

TRABAJO ESPECIAL DE LA LICENCIATURA EN FÍSICA

DINÁMICA DE BACTERIAS DE SUELO

POR

SOFÍA MONTAGNA

DIRECTORA: DRA. VERÓNICA I. MARCONI

MARZO 2018



FACULTAD DE MATEMÁTICA, ASTRONOMÍA, FÍSICA Y COMPUTACIÓN
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
ARGENTINA



EL ESTUDIO “DINÁMICA DE BACTERIAS DE SUELO” POR SOFÍA MONTAGNA SE
DISTRIBUYE BAJO UNA [LICENCIA CREATIVE COMMONS](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)
[ATTRIBUTION-NONCOMMERCIAL-NODERIVATIVES 4.0 INTERNATIONAL](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

Resumen

Dado que la movilidad de las bacterias en el suelo no puede ser observada *in vivo* al microscopio, el diseño de dispositivos que imiten la porosidad y tortuosidad de los canales del suelo y al mismo tiempo sean transparentes y biocompatibles puede contribuir a una mejor comprensión de este fenómeno y a aplicaciones biotecnológicas. Con esta motivación y enfoque interdisciplinario se estudiaron numéricamente las propiedades de transporte de poblaciones de bacterias de suelo *Bradyrhizobium diazoefficiens*, utilizando dinámica de Langevin. Las simulaciones se realizaron en un medio bidimensional con diferentes tipos de obstáculos, tarea menos costosa numéricamente que experimentalmente. En primer lugar se analizaron las estrategias de nado reales de las bacterias en un medio acuoso sin obstáculos y se lograron reproducir con un buen acuerdo teórico-experimental, obteniendo así parámetros para un modelado sin ajustes. Se estudió el desplazamiento cuadrático medio de las poblaciones y el coeficiente de difusión traslacional y su relación con el tipo de medio en el que las bacterias están inmersas, para diferentes cepas. Esto nos permitió realizar una caracterización de las propiedades de transporte relacionadas a cada sistema flagelar. El estudio de las propiedades de transporte de estas bacterias que se encuentran en el suelo cerca de las raíces, tiene como fin contribuir a la mejora de los biofertilizantes utilizados en los cultivos de soja para lograr una agronomía más sustentable.

Abstract

Since bacteria motility cannot be observed *in vivo* into the soil at the microscope, device designs that mimics the porosity and tortuosity of real soil could contribute to a better understanding of this phenomenon. Such devices, transparent and biocompatible, present advantages for biotechnological applications. Under this motivation and interdisciplinary approach, the transport properties of soil bacteria *Bradyrhizobium diazoefficiens* populations were studied numerically, using Langevin dynamics. The simulations were carried out in two-dimensions with different types of obstacles, a numerically costless task than experimentally. Firstly the actual swimming strategies of the bacteria were analyzed in an aqueous medium without obstacles and they were reproduced with a good theoretical-experimental agreement. Thus real parameters without adjustments were obtained for the model. The population mean square displacement, the translational diffusion coefficient and its relation to the type of medium in which bacteria are immersed were studied, for different strains. This allowed us to perform a characterization of the transport properties related to each flagellar system. The study of the transport properties of these soil bacteria, found near the roots, aim to contribute to the improvement of biofertilizers used in the soybean crops to achieve a more sustainable agronomy.

Agradecimientos

Este trabajo es el cierre de largos años de estudio, militancia y vida, y quiero agradecer:

A mi directora Verónica y a los grupos de Anibal Lodeiro y Ma. Luisa Cordero, que me hicieron aprender y aportaron muchísimo a este trabajo.

A la universidad pública y en particular a FaMAF. A toda la sociedad que con sus impuestos hace posible una educación gratuita y de calidad, sistema educativo que en estos tiempos hay que valorar y cuidar.

A mi familia: madre, padre, Emi y Pedro; y en especial a Nico, mi compañero, que me han acompañado con mucho cariño.

Al **GURI**-La Bisagra, que no solo me dio un grupo de buenos amigos sino que me hizo pensar, repensar el rol de la ciencia, el conocimiento y la educación en la política.

A mis amigos y compañeros, en particular a Fran que sin él estudiar Física no hubiera sido tan divertido.

A Néstor Kirchner y a Cristina Fernández por su compromiso por el desarrollo del país. La beca que tengo para hacer el doctorado forma parte de su pesada y buena herencia.

Índice general

Resumen	II
Agradecimientos	III
1. Introducción	1
2. Marco Teórico	3
2.1. La vida a un bajo número de Reynolds	3
2.2. Bacteria <i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>	4
2.2.1. Bacterias y sus estrategias de nado	5
2.2.2. Difusión de micronadadores	8
2.3. Microfluídica	10
3. Modelo y metodología	13
3.1. Modelo fenomenológico	13
3.2. Modelos de suelos porosos	18
3.3. Simulaciones	20
4. Dinámica libre y propiedades de transporte	25
4.1. Trayectorias	26
4.2. Difusión bacteriana	30
5. Difusión bacteriana en medios con obstáculos	35
5.1. Geometría con defectos circulares monodispersos	36
5.1.1. Cepa salvaje	38
5.1.2. Cepa monoflagelada	44
5.1.3. Cepa con sistema flagelar lateral	47

5.1.4. Comparación entre cepas	49
5.2. Geometría con defectos circulares bidispersos	51
5.3. Geometría con defectos circulares polidispersos	54
6. Conclusiones	57
6.1. Perspectivas	58
Bibliografía	64

CAPÍTULO 1

Introducción

Las *Bradyrhizobium diazoefficiens* [1] son bacterias de suelo utilizadas como biofertilizantes ya que favorecen la fijación de nitrógeno (N_2). En Argentina, país agroexportador, se usan por su bajo costo pero no reemplazan el uso de los fertilizantes no orgánicos ya que no son eficientes. Hay diversos factores que dificultan la respuesta de los biofertilizantes en la absorción del nitrógeno atmosférico [2], como por ejemplo las condiciones hídricas del suelo, la existencia de población nativa de bacterias en la zona de inoculación, la presencia de nitratos en el suelo por la aplicación de fertilizantes nitrogenados, la forma de inoculación en el cultivo, entre otras. Se sabe que el rendimiento de los cultivos de soja en los que se aplican los biofertilizantes es de un 5 % más que en los no inoculados. Sin embargo en los suelos pampeanos el aporte de N_2 por inoculación no es suficiente para sostener altos rendimientos de los cultivos, por lo que se aplican fertilizantes nitrogenados. Por estas razones es importante entender y conocer la dinámica de las *Bradyrhizobium diazoefficiens* y sus propiedades de transporte en diversos tipos de suelo.

Gracias a los últimos avances tecnológicos en nanolitografía, microfluídica y en la fabricación de laboratorios en microescala se han abierto muchas puertas a la microbiología, ya que se ha logrado una mejor visualización, manipulación y análisis de los sistemas de estudio. Algunos ejemplos son el diseño de dispositivos que utilizan el direccionamiento geométrico para generar una distribución homogénea para la mejora de los análisis de fertilidad [3] y para la acumulación de espermatozoides [4], para la separación de bacterias *E. Coli* por estrategia de nado [5, 6], microdispositivos para separar bacterias por tamaño [7] y por velocidad [8], el uso de dispositivos en aplicaciones médicas [9], la fabricación de micro válvulas compatibles con dispositivos realizados con litografía blanda con métodos baratos y accesibles que permiten el control de flu-

jos, el desarrollo de superficies antibacterianas como catéteres, conocer y estudiar la respiración celular a través del intercambio de electrones [10], el estudio de bacterias con magnetotaxis (atracción por campo magnético) en estructuras porosas [11], entre otros. El campo de aplicación y las posibilidades que brinda la microfluídica es muy amplio y se encuentra en pleno desarrollo.

Dado que la movilidad de las bacterias en el suelo con las técnicas disponibles al presente no puede ser observada *in vivo* al microscopio el diseño de dispositivos que imiten la porosidad y tortuosidad de los canales del suelo y al mismo tiempo sean transparentes y biocompatibles puede contribuir a una mejor comprensión de este fenómeno, que no puede ser extrapolado del conocimiento en medios líquidos homogéneos. Con esta motivación se estudia mediante simulaciones numéricas las propiedades de transporte de poblaciones bacterianas en medios de diversas porosidades, tarea menos costosa numéricamente que experimentalmente en dispositivos de microfluídica. Cabe destacar que el enfoque, trabajo y objetivo se encuentra fuertemente ligado a los experimentos, por ejemplo, todos los parámetros usados en los modelos que se proponen para la dinámica bacteriana son datos medidos por colegas experimentales y analizados en este trabajo, y no se utilizan parámetros ajustables. Nuestro objetivo es modelar la física del sistema biológico de forma realista.

Este enfoque podría contribuir a entender mejor la colonización del suelo por parte de bacterias mutualistas, como los rizobios fijadores de N_2 . En particular, los cultivos de soja son inoculados con *Bradyrhizobium* spp. en un 95 % de los casos con el objetivo de lograr obtener el N_2 del aire para la nutrición de la planta, preservando el N_2 del suelo, pero los resultados de la inoculación distan de ser óptimos debido en gran parte a la competencia ejercida por la población bacteriana del suelo sobre el inoculante. Sabemos muy poco acerca de cómo ocurre esta competencia dentro del suelo y nuestra falta de conocimiento es especialmente notoria con respecto a cómo los distintos componentes de la microbiota del suelo colonizan los hábitats disponibles, entre ellos las superficies de las raíces de las plantas. En este sentido es imprescindible entender cómo las bacterias se desplazan en las películas de agua del suelo dentro de los micro y macroporos y sobre las superficies radicales. Con los resultados de este trabajo se espera contribuir como fin último a la mejora de los biofertilizantes y con ello ayudar al desarrollo de una agricultura sustentable.

2.1. La vida a un bajo número de Reynolds

Los microorganismos nadadores abundan en nuestro mundo, algunos ejemplos son la *Escherichia coli* que vive en los intestinos de una gran parte de los mamíferos, los espermatozoides, las bacterias que viven en suelos, lagos y océanos. Es importante conocer la física que explica su nado en los medios acuosos. El número de Reynolds es un parámetro adimensional que caracteriza el movimiento en un fluido. Es una medida de la relevancia de las fuerzas inerciales frente a las viscosas y se puede escribir como [12]:

$$Re = \frac{\text{Fuerzas Inerciales}}{\text{Fuerzas Viscosas}} \simeq \frac{vL\rho}{\eta} \quad (2.1)$$

donde v es la velocidad media y L la longitud característica del nadador y ρ y η son la densidad y viscosidad del fluido.

Para una persona nadando $Re = 10^4$, para un pez $Re = 10^2$ y para microorganismos de tamaño del orden de 1 o $2\mu\text{m}$, $Re \approx 10^{-5} - 10^{-4}$. Entonces podemos decir que el mundo de los micronadadores es un mundo “sin inercia”. Con un análisis simple es posible estimar cuánto avanza una bacteria si deja de nadar. Si se la aproxima por una esfera de radio a la ecuación de movimiento según Stokes [13] es:

$$m \frac{-dv}{dt} = 6\pi\eta a v \quad (2.2)$$

Su solución es $v(t) = v(0) \exp(-t/\tau)$, con $\tau = m/6\pi\eta a$ que es su tiempo de decaimiento característico. Para los valores típicos correspondientes a la *E. Coli* en un medio acuoso, se obtiene $\tau \approx 0.1\mu\text{s}$. En este tiempo la bacteria recorre aproximadamente 0.03\AA ,

distancia despreciable en comparación a la longitud típica de la bacteria, $\sim 1\mu\text{m}$, por lo cual se puede considerar que la respuesta a una fuerza es instantánea.

Si se quiere describir la dinámica de una población de micronadadores inmersos en un fluido, la hidrodinámica del problema está descrita por la ecuación de Navier-Stokes [14]:

$$\rho \frac{\partial v}{\partial t} + \rho(\vec{v}\nabla)\vec{v} = -\nabla p + \eta\nabla^2\vec{v} \quad (2.3)$$

donde ρ es la densidad del medio, v la velocidad del fluido y p la presión. Esto se cumple si el fluido es incompresible y no se aplican campos externos. Como el interés de este trabajo es la dinámica de micronadadores a bajo número de Reynolds, se desprecian los términos inerciales de la Ec. (2.3), y linealizándola se obtiene la ecuación de Stokes:

$$\nabla p = \eta\nabla^2\vec{v} \quad (2.4)$$

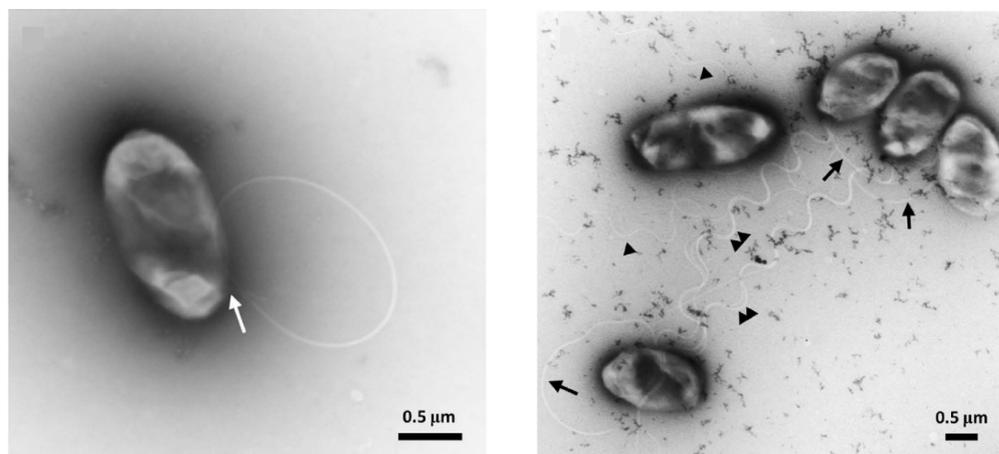
de la cual luego se obtiene la ecuación de movimiento que describe la dinámica de una bacteria y de una población de bacterias interactuantes, que se explicará en las secciones siguientes.

2.2. Bacteria *Bradyrhizobium diazoefficiens*

El sistema de estudio de este trabajo son las bacterias de suelo, en particular las *Bradyrhizobium diazoefficiens* [1]. Un objetivo es conocer las propiedades de transporte de cada cepa de estas bacterias que tienen movilidades características propias. Las *Bradyrhizobium* son usadas hace más de cuarenta años como biofertilizantes ya que favorecen la fijación del nitrógeno atmosférico. Esto sucede a través de un proceso de infección que es llamado nodulación, luego del cual las bacterias viven en simbiosis con la planta.

Estas bacterias poseen dos sistemas flagelares, el sistema subpolar y el lateral. El sistema subpolar está compuesto por un único flagelo, grueso y constitutivo, que se encuentra en la parte trasera de la bacteria. Es similar al flagelo de un espermatozoide. El sistema lateral consta de varios flagelos más largos, finos y blandos que el subpolar. Esto genera que se formen manojos y se enrollen. Los sistemas flagelares están presentados en la Fig. 2.1. La característica de poseer dos sistemas flagelares está presente en diversas especies de bacterias. Reportes previos [15, 16, 17] indican que en general el sistema primario (subpolar) es utilizado para el nado en medios acuosos y el lateral para el “arrastre” sobre superficies húmedas. Sin embargo estudios sobre mutantes carentes del sistema primario o secundario no esclarecen del todo las funciones de cada uno en el nado, arrastre y competencia por la nodulación en la raíz de la soja. Conocer la funcionalidad de los sistemas flagelares permitiría comprender y manipular las

estrategias de nado de las bacterias para aplicaciones específicas en nuevos desarrollos biotecnológicos.



(a) Mutante ΔlafA . El flagelo subpolar está indicado con una flecha y su largo es de $\sim 4\mu\text{m}$.

(b) Cinco bacterias WT. Se puede ver el flagelo subpolar (flecha) y los laterales (punta de flecha). Algunos flagelos laterales forman “bundles” (doble cabeza de flecha).

Figura 2.1: Imágenes obtenidas por micrografías electrónicas de transmisión (TEM) de bacterias *Bradyrhizobium diazoefficiens*. Imágenes extraídas de [18]. La escala es de $0.5\mu\text{m}$.

Es por esto que en este estudio se trabaja con tres cepas: la Wild Type (WT) que es la cepa salvaje, con los dos sistemas flagelares, la ΔfliC que solo posee el sistema lateral y la ΔlafA que solo tiene el subpolar. Estas cepas están siendo estudiadas por el grupo de A. Lodeiro, de la UNLP, en el Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM) dependiente del CONICET. Vale aclarar que el grupo de A. Lodeiro trabaja hace más de treinta años con los rizobios y dominan muy bien la manipulación genética en cuanto a las expresiones flagelares, siendo capaces de generar diversas mutaciones. Estas cepas son las estudiadas en Ref. [18]. Las conclusiones de este trabajo también podrían ser de utilidad para el estudio de otro tipo de cepas y bacterias con características similares, por ejemplo bacterias fijadoras de nitrógeno en otras leguminosas.

2.2.1. Bacterias y sus estrategias de nado

El paradigma del nado bacteriano en medio acuoso está dado por el modelo de corridas y tumbos (*run and tumble*, RT por sus siglas en inglés), que describe el nado de la *Escherichia Coli*, que fue muy estudiada por H. Berg y su grupo [19]. Esta estrategia de nado consiste en una sucesión de corridas rectas de velocidad constante (movimiento balístico), y tumbos, representado esquemáticamente en la Fig. 2.2. La velocidad está dada por la longitud de la corrida l_{run} y el tiempo característico de tumbo τ ,

$|\bar{v}| = l_{run}/\tau$ [19, 20]. A tiempos largos esta sucesión forma un movimiento *browniano*. El sistema de autopropulsión del motor genera que las corridas no sean tramos perfectamente rectos [5]. Las corridas corresponden al movimiento de todos los flagelos coordinadamente y los tumbos se producen cuando éstos se desagrupan. Los tumbos se producen en un tiempo mucho más corto que el de la corrida, de manera tal que el tiempo que le toma a la bacteria reacomodar sus flagelos para iniciar nuevamente su corrida es despreciable comparado con el que pasa corriendo. Es por esto que en los modelos los tumbos se toman como instantáneos, como veremos en la Sección 3.1. La

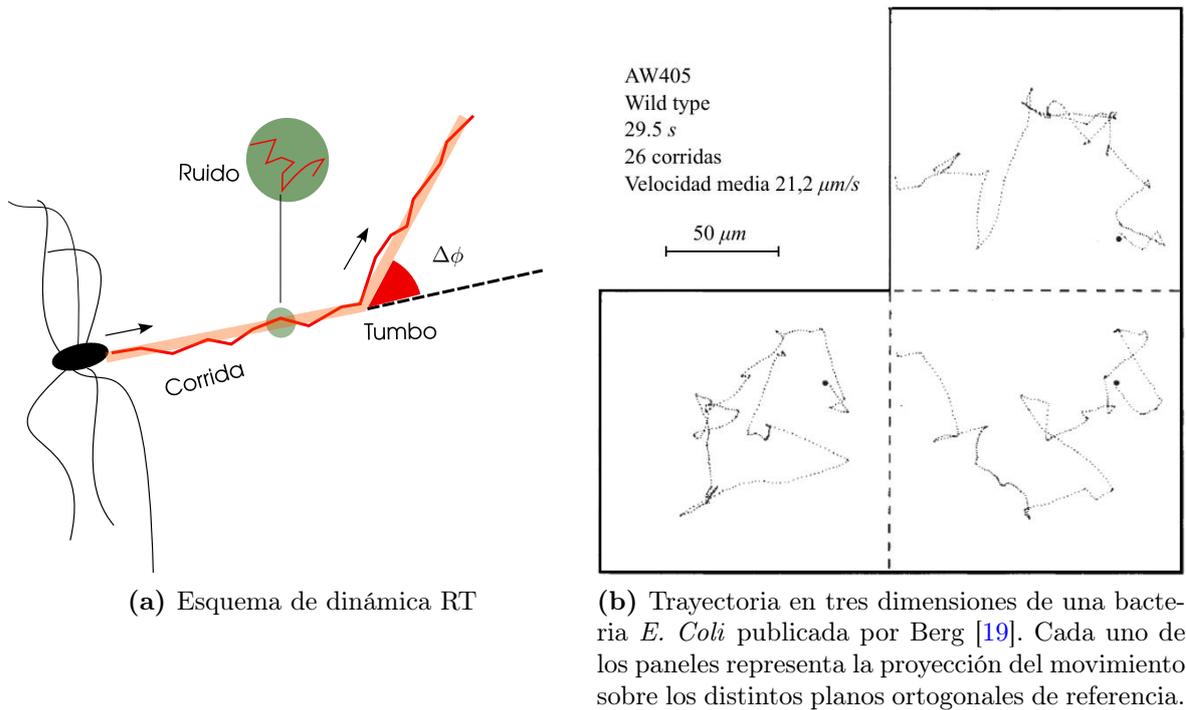


Figura 2.2: Dinámica de corridas y tumbos para la *E. Coli*

sucesión de corridas y tumbos produce un movimiento *browniano* a tiempos largos que puede tener un sesgo debido a la “memoria” de la dirección de movimiento anterior, es decir la **persistencia**. En estos sistemas de bacterias la “memoria” es a corto plazo, pues solo recuerdan la dirección anterior de movimiento en el momento del tumble. Esta estrategia de nado es la característica caminata aleatoria con un sesgo debido a la corta memoria de la dirección previa de movimiento.

Los experimentos de Berg de los 70’s muestran que la duración de las corridas responde a una distribución de Poisson con media τ y el ángulo de tumble a una distribución Gaussiana con media ϕ . Estos valores varían según la cepa y según la estrategia de nado. Investigaciones recientes sobre bacterias menos estudiadas [21, 22, 23] describen modelos alternativos al RT, como ser *run and reverse* (RR) y *run, reverse and flick* (RRF), Fig. 2.3.

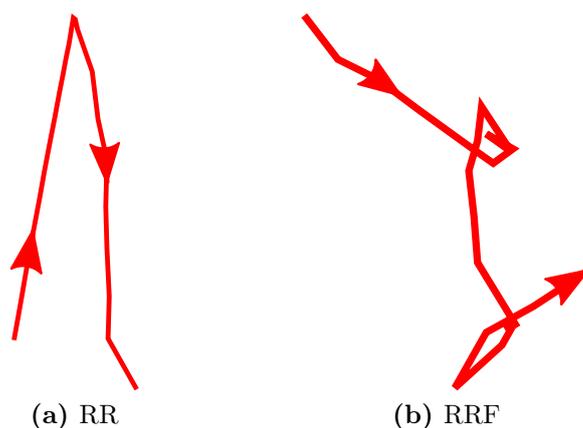


Figura 2.3: Otro tipo de trayectorias como Run and reverse (RR) y run, reverse and flick (RRF).

Las *Bradyrhizobium diazoefficiens* son usadas en el mercado como biofertilizantes desde hace muchos años, sin embargo recientemente gracias al trabajo conjunto entre físicas, biotecnólogos, biólogos y agrónomos en Ref. [18] se han reportado las diferentes estrategias de nado en un medio acuoso. Entre ellas se encuentran trayectorias RR, RRF, lineales, rugosas, curvas y circulares. En este trabajo nos centraremos en estudiar todas salvo las circulares y curvas como primer aproximación y las explicaremos con mayor detalle en la Sección 4.1. Se conoce [3, 24] que el nado en círculos se debe a la cercanía a la pared contenedora, de manera tal que solo describiremos las trayectorias de las bacterias que se encuentran lejos de las paredes, es decir en el seno del dispositivo o en *bulk*. En la Fig. 2.4 se encuentra la proporción de cada estrategia de nado para las tres cepas estudiadas. Es importante notar que no hay un único modo de nado adoptado por estas bacterias de suelo. Nuestro trabajo está basado en el artículo de Quelas [18]. La diversidad de estrategias de nado es algo novedoso en este campo de estudio y es importante lograr realizar un modelo que contemple esta heterogeneidad.

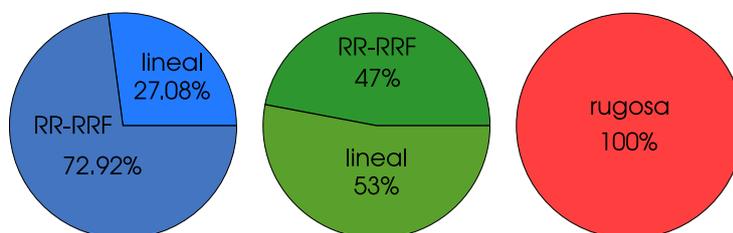


Figura 2.4: (Color en pdf) Diagrama de la proporción vista de cada estrategia de nado en cada cepa. Azul WT, verde Δ lafA, rojo Δ fliC, según los datos de Ref. [18]

Las velocidades medias de cada cepa se presentan en la Tabla 2.1 y estas rondan entre las $27\mu\text{m/s}$ para las que poseen el flagelo subpolar y dentro del error experimental son indistinguibles y la que solo presenta el sistema lateral tiene una velocidad $\sim 36\%$

menor. Estos datos se obtuvieron del trabajo del grupo de A. Lodeiro [18]. Es importante resaltar que la dispersión de estos resultados es mucho menor en comparación a los datos experimentales usados en otros trabajos del grupo [25], menos precisos y con menor estadística. Mejorar la estadística nos permite lograr una reproducción más fehaciente de los experimentos.

