

Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Matemática, Astronomía y Física

Trabajo Especial de la Licenciatura en Física

Dinámica bacteriana en sustratos micro-diseñados

Autor: Hernán Nehuén Moyano Cortéz

Directora: Verónica I. Marconi



Dinámica bacteriana en sustratos micro-diseñados por Moyano Cortéz,
Hernán Nehuén se distribuye bajo una
Licencia Creative Commons Atribución 2.5 Argentina.

Septiembre de 2014

Resumen

Estudiamos numéricamente un sistema complejo fuera del equilibrio: la dinámica de microorganismos autopropulsados microconfinados. Originalmente confinados en *micro-cámaras* de pocos nanolitros con *sustratos microdiseñados* de dimensiones del orden del tamaño de los nadadores.

Específicamente investigamos la dinámica típica de bacterias de *run and tumble* con sus variantes estratégicas de nado para la *Escherichia Coli* y la *Bradyrhizobium Japonicum*.

Proponemos *nuevas geometrías de los sustratos* para optimizar el direccionamiento de bacterias y la separación de poblaciones mixtas.

Palabras claves

Biofísica. Bacterias. Microconfinamiento.

Tabla de clasificación

87.10.Mn

Resumen

En esta tesina estudiamos numéricamente un sistema complejo fuera del equilibrio: la dinámica de microorganismos autopropulsados microconfinados. Originalmente confinados en *micro-cámaras* de pocos nanolitros con *sustratos micro-diseñados* de dimensiones del orden del tamaño de los nadadores.

Específicamente investigamos la dinámica típica de bacterias de *run and tumble* con sus variantes estratégicas de nado. Agregamos a estudios previos de dichas poblaciones: sus tasas de nacimiento y muerte, con el objetivo de simular un sistema más realista. Utilizamos micro-estructuras para controlar la dirección de movimiento de poblaciones de *Escherichia Coli* y separar diferentes cepas. Proponemos *nuevas geometrías de los sustratos* para optimizar el direccionamiento de bacterias y la separación de poblaciones mixtas.

Para conocer cómo se mueve una bacteria en un medio confinado es vital determinar cómo se mueve la misma cuando se encuentra en contacto con una pared. En este trabajo se propone entender cómo afectan los diversos parámetros del modelo y de la dinámica propia de cada bacteria a la acumulación en las paredes confinantes. Se determina cuál de ellos es más relevante para el direccionamiento y separación de poblaciones mixtas. Luego se incluyen al modelo las tasas de nacimiento y muerte estudiando su influencia en fenómenos de direccionamiento o rectificación.

Estudiamos la dinámica de poblaciones mixtas de *Escherichia Coli* utilizando nuevas geometrías en los sustratos, ordenadas y desordenadas. Se observa que a medida que el desorden aumenta la eficiencia en la separación de las poblaciones disminuye.

Además, simulamos la dinámica de la *Bradyrhizobium Japonicum*, una especie de bacteria que realiza simbiosis con la planta de soja y varios mutantes de la misma. Debido a la dificultad de su visualización en el suelo, se propone un estudio en laboratorio en dispositivos con *geometrías desordenadas* que imitan el medio poroso real que habita la bacteria. Comprender la dinámica de cada mutante en suelos de diversa porosidad tiene aplicaciones directas en el desarrollo de una agricultura responsable y sustentable, gracias a la mejora de biofertilizantes.

Realizamos un análisis para la dinámica de la *Bradyrhizobium Japonicum* similar al anterior hecho para la *E. Coli*, sumado a la caracterización de la difusión para distintas cepas versus el desorden del medio.

*A mi mamá y mi papá por su amor incondicional.
A los hermanos que me dio la vida.*

Y sobre todo a H!.

Índice general

1. Introducción	7
1.1. La vida de microorganismos a bajo número de Reynolds	7
1.2. Bacteria paradigmática: <i>Escherichia Coli</i>	11
1.2.1. Dinámica libre	13
1.2.2. Población variable: nacimiento y muerte	15
1.3. Bacteria de suelo: <i>Bradyrhizobium Japonicum</i>	19
1.4. Difusión bacteriana: traslacional y rotacional	22
2. Metodología	29
2.1. Modelo fenomenológico para la dinámica bacteriana	32
2.2. Cantidades calculadas	38
2.2.1. Trayectorias	38
2.2.2. Difusión traslacional	38
2.2.3. Rectificación	38
2.2.4. Separación: Eficiencia y tiempo de separación	38
2.3. Métodos numéricos	39
3. Dinámica bacteriana microconfinada	47
3.1. Acumulación en paredes de un microdispositivo	49
3.2. Acumulación en torno a microobstáculos versus su geometría .	60
4. Nacimiento y muerte de la <i>Escherichia Coli</i>	65
5. Dinámica de la <i>E. Coli</i> en micro-geometrías ordenadas y desordenadas	71
6. <i>Bradyrhizobium Japonicum</i> bajo micro-confinamiento desordenado	77
6.1. Desorden controlado	80
6.2. Difusión	86
7. Conclusiones	93

Capítulo 1

Introducción

El estudio de micro-nadadores confinados en dispositivos micro-estructurados es un tema de gran interés actual y de alta relevancia para diversas áreas que se entrecruzan, como la biofísica básica, la biotecnología, la medicina, la ecología y la agronomía sustentable. Recientemente se han publicado trabajos que muestran la relevancia de contribuir al conocimiento de “cómo” manipular sistemas biológicos usando sustratos micro-diseñados en vista a las nuevas aplicaciones tecnológicas [1, 2, 3, 4, 5, 6]. El estudio de la dinámica de poblaciones de nadadores confinados geoméricamente se ha desarrollado ampliamente en los últimos años gracias al avance tecnológico en la micro y nano litografía sobre diversos materiales, desde los clásicos silicio y aluminio, hasta los nuevos materiales plásticos biocompatibles. Dichos avances permiten controlar y diseñar a gusto una gran variedad de dispositivos de geometrías variadas, desde las más sencillas redes periódicas hasta intrincados laberintos en un chip. Estudios del control, direccionamiento y separación de micronadadores confinados han sido reportados, pero es un tema muy reciente y existen muchas cuestiones importantes de estos problemas dinámicos aún sin dilucidar, de las cuales nos ocuparemos en esta tesina.

1.1. La vida de microorganismos a bajo número de Reynolds

Las bacterias viven, al igual que muchos *micronadadores* naturales y artificiales, en un mundo bastante diferente respecto del que conocemos y tenemos intuición. Éstas están sujetas a fuerzas viscosas lo suficientemente grandes respecto de los términos inerciales, $m\dot{v}$ de la ecuación de Newton, por lo cual la inercia se desprecia justificadamente. El movimiento de las bacterias, gobernado por las fuerzas viscosas, es muy diferente del movimiento gobernado por la inercia que bien conocemos de nuestra experiencia cotidiana.

El número de Reynolds es un parámetro adimensional en las ecuaciones de movimiento de un fluido que indica el tamaño relativo de los términos de fuerzas inerciales y las fuerzas viscosas. Este es:

$$Re = \frac{F_{inerciales}}{F_{viscosas}} \simeq \frac{vL\rho}{\eta} \quad (1.1)$$

donde v es la velocidad media del nadador, L es una longitud característica del mismo, ρ y η son la densidad y viscosidad del fluido respectivamente. Para un humano nadando, el número de Reynolds es grande, $Re = 10^4$, para un pejerrey que se autopropela acelerando el agua es un poco menor, $Re = 10^2$, en cambio para las bacterias el número de Reynolds es pequeño se halla entre 10^{-4} y 10^{-5} , dependiendo de la bacteria, y utiliza el arrastre viscoso para desplazarse, Fig. 1.1. Éste difiere del número del hombre en ocho o nueve órdenes de magnitud y del pez en seis o siete órdenes. Es decir, el pez tiene una gran idea de la inercia, pero la bacteria no la conoce. En conclusión, los peces viven en un mundo hidrodinámico muy diferente al de bacterias y micronadadores en general.

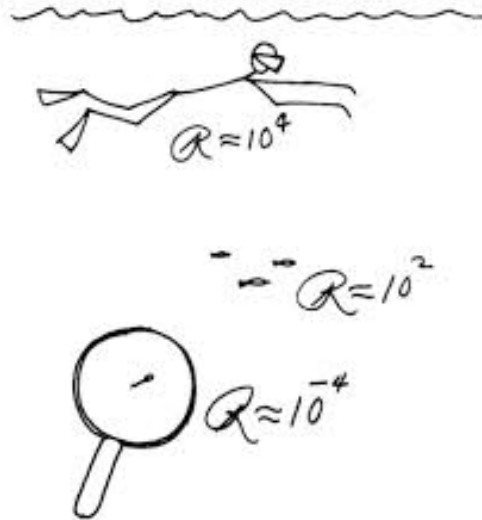


Figura 1.1: Diferentes nadadores con sus respectivos números de Reynolds. Figura extraída de [7].

Para entender qué sucede en un mundo sin inercia, calculemos la distancia que puede recorrer una bacteria si deja de nadar. Para ello aproximamos la misma por una esfera de radio a y densidad ρ_b . La ecuación de movimiento, de acuerdo a la segunda Ley de Newton es

$$m \frac{-dv}{dt} = 6\pi\eta av \quad (1.2)$$

y su solución $v(t) = v(0)\exp(-t/\tau)$ con $\tau = 2a^2\rho_b/9\eta$. Colocando valores típicos para la bacteria, se obtiene τ que es $\tau = 1\mu s$ y que recorre una distancia $d = 0,04\text{\AA}$. Ésta es comparable con el diámetro del átomo de hidrógeno, es decir muy pequeño respecto del tamaño de la bacteria, por lo cual deja de moverse debido a la fuerza viscosa. Pero no detiene completamente su movimiento debido al movimiento Browniano al que se encuentra sometida. Este movimiento se debe a las fluctuaciones en la posición que sufre debido a los golpes aleatorios que ejecutan las moléculas del líquido en el cual se encuentra inmerso.

Estamos interesados en un número de Reynolds pequeño, es decir en fuerzas pequeñas en sentido absoluto y estas determinan lo que sucede en ese momento y no importa su pasado. La física en la cual estamos interesados es en la hidrodinámica del problema. La dinámica de fluidos está gobernada por la ecuación de Navier-Stokes [8]:

$$\rho\left(\frac{\partial\vec{v}}{\partial t} + \vec{v} \cdot \nabla\vec{v}\right) = -\nabla p + \nabla \cdot \mathbf{T} + \vec{F} \quad (1.3)$$

donde ρ es la densidad del medio, \vec{v} es la velocidad del fluido, p la presión, \mathbf{T} es la componente “desviadora” del tensor total de estrés de orden 2 y \vec{F} representa las fuerzas del cuerpo actuando sobre el fluido. Despreciando los términos inerciales tenemos:

$$-\nabla p + \eta\nabla^2 v = 0 \quad (1.4)$$

donde $-\nabla p$ es el gradiente de presión y $\eta\nabla^2 v$ es el término viscoso. Como el tiempo no es explícito en la ecuación, la trayectoria depende solo de la secuencia de configuraciones, y no de cuán lenta o rápidamente sea realizado cualquier movimiento. Entonces, si un animal intenta nadar por un movimiento lineal repetitivo hacia adelante y atrás, no avanzará hacia ningún lugar. Éste exactamente volverá hacia atrás su trayectoria y volverá a donde empezó, este es el conocido Teorema del Escalope. El ejemplo típico de esto es una ostra de mar, esta abre su caparazón lentamente y lo cierra rápidamente, esto le permite avanzar soltando a chorros el agua (ver Fig. 1.2). Pero si pensamos este nadador a un bajo número de Reynolds no es bueno. Este tiene un único grado de libertad en su configuración espacial, y por lo tanto está destinado a realizar un movimiento repetitivo. Por esto, el animal más simple que puede nadar a un bajo número de Reynolds es uno con dos bisagras [7]. En el reino animal, hay dos soluciones típicas al nado a un bajo número de Reynolds. Una de ellas es el remo flexible; si pensamos en intentar navegar un bote a un bajo número de Reynolds no podremos puesto que al ser el remo rígido su movimiento será repetitivo. Pero si el remo es flexible, esto no es cierto, puesto que el remo se curva en una dirección durante la primer parte

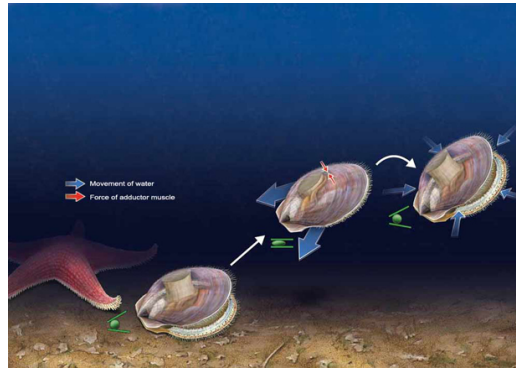


Figura 1.2: Dinámica de nado de un escalope de mar. Este abre su caparazón lentamente e ingresa agua en su interior, rápidamente lo cierra para poder expulsar el agua que se encontraba en su interior y así poder avanzar. Las flechas azules indican el movimiento del agua. Imagen extraída de [9].

de la corrida y en la contraria durante la segunda parte. Este simple cambio le es suficiente para eludir el teorema del escalope. El otro método posible es el conocido como sacacorchos. Si se mantiene el mismo girando, le permitirá avanzar, dado que no es un cambio repetitivo en la configuración espacial. Estudios experimentales [10] han desarrollado recientemente nadadores artificiales nanométricos que basan su movilidad en la concentración o gradientes de temperatura locales a los cuales se encuentran afectadas las partículas, lo cual resulta en una velocidad de deslizamiento en la superficie de la partícula y por lo tanto un movimiento de la misma respecto del fluido en el que se encuentra inmersa, es decir se desplaza gracias a las fuerzas estocásticas a las que está sometida. En esta escala tan pequeña donde, a diferencia de nuestros micro nadadores de interés, predomina el movimiento Browniano y no se pueden encontrar organismos vivos autopropulsados, crearon nanopartículas de Janus de un tamaño de $\sim 30nm$, que funcionan gracias a la catalización de la descomposición de peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno y se autopropulsan por electroforesis (técnica para la separación de moléculas según la movilidad de estas en un campo eléctrico). Estos nuevos dispositivos se encuentran en una nanoescala, donde el teorema del escalope deja de tener validez puesto que ahora importan los efectos estocásticos del medio. En esta tesis, nos interesamos en el mundo micrométrico de bacterias de diversas especies las cuales viven a bajo número de Reynolds. En las siguientes secciones particularizaremos sobre dos especies, la tan conocida *Escherichia Coli* y en una no tan estudiada pero sí muy interesante por sus aplicaciones, la *Bradyrhizobium Japonicum*.

1.2. Bacteria paradigmática: *Escherichia Coli*

La *Escherichia Coli*, *E. Coli*, es una bacteria que vive en nuestras gargantas, se han encontrado restos fósiles de bacterias que tienen billones de años de antigüedad. Su cuerpo tiene forma de bastón o salchicha, típicamente con una longitud de $1\mu m$ a $2,5\mu m$ y un diámetro de $0,8\mu m$ (ver Fig. 1.3). A

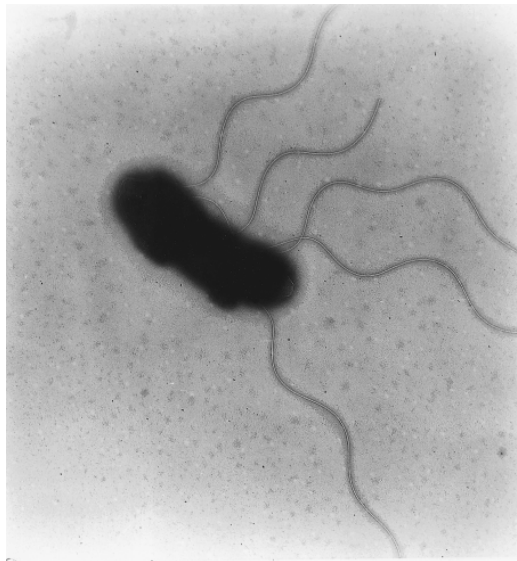


Figura 1.3: Micrografía electrónica de *E. coli* flagelada. Se observa que los flagelos son mucho más finos y largos que el cuerpo (típicamente de 2 o más cuerpos de largo). Por otro lado, los pili no se observan con esta resolución. Imagen extraída de [11].

medida que la bacteria crece, se hace larga y luego se divide al medio. En un ambiente caliente (temperatura del organismo que habita, $36^{\circ}C$) y rico en nutrientes, esto lleva sólo $20min$ (por eso si se quieren hacer experimentos en laboratorios se les baja la temperatura a $15^{\circ}C$ - $20^{\circ}C$ para controlar el tiempo de reproducción). Tiene organelas externas, finos filamentos rectos, llamados pili, que le permiten adherirse se en un sustrato específico, y unos más gruesos filamentos largos helicoidales, llamados flagelos, “que le permiten nadar”. Los cuales son los que más nos interesan en este trabajo, pues son cruciales para la dinámica de nado o desplazamiento.

La mayoría, pero no todas las *E. Coli*, son amistosas. Algunas pueden causar infecciones en el tracto urinario. Otras causan enfermedades diarreicas y contribuyen a la mortalidad infantil. La *E. Coli* tiene una vida de lujo en las intestinos de los animales de sangre caliente, incluidos los humanos. Una hez típica tiene más de 100 billones de bacterias (10^{14}) por mililitro y arriba de 1 billón (10^{12}) son *E. Coli*. La mayoría de las células son estrictamente anaeróbicas, es decir que “viven sin aire”. Pero bacterias de *E. Coli* pueden

vivir con o sin oxígeno, y así sobrevivir (con suerte) hasta encontrar otro huésped.

E. Coli tiene la capacidad de modificar el camino en el cual nada para moverse hacia regiones del ambiente que le sean más favorables o donde encuentra más alimentos. Cada flagelo es impulsado por un motor que puede revertir su rotación, impulsado por un flujo de protones (Fig. 1.4). Esta reversión en la rotación de los flagelos le permite a la bacteria realizar un tumbo. La habilidad de las bacterias para migrar hacia una determinada dirección resulta del control de la rotación de sus flagelos.

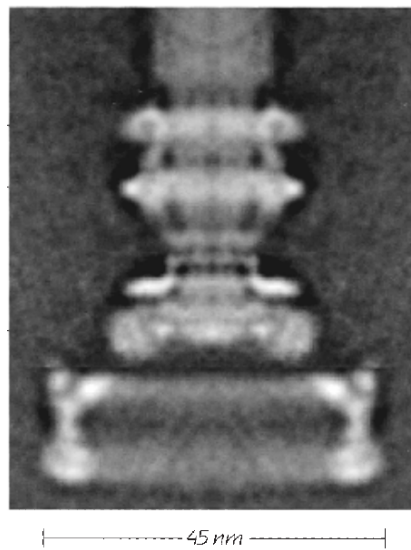


Figura 1.4: Imagen del motor de cada flagelo de una bacteria. La base del mismo mide 45nm . Este complejo sistema de intercambio de protones le permite a la bacteria avanzar y debido a la anisotropía del mecanismo flagelar estimamos para modelarla que esta es una de las fuentes de ruido. Imagen extraída de [12].

E. Coli es una bacteria paradigmática, un organismo útil para estudios de fisiología bacteriana, porque es accesible, generalmente benigna y crece fácilmente en un medio químico definido. Es uno de los micronadadores más estudiado y caracterizado, al que se le han realizado muchas mutaciones genéticas y del que se poseen más datos para su análisis. Esta bacteria es de un gran interés en diferentes campos. Los bioquímicos están interesados en la estructura e interacciones de las moléculas que monitorean el medio externo, etc y los genetistas en identificar los genes específicos y aprender cómo se activan o desactivan. Y nosotros los físicos estamos interesados en una descripción precisa de su movilidad, cómo interacciona con el medio que la rodea y que tipo de mediciones se pueden hacer para caracterizar su dinámica, tanto libre como confinada. En particular nos concentraremos en

su movilidad bajo microconfinamiento geométrico.

1.2.1. Dinámica libre

La *E. Coli* tiene aproximadamente seis filamentos que le emergen de puntos aleatorios al costado de su cuerpo y se extienden por un largo aproximado de tres cuerpos en el medio circundante (ver Fig. 1.3). Cuando los flagelos giran como un sacacorchos, forman un puñado sincronizado que mueve al cuerpo hacia adelante, a esto lo denominamos corrida o run. Cuando el manajo se desarma, por que el motor gira en la dirección contraria, la velocidad de la bacteria es aproximadamente cero. La bacteria se frena y elige una nueva dirección aleatoria de movimiento e inicia otra corrida. A esto lo llamamos tumbo o “tumble” y a la forma de moverse se la conoce como dinámica de corridas y tumbos, Fig. 1.5.

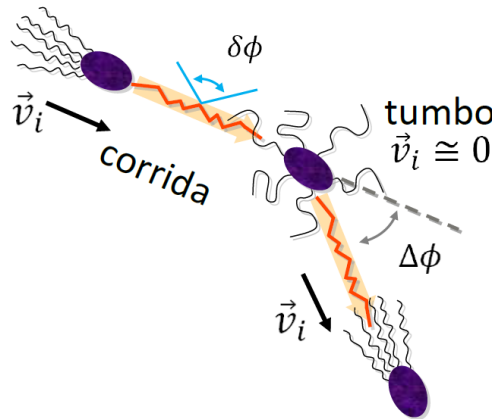


Figura 1.5: Dinámica de corridas y tumbos para la *E. Coli*. Durante el tiempo de corrida se desplaza con una velocidad constante v_i y con un ángulo ϕ respecto al eje x. Su trayectoria rectilínea durante el mismo se ve modificada en $\delta\phi$ debido al ruido de los motores, el efecto que realiza el medio que la rodea sobre la misma y cualquier otra fuente de ruido. Cuando la bacteria realiza un tumbo, esta modifica su dirección en $\Delta\phi$.

Los tumbos son mucho más cortos temporalmente que las corridas, pero estos generan cambios grandes en la dirección. Los flagelos son los encargados de activar la reorientación de la bacteria. Si la elección de la dirección fuese aleatoria, uno esperaría que la desviación angular media sea de 90° . Sin embargo, datos experimentales [14] indican que cuando *E. Coli* nada en un medio de baja viscosidad (como el agua), prefiere elegir un ángulo menor que 90° (en promedio 68° para la cepa salvaje). Es decir, realiza una caminata aleatoria con persistencia o memoria de la dirección de movimiento previa al

tumbo. Esta memoria es a corto plazo, pues sólo recuerda la dirección que tenía hasta unos pocos tumbos atrás.

Si una bacteria nada a una velocidad constante v a lo largo de una trayectoria compuesta de una secuencia de corridas rectilíneas distribuidas exponencialmente de duración media τ , tiene un coeficiente de difusión

$$D = \frac{v^2\tau}{3(1 - \cos(\phi))} \quad (1.5)$$

donde ϕ es el ángulo medio entre corridas sucesivas [13]. Si el cambio de direcciones es aleatorio, implica que $\phi = 90^\circ$ y se obtiene lo esperado

$$D = \frac{v^2\tau}{3} \quad (1.6)$$

Para la *E. Coli*, $\cos(\phi) \simeq 0,33$. Con $v \simeq 2 \times 10^{-3} \text{cm/seg}$ y $\tau \simeq 1 \text{seg}$, se obtiene $D \simeq 200 \mu\text{m}^2/\text{seg}$.

Un mutante que realiza tumbos incesantemente tiene un coeficiente de difusión menor, pues τ es pequeño. Una bacteria muerta, o un mutante que esté paralizado tiene un coeficiente de difusión mucho menor, pues sólo se desplaza por el movimiento browniano. Un mutante que nunca realiza tumbos, es decir τ grande, tendrá un coeficiente de difusión mayor.

En el siguiente trabajo se utilizan valores experimentales para la movilidad de esta bacteria en base a mediciones realizadas por el grupo de Berg [14]. En base a estos se estima el coeficiente de difusión rotacional y se calculó el coeficiente de difusión traslacional de las mismas [1]:

Bacteria	$\bar{v}[\mu\text{m}/\text{s}]$	$\sigma_v[\mu\text{m}/\text{s}]$	$\bar{\phi}[\circ]$	$\sigma_\phi[\circ]$	$\tau[\text{s}]$	$D_r[\text{rad}^2/\text{s}]$	$D_T[\mu\text{m}^2/\text{s}]$
s_1	14.2	3.4	68	36	0.86	0.18	128
s_3	20.0	4.9	33	15	6.30	0.06	1788

Cuadro 1.1: Parámetro de movilidad de las especies de *E. Coli* s_1 corresponde a AW405 (cepa salvaje) y s_3 a CheC497 (mutante de corrida larga) de [14]. D_r es el coeficiente de difusión rotacional y $D_T = D$ de la Ec. (1.5)

El cambio de dirección le provee a la bacteria un mecanismo para dirigir su caminata aleatoria. Cuando esta nada en un gradiente espacial debido a un atrayente o repelente químico y pasa a tener una dirección favorable de corrida, la probabilidad de tumbar se reduce. Como resultado, las corridas favorables son extendidas y difunde con un drift o sesgo. La bacteria analiza este estímulo y genera un drift internamente, cambiando la dirección en la que rotan sus flagelos. La velocidad de drift puede ser enorme, tan grande

como $v/10$. Una célula con esta velocidad de drift puede fácilmente dejar atrás a una que se desplaza sólo aleatoriamente.

La fuerza neta aplicada a un organismo que nada a velocidad constante es cero. Si la fuerza no es cero, el nadador se verá acelerado o desacelerado. Las bacterias flageladas (como la *E. Coli* y la *Bradyrhizobium Japonicum*) nadan por la rotación de uno o más de sus finos filamentos helicoidales que se encuentran en el medio acuoso. Cada filamento posee un motor rotante en la base del flagelo, este gira el filamento helicoidal respecto al cuerpo de la bacteria a una velocidad angular ω . Mirando la bacteria desde atrás, el cuerpo gira en sentido horario a una velocidad angular Ω , y el flagelo gira en sentido antihorario a una velocidad $\omega - \Omega$; siendo $\omega > \Omega$. Esta rotación de los flagelos es la que le permite a la bacteria avanzar en el medio que la rodea.

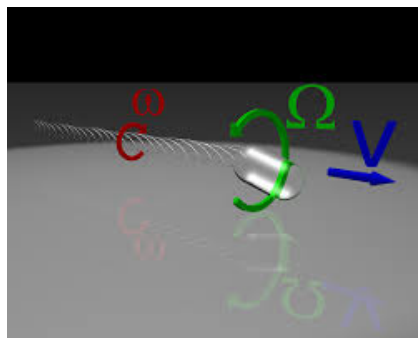


Figura 1.6: Rotación de los flagelos, con velocidad angular ω y el cuerpo de la *E. Coli* con velocidad angular Ω , lo cual le permite avanzar. Figura extraída de [15].

1.2.2. Población variable: nacimiento y muerte

Si colocamos una población joven de bacterias a una baja densidad con una alta concentración de nutrientes y una baja concentración de productos metabólicos tóxicos; claramente será un ambiente favorable para la reproducción y crecimiento. A medida que la población aumenta, hay una disminución de nutrientes y un simultáneo incremento en la concentración de productos metabólicos generados por las mismas bacterias. Por lo tanto, el ambiente se vuelve desventajoso y estresante, con lo cual la población llega a un estado estable, limitado por los nutrientes.

Convencionalmente se entiende por “generación” al período expandido entre el nacimiento y la división de un individuo. En el caso de las bacterias *Gram-negativa* como la *E. Coli*, que es un organismo unicelular, una generación empieza cuando una célula nace como una porción (usualmente la mitad) de su célula madre y termina cuando esta se divide a si misma en

sus correspondientes hijas. Uno puede pensar que la célula madre termina dejando información genética y separando las componentes celulares transportando información de las funciones celulares en dos partes mientras se prepara para la división celular.

Las células recogen información de sus antecesores y de sus alrededores. Alguna información afecta a las células temporalmente y otra afecta a las sucesivas generaciones. Cuando pensamos en el crecimiento de las bacterias hay que considerar dos aspectos, la evolución de la colonia [16, 17] y la reproducción de una bacteria, es decir la división celular [18]. Umehara *et. al.* nos ayudan a entender cómo es el origen de dos células hijas nacidas de una sola y aislada célula madre de *E. Coli*, mientras que Monod y Amsler *et. al.* explican como es el comportamiento de crecimiento de las colonias.

Originalmente, el crecimiento exponencial de bacterias es considerado posible sólo cuando todos los nutrientes, incluido el sustrato (superficie donde viven las bacterias), están presentes en altas concentraciones. Desde los 40's se sabe que las bacterias tienen crecimiento exponencial, a tiempos cortos (luego el sistema satura), incluso cuando uno de los nutrientes se encuentra en cantidad limitada. Se encontró que el coeficiente de velocidad de crecimiento, μ , depende de la concentración de un nutriente limitante, que puede ser una fuente de carbón, el dador de electrones, el captador de electrones, nitrógeno, o cualquier otro elemento necesario para el crecimiento celular. Monod propuso la siguiente ecuación:

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_S + S} \quad (1.7)$$

Donde μ es la velocidad de crecimiento específica de los microorganismos, μ_{max} es la velocidad de crecimiento máximo, S es la concentración del sustrato limitante para el crecimiento y K_S es el coeficiente de saturación medio, determinando cuan rápido μ se aproxima a μ_{max} y es definido como la concentración en el sustrato en la que $\mu = 0,5 * \mu_{max}$. K_S y μ_{max} son coeficientes empíricos para la ecuación de Monod.

Amsler *et. al.* desarrollaron una técnica para cuantificar una medida de la movilidad, la función flagelar y la velocidad de nado de las células. Han investigado la relación temporal entre la velocidad de nado, la expresión de los genes flagelares, producción de la proteína flagelina, el número y densidad de flagelos y el torque producido por el motor flagelar. En general, la movilidad de las bacterias en un lote de cultivo, caracterizada por la velocidad de nado de las células, es baja en la fase exponencial temprana, presenta un pico cuando entran en la fase post exponencial, y decae en la fase estacionaria temprana. En particular para la *E. Coli* (ver Fig. 1.7), la velocidad de nado en la primer etapa es baja, pues la mayoría de las células son “no

móviles” (no tienen que moverse para encontrar alimento) crece hasta un máximo hasta que el cultivo entra en la fase post-exponencial de crecimiento, porque los flagelos se vuelven largos y amontonados en la superficie de la célula. Finalmente cuando entran en la fase estacionaria, la velocidad decrece y está correlacionado con un decrecimiento en el torque producido por los motores flagelares. Esta velocidad de nado está íntimamente relacionada con la frecuencia del tumble.

