



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

INSTITUTO DE FÍSICA “LUIS RIVERA TERRAZAS”

“MODELADO DE LA DISPERSIÓN DE LUZ POR BACTERIAS EN CONTACTO CON NANOPARTÍCULAS DE PLATA”

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS
(EN LA ESPECIALIDAD DE CIENCIA DE
MATERIALES)**

**PRESENTA:
LIC. EN QUÍM. MARÍA DE JESÚS GÁLVEZ VÁZQUEZ**

**ASESOR:
DRA. ANA LILIA GONZÁLEZ RONQUILLO**

ENERO DE 2017

*A mis amados padres, Oscar y Esperanza
y a mis adoradas hermanas, Lili y Alin.*

Agradecimientos

Principalmente a Dios por todas las bendiciones que día a día me brinda y por permitirme llegar a este momento de mi vida en el que termino una etapa más en mi desarrollo profesional.

A mi asesora, la Dra. Ana Lilia, quien siempre se mostró muy paciente, atenta, amable y responsable conmigo para compartirme sus conocimientos, para resolver mis dudas y para guiarme en la realización de este trabajo. Además, porque siempre me hacía mejorar al corregirme y porque con eso me ayudaba a entender y darme a entender de una mejor manera. También, por todos los consejos que compartió conmigo relacionados a cuestiones académicas, así como de la vida.

Al Comité Revisor, integrado por la Dra. Minerva González Melchor, Dra. Xóchitl I. Saldaña Saldaña y por la Dra. Ma. Estela Calixto Rodríguez, por sus valiosas observaciones y sugerencias para mejorar este trabajo de tesis.

A mi padres y hermanas porque son la motivación principal que tengo para siempre dar mi mejor esfuerzo en todas las actividades que realizo y porque siempre están ahí cuando los necesito, apoyándome, escuchándome o simplemente acompañándome.

A la Dra. Rocío Aguilar S. por su amistad y porque siempre ha estado presente para escucharme, motivarme y brindarme palabras de apoyo y consejos.

A mis profesores del Instituto de Física (Dra. Ana Lilia González R., Dr. Rutilo Silva G., Dr. Antonio Méndez Blás, Dr. Antonio Méndez Bermúdez, Dr. Enrique Quiroga G., Dra. María Eugenia Mendoza A., Dr. Gregorio Hernández C., Dr. Enrique Sánchez M., Dr. Miguel Gracia y Dra. Estela Calixto R.) por todo lo enseñado en clases o en pláticas, que sin duda alguna han influido de manera positiva en mi formación académica o en mi desarrollo personal. Agradezco especialmente a la Dra. Lilia Meza por su apoyo para participar en el II Taller de Habilidades Profesionales para Jóvenes Científicas y Estudiantes de Ciencias Latinoamericanas.

A mis amigos del instituto y externos (Andrea, Shunashi, Chahinez, Manes, Maricruz, Monse, Evelyn, Carla, Maritza, Antonio, Iván, Miguel Ángel, Carlos, Pablo y los que se me hayan llegado a olvidar), por todos los momentos bonitos que hemos compartido a través de este viaje que involucró el estudio de la maestría.

Al Instituto de Física “Ing. Luis Rivera Terrazas” por haberme acogido y apoyado durante mis estudios de maestría.

Al Laboratorio Nacional de Supercómputo del Sureste de México (LNS) por las facilidades brindadas para la instalación y uso del código DDSCAT y por el apoyo técnico.

Al CONACyT por la beca otorgada (CVU/Becario: 627536/330362) para realizar mis estudios de maestría.

A la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado por el apoyo económico otorgado para concluir este trabajo de tesis.

Resumen

En este trabajo abordamos como tema principal de estudio la respuesta óptica de una bacteria con nanopartículas de plata (NPs Ag) sobre su superficie. Para realizar un estudio sistemático primero estudiamos las eficiencias de una bacteria sola, después la respuesta óptica de un arreglo de NPs Ag en diferentes posiciones y finalmente sistemas de bacteria-nanopartículas. Modelamos las eficiencias ópticas de absorción, dispersión y extinción de los sistemas de interés empleando la aproximación de dipolo discreto. Calculamos el patrón de dispersión de luz por una bacteria *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*, gram-positiva), cuya principal característica es su morfología esférica, consideramos bacterias de diferente diámetro y composición, esto último a través de un modelo sencillo para estimar un índice de refracción efectivo asociado a la compleja composición de la bacteria. Estudios similares se realizaron para una bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*, gram-negativa) con morfología esferocilíndrica. Del análisis de nuestros resultados concluimos que a mayor tamaño, los patrones de dispersión presentan un mayor número de mínimos. Además, bacterias con diferente composición presentan patrones de dispersión con el mismo número de mínimos y solo varían ligeramente sus intensidades. Se estudiaron arreglos de NPs Ag con 4, 5, 10, 15 y 30 partículas en diferentes distribuciones espaciales. Del análisis de los cálculos de las eficiencias ópticas se logró identificar que la línea espectral de la eficiencia de absorción tiene un máximo entre 400 y 410 nm. La intensidad de los espectros aumenta a medida que aumenta el número de NPs Ag. El sistema bacteria-NPs se estudió considerando una bacteria *S. aureus* con NPs de Ag sobre su superficie, considerando los arreglos mencionados anteriormente. La interacción bacteria-nanopartículas tiene como principal característica líneas espectrales similares a las de los arreglos de NPs solas, pero con intensidades 100 veces menores.

Índice general

1. Introducción	1
1.1. Objetivos y estructura de la tesis	2
2. Fundamentos teóricos	5
2.1. Bases físicas de la extinción	5
2.2. Matriz de amplitud de dispersión	9
2.3. Parámetros de Stokes	11
2.4. Matriz de dispersión	12
2.5. Extinción, dispersión y absorción	14
2.6. Plasmones de superficie de las nanopartículas de plata	18
3. Bacterias	25
3.1. Clasificación de las bacterias por su forma	25
3.2. Crecimiento bacteriano	25
3.3. Estructura bacteriana	27
3.4. Bacterias gram-positivas y gram-negativas	28
3.4.1. Pared celular de las bacterias gram-positivas y gram-negativas	29
3.4.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	30
3.4.3. <i>Escherichia coli</i>	31
3.5. Dispersión de luz por bacterias	31
3.5.1. Citometría de flujo	33
3.5.2. Índice de refracción de las bacterias	35
4. Metodología para el cálculo de eficiencias ópticas	37
4.1. Formalismo de la Aproximación de Dipolo Discreto (DDA)	38
4.2. Criterios de validez	40
4.3. Código computacional: DDSCAT	41
4.3.1. Elección de la polarizabilidad	42
5. Respuesta óptica de bacterias y NPs Ag	45
5.1. Respuesta óptica de la bacteria <i>Staphylococcus aureus</i>	45
5.2. Respuesta óptica de la bacteria <i>Escherichia coli</i>	50
5.3. Respuesta óptica de NPs Ag sobre la superficie de una bacteria <i>S. aureus</i>	58
5.3.1. Arreglos de NPs Ag solas con diferentes distribuciones espaciales	59
5.3.2. Bacteria <i>S. aureus</i> con NPs Ag distribuidas sobre su superficie	65
5.3.3. Bacteria <i>S. aureus</i> y arreglos de NPs Ag pequeñas	68
6. Conclusiones	73
Trabajo por realizar	75

Presentación del trabajo en diferentes eventos	77
A. Tinción de Gram	79
Bibliografía	81

Capítulo 1

Introducción

La colonización del ser humano por bacterias, como la *Escherichia coli* o *E. coli*, se inicia en las primeras horas de vida y la relación es benéfica para la bacteria y para el huésped, habitando en el tracto gastrointestinal. En individuos sanos la *E. coli* no produce daño, sin embargo, cuando las barreras de defensa del tracto gastrointestinal son alteradas y la bacteria sale de su hábitat natural, causa enfermedades. En la actualidad, las infecciones causadas por bacterias, permanecen como una de las mayores causas de muerte y discapacidad en millones de personas en todo el mundo. Se estima que el 50% de los pacientes hospitalizados sufren infecciones nosocomiales causadas por bacterias resistentes a medicamentos y precisamente, la resistencia a los antibióticos que han desarrollado las bacterias, hace que esta situación se complique cada día más. Por esta razón, se ha abierto la puerta al desarrollo de nuevos medicamentos o materiales para combatir a estos microorganismos patógenos [1].

Por otra parte, las propiedades antimicrobianas de la plata en sus diferentes formas, metálica, molecular, iónica o nanopartículas, se conocen desde la antigüedad. Por ejemplo, desde el año 1000 a. C los griegos, romanos y egipcios usaban recipientes de plata (en forma de metal en bulto) para hacer el agua potable y para transportarla, también para conservar sus alimentos. Antes del desarrollo de los antibióticos (en la primera mitad del siglo XX) el nitrato de plata (forma molecular) se usaba para curar las infecciones de quemaduras o heridas abiertas de la piel e infecciones oculares y las suspensiones de plata coloidal (en forma iónica) eran consumidas oralmente para prevenir y tratar infecciones gastrointestinales. Inclusive, hoy en día se usa la plata coloidal para desinfectar agua, frutas y verduras [2], [3]. Con los ejemplos anteriores, es posible percatarse de que independientemente de la forma en que este presente la plata, ésta conserva sus propiedades antimicrobianas.

Debido a las propiedades únicas que presentan los nanomateriales (una relación grande superficie/volumen y propiedades físicas y químicas totalmente diferentes comparadas con el material en bulto) se han usado en diversos campos que van desde la óptica, electrónica, mecánica, catálisis, ciencias de la energía y nanomedicina. A escala nano, la plata sigue preservando su propiedades bactericidas, por ello se ha empleado en forma de nanopartículas como un agente antimicrobial y desinfectante [4], [5]. Gracias a esto, las nanopartículas de plata (NPs Ag) se han aplicado en la desinfección de objetos médicos, desarrollo de implantes biomédicos, catéteres [5], compósitos de resinas dentales [6], gel tópico para tratar quemaduras [7], papel para empacar y preservar alimentos, tratamiento de aguas [4] y pintura para desinfectar superficies. En cuestiones tecnológicas para aprovechar sus propiedades antimicrobianas, las NPs Ag se han usado para equipar artículos como equipos para aire acondicionado [7], refrigeradores, lavadoras, lavatrastes, celulares, ropa (clínica y personal), cepillos de dientes y cosméticos [2], [8]. Inclusive, se han usado en lugares públicos como elevadores y estaciones de tren [9].

La plata es el metal más tóxico para los microorganismos, en la siguiente secuencia: Ag>Hg>Cu>Cd>Cr>Pb>Co>Au>Zn>Fe>Mn>Mo>Sn, pero afortunadamente es el menos tóxico para las células de los mamíferos. Además, es menos propenso para inducir resistencia microbiana que cualquier otro antibiótico [10], [11]. Como resultado, las NPs Ag parecen ser una opción prometedora para resolver el problema de salud pública concerniente a la resistencia que presentan los microorganismos a los antibióticos comunes [13]. Se ha estudiado ampliamente el efecto biocida de las NPs Ag (con diferentes formas y tamaños) en gérmenes [12], por mencionar algunos, se encuentran hongos como el *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida crusei* y el *Trichophyton mentagrophytes*. Resulta interesante comentar que algunos de éstos hongos eran resistentes a los antibióticos. Se ha encontrado que las NPs Ag también tienen propiedades antivirales y se han usado contra el virus de la inmunodeficiencia humana-1 (VIH-1), el del herpes simple, el de la hepatitis B, el monkeypox y el virus respiratorio sincitial [2], [10]. Inclusive se han usado las propiedades antimicrobianas de éstas nanopartículas en parásitos como la *Fasciola hepática* y el *Plasmodium falciparum* [14].

También, se ha estudiado el efecto de las NPs Ag en las bacterias tanto gram-positivas como gram-negativas como el *Staphylococcus aureus* [10], *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus mutans*, el *Staphylococcus epidermidis*, *Vibrio cholerae*, entre otras [13], [15]. Cabe mencionar, que el efecto biocida de las NPs Ag se ha demostrado, exponiendo los microorganismos, en medios de cultivo líquidos o sólidos, con disoluciones acuosas de nanopartículas [10]. Hasta el momento, no esta completamente clara la manera en la que actúan las NPs Ag en las bacterias para inhibir su crecimiento poblacional, pero se han propuesto principalmente tres formas: una sugiere que las NPs Ag se unen a la superficie de la bacteria e interrumpen sus funciones normales, otra que las NPs Ag pueden penetrar la membrana celular y la última involucra la liberación de iones de plata [16]. En la actualidad, este tema representa un campo abierto en la investigación.

Asimismo, se ha reportado que empleando técnicas que miden la dispersión de luz de bacterias, se ha logrado obtener información muy importante sobre su tamaño, forma, composición, grosor de la pared celular, entre otros. Es importante conocer las características anteriores porque de esta manera se pueden identificar y clasificar las bacterias para posteriormente aislarlas y aprovechar sus propiedades. Motivados por toda la información que se puede obtener de los estudios de las propiedades ópticas de bacterias, así como por las propiedades que poseen las NPs Ag (antimicrobianas y plasmónicas) y por la poca información que se tiene de las propiedades ópticas de NPs metálicas en contacto con bacterias, en este trabajo se presenta un estudio sistemático de la respuesta óptica de una bacteria *S. aureus* con NPs Ag sobre su superficie. También modelamos la luz dispersada por una bacteria gram-positiva y una gram-negativa de tamaño y composición varias. Todo esto, para su posible utilidad en la comprensión de los resultados que brindan los métodos ópticos de caracterización de células biológicas, como la citometría de flujo de barrido y la espectrofotometría.

1.1. Objetivos y estructura de la tesis

Objetivo general

Modelar el espectro de luz dispersada por una bacteria sola y con nanopartículas de plata sobre su superficie.

Objetivos particulares

- Calcular el espectro de dispersión de luz por una bacteria gram-positiva (*Staphylococcus aureus* o *S. aureus*) y una bacteria gram-negativa (*Escherichia coli* o *E. coli*) en solución

acuosa, diferenciando citoplasma y pared celular.

- Calcular las eficiencias ópticas de absorción, dispersión y extinción de arreglos de nanopartículas de plata esféricas distribuidas espacialmente de manera uniforme y no uniforme.
- Calcular las eficiencias ópticas de absorción, dispersión y extinción de una bacteria *S. aureus* en contacto con nanopartículas de plata, estas últimas distribuidas de manera uniforme y no uniforme sobre la superficie de la bacteria.

Estructura de la tesis

El presente trabajo de tesis está dividido en seis capítulos:

- En el capítulo 1 se introduce el tema de investigación y se menciona la motivación del trabajo.
- En el capítulo 2 se abordan los conceptos generales necesarios para comprender la física del fenómeno de dispersión, absorción y extinción de luz por partículas de forma arbitraria y de los plasmones de superficie de nanopartículas de plata.
- El capítulo 3 trata de las bacterias, su clasificación y se ahonda en las dos bacterias estudiadas: el *S. aureus* y la *E. coli*. Además, se da cuenta del estado del arte de la dispersión de luz por bacterias, tanto teórica como experimentalmente.
- Dado que éste es un trabajo teórico, en el capítulo 4 hacemos mención y describimos la metodología para realizar nuestros cálculos: la aproximación de dipolo discreto.
- En el capítulo 5 mostramos los resultados del estudio de la respuesta óptica por las dos bacterias anteriormente mencionadas, haciendo un análisis al considerar diferentes tamaños, composición y orientación. También se presentan los resultados de dispersión de luz por la bacteria *S. aureus* con nanopartículas de plata, variando el número y distribución de las nanopartículas sobre la superficie de la bacteria.
- Finalmente, en el capítulo 6 se presentan las conclusiones.

Capítulo 2

Fundamentos teóricos

Diariamente se pueden observar en la naturaleza, fenómenos que son manifestaciones de la dispersión y absorción de luz por partículas y, entre éstos se encuentran, el contraste de cúmulos de nubes blancas con el cielo azul, los arcoíris primarios y secundarios en un día lluvioso o inclusive el color verde del follaje.

Todo, excepto el vacío, es heterogéneo y esta heterogeneidad es la responsable de que todos los medios dispersen luz. Es decir, en cualquier sistema a nivel molecular se pueden distinguir átomos y moléculas y éstos al actuar como centros dispersores de luz, son los causantes de la dispersión de luz por cualquier medio.

2.1. Bases físicas de la extinción

Se conoce que la materia se compone básicamente de cargas eléctricas discretas: electrones y protones. Cuando un obstáculo, que puede ser un electrón, un átomo o molécula, una partícula sólida o líquida, es iluminado por una onda electromagnética, las cargas eléctricas que lo componen comienzan a oscilar por la interacción con el campo electromagnético de la onda incidente y es aquí cuando pueden ocurrir dos fenómenos que no son independientes, uno de estos es la dispersión y el otro la absorción: el primero consiste en que las cargas eléctricas aceleradas radien energía electromagnética en todas direcciones y a esta radiación secundaria es a la que se le denomina radiación dispersada (Fig. 2.1) y el segundo involucra que una carga excitada pueda transformar parte de la energía electromagnética incidente en otra forma de energía, por ejemplo, energía térmica.

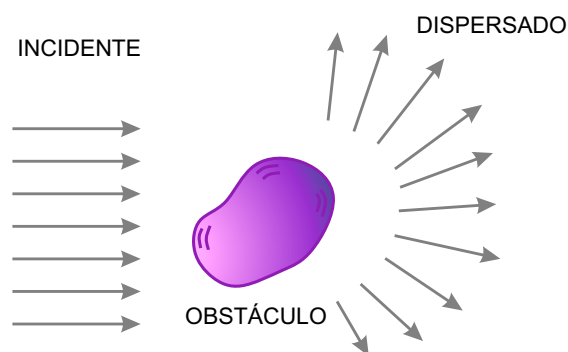


Figura 2.1: Dispersión de un campo electromagnético incidente por un obstáculo.

CAPÍTULO 2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1. BASES FÍSICAS DE LA EXTINCIÓN

Por otra parte, la extinción es el resultado de la atenuación de una onda electromagnética, causada por dispersión y absorción, cuando ésta atraviesa el medio en el que se encuentra el obstáculo y matemáticamente se puede expresar como:

$$\text{Extinción} = \text{Dispersión} + \text{Absorción} \quad (2.1.1)$$

Se puede comprender cualitativamente la física de la dispersión de luz por una partícula, sin definir una partícula en específico o sin hacer algún cálculo. Para esto se considera una partícula arbitraria, la cual se divide conceptualmente en pequeñas regiones. Un campo oscilante aplicado sobre esta partícula va a inducir un momento dipolar en cada región. Estos dipolos oscilan a la frecuencia del campo aplicado y van a dispersar radiación secundaria en todas las direcciones. En una distancia particular, en un punto P (Fig. 2.2), el campo total dispersado se obtiene superponiendo las ondas electromagnéticas secundarias y debido a que la dispersión por dipolos es coherente (elástica), se considera únicamente las ondas secundarias con la misma frecuencia que la del campo oscilante aplicado. En general, las relaciones de fase cambian para diferentes direcciones de dispersión. Si la partícula es pequeña comparada con la longitud de onda incidente, aproximadamente todas las ondas dispersadas estarán en fase, por lo tanto para esa partícula no se espera mucha variación de la dispersión con la dirección. Sin embargo, en cuanto más grande sea la partícula analizada, se observarán más picos y valles en su patrón de dispersión.

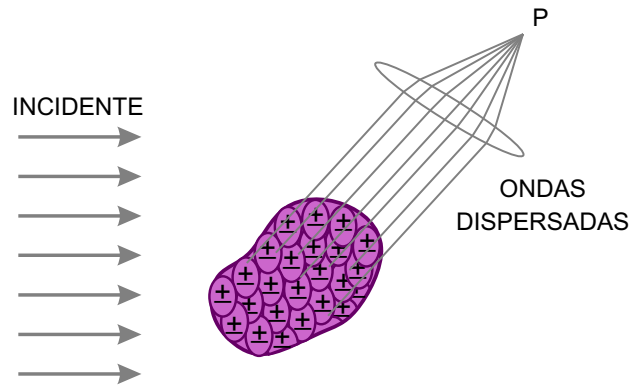


Figura 2.2: El campo electromagnético dispersado en el punto P es el resultado de todas las ondas dispersadas por los dipolos.

La dispersión depende de diversos factores geométricos: dirección de dispersión, tamaño y forma de la partícula. Pero la amplitud y fase del momento dipolar inducido para una frecuencia dada, depende de material que forma la partícula estudiada.

Una vez explicada la dispersión de una sola partícula, se procede a analizar la respuesta de varias partículas. En un conjunto de partículas, éstas se encuentran electromagnéticamente acopladas: cada partícula es excitada por un campo electromagnético externo y por el campo dispersado resultante de todas las demás; pero el campo dispersado por una partícula depende de campo total al que es expuesta. Aunque en la naturaleza es más común encontrarse con la absorción y dispersión por un conjunto de partículas en vez de una única partícula, si se satisfacen ciertas condiciones, es posible describir un arreglo de partículas con el estudio de una sola. Para eso, se asume la dispersión única, que implica que el número de partículas del arreglo que se estudia es lo suficientemente pequeño y su separación es tan grande que en la vecindad de cada partícula, el campo eléctrico total dispersado por todas las demás partículas es pequeño comparado con el campo eléctrico externo. Con esta aceptación, el campo eléctrico dispersado es la suma del campo eléctrico dispersado por las partículas individuales, cada una de las cuales es afectada de manera aislada por el campo eléctrico externo. Cabe mencionar que experimentalmente se puede lograr lo

CAPÍTULO 2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1. BASES FÍSICAS DE LA EXTINCIÓN

anterior al preparar suspensiones muy diluidas.

Ahora que ya se ha mencionado que bajo ciertas condiciones se puede describir un conjunto de partículas mediante el estudio de una sola partícula, a continuación se describirá este problema más detalladamente, pero antes de esto, es interesante saber que cuando una partícula se ilumina con un haz de luz con características específicas, la cantidad y distribución angular de luz dispersada por la partícula, así como la cantidad absorbida, dependen en gran manera de la forma, tamaño y material del cual está compuesta, lo que presenta un número ilimitado de posibilidades. Sin embargo, antes de invocar la naturaleza de la partícula, se explicará en forma general la dispersión y absorción de luz por una partícula.

El problema es el siguiente, se desea estudiar la interacción de una onda electromagnética monocromática, con una polarización arbitraria, con una sola partícula (la cual se define como un agregado de muchos átomos o moléculas), que se encuentra inmersa en un medio no absorbente y homogéneo (se entiende por homogéneo que la heterogeneidad atómica o molecular es pequeña comparada con la longitud de onda de la luz incidente y con la partícula que se desea estudiar). Aunque la partícula pueda poseer una forma complicada y tenga varios componentes homogéneos, se asume que ésta se encuentra formada por materia que puede ser descrita en cada punto en términos macroscópicos, en otras palabras, las propiedades ópticas de la partícula o de cada una de sus regiones pueden ser completamente especificadas con constantes ópticas que dependen de la frecuencia. Ahora bien, lo que se quiere, es conocer el campo electromagnético en cualquier punto de la partícula y del medio que la rodea. En la Fig. 2.3 se muestra un esquema del sistema que se describió previamente, donde el material que conforma la partícula y el medio que la rodea, se caracterizan por su permitividad ε y permeabilidad μ . ε_p y μ_p para la partícula y ε_m y μ_m para el medio.

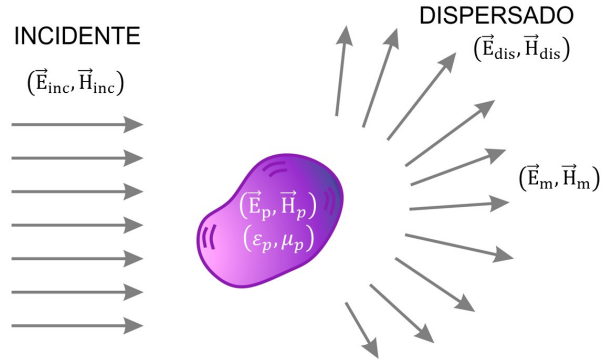


Figura 2.3: El campo electromagnético incidente $(\vec{E}_{inc}, \vec{H}_{inc})$ genera un campo en el interior de la partícula $(\vec{E}_p, \vec{H}_p)$ y un campo dispersado fuera de ella $(\vec{E}_{dis}, \vec{H}_{dis})$. El campo del medio $(\vec{E}_m, \vec{H}_m)$ es el resultado de la suma del campo incidente más el dispersado.

El campo electromagnético dentro de la partícula está denotado por $(\vec{E}_p$ y $\vec{H}_p)$ y el del medio que la rodea por $(\vec{E}_m$ y $\vec{H}_m)$, este último es el resultado de la superposición del campo incidente $(\vec{E}_{inc}$ y $\vec{H}_{inc})$ y el campo dispersado $(\vec{E}_{dis}$ y $\vec{H}_{dis})$ y matemáticamente se expresa como:

$$\vec{E}_m = \vec{E}_{inc} + \vec{E}_{dis}, \quad \vec{H}_m = \vec{H}_{inc} + \vec{H}_{dis} \quad (2.1.2)$$

con,

$$\vec{E}_{inc} = \vec{E}_0 e^{i(\vec{k} \cdot \vec{r} - \omega t)}, \quad (2.1.3)$$

CAPÍTULO 2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1. BASES FÍSICAS DE LA EXTINCIÓN

$$\vec{H}_{inc} = \vec{H}_0 e^{i(\vec{k} \cdot \vec{r} - \omega t)}, \quad (2.1.4)$$

donde $\vec{k}$ es el vector de propagación de la onda electromagnética, $\vec{r}$ el vector de posición de un punto en el espacio, ω la frecuencia de la onda, t el tiempo y $\vec{E}_0$ y $\vec{H}_0$ son los vectores de amplitud del campo eléctrico y magnético incidentes, respectivamente.

Los campos $\vec{E}$ y $\vec{H}$ deben satisfacer las ecuaciones de Maxwell, que en ausencia de cargas y corrientes libres y en el sistema internacional de unidades se expresan como:

$$\nabla \cdot \vec{E} = 0, \quad (2.1.5)$$

$$\nabla \cdot \vec{H} = 0, \quad (2.1.6)$$

$$\nabla \times \vec{E} = i\omega\mu\vec{H}, \quad (2.1.7)$$

$$\nabla \times \vec{H} = -i\omega\varepsilon\vec{E}, \quad (2.1.8)$$

en todos los puntos donde ε y μ sean continuas. Por consiguiente, los campos satisfacen las siguientes ecuaciones de onda vectoriales:

$$\nabla^2 \vec{E} + k^2 \vec{E} = 0, \quad (2.1.9)$$

$$\nabla^2 \vec{H} + k^2 \vec{H} = 0, \quad (2.1.10)$$

donde $k^2 = \omega\mu\varepsilon$, k es la magnitud del vector $\vec{k}$.

Como se mencionó, para que se cumplan las ecuaciones de Maxwell se requiere que la ε y la μ sean continuas en todos los puntos, sin embargo, cuando se cruza la frontera entre la partícula y el medio hay un cambio en dichas propiedades, por lo tanto, desde el punto de vista macroscópico existe una discontinuidad en la frontera de la partícula y el medio. Así que, se debe imponer que en la frontera de la partícula y del medio, los campos cumplan las siguientes condiciones a la frontera:

$$\hat{n} \times [\vec{E}_m - \vec{E}_p] = 0, \quad (2.1.11)$$

$$\hat{n} \times [\vec{H}_m - \vec{H}_p] = 0, \quad (2.1.12)$$

en donde $\hat{n}$ es el vector normal dirigido hacia afuera de la superficie de la partícula. Las condiciones a la frontera especifican que las componentes tangenciales del campo eléctrico y magnético son continuas a través de la frontera que separa los medios con diferentes propiedades y esto es una condición suficiente para la conservación de la energía a través de la frontera.

La magnitud y dirección de transferencia de energía electromagnética en todos los puntos del espacio y para campos electromagnéticos complejos armónicos se expresa a través del vector de Poynting:

$$\vec{S} = \text{Re}(\vec{E}) \times \text{Re}(\vec{H}), \quad (2.1.13)$$

Si se supone una superficie plana de forma arbitraria con una orientación descrita por el vector normal unitario $\hat{n}$, la cantidad de energía electromagnética que atraviesa la superficie es igual a $\vec{S} \cdot \hat{n}A$, siempre y cuando $\vec{S}$ sea constante a través de la superficie. Cuando $\vec{S}$ es función de la posición y si la superficie tiene una forma arbitraria, la potencia está dada por:

$$P = \int \vec{S} \cdot \hat{n} dA, \quad (2.1.14)$$

pero si ahora se supone una superficie cerrada que encierra un volumen V , la potencia correspondiente a la energía electromagnética que atraviesa tal superficie es:

$$P = - \int_A \vec{S} \cdot \hat{n} dA, \quad (2.1.15)$$

el signo menos se debe a que se elige que el vector normal $\hat{n}$ apunte hacia afuera de la superficie cerrada A . Si $\hat{n}$ y $\vec{S}$ están dirigidos en sentido opuesto ($\vec{S} \cdot \hat{n}$), el signo menos asegura que la contribución a P sea positiva. Por consiguiente, P es positiva si hay transferencia neta de energía electromagnética dentro del volumen, es decir, si se absorbe energía electromagnética en V .

El vector de Poynting instantáneo (2.1.13), es una función que varía rápidamente con el tiempo a las frecuencias que nos interesan, longitudes de ondas cortas, como la radiación ultravioleta, visible e infrarroja. Muchos detectores no son capaces de seguir las altas frecuencias de este vector ($\sim 10^{14} - 10^{15} Hz$), pero brindan un promedio temporal $\langle \vec{S} \rangle$:

$$\langle \vec{S} \rangle = \frac{1}{2} Re(\vec{E} \times \vec{H}^*), \quad (2.1.16)$$

el superíndice (*) denota el complejo conjugado. A la magnitud de $\langle \vec{S} \rangle$ se le conoce como *irradiancia*, se denota con el símbolo I y sus unidades son energía por área y tiempo. En ocasiones, también se suele denominar a la *irradiancia* como *intensidad*.

2.2. Matriz de amplitud de dispersión

Para describir con mayor detalle la dispersión de una onda electromagnética plana provocada por cualquier partícula, se elige cualquier punto de la partícula como el centro de un sistema de coordenadas cartesianas (x, y, z) , que sirva como sistema de referencia y en el que los vectores base ortonormales $\hat{e}_x$, $\hat{e}_y$ y $\hat{e}_z$ indiquen las direcciones positivas de los ejes x , y y z , respectivamente (Fig. 2.4). A la dirección de propagación de la onda electromagnética incidente, la elegimos paralela al eje z ($\hat{e}_z$). Se desea calcular el campo dispersado por la partícula en un punto r del espacio. La dirección de dispersión $\hat{e}_r$ y la del haz incidente $\hat{e}_z$ definen el *plano de dispersión*, el cual está caracterizado únicamente por el ángulo azimutal φ (excepto cuando $\hat{e}_r$ es paralelo al eje z , si sucede esto, cualquier plano que contenga al eje z es un plano posible de dispersión). El ángulo entre la dirección del haz incidente y la de la luz dispersada está caracterizado con la letra θ y se le conoce como *ángulo de dispersión*. Cuando $\theta = 0^\circ$ se le conoce como dispersión hacia adelante y cuando $\theta = 180^\circ$ se le conoce como dispersión hacia atrás o retrodispersión.

Conviene estudiar el campo eléctrico incidente, que incide en el plano $x - y$, en su componente paralela $\vec{E}_{inc,\parallel}$ y perpendicular $\vec{E}_{inc,\perp}$ al plano de dispersión:

$$\vec{E}_{inc} = (E_{0,\parallel} \hat{e}_{inc,\parallel} + E_{0,\perp} \hat{e}_{inc,\perp}) e^{i(kz - \omega t)} = E_{inc,\parallel} \hat{e}_{inc,\parallel} + E_{inc,\perp} \hat{e}_{inc,\perp}, \quad (2.2.1)$$

donde $\hat{e}_{inc,\parallel}$ y $\hat{e}_{inc,\perp}$ son los vectores unitarios paralelo y perpendicular al plano de dispersión, respectivamente; $k = 2\pi n_{med}/\lambda$, k es el número de onda en el medio que rodea a la partícula, n_{med} es el índice de refracción del medio y λ es la longitud de onda de la luz incidente en el vacío.

Los vectores $\hat{e}_{inc,\parallel}$ y $\hat{e}_{inc,\perp}$ quedan expresados en la base de coordenadas esféricas ($\hat{e}_r$, $\hat{e}_\theta$ y $\hat{e}_\varphi$) como:

$$\hat{e}_{inc,\perp} = \sin \phi \hat{e}_x - \cos \phi \hat{e}_y = -\hat{e}_\phi, \quad (2.2.2)$$

$$\hat{e}_{inc,\parallel} = \cos \phi \hat{e}_x + \sin \phi \hat{e}_y = \sin \theta \hat{e}_r + \cos \theta \hat{e}_\theta, \quad (2.2.3)$$

con $\hat{e}_{inc,\perp} \times \hat{e}_{inc,\parallel} = \hat{e}_z$.

A una distancia suficientemente grande del origen, $(kr) \gg 1$, en la región de campo lejano, el campo eléctrico dispersado, $\vec{E}_{dis}$, tiene un comportamiento casi transversal ($\hat{e}_r \cdot \vec{E}_{dis} \simeq 0$) y decae

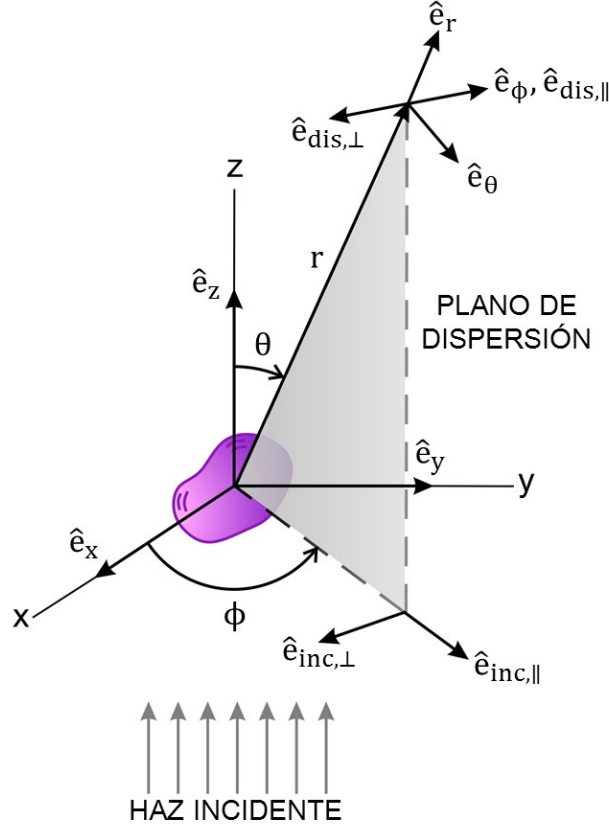


Figura 2.4: Dispersión por una partícula de forma arbitraria

inversamente proporcional con la distancia desde la partícula (r), por lo que se puede escribir con la forma asintótica:

$$\vec{E}_{dis} \sim \frac{e^{ikr}}{-ikr} \vec{A} \quad kr \gg 1, \quad (2.2.4)$$

donde $\hat{e}_r \cdot \vec{A} = 0$ y $\vec{A} = \mathbb{S} \vec{E}_{inc}$, donde $\mathbb{S}$ es una matriz de 2×2 conocida como matriz de amplitud de dispersión. En la región de campo lejano, el campo dispersado se puede escribir en sus componentes paralela y perpendicular:

$$\vec{E}_{dis} = E_{dis,||} \hat{e}_{dis,||} + E_{dis,\perp} \hat{e}_{dis,\perp}, \quad (2.2.5)$$

con $\hat{e}_{dis,||} = \hat{e}_\theta$, $\hat{e}_{dis,\perp} = -\hat{e}_\phi$, $\hat{e}_{dis,\perp} \times \hat{e}_{dis,||} = \hat{e}_r$. Los vectores base $\hat{e}_{dis,||}$ y $\hat{e}_{dis,\perp}$ son paralelo y perpendicular, respectivamente, al plano de dispersión.

