

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD MONTERREY

Motilidad de *Escherichia coli* y *Trypanosoma cruzi*
en sistemas confinados:

Experimentos y modelación matemática

Tesis que presenta:

Juan Eduardo Sosa Hernández

Para obtener el grado de:

**Doctor en Ciencias
en Ingeniería y Física Biomédicas**

Director de la Tesis:

Dr. Jesús Manuel Santana Solano

Apodaca, Nuevo León México.

Agosto, 2016

© Derechos reservados por
Juan Eduardo Sosa Hernández
2016

La tesis presentada por Juan Eduardo Sosa Hernández fue aprobada por:

Dr. Gabriel Caballero Robledo

Dr. Daniel Sánchez Herrera

Dr. Moisés Santillan Zerón

Dr. Jesús Manuel Santana Solano, Director

Apodaca, Nuevo León México., 23 de Agosto de 2016

A mi esposa y mi familia

Agradecimientos

Agradezco al personal de CINVESTAV-Unidad Monterrey que facilitó el trabajo diario dentro de las instalaciones haciendo del Cinvestav un lugar agradable.

A mis compañeros estudiantes que me compartieron sus conocimientos y tuvieron la paciencia de enseñarme en sus distintas áreas de expertos.

Agradezco a CONACyT por el apoyo económico que me permitió dedicarme a mis estudios y CINVESTAV-Unidad Monterrey y por la oportunidad de perseguir mis ambiciones académicas.

Al grupo de personas con quienes se realizó la colaboración en la parte de motilidad de *T. cruzi*, principalmente a Diego Debra, Jorge A. Arias, la Dra. Rebeca G. Manning y el Dr. Gilberto Ballesteros.

Al Dr. Moisés Santillan por sus consejos y la colaboración tan productiva que tuvimos.

Al Dr. Jesús Santana por su guía durante todos los años que fui su aprendiz, su tiempo y su experiencia son invaluable, la productividad de tan alta calidad que se desarrollo y heredo.

El presente trabajo fue financiado parcialmente por el proyecto Conacyt 60152.

Índice General

Índice General	I
Índice de Figuras	III
Índice de Tablas	V
Publicaciones	VII
Resumen	IX
Abstract	XI
1. Introducción	1
1.1. Objetivos	4
1.1.1. General	4
1.1.2. Particulares	4
2. Antecedentes	5
2.1. Motilidad	5
2.1.1. Seudópodos y pili	6
2.1.2. Cilios y flagelos	7
2.2. Nado a bajo número de Reynolds	8
2.2.1. “Pushers” y “pullers”	9
2.3. Microorganismos	10
2.3.1. <i>Escherichia coli</i>	10
2.3.1.1. Ciclo de vida	11
2.3.1.2. Motor y flagelo	11
2.3.2. <i>Trypanosoma cruzi</i>	13
2.3.2.1. Ciclo de vida	13
2.3.2.2. Flagelo y motor	14
2.4. Importancia biológica, médica y ecológica	14
2.5. Motilidad bajo confinamiento	15
2.5.1. Interacciones hidrodinámicas	16
2.5.2. Interacciones directas	17
2.6. Modelado de micronadadores	18
2.6.1. Caminante aleatorio simple	18
2.6.2. Caminantes aleatorios con correlación	20

3. Materiales y métodos	23
3.1. Cultivos celulares	23
3.1.1. <i>E. coli</i>	23
3.1.2. <i>T. cruzi</i>	24
3.2. Preparación de muestras	25
3.2.1. <i>E. coli</i>	25
3.2.2. <i>T. cruzi</i>	26
3.3. Diseño experimental	26
3.3.1. <i>E. coli</i>	26
3.3.2. <i>T. cruzi</i>	26
3.4. Video microscopia digital	27
4. Análisis de imágenes, trayectorias y batido del flagelo	29
4.1. Análisis de imágenes de las bacterias	29
4.2. Análisis de imágenes del parásito	33
4.3. Análisis de trayectorias	33
4.4. Análisis de batido de flagelos del parásito	37
5. Modelo matemático de un caminante aleatorio	39
5.1. Modelo base	39
5.1.1. Modelo matemático fenomenológico	40
5.2. Condiciones de frontera y convergencia	41
5.3. Variantes del modelo	41
5.3.1. Interacciones entre bacterias y obstáculos	41
5.3.2. Modelo variante que incluye cepa transformada	44
6. Motilidad de <i>E. coli</i> en un medio poroso cuasi-bi-dimensional	45
6.1. Motilidad bajo confinamiento sin obstáculos	45
6.1.1. Corridas y tumbos, descomposición de velocidad del nado de <i>E. coli</i> y parámetros para modelar la motilidad	47
6.2. Motilidad de bacterias a diferentes fracciones de área de obstáculos	49
7. Motilidad de <i>T. cruzi</i> en un medio cuasi-bi-dimensional	57
7.1. Suavizado de las trayectorias de los parásitos	57
7.2. Modos de movimiento persistente y de tumbo	59
7.3. Componentes de velocidad longitudinal y transversal	63
7.4. Validación del modelo	66
8. Conclusiones y perspectivas	69
8.1. Conclusiones	69
8.2. Perspectivas	72
A. Apéndice A	73

Índice de Figuras

2.1. Diagrama esquemático de una célula eucarionta en movimiento por medio de pseudópodos (<i>Cell Migration</i> . N.p., n.d. Web. 10 Aug. 2016. < http://www.cellmigration.org/images/index-background.png >).	6
2.2. Movimiento de flagelos en forma de helicoide y cilios en forma de batido.	7
2.3. Diagrama que describe la composición de un flagelo eucarionte. a) 1 axonema, 2 membrana plasmática, 3 transporte intra-flagelar, 4 cuerpo basal, 5 corte transversal del axonema y 6 tripletes de microtubulos. b) 1 doblete externo de microtúbulos, 2 doblete interno de microtúbulos, 3 dos brazos de dineína, uno interno y otro externo, 4 radio, 5 puente de nexina, 6 membrana plasmática.	8
2.4. Diagrama que representa a los micronadadores como bacterias “pushers” a) y algas “pullers” b) en donde las flechas negras indican la dirección del movimiento del micronadador y las flechas de color indican la dirección del flujo. En c) y d) sólo se presentan la dirección del flujo del fluido (Diagrama tomado de [55] bajo del número de licencia 3917250941838).	10
2.5. Diagrama esquemático de la bacteria <i>E. coli</i> mostrando sus características físicas más importantes como sus dimensiones, forma y partes fundamentales en la quimiotaxis con los flagelos y receptores.	11
2.6. Partes del motor y anclaje en la bacteria junto con una reseña de su función. Diagrama basado en <i>E. coli</i> in motion [5].	12
2.7. Ciclo de vida del <i>Tripanosoma cruzi</i> . Imagen de dominio público generada por DPD CDC [17].	13
3.1. Curva de crecimiento de la bacteria <i>E. coli</i> cuya población se mide a través de la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm en función del tiempo (en horas) y su respectivo ajuste de la parte lineal del crecimiento.	24
4.1. Representación de una imagen en pixeles. a) Imagen original, b) Valores de intensidad para cada pixel sobre la imagen.	30
4.2. Imagen correspondiente a un cuadro del video experimental a una fracción de área baja, en donde los bastones negros son las bacteria, los círculos blancos son las partículas separadoras y en gris el fondo.	31
4.3. a) Imagen binarizada y filtrada con el filtro pasa-altas para localizar los obstáculos. b) Imagen binarizada con los centroides localizados para cada obstáculo con una cruz (+) de color rojo. c) Imagen binarizada y filtrada con filtro pasa-bajas para localizar a las bacterias. d) Localización de los centroides de las bacterias se representa con una cruz (+) de color rojo.	31
4.4. Imagen original con las posiciones de los centroides de las bacterias localizados marcados con una cruz (+) de color rojo.	32

4.5.	Esquema de la trayectoria de un microorganismo cuya posición a diferentes tiempos está representada con círculos azules. Las etiquetas de t , V y r indican el cuadro, velocidad y posición respecto al origen para cada cuadro, respectivamente y en la esquina inferior derecha se presenta una sección de la trayectoria con el ángulo de cambio de dirección θ	34
4.6.	Esquema que indica con la misma trayectoria como se obtienen los desplazamientos $\Delta r_{n\Delta t}$ para ser promediados. En color negro podemos ver la colección de desplazamientos a $n = 1, \Delta t$, en verde los correspondientes a $n = 2, 2\Delta t$ y en rojo para $n = 3, 3\Delta t$. En donde n va de la primera posición hasta una posición antes de la final $N - 1$	35
4.7.	Figura esquemática que muestra una trayectoria con los dos tipos de nado de un microorganismo: corridas (círculos verdes) y tumbos (círculos rojos). Los vectores de velocidad en rojo son los que representan el nado en tumbo ya que su valor absoluto es muy inferior con respecto al promedio, lo que refleja la discriminación por el umbral inferior y su contraparte en verde.	36
4.8.	Figura esquemática que muestra la descomposición de los vectores de velocidad en sus componentes longitudinal (verde) y transversal (rojo) con respecto a la velocidad en un paso anterior.	36
4.9.	Vectores \vec{w}_c y \vec{w}_i que siguen las posiciones del flagelo y el cuerpo para seguir el movimiento del batido del flagelo con respecto al cuerpo.	37
5.1.	Se muestra el parámetro de desplazamiento cuadrático medio de las simulaciones a distintos números de pasos. La convergencia se alcanza con 1×10^4	42
5.2.	Esquema que muestra los dos tipos de choques (arco y tangente) que realizan las bacterias (discos negros) después de un choque con un obstáculo (discos amarillos). La distancia perdida l en la línea punteada roja y la distancia D recorrida por el choque en la línea solida con su respectivo retraso.	43
6.1.	Trayectorias de bacterias (líneas continuas de colores) en un sistema quasi-bidimensional con esferas de $2.98 \mu\text{m}$ de diámetro (círculos blancos) que actúan como separadores que forman una matriz porosa que ocupa una fracción de área de 0.01. Cada inicio de trayectoria esta indicado por un círculo negro que en algunas casos se puede ver que coincide con la posición de una bacteria.	46
6.2.	(a) Trayectoria experimental típica, donde el inicio de las corridas y tumbos se etiqueta con triángulos de color verde y rojo, respectivamente. El inicio de la trayectoria esta marcado con un triángulo verde. (b) Trazo de rapidez correspondiente de la trayectoria en (a). (c) PDFs experimentales (puntos) y líneas de mejores ajustes (líneas continuas) para corridas (verde) y tumbos (rojo). (d) PDFs experimentales para la velocidad longitudinal (puntos verdes) y tumbos (puntos rojos), y sus correspondientes ajustes Gaussianos (líneas continuas verdes y rojas). (e) Igual que en (d), pero para la componente transversal.	48

6.3.	Experimentales—(a) y (b)—y simuladas—(c) y (d)—trayectorias a 0.01—(a) y (c)— y 0.39—(b) y (d)—fracción de área. En todos los casos los obstáculos están representados por los discos blancos.	50
6.4.	Gráfica de la rapidez promedio experimental (normalizada contra el valor de la rapidez a fracción de área $\phi = 0.001$) contra la fracción de área para cada experimento.	51
6.5.	Funciones de densidad de probabilidad en la componente horizontal (v_x) y vertical (v_y) calculadas de los experimentos (símbolos) y simulaciones (líneas continuas), a diferentes fracciones de área(ϕ).	51
6.6.	(a) Distribuciones de rapidez calculadas de trayectorias experimentales (símbolos) y simuladas (línea continua) a varias fracciones de área (ϕ). (b) Distribuciones del valor absoluto ángulo de cambio de dirección calculadas de trayectorias experimentales (símbolos) y simuladas (línea continua) a varias fracciones de área.	52
6.7.	Mapa de rapidez media (promediada en el tiempo sobre todas las trayectorias en cada micra cuadrada) calculados de las trayectorias experimentales—(a) y (b)—y simuladas—(c) y (d)—a diferentes fracciones de área (mismos experimentos que en Figura. 6.3). El código de color está dado en la barra adyacente. Los obstáculos esféricos están representados por los discos blancos.	53
6.8.	Desplazamiento cuadrático medio (DCM) calculado de las trayectorias experimentales (símbolos) y simuladas (líneas continuas) a diferentes fracciones de área ocupada por obstáculos (ϕ).	55
7.1.	a) Trayectoria típica del parásito silvestre en su forma epimastigote (el punto inicial de la trayectoria se indica con el punto negro) y b) la misma trayectoria suavizada con un filtro de media de 5 puntos móvil. El inicio de segmentos de nado en modo persistente y modo tumbo se indican con triángulos verdes y rojos, respectivamente. En c) y d), la densidad de espectro de potencia del ángulo de cambio de dirección correspondiente a las trayectorias en a) y b), respectivamente.	58
7.2.	a) Trayectoria típica del parásito genéticamente modificado en su forma epimastigote (el punto inicial de la trayectoria se indica con el punto negro) y b) la misma trayectoria suavizada con un filtro de media de 5 puntos móvil. El inicio de segmentos de nado en modo persistente y modo tumbo se indican con triángulos verdes y rojos, respectivamente. En c) y d), la densidad de espectro de potencia del ángulo de cambio de dirección correspondiente a las trayectorias en a) y b), respectivamente.	59
7.3.	a) Imagen del parásito silvestre con los puntos que identifican el centroide (\vec{w}_c), la base del flagelo (\vec{w}_i), y su punta (\vec{w}_f), los cuales fueron utilizados para medir el batido del flagelo utilizando la variación temporal del ángulo ϕ . b) Trazo de ϕ en función del tiempo t en el batido del flagelo. c) Densidad del espectro de potencia de ϕ contra t	60