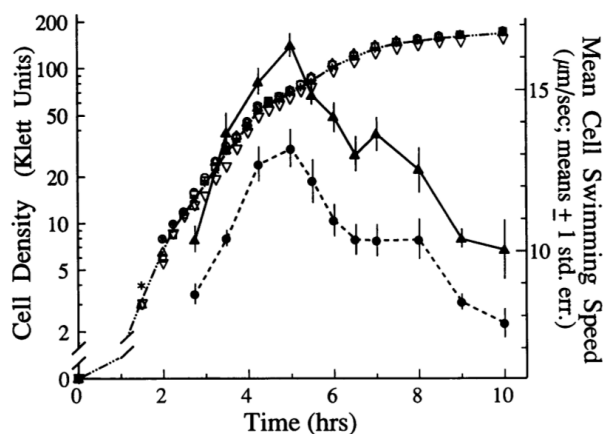


Figura 1.7: Velocidad media de las células y densidad de células en función del tiempo luego de iniciada la colonia. Figura extraída de [17].

Se observa que para ambas frecuencias de tumbos, el pico en la velocidad de nado a las 4 a 5 hs es significativamente superior (70 % de aumento) a las velocidades de nado inicial (2.75h) y de final (10 h). Nuestras simulaciones se encuentran en un rango de 20 a 60 minutos, así que lejos de esta fenomenología de tiempos largos. El crecimiento celular se reduce a un conjunto de fenómenos de muchos sistemas diferentes: replicación genética, división celular, conversión de energía, biosíntesis, biodegradación y así sucesivamente.

Por otro lado, las células madres e hijas son usualmente definidas por la división celular: un proceso físico que divide el cuerpo de la célula en dos recién nacidas. Para completar la división celular y dividirse en dos, un individuo pasa un determinado tiempo preparándose a niveles moleculares y celulares. Este puede ser un estado trascendente en el cual dos sistemas de control diferentes coexisten en la misma célula a dividirse. Este proceso está caracterizado por un tiempo de pausa en el movimiento: típicamente $0,1 - 1 \text{ seg}$ que es cerca de 10 veces mayor que el causado por un tumbo común ($0,01 - 0,1 \text{ seg}$). Llamamos a este tiempo “pausa prolongada” en contraste con los tumbos ordinarios. Luego del inicio de la constricción bacteriana, el contenido celular es segregado en las dos hijas que están separadas por una

estructura interna llamada septum. La individualidad emerge luego de que una bacteria inicia la constricción hasta que se separa físicamente en dos nuevos cuerpos celulares. Ya que los descendientes directos varían su largo, no se puede inferir que diferentes bacterias con el mismo largo celular se encuentren en la misma etapa de su ciclo celular.

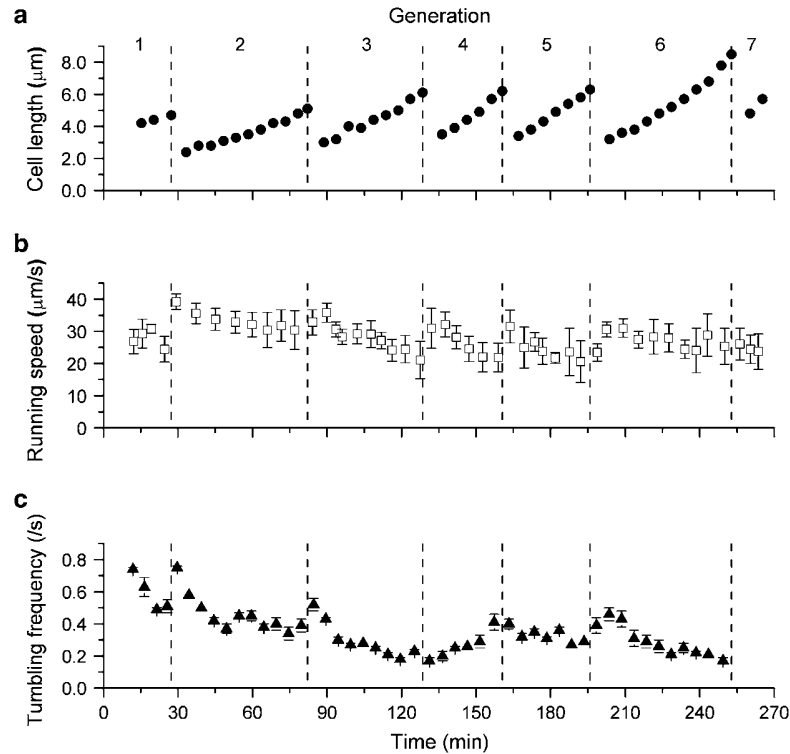


Figura 1.8: Mediciones simultáneas de crecimiento y movilidad de la *E. Coli*, monitoreadas por la medición de (a) la longitud de la célula, (b) la velocidad de corrida y (c) la frecuencia de tumblo. (Las líneas verticales punteadas representan la separación entre dos generaciones). Figura extraída de [18].

Umehara et al. en 2007 analizan el proceso de división celular, monitoreando el comportamiento de nado y la frecuencia con la que realiza un tumbo usando un chip que es un sistema de cultivo de partículas aisladas. Luego de la separación celular, la hija de mayor tamaño y/o menor movilidad es removida mediante la utilización de unas pinzas ópticas. Observando esta única bacteria, se compara el crecimiento y propiedades de nado entre una generación y la siguiente a lo largo de siete generaciones. Se observa en la Fig. 1.8 que el largo de la bacteria crece durante el ciclo celular (para luego poder dividirse) y crece suavemente con cada ciclo celular. La velocidad de corrida decrece a lo largo de cada ciclo celular, lo hacen suavemente pero las pendientes de esas curvas difieren de generación en generación. Las frecuen-

cias de tumblo fluctuan entre generaciones y no muestran un crecimiento o decrecimiento.

En esta tesis veremos cómo el suceso de nacimiento y muerte afecta los experimentos de nuestro interés.

1.3. Bacteria de suelo: *Bradyrhizobium Japonicum*

Pasamos ahora a describir otra bacteria fascinante, la *Bradyrhizobium Japonicum*. Es de nuestro interés intentar que el efecto del consumo humano sea lo menos nocivo para la naturaleza. En particular nos interesamos en los suelos que cultivamos, puesto que a medida que se utiliza éste se va degradando siendo cada vez menos efectivo, tanto por el uso del mismo como por los agregados químicos que contiene. Volviéndose los mismos cada vez más nocivos para la salud del hombre que los consume, para la tierra que los produce y así para la humanidad en su totalidad, la de hoy en día como la de generaciones futuras. Uno de los intereses actuales de los científicos es disminuir el efecto que se le produce al medio ambiente, es por ello que se realizan avances en biotecnología, biopesticidas, biofertilizantes entre otros. La idea de estos es poder lograr una alta productividad, con el menor costo ecológico posible para suelos, plantas, consumidores, etc. Los biopesticidas son productos utilizados en el control de plagas principalmente agropecuarias cuyo origen es algún organismo vivo, en su mayoría derivados de bacterias, pero también hay productos derivados de hongos y ejemplos de roedores para el control de ciertas hierbas. Son un componente clave en los programas de control de plagas y están recibiendo mucha importancia como medio para reducir la cantidad de pesticidas sintéticos utilizados en el control de plagas y enfermedades en los cultivos. Éstos no son sustitutos de los pesticidas químicos, sino un complemento de los mismos, con lo cual se intenta disminuir el efecto producido por los químicos, como así también evitar el acostumbramiento de las plagas y aumentar la efectividad del pesticida. De forma similar funcionan los biofertilizantes, estos son fertilizantes que provienen de animales, humanos, restos vegetales y de hongos, bacterias u otro fuente orgánica y natural. Los fertilizantes inorgánicos suelen ser más baratos y se utilizan en dosis más concentradas y precisas, sin embargo la utilización de fertilizantes orgánicos es necesaria para reponer la materia orgánica del suelo. Los fertilizantes inorgánicos corren con la desventaja de que degradan la vida del suelo y matan microorganismos que generan nutrientes para las plantas, se requiere más energía para su fabricación y distribución además de generar una dependencia en el agricultor para la producción. Por el contrario los biofer-

tilizantes permiten reutilizar residuos orgánicos, recuperar materia orgánica del suelo, permiten la fijación del carbono al suelo y mejoran la capacidad de absorción del agua. En la actualidad la utilización de fertilizantes orgánicos se encuentra en ascenso debido a la demanda de alimentos orgánicos y sanos para el consumo humano como así también la concientización en el cuidado del ecosistema y el medio ambiente.

Nuestro país es un gran productor agrícola, y en el último tiempo se destaca la soja como cosecha predominante. Por todo lo mencionado anteriormente es de gran interés el mejoramiento de biofertilizantes para esta planta. Existe una relación simbiótica en la fijación de nitrógeno entre esta leguminosa y los rizobios, bacterias de suelo que fijan nitrógeno después de haberse establecido dentro de nódulos de las leguminosas, ésta relación es única puesto que la planta puede satisfacer todas sus necesidades de nitrógeno sin necesidad de extraerlo del suelo. Como este nutriente es limitado, por mucho tiempo, los cultivos de leguminosas se inocularon con rizobios con una alta performance en cuanto a la fijación de nitrógeno. En 2007, el cultivo de soja en nuestro país abarcaba 16 millones de hectáreas y el 90 % de los mismos es inoculado con *Bradyrhizobium Japonicum* [19], que es un rizobio, es decir una bacteria fijadora de nitrógeno en el suelo originaria de la India, sobre todo en los nódulos de plantas leguminosas como la soja. Nuestro estudio se concentrará en esta bacteria, su dinámica, movilidad y un mejor entendimiento de su comportamiento para así poder aportar a una agricultura más productiva y menos nociva. La planta de soja no es originaria de América del sur, sin embargo existen varias rizobacterias capaces de nodularla [19], a menudo más de 10^4 rizobios noduladores de soja por gramo de suelo. La eficiencia en la fijación de N_2 de estos rizobios es crucial para aumentar la calidad de la soja producida. Esta eficiencia es variable, puesto que pueden derivar de inoculaciones anteriores sujetas a modificaciones genéticas en el suelo o pertenecen a una especie diferente a la *Bradyrhizobium Japonicum* que adquirió la capacidad de nodular las plantas de soja [20]. La preexistencia de estas bacterias en el suelo, realizan complicada la tarea de que se nodule la bacteria que nosotros deseamos. Puesto que la planta consume una cantidad de N_2 , una pobre fijación de esta en la planta hará que la misma consuma el nitrógeno del suelo, como se ha observado en el cultivo de otras leguminosas [21]. Se quiere conocer qué rasgos y condiciones son necesarios para garantizar la colonización de la raíz y la infección de los rizobios en la etapa temprana de crecimiento. Esta bacteria, similarmente a la *E. Coli*, tiene una dinámica de corridas y tumbos con persistencia o memoria en la dirección de movimiento. La misma posee dos tipos de flagelos que le permiten desplazarse, los subpolares (gruesos y constitutivos) que le permiten nadar y

otros laterales (finos e inducibles) que le permiten desplazarse en el medio viscoso, son los responsables del swarming (Arrastrado por superficies). En el laboratorio es posible generar mutaciones de esta cepa para entender cual es la funcionalidad de cada uno de los flagelos, se muestran en la Fig. 1.9.

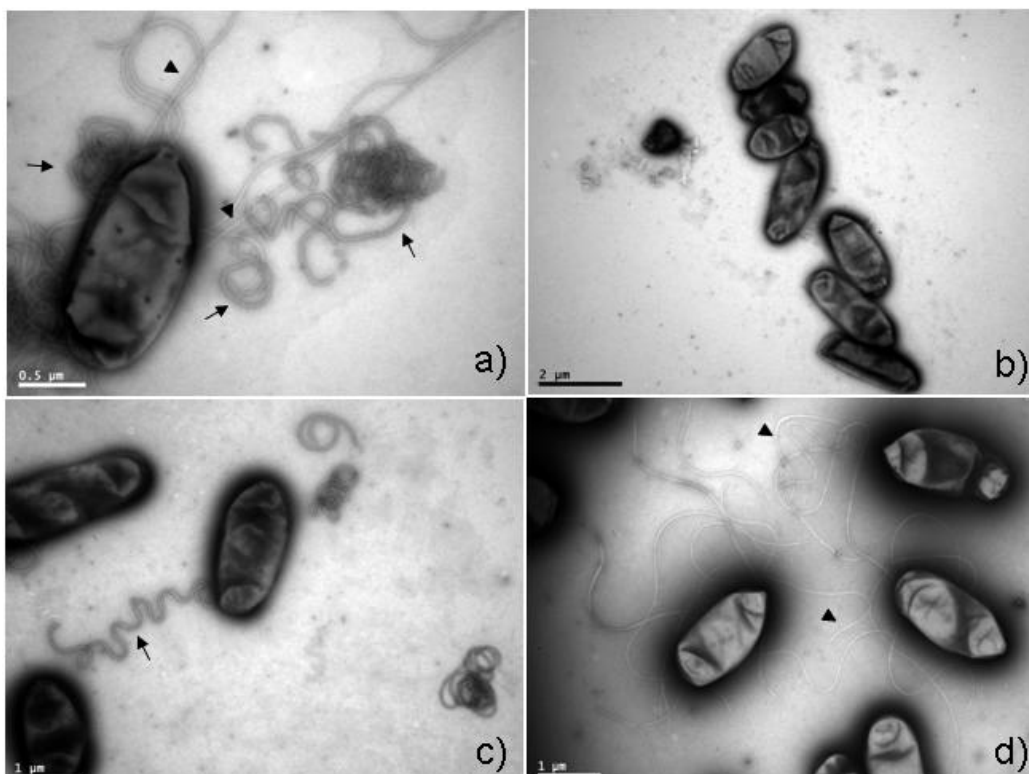


Figura 1.9: Micrografías electrónicas de transmisión de *Bradyrhizobium Japonicum* que muestra los flagelos gruesos (flecha) y los delgados (punta de flecha) para las cepas: a) LP 3004 o cepa salvaje posee ambos flagelos, b) LP 6543 mutación sin flagelos y no móvil, c) LP 6865 mutación sólo con flagelo subpolar y d) LP 5843 mutación sólo con flagelo lateral. La escala mostrada es de $1\mu\text{m}$. Figura extraída de [22].

Basado en estas mutaciones, el Profesor Anibal Lodeiro junto a su grupo de investigación en la UNLa Plata y en el IBBM (Inst. de Biotecnología y Biología Molecular) dependiente del CONICET midieron los siguientes datos aún no publicados que utilizamos en nuestras simulaciones:

Bacteria	$\bar{v}[\mu m/s]$	$\sigma_v[\mu m/s]$	$\bar{\phi}[^{\circ}]$	$\sigma_{\phi}[^{\circ}]$	$\tau[s]$	$D_r[rad^2/s]$	$D_T[\mu m^2/s]$
3004	29.85	4.21	50.9	5.9	0.57	0.0316	663.34
5843	11.51	4.35	91.1	1.2	0.21	0.3168	14.585
6865	25.72	7.87	70.7	14.1	0.53	0.0495	268.29
3008	33.70	5.7	62.0	5.8	0.74	0.0338	772.26
5844	15.20	2.97	87.1	6.3	0.35	0.6190	35.474
6866	32.65	9.01	90.6	8.6	0.84	0.0987	434.68

Cuadro 1.2: Parámetros de movilidad de las especies de *Bradyrhizobium Japonicum* en un medio acuoso. 3004 es la cepa salvaje y sus mutantes 5843 y 6865. La 3008 es un mutante seleccionado con mayor velocidad respecto de la 3004 y sus mutantes 5844 y 6866.

Debido a que ésta habita en la tierra, se tienen características generales de su comportamiento en este medio y en agar, pero esto nos brinda información respecto de su dinámica en un modo global. Si estamos interesados en un estudio más individual del proceso tenemos que pensar en realizar experimentos en otro medio, como el agua por ejemplo, y generar además algún mecanismo similar a la tierra porosa por la cual se desplaza. Por eso se caracterizó en el cuadro 1.2 la movilidad sobre un porta-objetos de una población diluida en un medio acuoso. En este trabajo intentaremos abordar su movilidad hidrodinámica en medios de microconfinamiento geométrico.

1.4. Difusión bacteriana: traslacional y rotacional

Describiremos ahora dos cantidades cruciales para entender las propiedades de transporte de las bacterias seleccionadas: la difusión traslacional simple o normal y la difusión rotacional. La trayectoria de las moléculas de perfume en aire quieto, o más generalmente cualquier molécula en un gas diluido, es una trayectoria desordenada de segmentos casi rectos modificada por las colisiones. La difusión es justamente la migración de moléculas o pequeñas partículas y este movimiento se debe a la energía térmica. Una partícula con temperatura absoluta T , tiene en promedio una energía asociada con el movimiento a lo largo de cada eje de $\frac{kT}{2}$, donde k es la constante de Boltzmann. Einstein en 1905 describió el movimiento Browniano: una partícula de masa m y velocidad v_x a lo largo del eje x tiene una energía cinética $mv_x^2/2$. Esta cantidad fluctúa, pero en promedio

$$\left\langle \frac{mv_x^2}{2} \right\rangle = \frac{kT}{2} \quad (1.8)$$

donde $\langle \rangle$ denota un promedio sobre ensamble o realizaciones. Si un conjunto de partículas es confinado a una pequeña región del espacio inicialmente, luego al liberarlas ellas se desplazarán en todas las direcciones, esto se llama difusión traslacional simple o normal.

Consideremos un conjunto de partículas que se encuentran inicialmente en $x = 0$ y realizan una caminata aleatoria unidimensional. Se tiene que el desplazamiento cuadrático medio crece con el número de pasos, y éste es proporcional al tiempo. Obteniendo la siguiente relación

$$\langle x^2 \rangle = 2Dt \quad (1.9)$$

donde D es el coeficiente de difusión que caracteriza la migración de las partículas en un dado medio a una dada temperatura. En general, depende del tamaño de la partícula, de la estructura del medio, de la temperatura absoluta y de la dimensión. Dependiendo de la dimensión la Ec. (1.10) se transforma en:

$$\langle x^2 \rangle = 2dDt \quad (1.10)$$

donde d es la dimensión en la que se desplaza la bacteria.

Si tenemos ahora una fuerza externa aplicada, F_x , esta produce una aceleración $a = F_x/m$. En un tiempo τ , el desplazamiento promedio es $a\tau^2/2$ y la partícula se desplaza en la dirección de la fuerza con una velocidad promedio $v_d = a\tau/2 = F_x\tau/2m$. En conclusión, esta velocidad es proporcional a la fuerza aplicada y el coeficiente de proporcionalidad es f (coeficiente de fricción) $v_d = \frac{F_x}{f}$. Haciendo uso de las relaciones antes mostradas, se puede llegar a la ecuación de Einstein-Smoluchowski [13]:

$$D = kT/f \quad (1.11)$$

Hemos mencionado que la ecuación de Navier Stokes describe el movimiento de fluidos, teniendo en cuenta todos los términos referidos a la hidrodinámica, que es un problema no lineal. Simplificando el problema, la Ley de Stokes, ley lineal, establece que la fuerza necesaria para mover una esfera de radio a a una velocidad v_d a través de un líquido incompresible y viscoso es

$$F = 6\pi\eta av_d \quad (1.12)$$

Al observar las trayectorias medidas experimentalmente para diferentes bacterias, se aprecia que éstas no son rectilíneas durante las corridas. La célula cambia su dirección durante la corrida, debido al efecto que genera la aleatoriedad de su motor y el medio en las bacterias. Se sabe que las partículas microscópicas tienen en promedio una energía asociada a la traslación de $\frac{kT}{2}$ y estas también tienen asociada en promedio una energía cinética de rotación a lo largo de cualquier eje de $\frac{kT}{2}$.

La difusión rotacional puede ser analizada de forma similar que el traslacional. En lugar de pensar en pasos de una distancia $\pm\delta$ a lo largo del eje x cada τ segundos, se utiliza un paso angular de $\pm\phi$ alrededor del eje x . La desviación media cuadrática angular en un tiempo t es:

$$\langle\theta^2\rangle = 2D_r t \quad (1.13)$$

Donde $D_r = \phi^2/2\tau$ es la constante de difusión rotacional (en unidades de rad^2/seg). La velocidad angular de arrastre, $\Omega_d = d\theta/dt$, resultante de la aplicación de un torque externo sobre el eje θ , N_θ es:

$$\Omega_d = \frac{N_\theta}{f_r} \quad (1.14)$$

donde f_r es el coeficiente de fricción rotacional. Del mismo modo que en el caso traslacional podemos concluir que

$$D_r = \frac{kT}{f_r} \quad (1.15)$$

La difusión rotacional afecta la precisión con la cual un microorganismo puede nadar en línea recta. Si se tiene una caminata aleatoria rotacional en dos dimensiones ($d = 2$), se tiene

$$\langle\theta^2\rangle = 2dD_r t = 4D_r t \quad (1.16)$$

Haciendo una aproximación similar a la realizada en el caso traslacional, encontramos que $D_r \cong 0,062rad^2/seg$ para la *E. Coli* salvaje [13].

Uno de los micro-dispositivos bidimensional que se analizará, tiene una de sus dimensiones mucho menor que la otra, de modo tal que podemos pensar un problema cuasi unidimensional. Para ello nos interesa entender el proceso de difusión confinada unidimensional desde el punto de vista de la teoría matemática [23]. La difusión de sustancias isotrópicas se basa en la hipótesis de que la velocidad de transferencia de la sustancia a la cual se le quiere conocer la difusión a través de una superficie de área unitaria es proporcional al gradiente de concentración normal a la superficie, es decir

$$F = -D \frac{\partial C}{\partial x} \quad (1.17)$$

donde F es la velocidad de transferencia por unidad de área, C es la concentración de la sustancia difusiva, x es la coordenada espacial normal a la superficie, y D es el coeficiente de difusión. En los casos de sistemas diluidos, se puede considerar que D es constante. El signo negativo de la ecuación

aparece puesto que la difusión ocurre en sentido opuesto al incremento de la concentración.

Pensemos en un elemento de volumen de forma de paralelepípedo rectangular de dimensiones $2dx, 2dy, 2dz$. Considerando el punto medio de este paralelepípedo donde la concentración es C . Nos concentramos en lo que sucede en la dirección x , la velocidad a la cual difunde la sustancia entrando a través de la cara $x - dx$ del paralelepípedo está dada por $4dydz(F_x - (\partial F_x/\partial x)dx)$ donde F_x es el valor de velocidad de transferencia en el centro del paralelepípedo. Similarmente podemos calcular la velocidad de pérdida por la cara opuesta $4dydz(F_x + (\partial F_x/\partial x)dx)$. Sumando ambas contribuciones tenemos:

$$-8dxdydz \frac{\partial F_x}{\partial x} \quad (1.18)$$

Similarmente ocurre a través de las otras caras. Pero por otro lado la velocidad con la que aumenta la difusión de la sustancia en ese paralelepípedo está dada por

$$8dxdydz \frac{\partial C}{\partial t} \quad (1.19)$$

Al comparar las ecuaciones (1.18) y (1.19), y utilizando (1.17), obtenemos:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \left(\frac{\partial^2 C}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} \right) \quad (1.20)$$

Reduciendo a una dimensión

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad (1.21)$$

Esta última ecuación (1.21) y (1.17) son las conocidas primera y segunda leyes de Fick para la difusión, con su relación directa a la ecuación de conducción del calor. Es fácil ver que una posible solución a (1.21) es:

$$C = D \frac{A}{t^{1/2}} \exp\left(\frac{-x^2}{4Dt}\right) \quad (1.22)$$

Suponiendo que la cantidad total de sustancia es M , debe cumplirse que: $M = \int_{-\infty}^{\infty} C dx$. Introduciendo (1.22) en esta expresión para M se encuentra la relación $M = 2A(\pi D)^{1/2}$; sustituyendo A de (1.22), se tiene:

$$C = D \frac{M}{2(\pi Dt)^{1/2}} \exp\left(\frac{-x^2}{4Dt}\right) \quad (1.23)$$

esta solución describe la propagación por difusión de una sustancia de cantidad M depositada a tiempo $t = 0$ en el plano $x = 0$. La misma posee

simetría alrededor de $x = 0$. Nuestro objetivo es entender que sucede bajo confinamiento, para ello, primero colocamos una pared en el plano $x = 0$, daremos una solución utilizando el concepto de reflexión en un borde. La solución será similar a (1.23), pero en este caso se permite solo el movimiento en la dirección de los x positivos; por lo que podemos considerar la solución para los x negativos reflejada en el plano $x = 0$ y superpuesta a la solución original en la región de los $x > 0$. Por la simetría de la solución original, tenemos:

$$C = D \frac{M}{(\pi Dt)^{1/2}} \exp\left(\frac{-x^2}{4Dt}\right) \quad (1.24)$$

La condición matemática que se impuso a este problema, fue la impenetrabilidad de a través de la pared colocada en $x = 0$, es decir

$$\left(\frac{\partial C}{\partial x}\right)_{x=0} = 0 \quad (1.25)$$

Hasta aquí se consideró como condición inicial un plano, ahora se coloca una distribución en una región finita del espacio. La concentración inicial puede escribirse como:

$$C = C_0 \Theta(x) \quad (1.26)$$

donde Θ es la función escalón. Para resolver esto, se piensa a toda la concentración como una sucesión de planos de ancho $d\xi$. Entonces, con el uso de Ec. (1.24), se puede conocer la concentración en el punto P, que se encuentra a una distancia ξ del elemento diferencial a tiempo t es: $(C_0 d\xi e^{-\xi^2/(4Dt)}) / (4\pi Dt)^{1/2}$. La solución completa para la distribución (1.26) es la suma sobre los elementos $d\xi$:

$$C(x, t) = \frac{C_0}{2(\pi Dt)^{1/2}} \int_x^\infty e^{\frac{\xi^2}{4Dt}} d\xi = \frac{C_0}{(\pi)^{1/2}} \int_{x/2Dt^{1/2}}^\infty e^{-\eta^2} d\eta \quad (1.27)$$

donde $\eta = \xi/2Dt^{1/2}$. Cuya solución es:

$$C(x, t) = 0,5C_0 \operatorname{erfc}\left(\frac{x}{2(Dt)^{1/2}}\right) \quad (1.28)$$

donde *erfc* hace referencia a la función error complementaria. En un sistema finito de longitud l , la condición en esta pared debe ser que no haya flujo de sustancia a través de esta. La condición establecida es:

$$\left(\frac{\partial C}{\partial x}\right)_{x=l} = 0 \quad (1.29)$$

Para satisfacer esta condición, la función debe reflejarse en $x = l$, luego reflejada en $x = 0$ y así sucesivamente. Resulta así en una reflexión sucesiva

y una superposición de las soluciones es:

$$C(x, t) = \frac{1}{2} C_0 \sum_{n=-\infty}^{\infty} \operatorname{erfc} \left(\frac{2nl - x}{2(Dt)^{1/2}} \right) \quad (1.30)$$

Hasta aquí se describió el fenómeno de la difusión de partículas con una dinámica de corridas y tumbos y por otro lado se describió que sucede con una sustancia confinada en una región del espacio, ahora nos toca entender que es lo que sucede cuando se introducen bacterias adentro de microdispositivos diseñados especialmente para este fin. Los mismos los podremos considerar cuasi bidimensionales por que la dimensión z es despreciable (un orden de magnitud menor) frente a las dimensiones x e y .

En este capítulo dimos el amplio marco teórico utilizado para realizar este trabajo, desde la hidrodinámica a un bajo número de Reynolds, hasta las cantidades físicas que son de nuestro interés, pasando por las particularidades de las diferentes especies bacterias representadas. En el capítulo 2 pondremos el foco en el modelo de nuestro problema, es decir las fuerzas involucradas, los vínculos existentes, las ecuaciones que se desean resolver, los métodos de integración utilizados para resolver el problema y las cantidades físicas medidas de interés. En el capítulo 3 nos concentraremos en entender cómo los diversos parámetros del problema afectan la acumulación de bacterias en las paredes microconfinantes. En el capítulo 4 entenderemos como afecta a nuestros experimentos numéricos el nacimiento y muerte de los nadadores. En el capítulo 5, desarrollaremos el problema de separación de poblaciones mixtas de *Escherichia Coli* y la utilización de nuevas geometrías. En el capítulo 6 nos concentraremos en la *Bradyrhizobium Japonicum*, la separación de poblaciones mixtas y la movilidad de las mismas en microdispositivos con geometrías desordenadas. Finalmente, en el capítulo 7 expresaremos las conclusiones de este trabajo.

Capítulo 2

Metodología

En los últimos tiempos, se ha incrementado el interés en la dinámica de agentes microscópicos bajo microconfinamiento en volúmenes muy pequeños, de unos pocos nanolitros. Estos agentes pueden ser de los más diversos por ejemplo objetos autopropulsados como bacterias, espermatozoides y micro-robots. Cada uno de estos, tiene una forma de autopropulsión diferente, como así también su interacción con las paredes confinantes es distinta. Es de interés entenderlos, para poder clasificar, separar, manipular y/o acumular los mismos, utilizando micro-arquitecturas. Este estudio experimental de la dinámica de microconfinamiento es posible gracias a los amplios avances que se han realizado recientemente en la construcción de estas micro-cámaras y los tan conocidos laboratorios en un chip, como así también los avances que se han realizado en las técnicas de observación. Hace más de 40 años, Berg y Brown [14], mostraron experimentalmente para la *E. coli* que:

- I El largo de las corridas está exponencialmente distribuido; este es el primer gran resultado de la época.
- II El cambio en la dirección luego de un tumbos es en media menor que 90° , teniendo memoria de la dirección de movimiento previa o persistencia. Cabe destacar que esta memoria es de corto alcance, se olvida luego de dos o más tumbos.
- III Las corridas no son perfectamente rectas, su fuente es el ruido intrínseco del micronadador y/o el ruido térmico. Las corridas tienen variaciones $\delta\phi$ mostradas en la Fig 1.5.

Estas tres características importantes de la movilidad bacteriana no se tuvieron en cuenta en modelos anteriores y nuestro modelado incluirá en detalle mostrando cuan importante es modelar la dinámica microconfinada en forma más detallada.