Aunque se ha expresado el campo incidente y dispersado en diferentes conjuntos de vectores base (ecuaciones (2.2.1) y (2.2.5)), debido a la linealidad de las condiciones a la frontera (ecuaciones (2.1.11) y (2.1.12)), la amplitud del campo eléctrico dispersado resulta ser una función lineal de la amplitud del campo eléctrico incidente y esto se puede escribir en forma matricial como:

$$\begin{pmatrix} \vec{E}_{dis,||} \\ \vec{E}_{dis,\perp} \end{pmatrix} = -\frac{e^{ik(r-x)}}{ikr} \begin{pmatrix} \mathbb{S}_2 & \mathbb{S}_3 \\ \mathbb{S}_4 & \mathbb{S}_1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \vec{E}_{inc,||} \\ \vec{E}_{inc,\perp} \end{pmatrix}, \quad (2.2.6)$$

la matriz que relaciona las amplitudes del campo incidente con las del campo dispersado, se conoce como matriz de amplitud de dispersión y cada uno de sus elementos S_i ($i = 1, 2, 3, 4$) es complejo y depende de θ (el ángulo de dispersión) y de ϕ (el ángulo azimutal). Pero, raramente son medidas la parte real e imaginaria de los elementos de esta matriz para todos los valores de θ y ϕ [17], [18].

2.3. Parámetros de Stokes

Además de la relación existente entre la amplitud del campo eléctrico dispersado con el incidente (ecuación 2.2.6)), existe una relación entre los parámetros de Stokes de los campos anteriores, pero antes de explicar tal relación, se describirán estos parámetros.

En 1852, Sir George Stokes demostró que el estado de polarización de un haz de luz natural, total o parcialmente polarizado puede ser descrito por cuatro cantidades, hoy llamadas los *parámetros de Stokes* y para deducirlos, se consideran cuatro experimentos hipotéticos, que son realizados con un haz monocromático, un detector y varios polarizadores, como los que se observan en la Fig. 2.5.

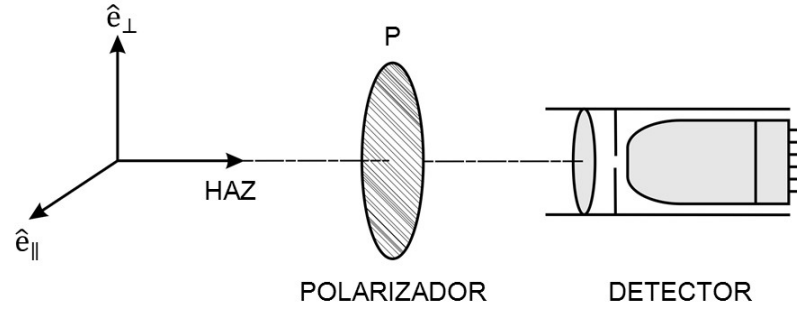


Figura 2.5: Diseño del experimento para obtener los parámetros de Stokes

El detector responde a la irradiancia, independientemente del estado de polarización de la luz y los polarizadores no cambian la amplitud del campo electromagnético transmitido. Conviene expresar el campo eléctrico en sus componentes paralela y perpendicular,

$$\vec{E} = \vec{E}_0 e^{i(kz - \omega t)}; \quad \vec{E}_0 = E_{\parallel} \hat{e}_{\parallel} + E_{\perp} \hat{e}_{\perp}. \quad (2.3.1)$$

- Experimento I (sin polarizador): Si no existe un polarizador, la irradiancia registrada por el detector será equivalente a la irradiancia incidente $E_{\parallel} E_{\parallel}^* + E_{\perp} E_{\perp}^*$, por simplicidad se omite el factor $k/2\omega\mu_0$
- Experimento II (polarizador horizontal y vertical): 1) Si P es un polarizador horizontal; la amplitud de la onda transmitida es $E_{\parallel}$ y la irradiancia $I_{\parallel}$ registrada por el detector es $E_{\parallel} E_{\parallel}^*$. 2) Si P es un polarizador vertical; la amplitud de la onda transmitida es $E_{\perp}$ y la irradiancia $I_{\perp}$ registrada por el detector es $E_{\perp} E_{\perp}^*$. La diferencia entre las dos irradiancias medidas es:

$$I_{\parallel} - I_{\perp} = E_{\parallel} E_{\parallel}^* - E_{\perp} E_{\perp}^*. \quad (2.3.2)$$

- Experimento III (polarizadores $+45^\circ$ y -45°): 1) Si P es un polarizador $+45^\circ$; la amplitud de la onda transmitida es $(E_{\parallel} + E_{\perp})/\sqrt{2}$ y la irradiancia I_+ es $(E_{\parallel} E_{\parallel}^* + E_{\parallel} E_{\perp}^* + E_{\perp} E_{\parallel}^* + E_{\perp} E_{\perp}^*)/2$.

CAPÍTULO 2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.4. MATRIZ DE DISPERSIÓN

2) Si P es un polarizador -45° ; la amplitud de la onda transmitida es $(E_{\parallel} - E_{\perp})/\sqrt{2}$ y la irradiancia I_- es $(E_{\parallel}E_{\parallel}^* - E_{\parallel}E_{\perp}^* - E_{\perp}E_{\parallel}^* + E_{\perp}E_{\perp}^*)/2$. La diferencia estas dos irradiancias es:

$$I_+ - I_- = E_{\parallel}E_{\perp}^* + E_{\perp}E_{\parallel}^*. \quad (2.3.3)$$

- Experimento IV (polarizadores circulares): 1) Si P es un polarizador circular a derechas, la irradiancia transmitida I_R es $(E_{\parallel}E_{\parallel}^* - iE_{\parallel}^*E_{\perp} + iE_{\perp}^*E_{\parallel} + E_{\perp}E_{\perp}^*)/2$. 2) Si P es un polarizador circular a izquierdas, la irradiancia transmitida I_L es $(E_{\parallel}E_{\parallel}^* + iE_{\perp}^*E_{\parallel} - iE_{\parallel}^*E_{\perp} + E_{\perp}E_{\perp}^*)/2$. La diferencia entre estas dos irradiancias es:

$$I_R - I_L = i(E_{\perp}^*E_{\parallel} + E_{\parallel}^*E_{\perp}). \quad (2.3.4)$$

Los experimentos anteriores son suficientes para determinar los *parámetros de Stokes* I , Q , U , V :

$$I = \langle E_{\parallel}E_{\parallel}^* + E_{\perp}E_{\perp}^* \rangle \quad (2.3.5)$$

$$Q = \langle E_{\parallel}E_{\parallel}^* - E_{\perp}E_{\perp}^* \rangle \quad (2.3.6)$$

$$U = \langle E_{\parallel}E_{\perp}^* + E_{\perp}E_{\parallel}^* \rangle \quad (2.3.7)$$

$$V = \langle i(E_{\perp}^*E_{\parallel} - E_{\parallel}^*E_{\perp}) \rangle \quad (2.3.8)$$

en las ecuaciones se ha omitido el factor $k/2\omega\mu_0$ porque las irradiancias medidas son relativas, no absolutas. Al analizar los parámetros de Stokes, se deduce que I es simplemente la irradiancia incidente, Q refleja si existe una polarización horizontal (si $Q > 0$) o vertical (si $Q < 0$). Si $Q = 0$, el haz puede ser elíptico a $\pm 45^\circ$, circular o no polarizado. U implica que la luz se encuentra polarizada linealmente en la dirección $+45^\circ$ (cuando $U > 0$) o en la dirección -45° (cuando $U < 0$) o en ninguna de las dos ($U = 0$). Mientras que V indica si el haz tiene un sentido a la derecha ($V > 0$) o a la izquierda ($V < 0$) o ninguno de los dos ($V = 0$).

Los parámetros de Stokes no son independientes:

$$I^2 = Q^2 + U^2 + V^2, \quad (2.3.9)$$

si se cumple la igualdad de la ecuación (2.3.9) se dice que la luz se encuentra totalmente polarizada, si la luz no esta polarizada $Q = U = V = 0$. Si no se cumple la igualdad de la ecuación (2.3.9), es decir, que $I^2 \geq Q^2 + U^2 + V^2$, se define un grado de polarización igual a $\sqrt{Q^2 + U^2 + V^2}/I$; un grado de polarización lineal $\sqrt{Q^2 + U^2}/I$ y un grado de polarización circular V/I .

H. Mueller señaló que los parámetros de Stokes se pueden representar como vector columna de cuatro elementos:

$$\begin{pmatrix} I \\ Q \\ U \\ V \end{pmatrix} \quad (2.3.10)$$

donde la irradiancia generalmente se normaliza a la unidad [17], [19].

2.4. Matriz de dispersión

Continuando con la descripción de la dispersión de una onda electromagnética plana provocada por una partícula, al realizar experimentos similares a los de la sección 2.3, se obtienen los

CAPÍTULO 2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.4. MATRIZ DE DISPERSIÓN

parámetros de Stokes de la luz dispersada por una partícula:

$$I_s = \langle E_{\parallel s} E_{\parallel s}^* + E_{\perp s} E_{\perp s}^* \rangle \quad (2.4.1)$$

$$Q_s = \langle E_{\parallel s} E_{\parallel s}^* - E_{\perp s} E_{\perp s}^* \rangle \quad (2.4.2)$$

$$U_s = \langle E_{\parallel s} E_{\perp s}^* + E_{\perp s} E_{\parallel s}^* \rangle \quad (2.4.3)$$

$$V_s = i(E_{\perp s}^* E_{\parallel s} + E_{\parallel s}^* E_{\perp s}) \quad (2.4.4)$$

donde nuevamente se ha omitido el factor $k/2\omega\mu_0$. La relación entre los parámetros de Stokes de la luz incidente y dispersada se deriva de la matriz de amplitud de dispersión (ecuación (2.2.6)) y tiene la siguiente expresión:

$$\begin{pmatrix} I_s \\ Q_s \\ U_s \\ V_s \end{pmatrix} = \frac{1}{k^2 r^2} \begin{pmatrix} S_{11} & S_{12} & S_{13} & S_{14} \\ S_{21} & S_{22} & S_{23} & S_{24} \\ S_{31} & S_{32} & S_{33} & S_{34} \\ S_{41} & S_{42} & S_{43} & S_{44} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} I_i \\ Q_i \\ U_i \\ V_i \end{pmatrix} \quad (2.4.5)$$

$$\begin{aligned} S_{11} &= \frac{1}{2} (|S_1|^2 + |S_2|^2 + |S_3|^2 + |S_4|^2), \\ S_{12} &= \frac{1}{2} (|S_2|^2 - |S_1|^2 + |S_4|^2 - |S_3|^2), \\ S_{13} &= \text{Re} \{ S_2 S_3^* + S_1 S_4^* \}, \\ S_{14} &= \text{Im} \{ S_2 S_3^* - S_1 S_4^* \}, \\ S_{21} &= \frac{1}{2} (|S_2|^2 - |S_1|^2 - |S_4|^2 + |S_3|^2), \\ S_{22} &= \frac{1}{2} (|S_2|^2 + |S_1|^2 - |S_4|^2 - |S_3|^2), \\ S_{23} &= \text{Re} \{ S_2 S_3^* - S_1 S_4^* \}, \\ S_{24} &= \text{Im} \{ S_2 S_3^* + S_1 S_4^* \}, \\ S_{31} &= \text{Re} \{ S_2 S_4^* + S_1 S_3^* \}, \\ S_{32} &= \text{Re} \{ S_2 S_4^* - S_1 S_3^* \}, \\ S_{33} &= \text{Re} \{ S_1 S_2^* + S_3 S_4^* \}, \\ S_{34} &= \text{Im} \{ S_2 S_1^* + S_4 S_3^* \}, \\ S_{41} &= \text{Im} \{ S_2^* S_4 + S_3^* S_1 \}, \\ S_{42} &= \text{Im} \{ S_2^* S_4 - S_3^* S_1 \}, \\ S_{43} &= \text{Im} \{ S_1 S_2^* - S_3 S_4^* \}, \\ S_{44} &= \text{Re} \{ S_1 S_2^* - S_3 S_4^* \}, \end{aligned}$$

la matriz 4×4 de la ecuación (2.4.5), es conocida como la *matriz de dispersión* o *matriz de Mueller* para la dispersión por una partícula. Los 16 elementos de la matriz de dispersión dependen de la dirección de dispersión y no son cero, aunque este número de elementos se puede reducir por simetría. Además, no son independientes, únicamente 9 de ellos lo son y deben ser independientes para cualquier valor de ϕ y para cualquier partícula o colección de partículas.

Resulta complicado interpretar cada elemento de la matriz de Mueller individualmente, pero se conoce que S_{11} especifica la distribución angular de luz dispersada cuando la luz que se incide es no polarizada; S_{14} está relacionado con la diferencia en las irradiancias cuando se incide luz circularmente polarizada a la derecha y a la izquierda; S_{12} esta asociado con la diferencia en las irradiancias cuando se incide luz polarizada paralela y perpendicularmente al plano de dispersión y la combinación de varios elementos de esta matriz, están relacionados con el cambio del estado de polarización de la luz incidente.

CAPÍTULO 2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.5. EXTINCIÓN, DISPERSIÓN Y ABSORCIÓN

Los parámetros de Stokes para la luz dispersada por una colección de partículas separadas y dispuestas al azar consiste en la suma de los parámetros de Stokes de la luz dispersada por cada partícula individual. Además, se conoce que la dispersión por una partícula o por un conjunto de partículas idénticas no va a disminuir el grado de polarización de la luz incidente totalmente polarizada, sin embargo, la dispersión de luz por una colección de partículas diferentes, va a resultar en la despolarización de la luz incidente totalmente polarizada.

Toda la información relacionada a la dispersión elástica por partículas pequeñas, está contenida en la matriz de Mueller, en la que cada elemento va a ser una función ángulo-dependiente de la longitud de onda, tamaño de partícula, forma y composición. Sin embargo, la mayoría de las mediciones y cálculos están restringidas a luz incidente no polarizada o polarizada linealmente por una colección de partículas orientadas al azar.

Las irradiancias dispersadas por irradiancia unitaria incidente, cuando se incide luz polarizada paralela o perpendicularmente al plano de dispersión, se denotan como i_p e i_s , respectivamente (esta notación proviene de las palabras en alemán *parallel* y *senkrecht*, que significan paralelo y perpendicular) y se calculan usando las siguientes expresiones (donde se omite $k^2 r^2$):

$$i_p = S_{11} + S_{12} \quad (2.4.6)$$

$$i_s = S_{11} - S_{12} \quad (2.4.7)$$

En la siguiente sección se presenta la deducción de las eficiencias de absorción, dispersión y extinción en términos de los campos absorbidos, dispersados y extinguidos para un sistema formado por un conjunto de partículas.

2.5. Extinción, dispersión y absorción

En la Fig. 2.6, una onda electromagnética incide sobre un conjunto de partículas y un detector capta la onda dispersada por éstas. La potencia recibida por el detector en presencia de las partículas es U . Si se retiran las partículas, la potencia recibida por el detector será U_0 con $U_0 > U$, entonces, se dice que la presencia de las partículas provoca la extinción del haz incidente. Si el medio en el que están las partículas es no absorbente, la diferencia $U_0 - U$ esta asociada a la energía absorbida y dispersada por las partículas. La extinción depende de múltiples factores, como la composición química de las partículas, su forma, tamaño, orientación, el medio que las rodea, el número de partículas y el estado de polarización y longitud de onda del haz incidente. A pesar de lo anterior, hay características en la extinción que son comunes a todas las partículas.

Considerando una sola partícula embebida en un medio no absorbente e iluminada por una onda plana, la potencia de radiación incidente sobre la partícula es $P_{inc} = AI_{inc}$, donde I_{inc} es la intensidad que caracteriza el campo electromagnético de la radiación incidente y A es el área de la sección transversal de la partícula que atraviesa la radiación. Por ejemplo, para una partícula esférica de radio a , A es igual a πa^2 . De manera intuitiva, la potencia dispersada por una sola partícula es proporcional a la intensidad de la radiación incidente I_{inc} :

$$P_{dis} = C_{dis} I_{inc}, \quad (2.5.1)$$

donde la constante de proporcionalidad es conocida como la *sección transversal de dispersión* y tiene unidades de área. Si la partícula absorbe parte de la radiación incidente, la potencia absorbida se escribe como:

$$P_{abs} = C_{abs} I_{inc}, \quad (2.5.2)$$

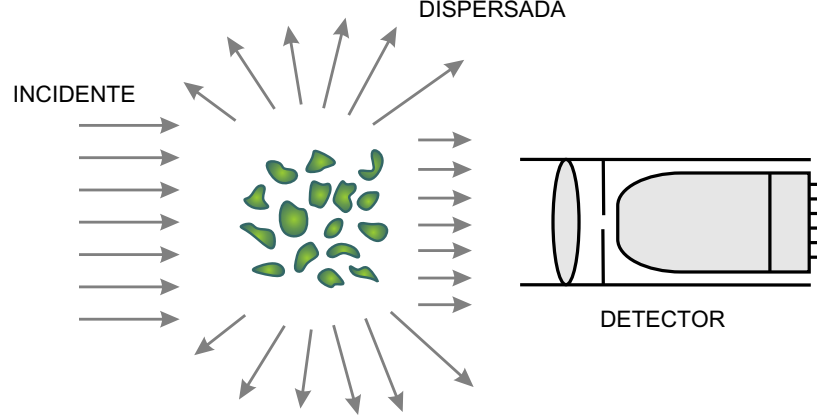


Figura 2.6: Extinción de una onda electromagnética provocada por una colección de partículas y captada por un detector.

donde C_{abs} es la *sección transversal de absorción*. La extinción consiste en la atenuación de una onda electromagnética, causada por los fenómenos de dispersión y absorción, cuando ésta atraviesa un medio particulado y es igual a:

$$P_{ext} = P_{abs} + P_{dis}, \quad (2.5.3)$$

y desde luego:

$$C_{ext} = C_{abs} + C_{dis}. \quad (2.5.4)$$

La razón entre la potencia dispersada y la incidente es conocida como la *eficiencia de dispersión*, es adimensional y se expresa como:

$$Q_{dis} = \frac{P_{dis}}{P_{inc}} = \frac{C_{dis}}{A}. \quad (2.5.5)$$

De igual manera se definen las *eficiencias de extinción* y de *absorción* como:

$$Q_{ext} = \frac{P_{ext}}{P_{inc}} = \frac{C_{ext}}{A}, \quad Q_{abs} = \frac{P_{abs}}{P_{inc}} = \frac{C_{abs}}{A}, \quad (2.5.6)$$

por lo que se cumple:

$$Q_{ext} = Q_{abs} + Q_{dis}. \quad (2.5.7)$$

Si se construye una esfera imaginaria de radio r y área A , alrededor de la partícula que se está analizando (Fig. 2.7), la potencia de la onda electromagnética que atraviesa esta esfera en términos del vector de Poynting promediado en el tiempo es:

$$P = - \int_A \langle \vec{S} \rangle \cdot \hat{e}_r dA, \quad (2.5.8)$$

donde $\langle \vec{S} \rangle$ está dado por la ecuación (2.1.16).

Para conocer las eficiencias se necesita el vector de Poynting fuera de la partícula. El promedio temporal del vector de Poynting $\langle \vec{S} \rangle$ en cualquier punto del medio que rodea a la partícula, se puede escribir como la suma de tres terminos:

$$\langle \vec{S} \rangle = \frac{1}{2} Re(\vec{E}_m \times \vec{H}_m^*) = \langle \vec{S}_{inc} \rangle + \langle \vec{S}_{dis} \rangle + \langle \vec{S}_{ext} \rangle \quad (2.5.9)$$

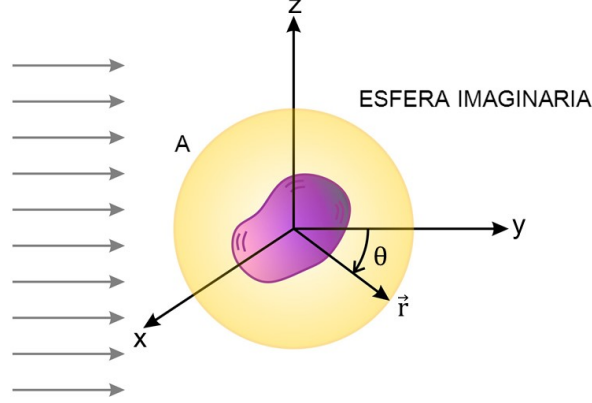


Figura 2.7: Esfera imaginaria que rodea una partícula de forma arbitraria.

donde,

$$\langle \vec{S}_{inc} \rangle = \frac{1}{2} Re(\vec{E}_{inc} \times \vec{H}_{inc}^*), \quad (2.5.10)$$

$$\langle \vec{S}_{dis} \rangle = \frac{1}{2} Re(\vec{E}_{dis} \times \vec{H}_{dis}^*), \quad (2.5.11)$$

$$\langle \vec{S}_{ext} \rangle = \frac{1}{2} Re(\vec{E}_{inc} \times \vec{H}_{dis}^* + \vec{E}_{dis} \times \vec{H}_{inc}^*), \quad (2.5.12)$$

$\langle \vec{S}_{inc} \rangle$ es el vector de Poynting asociado a la onda incidente y es independiente de la posición si el medio no es absorbente; $\langle \vec{S}_{dis} \rangle$ es el vector de Poynting del campo dispersado y $\langle \vec{S}_{ext} \rangle$ es el término que surge de la interacción entre la onda incidente y la dispersada.

La potencia de extinción queda expresada en términos del vector de Poynting como:

$$P_{ext} = - \int_A \langle \vec{S}_{ext} \rangle \cdot \hat{e}_r dA = -\frac{1}{2} Re \int_A (\vec{E}_{inc} \times \vec{H}_{dis}^* + \vec{E}_{dis} \times \vec{H}_{inc}^*) \cdot \hat{e}_r dA \quad (2.5.13)$$

A continuación, se calcula la P_{ext} para el caso particular de una onda plana incidente $E_{inc} = E\hat{e}_x$ polarizada en dirección e_x . El rotacional del campo incidente es $\nabla \times \vec{E}_{inc} = ik\hat{k} \times \vec{E}_{inc}$, entonces de la ecuación de Maxwell (2.1.7) se tiene:

$$\vec{H}_{inc} = \frac{k}{\omega\mu} \hat{k} \times \vec{E}_{inc}. \quad (2.5.14)$$

La potencia de absorción no depende del radio de la esfera imaginaria, porque el medio es no absorbente, por eso se puede elegir r lo suficientemente grande como para estar en la región de campo lejano, donde:

$$\vec{E}_{dis} \sim -\frac{e^{ik(r-z)}}{ikr} E \vec{X}, \quad (2.5.15)$$

se ha denotado el *vector de amplitud de dispersión* como $\vec{X}$, para recordar la dirección de polarización elegida para el campo incidente. $\vec{X}$ está relacionado con los elementos de la matriz de amplitud de dispersión $\mathbb{S}_j$:

$$\vec{X} = (\mathbb{S}_2 \cos \phi + \mathbb{S}_3 \sin \phi) \hat{e}_{dis,\parallel} + (\mathbb{S}_4 \cos \phi + \mathbb{S}_1 \sin \phi) \hat{e}_{dis,\perp}, \quad (2.5.16)$$

para calcular el campo magnético, se usa nuevamente la ecuación (2.1.7) y se obtiene:

$$\nabla \times \vec{E}_{dis} = -\frac{e^{ik(r-z)}}{ikr} \left[ik + \frac{1}{r} \right] \hat{e}_r \times \vec{X} E = i\omega\mu \vec{H}_{dis}, \quad (2.5.17)$$

se pueden despreciar términos del orden r^{-2} por estar en la región de campo lejano, entonces queda:

$$\vec{H}_{dis} \sim \frac{k}{\omega\mu} \hat{e}_r \times \vec{E}_{dis}. \quad (2.5.18)$$

Usando las expresiones para los campos $(\vec{E}_{inc}, \vec{H}_{inc})$ y $(\vec{E}_{dis}, \vec{H}_{dis})$ e identidades vectoriales, se calcula el primer producto vectorial de la ecuación (2.5.13) y se obtiene que:

$$(\vec{E}_{inc} \times \vec{H}_{dis}^*) \cdot \hat{e}_r = \frac{k}{\omega\mu} \left[(\vec{E}_{inc} \cdot \vec{E}_{dis}^*) - (\vec{E}_{inc} \cdot \hat{e}_r)(\vec{E}_{dis}^* \cdot \hat{e}_r) \right], \quad (2.5.19)$$

pero por estar en la región de campo lejano, donde $\vec{E}_{dis}$ es un campo transversal, se cumple que $\hat{e}_r \cdot \vec{X} = 0$, lo que permite escribir:

$$(\vec{E}_{inc} \times \vec{H}_{dis}^*) \cdot \hat{e}_r = \frac{k}{\omega\mu} (\vec{E}_{inc} \cdot \vec{E}_{dis}^*), \quad (2.5.20)$$

luego, al realizar los cálculos necesarios, el segundo producto vectorial de la ecuación (2.5.13) resulta ser:

$$(\vec{E}_{dis} \times \vec{H}_{inc}^*) \cdot \hat{e}_r = \frac{k|E|^2}{\omega\mu} e^{ik(r-z)} \left[\vec{X} \cdot \hat{e}_x \cos \theta - \vec{X} \cdot \hat{e}_z \sin \theta \cos \phi \right], \quad (2.5.21)$$

entonces la expresión para la P_{ext} queda reescrita como:

$$P_{ext} = - \frac{k|E|^2}{\omega\mu} \text{Re} \left\{ \frac{e^{-ikr}}{ikr} \int_A e^{ikz} \vec{X}^* \cdot \hat{e}_x dA - \frac{e^{ikr}}{ikr} \left[\int_A e^{-ikz} \cos \theta \vec{X} \cdot \hat{e}_x dA - \int_A e^{-ikz} \cos \phi \vec{X} \cdot \hat{e}_z dA \right] \right\}, \quad (2.5.22)$$

En el límite $kr \rightarrow \infty$, la potencia de extinción queda como:

$$P_{ext} = I_{inc} \frac{4\pi}{k^2} \text{Re} \left\{ (\vec{X} \cdot \hat{e}_x) |_{\theta=0} \right\}, \quad (2.5.23)$$

donde I_{inc} es la irradiancia incidente:

$$I_{inc} = |\langle \vec{S}_{inc} \rangle|^2 = \frac{k}{2\omega\mu} |\vec{E}_{inc}|^2, \quad (2.5.24)$$

por último, con las ecuaciones (2.5.23) y (2.5.24), la sección transversal de extinción se expresa como:

$$C_{ext} = \frac{P_{ext}}{I_{inc}} = \frac{4\pi}{k^2} \text{Re} \left\{ (\vec{X} \cdot \hat{e}_x) |_{\theta=0} \right\}. \quad (2.5.25)$$

La ecuación (2.5.25) es una forma particular del *teorema óptico* y es aplicado a los fenómenos de dispersión que involucran ondas acústicas, electromagnéticas y partículas elementales e indica que la extinción depende únicamente de la amplitud dispersada en la dirección hacia adelante ($\theta = 0^\circ$).

CAPÍTULO 2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS
2.6. PLASMONES DE SUPERFICIE DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA

En seguida, se procederá a determinar la potencia dispersada a través de la superficie A :

$$\begin{aligned}
 P_{dis} &= \int_A \langle \vec{S}_{dis} \rangle \cdot \hat{e}_r dA, \\
 &= \frac{1}{2} \frac{k}{\omega \mu} \text{Re} \int_A (\vec{E}_{dis} \times \hat{e}_r \times \vec{E}_{dis}) \cdot \hat{e}_r dA, \\
 &= \frac{k}{2\omega \mu} \text{Re} \int_A |\vec{E}_{dis}|^2 dA,
 \end{aligned} \tag{2.5.26}$$

por lo que:

$$C_{dis} = \frac{P_{dis}}{I_{inc}} = \int_A^{2\pi} \int_0^\pi \frac{|\vec{X}|^2}{k^2} \sin \theta d\theta d\phi = \int_{4\pi} \frac{|\vec{X}|^2}{k^2} d\Omega, \tag{2.5.27}$$

la cantidad $|\vec{X}|^2/k^2$ es conocida como la *diferencial de la sección transversal de dispersión* y se denota como $dC_{dis}/d\Omega$. Físicamente representa la distribución angular de la luz dispersada, es decir, la cantidad de luz dispersada dentro de una unidad de ángulo sólido en una dirección específica. También, puede representarse en términos de la irradiancia dispersada (I_d), de la irradiancia incidente (I_i) y de la distancia al detector (r):

$$\frac{dC_{dis}}{d\Omega} = \frac{r^2 I_d}{I_i}. \tag{2.5.28}$$

El valor de C_{abs} se calcula simplemente como la diferencia de las secciones eficaces de extinción y dispersión: $C_{abs} = C_{ext} - C_{dis}$.

Otra cantidad que brinda información importante es el promedio del coseno del ángulo de dispersión (θ) o *parámetro de simetría*, g , que esta definido como:

$$g = \langle \cos \theta \rangle = \int_{4\pi} \frac{|\vec{X}|^2}{k^2 C_{sca}} \cos \theta d\Omega, \tag{2.5.29}$$

para una partícula que dispersa luz isotrópicamente (es decir, sin dirección preferencial) g tiende a disminuir y también decrece si la dispersión es simétrica en un ángulo de dispersión cercano a 90° . Además, indica la dirección de la luz dispersada [20]: g es positiva si la partícula dispersa más luz en la dirección hacia adelante ($\theta = 0^\circ$), g es negativa si la dispersión de luz es en la dirección hacia atrás ($\theta = 180^\circ$) [17], [18].

Dado que en el presente trabajo se aborda el estudio de nanopartículas de plata y como éstas son plasmónicas, a continuación se describe el fenómeno de plasmón de superficie y sus características principales.

2.6. Plasmones de superficie de las nanopartículas de plata

Una de las propiedades más importantes de las nanopartículas metálicas, es que presentan *plasmones de superficie*, los cuales han sido ampliamente investigados por sus aplicaciones potenciales en óptica, magneto-óptica, fotónica, sensado químico y biológico, así como en terapia y diagnóstico médico [21]. Básicamente, un plasmón de superficie (PS) involucra oscilaciones colectivas de los electrones de conducción, generadas por el campo eléctrico de la luz y se denominan de superficie porque estas oscilaciones de cargas ocurren de manera transitoria en la superficie de nanopartículas [22].

CAPÍTULO 2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.6. PLASMONES DE SUPERFICIE DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA

Para entender mejor el concepto de PS, se describe a una nanopartícula metálica como una estructura cristalina cuyos núcleos positivos están fijos y con electrones de conducción moviéndose casi libremente dentro de la NP, como se muestra en la Fig. 2.8. Cuando la nanopartícula es iluminada, el campo eléctrico de la luz ejerce una fuerza que obliga a los electrones a moverse en el sentido contrario de éste, hacia la superficie de la nanopartícula. Como los electrones están confinados en la nanopartícula, las cargas negativas tienden a acumularse en un lado, quedando un exceso de cargas positivas en el lado contrario, creándose así un dipolo. Este dipolo genera un campo eléctrico restaurador ($\vec{E}_{res}$) dentro de la nanopartícula, contrario al de la luz, que forza a los electrones a regresar a su posición de equilibrio [23]. Cuando el campo eléctrico tiene una dependencia armónica con el tiempo, después de un tiempo $t + T/2$ (T es el periodo de oscilación del campo) el dipolo formado por la distribución de cargas positivas y negativas tendrá una orientación opuesta a la que tenía al tiempo t , generando un *dipolo oscilante*. Esta oscilación de la distribución de cargas en la cercanía y sobre la superficie de las nanopartículas es lo que se conoce como plasmón de superficie dipolar y la frecuencia a la cual son excitados, se le conoce como *frecuencia de resonancia del plasmón de superficie*. Dependiendo del tamaño y forma de la NP es posible excitar otro tipo de distribuciones de carga, por ejemplo cuadrupolos (octupolos), conocidos como plasmón de superficie cuadrupolar (octupolar), y de manera similar para distribuciones de carga de mayor orden [18].

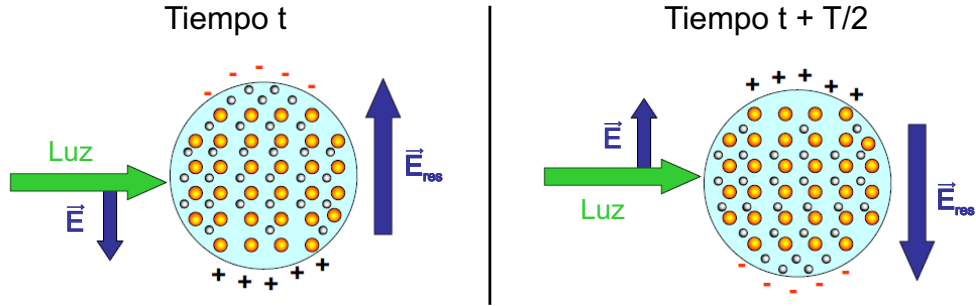


Figura 2.8: El campo eléctrico de la luz induce un movimiento de los electrones, que se acumulan en la cercanía de la superficie de la NP, variante en un tiempo t y $t+T/2$. Las esferas plateadas y doradas representan los electrones y núcleos, respectivamente.

En 1908 Mie desarrolló la solución para el problema de dispersión y absorción por partículas esféricas de tamaño arbitrario, inmersas en un medio homogéneo y considerando una onda incidente plana monocromática. En la teoría de Mie, las secciones transversales de dispersión y extinción C_{dis} y C_{ext} son expresadas en series de términos que involucran los polinomios de Legendre y las funciones esféricas de Ricatti-Bessel en función del parámetro de tamaño y de la razón entre los índices de refracción del medio y de la esfera. Expresado en forma de serie, los campos electromagnéticos dispersado y extinguido dan cuenta de los términos asociados a las diferentes contribuciones multipolares. Si se considera el caso de una partícula esférica pequeña comparada con la longitud de onda incidente, el campo eléctrico de la luz puede tomarse como constante a través de toda la partícula, a esta aproximación se le conoce como *aproximación electrostática*. Por lo que el desplazamiento de las cargas da lugar a una distribución dipolar sobre la superficie de ésta (Fig. 2.9) y en este caso las eficiencias de absorción y dispersión (Q_{abs} y Q_{dis}) pueden expresarse como:

$$Q_{abs} = 4x \text{Im} \left\{ \frac{\varepsilon_{esf}(\lambda) - \varepsilon_{med}}{\varepsilon_{esf}(\lambda) + 2\varepsilon_{med}} \right\}, \quad (2.6.1)$$

CAPÍTULO 2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.6. PLASMONES DE SUPERFICIE DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA

$$Q_{dis} = \frac{8}{3}x^4 \left| \frac{\varepsilon_{esf}(\lambda) - \varepsilon_{med}}{\varepsilon_{esf}(\lambda) + 2\varepsilon_{med}} \right|^2, \quad (2.6.2)$$

donde x es el parámetro de tamaño (ver ecuación 4.2.6), $\varepsilon_{esf}(\lambda)$ es la función dieléctrica de la esfera ($\varepsilon_{esf}(\lambda) = \varepsilon_1 + i\varepsilon_2$, con ε_1 la parte real y ε_2 la parte imaginaria) y ε_{med} la función dieléctrica del medio en donde se encuentra inmersa. La ecuación (2.6.1) es exacta si la contribución de la dispersión es mucho más pequeña que la absorción, tal y como ocurre con nanopartículas esféricas pequeñas. La importancia de ésta ecuación radica en que, debido a que los PS están asociados con la Q_{abs} , con ella se puede estimar la longitud de resonancia del plasmón de superficie dipolar cuando Q_{abs} alcanza su máximo valor, lo cual se cumple cuando,

$$\varepsilon_{esf}(\lambda) = -2\varepsilon_{med}, \quad (2.6.3)$$

y como se puede ver, depende del comportamiento de la función dieléctrica. En el caso de metales en bulto ε es función de la frecuencia, pero a escala nano ε depende de la frecuencia y tamaño de la NP. En el presente trabajo hemos estudiado NPs Ag de diámetro 50 nm, para las cuales se ha reportado que los efectos de tamaño no son tan importantes y a primera aproximación se puede usar la función dieléctrica del metal en bulto [18].