7.4.	a) Trazo de la rapidez como función del tiempo de una trayectoria representativa de la cepa silvestre que ilustra los modos de movimiento persistente y de tumbo. Los triángulos rojos y verdes indican el inicio de los modos de movimiento de tumbo y persistente, respectivamente. b) Distribuciones de los tiempos de duración del nado persistente (círculos verdes) y tumbos (círculos rojos) y sus respectivos ajustes (líneas continuas). Se utilizó un ajuste exponencial para la distribución de tumbo y de cola pesada para la distribución de nado persistente.	61
7.5.	a) Trazo de la rapidez como función del tiempo de una trayectoria representativa de la cepa genéticamente modificada que ilustra los modos de movimiento persistente y de tumbo. Los triángulos rojos y verdes indican el inicio de los modos de movimiento de tumbo y persistente, respectivamente. b) Distribuciones de los tiempos de duración del nado persistente (círculos verdes) y tumbos (círculos rojos) y sus respectivos ajustes (líneas continuas). Se utilizó un ajuste exponencial para la distribución de tumbo y de cola pesada para la distribución de nado persistente.	62
7.6.	Histogramas de las componentes de velocidad longitudinales y transversales de la cepa silvestre. a) Función de densidad de probabilidad experimental (círculos verdes para el modo de corrida y círculos rojos para el modo de tumbos) y su mejor ajuste (líneas continuas) para la componente transversal, durante el modo de nado persistente (línea continua verde) y de tumbo (línea continua roja). b) Función de densidad de probabilidad experimental (círculos verdes para el modo de corrida y círculos rojos para el modo de tumbos) y su mejor ajuste (líneas continuas) para la componente longitudinal, durante el modo de nado persistente (línea continua verde) y de tumbo (línea continua roja).	64
7.7.	Histogramas de las componentes de velocidad longitudinales y transversales de la cepa genéticamente modificada. a) Función de densidad de probabilidad experimental (círculos verdes para el modo de corrida y círculos rojos para el modo de tumbos) y su mejor ajuste (líneas continuas) para la componente transversal, durante el modo de nado persistente (línea continua verde) y de tumbo (línea continua roja). b) Función de densidad de probabilidad experimental (círculos verdes para el modo de corrida y círculos rojos para el modo de tumbos) y su mejor ajuste (líneas continuas) para la componente longitudinal, durante el modo de nado persistente (línea continua verde) y de tumbo (línea continua roja).	65
7.8.	Comparación entre los resultados experimentales (barras o círculos) y los obtenidos mediante la simulación computacional (líneas continuas) para la cepa silvestre. a) Función de densidad de probabilidad para el ángulo de cambio de dirección entre pasos consecutivos. b) Función de densidad de probabilidad para la rapidez instantánea. c) Desplazamiento cuadrático medio.	67

7.9. Comparación entre los resultados experimentales (barras o círculos) y los obtenidos mediante la simulación computacional (líneas continuas) para la cepa genéticamente modificada. a) Función de densidad de probabilidad para el ángulo de cambio de dirección entre pasos consecutivos. b) Función de densidad de probabilidad para la rapidez instantánea. c) Desplazamiento cuadrático medio. .	68
A.1. Rapidez normalizada con la rapidez en el infinito (considerada como la rapidez media del intervalo 10 pasos anteriores y 10 posteriores a la interacción) contra el tiempo $t - t_0$ en donde t_0 es el tiempo en el choque en donde el cambio de dirección promedio $ \theta $ entre antes y después del choque es menor a 50 grados. .	73
A.2. Rapidez normalizada con la rapidez en el infinito (considerada como la rapidez media del intervalo 10 pasos anteriores y 10 posteriores a la interacción) contra el tiempo $t - t_0$ en donde t_0 es el tiempo en el choque en donde el cambio de dirección promedio $ \theta $ entre antes y después del choque es mayor a 50 grados. .	74

Índice de Tablas

6.1. Valores de los parámetros de las distribuciones que mejor ajustan las funciones de distribución de probabilidad exponenciales para los tiempos de duración de corridas y tumbos, y las Gaussianas para la velocidad longitudinal y transversal en corridas y tumbos.	49
---	----

Publicaciones

J. Eduardo Sosa-Hernández, Gilberto Ballesteros-Rodea, Jorge A. Arias-del-Angel, Diego A. Dévora-Canales, Rebeca G. Manning-Cela, Jesús Santana-Solano y Moises Santillán, *Experimental and Mathematical-Modeling Characterization of Trypanosoma cruzi Epimastigote Motility*. (2015). PLOS ONE, 10(11), e0142478.

J. Eduardo Sosa-Hernández, Moises Santillán y Jesús Santana-Solano, Motility of *Escherichia coli* in a quasi-two-dimensional porous medium (2016). En revisión PRE.

Resumen

La migración de bacterias dentro de espacios confinados es crítica para fenómenos como la formación de bio-películas, el transporte de bacterias en suelos, y la terapia bacteriana contra el cáncer [3, 4, 13, 37, 70, 76]. En éste trabajo se estudió y caracterizó la motilidad de bacterias *Escherichia coli* (de la cepa silvestre K12-MG1655). El análisis se hizo a través de trayectorias individuales de bacterias contenidas dentro de una cámara quasi-bi-dimensional porosa. La matriz porosa se generó al colocar una muestra con partículas mono-dispersas de $2.98 \mu m$ de diámetro y bacterias entre dos placas de vidrio. Las partículas atrapadas por las paredes generan una matriz desordenada de obstáculos para las bacterias que nadan libremente dentro del plano formado. La porosidad de la matriz se cambió al alterar la mezcla de partículas y bacterias dentro de la muestra. Se analizaron los siguientes parámetros: velocidad instantánea, ángulo de cambio de dirección, desplazamiento cuadrático medio, y se cuantifican los efectos sobre la motilidad por la interacción entre bacterias y partículas de latex en función de la fracción de área ocupada por los obstáculos.

Con el fin de hacer una comparación, adicionalmente se caracterizó la motilidad del parásito *Trypanosoma cruzi* en su forma epimastigote dentro de un espacio quasi-bi-dimensional, construido de la misma forma que para la bacteria, utilizando partículas de latex de $10 \mu m$ de diámetro. Se capturaron videos de parásitos silvestres y genéticamente modificados de la cepa CL-Brener, los parásitos transformados sobre-expresan la proteína LYT1 y en consecuencia muestran una motilidad disminuida. Se obtuvieron las trayectorias por medio de análisis de imágenes para calcular el tamaño de paso, el ángulo de cambio de dirección, las componentes de velocidad longitudinal y transversal con respecto a la velocidad del paso anterior, y el desplazamiento cuadrático medio.

Para profundizar el estudio, se desarrolló un modelo matemático fenomenológico con el que se simularon los mismos experimentos para comparar directamente los resultados experimentales. Éste modelo permitió comprender cómo son las interacciones entre bacterias y obstáculos, y dado que el modelo predice fielmente la motilidad del parásito es posible concluir que la caracterización de su motilidad es acertada.

Abstract

Bacterial migration through confined spaces is critical for several phenomena like biofilm formation, bacterial transport in soils, and bacterial therapy against cancer [3, 4, 13, 37, 70, 76]. In the present work, *E. coli* (strain K12-MG1655 WT) motility was characterized by recording and analyzing individual bacterium trajectories in a simulated quasi-2-dimensional porous medium. The porous medium was simulated by enclosing, between slide and cover slip, a bacterial-culture sample mixed with uniform $2.98 \mu\text{m}$ spherical latex particles. The porosity of the medium was controlled by changing the latex particle concentration. By statistically analyzing trajectory parameters like: instantaneous velocity and turn angle, as well as mean squared displacement, we were able to quantify the effects that different latex particle concentrations have upon bacterial motility.

In addition, we characterized the motility of parasite *Trypanosoma cruzi* in its epimastigote form in a quasi-two-dimensional geometry, which was built with two glass surfaces separated with $10 \mu\text{m}$ diameter latex particles. We recorded the trajectories of two strains of this parasite (a wild-type strain and a stable transfected strain, which contains an ectopic copy of LYT1 gene and whose motility is known to be affected). We further extracted parasite trajectories from the recorded videos, and statistically analysed the following trajectory-step features: step length, angular change of direction, longitudinal and transverse displacement with respect to the previous step, and mean squared displacement.

To better understand our experimental results, trajectories were simulated by means of a phenomenological random-walk model (developed ad hoc), and the simulated results were compared with the experimental ones. This model allowed to understand how bacteria interact with obstacles and the fact that the model predictions closely match most of the experimentally observed parasite-trajectory characteristics, allows us to conclude that the model is an accurate *T. cruzi*'s motility description.

1

Introducción

La motilidad es la capacidad de un organismo de moverse espontánea e independientemente. Esta capacidad confiere una gran ventaja a los organismos que la poseen para encontrar alimento, alejarse del peligro y reproducirse. En el caso de motilidad de microorganismos, el fenómeno en esencia es el mismo, genera desplazamiento neto para satisfacer las mismas necesidades. Pero, en los detalles es mucho más complejo por lo que se requieren de estudios minuciosos y desde distintos enfoques para comprenderlo. Puesto que éstos estudios están acotados por los avances tecnológicos, hasta hace algunos años el movimiento de microorganismos se había limitado a unos cuantos modelos biológicos en condiciones muy particulares. Los principales estudios de motilidad se han realizado en el bulto, luego incorporando una superficie sólida y por último con dos superficies.

Uno de los principales grupos enfocados a investigar la motilidad de microorganismos es el de H. Berg, que inició estudiando la motilidad de bacterias en el bulto. Es decir, en un sistema sin confinamiento, en donde el nado es libre en las tres dimensiones espaciales. Berg y colaboradores describieron el nado como una sucesión de corridas (nado a rapidez y dirección constante) y tumbos (giros aleatorios con bajo desplazamiento neto) [7]. Más tarde, Lauga et al [42] realizaron estudios del nado de bacterias cerca de una superficie plana y sólida. Las trayectorias de las bacterias cambian con respecto a las que resultan en el bulto. En este escenario, las bacterias *E. coli* nadan en trayectorias circulares a favor de las manecillas del reloj (desde una vista superior) debido a la contra-rotación del cuerpo y el manojito de flagelos. También, Lauga junto con otros grupos han estudiado las interacciones hidrodinámicas con las superficies en donde encuentran atracción hidrodinámica hacia la superficie [11, 69]. Cuando existen dos superficies paralelas muy cercanas las bacterias tienden a nadar en un punto de equilibrio a la mitad de la

separación entre ambas superficies [65].

Como se puede ver, ha crecido el interés por entender como es el movimiento de microorganismos en sistemas complejos que confinan el nado. La atracción de los grupos de investigación científica hacia este tema se debe a la importancia del fenómeno de motilidad en distintas áreas del conocimiento y su posible aplicación en la vida diaria. Además, cabe resaltar que la motilidad de microorganismos es uno de los principales mecanismos que permite mantener la biomasa del planeta. A continuación se presentan cuatro ejemplos en los cuales la motilidad de microorganismos juega un papel primordial en tres áreas de estudio.

