobre el sustrato [24, 25, 29].

2.4. Análisis del mucílago por diversas técnicas

Existen una amplia variedad de estudios relacionados con las diatomeas, sus patrones ornamentales y el comportamiento del mucílago, su estructura interna, etc; ya sea microscopía de fluorescencia, microscopía de Barrido (SEM), microscopía de transmisión (TEM) o microscopía de fuerza atómica (AFM), esta serie de estudios como muchos otros han hecho de la microscopía su principal herramienta, jugando un papel primordial, así como la bioquímica.

En esta sección mostraré de manera breve algunos de los estudios más relevantes referentes al mucílago de las diatomeas, ya sea para conocer sus propiedades mecánicas, su origen o su composición.

2.4.1. Mucílago

Existen diversos estudios sobre la composición y comportamiento de las nanofibras que componen el mucílago, lo cierto es que son complejos de estudiar, ya que tienen una amplia gama de componentes; a esto se le tiene que sumar el hecho de que varían de acuerdo a el

tipo de diatomea, los nutrientes presentes en el medio, así como el origen anatómico y la función que desarrollan.

Se sabe que el mucílago, tienen una conformación dominante de glicoproteínas y carbohidratos [17, 23, 26]. Algunos otros estudios han permitido conocer la importancia de las proteínas en la adhesión, esto gracias a la acción de las proteasas (enzimas que se encargan de romper los enlaces peptídicos de las proteínas) [23].

Otra serie de estudios elaborados por medio de TEM han ayudado a revelar parte de la estructura celular interna de las diatomeas, así como algunas estructuras asociadas al rafe y por consecuencia al complejo de adhesión. Por medio de esta técnica se han logrado localizar el plasmalema, manojos de microfibras cerca del rafe, así como mucílago en los alrededores de las valvas y el rafe, entre otros. En esta área podemos mencionar artículos como [24, 26].

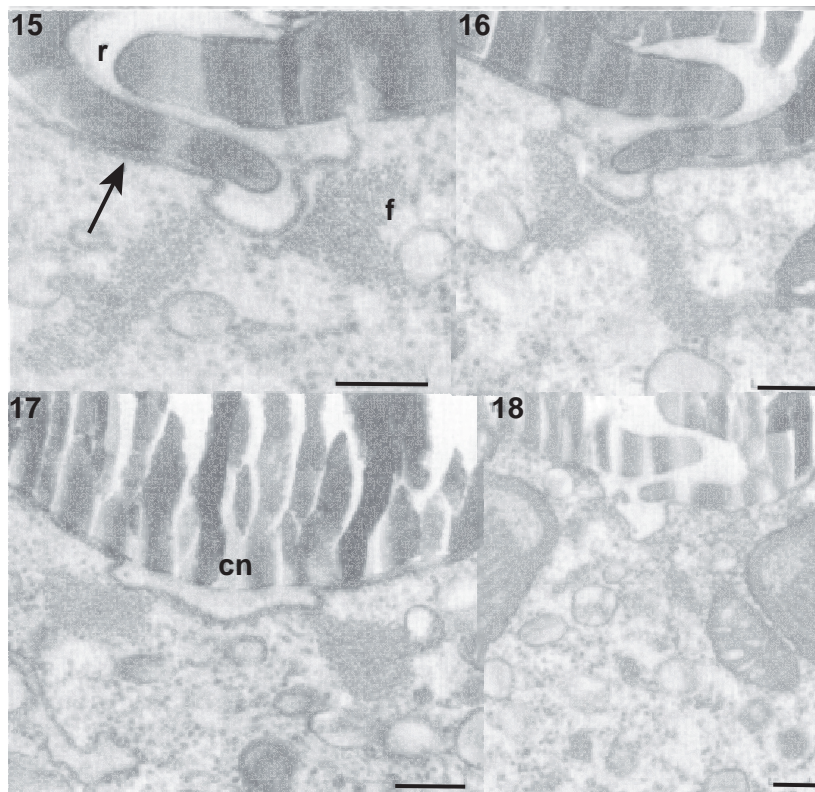


Figura 2.16: Micrografías de transmisión. Micrografías que muestran arreglos de microfilamentos. 15) Desde el nódulo central y poros los manojos están separado; 16) los manojos se encuentran unidos; 17) en el nódulo central existen dos grupos diferentes de manojos unidos a el plasmalema; 18) los manojos se encuentran muy fragmentados. En la imagen 15) se puede observar la presencia de glicoproteínas y atados desde la membrana hasta la valva (flechas). r = rafe; cn = nódulo central; f = nanofilamentos. Barras de escala = $0.2 \mu\text{m}$. Imagen tomada de [24].

A modo de ejemplo se muestran una serie de micrografías (Figura 2.16) de la referencia [24]. En estas imágenes se pueden hacer algunas observaciones como que el plasmalema se

introduce en el rafe, se encuentra unido a las valvas y se torna irregular cerca del rafe, (imagen 15 y 16). Se puede observar que el arreglo de las microfibras varía de célula a célula. En esta referencia se hacen una serie de observaciones acerca del rafe, plasmalema, vesículas internas, entre otros. [24].

En algunos estudios como el de la referencia [27], se unen al mucílago fluoróforos conjugados con lectinas (proteínas que se unen a azúcares de manera específica; Su papel principal es el reconocimiento), las cuales son capaces de unirse de manera específica a las glicoproteínas que conforman el mucílago. Por medio de este estudio es posible ubicar el rastro que ha dejado la diatomea tras deslizarse sobre un sustrato (ver Figura 2.17) y a su vez corroborar la naturaleza glicoprotéica del mucílago asociado con el rastro.

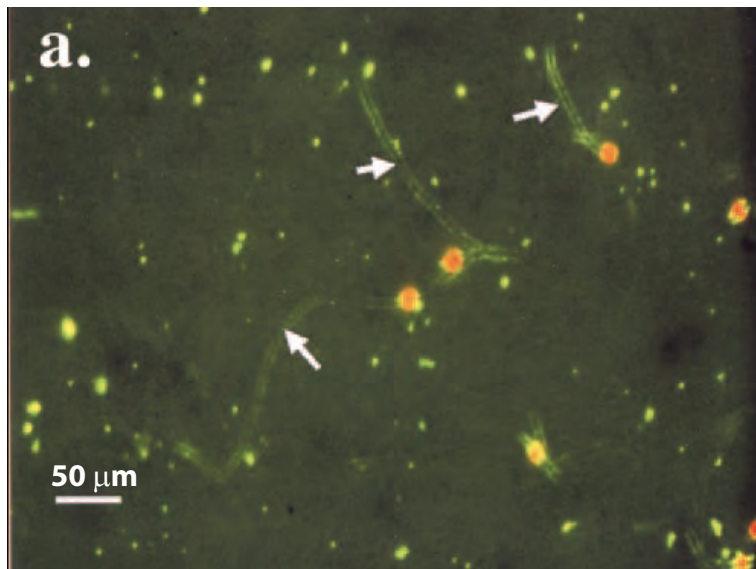


Figura 2.17: Rastros fluorescentes. Diatomeas (*Amphora coffeaeformis* y *Navicula* sp) fluorescen en verde gracias a que las glicoproteínas del mucílago se encuentran teñido con concanavalina A-FITC. Los cloroplastos presentan autofluorescencia en color rojo. (a) Por medio de flechas se ubican los rastros de polímeros, son usados para determinar la motilidad. Hay dos líneas paralelas de polímero, ya que la *Amphora coffeaeformis* presenta dos rafe [27].

En la Figura 2.18, a) se puede observar la unión entre dos diatomeas gracias al mucílago; se pudo confirmar que el mucílago está conformado por una multiplicidad de fibras con largos de hasta 30 μm ; estos son capaces de entrelazarse pudiéndose unir las fibras de dos o más diatomeas (Figura 2.18, a)). Es posible observar diatomeas unidas al sustrato por ambos lados de la frústula, gracias al mucílago de aproximadamente 10 μm , así como mucílago en los alrededores de las valvas (Figura 2.18, b,e). Se puede observar largas hebras de $\approx 40 \mu\text{m}$ de largo por 1-2 μm de ancho y una base unida al sustrato de aproximadamente 10-15 μm (Figura 2.18, c, f)). Es posible apreciar largos rastros curvos de mucílago y fibras de sujeción al sustrato (Figura 2.18, d)). Es común ubicar la producción de mucílago en la zona del nódulo central, las terminaciones del rafe y las uniones de las diatomeas (Figura 2.18, g)) [21].

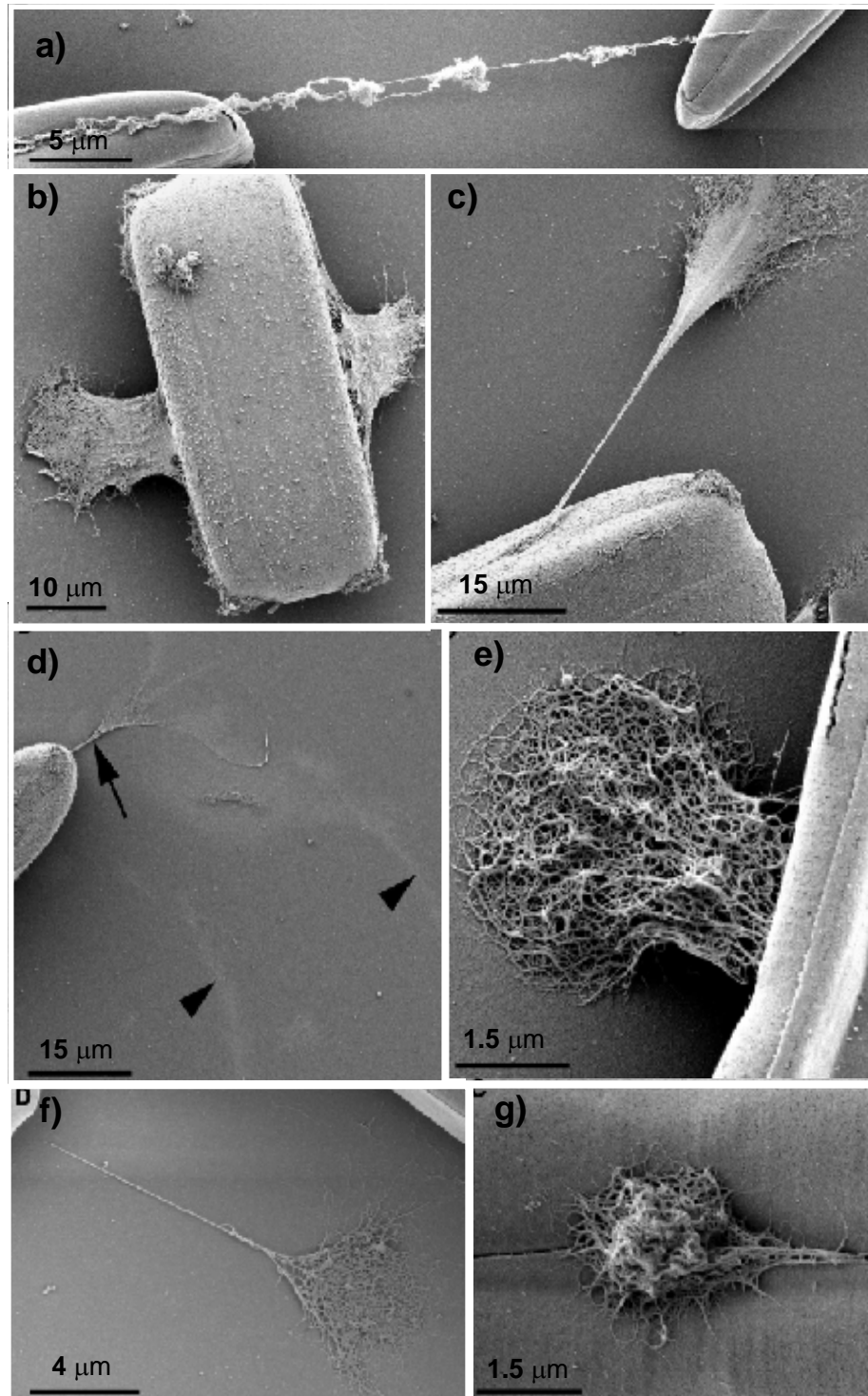


Figura 2.18: Nanofibras adhesivas. Diatomeas *Pinnularia viridis* (b, c, d) y *Craspedostauros australis* (a, e, f, g) fijadas químicamente. a) Unión de 2 diatomeas formadas por numerosas fibras entrelazadas; b) Conexión al sustrato por ambos lados de la diatomea; c, f) Largas cuerda mucilaginosa que se extiende desde la superficie de la valva hasta el sustrato, terminando en una amplia zona del sustrato; d) Uniones al sustrato, junto con patrones curvos del deslizamiento de la diatomea (puntas de flecha); e) Mucílago formado por múltiples filamentos unidos al sustrato; g) Mucílago concentrado en el nódulo central de la diatomea [21].

Una serie de estudios que se han desarrollado con gran importancia, son los realizados por medio de drogas inhibitoras del citoesqueleto, esto con el objetivo de conocer el grado de participación de la actina, miosina y los microtúbulos en la secreción de el mucílago y por ende el desplazamiento de las diatomeas. Este tipo de trabajos permitió establecer la relevancia en el sistema de adhesión y motilidad de los filamentos de actina y la miosina, así como la nula participación de los microtúbulos. La *latrunculina*, es una droga que inhibe a los filamentos de actina; Una vez que la latrunculina se encuentra en el medio con las diatomeas se puede observar que el deslizamiento de las diatomeas es cesado por completo. Pocos minutos después de que la latrunculina es retirada del medio, las diatomeas son capaces de volver a desplazarse, de esta manera se pudo demostrar que la actina se encuentra íntimamente involucrada en el sistema de motilidad [28].

Por otro lado, la microscopía de AFM ha permitido realizar una serie de estudios topográficos del área del mucílago, así como análisis de las propiedades elásticas, de las cuales hablaré en la sección 2.4.2. En la Figura 2.19 se puede observar el mucílago secretado por la unión de dos diatomeas (imagen superior). Los agregados de mucílago tienen alrededor de 10-20 nm de altura y un ancho de $\approx 1 \mu\text{m}$, con una separación similar entre cada secreción (imagen inferior).

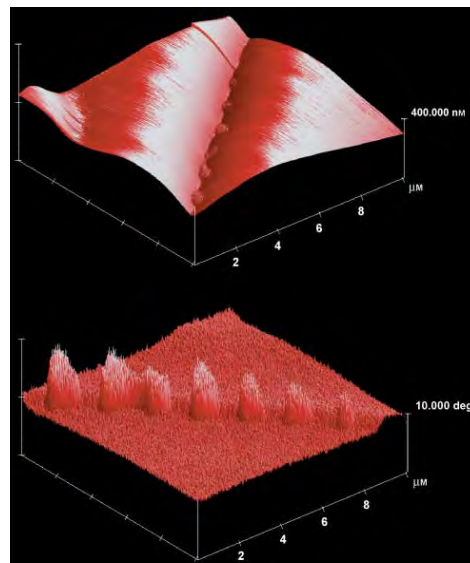


Figura 2.19: Mucílago. Adhesivos en la región de contacto entre dos células *Eunotia sudetica*; (b) se gira hacia la derecha en 90° con respecto a la imagen superior. [33].

2.4.2. AFM: Propiedades elásticas del mucílago.

La microscopía de fuerza atómica es una técnica llevada a cabo por medio de un instrumento mecano-óptico, capaz de registrar la topografía de las muestras de interés. Otro modo de operación que presenta esta técnica, a diferencia de las microcopias comunes, es la capacidad de generar y detectar fuerzas del orden de los cientos de pico Newtons, esto le confiere

la capacidad de hacer mediciones de fuerzas intramoleculares o modificar la superficie de las muestras. Para llevar estudios de AFM no es necesario aplicar recubrimientos a la muestra de interés, a diferencia de técnicas como SEM y TEM, lo cual representa una ventaja, ya que es posible trabajar con muestras en condiciones de humedad, así como muestras biológicas en estado nativo, es decir permite hacer mediciones *in situ*.

Actualmente existe una amplia gama de literatura sobre estudios de las propiedades elásticas del mucílago de las diatomeas por medio de AFM. Estos representan los antecedentes teóricos de nuestro trabajo. Entre algunos de los trabajos que podemos mencionar, existen un par de estudios comparativos entre la fuerza necesaria para romper el mucílago o los EPS provenientes del rafe que son ≤ 60 pN, y los provenientes de otros sitios de la frústula, los cuales son de ≤ 13 pN. Esto muestra que el mucílago del rafe presenta una mayor resistencia y fuerza, características ideales para la función de adhesión y motilidad [36].

Una configuración socorrida al momento de llevar a cabo mediciones por medio de AFM es adherir con epoxi una diatomea a la punta del cantilever del AFM (Figura 2.20), una vez hecho esto, la diatomea es colocada por medio del cantilever sobre la superficie del sustrato. Transcurridos unos minutos la diatomea es capaz de generar mucílago que se adhiere al sustrato, en ese momento se comienza a levantar el cantilever, generando una fuerza que estira las fibras adheridas al sustrato hasta llegar a la longitud total de estas. Si se continúa ejerciendo fuerza se comenzará a generar una elongación extra de la fibra, la cual dependerá de las propiedades elásticas propias de las fibras que conforman el mucílago 2.21.

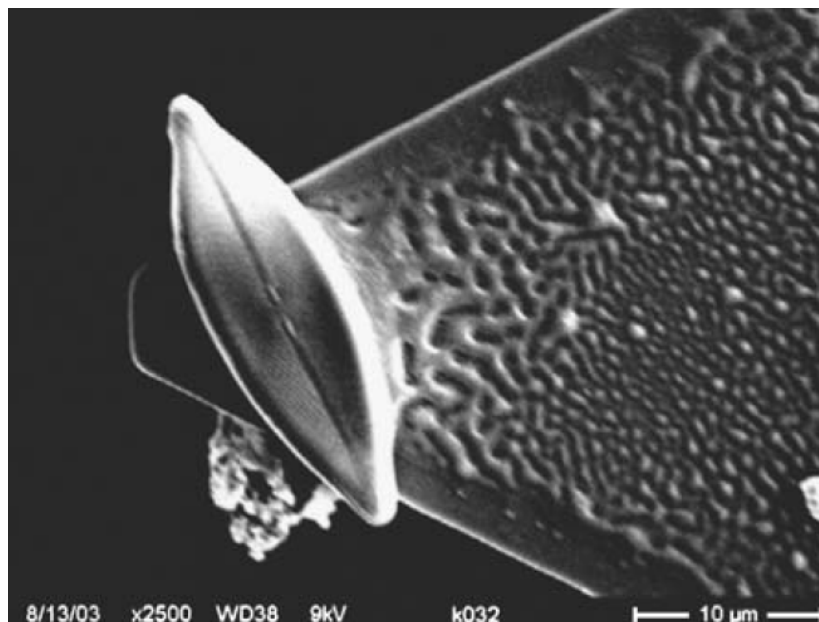


Figura 2.20: Cantilever con diatomea. Micrografía SEM de una diatomea pegada con epoxi a la punta de un cantilever de AFM [36].

En este mismo trabajo se comparó la capacidad de adhesión del mucílago de las diatomeas en un sustrato de mica y sobre un sustrato recubierto de Intersleek (recubrimiento

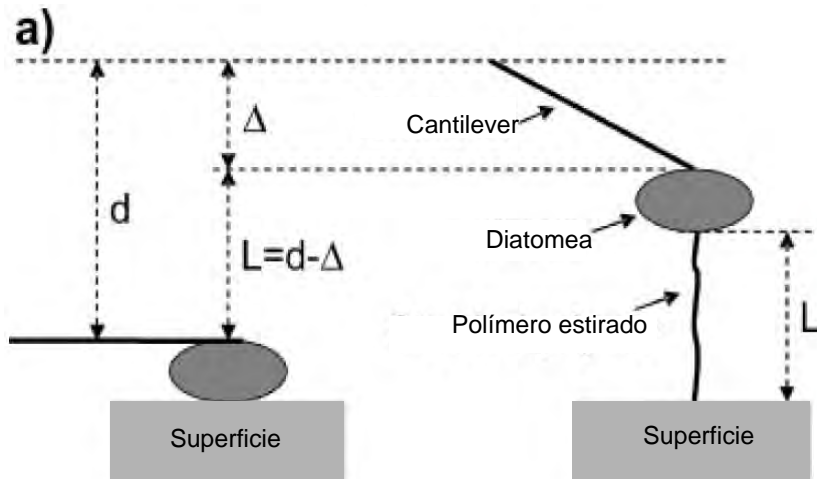


Figura 2.21: Medición de longitudes. En esta imagen es posible observar la configuración del cantilever respecto a la diatomea asentada en el sustrato (izq.). Transcurrido un periodo de tiempo “t” la diatomea generara mucilago que le permitirá adherirse al sustrato, una vez que esto sucede el cantilever es alejado del sustrato una distancia “d”, la cual corresponderá a la longitud de la fibra “L” más una longitud extra debido las propiedades elásticas de las fibras [36].

anti incrustante). Se encontró que las fuerzas de adhesión celular es comparable entre ambos sustratos, y que los EPS tienen propiedades hidrofóbicas e hidrofílicas.

Otros tipos de estudios muestran que las EPS segregadas a través del rafe presentan un alto grado de elasticidad y un comportamiento característico de las proteínas modulares, esto se sabe gracias a que es posible graficar la fuerza ejercida a la fibra vs la extensión de la fibra, generando patrones conocidos como “dientes de sierra”, característicos de las proteínas globulares.

Este tipo de mediciones se realizan tras un sensado por medio del cantilever. Este sensado se puede llevar a cabo sobre la frústula, los alrededores de las diatomeas o el rastro mucilaginoso que ha dejado la diatomea al deslizarse sobre el sustrato. Tras el sensado se espera que las nanofibras adhesivas interacciones de manera no específica con el cantilever del AFM, generándose una atadura; una vez unidas las fibras al cantilever este es alejado de la superficie, generando una gráfica de fuerza extensión que presenta este característico patrón de dientes de sierra [16, 15, 21, 37], (Figura 2.22).

Aunque las mediciones de las propiedades elásticas de las nanofibras se llevan a cabo por medio de AFM de manera usual, es necesario hacer notar que este tipo de estudios también tienen sus desventajas, claro que esto depende del tipo de estudio que se pretende realizar.

Uno de los inconvenientes que hemos notado en este tipo de estudios es que la fuerza ejercida por el AFM es del orden de los cientos de pN, lo que genera el desdoblamiento de las proteínas conformacionales de las nanofibras de nuestro interés; esto provoca que no se puedan medir las proteínas en su estado nativo y ya que a nosotros nos interesa estudiar el comportamiento elástico de estas nanofibras en su estado nativo, hacerlo mediante esta

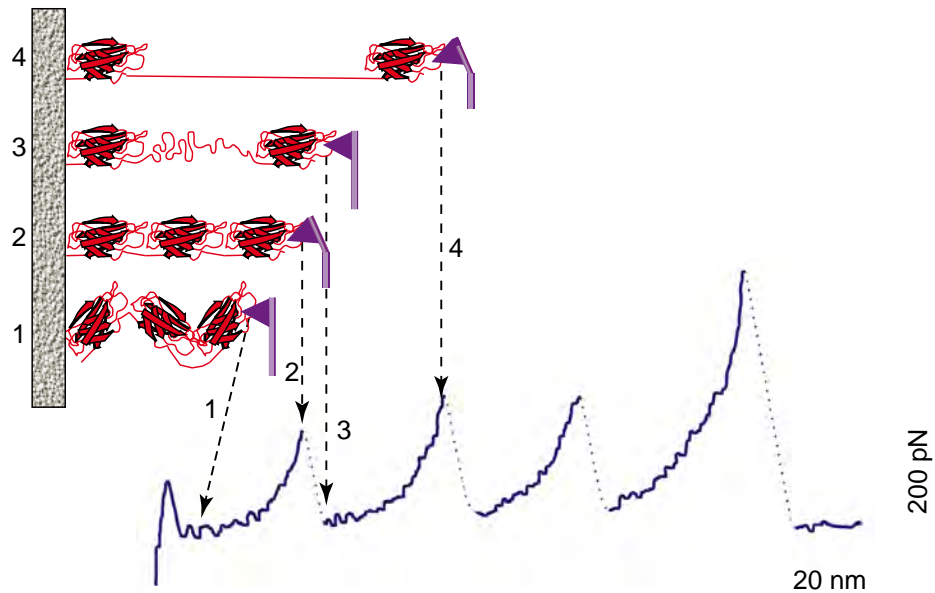


Figura 2.22: Desdoblamiento de proteínas modulares. En esta Figura se puede observar una gráfica fuerza vs. extensión, resultado del estiramiento de proteínas globulares estiradas por medio de un cantilever de AFM. El dibujo vertical muestra las fases de estiramiento de las proteínas y su fase en la gráfica. 1) El cantilever está unido a una proteína y es posible aplicar poca fuerza para obtener una extensión grande. 2) El cantilever ha extendido en su totalidad la fibra por lo que es necesario ejercer una mayor fuerza para obtener una extensión corta. 3) Debido a la fuerza ejercida por el cantilever del AFM a la fibra se logra desdoblar una de las proteínas que componen la fibra. En este punto la fibra gana una extensión proporcional al tamaño de la proteína desdoblada por lo que existe una caída abrupta de la fuerza. 4) Nuevamente se llega a la extensión total de la fibra, por lo que al seguir aplicando fuerza una proteína se desdoblara generando una mayor extensión de la fibra y una caída abrupta de la fuerza. El número de picos en la gráfica representa el número de proteínas globulares que componían la fibra [37].

técnica sería muy poco viable. Por otro lado otra desventaja que se observan en este tipo de estudios es el ruido generado, ya que es del orden de decenas de pN.