En una gráfica de Q_{abs} en función de la longitud de onda λ , la posición del máximo (longitud de onda de resonancia del PS) va a estar determinada por ε_1 y el ancho de éste va a depender de ε_2 y ε_{med} [22].

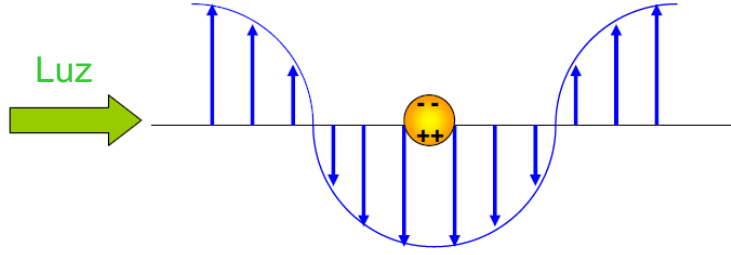


Figura 2.9: Distribución de carga dipolar en una NP pequeña comparada con la longitud de onda incidente.

En el caso de NPs metálicas esféricas con un tamaño mayor a 30 nm, la distribución de carga en la superficie ya no es uniforme y para describirla se necesitan momentos multipolares de orden mayor al dipolar, como el cuadrupolar que se observa en la Fig 2.12. Cuando esto sucede, el espectro de absorción muestra más de una resonancia y por lo tanto el espectro se hace más ancho y asimétrico. Las resonancias de plasmones de superficie multipolares aparecen en los espectros a menores longitudes de onda que la dipolar y conforme aumenta el tamaño de la nanopartícula, el plasmón dipolar se recorre hacia longitudes de onda mayores. Experimentalmente, se conoce que para NPs Ag cuyo tamaño se encuentra en un rango entre 10 y 50 nm los plasmones de superficie dipolares se encuentran en longitudes de onda mayores que los cuadrupolares [18].

En 2005, Noguez [24] reportó el cálculo de la Q_{abs} para una esfera de radio 7 nm y otra de 40 nm, usando la teoría de Mie (ver Fig. 2.10). En el caso de la NP de radio 7 nm, únicamente es posible observar el plasmón dipolar (Fig. 2.10 a)), mientras que para la de 40 nm (Fig. 2.10 b)) es posible distinguir el plasmón dipolar (pico más intenso) y el cuadrupolar (pico menos intenso).

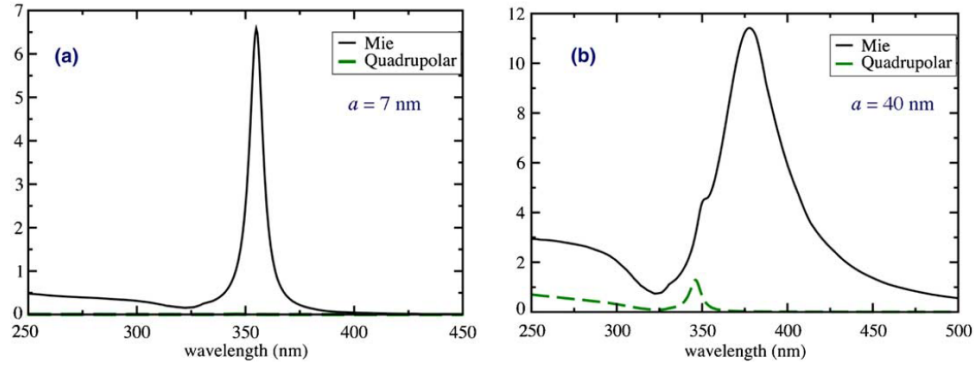


Figura 2.10: Q_{abs} de NPs Ag esféricas con diferentes radios: a) 7nm y b) 40 nm. Imagen tomada de [24].

Por otra parte, los plasmones cuadrupolares y de mayor orden también son característicos de NPs con morfología no esférica y pequeñas. Por ejemplo, A. L. González y Noguez [25] calcularon el espectro de absorción de un cubo de volumen igual al de una esfera de 10 nm y lograron identificar 6 resonancias, la dipolar y cuadrupolar corresponden a las de mayor longitud de onda (ver Fig. 2.11)

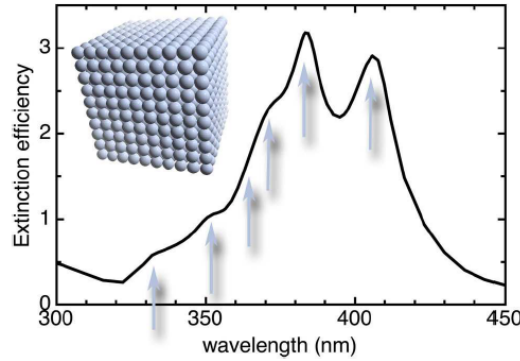


Figura 2.11: Eficiencia de extinción de una NP cúbica, las 6 principales resonancias de los plasmones están indicadas con flechas. Imagen tomada de [25]

Se conoce que en nanopartículas con un tamaño mayor a 30 nm, los efectos de dispersión llegan a ser importantes y la radiación secundaria que generan los electrones, hace que éstos pierdan energía y amortigüen su movimiento. Por otro lado, en nanopartículas de menor tamaño que 30 nm, el efecto de absorción es el más importante [18], [22], [23].

Se puede usar la ecuación (2.6.3) para encontrar la resonancia del o los plasmones de superficie, para ello es necesario conocer la función dieléctrica del material que compone la nanopartícula y en ciertos casos, se puede usar la función dieléctrica medida experimentalmente para materiales en bulto ($\epsilon_{exp}(\omega)$) ¹. Esta función dieléctrica tiene contribuciones de transiciones electrónicas inter e intrabanda, las cuales son aditivas:

¹La función dieléctrica de una NP depende del tamaño de la misma, ello debido al confinamiento de los electrones, llamado efectos de tamaño, estos son importantes en el estudio de NPs Ag de tamaño menor a 20 nm de diámetro [18], [26].

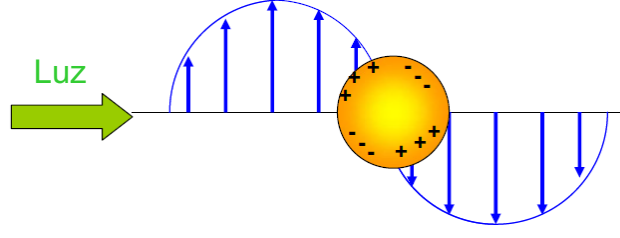


Figura 2.12: Distribución de carga cuadrupolar en una NP grande comparada con la longitud de onda incidente.

$$\varepsilon_{exp}(\omega) = \varepsilon_{inter}(\omega) + \varepsilon_{intra}(\omega). \quad (2.6.4)$$

La contribución interbanda se debe a transiciones electrónicas de bandas ocupadas a bandas vacías en el material metálico en bulto, separadas por una brecha de energía, éstas transiciones se asocian a electrones de los niveles más externos de los núcleos positivos. Se explicará lo anterior con un poco más de detalle. Se sabe que en un material metálico, las bandas de valencia y conducción se traslapan formando un espectro continuo de estados disponibles. Sin embargo, algunos niveles internos no se despliegan lo suficiente para traslaparse con la banda de conducción, pero si se hace incidir radiación electromagnética ultravioleta, se puede dar lugar a las transiciones interbanda, que no contribuyen en lo absoluto a las resonancias de plasmones de superficie.

Por otro lado, las contribuciones intrabanda vienen de transiciones electrónicas en el nivel de Fermi a bandas que se encuentran casi llenas, o cuando una banda llena se traslapa en energía con una banda vacía. Estas transiciones intrabanda generan mecanismos de absorción pero a energías muy bajas. En metales, los electrones del nivel de Fermi son excitados por fotones de muy baja energía, por lo que se considera prácticamente como electrones libres. Para estudiar los electrones libres de un metal, Drude propuso un modelo de gas de electrones libres que no colisionan entre sí y que se mueven en un fondo fijo de iones inmóviles de carga positiva [27], [26], [28], [29]. Con este modelo, se puede describir la contribución de los electrones libres a la ε_{exp} :

$$\varepsilon_{intra}(\omega) = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega(\omega + i/\tau)}, \quad (2.6.5)$$

donde ω_p es la frecuencia del plasma y es igual a $\omega_p^2 = \eta e^2 / m_0 \varepsilon_0$, donde η es la densidad de electrones libres y m_0 es la masa efectiva del electrón, $1/\tau$ es una constante de amortiguamiento debida a la dispersión de los electrones con los iones del sistema (τ es el parámetro que mide el camino libre medio que recorren los electrones antes de sufrir colisiones con otros iones). Con la ecuación (2.6.5), la ε_{exp} queda expresada como:

$$\varepsilon_{exp}(\omega) = \varepsilon_{inter}(\omega) + 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega(\omega + i/\tau)}. \quad (2.6.6)$$

Para los fines del presente trabajo, hemos usado los valores medidos experimentalmente por Jhonson y Christy [30] para la función dieléctrica de la plata en bulto; los datos experimentales más la contribución interbanda e intrabanda, se muestran en la Fig. 2.13. En la imagen se aprecia que la contribución interbanda domina a longitudes de onda menores a 350 nm y las intrabanda a longitudes de onda en un intervalo que abarca desde los 350 hasta los 700 nm.

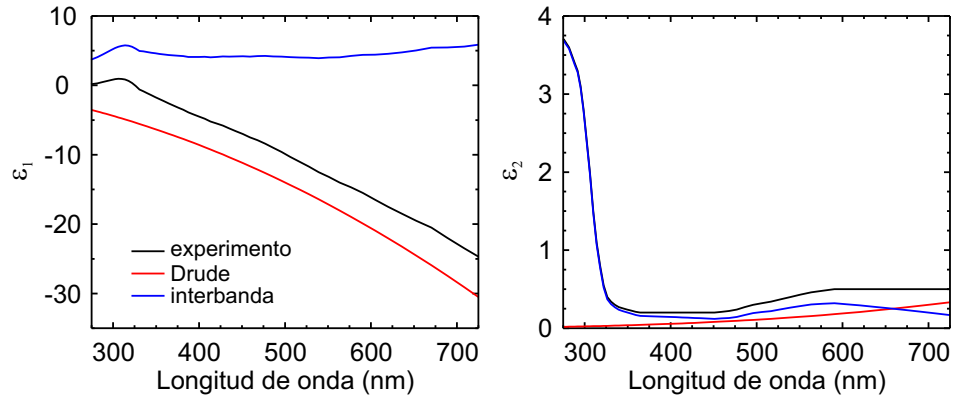


Figura 2.13: Función dieléctrica de la plata en bulto: ϵ_1 es la parte real y ϵ_2 es la parte imaginaria.

Antes de presentar los resultados de éste trabajo teórico, describimos aspectos importantes de las bacterias, como su clasificación, constituyentes y técnicas generales empleadas para su estudio.

Capítulo 3

Bacterias

Las bacterias son microorganismos procariotas (palabra griega que significa prenúcleo), es decir, son microorganismos unicelulares, cuyo material genético no se encuentra encerrado por una membrana nuclear y no poseen organelos (estructuras celulares especializadas que tienen funciones específicas como las mitocondrias, el aparato de Golgi o el retículo endoplásmico) y que se reproducen por división asexual.

3.1. Clasificación de las bacterias por su forma

Existe una gran diversidad en la forma y tamaño de las bacterias. Usualmente, el rango de tamaño en su diámetro abarca desde 0.2 - 2.0 μm y entre 2 - 8 μm en su longitud. Pero básicamente éstas poseen una de las siguientes formas: cocos (bacterias con forma esférica u ovalada), bacilos (bacterias con forma de bastón) y espirilos (bacterias con forma de sacacorchos o curvadas). Lo anterior, ha permitido establecer un tipo de clasificación.

Los cocos usualmente son esféricos, pero pueden ser ovalados, elongados o aplanados en uno de sus lados. Cuando los cocos se dividen para reproducirse, las células pueden permanecer unidas unas a otras. Los cocos que permanecen unidos en pares, son llamados diplococos; aquellos que se dividen y permanecen atados como una cadena, son llamados estreptococos. Los que se dividen en dos planos y forman grupos de cuatro células son conocidos como tétradas. Aquellos que se dividen en tres planos y forman una estructura cúbica de ocho células, son llamados sarcinas. Los que se dividen y se multiplican en diversos planos, formando una especie de racimos de uvas, son los denominados estafilococos (Fig. 3.1).

Los bacilos se dividen únicamente a través de su eje corto. La mayoría de los bacilos se presentan como un bacilo solo. Los diplobacilos aparecen en pares después de dividirse y los estreptobacilos forman cadenas (Fig. 3.1).

Los espirilos tienen una o más torceduras, nunca son rectas. Aquellas que parecen un bastón curvado son conocidas como vibrios. Los que tienen forma helicoidal (como un sacacorchos) y cuerpos rígidos, son los espirilos. Y el último grupo lo forman las espiroquetas, que son bacterias helicoidales y flexibles (Fig. 3.1) [31].

3.2. Crecimiento bacteriano

El material nutricional preparado para crecer microorganismos en el laboratorio, recibe el

CAPÍTULO 3. BACTERIAS

3.2. CRECIMIENTO BACTERIANO

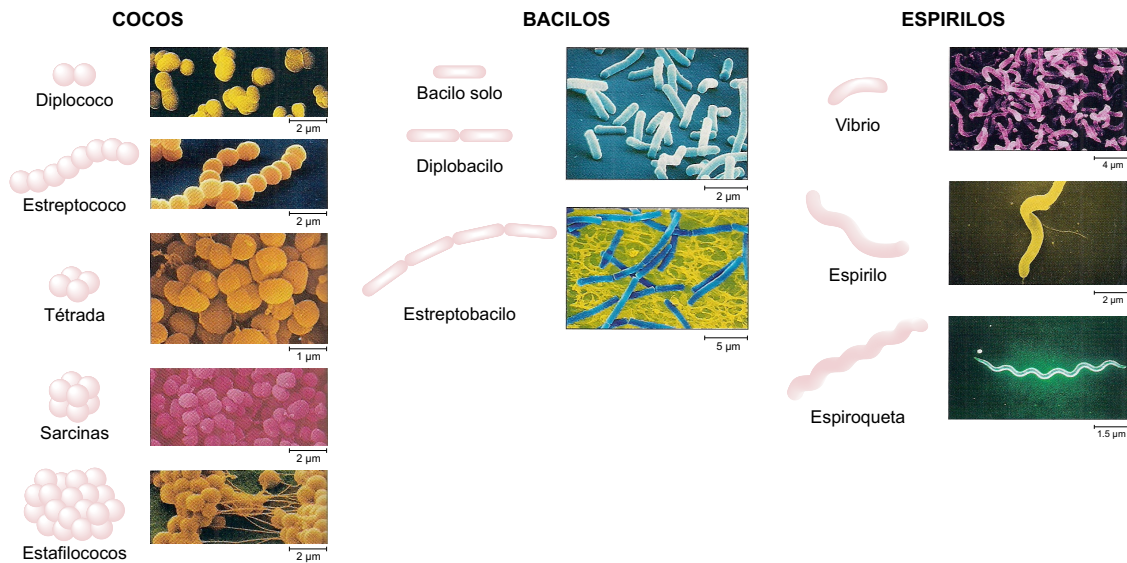


Figura 3.1: Representación gráfica e imágenes SEM de tipos de bacterias de acuerdo a su forma. Las imágenes SEM fueron tomadas de [31] .

nombre de medio de cultivo. Al hecho de introducir los microorganismos en el medio de cultivo, para comenzar su crecimiento, se le conoce como *inocular* . Los microorganismos que crecen y se multiplican en o sobre un medio de cultivo son referidos como *cultivo*.

Los medios de cultivo pueden ser líquidos o sólidos (como el agar), pero básicamente están formados principalmente por una fuente de carbono y energía, sales (que sirven como fuentes de nitrógeno, azufre y fósforo) y mayormente por agua.

El crecimiento bacteriano, se refiere al aumento del número de bacterias y no del tamaño de las células individuales. Normalmente, este ocurre cuando una bacteria se divide y genera dos células individuales idénticas. A este proceso se le conoce como *fisión binaria* y es el método de reproducción más común de las bacterias.

Cuando unas cuantas bacterias son inoculadas en un medio de cultivo y la población se cuenta en intervalos, es posible graficar una *curva de crecimiento bacteriano* que muestra el crecimiento de las mismas como función del tiempo (Fig. 3.2). En esta gráfica es posible identificar 4 fases de crecimiento:

- **Fase lag o de ajuste.** Cuando se inocula el medio de cultivo, el número de células no cambia o cambia muy poco porque las bacterias no se reproducen inmediatamente. A este periodo de poca o nula división celular, se le llama *fase lag*. En esta fase, la población bacteriana realiza una intensa actividad metabólica, sintetizando ADN y enzimas, que ocuparán para crecer. Es decir, las bacterias se adaptan y se preparan en el medio de cultivo para posteriormente dividirse.
- **Fase log (logarítmica) o exponencial.** Ocurre cuando las bacterias comienzan a dividirse y entran en un periodo de crecimiento poblacional exponencial.
- **Fase estacionaria.** Esta se da cuando el crecimiento exponencial se detiene, se agotan los nutrientes del medio de cultivo, las bacterias comienzan a morir y se tiene el mismo número de bacterias vivas que de bacterias muertas y se comienzan a acumular desechos tóxicos.

- Fase de muerte. Cuando el número de bacterias muertas excede el número de bacterias vivas, la población entra en una fase de muerte y puede terminar cuando quede una pequeña fracción de bacterias vivas o cuando mueran todas las bacterias [32].

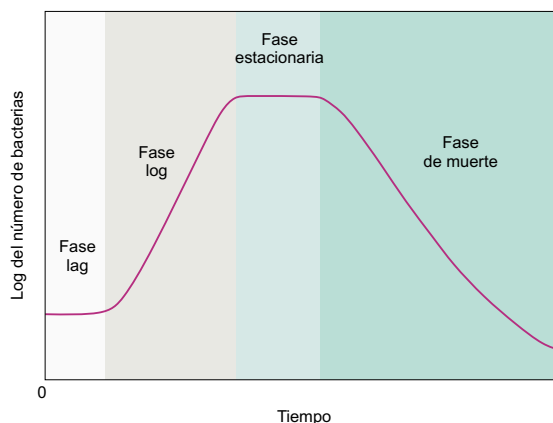


Figura 3.2: Curva de crecimiento bacteriano.

3.3. Estructura bacteriana

La estructura típica de una bacteria, es como la que se muestra en la Fig. 3.3. Aunque es posible que no todas las bacteria posean cada una de las estructuras que se observan en esta imagen. En seguida, se da una breve descripción de algunos componentes de las bacterias, comenzando desde las estructuras externas a las internas.

- Cápsula: es el estrato que se encuentra sobre la pared celular y esta formado por un polímero gelatinoso. Su función es proteger a la bacteria, adherir a la bacteria a diversas superficies, como las mucosas, y evita la desecación de la misma.
- Flagelos: son filamentos muy largos que sirven para la locomoción de las bacterias.
- Fimbrias y pilis: son estructuras mucho más rígidas y mucho más cortas que los flagelos. Las fimbrias sirven para la adhesión de la célula y los pilis sirven para la transferencia de ADN de una bacteria a otra.
- Pared celular: es una estructura compleja y semi-rígida, responsable de la forma de la bacteria. Rodea la membrana citoplasmática y protege el interior de la misma de los cambios adversos del ambiente exterior. Está formada por un componente macromolecular, conocido como peptidoglicano o mureína.
- Membrana citoplasmática o membrana interna: es una estructura delgada que encierra el citoplasma bacteriano. Su principal función es servir como barrera selectiva de los materiales que entran y salen de la bacteria.
- Citoplasma: es todo el material contenido por la membrana citoplasmática. Esta formado aproximadamente por un 80 % de agua, proteínas, carbohidratos, lípidos, iones inorgánicos y compuestos de bajo peso molecular.
- Ribosomas: son las estructuras encargadas de la síntesis de proteínas y se hallan en el citoplasma.

CAPÍTULO 3. BACTERIAS

3.4. BACTERIAS GRAM-POSITIVAS Y GRAM-NEGATIVAS

- Área nuclear o nucleoide: es la zona de la bacteria, donde se encuentra una cadena de ADN de doble cadena en forma circular y es la estructura que contiene el código de la información de los caracteres biológicos de la especie.
- Plásmido: son cadenas de ADN (independientes del nucleoide) de autorreplicación y son susceptibles de transferirse a otras bacterias para transmitir las características biológicas que contienen.
- Inclusiones: son depósitos donde se acumulan nutrientes. Son usados cuando la bacteria se encuentra en un medio ambiente deficiente [31], [33].

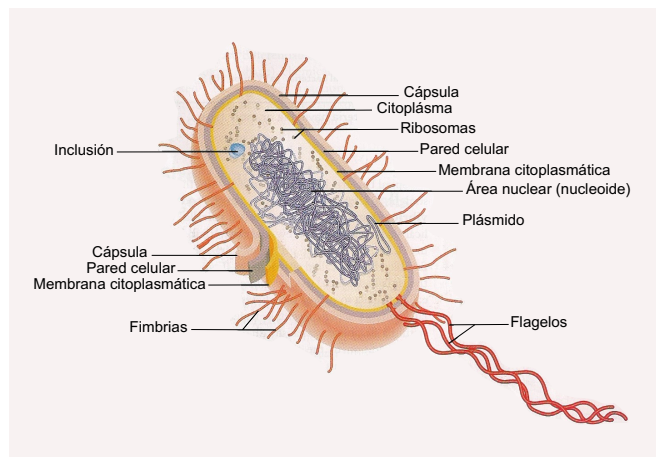


Figura 3.3: Estructura típica de una bacteria. Imagen tomada de [31].

3.4. Bacterias gram-positivas y gram-negativas

Cuando se observan microorganismos con el microscopio óptico, éstos suelen aparecer incoloros. Para que eso no ocurra, los microorganismos se tienen que preparar y un método para que se puedan observar de mejor manera consiste en teñirlos con colorantes.

La tinción de microorganismos con colorantes, permite enfatizar ciertas estructuras. Pero antes de teñirlos, se deben de fijar a la superficie de un portaobjetos. Para fijar un microorganismo, se debe extender una película delgada del material que lo contiene (cultivo bacteriano) sobre la superficie de un portaobjetos. A la película formada, se le conoce como *frotis* y para fijarla existen tres opciones: se deja secando con el aire del medio ambiente, se pasa varias veces el lado contrario del portaobjetos sobre una flama de un mechero Bunsen o se puede cubrir el frotis con alcohol metílico por un minuto. Posteriormente, se aplica la tinción al frotis, se enjuaga con agua, se seca con papel absorbente y se observa con el microscopio.

Las tinciones son disoluciones acuosas o alcohólicas que contienen colorantes, los cuales son sales formadas por un ión positivo y un ión negativo. Al ión responsable de brindarle color a la sal, se conoce como cromóforo. Si el cromóforo es el ión positivo, se tendrá un *colorante básico* y si el cromóforo es el ión negativo, se tendrá un *colorante ácido*. Generalmente, las bacterias están cargadas negativamente cuando se encuentran en un pH neutro ($\text{pH} = 7$), así que en estas condiciones se tiñen con colorantes básicos, donde el ión positivo (cromóforo) es atraído por la célula bacteriana cargada negativamente. Entre los colorantes básicos más empleados, se tiene

CAPÍTULO 3. BACTERIAS

3.4. BACTERIAS GRAM-POSITIVAS Y GRAM-NEGATIVAS

el cristal violeta, el azul de metileno, el verde malaquita y la safranina y comunmente son más usados que los colorantes ácidos.

Ocasionalmente, si se desea aumentar el color que proporcionan las tinciones, se les puede agregar sustancias químicas que se conocen como mordientes. Una función del mordiente es aumentar la afinidad de una tinción por algún espécimen biológico y otra es cubrir alguna estructura para hacerla más delgada y fácil de visualizar cuando se tiñe.

Existen tinciones diferenciales, las cuales reaccionan de diferente manera con diferentes especies de bacterias y esto sirve para diferenciar a las mismas. En 1884, el bacteriólogo danés Hans Christian Gram desarrolló la tinción de Gram, que es una tinción diferencial que permite clasificar las bacterias en dos grandes grupos, de acuerdo a las diferencias en sus paredes celulares: bacterias gram-positivas y gram-negativas [31]. Para conocer más información acerca la tinción de Gram, ver el apéndice A.

3.4.1. Pared celular de las bacterias gram-positivas y gram-negativas

Como se mencionó, las diferencias en la pared celular de las diferentes bacterias, es lo que permite que se puedan clasificar éstas con la tinción de Gram. En seguida, se dan más detalles de la estructura de la pared celular de las bacterias gram-positivas y gram-negativas.

Se sabe que la pared celular bacteriana esta formada por un componente macromolecular, conocido como peptidoglicano. Este se encuentra constituido por disacáridos repetidos unidos por polipéptidos para formar una red que protege a toda la célula.

En la Fig. 3.4 se observa la pared celular de una bacteria gram-positiva. Como se puede notar, esta consta de una capa gruesa, formada por varias subcapas, de peptidoglicano. Mide aproximadamente ~ 30 nm [13]. Además, en la pared celular de estas bacterias, se halla el ácido lipoteicoico (que se extiende por las capas de peptidoglicano y que está unido a la membrana plasmática) y el ácido teicoico (que está unido a las capas de peptidoglicano).

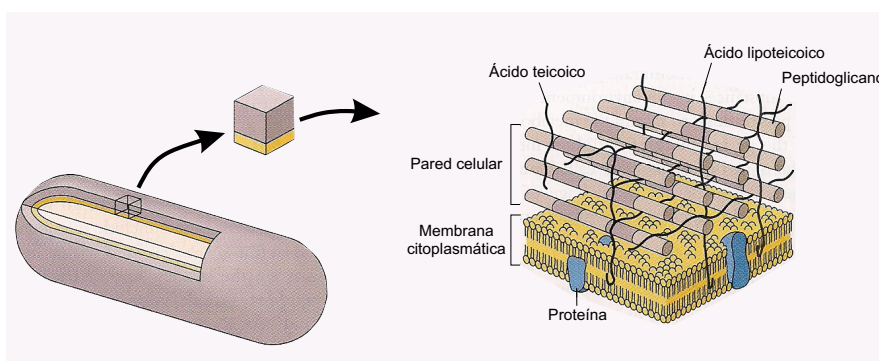


Figura 3.4: Pared celular de una bacteria gram-positiva. Imagen tomada de [31]

La pared celular de las bacterias gram-negativas posee una o pocas capas de peptidoglicano (que miden entre $\sim 2-3$ nm [13]) y una membrana externa. El peptidoglicano está unido a lipoproteínas de la membrana externa y se encuentra en el periplasma, que es un espacio lleno de líquido, ubicado entre la membrana externa y la membrana citoplasmática. El periplasma contiene una alta concentración de enzimas degradativas y transporta proteínas. Las bacterias

gram-negativas no contienen ácido lipoteicoico ni teicoico. La membrana externa de las bacterias gram-negativas posee lipopolisacáridos, lipoproteínas y fosfolípidos. La Fig. 3.5 muestra la pared celular de las bacterias gram-negativas [31].

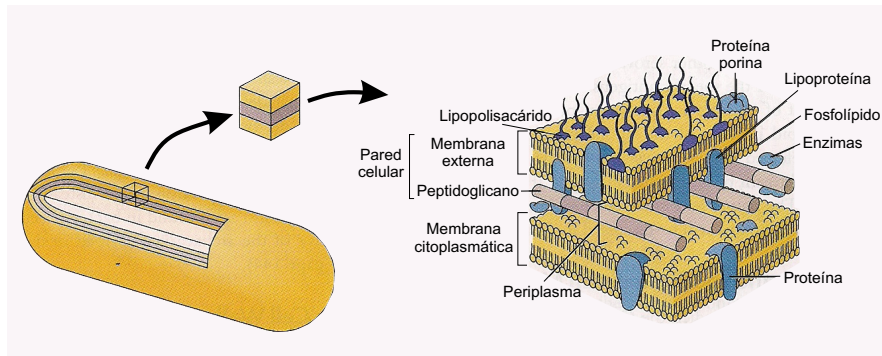


Figura 3.5: Pared celular de una bacteria gram-negativa. Imagen tomada de [31]

3.4.2. *Staphylococcus aureus*

El género *Staphylococcus* recibe su nombre de la palabra griega *staphylé*, que significa “racimo de uvas”. Por lo tanto, a las células de cocos que se desarrollan en un patrón que recuerda un racimo de uvas, se les conoce como estafilococos. Sin embargo, los microorganismos presentes en muestras clínicas aparecen como bacterias aisladas, en pares o en cadenas cortas. Este género pertenece a la familia *Micrococcaceae* y está constituido por bacterias esféricas, gram-positivas, inmóviles, que no forman esporas, que generalmente no tienen cápsula y son anaerobios facultativos (es decir, crecen aerobia y anaerobiamente). Existen 35 especies en el género *Staphylococcus*, de las cuales el más importante es el *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), el cual recibe su nombre por sus colonias o cepas (grupos de bacterias, crecidos en un medio de cultivo, que se observan a simple vista) de color amarillo dorado (*aureus* significa dorado) [31] provocado por los pigmentos carotenoides que se forman durante su crecimiento [35].

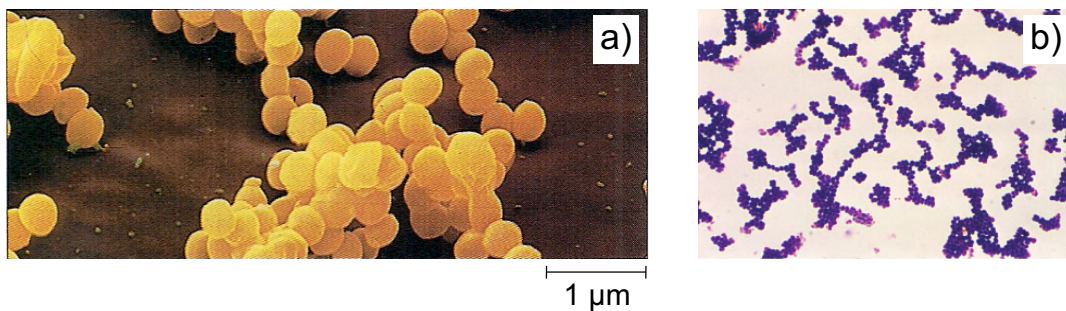


Figura 3.6: *S. aureus*: a) Imagen SEM (Imagen tomada de [31]) y b) Fotografía (tomada con el microscopio óptico) del *S. aureus* teñido con la tinción de Gram, se puede apreciar que es una bacteria gram-positiva ya que sus células son de color morado (Imagen tomada de [34]).

En el ser humano, el *S. aureus* habita en el tracto respiratorio superior (boca, cavidad nasal, fosas nasales, faringe y laringe) y en la piel. Sin embargo, la importancia médica de esta bacteria radica en que puede causar muchas infecciones en el hombre. Puede producir procesos

inflamatorios supurativos en cualquier tejido, los cuales pueden ser muy leves y otros pueden causar la muerte y entre estos se encuentran: el impétigo, los forúnculos, los abscesos, el antrax estafilocócico y el síndrome de la piel escaldada. En el aparato respiratorio puede producir: sinusitis, otitis, faringitis, neumonitis y abscesos pulmonares; en aparato digestivo: enterocolitis, abscesos del hígado, peritonitis, intoxicación por alimentos por enterotoxina estafilocócica; en el sistema nervioso central: meningoencefalitis; en vías urinarias: cistitis, prostatitis, nefritis; en el sistema musculoesquelético: osteomielitis, artritis, miositis; en corazón: endocarditis, miocarditis, pericarditis; en tejidos blandos: celulitis, fascitis, miositis; en los ojos: conjuntivitis, foliculitis de párpados; y además puede producir septicemias, síndrome de choque tóxico (asociado a la menstruación) y cabe mencionar que las infecciones de heridas quirúrgicas en los hospitales son causadas por esta bacteria [33].

3.4.3. *Escherichia coli*

La *Escherichia coli* o *E. coli* es la especie más importante del género *Escherichia* (que comprende cinco especies), que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* [35]. Esta bacteria es un bacilo gram-negativo, posee cápsula, fimbrias y flagelos con los que puede moverse. La colonización del ser humano por esta bacteria se inicia en las primeras horas de vida y la relación es benéfica para la bacteria y para el hospedero, habitando en el tracto gastrointestinal. En individuos sanos la *E. coli* no produce daño, sin embargo, cuando las barreras de defensa del tracto gastrointestinal son alteradas y la bacteria sale de su hábitat natural, causa enfermedades. A través de los años, esta bacteria se ha modificado genéticamente y hoy en día existen cepas que pueden causar infecciones del tracto gastrointestinal y urinario, septicemias, meningitis, diarrea de diferentes características clínicas, infecciones de heridas quirúrgicas, neumonía, peritonitis, perforación intestinal, colitis hemorrágica y pielonefritis [32], [33], [36].

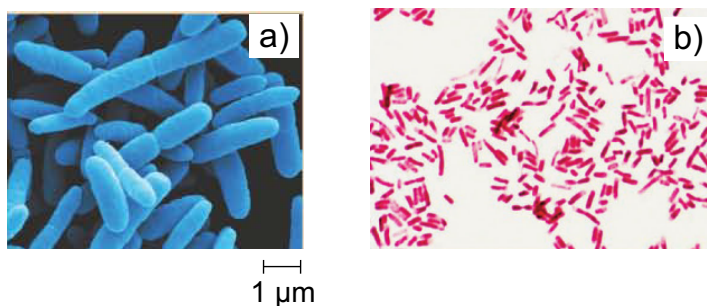


Figura 3.7: *E. coli*: a) Imagen SEM) y b) Fotografía (tomada con el microscopio óptico) de la *E. coli* teñida con la tinción de Gram, se puede apreciar el color rosado de sus bacterias, porque son gram-negativas (Imágenes tomadas de [31], [37]).

Se conoce mucho de la bioquímica y genética de la *E. coli*, por esta razón es un referente útil para la investigación básica biológica [31].

3.5. Dispersión de luz por bacterias

Existen dos niveles de descripción científica de partículas dispersas en un medio: la identificación y la caracterización. La identificación o clasificación implica asignar a las partículas a alguna de las varias clases predefinidas, que se diferencian unas de otras por sus características morfológicas y funcionales. La caracterización implica medir cuantitativamente una partícula por

sus diferentes características morfológicas y funcionales [38].

La dispersión de luz por partículas, juega un papel muy importante en varios campos de la ciencia, como son, la ciencia de la atmósfera, oceanografía, astronomía, ciencias de la ingeniería y nanotecnología, con aplicación específica en teledetección, meteorología, óptica de los océanos, investigación del clima, dispersión de luz por granos de polvo interplanetarios, determinación y determinación de tamaño de partículas y caracterización de células biológicas [40], [41]. En este último campo, la identificación y caracterización de bacterias es fundamental porque como ya se mencionó, algunas son capaces de generar enfermedades, así que es importante su rápida detección en muchas áreas, como el control de productos alimenticios [42] y agua potable, en diagnósticos bacteriológicos [43] e inclusive en amenazas de bioterrorismo [44] o armas biológicas [89]. Los métodos actuales para la identificación y clasificación de bacterias involucran aislar el espécimen, crecerlo en un medio de cultivo por uno o dos días, teñirlo e identificarlo con el microscopio óptico; los inmunoensayos [43]; la microscopía electrónica [46] y la dispersión de luz. Este último ofrece ventajas comparado con los otros métodos porque es un método no destructivo y rápido, se puede realizar *in situ* en tiempo real y no necesita un gran número de bacterias (altas concentraciones) para realizarse [44].