La motilidad permite, entre otras cosas, la reproducción de especies, en la cual se requiere de la unión de un gameto femenino con uno masculino. Para tal efecto los gametos masculinos son capaces de nadar en busca del gameto femenino. Las condiciones en las que nadan los espermatozoides varía de acuerdo a las distintas especies ya sea en un medio libre como es el caso de los espermatozoides de erizo de mar o en ambientes confinados como es el útero de las hembras en los mamíferos.

Por otro lado, algunas de las enfermedades se generan por la capacidad de un patógeno de alcanzar zonas vulnerables. Un ejemplo es el caso de la bacteria *Helicobacter pylori* que causa las úlceras gástricas y de manera prolongada gastritis. La bacteria se encuentra presente en el sistema digestivo de los mamíferos, pero solo genera las úlceras cuando encuentra una porción del tejido lastimado y desprotegido de la mucosa. Se ha demostrado que cuando la bacteria tiene defectos de motilidad su capacidad infecciosa disminuye significativamente comparada con una cepa silvestre [59].

En la bioremediación, el objetivo es que microorganismos metabolicen toxinas presentes en el medio, principalmente desechos tóxicos en el agua. Cuando es complicado solo extraerlos, se cultivan bacterias que son depositadas en el área afectada con el propósito de limpiar la zona. Un ejemplo es la biorremediación por diferentes bacterias como *Alcanivorax*, *Cycloclasticus*, *Oleiphilus*, *Oleispira*, *Thalassolituus* y *Planomicrobium*, entre otras [63] en aguas del mar contaminadas por derrames de petróleo. También se utiliza la biorremediación por medio de microorganismos en agua localizada en el subsuelo y en plantas de tratamiento de aguas en distintos tipos de industrias.

Una nueva aplicación es el tratamiento de cáncer por medio de bacterias. Los estudios aún se encuentran en una etapa temprana de desarrollo. Sin embargo, los resultados obtenidos demuestran que uno de los factores primordiales para obtener éxito dependen crucialmente de las características de la motilidad del microorganismo empleado y del tejido dañado [70].

Todos los ejemplos anteriores tratan acerca de la motilidad de diferentes seres vivos. Lo que

los une es la peculiaridad de su tamaño y el ambiente en el que se encuentran. En la escala microscópica el movimiento independiente de un organismo se rige por las fuerzas viscosas del medio en el que se encuentran. Como se ha explicado en los trabajos de Purcell y Berg, quienes han caracterizado la motilidad de microorganismos tipo de nado, los elementos que la producen y la física detrás del fenómeno es complejo, lo cual se abordará con más detalle en el siguiente Capítulo. Lo primero que se debe conocer es que el nado se da en un medio viscoso y representa diferentes complicaciones para generar un desplazamiento neto, pero provee de grandes ventajas para cubrir las necesidades antes mencionadas.

El nado a bajo número de Reynolds requiere que la fuente de propulsión se mantenga para sostener el movimiento. En estas condiciones, los microorganismos deben vencer al movimiento de las moléculas producido por agitación térmica ($K_B T$), fenómeno conocido como difusión. La viscosidad es la aliada de las bacterias ya que la inercia es despreciable y si se detiene la fuerza de propulsión el avance también. La viscosidad permite que el movimiento de los flagelos generen un impulso neto que depende del torque generado por el flagelo [22]. El proceso difusivo es considerado como un proceso estocástico en el que las moléculas se desplazan de manera aleatoria. El desplazamiento generado por el nado de los microorganismos debe superar al desplazamiento de las moléculas debidas a la difusión, con lo que se cambia de posición con respecto al microambiente local de las bacterias [44].

Una manera muy efectiva para entender la difusión y el nado de microorganismos es modelando dichos procesos, comúnmente como una secuencia de desplazamientos aleatorios. Tal secuencia se conoce como caminantes aleatorios y el más sencillo de ellos describe a la perfección el proceso de difusión. Cuando al caminante aleatorio se le agregan condiciones de correlación obtenemos algo similar a los micronadadores. Así, podemos entender detalles presentes en su movimiento de una manera simplificada. Además del movimiento a bajo número de Reynolds, el ambiente en donde se encuentran inmersos los microorganismos son sistemas complejos que pueden contener bio-películas, arcillas, tejidos, poros, entre otras cosas [71].

En resumen, es claro que el fenómeno de la motilidad juega un papel clave para que surjan otros procesos biológicos, y que las condiciones en las que se presentan dichos procesos son muy diversas y complejas. Un estudio sobre la motilidad de microorganismos en sistemas confinados se propone a continuación para desarrollar el conocimiento previo en dos modelos biológicos.

1.1 Objetivos

En el presente trabajo se analiza la motilidad desde un enfoque físico en el que se miden parámetros como velocidades, trayectorias, ángulo de cambio de dirección, desplazamiento cuadrático medio, entre otros. Primero, la dinámica de la motilidad de *E. coli* en espacios abiertos y confinados. Las bacterias motiles sometidas a un confinamiento espacial cuyas dimensiones son comparables a las dimensiones de las bacterias, tienen un cambio importante en su motilidad. Después, la caracterización de la motilidad del parásito *T. cruzi* en un poro de una cepa silvestre y una genéticamente modificada, la cual tiene afectado su movimiento debido a la modificación en la producción de la proteína LYT1. Por último, se desarrolla un modelo matemático fenomenológico con el que se simulan ambos experimentos y se realiza un análisis comparativo de los resultados experimentales y simulados con el modelo.

1.1.1 General

Estudio del nado de microorganismos en medios confinados.

1.1.2 Particulares

El presente estudio se desarrolló bajo los siguientes objetivos particulares.

1. Analizar los efectos sobre la motilidad de *E. coli* en un poro quasi-bi-dimensional y estudiar el impacto de incrementar la porosidad del medio en el nado de la bacteria.
2. Caracterizar la motilidad de *T. cruzi* en un poro quasi-bi-dimensional y estudiar los efectos sobre la motilidad del parásito *T. cruzi* mutado para sobre expresar LYT1 en las mismas condiciones de confinamiento.
3. Generar una descripción de la motilidad por medio de un modelo matemático simple y capaz de reproducir los cambios en ambos modelos biológicos a través de un caminante aleatorio.

2

Antecedentes

Este capítulo está dedicado a proporcionar la información necesaria para entender el fenómeno de motilidad. Después, se desarrolla un panorama general de las condiciones físicas del fenómeno describiendo el número de Reynolds, seguido por los dos tipos de motilidad de nado por flagelos. Uno que se impulsa por medio de varios flagelos localizados en la parte anterior del cuerpo y un segundo que se impulsa por un único flagelo localizado en la parte posterior del cuerpo. Se definen nuestros modelos biológicos de estudio junto con las características más relevantes para este trabajo. Se muestra la relevancia e implicaciones del desarrollo de conocimiento de la motilidad para las áreas de medicina, biología y ecología. Posteriormente se establece un marco de referencia de los estudios recientes en el tema que nos llevan a profundizar en dos ramas del estudio de la motilidad, interacciones hidrodinámicas entre bacterias, entre bacterias y superficies, y finalmente se proporciona una introducción de los modelos matemáticos de motilidad de microorganismos.

2.1 Motilidad

La motilidad de microorganismos se lleva a cabo mediante el nado a través de un medio fluido o mediante el arrastrarse sobre una superficie sólida. En el caso del nado, tres mecanismos fueron desarrollados por los microorganismos, los cilios, flagelos y superficies ondulantes que tienen la capacidad de propulsar el medio circundante para inducir movimiento. En el método de arrastre se logra movimiento cuando la superficie permite un anclaje por medio de pseudópodos y pili.

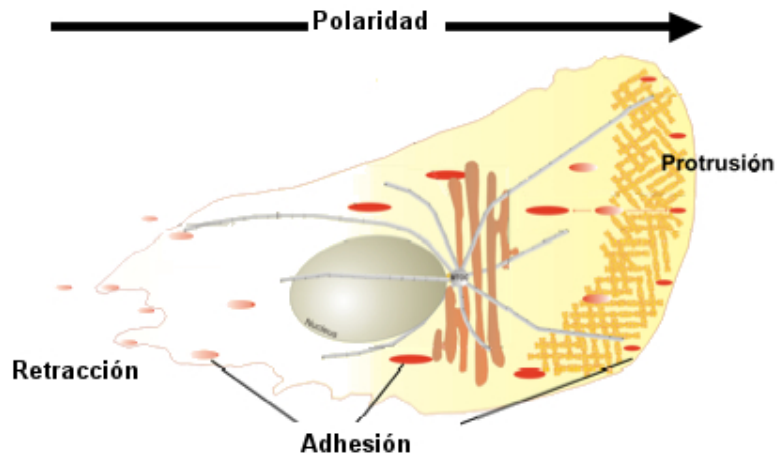


Figura 2.1: Diagrama esquemático de una célula eucarionta en movimiento por medio de pseudópodos (*Cell Migration*. N.p., n.d. Web. 10 Aug. 2016. <<http://www.cellmigration.org/images/index-background.png>>).

2.1.1 Seudópodos y pili

Los pseudópodos son extensiones del microorganismo que lanza por medio de una deformación del cuerpo, la cual contiene una región especializada para anclarse a las superficies fijas. De tal deformación se ejercen fuerzas internas que desplazan al resto del cuerpo a la siguiente posición. Las deformaciones se llevan a cabo por medio de reacciones bioquímicas en el citoesqueleto.

El citoesqueleto está conformado por microfilamentos (actina y miosina), filamentos intermedios y microtubulos. En conjunto dan estructura a la célula, pero también son los encargados de ejercer movimiento. Dicho movimiento involucra la participación de todos sus componentes por medio de reacciones bioquímicas.

El movimiento se genera por el ciclo que consta de polaridad, deformación, adhesión, traslocación y retracción posterior, por último integración y regulación (ver Fig. 2.1). Un ejemplo de organismos que utilizan éste método de motilidad son los leucocitos que se encuentran en la sangre y forman parte del sistema inmunológico. Las amibas son otro ejemplo.

De forma similar, las células se pueden desplazar por una superficie utilizando sus pili. La estructura del pili es una protuberancia similar a la de un cabello que se extiende desde el cuerpo hasta una superficie que sirve de base para ejercer fuerza sobre el cuerpo y moverse. Algunas bacterias gram positivo se mueven por medio de pili tipo IV.

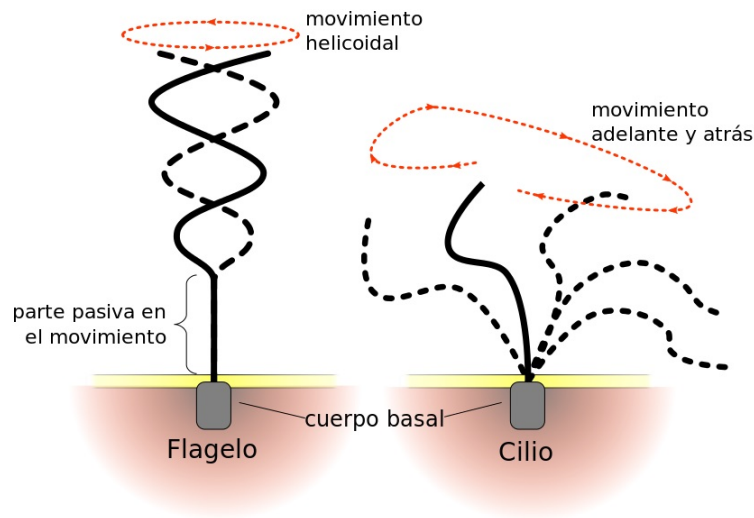


Figura 2.2: Movimiento de flagelos en forma de helicoides y cilios en forma de batido.

2.1.2 Cilios y flagelos

El mecanismo para generar movimiento a través de cilios y flagelos depende del fluido y sus propiedades: como viscosidad, temperatura, densidad, compresibilidad entre otras, así como de las características físicas del flagelo: dimensiones, frecuencia y tipo de movimiento. El movimiento de los cilios y flagelos eucariontes es por batido ondulante y rotatorio respectivamente (ver Fig. 2.2). Los cilios y flagelos eucariontes están compuestos por nueve pares de microtubulos que se encuentran organizados en forma de círculo envolviendo a un par central también de microtubulos. Los microtubulos se unen por medio de dos brazos de dineína, uno interno y otro externo que desplazan cada par de microtubulos con respecto del vecino. Los pares de microtubulos del flagelo se encuentran unidos a un cuerpo basal que proporciona estabilidad al flagelo formado por nueve tripletes de microtubulos fijos. Toda la estructura se encuentra envuelta en la misma membrana plasmática de las células eucariontes.