En base a lo anterior y debido al tipo de mediciones que nos interesan, es necesaria una técnica que presente la capacidad de trabajar con el menor número de fibras asociadas y de ser posible fibras individuales, así como una técnica que genere muy poco ruido (no más de 5 pN) y que tenga la capacidad de ejercer fuerzas menores a los 60-50 pN para evitar el desdoblamiento de las proteínas.

Para terminar esta sección, me gustaría hacer un poco de énfasis en que las propiedades de las diatomeas y por ende las nanofibras adhesivas presentan un alto grado de variación, esto debido a las características propias de la diatomea, el medio y condiciones de cultivo.

Capítulo 3

Pinzas Ópticas

3.1. Introducción

Las pinzas ópticas son desarrolladas en los laboratorios Bell, como una herramienta capaz de atrapar partículas dieléctricas por medio de luz [38]. Este tipo de sistemas es desarrollado hace aproximadamente 30 años, en 1984 por el físico Arthur Ashkin cuando descubre que al hacer incidir un haz de luz coherente altamente enfocado sobre una partícula dieléctrica, esta puede ser atrapada permitiendo su desplazamiento a voluntad en las 3 direcciones. Aunque inicialmente se desarrollo como una herramienta capaz de atrapar átomos, a finales de los años 80's y principios de los 90's se demostraría su gran utilidad en los sistemas biológicos, convirtiéndose en una asidua herramienta en la caracterización de motores moleculares, permitiendo observar la fuerza ejercida y/o generada así como la dinámica de motores moleculares de manera individual.

Algunas otras aplicaciones que se le han dado son en el estudio del citoesqueleto, propiedades de los biopolímeros, entre ellos el ADN, la motilidad celular, y en el campo de la física, el atrapamiento de átomos.

3.2. ¿Qué es una pinza óptica?

Las pinzas ópticas son una técnica de micromanipulación, que permite medir fuerzas, aplicar tensión y manipular objetos de una muestra. Son capaces de atrapar objetos dieléctricos que oscilan entre los 50 nm aproximadamente y algunas micras, por lo general pueden ejercer y medir fuerzas de entre 0,1 y 100 pN, tienen la capacidad de medir desplazamientos sub nanométricos y permiten tener una resolución temporal por debajo de los milisegundos [39, 40].

El sistema básico de las pinzas ópticas, ejemplificado en la Figura 3.1, consiste en un láser que es altamente enfocado por un objetivo con una apertura numérica alta, generando un gradiente en la intensidad de la luz que es capaz de atrapar pequeñas partículas, usualmente esferas micrométricas, dispersas en una solución acuosa.

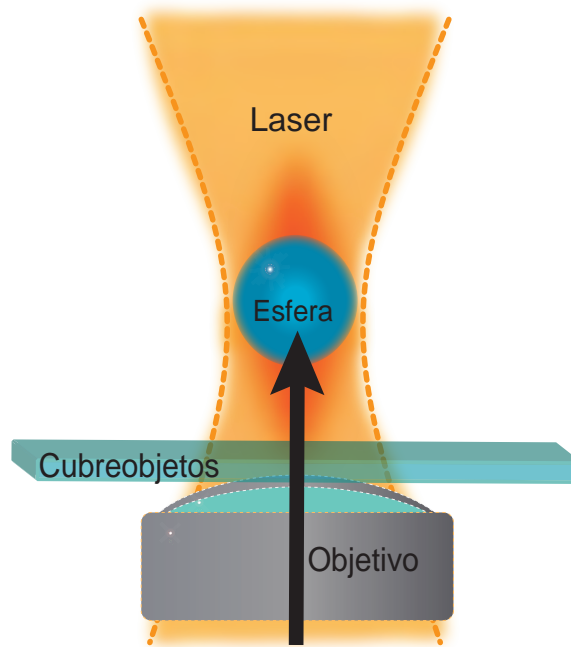


Figura 3.1: Esquema básico de un sistema de pinzas ópticas El láser es dirigido a la apertura trasera de un objetivo con apertura numérica alta, generando un gradiente en la intensidad de la luz alrededor del punto focal, permitiendo así el atrapamiento de una partícula del orden de micras.

En general existen múltiples configuraciones para el atrapamiento de partículas con un sistema de pinzas ópticas, como se muestra en la Figura 3.2. En algunos casos es necesaria la intervención de un segundo láser y, en otras configuraciones, basta con dividir y desacoplar el haz del láser. En algunas construcciones es necesario un sustrato donde son dispuestas las moléculas de interés y en algunas otras, las moléculas de interés permanecen todo el tiempo en el medio, sin necesidad de estar sobre el sustrato. Esta diversidad de configuraciones depende de la construcción del sistema de interés, es decir el tipo de molécula, sus características y qué es lo que se requiere medir.

Pero, ¿Cuáles son las ventajas que se presentan al trabajar con este tipo de dispositivos?

La principal ventaja de estas construcciones es que permiten trabajar con moléculas individuales, es decir, no se tiene problemas de resultados promedio presentes en experimentos en bulto a la vez que se tiene un mayor acceso a estados intermedios. Al contrario de otras técnicas, las pinzas ópticas son capaces de detectar desplazamientos tan pequeños que nos permiten determinar el tamaño de los pasos de algunas moléculas biológicas, como pueden ser las miosinas¹ [41, 42] o se puede conocer que tan flexible es una cadena de ADN [43], lo que las hace una herramienta muy eficiente y versátil en la biología, en la física de partículas y en la ciencia de biomateriales.

¹Motor molecular implicado en la contracción muscular.

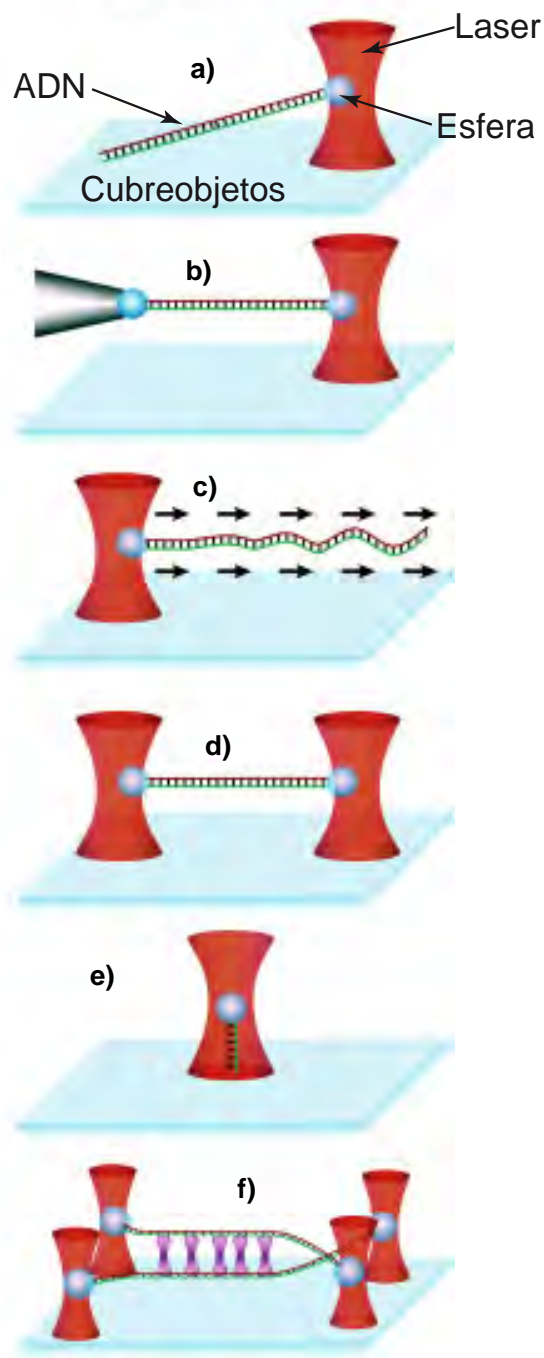


Figura 3.2: Configuraciones de una pinza óptica La imagen muestra una cadena doble de ADN unida por un lado a una esfera, que se encuentra atrapada por un láser. a) Geometría simple, la molécula de ADN se encuentra atada al sustrato y atada a la esfera por el otro lado; se genera un estiramiento lateral. b) Por medio de una micropipeta se sujeta una esfera que tira del ADN y que por el otro extremo tiene atada otra esfera sujeta por una pinza. c) Un fluido es generado, propiciando que el ADN se extienda mientras se encuentra unido a una esfera atrapada. d) Dos esferas atrapadas por 2 haces independientes se encuentran unidas por el ADN. Sistema de mancuernas. e) Igual que la configuración a) solo que con un estiramiento vertical del ADN. f) Doble geometría de mancuernas, lo que permite una precisa manipulación y medición de 2 moléculas de ADN para el estudio de proteínas (moradas), estas unen a las moléculas de ADN. Modificado de la referencia [50]

3.3. Principios básicos de una pinza óptica

Al hacer incidir un haz de luz altamente enfocado sobre una partícula, se ejercen dos tipos de fuerzas. La primera es la *presión de radiación* o *fuerza de dispersión*, la cual genera un empuje sobre la partícula en la dirección de propagación del haz, siendo proporcional a la intensidad del haz, y la segunda es la *fuerza de gradiente*, que se encarga de atraer a la partícula al área de mayor intensidad del gradiente, como se muestra en la Figura 3.3.

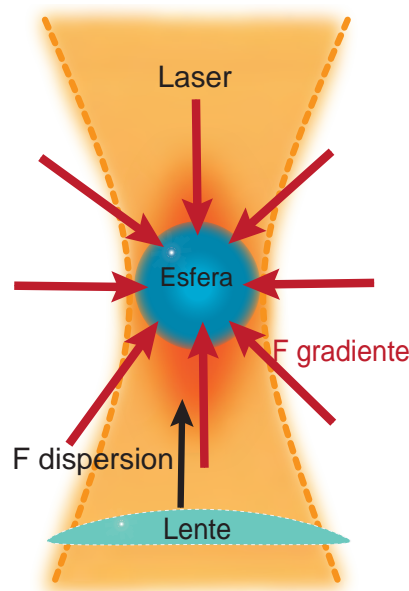


Figura 3.3: Fuerzas de dispersión y gradiente ejercidas a la partícula. Los rayos que componen el haz del láser generan un empuje en la partícula, es decir una fuerza de dispersión que desplaza a la partícula en dirección del haz, por otro lado el gradiente resultante, al enfocar el láser contrarresta el empuje que sufre la partícula debido a la fuerza de dispersión, restituyéndola al foco.

Esta combinación de fuerzas permite atrapar micropartículas en 3D. Ahora bien, para que el sistema de pinzas ópticas funcione adecuadamente es necesario que la *fuerza de gradiente* sea mayor a la *fuerza de dispersión*, esto con el objetivo de lograr que la esfera quede confinada por el láser. Lo anterior se obtiene por medio de una máxima intensidad en el gradiente lográndose a través de un objetivo de inmersión de aceite con apertura numérica alta, comúnmente $N.A. > 1,2$, propiciando que cada vez que la partícula sufra algún desplazamiento, sea restituida a la posición de equilibrio, el foco, por la *fuerza de gradiente*.

Para poder describir adecuadamente el papel que juegan estas fuerzas, es necesario analizarlas en base al tamaño de la esfera con respecto a la longitud de onda del láser (λ), por lo que a continuación hablaremos del *Régimen de rayos* como aquel en el que la partícula es grande comparado con λ , lo que permite usar óptica de rayos, y el *Régimen de Rayleigh*, en el que la esfera es mas pequeña que λ y se puede moldear como un dipolo que responde al campo eléctrico de la luz.

3.3.1. Régimen de rayos

En este régimen pensaremos en partículas esféricas con un radio $r \gg \lambda$, que actúan como lentes que dispersan el haz del láser. Pensaremos en el haz del láser como un conjunto de rayos. Bajo estas circunstancias, la dispersión de Mie ² se cumple, y las fuerzas pueden ser calculadas a partir de conceptos sencillos de óptica, como veremos a continuación.

Recordemos que un fotón tiene una energía (E) y un momento lineal (p) iguales a

$$E = h\nu \quad (3.1)$$

$$p = \frac{h}{\lambda} \quad (3.2)$$

por lo que el impulso transferido de un haz de luz con una potencia P genera una fuerza dada como

$$F = \frac{nP}{c} \quad (3.3)$$

siendo c la velocidad de la luz en el vacío y n el índice de refracción del medio. Bajo este enfoque tendremos un haz con un momento lineal por cada fotón que lo compone, por lo tanto la refracción que sufre el haz después de atravesar una partícula dieléctrica viene de un cambio en el momento del fotón y una fuerza de reacción sobre la partícula [46, 47].

Considerando que los índices de refracción entre la esfera y el medio de la muestra suelen ser muy parecidos, el haz del láser atravesando por el centro de la esfera no sufre cambio de dirección, como se muestra en la Figura 3.4; sin embargo si pensamos en el haz del láser atravesando por una orilla de la esfera tendremos una desviación interna (Figura 3.5).

Los rayos de luz llevan un cierto momento que al pasar a través de la esfera dieléctrica sufren una desviación debido a la refracción. Como consecuencia y por conservación del momento, el cambio de momento de los rayos desviados es igual y opuesta al cambio de momento en la esfera. Este cambio de momento produce una fuerza resultante, sin embargo al estar la esfera cerca de un gradiente en la intensidad de la luz, los rayos que pasan a través de la esfera generan un desequilibrio en la fuerza, que tiende a empujar a la esfera hacia la región más brillante de la luz (Figura 3.5).

3.3.2. Régimen de Rayleigh

Para abordar este régimen pensaremos en partículas muy pequeñas en comparación de λ y en el láser como un haz de fotones, por lo que la esfera se comporta como un dipolo que interactúa con el campo electromagnético inhomogeneo del haz y experimenta una fuerza en dirección del gradiente.

²Conforme aumenta el tamaño de la partícula, la dispersión hacia delante también aumenta. Describe la interacción de una onda plana con un dieléctrico esférico.

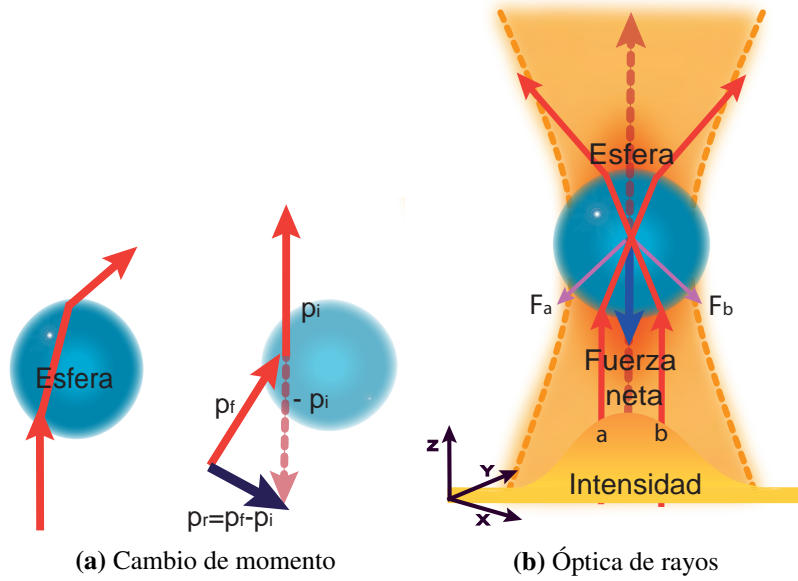


Figura 3.4: Cambio de momento y óptica de rayos. El diagrama de rayos a) muestra el cambio de momento p_r o el momento resultante de un fotón que sigue la trayectoria de la figura derecha, transmitiendo un impulso $-p_r$ a la esfera y generando el desplazamiento de esta hacia el centro del haz. b) Cuando la esfera está lateralmente centrada sobre el haz, los rayos que atraviesan la esfera generan un equilibrio de fuerzas, resultando en una fuerza neta que apunta en la dirección de la cintura del haz.

Pensemos en esferas de radio r , y una fuerza de dispersión debida a la absorción de la luz por el dipolo, dada como [45]

$$F_{disp} = \frac{I_0}{c} \frac{128\pi^5 r^6}{3\lambda^4} \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right)^2 n_m \quad (3.4)$$

donde I_0 es la intensidad del láser, n_m es el índice de refracción del medio en el que se encuentra inmersa la esfera, c es la velocidad de la luz en el vacío, $m = n_p/n_m$ es el índice de refracción relativo (relación entre el índice de refracción de la partícula y el índice de refracción del medio.), y λ es la longitud de onda del láser.

La fuerza de dispersión es perpendicular al frente de onda de la luz incidente, y es proporcional a la intensidad por lo que la partícula es empujada en la dirección de propagación. La fuerza de gradiente surge de la interacción del dipolo inducido con el campo inhomogeneo que es igual a

$$F_{disp} = \frac{2\pi\alpha}{cn_m^2} \nabla I_0 \quad (3.5)$$

donde

$$\alpha = n_m^2 r^3 \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right) \quad (3.6)$$

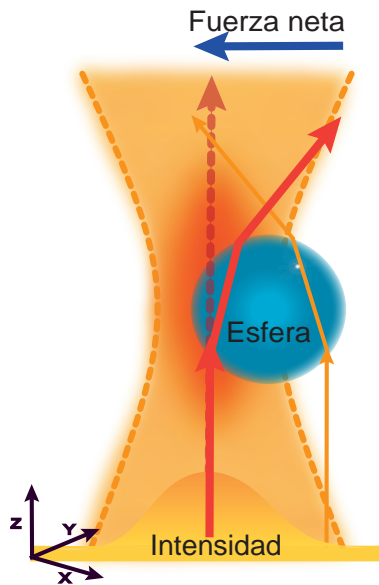


Figura 3.5: Desplazamiento de la esfera del centro del haz. El haz de luz con un gradiente en la intensidad, atraviesa una esfera dieléctrica, donde los rayos sufren una refracción. El rayo de mayor intensidad (rojo) transmite mayor fuerza que el rayo de menor intensidad (naranja), propiciando que la esfera empuje el haz de luz hacia la izquierda, mientras la luz empuja a la esfera con dirección contraria, es decir hacia el centro del haz; la suma de la totalidad de los rayos del haz generan una fuerza neta que ubica a la esfera en el centro del haz[44]

es la polarizabilidad de la esfera. La fuerza del gradiente es proporcional al gradiente de intensidad. Mientras que la fuerza de dispersión actúa en dirección del haz, la fuerza de gradiente actúa hacia el punto de enfoque (cuando $m > 1$), por lo que el punto de atrapamiento de la esfera se encuentra justo debajo del foco [45, 46].

3.4. Las pinzas como un resorte

Actualmente un sistema de pinzas ópticas puede ser tan complejo como uno desee, esto debido al tipo de sistemas de alineación, detección y manipulación con los que se cuenta recientemente; sin embargo la física básica involucrada en el atrapamiento de las partículas puede ser tan sencilla como la conservación de momento (explicada en la sección anterior) y la analogía con un resorte, como veremos a continuación.

La mayoría de las trampas ópticas son operadas con un haz láser de perfil Gaussiano. Para desplazamientos pequeños (≤ 200 nm) se encuentra que la fuerza aplicada a la partícula es lineal y con respecto a su desplazamiento desde el centro de la trampa. esto solo si el desplazamiento es pequeño. De tal forma que una pinza óptica puede ser comparada con un resorte simple, que sigue la ley de Hooke como se ejemplifica en la Figura 3.6.

Esta característica de las pinzas ópticas nos permite tener una herramienta que funciona como un transductor, lo que significa que en el momento que la esfera sea desplazada del

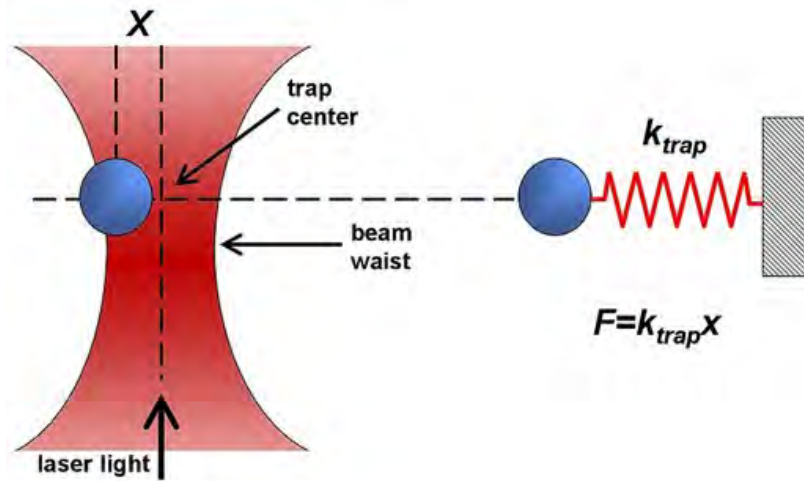


Figura 3.6: Resorte simple. La esfera que fue desplazada una distancia x con respecto al centro del haz, es restituida con una fuerza análoga a la ley de Hooke, es decir, la fuerza aplicada sobre la esfera depende linealmente del desplazamiento desde el centro de la trampa, como sucede con una esfera que está atada a un resorte. Imagen tomada de Wikipedia

punto de equilibrio con respecto al centro del haz, seremos capaces de conocer la distancia que la esfera se desplazó y la fuerza con la que lo hizo. De forma que si la esfera es desplazada fuera del punto de equilibrio tendremos una fuerza de restitución aplicada a la esfera, dada como

$$F = -\kappa_{trap}x \quad (3.7)$$

donde κ es la constante de rigidez de la trampa y x es el desplazamiento de la esfera con respecto al punto de equilibrio, es decir el centro del haz, estando linealmente relacionadas.

Gracias a esta analogía es posible caracterizar un sistema de pinzas ópticas, para desplazamientos pequeños, y saber, por ejemplo, qué fuerza ejerce un motor molecular, cuánto se desplaza a cada paso ó qué tanta fuerza es capaz de ejercer; sin embargo, es necesario caracterizar experimentalmente la trampa para poder conocer los valores de la rigidez, κ_{trap} .

3.5. Rigidez en las pinzas ópticas

Como mencionamos en la sección anterior, la rigidez de una trampa se puede caracterizar gracias a la analogía con el resorte simple; al igual que éste, la trampa puede ejercer mayor o menor fuerza al atrapar una esfera, es decir ser mas o menos rígida. Sin embargo, en el caso de las pinzas ópticas tenemos que tomar en cuenta que la esfera se encuentra inmersa en un medio acuoso capaz de proporcionarle una energía térmica debido al choque de las moléculas de los alrededores (agua, sales, entre otros), generando un movimiento Browniano de la partícula. Este movimiento será mayor si se encuentra inmersa en el medio pero sin estar confinada, y en el momento que la partícula es confinada por medio del láser, este

movimiento disminuye como consecuencia del atrapamiento (Figura 3.7)

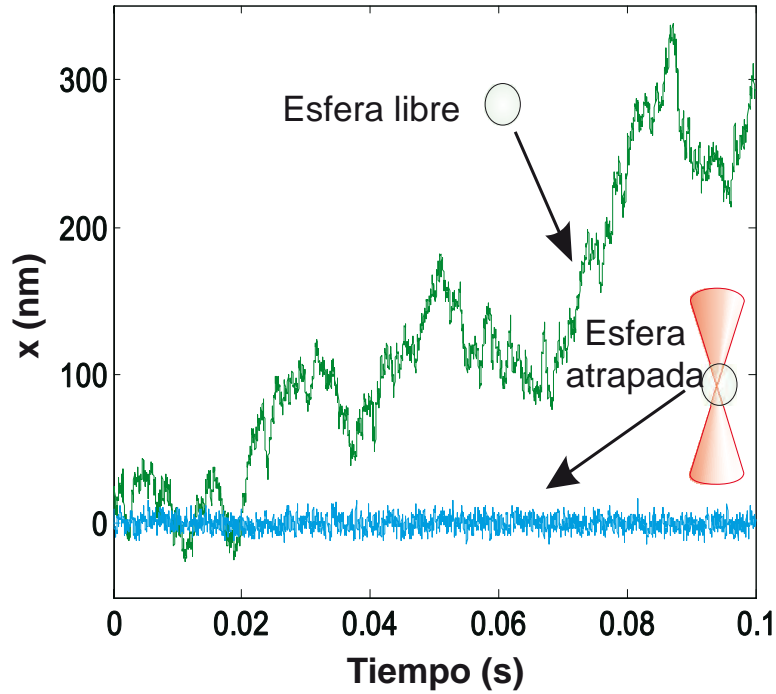


Figura 3.7: Movimiento Browniano de una esfera. El movimiento Browniano de una esfera libre (línea verde) y de una esfera atrapada por un sistema de pinzas ópticas (línea azul), son la consecuencia de los movimientos al azar de las moléculas en agua. La amplitud de movimiento de la esfera es una medida directa de la rigidez de la trampa. Modificada de la referencia [47]

Existen diversas formas de conocer la rigidez de un sistema de pinzas ópticas, todos de manera experimental y relacionando κ_{trap} con el movimiento Browniano. En este trabajo mencionaré tres de los métodos más usuales para conocer κ_{trap} : 1) Método de el *Espectro de potencias*, 2) El método de arrastre de *Stokes* y 3) El método de *Equipartición de la energía*. Para una revisión más detallada se puede consultar la referencia [45].