La dispersión de luz por bacterias ha sido ampliamente estudiada experimental y teóricamente por P. J Wyatt desde finales de la década de los sesentas y fue quien descubrió que *cada microorganismo que dispersa luz, genera un patrón de dispersión único, debido a sus diferencias estructurales y bioquímicas*. Lo anterior ayuda a identificar microorganismos desconocidos, al comparar los patrones de dispersión obtenidos con los patrones medidos de microorganismos conocidos. También, con estudios de dispersión de luz por bacterias, pudo diferenciar las bacterias: *Bacillus subtilis*, *Bacillus anthracis*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus* y *E. coli* y las esporas de *Bacillus megaterium* y *Bacillus cereus* [47], [50]. Determinó el tamaño, índice de refracción del citoplasma y de la pared celular (y su grosor) en el *S. aureus* [48], así como su resistencia a antibióticos [49]. Gracias a los resultados anteriores, otros investigadores tuvieron la motivación de seguir estudiando bacterias y por ejemplo, Shvalov y colaboradores pudieron identificar las fases de crecimiento log y estacionaria del *E. coli* [51] y Bronk y colaboradores pudieron medir el tamaño de las bacterias *E. coli*, *Bacillus subtilis* en las fases de crecimiento log y estacionaria [52], [53], [54]. Otra bacteria que se ha caracterizado por dispersión de luz es la *Pseudomona aeruginosa* [44].

Los patrones de dispersión, perfiles de dispersión o indicatrices, son gráficos que muestran la intensidad de la luz dispersada por una partícula en función del ángulo de dispersión θ , que es el ángulo entre el haz incidente y el punto a observar la dispersión, tal como se mostró en la Fig. 2.4 [55]. Generalmente se grafica la intensidad de luz dispersada cuando se incide luz polarizada paralela y perpendicularmente al plano de dispersión (ecuaciones (2.4.6) y (2.4.7)), pero también se pueden graficar individualmente algunos elementos de la matriz de Mueller (ecuación (2.4.5)) o alguna combinación de éstos, como la relación S_{34}/S_{11} que ha servido para identificar microorganismos crecidos en diferentes condiciones [17], [54]).

Wyatt reporta que la longitud de onda para estudiar la dispersión de luz por bacterias debe de cumplir que la razón entre la circunferencia del microorganismo estudiado y la longitud de onda incidente, debe tener un valor entre 1 y 10; si la razón es menor a 1, no se podrá obtener detalles de su estructura interna y si la razón es mayor, el patrón de luz dispersada será muy complejo y no se podrá deducir que información proporcionan los picos y valles del patrón. En nuestro caso, mostraremos estudios de dispersión de dos bacterias: *S. aureus* que son esféricas y con un diámetro que puede comprender desde los 400 hasta 1500 nm y bacterias *E. coli* que poseen forma esferocilindrica con un diámetro que puede abarcar desde los 550 nm y hasta los 2000 nm. Nos interesa realizar los estudios considerando una longitud de onda igual a 632.8 nm,

la cual es la que representa la línea más intensa de un láser de helio-neón. Por ejemplo, para el caso particular de una bacteria *S. aureus* de diámetro D igual a 800 nm, tenemos que dicha razón es $\pi D/\lambda = \pi(800 \text{ nm})/632.8 \text{ nm} = 3.97$, cumpliéndose de esta manera la condición mencionada.

Por otra parte, Wyatt también menciona que cuando se desee identificar un microorganismo empleando sus características de dispersión de luz a una longitud de onda particular, las estructuras diferenciables que serán observadas, serán aquellas que tengan una dimensión comparable con un décimo de la longitud de onda incidente, esto es, si se emplea una longitud de onda de la región visible del espectro electromagnético, las inhomogeneidades separadas por menos de 40 nm no podrán ser distinguidas. Como los principales constituyentes de las bacterias tienen dimensiones mayores a los 50 nm, los estudios de identificación y caracterización de bacterias, se pueden realizar usando luz visible [47].

3.5.1. Citometría de flujo

Los estudios de dispersión de luz por partículas se pueden realizar en alguna de las siguientes formas: analizando las partículas en una dispersión coloidal o analizándolas individualmente [56]. En el caso de bacterias, además de las anteriores formas, se puede estudiar su dispersión de luz cuando se encuentran dispuestas en alguna superficie [57].

La citometría de flujo es una técnica que se desarrolló en la década de 1960 y permite estudiar la dispersión de luz por células individuales. Un citómetro de flujo (Fig. 3.8) es un equipo que consta de un láser alineado ortogonalmente al flujo de células que pasa por una cubeta en la que se obliga a éstas a fluir en una secuencia lineal. Para hacer que las células fluyan por la cubeta una por una, se usa el enfoque hidrodinámico, que consiste en inyectar la muestra líquida dentro del flujo de un líquido que actúa como un embudo, de esta forma, el flujo de la muestra logra atravesar la cubeta que tiene un diámetro parecido al de la partícula por analizar. En los citómetros convencionales, la luz dispersada por cada partícula es medida por dos detectores que se colocan en direcciones fijas: en la dirección hacia adelante (*forward direction*), que puede abarcar valores de θ entre 0.5° y 10° y en la dirección lateral (*sideward scattered*), que comprende valores de θ mayores a 15° y hasta 130° . Además, es posible analizar hasta 50,000 células por segundo. La luz dispersada en la dirección hacia adelante y lateral se integra en un ángulo sólido pequeño, determinado por el área de los detectores. Se conoce que la luz dispersada en la dirección hacia adelante depende del tamaño, forma e índice de refracción de la partícula que se estudia y la lateral (además de depender del tamaño) se relaciona con la rugosidad y estructuras internas de la misma [58], [59], [20].

Una *indicatriz* o *patrón de dispersión* es un gráfico que representa la dependencia angular de la luz dispersada por una partícula y va a depender de varias de sus características, como lo son su forma, tamaño, índice de refracción, entre otras. Por lo tanto al depender las indicatrices de varios factores, van a fungir como una *huella digital* para cada una de éstas, la posición angular de sus mínimos y máximos se emplea para conocer las características de las partículas. Es importante conocer la luz dispersada en un rango amplio de valores de ángulos de dispersión y la desventaja que presentan los citómetros de flujo convencionales es que únicamente permiten medirla en dos direcciones. Para resolver este problema Maltsev y colaboradores desarrollaron el citómetro de flujo de barrido (*Scanning Flow Cytometer*), que es un equipo en el que las partículas son iluminadas por un láser (de helio-neón con una $\lambda = 632.8 \text{ nm}$) dirigido directamente a través del flujo del capilar de una cubeta óptica que posee en un extremo un espejo esférico (cuyo eje coincide con el eje del flujo) y en el otro extremo tiene un sistema óptico que recolecta la luz coaxialmente dispersada. A medida que la partícula se mueve en la cubeta óptica, cambia el ángulo de dispersión en el cual la luz alcanza el espejo. De esta manera es posible medir indicatrices completas de hasta 500

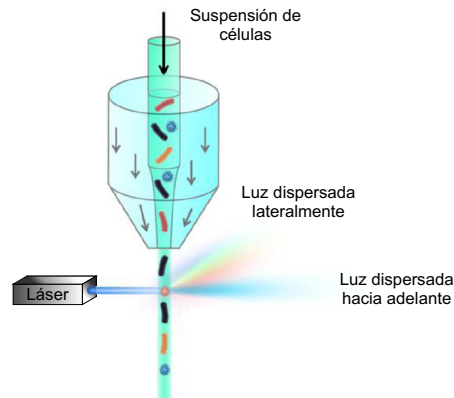


Figura 3.8: Citómetro de flujo convencional. Imagen tomada de [62]

partículas por segundo. En la Fig. 3.9 se observa la cubeta óptica de éste tipo de citómetro [60], [56].

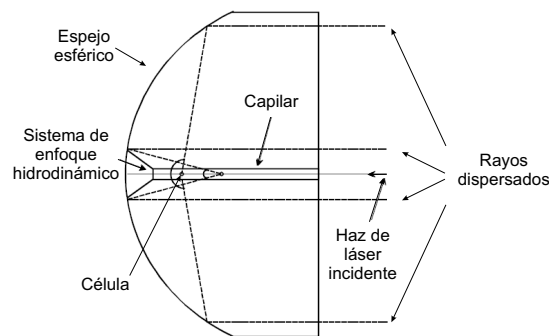


Figura 3.9: Esquema de la cubeta óptica del citómetro de flujo de barrido, en la que el láser incidente ilumina constantemente las células. Se muestra la posición de dos células, junto con sus diferentes ángulos de dispersión. Imagen tomada de [61]

Con las técnicas de citometría de flujo, además de medir luz dispersada, si se tiñen las células con sondas fluorescentes que se unan a moléculas específicas de la pared celular o dentro de la célula, es posible medir señales de fluorescencia, con las que se puede obtener información de la bioquímica de la célula, como la cantidad de ácidos nucleicos y proteínas, resistencia a antibióticos, su clasificación en bacterias gram-positivas o gram-negativas o simplemente la respuesta a estímulos [58], [38], [62].

Una de las principales ventajas que ofrece la citometría de flujo es que al ser posible realizar estudios de muchas bacterias individuales, se puede conocer la heterogeneidad de colonias de bacterias, algo que no se logra con métodos microscópicos. En salud pública, esto es importante porque de esta manera se conoce la resistencia a antibióticos de las bacterias individuales y es factible detectar las que son más patógenas y en la industria permite conocer la productividad y estabilidad de las bacterias para mejorar los procesos de fermentación. Incluso es viable aislar los microorganismos que poseen determinadas características para crecerlos o para su posterior análisis [63], [62], [59].

3.5.2. Índice de refracción de las bacterias

La variación angular de la luz dispersada por una célula depende de su tamaño, forma e índice de refracción (este último depende de sus estructuras celulares internas). Pero en el caso de células procariotas, como las bacterias, la dispersión no va a depender de las estructuras internas, únicamente lo hará de los primeros factores [44]. El índice de refracción (n) es una cantidad compleja que se puede representar de la siguiente manera:

$$n = n' + in'' = \sqrt{\frac{\epsilon\mu}{\epsilon_0\mu_0}} \quad (3.5.1)$$

donde n' y n'' son cantidades positivas y ϵ_0 y μ_0 son la permitividad y permeabilidad del vacío. n' es la parte real del índice de refracción y determina la velocidad de fase $\nu = c/n'$. n'' es la parte imaginaria del índice de refracción, se le conoce también como *coeficiente de absorción* o *índice de absortividad* y determina la atenuación de una onda electromagnética cuando se propaga a través de un medio. Al par de cantidades n' y n'' se les conoce como *constantes ópticas*, aunque no son “constantes” porque en general, dependen de la frecuencia [17].

Las bacterias poseen un coeficiente de absortividad igual a cero ($n'' = 0$), por lo tanto no van a ser capaces de absorber luz, pero sí van a dispersarla. Aunque el índice de refracción de las bacterias no está totalmente caracterizado, es decir, no se tiene un valor definido para cada longitud de onda ni para cada bacteria, se tienen registrados ciertos valores de n en la literatura. Por ejemplo, Wyatt reporta que el índice de refracción de la pared celular de las bacterias es igual a 1.4 y el del citoplasma es 1.35 a una longitud de onda de 632.8 nm y que estos valores de n son compatibles con microorganismos que están compuestos por un 78 % de agua. Cuando se estudia la dispersión de luz por bacterias, generalmente éstas se encuentran suspendidas en agua. Debido a que el índice de refracción de las bacterias es muy parecido al del agua ($n = 1.33$), sólo una pequeña fracción de la luz incidente será dispersada, pero con el uso de láseres de alta intensidad se puede asegurar que se dispersará la suficiente radiación electromagnética para registrar su patrón de dispersión [47].

Capítulo 4

Metodología para el cálculo de eficiencias ópticas

Debido a que en este trabajo es de interés el estudio teórico-numérico de las propiedades ópticas de bacterias en contacto con nanopartículas de plata. Primero se mostrarán los resultados del estudio de las bacterias solas (ver secciones 5.1 y 5.2), luego las eficiencias ópticas de un conjunto de NPs Ag solas (ver sección 5.3.1) y por último la respuesta óptica del sistema NPs-bacteria (ver secciones 5.3.2 y 5.3.3); todo ello para dar una interpretación apropiada a las eficiencias ópticas que resultan de la interacción entre las NPs Ag y la bacteria. Asimismo, lo anterior es realizado para obtener información de la respuesta óptica de los sistemas mencionados y la cual de alguna manera, sirva para el entendimiento apropiado de los resultados que se obtienen con técnicas que emplean métodos ópticos para analizar distintos tipos de células biológicas.

Para conocer la dispersión y absorción de luz por partículas, se pueden realizar los respectivos experimentos o se pueden hacer estudios teórico-numéricos. Ambas formas de estudiar la dispersión de luz ofrecen ventajas y desventajas. Pero cuando no se dispone de los instrumentos para realizar el experimento, se puede recurrir al uso de computadoras para conocer la respuesta óptica de algún sistema [58].

Como la teoría de Mie sólo describe la absorción y dispersión de luz por partículas esféricas, los científicos se dieron a la tarea de desarrollar métodos para resolver las ecuaciones de Maxwell para otro tipo de partículas, aprovechando obviamente el uso de las computadoras. Entre los métodos más usados se encuentra el método de diferencias finitas en el dominio del tiempo (*finite-difference time-domain*, FDTD) desarrollado por Yee (1966) que es una técnica numérica que discretiza al dispersor usando un mallado en el que cada elemento tiene un índice de refracción igual al del dispersor y las ecuaciones de Maxwell se resuelven en el dominio del tiempo en vez del de la frecuencia [64], [58]. Otro método muy empleado es el de la matriz-T, desarrollado por Waterman (1971), que consiste en expandir el campo eléctrico incidente y dispersado en series de funciones de onda vectoriales esféricas, para posteriormente relacionar estos campos con una matriz de transición (matriz-T) [65]. También se tiene el método de aproximación de dipolo discreto, que es el que se usó en este trabajo de tesis y del se hablará en párrafos siguientes con más detalle.

La aproximación de dipolo discreto (*Discrete dipole approximation*, DDA) se ha empleado para estudiar numerosos sistemas, como los granos de polvo interestelares e interplanetarios, cristales de hielo en la atmósfera, superficies de semiconductores, partículas porosas, capas porosas o superficies rugosas, cristales fotónicos, metamateriales y principalmente efectos de tamaño y forma de nanopartículas metálicas y sus agregados [66], [67], [28], [26]. Además, ha servido para simular

CAPÍTULO 4. METODOLOGÍA PARA EL CÁLCULO DE EFICIENCIAS ÓPTICAS

4.1. FORMALISMO DE LA APROXIMACIÓN DE DIPOLO DISCRETO (DDA)

la dispersión y absorción de luz por diversos sistemas biológicos, entre los que se encuentran células de sangre humanas (glóbulos rojos [55], [68], [69], glóbulos blancos [38], [70], [38] y plaquetas [71]), esporas del *Bacillus subtilis* [72], dinoflagelados [73], algas [74], cocolitóforos [75] y las bacterias como el *S. aureus* y la *E. coli* no han sido la excepción [53], [76], [51], [57], [77], [78].

La DDA, también conocida como aproximación de dipolos acoplados, permite calcular la dispersión y absorción de ondas electromagnéticas por partículas no necesariamente esféricas con un tamaño similar al de la longitud de onda incidente. Esta aproximación fue propuesta por Edward M. Purcell y Carlton R. Pennypacker en 1973 para modelar la interacción de luz con partículas de polvo en el espacio [79] y posteriormente fue revisada y desarrollada por Draine (1988), Draine y Goodman (1993) y por Draine y Flatau (1994 y 2008) [80].

4.1. Formalismo de la Aproximación de Dipolo Discreto (DDA)

La idea principal de DDA consiste en reemplazar el objeto dispersor por un número finito de elementos o entidades polarizables (a los cuales se les asigna una polarizabilidad compleja necesaria para reproducir la función dieléctrica del material en bulto) para emular su respuesta óptica cuando se le hace incidir un campo electromagnético. Con esta aproximación, se considera que las entidades dipolares tienen tamaño cero, es decir, se comportan como dipolos puntuales, a los que nos referimos en adelante simplemente como dipolos.

En la Fig. 4.1 se muestra un objeto dispersor esférico representado por un arreglo de N dipolos (simbolizados esquemáticamente como esferas pequeñas).

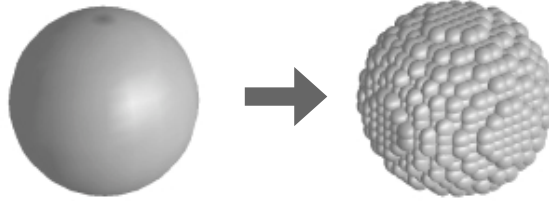


Figura 4.1: Objeto representado por un número N de dipolos dispuestos en una red cúbica. Imagen tomada de [67]

Es claro que a mayor número de dipolos, la superficie del objeto queda mejor representada ya que se desvanecen los efectos de granularidad. Cada dipolo es colocado en una posición de una malla cúbica y es etiquetado con la letra i , con $i = 1, 2, \dots, N$. La distancia de separación entre dos dipolos vecinos es d . La radiación electromagnética incidente induce un momento dipolar en cada uno de los dipolos igual a:

$$\vec{p}_i = \alpha_i \cdot \vec{E}_{loc,i}, \quad (4.1.1)$$

donde $\vec{p}_i$ y α_i son el momento dipolar inducido y la polarizabilidad en la posición $\vec{r}_i$, respectivamente; $\vec{E}_{loc,i}$ es conocido como el campo local y es el campo total que percibe el dipolo i -ésimo, resultado de la superposición del campo eléctrico incidente $\vec{E}_{inc,i}$ y el campo inducido $\vec{E}_{ind,i}$ por los otros $N-1$ dipolos que se encuentran alrededor del dipolo de interés, es decir,

$$\vec{E}_{loc,i} = \vec{E}_{inc,i} + \vec{E}_{ind,i}. \quad (4.1.2)$$

CAPÍTULO 4. METODOLOGÍA PARA EL CÁLCULO DE EFICIENCIAS ÓPTICAS

4.1. FORMALISMO DE LA APROXIMACIÓN DE DIPOLO DISCRETO (DDA)

Se asume que el campo aplicado sobre el dipolo i -ésimo es una onda monocromática plana:

$$\vec{E}_{inc,i} = \vec{E}_0 \exp(i \vec{k} \cdot \vec{r}_i - \omega t), \quad (4.1.3)$$

donde $\vec{E}_0$ es el vector de amplitud del campo incidente.

Por otra parte, el campo inducido es la contribución al campo local sobre el dipolo i -ésimo debida a la interacción con los otros dipolos y se expresa como:

$$\vec{E}_{ind,i} = - \sum_j \mathbb{A}_{ij} \vec{p}_j, \quad (4.1.4)$$

donde $\mathbb{A}_{ij} \vec{p}_j$ es el campo eléctrico en la posición $\vec{r}_i$ generado por el dipolo que se encuentra en la posición $\vec{r}_j$ dado por:

$$\mathbb{A}_{ij} \vec{p}_j = \frac{e^{ikr_{ij}}}{r_{ij}^3} \left\{ k^2 \vec{r}_{ij} \times (\vec{r}_{ij} \times \vec{p}_j) + \frac{(1 - ikr_{ij})}{r_{ij}^2} [r_{ij}^2 \vec{p}_j - 3 \vec{r}_{ij} (\vec{r}_{ij} \cdot \vec{p}_j)] \right\}, \quad (4.1.5)$$

donde $k = \omega/c = 2\pi/\lambda$ es la magnitud del vector de onda incidente, $\vec{r}_{ij}$ es el vector de la posición del dipolo i -ésimo al dipolo j -ésimo ($\vec{r}_{ij} = \vec{r}_i - \vec{r}_j$) y con r_{ij} se denota su magnitud. Cada elemento de la matriz $\mathbb{A}_{ij}$ es una matriz de 3×3 y de manera conveniente se define a los elementos $\mathbb{A}_{jj} = 0$.

Con las ecuaciones (4.1.2) y (4.1.4) se puede expresar la ecuación del momento dipolar inducido de cada dipolo (4.1.1) como:

$$\vec{p}_i = \alpha \cdot \left(\vec{E}_{inc,i} - \sum_{j=1}^N \mathbb{A}_{ij} \vec{p}_j \right) \quad i = 1, 2, \dots, N, \quad (4.1.6)$$

de donde es posible obtener los N momentos dipolares. La ecuación (4.1.6) se puede reescribir de la siguiente forma:

$$\vec{E}_{inc,i} = \sum_{j=1}^N [\{\delta_{ij} (\alpha_j^{-1}) + \mathbb{A}_{ij}\} \vec{p}_j] \quad i = 1, 2, \dots, N, \quad (4.1.7)$$

donde δ_{ij} es la delta de Kronecker. Se define la matriz $\mathbb{B}_{ij} \equiv \delta_{ij} (\alpha_j^{-1}) + \mathbb{A}_{ij}$, por lo que la anterior ecuación puede ser expresada como:

$$\sum_{j=1}^N \mathbb{B}_{ij} \vec{p}_j = \vec{E}_{inc,i} \quad i = 1, 2, \dots, N, \quad (4.1.8)$$

que es un sistema de $3N$ ecuaciones complejas acopladas. Como $\vec{E}_{inc,i}$ y $\vec{p}_i$ son vectores tridimensionales, la matriz $\mathbb{B}_{ij}$ se puede pensar como un arreglo simétrico de $N \times N$ con elementos matriciales de 3×3 . De la expresión (4.1.5) se puede ver que las matrices $\mathbb{B}_{ij}$ de 3×3 son simétricas, ya que se cumple $(\mathbb{B}_{ij})_{m,n} = (\mathbb{B}_{ij})_{n,m}$.

Es conveniente definir los vectores $3N$ -dimensionales $\vec{\mathbf{P}} = (\vec{p}_1, \vec{p}_2, \dots, \vec{p}_N)$ y $\vec{\mathbf{E}}_{inc} = (\vec{E}_{inc,1}, \vec{E}_{inc,2}, \dots, \vec{E}_{inc,N})$ y la matriz $\tilde{\mathbb{B}}$ simétrica de $3N \times 3N$ cuyos elementos satisfacen $\tilde{\mathbb{B}}_{3i-l, 3j-m} = (\mathbb{B}_{ij})_{3-l, 3-m}$, para que el problema se reduzca a la siguiente ecuación matricial:

$$\tilde{\mathbb{B}} \vec{\mathbf{P}} = \vec{\mathbf{E}}_{inc}, \quad (4.1.9)$$

que es la ecuación fundamental de DDA.

De la ecuación (4.1.9) se obtienen los valores de $\tilde{\mathbf{P}}$, con los que se pueden calcular las secciones transversales de extinción, absorción y dispersión, que están expresadas en términos de los momentos dipolares como:

$$C_{ext} = \frac{k}{|\vec{E}_{inc}|^2 \epsilon_0} \sum_{i=1}^N \text{Im} \left\{ \vec{E}_{inc}^* \cdot \vec{p}_i \right\} \quad (4.1.10)$$

$$C_{abs} = \frac{k}{|\vec{E}_{inc}|^2 \epsilon_0} \sum_{i=1}^N \left[\text{Im} \left\{ \vec{p}_i \cdot (\alpha_i^{-1})^* \vec{p}_i^* \right\} - \frac{\omega}{6\pi} k |\vec{p}|^2 \right] \quad (4.1.11)$$

donde el $*$ significa el complejo conjugado [18], [26], [28]. De la ecuación (2.5.4) se tiene que la $C_{dis} = C_{ext} - C_{abs}$, entonces, usando las ecuaciones (4.1.10) y (4.1.11), C_{dis} se expresa como:

$$C_{dis} = \frac{k}{|\vec{E}_{inc}|^2 \epsilon_0} \sum_{i=1}^N \text{Im} \left\{ \vec{E}_{inc}^* \cdot \vec{p}_i \right\} - \frac{k}{|\vec{E}_{inc}|^2 \epsilon_0} \sum_{i=1}^N \left[\text{Im} \left\{ \vec{p}_i \cdot (\alpha_i^{-1})^* \vec{p}_i^* \right\} - \frac{\omega}{6\pi} k |\vec{p}|^2 \right]. \quad (4.1.12)$$

Antes de comentar como se resuelve la ecuación fundamental de DDA, se mencionan los criterios de validez de esta aproximación.

4.2. Criterios de validez

Una de las principales ventajas de DDA es que se emplea para representar cualquier objeto, siempre y cuando se cumpla que la distancia de separación interdipolar (d) sea pequeña comparada con cualquier longitud del dispersor y con la longitud de onda del campo eléctrico incidente. Draine y colaboradores indican que el segundo criterio se cumple cuando se satisface la siguiente expresión [81]:

$$|n|kd < 1, \quad (4.2.1)$$

donde n es el índice de refracción complejo, k es el número de onda y λ es la longitud de onda en el vacío. Además, se tiene que cumplir que $|n - 1| \lesssim 3$.

La ecuación (4.2.1) también se puede expresar en términos del *radio efectivo*. El radio efectivo a_{ef} es la cantidad que asocia el volumen de cualquier dispersor con el radio de una esfera del mismo volumen:

$$a_{ef} = \left(\frac{3V}{4\pi} \right)^{1/3}, \quad (4.2.2)$$

donde V es el volumen del objeto, que en términos del número de dipolos y d resulta ser igual a:

$$V = Nd^3. \quad (4.2.3)$$

Cabe mencionar que las secciones transversales se pueden expresar en términos de a_{ef} [26] como:

$$Q_{ext} = \frac{C_{ext}}{\pi a_{ef}^2}, \quad Q_{abs} = \frac{C_{abs}}{\pi a_{ef}^2}, \quad Q_{dis} = \frac{C_{dis}}{\pi a_{ef}^2} \quad (4.2.4)$$

Con las ecuaciones (4.2.2) y (4.2.3), la ecuación (4.2.1) se puede escribir como:

$$a_{ef} < 9.88 \frac{\lambda}{|n|} \left(\frac{N}{10^6} \right)^{1/3} \quad (4.2.5)$$

Otra manera de expresar el criterio de la ecuación (4.2.1) es en términos de la razón entre el radio efectivo y la longitud de onda, conocida como el parámetro de tamaño, x :

$$x \equiv ka_{ef} = \frac{2\pi a_{ef}}{\lambda}, \quad (4.2.6)$$

por lo tanto, la ecuación (4.2.1) queda como:

$$x < \frac{62.04}{|n|} \left(\frac{N}{10^6} \right)^{1/3}. \quad (4.2.7)$$

Es claro que DDA no es adecuado para valores muy grandes de x ni para valores muy grandes de n y si lo anterior llegara a suceder, sería necesario aumentar el número de N y como se puede observar en la Fig. 4.1, con un mayor número de N se representa mejor el objeto estudiado. Hace algunos años, la velocidad y memoria del CPU de las estaciones de trabajo limitaban el número de dipolos a un $N < 10^6$ [81], pero en la actualidad es posible considerar N del orden de 9 o 10 millones de dipolos.

4.3. Código computacional: DDSCAT

DDSCAT es un código computacional escrito en Fortran que se basa en DDA para calcular la dispersión y absorción por partículas con geometría arbitraria, homogéneas o inhomogéneas, isotrópicas o anisotrópicas y de índice de refracción complejo y por arreglos periódicos (en una o dos dimensiones). Fue desarrollado por B. T. Draine y por P. J. Flatau en 1994 y para resolver la ecuación fundamental de DDA, emplea el método iterativo de gradiente complejo conjugado y la transformada rápida de Fourier [80].

El paquete de software DDSCAT 7.3, que es el que usamos, es gratuito y se encuentra disponible en [82], permite realizar cálculos de dispersión electromagnética de objetos dispersores (o blancos) con un parámetro de tamaño $x \lesssim 25$, siempre y cuando el índice de refracción complejo n no sea grande comparado a la unidad ($|n - 1| \lesssim 2$). Este software contiene rutinas para generar arreglos de dipolos que representen blancos finitos con geometrías determinadas como esferas, elipsoides, sólidos rectangulares, cilindros, prismas hexagonales, tetraedros y dos o tres elipsoides que se tocan y posee la opción de “importar” blancos con geometrías particulares.

DDSCAT 7.3 calcula automáticamente los valores de Q_{ext} , Q_{abs} , Q_{dis} , $\langle \cos\theta \rangle$ y algunos elementos de la matriz de Mueller. Para emplear este software se requiere indicar en éste la forma y tamaño del blanco, su índice de refracción, el índice de refracción del medio en el que se encuentra embebido, la longitud de onda y polarización del campo electromagnético incidente, la tolerancia de error, el número máximo de iteraciones permitidas, el plano de dispersión (junto con los valores del ángulo de dispersión) y la orientación del blanco.

Para indicar el estado de polarización, DDSCAT usa un sistema de referencia denotado como sistema de laboratorio (SL) donde los vectores unitarios $\hat{x}$, $\hat{y}$ y $\hat{z}$ indican los tres ejes de coordenadas del SL y la radiación incidente se propaga a lo largo del eje x de este sistema. Para orientar el blanco se usa otro sistema que se conoce como sistema del blanco (SB), esta fijo en el objeto dispersor y emplea los vectores unitarios $\hat{a}_1$, $\hat{a}_2$ y $\hat{a}_3$ que son perpendiculares entre sí.

Para orientar los vectores $\hat{a}_1$, $\hat{a}_2$ y $\hat{a}_3$ en el SL se dispone de tres ángulos (Θ , Φ y β). Θ es el ángulo entre el vector $\hat{a}_1$ y $\hat{x}$; Φ señala la rotación de $\hat{a}_1$ alrededor de $\hat{x}$, si Φ es igual a 0° , $\hat{a}_1$ se encontrará en el plano $\hat{x} - \hat{y}$ y si Φ es igual a 90° , $\hat{a}_1$ se encontrará en el plano $\hat{x} - \hat{z}$ y β indica la rotación de $\hat{a}_2$ alrededor de $\hat{a}_1$, si es igual a 0° , $\hat{a}_2$ se encontrará en el plano $\hat{x} - \hat{a}_1$ [81]. En la Fig. 4.2 se muestran los sistemas SL y SB que emplea DDSCAT.

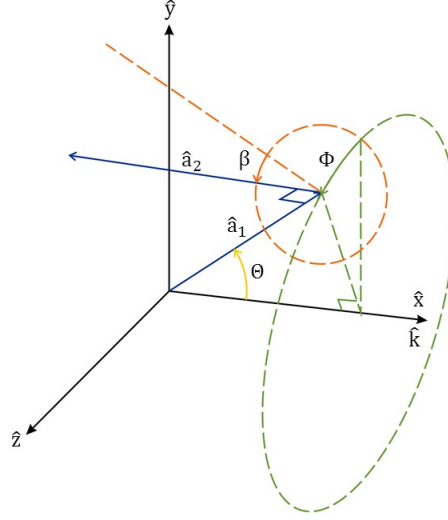


Figura 4.2: Sistema de laboratorio (SL) y sistema del blanco (SB) que emplea DDSCAT.

En el texto *User Guide for the Discrete Dipole Approximation Code DDSCAT 7.3* [81], se dispone de información más detallada para descargar y compilar el código, realizar los cálculos de dispersión, entender los datos de entrada y salida, *correr* ejemplos, orientar el blanco, indicar diferentes estados de polarización de la radiación incidente, entre otros.

4.3.1. Elección de la polarizabilidad

En la ecuación (4.1.1), se asume que la polarizabilidad es isotrópica. Sin embargo, también es posible considerarla como un tensor de polarizabilidad. Originalmente, Purcell y Pennypacker emplearon la relación de Clausius-Mossotti para la polarizabilidad (α) [83], quienes encontraron que la polarizabilidad de N dipolos colocados en una malla cúbica de tamaño de red d en la posición $\vec{r}_i$ tiene la forma:

$$\alpha^{CM} = \frac{3 \epsilon_i - 1}{\eta \epsilon_i + 2} \quad i = 1, 2, \dots, N, \quad (4.3.1)$$

donde ϵ_i es la función dieléctrica compleja del dipolo en la posición $\vec{r}_i$ y $\eta = N/V = 1/d^3$. La ecuación (4.3.1) es exacta para una red cúbica infinita en el límite de frecuencia cero ($\omega \rightarrow 0$), pero no es exacta para redes finitas.

Para solucionar el problema anterior, Draine y Goodman presentaron en 1993 la relación de dispersión de la red (LDR, por sus siglas en inglés) para la polarizabilidad de un arreglo de puntos polarizables colocados en una malla cúbica. Encontrando que el dipolo en la posición i -ésima tiene una polarizabilidad dada por:

$$\alpha_i = \frac{\alpha_i^{nr}}{1 - \left(\frac{2}{3}\right) i \left(\frac{\alpha_i^{nr}}{d^3}\right) (kd)^3} \quad (4.3.2)$$

con

$$\alpha_i^{nr} = \frac{\alpha_i^{CM}}{1 + \left(\frac{\alpha_i^{CM}}{d^3}\right) [b_1 + m^2 b_2 + m^2 b_3 S] (kd)^2}, \quad (4.3.3)$$

donde α^{CM} es la polarizabilidad de Clausius-Mossotti (4.3.1), los valores de las constantes son: $b_1 = -1.8915316$, $b_2 = 0.1648469$ y $b_3 = -1.7700004$, m es la razón entre los índices de refracción de la esfera y el medio ($m = n_{esf}/n_{med}$) y $S \equiv \sum_j (a_j e_j)^2$, (a_j , e_j son las componentes de los vectores unitarios que definen la dirección de propagación y de polarización, respectivamente).

Draine demostró que la LDR brinda resultados más exactos que la relación de Clausius-Mossotti [18], por ello, en nuestros cálculos hemos elegido en el código la opción de calcular la polarizabilidad de cada dipolo usando la ecuación (4.3.2).

Capítulo 5

Respuesta óptica de bacterias y NPs Ag

Como las NPs Ag poseen propiedades muy interesantes, como las antimicrobianas y las plasmónicas, y el estudio de la dispersión de luz por bacterias brinda información muy útil acerca de su tamaño, orientación e índice de refracción. Nos hemos enfocado en el estudio de la interacción de la luz por el sistema formado por NPs Ag y una bacteria. Esperamos que los resultados aquí presentados ayuden a comprender de mejor manera los métodos ópticos de caracterización de células biológicas, como la citometría de flujo de barrido. Es importante mencionar que se encontró en la literatura únicamente un artículo publicado acerca del estudio experimental de las propiedades ópticas de bacterias y NPs de oro [84] y se encontraron pocas referencias acerca del estudio teórico de las propiedades ópticas de NPs de oro interactuando con células con núcleo (que obvio no son bacterias) y que emplean el método FDTD [85], [86]. Por lo tanto, con este trabajo mostramos, al emplear la *aproximación de dipolo discreto* o DDA, otra posibilidad para estudiar teóricamente la interacción de ondas electromagnéticas con el sistema formado por NPs Ag y por una bacteria esférica como lo es el *S. aureus*.

La dispersión de radiación electromagnética por cualquier objeto va a depender básicamente de su forma, tamaño e índice de refracción; además de la longitud de onda incidente, polarización y del medio que rodea al objeto. En este trabajo se estudiaron dos bacterias, una gram-positiva (*S. aureus*) y una gram-negativa (*E. coli*), que como ya se mencionó, la diferencia en sus paredes celulares, es la que permite clasificarlas con la tinción de Gram.