Cepa	$ \bar{v} [\mu\text{m/s}]$
WT	28.8 ± 1.3
ΔlafA	26.9 ± 2.0
ΔfliC	17.2 ± 0.8

Tabla 2.1: Velocidad media de cada cepa. Datos obtenidos de Ref. [18].

En la literatura se encuentra que los micronadadores tienen una dinámica particular cerca de paredes o superficies contenedoras. Si un micronadador tipo *pusher* llega a una pared, dependiendo del ángulo de incidencia, prefiere nadar paralelo a la superficie. Esto se puede explicar a través del método de las imágenes, como un problema de un dipolo/multipolo frente a una pared de potencial. Las bacterias nadan cerca de la pared con una imagen del otro lado. La atracción a la pared sucede solo a una distancia de muy pocos cuerpos de ella [26, 27, 28, 29].

2.2.2. Difusión de micronadadores

Hay dos cantidades importantes para describir las propiedades de transporte de un sistema, en este caso de un sistema bacteriano: la difusión traslacional y la difusión rotacional. El estudio de las propiedades de transporte de un sistema biológico está enmarcado en la física de no equilibrio, por la autopropulsión de las bacterias [30]. En primer lugar se presenta la difusión típica en medios líquidos. Cualquier partícula en un líquido describe una trayectoria desordenada con segmentos casi rectos que se modifica por las colisiones con las moléculas del líquido. La difusión es este movimiento que se debe a las fluctuaciones térmicas. Es importante tener una noción intuitiva de la difusión. La difusión a distancias cortas es muy eficiente, en cambio a distancias largas muy ineficiente. El tiempo de la difusión va como el cuadrado de la distancia. Por ejemplo, una partícula de $1\mu\text{m}$ en agua se desplaza un cuerpo en unos pocos milisegundos, en cambio desplazarse el ancho de un dedo ($\sim 1.5\text{cm}$) puede tomarle un día. Una partícula de masa m y velocidad v_x a lo largo del eje x tiene una energía cinética $mv_x^2/2$. En promedio:

$$\left\langle \frac{mv_x^2}{2} \right\rangle = \frac{kT}{2} \quad (2.5)$$

donde $\langle \rangle$ es promedio sobre ensemble o realizaciones. Si colocamos un conjunto de partículas en una región acotada del espacio éstas se desplazarán en todas las direcciones, como por ejemplo una gota de tinta en agua. Cómo se propaga la mancha de tinta es la

difusión traslacional. En dos dimensiones el desplazamiento cuadrático medio (MSD) de un grupo de partículas muestra cuánto avanza una población, es decir cuánta área por unidad de tiempo en círculos concéntricos, separándose del origen en el que se encontraban a tiempo $t = 0$. Es un desplazamiento uniformemente circular en 2D.

Es de interés estudiar las propiedades difusivas de poblaciones de micronadadores, las cuales se explican al igual que en un sistema de partículas por el desplazamiento MSD. El coeficiente de difusión traslacional, D , está relacionado al MSD por la ecuación:

$$\langle (x(t) - x(0))^2 \rangle \propto Dt^\alpha \quad (2.6)$$

donde α es el exponente que caracteriza la evolución temporal del MSD. Para $\alpha < 1$ el proceso es subdifusivo, para $\alpha = 1$ difusivo, para $\alpha > 1$ superdifusivo y para $\alpha = 2$ es balístico. Esta ecuación vale para $t \rightarrow \infty$.

Si se considera una caminata aleatoria unidimensional, el desplazamiento cuadrático medio crece linealmente con el número de pasos. Si los pasos son todos del mismo largo δ y están separados temporalmente por τ , el número de pasos es proporcional al tiempo. De esta manera, se obtiene [20]:

$$\langle x^2 \rangle = 2Dt \quad (2.7)$$

$D = \delta^2/2\tau$ es el coeficiente de difusión y en general depende del *tamaño y forma* de la partícula, la *viscosidad* del medio en el que está inmerso y la *temperatura*.

La Ec. (2.7) se puede generalizar para cualquier dimensión:

$$\langle x^2 \rangle = 2dDt \quad (2.8)$$

donde d es la dimensión del espacio en el que se encuentra la partícula.

La difusión rotacional [20] se puede entender de manera similar que la traslacional. Si ϕ es el paso angular, análogo a δ , respecto a algún eje el cambio cuadrático medio de dirección:

$$\langle \theta^2 \rangle = 2dD_r t \quad (2.9)$$

donde como antes d es la dimensión del problema y $D_r = \phi^2/2\tau$ es el coeficiente de difusión rotacional, con unidades *radianes²/segundos*. Esto modifica la trayectoria de las partículas, haciendo que los tramos que la componen no sean totalmente rectos. La difusión de coloides autopropulsados, esto es partículas que son del orden de 1 nm-1 μ m de radio, disueltas en un medio con partículas del orden del Å, es similar a la ya vista. Si se asume que las trayectorias están compuestas por tramos rectos con tumbos infinitesimales distribuidos exponencialmente con media τ , es decir una bacteria con una estrategia de nado tipo RT (Fig. 2.2) como la *E. Coli* es posible demostrar que [20]:

$$D = \frac{v^2\tau}{3(1 - \beta)} \quad (2.10)$$

donde $\beta = \langle \cos \theta \rangle$, es decir el coseno medio del ángulo entre corridas sucesivas [31, 32]. Para un caminante aleatorio $\beta = 0$, entonces $D = v^2\tau/3$. Si las corridas son largas con respecto a su tamaño, la suposición de que los tramos son rectos no es válida ya que el efecto de la difusión rotacional es considerable. Para tener una noción más intuitiva se puede realizar el siguiente análisis. Si se considera que las corridas tienen un tiempo muy corto de duración τ' , tendiente a cero y el ángulo de cambio de dirección también es muy pequeño de manera tal que $\beta \rightarrow 0$, entonces $\cos \theta \simeq 1 - \theta^2/2$ y $1 - \beta = 2D_r\tau'$. Usando la Ec. (2.10), se llega a:

$$D = \frac{v^2}{6D_r} \quad (2.11)$$

Es posible notar que a un mayor D_r la difusión traslacional se ve afectada por la curvatura de los supuestos tramos rectos. Este efecto se verá con más detenimiento en la Sección 3.1.

2.3. Microfluídica

En los últimos años se han hecho considerables progresos en el campo de la miniaturización. Es posible realizar todo tipo de sistemas en la escala micrométrica, por ejemplo mecánicos, electromecánicos, térmicos, de fluidos, etc. Estos sistemas son usados cada vez más frecuentemente para el estudio de sistemas químicos, biológicos y en aplicaciones biomédicas. La *microfluídica* es el área de estudio de los fluidos que pueden ser simples o complejos, mono o multifásicos, que se encuentran en sistemas microscópicos artificiales, es decir dispositivos creados con nuevas tecnologías [33]. La expansión del campo de la microfluídica ha abierto las puertas a muchas áreas. La fabricación de dispositivos de laboratorios en un chip (*Lab on a chip*) ha dado la posibilidad por ejemplo de detectar, controlar el transporte, mezclar y caracterizar en un único dispositivo sistemas biológicos.

Cuando se analizan las propiedades físicas en sistemas de escala micrométrica, es importante introducir el concepto de las leyes de escala [34]. Estas expresan la variación de una cantidad física con el tamaño l de un dado sistema, dejando otras cantidades constantes, como ser el tiempo, la presión, la temperatura, etc. Por ejemplo si se consideran las fuerzas volumétricas, como la gravedad o la inercia, y las fuerzas superficiales como la tensión superficial o esfuerzos de corte, la ley de escala se escribe como:

$$\frac{\text{Fuerzas superficiales}}{\text{Fuerzas volumétricas}} \propto \frac{l^2}{l^3} = l^{-1} \xrightarrow{l \rightarrow 0} \infty \quad (2.12)$$

Esto implica que cuando se trabaja en la micro escala las fuerzas volumétricas, que prevalecen en la vida cotidiana, se vuelven menos importantes que las superficiales. Por esta razón la intuición física del problema debe ser modificada. Es por esto que las

predicciones sobre el comportamiento de bacterias en medios confinados y en sistemas microfluídicos de este trabajo serán desarrolladas con cuidado.

En este capítulo se presenta el modelo utilizado para describir la física del problema y los métodos numéricos para resolverlo.

3.1. Modelo fenomenológico

En la literatura se encuentran diferentes modelos [31, 35] de la dinámica bacteriana. A partir de estos, en publicaciones del grupo de trabajo en la FaMAF [5, 6, 25, 36] se construyó un modelo fenomenológico más realista que describe la dinámica de bacterias con una estrategia de nado tipo RT en dos dimensiones teniendo en cuenta las características principales de diferentes especies. El modelo representa a cada bacteria como un disco de radio a . La posición del centro de masa de cada bacteria en el plano xy está dada por el vector \vec{r}_i y la dirección de movimiento forma un ángulo θ con el eje x , es decir $\vec{v}_i = |\vec{v}_i|[\cos(\theta)\hat{i} + \sin(\theta)\hat{j}]$.

De la Ec. (2.4) se obtiene la ecuación de movimiento sobreamortiguado, en la que domina la viscosidad, para una bacteria bajo confinamiento es:

$$\sum_j \vec{F}_j = -\gamma \frac{d\vec{r}_i}{dt} + \vec{F}_i^M + \vec{F}_i^{SW} + \vec{F}_i^{SS} = 0 \quad (3.1)$$

donde $-\gamma \frac{d\vec{r}_i}{dt}$ es la fuerza de fricción. De esta manera tenemos:

$$\gamma \frac{d\vec{r}_i}{dt} = \vec{F}_i^M + \vec{F}_i^{SW} + \vec{F}_i^{SS} \quad (3.2)$$

donde γ es la constante de amortiguamiento del medio. La Ec. (3.2) es la ecuación

de evolución de microorganismos autopropulsados en un fluido newtoniano sin flujo externo. La fuerza que actúa sacando al sistema del equilibrio es la autopropulsión de la bacteria, \vec{F}_i^M . El lado derecho es la suma de las fuerzas que actúan sobre la bacteria. La fuerza del motor $\vec{F}_i^M \sim |\vec{v}_i|$, la fuerza de interacción entre el nadador y las paredes \vec{F}_i^{SW} , y la interacción entre nadadores \vec{F}_i^{SS} . Ahora que se conoce la física del problema se explica con más detenimiento las fuerzas involucradas:

Fuerza del motor: Es la fuerza de autopropulsión del micronadador. A bajo número de Reynolds, como dijimos antes prácticamente no hay efecto de la inercia, por lo que los nadadores se mueven a una velocidad constante, directamente proporcional al módulo de la fuerza de su motor, cuando las bacterias no interactúan entre sí o con las paredes. El motor es el que da la característica o estrategia de nado a la bacteria, es decir contiene las propiedades biológicas del problema que queremos describir de manera realista. Por ejemplo no se describe de la misma manera el motor de un espermatozoide que “cabecea” que el de una bacteria. Esta fuerza saca al sistema del equilibrio. La dificultad en un sistema biológico es que cada motor es diferente, por lo que la fuerza del motor no es uniforme para toda la población. Por esta razón el problema es de sistemas complejos fuera del equilibrio, al que se suma la interacción entre ellas y el confinamiento, como se describirá a continuación.

Interacción con las paredes: Está dada por una fuerza de exclusión, repulsiva de corto alcance, perpendicular a la pared. La fuerza que sufre la bacteria i por la pared k es:

$$\vec{F}_i^{SW} = f^{SW} \left[1 - \frac{|\vec{r}_{ik} \cdot \hat{n}_k|}{a} \right]^\epsilon \Theta \left(1 - \frac{|\vec{r}_{ik} \cdot \hat{n}_k|}{a} \right) \hat{n}_k \quad (3.3)$$

donde f^{SW} es la máxima intensidad de la fuerza, $\epsilon = 0.1$, Θ es la función escalón, \hat{n}_k es el vector normal a la pared, \vec{r}_{ik} es la distancia entre el centro de masa de la bacteria y la pared k como se muestra en la Fig. 3.1(a) y a es la suma del radio de la bacteria y el semiancho de la pared. En la Fig. 3.2 se puede ver cómo es el módulo de la fuerza para diferentes valores de ϵ en función a la distancia entre la bacteria y la pared. Se eligió ese valor de ϵ ya que se busca que la pared sea rígida pero se deben evitar los problemas numéricos causados por la discontinuidad en la derivada. Si $\epsilon = 0$ es una pared dura o impenetrable, por lo cual la interacción con $\epsilon = 0.1$ es blanda.

Interacción nadador-nadador: Al igual que la interacción con las paredes, es una fuerza repulsiva blanda. La fuerza entre la bacteria i con la bacteria k es:

$$\vec{F}_{ik}^{SS} = f^{SS} \left[1 - \frac{r_{ik}}{2r_b} \right]^\epsilon \Theta \left(1 - \frac{r_{ik}}{2r_b} \right) \hat{r}_{ik} \quad (3.4)$$

donde r_b es el radio de la bacteria y en el caso de la *Bradyrhizobium diazoefficiens* $r_b = 0.5\mu\text{m}$, r_{ik} es la distancia entre los centros de masa de las bacterias i, k , $\epsilon = 0.1$ al igual que en la fuerza de interacción con las paredes.

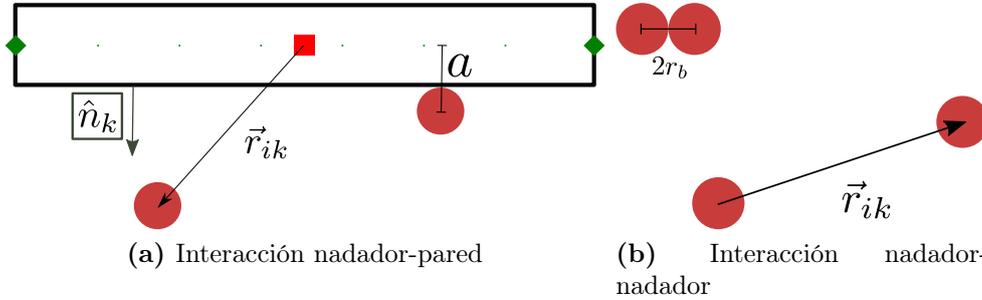


Figura 3.1: Representación esquemática de las fuerzas de interacción. a es la distancia entre el centro de la pared y el centro de masa de la bacteria y r_b es el radio del disco que representa a la bacteria.

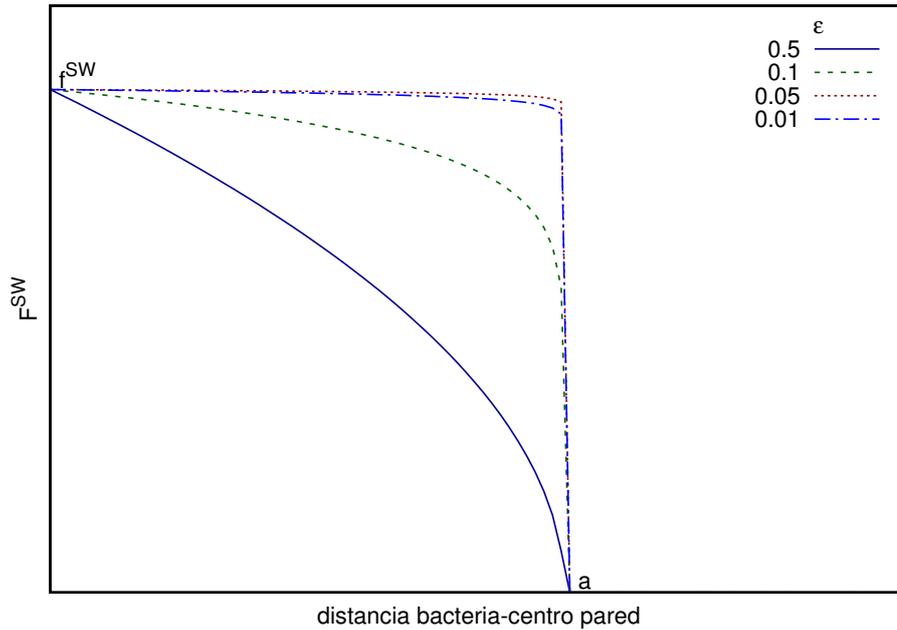


Figura 3.2: Curva de la función que gobierna la interacción con las paredes para diferentes exponentes ϵ .

Ahora que las principales fuerzas del sistema se encuentran modeladas fenomenológicamente es posible describir su velocidad, la cual se despeja de la Ec. (3.1). Para cada bacteria el módulo de su velocidad $|\bar{v}|$ es constante. Las bacterias modifican la dirección de movimiento, $\Delta\theta$, por los cambios de dirección $\Delta\phi$ (ángulo entre la dirección de movimiento previa y la nueva) y por el coeficiente de difusión rotacional D_r , y

se puede expresar como:

$$\Delta\theta = \Delta\phi\chi + \nu\sqrt{2D_r\Delta t}(1 - \chi) \quad (3.5)$$

donde χ es una variable de estado, que vale 0 o 1. En nuestro modelo hay dos fuentes de aleatoriedad presentes, los cambios de dirección $\Delta\phi$, y el ruido del motor. $\Delta\phi$ es variable gaussiana centrada en el valor medio del módulo del cambio de dirección $|\overline{\Delta\phi}|$, que por simplicidad llamaremos ϕ , con ancho σ_ϕ , y se fija la misma probabilidad de girar hacia la derecha ($-\Delta\phi$) o a la izquierda ($+\Delta\phi$). El ruido del motor es $\nu\sqrt{2D_r\Delta t}(1 - \chi)$ y ν es una variable gaussiana elegida al azar, con media 0 y desviación estándar 1. Por las fuentes de aleatoriedad el modelo es estocástico. La diferencia con los modelos anteriores es que la parte estocástica del modelo se introduce en el ángulo de la velocidad, no como en el caso del modelo de Wan *et al.* [35] que implementa un ruido blanco en el módulo de la velocidad. En nuestro modelo el ruido del motor es aplicado en cada Δt , que es la discretización numérica de la ecuación de evolución del sistema Ec. (3.2). Si la difusión rotacional $D_r = 0$ los tramos de las corridas son totalmente rectos. Los cambios de dirección $\Delta\phi$ suceden cada un cierto τ_i que corresponde a una variable exponencial con media τ , que determina el valor de χ .

En las simulaciones de este estudio siempre se trabaja en sistemas diluidos, de manera tal que la interacción entre bacterias es muy chica. Es por ello que siempre se trabaja con:

$$\varphi = \frac{A_{bacterias}}{A_{libre}} < 0.08 \quad (3.6)$$

donde A_{libre} es el área disponible para el movimiento de las bacterias en el dispositivo, y el $A_{bacterias}$ es el área total ocupada por la población de bacterias en el dispositivo. De esta manera trabajamos con densidades de micronadadores muy bajas, al igual que en los experimentos, en los que se trabaja con una densidad de $10^4 - 10^7$ cel/ml. De esta manera, si se inoculan las bacterias en un sector, éstas solo ocupan el 8% del espacio, es decir la mayor parte del sistema está vacío, de forma tal que la probabilidad de interacción entre las bacterias es despreciable.

En busca de representar una población de forma más realista, el módulo de la velocidad de cada partícula está asignada aleatoriamente de acuerdo a una distribución normal con media \bar{v} y desviación estándar σ_v y se mantiene constante durante toda la simulación [4]. De esta manera el motor de cada bacteria es diferente. Los cambios de dirección se asumen instantáneos, $\Delta\phi$ es la modificación del ángulo respecto a la dirección previa de movimiento, como se esquematiza en la Fig. 2.2(a).

Como se ha dicho anteriormente, en estudios recientes se ha registrado que las estrategias de nado de las *Bradyrhizobium diazoefficiens* es muy heterogénea, de manera tal que para poder reproducir de manera realista una población se debe tener en cuenta esta heterogeneidad. Es por esto que por primera vez se incluyó en las simulaciones

los parámetros de movilidad de cada estrategia por separado y ponderadas por el peso de cada una (Fig. 2.4). Los valores del ángulo medio de cambio de dirección ϕ , el tiempo medio de cambio de dirección τ y la velocidad media \bar{v} , fueron obtenidos de los datos experimentales de las trayectorias provistos por el grupo de A. R. Lodeiro [18], y los valores para cada tipo de estrategia de nado y cepa bacteriana se verán con detenimiento en la Sección 4.1.

Con el fin de tener una noción más intuitiva de cómo afectan los parámetros a la dinámica de nado de las bacterias, es importante analizar las trayectorias. En la Fig. 3.3 se presenta en (b), (e) y (h) trayectorias con estrategia de nado lineal, reportada en Ref.[18], no reproducida antes. En la primer fila se varía únicamente el tiempo característico de cambio de dirección τ , dejando los otros parámetros ϕ y D_r fijos. Para τ menor las trayectorias son más *brownianas* que para τ mayores. En la segunda fila se varía el ángulo medio de cambio de dirección ϕ , es decir la persistencia. Claramente a medida que se aumenta el ϕ los cambios de dirección (CD) son más abruptos Fig. 3.3(h), al estilo de las trayectorias RR-RRF vistas en la Fig. 2.3. En la última fila se varía el coeficiente de difusión rotacional D_r . Si se compara la Fig. 3.3(g) con la Fig. 3.3(i) es evidente que el coeficiente de difusión rotacional modifica la curvatura de las trayectorias. Para notar esto es necesario analizar el radio de un círculo que coincida en parte con la trayectoria. A medida que aumenta D_r el radio disminuye. También cabe resaltar que un coeficiente de difusión rotacional $D_r=0.01\text{rad}^2/s$ que es el caso de la Fig. 3.3(g) genera trayectorias con tramos casi rectos, es decir el ruido propio del motor es muy pequeño. Se observa que un tiempo característico de CD del orden de $\tau =23.5\text{s}$ es análogo a imponer un coeficiente de difusión rotacional $D_r=0.01\text{rad}^2/s$, como así también imponer un tiempo característico muy pequeño comparado a la velocidad media, $\tau=0.235\text{s}$, es análogo a aumentar el coeficiente de difusión rotacional $D_r=1\text{rad}^2/s$.

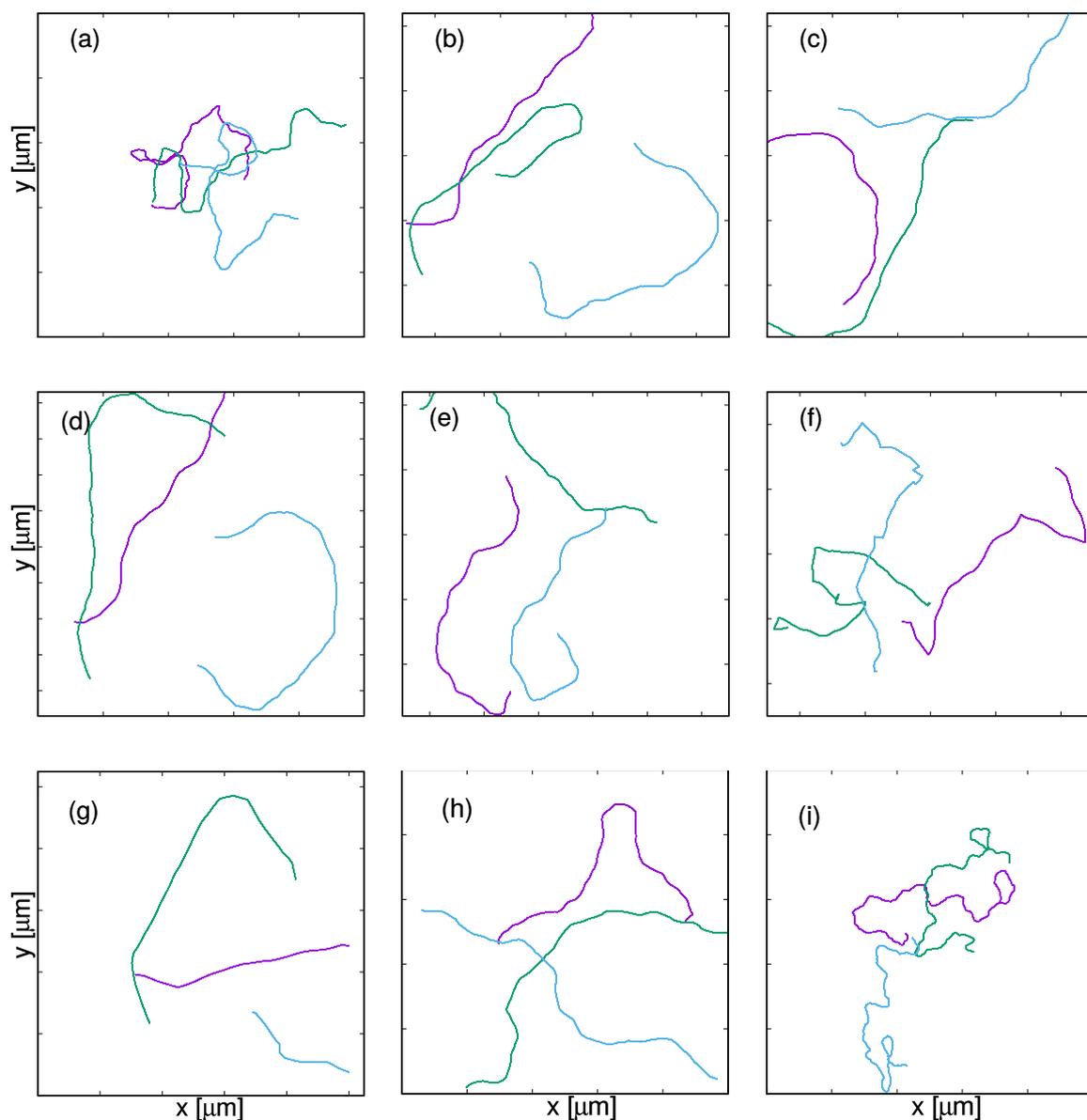


Figura 3.3: (Color en pdf) Figuras (b), (e) y (h) (la columna central) son simulaciones de WT con una estrategia de nado lineal, con $\tau=2.35\text{s}$, $D_r=0.1\text{rad}^2/\text{s}$ y $\phi=25.39^\circ$. En (a) $\tau=0.235\text{ s}$, en (c) $\tau=23.5\text{ s}$. En (d) el $\phi=0\pm 8.03$, en (f) $\phi=95\pm 8.03$. En (g) $D_r=0.01\text{rad}^2/\text{s}$ y en (i) $D_r=1\text{rad}^2/\text{s}$. En todas las imágenes cada tic son $100\mu\text{m}$. Todas son trayectorias de 20s de duración.