3.5.1. Equipartición de la energía

El teorema de equipartición de la energía relaciona la temperatura de un sistema con la energía presente en las partículas de la muestra. En equilibrio térmico, la energía asociada a cada grado de libertad que contribuye con un término cuadrático, a la energía total es igual a $1/2K_B T$.

Estableciendo que la energía térmica dada como

$$E = \frac{\kappa_B T}{2} \quad (3.8)$$

donde κ_B es la constante de Boltzmann y T es la temperatura absoluta del sistema.

Para una sistema de pinzas ópticas el teorema de equipartición de la energía se cumple cuando la esfera se encuentra en equilibrio térmico con sus alrededores, y entonces la energía potencial es

$$E_{pot} = \frac{\kappa \langle x^2 \rangle}{2} \quad (3.9)$$

donde $\langle x^2 \rangle$ es la varianza de la posición de la esfera con respecto a la posición de equilibrio, igualando las ecuaciones 3.8 y 3.9 tendremos [46]

$$\frac{\kappa \langle x^2 \rangle}{2} = \frac{\kappa_B T}{2} \quad (3.10)$$

y por lo tanto la rigidez de la trampa esta dada como

$$\kappa = \frac{\kappa_B T}{\langle x^2 \rangle} \quad (3.11)$$

3.5.2. Stokes

La resistencia que ofrece un medio viscoso para el deslizamiento de una esfera en él, está dado por la ley de Stokes como

$$F_{fricción} = 6\pi r \eta v \quad (3.12)$$

donde r es el radio de la esfera, η es la viscosidad del fluido y v es la velocidad del fluido, siendo valida en el movimiento de esferas pequeñas que son desplazadas a bajas velocidades.

Para esta método de calibración es necesario tener un flujo sobre la partícula, (generalmente se lleva acabo por medio del movimiento de la platina donde se encuentra montada la muestra ó por medio de sofisticadas cámaras donde se puede regular la entrada de medio y por lo tanto generar un flujo). Para una velocidad de flujo dada, la fuerza de fricción que se genera sobre la partícula sera equilibrada por $(-kx)$, la fuerza con la que el sistema mantiene atrapada a la esfera:

$$\kappa x = 6\pi r \eta v \quad (3.13)$$

en donde “ x ” es la nueva posición de equilibrio. Por lo tanto, podremos conocer κ en función de la velocidad del fluido y de la posición de la esfera, como

$$\kappa = \frac{6\pi r \eta v}{x} = \beta \frac{v}{x} \quad (3.14)$$

3.5.3. Espectro de potencias

Este método presenta varias ventajas con respecto a los 2 anteriores, La primera es que es el único que no necesita una calibración de la posición, y la segunda es que sirve como una herramienta para observar errores de alineación y como detector de fuentes externas de ruido ya que genera picos adicionales en el espectro de potencias.

Para una partícula sujeta a un resorte en presencia de movimiento Browniano, el espectro de potencias de la posición esta dado como:

$$G_x(f) = \frac{4\kappa_B T \beta}{\kappa^2 \left(1 + \frac{f}{f_0}\right)^2} \quad (3.15)$$

donde $G_x(f)$ esta en unidades de nm^2/Hz , κ_B es la constante de Boltzmann, T la temperatura absoluta, β es el coeficiente de resistencia hidrodinámica y f_0 es la frecuencia de corte. La frecuencia de corte es

$$f_0 = \frac{\kappa}{2\pi\beta} \quad (3.16)$$

Las fluctuaciones térmicas que sufre la partícula atrapada dan origen a la ecuación 3.15. A este espectro de potencias se le hace un ajuste con una función Lorentziana y dado que conocemos los parámetros de β es posible que se calcule κ a través de la frecuencia de corte. Esto solo es valido para esferas atrapadas a una altura $h \gg r$ de la superficie, de otra forma es necesario hacer una serie de correcciones [45].

3.6. Nuestro sistema de pinzas ópticas

Durante las secciones pasadas de este capítulo discutimos las bases físicas para un sistema general de pinzas ópticas, qué es, cómo funciona, etc. . . por lo que las bases teóricas para la construcción de un sistema ya están asentada. En lo que resta del capítulo presentaré un esquema muy general de como se encuentra diseñado y montado el sistema en el **Laboratorio de Pinzas Ópticas** del **IPICYT**. Cabe mencionar que este sistema fue construido hace no mas de un año por mis dos compañeras de laboratorio como trabajo de tesis de maestría [48], [49] y es el equipo en el que yo realice mis mediciones.

Nuestro sistema de pinzas ópticas presenta una configuración de geometría simple. Como se muestra en la Figura 3.8, consiste básicamente de un un láser infrarrojo, un microscopio invertido, el sistema de detección de la posición, un sistema de iluminación, un sistema de adquisición de video, y un complejo sistema de automatización. En las secciones subsecuentes les presentaré las características mas relevantes de nuestro sistema.

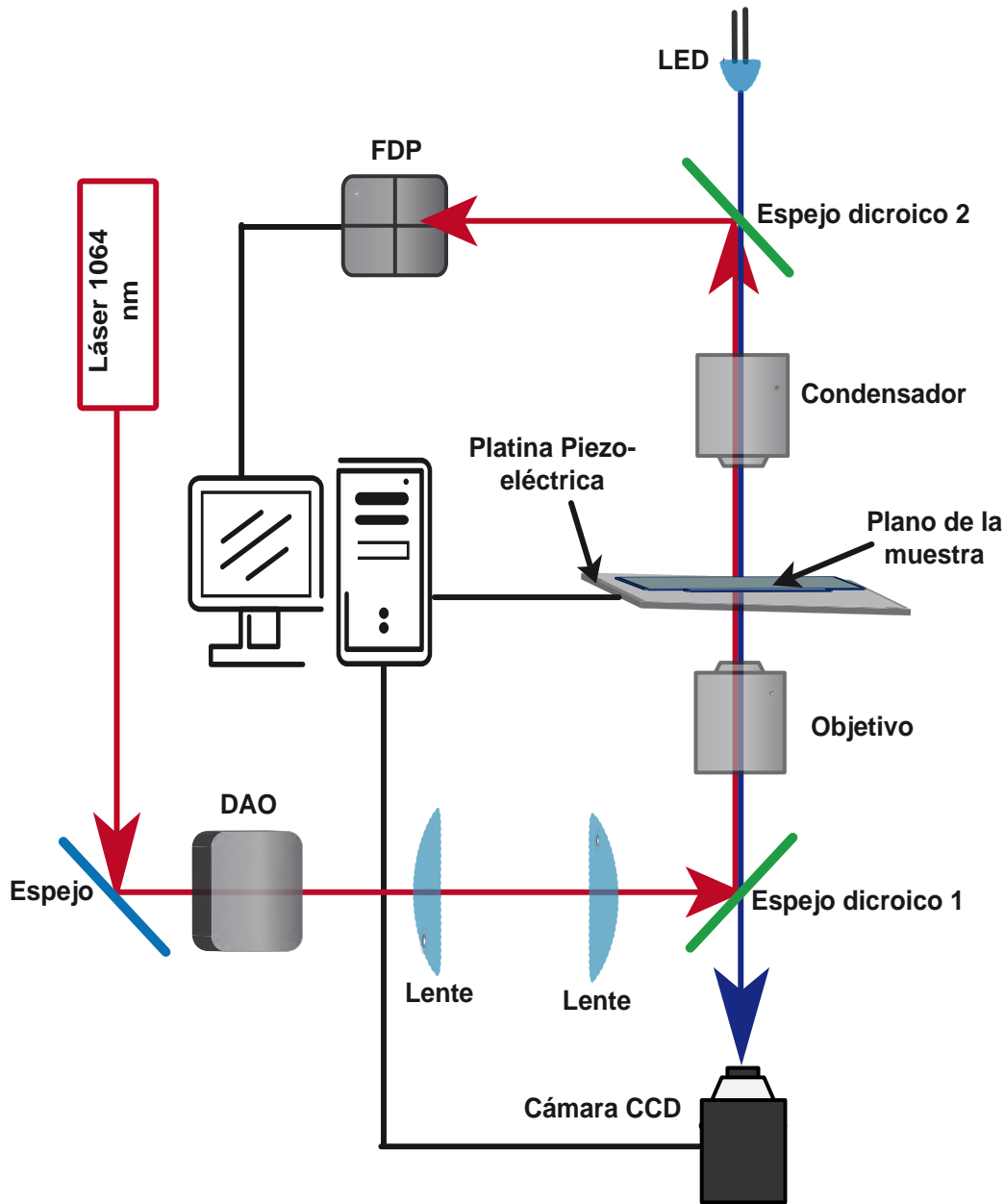


Figura 3.8: Esquema básico del sistema de pinzas ópticas. Esta imagen es el esquema simplificado del dispositivo de pinzas ópticas montado en el Laboratorio de Pinzas Ópticas del IPICYT. Consiste en un láser IR ($\lambda = 1064$) cuya trayectoria está trazada en color rojo; un juego de lentes encargados de alinear y colimar el haz del láser; un par de espejos dicroicos, que permiten pasar la luz de iluminación mientras reflejan la luz del láser; un objetivo capaz de generar el gradiente para el atrapamiento de las partículas; una platina piezoeléctrica donde se coloca la muestra, permitiéndonos generar desplazamientos; un condensador, el cual recolecta la información en el plano de la muestra; un FDP encargado de capturar la información que lleva el láser y enviarla a la computadora; un led azul encargado de la iluminación de la muestra y cuya trayectoria se representa en azul. Esta trayectoria azul también nos permite ubicar al microscopio invertido que conforma la pinza; y por último, una cámara CCD que nos permite tener una imagen del plano de la muestra.

3.6.1. Láser infrarrojo y su trayectoria

En el laboratorio se cuenta con un láser infrarrojo marca IPG-Photonics, modelo YLR-10-1064-LP de Nd:YAG con una λ de 1064 nm y una potencia de salida de 10 W. Cabe mencionar que este tipo de láser es seleccionado debido a que no genera daño a los sistemas biológicos, gracias a que todos los seres vivos presentan una ventana de **no absorción** debido a la cantidad de agua por la que estamos compuestos, propiciando que la muestra biológica no sufra daño por calentamiento [51].

El láser se encuentra acoplado a una fibra óptica, la cual es colocada sobre una mesa óptica de flujo laminar (Newport, modelo I-2000), a partir de este punto el láser es direccionado por un camino óptico que lo guía a la muestra donde se genera el atrapamiento y, más tarde al sistema de detección (fotodetector de posición, FDP). En cuanto el láser sale de la fibra óptica es dividido en 2 haces, direccionando uno de ellos a un disipador donde se desecha aproximadamente un 95 % de su potencia. El otro haz llega a un deflector acusto óptico (DAO)² (IntraAction, modelo DTD-274HD6M), con el que somos capaces de generar una pinza móvil (no implementada hasta el momento) y modificar la intensidad del haz de la pinza.

Tras salir del DAO el haz sigue por un arreglo de lentes, que forman un telescopio, el cual nos permite alinear el láser, colimarlo y generar el tamaño correcto del haz para que pueda entrar por la abertura trasera del objetivo, esto sin pérdida de potencia ni calentamiento del objetivo. Más adelante el haz llega por un espejo dicróico (ED1)³ que refleja el haz del láser direccionándolo al objetivo, donde se llena la apertura trasera y se coloca el plano focal adecuadamente. Con esto se puede generar la pinza óptica en el plano adecuado, es decir entre el cubre objetos y el portaobjetos.

En este punto solo tenemos un haz perfectamente alineado y colimado para poder generar la trampa, un haz con la potencia justa para el atrapamiento, que a su vez no genere un sobrecalentamiento de los componentes ópticos del microscopio invertido.

3.6.2. Microscopio invertido

El corazón de nuestro sistema de pinzas ópticas está conformado por el microscopio invertido, el cual se encarga primordialmente de generar el atrapamiento en el plano de la muestra, nos permite tener una manipulación nanométrica de la muestra gracias a la platina con la que cuenta (mas adelante se detallará), y por ultimo, nos permite formar una imagen del plano de la muestra.

El microscopio invertido construido, cuenta con un objetivo OLYMPUS 100X, de inmersión en aceite, con una apertura numérica de 1,25 y corregido a infinito, el cual es el

²Dispositivo capaz de deflectar el haz del láser, por medio de una variación de la frecuencia genera un cambio en el ángulo de salida.

³Espejo que es capaz de dejar pasar una cierta longitud de onda y reflejar otra λ , en nuestro caso deja pasar la luz azul y refleja la luz del infrarrojo

encargado de la tarea más importante del sistema, enfocar el haz de láser en el plano de la muestra, de manera que se genere el gradiente en la intensidad encargada del atrapamiento en 3D de las partículas. Enseguida este haz es colectado por un condensador Carl Zeiss, Plan-apo, de apertura numérica 1,4 para ser enviado al FDP por medio de un segundo espejo dicroico (ED2). La muestra está montada en una platina piezoeléctrica (Mad City Labs, LP100), la cual más adelante detallare.

El sistema de iluminación e imagen

El microscopio invertido, como cualquier otro microscopio, cuenta con un sistema de iluminación, el cual se encuentra acoplado a el camino óptico del láser por medio del ED1 a lo largo del microscopio, para mas tarde ser desacoplado por medio del ED2, como se muestra en la Figura 3.9.

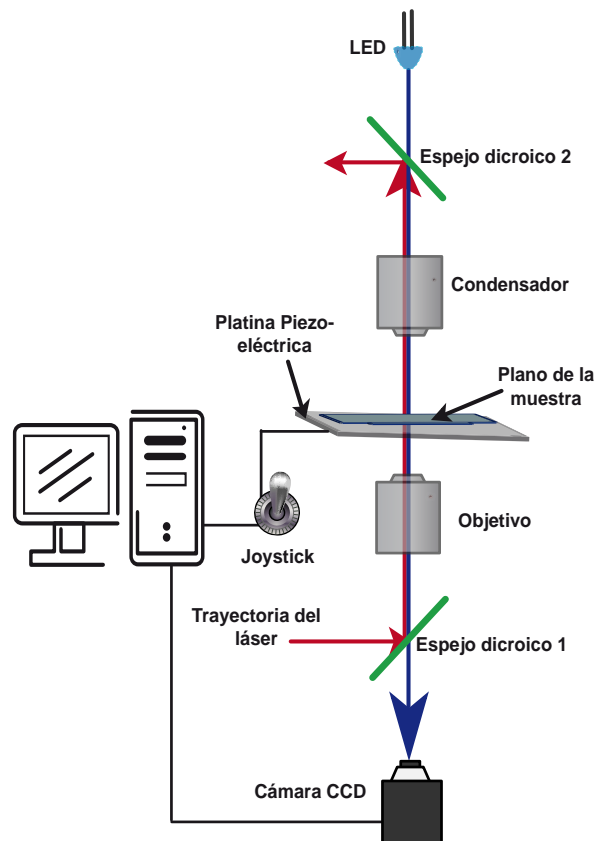


Figura 3.9: Esquema del microscopio. En esta imagen se observa únicamente las partes que constituyen el microscopio invertido de la pinza. De la parte superior hacia abajo, iniciamos con un rayo de luz de un LED azul, que sigue la trayectoria marcada con una flecha azul; atraviesa un espejo dicroico encargado de desacoplar la trayectoria del láser; entra por la abertura trasera del condensador, llegando al plano de la muestra, atraviesa la platina piezoeléctrica; entra al objetivo y sale a otro espejo dicroico encargado de acoplar la trayectoria del láser, al camino óptico del sistema de iluminación del microscopio. Por ultimo la señal es colectada por una cámara CCD, que se encuentra conectada a una computadora.

Este sistema de iluminación formado por un led azul, se encuentra instalado en la parte superior del microscopio. La luz del LED atraviesa por el ED2 llegando a la apertura trasera del condensador, atraviesa la muestra y es colectado por el objetivo quien lo manda al ED1 para finalmente llegar a la cámara CCD. La cámara de video CCD genera una imagen del plano de la muestra permitiéndonos tener una imagen de video en la computadora principal.

Desplazamiento de la muestra: Platina piezoeléctrica y Joystick

Se cuenta con una platina piezoeléctrica, Mad City Labs LP100, capaz de realizar desplazamientos con una resolución sub-nanométrica y en un rango de los 100 μm , esto para los 3 ejes (x, y, z) . Esta platina es una de las partes fundamentales de nuestro sistema ya que nos permite obtener un muy alto grado de precisión para llevar a cabo desplazamientos finos de la muestra respecto de la trampa.

La platina piezoeléctrica se encuentra montada sobre una platina secundaria que cuenta con tornillos micrométricos; con esta platina se llevan a cabo los desplazamientos burdos. Por otro lado se cuenta con un sistema de desplazamiento rápido gracias a un joystick (Logitech, Attack 3), acoplado a la platina por lo que se convierte en una palanca de mando.

La platina aparte de permitirnos desplazamientos finos también nos proporciona una extraordinaria herramienta al momento de hacer las calibraciones del sistema. Esta platina se encuentra totalmente automatizada y conectada a la computadora principal; por medio de un conjunto de rutinas de LabView ⁶ se pueden generar diversos desplazamientos de la platina controlando la velocidad, generar patrones de desplazamientos, etc... Por otro lado, esta platina y su automatización, juegan un papel fundamental en la calibración del sistema tanto para conocer la rigidez de la trampa como para conocer los desplazamientos de la esfera, como se verá en las dos ultimas secciones del capítulo.

3.6.3. Fotodetector de posición

El fotodetector de posición por cuadrantes (FDP) (Pacific Silicon Sensor, modelo DL100-7PCBA2) es un dispositivo electrónico capaz de transformar la potencia óptica que detecta a una corriente eléctrica de salida, generando tres señales de voltaje; una que es proporcional a la intensidad y dos que son proporcionales a la posición del centro de masa del haz.

El FDP es el encargado de medir los desplazamientos de la esfera, esto, por medio de las deflecciones del haz producidas por la esfera al encontrarse fuera de su posición de equilibrio (x_0, y_0, z_0) . Un FDP de cuadrantes tiene la característica, como su nombre lo indica, de tener una detección por medio de cuadrantes, donde nosotros seremos capaces de detectar cualquier desplazamiento del láser gracias a la cantidad de luz colectada por cada uno de estos. La lectura del voltaje que nos proporciona depende directamente de la proporción del haz que sea detectado en cada cuadrante; de esta forma si la esfera se encuentra en la posición

⁶Entorno de programación gráfico.

de equilibrio los cuadrantes recibirán igual cantidad de luz y el voltaje será $V_x = 0, V_y = 0$ y $V_z = 0$. Si la esfera se ha desplazado en x , como se muestra en la Figura 3.10, existirán 2 cuadrantes (verticales) que detectaran mayor cantidad de luz que los otros 2, generando un voltaje $V_x \neq 0$; si la esfera se desliza en y tendremos 2 cuadrantes horizontales, detectando mayor cantidad de luz y por lo tanto $V_y \neq 0$.

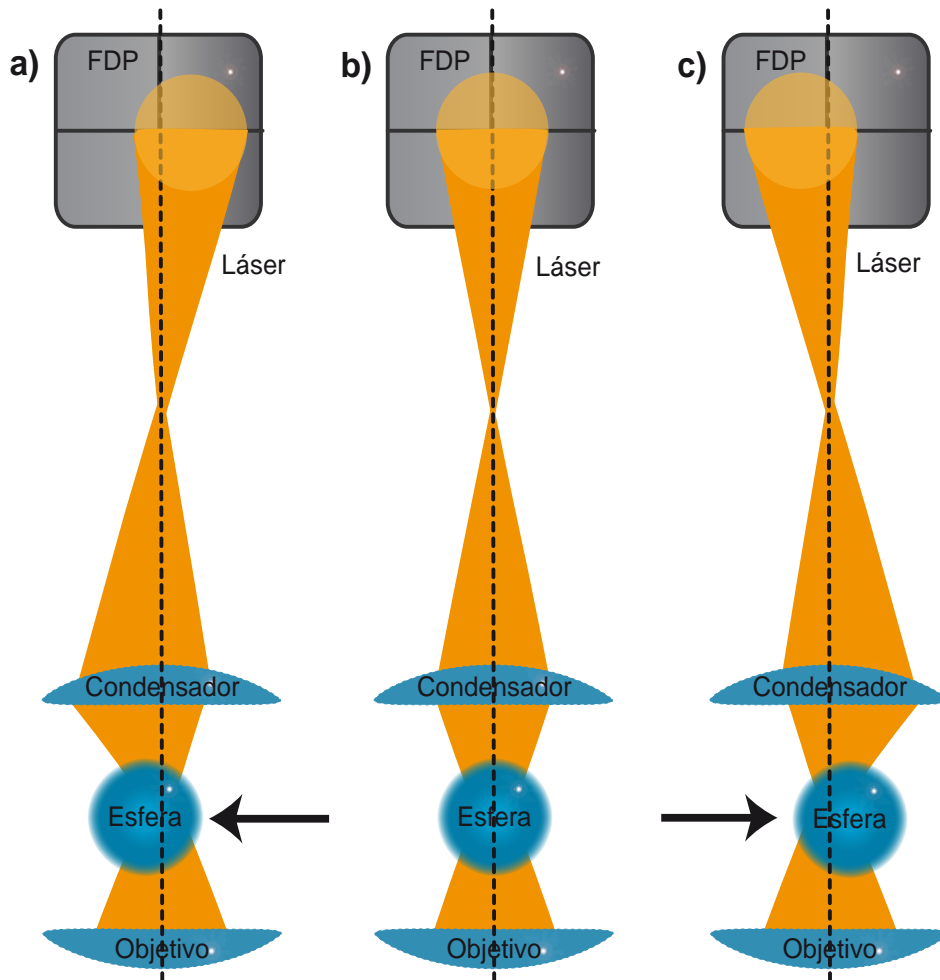


Figura 3.10: Fotodetector. En la figura se esquematiza cómo es que el FDP detecta los desplazamientos de la esfera para los ejes X y Y , recordemos que el FDP detecta el centro de masa del haz incidente. a) Si la esfera es desplazada de su posición de equilibrio, generará un desplazamiento del haz incidente en el FDP; si la esfera es desplazada hacia la izquierda, el FDP captará mayor cantidad de luz en los dos cuadrantes de la derecha. b) Si la esfera se encuentra en la posición de equilibrio (x_0, y_0) , el haz no sufre deflecciones, por lo que, todos los cuadrantes del FDP recibirán la misma cantidad de luz. c) Si la esfera es desplazada hacia la derecha, el FDP captará mayor cantidad de luz en los dos cuadrantes de la izquierda. Esto es análogo para el eje Y , solo tomando en cuenta que los cuadrantes se dividirán horizontalmente.

Para el caso de los desplazamientos en Z , lo que tendremos es la detección del voltaje como la suma de los 4 cuadrantes. Antes de que el haz incida en el FD, se coloca un diafragma que es acomodado de forma tal que el haz del láser solo ilumina el borde. Por medio

de este diafragma se limita la cantidad de luz del haz que pasa al FDP. Así, cuando la esfera se desplaza en z , la distancia que recorre el haz desde la esfera hasta el FDP se modifica, es decir converge o diverge propiciando una mayor o menor cantidad de luz retenida por el diafragma y por lo tanto tendremos un $V_z \neq 0$. Cabe señalar que para tener una correcta lectura de la posición es necesario, previamente a las mediciones, alinear el haz del láser con respecto al centro del FDP.

Estas señales detectadas por el FDP son enviadas a la computadora donde son analizadas y transformadas en desplazamientos gracias a las calibraciones, que se detallan a continuación.