5.1. Respuesta óptica de la bacteria *Staphylococcus aureus*

La primer bacteria que estudiamos (empleando DDSCAT) fue el coco *S. aureus*, debido a que posee la forma más simple, una esfera. A pesar de que las bacterias poseen varias estructuras intracelulares, esta bacteria la modelamos como una esfera homogénea e isotrópica, pero en su índice de refracción se incluyó información acerca de su pared celular y citoplasma, acogiendo el modelo propuesto por Balaev y colaboradores [76], quienes para estudiar las propiedades ópticas de bacterias, proponen usar un índice de refracción volumétrico promedio (n_{vp}) igual a:

$$n_{vp} = n_{pc} + (n_{cit} - n_{pc})(1 - t/r)^3, \quad (5.1.1)$$

donde n_{pc} y n_{cit} son los índices de refracción de la pared celular y del citoplasma, respectivamente; t es el grosor de la pared celular y r el radio de la bacteria. Los valores usados para los índices de

CAPÍTULO 5. RESPUESTA ÓPTICA DE BACTERIAS Y NPS AG

5.1. RESPUESTA ÓPTICA DE LA BACTERIA *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

refracción son $n_{pc} = 1.4$ y $n_{cit} = 1.35$, que son los que reportó Wyatt [47] para una $\lambda = 632.8$ nm, que es la que emplean los citómetros de flujo (convencionales y de barrido) equipados con un láser de helio-neón. De manera particular, consideramos un grosor de la pared celular $t = 0.01 \mu m$ y el radio del *S. aureus* $r = 0.4 \mu m$, por lo que de la ecuación (5.1.1) se tiene un valor $n_{vp} = 1.3537$.

El medio en el que se estudiaron las bacterias fue agua y para obtener su índice de refracción en función de λ , se usó la siguiente expresión (también propuesta por Balaev [76]):

$$n_{agua} = 1.3236 + \frac{3.35 \times 10^{-3}}{\lambda^2} - \frac{3.45 \times 10^{-5}}{\lambda^4}, \quad (5.1.2)$$

por lo tanto, para una $\lambda = 632.8$ nm el índice de refracción del agua (n_{agua}) es igual a 1.3318.

En el año 2000, Balaev y colaboradores reportaron los patrones de dispersión del *S. aureus* usando DDA y un número de dipolos $N = 11,536$, haciendo incidir luz polarizada paralela (i_p) y perpendicularmente (i_s) al plano de dispersión $\hat{x} - \hat{y}$. El tamaño de la bacteria reportado fue de 800 nm de diámetro y considerando como medio agua, compararon sus resultados con la teoría de Mie (que como ya se mencionó, es una teoría que describe analíticamente la absorción y dispersión por partículas esféricas homogéneas) y mostraron que DDA brinda los mismos resultados que la teoría de Mie.

Quedando claro que DDA es un método efectivo para estudiar la dispersión de luz por bacterias, en el capítulo 4 se indicó claramente que los resultados son confiables si se elige el número apropiado de dipolos, para ello es necesario realizar estudios de convergencia. Un estudio de convergencia es un estudio de la respuesta óptica en función del número de dipolos N , sabiendo que ésta tiene que ser la misma, independientemente de N . Sin embargo, a pesar de que se representa de mejor manera un objeto dispersor con un mayor N , usualmente se escoge el N menor al que converjan los resultados, para que de esta forma se requiera el menor esfuerzo computacional.

Para realizar nuestros cálculos, utilizamos el código DDSCAT versión 7.3, el cual se encuentra instalado en el servidor del IFUAP Txamula (que consta de 5 nodos con procesadores Intel Xeon (x89_64), con sistema operativo Linux CentOS, 152 Cores y 576 GB en RAM) y en el Laboratorio Nacional de Supercómputo del Sureste de México (LNS).

Las intensidades o irradiancias dispersadas por unidad de irradiancia incidente, i_p e i_s , de todos los patrones de dispersión mostrados en este trabajo, se calcularon usando las ecuaciones (2.4.6) y (2.4.7) y los valores S_{11} y S_{22} obtenidos con DDSCAT, además, se presentan en escala logarítmica y están normalizadas a la unidad cuando el ángulo de dispersión es igual a 0° .

En la Fig. 5.1 se muestra el estudio de convergencia de la dispersión del *S. aureus* modelado como una esfera isotrópica y homogénea con un $r = 0.4$, un $n_{vp} = 1.3537$, en agua ($n_{agua} = 1.3318$) y suponiendo un haz láser de He-Ne ($\lambda = 632.8$ nm). Las Fig. 5.1 a) y b) muestran el estudio de convergencia de los patrones de dispersión, cuando la luz incide paralela y perpendicularmente al plano de dispersión $\hat{x} - \hat{y}$, respectivamente, la definición de plano de dispersión se menciona en la sección 2.2 y es el mismo que usó Balaev. Se aprecia en ambas figuras que, para todos los valores de N elegidos, independientemente del número de dipolos, la respuesta es prácticamente la misma en todos los patrones, en los cuales se observan 2 mínimos en un intervalo de ángulos de 0° a 150° . También, se distingue que la máxima dispersión se presenta en 0° y en ángulos muy pequeños, menores a 15° (ver la escala de intensidad), lo que indica que la bacteria dispersa prácticamente toda la luz hacia adelante y nada hacia atrás (nula retrodispersión). Para ángulos mayores a 150° , la convergencia se alcanza para un número N mayor a 115 mil dipolos, pero estos ángulos no son de mucho interés ya que es difícil medir la retrodispersión. Como se logra una convergencia para los ángulos menores a 150° , representando la bacteria con un N aproximado de

CAPÍTULO 5. RESPUESTA ÓPTICA DE BACTERIAS Y NPS AG

5.1. RESPUESTA ÓPTICA DE LA BACTERIA *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

11 mil dipolos, se decidió modelar esta bacteria con tal número de dipolos en los estudios que se realizaron posteriormente. Cabe mencionar que el tiempo de cómputo de los cálculos anteriores es de unos 3 a 5 minutos. Para corroborar si el número de dipolos mencionado satisface uno de los criterios propuestos por Draine y colaboradores (para usar DDA) empleamos la ecuación 4.2.5, los valores del radio efectivo $a_{ef} = 0.4 \mu\text{m}$, la magnitud del índice de refracción $n = 1.3537$ y la longitud de onda incidente $\lambda = 632.8 \text{ nm}$, obteniendo así que el número mínimo de dipolos que satisface tal criterio es $N = 650$ dipolos. Además de realizar cálculos de los patrones de dispersión, también calculamos las eficiencias ópticas en un rango de longitud de onda desde 300 nm hasta 700 nm, para estos valores de λ , necesitamos 6,097 y 480 dipolos, respectivamente. Por lo tanto, nos aseguramos de satisfacer en todos los casos el criterio mencionado al elegir un número de dipolos $N = 11,000$.

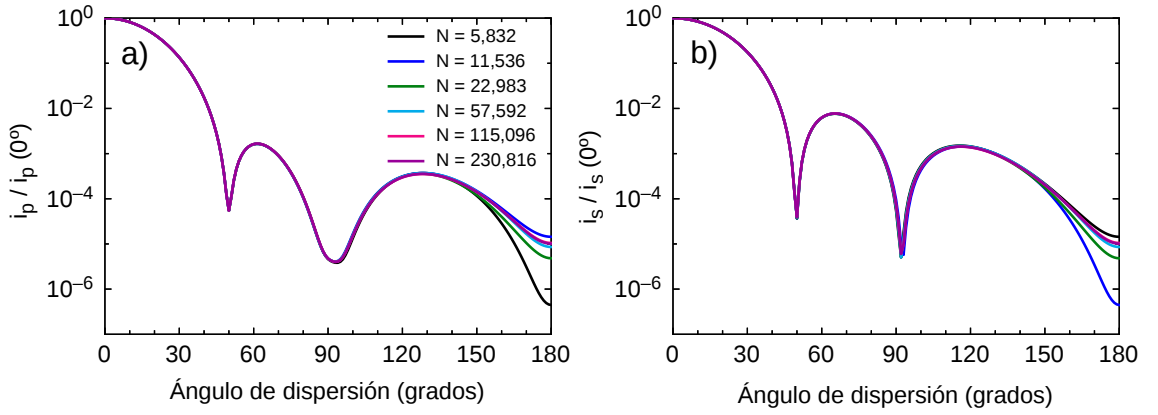


Figura 5.1: Estudio de convergencia del *S. aureus*: a) al incidir luz polarizada paralela y b) perpendicularmente al plano de dispersión $\hat{x}-\hat{y}$ y con $\lambda = 632.8 \text{ nm}$.

En general, el índice de refracción de las bacterias que se reporta en la literatura para cada estructura bacteriana varía desde 1.36 hasta 1.40 [87], igualmente, nosotros hemos empleado un índice de refracción igual a 1.3537 (un valor más pequeño), ésta discrepancia en valores es resultado de la complejidad de este tipo de sistemas biológicos.

Los patrones de dispersión del *S. aureus* con un diámetro igual a $0.8 \mu\text{m}$ y considerando diferentes índices de refracción, son mostrados en la Fig. 5.2. Es posible ver que el número de mínimos no cambia cuando se varía el n del *S. aureus*. Específicamente, cuando la luz incide paralelamente al plano de dispersión $\hat{x} - \hat{y}$ (Fig. 5.2 a)), se nota que a ángulos de dispersión menores a 150° se mantiene la posición de los mínimos del espectro, variando únicamente sus intensidades y al parecer a menor n menor es la intensidad. Cuando la luz incide perpendicularmente al plano de dispersión mencionado, Fig. 5.2 b)), se distingue que los mínimos se desplazan ligeramente a ángulos menores y su intensidad aumenta cuando aumenta n . Con estos resultados, se concluye que bacterias con índice de refracción en el intervalo de 1.34 a 1.4 presentan espectros de dispersión similares, con ligeras diferencias en intensidad y con dos mínimos (uno alrededor de 50° y otro alrededor de 90°), independientemente de la polarización de la luz incidente. En los resultados que se muestran en adelante hemos considerado un $n = 1.3537$.

En la literatura se encuentra reportado que el diámetro del *S. aureus* puede estar entre $0.4 \mu\text{m}$ y $1.5 \mu\text{m}$, dependiendo de la colonia o de la etapa de crecimiento bacteriano [47], [88]. En la Fig. 5.3 se muestran los espectros de dispersión de bacterias *S. aureus* de diferentes tamaños: $0.4 \mu\text{m}$ (Fig. 5.3 a)), $0.8 \mu\text{m}$ (Fig. 5.3 b)), $1.2 \mu\text{m}$ (Fig. 5.3 c)) y $1.5 \mu\text{m}$ (Fig. 5.3 d)). Se aprecia que conforme aumenta el tamaño de la bacteria, aumenta el número de los mínimos y cambia su

CAPÍTULO 5. RESPUESTA ÓPTICA DE BACTERIAS Y NPS AG
5.1. RESPUESTA ÓPTICA DE LA BACTERIA *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

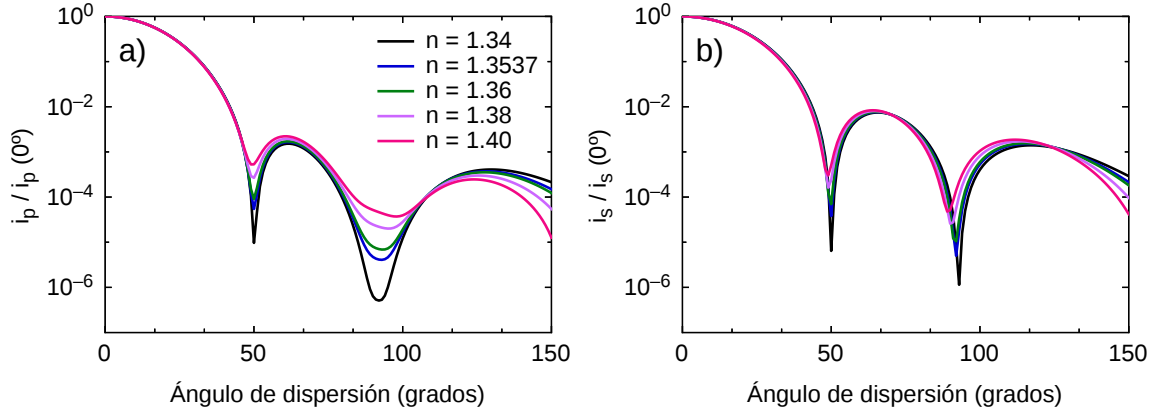


Figura 5.2: Patrones de dispersión del *S. aureus* con un $D = 0.8 \mu m$ y diferente índice de refracción (n): a) al incidir luz polarizada paralelamente y b) perpendicularmente al plano de dispersión $\hat{x}\text{-}\hat{y}$ y con $\lambda = 632.8 \text{ nm}$.

posición, lo que genera una estructura cada vez más ondulada en los patrones de dispersión, tal y como lo indica lo que se menciona en los primeros párrafos de la sección 2.1 y que indica que en cuanto más grande sea la partícula analizada, se observarán más picos y valles en su patrón de dispersión. Complementando los resultados de esta simulación con estudios por técnicas como la citometría de flujo de barrido, sería posible obtener información más precisa sobre el tamaño y componentes de individuos del *S. aureus*.

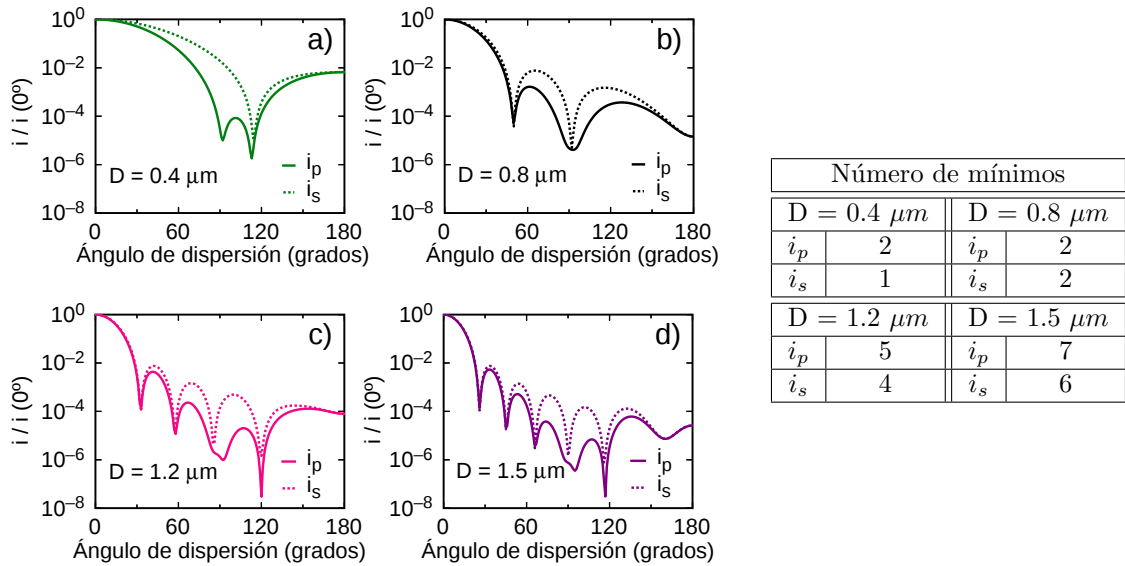


Figura 5.3: Patrones de dispersión del *S. aureus* con diferentes diámetros (D), al incidir luz polarizada paralela (i_p) y perpendicularmente (i_s) al plano de dispersión $\hat{x}\text{-}\hat{y}$ y con $\lambda = 632.8 \text{ nm}$.

Por otro lado, se determina el crecimiento poblacional de bacterias en cultivos como función de a) el aumento de masa del cultivo o b) aumento del número de células. Para ello es común encontrar en los laboratorios de microbiología espectrofotómetros, equipo con el que se mide de manera indirecta la masa bacteriana a partir de la densidad óptica ($D.O.$) o absorbancia (A) de

CAPÍTULO 5. RESPUESTA ÓPTICA DE BACTERIAS Y NPS AG

5.1. RESPUESTA ÓPTICA DE LA BACTERIA *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

las suspensiones bacterianas. Lo que usualmente se hace es contar con una curva inicial estándar y comparar con los valores de A con la masa bacteriana en la muestra de interés. La relación entre la densidad óptica, la absorbancia y la eficiencia de extinción está dada por:

$$D.O. = A = -\log(e^{-\phi C_{ext} D}), \quad (5.1.3)$$

donde ϕ es el número de partículas por mL, C_{ext} la eficiencia de extinción y D el grosor de la muestra, usualmente 1 cm. Cabe mencionar que la ecuación 5.1.3 es válida para soluciones diluidas. Mediante el uso de operaciones sencillas y la ecuación (2.5.6) se puede mostrar que:

$$A = \frac{\phi D \pi r^2 Q_{ext}}{\ln 10}, \quad (5.1.4)$$

vemos que A es directamente proporcional a la eficiencia de extinción o bien, $A \propto Q_{abs} + Q_{dis}$.

La Q_{ext} de bacterias *S. aureus* con los mismos diámetros que los de la Fig. 5.3 se muestra en la Fig. 5.4. Debido a que esta bacteria es totalmente simétrica, la Q_{ext} no cambia cuando el campo eléctrico se encuentra polarizado en la dirección $\hat{y}$ o en la dirección $\hat{z}$, por eso solo presentamos la eficiencia cuando el campo eléctrico incidente tiene su vector de onda en dirección $\hat{x}$ y polarización en $\hat{y}$, Fig. 5.4 a). Es posible notar que conforme aumenta el diámetro del *S. aureus* aumenta el valor de Q_{ext} y que para todos los casos Q_{ext} decrece conforme aumenta λ . En la Fig. 5.4 b) se muestran la eficiencia de extinción, dispersión y absorción para una bacteria con un diámetro igual a $0.8 \mu\text{m}$ (un resultado similar se observó para los otros tamaños), donde es posible observar que la absorción es nula, porque el índice de refracción de la bacteria es una cantidad positiva y real, por lo tanto se puede decir que en las bacterias con este tipo de índice de refracción la *extinción = dispersión*, y por ende la densidad óptica medida en los laboratorios de microbiología está relacionada sólo con el fenómeno de dispersión de la luz por bacterias.

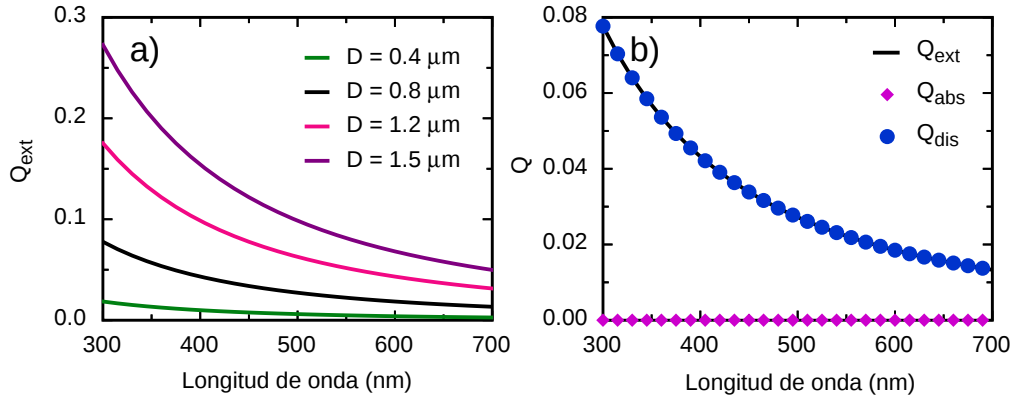


Figura 5.4: a) Q_{ext} del *S. aureus* de diferentes diámetros (D) y con el campo eléctrico polarizado en la dirección $\hat{y}$ y b) Q_{ext} , Q_{abs} y Q_{dis} de una bacteria *S. aureus* con un diámetro igual a $0.8 \mu\text{m}$.

Al final de la sección 2.5 se comentó que el promedio del coseno del ángulo de dispersión, ecuación (2.5.29), da información sobre la dirección principal hacia la cual dispersa la luz la partícula. Si dicho valor es positivo significa que la bacteria dispersa la mayor cantidad de luz hacia adelante ($\theta = 0^\circ$), si es negativo entonces la dispersión es hacia atrás ($\theta = 180^\circ$). En la Fig. 5.5 presentamos el $\langle \cos\theta \rangle$ en función de la longitud de onda incidente para bacterias *S. aureus* de diferentes tamaños. Se nota que el valor del $\langle \cos\theta \rangle$ es positivo para todos los tamaños de la bacteria, por lo tanto la dirección de la luz dispersada es principalmente hacia adelante ($\theta = 0^\circ$), lo que justifica

por qué la retrodispersión no es importante. También, se distingue que este valor va disminuyendo conforme aumenta la longitud de onda incidente, lo cual es característico de objetos que dispersan luz isotrópicamente.

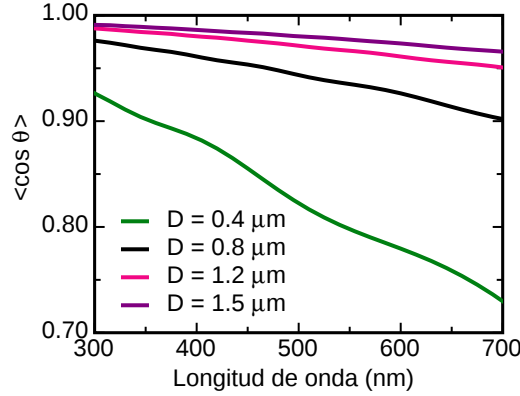


Figura 5.5: $\langle \cos \theta \rangle$ del *S. aureus* de diferentes diámetros (D) y con el campo eléctrico polarizado en la dirección $\hat{y}$.

5.2. Respuesta óptica de la bacteria *Escherichia coli*

En el capítulo 3, se mencionó que una de las diferencias entre las bacterias gram-positiva y una gram-negativa, es el grosor de su pared celular. A continuación, presentamos el estudio que realizamos sobre la respuesta óptica de la bacteria *E. coli*, la cual tiene las características de una gram-negativa, y por lo tanto su pared celular es más gruesa que la del *S. aureus*, que es gram-positiva [89].

En el año 2000, Balaev y colaboradores reportaron un estudio de la bacteria *E. coli* [76], ellos la modelaron como un cilindro homogéneo e isotrópico con un largo igual a $2.5 \mu\text{m}$, un diámetro $D = 0.55 \mu\text{m}$ y un $N = 18,096$. Para obtener su índice de refracción volumétrico promedio, n_{vp} , usaron la ecuación (5.1.1) y los datos mostrados en la tabla 1, que difieren de los usados para el *S. aureus* en el grosor de la pared celular $t = 0.0140 \mu\text{m}$, con estos datos el n_{vp} de la *E. coli* resulta 1.3539. Sin embargo, de la imagen SEM mostrada en la Fig. 3.7 se aprecia que la forma real de la bacteria es mejor representada por un esferocilindro¹ (Ver Fig. 5.6).

Tabla 1: Datos para modelar la <i>E. coli</i>			
n_{pc}	n_{cit}	$r (\mu\text{m})$	$t (\mu\text{m})$
1.4	1.35	0.5215	0.0140

Una de las aportaciones de este trabajo es el cálculo de los patrones de dispersión de la *E. coli* al representarla como un esferocilindro, caracterizado con los parámetros l (largo sin incluir los extremos esféricos) o L (longitud de extremo a extremo) y D (diámetro), como se puede observar en la Fig. 5.6. Cabe mencionar que otros investigadores han estudiado la *E. coli* pero la han modelado como un cilindro [76], como un prolato [51], [47] y también como un esferocilindro, pero en esta última situación únicamente han medido las relaciones de los elementos de la matriz de Mueller S_{34}/S_{11} [53], [54] o la diferencial de la sección transversal de dispersión [57], [77]. Se modeló la bacteria *E. coli* como un esferocilindro con el mismo volumen que el cilindro usado por Balaev, de

¹Un esferocilindro es un cilindro con semiesferas en los extremos

CAPÍTULO 5. RESPUESTA ÓPTICA DE BACTERIAS Y NPS AG

5.2. RESPUESTA ÓPTICA DE LA BACTERIA *ESCHERICHIA COLI*

esta manera las dimensiones del esferocilindro son $D = 0.55 \mu m$, un $l = 2.13 \mu m$ y un $L = 2.68 \mu m$.

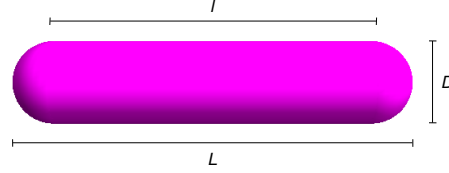


Figura 5.6: Esferocilindro, forma geométrica para representar a la bacteria *E. coli*

Como la forma de la bacteria *E. coli*, posee simetría axial, se calcularon sus patrones de dispersión en tres orientaciones principales, que son las que se muestran en la Fig. 5.7. Para brindarles nombre a estas orientaciones, se observó la orientación del eje principal del esferocilindro con respecto a $\hat{k}$ (que es el vector de onda del haz incidente y que siempre se encuentra paralelo a la dirección $\hat{x}$): a) Orientación paralela (el eje principal del esferocilindro se encuentra paralelo al vector $\hat{k}$), b) Orientación perpendicular $_{\parallel y}$ (el eje principal del esferocilindro se encuentra perpendicular al vector $\hat{k}$ y paralelo a $\hat{y}$) y c) Orientación perpendicular $_{\parallel z}$ (el eje principal del esferocilindro se encuentra perpendicular al vector $\hat{k}$ y paralelo a $\hat{z}$). Además, para todas las configuraciones, la luz incidente tiene una componente paralela ($\vec{E}_y$) o perpendicular ($\vec{E}_z$) al plano de dispersión $\hat{x} - \hat{y}$.

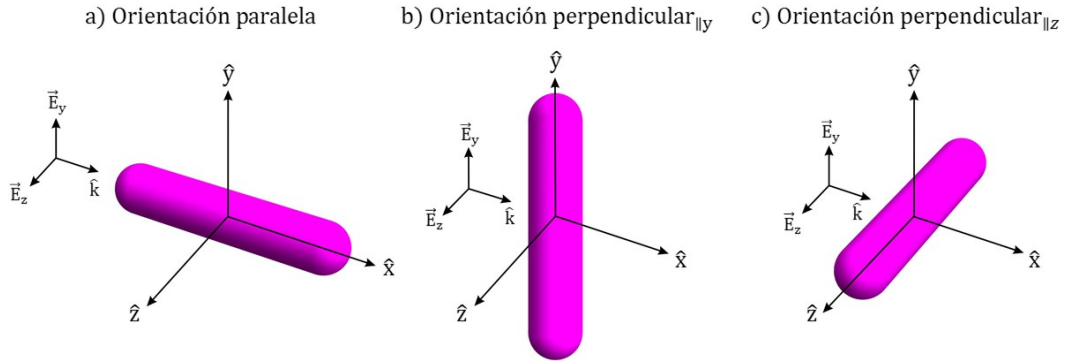


Figura 5.7: Orientaciones principales tomadas en consideración para estudiar la dispersión de luz por la *E. coli*. En todos los casos se considera un haz de luz incidente con componente paralela ($\vec{E}_y$) o perpendicular ($\vec{E}_z$) al plano de dispersión $\hat{x} - \hat{y}$.

DDSCAT permite representar objetos dispersores con forma de cilindro y esferocilindro, así que se realizó el estudio de convergencia del esferocilindro únicamente en la orientación paralela (indicada en la Fig. 5.7 a)) y los patrones obtenidos cuando éste se encuentra en agua (que es el medio en el que experimentalmente se encuentran las bacterias cuando se les realizan sus estudios de dispersión y que tiene un índice de refracción $n = 1.3318$) y bajo luz incidente polarizada paralela y perpendicular al plano de dispersión se muestran en las Fig. 5.8 a) y b), respectivamente. Es posible notar que con un N aproximado a 18,000 dipolos, se obtiene una convergencia en un rango de ángulos de dispersión de 0° a 150° , similar a lo observado para el *S. aureus*. Por consiguiente, se usará alrededor del número de dipolos mencionado para representar a la *E. coli*. Se observan 10 mínimos cuando la luz incide paralela o perpendicularmente (i_p o i_s) al plano de dispersión $\hat{x} - \hat{y}$. Para confirmar el número de dipolos N necesarios para representar a esta bacteria (con un $a_{ef} =$

CAPÍTULO 5. RESPUESTA ÓPTICA DE BACTERIAS Y NPS AG

5.2. RESPUESTA ÓPTICA DE LA BACTERIA *ESCHERICHIA COLI*

0.52 μ m), en un rango de longitudes de onda desde 300 nm hasta 700 nm, usamos la ecuación (4.2.5), con la cual calculamos que se necesitan al menos 13,517 y 1,064 respectivamente, para las longitudes de onda mencionadas. Por lo tanto, un N aproximado a 18,000 dipolos es suficiente para modelar a la bacteria. *E. coli*.

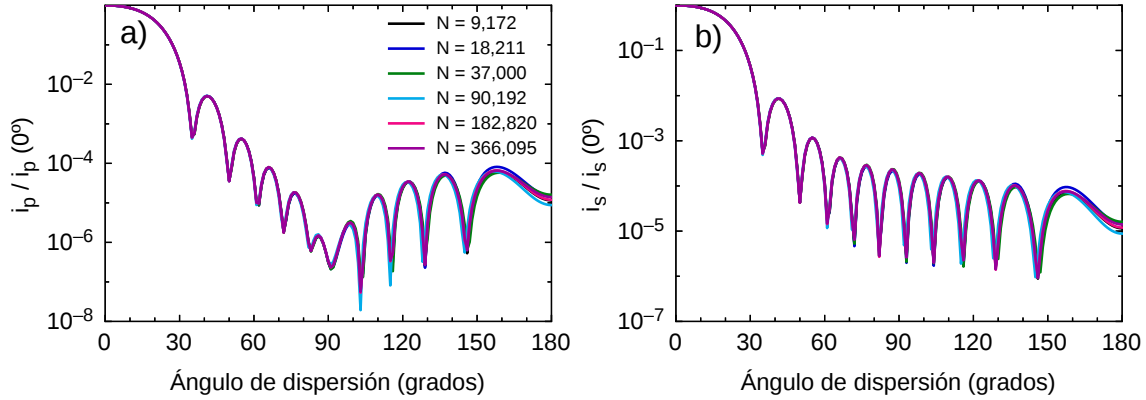


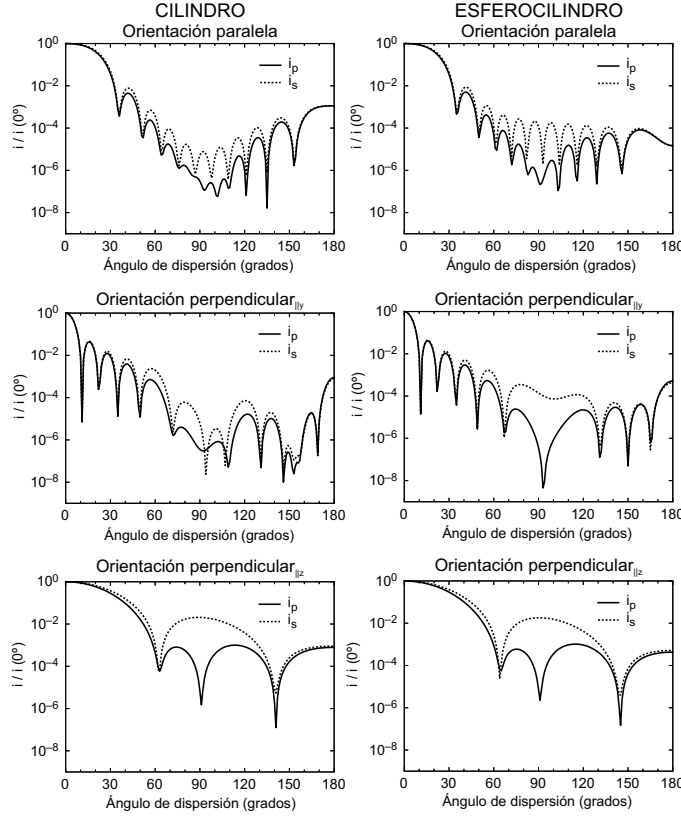
Figura 5.8: Estudio de convergencia de la *E. coli*: a) al incidir luz polarizada paralela y b) perpendicularmente al plano de dispersión $\hat{x}-\hat{y}$ y con $\lambda = 632.8$ nm.

En la Fig. 5.9 se muestran los resultados obtenidos por Balaev al representar la *E. coli* como un cilindro y los resultados que obtuvimos al modelarla como un esferocilindro, en las tres diferentes orientaciones que se comentaron anteriormente. Se aprecia a primera vista que los patrones de dispersión del cilindro comparados con los del esferocilindro, en las orientaciones paralela y perpendicular $_{\parallel y}$, respectivamente, son cualitativamente semejantes excepto en el intervalo de 70° a 120° , diferencia que es notable en la configuración perpendicular $_{\parallel y}$, y esto ocurre porque precisamente en estas orientaciones el eje principal del objeto dispersor, ya sea del cilindro o esferocilindro, se encuentra dispuesto paralelamente al plano de dispersión elegido ($\hat{x} - \hat{y}$) y la presencia de los extremos semiesféricos en el esferocilindro o la carencia de estos en el cilindro, hacen que se note un cambio en los patrones de dispersión al registrar la intensidad de la luz dispersada desde los 0° hasta los 180° (que corresponderían a los ángulos registrados desde la dirección $+\hat{x}$ hasta la $-\hat{x}$), ya sea cuando se incide luz paralela o perpendicular al plano de dispersión mencionado. Por otra parte, en la orientación perpendicular $_{\parallel z}$, el eje principal del cilindro o esferocilindro, se encuentra perpendicular al plano de dispersión $\hat{x} - \hat{y}$, es decir, lo atraviesa y en esta orientación la sección transversal que atraviesa este plano es un círculo del mismo diámetro, tanto para el cilindro como para el esferocilindro. Por tal razón, al registrar la intensidad de la luz dispersada, se obtiene prácticamente la misma indicatriz.

Para describir cuantitativamente las diferencias o similitudes entre los patrones de dispersión de las dos representaciones de la *E. coli*, se tabuló el número de mínimos para cada objeto dispersor y para cada orientación (ver tabla de la Fig. 5.9). Se encontró que para la primera orientación, se tiene un número diferente de mínimos para cada patrón y para las dos últimas, el número de mínimos es el mismo, todo esto debido a las diferencias en la morfología de cada dispersor. También, se asegura que cuando el objeto abarca una mayor área del plano de dispersión, se observa un mayor número de mínimos en su indicatriz, tal como sucede en las dos primeras orientaciones, dicho en otras palabras, el número de mínimos es considerablemente menor cuando se elige un plano de dispersión perpendicular al eje principal. De esto se concluye que el número de mínimos que se observe en los patrones de dispersión va a estar relacionado a la orientación y al área que cubra del plano de dispersión escogido, siendo mayor cuando se considere una orientación que abarque una mayor área del plano mencionado.

CAPÍTULO 5. RESPUESTA ÓPTICA DE BACTERIAS Y NPS AG

5.2. RESPUESTA ÓPTICA DE LA BACTERIA *ESCHERICHIA COLI*



Número de mínimos			
Orientación paralela			
Cilindro		Esferocilindro	
i_p	11	i_p	10
i_s	10	i_s	10
Orientación perpendicular $_{ y}$			
Cilindro		Esferocilindro	
i_p	12	i_p	9
i_s	12	i_s	9
Orientación perpendicular $_{ z}$			
Cilindro		Esferocilindro	
i_p	3	i_p	3
i_s	2	i_s	2

Figura 5.9: Patrones de dispersión de la *E. coli* al modelarla como cilindro y esferocilindro en tres diferentes orientaciones, al incidir luz polarizada paralela (i_p) y perpendicularmente (i_s) al plano de dispersión $\hat{x}\text{-}\hat{y}$ y con $\lambda = 632.8$ nm.