3.2. Modelos de suelos porosos

Gran parte de los micronadadores se encuentran en medios reducidos y su movilidad se ve afectada por obstáculos. El ambiente natural de las bacterias *Bradyrhizobium diazoefficiens* es el suelo, que se puede considerar como un medio con obstáculos o un medio poroso. En busca de poder estudiar en el laboratorio las propiedades en el suelo, se diseñan microdispositivos que imiten un suelo poroso. La diversidad de

suelos y condiciones como por ejemplo la cantidad de agua, el tamaño de los poros, la distribución de estos, etc muestran la complejidad del análisis de los suelos. En este trabajo al igual que en los experimentos se trabaja a campo lleno, es decir con el espacio lleno de medio acuoso. Como ya explicamos, nuestras simulaciones están realizadas en dos dimensiones (2D). Esto es al igual que en experimentos de microfluídica, un confinamiento en la dirección z , es decir las bacterias tienen disponible un espacio de profundidad del orden de su tamaño en la dirección vertical y en las otras dos dimensiones hay confinamiento, pero del orden de $1000 \mu\text{m}$ o mayor. Un parámetro relevante para caracterizar el medio poroso es el ϕ_{geo} (Ec. (3.7)) que es la densidad de defectos, esto es el área que ocupan los obstáculos en el medio, en relación al área total:

$$\phi_{geo} = \frac{A_{\text{obst}}}{A_{\text{total}}} \quad (3.7)$$

En la Fig. 3.4 se puede ver una comparación entre dos valores de este parámetro, un caso en el que solo el 10% del área está ocupada por los obstáculos y otro la mitad.

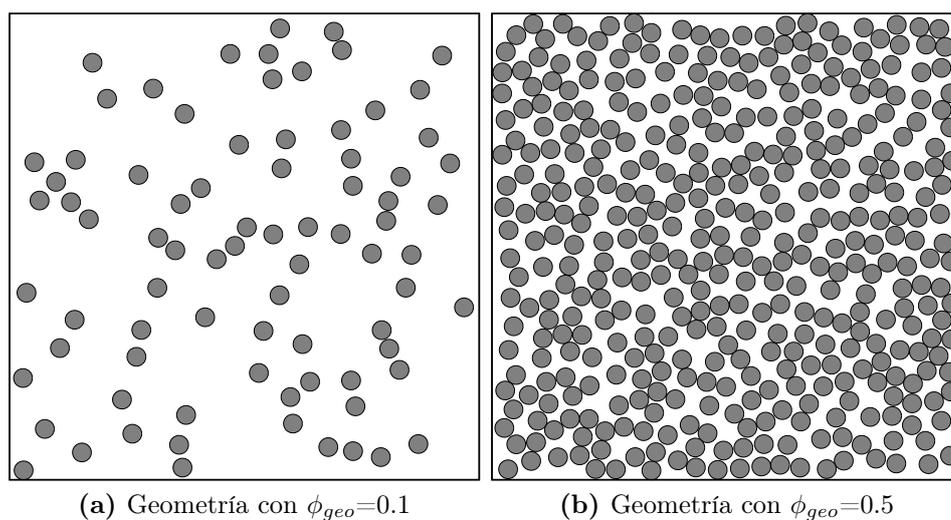


Figura 3.4: Esquema para entender el ϕ_{geo} .

Como ya se ha dicho, los micronadadores y en particular las bacterias tienen una tendencia al nado paralelo a las paredes. Es por esto que un parámetro importante es la cantidad de superficie de pared sólida hay en el medio, es decir la densidad de pared, que está definida como:

$$\text{densidad de pared} = \frac{\text{long de pared}}{\text{área total}} \quad (3.8)$$

Con el fin de imitar un suelo poroso en 2D, se realizaron diferentes modelos. Uno de ellos es generar una caja de $L_x \times L_y$ con defectos circulares distribuidos aleatoriamente,

todos con igual radio. Esto se hizo con el código desarrollado por I. Berdakin [36], H. Moyano [25] y M. Brito.

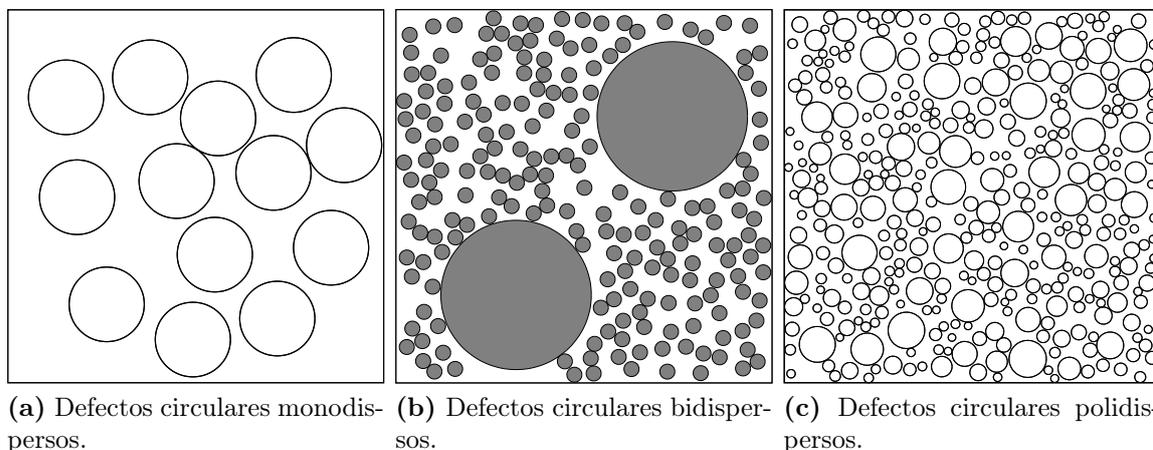


Figura 3.5: Geometrías utilizadas en las simulaciones.

En busca de un suelo más realista y en orden de complejidad realizamos simulaciones con defectos circulares, con radios monodispersos, bidispersos y polidispersos. Para ello se modificó el código anterior. En todos los casos se define de antemano la densidad de defectos y sus radios.

3.3. Simulaciones

Como dijimos antes, se realizaron cálculos numéricos de la dinámica bacteriana con medios de diversas geometrías, con el código desarrollado en trabajos anteriores [25, 36]. La ecuaciones de Langevin a resolver son:

$$\gamma \dot{x}_i = [\vec{F}_i^M + \vec{F}_i^{SW} + \vec{F}_i^{SS}] \quad (3.9)$$

$$\Delta\theta_i = \Delta\phi\chi + \nu\sqrt{2D_r\Delta t}(1 - \chi) \quad (3.10)$$

en donde x_i es la posición y $\Delta\theta_i$ es el ángulo de la velocidad de la i -ésima bacteria con respecto al eje x . Los parámetros involucrados en la fuerza del motor dependen de cada cepa, no son ajustables dado que se obtienen de los datos experimentales. El valor utilizado de la máxima fuerza de interacción con las paredes y los micronadadores $f^{SW} = 300$ y el de la interacción entre nadadores es $f^{SS} = 200$. El coeficiente de frenamiento utilizado es $\gamma = 1$. Estos valores de intensidad de fuerzas fueron analizados exhaustivamente en Ref. [25]. En todos los casos la evolución de las ecuaciones en \dot{x} se realiza con el método de Runge-Kutta 4, con condiciones iniciales al azar, con un paso temporal $\Delta t = 0.001$ s [37], y la evolución en el ángulo de la velocidad se realiza con el método de Euler. El valor de χ se sortea en cada paso temporal, y su valor se define

con una variable aleatoria uniformemente distribuida entre 0 y 1: si esta es menor a $1/\tau$, χ vale 1 y en caso contrario vale 0.

En todos los casos, salvo que se aclare, se simula una hora de tiempo real (3600 s). Se eligió ese tiempo debido a que las probabilidades de reproducción y muerte de las bacterias es baja, de manera tal que el número de bacterias en la población es constante en los experimentos de laboratorio. En los casos de la geometría con defectos circulares, se aplicaron condiciones periódicas de contorno (CPC) [37], ver Fig. 3.6.

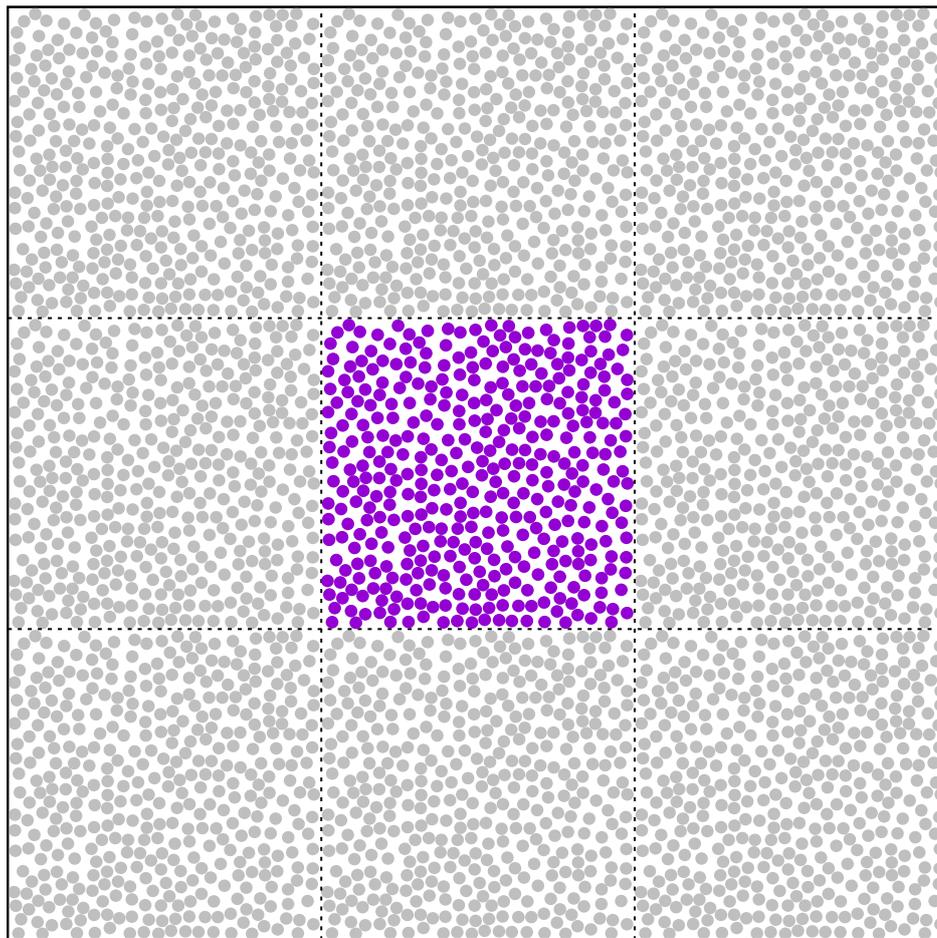


Figura 3.6: Cómo es la geometría con CPC. Los puntos violetas son los correspondientes a los defectos de la celda unidad, que se repite generando un medio pseudoinfinito.

Para ello se modificó el código que no tenía aplicadas las CPC. Esto consiste en modificar la posición de las bacterias, de manera tal en la que si cruza la pared ficticia que hay en el límite de la celda unidad, pasa para el otro lado. De esta manera la densidad de bacterias en el medio es constante. Esto puede no ser realista, si se inoculaba en un suelo sin población bacteriana nativa ya que es posible que la densidad de bacterias no sea homogénea en el suelo. Sin embargo nuestro objetivo es comparar los resultados numéricos con los experimentales en laboratorio bajo condiciones controladas.

La aplicación de las CPC consiste en la actualización de la posición bajo determi-

nadas condiciones. Se tiene la posición inicial de una partícula (x_0, y_0) , y en un tiempo Δt , (x_1, y_1) , calculada por la evolución física temporal. El desplazamiento “real” [37] de la partícula en la dirección x es $dx = x_1 - x_0$. Así, si la celda unidad es rectangular, de lados L_x y L_y , y el vértice inferior izquierdo se encuentra en $(0,0)$, la posición actualizada, x_1 es:

$$\text{si } x_1 < 0 \Rightarrow x_1 = x_1 + L_x, \quad (3.11)$$

$$\text{si } x_1 > L_x \Rightarrow x_1 = x_1 - L_x \quad (3.12)$$

De manera análoga se aplican en la coordenada y . Es importante tener en cuenta que el desplazamiento “real” dx puede no coincidir luego de aplicar las CPC con $x_1 + x_0$.

Siempre se utilizó una celda unidad de $100 \times 100 \mu\text{m}^2$, a menos que se aclare lo contrario. Es un buen tamaño si los defectos son pequeños, y como primer estudio se comparan los resultados usando esta celda unidad. Fue necesario aplicar CPC debido a que necesitamos un medio pseudoinfinito sin confinamiento para poder estudiar las propiedades de transporte. No aplicarlas implicaba generar una geometría del medio en un espacio del orden de $30 \mu\text{m}/\text{s} \times 1h$, lo que implica una caja de al menos $10800 \times 10800 \mu\text{m}^2$ (para que al menos demoren una hora en llegar de una pared a la otra). Si se introducen defectos en esa caja, el tiempo de cómputo es ridículamente alto. La totalidad de las simulaciones se realizaron en el *cluster* perteneciente al Grupo de la Teoría de la Materia Condensada de FaMAF, que consta de un *frontend* Core2 Quad y 21 nodos, su mayoría i7 con diferente número de Cores y uno de ellos con 3 tarjetas GPU NVIDIA. El tiempo de cómputo se puede estimar sabiendo que para una geometría con ~ 400 obstáculos (que corresponde a una densidad de 0.5 con círculos de radio $2 \mu\text{m}$ en un cuadrado de $100 \times 100 \mu\text{m}^2$) una realización de una hora demora en el orden de 23 hs de cómputo. Si se quiere la misma densidad de defectos en un cuadrado de $10800 \times 10800 \mu\text{m}^2$ se requiere en el orden de 4.642.272 obstáculos, lo que implica un tiempo de cómputo de ~ 11200 días, es decir unos 30 años. En el caso de los experimentos con dispositivos de microfluídica, sí hay un confinamiento debido a las dimensiones del dispositivo, que pueden ir de $500 \times 500 \mu\text{m}^2$ a los milímetros o algunos centímetros. En el caso de dispositivos tipo “cinta” se evidencia el confinamiento pero sólo en una dirección. El tiempo de cómputo se puede reducir considerablemente si se aplicara *linkedlist* [37] para los obstáculos, que sí está aplicado en el código para la interacción entre bacterias pero no para la interacción con los obstáculos. La mejora del código está prevista para la continuación e inicio del doctorado. Debido al proceso de trabajo, en estudios previos del grupo [25] se utilizaban geometrías de menor tamaño, (100, 200 μm de largo de caja) y no era necesaria la aplicación de este método.

Se introdujeron un total de 500 bacterias en cada caso para todas las densidades de defectos usadas, con la proporción adecuada de cada estrategia de nado correspondiente

a cada cepa, Fig. 2.4. Las cantidades calculadas son: las trayectorias y el desplazamiento cuadrático medio (MSD). También se calcula indirectamente el coeficiente de difusión traslacional a partir de las curvas de MSD en función al tiempo.

En el caso de los defectos circulares el MSD se calculó para todo Δt , considerando el desplazamiento total “real” de las bacterias, no su posición dada por las CPC, como se explicó anteriormente. Se promedia en un número de realizaciones variando las condiciones iniciales de las bacterias. El coeficiente D se calcula con la Ec. (2.6), realizando un ajuste lineal, de la curva $\log(\text{MSD})$ a partir de $t_0 = 100\text{s}$ ya que el cálculo es válido solo a tiempos largos, Ec. (2.6), es decir $\log(\text{MSD}) = \log(4D) + \alpha \log(t)$. De esta manera, la ordenada al origen es el logaritmo del coeficiente de difusión y la pendiente es el exponente α , que caracteriza el tipo de movilidad, como se explica en la Sección 2.2.2. El coeficiente D depende de t_0 , ya que como veremos en la Sección 4.2 el MSD presenta dos regímenes. En todos los casos, salvo que se aclare se utiliza un $t_0 = 100\text{s}$, ya que es el punto en el cual termina la transición entre los dos regímenes y para garantizar que se utilicen al menos dos décadas para fitear. Este valor puede cambiar según el set de parámetros de las simulaciones, pero no se modifica si se hacen simulaciones con diferentes condiciones iniciales sobre las bacterias. Si bien las simulaciones se pueden realizar por más tiempo, es importante tener en cuenta la curva de nacimiento y muerte de las bacterias ya que el número de células si se simula por más tiempo puede no ser constante, razón por la cual se debe incluir un número variable de partículas en las simulaciones.

Dinámica libre y propiedades de transporte

En este capítulo se estudian las estrategias de nado de las bacterias y las propiedades de transporte de poblaciones de bacterias sin confinamiento ni obstáculos. Es importante conocer las propiedades colectivas a tiempos largos y el detalle de su movilidad, para luego entender cómo se modifican en diferentes medios. En primer lugar se corrobora que los parámetros de las simulaciones son los adecuados para reproducir las estrategias de nado de las bacterias observadas por colegas biotecnólogos. Luego se estudia el desplazamiento cuadrático medio y el coeficiente de difusión de poblaciones bacterianas.

Teniendo en cuenta los parámetros de movilidad de cada cepa, se espera que la cepa salvaje (WT) y la ΔlafA , que sólo tiene el sistema flagelar subpolar, posean coeficientes de difusión similares, y la cepa ΔfliC coeficiente menor. Esta suposición está dada por las velocidades medias \bar{v} de cada cepa. La cepa salvaje y la que solo posee el flagelo subpolar ΔlafA tienen velocidades similares, en cambio la ΔfliC tiene una velocidad menor [18], como se presenta en la Tabla 2.1. No hay que pasar por alto que las estrategias de nado no sólo contemplan la velocidad media, sino que también es relevante la persistencia en la dirección de movimiento de cada bacteria. En principio la velocidad media domina en difusión traslacional, pero sabemos que la persistencia favorece la difusión [4, 19]. La combinación de los parámetros de movilidad en la influencia en las propiedades de transporte pueden resultar muy complejas y es lo que se analiza en este capítulo.

4.1. Trayectorias

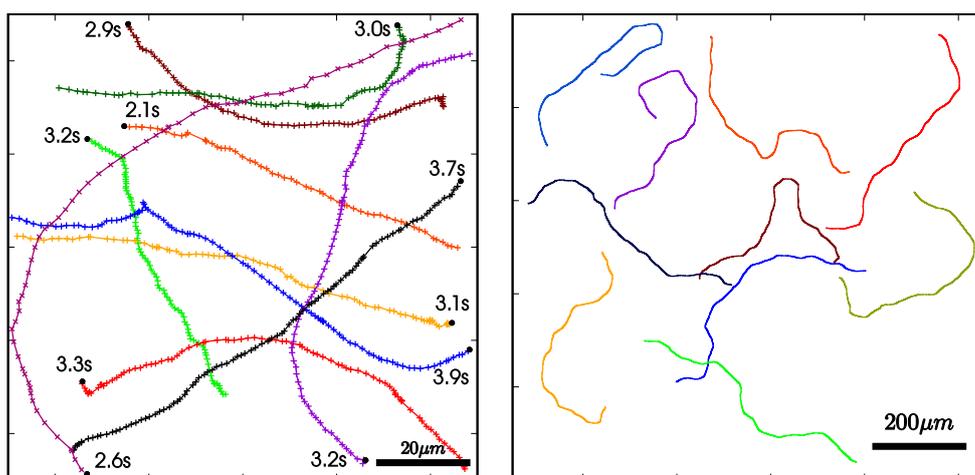
En primer lugar, trabajamos en reproducir de manera más realista las trayectorias (tracks) descritas por las bacterias. Es importante notar que las estrategias de nado de las bacterias son diversas. En ese sentido se realizó un análisis exhaustivo de los datos experimentales por A. R. Lodeiro y su grupo [18] que trabajan hace muchos años con este tipo de bacterias [38, 39]. El análisis de los datos experimentales biológicos es muy dificultoso por el volumen de datos y los softwares para analizar las trayectorias. En muchos casos estos softwares introducen datos espurios por la detección automática de las posiciones de las bacterias en los videos. Es por esto que es necesario hacer un estudio manual de cada track para poder tener datos fehacientes. Ya hemos visto en la Fig. 3.3 cómo afecta cada parámetro en la forma de las trayectorias. Los parámetros utilizados en las simulaciones se presentan en la Tabla 4.1. Estos fueron obtenidos por un análisis de los datos de trayectorias individuales de las tres cepas obtenidos por A. R. Lodeiro. De esa manera se obtuvo el tiempo característico de cambio de dirección (CD), τ , y el ángulo medio de CD, ϕ . El coeficiente de difusión rotacional, D_r fue determinado a través de simulaciones, comparando cualitativamente la forma de las trayectorias simuladas con las experimentales, debido a que es complicado determinarlo de los tracks experimentales, que son muchos pero de poca duración, $\lesssim 6s$, y el D_r es una propiedad que se nota a tiempos largos. Con el fin de reproducir las trayectorias con simulaciones computacionales comparamos los datos experimentales con las trayectorias simuladas. Dadas las particularidades de cada estrategia de nado, no es posible reproducirlas con un solo set de parámetros en las simulaciones. Es importante para poder reproducir de manera realista y comprender las propiedades de transporte en diversos medios, tener un conjunto de parámetros adecuado para las simulaciones.

Cepa	Estr. de nado	$v[\mu\text{m}/\text{s}]$	τ [s]	ϕ [°]	$D_r[\text{rad}^2/\text{s}]$
WT	Lineal	28.8 ± 1.3	2.35	25.39 ± 8.03	0.1
WT	RR-RRF	28.8 ± 1.3	2.35	95 ± 38	0.1
Δ lafA	Lineal	26.9 ± 2.0	2.74	27.44 ± 2.6	0.1
Δ lafA	RR-RRF	26.9 ± 2.0	2.74	98 ± 35	0.1
Δ fliC	Rugosa	17.2 ± 0.8	5.7	52 ± 15	0.05

Tabla 4.1: Parámetros utilizados en las simulaciones

En las siguientes figuras se presenta una comparación entre las trayectorias obtenidas de experimentos en un medio acuoso sin obstáculos, y las trayectorias simuladas. Las posiciones de las bacterias se obtuvieron de los datos provistos por A. R. Lodeiro, con videos a 30 fps, las cuales están graficadas con puntos.

En la Fig. 4.1(a) se presentan algunas trayectorias experimentales de la cepa salvaje. Estas están catalogadas como lineales ya que presentan pocos cambios de dirección (CD). Es importante notar que la duración de cada trayectoria es del orden de 3s



(a) Trayectorias experimentales de *Que- las et. al.* Ref[18]. Al lado de cada track está la duración.