Existen también flagelos para organismos procariontes que son muy diferentes a los eucariontes. Éstos flagelos están formados por una cadena de proteínas sin recubrimiento (ver Fig. 2.3). El flagelo se adhiere al cuerpo celular por medio de un gancho y a su vez a una base motriz fija en las tres capas que recubren al material genético. La base motriz es un complejo proteico que tiene como partes generales un estator, motor, rotor y eje.

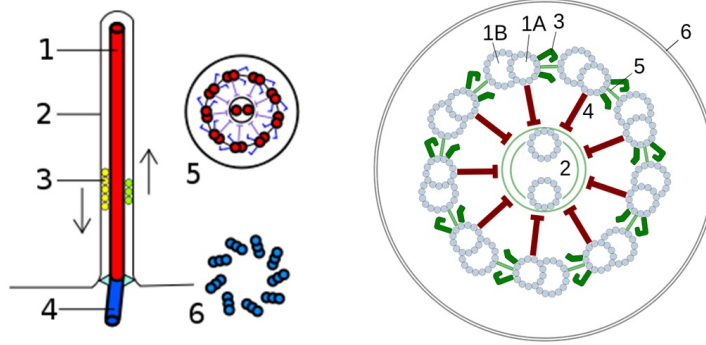


Figura 2.3: Diagrama que describe la composición de un flagelo eucarionte. a) 1 axonema, 2 membrana plasmática, 3 transporte intra-flagelar, 4 cuerpo basal, 5 corte transversal del axonema y 6 tripletes de microtubulos. b) 1 doblete externo de microtúbulos, 2 doblete interno de microtúbulos, 3 dos brazos de dineína, uno interno y otro externo, 4 radio, 5 puente de nexina, 6 membrana plasmática.

2.2 Nado a bajo número de Reynolds

El movimiento de objetos inmersos en un fluido depende de cantidades físicas que describen el comportamiento del fluido y del objeto. El número de Reynolds (Re) se define como el cociente entre las fuerzas inerciales y las fuerzas viscosas que actúan sobre el objeto en movimiento. Este número adimensional se puede derivar de la ecuación de conservación de momento lineal que es una de las ecuaciones de Navier-Stokes:

$$-\nabla p + \eta \nabla^2 \vec{v} = \rho \frac{\delta \vec{v}}{\delta t} + \rho(\vec{v} \cdot \nabla) \vec{v}, \quad (2.1)$$

en donde, p es la presión, η la viscosidad, ρ es la densidad y v es la velocidad del fluido. El número de Reynolds es utilizado ampliamente en aerodinámica, mecánica de fluidos, diseño de reactores, además de muchas otras áreas de la ingeniería y la ciencia. Por lo general sirve para catalogar entre fluido laminar, en transición o turbulento, en donde los límites son $Re \leq 2300$ para un flujo laminar, mientras que $Re \geq 4000$ es un flujo turbulento y entre ambas zonas se le conoce como transición [35]. La razón entre fuerzas inerciales y viscosas está dada por,

$$Re = \frac{\rho v a}{\eta}, \quad (2.2)$$

$$= \frac{v a}{\nu}, \quad (2.3)$$

en donde ρ es la densidad del fluido, v es la velocidad y a es el diámetro característico (es decir la dimensión más representativa del objeto) y multiplicados representan a la inercia o fuerzas convectivas. Por otra parte, η es la viscosidad del fluido y ν es la viscosidad cinemática. Si se calcula el número de Reynolds para la bacteria *E. coli* utilizando $a = 1\mu m$, $v = 30\mu m/s$ y $\nu = 10^{-2}cm^2/s$ obtenemos un $Re = 3 \times 10^{-5}$.

Para generar impulso en condiciones de bajo número de Reynolds es necesario saber que se está sujeto a lo que se conoce como el teorema de la almeja. Que establece la necesidad de realizar deformaciones invariantes en el tiempo para propulsarse. Es decir si se toma la ecuación 2.1 (conservación de momento lineal) se desprecian los términos inerciales entonces la ecuación queda de la siguiente forma;

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

y si hay un movimiento recíproco el desplazamiento neto sería cero. Así, es necesario realizar movimientos irreversibles como el batido de un remo flexible o la rotación de un saca corchos para poder generar un desplazamiento neto.

2.2.1 “Pushers” y “pullers”

La rotación de una helicoide es precisamente un mecanismo muy utilizado por los microorganismos para moverse. Pero no todos los microorganismos realizan su movimiento de la misma manera. Existen dos formas de utilizar la helicoide que forma el flagelo. Una es, que el o los flagelos al rotar se posicionan en la parte anterior del cuerpo, y la otra es que el o los flagelos se posicionan en la parte posterior del cuerpo. De esta forma se distinguen “pushers” y “pullers”. Sin embargo, recientemente se ha evaluado también el campo de flujo alrededor de los microorganismos para establecer si se trata de “pushers” ó “pullers”. El campo de flujo cambia con respecto a la distribución de los vectores de velocidad como se muestra en la Fig. 2.4. La representación mostrada es para los campos de flujo del fluido de manera general. Para conocer a detalle cómo son los campos de flujo y el origen de ellos se puede consultar las siguientes referencias [11, 27, 28, 32, 36, 43, 46, 56, 65].

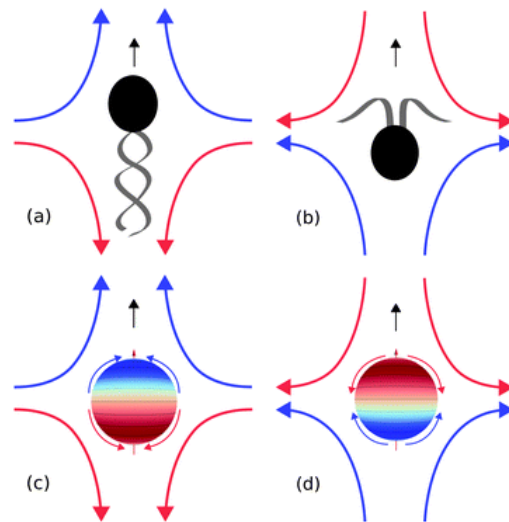


Figura 2.4: Diagrama que representa a los microneadores como bacterias “pushers” a) y algas “pullers” b) en donde las flechas negras indican la dirección del movimiento del microneador y las flechas de color indican la dirección del flujo. En c) y d) sólo se presentan la dirección del flujo del fluido (Diagrama tomado de [55] bajo del número de licencia 3917250941838).

2.3 Microorganismos

2.3.1 *Escherichia coli*

La bacteria *E. coli* fue descubierta por el pediatra Theodor Escherich en 1885. Estudiando enfermedades digestivas en la niñez logró correlacionar la enfermedad con el microorganismo [31]. A partir de ésta época, *E. coli* comenzó a ser estudiada arduamente por su fácil acceso y temprano entendimiento. El hecho de ser uno de los organismos más simples y aún muy sofisticado para nuestro entender la convierten en un objeto de estudio muy interesante. La bacteria tiene mecanismos similares a los de las células humanas de almacenamiento de información genética, procesamiento de genes y síntesis de herramientas moleculares para sus funciones. Debido a éstas similitudes, se han podido estudiar y aplicar el conocimiento obtenido en nuestro beneficio. Por ejemplo, los estudios en las vías metabólicas y últimamente la manufactura de proteínas para su uso comercial [6].

E. coli es una bacteria gram-negativa, anaerobia facultativa y que no genera esporas. Produce ATP por respiración aerobia si hay oxígeno presente, pero es capaz de cambiar a fermentación o respiración anaerobia si no hay oxígeno. Las bacterias *E. coli* tienen un diámetro de aproximadamente $1 \mu\text{m}$ en los extremos semiesféricos y una longitud de cilindro de aproximadamente $2 \mu\text{m}$ como cuerpo. La célula tiene tres capas que cubren al citosol compuesto

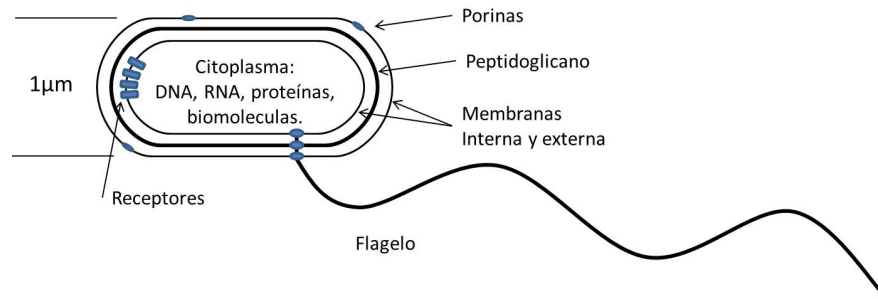


Figura 2.5: Diagrama esquemático de la bacteria *E. coli* mostrando sus características físicas más importantes como sus dimensiones, forma y partes fundamentales en la quimiotaxis con los flagelos y receptores.

por biomoléculas como proteínas, iones, glúcidos, ácidos nucleicos, etc. No cuenta con un núcleo ni organelos cubiertos por membranas ni citoesqueleto. Fuera del citoplasma y contruidos en las membranas se pueden localizar algunos elementos considerados como organelos. Para la quimiotaxis son muy importantes dos partes fundamentales, un generador de movimiento y timón para dirigirlo. Estas dos partes esenciales son los flagelos y los receptores respectivamente, ambos se encuentran incrustados en la membrana y están constituidos por complejos protéicos [5]. Los cuales se ilustran en la Fig. 2.5.

2.3.1.1. Ciclo de vida

El ciclo de vida de la *E. coli* se divide en tres etapas. El periodo B ocurre entre la división celular y el inicio de la replicación de ADN. El periodo C se acopla al tiempo que le toma replicar el ADN cromosomal. El periodo D es el estado entre la conclusión de la replicación de ADN y el fin de la división celular. La razón de duplicación de la bacteria es mayor cuando existe más nutrientes en el medio de cultivo. Aún en altas concentraciones de nutrientes los periodos C y D no cambian.

2.3.1.2. Motor y flagelo

Gracias al avance en micrografía electrónica es posible tomar imágenes de objetos que miden decenas de nanómetros. Así, fue posible elucidar la estructura del motor flagelar (ver la Fig. 2.6). Éste motor se encuentra anclado a las membranas interna, externa y al peptidoglicano intermembranal. Esto garantiza que tenga fuerza suficiente para sostener y girar al flagelo que propulsa al cuerpo.

La estructura fuera de la bacteria incluye un gancho flexible y un flagelo que puede tener una

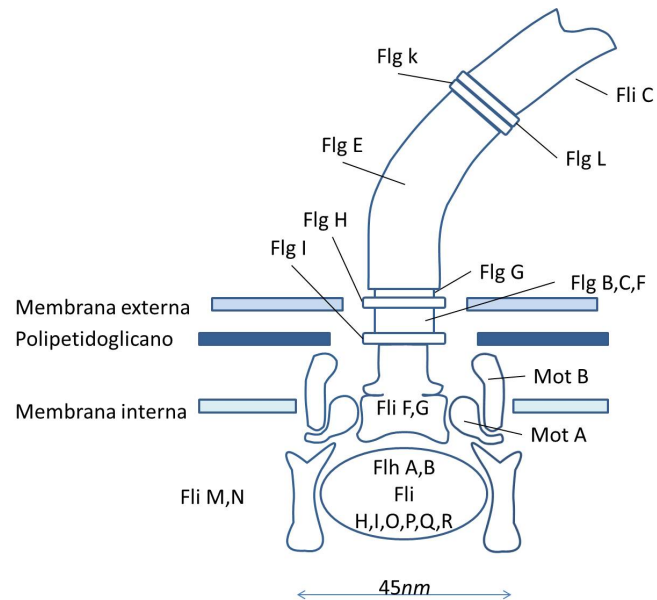


Figura 2.6: Partes del motor y anclaje en la bacteria junto con una reseña de su función. Diagrama basado en *E. coli* in motion [5].

longitud de hasta $10 \mu\text{m}$. y un ancho de 40 nm . La estructura embebida en las paredes celulares incluye anillos y una raíz. Se cree que el par de anillos externos (Flg H llamado anillo-L por lipopolisacárido y Flg I llamado anillo-P por peptidoglicano) que proporcionan soporte desde la raíz a la base Flg B,C,F y G del gancho al exterior de la membrana. La raíz transmite la rotación del motor al flagelo por el par de anillos interiores (llamados M por membrana y S por supramembrana unidos MS). Un anillo adicional llamado C por citoplasmático incrustado es parte de un “*interruptor*”, Fli G,M y N, controla la dirección de rotación. Estos componentes también se relacionan con la generación de torque. La interacción de CheY-P con FliM controla el sentido de giro del flagelo, el cual gira en el sentido de las manecillas del reloj si se observa desde la parte posterior de la bacteria. A temperatura ambiente el estado nulo de giro del flagelo es en favor de las manecillas del reloj tomando la misma referencia de observación. El motor rota gracias a un flujo de protones del exterior al interior de la bacteria debido a las condiciones de pH.