Para corroborar la validez de los cálculos presentados, comparamos los patrones de dispersión de la *E. coli* modelada como esferocilindro con estudios experimentales de esta bacteria en las fases logarítmica y estacionaria. Shvalov y colegas [51] midieron los patrones de dispersión en ambas fases usando un citómetro de flujo de barrido (como el mostrado en la Fig. 3.9). Los patrones se muestran en la Fig. 5.10 a) de la fase logarítmica y b) de la fase estacionaria. Shvalov et. al., observaron que la posición del primer mínimo está asociada a la fase de crecimiento, ya que en el caso de la fase logarítmica, el primer mínimo se encuentra entre 20° y 25° , mientras que para la fase estacionaria el mínimo está alrededor de los 30° . Comparando estos resultados con las simulaciones que realizamos (ver Fig. 5.10 c) orientación perpendicular $_{||y}$ y d) orientación paralela), se puede apreciar que la indicatriz que más se asemeja a la de los resultados experimentales es la del esferocilindro con orientación paralela, ya que en ésta es posible ver dos mínimos localizados aproximadamente en 35° y alrededor de 50° , que coinciden con los observados experimentalmente en la fase estacionaria.

Es importante recordar que la fase logarítmica es aquella cuando las bacterias se están dividiendo, por lo tanto en esa fase se tiene una gran diversidad de individuos con diversos tamaños. Mientras que la fase estacionaria es aquella cuando se tiene prácticamente el mismo número de bacterias vivas que muertas, es decir, la mayoría están en su edad adulta, por lo que hay un tamaño promedio que caracteriza al sistema. La diferencia observada entre el primer mínimo experimental (alrededor de 30°) y los cálculos (alrededor de 35°) la atribuimos a que no corresponden al mismo tamaño de bacteria (como veremos más adelante, el tamaño también influye en la posición del pri-

CAPÍTULO 5. RESPUESTA ÓPTICA DE BACTERIAS Y NPS AG

5.2. RESPUESTA ÓPTICA DE LA BACTERIA *ESCHERICHIA COLI*

mer mínimo). En ese sentido, los cálculos obtenidos describen mejor a la fase estacionaria, ya que se ha considerado un solo individuo, que pudiera tener el tamaño promedio del sistema. También se deduce que las bacterias estaban orientadas paralelamente al vector de onda incidente cuando se realizaron los estudios experimentales y esto correspondería perfectamente con la geometría del equipo usado: las partículas son iluminadas por un láser dirigido a través del flujo del capilar de la cubeta óptica.

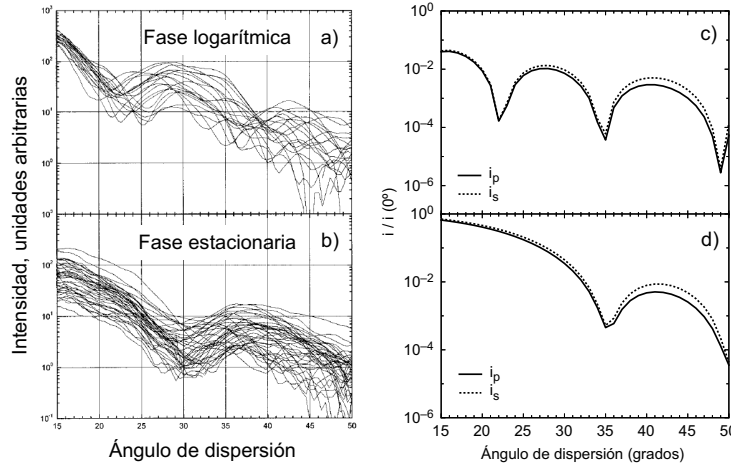


Figura 5.10: Indicatrices medidas, por Shvalov y colegas, de la bacteria *E. coli* en a) fase logarítmica y b) fase estacionaria [51], Los gráficos de la columna derecha son las indicatrices que calculamos usando la morfología de un esferocilindro: c) orientación perpendicular $\parallel_y$ y d) orientación paralela.

El tamaño de la *E. coli* puede variar, dependiendo de la cepa o de la etapa de crecimiento, en la literatura se encuentran reportados valores desde $0.4 \mu m$ a $1.5 \mu m$ para el diámetro y de $1 \mu m$ a $6 \mu m$ en su longitud [47], [52], [90]. Para estudiar los posibles efectos en los espectros de dispersión debido al diferente tamaño de bacteria, se estudió únicamente la orientación paralela. Se analizaron dos casos, bacteria con 1) misma longitud y diferentes grosores y 2) mismo grosor y diferentes longitudes.

Para el primer caso se consideró $l = 2.13 \mu m$ (largo sin incluir los extremos esféricos), se varió D desde $0.55 \mu m$ hasta $2 \mu m$ y los patrones obtenidos bajo estas condiciones, se muestran en la Fig. 5.11. Básicamente, lo que se distingue es que conforme aumenta D , aumenta el número de mínimos en las indicatrices, ya sea que se incida luz paralela o perpendicular al plano de dispersión. En conclusión, la indicatriz de bacterias gruesas presenta mayor número de mínimos en comparación con bacterias de menor grosor.

En el segundo caso estudiado, cuando se fija el diámetro ($D = 0.55 \mu m$) y se varía la longitud de extremo a extremo de la bacterias (L), desde $2 \mu m$ hasta $5 \mu m$ (Fig. 5.12), se nota un comportamiento similar al caso 1, el número de mínimos crece al aumentar la longitud. Igualmente, conforme aumenta el tamaño del esferocilindro, es posible notar que la posición de los mínimos de las indicatrices se mueve hacia la dirección hacia adelante (0°) y esto mismo reporta Shvalov y colaboradores al modelar la *E. coli* como un prolato [51]. Además, parece ser que se presenta un número mayor de mínimos cuando la luz incide de manera paralela que cuando incide perpendicularmente al plano de dispersión.

Asimismo, en ambos casos de estudio, cuando se varía el grosor y la longitud de la bacteria, se observa que ésta dispersa la mayor parte de la luz hacia adelante, es decir, su máxima dispersión

CAPÍTULO 5. RESPUESTA ÓPTICA DE BACTERIAS Y NPS AG
5.2. RESPUESTA ÓPTICA DE LA BACTERIA *ESCHERICHIA COLI*

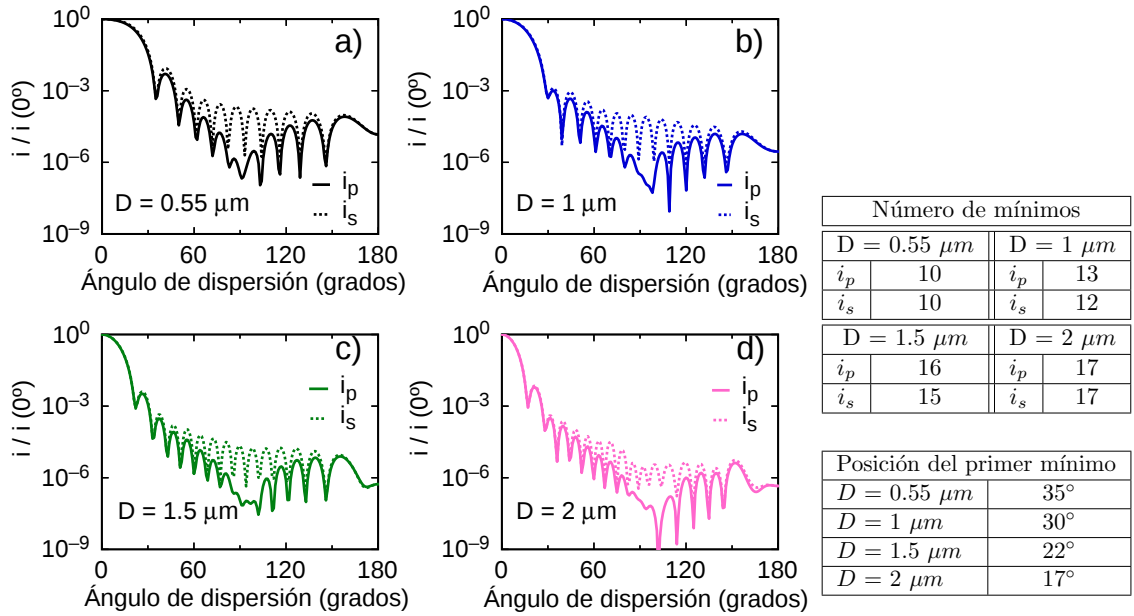


Figura 5.11: Patrones de dispersión de la *E. coli* con diferentes diámetros (D) y mismo $l = 2.13 \mu m$, al incidir luz polarizada paralela (i_p) y perpendicularmente (i_s) al plano de dispersión $\hat{x}\text{-}\hat{y}$ con $\lambda = 632.8 \text{ nm}$.

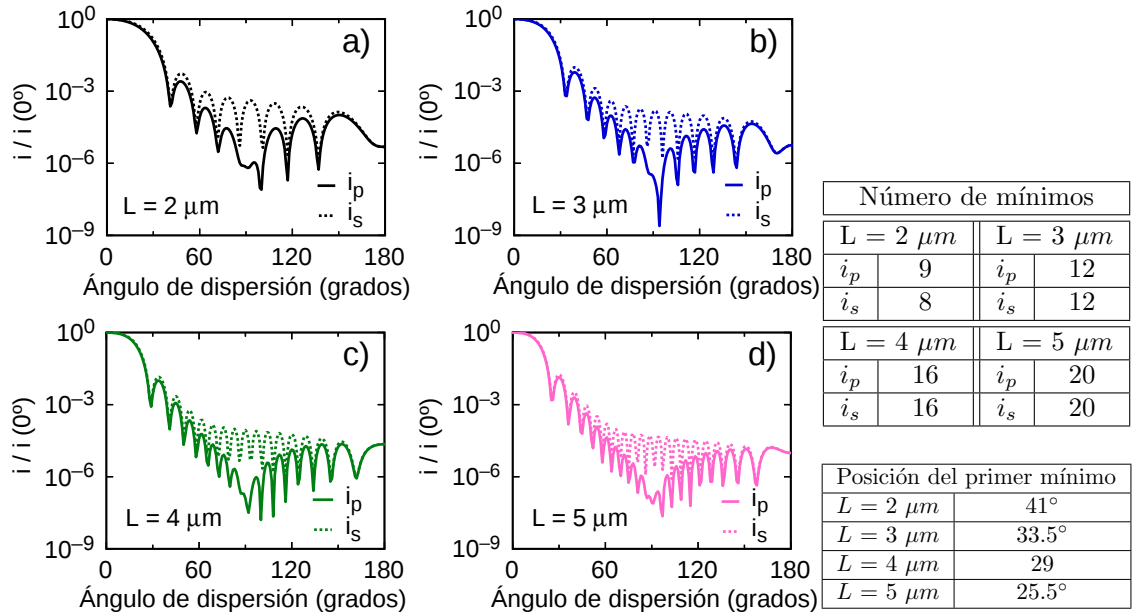


Figura 5.12: Patrones de dispersión de la *E. coli* con diferente valor de longitud L (de extremo a extremo) y fijando $D = 0.55 \mu m$, al incidir luz polarizada paralela (i_p) y perpendicularmente (i_s) al plano de dispersión $\hat{x}\text{-}\hat{y}$ con $\lambda = 632.8 \text{ nm}$.

CAPÍTULO 5. RESPUESTA ÓPTICA DE BACTERIAS Y NPS AG

5.2. RESPUESTA ÓPTICA DE LA BACTERIA *ESCHERICHIA COLI*

se presenta a 0° . De igual manera, se aprecia que conforme aumenta D o L , la posición del primer mínimo en los patrones de dispersión (ver Tabla en la parte inferior derecha de las Fig. 5.11 y 5.12, respectivamente) se mueve hacia ángulos menores. Observando la forma de los patrones de dispersión y la posición de su primer mínimo, es posible distinguir que, a ángulos menores del mínimo, es cuando se tiene la mayor cantidad de luz dispersada. En conclusión, el número de mínimos está asociado a la relación entre largo y ancho de la bacteria.

También, se calculó la Q_{ext} de la *E. coli* para los diversos tamaños estudiados. La Fig. 5.13 a) muestra los resultados considerando diferentes diámetros y la Fig. 5.13 b) diferentes longitudes. Se aprecia en ambos casos estudiados, que a mayor tamaño, mayor es la Q_{ext} y que ésta tiene un comportamiento decreciente a medida que aumenta la longitud de onda.

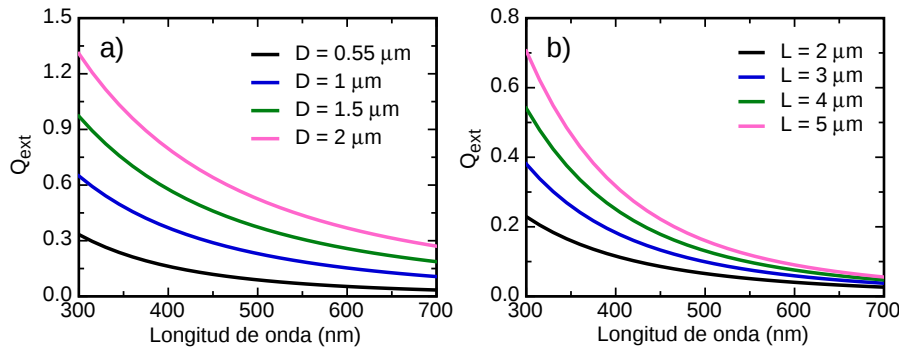


Figura 5.13: Q_{ext} de la *E. coli* de diferente tamaño: a) diferentes grosores y una longitud $l = 2.13 \mu m$ y b) diferentes longitudes de extremo a extremo (L) y un grosor $D = 0.55 \mu m$.

En 1969, Bryant y colaboradores midieron la absorbancia de una disolución de bacterias *E. coli* (10^6 células/mL de disolución salina acuosa) [91], ver Fig. 5.14, considerando que la absorbancia es directamente proporcional a la eficiencia de extinción (ecuación 5.1.4), nuestros resultados teóricos y los experimentales empatan bien, al menos cualitativamente, ver Fig. 5.14).

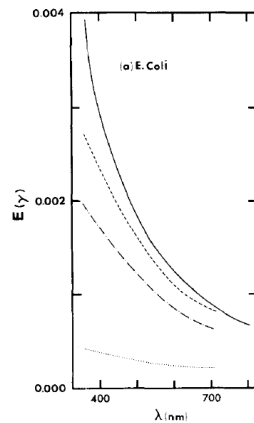


Figura 5.14: Absorbancia ($E(\gamma)$) de una disolución formada por 10^6 bacterias *E. coli* por mL medidas con diferentes espectrofotómetros. Las diferentes líneas observadas, indican diferentes valores de γ (que es ángulo medio promedio del eje de la celda que contiene a la muestra), desde la línea continua a la punteada: $E(0^\circ)$, $E(2^\circ)$, $E(4^\circ)$ y $E(35^\circ)$. Imagen tomada de [91].

La dirección principal de la luz dispersada por la bacteria es hacia adelante, como lo indica el

CAPÍTULO 5. RESPUESTA ÓPTICA DE BACTERIAS Y NPS AG

5.2. RESPUESTA ÓPTICA DE LA BACTERIA *ESCHERICHIA COLI*

valor positivo del coseno del ángulo de dispersión para los diferentes tamaños analizados, en la Fig. 5.15 a) y b) se muestran los resultados de considerar bacterias con diferentes grosores y diferentes longitudes, respectivamente. De igual manera, este valor va disminuyendo conforme aumenta la longitud de onda incidente, lo que es característico de objetos que dispersan luz isotrópicamente.

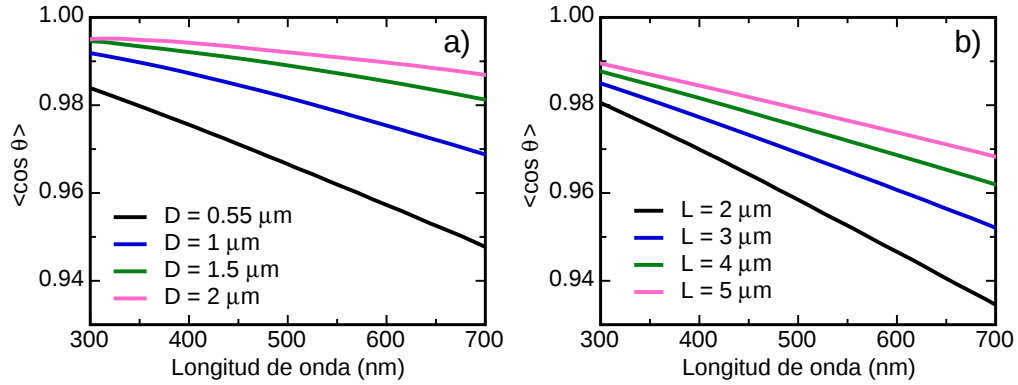


Figura 5.15: $\langle \cos \theta \rangle$ de la *E. coli* de diferente tamaño: a) diferentes grosores y una longitud $l = 2.13 \mu\text{m}$ y b) diferentes longitudes de extremo a extremo (L) y un grosor $D = 0.55 \mu\text{m}$.

Como se mencionó en la sección anterior, el índice de refracción de las bacterias varía de 1.36 hasta 1.4 dependiendo de su composición interna. Las indicatrices calculadas al variar este parámetro en una bacteria *E. coli* con orientación paralela, un $D = 0.55 \mu\text{m}$, un $l = 2.13 \mu\text{m}$ y luz polarizada paralela o perpendicularmente al plano de dispersión $\hat{x} - \hat{y}$, se muestran en las Fig. 5.16 a) y b), respectivamente. Se observa que cuando varía n , al incidir luz paralela y perpendicularmente, el número de mínimos no cambia y a mayor n , se desplaza la posición de los mínimos a menores ángulos y se ven menos definidos. Las diferencias más notables se dan en el intervalo de 70° a 120° cuando la luz incide paralelamente al plano de dispersión. En conclusión, podemos decir que el número de mínimos no está asociado a la composición de la bacteria, pero sí su intensidad y esto mismo se cumple para el *S. aureus*.

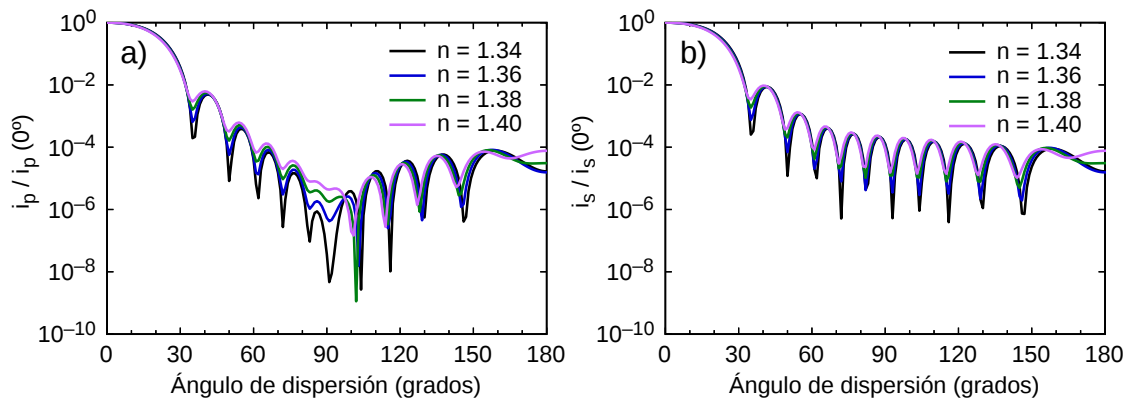


Figura 5.16: Patrones de dispersión de la *E. coli* con un $D = 0.55 \mu\text{m}$ y un $l = 2.13 \mu\text{m}$, con diferente índice de refracción (n): a) al incidir luz polarizada paralelamente y b) perpendicularmente al plano de dispersión $\hat{x} - \hat{y}$ y con $\lambda = 632.8 \text{ nm}$.

Para estudiar la interacción de las NPs Ag con la bacteria, se analizó únicamente a la bacteria *S. aureus* (por la forma completamente simétrica que presenta) y en la siguiente sección se exponen los resultados obtenidos.

5.3. Respuesta óptica de NPs Ag sobre la superficie de una bacteria *S. aureus*

Debido a que las NPs Ag poseen propiedades muy interesantes como las plasmónicas y las antimicrobianas, los investigadores las han puesto en contacto con diferentes tipos de bacterias patógenas para aprovechar sus propiedades. Por otra parte, mediante estudios de dispersión de luz por bacterias, se ha podido obtener información acerca de su tamaño, índice de refracción u orientación. Sin embargo, la caracterización óptica de bacterias con NPs se ha realizado en muy pocas ocasiones y no se comprende del todo la respuesta óptica de este sistema. Por toda la información que se puede obtener acerca del estudio de las propiedades ópticas, nos hemos interesado en realizar estudios que ayuden a comprender los resultados de la caracterización de bacterias o de bacterias cuando están en contacto con NPs Ag y en seguida mostraremos el producto de las investigaciones realizadas.

Cuando se ponen en contacto NPs Ag con cualquier microorganismo, existen varias posibilidades, dependiendo del tamaño de las NPs, éstas pueden penetrar la capa externa de la bacteria o bien posicionarse sobre su superficie, tal y como se observa en la Fig. 5.17. En el presente trabajo nos interesamos en la situación cuando las NPs se quedan sobre la superficie de la bacteria y analizamos la respuesta óptica cuando las NPs están colocadas de manera arbitraria. Es importante mencionar que el estudio del sistema formado por NPs Ag - bacteria solo se hizo para la bacteria *S. aureus*.

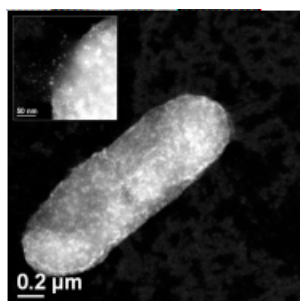


Figura 5.17: Imagen STEM de una bacteria *E. coli* con NPs Ag sobre su superficie. Los puntos brillantes, representan las NPs [13].

La presente sección está dividida en tres temas principales, la sección 5.3.1 trata del estudio de las eficiencias ópticas de un arreglo de NPs Ag solas con diferentes distribuciones (ver por ejemplo Fig. 5.18 a) a d)); la segunda sección, 5.3.2, comprende el estudio de las eficiencias ópticas de la bacteria *S. aureus* con NPs Ag distribuidas sobre su superficie (ver por ejemplo Fig. 5.18 a*) a d*). Las secciones 5.3.1 y 5.3.2 muestran resultados con NPs Ag de 50 nm de diámetro, mientras que en la última sección, 5.3.3, se reporta un estudio considerando la bacteria y NPs Ag de 20 nm. Cabe mencionar que el diámetro de la bacteria *S. aureus* es de 800 nm y se considera que todos los sistemas se encuentran en agua ($n = 1.33$). Para estudiar los sistemas de interés, usamos DDSCAT y su subrutina denominada *SPH.ANLN*, que genera (en base a las coordenadas de los centros de las NPs Ag y de la bacteria, además de los radios) un arreglo de múltiples esferas que no se trasladan y que pueden ser de diversos materiales, en nuestro caso NPs Ag y la bacteria esférica *S. aureus*.

Es importante mencionar que se presentan las eficiencias ópticas (Q_{ext} , Q_{abs} y Q_{dis}), porque es bien conocido que la Q_{abs} brinda información sobre la frecuencia de resonancia de los plasmones de superficie y además, las NPs Ag de 50 nm presentan efectos de dispersión que no pueden ser despreciados [18].

5.3.1. Arreglos de NPs Ag solas con diferentes distribuciones espaciales

Primero se expone el estudio de un arreglo de 4 NPs Ag de 50 nm de diámetro, dispuestas en 4 posibles configuraciones espaciales en el plano $x - y$: las configuraciones 1 y 2 (ver Fig. 5.18 a) y b)) corresponden a distribuciones uniformes, mientras que las configuraciones 3 y 4 (ver Fig. 5.18 c) y d)) corresponden a distribuciones no uniformes. La configuración 1 corresponde a una distribución uniforme de NPs Ag y totalmente simétrica, la configuración 2 consta de un mismo número de NPs en los extremos opuestos de la bacteria, la configuración 3 consiste de un mayor número de NPs en un extremo que en otro de la bacteria y la configuración 4 consta de todas las NPs en un extremo de la bacteria. En todos los casos estudiados, el plano en el que se encuentran las NPs es el plano $\hat{x} - \hat{y}$ y el vector de onda incidente es $\vec{k} = \vec{x}$.

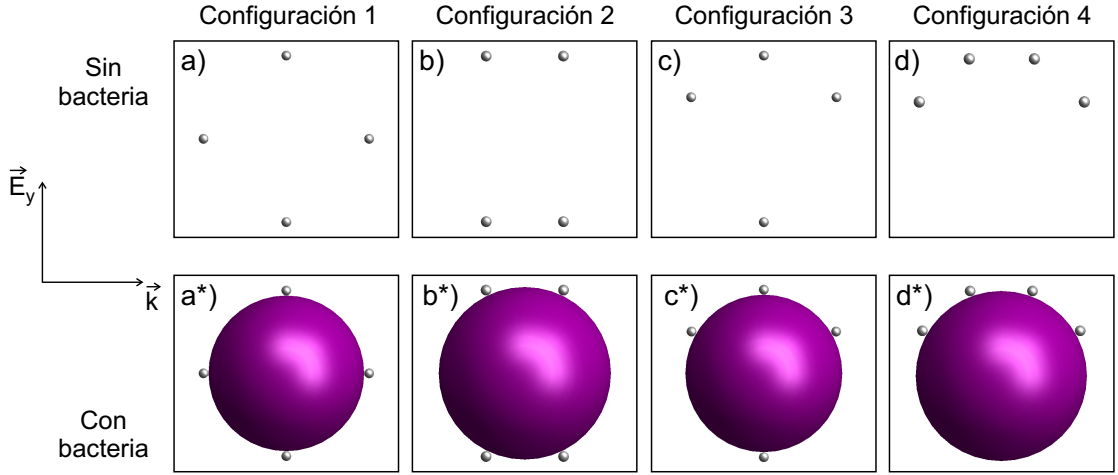


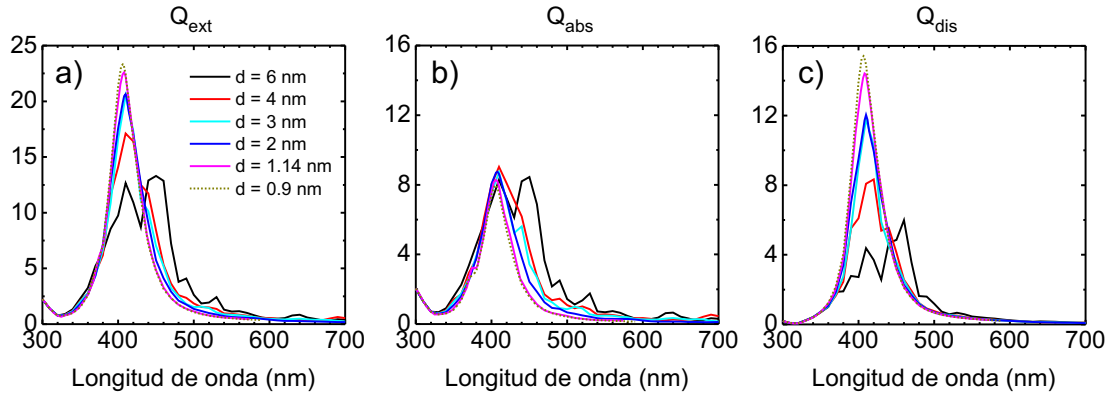
Figura 5.18: Representación esquemática de las configuraciones 1-4 de 4 NPs Ag sin bacteria (desde a) hasta d)) y con bacteria (desde a*) hasta d*). El sistema de la izquierda muestra la dirección del vector de onda incidente en dirección $\hat{x}$ y la componente de luz polarizada en $\hat{y}$.

En la Fig. 5.19 se muestra el estudio de convergencia para el arreglo de 4 NPs en la configuración 1. En este caso, la respuesta óptica se obtuvo para diferentes valores de la distancia de separación interdipolar ($d = 6, 4, 3, 2, 1.14, 0.9$ nm), lo cual es equivalente a estudiarla variando el número de dipolos (N), ver tabla de la Fig. 5.19. En las Fig. 5.19 a), b) y c) se muestran sus eficiencias ópticas de extinción, absorción y dispersión, respectivamente, cuando incide luz en dirección $\hat{x}$ y esta polarizada en $\hat{y}$. Es posible notar de la Fig. 5.19 a) que cuando $d = 6$ nm, las eficiencias no han alcanzado la convergencia. Sin embargo, conforme d disminuye, las respuestas parecen converger y cuando $d = 1.14$ y 0.9 nm, las curvas se superponen, lo que hace suponer que la convergencia se ha alcanzado, pudiéndose apreciar para los valores de $d = 0.9$ y 1.14 nm un máximo que se encuentra en 408 nm. Vale la pena mencionar que el hecho de que las eficiencias ópticas converjan cuando se representa cada NP con aproximadamente 45 mil y 90 mil dipolos, coincide con los estudios reportados de cuando se estudia una sola NP [18], [29], [95], [26], [66]. Asimismo, al ir disminuyendo el valor de d , se observa que los espectros de Q_{abs} tienden a definir una banda ancha en el intervalo de 360 a 440 nm, la cual se puede atribuir a excitaciones plasmónicas. Otra tendencia es que en ese mismo intervalo, la dispersión contribuye en mayor medida a la extinción en comparación con la absorción.

CAPÍTULO 5. RESPUESTA ÓPTICA DE BACTERIAS Y NPS AG

5.3. RESPUESTA ÓPTICA DE NPS AG SOBRE LA SUPERFICIE DE UNA BACTERIA *S. AUREUS*

AUREUS



d	Número total de dipolos, N	Número de dipolos por NP
6	1,168	292
4	4,016	1,004
3	9,728	2,432
2	32,544	8,136
1.14	177,892	44,473
0.9	358,988	89,747

Figura 5.19: Estudio de convergencia de la a) Q_{ext} , b) Q_{abs} y c) Q_{dis} del arreglo de 4 NPs solas distribuidas como en la configuración 1, mostrado en la Fig. 5.18a), y cuando éstas se encuentran en agua ($n = 1.33$).

En la Fig. 5.20, se muestran por separado las eficiencias ópticas cuando $d = 1.14$ nm. Es posible ver en el gráfico de la Q_{abs} y la Q_{dis} que el efecto que contribuye principalmente a la extinción es el de dispersión (Fig. 5.20c), mientras que la absorción (Fig. 5.20b) tiene una menor contribución y esto es debido al tamaño de las NPs. Por otra parte, en el gráfico de la Q_{abs} se aprecian dos picos asociados a plasmones, el modo cuadrupolar localizado a una longitud de onda de 375 nm (que no se observa en la Q_{abs} de la Fig. 5.19) y el dipolar en 408 nm, asignamos estos modos a cada pico porque de la literatura se conoce que el plasmón dipolar en nanopartículas de plata esféricas se localiza en mayores longitudes de onda que el cuadrupolar. Adicionalmente, como las NPs están lo suficientemente separadas entre sí, asociamos la respuesta óptica de las 4 NPs a la suma de las eficiencias individuales.

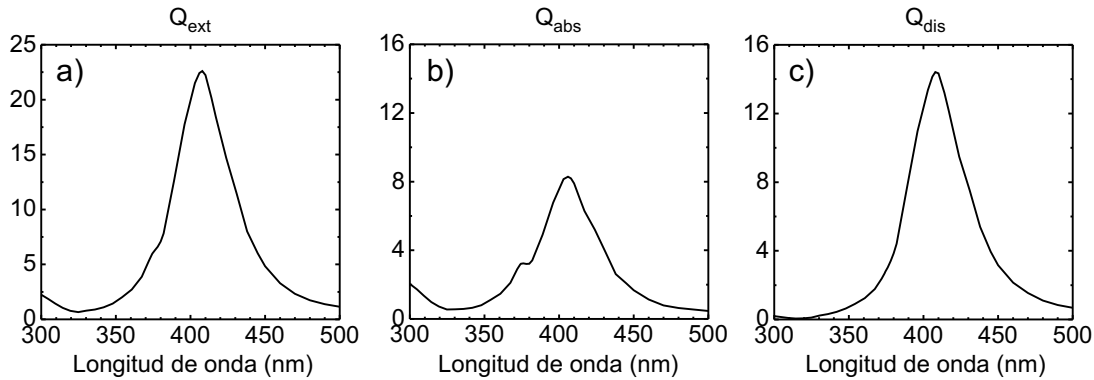


Figura 5.20: Eficiencias ópticas con una $d = 1.14$ nm de la configuración 1 de 4 NPs Ag y cuando éstas se encuentran en agua ($n = 1.33$): a) Q_{ext} , b) Q_{abs} y c) Q_{dis} .

Además de estudiar el arreglo de 4 NPs Ag de 50 nm de diámetro en la configuración 1, también se estudiaron las otras tres configuraciones que se muestran en la Fig. 5.18b), c) y d), a fin de estudiar los efectos generados en la respuesta óptica de las NPs debidos a su distribución espacial. Es importante mencionar que la respuesta óptica de un objeto dispersor cualquiera, en general, depende de la dirección del vector de onda incidente y del estado de polarización del campo eléctrico. Dado que hemos elegido estudiar 4 configuraciones de 4 NPs sobre un plano, resulta importante conocer la respuesta óptica cuando el estado de polarización del campo eléctrico es paralelo (polarización en $\hat{y}$ o polarización paralela) y perpendicular al plano (polarización en $\hat{z}$ o polarización perpendicular) donde se encuentran las NPs.

En las Fig. 5.21 a) - d) se muestra la respuesta óptica de las 4 NPs Ag en sus diferentes configuraciones al incidir luz con polarización paralela y en las Fig. 5.21 a*) - d*) se muestra la respuesta óptica de las mismas configuraciones al incidir luz con polarización perpendicular. Resulta importante mencionar que para calcular estas respuestas ópticas se usó una distancia interdipolar igual a 1.14 nm. Se nota que el fenómeno de dispersión genera una mayor contribución a la dispersión que la absorción. También, es posible apreciar que la eficiencia de absorción presenta dos picos, uno entre 370 y 380 nm y otro entre 400 y 410 nm. Para identificar las diferencias entre los 4 casos, se presenta la Fig. 5.22.

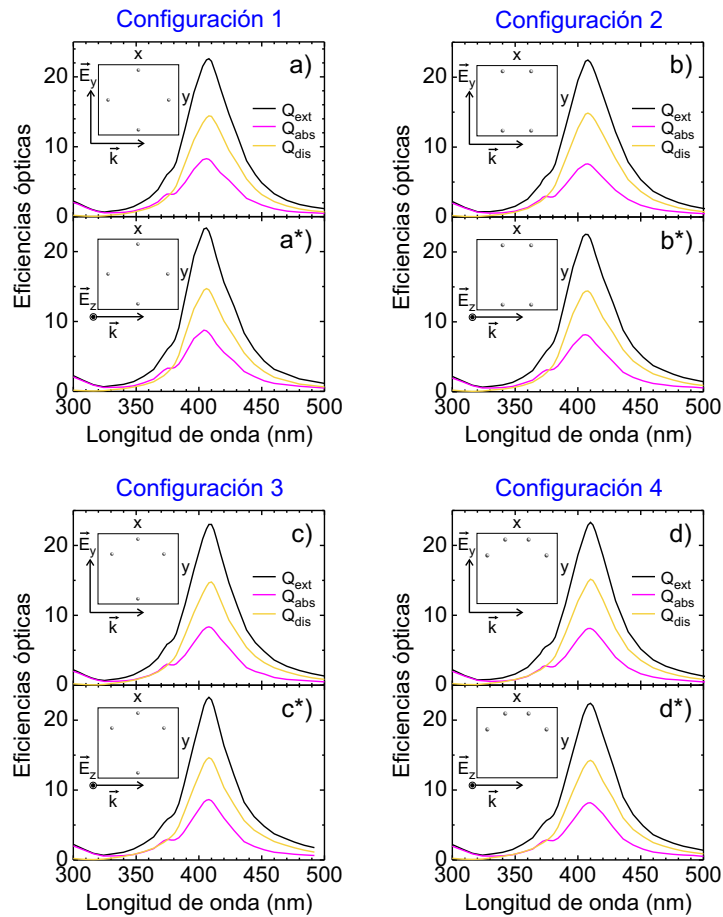


Figura 5.21: Eficiencias ópticas de un arreglo de 4 NPs Ag con un $D = 50$ nm, dispuestas en las 4 diferentes configuraciones mostradas en la Fig. 5.18 a) - d) cuando incide luz con polarización paralela: Fig. a) - d) y perpendicular: Fig. a*) - d*).