3.7. Calibración

Como mencioné en la sección 3.4, las pinzas ópticas se comportan análogas a un resorte, gracias a esto tenemos una respuesta proporcional del FDP, para pequeños desplazamientos de la esfera cercanos a la posición de equilibrio (x_0, y_0, z_0) . Es decir, basta con multiplicar los voltajes que arroja el FDP con un número a determinar para poder tener el desplazamiento de la esfera.

En las dos secciones restantes describiré cómo se determina este coeficiente de transformación para el desplazamiento, y también como obtenemos κ . En este punto hago notar que las calibraciones se llevaron a cabo para esferas de poliestireno con un diámetro de $\approx 1.26 \mu\text{m}$ y diluidas en un medio conocido como Woods-Hole, el que les detallaré en la sección 4.1.2.

3.7.1. Desplazamiento de la esfera: conversión V vs. nm

El objetivo de esta sección es describir cómo se lleva a cabo la calibración del FDP, es decir, determinar el factor de conversión que relacione voltajes que registra el PSD con desplazamiento de la esfera en nm .

Esto se logra gracias a la automatización que presenta el sistema, por medio de las rutinas desarrolladas con LabView. Con estas rutinas somos capaces entre otras muchas cosas de llevar una esfera a la ubicación del láser, por medio del joystick y/o la platina, desplazarnos en el eje z o generar desplazamientos periódicos por un tiempo o número de corridas determinado, etc . . . Recordemos que la pinza óptica se encuentra fija y lo que **siempre** deslizamos es la platina.

Lo primero que hacemos es determinar en qué punto en el eje z se genera la trampa, es decir el punto de equilibrio z_0 . Recordemos que gracias a las fuerzas de dispersión el punto de equilibrio en z está levemente desplazado respecto al centro del láser. Para determinar este punto de equilibrio es necesario atrapar una esfera en solución, por medio de la rutina *scanStageLookForStuckBead_STM.vi* la platina da pasos en z graficando en tiempo real la respuesta del FDP. La platina se desplaza en z hasta que el cubre objeto choca con la esfera,

generando un empuje. En este punto se genera una traza característica del choque con la superficie. Comúnmente la esfera se adhiere al cubreobjeto por lo que a partir de ahora la esfera se desliza junto a la platina y cuando esta, la platina, regresa a su origen se lleva consigo a la esfera. A partir de este momento tendremos una traza característica de una esfera adherida al cubre objeto, (Figura 3.11), generando una superposición de las trazas, por lo que es muy evidente el punto de choque, a partir del cual las trazas coinciden. Este punto de choque es el punto de equilibrio para z , en nuestro caso es $0,7856 \nu$.

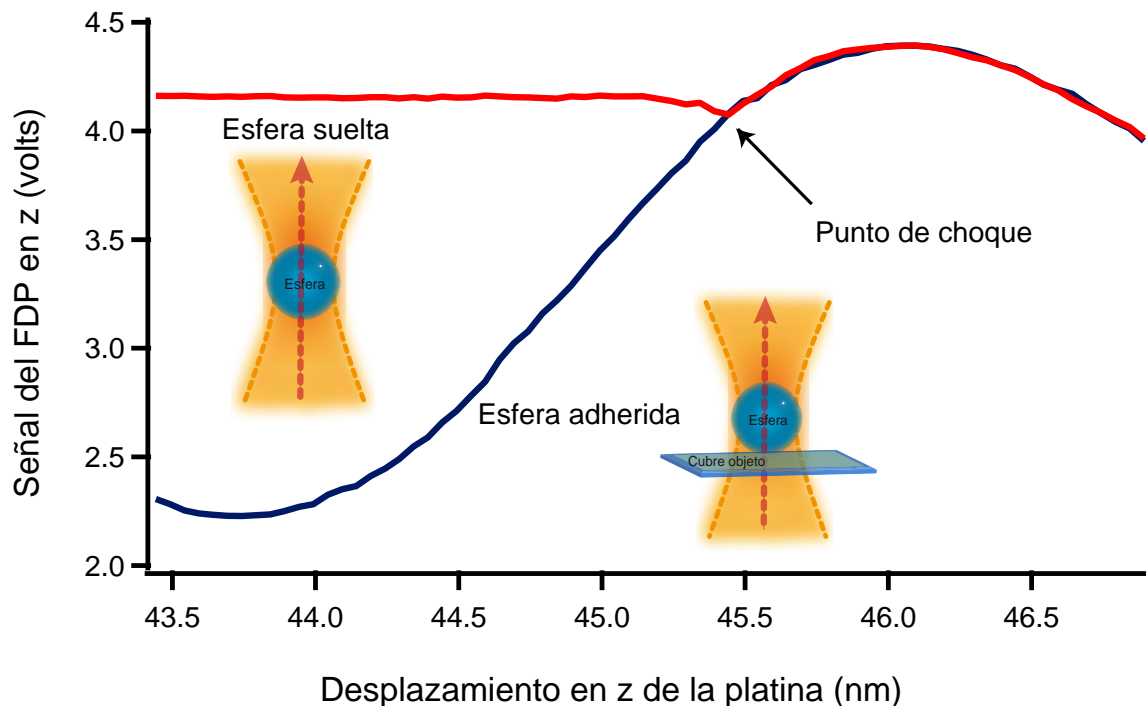


Figura 3.11: Gráfica de voltaje vs. posición en z En trazo rojo se muestra el desplazamiento de la esfera en solución atrapada por la pinza. La primer parte no muestra cambio en el voltaje debido a que la esfera se encuentra en su posición de equilibrio (x_0, y_0, z_0) . A partir del punto de choque la esfera se encuentra adherida al cubre objeto. En trazo azul se muestra el cambio de voltaje en el FDP debido al desplazamiento de la esfera adherida al cubre objeto; a partir del punto de choque se observa como se superponen las gráficas.

El siguiente paso es conocer la calibración para x y y . Para lograr conocerla es necesario centrar con respecto a la mancha del láser una esfera adherida al vidrio. En este paso quisiera recordar que cada vez que se realizan desplazamientos bruscos de la platina se genera una deriva, por lo que es importante dejar reposar un poco (≈ 3 minutos) la muestra después de cada desplazamiento brusco.

Con ayuda del joystick ubicamos una esfera pegada en la mancha del haz y por medio de la rutina *CenterStuckBead3D_85%FIT_MX_BGM.vi*, se centra la esfera en el láser, corroborando que la esfera se encuentre bien adherida al vidrio. Una vez centrada la esfera, se corre el programa *CenterStuckBead2DMX_Poly7.vi*, el cual generar un barrido completo

de la esfera, como se muestra en la Figura 3.12, la platina se mueve desplazando la esfera por el láser, esto lo hace tanto en x como en y , obteniendo gráficas que nos dicen en qué momento la esfera entra al régimen del láser y en que momento vuelve a salir. Cabe señalar que nosotros somos capaces de decirle a la rutina cuantos pasos se requieren y de que tamaño.

Automáticamente la rutina ajustará la posición de la esfera respecto al láser, la derivada de una función Gaussiana y una recta en la sección lineal de la curva de calibración, donde la pendiente de esta recta nos dará la calibración de Volts a nm. Como se muestra en la Figura 3.12, la señal de salida es una gráfica de posición de la platina contra el voltaje detectado por el FDP. El procedimiento es análogo para x y y .

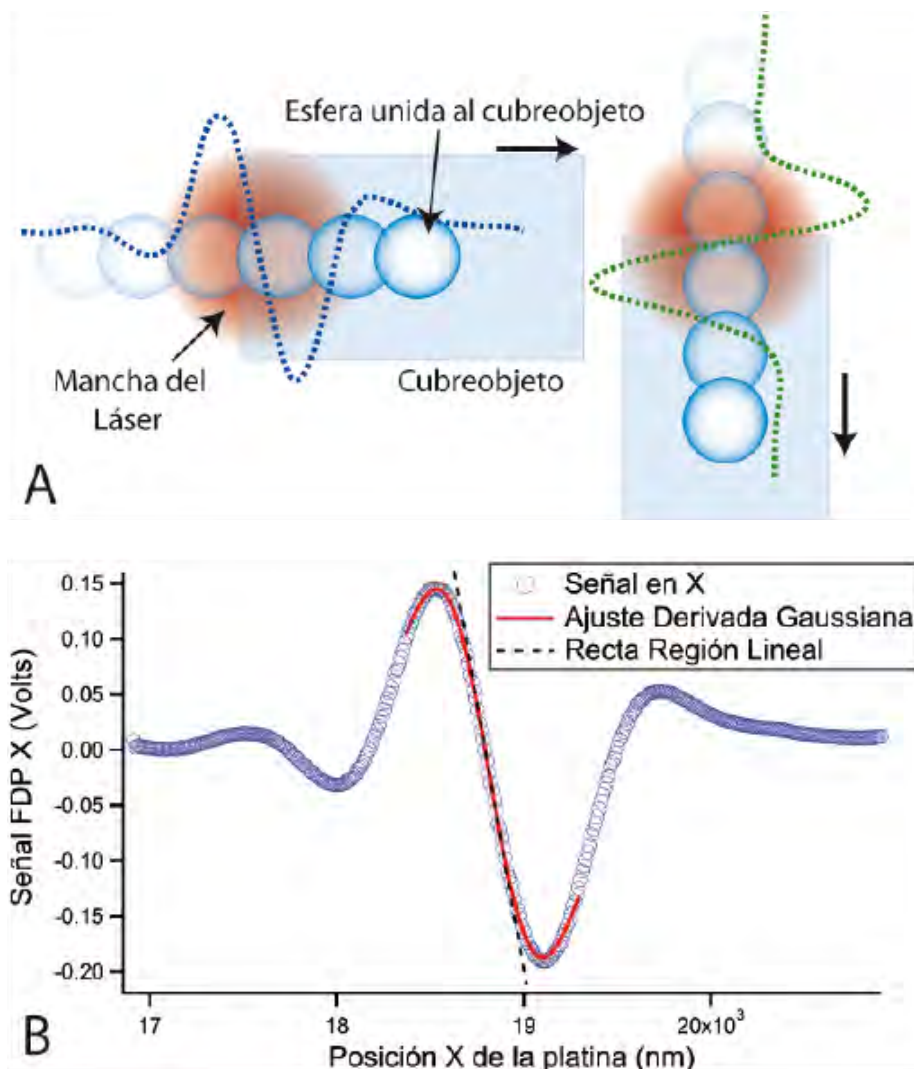


Figura 3.12: Barrido del láser para x y y A) Imagen del barrido en x y y . La esfera es deslizada a través del láser, mientras la computadora registra la señal y automatiza el proceso, ajustando una derivada de la Gaussiana. B) Gráfica correspondiente al barrido en x , en azul se puede observar la señal del FDP, análogo para el eje y ; el ajuste Gaussiano se muestra en línea roja. Con una línea en negro se puede observar el centro con pendiente a/α^2 . Imagen tomada de la referencia [48]

Se tomaron los datos de 14 esferas, en 4 zonas diferentes de la muestra. Se sacó un promedio y la desviación estándar para conocer el valor de calibración para x y y .

Calibración	
X	$585,73 \pm 5,90^{-5}$ nm/V
Y	$624,7 \pm 1,2^{-4}$ nm/V

Cuadro 3.1: Calibración del FDP. Coeficientes de transformación de V_x , V_y para el desplazamiento de la platina en nm.

3.7.2. Rigidez de la trampa

Como vimos en la sección 3.5 existen 3 formas comunes de calibrar la rigidez de las pinzas ópticas: Equipartición de la energía, Stokes y Espectro de potencias. Para el caso de nuestro sistema se tienen implementadas algunas rutinas de LabView capaces de proporcionarnos la rigidez de la trampa a partir de de estos 3 métodos.

Lo primero que necesitamos hacer es atrapar una esfera libre, esto con el objetivo de poder encontrar la superficie del cubre objeto. Esto se lleva a cabo por medio de la rutina *SurfaceHeight_modificado.vi* el cual realiza un barrido en z ; cuando el cubre objeto choca con la esfera se genera el cambio en la señal mostrado en la Figura 3.12. Aquí cabe mencionar que a diferencia con la calibración del desplazamiento, nos interesa que la esfera todo el tiempo se encuentre atrapada por el láser, regresando a su posición de equilibrio z_0 cada vez que llega al punto de choque. La rutina nos pedirá que ubicamos en su gráfica cual es el punto de choque, propiciando que la platina sea colocada en la superficie del cubreobjeto.

Recordemos que hasta este punto la esfera sigue atrapada por el láser. Una vez localizada la superficie se corre otra rutina de LabView *PowerSpectraMXmayo_2011.vi* ordenándole que lleve a la esfera a una distancia de 500 nm con respecto de la superficie, donde este programa es capaz de proporcionarnos los valores de κ por los métodos de Equipartición de la energía y Espectro de potencias de manera prácticamente automática. Aquí es importante señalar que existe una rutina *Global_ParameterWrite.vi*, en donde se colocan los resultados de las calibraciones anteriores es decir el factor de conversión en x, y, z y por medio de este programa obtienen los datos necesarios para las calibraciones las demás rutinas.

Ahora solo nos queda hacer la calibración con el método de Stokes para lo cual se tiene la rutina *XYZStokesDragMxfast_modificado_promedios.vi* con la que somos capaces de simular un flujo sobre la esfera para poder obtener la κ_x y κ_y . Es usual que para esta calibración se pierdan las esferas al momento de generar el flujo. Por medio de este método no se ha obtenido κ_z .

Para llevar a cabo esta calibración se tomaron ≈ 10 esferas de poliestireno con un diámetro aproximado de $1.26 \mu\text{m}$, en tres zonas diferentes de la muestra. Las esferas se encontraban

en dilución con medio Woods Hole.

En la siguiente tabla muestro los resultados promedio de los tres métodos implementados en nuestro sistema de pinzas ópticas, así como el promedio de estos.

	kvarianza pN/nm	kpowerspectra pN/nm	Stokes pN/nm	Promedios pN/nm
X	0.056 ± 0.0017	0.071 ± 0.0044	0.061 ± 0.0048	0.063 ± 0.0014
Y	0.060 ± 0.0034	0.087 ± 0.011	0.071 ± 0.0061	0.070 ± 0.0034
Z	0.0011 ± 0.0005	0.0087 ± 0.0041	————	0.0038 ± 0.002

Cuadro 3.2: Calibración para la rigidez de nuestro sistema de pinzas ópticas.

Capítulo 4

Metodología experimental

4.1. Selección y cultivo de diatomeas

4.1.1. Condiciones de un cultivo

Las diatomeas, como ya lo he mencionado en el Capítulo 2, son capaces de crecer prácticamente en cualquier ambiente húmedo que presente los nutrientes necesarios para su desarrollo; es por este motivo que son algas relativamente fáciles de cultivar, sin embargo también es muy fácil que el medio donde se encuentran se contamine de bacterias y cianobacterias, esto debido a la cantidad de nutrientes que presenta.

Para poder tener cultivos lo suficientemente estables hay que tomar en cuenta 5 factores de suma importancia:

- pH: por lo regular cercano a 7.
- Temperatura: Entre los 18°C y los 25°C.
- Fotoperiodo: Dependiente del tipo de diatomea, pero de manera general son 16 h luz:8 h oscuridad.
- Medio: Dependiente del tipo de diatomea; existen algunos relativamente generales.
- Ambiente estéril: Esto es dependiente del tipo de estudios y del grado de pureza que se requiere para el cultivo.

Para poder trabajar con las diatomeas, ya sea de agua salada o agua dulce (como es nuestro caso), se debe seleccionar el medio de cultivo idóneo para la especie de diatomea, esto dependerá del origen de estas. Es muy probable (y seguramente lo mas recomendable), que si se han comprado las diatomeas en algún cepario de microalgas, se procure mantener los cultivos bajo las mismas condiciones, (pH, temperatura, nutrientes, fotoperiodo, etc...) ya que las diatomeas se encontrarán muy bien adaptadas a estas condiciones. Existen un par de medios que prácticamente funcionan para cualquier especie de agua dulce, como lo pueden ser el medio “Diatom Medium” (DM) y el “Woods Hole” (WC) [55], en general estos son

los medios mas ricos en nutrientes.

Los cultivos con los que he trabajado se mantienen en un ambiente controlado a $\approx 25^{\circ}\text{C}$, con fotoperiodos de 12 horas de luz y 12 horas oscuridad, en un principio y con fotoperiodos de 16 horas luz, 8 horas oscuridad al final de los ensayos. Se les proporciona una oxigenación permanente y una agitación moderada, ambos por medio de una manguera de pecera conectada a una bomba de aire para pecera, la cual pasa a través de los tapones de los frascos de cultivo por medio de una perforación realizada al centro de éste; en algunos casos se les colocó tapones de algodón, previamente esterilizados y en otras ocasiones se les colocó una tapa provisional de aluminio.

4.1.2. Medio Woods Hole

El medio en el que se han crecido las diatomeas con las que he trabajado es el medio *Woods Hole* (WC) [55].

La preparación de este medio requiere de 9 stocks, los cuales son elaborados con agua desionizada. Los 5 primeros stocks son los macronutrientes (Cuadro 4.1), los cuales proporcionan los nutrientes que suministran la mayor parte de la energía metabólica; el stock 6 esta compuesto de varios elementos trazas o micronutrientes (Cuadro 4.2), los cuales son sustancias que se necesitan en muy pequeñas dosis, pero son indispensables para diferentes procesos bioquímicos y metabólicos de las algas. El stock 7 consta solo de 2 compuestos (Cuadro ??), los cuales proporcionan un bajo aporte de nutrientes; el stock 8 son las vitaminas (Cuadro ??) nutrientes esenciales para el funcionamiento fisiológico, funcionan como catalizadoras de todos los procesos fisiológicos; por ultimo se tienen los silicatos como stock 9 (Cuadro 4.5), fundamentales para la formación de la frústula.

Para la realización del medio es necesario contar con los 9 stocks ya elaborados, de esta manera resulta ser muy sencilla la preparación del medio. Para obtener un volumen final de 1 l de medio se toma 1 ml de los stocks 1 al 6.

Stock	Compuesto	Marca	g/l
1.-	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Fermont	36.76
2.-	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Hight purity	36.97
3.-	NaHCO_3	Sigma	12.60
4.-	K_2HPO_4	J. T. Baker	8.71
5.-	NaNO_3	Fermont	85.01

Cuadro 4.1: Macronutrientes

Se le adicionan 500 mg/l de amortiguador HEPES (Promega) y se ajusta el pH a 7 con HCl ó NaOH. Se procede a esterilizar en una autoclave a 120°C por 20 minutos.

Compuesto	Marca	g/l
MnCl ₂ ·4H ₂ O	Fermont	0.18
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	J. T. Baker	0.022
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	Desconocida	0.0046
CaCl ₂ ·6H ₂ O	Fermont	0.012
CuSO ₄ ·5H ₂ O	Desconocida	0.01
H ₃ BO ₃	CTR Scientific	0.06

Cuadro 4.2: Stock 6, Micronutrientes

Una vez que el medio se encuentra frío se le agrega 1 ml de los stocks restantes, 7 al 9. Previamente todos han sido esterilizados por filtración y elaborados con agua desionizada.

Para el stock 7 es necesario disolver el Na₂ EDTA en agua desionizada y después añadir el FeCl₃·6H₂O.

Compuesto	Marca	g/l
Na ₂ EDTA	Promega	4.36 g/l
FeCl ₃ ·6H ₂ O	Desconocida	3.15 g/l

Cuadro 4.3: Stock 7

Vitamina	Marca	g/l
Biotina	Sigma	0.0005 g/l
Cianocobalamina (B12)	Sigma	0.0005 g/l
Tiamina-HCl (B1)	Sigma	0.1 g/l

Cuadro 4.4: Stock 8, Vitaminas

El procedimiento para la preparación de los stock debe ser bajo condiciones de esterilidad, así como su manipulación para la realización de los medios. Debemos tomar en cuenta que si los stocks se llegan a contaminar, el medio que se prepare con estos seguramente estará contaminado, lo que puede generar problemas con el cultivo. En este caso sera preferible desecharlo y volverlo a elaborar.

Tanto los stocks como el medio preparado debe ser resguardado bajo refrigeración (4°C), para evitar el crecimiento de bacterias y su degradación. Es importante tomar en cuenta que cuando sea necesario rellenar los cultivos de las diatomeas con el medio refrigerado, este se debe dejar atemperar. Si el medio frío es vertido al cultivo que se encuentra a mayor temperatura se podría provocar un choque térmico de las diatomeas.

Compuesto	Marca	g/l
NaSiO ₃ ·9H ₂ O	Aldrich	28.40g/l

Cuadro 4.5: Stock 9, Silicatos.

Aquí es importante mencionar que aunque el protocolo original menciona que el medio se puede llevar a cabo con agua destilada, se ha decidido realizar el medio de cultivo con agua desionizada. Esto debido a que pudimos observar que el tipo de agua utilizada en el medio puede interferir de manera negativa en el comportamiento del ensayo. Cabe mencionar que esto se debe al tipo de estudio que se desea realizar. El usar agua desionizada evita que las micropartículas presentes en nuestros experimentos se adhieran a la superficie del cubreobjetos.

4.1.3. Cultivo funcional

Lo primero que se procedió a hacer fue localizar un cultivo que fuera útil para nuestros propósitos, es decir un cultivo con una buena densidad celular, y que presentara diatomeas con motilidad. Esta selección se realizó por medio de observación en un microscopio óptico (LEICA DME) a magnificaciones de 10X, 40X y 100X, (este último es un objetivo de inmersión en aceite). Esto se llevó a cabo en el laboratorio de Geomicrobiología del Instituto de Metalurgia (IM) de la UASLP, a cargo de la Dra. Viridiana García Meza.

El laboratorio de Geomicrobiología cuenta con una amplia variedad de diatomeas, tanto marinas como dulceacuícolas, esto nos permitió realizar una exhaustiva observación de las diatomeas, tanto de densidades de los cultivos, como de la capacidad de motilidad que presentaban. A partir de esto fue posible seleccionar un cultivo idóneo para nuestro trabajo, el cual presentaba varios tipos de diatomeas, predominando el tipo *Nitzschia spp.* Estas son diatomeas pennadas, rafideas y, por lo tanto presentan un alto grado de motilidad.

El cultivo seleccionado proviene de una recolección de diatomeas llevada a cabo por Yadiralia Covarrubias Rubio, alumna de Maestría de la Dra. Viridiana García Meza. Esta recolección se realizó en la parte lateral de la torre de enfriamiento 2 de la central termoeléctrica de Villa de Reyes, San Luis Potosí. La temperatura de colecta fue de 24 °C, por lo que cuenta con diatomeas mesófilas¹. Son diatomeas bentónicas, que se desarrollan en los sedimentos de las torres de enfriamiento y se caracterizan por ser polisaprobias², oligohalobias³.

En este cultivo se encuentra una amplia diversidad de diatomeas, y algunos tipos de bacterias, por lo cual, una vez seleccionado el cultivo, se llevó a cabo una serie de diluciones seriadas en pozos de cultivos o multiplatos estériles de 24 pozos (Multiple Well Plates, Costar 3524), esto con la finalidad de conseguir un cultivo lo más puro posible, libre de bacterias

¹Temperatura óptima de crecimiento comprendida entre 20°C y 45°C. La temperatura mínima se encuentra en el rango de 15°C a 20°C y la temperatura máxima en torno a 45°C.

²Se desarrollan sobre organismos muertos o sustancias orgánicas en descomposición

³Organismo que vive en aguas salobres, es decir con baja concentración de sales

como de diversidad de diatomeas.

En la charola de cultivo se colocó 3 ml de muestra en el primer pozo (a cada pozo le cabe un volumen de ≈ 3.4 ml); en el segundo pozo se colocó 0.5 ml de muestra del primer pozo y se completo con 2.5 ml de medio. Una vez realizado esto, en el segundo pozo, se agita con precaución y se tomó 0.5 ml de muestra que es transferido al siguiente pozo, este se completa con 2.5 ml de medio y se agita con precaución; se vuelve a tomar 0.5 ml de muestra y es colocado en el siguiente pozo y así sucesivamente.

Para este trabajo en particular, se llevó a cabo diluciones en un pozo si y uno no (como se muestra en la Figura 4.1) con el objetivo de prevenir la mezcla entre ellos en el momento de la manipulación, ya fuera traslado o relleno de los pozos. Se comenzó con 6 diluciones.



Figura 4.1: Pozos de cultivo. Plato de pozos de cultivo en el que se puede observar las diluciones marcadas como dir, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000; Es claro como las diluciones “dir y 1:10” presentan una tonalidad café claro, transparentosa, esto debido al mayor numero de muestra biológica, en comparación con los pozos que tienen una mayor dilución. También se puede observar que se encuentra marcada con el nombre del cultivo original diatomeas lavadas 1:1000.