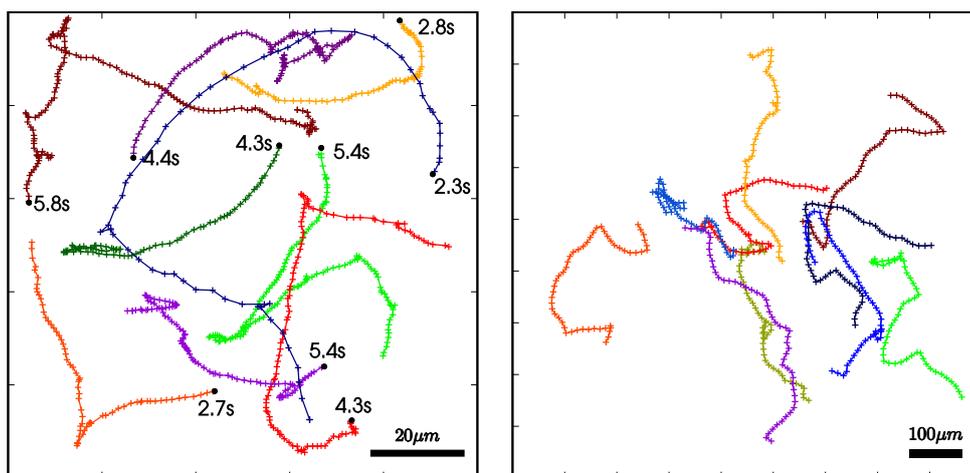
(b) Trayectorias simuladas de 20 s de duración.

Figura 4.1: (Color en pdf) Comparación entre experimento y simulación para trayectorias lineales de la WT. Los círculos negros son referencia al tamaño de una bacteria.

y el tiempo característico de cambio de dirección es $\tau = 2.35s$. Es posible mejorar la precisión del valor del τ si se pudiese seguir a las bacterias por tiempos más largos sin que se vayan del plano focal. Se nota la diferencia de velocidades entre bacterias prestando atención a la distancia entre puntos consecutivos.

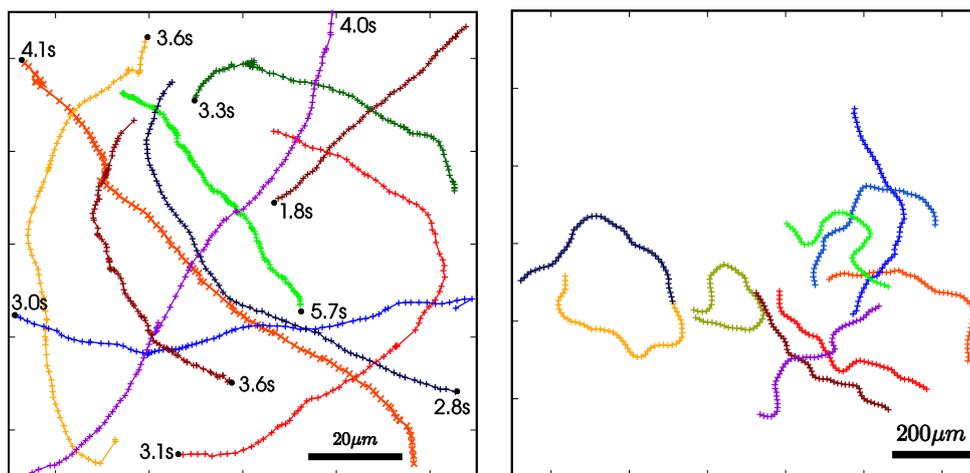
Si se comparan estas trayectorias con las de la Fig. 4.2, que están catalogadas como RR-RRF, se puede pensar que las trayectorias lineales son los tramos sin CD de las RR-RRF. Por esta razón ambos tipos de trayectorias tienen el mismo tiempo característico de CD, τ , como se presenta en la Tabla 4.1. Sin embargo se nota una diferencia en los ángulos de CD ϕ , que son más abruptos en el caso de RR-RRF. Es importante resaltar que los cambios de dirección deben ser tales que la distancia recorrida antes y después de cada CD sea mayor al orden del tamaño de la bacteria, de manera tal que no se pueden asociar al ruido propio de la forma de adquisición y análisis de datos. Cabe destacar que las trayectorias simuladas que se presentan en Fig. 4.1(a) tienen tramos rectos en la misma escala que los experimentos, pero si se achica la escala, se notan curvas. Esto se debe al efecto del coeficiente de difusión rotacional D_r .

En la Fig. 4.3 se muestra la comparación entre experimento y simulación de las trayectorias lineales y en la Fig. 4.4 de las trayectorias RR-RRF, correspondientes a la cepa que solo posee el flagelo subpolar, $\Delta lafA$. Cualitativamente son similares a las de la cepa salvaje, ya que individualmente no se percibe diferencia entre ellas. Esto se debe a que los parámetros de la movilidad son semejantes, mostrados en la Tabla 4.1. Sin embargo es relevante la dinámica poblacional, que se verá en la siguiente sección, para estudiar y comprender las propiedades de transporte, ya que cada cepa tiene una preferencia diferente a los tipo de trayectoria como se presentó en la Fig. 2.4.



(a) Trayectorias experimentales RR-RRF Al lado de cada track está la duración. Los círculos negros son referencia al tamaño de una bacteria.
 (b) Trayectorias simuladas de 20 s de duración. La escala es 10 veces mayor que la de las trayectorias experimentales.

Figura 4.2: (Color en pdf) Comparación entre experimento Ref[18] y simulación para trayectorias RR y RRF de la WT



(a) Trayectorias experimentales Δ lafA. Al lado de cada track está la duración.
 (b) Trayectorias simuladas de 20 s de duración. La escala es 10 veces mayor que la de las trayectorias experimentales.

Figura 4.3: (Color en pdf) Comparación entre experimento Ref[18] y simulación para trayectorias lineales de la Δ lafA. Los círculos negros son referencia al tamaño de una bacteria.

En cuanto a las trayectorias de la cepa que solo presenta el sistema flagelar lateral, que tiene una velocidad media menor que las anteriores, se observa en la Fig. 4.5(a) que los puntos que componen al track están muy cerca entre sí y que hay una tendencia lineal pero con un ruido del orden de pocos cuerpos, es decir que es notorio en comparación a su tamaño y por lo cual es una trayectoria catalogada como rugosa. En una escala microscópica se ve una caminata aleatoria del orden de su tamaño pero

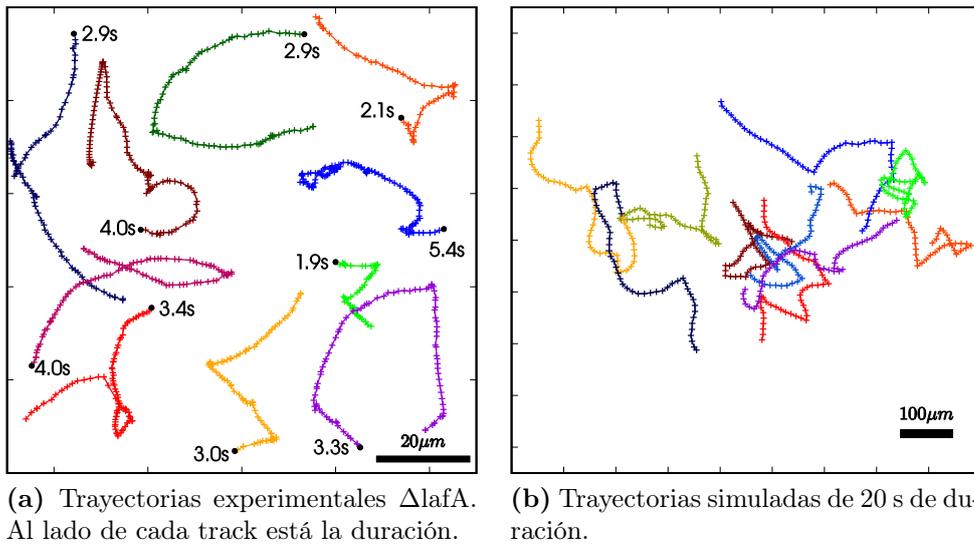


Figura 4.4: (Color en pdf) Comparación entre experimento Ref[18] y simulación para trayectorias RR-RRF de la Δ lafA. Los círculos negros son referencia al tamaño de una bacteria.

que logra avanzar, es decir una caminata aleatoria con sesgo. Esta bacteria difunde más que un caminante aleatorio puro, dado que tiene un ángulo medio de cambio de dirección menor. Es importante notar que si bien esta bacteria es más lenta que las otras analizadas, la forma de las trayectorias es cualitativamente similar a las trayectorias lineales. A pesar de que la longitud temporal de los *tracks* experimentales no

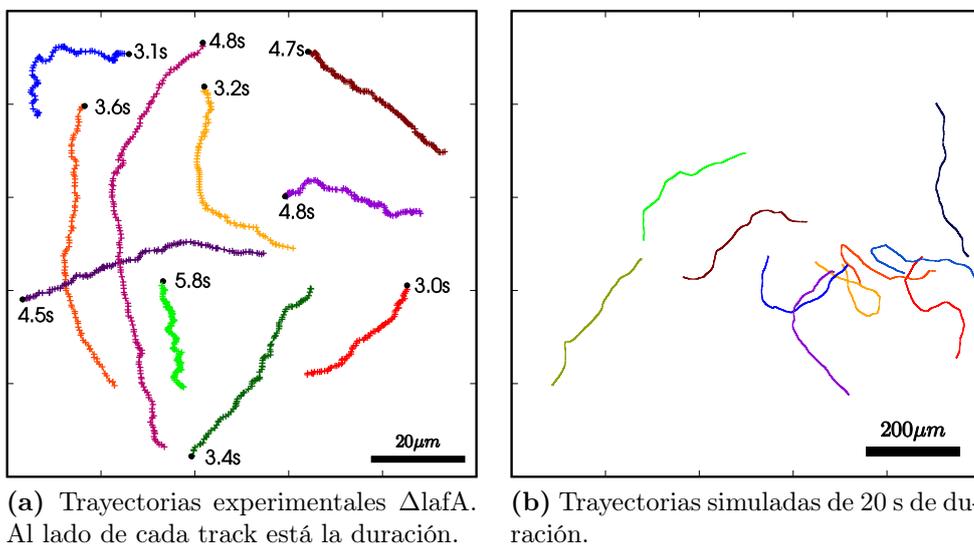


Figura 4.5: (Color en pdf) Comparación entre experimento y simulación para trayectorias de la Δ fliC. Los círculos negros son referencia al tamaño de una bacteria.

permite una comparación numérica se ha logrado un buen acuerdo cualitativo en la visualización de las trayectorias experimentales y simuladas, lo cual permite confiar en los siguientes análisis sobre las propiedades de transporte.

4.2. Difusión bacteriana

Con el fin de entender cómo son las propiedades de transporte de las bacterias en el suelo, en primer lugar nos centramos en comprender cómo es la difusión de una población en un medio acuoso libre, es decir sin obstáculos. Es por esto que realizamos simulaciones en una caja cuadrada sin obstáculos con condiciones periódicas de contorno (CPC), con una celda de simulación de $300 \times 300 \mu\text{m}^2$, con un promedio de 10 realizaciones en las posiciones iniciales de las bacterias de 1 h de tiempo de simulación. Simulamos con poblaciones homogéneas, con los parámetros de cada cepa y cada estrategia de nado por separado para entender qué aporta cada una en la difusión de la población real. También realizamos simulaciones con cada una de las cepas por separado, para obtener un valor real del coeficiente de difusión de cada población.

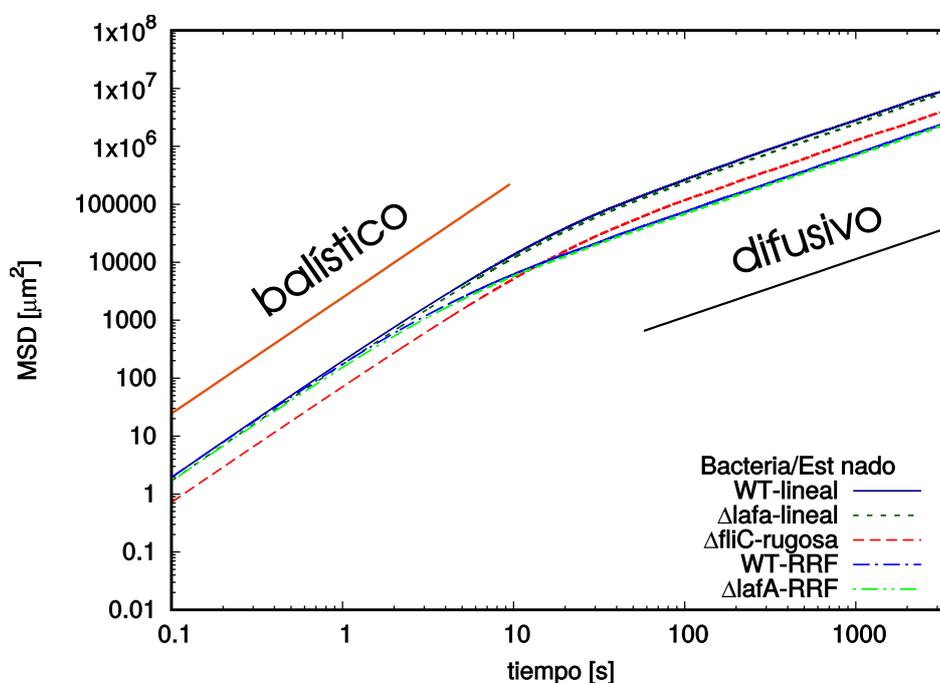


Figura 4.6: (Color en pdf) MSD en función al tiempo para las cepas WT y ΔlafA con las estrategias de nado por separado.

En la Fig. 4.6 se muestra el desplazamiento cuadrático medio en función del tiempo entre $t=0.1\text{s} < \tau$ y $t=1\text{h} \gg \tau$. Se observan claramente dos regímenes. A tiempos cortos el régimen es balístico. Para la cepa salvaje y la monoflagelada las curvas del MSD a tiempos cortos están superpuestas ya que a tiempos menores a τ el MSD solo depende de la velocidad media. Por dicho motivo es que en la Fig. 4.7 se evidencia que las curvas de cada cepa comienzan superpuestas y luego se cruzan. A tiempos largos el régimen es difusivo y lo que predomina es la estrategia de nado, como se ve en Fig. 4.8, ya que se juntan las curvas según la estrategia de nado. De todas maneras la velocidad media determina qué curva está por encima de la otra. En la Tabla 4.2 se encuentran los

valores obtenidos de la Fig. 4.8 para el coeficiente de difusión traslacional D para cada cepa y estrategia de nado. Cabe resaltar que en todos los casos el proceso es difusivo según la Ec. (2.6), ya que $\alpha=1$.

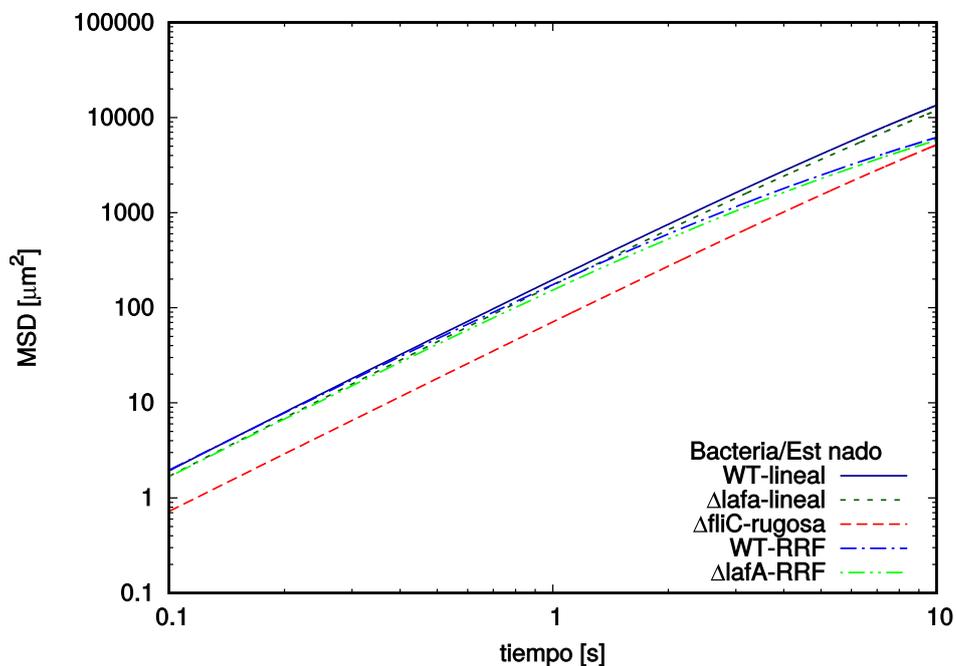


Figura 4.7: (Color en pdf) Desplazamiento cuadrático medio de todas las cepas separadas por estrategia de nado, en función del tiempo para tiempos cortos, hasta 10 s.

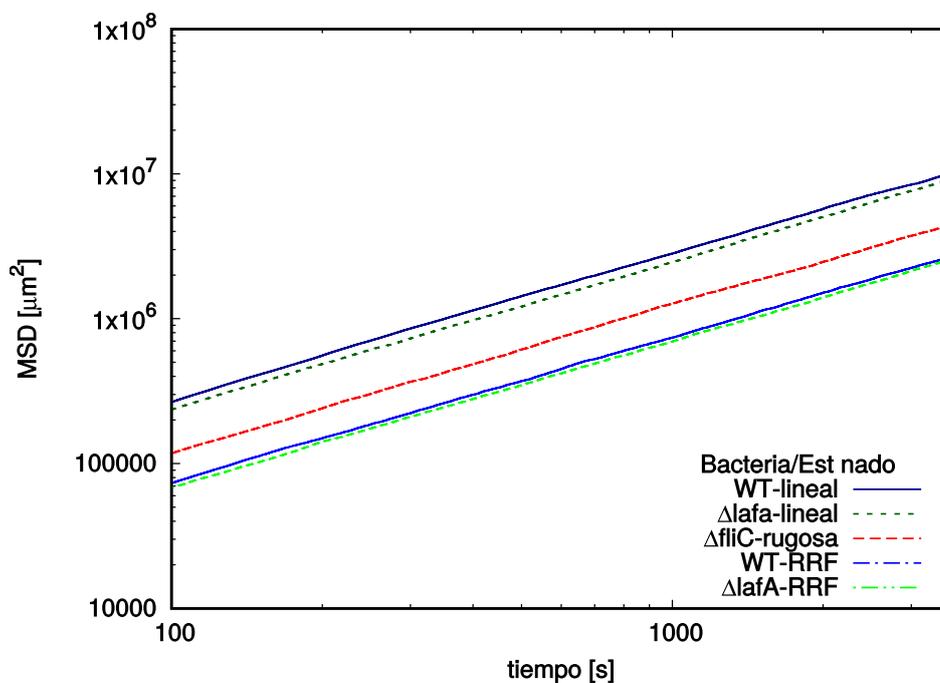


Figura 4.8: (Color en pdf) Desplazamiento cuadrático medio de todas las cepas separadas por estrategia de nado, en función del tiempo para tiempos largos, desde ~ 15 min hasta 1 h.

Bacteria	Est. de nado	D [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]	α
WT	lineal	2792 ± 187	1.00203 ± 0.00008
WT	RRF-RR	728 ± 10	1.00345 ± 0.00004
lafA	lineal	2147 ± 54	1.020730 ± 0.000005
lafA	RRF-RR	660 ± 5	1.008440 ± 0.000005

Tabla 4.2: Parámetros calculados por ajuste lineal. α es el exponente de la dependencia temporal del MSD.

La difusión para las bacterias con trayectorias lineales es 3,8 veces mayor para la WT y 3,25 veces mayor para la lafA que las bacterias que tiene una estrategia de nado RR-RRF, que las hace volver o tener un movimiento hacia atrás. Con estos datos podemos estimar el valor del coeficiente de difusión de poblaciones heterogéneas, sabiendo la proporción de cada estrategia de nado. Es así que la WT debe tener un $D \sim 1287\mu\text{m}^2$, y la ΔlafA $D \sim 1452\mu\text{m}^2$, claramente mayor ya que la cepa salvaje, que tiene más movimientos hacia atrás, es decir trayectorias RR-RRF. Por otro lado se realizaron simulaciones con poblaciones heterogéneas en cuanto a estrategia de nado, es decir una población realista de cada cepa como se reportó recientemente en Quelas *et al.* [18]. En la Fig. 4.9 se presenta la curva de MSD vs t, comparando tres cepas.

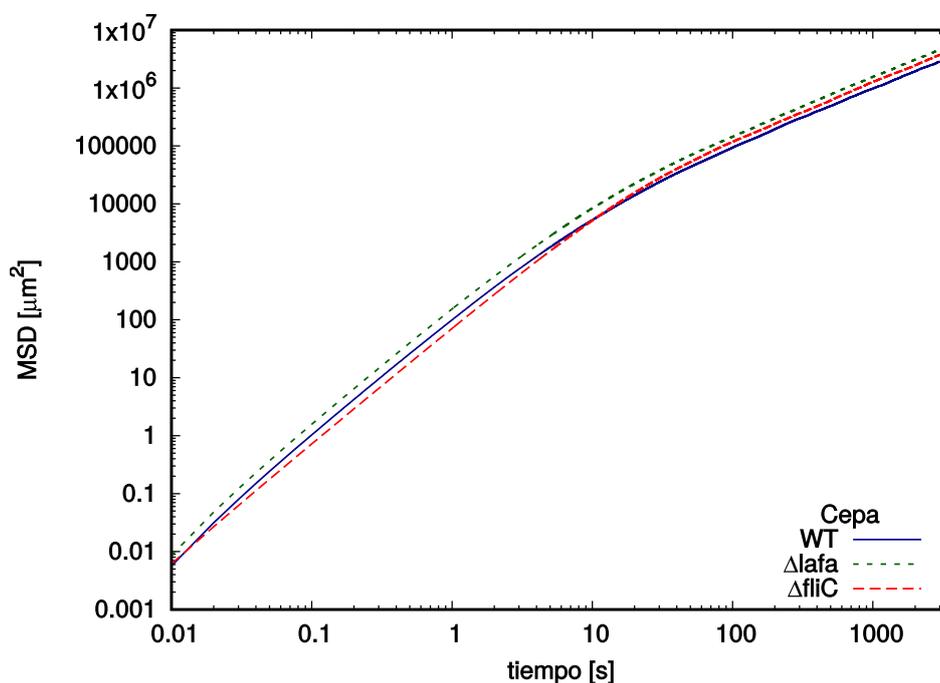


Figura 4.9: (Color en pdf) Desplazamiento cuadrático medio en función del tiempo para las tres cepas estudiadas.

Es notable que la velocidad media influye ampliamente en las propiedades de transporte, como es de esperar. Si bien la cepa salvaje y la ΔlafA poseen velocidades medias muy parecidas, la estrategia de nado determina que la difusión de la segunda es mayor

que la de la primera, debido a que la bacteria sin el sistema flagelar lateral tiene una proporción de estrategia de nado diferente a la WT. La *lafA* elige casi en más de un 50 % la estrategia lineal, en cambio la WT un $\sim 27\%$. También es evidente que la cepa más lenta, la ΔfliC a tiempos cortos, la curva de MSD se encuentra por debajo de la de la WT, y luego la cruza. Esto se debe a que a tiempos cortos la dinámica es balística. Lo que predomina es la velocidad media y no el tipo de nado. En cambio a tiempos largos la estrategia de nado se vuelve predominante, y debido a que la ΔfliC tiene una forma de nado más persistente que la WT (que tiene muchos RR-RRF), difunde más, es decir avanza más en menor tiempo.

Con el fin de analizar el error estadístico en el cálculo del coeficiente de difusión podemos analizar las curvas de MSD en función al tiempo, para tiempos largos, a partir de $t = 1000\text{s}$ para diferente número de realizaciones para promediar, que se presenta en la Fig. 4.10. Las realizaciones son en diferentes condiciones iniciales de las partículas, y en el caso de sistemas con obstáculos, se mantiene su posición fija, como se explicó en la Sección 3.3. Se percibe que las fluctuaciones disminuyen con el número de realizaciones, como es de esperar. Sin embargo es relevante notar que las fluctuaciones entre 5 y 10 realizaciones no disminuyen considerablemente. Por esta razón en las siguientes simulaciones en medios con obstáculos se harán 5 realizaciones para promediar.