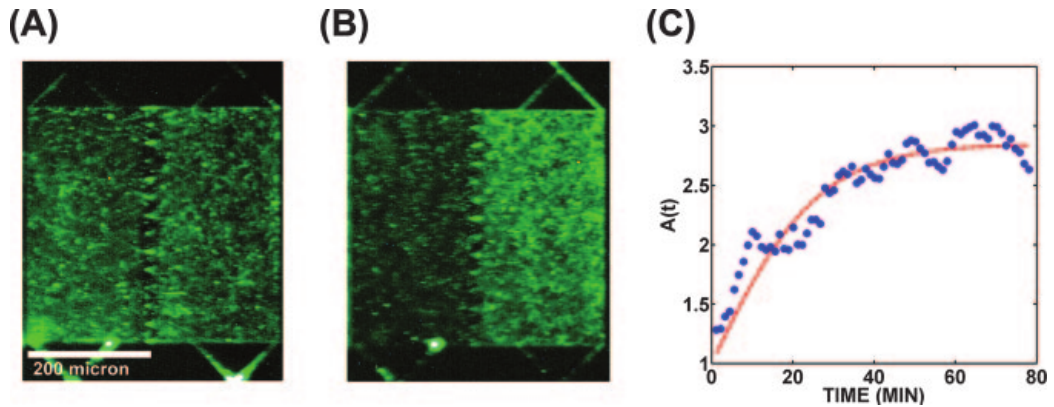


Figura 2.1: Distribución de bacterias en una estructura con una columna de embudos. (A) Distribución uniforme luego de la inoculación. (B) Distribución del estado estacionario luego de 80 minutos. (C) Razón de las densidades en el compartimiento de la derecha respecto del de la izquierda en función del tiempo. $R(t) = n_2/n_1 = derecha/izquierda$. Los puntos son los datos experimentales y la línea es el fito de la ecuación que describe este fenómeno. Figura extraída de [24].

Galajda *et. al.* [24], mostraron experimentalmente cómo acumular bacterias en diferentes lugares del espacio, gracias a la utilización de una columna de defectos u obstáculos asimétricos, Fig 2.1, generando una diferencia de densidades a ambos lados. Es decir, generan una distribución inhomogénea de bacterias gracias al efecto ratchet producido por las columnas de embudos. Esta columna funciona como un ratchet geométrico y la dirección de fácil movimiento de este ratchet es de izquierda a derecha. Cuando las bacterias que chocan con el defecto en esta dirección son dirigidas por las paredes hacia la derecha. Mientras que cuando chocan de derecha a izquierda, por la forma del embudo, son re-dirigidas a la derecha. Generando una consecuente acumulación hacia la derecha de caja, Fig 2.2.

En trabajos anteriores [25], modelaron fenomenológicamente estos experimentos, considerando una dinámica de corridas y tumbos con una magnitud constante en la fuerza del motor, a diferencia de lo dicho en el inciso I. Es decir consideraron una distribución de velocidades constante y con fluctuaciones térmicas modelaron el ruido, sin considerar ningún efecto hidrodinámico. En este trabajo los tiempos de corridas son constantes, la velocidad de todas las bacterias es la misma y el ángulo luego de un tumbo es aleatorio. Berdakin *et. al.* [1], desarrollaron un modelo fenomenológico y más detallado, que considera los puntos I, II y III descritos anteriormente. El mismo describe la dinámica de las bacterias teniendo en cuenta factores no considerados con anterioridad en otros modelos y gracias a estos factores es capaz de *reproducir cuantitativamente* los experimentos previos realizados por Galajda. En este trabajo utilizaremos un código desarrollado por Iván Berdakin para su



Figura 2.2: Esquema de la trayectoria de las bacterias cuando interacciona con los defectos. Los mismos funcionan como un ratchet geométrico cuya dirección de fácil movimiento es de izquierda a derecha, generándose un direccionamiento en esta dirección.

tesis doctoral, al cual se le realizaron modificaciones como el mejoramiento de geometrías para la separación y luego se realizaron geometrías desordenadas, también se agregó una población variable debido a los procesos de nacimiento y muerte. Gracias a la utilización de este modelo, se obtuvieron los siguientes resultados [1, 2]:

1. En condiciones de nado libre, hay dos factores que atenuan la correlación en la orientación: los tumbos y la difusión rotacional. El primero afecta más a sistemas con un corto tiempo de corrida, mientras que el segundo lo hace en sistemas con tiempos de corridas más largos.
2. El coeficiente de difusión traslacional disminuye fuertemente a medida que el ángulo de los tumbos aumenta. Por lo que resulta necesario considerar la dinámica específica y movilidad de los nadadores involucrados.
3. En ambientes confinados, bacterias con largos tiempos de corrida y gran persistencia tienen una mayor densidad en las cercanías de las paredes, incrementando así el direccionamiento en la dirección de fácil movimiento del ratchet. En conclusión, un mayor tiempo de permanencia en las paredes y un diseño adecuado de la arquitectura de las paredes y embudos del dispositivo, es decir, paredes del largo de la corrida del run y gaps de los embudos del orden del ancho de la bacteria favorecen la rectificación o concentración de los nadadores.
4. A medida que se incrementa el tiempo de corrida de los nadadores, estos permanecen mayor tiempo en las paredes, aumentando así su

rectificación. Y cuando este τ es insignificante los nadadores no pueden hacer provecho de los embudos y no muestran un movimiento dirigido.

5. Incrementando la velocidad media de los nadadores durante la corrida o aumentando la persistencia en la dirección del movimiento, se mejora la acumulación en las paredes y la rectificación.

En conclusión, diversos tipos de estrategia de nado y parámetros de la dinámica, producen eficiencias en la acumulación de micronadadores muy diferentes. Para la realización de este trabajo nos basaremos en este modelo que a continuación desarrollaremos en profundidad.

2.1. Modelo fenomenológico para la dinámica bacteriana

Estudiaremos numéricamente un sistema diluido de micronadadores autotopropulsados a un bajo número de Reynolds y confinadas en un microdispositivo bidimensional de dimensiones $L_x \times L_y$ con una red de defectos u obstáculos en su interior. En esta caja se dispondrán defectos arreglados en forma ordenada en columnas y luego se generarán geometrías desordenadas de defectos. Las primeras están diseñadas (Fig 2.3) a través de M columnas equidistantes de una cantidad de defectos tipo embudos, N_f , separados entre sí por una distancia $l_g = 2\mu m$, un largo de las paredes $l_f = 30\mu m$ y un ángulo de apertura $\theta = 68^\circ$ (Fig 2.4). Se tomaron estos valores de la geometría debido a que en [1] se buscaron los valores óptimos para una mayor eficiencia en la rectificación de la bacteria salvaje en un ratchet del tipo mostrado en Fig 2.1. Nosotros estudiamos [2] redes ordenadas de columnas y la eficiencia de separación de una población mixta versus la distancia entre filas de columnas, l_D , y usamos la longitud de la cámara de inoculación constante $l_I = 450\mu m$.

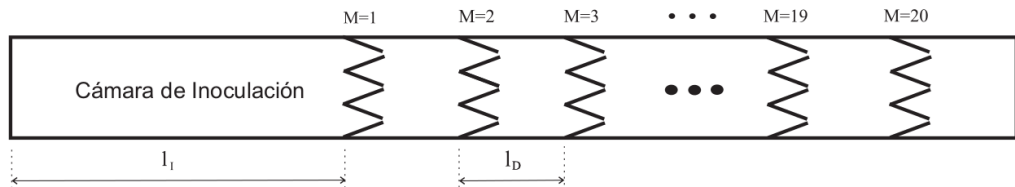


Figura 2.3: Esquema de la geometría de un microdispositivo de 21 cámaras con $M = 20$ columnas idénticas de embudos asimétricos. Todas las cámaras tienen la misma longitud excepto la cámara de inoculación, $l_I = 450\mu m$

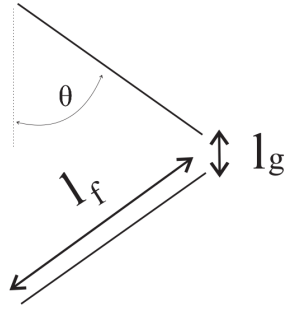


Figura 2.4: Esquema de la geometría de un embudo asimétrico destacando sus parámetros relevantes: longitud y ángulo de las microparedes, l_f y θ , y apertura del embudo, l_g .

En suma, estudiamos geometrías desordenadas que se desarrollaron de diversas formas, a partir de bastones de largo $l_b = 30\mu m$ y un ancho de $w_b = 2\mu m$ dispuestos con un ángulo θ_b respecto de la horizontal, medido de igual forma que el ángulo de apertura de los embudos. Notemos que el bastón tiene dimensiones similares a las de la bacteria pues ésta la representamos por un disco de $1\mu m$ de diámetro. Dependiendo del experimento y a medida que se avanza en el proyecto la posición de los bastones es aleatoria o fija, también se utilizaron y analizaron bastones colocados en el lateral del dispositivo para contener a las bacterias y evitar que las mismas regresen hacia atrás. En cada experimento se explicará la geometría utilizada y cómo se la generó. Siempre se busca encontrarse en el límite de baja densidad, para ello se emplea una fracción de empaquetamiento, Ec. (2.1).

$$\varphi = \frac{Area_{dispositivo}}{Area_{bacterias}} < 0,05 \quad (2.1)$$

Cada nadador, es representado por un disco de radio $r_s = 0,5\mu m$ y se localiza con un vector posición en el centro de masa \vec{r}_i , moviéndose en dos dimensiones. El módulo de la velocidad es v_i y su dirección $\hat{v}_i = \cos\Phi_i\hat{i} + \sin\Phi_i\hat{j}$. Bajo confinamiento las mismas responden a una dinámica determinada por la siguiente ecuación de movimiento sobreamortiguada:

$$\gamma\vec{v}_i = \vec{F}_i^m + \vec{F}_i^{sw} + \vec{F}_i^s \quad (2.2)$$

donde γ es la constante de amortiguamiento del medio. Luego nos detendremos en la explicación de las fuerzas involucradas, a saber fuerza del motor o autopropulsión, F_M , fuerza de interacción entre el micronadador y las paredes, F_{SW} , y fuerza de interacción entre bacterias, F_S .

Las corridas antes descritas, modifican su dirección debido a que la bacteria realiza un tumbo y en cada paso temporal se ve afectada por el coeficiente de difusión rotacional, estos cambios en la dirección de la velocidad se pueden

expresar de la siguiente manera (Fig 1.5):

$$\Delta\Phi_i = \Delta\phi\chi + \nu\sqrt{2D_r\Delta t}(1 - \chi) \quad (2.3)$$

donde $\Delta\phi$ es la variación en el ángulo debido a un tumbo, χ es una variable de estado que vale 0 durante la corrida y 1 durante el tumbo, ν es un número aleatorio con distribución gaussina, D_r es el coeficiente de difusión rotacional, Δt es el paso de integración numérico.

Ahora para entender el efecto de cada uno de los parámetros del modelo, se analiza la Fig. 2.5. En (a) se observa como el movimiento tiene una forma más browniana, respecto de la cepa salvaje, pues realiza muchos más tumbos durante el tiempo mostrado, por poseer corridas de menor largo. En contrapartida en (c) se observan trayectorias más rectilíneas y alargadas en las que cada bacteria sólo realiza entre 5 y 7 tumbos durante los 20 segundos mostrados. Analizando la memoria del movimiento previo, se tiene que cuando el ángulo es pequeño (d) se tiene una trayectoria casi rectilínea. Puesto que la bacteria no modifica su dirección previa considerablemente, en cambio cuando este ángulo es grande (f) su trayectoria es similar a un caminante aleatorio típico que recorre el espacio más uniformemente. Finalmente al observar las modificaciones debido al coeficiente de difusión rotacional, se nota que cuando este es pequeño (g) su trayectoria no se ve modificada por este parámetro y se observan a simple vista similar a la cepa salvaje. En cambio cuando este coeficiente es mayor (i) las trayectorias se vuelven más irregulares.

Las fuerzas ejercidas sobre cada micronadador son:

1. *Fuerza de autopropulsión:* A un bajo número de Reynolds, los nadadores adquieren casi inmediatamente una velocidad de nado constante, directamente proporcional a la fuerza de su motor autopropulsante. En nuestro modelo, el valor de esta velocidad está dado por F^m/γ donde F^m es el módulo de la fuerza de propulsión. Para generar una población heterogénea, se le asigna a cada bacteria un módulo de la velocidad proveniente de una distribución normal de media \bar{v} y desviación estándar σ_v , los valores de esta distribución son tomados de mediciones biológicas, pues como hemos descripto anteriormente la velocidad de nado de las bacterias se modifica a lo largo de la vida de la misma. Inicialmente, se le asigna a cada bacteria un módulo de la velocidad propio proveniente de la distribución antes mencionada y se mantiene constante a lo largo de todo el experimento numérico. La dirección del nadador se ve afectada por un tumbo o por la difusión rotacional Ec. (2.3). Los tumbos se asumen instantáneos, puesto que los tumbos reales demoran del orden de 0.1seg que es del orden del 10% al 20% del tiempo de la corrida para la *Escherichia Coli* y la *Bradyrhizobium Japonicum*. En cada tumbo (Fig 1.5), se realiza una modificación

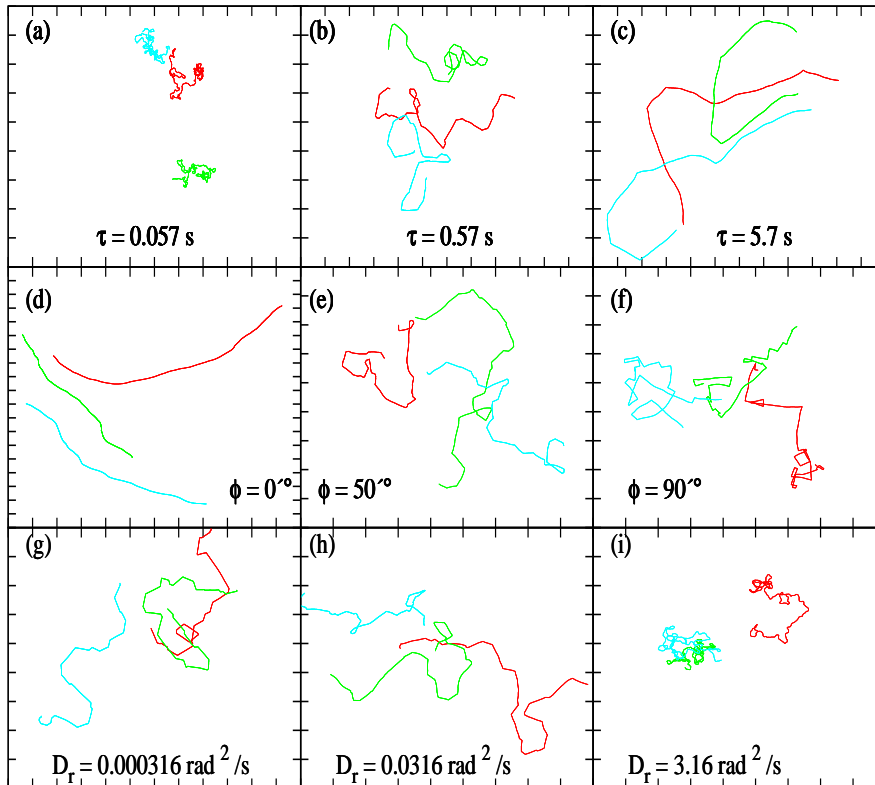


Figura 2.5: Trayectorias típicas de tres bacterias de la cepa 3004 durante 20s a las que se le modificaron diversos parámetros de la movilidad. La separación entre tics de cada gráfico es de $50\mu m$. En (b), (e) y (h) se muestran trayectorias de tres bacterias de la cepa 3004. En (a) se redujo un orden de magnitud en el tiempo de corrida, en contrapartida en (c) se muestra una bacteria con un tiempo de corrida un orden por encima de la cepa salvaje. En (d) se muestra una bacteria que realiza tumbos y modifica su dirección entre 0° y 5° por tumbo; en cambio en (f) se muestra una bacteria que cambia su dirección en 90° . Finalmente en (g) se tiene una bacteria cuyo D_r es pequeño y en (i) un D_r de dos órdenes de magnitud más que el de la cepa salvaje. Cabe destacar que el resto de los parámetros, en todos los casos, es el correspondiente a la cepa 3004.

angular de $\Delta\phi$ respecto de la dirección previa de movimiento, que consideramos de distribución gaussina centrada en $\bar{\phi}$ y con un ancho σ_ϕ . Los sucesivos tumbos están separados por corridas casi rectas (salvo el pequeño efecto de D_r) distribuidas exponencialmente con una duración media τ . Recordemos que durante cada corrida, las fluctuaciones de los motores flagelares, del ambiente y de diversos factores generan una desviación de una corrida perfectamente rectilínea. Las fluctuaciones introducidas por agitación térmica del fluido a temperatura ambiente son despreciables, del orden de $10^{-4} - 10^{-5}$ veces más pequeñas que la fuerza del motor. Estas desviaciones están medidas en el coeficiente de difusión rotacional, D_r , que se observa experimentalmente y es incluido en nuestro modelo a través Ec. (2.3). Cabe destacar que este ruido no es un ruido blanco sumado a la velocidad, Ec. ((2.2) como en [25], sino que es un ruido blanco en la dirección de la velocidad.

2. *Interacción con las paredes:* Está modelada por una fuerza estérica repulsiva \vec{F}_i^{sw} normal a las paredes,

$$\vec{F}_i^{sw} = f^{sw} \left(1 - \frac{r_{ik}}{a}\right) \Theta \left(1 - \frac{r_{ik}}{a}\right) \widehat{n}_k \quad (2.4)$$

donde f^{sw} es el máxima intensidad de la fuerza, Θ es la función escalón, \widehat{n}_k es el vector normal a la k -ésima pared, r_{ik} es la distancia entre la i -ésima partícula y el centro de la k -ésima pared, $a = r_s + w/2$ y w es el ancho de la pared. Cuando cualquier bacteria colisiona con una pared, la dirección del nadador no se modifica y la componente normal de la velocidad a la pared es contrarestanda por la repulsión de esta última, y así el nadador se mantiene ligeramente rebotando contra la pared. Imponemos que la componente de \vec{F}_i^m paralela a la pared es la que propulsa a la bacteria a lo largo de la pared con una velocidad reducida proporcional al seno del ángulo formado entre la dirección de incidencia de la bacteria y \widehat{n}_k . Esta representación fenomenológica de la interacción tiene la interesante propiedad de reducir la velocidad de la bacteria al chocar con la pared sin la utilización de ningún parámetro extra en el modelo y mantiene al nadador paralelo a la pared como se observa experimentalmente. Esta reducción de la velocidad cuando la bacteria nada paralela a la pared ha sido estudiada experimentalmente en [26]. En conclusión cuando un nadador se encuentra con una micro pared, sentirá una fuerza de atracción hidrodinámica con la misma (que introducimos fenomenológicamente con el nado paralelo a la pared) y seguirá con una dirección paralela a la pared con una velocidad reducida hasta que, por un tumbo o por la acción del coeficiente de difusión rotacional, se reorienta, tome una nueva dirección y abandone la pared.

3. *Repulsión estérica entre nadadores*: Viene dada por:

$$\vec{F}_{ij}^s = f^s \left(1 - \frac{|\vec{r}_{ij}|}{2r_s}\right) \Theta \left(1 - \frac{|\vec{r}_{ik}|}{2r_s}\right) \vec{r}_{ik} \quad (2.5)$$

siendo f^s la máxima magnitud de la fuerza y $\vec{r}_{ik} = \vec{r}_i - \vec{r}_k$. Esta fuerza permite evitar solapamiento de bacterias, es la repulsión de una con la otra. Se estudió que la interacción hidrodinámica entre nadadores no es relevante para una baja densidad de los mismos y para el direccionamiento geométrico [30]. Luego se realizará una comparación y se discutirá el efecto e influencia de la misma.

Para la realización del modelo antes descripto se utilizó como referencia [25]. En el mismo se propone que las corridas tienen un largo constante, todos los nadadores se mueven con la misma velocidad inicial y luego de cada tumbo toman una dirección completamente aleatoria en el intervalo $[0, 2\pi]$. Nuestro modelo difiere de este en todos los aspectos antes mencionados. Cómo se explicó con anterioridad se utilizaron distribuciones para estas cantidades (velocidad, tiempo de corrida y persistencia) y así generar una semejanza con los resultados experimentales en los cuales se basa el modelo.

Otra diferencia sustancial se encuentra donde se coloca el ruido, Wan et al. colocan el mismo como un ruido blanco térmico en la evolución de la velocidad (Ver Ec. (2.2)), lo cual resulta en una buena primera aproximación. Los mismos le ponen una intensidad a este ruido de modo tal de representar la trayectoria no rectilínea en cada corrida. Dada la intensidad del ruido blanco ($F^T = 10$ en unidades del problema) y recordando que este es de la forma $\xi\sqrt{2T\Delta t}$ se calculará la temperatura asociada. Considerando el paso temporal $\Delta t = 0,005$ en unidades del tiempo simulado y para un número aleatorio $\xi = 0,5$, se obtiene una temperatura $T = 40000^\circ K$. Ésta es mucho mayor que la temperatura a la cual las bacterias viven y son capaces de sobrevivir. En cambio, en nuestro modelo la estocasticidad del problema se incluye como un ruido blanco en la fuerza del motor de la bacteria, como una modificación en el ángulo de la velocidad (Ver Ec. (2.3)). En conclusión nuestro modelo describe una dinámica fenomenológica y la estocasticidad del problema está en el ángulo ϕ de la velocidad. Esta descripción coincide con una dinámica de Langevin para objetos autopropulsados [27].

Si el coeficiente de fricción $\gamma = 6\pi\eta r_s$, utilizando $r_s = 0,5\mu m$ y $\eta = 10^{-2} poise$ (que es la viscosidad del agua a $20^\circ C$), entonces $\gamma \sim 9,452 \times 10^{-6} g/s$. Bajo estas condiciones, la intensidad de la fuerza del motor de una bacteria que se desplaza a $20\mu m/s$ es $0,17 pN$. La magnitud de las fuerzas actuando sobre los nadadores son $f^s = 200$ y $f^{sw} = 300$ en unidades de γ , equivalente a diez y cincuenta veces la fuerza ejercida por el motor en un fluido a $20\mu m/s$.

2.2. Cantidades calculadas

2.2.1. Trayectorias

Se analizó cómo se mueven las bacterias libres y en medios de confinamiento. Las posiciones de las bacterias se calculan para cada paso temporal, pero las mismas sólo se escriben cada un determinado tiempo, en general 1 segundo. Se hace esto, puesto que es costoso computacionalmente por el espacio de disco que ocupa esta cantidad de datos. Tener en cuenta que cada vez que se graba un tiempo, se lo hace para todas las bacterias ($N_s \geq 1000$) y en las dos direcciones (x e y) en una matriz de dimensiones $N_s \times 2$.

2.2.2. Difusión traslacional

Dedicamos especial énfasis al cálculo de la difusión bajo confinamiento, como hemos explicado en el capítulo anterior, sección 1.4. Calcularemos el mismo para diferentes bacterias y especies en diversos sustratos. Para el cálculo de la misma se utiliza la Ec. (1.10), donde $\langle x^2 \rangle = \sum_{i=1}^{N_s} ((x(t) - x(0))^2 + (y(t) - y(0))^2) / N_s$, esta cantidad se calcula para todo tiempo. Luego se hace un ajuste lineal de esta cantidad a través de la ecuación antes mencionada y se obtiene el valor de D .

2.2.3. Rectificación

En un dispositivo con una columna central de embudos asimétricos separando dos cámaras, se define una medida de transporte, la rectificación, como el cociente de densidad de bacterias que se encuentran a uno y otro lado de la barrera de obstáculos o equivalentemente como el cociente entre la cantidad de bacterias que se encuentra en una de las cámaras respecto de la cantidad de bacterias que se encuentran en el otro. Esta cantidad está relacionada con la geometría y el rompimiento de la simetría del sistema. Esta cantidad se calcula luego del tiempo necesario para que el sistema llegue a un equilibrio.

$$R = \frac{\rho_2}{\rho_1} = \frac{n_2}{n_1} \quad (2.6)$$

2.2.4. Separación: Eficiencia y tiempo de separación

Luego consideramos una población mixta de bacterias en una caja como la mostrada en Fig. 2.3, es decir dos cepas que difieren en sus parámetros de movilidad, el objetivo es intentar separar controladamente estas dos poblaciones y queremos encontrar una forma de cuantificar la eficiencia de los

dispositivos con muchas cámaras para ello se proponen dos parámetros que son indicadores del proceso de separación:

1. Tiempo de separación, t^* es el lapso de tiempo desde que arriba a la última cámara de la caja la primer bacteria de la cepa rápida hasta que arriba la primer bacteria de la cepa lenta. En este tiempo, tenemos pureza en la separación de las dos cepas.
2. Eficiencia en la separación, $\epsilon \%$, que está definida como la fracción de bacterias de la cepa que primero arriba a la última cámara en el tiempo t^* . Es conveniente, definir el porcentaje de extracción porcentual como,

$$\epsilon \% = 100 \frac{N_f(t^*)}{N_0} \quad (2.7)$$

donde $N_f(t^*)$ es la cantidad de nadadores de la especie rápida que están en la última cámara en el tiempo t^* , donde se la puede extraer con una pureza del 100% y N_0 es la cantidad de nadadores inoculados en la cámara de inoculación al inicio de cada simulación.

2.3. Métodos numéricos

Nuestra ecuación de movimiento de primer orden Ec. (2.2) se puede resolver mediante diversos métodos de integración. Por ejemplo a través de Euler Ec. (2.8) o Runge Kutta de orden 4, RK4, Ec. (2.9) [28]. La solución del primero de ellos viene dada por:

$$y_{n+1} = y_n + hf(x_n, y_n) \quad (2.8)$$

Donde y_n representa el valor aproximado de la función en el paso de simulación n , h es el paso temporal de integración y $f(x_{n-1}, y_{n-1})$ es el valor de la función f que queremos conocer, evaluada en el paso temporal anterior. El error es de primer orden $O(h^1)$ y presenta inestabilidades en determinadas situaciones a tiempos largos. Por otro lado, el método RK4 para este problema está dado por la siguiente ecuación:

$$y_{n+1} = y_n + \frac{1}{6}h(k_1 + 2k_2 + 2k_3 + k_4) \quad (2.9)$$

donde y_n y h son similares a lo descrito en Euler, $k_1 = f(x_n, y_n)$, $k_2 = f(x_n + 0,5h, y_n + 0,5k_1h)$, $k_3 = f(x_n + 0,5h, y_n + 0,5k_2h)$ y $k_4 = f(x_n + h, y_n + k_3h)$. Así el valor y_{n+1} es determinado por el valor y_n más el valor del tamaño del intervalo h por una pendiente estimada. Esta pendiente es un promedio

ponderado de pendientes en distintas partes del intervalo. Este es un método de cuarto orden, es decir que el error por paso es del orden de $O(h^5)$, mientras que el error tiene orden $O(h^4)$.

Se compararon estos métodos viendo que se obtienen resultados similares para ambos casos, así luego usaremos el de mayor conveniencia según su estabilidad y tiempo de CPU. Para ello se consideró el dispositivo de confinamiento más sencillo, una caja de dimensiones $211,81 \times 300 \mu m$ con una única fila de embudos que separa la caja en dos partes, similar a la mostrada en Fig. 2.1. Aquí medimos la rectificación, a través de la Ec. (2.6), como cantidad física fácil de interpretar y calcular.

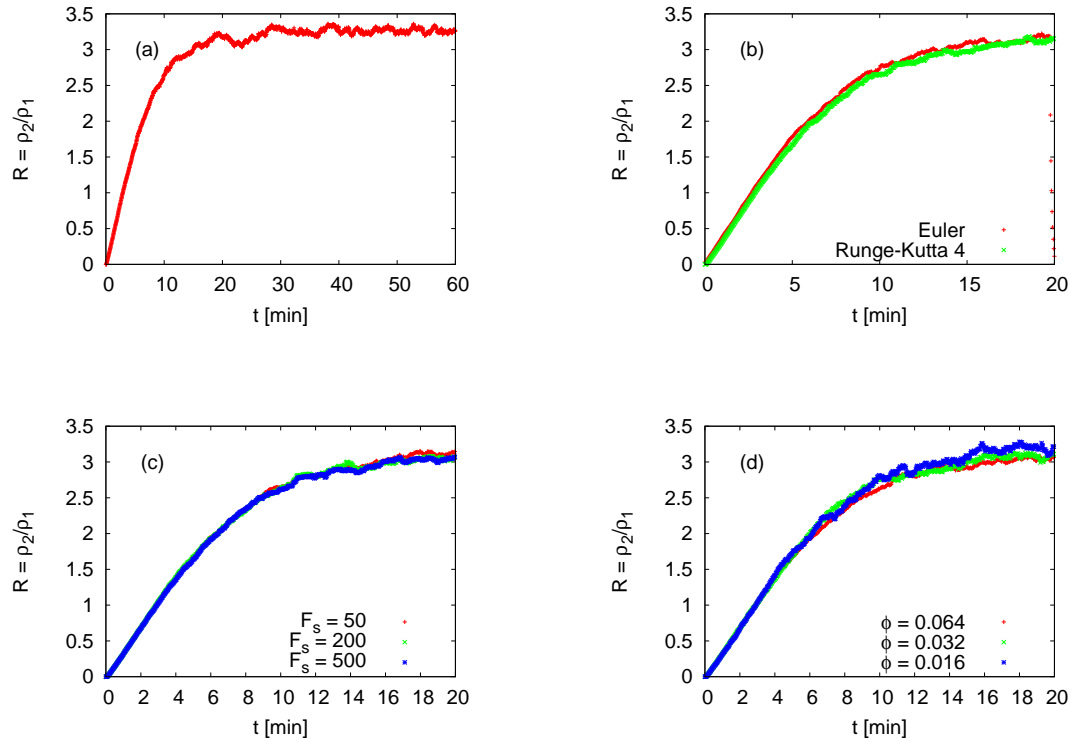


Figura 2.6: Rectificación para la cepa s_1 en una caja de dimensiones $211,81 \times 300 \mu m$ (a) para un tiempo de 60 minutos. (b) Se comparan los diferentes métodos de integración Euler y RK4, promedidas en 10 realizaciones. (c) Se comparan diferentes valores de la intensidad de la fuerza de repulsión estérica, promedidas en 10 realizaciones. (d) Se comparan diferentes valores de la densidad de nadadores inoculados, siempre trabajando en el límite de baja densidad donde tiene validez nuestro modelo.