Transcurridas de 2 a 3 semanas y tras una observación periódica, se determinó cuál de las diluciones realizadas era la más conveniente para el trabajo, por lo que se seleccionó y trasplantó a un frasco de cultivo de 250 ml con tapón de rosca, al cual se le ha hecho una perforación de ≈ 5 mm en el centro para poder suministrar la oxigenación y el burbujeo al cultivo a través de una manguera de pecera. La primera semana de realizado el trasplante el frasco de cultivo, permanece hasta los 100 ml, transcurrida esta semana es rellenado hasta los 200 ml; aproximadamente 1 semana más tarde se tiene un cultivo con el cual es posible trabajar (Figura 4.2)

Aquí es importante mencionar que idealmente es necesario hacer resiembras del cultivo cada 3 o 4 semanas, con la finalidad de tener siempre a disposición cultivos con baja contaminación bacteriana, alta densidad celular y en fase exponencial de crecimiento. También



Figura 4.2: Cultivos. Imagen de 2 cultivos de diatomeas, ambos de agua dulce, con oxigenación y burbujeo. Ambos presentan el característico color marrón, pardo, lo que nos habla de un cultivo sano.

es recomendable tener siempre un duplicado del cultivo, como una medida precautoria ante cualquier incidente.

Análisis de un cultivo funcional

En esta sección comentaré brevemente una serie de sencillas pruebas y análisis que se llevaron a cabo para conocer el comportamiento del cultivo bajo ciertas condiciones.

Una vez seleccionado y en vías de crecimiento, se llevó a cabo un pequeño análisis de el comportamiento del cultivo en función del material del recipiente de traslado, así como otros 2 parámetros. Esto fue necesario debido a que el laboratorio de Geomicrobiología no se encuentra dentro de las instalaciones del IPICYT, por lo tanto era necesario comprobar el buen funcionamiento de las diatomeas después de un tiempo de traslado y de preparación de las muestras (≈ 1 hr), para así encontrar las condiciones ideales para este fin, así como determinar el tiempo promedio con el que contamos una vez que las diatomeas han sido retiradas del frasco de cultivo.

Para este estudio se tomaron en cuenta 3 parámetros:

- Material del vial para el traslado (vidrio o plástico).
- Si se trasladaría cerrado o abierto.
- Si era necesario trasladarlo en un ambiente oscuro o no.

Los viales utilizados fueron viales para micro centrifuga de polipropileno con tapa de 1.5 ml y viales de vidrio claro con tapa de rosca marca KIMAX de 4 ml. Los viales de plástico tienen un fondo en forma cónica mientras los viales de vidrio presentan un fondo plano. En ambos casos se trasladaron muestras bajo las siguientes condiciones: vial de vidrio recubierto de aluminio tapado y destapado, vial de vidrio sin recubrir abierto y tapado, estas condiciones se repitieron para los viales de plástico. En general se colocaron 1 ml de muestra en los viales de plástico, mientras en los viales de vidrio se colocó \approx 2 ml.



Figura 4.3: Viales. Viales utilizados para el traslado de las diatomeas. Del lado izquierdo se muestra un vial eppendorf de 1.5 ml y del lado derecho un vial de vidrio de 4 ml.

Después de ser trasladados bajo las condiciones mencionadas se procedió a hacer preparaciones tal como son necesarias para el montaje experimental; es decir colocar muestra en un canal elaborado con cinta doble cara, que es adherida a un portaobjetos y después tapada con el cubreobjetos (Figura 4.4). Una vez colocada la muestra en el canal es necesario sellarlo para evitar la pérdida de muestra, esto se realiza normalmente con esmalte de uñas, sin embargo se descubrió que las diatomeas se degrada rápidamente, por lo que se optó por sellar los canales con parafina; en algunos casos se colocó esmalte sobre la parafina con el objetivo de asegurar que los canales se encontraban perfectamente sellados.

Después de realizar este ejercicio por aproximadamente 6 ocasiones, se llegó a la conclusión de que las diatomeas presentan un comportamiento similar con ambos materiales. Sin embargo, debido a la forma cónica del vial de plástico, las diatomeas tienden a agruparse con mayor facilidad en estos, lo cual repercute al momento de montar la muestra en el canal, pues dificulta la motilidad sobre el cubre objetos, probablemente debido a la secreción de mucílago que se genera al estar aglutinadas.

Por otro lado pareciera (no resultó del todo claro) que el hecho de tenerlos cerrados disminuye el tiempo de vida de las diatomeas o al menos la viabilidad para los estudios, ya que decae notablemente el porcentaje de diatomeas que se deslizan transcurrido un cierto tiempo.

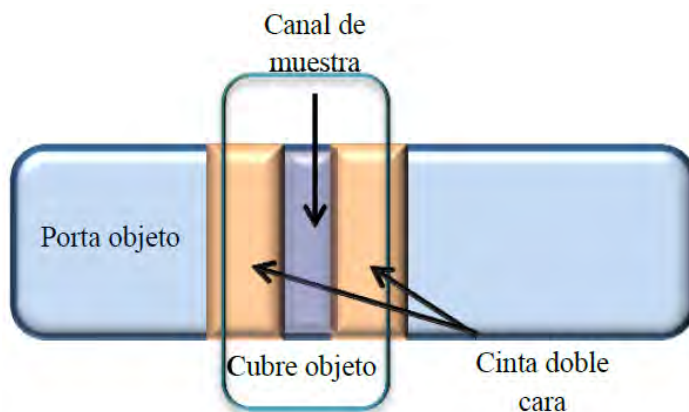


Figura 4.4: Canal. En esta imagen se puede observar el arreglo del canal donde es colocada la muestra. Donde la adherencia de la cinta doble cara resulta un factor de suma importancia, tanto para que los vidrios no se despeguen, como por el grosor que presenta.

Supongo que esto se debe a la cantidad limitada de oxígeno en la muestra, por lo cual resultan más factibles los viales de vidrio debido a su mayor capacidad volumétrica. Por último se observó que es completamente indiferente si el traslado se realiza en un ambiente oscuro o no. Dadas estas observaciones se decidió trasladar las muestras en viales de vidrio abiertos.

Otra observación que se realizó fue una estadística de las diatomeas que presentan motilidad dentro de los canales, esto por medio de conteos de el total de las diatomeas vs. las diatomeas deslizándose; con lo que se puede saber que aproximadamente el 25 % de las diatomeas exhiben una buena motilidad.

4.2. Análisis de la interacción rafe-esfera, mucílago-esfera

Como ya lo he comentado en el Capítulo 3, las *Pinzas Ópticas* es una técnica de micromanipulación que se ayuda de esferas que son atadas a la molécula de interés, es decir, las esferas cumplen la función de “anclaje de manipulación” debido a que por lo general la molécula de interés es de un tamaño menor al que es posible manipular. En nuestro caso, estas esferas deberían anclarse a las nanofibras adhesivas que exudan las diatomeas, para ello es necesario conocer si se genera esta interacción y, en su caso, en qué grado y bajo qué condiciones.

Una vez obtenido un cultivo funcional (lo que lleva en promedio 5 semanas a partir de pozos y 3 a partir de resiembra directa), es decir, un cultivo cuyas diatomeas presentan motilidad y una alta densidad celular, se comenzó con una serie de pruebas por medio de microscopía óptica, videomicroscopía y microscopía electrónica de barrido (SEM), cuyos objetivos son:

- Conocer la morfología⁴ de las diatomeas, específicamente la ubicación del rafe.

⁴Disciplina encargada del estudio de la estructura de un organismo o sistema.

- Conocer la interacción esfera-rafe.
- Conocer la interacción esfera-mucílago.

4.2.1. Materiales y equipo

Para poder llevar a cabo las mediciones fue necesario elaborar una serie de experimentos preliminares, los cuales consistieron en incubar diluciones de esferas-diatomeas, cuyo objetivo era verificar que las esferas se adhieran de manera específica al rafe de las diatomeas y al mucílago. Estos se llevaron a cabo con varios tipos de esferas de poliestireno:

- 0.53 μm de diámetro, recubiertas de grupos carboxilos.
- 1.26 μm de diámetro, recubiertas de estreptavidina⁵.
- 1.87 μm de diámetro, recubiertas de estreptavidina.

Es necesario mencionar que este tipo de esferas de poliestireno se encuentran a la venta, tanto recubiertas con grupos o marcadores específicos como sin recubrir. En el laboratorio de pinzas ópticas del IPICYT contamos con una amplia variedad de stocks, los cuales varían tanto en el diámetro de la esfera como en los recubrimientos que presentan, esto debido a la naturaleza de los estudios que se llevan a cabo en el laboratorio.

A partir de observaciones realizadas en los primeros experimentos, se decidió que las esferas con las que se realizaran los experimentos serían las esferas de 1.26 μm , esto debido a que el tamaño que presentan son ideales para las características técnicas propias de las pinzas y el montaje experimental.

Se realizaron observaciones de las muestras en los SEM:

- UHRSEM FEI Philips XL30 SFEG
- ESEM FEI QUANTA 200

ambos pertenecientes al LINAN (Laboratorio Nacional de Investigación en Nanociencias y Nanotecnología), laboratorio dependiente del IPICYT. Se utilizaron pines estándar para SEM, con un diámetro de 12.7 mm, de aluminio, con el borde acanalado.

El microscopio XL30 cuenta con el modo de alta resolución mientras el microscopio QUANTA 200 es un equipo que permite 3 modos de trabajo, a alto vacío, bajo vacío y modo ambiental, lo que lo hace una estación de trabajo muy versátil; a esto debemos sumarle que se cuenta con aditamentos especializados, como lo son la platina de enfriamiento de las muestras (-5° C a 60° C, rangos de precisión de lectura de 0,1 °C), que permite disminuir la temperatura de la muestra ajustando parámetros como la presión y la humedad, lo que permite trabajar con muestras vivas, teniendo un mayor margen de tiempo para su manipulación.

⁵Proteína tetramérica, se caracteriza por su elevada afinidad a la biotina.

La videomicroscopía se llevó a cabo con una cámara SONY HANDYCAM HDD modelo DCR-SR200 NTSC, la cual es montada sobre el microscopio óptico LEICA DME del laboratorio de Geomicrobiología (IM-UASLP).

Por otro lado se utilizó un baño ultrasónico Branson BRANSONIC 2510 MT (BR2510MT) con temporizador mecánico (Frecuencia: 47 kHz, Capacidad: 2.8 l), para la separación de las esferas, ya que estas se encuentran en altas concentraciones y aglutinadas.

Los portaobjetos utilizados para las muestras son prelavados de la marca VWR de 3x1 in, con un grosor aproximado de 1.2 mm. Los cubreobjetos son de la marca Corning de 22x40 mm. La cinta de doble cara es marca Scotch[®] (Transparente, sin recubrimiento.)

4.2.2. Microscopía y videomicroscopía

En la primera parte de este estudio se intentó realizar por medio de SEM (Quanta) una serie de micrografías (Figura 4.5,4.6) con diatomeas vivas, esto gracias al modo ambiental en el que puede trabajar el equipo; sin embargo la resolución resultó ser pobre, ya que bajo este tipo de condiciones (es decir una muestra no metálica, sin recubrimiento, con materia orgánica y en modo ambiental) la muestra se carga eléctricamente de forma muy rápida.

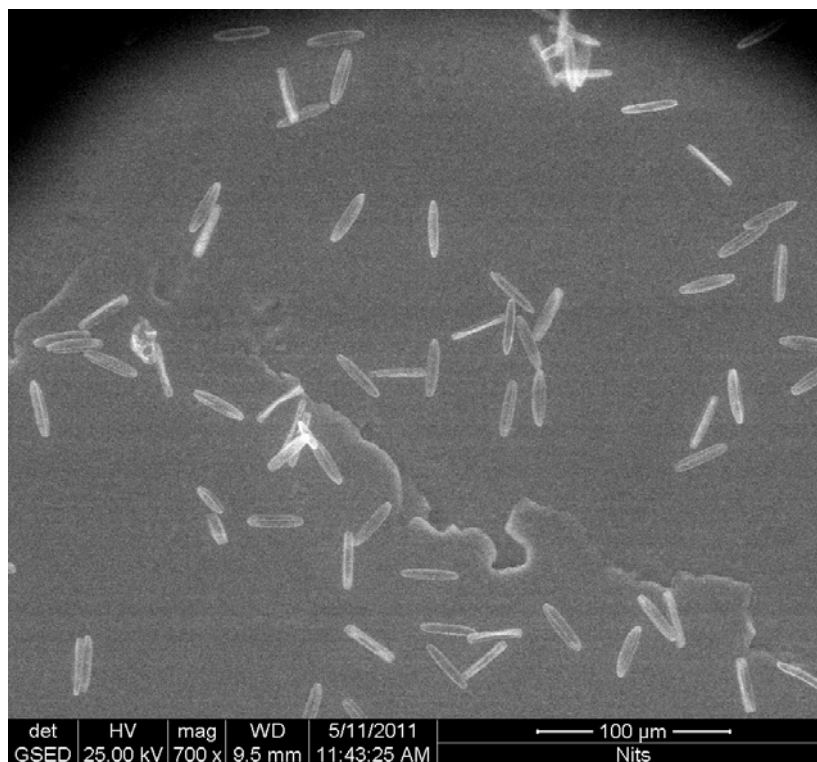


Figura 4.5: Vista general. En esta imagen se puede observar la homogeneidad del cultivo, así como la densidad de éste. Observadas en SEM (QUANTA) modo ambiental.

Se puede observar una vista general del cultivo en la Figura 4.5 y en la Figura 4.6 un acercamiento a una diatomea. Estas imágenes nos proporcionan los tamaños aproximados que presentan nuestras diatomeas.

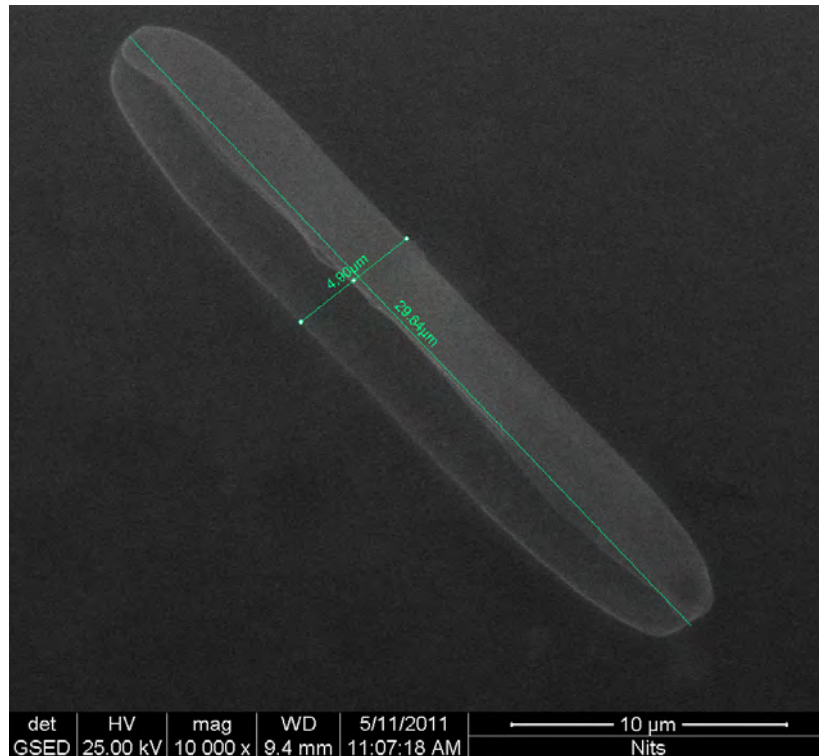


Figura 4.6: Acercamiento. Micrografía que muestra las dimensiones promedio de las diatomeas de nuestro interés; $\approx 30 \mu\text{m}$, las mas grandes. Observadas en SEM (QUANTA) modo ambiental.

Dadas las dificultades técnicas anteriores, se optó por trabajar con diatomeas lavadas, es decir diatomeas a las que se les ha quitado todo el material orgánico. Esto con la finalidad de conocer la morfología con mayor detalle. Las muestras fueron montadas sobre un pin de microscopía electrónica y recubiertas por hilo de carbono. Esto nos dio un panorama general de la conformación de la frústula, los patrones ornamentales, ubicación del rafe y tamaño de las diatomeas (Figura 5.1, así como la Figura 2.7).

La segunda parte de este estudio se llevó a cabo por medio de videomicroscopía. Esto se realizó con diatomeas que se encontraban en condiciones óptimas de cultivo y a las cuales se les agregaron esferas (recubiertas de estreptavidina y de $1.26 \mu\text{m}$ de diametro); por medio de estas observaciones se pudo conocer la interacción de las esferas con el rafe y el mucílago.

El protocolo utilizado para las muestras de videomicroscopía fue:

1. Se toman $50 \mu\text{l}$ de medio y se le agregan $0.5 \mu\text{l}$ de esferas.
2. Se sonica por 20 minutos. Esto con la finalidad de evitar aglomeraciones de esferas.

3. Transcurrido este tiempo se agregan 200 μl de cultivo con diatomeas, se deja en reposo 10 min.
4. Se coloca la muestra en el canal (Figura 4.4) y se sella con parafina y/o esmalte.

Tras haber realizado el protocolo, la muestra es colocada en el microscopio ya con la Handycam adaptada, lo que nos permitió obtener un gran número de videos y de esta manera corroborar las interacciones de la esfera (Resultados descritos en el capítulo 5).

Una vez que se llevó acabo la videomicroscopía se procedió a tomar imágenes de microscopía electrónica de barrido, por medio de los equipos QUANTA y XL30 del LINAN. Lo primero que se realizó fue colocar muestra fresca en el equipo QUANTA, trabajando con el modo de operación ambiental.

Una vez terminadas las observaciones de las diatomeas en el microscopio QUANTA, éstas mismas muestras fueron observadas en el microscopio de alta resolución XL30, para lo cual fue necesario recubrirlas con oro. Las imágenes adquiridas con este equipo resultan ser de mejor calidad, aunque nuestras muestras en particular se observan un poco sucias debido a la materia orgánica presente.

El último estudio de microscopía que se realizó fue por medio de la platina Peltier para enfriamiento, aditamento de el microscopio de barrido QUANTA. En este caso solo es necesario agregar una gota del medio de cultivo con las diatomeas y las esferas, sobre el pin de la platina Peltier.

4.3. Sistema de pinzas ópticas: Preparando el ensayo

Una vez concluidos los ensayos anteriores, sera necesario montar el ensayo en nuestro sistema de pinzas ópticas. Aquí es importante recordar que el sistema cuenta con una serie de características relevantes al momento de montar la muestra. Entre estas destaca el hecho de que el equipo consta de un microscopio invertido, por lo que la muestra debe ser montada con el cubreobjeto hacia abajo. Una platina piezoeléctrica que nos proporciona un rango limitado de movilidad y un objetivo de inmersión en aceite, por lo que es necesario colocarle una cantidad suficiente de aceite de inmersión¹, tanto a el objetivo como al plano de la muestra donde hará contacto con el condensador.

Lo primero que se debe llevar a cabo al montar la muestra es: Realizar la calibración correspondiente tal como se ha descrito en la sección 3.7.1, es decir conocer el factor de conversión entre el voltaje que detecta el fotodetector y el desplazamiento de la esfera, esto se llevó a cabo para 14 esferas, ubicadas en diferentes áreas de la muestra.

¹Tiene aproximadamente el mismo índice de refracción que el vidrio, lo que elimina casi por completo la desviación de los rayos de luz, aumentando considerablemente la eficacia de los objetivos de los microscopios.

Lo segundo que se debe llevar a cabo es la calibración de la rigidez de la trampa, como se plantea en la sección 3.7.2. En nuestro caso se tomaron en cuenta 8 mediciones por medio de los métodos de varianza y espectro de potencias para “x”, “y”, y “z”; 5 de estas mediciones fueron complementadas por mediciones a través del métodos de Stokes para “x” y “y”.

Para estas calibraciones se colocó una muestra que contenía: **i.-** 2 μl de esferas; **ii.-** 100 μl de medio. Esta dilución fue sonicada por 20 minutos y luego fluida a través del canal.

Una vez realizadas las calibraciones podemos proceder a hacer las mediciones de nuestro sistema, para ello se implementaron varios protocolos, entre ellos:

- Se colocaban las diatomeas en el canal, se dejaban reposar por 5 min y se fluían las esferas previa sonicación, para finalizar con el sellado del canal.
- Se colocaron las esferas (previamente sonicadas) con las diatomeas en el vial. Se dejan reposar un par de minutos (entre 5 y 10 minutos), se fluyen por el canal; se dejan reposar por otros 5 minutos y se sella el canal.
- Se colocan las esferas en el canal (previa sonicación), se fluyen las diatomeas dejando reposar la muestra por 5 minutos para proseguir con el sellado del canal.
- Se mezclan las esferas sonicadas con las diatomeas, se les da un tiempo de reposo en el vial y tras este son fluidas a través del canal, luego el canal es lavado y sellado.

Finalmente el protocolo de preparación de la muestra para el montaje en el sistema de pinzas ópticas que se siguió, previa observación de los protocolos propuestos fue:

1. Se diluye 5 μl de esferas en 5 μl de medio, por cada muestra. Normalmente se sonica el doble del volumen necesario como mínimo, con el fin de garantizar una buena sonicación.
2. Se sonica esta dilución por ≈ 20 min, con el objetivo de evitar aglomeraciones de las esferas.
3. Las diatomeas son agitadas a través de un vórtex mecánico por 5 minutos.
4. Se toman 10 μl de la solución de esferas y se agregan 90 μl de diatomeas.
5. Se mezclan a través de el vórtex mecánico por 2 minutos.
6. Se fluye un primer volumen de muestra ($\approx 20 \mu\text{l}$) a través del canal.
7. Se deja incubar la muestra entre 4 y 5 minutos.
8. Se vuelve a fluir muestra por el canal, $\approx 30 \mu\text{l}$.
9. Se deja incubar la muestra entre 4 y 5 minutos.

El paso 8 y 9 se realiza en 3 ocasiones esto con la finalidad de acabarnos el volumen total de la muestra ($\approx 100 \mu\text{l}$), propiciando una mayor población de diatomeas en el canal.

10. Se lava el canal con $40 \mu\text{l}$ de medio, con el objetivo de remover aquellas esferas y diatomeas que no se hayan adherido a la superficie del cubreobjetos.
11. Se sella con parafina el canal de la muestra, esto con el objetivo de que no se evapore la muestra. En algunas ocasiones se le colocaba una capa de barniz sobre la parafina con el fin de asegurar su correcto sellado.

Es necesario agregar que cada vez que se fluía la muestra por el canal, se colocaba un papel filtro por el lado contrario al que se introducía la muestra, esto con el objetivo de facilitar la introducción de la muestra al canal. Otro detalle importante es que se procuró que las muestras nunca se secaran en el tiempo de reposo, por lo que continuamente era necesario agregarle un poco de muestra al canal durante este reposo.

4.3.1. Medición del ensayo

Una vez que se tiene una muestra funcional en el sistema de pinzas ópticas y que ya se han llevado a cabo las calibraciones necesarias, se puede comenzar con las mediciones del ensayo. Para esto es necesario hacer una serie de observaciones acerca del comportamiento de la muestra.

Primero es necesario ubicar una diatomea que se encuentre deslizándose sobre el cubreobjetos, esto con la finalidad de garantizar la presencia de mucílago.

Lo segundo que se debe observar es, el comportamiento de las esferas, ya que en este tipo de muestras se encuentran 3 posibles comportamientos de las esferas:

- i.- Las esferas que se encuentran libres en solución, es decir presentan un movimiento Browniano, por lo que se difunden rápidamente a través del medio. Estas esferas se pueden manipular muy fácilmente por la pinza, trasladándolas a prácticamente cualquier lugar de la muestra.
- ii.- Las esferas que se encuentran adheridas al vidrio, por lo tanto no presentan movimiento alguno. Para nuestro caso la interacción que se da entre la esfera y el cubreobjetos es una interacción inespecífica. Normalmente no se pueden manipular con el sistema de pinzas ópticas.

- iii.- Las esferas que en apariencia se encuentran en solución, pero que no son capaces de desplazarse más allá de cierta distancia entorno a un punto. Estas esferas son las esferas con las que nos interesa trabajar, ya que estas se encuentran atadas por una o varias fibras de mucílago. (Este tipo de comportamiento se asemeja al comportamiento de las esferas que se encuentran atadas por medios específicos a una o varias moléculas de ADN [49, 48].)

Una vez que se ha podido localizar una diatomea con desplazamiento y ubicar una esfera que se encuentra anclada al rastro mucilaginoso, se procede a comprobar que tan fuerte es la adhesión, esto por medio de manipulación de la esfera a través del joystick, a la vez que la esfera es centrada en el haz de la pinza óptica.

Comprobado esto y habiendo asegurado que la adhesión de la esfera al rastro es confiable, se procede por medio de una rutina de labview (*FindSurfaceHeight_modificado.vi*) encontrar la superficie del cubreobjetos, para a partir de esto poder posicionar a la esfera a cierta altura, con respecto a la superficie del vidrio.