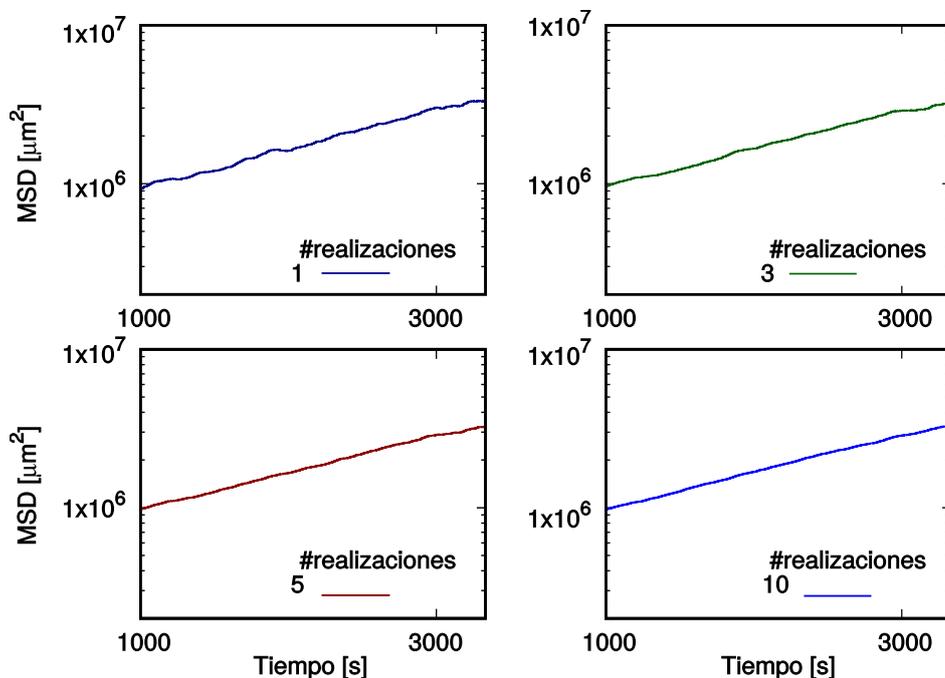


Figura 4.10: MSD en función al tiempo, promediando en diferente número de realizaciones, para la cepa salvaje.

En resumen se lograron reproducir fehacientemente las diversas y novedosas estrategias de nado de las *Bradyrhizobium diazoefficiens*, recientemente reportadas. Se

caracterizaron las propiedades de transporte según las estrategias de nado y cepa.

Los datos del coeficiente de difusión traslacional obtenidos para cada cepa se presentan en la Tabla 4.3. La cepa que solo presenta el flagelo subpolar, ΔlafA tiene un coeficiente de difusión traslacional $D = 1504 \pm 53 \mu\text{m}^2/\text{s}$, la cepa salvaje un $\sim 28\%$ menor que ΔlafA , y la cepa que únicamente tiene el sistema flagelar lateral, ΔfliC disminuye un $\sim 24\%$ respecto de la ΔlafA .

Bacteria	D [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]
ΔlafA	1504 ± 53
WT	1080 ± 25
ΔfliC	1140 ± 24

Tabla 4.3: Coeficiente de difusión traslacional para cada cepa.

Difusión bacteriana en medios con obstáculos

En el capítulo anterior se analizó la movilidad de bacterias individuales y de poblaciones bacterianas en medios libres, sin obstáculos. Es importante conocer las propiedades de transporte en un sistema artificial poroso e infinito, que imita un suelo real, para luego entenderlas en un sistema bajo confinamiento, que es el caso de los experimentos en laboratorio con bacterias en dispositivos microfluídicos. Esto también nos permite realizar una comparación entre los dos casos, ya que con el fin de estudiar a las bacterias en un medio similar a su ambiente natural, se propone utilizar microdispositivos transparentes y biocompatibles. Las simulaciones de estos sistemas nos permiten entender, predecir y comparar las propiedades de transporte en un medio finito e infinito, usando condiciones periódicas de contorno. Los obstáculos con paredes sólidas rectas o curvas se han usado de diversas formas para dirigir, controlar y separar bacterias *E. Coli* o espermatozoides [3, 4]. En la literatura se encuentran experimentos en medios porosos como columnas de arena [40, 41, 42] con bacterias *E. Coli* y *Pseudomonas putida* que se utiliza para remediación ambiental de suelos contaminados, como así también en medios cuasi bidimensionales artificiales [43]. Sin embargo estos estudios no cuantifican a tiempos largos las propiedades de transporte. Uno de nuestros objetivos es conocer y cuantificar la influencia de los obstáculos en las propiedades de transporte. Nuestra hipótesis es que para densidades altas de defectos la difusión disminuye independientemente de la estrategia de nado. Además nos preguntamos si el tamaño de los defectos modifica las propiedades de movilidad de cada cepa bacteriana. Estas son las preguntas que intentaremos responder con los resultados numéricos que se presentan a continuación.

En este capítulo se presentan los resultados de las simulaciones con diferentes tipos de geometrías, creciendo en orden de complejidad, con defectos circulares con radios

monodispersos (Sección 5.1), bidispersos (Sección 5.2) y polidispersos (Sección 5.3) utilizando condiciones periódicas de contorno, con el fin de imitar de manera más realista un suelo. En todos los casos se varió la densidad de defectos ϕ_{geo} . Si bien en los experimentos de microfluídica hay confinamiento en la dirección z , del orden del tamaño de los micronanadores, y en x e y por el tamaño de los dispositivos que pueden ir de las $500 \times 500 \mu\text{m}$ a unos pocos centímetros, es un aporte relevante realizar las simulaciones en medios infinitos. En la Fig. 5.1 se presentan curvas del desplazamiento cuadrático medio en función del tiempo para la cepa ΔlafA en un medio con obstáculos en una caja de dimensiones $L_x, L_y = 100 \mu\text{m}$. Es notable el *plateau* a partir de $t \sim 100\text{s}$. En los experimentos, dependiendo de las dimensiones del dispositivo se espera un comportamiento similar. De esta manera un aporte posible de este trabajo es a partir de las simulaciones comparar y poder predecir a tiempos más largos que el tiempo de aparición del *plateau*, las propiedades de transporte.

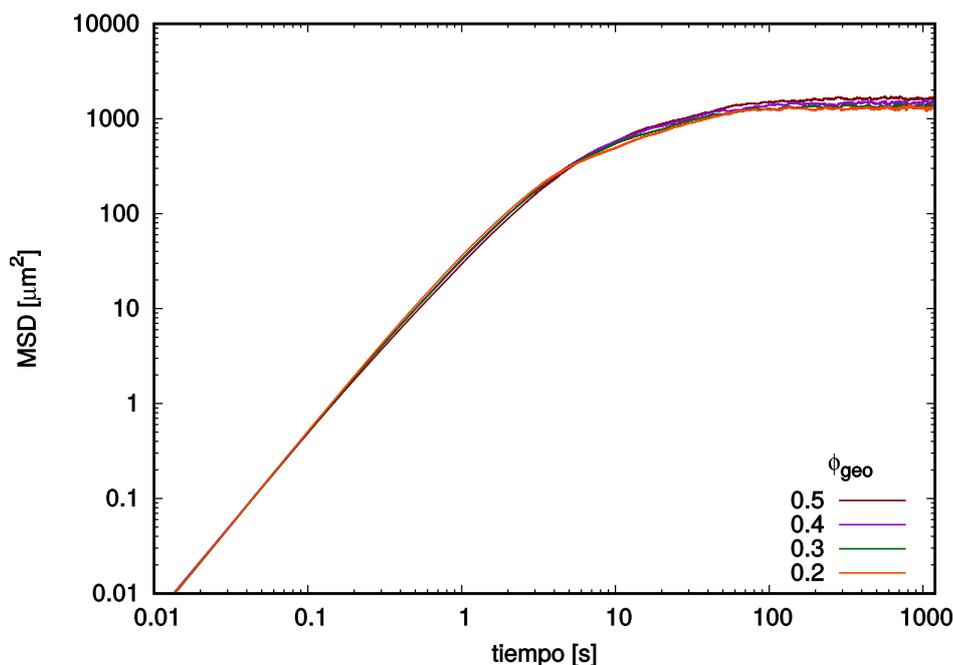


Figura 5.1: (Color en pdf) Desplazamiento cuadrático medio en función del tiempo para la cepa ΔlafA . Medio con defectos de radio $R=5 \mu\text{m}$, con diferentes densidades de defectos en una caja bidimensional de $L_x \times L_y$, $L_x = L_y = 100 \mu\text{m}$.

5.1. Geometría con defectos circulares monodispersos

En esta sección se realizará un análisis de cómo interactúan las diferentes cepas en medios con obstáculos de tamaño del orden de las bacterias, y de órdenes de magnitud mayores, hasta lograr defectos 40 veces más grandes que las bacterias.

Para cada cepa se varió a su vez el ϕ_{geo} desde $\phi_{geo} \sim 0.1$, hasta $\phi_{geo} \sim 0.5$, es decir

trabajamos con un sistema muy diluído en defectos, con apenas un 10 % de ocupación, hasta la mitad del sistema ocupado por los defectos. En el caso de defectos monodispersos, hay limitaciones en cuanto al valor máximo de la densidad de defectos. Estas están dadas por la relación entre el tamaño de los defectos y el del contenedor: si se quiere llenar un recipiente cúbico con pelotas de básquet un cierto espacio permanece vacío. Ahora si se cambian las pelotas por canicas, o esferas muy pequeñas, se tiende a pensar que el espacio vacío es menor. En este estudio se trabaja en dos dimensiones, pero la idea es similar, el objetivo es introducir una cierta cantidad de círculos en la celda de simulación de las CPC, que actúa de contenedor. Con objetos circulares no es posible ocupar todo el espacio. Por teoría de Sólidos se sabe que la mayor fracción ocupada por esferas, es $\pi/3\sqrt{2} \sim 0.74$, que es el caso en el que las esferas están en una red ordenada, la cúbica centrada en las caras (FCC) o hexagonal (HCP), independiente del radio [44]. Este principio se puede trasladar a dos dimensiones (2D), que es nuestro caso de estudio. En 2D la fracción máxima del área ocupada por círculos es $\pi\sqrt{3}/6 \sim 0.9069$, que también se logra con un arreglo ordenado, como ser una red cuadrada o hexagonal (panal de abejas). En este sentido, como los círculos no se acomodan de manera ordenada, sino que al azar, es de esperar que la fracción máxima ocupada sea menor que en el caso de un arreglo ordenado. En nuestro programa los círculos se distribuyen en el espacio al azar, uno a uno, ya que se impone que no se superpongan al ir agregándolos. De esta manera existe una densidad máxima de defectos en el orden de $\phi_{geo} \sim 0.5$.

Es de esperar que, independientemente de la cepa, la difusión de la población se reduzca a medida que el medio se llene de obstáculos. También que en los medios con obstáculos de menor radio la población bacteriana difunda más que en medios con radios mayores, debido a cómo interactúan las bacterias con las paredes.

Las simulaciones de estos sistemas se realizaron con radios, $R = 2, 5, 10, 15$ y $20\mu\text{m}$. Como explicamos en la Sección 3.3 se aplicaron condiciones periódicas de contorno, con una celda unidad de $100 \times 100\mu\text{m}^2$. Se registró el desplazamiento cuadrático medio (MSD) para todo tiempo y se realizaron 5 simulaciones de 1 h de duración, variando la condición inicial de las posiciones de las bacterias pero no se modificó la configuración de los defectos.

Es relevante poder caracterizar las propiedades de transporte de cada cepa en un medio poroso, ya que es una herramienta para poder entender la funcionalidad de cada sistema flagelar, lo cual es un tema abierto y en discusión en la comunidad de biotecnólogos del área. En ese sentido, en primer lugar mostraremos los resultados de cada cepa por separado, la salvaje (WT), la que no posee el sistema flagelar lateral (ΔlafA) y la que no presenta el subpolar (ΔlafA). Es importante para realizar este análisis tener en cuenta las diferentes propiedades de cada cepa en relación a las estrategias de nado, vistas en Tabla 2.1.

5.1.1. Cepa salvaje

En la Fig. 5.2 se puede ver el MSD vs tiempo, para diferentes valores de ϕ_{geo} , en un medio con obstáculos de radio $R=20\mu m$, es decir defectos con radio 40 veces más grandes que la bacteria, $R=40R_b$. Al igual que en la Sección 4.2, se observan dos regímenes claramente diferenciados. Como se explicó anteriormente el $MSD \sim 4Dt^\alpha$. A tiempos cortos la dinámica es balística, ya que el exponente es $\alpha = 2$ y a tiempos largos difusiva, porque corresponde a un exponente $\alpha = 1$. Las curvas para diferente densidad de obstáculos poseen la misma pendiente a tiempos largos, en el gráfico con escala log-log. Es decir que poseen las mismas características en las propiedades de transporte, el MSD sigue la misma ley de potencia para todos los casos. Vale destacar que a medida que la densidad de defectos aumenta la curva se desplaza hacia abajo, es decir a mayor densidad de defectos hay una menor difusión, que cuantificaremos con el coeficiente de difusión a continuación. Con los datos del MSD en función del tiempo

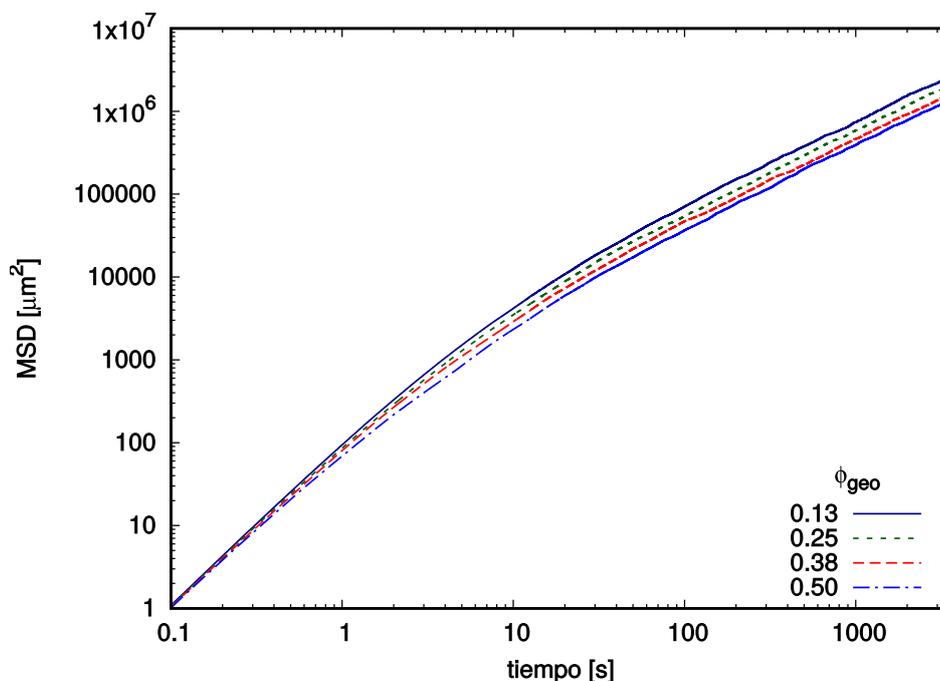


Figura 5.2: (Color en pdf) Desplazamiento cuadrático medio en función del tiempo para la cepa biflagelada, WT. Medio con defectos de radio $R=20\mu m$, con diferentes densidades de defectos, ϕ_{geo} desde 0.13 a 0.5.

se puede obtener el coeficiente de difusión, de la misma manera en la que se procedió en la Sección 4.2.

En la Fig. 5.3 es posible notar que la difusión disminuye con la densidad de obstáculos. Se observa un decaimiento monótono. Para un espacio sin defectos $D = 1080 \pm 25\mu m^2/s$, y para un espacio con el $\sim 50\%$ del espacio ocupado con defectos $D = 398 \pm 9\mu m^2/s$, es decir el coeficiente disminuye un $\sim 63\%$. En el caso en que sólo se ocupe $\sim 12\%$ del espacio con obstáculos, $D = 744 \pm 30\mu m^2/s$, es decir

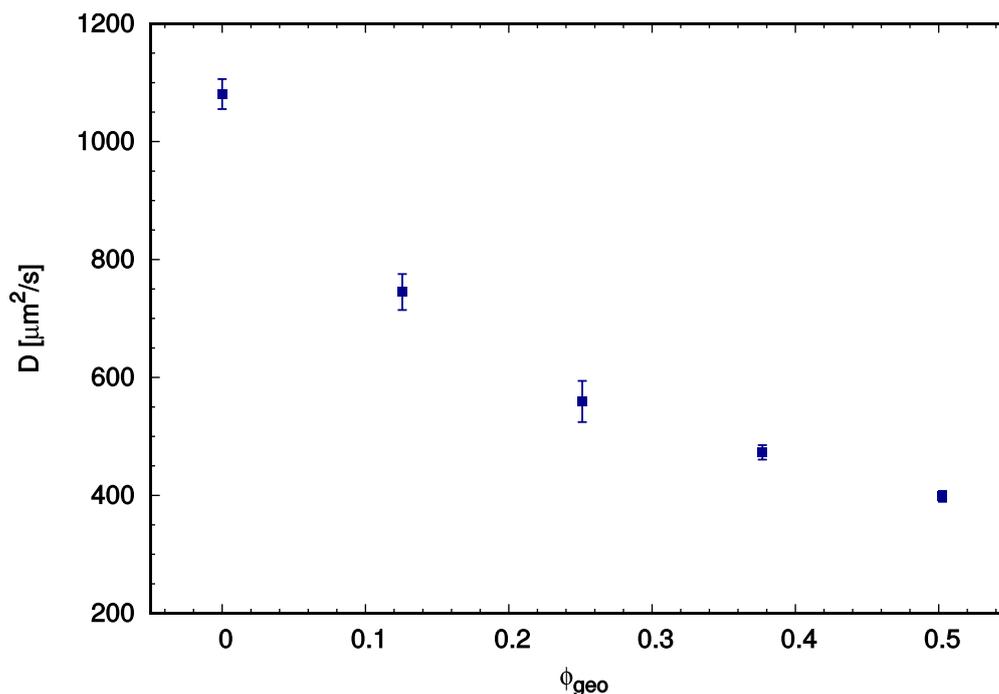


Figura 5.3: Coeficiente de difusión para la WT en un medio con defectos de radio $20\mu\text{m}$, en función de la densidad de defectos.

disminuye un $\sim 31\%$.

Es posible realizar un gráfico análogo para todos los radios usados. En la Fig. 5.4 se muestran los datos obtenidos del coeficiente de difusión según el ϕ_{geo} . Se observa un decaimiento monótono para todos los radios usados, salvo para radios $R_1=2\mu\text{m}$ y $R_2=5\mu\text{m}$. En estos casos, el decaimiento no es monótono pero dentro de la franja de error sí se lo puede considerar monótono. Es posible que para los defectos más pequeños, del orden del tamaño de la bacteria (recordemos que tiene radio $R_b=0.5\mu\text{m}$) falte estadística. También se evidencia que a densidades bajas ($\phi_{geo} \sim 0.1$) el radio de los defectos no influye en la difusión, en cambio a densidades más altas ($\phi_{geo} \sim 0.5$) se percibe una dependencia con el radio, a menor radio de los obstáculos mayor difusión. Si se hicieran más realizaciones para mejorar la estadística y se tomara un bin de ϕ_{geo} más pequeño, de forma tal de tener una curva con la dependencia del coeficiente de difusión con la densidad de defectos ϕ_{geo} , se espera que las curvas para los diferentes radios comiencen “pegadas” y a medida que aumenta el ϕ_{geo} se separen, porque a densidades bajas la interacción con los defectos es mínima, es decir, el tiempo que cada bacteria está en contacto con los obstáculos es poco ya que se escapan rápidamente por la tangente, es lo más parecido a la dinámica libre que vimos en la Sección 4.2, en cambio a densidades altas las bacterias interactúan con los obstáculos “todo el tiempo”. Para un medio con densidad de obstáculos $\phi_{geo} \sim 0.1$, de radio $R=20\mu\text{m}$, la distancia que recorre una bacteria al partir de un obstáculo para encontrarse con otro es de $\sim 60\mu\text{m}$, es decir que demora $t \sim 2.01\text{s}$ en recorrerla. Ese tiempo es del orden

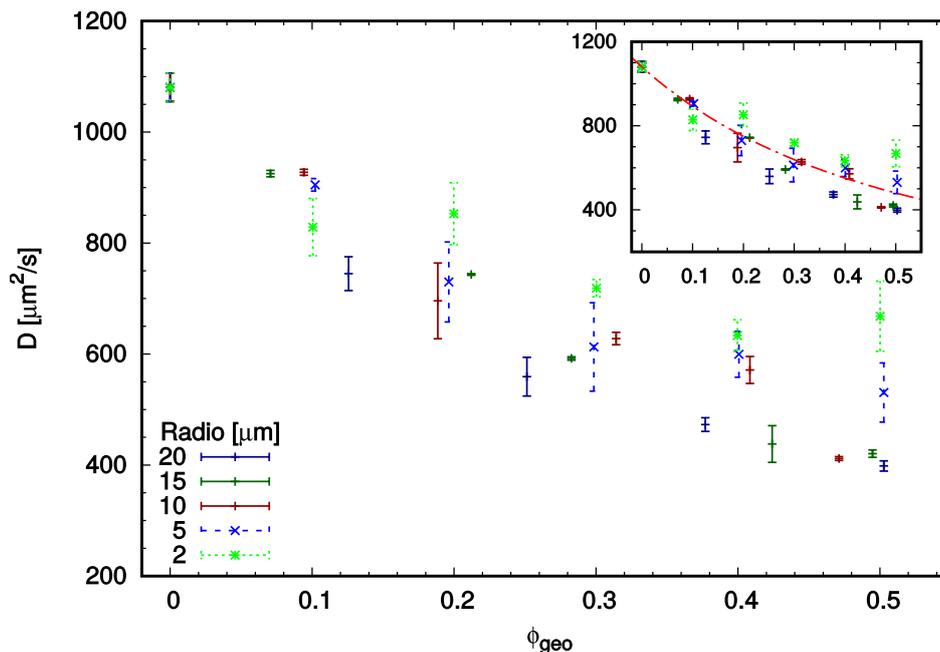


Figura 5.4: (Color en pdf) Coeficiente de difusión para la WT en función de la densidad de defectos, ϕ_{geo} . Inset: Como guía del decaimiento del coeficiente se graficó una curva que va como $[1/(\phi_{geo} + 1)^2]$

del tiempo característico de cambio de dirección $\tau = 2,35s$. En este caso el efecto de los obstáculos compite con los cambios de dirección. En cambio en una densidad de defectos $\phi_{geo} \sim 0.5$ la distancia media entre defectos es $\sim 10\mu m$, con lo cual demora $t \sim 0.35s$ en encontrarse con otro obstáculo. En este caso los defectos obstaculizan la difusión ya que en un tiempo de un orden menor que τ se encuentra con un obstáculo. En el caso de defectos de radio $R = 2\mu m$, los círculos se encuentran a una distancia menor entre ellos, sin embargo la difusión es mayor que en el caso $R = 20\mu m$. Esto se debe a la diferencia de curvatura de los defectos. Para un radio $R = 20\mu m$, la longitud de medio arco es comparable con el largo de la corrida, $l_r \sim 68\mu m$, con lo cual los defectos pequeños son sorteados con mayor facilidad ya que en obstáculos más grandes las bacterias permanecen mayor tiempo cerca de la pared. La curvatura en relación al largo de la corrida determina cuánto permanece la bacteria en las inmediaciones del defecto. En ese sentido, es importante saber cómo influyen las paredes sólidas en la difusión bacteriana ya que se alejan de una pared recta por el efecto de τ y D_r y de una pared curva por los mismos efectos, sumado a el escape por la tangente.

En la Fig. 5.5 se presenta el coeficiente de difusión en función de la densidad de pared, Ec. (3.2). Es claro que el coeficiente de difusión decae con la densidad de paredes para todos los radios de defectos. Su decaimiento es abrupto y monótono para los radios mayores usados, $R_1 = 20\mu m$ y $R_2 = 15\mu m$. Al disminuir el radio, y por ende aumentar la densidad de paredes, decae menos abruptamente. Esto se debe a la curvatura de los defectos en relación al largo de las corridas. Para radio $R = 10\mu m$ no se observa un

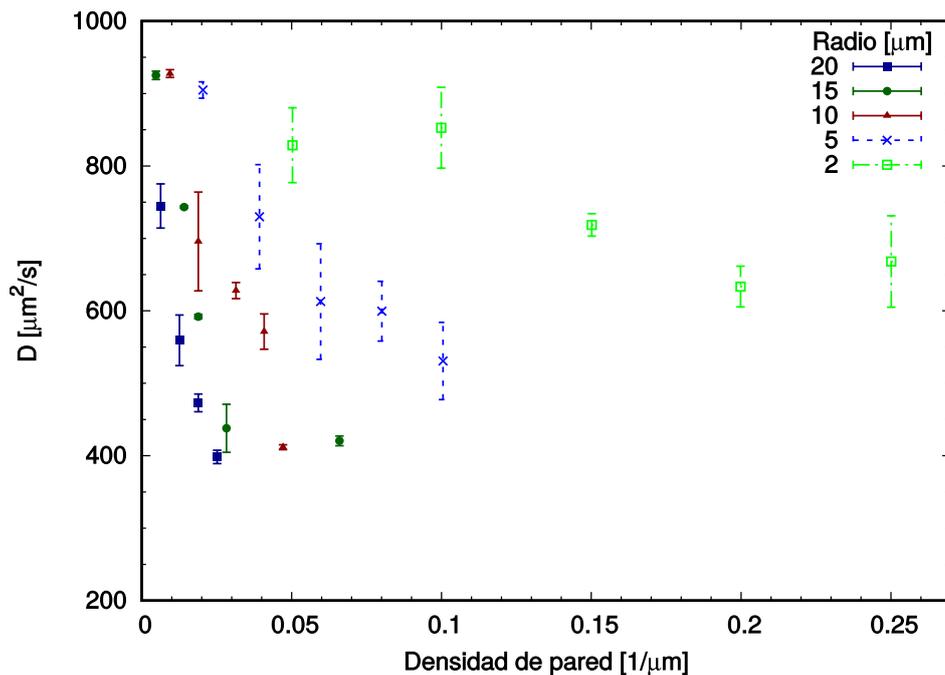


Figura 5.5: (Color en pdf) Coeficiente de difusión para la WT según la densidad de paredes.

comportamiento monótono, así como para radio $R=2\mu\text{m}$. Sin embargo si observamos las barras de error estas cubren un ancho en el que la curva decae monótonamente. Es importante realizar un análisis exhaustivo de la interacción con los defectos en función al radio, para poder entender mejor este fenómeno.