Ahora analicemos la Fig 2.6. En (a) observamos que se llega a un estado estacionario a los 20 minutos, por eso este será el tiempo máximo que uti-

lizaremos para analizar las curvas siguientes. Cuando se modifica el método de integración utilizado (b) no se observan diferencias sustanciales en cuanto al resultado. Respecto de los tiempos de CPU para obtener una realización del experimento son para Euler 15:35 minutos y con RK4 los tiempos son 30:32 minutos. Es razonable que con RK4 se demore más tiempo en resolver el problema, puesto que debo resolver cuatro ecuaciones respecto de una única que debo hacer con Euler. Al modificar la intensidad de la fuerza de repulsión estérica o de exclusión de volumen (c) no se observan diferencias sustanciales en cuanto al resultado. El tiempo de CPU para obtener una realización es de 41:07 minutos utilizando RK4 con interacciones estéricas a través de la subrutina linked list. Finalmente al modificar el factor de empaquetamiento (d) se observa que cuando tengo una menor cantidad de bacterias, es decir la densidad más baja, se tiene una mayor cantidad de fluctuaciones en esta medida, relacionado directamente con la menor cantidad de datos para promediar.

Observamos que la rectificación no modifica su valor medio cuando utilizamos distintos valores de Fuerza estérica ni distinta densidad, es decir distinta cantidad de bacterias por área. Tampoco se observan diferencias en este valor al integrar nuestra ecuación con los dos métodos de integración descriptos, sin embargo en este caso la diferencia sustancial se encuentra en el tiempo de CPU que toma cada proceso. Los mismos se muestran en el cuadro 2.1.

Método	Interacción estérica	Δt [seg]	CPU [min]
Euler	No	0.001	21:27
Euler	Si	0.001	44:52
Euler	Si con linked list	0.001	35:48
Runge Kutta	No	0.001	30:29
Runge Kutta	Sí	0.001	68:35
Runge Kutta	Sí con linked-list	0.001	51:39

Cuadro 2.1: Comparación de los métodos de integración

Comparando los métodos, RK4 demora un 40 % más respecto de Euler, sin embargo sabemos que este último presenta inestabilidades y una mayor acumulación de errores, por ser un método de menor orden. Además, se observa que debido a la utilización de las interacciones estéricas el tiempo de CPU es dos veces mayor, sin embargo la utilización de la rutina linked list [29] reduce en aproximadamente 25 % respecto de la comparación de célula con todas las otras. En conclusión utilizaremos RK4 para la integración de nuestra ecuación por ser este un método más estable y confiable, con un

paso temporal de 0.001 seg que es el óptimo. Respecto de las interacciones estéricas, no las utilizaremos por encontrarnos en un sistema diluído [30] y ser estas despreciables.

Ahora se utiliza un dispositivo que consta de 21 cámaras separadas por filas de 3 embudos equidistantes en $l_D = 150\mu m$, en el cual se inocula una población mixta en la cámara de inoculación. Estas tendrán una evolución temporal como la mostrada en Fig. 2.7 donde se puede apreciar, cómo gracias al efecto del ratchet geométrico se produce la separación de las dos cepas, permitiendo así la extracción pura de la cepa s_3 (mutante de corrida larga) en la última cámara en un largo período.

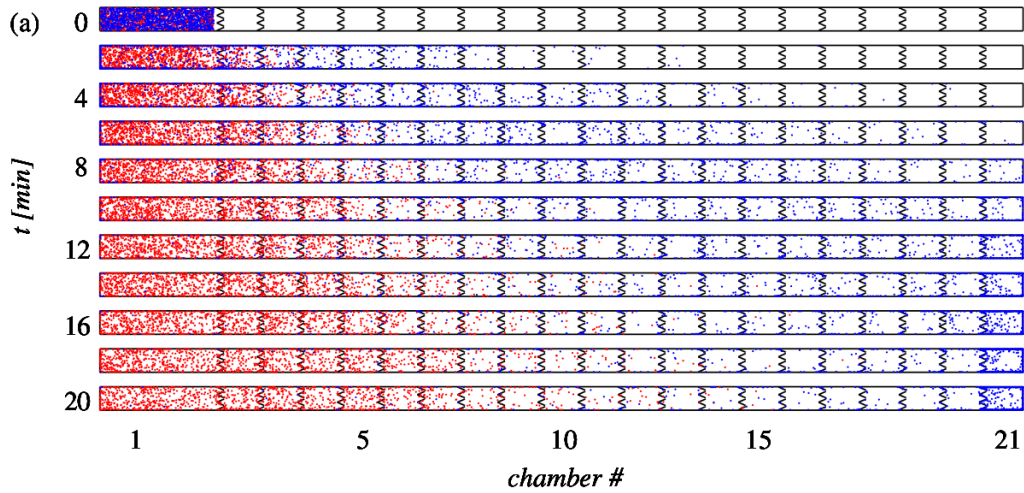


Figura 2.7: (Ver color en pdf) Posiciones de las bacterias a difentes tiempos de una población mixta de *E. Coli*, cepas s_1 (rojo) y s_3 (azul), inoculadas en la primer cámara de la izquierda a $t = 0$.

Realizando una cuantificación de este fenómeno Fig. 2.8, podemos observar como se puede extraer bacterias de la cepa s_3 puras en las últimas cámaras. Observamos como en la cámara de inoculación, en el tiempo final, se tiene la mitad de la población de la cepa s_1 y menos de un 3% de la cepa s_3 . Por otro lado a la última cámara arribó más de la mitad de la población de la cepa s_3 mientras que no ha llegado ninguna bacteria de la cepa s_1 durante tiempos realistas de manipulación experimental. Esto nos permite entender cómo funciona el sustrato microdiseñado para la separación de bacterias con diferente movilidad.

La primer modificación fue realizar la inoculación en la quinta cámara (Ver Fig. 2.9), es decir se modificó la posición inicial de las bacterias. En este caso se modificó la cantidad de bacterias de modo de mantenerse en el límite de baja densidad bacteriana, dado que la todas las cámaras tienen un

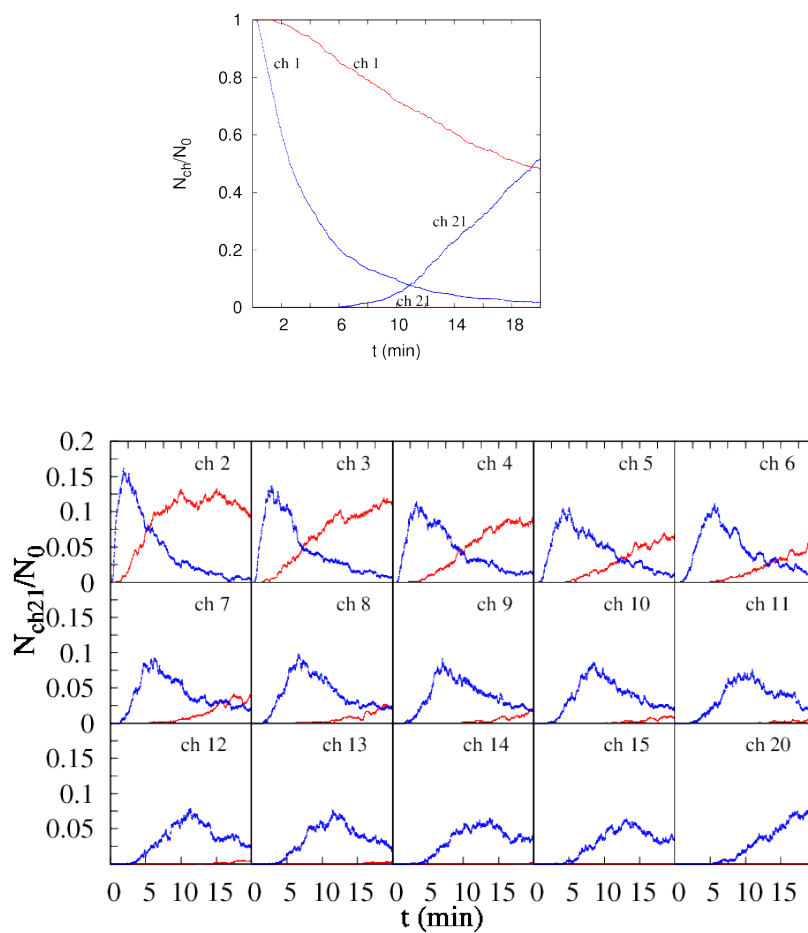


Figura 2.8: Cantidad de bacterias que se encuentran en cada cámara respecto de las inoculadas en función del tiempo para la mayoría de las cámaras. Las cámaras de la 15 a la 20 muestran comportamientos similares.

tamaño menor que la cámara de inoculación. Se muestra el comportamiento de ambas cepas en este dispositivo es decir el desplazamiento de las bacterias en función del tiempo, y se observa el movimiento de las bacterias en los dos sentidos y del ratchet. Ambas cepas avanzan en la dirección de fácil movimiento del ratchet, pero las bacterias “rápidas” lo hacen mayoritariamente en esta dirección. La bacteria s_1 lo hace en los dos sentidos del ratchet, y presenta un direccionamiento en la dirección de “difícil” movimiento. Pero estas bacterias “lentas” tienen una mayor probabilidad de desplazarse en la dirección de “difícil” movimiento. Se puede apreciar, cómo gracias al efecto del ratchet geométrico se produce la separación de las dos cepas, permitiendo así la extracción pura de la cepa s_3 en la última cámara en un largo período. Sin embargo la cantidad de bacterias que se puede extraer respecto de las mostradas en Fig. 2.7 es mucho menor debido principalmente a que se han inoculado una menor cantidad de bacterias .

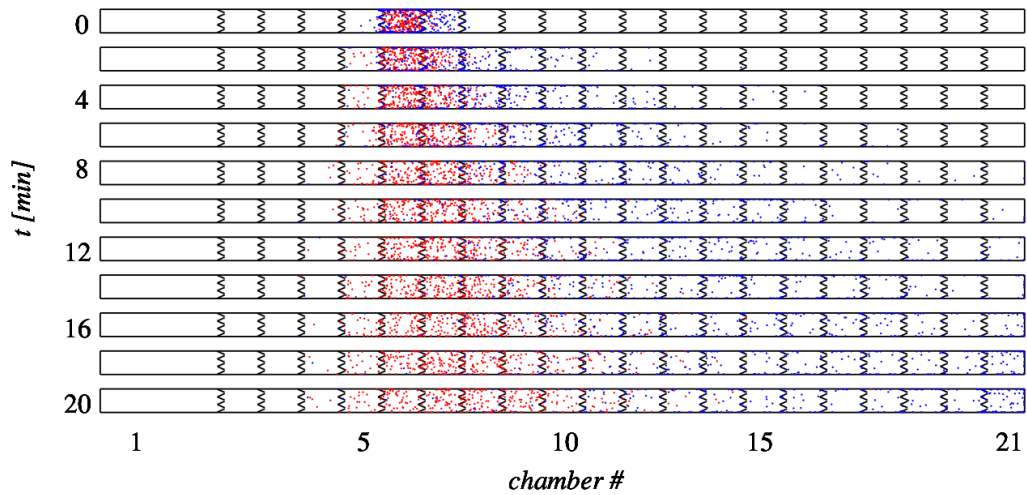


Figura 2.9: (Ver color en pdf) Posiciones de las bacterias a diferentes tiempos de una población mixta de *E. Coli*, cepas s_3 (azul) y s_1 (roja), inoculadas en la quinta cámara del dispositivo con embudos ordenados.

Luego, nos interesa entender cómo modificando alguno de los parámetros, la solución al problema varía. A tal fin, se analiza la cantidad de nadadores que se encuentran en última cámara respecto de la cantidad de nadadores inoculados en función del tiempo. Primero se disminuyó la separación entre filas de embudos a $l_D = 25\mu m$, lo cual reduce notablemente el tamaño de la caja y así el tiempo en el que las bacterias abarquen la totalidad del dispositivo. En este caso se tomó la bacteria s_1 y se le modificaron la difusión rotacional a la cual se encuentra afectada (Fig. 2.10 (a)) y el paso de integración numérico utilizado (Fig. 2.10(b)). Se observa que cuando D_r varía entre órdenes de

10^{-4} y 10^{-2} se obtiene el mismo valor de rectificación. Cuando este aumenta en un orden más de magnitud, las bacterias demoran medio minuto más en llegar al final de la caja. Cuando vemos $D_r = 1 \text{ rad}^2/\text{seg}$ las bacterias demoran el doble de tiempo en llegar al final de la caja respecto de los valores de menor orden. Y para los valores más grandes del mismo las bacterias no llegan nunca al final de la caja en el tiempo de simulación estudiado. Por otro lado, no se observan diferencias sustanciales en la curva analizada para los diferentes pasos temporales de integración estudiados, $\Delta t = 0.005$, 0.001 y 0.0005 manteniendo el tiempo real constante. Razón por la cual utilizaremos el de mayor valor para disminuir los tiempos de CPU de las simulaciones.

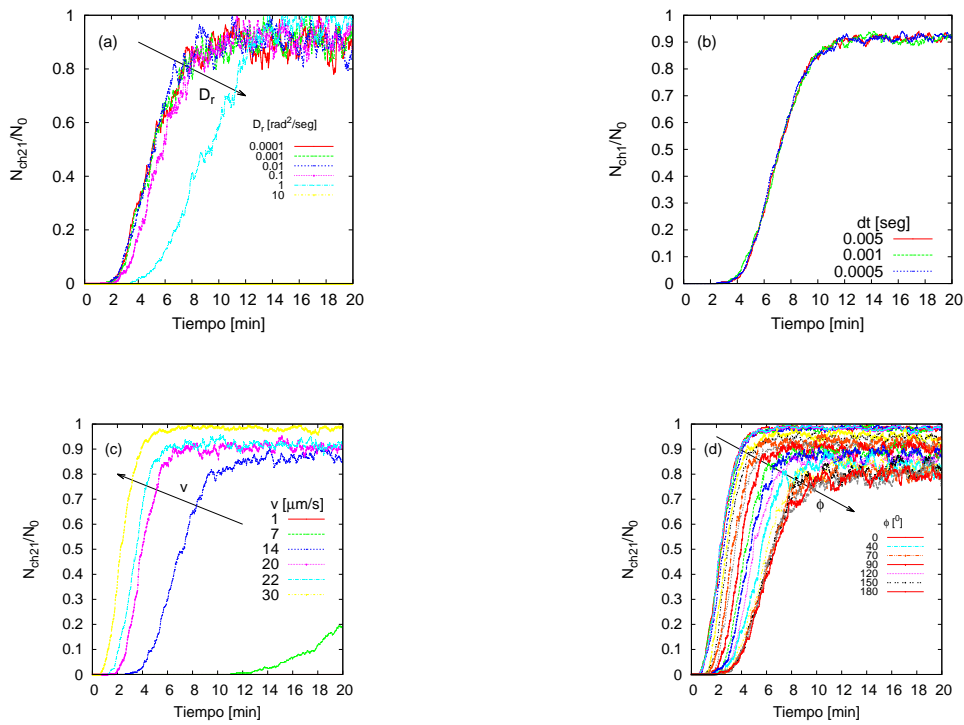


Figura 2.10: Cantidad de nadadores en la última cámara respecto de las inoculadas en función del tiempo para la cepa s_1 (a) modificando el valor de D_r al que están sometidas las bacterias. (b) Modificando el valor de dt con el cual se integra la ecuación de movimiento. (c) Modificando el valor de la velocidad con el cual corre la bacteria. (d) Modificando el valor de ϕ con el cual la bacteria realiza un tumbos.

Ahora modificamos el valor de algunos de los parámetros de la movilidad de las bacterias. Como era de esperar, a medida que se disminuye la velocidad media de la población, el tiempo que demoran las bacterias en llegar al final de la caja también. Con una velocidad de $30 \mu\text{m}/\text{s}$ la mayoría de las bacterias

llegan a la última cámara en $3min$; cuando esta tiene $20\mu m/s$ demora $6min$ en recorrer el un largo de la caja de $525\mu m$. Con una velocidad $14\mu m/s$ demora poco más de $10min$, mientras que con una velocidad de $7\mu m/s$ sólo el 20% de la población ha llegado al final de la caja y con una velocidad de $1\mu m/s$ ninguna alcanza esta última cámara. Por otro lado cuando modificamos el valor del ángulo de persistencia de las bacterias utilizando en todos los casos una desviación estandar $\sigma_\phi = 25^\circ$. Tenemos que para ángulos menores que $\phi = 40^\circ$ el tiempo que demoran en llegar al final de la caja es el similar y este empieza a aumentar a medida que el ángulo lo hace, hasta llegar a $\phi = 150^\circ$ donde nuevamente se observan iguales comportamientos hasta llegar al valor máximo de $\phi = 180^\circ$. También hay que notar que las fluctuaciones en esta medida aumentan a medida que el ángulo lo hace y esto se debe a que las bacterias tienen una mayor probabilidad de “volver hacia atrás”. Cabe destacar que si se deseara separar bacterias con estas movi- lidades, se tendría que pensar en un dispositivo de mayor tamaño, es decir, mayor l_D . Esto es así para poder tener mayor tiempo de manipulación del experimento y así lograr una efectiva separación de las cepas. En el siguiente capítulo veremos como se afecta la acumulación de bacterias en las paredes en función de estos y otros parámetros más del modelo.

Capítulo 3

Dinámica bacteriana microconfinada

Una gran cantidad de los microorganismos nadadores se encuentran en ambientes de confinamiento muy pequeños, del orden de su tamaño. Por ejemplo, las bacterias en medios porosos, en superficies rugosas en las cuales se pueden acumular o en microdispositivos especialmente diseñados con microlitografía. Ya sea para estudios en laboratorio o para múltiples aplicaciones vistas en el mercado. Un ejemplo de estas últimas son los muy recientes e innovadores controladores de calidad de alimentos que detectan una mínima población de bacterias mejorando métodos muy antiguos y tradicionales como la pasteurización [32] o una nueva clase de polímeros que son resistentes a la adhesión de bacterias [33], etc. A pesar de que las bacterias en medios microconfinados son habituales y actualmente es mucho más sencillo la fabricación de microdispositivos gracias a los grandes avances tecnológicos, poco se sabe de la dinámica bacteriana microconfinada. Éste es el tema central de estudio que desarrollaremos en este capítulo.

En una serie de experimentos recientes se ha observado que, micronadadores pushers desde bacterias a espermatozoides [6, 27, 30, 31, 34], hasta la *Chlamidomona* que es un micronadador puller [35], tienen una fuerte tendencia a nadar por las paredes confinantes. Si un micronadador suspendido en un fluido se encuentra cerca de una superficie, la interacción hidrodinámica entre ellos (que resulta atractiva) da lugar a una reorientación, en gran parte de los micronadadores, paralela a la superficie y genera una consecuente “acumulación” o aumento de la densidad de la población cercana a las paredes.

Este hecho ha sido observado en una diversidad de experimentos y con todo tipo de micronadadores, pero aún su origen se encuentra en discusión. La acumulación y nado en paralelo se ha detectado en dispositivos contenedores de cientos de micrones a milímetros de separación entre sus paredes contene-

doras. Nosotros estamos interesados en una mejor caracterización del nado cercano a las paredes en dispositivos más pequeños del orden del tamaño de sus cuerpos y en usar este fenómeno para aplicaciones. Es decir, en el comportamiento bacteriano cercano a paredes y microobstáculos de unas pocas micras.

En literatura reciente se ha demostrado teóricamente que los micronadadores tienen una fuerte atracción a paredes sólidas. Para algunos autores el origen de este efecto es puramente hidrodinámico [31], pero aún es un tema de discusión. Es crucial entender la física de dicho efecto observado para poder usar y controlar el mismo. Veamos brevemente lo que entendemos hasta ahora: el flujo alrededor de muchos de los organismos flagelados, como las bacterias, puede ser aproximado por una fuerza dipolar, Fig. 3.1 (B). El movimiento flagelar proporciona la fuerza de propulsión que es opuesta al arrastre del nadador (cuerpo y flagelos), correspondiéndose con una fuerza dipolar en la cual los flagelos y el cuerpo actúan en el fluido en sentido opuesto a la dirección de la bacteria.

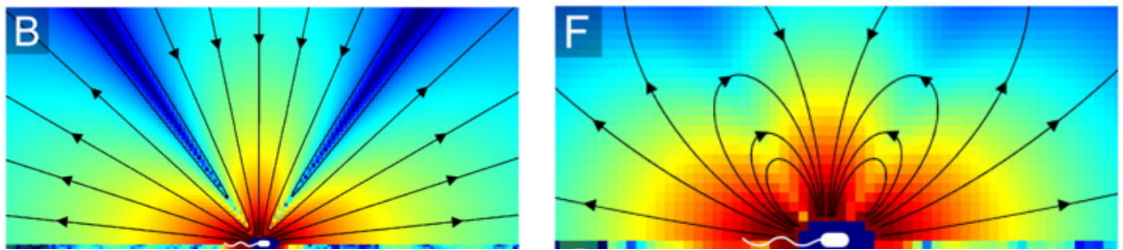


Figura 3.1: Mediciones experimentales del flujo de la fuerza dipolar de una bacteria (B) libre y (F) para una bacteria nadando en paralela a una pared. Figura extraída de [36]

Cerca de una pared, el campo de flujo inducido por el nadador es una superposición de la fuerza dipolar, más cualquier flujo de campo, localizado del otro lado de la pared, Fig. 3.1 (F), éste es necesario para hacer cumplir la condición de contorno correcta. Esto es similar al método de las imágenes de electrostática, sólo que aquí la imagen es un campo vectorial. La imagen del sistema para una fuerza dipolar paralela a una superficie es conocida (fuerza dipolar, fuerza cuadrupolar y fuente del cuadrupolo) [37] y es calculada para conocer, en la posición del dipolo, la componente de la velocidad paralela a la superficie sólida. Es del orden $\sim p/\eta h^2$ donde p es la intensidad del dipolo, η es la viscosidad e h es la distancia a la superficie. Este flujo inducido por la pared es la razón de la atracción. Simplemente, para tener un poco más de intuición: basta pensar un dipolo cerca de una pared libre, en este caso la imagen del sistema es un dipolo igual del otro lado de la superficie, y dos dipolos paralelos se atraen el uno al otro. La interacción hidrodinámica con la superficie provee el mecanismo físico para modificar la orientación de las

bacterias. Consideramos el flujo del campo completo de la bacteria nadando cerca de la superficie. Éste no sólo genera la imagen del sistema para la fuerza dipolar induciendo una velocidad atractiva para las bacterias, sino que contiene (en general) un gradiente de velocidades no nulo, este gradiente es el responsable de la rotación de las bacterias en la superficie de contacto. Cómo nuestro problema numérico es bidimensional, se piensa que lo analizado ocurre en el medio de las superficies superior e inferior del dispositivo por lo que esta rotación no es tenida en cuenta, sólo consideramos la acumulación en los bordes de la caja 2D.

Se mostró que se pueden separar y direccionar bacterias, es decir controlar su dinámica tanto en poblaciones mixtas como simples gracias a su acumulación en paredes y nado a lo largo de las mismas en forma paralela. Se usó el hecho que a las bacterias les “gusta” nadar siguiendo los bordes y superficies confinantes para aplicaciones de alta utilidad. El dispositivo microconfinante es una caja chata del orden de los cientos de micras en x e y , delimitado por paredes laterales, y tiene una altura en z de unas pocas micras, delimitando el espacio con paredes superior e inferior. Esta observación de la adhesión bacteriana a las paredes y su nado en paralelo, es observado y explicado muy recientemente [30, 31]. Es por esto que nos interesa caracterizar en más detalle la acumulación cercana a las paredes laterales del dispositivo microconfinante. Además nos interesa caracterizar el detalle de la acumulación y nado en torno a microobstáculos del orden de su tamaño o de varios cuerpos.

Casi nada ha sido estudiado respecto al atrapamiento y nado paralelo a superficies confinantes en función del tipo de micronadadores y las características específicas de nado (movilidad) de diversas cepas de una misma bacteria. Este estudio al que nos dedicamos puede ser de gran relevancia para poder separar poblaciones mixtas de cepas. Cabe destacar que cuando hablamos de “acumulación” en las paredes, nos referimos a que las mismas nadan en la dirección paralela a la pared confinante y no existe un amontonamiento de bacterias en un pequeño lugar del espacio. En literatura reciente se habla también de un atrapamiento a las superficies si se nada a unos pocos cuerpos de la misma [31]. Una atracción hidrodinámica atrapará a los micronadadores a las superficies dependiendo de su motor y diferentes mecanismo de nado.

3.1. Acumulación en paredes de un microdispositivo

En nuestro modelo fenomenológico, Ec. (2.2) y (2.4), sólo imponemos el nado paralelo a una pared cuando la bacteria llega a tocarla y además se

disminuye la velocidad sólo al valor de la componente paralela a la pared. Hay dos procesos independientes y determinantes que modifican la orientación de un nadador y así permite que abandone la dirección paralela a la pared: por que realiza un tumbo y al reorientarse en la siguiente corrida lo hace con una dirección diferente a la que tenía (paralela a la pared), como se muestra en Fig. 3.2 (a). O bien abandona la pared por los ruidos a los que se encuentra sometida, originados principalmente por su sistema de locomoción y en menor orden por efectos de origen térmico, cuantificados ambos por el coeficiente de difusión rotacional (Fig. 3.2 (b)).

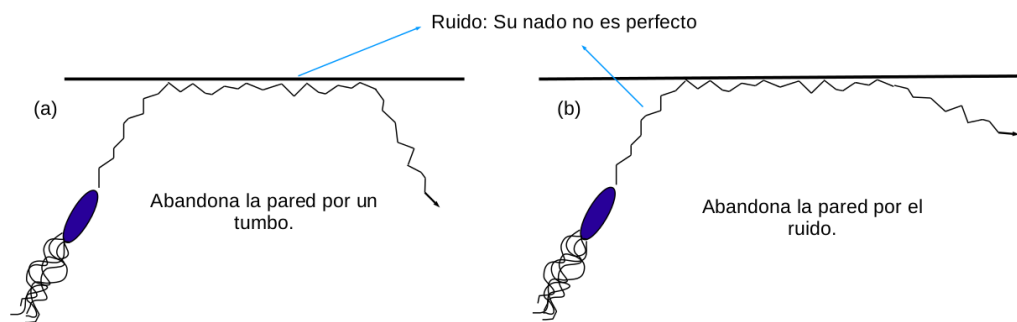


Figura 3.2: Interacción de una bacteria con paredes, (a) ésta abandona la pared pues realiza un tumbo o (b) por ruidos en su nado debido predominantemente a su sistema de locomoción.

Los parámetros específicos que caracterizan la movilidad de cada nadador tienen una fuerte influencia en el tiempo que los nadadores pasan cerca de las paredes, factor crucial para caracterizar y utilizar en aplicaciones para controlar y dirigir el movimiento de los nadadores con confinamientos microgeométricos. Queremos ilustrar el efecto de acumulación cercana a las paredes, para ello primero consideramos los nadadores s_1 y s_3 (cepas salvaje y de tiempo de corrida largo de *E. Coli*, ver Cuadro 1.1) en una caja cuadrada ($200 \times 200 \mu m^2$) sin obstáculos, es decir sin embudos.

Mostraremos de aquí en más los resultados de nuestro análisis, es decir el cálculo de la densidad de bacterias por unidad de área. Esta cantidad se mide y promedia en las cuatro paredes laterales equivalentes de esta caja cuadrada. Primero se estudió el ancho del bineo utilizado Fig. 3.3 (a). Recordemos que la bacteria tiene un diámetro de $1 \mu m$ y su posición se mide en el centro de masa. Notamos que utilizando un bineo de $1 \mu m$ de ancho, probabilidad de densidad es un 15 % menor en las paredes que si utilizamos un bineado del doble de ancho. Utilizaremos el bineado más grande, ya que es más realista y asegura que todas las bacterias que siguen la pared están siendo contadas, puesto que por efecto del ruido al que está sometida puede alejarse levemente

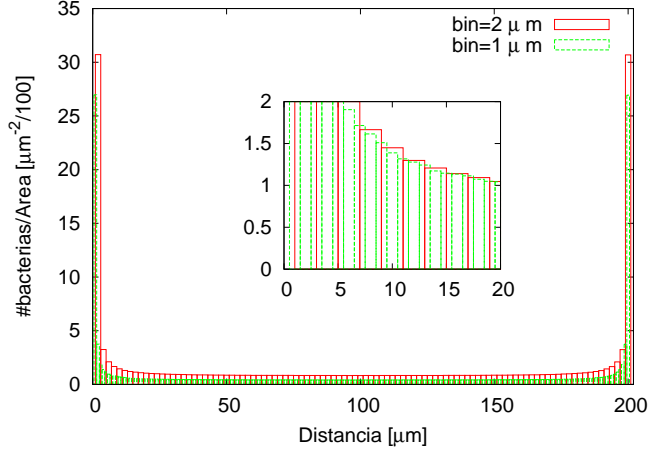


Figura 3.3: Histograma de la densidad de probabilidad de bacterias para la cepa s_3 para dos bineados equidistantes de 1 y $2\mu m$.

de la pared y no ser contada con el bineo corto. Además esta cantidad es más consistente y acorde con las observaciones realizadas [31].