Los filamentos flagelares son polímeros de sub-unidades idénticas que tienen una longitud aproximada a los $10 \mu\text{m}$, las sub-unidades son moléculas de Fli C, también llamado flagelina. Las distintas formas del flagelo como estirado o enroscado se deben al empaquetamiento que tiene la misma proteína siendo alargadas por proteínas de tipo L y enroscadas por el tipo R por su inicial en inglés de “*left*” y “*right*” de levógiro y dextrógiro.

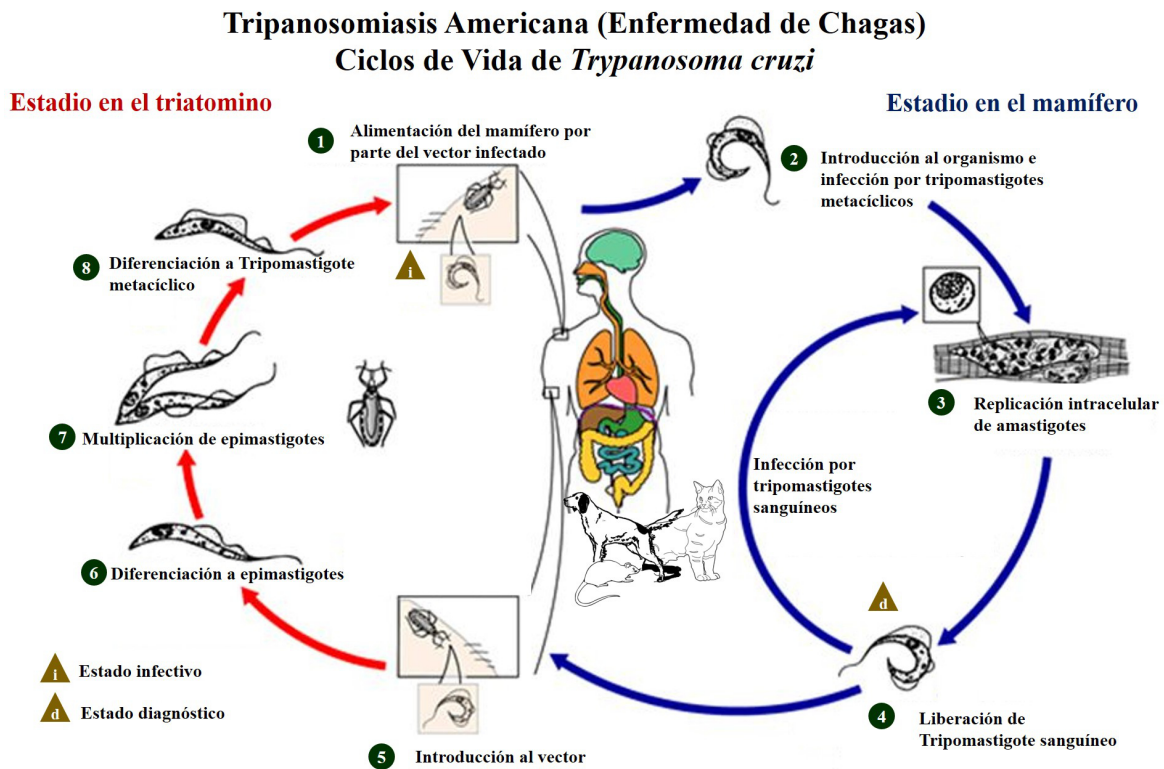


Figura 2.7: Ciclo de vida del *Trypanosoma cruzi*. Imagen de dominio público generada por DPD CDC [17].

2.3.2 *Trypanosoma cruzi*

El *Trypanosoma cruzi* es el protozoo causante de la enfermedad del Chagas o Tripanosomiasis Americana. Ésta enfermedad afecta aproximadamente entre 8 y 10 millones de personas, además de los 20 millones de personas en latinoamérica en peligro de infección [60]. Éste parásito ha sido estudiado desde 1909 cuando Carlos Chagas se enfrenta a un brote de malaria en el río Sao Francisco [20].

2.3.2.1. *Ciclo de vida*

El parásito *T. cruzi* presenta un ciclo de vida di-genético (ver Fig. 2.7), lo que significa que el parásito alterna estadio entre un vector y un mamífero. El vector es un triatoma que se alimenta de algún mamífero, comúnmente llamado chinche besucona.

Dentro del sistema circulatorio de los mamíferos, el parásito se puede encontrar en su forma tripomastigote. Cuando el insecto pica al mamífero también ingiere al parásito en forma tripomastigote, dentro del sistema digestivo del vector se transforma en epimastigote. Más tarde

en la parte final del sistema digestivo del vector se diferencia en tripomastigote metacíclico. Cuando el insecto infectado pica a un mamífero sano los tripomastogotes son defecados y entran al torrente sanguíneo por alguna lesión en la piel. Una vez dentro del hospedero los tripomastigotes metacíclicos infectan diferentes células como fibroblastos, macrófagos y células epiteliales [62]. Dentro de las células el tripomastigote metacíclico se transforma en amastigote, que son capaces de reproducirse y por último volver a su forma tripomastigote distribuidos en el torrente sanguíneo [24].

En el ciclo de vida del *T. cruzi*, dos etapas tienen flagelo: epimastigote y tripomastigote. El flagelo tiene varias funciones importantes como sensar, anclarse en la membrana y nadar [39]. Además se especula que la motilidad tiene relevancia para la reproducción y el proceso de infección [41, 66]. De hecho, estudios recientes [29, 38] han demostrado que varios factores que afectan a la motilidad también inhiben la infección.

2.3.2.2. Flagelo y motor

Para el caso de *T. cruzi* el flagelo es del tipo eucarionte. Previamente se ha explicado su composición; ahora se explica su función. De manera particular su movimiento es del tipo batido que se genera por el mecanismo de transporte proporcionado por acción de dineínas en los dobletes de microtubulos α y β que se encuentran posicionadas de manera interna y externa. Dichas proteínas funcionan por medio de reacciones de fosforilación que generan las deformaciones del flagelo al interactuar las dineínas con las α y β tubulinas. Dicha deformación genera una ondulación localizada que se transmite como onda a lo largo del flagelo. En la base se encuentra el axonema que da soporte al flagelo por medio de seis tripletes de microtubulos. Para generar el movimiento es necesario introducir energía al sistema, la cual proviene de ATP que es producida muy cerca de la base del flagelo por una mitocondria. También es importante recalcar la presencia de un cinetoplasto dentro de la mitocondria. Éste complejo es capaz de producir la cantidad requerida de ATP para generar el movimiento del parásito.

2.4 Importancia biológica, médica y ecológica

Como se ha mencionado en la introducción, el desplazamiento de los seres vivos juega un papel relevante en áreas de la ciencia como la biología, la medicina y la ecología. Los ejemplos presentados con anterioridad son generales, pero para el caso de los modelos biológicos utilizados en el presente trabajo, la importancia de desarrollar conocimiento puede impactar positivamente dichos sectores como se describe a continuación.

La bacteria *E. coli* se ha utilizado ampliamente en biología como modelo de estudio para distintos fenómenos. Por ejemplo, el dogma de la biología molecular (en donde se describen los procesos de replicación, transcripción y traducción del genoma) varias vías de señalización, y el nado de microorganismo. En medicina, es importante como modelo de infección bacteriana y recientemente como método de combate contra el cáncer [70], entre otros. En ecología se ha utilizado para biorremediación de toxinas en agua [18, 53].

Por otro lado, la motilidad del parásito se ha estudiado muy poco. Hasta ahora sólo se sabe que dicha característica puede jugar un papel muy importante en etapas de reproducción, crecimiento e infección. Hasta el momento, un trabajo previo estudió la motilidad del parásito de manera cuantitativa, en el cual se estudia su rapidez utilizando trayectorias con una frecuencia de muestreo de 10 cuadros por segundo [1]. En dicho trabajo se caracteriza por primera vez su motilidad y contrastan sus resultados con los obtenidos para el *Trypanosoma brucei* organismo con un estudio más amplio [74]. Por otra parte la motilidad es crucial para la multiplicación del parásito dentro del vector, pues solo lo puede hacer cuando se encuentra anclado a la superficie del intestino del insecto. En dichas condiciones el parásito se encuentra en su estadio epimastigote.

2.5 Motilidad bajo confinamiento

El medio ambiente en el que se desarrolla la vida de microorganismos en muchos casos está asociado a medios porosos. Por tal motivo se han realizado una gran cantidad de estudios de motilidad en medios porosos tridimensionales [3, 30, 37, 40, 57]. En algunos de los estudios se genera el medio poroso de manera sintética. Un ejemplo es el estudio en el que crearon una matriz porosa con geles (Gelitre) de partículas con diámetros cercanos a cincuenta micrómetros. En este trabajo, los autores concluyen que la interacción mótil de las bacterias con las superficies aparentes del gel genera un proceso de migración no difusiva, el cual fue caracterizado a través de un modelo matemático estocástico. Estos estudios tienen resultados importantes para concluir que el fenómeno tiene mucha relevancia en la biorremediación [40, 47].

El estudio de la motilidad en confinamiento de células únicas se ha limitado por la complejidad que representan las diferentes interacciones entre los microorganismos y el medio confinante, así como por la enorme variedad de efectos físicos, químicos y biológicos que existen en un sistema real [71]. Uno de los trabajos encontrados en la literatura es el realizado por Goldfine et al [14], en el cual se estudia la dinámica de célula única de bacterias *E. coli* confinadas entre dos placas de vidrio con diferentes separaciones (2, 3, 10, 15 y 20 μm). Los

autores observaron que hay una disminución en la velocidad del orden del 30 % únicamente cuando la distancia entre las placas es de $2\mu m$ [14].

Respecto a la motilidad con confinamiento en dispositivos microfluidicos, se han realizado algunos trabajos interesantes como el de Männik et al [51], en donde demuestran que las bacterias dejan de moverse en confinamiento cuando el canal es del mismo tamaño que el diámetro del cuerpo de la bacteria. Para lograr avanzar la bacteria recurre a la división celular. Además, la velocidad no cambia hasta que se confina la bacteria en dimensiones muy cercanas al diámetro del cuerpo de la célula. Otro trabajo relevante es el realizado por Binz et al [13], quienes encuentran que la motilidad de la bacteria *Serratia marcescens* disminuye aproximadamente un 50 % al pasar por un canal con obstáculos y con dimensiones del orden del tamaño de la bacteria. En otro trabajo se realizó un estudio de motilidad en un microdispositivo el cual contiene canales con una altura de 1.3-1.4 μm y un ancho de 10 μm colocado sobre a una lámina de agarosa. Los resultados muestran una interacción con las paredes de los canales con una preferencia de las bacterias a nadar de lado derecho del canal como resultado de la hidrodinámica [25].

En esta revisión de trabajos de confinamiento se resaltan detalles cualitativos sobre el comportamiento de los distintos microorganismos. Para lograr un mayor entendimiento de los fenómenos que ocurren en bacterias mótils es importante conocer la causa de dichos cambios tanto cualitativos como cuantitativos. Desde el punto de vista físico, estos sistemas biológicos se han estudiado principalmente a través de interacciones directas e hidrodinámicas, entre microorganismos y entre dichas células con el medio que las confina.

2.5.1 Interacciones hidrodinámicas

Las interacciones hidrodinámicas son aquellas que son originadas por el movimiento de los cuerpos en un fluido. Estos movimientos perturban el fluido circundante generando un acoplamiento en los desplazamientos de los cuerpos. En el bulto, se sabe que el campo de flujo del fluido para “pushers”, como las bacterias *E. coli* y *B. subtilis*, corresponde a un dipolo hidrodinámico y que éste es de largo alcance ($1/r^2$) [36, 43]. Las trayectorias descritas para “pushers” en su nado en modo de corrida son rectilíneas gracias a las interacciones hidrodinámicas de sus flagelos que los mantiene unidos y apuntando en una dirección. También, dichas interacciones aparecen entre pares de bacterias en donde se afectan mutuamente las trayectorias por medio de la hidrodinámica, efecto que se ha medido a través de la correlación de velocidades de pares de bacterias [43, 46] o por medio de partículas trazadoras [28].