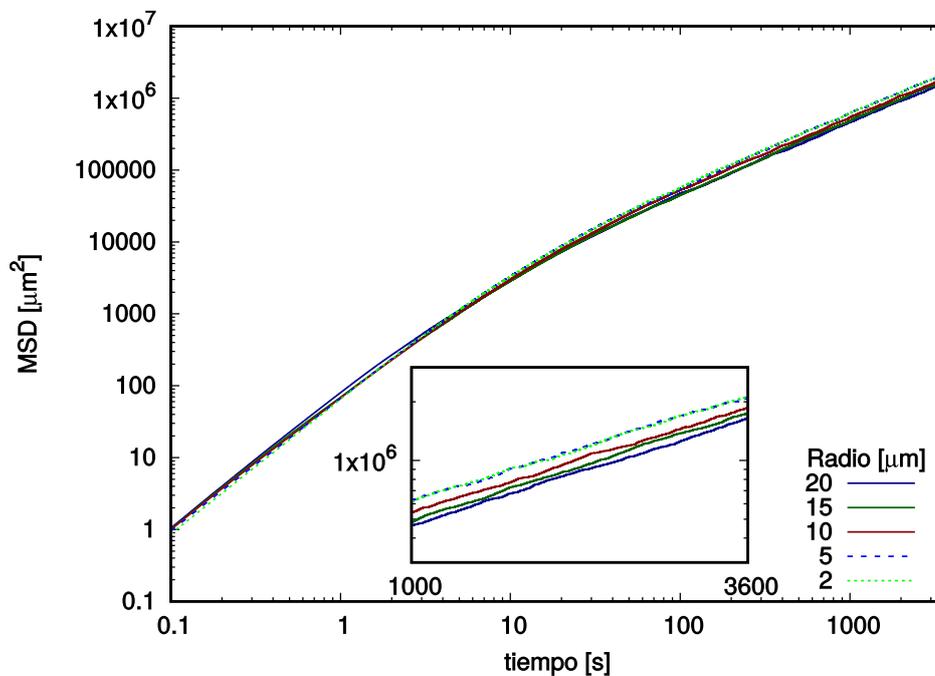


Figura 5.6: (Color en pdf) Desplazamiento cuadrático medio de la cepa salvaje en función del tiempo para una geometría con densidad de defectos $\phi_{geo} \sim 0.4$, para diferentes radios de defectos.

También es posible notar cómo influye el radio de los defectos en las propiedades de transporte con las curvas de MSD en función al tiempo para una densidad de defectos fija, para todos los radios. En la Fig. 5.6 se puede ver que las diferentes curvas están superpuestas. Se observa que para una densidad de defectos fija las propiedades de transporte en términos generales son similares para todos los radios de defectos utilizados. Si se analiza con más detalle, a tiempos largos a partir de los 1000s, las curvas se separan. Es necesario realizar este análisis a tiempos largos para poder estudiar las propiedades difusivas del sistema bacteriano, por la Ec. (2.6). Aquí se nota claramente que para radios de defectos mayores las curvas están por debajo de las correspondientes a radios $R=2\mu\text{m}$ y $R=5\mu\text{m}$. Para estos dos últimos casos no se percibe a simple vista una diferencia notoria, sin embargo se cuantifica con el cálculo del coeficiente de difusión, que se presentó anteriormente en la Fig. 5.4.

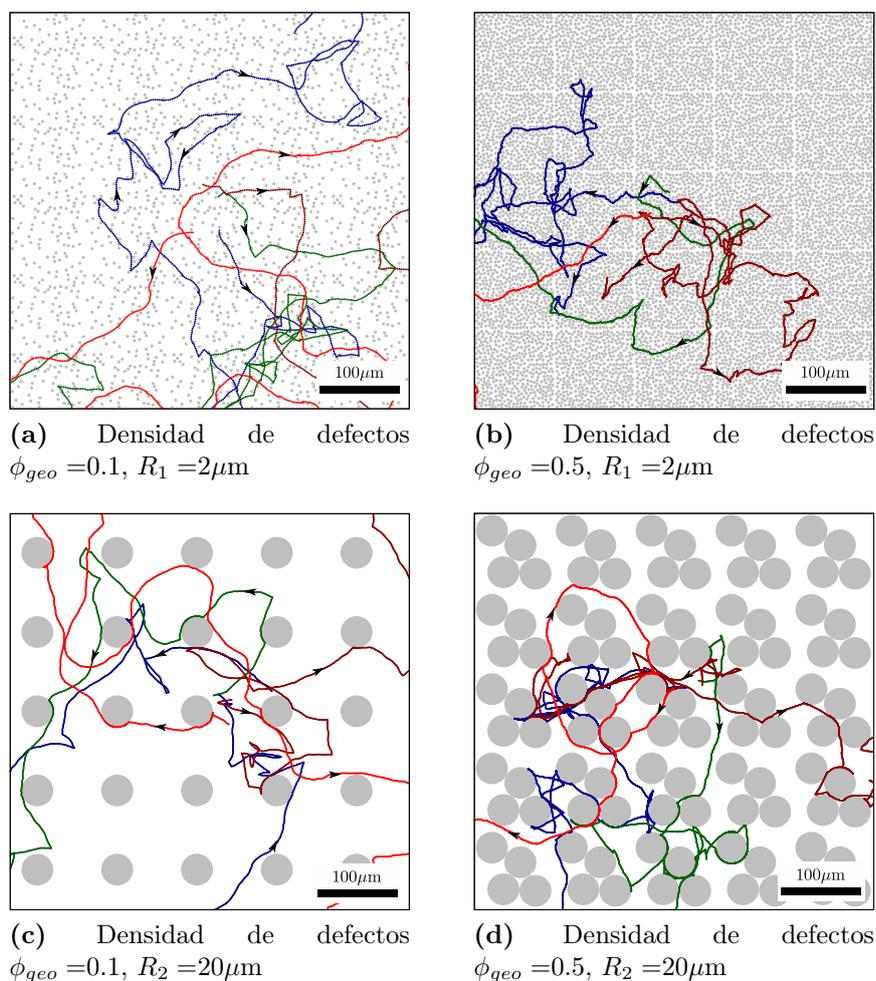


Figura 5.7: (Color en pdf) Trayectorias de cuatro bacterias WT en sistemas con defectos de radio $R_1=2\mu\text{m}$ y $R_2=20\mu\text{m}$. El espacio graficado es de $500 \times 500\mu\text{m}^2$, para dos densidades de defectos diferentes. $t_{total} = 100\text{s}$. Las flechas negras señalan el sentido de movimiento de la bacteria. Nota: El arreglo espacial de los defectos de la celda de simulación luce periódico debido a las condiciones periódicas de contorno.

Para tener una mejor noción de cómo es la dinámica con los obstáculos circulares, es importante analizar las trayectorias de las bacterias en los diferentes medios. Por simplicidad, se exponen sólo los resultados para los extremos de los radios y densidades de defectos usados. En la Fig. 5.7 se presentan 4 trayectorias en medios con un $\phi_{geo} \sim 0.1$ y 0.5 con obstáculos de $R_1 = 2\mu\text{m}$ y $R_2 = 20\mu\text{m}$, de 100s $\tau \sim 3\text{s}$ de duración. A densidades bajas de defectos, las trayectorias son cualitativamente similares a las vistas en la dinámica libre, es decir los obstáculos no condicionan la dinámica de nado. Se pueden apreciar algunos movimientos típicos como *run reverse and flick* (RRF) y *run and reverse* (RR) (ver Fig. 2.3). Por otro lado a densidades más altas el movimiento de las bacterias está totalmente condicionado por los obstáculos, ya que en un tiempo menor que el tiempo característico de cambio de dirección τ se encuentra con un obstáculo, y dependiendo del ángulo de incidencia nada paralelo a él. Una bacteria puede alejarse de la pared de un obstáculo por irse por la tangente, por un cambio de dirección, o bien el ruido de su motor, generado por la difusión rotacional, que la mueve por una patada al azar. Nótese que en los dos últimos casos, la probabilidad de dejar de nadar paralelo al obstáculo es menor, dado que el cambio de dirección o la patada al azar tienen la misma probabilidad para alejarse del obstáculo o acercarse. Es decir, que en la mitad de los casos el cambio de dirección o el ruido del motor ayudan a que la bacteria permanezca “pegada” al defecto.

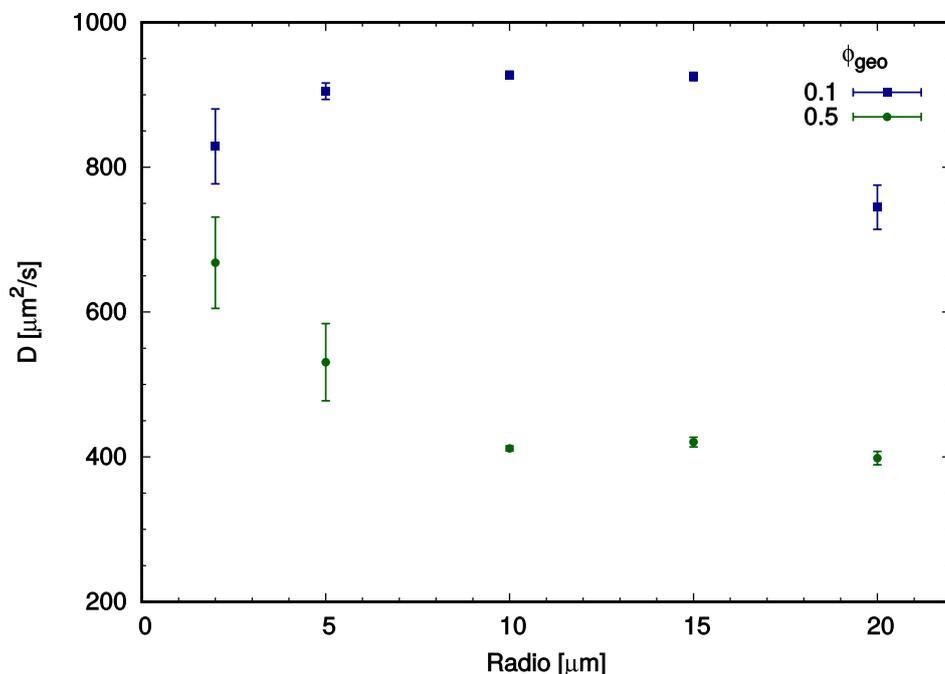


Figura 5.8: (Color en pdf) Coeficiente de difusión de la cepa WT en función del radio de los defectos, para dos densidades de defectos, $\phi_{geo} \sim 0.1$ y $\phi_{geo} \sim 0.5$.

Para evidenciar cuándo es más importante el efecto del radio de los defectos, se estudia el coeficiente de difusión en función del radio, para densidades bajas ($\phi_{geo} \sim 0.1$)

y altas ($\phi_{geo} \sim 0.5$), Fig. 5.8. Se percibe que para $\phi_{geo} \sim 0.1$ el coeficiente no decae tan abruptamente como en el caso de $\phi_{geo} \sim 0.5$, que luego para radios mayores a $R = 10\mu\text{m}$ se mantiene constante alrededor de $D \sim 400\mu\text{m}^2$. También que para densidades bajas los valores distan menos entre sí, para densidades bajas distan sólo en $\sim 84\mu\text{m}^2$ y para densidades altas $\sim 170\mu\text{m}^2$, es decir aproximadamente el doble. Es posible afirmar que a densidades bajas de defectos, prima la dinámica libre, en cambio a densidades mayores los efectos de confinamiento dominan. Esto se debe a que para $\phi_{geo} \sim 0.5$, los defectos se encuentran muy cerca unos de otros, creando barreras para el paso de las bacterias, por lo que se ve un efecto de “encajonamiento”. En un futuro se realizarán más simulaciones para poder entender y describir la dependencia del coeficiente de difusión traslacional con el radio de los defectos.

Este estudio aporta en el caso de medios a campo lleno, es decir con todo el volumen ocupado por un medio acuoso. Se sabe que las *Bradyrhizobium diazoefficiens* desarrollan el sistema flagelar lateral para hacer *swarming*, y es probable que en un suelo real adapten sus sistemas flagelares para sobrevivir y llegar a las raíces en casos de condiciones hídricas críticas, como sequías. El problema real es complejo, pero estudios sistemáticos desde lo más simple a lo más complejo pueden contribuir al entendimiento del problema.

5.1.2. Cepa monoflagelada

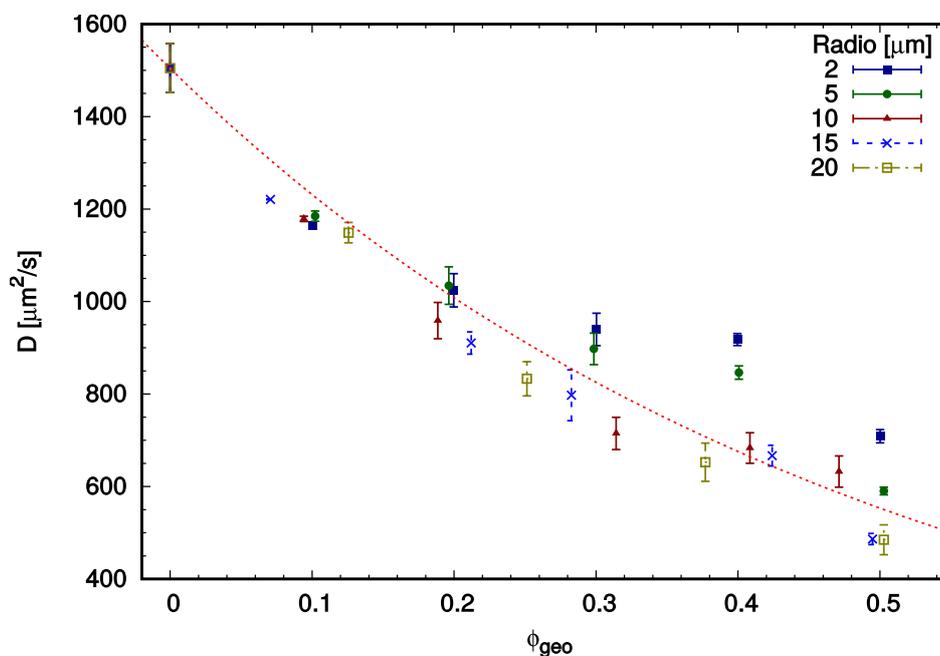


Figura 5.9: (Color en pdf) Coeficiente de difusión de la cepa ΔlafA en función de la densidad de defectos, . La línea de puntos es solo una guía del decaimiento del coeficiente de difusión se grafica una función que va como $1/e^{(2\phi_{geo})}$.

A continuación se presenta un análisis similar al realizado con la cepa salvaje, con la ΔlafA , que solo presenta el sistema flagelar subpolar. Esta cepa tiene una velocidad media muy similar a la cepa salvaje, pero mayor preferencia a las trayectorias lineales, (Fig. 2.4). Tiene una mayor persistencia en la dirección de nado y mayor difusión libre que la cepa salvaje como se presentó en la sección Sección 4.2. Sin embargo esto no indica a priori que las propiedades bajo confinamiento y en medios con obstáculos se mantendrán.

En la Fig. 5.9 se muestra el coeficiente de difusión en función de la densidad de defectos para todos los radios usados. Al igual que en el caso de la WT el coeficiente decae con la densidad de defectos, ϕ_{geo} . Se observa que para los radios menores usados $R_1 = 2\mu\text{m}$ y $R_2 = 5\mu\text{m}$, los valores del coeficiente de difusión son mayores que para los otros radios. En un medio con defectos de radio $R = 20\mu\text{m}$ con el 12% del espacio ocupado el coeficiente de difusión es $D = 1149 \pm 20\mu\text{m}^2/\text{s}$, es decir disminuye un $\sim 24\%$ con respecto al valor del coeficiente en un sistema sin obstáculos. Para un sistema con $\sim 50\%$ espacio ocupado, el coeficiente es $D = 486 \pm 10\mu\text{m}^2/\text{s}$, disminuye un $\sim 68\%$.

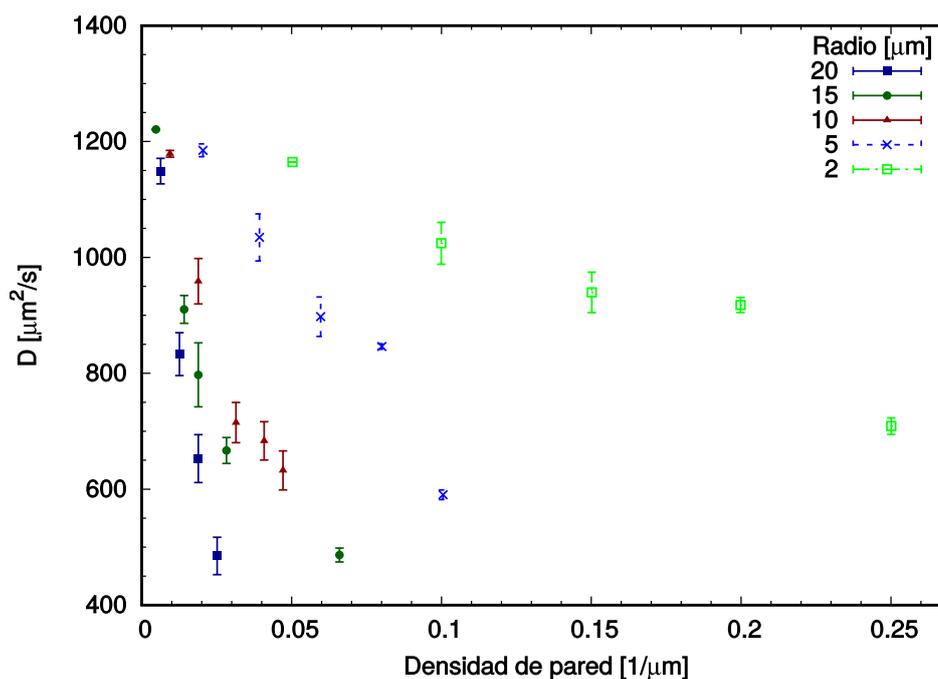


Figura 5.10: (Color en pdf) Coeficiente de difusión de la bacteria con el sistema flagelar subpolar, ΔlafA en función de la densidad de paredes.

El comportamiento del coeficiente de difusión según la densidad de paredes, es similar al de la WT, como se puede ver en la Fig. 5.10. Para radios mayores las curvas decaen monótonamente y de forma abrupta, y para radios menores ($R = 2, 5 \mu\text{m}$) decaen con mayor suavidad y salvo por un punto, lo hace monótonamente. Esto es acorde a lo esperado, ya que en nuestras simulaciones la interacción con las paredes es la misma para todas las bacterias. Cabe remarcar que a densidades bajas de defectos

el valor del coeficiente de difusión para todos los radios es $D \sim 1150 - 1250 \mu\text{m}^2$, en cambio a densidades más altas $D \sim 500 - 700 \mu\text{m}^2$. Aquí se nota el efecto del radio de los defectos. En la Fig. 5.11 se presentan trayectorias en dos geometrías diferentes. En

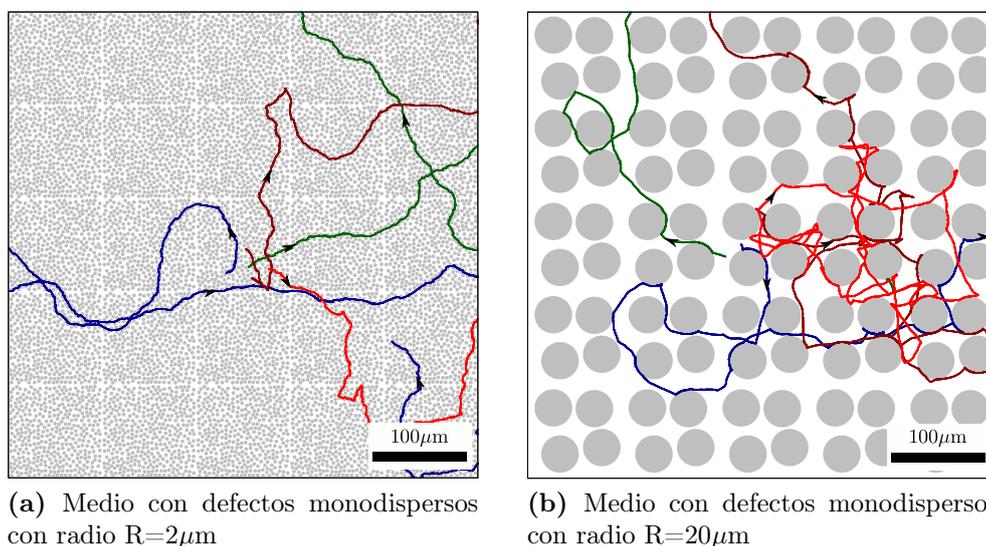


Figura 5.11: (Color en pdf) Trayectorias de 4 bacterias de la cepa ΔlafA , de $t_{total} = 100$ s de duración. Espacio graficado es de $500 \times 500 \mu\text{m}^2$, con una densidad de defectos $\phi_{geo} \sim 0.5$.

el caso del medio con defectos de radio $R = 20\mu\text{m}$, podemos notar que las bacterias no “se pierden” del cuadrado, sino que quedan rebotando, en cambio en el caso con radio $R = 2\mu\text{m}$, las bacterias se van rápidamente del cuadrado graficado, lo que afirma que con radios menores difunden más. También se nota una gran diferencia entre bacterias de la misma cepa, esto se da por la estrategia de nado de cada una. La estrategia RR-RRF tiene cambios de dirección más abruptos y esto genera un “encajonamiento” de las bacterias en un espacio reducido. En cambio las trayectorias lineales sortean a los defectos fácilmente. Para tener una noción intuitiva de cómo difunde cada una, si se encierra en un círculo cada trayectoria para un cierto tiempo, claramente el radio del círculo que encierra a la trayectoria lineal es mayor que el de la RR-RRF. Es importante notar que en las figuras Fig. 5.11 se observa la periodicidad de la configuración de los defectos impuesta por las condiciones periódicas de contorno (CPC) y la prohibición de que los círculos intersequen con el borde de la celda de simulación. Es importante en un futuro realizar un análisis de los posibles efectos de tamaño que provoca la implementación de las CPC.

En la Fig. 5.12 se presentan los resultados del coeficiente de difusión en función del radio de los obstáculos para dos densidades $\phi_{geo} \sim 0.1$ y $\phi_{geo} \sim 0.5$. Se nota claramente que para densidades bajas de defectos, la curva es prácticamente constante, en cambio para densidades altas se ve un decaimiento, que luego se estanca para defectos de radios $R = 15\mu\text{m}$ y $R = 20\mu\text{m}$.

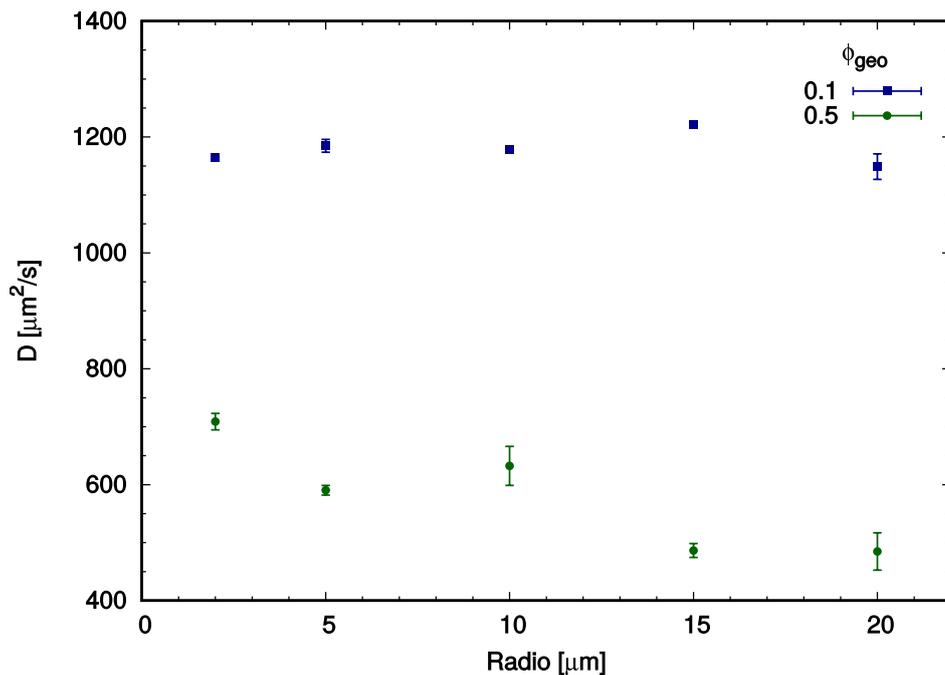


Figura 5.12: (Color en pdf) Coeficiente de difusión de la cepa Δ lafA versus el radio de los defectos para dos densidades, $\phi_{geo} \sim 0.1$ y $\phi_{geo} \sim 0.5$.