En Fig. 3.4 (a) y (b) se muestran los histogramas para las dos cepas (s_3 y s_1 respectivamente) de *E. Coli* calculados para diferentes promedios. Primero se muestra el histograma para una foto (línea punteada); este presenta muchas fluctuaciones, además la altura de la acumulación en las paredes laterales difieren considerablemente. En cada realización de $20min$ se promedia temporalmente luego de que el sistema llega al estado estacionario, para asegurarnos estar en este estado promediamos del minuto 2 en adelante. Este promedio se realiza así para todos los casos de ahora en más. Al promediar en una realización (línea a rayas) se observa como las fluctuaciones de la medida disminuyen respecto de la anterior, también la acumulación en las paredes es diferente en ambos lados pero no tan apreciable como en el caso anterior. Finalmente, si se realiza un promedio sobre tiempo y además en 10 realizaciones de ruido (línea continua), se observa como el histograma no presenta fluctuaciones y la acumulación en los dos extremos de la pared es igual. Notemos que ambas especies tienen comportamientos similares ante la estadística y sus promedios, pero en el caso de la s_3 la acumulación es un poco más de tres veces mayor que para la s_1 esto se debe principalmente a que se diferencian en el tiempo de corrida que es siete veces mayor y una persistencia de la mitad para la s_3 respecto de la s_1 . De ahora en más los resultados mostrados corresponden a un promedio en el número de realizaciones necesarias para que nuestro resultado sea independiente del número

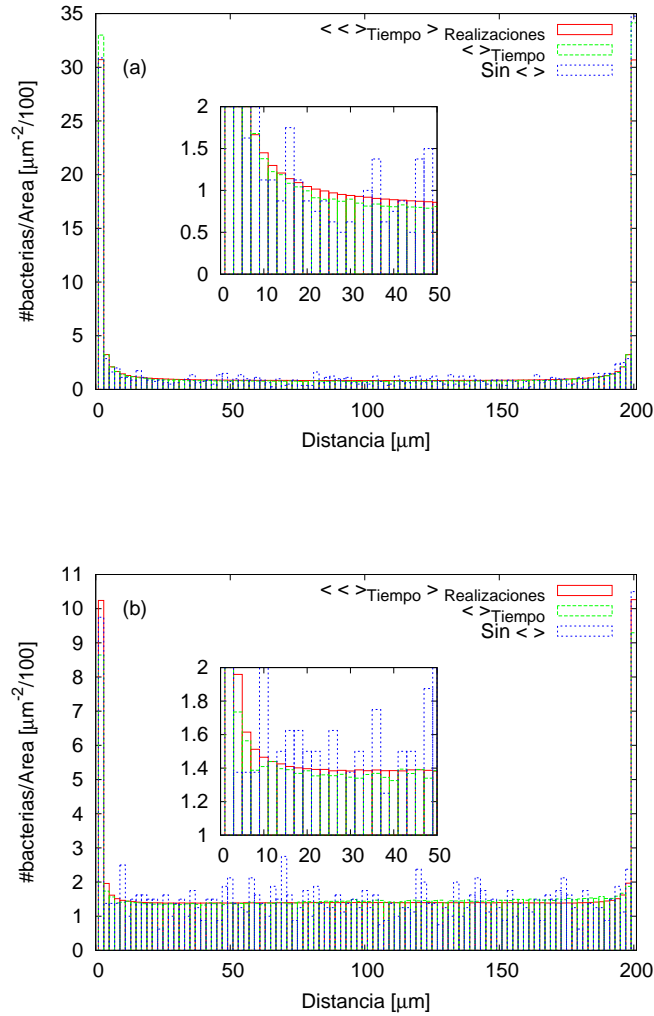


Figura 3.4: (color en pdf) Histograma de la cantidad de bacterias por área en función de la distancia para la especie s_3 (a) y s_1 (b). Se muestra el mismo para un tiempo en particular (foto), el promedio realizado en el tiempo del estado estacionario y el promedio en tiempo y a su vez en realizaciones.

de realizaciones y del tiempo promediado. Típicamente del orden de 30 realizaciones y un tiempo real entre 2 y 20 minutos (estos tiempos son tales que el sistema ha llegado al equilibrio).

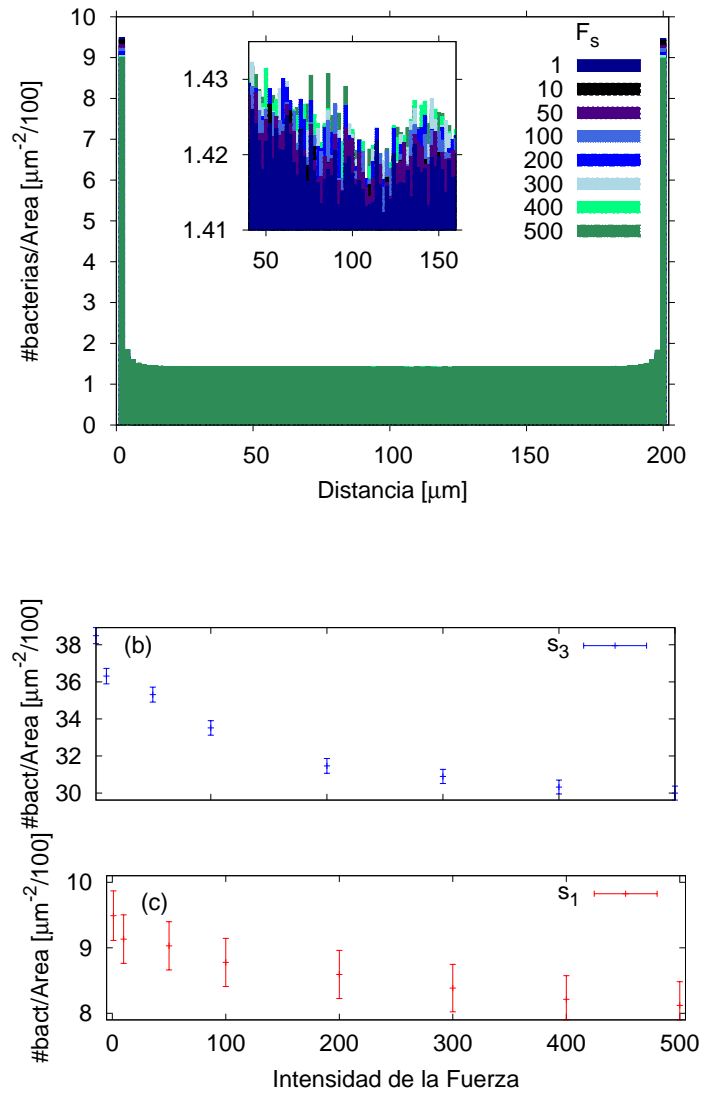


Figura 3.5: (color en pdf) (a) Histograma de la cantidad de bacterias por área en función de la posición para diferentes valores de F_s . Densidad de probabilidad en el borde de la caja para las cepas s_3 (b) y s_1 (c) al variar la fuerza estérica.

Nos interesa entender los efectos de cada parámetro de nuestro modelo en profundidad, para ello modificamos dos de los parámetros del mismo más

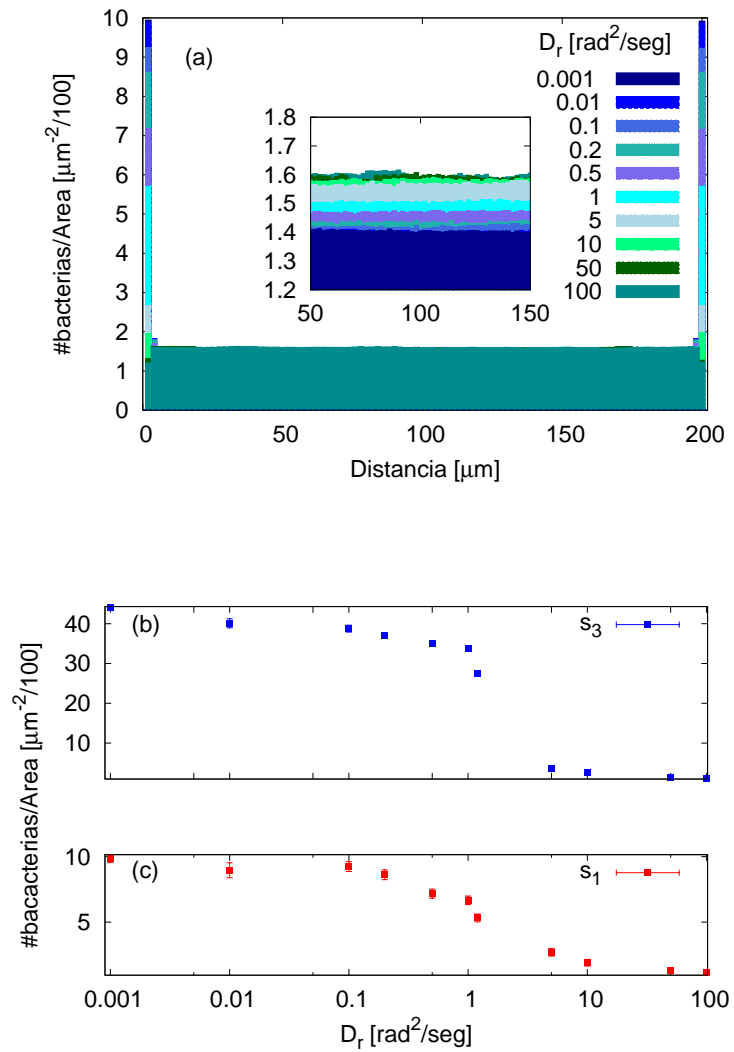


Figura 3.6: (color en pdf) (a) Histograma de la cantidad de bacterias por área en función de la posición para diferentes valores de D_r . Densidad de probabilidad en las paredes de la caja para las cepas s_3 (b) y s_1 (c) con diferentes valores de D_r .

relevantes: la intensidad de la fuerza estérica (exclusión de volumen) y el coeficiente de difusión rotacional (ruido que es difícil de controlar y medir en experimentos). Ambos parámetros que están relacionados a cada bacteria: cómo interactúan con otra y su ruido interno, son muy complicados de tener bien caracterizados experimentalmente para introducir luego dichos valores en nuestras simulaciones, por eso es bueno saber bien su influencia en la dinámica al menos numéricamente.

En la Fig. 3.5 (a) se muestra el histograma de la probabilidad de densidad de bacterias para la cepa s_1 cuando se modifica la intensidad de la fuerza estérica entre 1 y 500 (en unidades de η). Se observa para ambas cepas una disminución en la acumulación a medida que aumenta el valor de F_s Fig. 3.5 (b y c). Cuando se varía la intensidad entre 100 y 500, la variación en la acumulación es tan sólo de un 5%. Mientras que para valores menores que 100, se incrementa la acumulación en un 10% respecto de las fuerzas de mayor valor. En el inset se observa la acumulación en el medio de la caja, el mismo muestra muchas fluctuaciones, pero la variación de las mismas es muy pequeña del orden de 0.01 bacterias por unidad de área. De aquí en más se utilizará $F_s = 300$, pues hay poca variación de las cantidades macroscópicas, cómo la acumulación, para un amplio rango de fuerzas y siempre se usarán F_s de un orden de magnitud mayor que la fuerza de su motor, Ec. (2.2).

En la Fig. 3.6 (a) se muestran los resultados de acumulación para la cepa s_1 cuando se modifica el valor del coeficiente de difusión rotacional entre 0.001 y 100 rad^2/seg . Se puede ver que a medida que el coeficiente de difusión aumenta, las bacterias disminuyen su acumulación en las paredes. Esto nos revela el hecho que las bacterias “salen” de la pared por efecto del coeficiente de difusión rotacional, pues este modifica el ángulo de la velocidad, Ec. (2.3) con el cual las bacterias avanzan. Los valores de este coeficiente para las bacterias estudiadas en este trabajo varían entre 0.06 y 0.18 rad^2/seg para la *E. Coli* y entre 0.0316 y 0.619 rad^2/seg para la *Bradyrhizobium Japonicum*. Hasta este rango de valores de la *E. Coli* no se observan considerables diferencias para la acumulación en las paredes. Sin embargo cuando consideramos el rango del coeficiente que afecta a la *Bradyrhizobium Japonicum* se observa una variación del 16% respecto de valores menores. En el inset de la Fig. 3.6 (a) se muestra la variación de nadadores en el medio de la caja, se observa que a medida que el coeficiente aumenta, también lo hace esta acumulación. Cuando se llega a valores muy grandes, sólo de interés numérico, se puede observar que las bacterias se encuentran más acumuladas en el interior de la caja que en los bordes. Este efecto se debe a que se encuentran afectadas por un ruido demasiado grande, que hace que sus trayectorias sean muy ruidosas y domina el desorden en sus corridas y tumbos característicos.

En todos los histogramas que analizamos hay que notar que a medida que

la acumulación en las paredes disminuye, la misma aumenta en el interior de la caja (Ver el inset correspondiente). Esto se debe a que el número de bacterias es constante.

Luego se modificaron los parámetros que definen la dinámica de cada bacteria: a saber tiempo de corrida, τ , persistencia, ϕ y módulo de la velocidad, v . Nos interesa saber cómo las diferentes dinámicas bacterianas pueden ser utilizadas para la separación y direccionamiento de modo más eficiente. Por este motivo se tomaron los valores de la cepa s_1 (bacteria con la menor velocidad, tiempo de corrida y mayor persistencia de las bacterias de Berg) y se le modificó de a uno estos parámetros únicamente. En la Fig. 3.7 se muestran los histogramas la cantidad de bacterias por unidad de área en función del largo de la caja para estas variaciones. Se estudiaron los siguientes rangos para la velocidad entre 1 y 40 $\mu m/seg$, que abarca la velocidad de muchos de los micronadadores existentes. El rango de τ entre 0.01 y 100 seg , que recorre los valores desde una partícula browniana hasta un espermatozoide de toro o ratón. Para ϕ se estudió el rango entre 0 y 180 $^\circ$, lo cual nos da un recorrido por todos los ángulos posibles, incluyendo bacterias que realizan un tumbo y vuelven hacia atrás que es poco probable en la naturaleza.

Analizando los valores de acumulación en las paredes Fig. 3.8 (a), se observa que a medida que la velocidad aumenta, la acumulación en las paredes crece en forma casi lineal. Como el tiempo de corrida de cada nadador es el mismo ($\tau = 0,86seg$), al aumentar la velocidad aumenta la distancia que recorre en la misma corrida. Esto se ve reflejado en la cantidad de bacterias que se encuentran en dirección paralela a las paredes.

En la Fig. 3.8 (b), observamos la variación de la acumulación en las paredes en función del tiempo de corrida, a medida que este aumenta, la acumulación también lo hace. Cuando el tiempo de corrida se eleva de $\tau = 0,86seg$ hasta 10 seg la acumulación aumenta en un 250 %. Las bacterias con el tiempo de corrida de una partícula browniana pasan mayor tiempo en el medio de la caja que en las paredes, ya que su corrida es despreciable por ende su acumulación en las paredes también (Ver Fig. 3.8 (b) inset).

Por último en la Fig. 3.8 (c) se muestra la modificación de la acumulación en función de la persistencia. Para valores por encima de los 90 $^\circ$ la acumulación es casi constante y es un 17 % menor que la correspondiente a $\phi = 68^\circ$ (característico de la cepa salvaje). Por el contrario para valores menores que este la acumulación crece de forma exponencial llegando a alcanzar una acumulación hasta tres veces mayor para ángulos menores a 10 $^\circ$.

En conclusión, el nadador s_3 de Berg tiene una mayor acumulación en las paredes respecto del nadador s_1 . Esto se debe a que el primero tiene mayor velocidad y tiempo de corrida y menor persistencia que el segundo. Esto está asociado directamente con los comportamientos generales de acu-

mulación en función de estos parámetros. A medida que la velocidad del nadador aumenta, también lo hace la acumulación. De igual modo sucede con el tiempo de corrida, y estos dos son los factores más importantes en la acumulación. Pero, también es importante la influencia de la persistencia, a medida que ésta disminuye la acumulación en las paredes disminuye. Por otro lado, se estudió el comportamiento al modificarse la fuerza estérica y éste es aproximadamente constante cuando es de un orden de magnitud mayor que el término de la velocidad. Y finalmente, al modificar el coeficiente de difusión rotacional la acumulación es aproximadamente similar para el rango en el cual se encuentra el valor asociado a las bacterias.

Entonces entender cómo se comportan los diferentes micronadadores en contacto con una pared cuando se les modifican estos parámetros, nos ayuda a mejorar la eficiencia en la separación y direccionamiento de bacterias gracias a dicha acumulación en el microdispositivo.

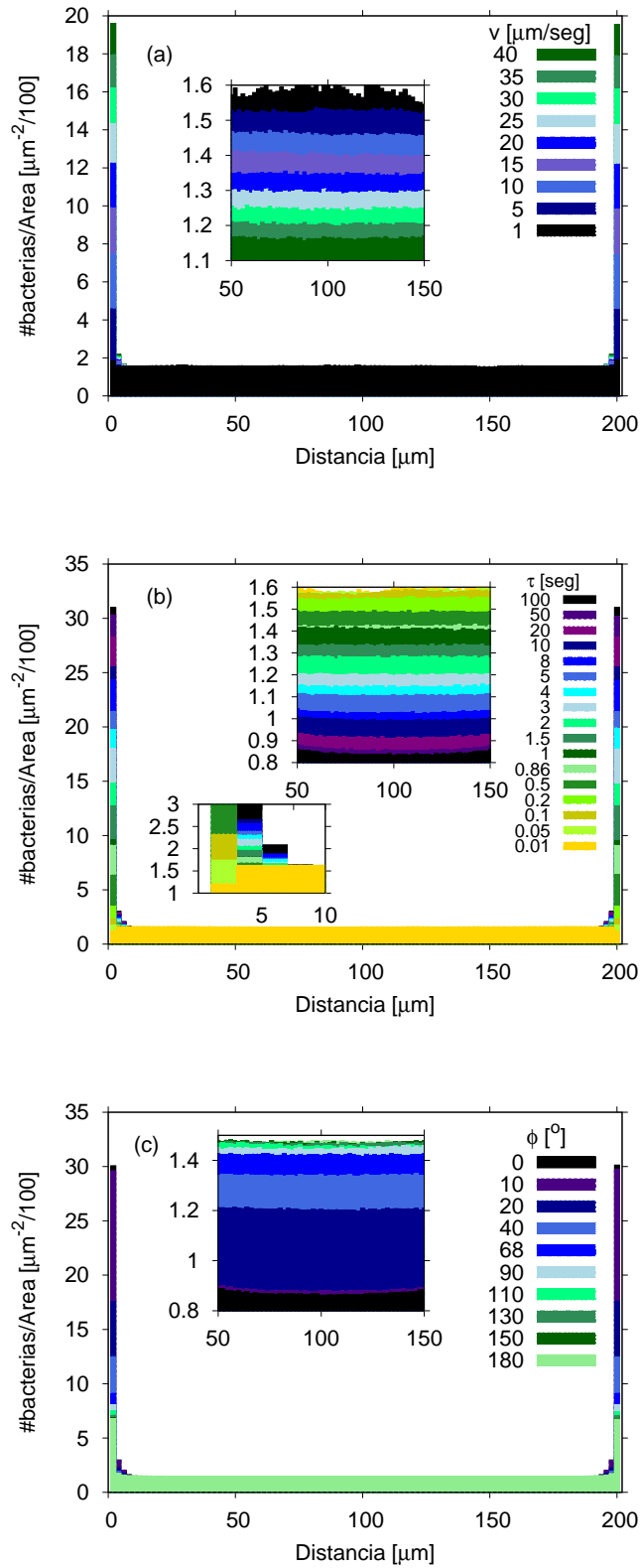


Figura 3.7: (color en pdf) Histograma de la cantidad de bacterias por área para diferentes valores de (a) la velocidad del nadador v , (b) el tiempo de corrida τ y (c) la persistencia ϕ . Insets: muestran un zoom en la zona del medio de la caja.

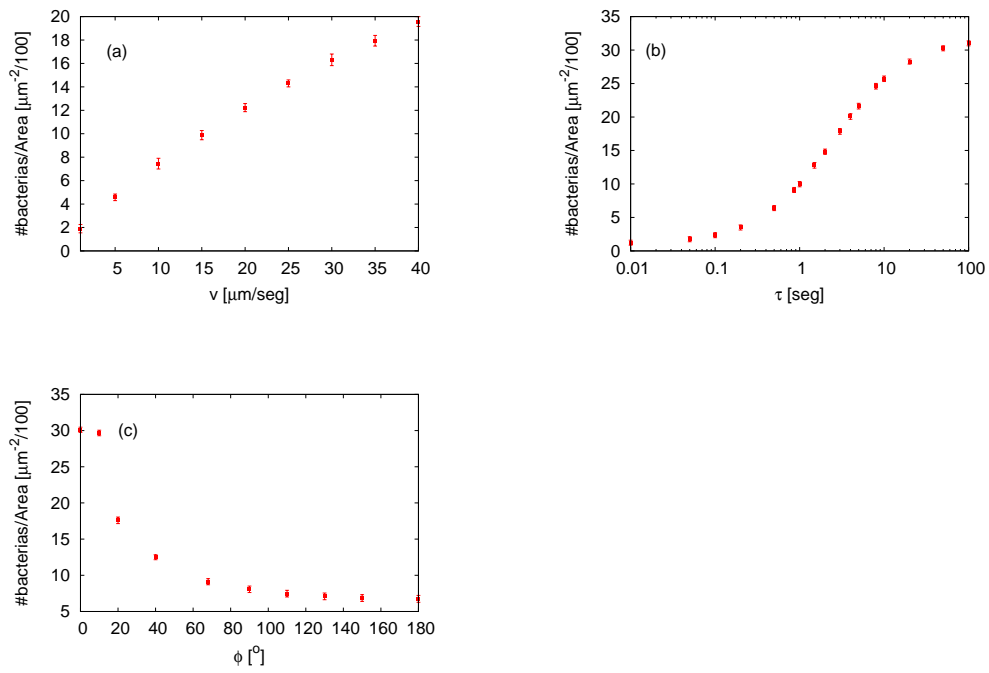


Figura 3.8: Probabilidad de densidad de bacterias en las paredes de la caja para los diferentes valores de (a) la velocidad del nadador v , (b) el tiempo de corrida τ y (c) la persistencia ϕ .

3.2. Acumulación en torno a microobstáculos versus su geometría

Ahora consideramos un dispositivo como el mostrado en Fig. 2.3 con 21 cámaras y 20 filas de embudos. Se inocularon las bacterias en la cámara de inoculación y se contó la cantidad de bacterias que se acumulan en los embudos típicos promediando esta cantidad en un tiempo de 20 minutos. Los embudos que se estudian son uno del medio de la caja y uno lateral de diferentes filas. Se observa que la cantidad de bacterias mantiene la simetría correspondiente al embudo, con un notable pico de acumulación en la esquina del embudo cinco veces mayor para la s_3 (y siete para la s_1) que la constante a lo largo de la pared Fig. 3.9. Los picos máximos que se observan en estas gráficas están asociados con los corners de los embudos. También se nota una diferencia entre la cantidad que hay sobre las paredes y las que pasan entre el gap de dos embudos consecutivos. Esta diferencia es del orden del 30% y se observa claramente cuando se muestra el embudo de modo horizontal, aquí para distancias menores que los $30\mu m$ (no hay pared) la cantidad de nadadores es menor que la que se encuentra para distancias mayores (la pared acumula bacterias). Como las partículas se acumulan en el último chamber, se observa que el pico en la última fila es 25 veces más grande que en los otros dos casos. Pues como la especie s_3 tiene una velocidad mayor que la s_1 , la primera llega más rápido al final de la caja, por lo que en el último chamber tengo mayor cantidad de la primera respecto de la segunda pues estas se encuentran una mayor cantidad de tiempo en esa cámara. Pero por el contrario en los otros embudos la s_1 se acumula más que la s_3 puesto que la primera le cuesta más avanzar en media y estas bacterias pasan mayor cantidad de tiempo en cada cámara y así un mayor tiempo en los embudos correspondientes a esas cámaras.

Se observa que los comportamientos generales son similares entre los embudos centrales y los laterales Fig. 3.10, pero estos últimos tienen una acumulación hasta tres veces mayor para las filas intermedias y más de seis veces para la última fila. En los embudos laterales, se observa que la relación entre los picos de máxima acumulación (correspondientes a la posición del corner) es de diez veces mayor que la acumulación a lo largo del embudo. Esta diferencia respecto del caso anterior, que era de tan sólo tres veces mayor, está asociado con que a medida que el ángulo del embudo es más pequeño a las bacterias les cuesta más salir de allí, puesto que tienen que hacerlo por un tumbo en alguna dirección que le sea favorable. Este comportamiento está en concordancia con lo probado para espermatozoides en [6]. Además se observa una mayor concentración de bacterias en los embudos laterales que en los

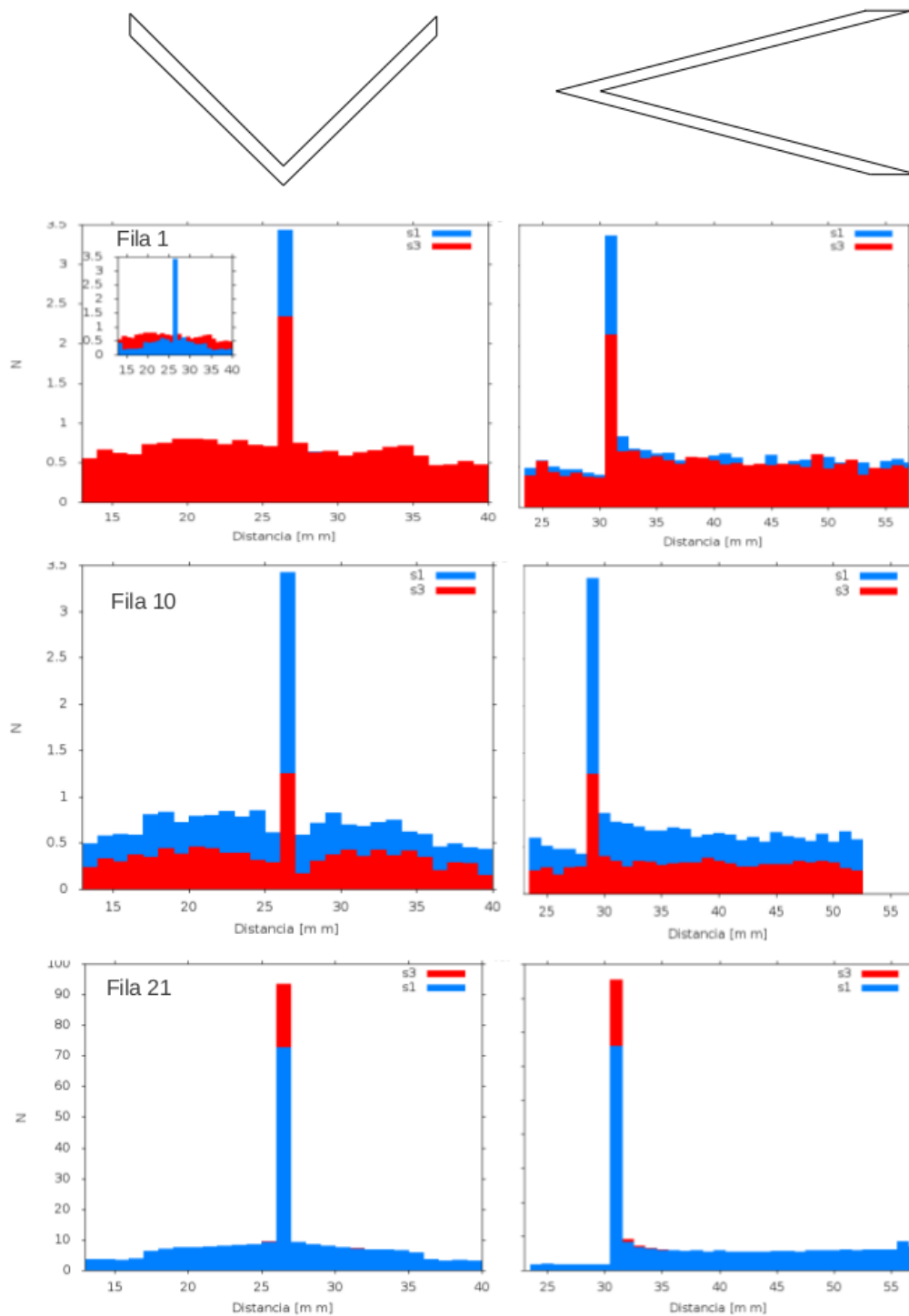


Figura 3.9: (color en pdf) Histograma de la cantidad bacterias en un embudo de la primer, décima y última fila, para las bacterias s_1 y s_3 .

embudos del medio. Esta diferencia en la acumulación se debe a que las bacterias encuentran las paredes de los costados de la caja y toman la dirección de la pared, eventualmente encontrándose con los embudos laterales que le limitan el regreso hacia atrás de la caja. En conclusión, estos embudos de las paredes laterales son de gran importancia para el direccionamiento hacia la dirección favorable del ratchet, lo tendremos en cuenta cuando diseñemos nuevas geometrías en los capítulos siguientes.

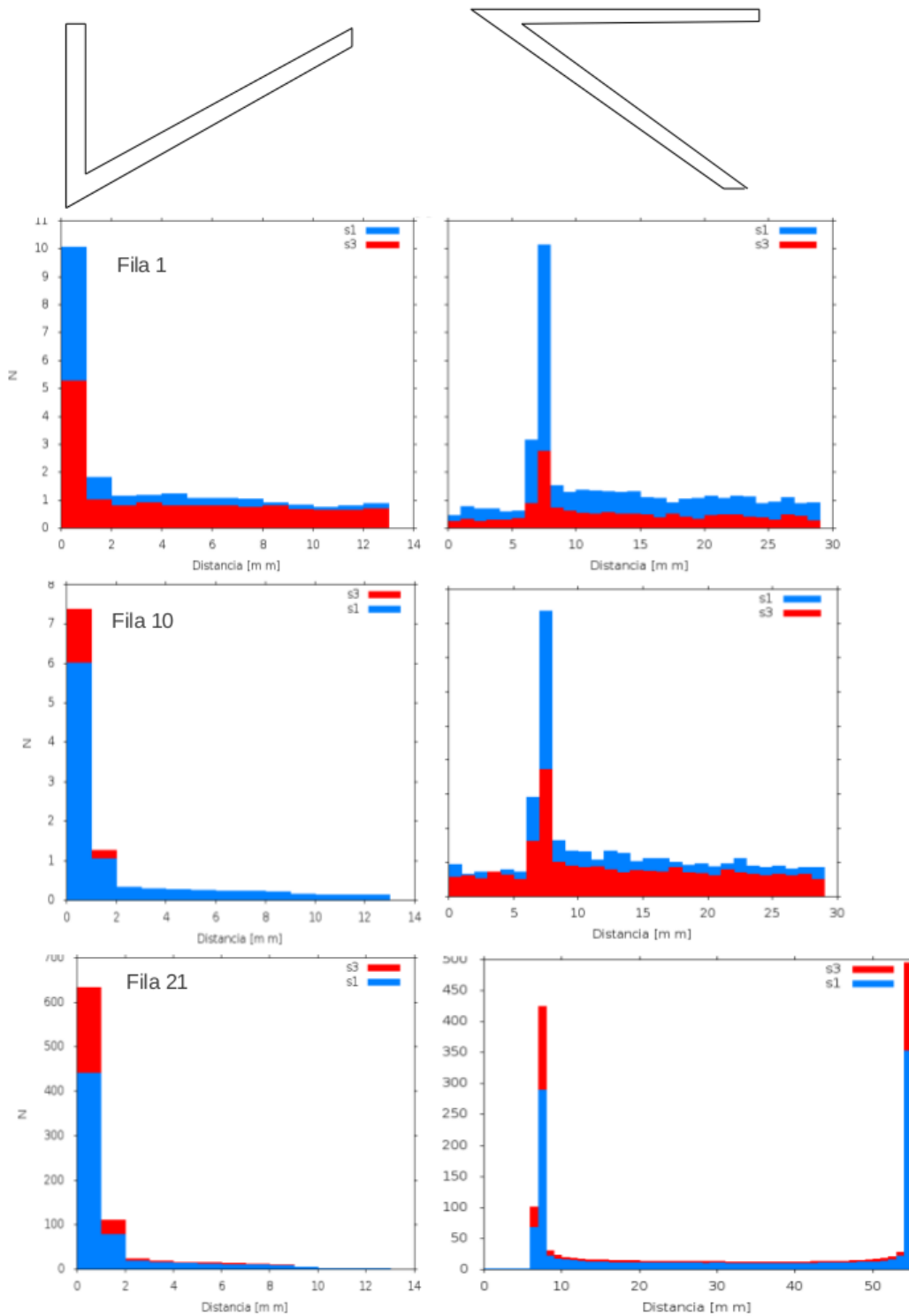


Figura 3.10: (color en pdf) Histograma de la cantidad bacterias en un embudo lateral de la primera, décima y última fila, para las bacterias s_1 y s_3 .