CAPÍTULO 5. RESPUESTA ÓPTICA DE BACTERIAS Y NPS AG

5.3. RESPUESTA ÓPTICA DE NPS AG SOBRE LA SUPERFICIE DE UNA BACTERIA *S. AUREUS*

Cuando incide luz con polarización paralela, ver Fig. 5.22 a) - c), se aprecia que en la Q_{abs} la posición del primer máximo en todas las configuraciones se encuentra en 375 nm y la posición del segundo máximo se desplaza ligeramente a mayores longitudes de onda conforme disminuye la simetría de la distribución espacial de las 4 NPs Ag solas, es decir desde la configuración 1 que es la más simétrica hasta la configuración 4 que es la menos simétrica. Además, todas las configuraciones presentan intensidades de sus eficiencias muy semejantes. Las líneas espectrales de la Q_{dis} son muy parecidas y se observa únicamente un máximo para todas las configuraciones entre 406 y 410 nm (ver tabla 1 y 2 de la Fig. 5.22) para todas las configuraciones. Cuando incide luz con polarización perpendicular, ver Fig. 5.22 a*) - c*), se aprecia que las eficiencias ópticas tienen un comportamiento cualitativo similar a cuando incide luz con polarización paralela.

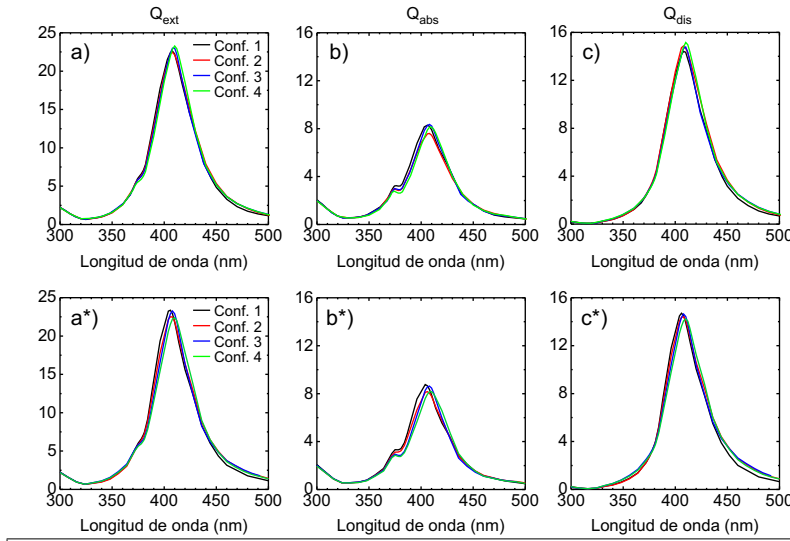


Tabla 1: Posiciones de los máximos de las eficiencias ópticas - Polarización paralela

	Configuración 1	Configuración 2	Configuración 3	Configuración 4
Q_{ext}	408	408	408	410
Q_{abs}	406	408	408	410
Q_{dis}	408	408	410	410

Tabla 2: Posiciones de los máximos de las eficiencias ópticas - Polarización perpendicular

	Configuración 1	Configuración 2	Configuración 3	Configuración 4
Q_{ext}	406	406	408	410
Q_{abs}	404	406	408	410
Q_{dis}	406	408	408	410

Figura 5.22: Comparación de las eficiencias ópticas de las 4 configuraciones estudiadas de 4 NPs Ag con un $D = 50$ nm cuando incide luz con polarización paralela: a) - c) y perpendicular: a*) - c*).

Habiendo mostrado los efectos de tener NPs Ag en distribuciones específicas, enseguida presentamos los resultados del estudio de la respuesta óptica de arreglos con diferente número de NPs Ag: 1, 5, 10, 15 y 30, distribuidas espacialmente de manera no uniforme, ver Fig. 5.23 a) hasta d). Para esto, se usó nuevamente la rutina de DDSCAT *SPH.ANL.N* y el código desarrollado por N. Ferralis [92] y que se encuentra disponible en [93]. Básicamente, lo que hace este código es generar las coordenadas de los centros de esferas pequeñas situadas aleatoriamente en la superficie de una esfera central grande. En nuestro caso, las esferas pequeñas representan las NPs Ag y la esfera central grande representa la bacteria *S. aureus*. Las variables físicas del sistema que considera el código son: la posición de las esferas pequeñas, el diámetro de todas las esferas y su composición y el desplazamiento de la posición del centro de las esferas pequeñas con respecto a la superficie de

la esfera grande. El diámetro y la composición (función dieléctrica) de las NPs Ag y del *S. aureus* se determinó como un dato de entrada. Se modificó el código a fin de garantizar que las esferas pequeñas siempre estén situadas exactamente sobre la superficie de la esfera grande. Para realizar los estudios de las NPs sin la bacteria, simplemente no se indica en DDSCAT las coordenadas del centro de la esfera central o la bacteria.

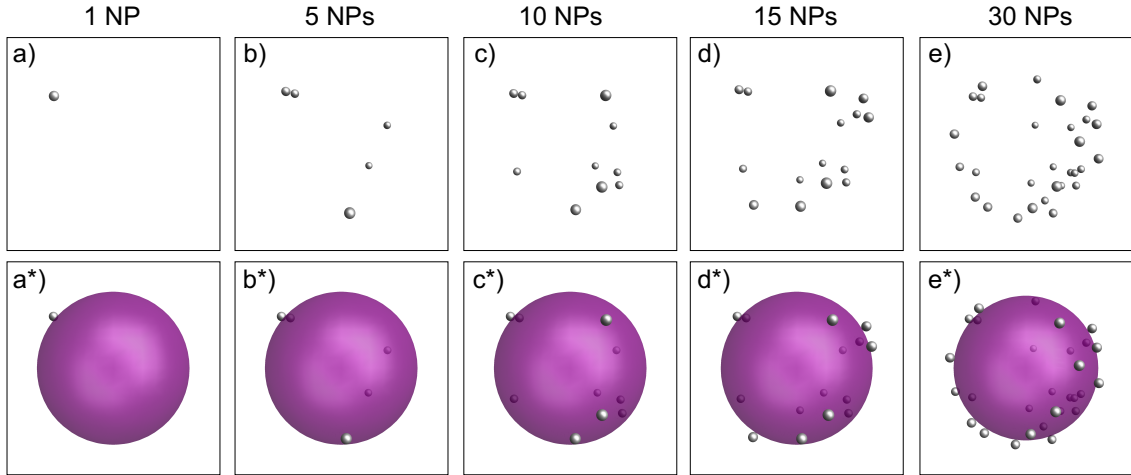


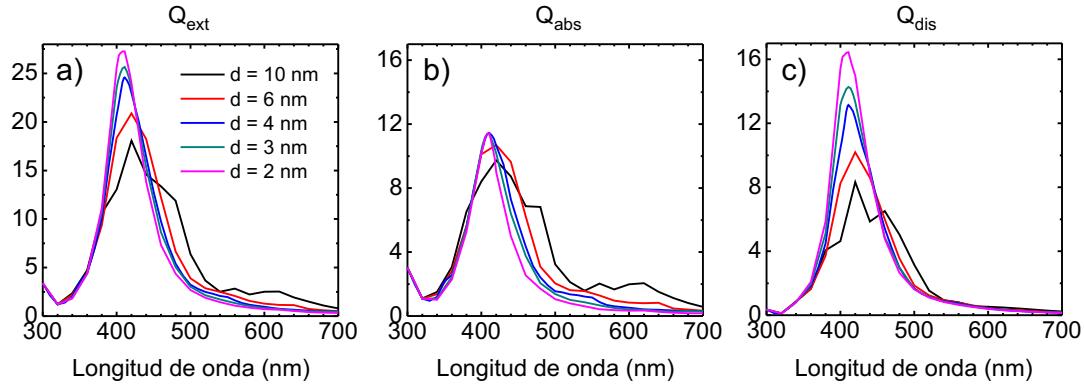
Figura 5.23: Representación esquemática de 1, 5, 10, 15 y 30 NPs Ag distribuidas especialmente de manera no uniforme: desde a) hasta e) y representación de éstas sobre una bacteria *S. aureus* con un $D = 800$ nm: desde a*) hasta e*).

El primer estudio que se realizó para las NPs Ag distribuidas espacialmente de manera no uniforme, fue el de convergencia. Para esto ubicamos 15 NPs Ag con un $D = 50$ nm distribuidas como se muestra en la Fig. 5.23 d)) y en la Fig. 5.24 se presentan los resultados de las eficiencias ópticas obtenidas al representar éstas NPs Ag con una distancia interdipolar $d = 10, 6, 4, 3$ y 2 nm, al incidir luz con polarización paralela al plano $x - y$. Es posible notar que conforme d disminuye, se va observando en las eficiencias cierta tendencia (ver líneas espectrales para $d = 4, 3$ y 2 nm), por ejemplo, un máximo alrededor de 410 nm y debido al tamaño de las NPs, el efecto de dispersión es mayor que la absorción. Al comparar estos resultados con los de la Fig. 5.19, se puede comentar que cuando se dispone de un mayor número de NPs Ag, se observan bandas más anchas y en el caso de la Q_{abs} , se observa únicamente un máximo cerca de los 410 nm.

Se nota en la Fig. 5.24 que las eficiencias con $d = 4$ nm presentan la misma tendencia (variando únicamente su intensidad) que cuando se tiene la menor distancia interdipolar considerada, $d = 2$ nm. Además, con una distancia interdipolar mayor, se requiere un menor tiempo de cálculo, ya que con $d = 2$ nm se requiere hasta 1 día por punto y con $d = 4$ nm aproximadamente 12 horas. Por lo anterior, el estudio de arreglos con $5, 15$ y 30 NPs Ag (mostrados en la Fig. 5.23 b), c) y e)) se reporta empleando una $d = 4$ nm.

Para la NP Ag sola mostrada en la Fig. 5.23 a) se usó un número de dipolos igual a 150 mil debido a que como es una única NP, el tiempo de cálculo para esta es de aproximadamente 6 horas y porque con este número de dipolos se asegura una convergencia [18].

La Fig. 5.25 a) muestra el espectro de las eficiencias de extinción, la cual resulta de la suma de las líneas espectrales de las eficiencias de absorción y dispersión, Fig. 5.25 b) y c), al variar el número de NPs Ag ($1, 5, 10, 15$ y 30) distribuidas espacialmente de manera no uniforme. En la línea espectral de la eficiencia de absorción de 1 NP, se identifica la señal de un plasmón cuadrupolar en



d	Número de dipolos totales	Número de dipolos por NP
10	1,145	76
6	5,430	362
4	18,244	1,216
3	43,336	2,889
2	146,037	9,735

Figura 5.24: Estudio de convergencia de la a) Q_{ext} , b) Q_{abs} y c) Q_{dis} de un arreglo de 15 NPs Ag espacialmente distribuidas de manera no uniforme (ver Fig. 5.23 d)).

375 nm y la de uno dipolar en 407 nm (ver Fig. 5.25 b) línea negra). Conforme aumenta el número de NPs Ag, las bandas ópticas se ensanchan y la posición del máximo en la línea espectral de la eficiencia de absorción, se desplaza ligeramente a mayores longitudes de onda. De la Fig. 5.25 c) se nota que la dispersión del diferente número de NPs Ag estudiadas no sigue una tendencia, ya que es posible observar en algunos casos más de un pico.

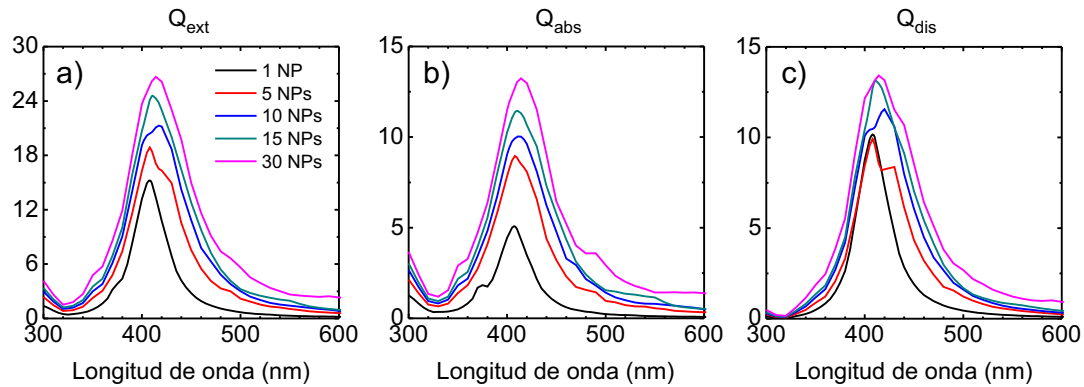


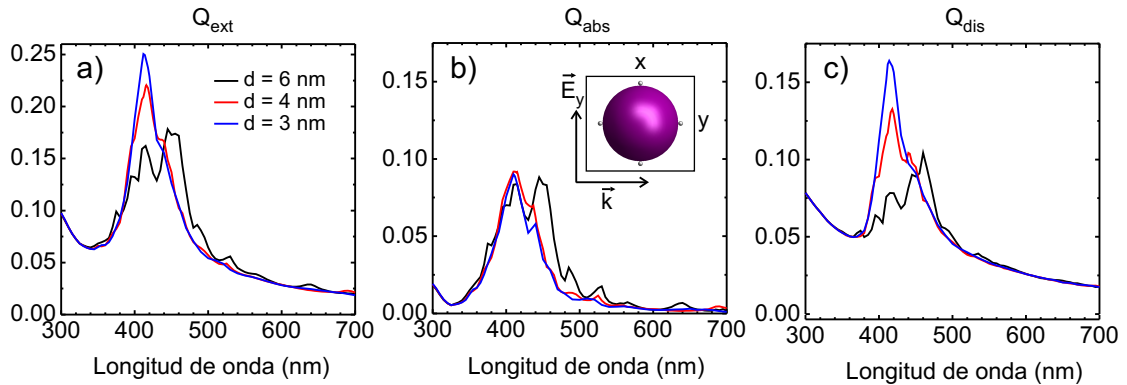
Figura 5.25: Eficiencias ópticas al variar el número de NPs Ag con un $D = 50$ nm (representadas en la Fig. 5.23 a) - e)): a) Q_{ext} , b) Q_{abs} y c) Q_{dis} .

Resulta importante mencionar que el mínimo que se observa por debajo de los 350 nm en las eficiencias ópticas de todos los gráficos anteriores (aquellos que involucran el estudio de NPs Ag) es prácticamente el mismo, porque se conoce que para la Ag el principal mecanismo de absorción en esas longitudes de onda, es debido únicamente a las transiciones interbanda. Lo cual es independiente de la morfología de las NPs Ag y dependiente únicamente de las propiedades electrónicas de la plata en bulto [26], [95], [29].

5.3.2. Bacteria *S. aureus* con NPs Ag distribuidas sobre su superficie

Una vez calculadas las eficiencias ópticas de arreglos de NPs Ag solas, como función de su distribución espacial y número de partículas del arreglo, se procedió a realizar el estudio cuando se encuentran sobre una bacteria *S. aureus* de 800 nm de diámetro y en agua. En seguida, mostramos los resultados del sistema NPs Ag - bacteria, retomando el orden que se siguió cuando se analizaron las NPs Ag solas, es decir, primero analizamos la respuesta óptica de 4 NPs Ag en sus diferentes configuraciones y posteriormente cuando se tienen arreglos con diferente número de NPs Ag, distribuidas de manera no uniforme, considerando en ambos casos la situación de colocarlas en la superficie de una bacteria.

En la Fig. 5.26 se muestra el estudio de convergencia de las eficiencias ópticas de la configuración 1 de 4 NPs Ag con un diámetro de 50 nm, situadas sobre la superficie de una bacteria *S. aureus* con un diámetro igual a 800 nm (arreglo mostrado en la Fig. 5.18 a*)) y cuando incide luz con vector de onda en $\hat{x}$ y polarización paralela al plano $\hat{x}-\hat{y}$. Se calcularon las eficiencias considerando valores de $d = 6, 4$ y 3 nm. En la tabla de la Fig. 5.26 se muestra el número total de dipolos (N) para cada d , conjuntamente con el número de dipolos asociado a la bacteria y a cada NP estimado usando la ecuación 4.2.3. Se aprecia que al representar la bacteria y las 4 NPs Ag mediante una red tridimensional de dipolos de más de un millón de dipolos ($d \leq 6$ nm), el 99.9 % de estos representa a la bacteria y como se mostró en secciones anteriores, para representar a la bacteria basta con $N \approx 11,000$. Por otro lado, para el valor de $d = 3$ nm se alcanza apenas un N cercano a 2,500 para representar cada NP, y como vimos anteriormente, la convergencia se alcanza para más de 40,000 dipolos. Es importante mencionar que no se obtuvo la respuesta óptica del sistema formado por la bacteria y 4 NPs Ag con distancias interdipolares menores a 3 nm, debido a que el tiempo de cálculo aumentaba demasiado (pasaban de 14 hasta más de 45 días), pero principalmente a que las exigencias de memoria computacional quedaron fuera de los recursos con los que disponíamos para realizar los estudios.



d	Número total de dipolos, N	Número de dipolos por bacteria	Número de dipolos por NP
6	1,241,793	1,240,625	292
4	4,191,723	4,187,707	1,004
3	9,937,775	9,928,047	2,432

Figura 5.26: Estudio de convergencia de la a) Q_{ext} , b) Q_{abs} y c) Q_{dis} del arreglo de 4 NPs solas distribuidas como en la configuración 1 y cuando se encuentran sobre la superficie de una bacteria *S. aureus* ($D = 800$ nm), tal como se ve en el recuadro de b), y cuando éstas se encuentran en agua ($n = 1.33$).

CAPÍTULO 5. RESPUESTA ÓPTICA DE BACTERIAS Y NPS AG

5.3. RESPUESTA ÓPTICA DE NPS AG SOBRE LA SUPERFICIE DE UNA BACTERIA *S. AUREUS*

AUREUS

De las gráficas de la Fig. 5.26 se aprecia que la respuesta óptica difiere bastante cuando $d = 6$ nm en comparación con $d = 4$ nm y $d = 3$ nm. Aunque no se puede garantizar que se haya alcanzado convergencia cuando $d = 3$ nm, se distingue que la tendencia en los espectros de la Q_{ext} (ver Fig. 5.26 a), al ir disminuyendo d , es una banda ancha en el intervalo de 360 a 500 nm, con un máximo que se va definiendo cada vez mejor, ya que el hombro que aparece a la derecha del mismo tiende a desaparecer. También, se nota que la interacción entre la bacteria y las NPs Ag tiene como consecuencia una disminución notable de la intensidad de la respuesta óptica, en comparación con las 4 NPs solas (Fig. 5.19). La intensidad de la Q_{ext} es del orden de cien veces menor. Además, debido a la interacción entre las NPs y la bacteria resulta que la dispersión (Fig. 5.26 c)) contribuye en mayor medida a la extinción que la absorción (Fig. 5.26 b)).

Para analizar la respuesta óptica del arreglo de 4 NPs en las diferentes distribuciones espaciales como las mostradas en la Fig. 5.18a*) - d*) al incidir luz con estado de polarización paralela se eligió una $d = 4$ nm y en la Fig. 5.27 a*) - d*) se muestran los espectros de extinción, absorción y dispersión para cada configuración. Mientras que en la Fig. 5.27 a)-d) se muestran los cálculos previos obtenidos para cada configuración sin bacteria (con convergencia alcanzada), a fin de poder hacer una comparación cualitativa.

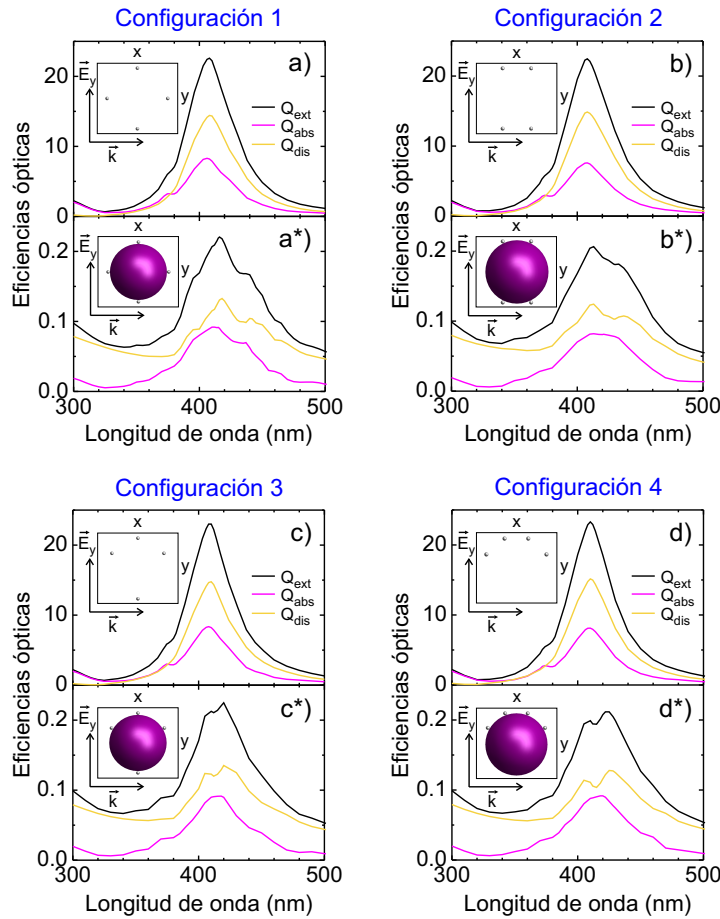


Figura 5.27: Eficiencias ópticas de un arreglo de 4 NPs Ag con un $D = 50$: solas a) - d) y sobre la bacteria *S. aureus* con un $D = 800$ a*) - d*), en 4 diferentes configuraciones

De la Fig. 5.27 se aprecia que las eficiencias ópticas de las 4 diferentes configuraciones tienen un comportamiento parecido, se observan bandas anchas y asimétricas entre los 380 y 500 nm.

Además, la banda correspondiente a la dispersión es más intensa que la de la absorción en todos los casos y esto es resultado de la interacción entre las NPs y la bacteria.

En la Fig. 5.28 se presentan las líneas espectrales de las eficiencias de extinción para las 4 configuraciones estudiadas, en a) las 4 NPs solas y en b) las 4 NPs sobre la bacteria. Cuando las NPs están solas se aprecia un máximo alrededor de 410 nm y una intensidad de la Q_{ext} de aproximadamente 25, mientras que cuando las NPs interactúan con la bacteria (tomando en cuenta el problema de la convergencia) se estima que hay un máximo entre 400 y 420 nm y una disminución en la intensidad de la Q_{ext} del orden de 100. Por lo tanto, concluimos que la interacción de NPs con la bacteria presenta una eficiencia de dispersión cerca de 100 veces menor que la eficiencia mostrada por un sistema solo de NPs.

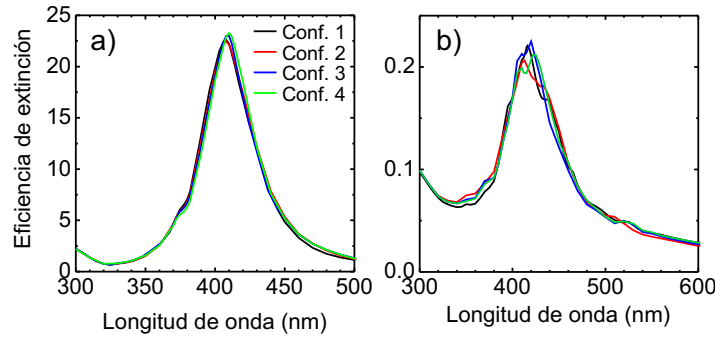
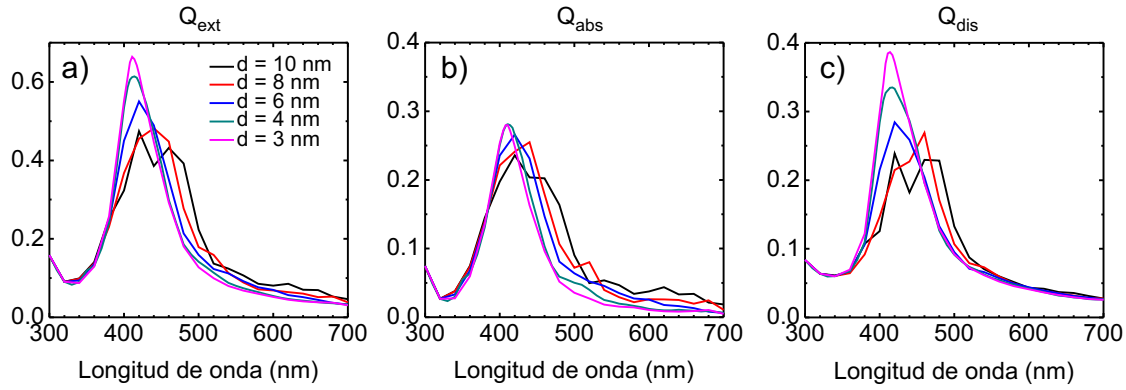


Figura 5.28: Comparación de las eficiencias ópticas de las 4 configuraciones estudiadas de 4 NPs Ag con un $D = 50$ nm solas a) y ubicadas sobre la bacteria b), cuando incide luz con polarización paralela.

A continuación, presentamos el estudio de la respuesta óptica al disponer de un cierto número $m > 1$ de NPs Ag distribuidas de manera no uniforme sobre la superficie de la bacteria, ver arreglos en la Fig. 5.23 a*) hasta e*). Como en los casos anteriores estudiados, anticipadamente realizamos un estudio de convergencia, escogiendo 15 NPs Ag ubicadas como en la Fig. 5.23 d*) y se muestran en la Fig. 5.29 a), b) y c) los resultados de las eficiencias de extinción, absorción y dispersión, respectivamente, para $d = 10$ nm y hasta $d = 3$ nm. De esta figura es posible apreciar que la interacción de la bacteria con las NPs genera una eficiencia menor que las NPs solas, pero como en este caso se dispone de un mayor número de NPs, las eficiencias presentan una mayor intensidad comparadas al disponer únicamente de 4 NPs Ag sobre la bacteria (ver Fig. 5.26). A pesar de que no convergen los resultados cuando d es igual a 3 o 4 nm, es posible contemplar en la línea espectral de Q_{abs} que su máximo tiende a ubicarse alrededor de 410 nm. Por otra parte, en la tabla de esta figura se distingue que aunque se tenga un gran número de dipolos para representar el sistema bacteria-NPs, nuevamente, más del 90 % constituyen la bacteria y muy pocos representan a las NPs y como se mencionó, esto provoca que no se pueda garantizar la convergencia de los resultados, sin embargo, no estamos lejos de ello, y la muestra clara es la tendencia que se observa en las líneas espectrales a distintos valores de d . Lamentablemente, DDSCAT no ofrece aún la opción de especificar una d diferente para los distintos componentes del objeto dispersor, lo cual sería la solución idónea al problema que nos ocupa.

De las líneas espectrales mostradas en la Fig. 5.29 se concluye que la no convergencia tiene como consecuencia el no poder garantizar que la intensidad de las eficiencias sea la correcta, sin embargo, sí hay una clara tendencia a la forma de la curva espectral y a la posición del máximo.



d	Número de dipolos totales	Número de dipolos por bacteria	Número de dipolos por NP
10	268,719	267,579	76
8	525,058	523,153	127
6	1,245,185	1,239,755	362
4	4,203,040	4,184,796	1,216
3	9,964,458	9,921,123	2,889

Figura 5.29: Estudio de convergencia de la a) Q_{ext} , b) Q_{abs} y c) Q_{dis} de un arreglo de 15 NPs Ag espacialmente distribuidas de manera no uniforme sobre una bacteria *S. aureus* (ver Fig. 5.25 d*).

Teniendo en mente estas anotaciones, se estudiaron arreglos con diferente número de NPs Ag con un $D = 50$ nm desde 1 hasta 30 NPs sobre la bacteria con una distribución como la mostrada en las Fig. 5.23 a*) - e*) usando $d = 4$ nm. Se escogió esta distancia interdipolar porque la línea espectral es muy semejante a la obtenida con $d = 3$ nm pero el tiempo de cómputo es menor de 45 días (aunque mayor a 20). La Fig. 5.30 muestra el efecto en las eficiencias ópticas al variar el número de NPs Ag sobre la bacteria. Se aprecia en la línea espectral de la Q_{abs} la presencia de un hombro y una banda, alrededor de 350 nm y 414 nm, respectivamente. Para los casos de más de 5 NPs, distribuidas de manera no uniforme sobre la bacteria, se puede ver en los arreglos de las Fig. 5.23 b*) - e*) que existen NPs que se encuentran muy cerca una de la otra, lo que indica que hay interacción NP - NP y un efecto consecuente es la interacción entre los plasmones de cada NP, es decir, generación de señales por plasmones acoplados. Por otra parte, conforme aumenta el número de NPs, se aprecia en las eficiencias una mayor anchura y una mayor intensidad.

En la Fig. 5.31 se muestra que cuando se dispone de las NPs sobre la bacteria, b), se observan efectos semejantes a los vistos cuando no se tiene la bacteria (en las ocasiones en las que se ha alcanzado o se esta cerca de la convergencia), a), únicamente las bandas de las eficiencias son más anchas y menos simétricas. Asimismo, se puede comentar que la presencia de una sola NP Ag sobre la bacteria, es capaz de afectar la respuesta óptica de la bacteria, ver línea negra de la Fig. 5.31.

5.3.3. Bacteria *S. aureus* y arreglos de NPs Ag pequeñas

También estudiamos NPs Ag de 20 nm de diámetro y en la Fig. 5.32 se muestra el arreglo de 15 NPs con una distribución no uniforme sin y colocadas sobre la superficie de una bacteria *S. aureus* de 800 nm de diámetro.

El estudio de convergencia de las eficiencias ópticas de extinción, absorción y dispersión del arreglo de las NPs Ag solas mostradas en la Fig. 5.32 a), se presenta en la Fig. 5.33 a), b) y c), respectivamente. Al calcular las eficiencias usando valores de $d = 6$ hasta $d = 3$ se observa que

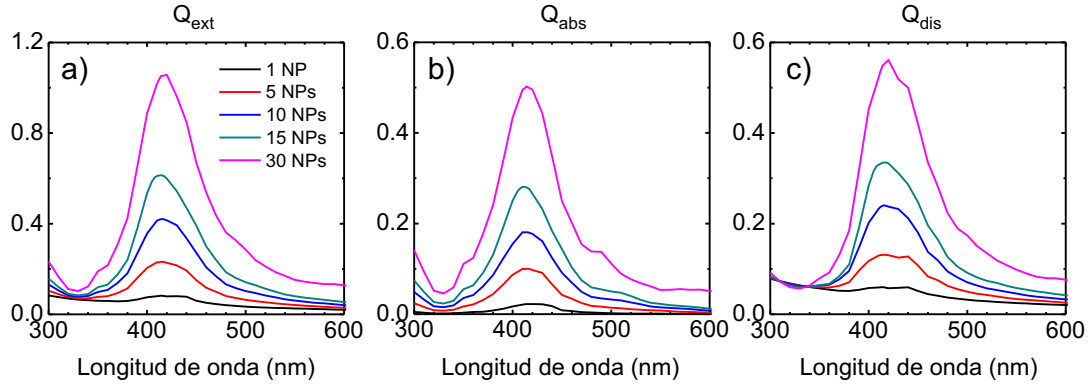


Figura 5.30: Eficiencias ópticas al variar el número de NPs Ag con un $D = 50$ nm situadas, de manera no específica, sobre una bacteria *S. aureus* (representadas en la Fig. 5.23 a*) - e*)) y cuando éstas se encuentran en agua ($n = 1.33$): a) Q_{ext} , b) Q_{abs} y c) Q_{dis} .

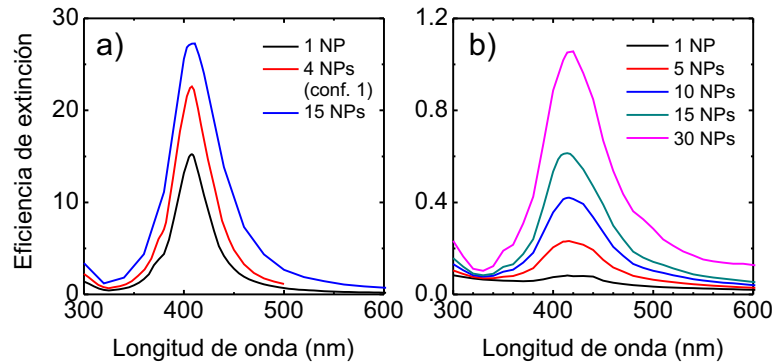


Figura 5.31: Comparación de las eficiencias ópticas de las 15 NPs Ag con un $D = 50$ nm solas a) y ubicadas sobre la bacteria b), cuando incide luz con polarización paralela.

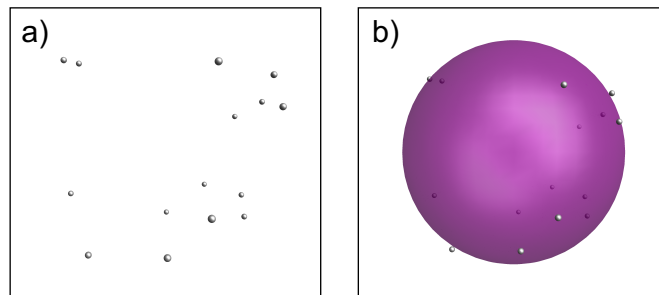


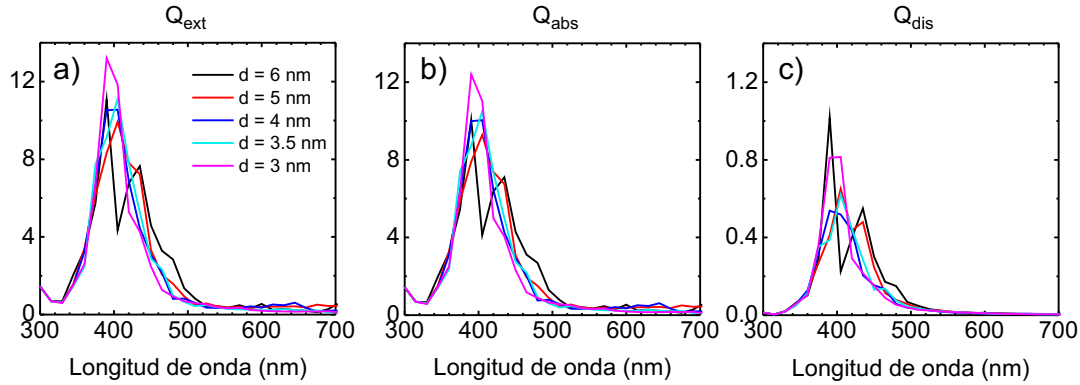
Figura 5.32: Representación esquemática de 15 NPs Ag de 20 nm distribuidas espacialmente de manera no uniforme a) sin y b) sobre una bacteria *S. aureus* con un $D = 800$ nm.