Por medio de esta rutina, se puede observar el punto de transición entre una esfera atada a una superficie, y una esfera que es empujada por el cubreobjetos conforme la platina se desliza. Se puede colocar a la esfera a una altura determinada (esto con respecto al vidrio). Para nuestras mediciones, la altura fue regularmente de 50 nm. En este punto es necesario tener cuidado ya que las esferas se pueden pegar de manera permanente al cubreobjetos.

Nuevamente se procede a centrar la esfera en el haz del láser, generando por medio de la rutina de labview *CenterStuckBead2DMXpoly7.vi* un barrido tanto en “x”, como en “y” que nos permita cubrir la longitud total o longitud de contorno (L_c) de la o las fibras al momento de estirla. En este punto es necesario ir estimando poco a poco la longitud total de las fibras ya que si jalamos una distancia mucho mayor, es probable que las perdamos, debido a que sacamos a la esfera atrapada de la posición de equilibrio. Esta misma rutina nos permite hacer un ajuste a un polinomio de séptimo orden (en el capítulo siguiente se detallará.). Este procedimiento se lleva a cabo un par de veces, asegurarnos de cubrir la longitud total de la fibra. Aquí cabe recalcar que en el caso de nuestras fibras nosotros desconocemos previamente su longitud, lo que nos lleva a tener mediciones de fibras entre 300 nm y 4000 nm de largo.

Una vez que se se llevaron a cabo todos los pasos anteriores, entonces se procede a guardar los datos generados. Este archivo tiene los datos de la posición de la platina, así como los datos del fotodetector. Estos generan una señal como la observada en la Figura 4.7 los cuales son analizados en el Capítulo siguiente.

En esta gráfica se pueden observar los datos característicos de las lecturas en “x” de una sola esfera.

Para un mayor detalle de las rutinas de labview se puede ir a las referencias [49, 48].

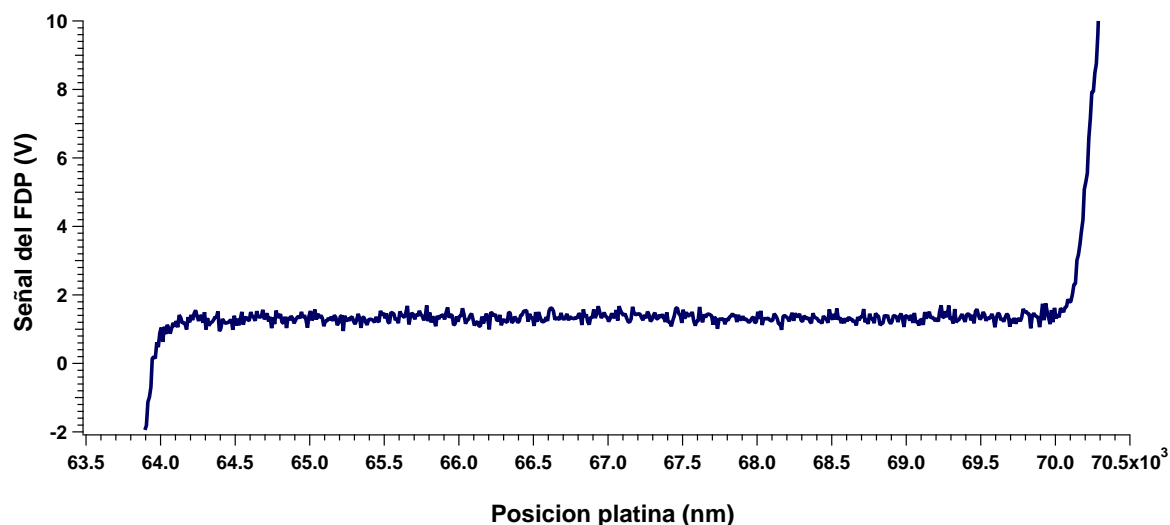


Figura 4.7: Señal del FDP vs posición de la platina. Traza característica de la medición de una esfera.

4.3.2. Extras

Antes de terminar el presente capítulo, agregaré que uno de los intentos para hacer las mediciones se llevó a cabo por medio de esferas sueltas que fueron atrapadas y llevadas a un rastro mucilaginoso. Mediante una serie de rutinas de la platina se hacen barridos en formas triangulares a la vez que se acerca a la esfera a la superficie del vidrio (recuadro superior izquierda de la Figura 4.8). En cuanto la altura de separación disminuye, se comienzan a observar picos, los cuales muestran las uniones de una o varias fibras a la esfera, tal como se puede observar en la Figura 4.8.

Para poder llevar a cabo este tipo de barrido se realiza el siguiente procedimiento:

1. Es atrapada una esfera que previamente se encontraba libre en solución y colocada justo por encima del camino que deja la diatomea al desplazarse.
2. Por medio de la computadora se le ordena a la platina piezoeléctrica realiza un barrido triangular sobre algún punto del camino mucilaginoso (puede llevarse a cabo en la dirección X y la dirección Y).
3. Se procede a modificar poco a poco la altura de la esfera con respecto a la superficie del vidrio. Este procedimiento tiene la finalidad de acercar muy suavemente la esfera a la traza mucilaginosa que deja la diatomea, permitiendo así obtener una señal que variará al presentarse algún evento de adhesión entre las nanofibras y la esfera. Estos datos son analizados posteriormente con el objetivo de discernir entre eventos reales y los que no nos son útiles.

Aquí es importante señalar que este método de adquisición de datos no fue del todo eficiente, motivo por el cual no se procedió a llevar a cabo las mediciones de esta manera.

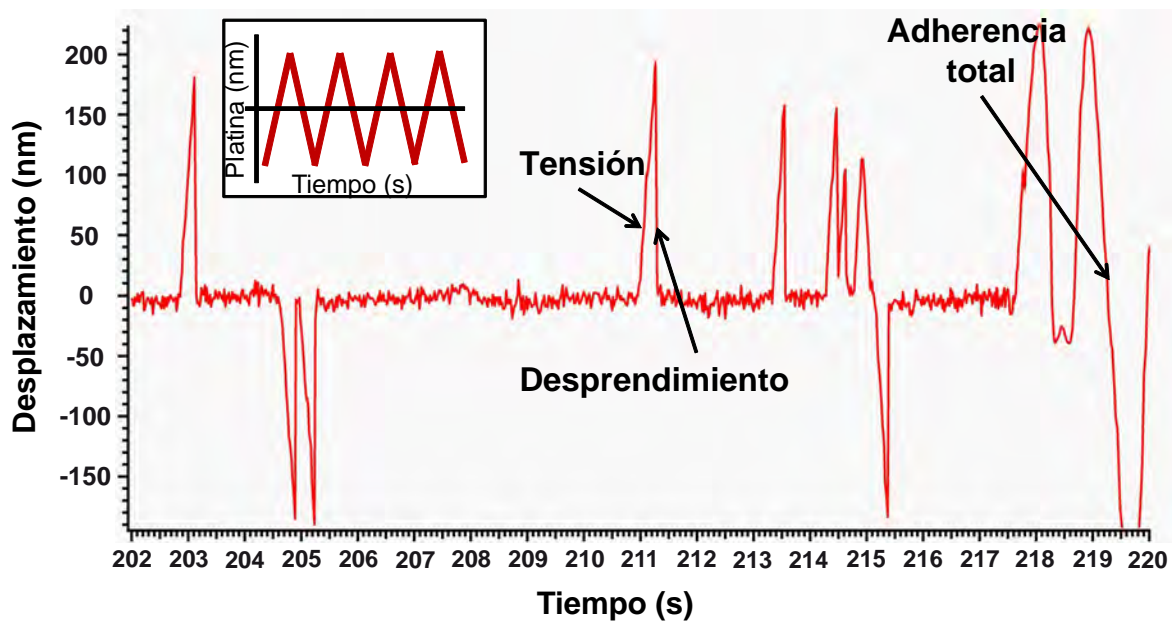


Figura 4.8: En busca del mucílago. En el recuadro de arriba se puede apreciar el barrido que se lleva a cabo por la platina a través de la computadora. La gráfica representa el desplazamiento de la platina a través de un cierto tiempo. Los picos en ambas direcciones se deben a que el deslizamiento de la platina es a ambas direcciones con respecto al rastro mucilaginoso. Cada pico es la adhesión de una o varias fibras a la esfera, con un periodo de estiramiento o tensión y otro de desprendimiento. Al final de la gráfica se puede observar la adherencia total de la esfera al cubreobjetos.

Capítulo 5

Resultados, análisis y conclusiones

5.1. Microscopía y videomicroscopía

Por medio de la microscopía SEM de alta resolución (XL30) se pudo observar la morfología de las diatomeas trabajadas. En la Figura 5.1 es posible apreciar tres tipos de diatomeas *Nitzschias*, las cuales se pueden diferenciar gracias a las terminaciones de las frústulas y al tamaño.

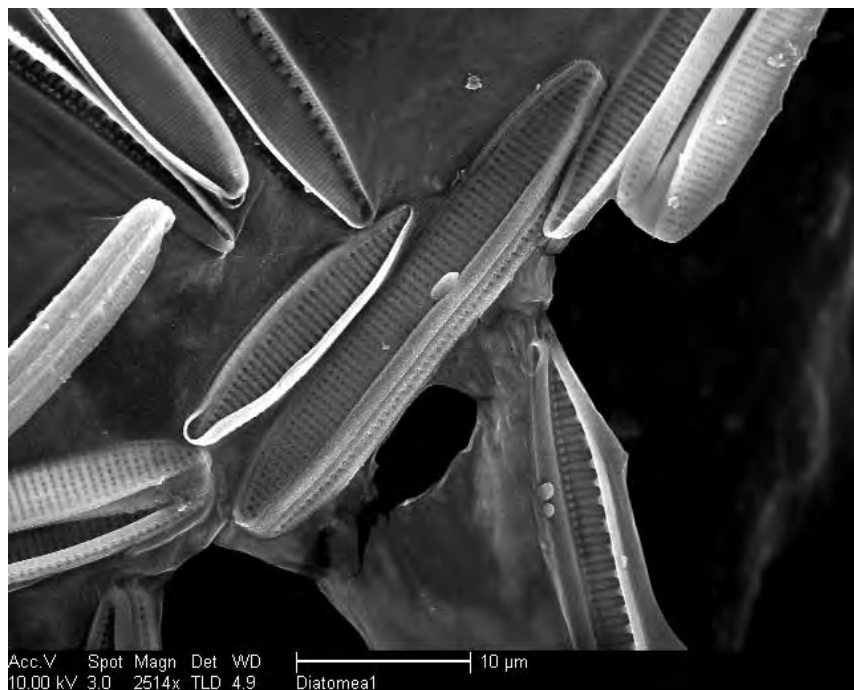


Figura 5.1: Morfología diatomea. Imagen tomada con el microscopio XL30 en alta resolución, se muestra la forma de las diatomeas así como el trazo de sus patrones ornamentales, el cual consiste en arreglos lineales de poros, en las diversas especies presentes. Los poros tienen un diámetro aproximado de 165 nm; el tamaño aproximado de estas diatomeas es de 30 μm (para la segunda especie de diatomea). Las diversas especies presentan dos rafes, ubicados por un costado de la frústula. Estos rafes no presentan nódulo central y se encuentran en ambos lados de las diatomeas.

La primera especie de diatomea es la más pequeña ubicada en el centro de la imagen, esta es de menor tamaño y los extremos de las frústulas presentan una especie de cintillo, terminando en una pequeña punta redonda. La segunda especie de diatomea es el que se encuentra exactamente a un costado de la diatomea pequeña, siendo el más abundante de los cultivos; estas presentan una terminación achatada y ancha en los extremos de la frústula. La última especie es la que se encuentra abajo a la derecha, la cual es una especie más estilizada con una terminación puntiaguda de la frústula y un patrón ornamental más abierto. Existe una cuarta especie de diatomea, la cual no se encuentra en la Figura 5.1. Esta se caracteriza por tener una longitud mucho mayor con respecto a las diatomeas anteriores y es la especie menos presente en el cultivo.

Videomicroscopía

La secuencia de imágenes que se muestra en la Figura 5.2 forman parte de un video con una duración de 10 minutos, éste se tomó en el laboratorio de Geomicrobiología. Las imágenes presentadas tienen una distancia temporal de 3 segundos.

Se puede observar cómo la esfera está completamente adherida al rafe de la diatomea, así como el deslizamiento que ésta presenta sobre el rafe. De manera poco evidente en las imágenes, pero muy evidente en el video, se pudieron observar pequeños brincos de la esfera, así como cambios bruscos de dirección tanto de la esfera como de la diatomea.

En la Figura 5.3 se muestra una secuencia de imágenes del comportamiento e interacción de 3 esferas que son adheridas al rafe en diferente momento. Lo que resulta interesante de este video es la capacidad del complejo de adhesión para adherir a una tercera esfera, que es deslizada de manera independiente a las otras 2 esferas (adheridas previamente) y en sentido contrario a éstas, hasta llegar el momento en el que chocan y se adhieren entre ellas. A partir de este momento se puede observar como las 3 esferas actúan juntas, teniendo la capacidad de deslizamiento sobre el rafe y evidenciando una capacidad de rotación y cambio de posición que no es evidente cuando sólo se observa una esfera.

Por medio de estos vídeos se pudieron hacer varias observaciones, entre las que destacan:

- Existe una adherencia y preferencia de las esferas con el rafe, así como desplazamiento de las esferas sobre el rafe.
- Tanto el deslizamiento de la diatomea como el deslizamiento de la esfera sobre el rafe, no es un movimiento regular; es decir varía la velocidad y la dirección aparentemente sin ningún patrón, así como que el deslizamiento entre la diatomea y la esfera no tienen patrón aparente entre ellos.
- La adhesión al rafe no es selectiva, es decir la capacidad de adhesión de las nanofibras es muy amplia.



Figura 5.2: Interacción rafe-esfera. Secuencia de imágenes de un vídeo tomadas cada 3 segundos. Se puede observar el deslizamiento de la diatomea así como el deslizamiento de la esfera sobre el rafe. En la imagen 19 se puede observar como la diatomea pasa al costado de una basura presente en el medio y a partir de ese cuadro esta basura se encuentra anclada a la diatomea, sin embargo esta no se desliza, lo que nos habla de la poca selectividad de adherencia. El deslizamiento solo se presenta en el rafe y la presencia de mucílago permite este tipo de adherencia; la basura se pierde un par de minutos después. En los cuadros 18-20 se puede observar el bamboleo de la diatomea, lo que provoca que visualmente la esfera se haya movido de la parte de abajo hacia arriba de la diatomea.

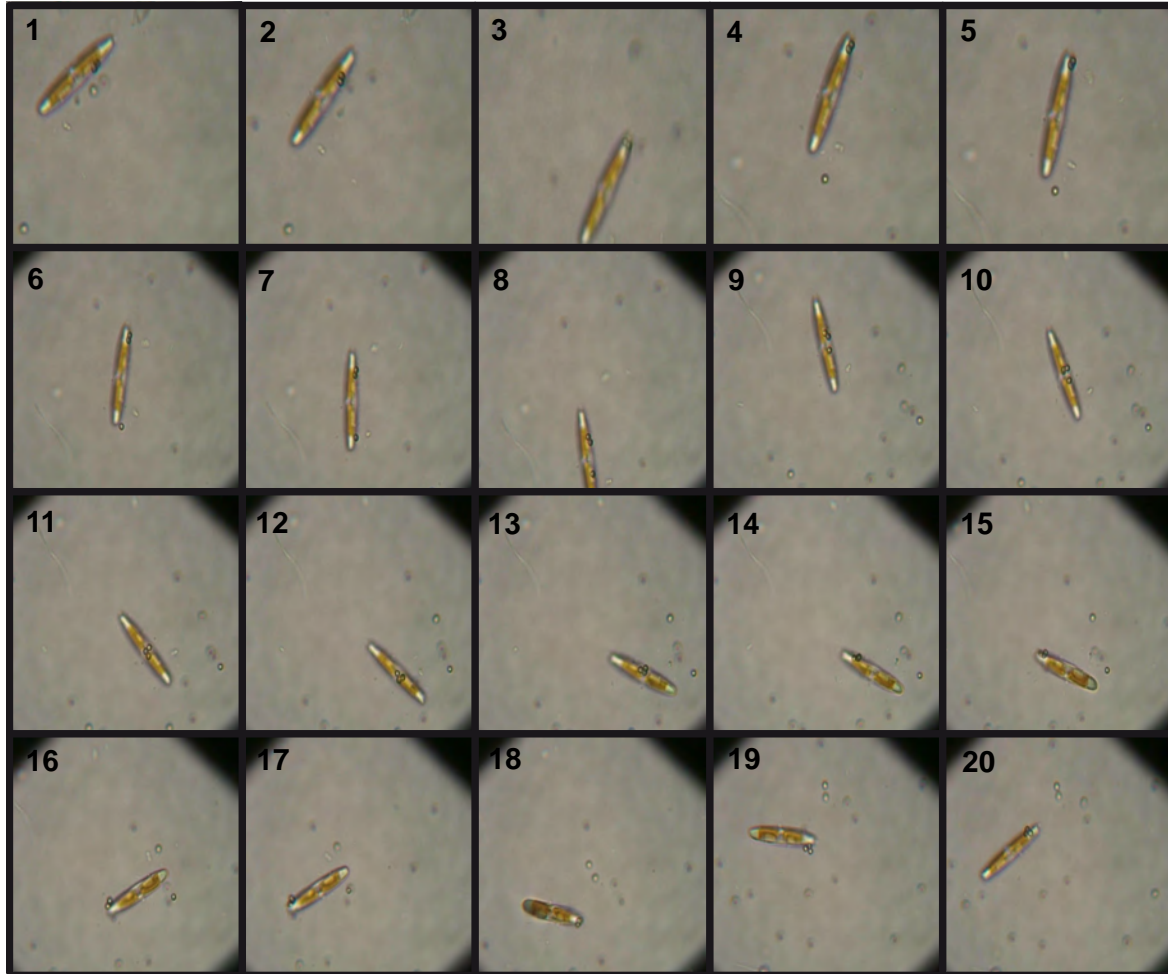
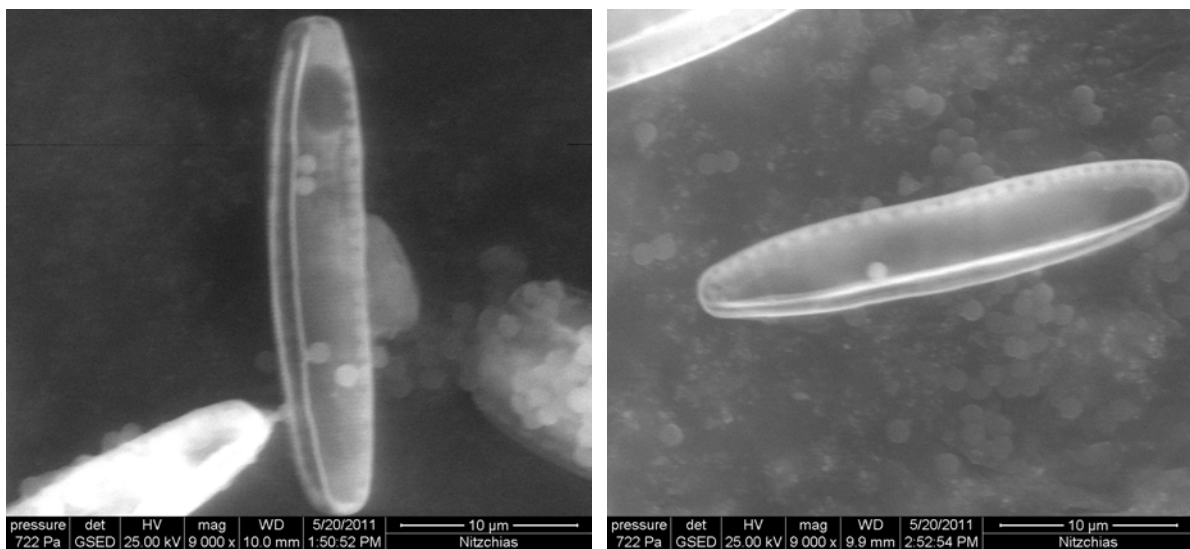


Figura 5.3: Interacción de 3 esferas. Secuencia de imágenes de un vídeo tomadas cada 2 segundos. Imágenes 1-5: se puede observar 2 esferas adheridas al rafe. Imagen 6: se adhiere una nueva esfera al rafe. Imágenes 7-10: se observa el deslizamiento de la esfera nueva de manera independiente y contraria al deslizamiento de las 2 esferas que ya se encontraban adheridas previamente. Imágenes 11-20: se observa el comportamiento de las 3 esferas como un conjunto. Aunque poco evidente en la secuencia, se puede observar la rotación de las esferas sobre el rafe, así como un giro completo y brusco de la diatomea de la imagen 17 a la 18.

- No es necesario que la diatomea se encuentre deslizando para que la esfera se deslice sobre el rafe, esto podría sugerir complejos de motilidad completamente independientes, al menos para las diatomeas que presentan doble rafe.
- Existen largos periodos de tiempo en los que las esferas no se deslizan sobre el rafe, aún cuando las diatomeas se encuentren deslizando sobre la superficie.
- Se pudo observar el movimiento independiente de esferas que se encuentran adheridas en diferente zona del rafe de la diatomea, así como rotación de las esferas.

SEM

Por medio de esta técnica de microscopía y el modo ambiental que presenta el QUANTA se pudieron obtener imágenes como la mostrada en la Figura 5.4, donde es posible observar dos diatomeas con esferas adheridas al rafe, así como unas sombras oscuras, circulares dentro de la diatomea que probablemente pudieran ser gotas de aceites (les sirven para flotar).



(a) Micrografía rafe-esfera

(b) Micrografía rafe-esfera 2

Figura 5.4: Esferas sobre el rafe. Micrografías que muestran la adherencia preferencial de las esferas por el rafe; a) Esta imagen muestra 3 esferas adheridas al rafe y otra asentada sobre la frústula; en esta imagen es completamente claro que el rafe de este tipo de diatomeas no se encuentra centrado. b) Esta imagen muestra una esfera adherida al rafe de la diatomea. En ambas imágenes se observa un asombro circular oscuro dentro la diatomea lo que probablemente pudieran ser gotas de aceites. Este tipo de imágenes es posible gracias al modo ambiental del microscopio.

Por otro lado, gracias a la alta resolución del XL30 hemos podido hacer observaciones que con el otro equipo no fue posible realizar, obteniendo micrografías como las que se muestran en las Figuras 5.5, 5.6.

En la Figura 5.5 se puede observar una esfera completamente asentada en la frústula de una diatomea, aquí lo realmente relevante es que se alcanza a apreciar un par de “fibras” que se encuentran anclados desde la diatomea hasta la esfera, lo que suponemos son nanofibras. En base a la referencia propia de la imagen, calculamos que estos fibras son de $\approx 20\text{-}25$ nm de ancho.



Figura 5.5: Unión diatomea-esfera. Imagen tomada con el microscopio XL30, se puede observar, marcadas con flechas, la presencia de anclajes que van desde la frústula de la diatomea hasta la esfera, lo que presumiblemente son nanofibras. Tienen $\approx 20\text{-}25$ nm de ancho.

En la Figura 5.6 podemos apreciar 4 imágenes; las 2 del lado derecho (b,d) son ampliaciones de las respectivas imágenes de la izquierda. Con estas imágenes resulta clara la presencia de “fibras” ya sea que funcionen como puente de unión entre las diatomeas a), b) o de anclaje entre las esferas y la diatomea c), d). Probablemente estos anclajes sean aglomerados de nanofibras, ya que resultan entre 3 y 4 veces mas gruesas que las mostradas en la Figura 5.5. Con este tipo de imágenes nos resulta imposible afirmar si las fibras de la Figura anterior son individuales, aunque suponemos que no debido a que referencias como la ??.

El siguiente estudio se llevo a cabo en el QUANTA con la platina Peltier de enfriamiento, siendo un intento por mantener viva la muestra mientras se hacía microscopía de barrido, con la intención de observar las fibras presentes en el proceso de adhesión y la motilidad.