Capítulo 4

Nacimiento y muerte de la *Escherichia Coli*

En el Cap. 1, se desarrollaron los aspectos más globales que intervienen en el proceso de crecimiento de una población. Se trató en detalle el comportamiento general de una colonia de bacterias, el proceso de replicación o nacimiento de las mismas, el crecimiento exponencial de la población, la saturación del sistema cuando se llega a un máximo de bacterias. En este capítulo introduciremos estos aspectos a nuestras simulaciones y se discutirá su influencia en fenómenos de rectificación. Para simularlos, se propuso una distribución Lorentziana para la probabilidad de replicación con valor medio τ_N ; de modo similar se realizó para la muerte de bacterias, con media τ_M [17, 18]. Tal cual se muestra en la Fig 4.1 (b) para el valor de $\tau_M = 10min$ la población se redujo a un tercio de la inicial, de modo semejante ocurre para el nacimiento, pero con una población creciente. En nuestras simulaciones, cuando una bacteria se replica, se coloca una nueva bacteria con igual velocidad que la madre. La posición de la nueva bacteria es a la derecha de la anterior, a menos que se encuentre en una pared en ese lugar en cuyo caso se pone gira en 90° . Esto está pensado así para que todas las bacterias estén siempre adentro del microdispositivo. Así se tienen dos bacterias idénticas una al lado de la otra, con la misma velocidad que tenía la madre y éstas se separan por la repulsión estérica (Ver Ec. (2.5)). Con respecto a la muerte, esta se implementó poniendo la velocidad de la bacteria cero, es decir sólo se mueve por su interacción con el fluido como una partícula pasiva. Los rangos estudiados varían entre 20 y 120 minutos para τ_N (recordemos que para la *Escherichia Coli* el tiempo promedio de duplicación es de 20 minutos) y entre 5 y 180 minutos para τ_M (la tasa no tiene un valor tabulado, pues esta depende de muchos factores). A medida que el valor de τ_N (ó τ_M) crece quiere decir que la población demora más en reproducirse (extinguirse). Además se propuso una saturación del sistema, es decir, un crecimiento de la población

hasta un valor máximo de modo tal de mantener al sistema con baja densidad, donde tiene validez el modelo. Es importante destacar que por agregar estos aspectos, se trabajaba con una población variable, a diferencia de otros modelos.

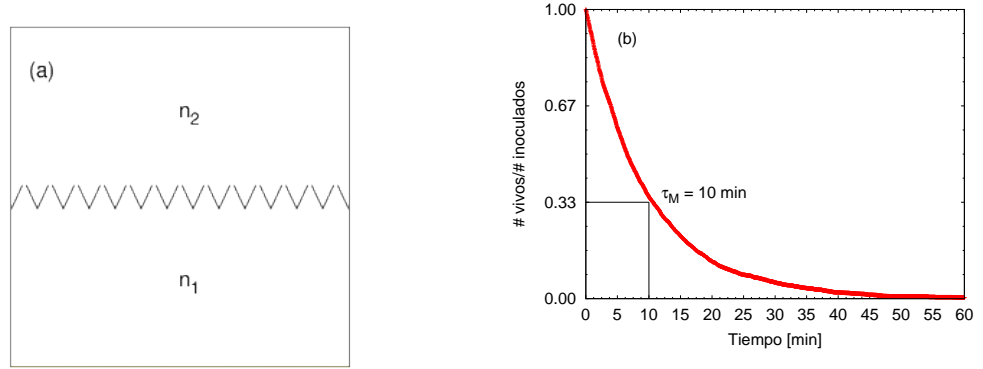


Figura 4.1: (a) Geometría utilizada para estudiar la rectificación, $R = n_2/n_1$. (b) Distribución de Lorentz típica.

Se estudiará la rectificación en función del tiempo para la cepa salvaje s_1 (ver cuadro 1.1) en una caja de dimensiones $400 \times 344 \mu m^2$ como la mostrada en Fig 4.1 (a). La misma consta de una única fila de 13 embudos formados con los valores óptimos estudiados en [1] a saber $l_f = 30 \mu m$, $\theta = 68^\circ$ y $l_g = 2 \mu m$. Se toma esta dimensión grande para poder tener una mayor cantidad de nadadores cuando sature el sistema. Se consideró como condición inicial todas las bacterias ubicadas en la primer cámara, es decir $n_2(t = 0) = 0$. Es por este motivo que en todos los casos la rectificación tiene valor inicial cero, luego la misma crece como una ley de Gompertz [1].

Observando los resultados de rectificación en función del tiempo, Fig. 4.2, se observa que no hay grandes modificaciones en el valor medio de esta cantidad, esto se debe a que a el nacimiento o la muerte de una bacteria es un suceso aislado. El mismo tiene una baja probabilidad en una población de 1000 bacterias y el sistema rápidamente es capaz de volver al estado de equilibrio que tenía. Es interesante notar que a medida que la tasa de muerte disminuye desde $\tau_M = 180 min$ a $\tau_M = 5 min$, la curva de rectificación presenta cada vez más fluctuaciones Fig. 4.2 (a). El valor de rectificación de referencia es de $\langle R \rangle = 3,0 \pm 0,5$ y este llega a $\langle R \rangle = 3,0 \pm 1,5$ para $\tau_M = 10 min$ y $\langle R \rangle = 3,0 \pm 2$ para $\tau_M = 5 min$. Esto se debe a que a medida que las bacterias se van muriendo, se tiene menor número de estas para realizar la estadística del sistema. Sin embargo, los valores de τ_M para los que esto ocurre son valores extremos ($\tau_M < 30 min$), y representa un

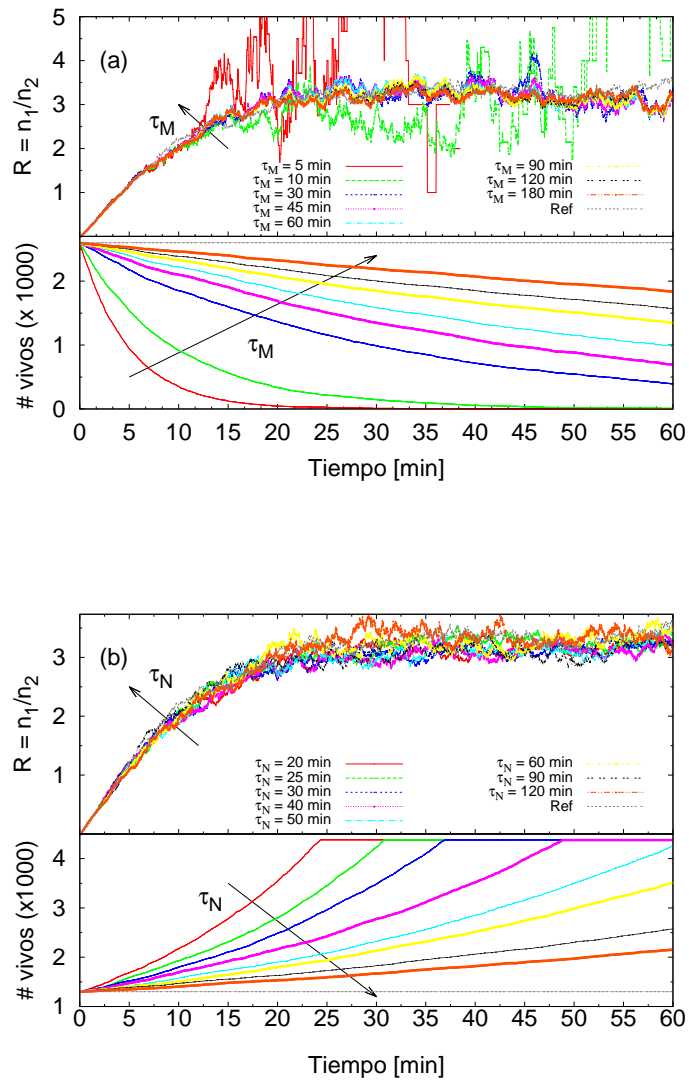


Figura 4.2: (color en pdf) Rectificación y cantidad de nadadores en función del tiempo. Se muestra (a) para diferentes valores de tasa de muerte y (b) para distintos valores de tasa de nacimiento. Ref es el valor de referencia, es decir tasas nulas en cada caso.

medio muy poco favorable para las bacterias el cual lleva a la extinción rápida de la colonia. También se puede observar el decaimiento exponencial que presenta la cantidad de nadadores en función del tiempo y destacar que éste está directamente relacionado con la tasa correspondiente, cómo esperábamos.

En contrapartida, al considerar diferentes tasas de nacimiento de bacterias, se observa que la rectificación en función del tiempo no presenta fluctuaciones ni alteraciones. También hay que destacar el crecimiento exponencial de la población y la saturación del sistema para mantener el factor de ocupación $\varphi = A_{bact}/A_{total} \leq 0.1$ y así permanecer en el límite de baja densidad bacteriana. Sin embargo notemos que el crecimiento es mayor que el doble de la población en el tiempo τ_N y esto se debe a que todas las bacterias, independientemente del tiempo que lleven vivas tiene una probabilidad lorentziana de replicarse. Este suceso no es completamente realista, pero cómo simuladores debemos entender antes el efecto de cada parámetro independientemente, puesto que al mezclarlos no podríamos saber cual es más relevante. Sin embargo, este hecho, no modifica sustancialmente los resultados obtenidos. Nos interesa en particular la rectificación, una cantidad macroscópica y, ésta sólo depende de la cantidad global de nadadores a uno y otro lado de la fila de embudos. Supongamos que de un lado de la caja se duplica una bacteria, esto produce una pequeña variación en la rectificación y en un breve tiempo el sistema se reacomoda; también puede ocurrir del otro lado y se mantiene la rectificación invariante. En conclusión esta variación no afecta el resultado global de rectificación, Fig. 4.4, que es lo que nos interesa.

Luego para recrear un sistema más realista, se mezclaron ambas probabilidades, nacimiento y muerte. El comportamiento general es el mencionado anteriormente, sólo que en este caso no se llega a la extinción de la especie pues la tasa de nacimiento siempre es más grande que la de muerte. Ahora cabe destacar que debido a la tasa de muerte $\tau_M = 60min$, el sistema demora en llegar al estado de máxima cantidad de nadadores 7 minutos más que sin la misma (Fig. 4.3 (a)). Igualmente la diferencia de tiempos entre considerar a una población con y sin tasa de muerte es de 8 minutos a $\tau_N = 20min$ (Fig. 4.3 (b)). En conclusión, la presencia de las tasas de nacimiento y muerte no son reelevantes en simulaciones numéricas cuando se calcula la rectificación, puesto que el valor medio de la misma no se modifica apreciablemente. Sumando a esto que manejar datos numéricos de una población variable es complejo y conlleva un incremento en el tiempo de CPU. Además los tiempos para los cuales estos efectos pueden ser relevantes son mucho más grande que los tiempos de las simulaciones que nosotros realizamos, de entre 20 y 40 minutos. De ahora en más no se considerarán estos efectos debido a su poca influencia en los resultados; pero era importante

investigarlo en detalle.

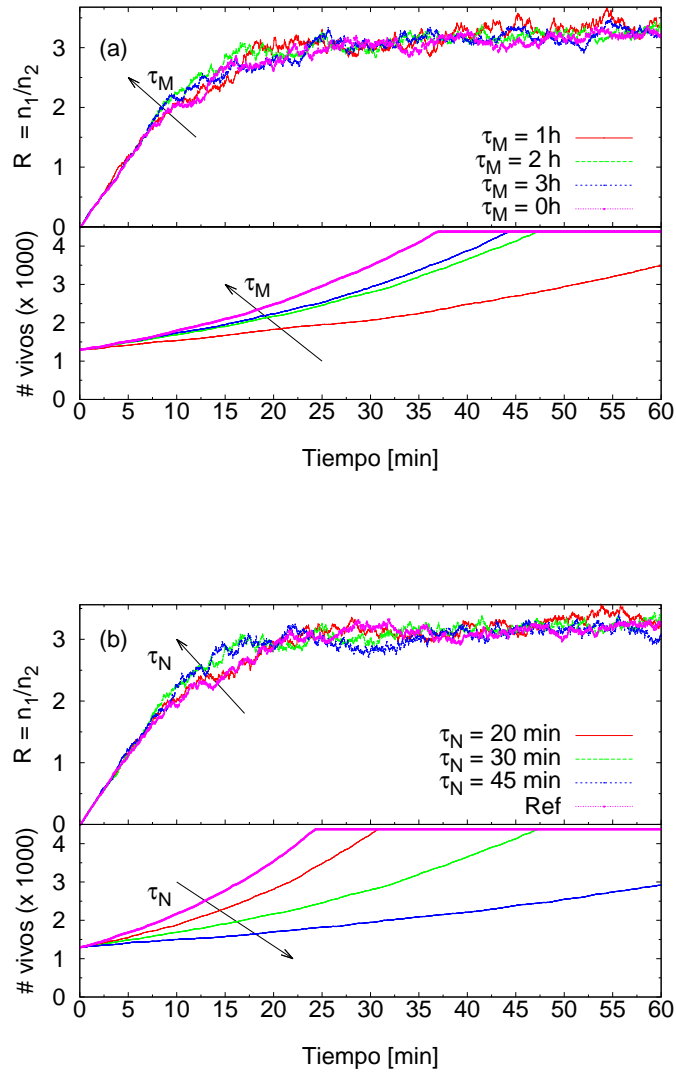


Figura 4.3: (color en pdf) Rectificación y cantidad de nadadores en función del tiempo. Se muestra para (a) una tasa de nacimiento de 20 minutos y diferentes valores de probabilidad de muerte y (b) una tasa de muerte de 1 hora y diferentes valores de probabilidad de nacimiento.

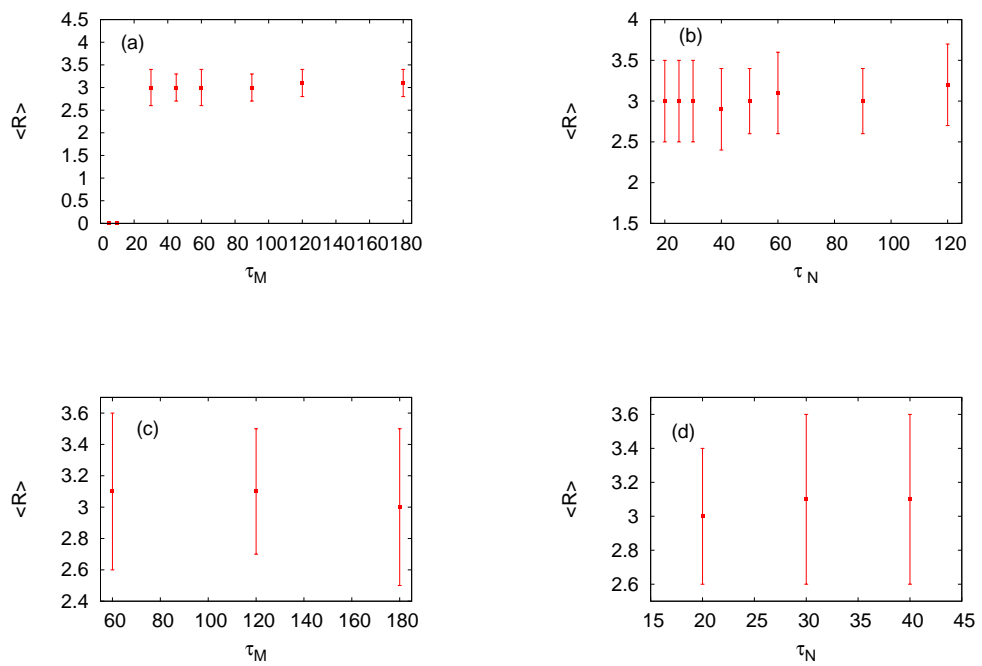


Figura 4.4: Valor de la rectificación media (a) en función de la tasa de muerte y (b) en función de la tasa de nacimiento. Valor de la rectificación media de una combinación de ambas tasas (c) con tasa de nacimiento constante $\tau_N = 20min$ y (d) tasa de muerte constante $\tau_M = 60min$.

Capítulo 5

Dinámica de la *E. Coli* en micro-geometrías ordenadas y desordenadas

El efecto de rectificación o direccionamiento controlado de micronadadores por métodos puramente físicos (ratchet) sin aplicación de campos externos, puede ser particularmente útil cuando se tienen mezclas de diferentes micronadadores con diferentes estrategias de nado. En este sentido en los últimos años se han realizado grandes avances en diversas áreas cómo en la separación de nadadores por su longitud [5], la separación de espermatozoides móviles y no-móviles [39] o cómo micromotores catalíticos pueden ser atrapados en microchips [40]. Uno de los objetivos de estos trabajos es eliminar el estrés al cual se someten los nadadores al ser separados por centrifugado. En este sentido la separación geométrica puede ser una solución, por ello nos preguntamos cómo usar el efecto de rectificación para separar eficientemente bacterias con diferentes movilidades. Se proponen diferentes dispositivos en el cual se inocularon inicialmente una mezcla de bacterias en uno de los extremos del microdispositivo. Esta mezcla fue compuesta como una cantidad igual de bacterias *E. Coli* del tipo s_1 y del s_3 , cuadro 1.1. El objetivo es utilizar la geometría de paredes y obstáculos asimétricos para poder separar y controlar del modo más eficiente posible dichas cepas.

Se tomó como referencia lo que sucede en una caja en blanco, es decir, sólo con las paredes laterales sin ningún obstáculo en su interior. Ésta se muestra en la Fig. 5.1 representada por un signo \times y la denominamos “geometría blanca”, ésta y todas las cajas tienen dimensiones $132 \times 1180 \mu m^2$. La primera propuesta fue utilizar una geometría similar a la mostrada en Fig. 2.3, la misma consta de $M = 20$ filas de 5 embudos esta se muestra en la Fig. 5.1 representada por un signo $+$ y la llamaremos “geometría de embudos ordenados”. La siguiente geometría propuesta, es una similar a la anterior,

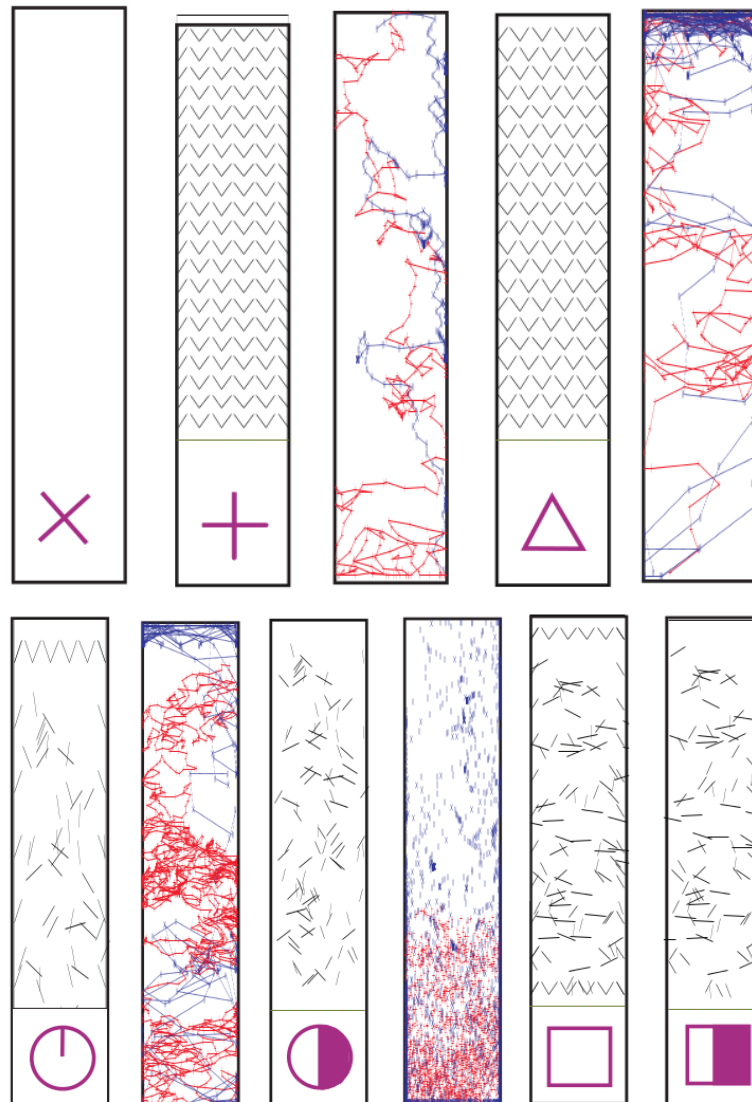


Figura 5.1: (Color en pdf) Geometrías utilizadas y algunas trayectorias de 20 minutos de las bacterias s_1 (tiempo de corrida corto y color rojo) y s_3 (tiempo de corrida largo y color azul), las mismas se muestran a la derecha de la geometría correspondiente.

pero las filas impares de embudos están corridas en una distancia $l_f \sin(\theta)$. Es decir desplazada en una distancia de la mitad de lo que mide un embudo en la dirección de x , de modo tal que coincide el pico de una fila con el gap entre embudos de la fila siguiente. Esta geometría se muestra en la Fig. 5.1 representada con un triángulo y la llamaremos “geometría de embudos desplazados”.

Luego pensamos en geometrías desordenadas, las mismas se realizaron con bastones de largo $l_f = 30\mu m$ y ancho $w_f = 2\mu m$, ubicados con un ángulo θ variable respecto de la horizontal. Éste se mide de forma igual que el ángulo de los embudos Fig. 2.4. La primer geometría desordenada es la Fig. 5.1 representada con un círculo blanco, la misma consta de bastones cuyo ángulo posee una distribución gaussina con un ángulo medio $\bar{\theta} = 68^\circ$ y ancho $\sigma_\theta = 20^\circ$ y la posición en la caja se toma aleatoria. Esta geometría además cuenta con paredes laterales, que cómo hemos visto anteriormente, son altamente acumuladoras y direccionan en el sentido de fácil movimiento (de abajo hacia arriba) y además cuenta con una fila de embudos al final de la caja para contener las bacterias y evitar su retorno. A esta geometría la denominamos “geometría desordenada con bastones a 68° y paredes contenedoras”. La siguiente geometría es la mostrada con un círculo a medio pintar, denominada “geometría desordenada con bastones a 68° y sin paredes contenedoras” y difiere de la anterior en no poseer no las paredes contenedoras ni la fila de embudos al final de la caja. Las últimas geometrías propuestas en esta parte, son similares a las últimas dos mencionados con la diferencia que los obstáculos pueden tomar cualquier ángulo uniformemente distribuidos. Estas dos últimas se muestran en la Fig. 5.1 representadas con un cuadrado blanco y uno medio pintado, las denominamos “geometría desordenada con bastones aleatorios con y sin paredes contenedoras” respectivamente. Estas geometrías han sido desarrolladas en un orden creciente de desorden.

Lo primero que nos interesa es reconocer cómo se mueven las diferentes cepas en estos dispositivos, es decir, la trayectoria típica que realiza una bacteria en cada dispositivo. Las gráficas de trayectorias que se muestran en la Fig. 5.1 son para las cepas s_1 (rojo) y s_3 (azul) se muestran para una sólo bacteria particular y los puntos representan la posición de la misma cada 1 segundo. Se aprecia que para la geometría ordenada, las bacterias utilizan las paredes de los embudos para avanzar y una vez que se topan con uno avanzan en la dirección de fácil movimiento del ratchet, esto les permite encontrarse con otro embudo y así seguir avanzando en esa dirección. Lo que la lleva a tener una trayectoria casi rectilínea en la dirección de fácil movimiento. Cuando se desplazan las filas de embudos, notamos cómo difiere de la anterior en que realiza una trayectoria más intrincada y se desplaza de lado a lado en el ancho de la caja porque el ángulo de los embudos direcciona de lado a lado. Este efecto se debe a que la misma, una vez que se despega de un embudo y avanza hacia la siguiente cámara, le cuesta encontrar la dirección de fácil movimiento y se queda “atrapada” en esa región del espacio.

Luego pasamos a las trayectorias en los dispositivos desordenados, aquí las trayectorias son mucho más desordenadas y presentan un menor direccionamiento que respecto de los anteriores. En los casos anteriores, los embudos sirven

para contener a las bacterias; en contrapartida con la utilización de bastones la bacteria tiene más probabilidad de volver hacia atrás. Además cómo se encuentra en una geometría intrincada, las mismas se quedan atrapadas en los diferentes defectos (entendiendo por defecto al cruce de dos bastones). Cuando comparamos las dos geometrías desordenadas, con y sin paredes contenedoras, se aprecian grandes diferencias en cuanto al avance de las bacterias, puesto que ya hemos destacado la función importante que cumplen las paredes laterales en el avance de las bacterias. Las trayectorias para las geometrías desordenadas con bastones aleatorios, son similares a las de los bastones colocados a 68° , sólo que estas últimas tienen un mayor direccionamiento. En conclusión, a medida que el desorden de los sustratos aumenta y el ratchet geométrico ordenado va desapareciendo, las trayectorias de las bacterias resultan mucho más complicadas y con un menor direccionamiento de abajo hacia arriba de la caja, Fig. 5.1.

Una vez observado cómo se mueven en un modo general las bacterias en las diferentes geometrías propuestas, nos interesa “cuantificar” este comportamiento. Con tal fin, se contaron la cantidad de nadadores que hay en la última cámara en función del tiempo para ambas cepas, luego de haber inoculado $N_s = 1300$ de cada cepa mezcladas uniformemente en la base de la caja. Los resultados se muestran en la Fig. 5.2, en ésta cada geometría está asociada con igual símbolo en la Fig. 5.1.

Lo primero que notamos como generalidad es que a medida que el desorden se incrementa, la cantidad de nadadores en la última cámara disminuye y el tiempo que demoran las mismas en hacerlo aumenta. Observamos como a tiempos cortos el número de nadadores, N_s , en la última cámara comienza de cero a crecer suavemente hasta saturar a un determinado tiempo dependiendo de la geometría. Observamos también que las geometrías que logran una mayor acumulación en la última cámara son los ratchets de arreglos de embudos ordenados alineados y desplazados y son también las que lo realizan en menor tiempo, cómo esperábamos. Pero la geometría de los embudos desplazados demora tres minutos más en llegar a este estado respecto de la geometría ordenada. Por otro lado, existe una ventana temporal, en la cual se puede extraer puramente una cepa de la última cámara. Éste tiempo que es la separación entre la curva de una cepa y la otra en la Fig. 5.2 (b) aumenta a medida que el desorden de los dispositivos lo hace. Ahora cuantificaremos esta ventana temporal para extraer una sola cepa y evaluaremos cuántas bacterias puedo extraer, es decir, calculamos el tiempo de separación y la eficiencia de la separación para estas cepas y todos los dispositivos, definidos en el Cap. 2 sección 2.4.

En la Fig. 5.3 se muestran la ϵ % en (a) y t^* en (b) y se observa que a medida que el desorden aumenta la eficiencia de separación decrece. Disminuye en

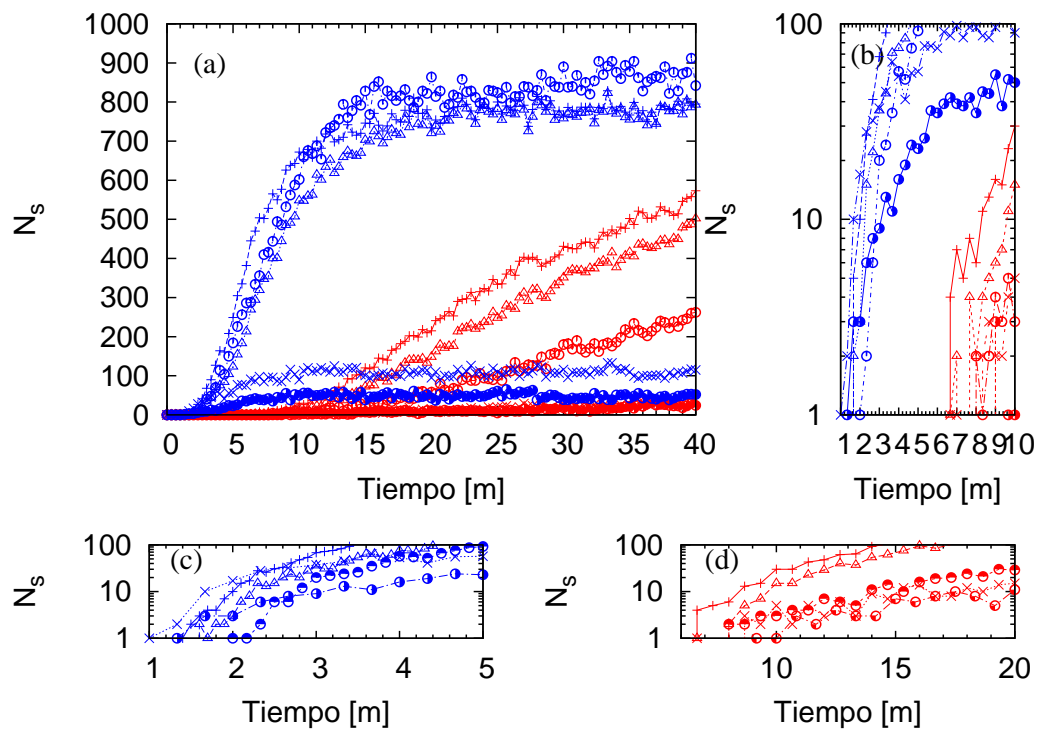


Figura 5.2: (Color en pdf) Cantidad de bacterias de *E. Coli* en la última cámara en función del tiempo para las diferentes geometrías (los símbolos de los gráficos se corresponden con las geometrías mostradas en Fig 5.1) y los colores con los nadadores s_1 (rojo) y s_3 (azul).

un 53 % para la geometría más desordenada que contiene paredes contenedoras respecto de la geometría de embudos ordenados. Además las geometrías que no poseen las paredes contenedoras tienen una eficiencia menor del 73 y 83 % respecto de la idéntica geometría que tiene estas paredes. Esto es un hecho que nos muestra que estos semi-embudos en los laterales son muy influyentes en la dinámica de nado de las bacterias, y que el movimiento sobre paredes laterales es determinante en todos los experimentos y simulaciones de rectificación y separación antes publicados [1, 2, 24].