CAPÍTULO 5. RESPUESTA ÓPTICA DE BACTERIAS Y NPS AG

5.3. RESPUESTA ÓPTICA DE NPS AG SOBRE LA SUPERFICIE DE UNA BACTERIA *S. AUREUS*

AUREUS

aún para $d = 3$ nm no se ha alcanzado la convergencia, ello en base a que todavía se aprecia un hombro del lado derecho del máximo, cuya presencia es característica de que no se ha alcanzado la convergencia (tal como el que se ve en la Fig. 5.26). Sin embargo, conforme disminuye d , las líneas espectrales van definiendo una banda con un máximo alrededor de los 400 nm y que tiende a ser menos ancha que la observada para el arreglo de 15 NPs con diámetro de 50 nm (ver Fig. 5.24). También, se distingue para este tipo de NPs que la contribución de la absorción a la extinción (Fig. 5.33b)) es mucho mayor que la de la dispersión (Fig. 5.33c)) y esto es debido al tamaño de las mismas.



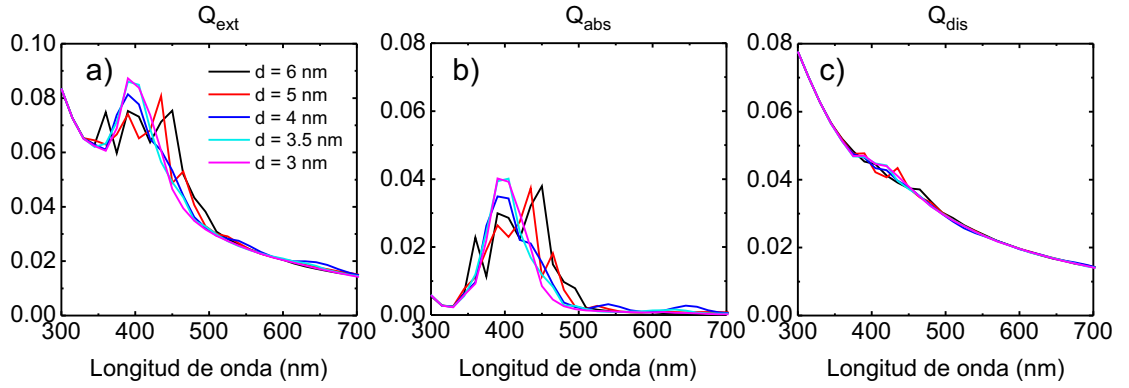
d	Número de dipolos totales	Número de dipolos por NP
6	426	28
5	752	50
4	1476	98
3.5	2183	145
3	3463	230

Figura 5.33: Estudio de convergencia de la a) Q_{ext} , b) Q_{abs} y c) Q_{dis} del arreglo de 15 NPs Ag solas, mostrado en la Fig. 5.32 a), al incidir luz con polarización paralela.

En la Fig. 5.34 se observan los resultados del estudio de convergencia del sistema mostrado en la Fig. 5.32 b). Se realizaron estudios con $d = 6$ nm y hasta $d = 3$ nm. En la Fig. 5.34 a), b) y c) se muestran los espectros de extinción, absorción y dispersión. A pesar de no haber alcanzado la convergencia, se aprecia que la interacción de la bacteria con las NPs provoca que la línea espectral de la Q_{ext} presenta una banda ancha en el intervalo entre 350 y 450 nm, consecuencia de la contribución por absorción (líneas espectrales mostradas en la Fig. 5.34 b)), mientras que las líneas de dispersión (Fig. 5.34 c)) son semejantes a las curvas de dispersión de la bacteria sola, incluso misma intensidad (Fig. 5.4 a), curva espectral de $D = 0.8$ micras). En el caso de Q_{abs} , damos cuenta que ésta presenta un orden de magnitud menor comparado con la de las NPs de 50 nm.

Como en las Fig. 5.33 y 5.34 no se observa que se haya alcanzado la convergencia o que al menos se distinga una tendencia, no es viable realizar más estudios. Además de que el número de dipolos con los que se representa cada NP de 20 nm es muy pequeño, $N = 230$, y aun trabajar con $d = 3$ nm implica una demanda de recursos computacionales importantes. Para el arreglo de m NPs Ag de diámetro de 20 nm, es necesario usar más de 10 millones de dipolos para garantizar convergencia. Por lo anterior, establecemos una conclusión general, que en el arreglo de m NPs Ag el número de dipolos necesario para garantizar convergencia numérica es mayor a menor tamaño de NP.

CAPÍTULO 5. RESPUESTA ÓPTICA DE BACTERIAS Y NPS AG
5.3. RESPUESTA ÓPTICA DE NPS AG SOBRE LA SUPERFICIE DE UNA BACTERIA *S. AUREUS*



d	Número de dipolos totales	Número de dipolos por bacteria	Número de dipolos por NP
6	1,240,923	1,240,503	28
5	2,144,106	2,143,356	50
4	4,188,682	4,187,212	98
3.5	6,254,752	6,252,577	145
3	9,930,371	9,926,921	230

Figura 5.34: Estudio de convergencia de la a) Q_{ext} , b) Q_{abs} y c) Q_{dis} del arreglo de 15 NPs Ag de 20 nm de diámetro situadas sobre una bacteria *S. aureus*, arreglo mostrado en la Fig. 5.32 b), al incidir luz con polarización paralela

Capítulo 6

Conclusiones

Calculamos los patrones de dispersión de dos bacterias: el *S. aureus* y la *E. coli*, con diferentes tamaños, índice de refracción y en el caso de la última bacteria, diferente orientación. Al analizar las bacterias con diferentes tamaños, observamos que el número de mínimos en el patrón de dispersión aumenta conforme aumenta el tamaño de la bacteria. Lo anterior provoca que la posición del primer mínimo se recorra a menores ángulos de dispersión.

Ilustramos que las bacterias con un índice de refracción en el intervalo de 1.34 a 1.4 presentan espectros de dispersión similares, con ligeras diferencias únicamente en sus intensidades, pero el número de mínimos no cambia. Por lo tanto, podemos decir que el número de mínimos no está asociado a la composición de la bacteria, pero sí su intensidad.

En el caso de la *E. coli*, el número de mínimos de sus patrones de dispersión depende de su orientación y del plano de dispersión.

Se estudiaron arreglos de 4 NPs Ag solas a fin de identificar el efecto generado por distribuciones uniformes y no uniformes. En todos los casos estudiados se observa que las líneas espectrales de las eficiencias ópticas son cualitativamente similares. Las curvas de absorción presentan un máximo entre 400 y 410 nm.

Se estudiaron arreglos de 1, 5, 10, 15 y 30 NPs solas, de diámetro 50 nm, con distribuciones arbitrarias, observando que algunas NPs están cerca de otras, lo que indica que hay interacción NP-NP. De los estudios de convergencia, se concluye que a mayor número de NPs se debe usar una d menor para garantizar la convergencia.

La interacción entre las NPs Ag (de diámetro 50 nm) y la bacteria se estudió eligiendo una posición uniforme y no uniforme de las NPs y también se realizó el análisis al variar el número de éstas (1, 5, 10, 15 y 30). La característica principal que se observa en los espectros de extinción, absorción y dispersión del sistema NPs Ag-bacteria consiste en la disminución de las eficiencias hasta 100 veces menos, comparadas con las de los espectros de un sistema formado únicamente por NPs. Cuando se varía el número de NPs Ag en contacto con la bacteria, se observa que la intensidad de las eficiencias ópticas aumenta conforme lo hace el número de NPs.

Se realizó el estudio de convergencia de 15 NPs de 20 nm de diámetro con una ubicación no específica con y sin bacteria, de este se concluye que el número de dipolos necesario para garantizar convergencia numérica es mayor a menor tamaño de NP. Además se observa que los espectros de NPs con este tamaño presentan picos más estrechos que los de NPs de mayor tamaño y que la interacción de una bacteria con estas NPs también provoca que disminuya la señal de las

eficiencias ópticas.

Trabajo por realizar

- Para corroborar la validez de los estudios que realizamos, se podrían llevar a cabo los experimentos que representen los sistemas estudiados en esta tesis y se compararían los resultados teóricos con los experimentales.
- También, sería de bastante provecho, corroborar la similitud o diferencia de los resultados de los sistemas presentados en esta tesis al aplicar teorías diferentes, como FDTD.
- Para ahondar en la investigación de este tema se piensa en extender los estudios realizados considerando ahora NPs Ag con una forma diferente a la esférica y considerando otro metal (como el oro o el cobre, porque se conoce que también presentan propiedades antimicrobianas).
- De igual manera, sería de mucha utilidad, realizar estudios de las propiedades ópticas, pero ahora examinando bacterias gram-negativas como la *E. coli* o que presenten una forma más compleja. Para esto, sería conveniente utilizar FDTD y alguna implementación numérica como podría ser Lumerical.

Presentación del trabajo en diferentes eventos

Este trabajo fue presentado en diversas modalidades en los siguientes eventos:

- Seminario del Cuerpo Académico de Materiales Avanzados del 2 de marzo de 2016 en el IFUAP. Plática titulada “Modelado de la dispersión de luz por bacterias tipo gram-positivas y gram-negativas en presencia de nanopartículas de plata”.
- II Taller de Habilidades Profesionales para Jóvenes Científicas y Estudiantes de Ciencias Latinoamericanas del 12 - 15 de julio de 2016 en Buenos Aires, Argentina. Póster titulado “Dispersión de luz por bacterias tipo gram-positivas y gram-negativas en presencia de nanopartículas de plata”.
- 1er. Taller de la Red “Materiales Magnetofotónicos” del 8 al 9 de agosto de 2016, Póster “Dispersión de luz por bacterias tipo gram-positivas y gram-negativas en presencia de nanopartículas de plata”.
- *International Materials Research Congress* del 14 al 19 de agosto de 2016 en Cancún, Méx. Póster titulado “Light scattering by bacteria in contact with silver nanoparticles”.
- Seminario de estudiantes del 30 de agosto de 2016 en el IFUAP. Plática titulada “Dispersión de luz por bacterias tipo gram-positivas y gram-negativas en presencia de nanopartículas de plata”.
- 6th Mexican Workshop on Nanostructured Materials del 12 al 14 de octubre de 2016 en Puebla, Pue. Póster titulado “A numerical modeling of the optical response of bacteria: size, shape and composition effects”.

Apéndice A

Tinción de Gram

La tinción de Gram se muestra en la Fig. A.1 y consta de los siguientes pasos:

1. Se cubre un frotis fijado con calor con un colorante básico violeta, usualmente se usa cristal violeta. Como la tinción violeta imparte color a todas las células bacterianas, se conoce como una tinción primaria.
2. Después de un corto tiempo, se enjuaga el colorante con agua y se cubre el frotis con una disolución de yodo, que funciona como mordiente. Cuando se enjuaga el yodo, tanto las bacterias gram-positivas como las gram-negativas adquieren un color violeta o morado.
3. Luego, se lava el portaobjetos con una disolución alcohólica o una con alcohol-acetona, la cual funciona como un agente decolorante que remueve únicamente el color morado de algunas células.
4. Se enjuaga la disolución alcohólica y se tiñe ahora con safranina, un colorante básico de color rojo. El frotis se enjuaga otra vez, se seca y se examina microscópicamente.

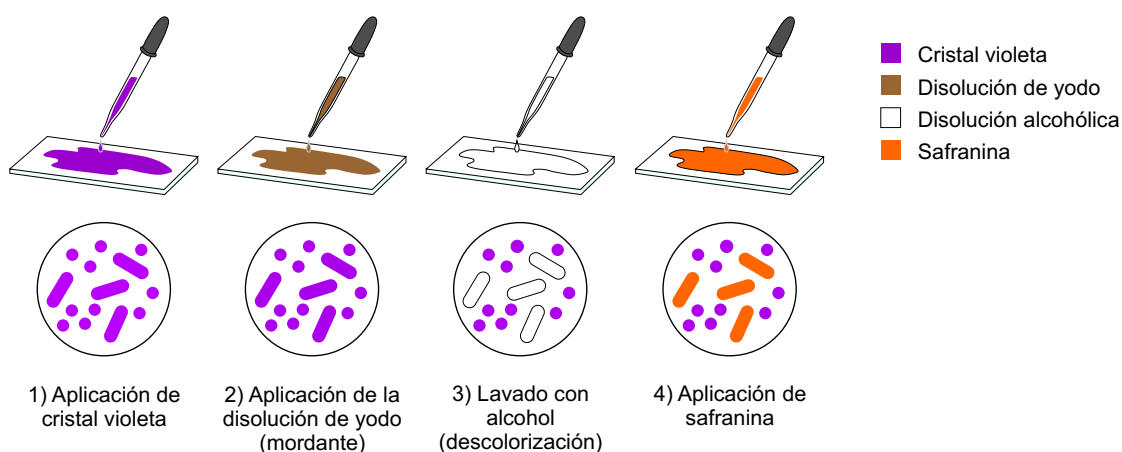


Figura A.1: Procedimiento de la tinción de Gram.

El colorante morado y el yodo se combinan en el citoplasma de cada bacteria y le brindan un color violeta oscuro o morado. Las bacterias que retienen el color, después de que se decoloran con alcohol, son clasificadas como gram-positivas; las bacterias que pierden el color violeta oscuro o morado son clasificadas como gram-negativas. Las bacterias gram-negativas se pintan de color

APÉNDICE A. TINCIÓN DE GRAM

rosa cuando se agrega la safranina. En la Fig. A.2 se observan ejemplos de éstas bacterias.

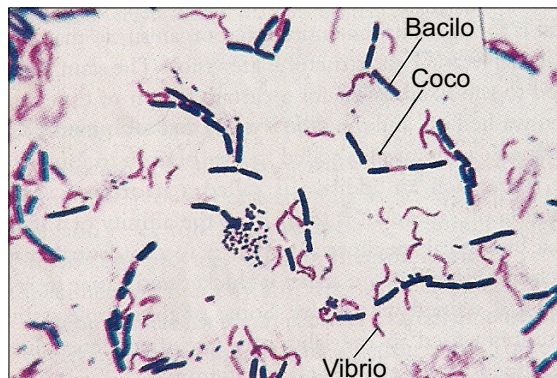


Figura A.2: Micrografía de bacterias teñidas con la tinción de Gram. Los bacilos y cocos (morados) son bacterias gram-positivas y los vibrios (rosas) son gram-negativas. Imagen tomada de [31]

Los diferentes tipos de bacterias reaccionan de diferente manera a la tinción de gram, porque las diferencias estructurales en su pared celular propician la retención o el escape de una combinación del cristal violeta con el yodo, que se conoce como complejo cristal violeta-yodo (CV-I, por sus siglas en inglés). Entre otras diferencias, las bacterias gram-positivas tienen una pared celular de peptidoglicano más gruesa que las bacterias gram-negativas. Además, las bacterias gram-negativas, contienen una capa de lipopolisacáridos como parte de su pared celular. Cuando se aplica el cristal violeta y luego el yodo a las bacterias gram-positivas y gram-negativas, ambos entran a las células. Dentro de las células, el cristal violeta y el yodo se combinan para formar el CV-I. Este complejo es más largo que la molécula de cristal violeta que entra a las células y por esta razón, al lavarse con alcohol, en las bacterias gram-positivas la capa gruesa de peptidoglicano impide su salida, consecuentemente las bacterias gram-positivas retienen el color del cristal violeta. No obstante, en las bacterias gram-negativas el alcohol desorganiza la capa externa de lipopolisacáridos, de esta manera el complejo CV-I sale a través de la capa delgada de peptidoglicano, como resultado, las bacterias gram-negativas se decoloran y se tiñen de rosa cuando se les aplica safranina.

La tinción de Gram en una bacteria, brinda información valiosa para el tratamiento de enfermedades. Las bacterias gram-positivas tienden a ser eliminadas con penicilinas y cefalosporinas. En cambio, las bacterias gram-negativas son más resistentes porque los antibióticos no pueden penetrar la capa de lipopolisacáridos [31].

Bibliografía

- [1] B. Ramalingam, T. Parandhaman and S. K. Das. Antibacterial effects of biosynthesized silver nanoparticles on surface ultrastructure and nanomechanical properties of gram- negative bacteria viz. *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2016, 8, 4963-4976.
- [2] S. Chernousova and M. Epple. Silver as antibacterial agent: ion, nanoparticle, and metal. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 52, 1636-1653, 2013.
- [3] T. S. Sreeprasad and T. Pradeep. Noble metal nanoparticles. *Springer Handbook of Nanomaterials*, Springer, Heidelberg, 2013.
- [4] M. A. Shenashen, S. A. El-Safty and E. A. Elshehy. Synthesis, morphological control, and properties of silver nanoparticles in potential applications. *Part. Part. Syst. Charact.*, 31, 293-316, 2014.
- [5] S. Gurunathan. Biologically synthesized silver nanoparticles enhances antibiotic activity against Gram-negative bacteria. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 29, 217-226, 2015.
- [6] I. Sondi and B. Salopek-Sondi. Silver nanoparticibles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria, *Journal of Colloid and Interface Science*, 275, 177-182, 2004.
- [7] Q. H. Tran, V. Q. Nguyen and A. Le. Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. *Adv. Nat. Sci.: Nanosci. Nanotechnol.*, 4, 1-20, 2013.
- [8] M. Rai, A. Yadav and A. Gade. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*, 27, 76-83, 2009.
- [9] K. Sahayaraj and S. Rajesh. Bionanoparticles: synthesis and antimicrobial applications. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*, Formatex Research Center, Spain, 2011.
- [10] W. Li, X. Xie, O. Shi, S. Duan, Y. Ouyang and Y. Chen. Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. *Biometals*, 24, 135-141, 2011.
- [11] M. Raffi, F. Hussain, T. M. Bhatti, J. I. Akhter, A. Hameed and M. M. Hasan. Antibacterial Characterization of Silver Nanoparticles against *E. Coli* ATCC-15224. *J. Mater. Sci. Technol.*, 24, 192-196, 2008.
- [12] J. S. Kim, E. Kuk, K. N. Yu, J. Kim, S. J. Park, H. J. Lee, S. H. Kim, Y. K. Park, Y. H. Park, C. Hwang, Y. Kim, Y. Lee, D. H. Jeong and M. Cho. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology*, 3, 95-101, 2007.
- [13] J. R. Morones, J. L. Elechiguerra, A. Camacho, K. Holt, J. B. Kouri, J. Tapia Ramirez and M. J. Yacaman. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16, 2346-2353, 2005.

- [14] C. A. Dos Santos, M. Martins Seckler, A. P. Ingle, I. Gupta, S. Galdiero, M. Galdiero, A. Gade and M. Rai. Silver nanoparticles: therapeutical uses, toxicity, and safety issues. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 103, 1931-1944, 2014.
- [15] M. J. Hajipour, K. M. Fromm, A. A. Ashkarran, D. Jimenez de Aberasturi, I. Ruiz de Larra-mendi, T. Rojo, V. Serpooshan, W. J. Parak and M. Mahmoudi. Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends in Biotechnology*, 30, 499-511, 2012.
- [16] L. A. Austin, M. A. Mackey, E. C. Dreaden, M. A. El-Sayed. The optical, photothermal, and facile surface chemical properties of gold and silver nanoparticles in biodiagnostics, therapy, and drug delivery. *Arch. Toxicol.*, 88, 1391-1417, 2014.
- [17] C. Bohren and D. Huffman. *Absorption and Scattering of Light by Small Particles*. John Wiley and Sons, USA, 1983.
- [18] A. L. González. *Propiedades ópticas de nanopartículas metálicas*, Dirigida por Cecilia Noguez Garrido. Tesis de doctorado en Ciencias Físicas, Instituto de Física, UNAM, México, 2007.
- [19] E. Hecht. *Óptica*. Addison Wesley Iberoamericana, Madrid, 2000.
- [20] M. Kinnunen and A. Karmenyan. Overview of single-cell elastic light scattering techniques. *Journal of Biomedical Optics*, 20, 051040-1-051040-11, 2015.
- [21] A. L. González and C. Noguez. Surface plasmon of polyhedral nanoparticles. *Nanotech* 1, 423-426, 2006.
- [22] J. Z. Zhang and C. Noguez. Plasmonic optical properties and applications of metal nanostruc-tures. *Plasmonics*, 3, 127-150, 2008.
- [23] M. A. García. Surface plasmons in metallic nanoparticles: fundamentals and applications. *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 44, 1-20, 2011.
- [24] C. Noguez. Optical properties of isolated and supported metal nanoparticles. *Optical Mate-rials*, 27, 1204-1211, 2005.
- [25] A. L. González and C. Noguez. Influence of morphology on the optical properties of metal nanoparticles. *J. Comput. Theor. Nanosci.*, 4, 231-238, 2007.
- [26] A. L. González and C. Noguez. Optical properties of silver nanoparticles. *Phys. Stat. Sol. C*, 4, 4118-4126, 2007.
- [27] C. Noguez. Surface plasmons on metal nanoparticles: the influence of shape and physical environment. *J. Phys. Chem. C*, 111, 3806-3819, 2007.
- [28] A. L. González, C. Noguez, G. P. Ortiz and G. Rodríguez-Gattorno. Optical absorbance of colloidal suspensions of silver polyhedral nanoparticles. *J. Phys. Chem. B*, 109, 17512-17517, 2005.
- [29] A. L. González and C. Noguez. Surface plasmons resonances of metal polyhedral nanoparticles. *NSTI-Nanotech*, 1, 423-426, 2006.
- [30] P. B. Johnson and R. W. Christy. Optical constants of the noble metals. *Phys. Rev. B*, 6, 4370-4379, 1972.
- [31] G. J. Tortora, B. R. Funke and C. L. Case. *Microbiology: An Introduction*. Benjamin Cum-mings, USA, 2001.
- [32] J. Molina López, M. E. Manjarrez Zavala y J. Tay Zavala. *Microbiología: Bacteriología y Virología*. Méndez Editores, México, 2010.

- [33] R. Romero Cabello. *Microbiología y Parasitología Humana. Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias*. Editorial Médica Panamericana, México, 2007.
- [34] V. Edwards-Jones. *Essential Microbiology for Wound Care*. Oxford University Press, UK, 2016.
- [35] P. R. Murray, K. S. Rosenthal, M. A. Pfäuer. *Microbiología Médica*, Elsevier, España, 2006.
- [36] A. Llop Hernández, M. M. Valdés-Dapena Vivanco, J. L. Zuazo Silva. *Microbiología y Parasitología Médicas*, Tomo I. Editorial Ciencias Médicas, La Habana, 2001.
- [37] S. D. Manning and H. Babcock. *Escherichia coli infections*. Chelsea House Publishers, USA, 2010.
- [38] V. P. Maltsev, A. G. Hoekstra and M. A. Yurkin. Optics of white blood cells: optical models, simulations and experiments. *Advanced Optical Flow Cytometry: Methods and Disease Diagnoses*, Wiley-WCH, Germany, 2011.
- [39] R. Xu. Light scattering: A review of particle characterization applications. *Particuology*, 18, 11-21, 2015.
- [40] J. Liu, Y. Zeng and F. Lin. Experimental study on light scattering by biological cells with discrete sources method. *Optik*, 127, 4731-4735, 2016.
- [41] F. M. Kahnert. Numerical methods in electromagnetic scattering theory. *Journal of Quantitative Spectroscopy & Radiative Transfer*, 79, 775-824, 2003.
- [42] E. Bae, H. Kim, H. A. McNally, A. K. Bhunia and E. D. Hirleman. Investigation of the presence of rod-shaped bacteria on food surface via elastic light scattering. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 3, 344-352, 2012.
- [43] O. I. Bilyy, V. B. Getman, R. O. Bilyy, I. M. Kushnir and I. Y. Kotsyumbas. Rapid detection of bacterial cells by light scattering method. *Proc. SPIE*, 6864, 686411-1-686411-10, 2008.
- [44] A. Katz, A. Alimova, M. Xu, E. Rudolph, M. K. Shah, H. E. Savage, R. B. Rosen, S. A. McCormick and R. R. Alfano. Bacteria size determination by elastic light scattering. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 9, 277-287, 2003.
- [45] C. Feng, L. Huang, J. Han, G. Zhou, A. Zeng, Y. Zhao and H. Huang. Light scattering modeling of bacteria using spheroids and cylinders. *Proc. SPIE*, 7511, 75110P-1-75110P-10, 2009.
- [46] W. P. Van De Merwe, Z. Li, B. V. Bronk and J. Czégé. Polarized light scattering for rapid observation of bacterial size changes. *Biophysical Journal*, 73, 500-506, 1997.
- [47] P. J. Wyatt, Differential light scattering: a physical method for identifying living bacterial cells. *Applied Optics*, 7, 1879-1896, 1968.
- [48] P. J. Wyatt. Cell wall thickness, size distribution, refractive index ratio and dry weight content of living bacteria (*Staphylococcus aureus*). *Nature*, 226, 277-279, 1970.
- [49] P. J. Wyatt. Light scattering in the microbial world. *Journal of Colloid and Interface Science*, 39, 479-491, 1972.
- [50] P. J. Wyatt and D. T. Phillips. Structure of single bacteria from light scattering. *J. Theor. Biol.*, 37, 493-501, 1972.

- [51] A. N. Shvalov, J. T. Soini, I. V. Surovtsev, G. V. Kochneva, G. F. Sivolobova, A. K. Petrov and V. Maltsev. Individual *Escherichia coli* cells studied from light scattering with the scanning flow cytometer. *Cytometry*, 41, 41-45, 2000.
- [52] B. V. Bronk, W. P. Van De Merwe and M. Stanley. In vivo measure of average bacterial cell size from a polarized light scattering function. *Cytometry*, 13, 155-162, 1992.
- [53] B. V. Bronk, S. D. Druger, J. Czégé and W. P. Van De Merwe. Measuring diameters of rod-shaped bacteria in vivo with polarized light scattering. *Biophysical Journal*, 69, 1170-1177, 1995.
- [54] W. P. Van De Merwe, Z. Li, B. V. Bronk and J. Czégé. Polarized light scattering for rapid observation of bacterial size changes. *Biophysical Journal*, 73, 500-506, 1997.
- [55] M. A. Yurkin, K. A. Semyanov, P. A. Tarasov, A. V. Chernyshev, A. G. Hoekstra and V. P. Maltsev. Experimental and theoretical study of light scattering by individual mature red blood cells by use of scanning flow cytometry and discrete dipole approximation. *Applied Optics*, 44, 5249-5256, 2005.
- [56] V. P. Maltsev. Scanning flow cytometry for individual particle analysis. *Review of Scientific Instruments*, 71, 243-255, 2000.
- [57] B. M. Nebeker, B. Buckner, E. D. Hirleman, A. Lathrop and A. Bhunia. Identification and characterization of bacteria on surfaces using light scattering. *Proc. of SPIE*, 4206, 224-234, 2001.
- [58] M. I. Mishchenko, J. W. Hoovenier and L. D. Travis. *Light scattering by nonspherical particles: theory, measurements and applications*. Academic Press, USA, 2000.
- [59] H. M. Shapiro. Microbial analysis at the single-cell level: tasks and techniques. *Journal of Microbiological Methods*, 42, 3-16, 2000.
- [60] H. M. Shapiro. *Practical Flow Cytometry*, John Wiley and Sons, USA, 2003.
- [61] M. A. Yurkin. *Discrete dipole simulations of light scattering by blood cells*. PhD. Thesis, University of Amsterdam, Netherlands, 2007.
- [62] L. Wu, S. Wang, Y. Song, X. Wang and X. Yan. Applications and challenges for single-bacteria analysis. *Science China Chemistry*, 59, 30-39, 2016.
- [63] A. Brunsting and P. F. Mullaney. Differential light scattering from spherical mammalian cells. *Biophysical Journal*, 14, 439-453, 1974.
- [64] A. Hoekstra, V. Maltsev and G. Videen. *Optics of Biological Particles*. Springer, Netherlands, 2007.
- [65] M. I. Mishchenko, L. D. Travis and D. W. Mackowski. T-matrix method and its applications to electromagnetic scattering by particles: A current perspective. *Journal of Quantitative Spectroscopy & Radiative Transfer*, 111, 1700-1703, 2010.
- [66] I. O. Sosa, C. Noguez and R. G. Barrera. Optical properties of metal nanoparticles with arbitrary shapes. *J. Phys. Chem. B*, 107, 6269-6275, 2003.
- [67] N. K. Balla, P. T. C. So and C. J. R. Sheppard. Second harmonic scattering from small particles using Discrete Dipole Approximation. *Optics Express*, 18, 21603-21611, 2010.
- [68] A. Karlsson, J. He, J. Swartling and S. Andersson-Engels. Numerical simulations of light scattering by red blood cells. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 52, 13-18, 2005.

- [69] K. V. Gilev, E. Eremina, M. A. Yurkin and V. P. Maltsev. Comparison of the discrete dipole approximation and the discrete source method for simulation of light scattering by red blood cells. *Optics Express*, 18, 5681-5690, 2010.
- [70] D. Y. Orlova, M. A. Yurkin, A. G. Hoekstra and V. P. Maltsev. Light scattering by neutrophils: model, simulation, and experiment. *Journal of Biomedical Optics*, 13, 054057-1-054057-7, 2008.
- [71] A. E. Moskalensky, D. I. Strokotov, A. V. Chernyshev, V. P. Maltsev and M. A. Yurkin. Additivity of light-scattering patterns of aggregated biological particles. *Journal of Biomedical Optics*, 19, 085004-1 - 085004-11, 2014.
- [72] E. Zubko, Y. Shkuratov, M. Hart, J. Eversole and G. Videen. Backscatter of agglomerate particles. *Journal of Quantitative Spectroscopy & Radiative Transfer*, 88, 163-171, 2004.
- [73] J. Liu and G. W. Kattawar. Detection of dinoflagellates by the light scattering properties of the chiral structure of their chromosomes. *Journal of Quantitative Spectroscopy & Radiative Transfer*, 131, 24-33, 2013.
- [74] K. D. Gilroy, S. Neretina, R. W. Sanders. Behavior of gold nanoparticles in an experimental algal-zooplankton food chain. *J. Nanopart. Res.*, 16, 2414-1-2414-8, 2014.
- [75] H. R. Gordon and T. Du. Light scattering by nonspherical particles: application to coccoliths detached from *Emiliana huxleyi*. *Limnol. Oceanogr.*, 46, 1438-1454, 2001.
- [76] A. E. Balaev, V. A. Doubrovski and K. N. Dvoretzki. Laser beam scattering by bacterial cells: applications of the discrete dipole approximation. *Proceedings of SPIE*, 4001, 312-316, 2000.
- [77] M. Venkatapathi, B. Rajwa, K. Ragheb, P. P. Banada, T. Lary, J. P. Robinson and E. D. Hirleman. High speed classification of individual bacterial cells using a model-based light scatter system and multivariate statistics. *Applied Optics*, 47, 678-686, 2008.
- [78] A. I. Konokhova, A. A. Gelash, M. A. Yurkin, A. C. Chernyshev and V. Maltsev. High-precision characterization of individual *E. coli* cell morphology by scanning flow cytometry. *Cytometry Part A*, 83A, 568-575, 2013.
- [79] E. M. Purcell and C. R. Pennypacker. Scattering and absorption of light by nonspherical dielectric grains. *The Astrophysical Journal*, 186, 705-714, 1973.
- [80] B. T. Draine and P. J. Flatau. Discrete-dipole approximation for scattering calculations. *J. Opt. Soc. Am. A*, 11, 1491-1499, 1994.
- [81] B. T. Draine and P. J. Flatau. *User Guide for the Discrete Dipole Approximation Code DDS-CAT 7.3*, disponible en [82]
- [82] <http://code.google.com/p/ddscat>
- [83] V. L. Y. Loke, M. Pinar Mengüç and T. A. Nieminen. Discrete-dipole approximation with surface interaction: Computational toolbox for MATLAB. *Journal of Quantitative Spectroscopy & Radiative Transfer*, 112, 1711-1725, 2011.
- [84] T. Kinoshita, K. Kiso, D. O. Le, H. Shiigi and T. Nagaoka. Light-scattering characteristics of metal nanoparticles on a single bacterial cell. *Analytical Sciences*, 32, 301-305, 2016.
- [85] S. Tanev, V. Tuchin and P. Paddon. Finite-difference time-domain modeling of light scattering from biological cells containing gold nanoparticles. *Photon-based Nanoscience and Nanobiotechnology*, Springer, Netherlands, 2006.

- [86] S. Tanev, W. Sun, J. Pond, V. V. Tuchin and V. P. Zharov. Flow cytometry with gold nanoparticles and their clusters as scattering contrast agents: FDTD simulation of light-cell interaction. *J. Biophoton.* 2, 505-520, 2009.
- [87] P. Foladori, A. Quaranta and G. Ziglio. Use of silica microspheres having refractive index similar to bacteria for conversion of flow cytometric forward light scatter into biovolume. *Water Research*, 42, 3757-3766, 2008.
- [88] L. G. Harris, S. J. Foster and R. G. Richards. An introduction to *Staphylococcus aureus*, and technique for identifying and quantifying *S. aureus* adhesins in relation to adhesion to biomaterials: Review. *European Cells and Materials*, 4, 39-60, 2002.
- [89] Q. L. Feng, J. Wu, G. Q. Chen, F. Z. Cui, T. N. Kim and J. O. Kim. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J. Biomed. Mater. Res.*, 52, 662-668, 2000.
- [90] B. Volkmer, M. Heinemann. Condition-Dependent Cell Volume and Concentration of *Escherichia coli* to Facilitate Data Conversion for Systems Biology Modeling. *PLoS ONE*, 6, e23126.
- [91] F. D. Bryant, B. A. Seiber and P. Latimer. Absolute optical cross sections of cells and chloroplasts. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 135, 79-108, 1969.
- [92] N. Ferralis and C. Carraro. Evolution of interfacial intercalation chemistry on epitaxial graphene/SiC by surface enhanced Raman spectroscopy. *Applied Surface Science*, 320, 441-447, 2014.
- [93] N. Ferralis, Randomsphere, 2013, <http://github.com/feranick/ddscat-tools>
- [94] C. Noguez, I. O. Sosa and R. G. Barrera. Light scattering by isolated nanoparticles with arbitrary shapes. *Mat. Res. Soc. Symp. Proc.*, 704, 275-280, 2000.
- [95] A. L. González, J. A. Reyes-Esqueda and C. Noguez. Optical properties of elongated noble metal nanoparticles. *J. Phys. Chem. C*, 112, 7356-7362, 2008.



BUAP

MEMORANDUM

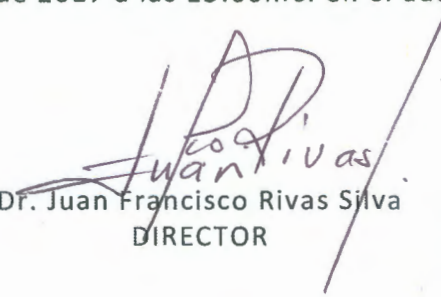
Para: Dra. Minerva González Melchor. (Presidenta).
Dr. Xóchitl Inés Saldaña Sánchez.
Dra. Ma. Estela Calixto Rodríguez.
Dra. Ana Lilia González Ronquillo (Asesora).

De: Dr. Juan Francisco Rivas Silva, Director.

Asunto: **Se cita al Examen de Grado de Maestría en Ciencias (en la especialidad de Ciencia de Materiales) de María de Jesús Gálvez Vázquez.**

Fecha: 30 de Enero, 2017

Me permito informarles que el Comité Académico del IFUAP, los ha designado integrantes del Comité para el EXAMEN DE GRADO de Maestría en Ciencias (en la especialidad de Ciencia de Materiales) de **María de Jesús Gálvez Vázquez**, con su tesis intitulada: ***"Modelado de la dispersión de luz por bacterias en contacto con nanopartículas de plata"***, que presentará el día martes 31 de enero de 2017 a las 13:00hrs. en el auditorio del IFUAP.


Dr. Juan Francisco Rivas Silva
DIRECTOR



Instituto de Física
"Ing. Luis Rivera
Terrazas"

Av. San Claudio esq. 18 sur, edif 110 A, B y C.
Ciudad Universitaria, Col. San Manuel,
Puebla, Pue. C.P. 72570
01(222) 2295610, Fax: ext. 5611