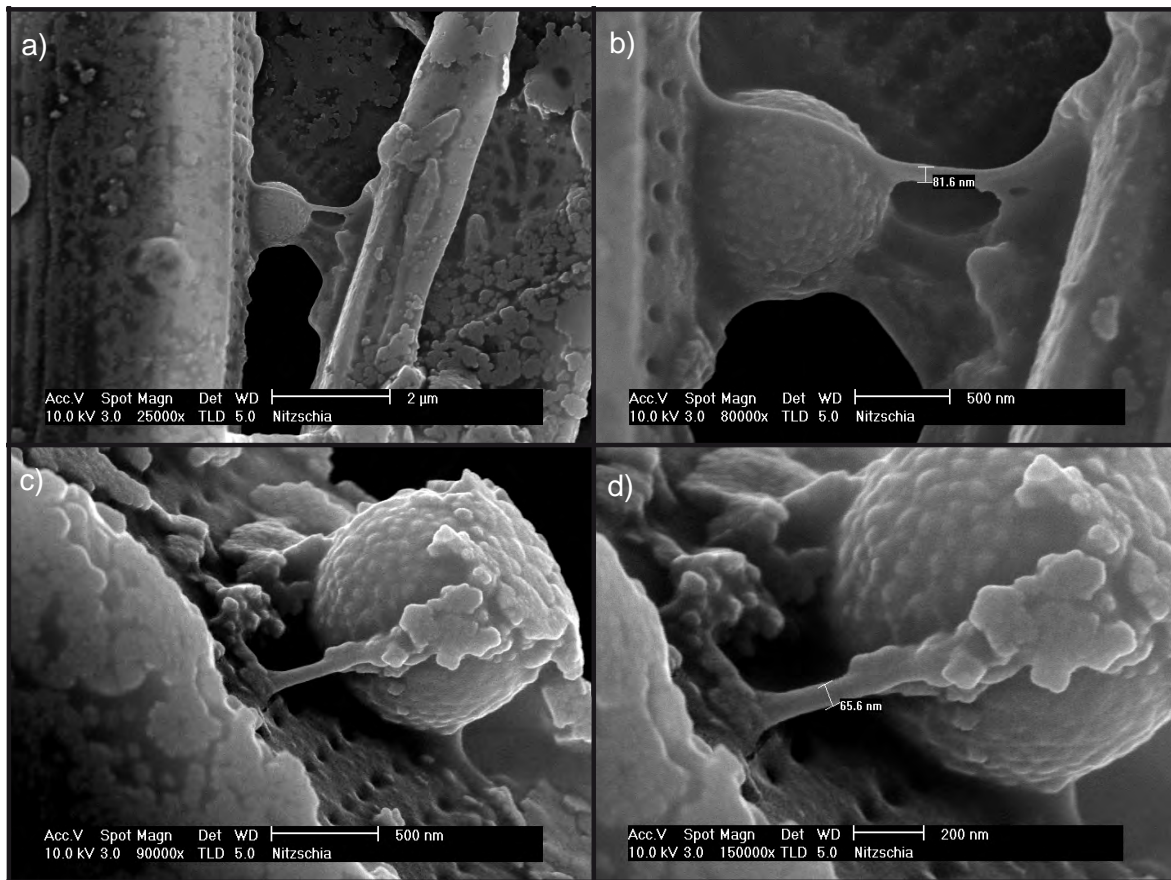


Figura 5.6: Aglomerados de nanofibras. Secuencia de micrográficas SEM. a) Imagen que muestra una esfera aparentemente adherida a la diatomea de la izquierda y unida mediante una serie de fibras a la diatomea de la derecha. b) Acercamiento de a) donde es posible observar la presencia de lo que probablemente sea un aglomerado de nanofibras que pasan por encima de la esfera hasta llegar a la diatomea de la derecha, con un grosor de ≈ 82 nm. Por la parte de abajo de la esfera se puede observar una especie de “manto” que une a la diatomea de la derecha con la esfera. c) Esfera adherida a la frústula de una diatomea. d) Acercamiento de c); se puede observar la presencia de lo que muy probablemente sea un aglomerado de fibras que unen la frústula de la diatomea con la esfera. Tiene un grosor de ≈ 65 nm.

Por este método se pudo observar nuevamente la preferencia de las esferas por adherirse al rafe, así como la presencia de lo que creemos es mucílago.

La Figura 5.7 nos muestra una diatomea a la cual se encuentran adheridas al menos 2 esferas, las cuales parecen recubiertas por una suave capa de lo que muy probablemente sea mucílago.

Cabe señalar que nuestra intención al utilizar la platina de enfriamiento era poder captar el desplazamiento de las esferas sobre el rafe con una mayor resolución y a un mayor acercamiento que lo obtenido por la videomicrocopia, sin embargo esto no pudo ser obtenido en su totalidad. A pesar de estas dificultades las imágenes obtenidas muestran con claridad la presencia de lo que presumiblemente es mucílago.

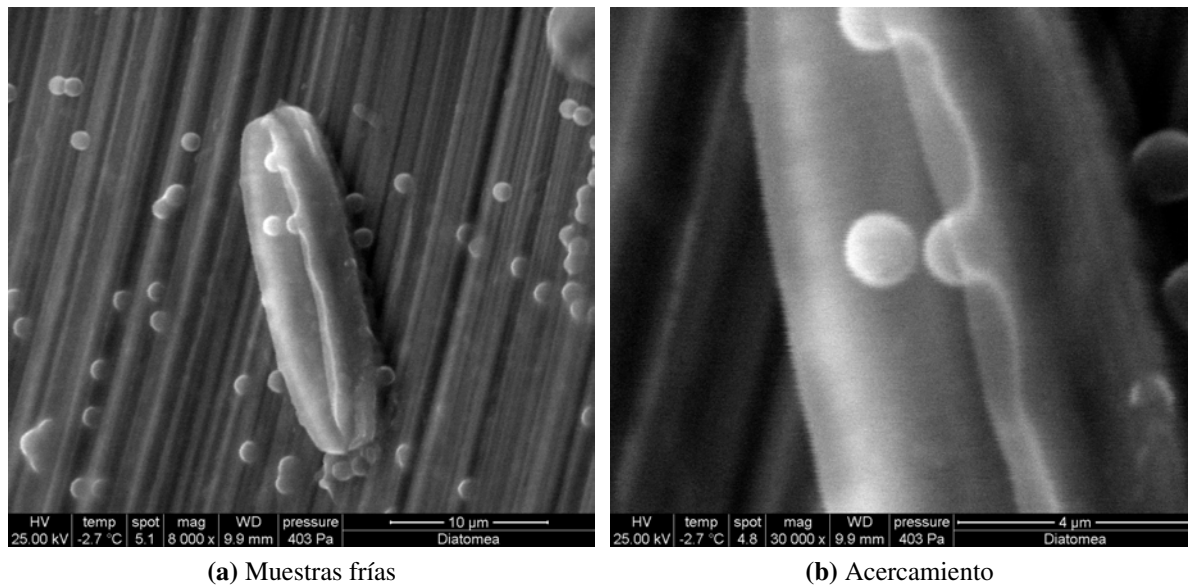


Figura 5.7: Mucílago de una diatomea fría. a) Diatomea que presenta la adhesión de 2 esferas, ambas se encuentran recubiertas por una delgada capa de lo que creemos es mucílago. b) Acercamiento a la zona de adhesión de las esferas. En esta imagen es más claro que existe una capa que cubre parte de las esferas y que se encuentra adherida a la diatomea. Ambas muestras se encuentran a -2.7°C .

En la Figura 5.8 se puede observar una esfera adherida al rafe, así como lo que presumiblemente es mucílago.

La Figura 5.9 muestra un aglomerado de 4 esferas y una esfera mas a un costado. Las esferas se encuentran aparentemente adheridas al rafe, aunque a diferencia de las figuras anteriores no es visible ninguna capa que pudiera ser mucílago o nanofibras.

Una vez elaboradas toda esta serie de observaciones, a través de diferentes técnicas, se ha podido observar que la interacción de las esferas con el rafe y mucílago era satisfactoria y

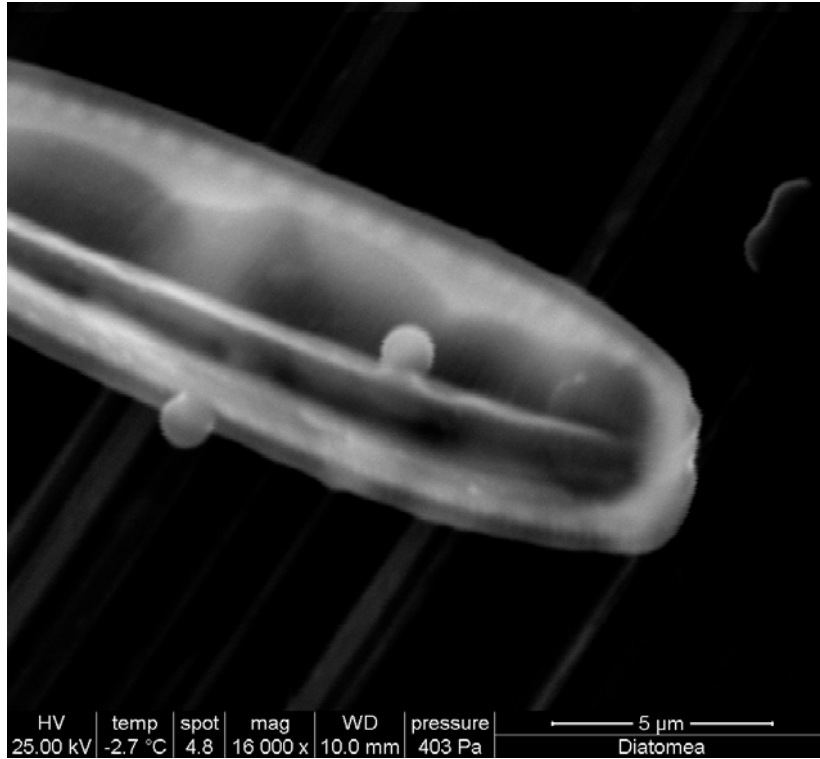


Figura 5.8: Muestras frías. Micrografía de la adhesión de una esfera a una diatomea; Se alcanza a observar la capa de adhesión que presumiblemente es mucílago.

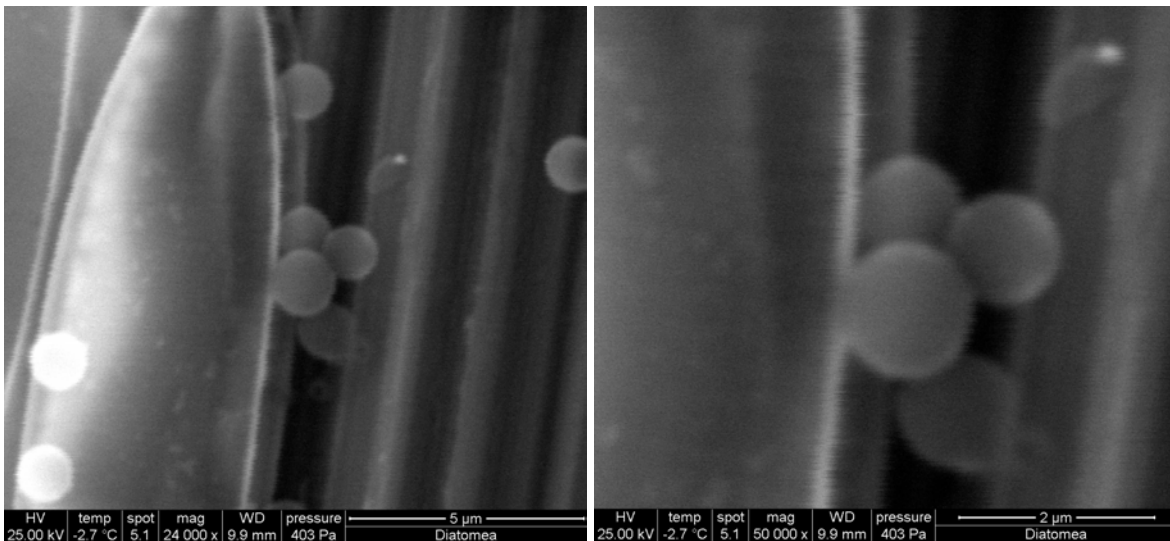


Figura 5.9: Muestras frías. Derecha: En esta micrografía se puede observar un agrupamiento de 4 esferas en el rafe, muy probablemente adheridas. Izquierda: Ampliación de la zona de las esferas.

que en los 3 casos, es decir microscopia óptica, videomicroscopía y SEM (Alta resolución y modo ambiental) el comportamiento era muy similar, lo que nos permite comenzar a trabajar con el sistema de pinzas ópticas.

5.2. Análisis del ensayo

5.2.1. Modelo de análisis

La elasticidad de un biopolímero puede ser caracterizado por longitud de contorno L_c y la longitud de persistencia L_p y el módulo de elasticidad, K_o .

Definiciones

Los **polímeros** son macromoléculas formadas por la unión repetida de moléculas más pequeñas llamadas monómeros. Generalmente están formados por una cantidad finita de moléculas que le confieren un alto peso molecular, característica representativa de estos compuestos. Un ejemplo común de un polímero natural es una molécula de ADN de doble cadena. Existen varias formas de caracterizar las propiedades de un polímero, entre ellas se encuentra el medir las deformaciones y cambios en la extensión en función a una fuerza externa.

La **longitud de contorno** (L_c), (*Contour length*), se ha definido como la suma de las longitudes de todos los enlaces que constituyen una cadena polimérica, es decir es la máxima longitud del polímero sin deformación. Para cadenas sencillas corresponde, usualmente, a su distancia extremo a extremo.

La **longitud de persistencia** (L_p), (*Persistence length*), es un valor que se le asigna al grado de flexibilidad de un polímero. Este se encuentra gracias a la correlación que existe entre dos elementos diferenciables de la cadena. Está relacionado con la deformación que este sufre debido a las fuerzas térmicas y es proporcional a la rigidez de flexión que presenta el polímero [53]. Para un biopolímero en una solución acuosa, a temperatura T , L_p está dado por la ecuación 5.1:

$$L_p = \frac{EI}{K_B T} \quad (5.1)$$

Donde E es el módulo de Young I , es el momento de inercia y K_B la constante de Boltzmann.

Modelos

Existe una variedad de modelos que se han propuesto para explicar las propiedades elásticas de los polímeros, en particular enfocados a las cadenas de ADN, por lo que uno debe probar si el modelo seleccionado se ajusta a los datos experimentales. En nuestro caso aplicaremos estos modelos al biopolímero exudado por las diatomeas.

En el modelo más simple, conocido como *Modelo de cadena libre* se considera que el polímero está formado por n segmentos de longitud b , donde los segmentos no interaccionan entre ellos y no presentan deformación. La longitud total o de contorno esta dada por:

$$L_c = nb \quad (5.2)$$

El modelo de la *Cadena Vermiforme* o *Worm Like chain* es un modelo de cadena adecuado para describir cadenas rígidas o semi-rígidas. En una cadena vermiforme la conformación global responde a formas ligeramente curvadas (como un gusano). Este modelo probablemente sea el más adecuado para las moléculas de ADN [43]. La fuerza (F) ejercida sobre el polímero está relacionada con la extensión (x) por la ecuación:

$$F = \left(\frac{K_B T}{L_p} \right) \left[\frac{1}{4(1-x/L_c)^2} - \frac{1}{4} + \frac{x}{L_c} \right] \quad (5.3)$$

Otro de los modelos propuestos para determinar la flexibilidad de un polímero es el modelo de la *Cadena libremente articulada* o *FJC* [43]. Dado por la ecuación 5.4:

$$X = L_c \left[\coth \left(\frac{2FL_p}{K_B T} \right) - \frac{K_B T}{2FL_p} \right] \left(1 + \frac{F}{K_0} \right) \quad (5.4)$$

Donde K_0 es la llamada Longitud de Kuhn $= 2L_p$, definida como, el tamaño del segmento b en términos de la L_p .

5.2.2. Curvas fuerza vs extensión

Una vez que se han tomado los datos a través de los procedimientos descritos en la sección 4.3.1, estos datos son guardados en un archivo que contiene la posición de la platina (nm) con respecto a la señal detectada por el fotodetector (V). Ya con estos datos es necesario hacerles una serie de ajustes, graficarlos, conversiones, etc...que son realizados por medio del programa estadístico Igor.

Recordemos que el fotodetector nos proporciona una señal en voltaje, por lo que es necesario transformarla a distancia (nm), la cual es la distancia de desplazamiento de la esfera respecto al centro del láser. Para llevar a cabo esta transformación se realiza una sencilla

multiplicación de la señal del FDP (V) por el coeficiente de conversión de unidades, obtenida mediante la calibración del sistema. Para nuestro caso la conversión corresponde a 586 nm por volt para la dirección “x”, y 625 nm para la dirección “y”.

Una vez transformados los datos de el FDP (V) a desplazamiento de la esfera (nm), se lleva a cabo una nueva conversión, la cual lleva de el desplazamiento de la esfera (nm) a la fuerza (pN) ejercida por la pinza sobre la esfera atrapada, esto en cierta dirección (x, y, z), como se puede observar en la ecuación 5.5.

$$F_x = -K_x x \quad (5.5)$$

Mediante Igor y con las calibraciones obtenidas del sistema para la rigidez de la trampa, se lleva a cabo esta conversión. En nuestro caso, es decir para nuestras condiciones de la trampa y las esferas utilizadas, esta calibración corresponde en promedio a $K_x = 0,063$ pN/nm, $K_y = 0,070$ pN/nm y $K_z = 0,0038$ pN/nm.

A esta transformación se le ajusta un polinomio de orden 7, dado por la ecuación 5.6 [43]. Debido a que las trazas son asimétricas se pueden considerar solo los términos impares. Esto para los ejes “x” y “y”.

$$p(x) = a_1 x + a_3 x^3 + a_5 x^5 + a_7 x^7 \quad (5.6)$$

Este ajuste nos permite conocer la longitud total de la traza (uno limita los extremos) y a partir de esto podemos conocer el centro de esta.

Una vez que hemos ubicado el centro de la traza, la gráfica es centrada en ambos ejes, obteniendo una traza característica como la mostrada en la Figura 5.10. Como se puede observar, para esta corrida, las trazas no coinciden, por lo que suponemos la presencia de al menos dos conjuntos de nanofibras.

En el ultimo procedimiento se gira la traza correspondiente al cuadrante III y la ubicamos en el cuadrante I, obteniendo una gráfica como la mostrada en la Figura 5.11, esto para la extensión total de la traza. Esta traza es conocida como curva fuerza (pN) vs extensión (nm).

En la Figura 5.11, se ha representado el comportamiento de la fibra (al estar atada a una esfera y al cubreobjetos por el otro extremo), a medida que se desliza el cubreobjetos (por medio de la platina). Esto genera el desenrollamiento de la fibra, obteniendo la longitud de contorno y después su estiramiento, lo que nos proporciona las características de la elasticidad de la fibra. La esfera se encuentra atrapada por el sistema de pinzas ópticas.

En este punto somos capaces de conocer la fuerza ejercida a el arreglo de fibras en cada una de las direcciones, (F_x , F_y), así como la fuerza total ejercida a la molécula de interés F_t .

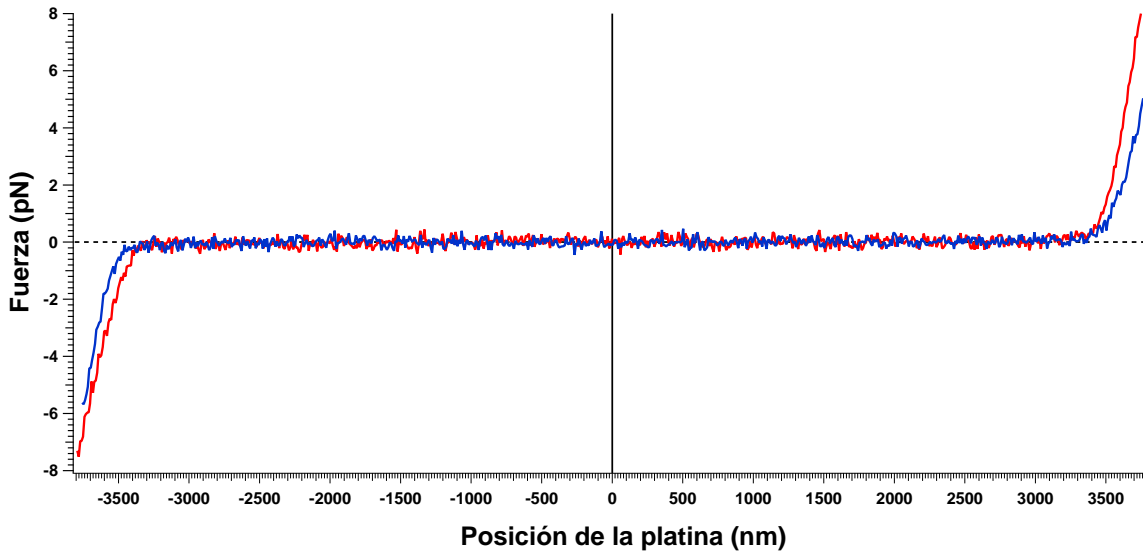


Figura 5.10: Traza fuerza vs posición de la platina. Traza característica de el estiramiento del mucílago. En rojo se muestra la traza de x y en azul la traza en dirección y. Una de las primeras observaciones que realizamos de las trazas es que no necesariamente coinciden en los diferentes ejes, lo cual nos puede estar hablando de diferentes aglomerados de fibras.

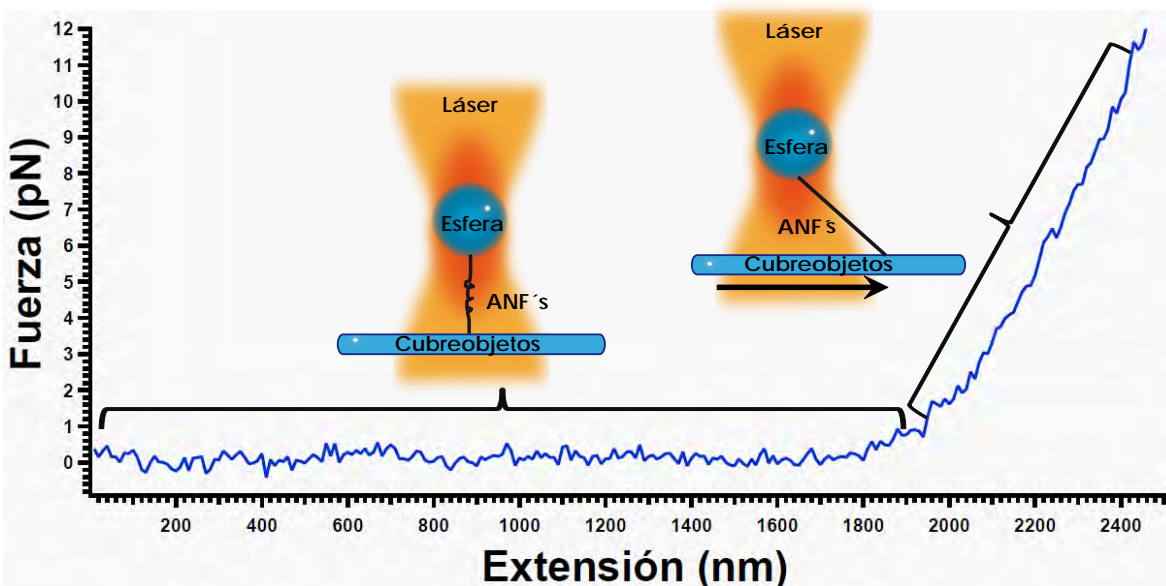


Figura 5.11: Traza fuerza vs extensión. Traza característica de el estiramiento de el mucílago, donde se representa la fuerza total ejercida a la fibra contra su extensión total. También es posible observar por medio de los esquemas, el comportamiento del mucílago conforme se lleva a cabo el estiramiento.

A través de este arreglo de las gráficas, después de conocer la configuración geométrica del ensayo (Figura 5.12) y de llevar a cabo un ajuste a través de un modelo dado para conocer las propiedades elásticas de los polímeros, seremos capaces de conocer L_p y L_c .

La geometría del ensayo representado por la Figura 5.12 nos proporciona la relación entre el desplazamiento de la esfera con respecto al centro del láser (x), el desplazamiento de el anclaje de las fibras al cubreobjetos con respecto al centro del láser (x_p) (desplazamiento de la platina), la altura del sistema (h) respecto al cubreobjetos y al centro de la esfera, la extensión de la o las fibras ($X_{anf's}$) y el radio de la esfera (r). Estos parámetros se encuentran relacionados por la ecuación 5.7. En este punto del análisis, es importante hacer énfasis en que la fuerza ejercida sobre las fibras es la resultante de un arreglo geométrico, ya que la fuerza total F_t esta determinada por las componentes F_x , F_y y F_z .

$$X_{anf's} = \sqrt{h^2 + (x_p - x)^2} - r \quad (5.7)$$

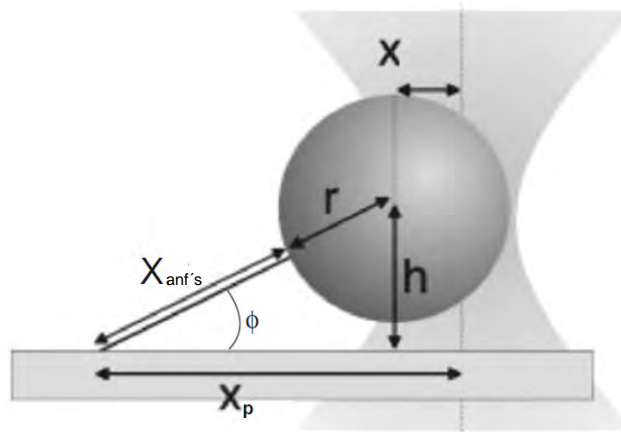


Figura 5.12: Geometría del ensayo. Esquema geométrico de el comportamiento de las fuerzas, relacionadas con el desplazamiento de la platina X_p , la extensión de la fibra ($X_{anf's}$) y el desplazamiento que sufre la esfera respecto al centro del láser (X).