Cerca de un plano, existe una discusión entre si el campo corresponde a un dipolo hidrodinámico, cuadrupolo hidrodinámico o una combinación, y si el alcance que tiene la

interacción es de largo [11, 28, 32] o corto alcance [27]. En cualquier caso, las trayectorias se alinean al plano y describen círculos debido a dichas interacciones.

Entre dos planos paralelos, las interacciones entre bacterias y los planos se apantallan o se equilibran, y los campos de flujo se hacen más complejos [56, 61, 65]. Las interacciones hidrodinámicas hacen que las bacterias naden cerca de las superficies cuando las superficies se encuentran muy separadas entre si. Al disminuir la distancia de separación las bacterias nadan en el punto de equilibrio, es decir a la mitad de la distancia de separación entre los planos paralelos.

También se han estudiado dichas interacciones entre pares de bacterias y se han descrito sus campos de flujo de fluido debido a la hidrodinámica junto con la correlación de velocidades que describen dichas interacciones [46]. En tales estudios, se han propuesto cuadrupolos, dipolos y una combinación de ambos en los campos de flujo del fluido. Además, la distancia de interacción entre micronadadores disminuye cuando se encuentran cerca de una superficie [15, 16, 28, 34, 43, 46]. También se ha comprobado que las interacciones hidrodinámicas entre micronadadores es responsable de nuevos fenómenos en el nado colectivo. Con las condiciones adecuadas de concentración, de motilidad, viscosidad, entre otros factores aparecen vórtices y flujos turbulentos [34, 46].

2.5.2 Interacciones directas

Las interacciones directas son aquellas producidas por choques entre cuerpos. Por ejemplo, los choques entre el cuerpo de las bacterias y los obstáculos. Pero es importante resaltar que otras interacciones directas se encuentran presentes en los experimentos debido a la presencia de los flagelos y otras bacterias. Dichos choques se dan entre flagelos y flagelos de distintas bacterias, flagelos y obstáculos, y por último los choques entre bacterias.

Estudios previos se han enfocado a entender las interacciones entre micronadadores y distintos obstáculos. En la mayoría se utilizan obstáculos mucho más grandes que los micronadadores y dentro de los resultados se encuentra tiempos de reposo, interacciones con las superficies y cambios de dirección. En los choques se ha demostrado que existe un retraso en la continuación del nado del micronadador [47]. También se ha encontrado un cambio drástico en la dirección del nado en donde se propone que los flagelos cambian de posición para moverse en el sentido contrario al original [19]. Otros trabajos se han dedicado a explorar las interacciones con las superficies en donde encuentran una adhesión con la superficie del obstáculo debida a la geometría del nadador y el obstáculo [48, 69]

2.6 Modelado de micronadadores

El modelado matemático del movimiento de animales, microorganismos y células ha sido de gran importancia para la biología, medicina y ecología. Existen muchas maneras de representar el movimiento, pero la más utilizada por su simpleza es la del caminante aleatorio. En este capítulo se introducen los conceptos básicos del caminante aleatorio y el caminante aleatorio con correlación.

El primer estudio realizado en esta área de la ciencia fue sobre la observación de partículas de polen a través de un microscopio por el botánico Brown en 1828, cuyo movimiento irregular del polen se conoce ahora como movimiento Browniano. Durante el siglo XX siguieron los estudios sobre estos fenómenos del movimiento a escalas microscópicas, pero fue hasta 1905 que por estudios de Pearson y Raleygh se acuñó el nombre de caminantes aleatorios. También Einstein y Smoluchowski fueron atraídos por el tema y durante sus estudios desarrollaron nuevas áreas de estudio como procesos aleatorios, ruido aleatorio, análisis espectral y ecuaciones estocásticas. La teoría de caminantes aleatorios fue desarrollada más tarde por Uhlenbeck y Ornstein en 1930.

Este campo de estudio es más profundo, pero en esta sección se describe un panorama general. Con tal conocimiento es posible ahora ubicar en que punto se trabajó en el presente proyecto. La herramienta matemática que se desarrolla en los caminantes aleatorios se aplica directamente en microorganismos, sin embargo recientemente también se ha aplicado en el estudio de organismos más complejos. Información relevante sobre este tema se puede encontrar en artículos de revisión y libros (como: Weiss 1994; Turchin 1998; Okubo and Levin 2001; Hillen 2002).

Los caminantes aleatorios son una representación matemática del movimiento de distintos organismos. La representación se realiza por medio de modelos que contienen las principales características del movimiento en donde se crea una trayectoria a partir de pasos aleatorios enlazados sucesivamente. El caso más sencillo es el de el movimiento en una dimensión, en donde solo existe la posibilidad de avanzar o retroceder con una probabilidad de 0.5 para cada dirección. Se aumenta la complejidad al incrementar las dimensiones y cambios en la probabilidad.

2.6.1 Caminante aleatorio simple

El caminante aleatorio simple es uno de los ejercicios más utilizados en la enseñanza de procesos de difusión. En éste caso se considera a un caminante que se puede desplazar sólo en una dimensión con pasos discretizados. Se supone que el caminante comienza en la posición cero u origen y se mueve un paso δ a la izquierda o derecha en un pequeño periodo de tiempo

τ . El movimiento se asume completamente aleatorio y que la probabilidad de moverse en una dirección o la otra es $1/2$. Después de un paso, el caminante se encuentra a una distancia dada δ a la derecha o izquierda del origen, con la probabilidad de $1/2$ en ambas direcciones. A un segundo paso en el tiempo el caminante se encontrará a una distancia de 2δ a la izquierda o derecha del origen con probabilidad de $1/4$, o habrá regresado al origen con la probabilidad de $1/2$. Es importante notar que después de un número de pasos impar/par el caminante se encontrará a una distancia impar/par del origen. Continuando con la lógica, la probabilidad de que el caminante se encuentre a una distancia $m\delta$ a la derecha del origen después de n pasos está dada por:

$$p(m, n) = \frac{1^n}{2} \binom{n}{\frac{n-m}{2}}, \quad (2.5)$$

$$= \frac{n!}{2^n ((n+m)/2)! ((n-m)/2)!}. \quad (2.6)$$

La cual es una forma de la distribución binomial con media 0 y varianza n . Que con un número n muy grande converge a una distribución normal o Gaussiana. Entonces, después de un tiempo suficientemente largo la posición del caminante se da por una distribución normal con media 0 y varianza $\delta^2 t / \tau$. Si el límite es δ , $\tau \rightarrow 0$ tal que $\delta^2 / \tau = 2D$, donde D es el coeficiente de difusión, se obtiene la función de densidad de probabilidad para la localización del caminante después de un tiempo dado t como;

$$p(x, t) = \frac{1}{\sqrt{4\pi Dt}} \exp\left(\frac{-x^2}{4Dt}\right). \quad (2.7)$$

cabe notarse que ésta es la solución fundamental para la ecuación de difusión.

Los momentos de orden 1 y 2 para éste proceso son la localización media $E(X_t)$ y el desplazamiento cuadrático medio (DCM) $E(X_t^2)$, que están definidos por

$$E(X_t) = \int_{-\infty}^{\infty} xp(x, t)dx, \quad (2.8)$$

$$E(X_t^2) = \int_{-\infty}^{\infty} x^2 p(x, t)dx. \quad (2.9)$$

Para una dimensión, es sencillo demostrar que $E(X_t) = 0$ y $E(X_t^2) = 2Dt$. En donde el primer resultado demuestra que no existe anisotropía en el movimiento en promedio, mientras que para la segundo resultado se ilustra la propiedad de un proceso difusivo—que indica que

DCM se incrementa linealmente con el tiempo t . Esto último contrasta con un proceso balístico en el que el DCM es proporcional a t^2 . Ésta relación se mantiene para un mayor número de dimensiones, y es un hecho importante puesto que a partir de datos empíricos es posible estimar el coeficiente de difusión D que es utilizado en muchos modelos matemáticos de dinámica de poblaciones y procesos difusivos. A partir de éste desarrollo se han propuesto más procesos y complejidades, y en particular para este trabajo es de suma importancia el modelo de caminante aleatorio con correlación, el cual se describe a continuación.

2.6.2 Caminantes aleatorios con correlación

El caminante aleatorio con correlación y la ecuación del telégrafo toman en cuenta un término pequeño de correlación en la dirección del movimiento. En la mayoría de los casos el caminante se mueve preferentemente en la misma dirección o en una dirección muy similar a la dirección de un movimiento previo. A esto se conoce como persistencia. Al incluir de manera explícita la persistencia en el movimiento y una rapidez constante del caminante aleatorio, se evita el problema de velocidad de propagación infinita. Considerando una población de individuos moviéndose en una dirección, izquierda o derecha en una línea infinita a rapidez constante v . Denota la densidad de derecha e izquierda individual en la posición x y tiempo t por $\alpha(x, t)$ y $\beta(x, t)$, respectivamente. El total de la densidad de la población es $p(x, t) = \alpha(x, t) + \beta(x, t)$. A cada paso temporal τ , cada individuo cambia de dirección y se mueve a una distancia δ en dicha dirección (con una probabilidad $r = \lambda\tau$, en donde λ es el promedio de eventos ocurridos en un periodo de tiempo fijo), o se mueve a una distancia δ en la dirección previa (con una probabilidad $q = 1 - \lambda\tau$). Por lo tanto los eventos de cambio de dirección ocurren con una distribución de probabilidad de Poisson con una razón de λ . Si se toma un tiempo posterior, la densidad de individuos en la posición x moviéndose a la derecha e izquierda está dada por;

$$\alpha(x, t + \tau) = (1 - \lambda\tau)\alpha(x - \delta, t) + \lambda\tau\beta(x - \delta, t), \quad (2.10)$$

$$\beta(x, t + \tau) = \lambda\tau\alpha(x + \delta, t) + (1 - \lambda\tau)\beta(x + \delta, t). \quad (2.11)$$

Al expandirlas como series de Taylor y tomando el límite de $\delta, \tau \rightarrow 0$ tal que $\delta/\tau = v$ obtenemos

$$\frac{\partial\alpha}{\partial t} = -v\frac{\partial\alpha}{\partial x} + \lambda(\beta - \alpha), \quad (2.12)$$

$$\frac{\partial\beta}{\partial t} = v\frac{\partial\beta}{\partial x} + \lambda(\beta - \alpha). \quad (2.13)$$

Al sumar (2.12) y (2.13) y derivando con respecto de t . Posteriormente al restar (2.12) y (2.13) y derivando con respecto de x , obtenemos

$$\frac{\partial^2(\alpha + \beta)}{\partial t^2} = v \frac{\partial^2(\beta - \alpha)}{\partial x \partial t}, \quad (2.14)$$

$$\frac{\partial^2(\beta - \alpha)}{\partial t \partial x} = v \frac{\partial^2(\alpha + \beta)}{\partial x^2} - 2\lambda \frac{(\beta - \alpha)}{\partial x}. \quad (2.15)$$

Finalmente, substituyendo (2.15) en (2.14), y usando las ecuaciones (2.12) y (2.13), y el hecho de que $\alpha + \beta = p$ obtenemos

$$\frac{\partial^2 p}{\partial t^2} + 2\lambda \frac{\partial p}{\partial t} = v^2 \frac{\partial^2 p}{\partial x^2}. \quad (2.16)$$

La ecuación (2.16) es un ejemplo de la ecuación de telégrafo, llamada así originalmente por el estudio de Lord Kelvin en relación a la propagación de señales a lo largo del cable transatlántico. Goldstein más tarde demostró que esta ecuación también es la ecuación que gobierna éste tipo de caminante aleatorio en especial [33]. Kac realizó un análisis similar por lo que al modelo se le conoce como Goldsten-Kac [67]. Es importante notar que ésta ecuación representa el movimiento correlacionado, el caminado aleatorio es en general imparcial en el sentido de que no domina una dirección particular, simplemente existe una tendencia de los individuos en moverse en una dirección (una parcialidad local). A pesar de que el proceso original utiliza un tiempo fijo de paso τ , el tiempo promedio entre cambios de dirección, $\bar{\tau} = 1/\lambda$, es distinto puesto que el proceso del telégrafo no tiene cambios de dirección a cada paso.