5.1.3. Cepa con sistema flagelar lateral

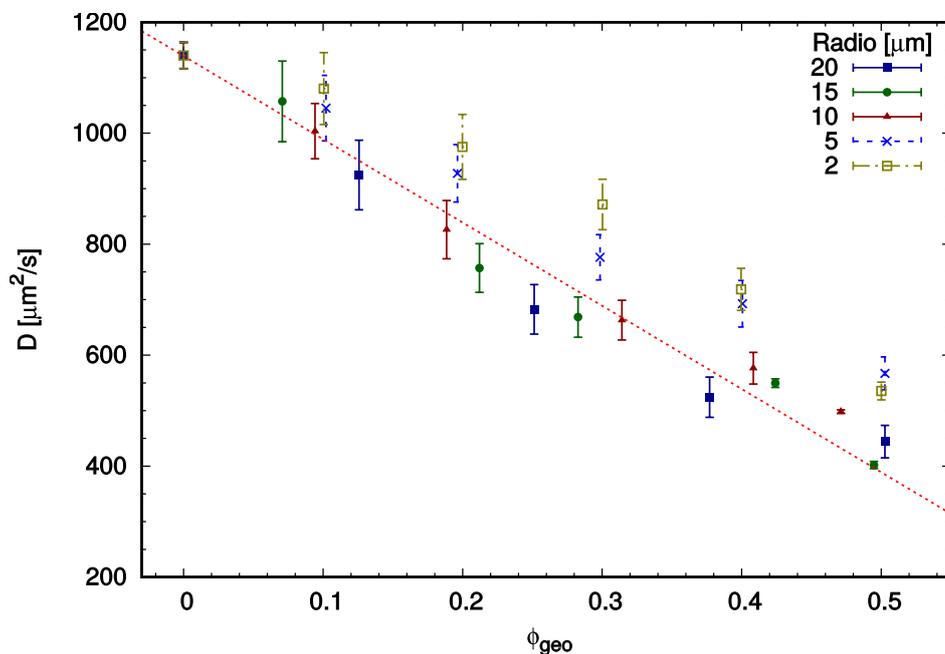


Figura 5.13: (Color en pdf) Coeficiente de difusión para la bacteria Δ fliC en función de la densidad de defectos ϕ_{geo} . Línea de puntos roja, sólo como guía al ojo para ver cómo decae, función lineal del tipo $a\phi_{geo} + b$, donde $a = -1500 \mu\text{m}^2/\text{s}$ y $b = 1139 \mu\text{m}^2/\text{s}$.

La cepa Δ fliC es una modificación genética de la *Bradyrhizobium diazoefficiens* que solo posee el sistema flagelar lateral, es decir no posee el flagelo subpolar, que es el

que genera la fuerza del motor para la propulsión. Esto genera que su velocidad media sea aproximadamente la mitad que en el caso de las otras dos cepas (Tabla 2.1). Sin embargo, como vimos en la Sección 4.2, difunde más que la bacteria biflagelada en un medio sin obstáculos, debido a que su tipo de nado tiene mayor persistencia que el de la cepa salvaje. En la Fig. 5.13 se observa que el coeficiente de difusión decae

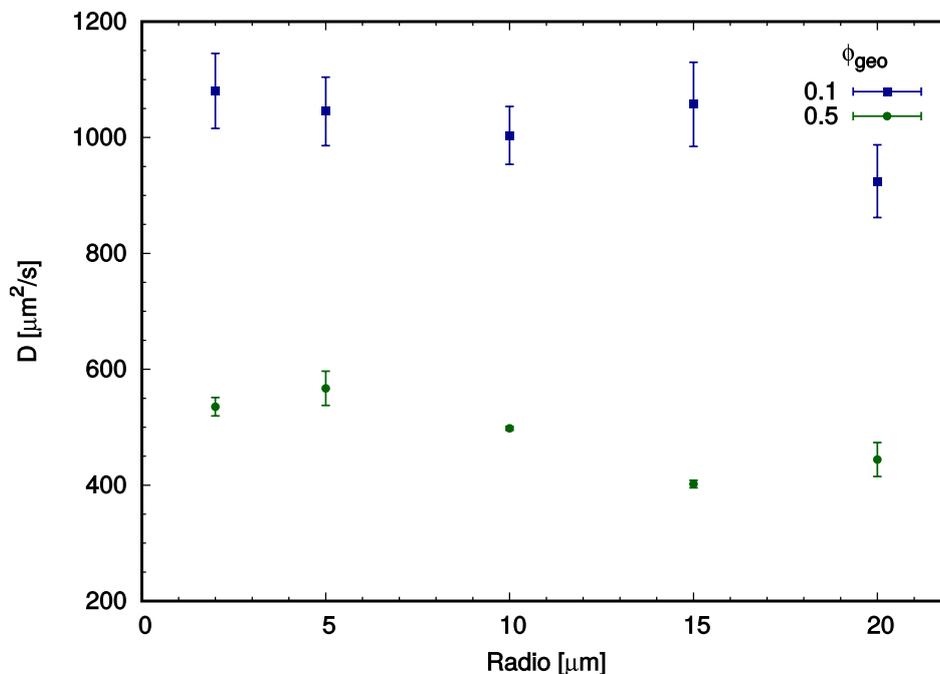


Figura 5.14: (Color en pdf) Coeficiente de difusión de una población de bacterias que poseen solo el sistema flagelar lateral, Δ fliC, versus el radio de los defectos, para dos ϕ_{geo} .

monótonamente con la densidad de defectos. Para un medio sin defectos, el coeficiente de difusión es $D = 1140 \pm 23 \mu\text{m}^2$, con obstáculos de radio $R = 20 \mu\text{m}$, si la densidad de defectos es $\phi_{geo} \sim 0.1$, $D = 924 \pm 60 \mu\text{m}^2$, es decir decae un $\sim 19\%$, si $\phi_{geo} \sim 0.5$ $D = 444 \pm 30 \mu\text{m}^2$, decae un $\sim 61\%$. Al igual que para las otras dos cepas, los valores del coeficiente de difusión correspondiente a los radios $R_1 = 2 \mu\text{m}$ y $R_2 = 5 \mu\text{m}$, se encuentran por encima de los otros. En la Fig. 5.14 se presenta el coeficiente de difusión en función al radio de los defectos para dos densidades de obstáculos. Se observa que los valores para cada densidad se mantienen aproximadamente constantes en los dos casos.

En la Fig. 5.15 se presentan trayectorias de las bacterias en diferentes geometrías. Cabe resaltar que en un medio con defectos de radio $R = 2 \mu\text{m}$ las trayectorias son cualitativamente lineales. Si se compara con la Fig. 5.15(b) ésta tiene tracks más curvos dado que las bacterias permanecen en los obstáculos de radio mayor. Se observa un avance de cada bacteria de forma más recta que en la Fig. 5.15(b), y sin retornos, como en Fig. 5.11(a). Esto se debe a la estrategia de nado, que tiene un tiempo característico de cambio de dirección mayor que las otras dos bacterias, ya que para la Δ fliC $\tau = 5.7\text{s}$ y las que presentan el flagelo subpolar tienen un $\tau \sim 2.5\text{s}$. Sin embargo la cepa Δ fliC

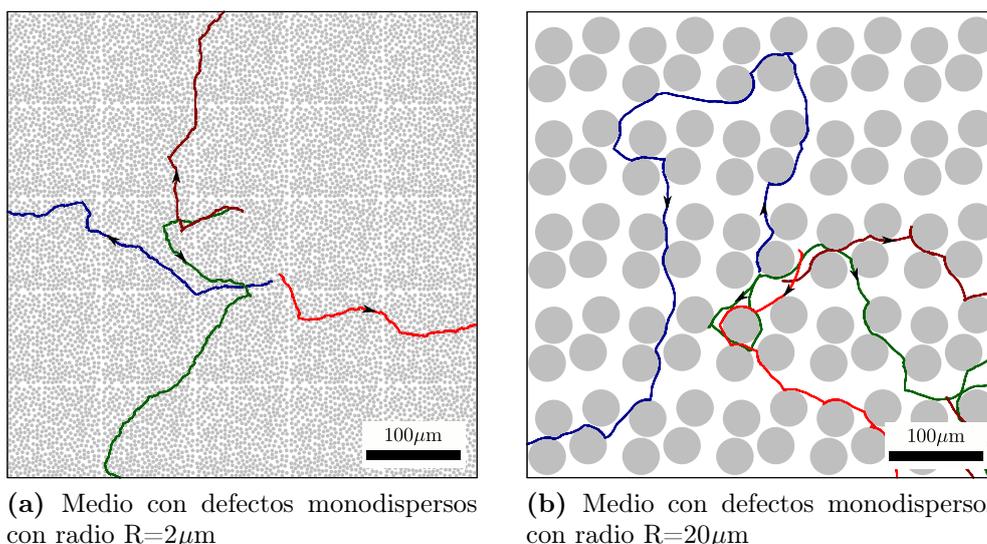


Figura 5.15: (Color en pdf) Trayectorias de 4 bacterias de la cepa ΔfliC , de $t_{\text{total}} = 100$ s de duración. Espacio graficado es de $500 \times 500 \mu\text{m}^2$, con una densidad de defectos $\phi_{\text{geo}} \sim 0.5$.

difunde menos que la que sólo tiene el flagelo subpolar, por las velocidades medias de nado, la ΔfliC tiene $v = (17.2 \pm 0.8) \mu\text{m/s}$ y la ΔlafA $v = (26.9 \pm 2.0) \mu\text{m/s}$.

5.1.4. Comparación entre cepas

En la Fig. 5.16 y Fig. 5.17 se presentan los resultados del coeficiente de difusión de las tres cepas estudiadas versus la densidad de defectos, para los dos radios de obstáculos extremos estudiados $R = 2\mu\text{m}$ y $R = 20\mu\text{m}$ respectivamente. En ambos casos el coeficiente decae de $D = 1600 \mu\text{m}^2$ a $D = 400 \mu\text{m}^2$ mostrando que lo relevante parece ser la densidad de obstáculos. Sin embargo hay mayor dispersión para $R = 2\mu\text{m}$ ya que hay mayor interacción o choques con los defectos y más salidas de las bacterias de las paredes de los defectos por la tangente. Se observa que a densidades mayores, lo que predomina es la geometría del medio en la difusión y no la estrategia de nado, que incluye la velocidad media, la persistencia, el ángulo medio de cambio de dirección, etc. Sin embargo no hay estudios sistemáticos experimentales in vivo para poder afirmar esto, ya que no se conoce si las bacterias adaptan su movilidad al medio en el cual están inmersos. Sin embargo, independientemente de la geometría, el radio y la densidad de defectos, a tiempos largos siempre se mantiene el orden de las curvas de MDS vs t que se ve en la difusión libre, la curva de la cepa ΔlafA se encuentra por encima de la ΔfliC y de la cepa salvaje. Podemos afirmar que de manera general para radios del orden de 4 y 10 veces el tamaño de la bacteria siempre difunde más rápido, independientemente de la cepa.

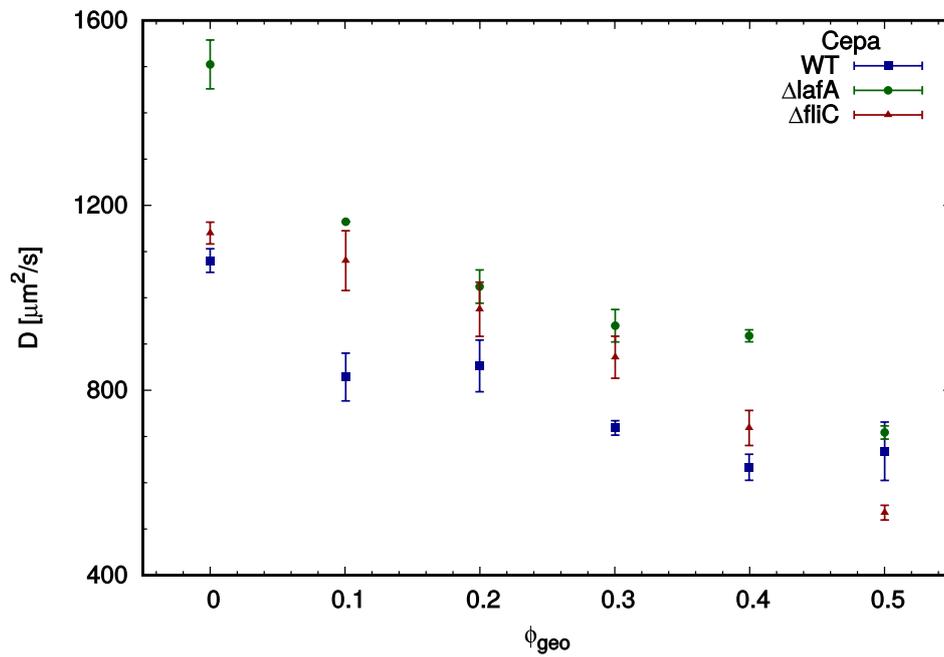


Figura 5.16: (Color en pdf) Coeficiente de difusión versus la densidad de defectos para un radio de $R=2\mu\text{m}$, para las tres cepas: WT, ΔlafA y ΔfliC .

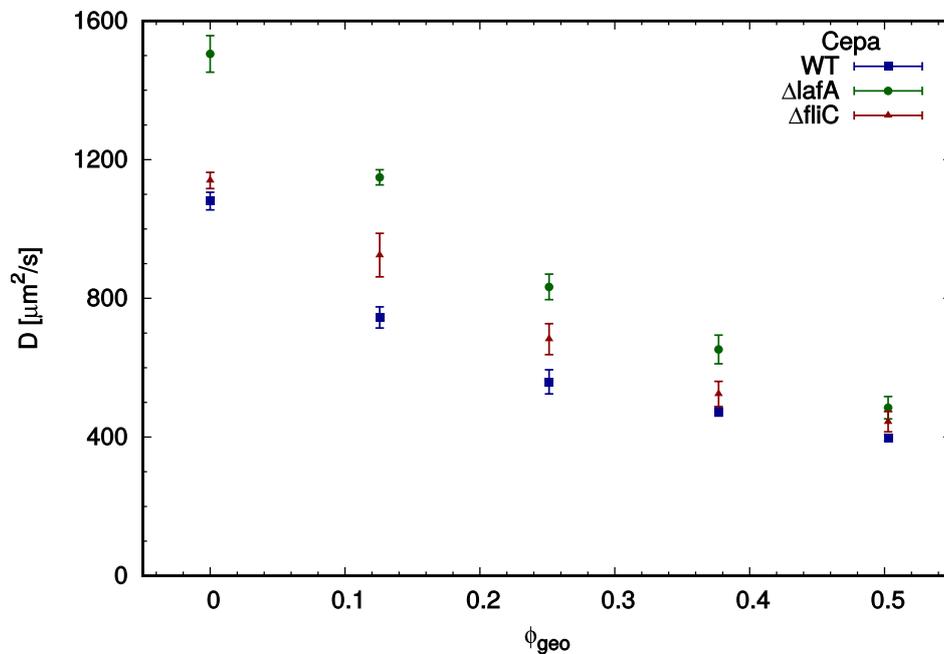


Figura 5.17: (Color en pdf) Coeficiente de difusión de las tres cepas de *Brady* estudiadas en función de la densidad de defectos para un radio de $R=20\mu\text{m}$.

5.2. Geometría con defectos circulares bidispersos

Avanzamos en orden de complejidad en cuanto la configuración de los obstáculos. En esta sección se presentan los resultados de las propiedades de transporte en un medio con radios bidispersos, con $R_{menor} = 2\mu\text{m}$ y $R_{mayor} = 20\mu\text{m}$ que son los radios extremos usados en la Sección 5.1. Se varió la densidad de defectos desde $\phi_{geo} \sim 0.2$ - 0.55 . La proporción de círculos de cada radio está fijada por la condición de que del total del área ocupada por los obstáculos, la mitad corresponda a círculos de radio R_{menor} y la otra a los de R_{mayor} .

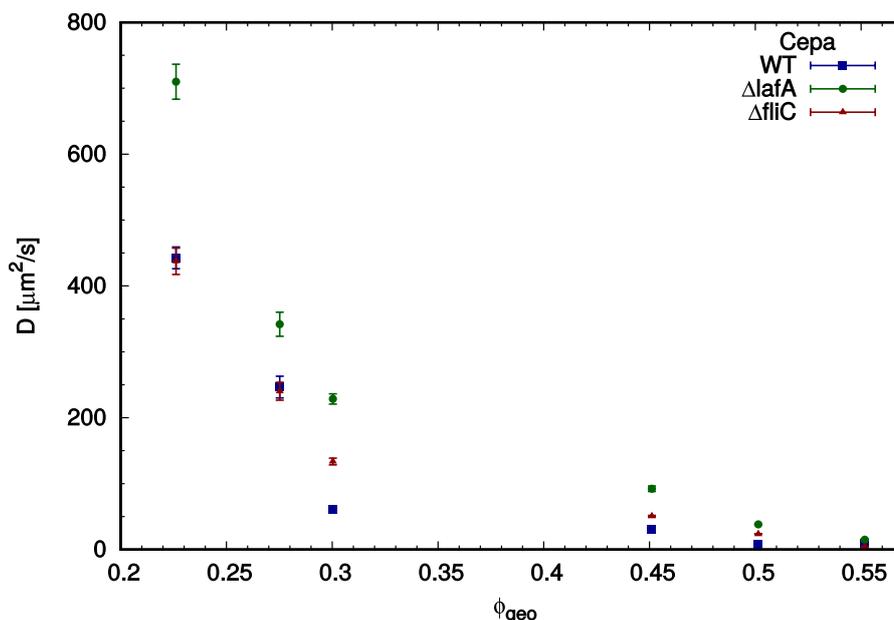


Figura 5.18: (Color en pdf) Coeficiente de difusión de las tres cepas estudiadas versus la densidad de defectos, en un medio con obstáculos circulares de radios bidispersos.

En la Fig. 5.18 se muestra el coeficiente de difusión en función a la densidad de defectos para un medio con defectos circulares con radios bidispersos. El coeficiente decae monótonamente a medida que aumenta la densidad de defectos. Se observa el mismo tipo de decaimiento en las tres cepas estudiadas. Es notable que la cepa salvaje (WT) y la que no presenta el sistema flagelar subpolar (ΔfliC) poseen coeficientes de difusión similares y para algunas densidades de defectos son indistinguibles. Es importante recalcar que a medida que aumenta la densidad de defectos, las características de cada cepa no resultan relevantes en la difusión, es decir, las propiedades de transporte de la población se va tornando independiente de la estrategia de nado.

En la Fig. 5.19 se presentan dos gráficos del desplazamiento cuadrático medio en función del tiempo para las tres cepas estudiadas para dos densidades de defectos. La cepa ΔlafA difunde más que las otras. Es importante recalcar que a tiempos cortos, el orden de las curvas de difusión es diferente que a tiempos largos. Realizando un análisis como en la Sección 5.1 podemos decir que como a tiempos cortos la dinámica

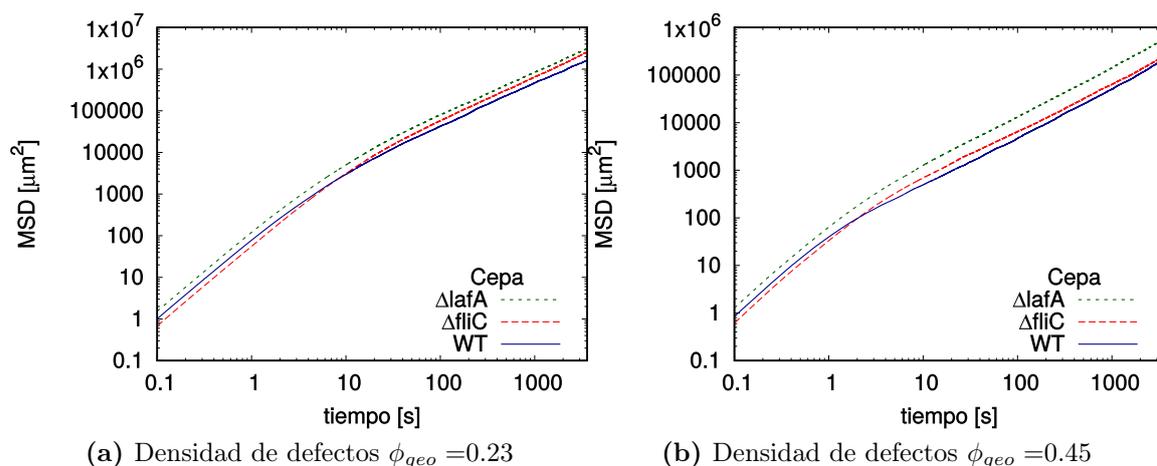


Figura 5.19: (Color en pdf) Desplazamiento cuadrático medio de las tres cepas de *Brady* en función del tiempo para un medio con defectos circulares con radios bidispersos para dos densidades de defectos.

es balística, prevalece la velocidad media de las bacterias, y no la estrategia de nado completa, es decir los otros parámetros de la movilidad que caracterizan cada tipo de movimiento no influyen. Esto se debe a que a tiempos cortos ($t \sim 10s$) no se puede percibir la estrategia de nado completa ya que es el tiempo de unos pocos cambios de dirección (CD), por ejemplo en el caso de la cepa salvaje, que tiene el menor tiempo característico de CD $\tau = 2.35s$, tiene en el orden de 4 CD. En cambio a tiempos largos los efectos de los cambios de dirección influyen ampliamente. Es notable que el tiempo de cruce de las curvas de la bacteria WT y $\Delta fliC$ cambia con la densidad de obstáculos. El tiempo de cruce disminuye con la densidad de obstáculos. Para densidades bajas de defectos $\phi_{geo} \sim 0.23$, el tiempo de cruce es $t_c \sim 8s$, y para $\phi_{geo} \sim 0.45$ $t_c \sim 2s$. Esto se debe a que al haber menor densidad de defectos la dinámica de la población es similar a la libre, en cambio los defectos producen que la dinámica de tipo balística (a tiempos cortos) se reduzca en tiempo por los efectos de confinamiento y encajonamiento.

Por otro lado podemos hacer una comparación entre la dinámica en cada tipo de medio. En la Fig. 5.20 se muestra el coeficiente de difusión en función de la densidad de defectos para la geometría con defectos monodispersos y bidispersos para la cepa salvaje. Es notable que el coeficiente de difusión en el caso bidisperso es menor que los dos casos con defectos monodispersos. Disminuye un $\sim 48\%$ con respecto al valor para un medio con defectos de radio $R = 2\mu m$ con densidad $\phi_{geo} \sim 0.2$, y un 99% con densidad $\phi_{geo} \sim 0.5$. Si bien la geometría bidispersa es una “mezcla” de los dos casos monodispersos graficados, el coeficiente está por debajo y no en el medio, como se esperaba. La presencia de dos tipos de defectos disminuye la difusión porque favorece los casos de “encajonamiento”, como se muestra en las siguientes figuras, en las que se presenta la dinámica individual.