Para nuestro montaje la altura considerada es de 50 nm y un radio de esfera $r=0.63 \mu\text{m}$.

La fuerza total F_t , se puede obtener con una sencilla triangulación de la fuerza (F_x o F_y), esto de acuerdo a la Figura 5.12, dada como la ecuación 5.8, aplicable a F_x o F_y .

$$F_t = \frac{F_x}{\cos\phi} = \frac{F_x}{x_p} h \quad (5.8)$$

Una vez que se tienen estos ajustes de fuerza, geometría del sistema, etc..., se procede a ajustar algún modelo existente para polímeros, esto con la finalidad de conocer sus propiedades elásticas. Probablemente el mas popular para los biopolímeros sea el modelo del

gusano inextensible o *Worm Like chain* utilizado frecuentemente como modelo para el ADN.

Se llevo a cabo una serie de ajustes por medio de el modelo de *Worm Like chain*, esto por medio del programa igor, sin embargo los ajustes fueron pobres, por lo que se probó el modelo de la *Cadena libremente articulada*, para este modelo hubo necesidad de girar las gráficas como se puede apreciar en la Figura 5.13. Haré notar que aunque este modelo en efecto ajusto de manera mucho mas precisa en comparación con el de *Worm Like chain*, aun así el ajuste no es el todavía el óptimo. En la Figura 5.13 se puede observar un ejemplo de estos ajustes.

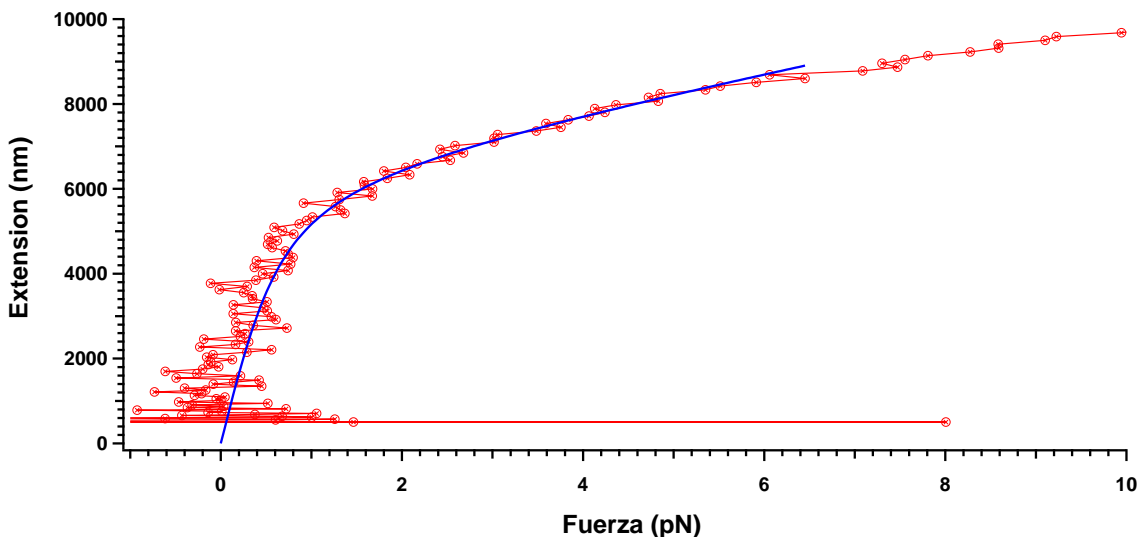


Figura 5.13: Ajuste al modelo de cadena libremente articulada. Por medio de la traza roja se puede observar el comportamiento experimental. La traza azul es el ajuste que se llevo a cabo por medio del modelo de cadena libremente articulada. El ajuste se efectuó entre 0 y 6 pN (región lineal de nuestra *Pinza Óptica*).

Una vez obtenidos los ajustes para todos los datos, fue posible conocer L_p y L_c , esto para cada una de las trazas. Enseguida se generaron un par de histogramas, uno para L_p y otro para L_c , donde se recopilaron los datos de las 56 trazas analizadas.

En la Figura 5.14 y 5.15 se pueden observar los histogramas y aunque no fue posible llevar a cabo algún ajuste de los datos, debido a la polidispersidad que presentan, estos datos son consistentes, al menos para L_c con experimentos previos [57], donde se observan una diversidad de tamaños en las fibras, así como un grosor aproximado a 2 nm.

Se promediaron los datos, obteniendo una L_c que va de los 400 a los 5200 nm y una L_p promedio de 60 ± 42 nm. En estudios previos de AFM se ha reportado que la L_p es del orden de 1 Å [?], lo que resulta completamente inconsistente con los datos que se obtuvieron en este trabajo, sin embargo, suponemos que la L_p reportada en la literatura es muy baja debido al desdoblamiento que sufren las proteínas debido a la técnica, resultando en una L_p de proteínas no nativas, a diferencia de este estudio.

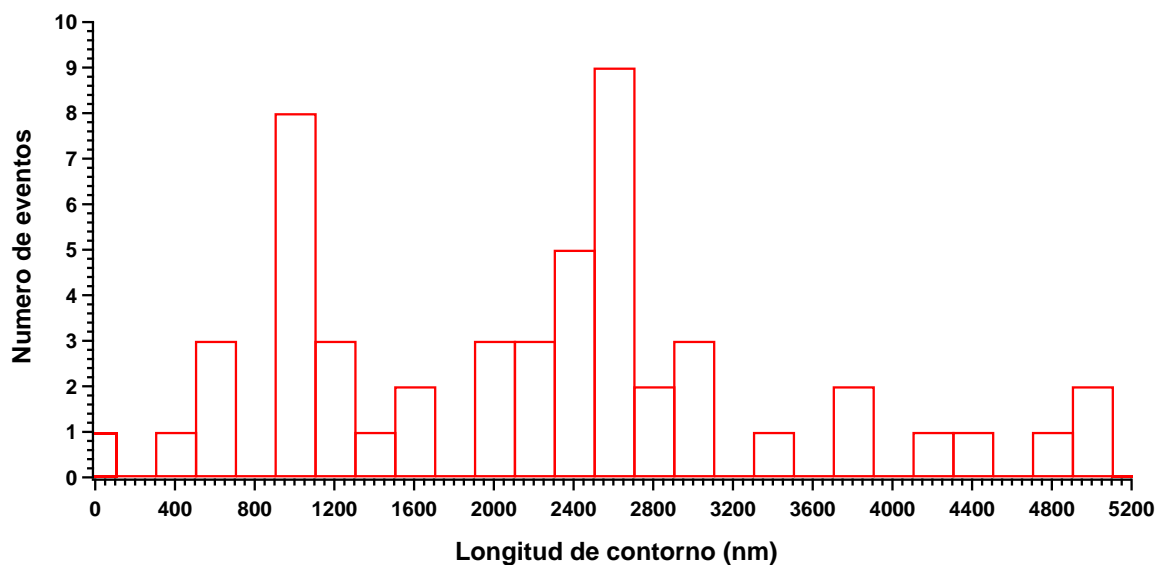


Figura 5.14: Longitud de contorno. Histograma de la longitud de contorno obtenida al juntar todos los ajustes de cadena libremente articulada. La longitud de las fibras varía considerablemente entre ≈ 400 y 5000 nm.

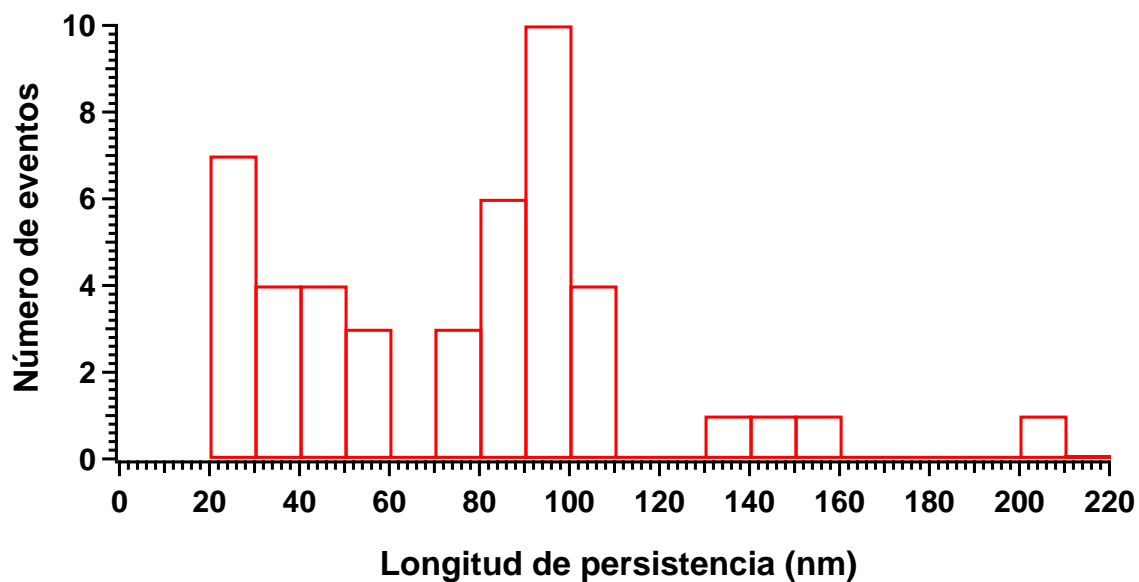


Figura 5.15: Longitud de persistencia. Histograma de la longitud de persistencia obtenida al juntar todos los ajustes de cadena libremente articulada. Se observan dos regiones en donde se acumulan los datos, cerca de ≈ 40 nm y ≈ 90 nm, lo cual puede indicar que estamos midiendo grupos de 2, 3, 4, ...fibras.

5.3. Resultados y conclusiones

Recordemos que los objetivos de nuestro trabajo son poder conocer las propiedades elásticas de las nanofibras, así como de manera más prudente tratar de hacer las mediciones en fibras independientes. Para poder conocer estos datos fue necesario llevar a cabo todo un proceso, en el cual he separado en cuatro pasos fundamentales: i.- Cultivo; ii.- Caracterización de las diatomeas; iii.- Interacción esfera-mucílago, esfera-rafe; iv.- Caracterización propiedades elásticas.

A continuación les resumiré los resultados de cada paso, así como algunos datos extras al final de la sección.

1. Cultivo sano: En un inicio fue posible obtener un cultivo no axénico de diatomeas, en este se encontraban presentes varios tipos de diatomeas *Nitzschia* spp. y algunas bacterias. Sin embargo tras la obtención de este primer cultivo, resulto sumamente difícil mantener los nuevos cultivos en estas condiciones, idóneas en nuestro caso y de suma importancia, ya que debido al tipo de sistema con el que trabajamos, es decir las *pinzas ópticas*, cualquier tipo de contaminación era relevante. En un cultivo contaminado se podían presentar algunos tipos de cianobacterias que propiciaban el agrupamiento de las diatomeas; así como bacterias, que en el caso de una muestra ya montada resultaban en datos incorrectos debido a la interrupción del proceso de adquisición de datos.
2. Caracterización de las diatomeas: Las diatomeas utilizadas pudieron ser caracterizadas morfológicamente, gracias a la microcopia electrónica de barrido. De esta manera fue posible conocer algunas características de los patrones ornamentales. Son diatomeas que presentan dos rafe opuestos entre si, ubicado en la orilla de la frústula y sin núcleo central. Principal interés en esta sección.
3. Aseguramiento de la interacción de la esferas-mucílago: Mediante técnicas de microcopia (óptica y SEM), se pudo conocer la interacción que presentan las esferas adheridas a el mucílago. Se descubrió que las esferas son capaces de adherirse de manera muy específica al rafe, ya que hemos observado que las esferas decoran preferentemente a éste. Este tipo de interacción esfera-biopolímero es inespecífico, esto se descubrió al observar que tanto las esferas carboxiladas como las esferas recubiertas de estreptavidina, sin importar su tamaño son capaces de adherirse al rafe de las diatomeas.

La primera interacción de nuestro interés fue la de las esferas con el rafe, confirmándose una muy alta afinidad. Fue posible observar que cuando se encuentran conjuntos de esferas adheridas al rafe, estas presentan rotaciones al momento de deslizarse. Un dato muy interesante fue descubrir que el movimiento de dos esferas ancladas al rafe de manera independiente, no presentan necesariamente un deslizamiento en la misma dirección, aun a pesar de estar sobre el mismo rafe, sin embargo terminan por encontrarse y comportarse como un conjunto. La dirección en la que se desliza una esfera

sobre el rafe con respecto al deslizamiento que presenta la diatomea sobre el sustrato es completamente independiente.

4. Caracterización de las propiedades elásticas: Consideremos dentro de este paso toda la parte de calibración del sistema, que se tuvo que llevar a cabo para poder tomar los datos experimentales, así como los procedimientos que se realizaron mediante Igor. Se inició con la toma de datos de 56 esferas, de estas solo se seleccionaron 36 esferas que nos proporcionaron un total de 56 trazas útiles. A este conjunto de trazas se les hizo un ajuste por medio del modelo de *Cadena libremente articulada* Eq. 5.4, dado que el ajuste con el modelo de *Worm Like chain* Eq. 5.3 resultó pobre. Por medio de este ajuste se pudo conocer el promedio de la $L_p = 60 \pm 42$ nm, la $L_c = 400 - 5200$ nm, y la $K = 94 \pm 63$ nm. Se realizaron los histogramas dependientes de L_p y L_c , Figuras 5.14, 5.15 confirmando la polidispersidad, tanto para L_p como para L_c . El módulo de Young, “E” es aproximadamente 2 GPa, es decir aproximadamente 2 veces menor que el del policarbonato y 20 veces menor que el del concreto.

Gracias a los datos obtenidos y a los ajustes que se llevaron a cabo para estos datos, hemos podido asegurar que la polidispersidad tanto en longitud de contorno como en longitud de persistencia es muy amplia, siendo consistente con algunos estudios previos. Se pudo observar en la adquisición de datos, que, también se presenta una variabilidad muy amplia en el número de fibras ancladas a una sola esfera. Esto se puede comprobar debido al comportamiento de las trazas, ya que si éstas fueran completamente simétricas para ambos ejes y fueran reproducibles, es decir, si repetimos la medición bajo las mismas condiciones, las trazas son exactamente iguales, entonces estamos hablando de una sola molécula anclada a una esfera. Para nuestros experimentos por lo general obtuvimos varias trazas de una sola esfera, sin embargo en su mayoría no eran reproducibles, a diferencia de lo que sucede con moléculas como el ADN [48, 49].

Algunos resultados extras interesantes, de los cuales nos percatamos a lo largo del trabajo fue que:

- Las diatomeas huyen del láser; es decir, se induce un cambio de dirección en el desplazamiento de las diatomeas en presencia del láser, siendo congruente con observaciones reportadas en la literatura [54].
- Se deslizan más y a mayor velocidad con una intensidad alta de luz. Suponemos que existe un mayor trabajo fotosintético.
- Hemos sido capaces de manipular pequeños objetos (muy probablemente bacterias) que se encuentran dentro de las diatomeas. Siendo capaces de deslizarlos en el interior de la frústula.

5.4. Conclusiones

Se cumple con el objetivo principal al lograr medir los parámetros característicos de las propiedades elásticas de los biopolímeros (Lp y Lc).

A diferencia de los estudios previos de AFM, logramos medir las propiedades de las nanofibras en su estado nativo, con una técnica no implementada hasta el momento para este tipo de estudios, es decir *Las pinzas ópticas*. Nuestras mediciones tienen un ruido no mayor de 1 pN y somos capaces de ejercer fuerzas de decenas de pN, es decir, sin generar un desdoblamiento de las proteínas. Motivo por el cual nuestro estudio resulta novedoso.

5.5. Perspectivas a futuro

Queda mucho por hacer!!!. Trabajar con diversos tipos de diatomeas, esto con la finalidad de hacer un estudio comparativo del mucílago dependiente del origen acuícola de éstas, para diferenciar entre mucílago de agua dulce y de agua salada.

Llevar a cabo estudios de AFM (equipo con el que cuenta el LINAN) para la adhesión de las diatomeas a diversos sustrato y bajo diversas condiciones de estrés.

Realizar conjuntamente estudios de microscopia de fluorescencia, AFM y SEM modo ambiental, con el objetivo de conocer tamaños de nanofibras y agrupamientos de estas.

Conocer la correlación entre el deslizamiento que presenta la diatomea, con el deslizamiento que presentan las esferas sobre el rafe.

Realizar estudios de foto sensibilidad generales y en particular al láser IR, ya que se observo un comportamiento evasivo a éste.

Bibliografía

- [1] *Diatoms in biotechnology: Modern tools and applications*, Applied Microbiology and Biotechnology (2009) 82:195–201

- [2] *The diatoms: Biology and morphology of the genera*, Cambridge University Press, Cambridge 2000.

- [3] http://es.wikipedia.org/wiki/Cristal_fot%C3%B3nico

- [4] *Beyond micromachining: the potential of diatoms*, TIBTECH (1999) 17:190–196

- [5] *Diatoms as quantitative indicators of pH and water temperature in subarctic Fennoscandian lakes*, Hydrobiologia (1997) 347:171-184

- [6] *Natures nanotechnologists: Unveiling the secrets of diatoms*, PLoS Biology (2004) 2:1512–1515

- [7] *The genome of the diatom Thalassiosira Pseudonana: Ecology, evolution, and metabolism*, Science (2004) 306:79–86

- [8] http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Haeckel_Diatomea_4.jpg

- [9] <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/b/b9/Diatomeas-Haeckel.jpg/300px-Diatomeas-Haeckel.jpg>

- [10] *Diatoms-from cell wall biogenesis to nanotechnology*, Annual Review of Genetics (2008) 42:83-107

- [11] *Exploring bioinorganic pattern formation in diatoms. A story of polarized trafficking*, Plant Physiology (2001) 127:1339-1345

- [12] http://www.bio.vu.nl/thb/deb/diatom_cycle.jpg
- [13] http://rbg-web2.rbge.org.uk/algae/sellaphora/cell_structure/sellaphora_frustule.jpg
- [14] *Mucilage secretions of moving diatoms*, *Protoplasma* (1983) 118:44-48
- [15] *Adhesive modular proteins occur in the extracellular mucilage of the motile, Pennate diatom Phaeodactylum Tricornutum*, *Biophysical Journal: Biophysical Letters* (2006) 90(8):L58–L60.
- [16] *Single adhesive nanofibers from a live diatom have the signature fingerprint of modular proteins*, *Biophysical Journal* (2005) 89:4252-4260
- [17] *Heterogeneous xylose-rich glycans are associated with extracellular glycoproteins from the biofouling diatom Craspedostauros australis (Bacillariophyceae)*, *European Journal of Phycology* (2003) 38:351–360
- .
- [18] http://rbg-web2.rbge.org.uk/algae/sellaphora/cell_structure/sellaphora_plasmogamy.jpg
- [19] *Atomic force microscopy study of living diatoms in ambient conditions*, *Journal of Microscopy* (2003) 212:292-299
- [20] *Probing the surface of living diatoms with atomic force microscopy: The nanostructure and nanomechanical properties of the mucilage layer*, *Journal of Phycology* (2003) 39:722-734
- [21] *The structure and nanomechanical properties of the adhesive mucilage that mediates diatom-substratum adhesion and motility*, *Journal of Phycology* (2003) 39:1181-1193
- [22] *Marine biofouling: A sticky problem*, *Biologist* (2002) 49:1–5.
- [23] *Cap 5; Diatom adhesives: Molecular and mechanical properties*, *Biological Adhesives* (ed. by A.M. Smith and J.A. Callow), Springer-Verlag Berlin Heidelberg (2006) 79–103.
- [24] *The mechanism of diatom locomotion. I: An ultrastructural study of the motility apparatus*, *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* (1983) 218:331–343

- [25] *The mechanism of diatom locomotion. II: Identification of Actin*, Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences (1983) 218:345–348
- [26] *Ultrastructural localization of polysaccharides in the motile diatom Navicula cuspidata*, Protoplasma (1982) 113:10–22
- [27] *Use of fluorophore-conjugated lectins to study cell-cell interactions in model marine biofilms*, Applied and environmental microbiology (2005) 71(1):428–435
- [28] *Diatom gliding is the result of an actin-myosin motility system*, Cell Motility and the Cytoskeleton (1999) 44:23-33
- [29] *The first kiss: Establishment and control of initial adhesion by raphid diatoms*, Journal of Phycology (1998) 34:9-15
- [30] *The Glass Menagerie: diatoms for novel applications in nanotechnology*, Trends in Biotechnology (2009) 27(2):116–127
- [31] *AFM Nanoindentations of diatom biosilica surfaces*, Langmuir (2007) 23:5014–5021.
- [32] *The biology of biofouling diatoms and their role in the development of microbial slimes*, Biofouling (2008) 24(5):365-379
- [33] *Rapid fabrication of micro- and nanoscale patterns by replica molding from diatom biosilica*, Advanced Functional Materials (2007) 17:2439-2446
- [34] a) <http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/imgjan02/coscinodiscus1.jpg>
 b) http://planktonnet.awi.de/repository/rawdata-PlanktonNet2/viewable/alexandra_2104_striatella_folder3_0303u5_21042010_zs_20100624222325_small.jpg
 c) http://jcoll.org/genoma/vida_microsubmarina/diatomeas/img/pinnularia/pinnularia.jpg
 d) http://protist.i.hosei.ac.jp/PDB/Images/heterokontophyta/raphidineae/gomphonema/acuminatum/acuminatum_4.jpg
- [35] http://starcentral.mbl.edu/msr/rawdata/viewable/pinnularia_viridis_1293830401_g_543w.jpg
http://jcoll.org/genoma/vida_microsubmarina/diatomeas/img/pinnularia/pinnularia.jpg

http://www.asdk12.org/staff/vanarsdale_mark/pages/mrva/marine/Plankton_images/Diatoms.gif

- [36] *A Live Bioprobe for Studying Diatom-Surface Interactions*, Biophysical Journal (2004) 87(6):4284-4297

- [37] *The study of protein mechanics with the atomic force microscope*, Trends in Biochemical Sciences (1999) 24(10):379-84

- [38] *Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles*, Optics Letters (1986) 11(5):288–290

- [39] *Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy*, Nature Methods (2008) 5:491–505

- [40] *Single-molecule micromanipulation techniques*, Annual Review of Materials Research (2007) 37:33–67

- [41] *Myosin-V stepping kinetics: A molecular model for processivity*, PNAS (2000) 97(17):9482-9486

- [42] *Single myosin molecule mechanics: piconewton forces and nanometre steps*, Nature (1994) 368:113–119

- [43] *Stretching DNA with optical tweezers*, Biophysical Journal (1997) 72:1335–1346

- [44] *Biological applications of optical forces*, Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure (1994) 23:247–285

- [45] *Optical trapping*, Review of Scientific Instruments (2004) 75(9):2787–2809

- [46] *Lights, action: optical tweezers*, Contemporary Physics (2002) 43(4):241–258

- [47] *The smallest tweezers in the world*, The Physics Teacher (2008) 46:467–472

- [48] *Construcción, caracterización y calibración de una pinza óptica para manipulación de moléculas individuales de ADN*, Trabajo de tesis, Instituto de física de la UASLP, México 2011
- [49] *Construcción y caracterización de una pinza óptica para el estudio de moléculas individuales*, Trabajo de tesis, Instituto de física de la UNAM, Mexico 2011
- [50] *Optical traps for single molecule biophysics: a primer*, Laser and Photon. Reviews, (2009) 3(1-2):203-220
- [51] *Characterization of photodamage to Escherichia coli in optical traps*, Biophysical Journal (1999) 77:2856-2863
- [52] *Optical trapping for undergraduates*, American Journal of Physics (2007) 75(1):5–14
- [53] *Mechanics of motor proteins and the cytoskeleton*, Chapter 6 Polymer Mechanics, edited by Sinauer Associates, Inc. 2001
- [54] *Chapter 13; Photo-stimulated effects on diatom motility*, Photomovement 2001, Elsevier Science B.V.
- [55] *Handbook of Psychological Methods*, Nichols, H. W., 1973
- [56] *Polymer networks produced by marine diatoms in the northern Adriatic Sea*, Marine Drugs (2011) 9:666–679.
- [57] *AFM imaging of extracellular polymer release by marine diatom *Cylindrotheca closterium* (Ehrenberg)* Reiman J.C. Lewiny, Journal of Molecular Recognition (2011) 24:436-445.