La ecuación (2.16) se resuelve con las condiciones iniciales dadas de $p(x, 0)$ y $(\partial p / \partial t)(x, 0)$, pero la solución completa es aún más compleja. Como la rapidez es fija v , la solución no propaga la rapidez infinitamente. Es posible utilizar un método similar a (2.10) para obtener las ecuaciones de los momentos:

$$E(X_t) = 0, \quad (2.17)$$

$$E(X_t^2) = \frac{v^2}{\lambda} \left(t - \frac{1}{2\lambda} (1 - e^{-2\lambda t}) \right). \quad (2.18)$$

Para tiempos pequeños t (por ejemplo $t = 1/\lambda$), $E(X_t^2) \approx O(v^2 t^2)$, que es característico de un proceso superdifusivo; para tiempos largos t , $E(X_t^2) \approx O(v^2 t / \lambda)$, que es característico de un proceso difusivo.

3

Materiales y métodos

3.1 Cultivos celulares

3.1.1 *E. coli*

En el presente trabajo se utilizó un modelo bacteriano de *Escherichia coli* de la cepa silvestre MG1655 que fue proporcionada por el Dr. Agustino Martínez Antonio (Unidad Irapuato - Cinvestav, Irapuato, Guanajuato, México), y perteneciente a la colección Keio. A partir de un inóculo se generaron cultivos de reserva siguiendo el protocolo previamente reportado por Lauga [42]. De esta manera se garantiza homogeneidad entre experimentos, puesto que por cada ciclo de cultivo de reserva se generaron 98 tubos con 200 μ l de medio LB saturado de bacterias que sirven para realizar experimentos por un día. Primero se hace un cultivo de bacterias al inocular medio LB por 16 horas a 34°C, con agitación a 150 rpm. Después, a cada tubo con 200 μ l de cultivo saturado se agrega glicerol al 15 % (*v/v*) y se almacena a -80°C

El medio de LB es un medio rico en nutrientes que se utiliza ampliamente en el cultivo de bacterias. Éste medio consta de 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de cloruro de sodio diluido en 1 L de agua bidestilada.

Para cada sesión experimental, un nuevo cultivo de bacterias se prepara con 4 mL de LB en un tubo de 8 mL al cual se le agrega el inóculo stock de 200 μ L de LB saturado. El cultivo se crece por 3.5 h a 34°C con agitación orbital a 150 rpm, tiempo en el que el crecimiento se encuentra a la mitad de su fase exponencial (ver Fig. 3.1).

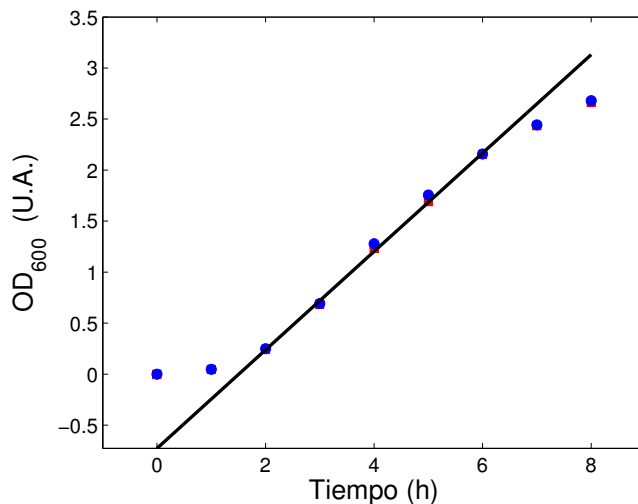


Figura 3.1: Curva de crecimiento de la bacteria *E. coli* cuya población se mide a través de la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm en función del tiempo (en horas) y su respectivo ajuste de la parte lineal del crecimiento.

3.1.2 *T. cruzi*

Los parásitos de *T. cruzi* cepas CL-Brener, silvestre y transformada fueron provistos por el grupo del Dr. Gilberto Ballesteros (Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, México). Los parásitos silvestres y transformados se cultivaron en medio infusión de hígado y triptosa (LIT), a una temperatura de 28°C. En éste caso en particular el medio se adiciona con 10 % de suero fetal bobino, 0.5 % de penicilina/estreptomicina y 1 % de hemina.

Se conoce que la proteína LYT1 participa en por lo menos tres procesos: desarrollo, patogénesis en la infección y motilidad del parásito *T. cruzi*. Por medio de coimmunoprecipitación se realizaron experimentos que demuestran la participación activa con proteínas trans-sialidasa que cataliza la reacción de la transferencia de residuos de ácido siálico de las glicoproteínas y glicolípidos del hospedero hacia sacáridos aceptores sobre la superficie de los tripomastigotes en la infección. En la transcripción, ciclo celular y desarrollo del parásito se encuentran las histonas H2A y H2B junto con kDSPs. En la motilidad y acarreamiento de proteínas se encontró interacción con dineínas, α -tubulina y β -tubulina. Interacciones con otras proteínas y sus respectivos procesos se hipotetizan pero se requiere un estudio más profundo [49].

El grupo del Dr. Ballesteros pudo generar tres cepas que sobrepresan las dos isoformas de la proteína LYT1, la primera sobrepresa LYT1s, la segunda LYT1n y la tercera LYT_{s+n}, eligió trabajar con la cepa transformada capaz de sobrepresar ambas isoformas (LYT_{s+n}) [1].

La razón es que cuando se contrastaron con la cepa silvestre, la cepa elegida presenta mayores efectos de disminución en la motilidad del parásito [2].

Los parásitos se crecieron en condiciones homogéneas para ser utilizados en 59 experimentos en su fase logarítmica de crecimiento a 48 horas. Los cultivos de reserva fueron crecidos cada 4 días utilizando 1×10^6 parásitos en el inóculo inicial para garantizar homogeneidad y motilidad.

3.2 Preparación de muestras

3.2.1 *E. coli*

Para cada muestra experimental se lava tres veces 1 *ml* de medio LB saturado con bacterias por medio de centrifugación a 2000 *g* por 5 min. y al final es resuspendido en medio de motilidad. El buffer de motilidad es una solución diseñada para mantener la motilidad de las bacterias pero con su metabolismo detenido. El medio contiene 10 mM de fosfato de potasio, 0.1 mM EDTA, 10 mM cloruro de sodio y tiene un pH de 7.5. El buffer también es esterilizado por autoclave a 120 °C.

Las muestras experimentales se diseñaron con el propósito de confinar una suspensión diluida de bacterias en un sistema quasi-bi-dimensional, que al mismo tiempo genera un medio poroso. El sistema se construyó al confinar una mezcla de bacterias y esferas de poliestireno con diámetro de $2.98 \pm 0.14 \mu\text{m}$ (Thermo Scientific) entre dos placas de vidrio (un porta objetos y un cubreobjetos), de tal manera que la separación entre los vidrios coincide con el diámetro de las partículas [64]. Las esferas cumplen dos propósitos: 1) tienen una función de soporte entre las dos superficies para garantizar una separación uniforme, y 2) generan una matriz porosa heterogénea cuasi-bi-dimensional. La fracción de área ocupada por los obstáculos fue controlada en cada experimento al mezclar diferentes proporciones de bacterias y esferas, el rango de variación de la fracción de área ocupada por los obstáculos fue de 0.01 a 0.4. En todos los casos, el conteo de bacterias se mantuvo entre 15 y 30 bacterias dentro del área de grabación. La evaporación del fluido y la aparición de flujos externos fue eliminada por medio de un sello con poli-dimetil-siloxano (PDMS). Cada muestra contiene un volumen aproximado de 8 μL , lo cual asegura una capa única de esferas. Para prevenir la adhesión de bacterias a las superficies, los vidrios se trataron previamente a su utilización con PVP-40 (polivinilpirrolidona) diluida en agua Milli-Q a una concentración de 0.005 % (*w/v*). Todos los experimentos fueron realizados a una temperatura de 25°C.

3.2.2 *T. cruzi*

La preparación de las celdas para los parásitos *T. cruzi* epimastigotes se realizó de una forma similar al caso de las bacterias *E. coli*. Es decir, de la mezcla de parásitos y partículas se tomaron 10 μL que fueron confinados entre dos superficies de vidrio (un porta objeto y un cubre objeto) separados con partículas de 10 μm de diámetro. Dicha mezcla generó una fracción de área $\phi \approx 0.001$. Asimismo, la celda fue sellada con PDMS para evitar flujos provocados por evaporación del fluido y los vidrios se trataron previamente a su utilización con PVP-40 (polivinilpirrolidona) diluida en agua Mili-Q a una concentración de 0.005 % (w/v) para evitar que los parásitos se adhieran a las superficies. Las partículas de latex proveen de una separación uniforme entre superficies de 10 μm , lo cual permite a los parásitos moverse en trayectorias quasi-bi-dimensionales. Dichos experimentos se realizaron a una temperatura de 25°C.

3.3 Diseño experimental

3.3.1 *E. coli*

El estudio de la motilidad de las bacterias en un sistema confinado considera la situación más sencilla como la condición control o base. En el experimento control se mantienen una fracción de área ocupada por obstáculos mínima que permite garantizar la separación entre superficies y que la interacción entre bacterias y partículas sea muy baja para considerarla despreciable. A partir del primer paso se desarrollaron experimentos en donde el sistema de confinamiento incrementa su complejidad al incrementar la cantidad de obstáculos en el sistema, es decir, se aumentó la fracción de área ocupada por los obstáculos. Con el aumento de obstáculos la cantidad de interacciones entre obstáculos y bacterias incrementa por lo que se espera observar un efecto sobre la motilidad de las bacterias que se cuantifica por medio del análisis de los resultados.

3.3.2 *T. cruzi*

En el caso del parásito se desea conocer las características principales de su nado y cuantificar parámetros físicos. Se hacen dos estudios, uno sobre la motilidad de una cepa silvestre y el segundo sobre la motilidad de una cepa transformada que presenta una alteración en sus capacidades motiles. Comparar los resultados experimentales entre si, nos puede proporcionar información importante, sin embargo, para conocer más detalles sobre su motilidad también se

desarrolló un modelo matemático simple que reproduce su motilidad.

3.4 Video microscopia digital

Para cada experimento se generaron videos con ayuda de un microscopio con contraste de fases que permite obtener imágenes con alto contraste. Dichas imágenes ayudan a discriminar el fondo de los microorganismos como se explicará más adelante en la sección de análisis. Los videos fueron grabados a 30 cuadros por segundo por medio de una cámara CCD montada sobre un microscopio de contraste de fases Olympus (BX51) y con un objetivo de 40X, con una resolución espacial de 480×720 pixeles, lo que genera un área de captura en el video de $120 \times 160 \mu\text{m}^2$. Cada video se analizó directamente para obtener las posiciones de cada microorganismo, después se ligaron las posiciones para generar trayectorias y cada trayectoria se utilizó para calcular los parámetros físicos de velocidades, rapidez, ángulo de cambio de dirección, desplazamiento cuadrático medio, correlación de velocidad, entre otros.

4

Análisis de imágenes, trayectorias y batido del flagelo

La ciencia de imágenes es una disciplina de reciente creación y se basa en la implementación de filtros de distintas naturalezas para cuantificar la información contenida en las imágenes. En esta disciplina se manejan a las imágenes como una colección de información cuantificada y localizada. Cada punto en el espacio es representado por un pixel, en el cual se almacena la cantidad de intensidad luminiscente en una posición específica. Para extraer información de dicho sistema se realizan operaciones matemáticas con la colección de números junto con su posición. En este trabajo se utilizan implementaciones en MatLab de un programa desarrollado con anterioridad para IDL con el propósito de extraer las trayectorias contenidas en cada video [21]. También se programaron las herramientas necesarias para procesar la información obtenida de las trayectorias.

4.1 Análisis de imágenes de las bacterias

Los videos son secuencias de imágenes separadas por intervalos de tiempo constantes. Esto nos permite registrar la motilidad de microorganismos o células y seguir sus trayectorias, midiendo cantidades físicas como rapidez, velocidad, aceleración, etc. El inverso del intervalo de tiempo que transcurre entre imágenes es conocido como la frecuencia de adquisición o los cuadros por segundo. Las imágenes se registran de manera digital en formato cuantificado por medio de pixeles los cuales registran una intensidad de color para un área dada, así se construye una imagen que consta de $n \times m$ pixeles (ver Fig.4.1).