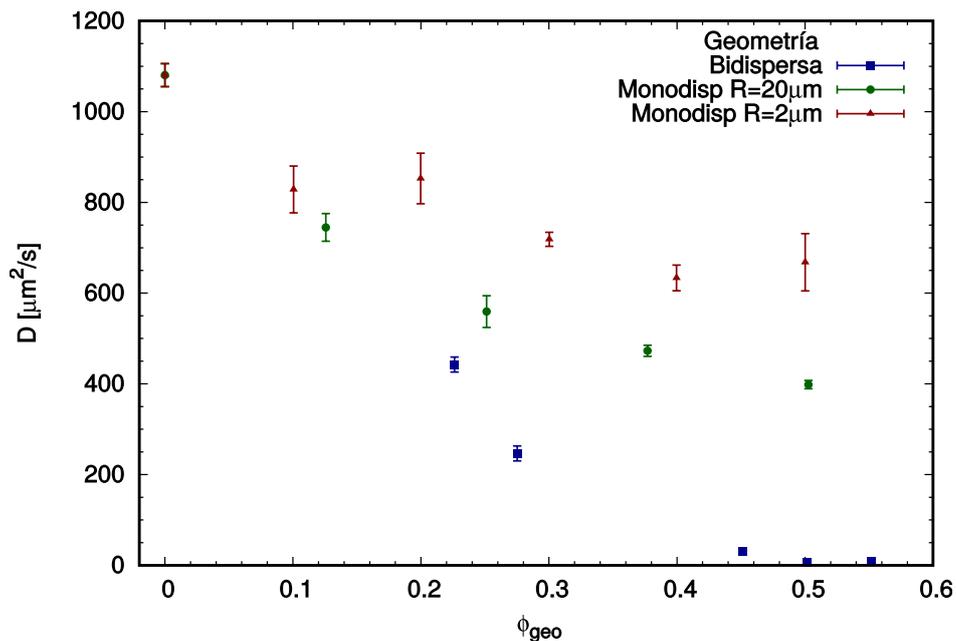


Figura 5.20: (Color en pdf) Coeficiente de difusión de la cepa salvaje versus la densidad de defectos para diferentes geometrías estudiadas

Si realizamos un análisis de los tracks, se puede observar un “encajonamiento” de las bacterias en una región, en la Fig. 5.21.

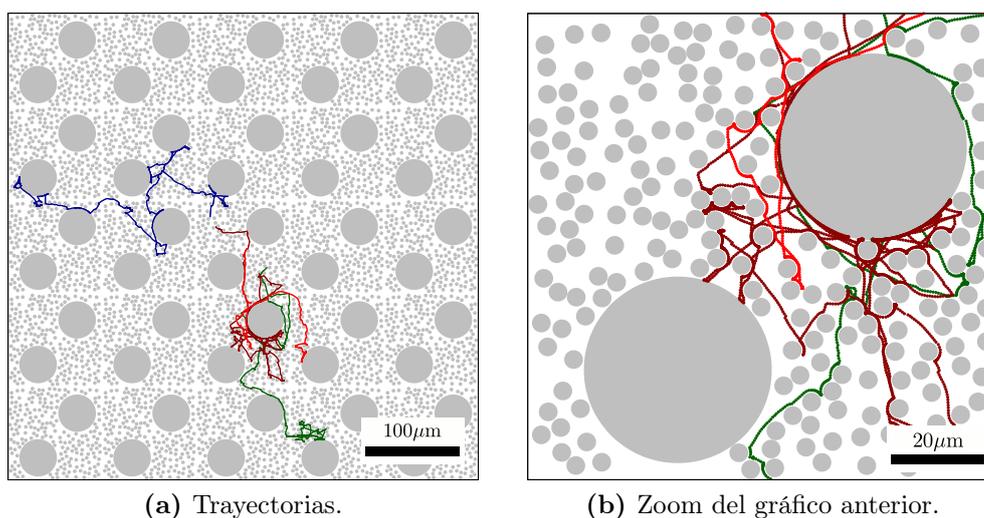


Figura 5.21: (Color en pdf) Trayectorias de cuatro bacterias de la cepa salvaje, para un medio con defectos circulares con radios bidispersos, con una densidad $\phi_{\text{geo}} \sim 0.5$. El tiempo $t_{\text{total}} = 100\text{s}$.

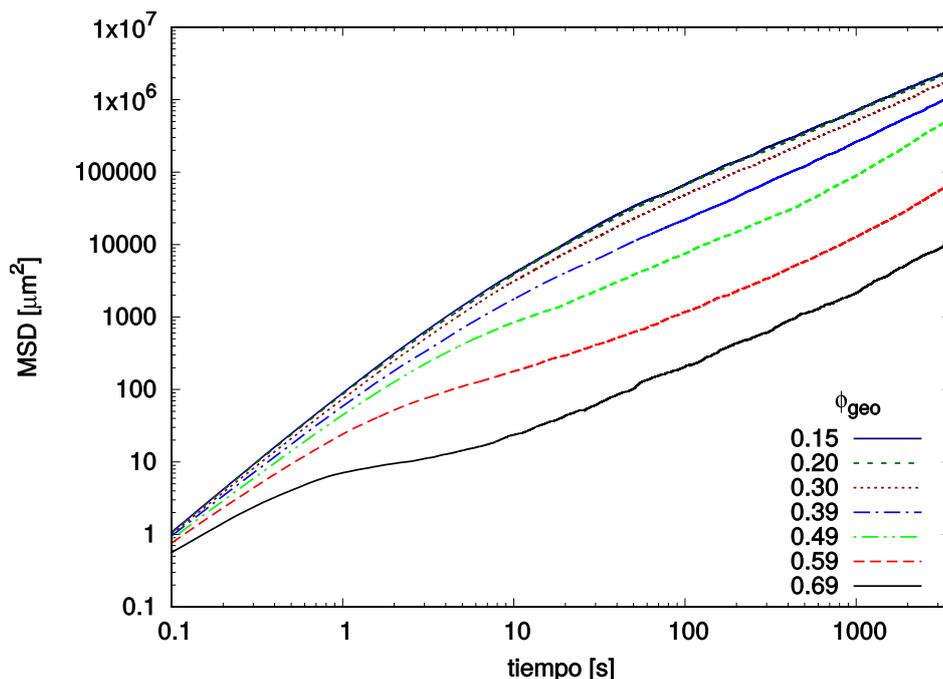


Figura 5.22: (Color en pdf) Desplazamiento cuadrático medio de la cepa WT en función al tiempo para diferentes densidades de defectos.

5.3. Geometría con defectos circulares polidispersos

En esta sección se presentan los resultados de las propiedades de transporte en medios con defectos circulares con radios polidispersos, más cercanos a un suelo real. Se generó la geometría con una distribución de radios entre $R_{\text{mínimo}} = 2\mu\text{m}$ y $R_{\text{máximo}} = 20\mu\text{m}$, y se varió la densidad de defectos desde $\phi_{geo} \sim 0.1$ hasta $\phi_{geo} \sim 0.7$. La configuración de círculos se realiza sorteando al azar el radio y la posición, uno a uno, corroborando que no se el círculo nuevo no se superponga con los anteriores, hasta alcanzar la densidad deseada. El radio se sortea con una distribución uniforme, pero como no se debe superponer, se favorecen los radios más pequeños frente a los más grandes. En la Fig. 5.22 se presentan las curvas del desplazamiento cuadrático medio de la cepa salvaje en función al tiempo. Se observa claramente que el desplazamiento cuadrático medio disminuye con la densidad de defectos. Cabe resaltar que a medida que aumenta la densidad de defectos las curvas son más rugosas, esto se debe a que al haber mayor interacción con las paredes es necesario tener mayor estadística. En las curvas correspondientes a densidades en el rango $\phi_{geo} \sim 0.15-0.39$, se observan dos regímenes que caracterizan la dinámica poblacional, a tiempos cortos balístico, a tiempos largos difusivo. Por otro lado, a densidades mayores, es decir a partir de $\phi_{geo} \sim 0.49$ se observan también dos regímenes y uno adicional, ya que hay un cambio en la pendiente en un tiempo $t \sim 800\text{s}$, digamos que a los 13 min se percibe un cambio de la dinámica. El tiempo en el que se produce el primer quiebre de las curvas, que da cuenta del tiempo en el que cambia la

dinámica de tipo balística a difusiva, disminuye con la densidad de defectos. Esto se debe a que a medida que aumenta la densidad el espacio libre es menor y el camino libre medio de las bacterias es menor a la longitud de corrida l_r , es decir antes del tiempo característico de CD se chocan con un obstáculo de manera tal que la dinámica balística se ve dificultada.

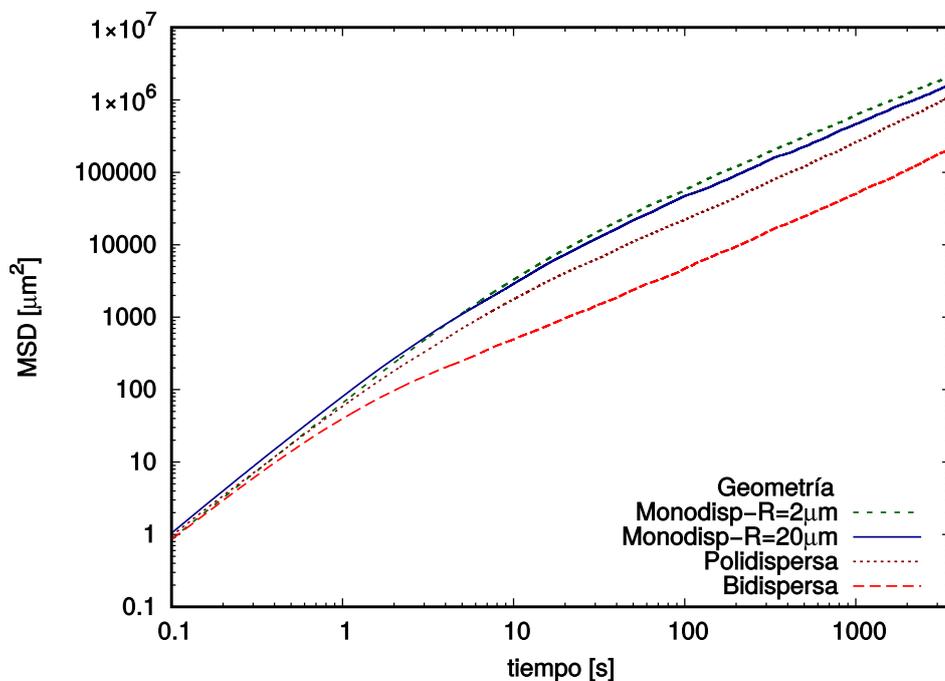


Figura 5.23: Desplazamiento cuadrático medio de la cepa biflagelada en función al tiempo para diversos tipos de defectos, todas con un $\phi_{geo} \sim 0.4$

Dado que uno de los objetivos de nuestro trabajo es conocer y entender cómo es la dinámica bacteriana en su ambiente natural, el suelo, es importante realizar una comparación de las propiedades de transporte de cada tipo de suelo poroso artificial con los que trabajamos. En la Fig. 5.23 se presentan las curvas de el desplazamiento cuadrático medio en función al tiempo para una densidad de defectos $\phi_{geo} \sim 0.4$. Las curvas correspondientes a los defectos de radios monodispersos se encuentran por encima de las otras. Hay un cruce de estas curvas en un tiempo $t \sim 4s$, que se debe a que para radio de obstáculos $R = 2\mu m$ estos se encuentran más cerca unos de otros que para $R = 20\mu m$, lo cual genera que para radios chicos la dinámica de tipo balística se acorte, pues en menor tiempo las bacterias se encuentran con obstáculos, que para radios grandes. Sin embargo la interacción con las paredes provoca que para radios grandes la difusión sea menor, pues las bacterias permanecen más tiempo en las paredes de los obstáculos con radio mayor.

En resumen se estudiaron las propiedades de transporte en medios con obstáculos. Se realizaron simulaciones del sistema biológico a tiempos largos, $t=1h$, con diversas densidades de defectos. En la literatura se han encontrado trabajos experimentales y

numéricos en medios similares a los trabajados [43, 45], pero estos no realizan un estudio a tiempos largos y a altas densidades de defectos. En concordancia con la literatura, la difusión disminuye con la densidad de defectos, como así también el tiempo en el que el sistema se encuentra en un régimen de tipo balístico. También es posible afirmar que el coeficiente de difusión traslacional disminuye con el radio de los defectos. Si se realiza una comparación de los coeficientes de difusión traslacional de cada cepa se observa que el orden de estos se mantiene igual que en el caso de la difusión libre. Es importante realizar un estudio sistemático experimental y computacional de la interacción de las bacterias con los defectos y en medios confinados, ya que no se conoce si las bacterias adaptan sus estrategias de nado al medio en el que se encuentran.

CAPÍTULO 6

Conclusiones

En resumen se estudió la movilidad y las propiedades de transporte de poblaciones de tres cepas de bacterias de suelo *Bradyrhizobium diazoefficiens* en medios bidimensionales con obstáculos. Se encontraron los parámetros adecuados correspondientes a las diversas y novedosas estrategias de nado de las tres cepas estudiadas realizando un análisis de los datos biológicos experimentales y simulaciones numéricas. A partir de esto se propuso un modelo para describir sus estrategias de nado, es decir el detalle de la movilidad bacteriana a nivel microscópico. También se reprodujeron a través de simulaciones los tipos de trayectoria a tiempos más largos, alcanzando una descripción más realista. Se estudió la dinámica poblacional en medios libres, es decir sin obstáculos con simulaciones con condiciones periódicas de contorno. Como resultado de esto podemos afirmar que la cepa que solo presenta el flagelo subpolar, ΔlafA tiene un coeficiente de difusión traslacional $D = 1504 \pm 53 \mu\text{m}^2/\text{s}$, la cepa salvaje $D = 1080 \pm 25 \mu\text{m}^2/\text{s}$, es decir un $\sim 28\%$ menor que ΔlafA , y la cepa que únicamente tiene el sistema flagelar lateral, ΔfliC , $D = 1140 \pm 24 \mu\text{m}^2/\text{s}$, disminuye un $\sim 24\%$ respecto de la ΔlafA . También se caracterizaron las propiedades de transporte de poblaciones bacterianas en diversos medios con obstáculos, con diferentes porosidades y con diferentes tipos de obstáculos. Se realizó un análisis desde lo más simple, defectos circulares monodispersos a lo más complejo, con mayor similitud a un suelo real, defectos con radios polidispersos. En los casos de defectos bidispersos y polidispersos se encontraron efectos de encajonamiento, que dan lugar a que la difusión disminuya. Si se realiza una comparación de los coeficientes de difusión traslacional de cada cepa se observa que el orden de estos se mantiene igual que en el caso de la difusión libre.

6.1. Perspectivas

Este trabajo deja muchas puertas abiertas y resultados a refinar, que se continuarán en el trabajo de doctorado. Los resultados son prometedores y se trabajó en colaboración con el grupo de A. R. Lodeiro y de M. L. Cordero.

- Optimizar el código para reducir el tiempo de cómputo de las simulaciones en medios con obstáculos. Esto nos permitirá obtener en menos tiempo más datos mejorando la estadística y realizar simulaciones con dimensiones reales de dispositivos de microfluídica, pudiendo así comparar exactamente el mismo caso.
- Realizar simulaciones en otros medios como por ejemplo redes de canales. Ya hay resultados preliminares teórico-experimentales en colaboración con el laboratorio de microfluídica de M. L. Cordero.
- Mejorar la estadística de los datos obtenidos en el caso de la difusión en medios con defectos, haciendo realizaciones en desorden, es decir modificando la configuración de los obstáculos.
- Mejorar los resultados, haciendo más simulaciones variando el radio de los obstáculos y la densidad de estos para obtener la relación de dependencia entre el coeficiente de difusión traslacional y el radio de defectos, y la densidad.
- Mejorar los datos biológicos del problema usados en las simulaciones, como la velocidad media, el tiempo y ángulo característico de cambio de dirección. En los experimentos de biología hay muchas complicaciones experimentales por las cuales no es posible realizar buena estadística. Se está desarrollando un software [46, 47] para poder analizar los videos provistos por colegas experimentales y realizar un análisis estadístico.
- Realizar un análisis de los efectos de tamaño generados por la aplicación de condiciones periódicas de contorno.

Bibliografía

- [1] J. R. M. Delamuta, R. A. Ribeiro, E. Ormeno-Orrillo, I. Soares Melo, E. Martínez-Romero, and M. Hungria. [Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* group Ia strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov.](#) *Int J Syst Evol Microbiol.*, 63:3342–51, 2013.
- [2] F. Salvagiotti, J. Capurro, and J. M. Enrico. [El manejo de la nutrición nitrogenada en soja.](#) *INTA*, 2009.
- [3] H.A. Guidobaldi, Y. Jeyaram, C.A. Condat, M. Oviedo, I. Berdakin, V.V. Moshchalkov, L.C. Giojalas, A.V. Silhanek, and V.I. Marconi. [Disrupting the wall accumulation of human sperm cells by artificial corrugation.](#) *Biomicrofluidics*, 9(2):024122, 2015.
- [4] A. Guidobaldi, Y. Jeyaram, I. Berdakin, V. V. Moshchalkov, C. A. Condat, V. I. Marconi, L. Giojalas, and A. V. Silhanek. [Geometrical guidance and trapping transition of human sperm cells.](#) *Phys. Rev. E.*, 89:0327201–6, 2014.
- [5] I. Berdakin, Y. Jeyaram, V. V. Moshchalkov, L. Venken, S. Dierckx, S. J. Vanderleyden, A. V. Silhanek, C. A. Condat, and V. I. Marconi. [Influence of swimming strategy on microorganism separation by asymmetric obstacles.](#) *Phys. Rev. E*, 87:0527021–0527029, 2013.
- [6] I. Berdakin, A. V. Silhanek, H. N. Moyano Cortez, V. I. Marconi, and C. A. Condat. [Quantifying the sorting efficiency of self-propelled run-and-tumble swimmers by geometrical ratchets.](#) *Central Eur. J. Phys.*, 11(12):1653–1661, 2013.
- [7] S. E. Hulme, W. R. DiLuzio, S. S. Shevkoplyas, L. Turner, M. Mayer, H. C. Berg, and G. M. Whitesides. [Using ratchets and sorters to fractionate motile cells of *Escherichia coli* by length.](#) *Lab on a Chip*, 8:1888–1895, 2008.

- [8] P. Galajda, J. Keymer, P. Chaikin, and R. Austin. [A wall of funnels concentrates swimming bacteria](#). *Journal of bacteriology*, 189(23):8704–8707, 2007.
- [9] A. de Mel, T. Yap, G. Cittadella, L. R. Hale, P. Maghsoudlou, P. de Coppi, M. A. Birchall, and A. M. Seifalian. [A potential platform for developing 3D tubular scaffolds for paediatric organ development](#). *J Mater Sci Mater Med*, 26:141, 2015.
- [10] F. J. H. Hol and C. Dekker. [Zooming in to see the bigger picture: Microfluidic and nanofabrication tools to study bacteria](#). *Science*, 346(6208):1251821, 2014.
- [11] S. Rismani Yazdi, N. Nosrati, C. A. Stevens, D. Vogel, and C. Escobedo. [Migration of magnetotactic bacteria in porous media](#). *Biomicrofluidics*, 12:011101, 2018.
- [12] E. M. Purcell. [Life at low Reynolds number](#). *Am. J. Phys.*, 45(1):3–11, 1977.
- [13] G.G. Stokes. On the effect of the internal friction of fluids on the motion of pendulums. *Trans. Cambr. Phil. Soc.*, 9:8–106, 1851.
- [14] G. Nägele. *Colloidal Hydrodynamics*. Elsevier, 2013.
- [15] S. Merino and J. M. Tomás. *Pili and Flagella: Current Research and Future Trends*. Caister Academic Press, 2009.
- [16] J. D. Partridge and R. M. Harshey. [Swarming: flexible roaming plans](#). *Journal of bacteriology*, 195:909–918, 2013.
- [17] S. M. Kirov. [Bacteria that express lateral flagella enable dissection of the multifunctional roles of flagella in pathogenesis](#). *FEMS Microbiology Letters*, 224:151–159, 2003.
- [18] J. I. Quelas, M. J. Althabegoiti, C. Jimenez-Sanchez, A. A. Melgarejo, V. I. Marconi, E. J. Mongiardini, S. A. Trejo, F. Mengucciland J. J. Ortega-Calvo, and A. R. Lodeiro. [Swimming performance of *Bradyrhizobium diazoefficiens* is an emergent property of its two flagellar systems](#). *Sci. Rep*, 6:23841, 2016.
- [19] H. C. Berg and D. A. Brown. [Chemotaxis in escherichia coli analysed by three dimensional tracking](#). *Nature*, 239:500–504, 1972.
- [20] H. C. Berg. *Random walks in biology*. Princeton University Press, 1993.
- [21] J. G. Mitchell. [The Energetics and Scaling of Search Strategies in Bacteria](#). *Am. Nat.*, 160:727–740, 2002.
- [22] R. Stocker. [Reverse and flick: Hybrid locomotion in bacteria](#). *PNAS*, 108:2635–2636, 2011.

- [23] K. Son, J. S. Guasto, and R. Stocker. [Bacteria can exploit a flagellar buckling instability to change direction](#). *Nature Physics*, 9:494–498, 2013.
- [24] S. Bianchi, F. Saglimbeni, and R. Di Leonardo. [Holographic Imaging Reveals the Mechanism of Wall Entrapment in Swimming Bacteria](#). *Physical Review X*, 7:011010, 2017.
- [25] H. N. Moyano Cortéz. [Dinámica bacteriana en sustratos micro-diseñados](#), 2014. Trabajo especial de la Lic. en Física. FaMAF-UNC.
- [26] E. Lauga and T. R. Powers. [The hydrodynamics of swimming microorganisms](#). *Rep. Prog. Phys.*, 72:096601, 2009.
- [27] A. P. Berke, L. Turner, H. C. Berg, and E. Lauga. [Hydrodynamic Attraction of Swimming Microorganisms by Surfaces](#). *Phys. Rev. Lett.*, 101:038102, Jul 2008.
- [28] J. R. Blake. [A note on the image system for a stokeslet in a no-slip boundary](#). *Mathematical Proceedings of the Cambridge Philosophical Society*, 70:303–310, 1971.
- [29] G. Li and J. X. Tang. [Accumulation of Microswimmers near a Surface Mediated by Collision and Rotational Brownian Motion](#). *Phys. Rev. Lett.*, 103:078101, 2009.
- [30] C. Bechinger. [Active particles in complex and crowded environments](#). *Reviews of Modern Physics*, 88:045006, 2016.
- [31] P. S. Lovely and F.W. Dahlquist. [Statistical measures of bacterial motility and chemotaxis](#). *Journal of theoretical biology*, 50:477–196, 1975.
- [32] H. C. Berg. *E. Coli in Motion*. Springer, 2004.
- [33] P. Tabeling. *Introduction to microfluidics*. Oxford, University Press, 2005.
- [34] H. Bruus. *Theoretical Microfluidics*. Oxford, University Press, 2008.
- [35] M. B. Wan, C. J. Olson Reichhardt, Z. Nussinov, and C. Reichhardt. [Rectification of Swimming Bacteria and Self-Driven Particle Systems by Arrays of Asymmetric Barriers](#). *Phys. Rev. Lett.*, 101:018102, 2008.
- [36] I. Berdakin. [Dinámica de micronadadores: optimización y control](#). PhD thesis, FaMAF-UNC, 2015.
- [37] M. P. Allen and D. J. Tildesley. *Computer Simulation of Liquids*. Clarendon press-Oxford, 1987.

- [38] S. L. López-García, A. Peticari, C. Piccinetti, L. Ventimiglia, N. Arias, J.J. De Battista, M. J. Althabegoiti, E. J. Mongiardini, J. Pérez-Giménez, J. I. Quelas, and A. R. Lodeiro. [In-Furrow Inoculation and Selection for Higher Motility Enhances the Efficacy of *Bradyrhizobium japonicum* Nodulation](#). *Agronomy Journal*, 101:357–363, 2009.
- [39] A. R. Lodeiro and G. Favelukes. [Early interactions of *Bradyrhizobium japonicum* and soybean roots: specificity in the process of adsorption](#). *Soil Biology and Biochemistry*, 31:1405–1411, 1999.
- [40] J. W. Barton. *Determination of effective coefficients for bacterial migration in sand columns*. PhD thesis, University of Virginia.
- [41] K. J. Duffy, P. T. Cummings, and R. M. Ford. [Random Walk Calculations for Bacterial Migration in Porous Media](#). *Biophysical Journal*, 68:800–806, 1995.
- [42] J. Liu, R. M. Ford, and J. A. Smith. [Idling Time of Motile Bacteria Contributes to Retardation and Dispersion in Sand Porous Medium](#). *Environ. Sci. Technol.*, 45:3945–3951, 2011.
- [43] J. E. Sosa-Hernández, M. Santillán, and J. Santana-Solano. [Motility of *Escherichia coli* in a quasi-two-dimensional porous medium](#). *Physical Review E*, 95, 2017.
- [44] H. Liu, E. Jiang, C. Q. Sun, and B. Z. Gao. [The Volume Rule in the Random Packing Ratio](#). *Preprint arXiv:1205.4743*, 2012.
- [45] H. Auradou. [Observation of the dispersion of microbes in a lab-on-a-chip porous media](#). *Congreso de Microfluídica Argentina*, 2017.
- [46] J. A. Sánchez, P. A. Pury, and V. I. Marconi. [Un algoritmo modular para el seguimiento de partículas en videos de microscopía](#). *Mecánica Computacional*, XXXIV:3443–3450, 2016.
- [47] M. G. Reyes. [Seguimiento de partículas en videos de microscopía](#), 2017. Trabajo especial de la Lic. en Ciencias de la Computación. FaMAF-UNC.