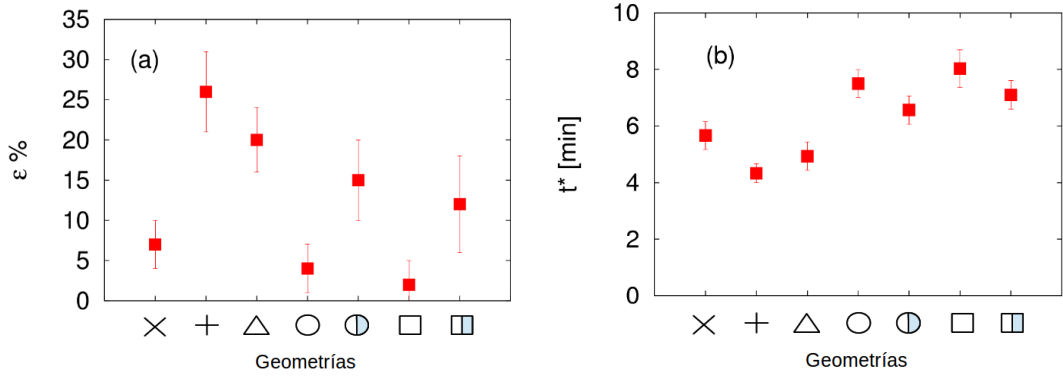


Figura 5.3: Eficiencia de la separación (a) y tiempo de extracción (b) medidos para los mutantes s_1 y s_3 de *E. Coli* en función de las geometrías (de orden a desorden).

Respecto del tiempo de extracción pura de una especie, t^* , se observa que a medida que el desorden aumenta el tiempo de extracción también, por lo que cuánto mayor sea el desorden mayor será el tiempo de manipulación del experimento. El tiempo es hasta un 55 % mayor para las geometrías desordenadas respecto de la geometría de embudos ordenados. Además las geometrías que no poseen las paredes contenedoras tienen un tiempo de extracción mayor, pero no difiere el mismo de modo considerable respecto de las idénticas geometrías sin paredes.

En conclusión, a medida que el desorden de los sustratos aumenta, disminuye la eficiencia en la separación, pero se posee “un mayor tiempo de extracción”. Lo cual puede ser interesante en experimentos reales, donde el preparado del sistema lleva un tiempo importante de manipulación experimental hasta poder realizar las mediciones.

En resumen, estudiar la movilidad de bacterias de las diferentes cepas *E. Coli* restringidas a geometrías desordenadas nos sirve para inferir porque desarrollan diferentes estrategias de nado, puede que lo hagan para difundir más, para sobrevivir o para llegar más lejos en búsqueda de alimento en medios porosos.

Capítulo 6

Bradyrhizobium Japonicum bajo micro-confinamiento desordenado

Ahora estudiamos la *Bradyrhizobium Japonicum* salvaje, bacteria de suelo y menos estudiada que la *E. Coli*. La *Bradyrhizobium Japonicum* es una clase de bacterias semejantes a la *E. Coli* por su dinámica de corridas y tumbos pero fijadoras del N_2 (Nitrógeno atmosférico) en simbiosis con la planta de soja, y que poseen un sistema particular de flagelos dual: flagelos subpolares y flagelos laterales [22]. Estos flagelos tienen funcionalidades distintas, las cuales aun están en estudio y discusión y han motivado nuestras simulaciones.

Estudiaremos dos de sus mutantes a los cuales se les quitaron los flagelos subpolares $\Delta fli0234$ (cepa 5843) o los flagelos laterales $\Delta lafA12$ (cepa 6865), se realiza este estudio para caracterizar individualmente la funcionalidad de cada flagelo versus la cepa salvaje que tiene ambos flagelos. Se espera que el flagelo subpolar controle el avance en el nado y el flagelo lateral sea el encargado de estabilizar el mismo. Tenemos caracterizada sus movibilidades: velocidad media de nado, tiempo de corrida y ángulo medio de tumbos en un medio líquido acuoso sobre un portaobjetos gracias al Dr. Ignacio Quelas y a los demás integrantes del grupo de investigación del Dr. Anibal Lodeiro, del Laboratorio de Interacciones entre Rizobios y Soja (LIRyS) IBBM- Fac. De Ciencias Exactas, UNLP-CONICET en La Plata. Dado que experimentalmente es difícil ver el comportamiento de las bacterias y cómo se desplazan en la tierra, es decir caracterizar la movilidad y difusión bacteriana en los poros de este medio, etc. se propone entender este comportamiento en un dispositivo artificial que simule dicho medio poroso. Con tal fin se utilizarán estas bacterias en nuestras simulaciones con las geometrías explicadas en el capítulo anterior.

Primero calculamos la trayectoria, tanto de la cepa salvaje como la de sus

mutantes en los diferentes sustratos, para entender su movilidad a medida que aumentamos el desorden del mismo. Estas trayectorias se muestran en la Fig. 6.1 para 20 minutos de tiempo real simulado. El comportamiento general que tienen estas bacterias es similar al contado anteriormente para la *E. Coli*, un movimiento dirigido en la dirección de fácil movimiento cuando se utiliza la geometría de embudos ordenados o ratchet y se vuelve más desordenada y lenta cuando se desordena el sustrato.

Las cepas estudiadas tienen sus movilidades caracterizadas en el cuadro 1.2. La diferencia más notable entre las cepas es que la 5843, sin flagelos subpolares, tiene un menor recorrido en el dispositivo, esto se debe primordialmente a que posee una velocidad ($\bar{v}_{5843} = 11,51\mu m/seg$) que es casi tres veces menor que las otras cepas ($\bar{v}_{3004} = 29,85\mu m/seg$ y $\bar{v}_{6865} = 25,72\mu m/seg$), además de ser la cepa con menor tiempo de corrida, $\tau = 0,21seg$, y menor persistencia, $\bar{\phi} = 91,1^\circ$. Todos estos factores hacen que la misma sea la más difícil de direccionar por todo lo explicado en capítulos anteriores. La comparación entre las otras dos cepas no devela sustanciales diferencias a simple vista. Pero observando en detalle, la cepa 6865, sin flagelos laterales, muestra determinadas regiones en las cuales está un mayor tiempo que la 3004, esto se debe a que la primera posee una persistencia menor. Las trayectorias de las cepas restantes son similares a las mostradas, por haber sido estas elegidas como bacterias de mayor desplazamiento.

En este caso se calcularon, como para la *E. Coli*, la eficiencia en la separación de una población mixta y el tiempo de extracción de 100 % pureza, ver sección 2.2.4 y Ec. (2.7). Sabemos que gracias a los ratchets geométricos se puede separar cualquier par de cepas que sólo difieran en uno de los parámetros de su movilidad, incluso si difieren en muy poco porcentaje [2]. Además la velocidad es el factor determinante en cualquier movimiento bacteriano, y en particular para la separación, por esto se propuso colocar a todas las bacterias la misma velocidad de la bacteria madre, 3004. El propósito central fue entender la función del resto de parámetros fijando alguno, pues si todos los parámetros varían es difícil de entender el problema. Los resultados de la eficiencia en la separación y del tiempo de separación en función de las geometrías, en esta oportunidad no utilizamos las geometrías sin paredes contenedoras, pues queremos un dispositivo completamente desordenado y su influencia en la difusión.

Mezclamos en la cámara de inoculación las cepas 3004 y 5843, o sea la salvaje versus su mutación sin flagelos subpolares, y la salvaje con la que no tiene flagelos laterales (6865). En suma usamos la cepa 3008, que es una selección de nadadores más móviles de la cepa 3004, y se la mezcla con sus mutantes 5844 y 6866 (sin flagelos subpolar y lateral respectivamente). La eficiencia en la separación disminuye a medida que el desorden aumenta,

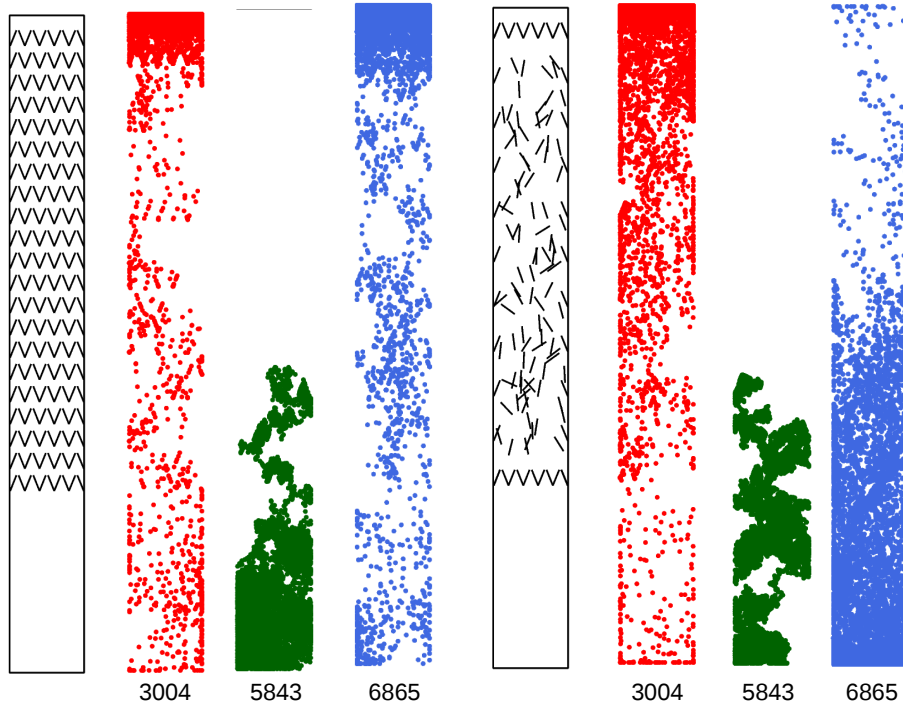


Figura 6.1: Trayectoria de una bacteria de las diferentes cepas de *Bradyrhizobium Japonicum*; se muestran de izquierda a derecha la cepa 3004, 5843 y 6865 para dos geometrías de embudos ordenados (izquierda) y de bastones en posiciones aleatorias con un ángulo medio $\bar{\theta} = 68^\circ$ (derecha).

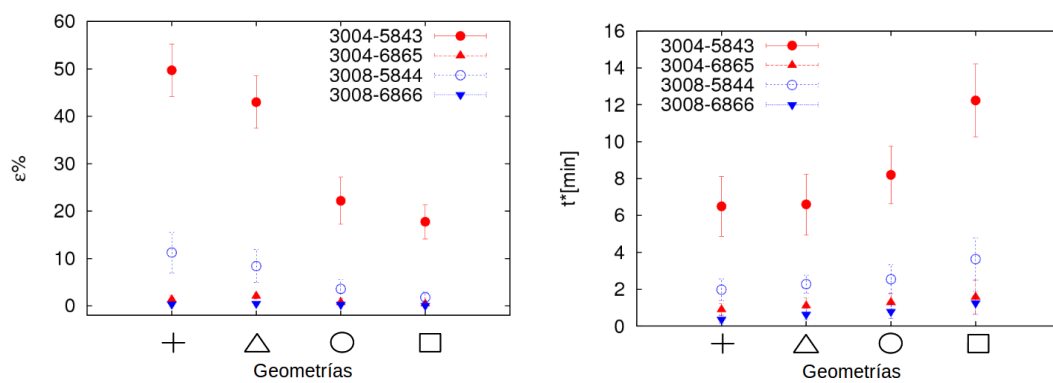


Figura 6.2: Eficiencia y tiempo de separación medida para las diferentes geometrías, comparando cada nadador con sus respectivos mutantes con velocidad media correspondiente a la de la madre.

el descenso es de hasta un 60 % para las cepas 3004 y 5843 que tienen la mayor amplitud en la eficiencia de la separación Fig. 6.2. Esta presenta una duplicación en el tiempo de extracción de la geometría más desordenada respecto de la geometría de embudos ordenados.

También se observa que las cepas que tienen mayor amplitud en la eficiencia y tiempo de extracción son las cepas salvajes con sus mutantes sin flagelos subpolares Fig. 6.2. Esta diferencia se debe a que los mutantes tienen un tiempo de corrida cerca de tres veces menor que el de sus respectivas madres y una persistencia mucho mayor $\Delta\bar{\phi} = 40,2^\circ$ y $25,1^\circ$, estas son las diferencias de persistencia entre la cepa salvaje y el mutante. En cambio cuando se comparan los mutantes sin flagelos laterales con sus madres, los mismos no presentan grandes diferencias entre la cepa salvaje y los mutantes en los tiempos de corrida $\Delta\tau = 0,04$ y $0,10\text{seg}$ y persistencia $\Delta\bar{\phi} = 19,8^\circ$ y $28,6^\circ$, por lo que la separación resulta mucho más difícil y por ende menos efectiva.

Hasta aquí hemos utilizado geometrías una más desordenada que la otra, pero las mismas no han sido cuantificadas, esto es útil si caracterizamos la tortuosidad del medio como se hace en experimentos de biología donde se mide la difusión en un medio sin tortuosidad, o sea en una caja limpia nuestra, y lo comparan con la difusión en medios porosos [38]. El factor de diferencia lo llaman tortuosidad. A nosotros nos interesa cuantificar más exhaustivamente el efecto del desorden por eso desarrollamos el análisis de la siguiente sección.

6.1. Desorden controlado

Se realizaron geometrías con un “desorden controlado”, es decir, para las paredes interiores de la caja se utilizaron posiciones iniciales fijas y las posiciones finales de las mismas formando un ángulo $\bar{\theta}$ respecto de la horizontal, definido de igual modo que el ángulo de los embudos (Ver Fig. 2.4). Se realizó un análisis en función de este ángulo medio variable desde 0° a 90° con una desviación estandar de 10° en cada caso.

Se colocaron inicialmente en la cámara de inoculación, las especies 3004 y 3008 mezcladas cada una con sus respectivos mutantes. A cada par de especies se les colocó la misma velocidad correspondiente a la velocidad promedio de las mismas y con un error tal que contiene a las velocidades experimentales y es no menor que el error de las velocidades individuales. Como poseen la misma velocidad, la diferencia en movilidad está dominada por el tiempo de corrida y la persistencia.

En la figura 6.3 se muestran imágenes a determinados tiempos de las especies 3004 y 5843 en los diferentes dispositivos con bastones a diferentes ángulos. Se utilizaron estas cepas puesto que de todas las combinaciones

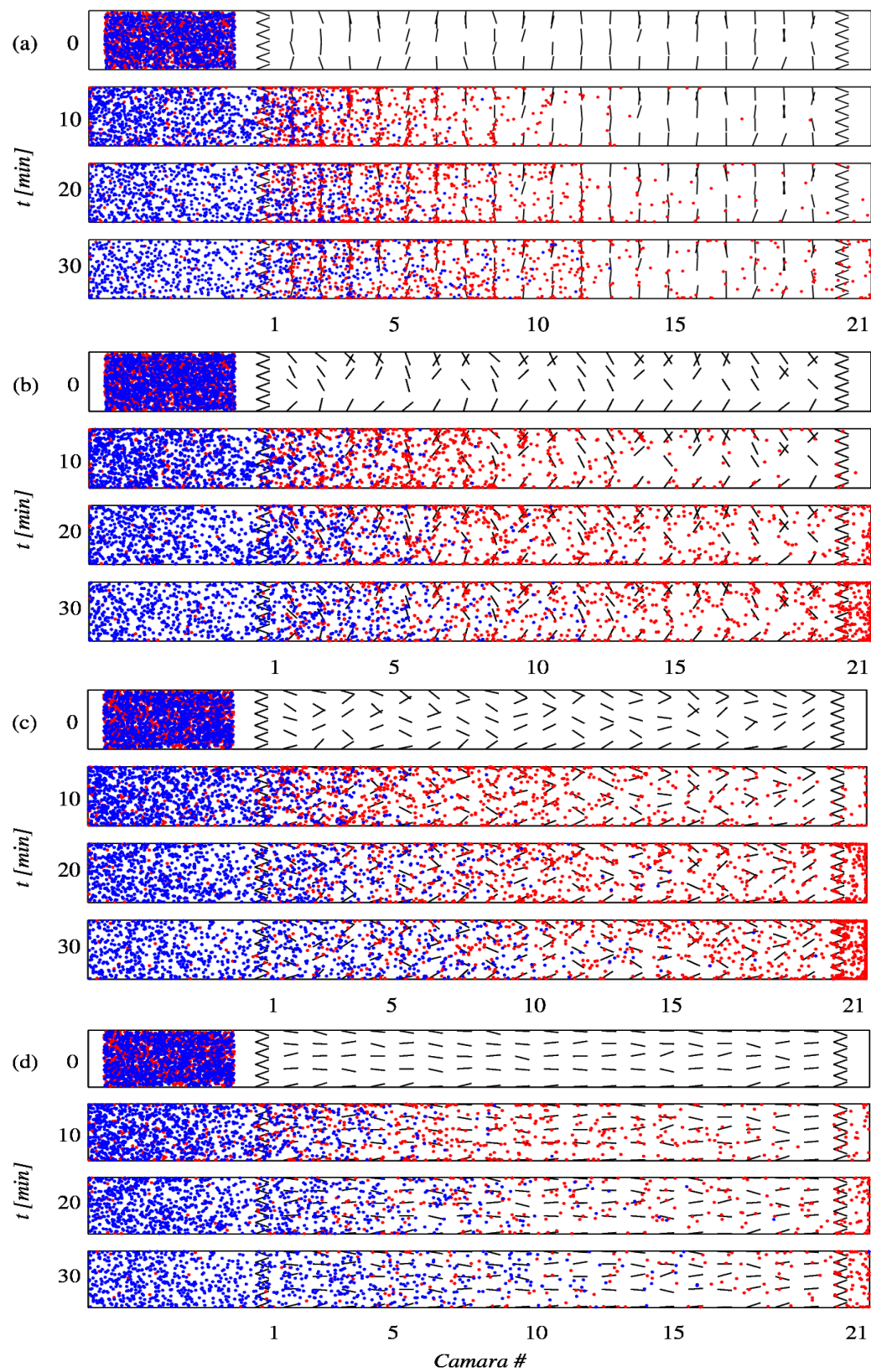


Figura 6.3: (Ver color en pdf) Posiciones a escala de las bacterias 3004 (rojo) y 5843 (azul) para diferentes tiempos colocadas en cajas con bastones de ángulo medio (a) 0° , (b) 30° , (c) 60° y (d) 90° .

realizadas estas dos son las que mayor diferencia en sus parámetros de movilidad. Dado que de las bacterias analizadas la 5843 es la que posee el menor de los tiempos de corrida $\tau = 0,21\text{seg}$, es la más similar a una partícula browniana, ver Fig. 6.1. Este comportamiento es observado puesto que esta bacteria posee un movimiento aleatorio y cuando se encuentra en contacto con una pared rápidamente la abandona, lo que no permite la utilización de las mismas para avanzar a lo largo de la caja. Generándose una amplia diferencia con respecto a la 3004 que al poseer un $\tau = 0,57\text{seg}$, utiliza las paredes para avanzar y se aleja de la otra especie, esto se pone de manifiesto en la eficiencia, ver Fig. 6.5.

En la figura 6.4 se observan los histogramas correspondiente a las especies 3004 (rojas) y 5843 (azul) para diferentes tiempos en los distintos arreglos geométricos. La condición inicial en todos los casos es similar: uniformemente distribuida en la cámara de inoculación. En todos los histogramas se observan picos, éstos se corresponden con las posiciones de las filas de paredes. Los picos más intensos se observan para la geometría con ángulo medio 0° y esto se debe a que las bacterias encuentran un obstáculo perpendicular a la dirección de avance. El mismo posee pequeños gaps por los cuales se puede pasar a la siguiente cámara, las bacterias demoran un tiempo en encontrar ese lugar por el cual avanzar y por eso se acumulan en esas regiones. A medida que el ángulo de las paredes aumenta los picos se ven disminuidos en intensidad pero se nota una mayor distribución a lo largo de la caja, es decir existe un flujo de bacterias mayor. Esta mayor uniformidad a lo largo de la caja nos señala que para geometrías de mayor θ las bacterias no se ven atrapadas por las paredes y permiten un mayor direccionamiento a medida que este aumenta. Nótese que a medida que el ángulo aumenta las bacterias avanzan una mayor distancia a lo largo de la caja o es lo mismo que decir que incrementa su difusión.

El tiempo de extracción de 100 % de pureza Fig. 6.5 (a) es constante para todas las geometrías y todas las cepas que separamos, esto nos indica que el tiempo que separa los frentes de onda de las bacterias es el mismo independiente de la geometría utilizada, pero no sucede lo mismo con la eficiencia con la que se realiza este proceso, Fig. 6.5 (b). La misma presenta un pico cuando $\theta = 70^\circ$ que es muy claro en la separación de las cepas 3004 y 5843, puesto que estas son las que presentan mayor diferencia en sus respectivos tiempos de corridas que son el factor de mayor importancia en la separación dado que ambas especies poseen la misma velocidad. Este pico también se observa a simple vista con las cepas 3008 y 5844 que es de las combinaciones posibles la que continua en diferencias de τ . Cabe destacar también, que cuando se separan las cepas 3004 y 6865, se tiene una eficiencia de cerca del 3 %. Esta separación se debe principalmente a su diferencia en la persistencia, puesto

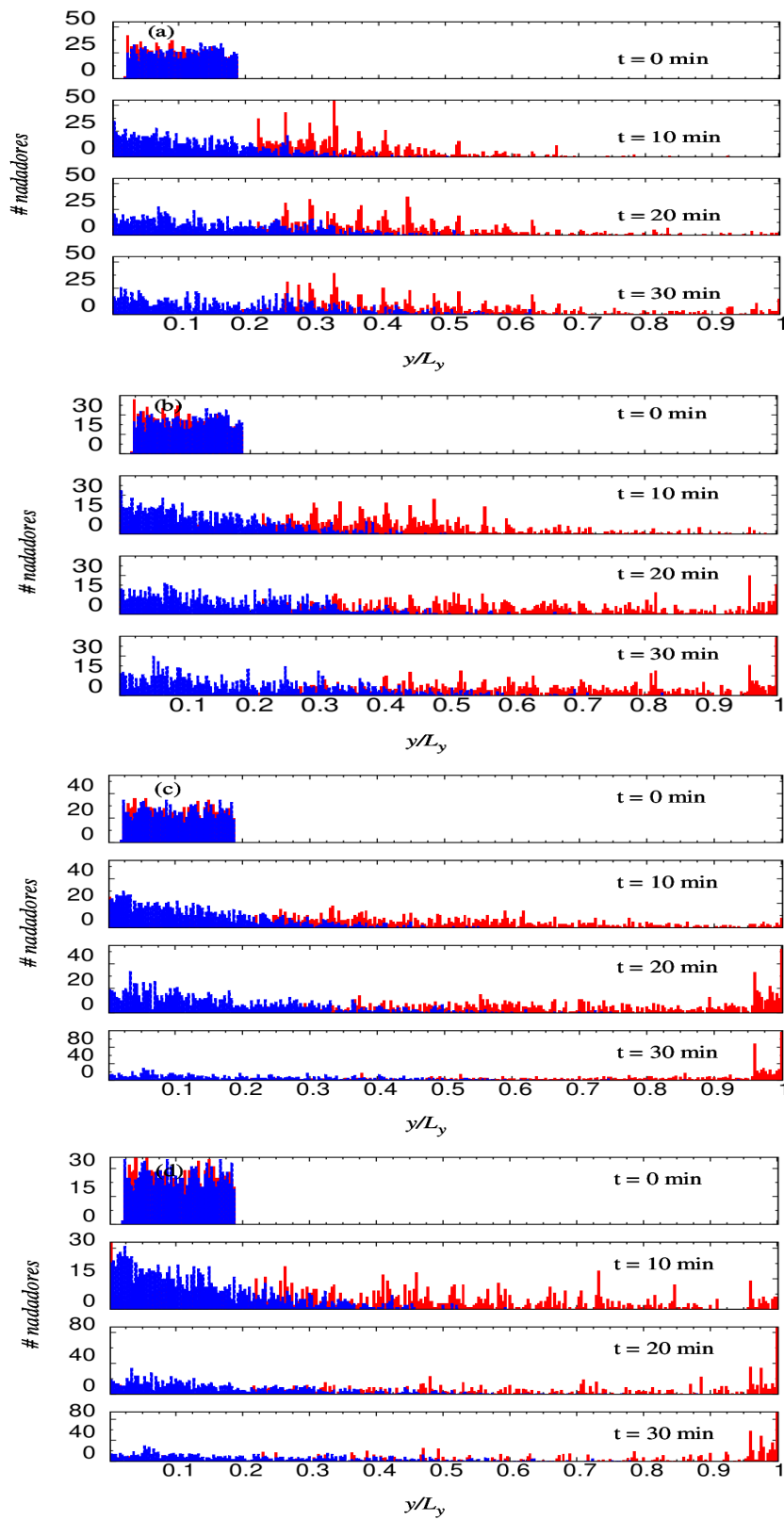


Figura 6.4: Histogramas de la posición de las bacterias 3004 (rojo) y 5843 (azul) para diferentes tiempos colocadas en cajas con paredes de ángulo medio (a) 0° , (b) 30° , (c) 60° y (d) 90° .

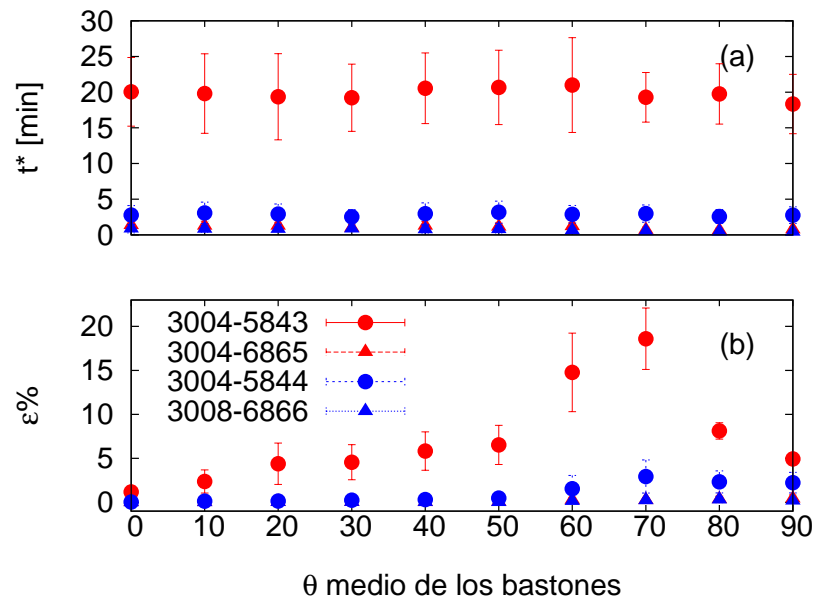


Figura 6.5: (a) Tiempo de extracción y (b) eficiencia en función del ángulo medio de los bastones inoculando los nadadores 3004 y 3008 con sus correspondientes mutantes. La velocidad de cada par de nadadores es la misma, correspondiente al promedio de las velocidades de las cepas, con un error tal de comprender la media de las mismas. Entonces los mismos sólo se separan por los efectos de τ y ϕ .

que sus tiempos de corridas son similares. Recordemos que se ha demostrado [2] que es posible separar dos cepas aunque sólo difieran en uno de sus parámetros de movilidad por más pequeña que sea esta diferencia. Este hecho lo ratificamos en este caso y lo hacemos para otro tipo de geometría menos eficiente en la separación que la usada en ese caso.

Berdakin en [1] calcula el ángulo óptimo para la rectificación de diferentes especies en una caja con una única fila de embudos y este es de 68° , nótese que este ángulo es similar a los 70° que encontramos como máximo de la eficiencia en la separación de dos especies. Pese a que se miden diferentes magnitudes, la similitud en estos valores nos habla de que la física involucrada en los procesos es similar.

Cabe destacar que ambos flagelos aportan a la movilidad de las bacterias puesto que las bacterias salvaje y salvaje modificada, tienen una movilidad mayor que sus mutantes sin alguno de los flagelos. En conclusión, si se tiene una mezcla de las cepas salvajes con sus mutantes, es más fácil separar las bacterias salvajes respecto de las bacterias sin flagelos subpolares que separarlas de aquellas sin flagelos laterales.

6.2. Difusión

Nos interesa entender en profundidad cómo es la dinámica de esta bacteria tan especial y poco estudiada. Para ello, calculamos la difusión libre de la misma en un medio acuoso, para ellos en nuestras simulaciones usamos condiciones libres de contorno. Recordemos antes los regímenes de difusión que podemos tener, éste está relacionado con el exponente con el cual el desplazamiento cuadrático medio se relaciona con el tiempo. Durante la difusión anómala la relación de la difusión es:

$$\langle (x(t) - x(0))^2 \rangle = 4Dt^\alpha \quad (6.1)$$

donde α es el exponente que caracteriza la evolución temporal de la movilidad. Para $\alpha < 1$ el proceso es sub-difusivo, para $\alpha = 1$ es difusivo, para $\alpha > 1$ es super difusivo y para $\alpha = 2$ el proceso es balístico. Esta ecuación es válida en el límite del tiempo tendiendo a infinito, pero cuando calculemos este exponente bajo confinamiento, utilizaremos la Ec. (6.1) en un rango determinado de tiempo.

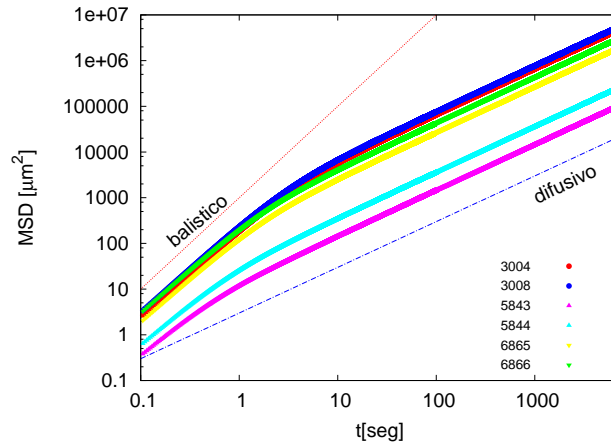


Figura 6.6: Desplazamiento cuadrático medio en función del tiempo para las diferentes cepas de *Bradyrhizobium Japonicum* libres.

Para calcular la difusión libre, utilizamos la Ec. (1.10) y gracias a un ajuste lineal del desplazamiento cuadrático medio de una población de 1000 bacterias en función del tiempo, se calcula el coeficiente de difusión traslacional. Estos resultados son los mostrados en el cuadro 1.2 y los datos para calcularla se extrajeron de Fig. 6.6. En la misma se observan dos regímenes claramente diferentes, el primero de ellos balístico que describe la dinámica

a tiempos cortos de cualquier población y el segundo de ellos difusivo. Es en este último donde la Ec. (1.10) tiene validez, pues este calculo es válido para tiempos largos.

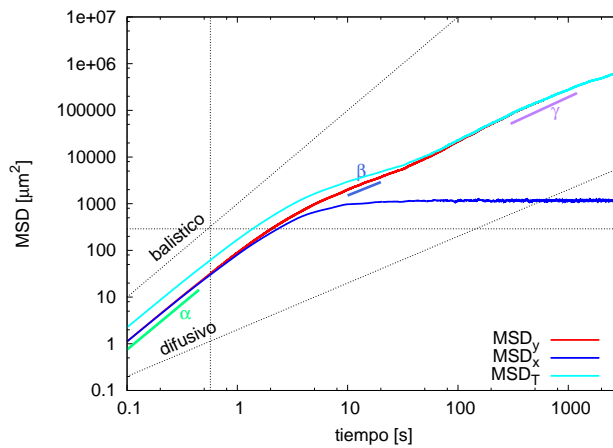


Figura 6.7: Desplazamiento cuadrático medio en función del tiempo cepas 3004 en una geometría de bastones desordenados, el mismo se grafica para las dos dimensiones y la total.

En la Fig. 6.7 se muestra el desplazamiento cuadrático medio en función del tiempo y es calculado para las dos dimensiones del problema, en ella se puede observar cómo en la dirección x, que es la menor dimensión de la caja, rápidamente se llega a un valor máximo y constante. Y cuando se observa el desplazamiento total, se aprecia que es similar al de la dimensión y, el largo de la caja, es por esto que decimos que nuestro problema puede compararse con la difusión en una dimensión confinada.

Se calculó el desplazamiento cuadrático medio para la cepa 3004 en diferentes geometrías, en la Fig. 6.8 se observa para todas las geometrías la presencia de diferentes regímenes denotados por diferentes letras griegas. Las geometrías utilizadas en el caso de la Fig. 6.8 (a) es la de ordenadas con embudos alineados, la geometría asociada a (b) es la de bastones de desorden controlado y paredes laterales y la geometría de (c) es la de bastones desordenados sin paredes laterales. Los valores de los exponentes son:

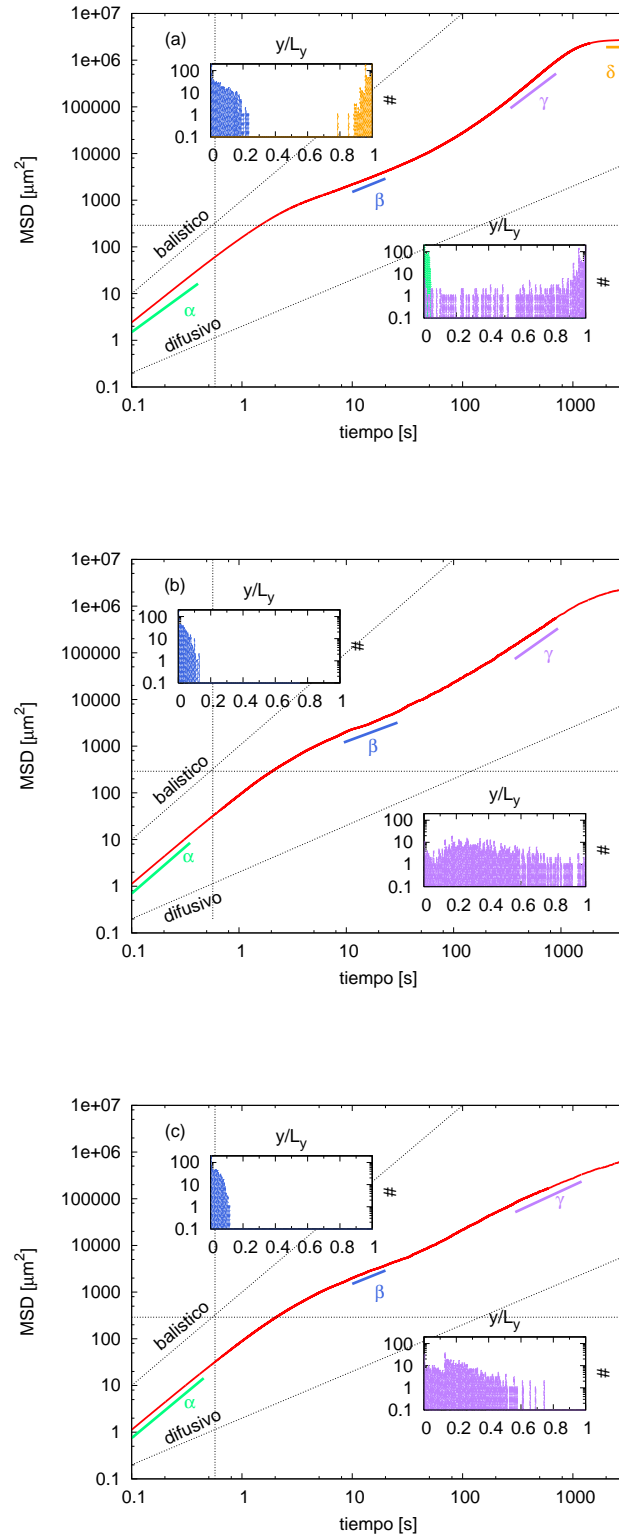


Figura 6.8: (Ver color en pdf) Desplazamiento cuadrático medio de la cepa 3004 en función del tiempo (a) para la geometría de embudos ordenados, (b) para la geometría de bastones desordenados con paredes laterales contenedoras y (c) para la geometría de bastones desordenados con ángulo medio de 70° . Los insets muestran un histograma de la población en los diferentes regímenes, el color está asociado a cada régimen.

Exponente	Geo. (a)	Geo. (b)	Geo. (c)
α	1.95	1.94	1.94
β	0.86	0.80	0.88
γ	1.96	1.52	1.00
δ	0.005	-	-

Cuadro 6.1: Exponentes de la difusión de los diferentes regímenes para la cepa 3004, en todos los casos el error está asociado a un promedio en 10 realizaciones y su valor es de 0.01.

El régimen α caracteriza la dinámica de tiempos cortos, estos son menores que el tiempo de corrida típico de las bacterias (este tiempo se marca con una línea vertical punteada a los 0.57 segundos). En éste régimen todas las geometrías se comportan de igual manera debido a que las bacterias están acomodándose en el espacio y la interacción con las paredes es pequeña por eso es similar al régimen balístico de la dinámica libre. El régimen β está asociado con la salida de las bacterias de la cámara de inoculación y un correspondiente ingreso al sector del dispositivo que tiene diferentes geometrías en cada caso. Los insets de la Fig. 6.8 muestran con los colores correspondientes a cada exponente la posición de las bacterias a lo largo de la caja, estos sirven para justificar lo antes mencionado de los exponentes α y β y su relación con la posición de las bacterias en la caja.

El régimen γ es el exponente más relevante a nuestro estudio, pues está asociado con la movilidad de las bacterias en las diferentes geometrías propuestas y como se observa en los insets de la Fig. 6.8 las bacterias están distribuidas a lo largo de la caja. Observamos que para la geometría ordenada este exponente es similar al exponente que se tiene en el régimen α , entonces el ratchet sirve para dirigir las bacterias en la dirección de fácil movimiento casi como un movimiento balístico. A medida que el desorden aumenta, este exponente decrece. Para la geometría de embudos desordenados con paredes laterales decrece en un 23 % respecto de la embudos ordenados y la desordenada sin paredes laterales lo hace en un 49 %.

Nos concentramos en cómo es el comportamiento de las bacterias en la última geometría utilizada, y para ella modificamos el largo del bastón y del ángulo medio con el que está dispuesto. Los resultados se observan en la Fig. 6.9, vemos en (a) que el desplazamiento cuadrático medio aumenta a medida que el ángulo lo hace y en (b) que decrece a medida que la longitud del bastón crece. Luego cuantificamos este resultado para todos los valores de ángulo y bastones analizados y se muestran en la Fig. 6.10.

En la Fig. 6.10 se observa que para todas las longitudes de bastón existe un mínimo en el ángulo que se encuentra alrededor de los 30° . Cuando se utiliza

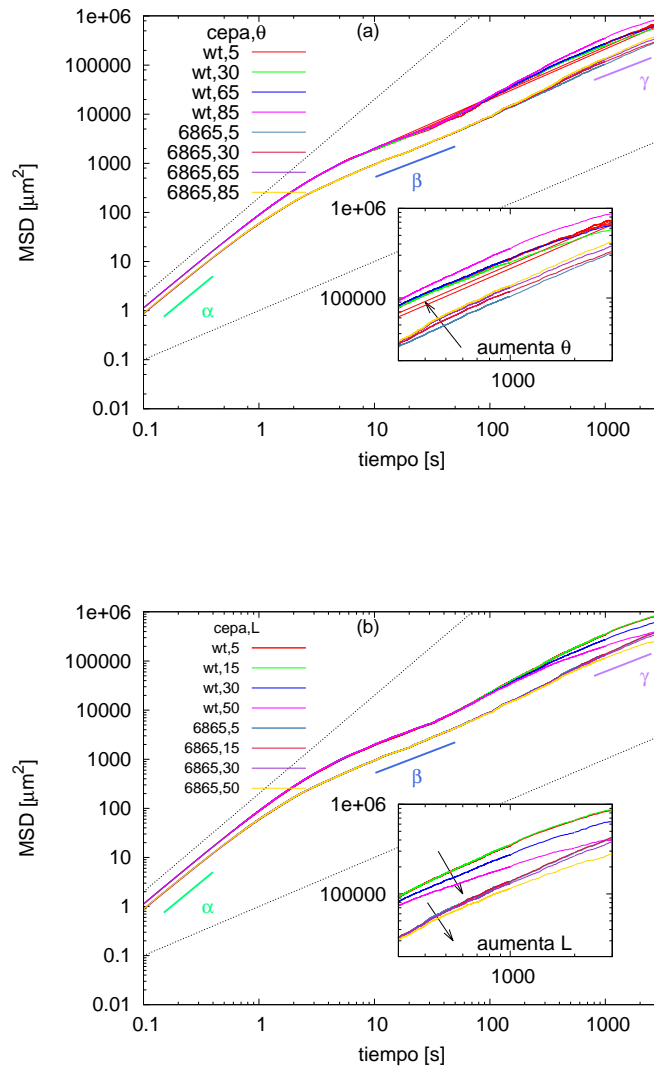


Figura 6.9: Desplazamiento cuadrático medio en función del tiempo para la geometría de bastones desordenados y las cepas 3004 y 6865, la misma nos permite comparar (a) para bastones de largo $30\mu\text{m}$ y diferentes valores de ángulo y (b) bastones con un ángulo 65° y diferentes largos. Los insets muestran un acercamiento de cada curva en el régimen γ .

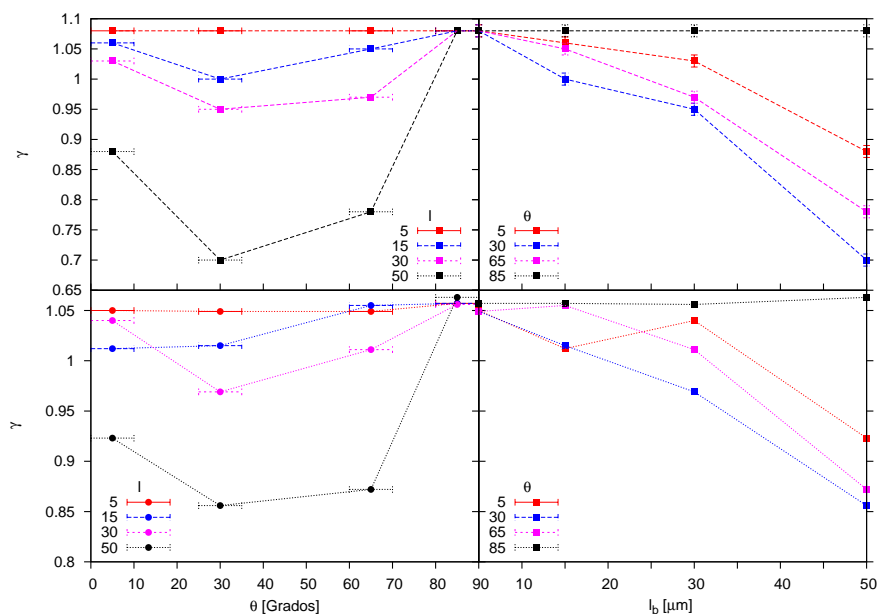


Figura 6.10: Valor del exponente γ en función del largo de los bastones y del ángulo de los mismos para las cepas 3004 y 6853.

un bastón de longitud $5\mu m$ el mismo tiene forma cuadrada con esa dimensión por lo que el resultado no observa diferencias al modificar el ángulo. Por otro lado, a medida que el bastón se hace más largo el exponente disminuye, dado que en estos casos las paredes frenan el movimiento de las mismas porque los bastones se entrecruzan. Cuando colocamos un ángulo de 85° , es decir los bastones paralelos la dimensión de mayor largo de la caja el exponente no se ve modificado por la longitud del bastón, esto se debe a que cuando las bacterias chocan con estas paredes se ven direccionadas hacia adelante y una vez que abandonan la pared siguen con la misma dirección.

En la Ref. [41] se sugiere que en medios desordenados como el agar, gel que generara espacios tortuosos tridimensionales, tal vez las bacterias adaptan su movilidad realizando tumbos más frecuentemente para poder sobrepasar los obstáculos o desorden del medio. Este medio intrincado podría mimificarse en 2D como uno de los dispositivos con los que hemos trabajado. A diferencia de lo sugerido en la Fig. 6.1, observamos que la bacteria que realiza tumbos más frecuentes (cepa 5843) es la que menos avanza o difunde en nuestras cámaras micro-desordenadas. Cabe destacar que nosotros hemos simulado la dinámica en un medio no viscoso con los parámetros de movilidad experimental extraídos del nado en un medio acuoso.

De todos modos, este trabajo puede ayudar a entender la movilidad y

la funcionalidad de los flagelos de estas bacterias en un medio desordenado y viscoso. Nuestros resultados se contraponen a los observados en medios viscosos donde la cepa con flagelo lateral difunde igualmente que la cepa que sólo tiene el flagelo subpolar. Estos ayudan a corroborar que el flagelo lateral se expresa para nadar más rápido en un medio altamente viscoso y tortuoso [I. Quelas et al, preprint 2014 a ser enviado al Journal of Bacteriology].

Capítulo 7

Conclusiones

En resumen hemos estudiado la dinámica de diversas bacterias microconfinadas y como conclusiones de este trabajo final podemos enumerar que:

1. Se utilizó un modelo fenomenológico nuevo y novedoso sin parámetros de ajuste para la descripción de la dinámica bacteriana. Se utilizaron valores experimentales biológicos y se incluyen diferentes tipos de distribuciones en el modelo acorde a las cantidades medidas. Este código fue realizado por Ivan Berdakin [1, 2], se lo utilizó y modificó adecuadamente para una serie de aplicaciones a diversas bacterias. Se mejoró el dispositivo, se halló el valor óptimo de la separación entre filas de embudos para obtener una mayor separación de mezcla de *Escherichia Coli* [2]. Se aplicó el mismo programa para nuevas bacterias de suelo y para las dos especies se estudió su dinámica en dispositivos ordenados como desordenados con el fin de simular un medio poroso real.
2. Se estudió la acumulación en las paredes de un microdispositivo en función de todos los parámetros de la movilidad de las bacterias. La acumulación es mayor a medida que se incrementa la velocidad de nado, el tiempo de corrida y la persistencia o memoria en la dirección de movimiento. Además si se tienen pequeños cambios en cualquiera de estos parámetros, se generan cambios en la acumulación y esto es útil en la separación de bacterias de una población mixta.
3. En particular, el nadador s_3 de *Escherichia Coli* tiene una mayor acumulación en las paredes respecto del s_1 , por ser el primero un mutante con mayor velocidad, tiempo de corrida y persistencia que el segundo.
4. Se investigó la influencia de las paredes laterales del dispositivo y se observó una acumulación mayor respecto de los microobstáculos del medio de la caja. Los microobstáculos laterales son de gran importancia para el direccionamiento en la dirección favorable del ratchet.

5. Se agregó al modelo, la dinámica de nacimiento y muerte de bacterias, generando así una población variable de micronadadores. Se estudió su influencia en el proceso de rectificación y se concluyó que el mismo no es influyente a tiempos cortos, menores de la media hora o del orden de tiempo donde se realizan experimentos reales. La rectificación es una cantidad macroscópica que no se ve afectada a tiempos cortos por ese proceso, puesto a que el nacimiento y muerte afecta a la dinámica individual o sea microscópica.
6. Se generaron diferentes microdispositivos de geometría desordenada y se estudió la dinámica bacteriana en ellos. Se concluyó que a medida que el desorden en las geometrías aumenta, la eficiencia en la separación disminuye pero se incrementa el tiempo de extracción de una cepa pura. Esto puede ser útil en futuras aplicaciones, ya que existe un tiempo de manipulación experimental más accesible al predicho en [1]. Sumado que la construcción de geometrías desordenadas puede ser más sencillo que la observación directa en medios reales desordenados y así facilitar el trabajo en laboratorio para entender la funcionalidad de cada flagelo específico (cada mutante con su movilidad específica).
7. Se generaron geometrías de desorden controlado en función del ángulo de los bastones. Se estudió la separación de una población mixta en estos sistemas y se obtiene una mayor eficiencia en la separación para un ángulo de 70° , este valor se corresponde con el valor óptimo para los embudos, 68° , en el experimento numérico de rectificación de bacterias hallado en [1]. Pese a ser dos cantidades diferentes, el fenómeno físico que se encuentra detrás es el mismo.
8. Se calculó el exponente de la difusión para la *Bradyrhizobium Japonicum* en diferentes geometrías y se encontró que a medida que el desorden aumenta el exponente disminuye, asociado con un menor avance. Además se calculó el mismo para geometrías de desorden controlado y existe un mínimo en el mismo cuando el ángulo es de 30° , pues los bastones detienen el paso de las bacterias. También se observó que a medida que el largo de los bastones aumenta el coeficiente disminuye y esto se debe a que se genera una cantidad mayor de cruce entre bastones. Estos dos casos son los más similares a un medio tortuoso similar al que habitan estas bacterias.

En resumen, este trabajo de tesis ha contribuido a diseñar microdispositivos más eficientes para la separación de poblaciones de *Escherichia Coli* publicados *Quantifying the sorting efficiency of self-propelled run-and-tumble swimmers by geometrical ratchets*, I. Berdakin, A. V. Silhanek, **H.**

N. Moyano-Cortéz , V. I. Marconi, y C. A. Condat, *Cent. Eur. J. Phys.* **11(12)**, 1653-1661 (2013).

En suma, los resultados de esta tesina han generado gran interés por microbiólogos argentinos y han sido utilizados para interpretar sus recientes experimentos (artículo en preparación, I. Quelas et. al. a presentarse al *Journal in Bacteriology* en 2014). Se ha iniciado este año una colaboración entre FaMAF y el grupo del Dr. Anibal Lodeiro del IBBM de La Plata con el objetivo de diseñar microdispositivos en PDMS transparentes y desordenados para estudios en laboratorio. El estudio tanto teórico como experimental, de la dinámica bacteriana en medios porosos artificiales puede contribuir a entender la dinámica bacteriana real en suelos porosos que ayuden a desarrollar mejores biofertilizantes para la soja, en búsqueda de una agronomía más sustentable.

Bibliografía

- [1] *Influence of swimming strategy on microorganism separation by asymmetric obstacles*, I. Berdakin, Y. Jeyaram, V. V. Moshchalkov, L. Venken, S. Dierckx, S. J. Vanderleyden, A. V. Silhanek, C. A. Condat, V. I. Marconi, Phys. Rev. E, **87**, 052702 (2013).
- [2] *Quantifying the sorting efficiency of self-propelled run-and-tumble swimmers by geometrical ratchets*, I. Berdakin, A. V. Silhanek, H. N. Moyano-Cortéz, V. I. Marconi, y C. A. Condat, Cent. Eur. J. Phys. **11**(12), 1653-1661 (2013).
- [3] *Active Matter Transport and Jamming on Disordered Landscapes*, C. Reichhardt y C. J. Olson Reichhardt, Physics Reports, **361**, 57-265, (2014).
- [4] *A microfluidic concentrator array for quantitative predation assays of predatory microbes*. Seongyong Park, Dasol Kim, Robert J. Mitchell, and Taesung Kim. Lab Chip, **11**, 2916, (2011).
- [5] *Using ratchets and sorters to fractionate motile cells of Escherichia coli by length* S. E. Hulme, W. R. DiLuzio, S. S. Shevkoplyas, L. Turner, M. Mayer, H. C. Berg, G. M. Whitesides. Lab on a chip, **8** 1888 (2008).
- [6] *Geometrical guidance and trapping transition of human sperm cell*. A. Guidobaldi, Y. Jeyaram, I. Berdakin, V. V. Moshchalkov, C. A. Condat, V. I. Marconi, L. Giojalas y A. V. Silhanek. Phys. Rev. E, **89**, 032720, (2014)
- [7] *Life at low Reynolds number*, E. M. Purcell, American J. Phys. (**45**), 3 (1977).
- [8] *An Introduction to Fluid Dynamics*, G. K. Batchelor, New York: Cambridge University Press, (2000).
- [9] <http://www.naturalhistorymag.com/biomechanics/201394/cold-squirts>.

- [10] *Self-Propelling Nanomotors in the Presence of Strong Brownian Forces*, T.C. Lee, M. Alarcon-Correa, C. Miksch, K. Hahn, J. G. Gibbs, y P. Fischer, *Nano lett*, **14**, 2407-2412, (2014).
- [11] *Chemotaxis in Escherichia coli*. J. Adler. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **30**, 289-292, (1965).
- [12] *E. coli in motion*, H. C. Berg, Biological and medical physics; biomedical engineering, Springer, Reprint (2004).
- [13] *Random walks in biology*, H. C. Berg, Princeton University press, (1982).
- [14] *Chemotaxis in Escherichia coli analysed by three-dimensional tracking*. H. C. Berg, D. A. Brown. *Nature*, **239**, 500-504, (1972).
- [15] <http://www.rowland.harvard.edu/rjf/wilson/Research-bacteria.html>.
- [16] *The growth of bacterial cultures* J. Monod. *Annu. Rev. Microbiol.*, **3**, 371-394, (1949).
- [17] *Multiple factors underlying the maximum motility of Escherichia coli as cultures enter post-exponential growth*. C. D. Amsler, M. Cho y P. Matsumura. *J. Bacteriol*, **175**(19), 6238-6244, (1993).
- [18] *Origin of Individuality of Two Daughter Cells during the Division Process Examined by the Simultaneous Measurement of Growth and Swimming Property Using an On-Chip Single-Cell Cultivation System*, Senkei Umehara, Ippei Inoue, Yuichi Wakamoto y Kenji Yasuda. *Biophysical Journal*.(93), 1061-1067, (2007).
- [19] *Fijación de nitrógeno en soja. Inoculantes: situación actual y perspectivas en Argentina*. N. Gonzalez. De la Biología del Suelo a la Agricultura (A. Thuar, F. Cassán y C Olmedo C, eds). pp. 161-169, (2007).
- [20] *Strain selection for improvement of Bradyrhizobium japonicum competitiveness for nodulation of soybean* M. J. Althabegoiti1, S. L. Lopez-García, C. Piccinetti, E. J. Mongiardini, J. Perez-Gimenez, J. I. Quelas, A. Peticari y A. R. Lodeiro. *FEMS Microbiology Letters* **282**, 115-123, (2008).
- [21] *Agricultural and Environmental Applications of Nitrogen Fixing Organisms*. M. J. Sadowsky y P. H. Graham. *Highlights of Nitrogen Fixation Research*. Springer US. pp. 219-223, (1999).

- [22] *Analysis of the role of the two flagella of Bradyrhizobium japonicum in competition for nodulation of soybean* M.J. Althabegoiti, J.M. Covelli, J. Pérez-Giménez, J.I. Quelas, E.J. Mongiardini, M.F. López, S.L. López-García, A.R. Lodeiro. FEMS Microbiology Letters **319**, 133-139, (2011).
- [23] *The mathematics of diffusion*, J. Crank, Clarendon press Oxford, (1975).
- [24] *A wall of funnels concentrates swimming bacteria*. Peter Galajda, Juan Keymer, Paul Chaikin y Robert Austin. J. Bacteriol, **189(23)**, 8704-8707, (2007).
- [25] *Rectification of Swimming Bacteria and Self-Driven Particle System by Arrays of Asymmetric Barriers*. M. Wan, C. J. O. Reichhardt, Z. Nussinov, C. Reichhardt. PRL, **101**, 018102, (2008).
- [26] *Three-dimensional tracking of motile bacteria near a solid planar surface*. P. D. Frymier, R. M. Ford, H. C. Berg y P. T. Cummings. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **92**, 6195-9, (1995).
- [27] *Theoretical models in low-Reynolds-number locomotion* O. S. Pak y E. Lauga. Capítulo en Low-Reynolds-Number Flows: Fluid-Structure Interactions. Royal Society of Chemistry Soft Matter Series. (2014)
- [28] *Nonlinear dynamics and chaos*. S. H. Strogatz. Perseus Books. Reading Massachusetts. (1994)
- [29] *Statistical Mechanics: Algorithms and Computations* W. Krauth. Oxford master series in statistical, computational and theoretical physics. (2006).
- [30] *Accumulation of Microswimmers near a Surface Mediated by Collision and Rotational Brownian Motion*. G. Li, J. X. Tang. PRL, **103**, 078101, (2009).
- [31] *Hydrodynamic attraction of swimming microorganisms by surfaces*. A. Berke, L. Turner, H. C. Berg y E. Lauga. Phys. Rev. Lett., **101**:038102-038106 (2008).
- [32] *On-chip microbial culture for the specific detection of very low levels of bacteria* S. Bouguelia, Y. Roupioz, S. Slimani, L. Mondani, M.G. Casabona, C. Durmort, T. Vernet, R. Calemczuka y T. Livache. Lab on a chip. **13**, 4024, (2013).

- [33] *Combinatorial discovery of polymers resistant to bacterial attachment.* A. L. Hook, C.-Y. Chang, J. Yang, J. Lockett, A. Cockayne, S. Atkinson, Y. Mei, R. Bayston, D. J. Irvine, R. Langer, D. G. Anderson, P. Williams, M. C Davies y M. R. Alexander. *Nature Biotechnology* **30**, 868-875, (2012).
- [34] *Study of the diffusion, rheology and microrheology of complex mixtures of bacteria and particles under flow confined in thin channels.* Tesis doctoral de G. L. Miño. Universidad Pierre y Marie Curie. (2012)
- [35] *Ciliary contact interactions dominate surface scattering of swimming eukaryotes* V. Kantsler, J. Dunkel, M. Polin, R. E. Goldstein. *PNAS*. (2013)
- [36] *Fluid dynamics and noise in bacterial cell-cell and cell-surface scattering* K. Drescher, J. Dunkel, L. H. Cisneros, S. Ganguly y R. E. Goldstein. *PNAS*. **108(27)**, 10940-10945, (2011).
- [37] *A note on the image system for a stokeslet in a no-slip boundary.* J. R. Blake. *Proc. Camb. Phil. Soc.*, **70** 303 (1971).
- [38] *Dispersion in Sand Porous Medium.* J. Liu, R. M. Ford y J. A. Smith. *American Chemical Society*, **45**, 3945-3951, (2011).
- [39] B. S. Cho, T. G. Schuster, X. M. Zhu, D. Chang, G. D. Smith, S. Takayama. *Anal. Chem.* **75**, 4671, (2003).
- [40] *Trapping self-propelled micromotors with microfabricated chevron and heart-shaped chips.* L. Restrepo-Pérez, L. Soler, C. S. Martínez-Cisneros, S. Sánchez y O. G. Schmidt. *Lab Chip*, **14**, 1515, (2014).
- [41] *Migration of bacteria in semisolid agar.* A. J. Wolfe y H. C. Berg. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 6973-6977, (1989).
- [42] *Brownian motors: noisy transport far from equilibrium,* P. Reimann, *Physics Reports*, **361**, 257-265, (2002).
- [43] *Bacterial growth and motility in sub-micron constrictions.* Jaan Mannik, Rosalie Driessen, Peter Galajda, Juan E Keymer y Cees Dekker. *PNAS*, **106(35)**, 14861-6, (2009).
- [44] *Escherichia coli swim on the right-hand side.* W. R. DiLuzio, L. Turner, M. Mayer, P. Garstecki, D. B. Weibel, H. C. Berg y G. M. Whitesides, *Nature*, **435**, 1271-74 (2005).