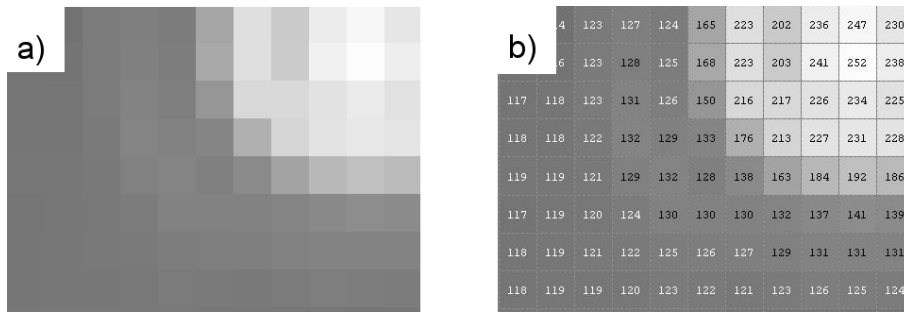


Figura 4.1: Representación de una imagen en píxeles. a) Imagen original, b) Valores de intensidad para cada píxel sobre la imagen.

En este trabajo se generaron videos de cada experimento con una duración de 5 minutos capturados a 30 cuadros por segundo, cuya área consta de 480×720 píxeles, que equivale a $120 \times 160 \mu m^2$ (ver Fig. 4.2). En estas imágenes es posible identificar distintos objetos por medio de la técnica de contraste de fases que incrementa las diferencias de los valores de intensidad de los píxeles entre los objetos y el fondo. Dichos videos y sus imágenes correspondientes presentan a las bacterias y obstáculos claramente distinguibles gracias a su contraste con el fondo (ver Fig.4.2).

Con éste tipo de imágenes se trabajó para obtener las trayectorias correspondientes a cada bacteria. Dicho proceso consta de una serie de cálculos aplicados a cada imagen del video. Primero, en cada cuadro obtenemos imágenes con un contraste suficiente para discriminar dos tipos de objetos del fondo. Para después aplicar un filtro pasa-altas para localizar las posiciones de los obstáculos (esferas de látex) que son los objetos blancos, lo cual se realiza en una sola ocasión para cada experimento ya que las posiciones de las partículas separadoras son fijas (Figs. 4.3(a) y (b)). Después, se aplica un filtro pasa-bajas para localizar a las bacterias, representadas por objetos negros (ver Figs. 4.3(c) y (d)).

Una vez que se tienen localizadas todas las bacterias en una imagen como se muestra en la Fig. 4.4, se procede con el análisis que construye las trayectorias. Con la colección de posiciones de las bacterias para cada cuadro del video es necesario realizar una correlación entre las posiciones entre cuadros consecutivos. Para realizar dicha correlación se requiere establecer parámetros de exploración. En el trabajo desarrollado por Crocker et al [21] para generar las trayectorias se plantea el calcular un error al relacionar las posiciones entre cuadros con todas las posibles posiciones vecinas dentro de un rango que a continuación se explica en detalle.

Para ligar las posiciones de las bacterias entre la imagen tomada un instante de tiempo t_i y otra imagen en un tiempo posterior t_{i+1} es necesario establecer una correspondencia entre las posiciones de las bacterias en base al desplazamiento promedio de las células entre dicho

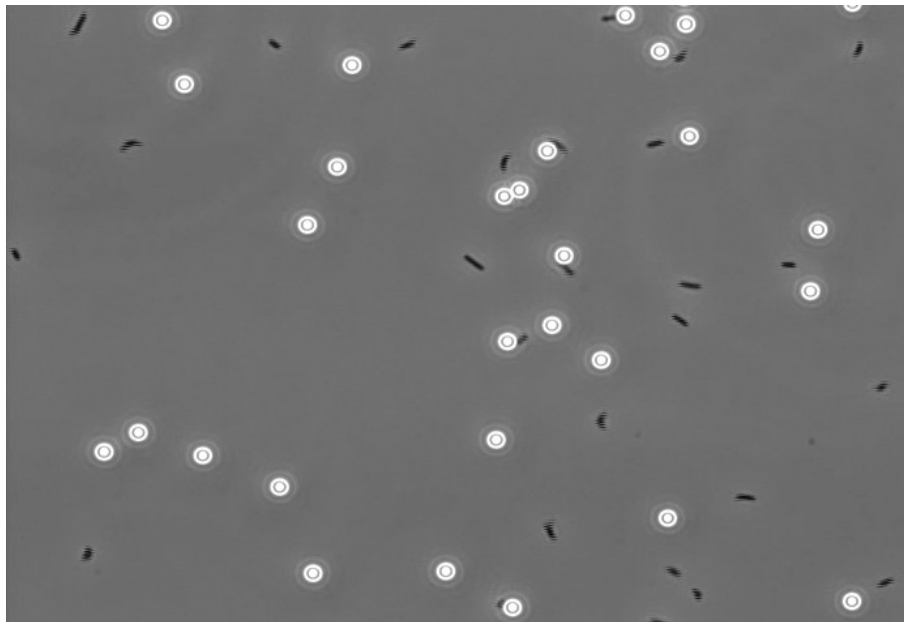


Figura 4.2: Imagen correspondiente a un cuadro del video experimental a una fracción de área baja, en donde los bastones negros son las bacteria, los círculos blancos son las partículas separadoras y en gris el fondo.

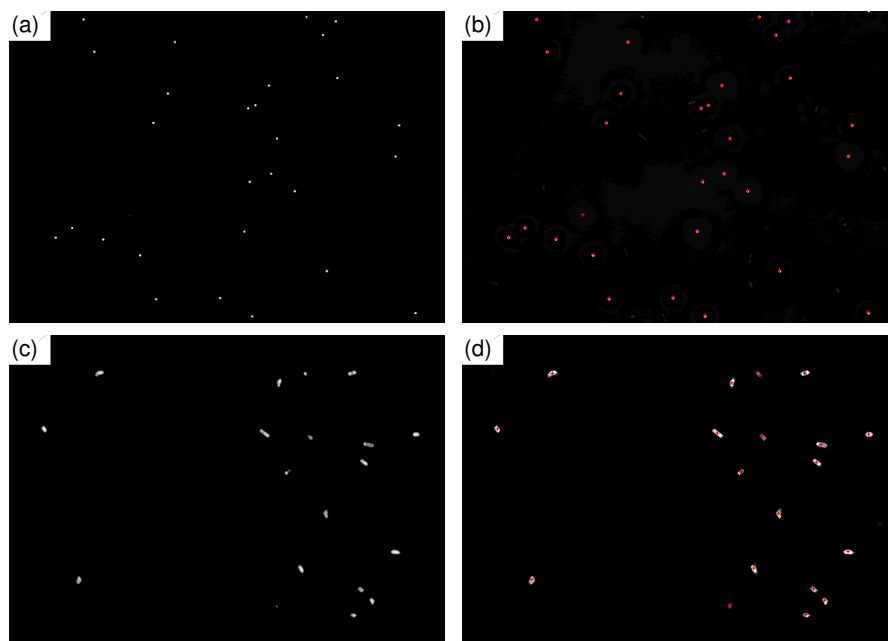


Figura 4.3: a) Imagen binarizada y filtrada con el filtro pasa-altas para localizar los obstáculos. b) Imagen binarizada con los centroides localizados para cada obstáculo con una cruz (+) de color rojo. c) Imagen binarizada y filtrada con filtro pasa-bajas para localizar a las bacterias. d) Localización de los centroides de las bacterias se representa con una cruz (+) de color rojo.

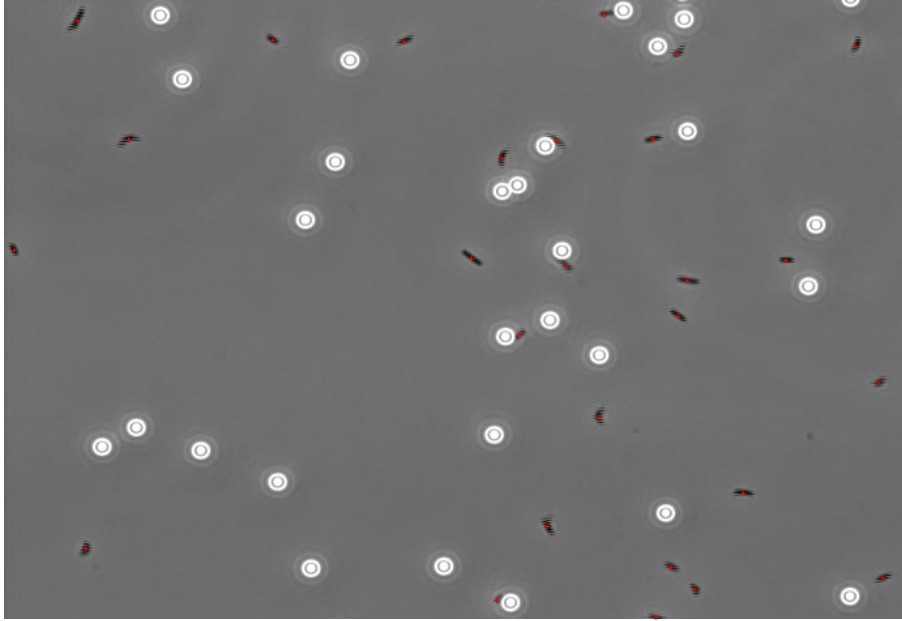


Figura 4.4: Imagen original con las posiciones de los centroides de las bacterias localizados marcados con una cruz (+) de color rojo.

intervalo de tiempo. Cuando no se puede calcular la trayectoria de una célula, lo que se hace es determinar por proximidad entre las dos imágenes. El algoritmo para ligar trayectorias no considera la interacción entre bacterias. Primero se establece la probabilidad de desplazamiento de la bacteria una distancia δ en el plano en un tiempo τ como se muestra en la Ec. 4.1.

$$P(\delta | \tau) = \frac{1}{\sqrt{4\pi D\tau}} \exp\left(-\frac{\delta^2}{4D\tau}\right), \quad (4.1)$$

en donde D es la velocidad de la bacteria. Para un ensamble similar de N bacterias idénticas, la probabilidad correspondiente es como se presenta en la Ec. 4.2.

$$P(\delta_i | \tau) = \left(\frac{1}{\sqrt{4\pi D\tau}}\right)^N \exp\left(-\sum_{i=1}^N \frac{\delta_i^2}{4D\tau}\right). \quad (4.2)$$

Lo más parecido a la asignación de etiquetas o indicadores a bacterias es la maximización de $P(\delta | \tau)$, o la minimización de $\sum_{i=1}^N \delta_i^2$ que es equivalente. Para reducir la complejidad de asignación de indicadores a las bacterias se acota la distribución de probabilidad a $\delta = L$ en donde L es el desplazamiento característico. Por último se hace una adecuación en el programa para cuando las bacterias salen de la imagen o bien cuando su trayectoria pudiera confundirse con la trayectoria de otra bacteria, en cuyos casos se indica como “perdida” para evitar errores.

Ligar las trayectorias es posible solo si la resolución temporal entre las imágenes es adecuada para distinguir entre la separación de bacterias a y su desplazamiento máximo L .

4.2 Análisis de imágenes del parásito

Los videos obtenidos en el caso de los parásitos tienen las mismas características que los obtenidos para las bacterias *E. coli*. Sin embargo, fue necesario realizar un pre procesamiento adicional a las imágenes debido a que la morfología de los parásitos es mas difícil de identificar. Por tal motivo se realizó un pre procesamiento que proporciona una clara identificación del parásito por medio de contornos. Los parásitos en las imágenes están conformados por píxeles en blanco, negro o una combinación con el fondo en gris. Así que se calcularon los bordes oscuros y los brillantes para después unirlos en una imagen. Primero se obtienen los contornos al calcular las derivadas direccionales en X y Y . Posteriormente, los bordes se ensanchan y se binariza la imagen. Los kernels (Ec. 4.3) utilizados para realizar las derivadas son conocidos como operadores de Sobel y son presentados a continuación:

$$H_{\Delta x} = \begin{bmatrix} 1 & 0 & -1 \\ 2 & 0 & -2 \\ 1 & 0 & -1 \end{bmatrix}, \quad H_{\Delta y} = \begin{bmatrix} 1 & 2 & 1 \\ 0 & 0 & 0 \\ -1 & -2 & -1 \end{bmatrix}. \quad (4.3)$$

Los bordes en algunos casos no encierran por completo al parásito por lo que se reducen los huecos al ensanchar los bordes obtenidos en las derivadas al agregar 2 píxeles a las partes brillantes. Para incrementar la definición de los parásitos de la imagen se suman las áreas brillantes de tal forma que el punto más brillante corresponde al centroide del parásito. Una vez que se obtienen los centroides se siguen los mismos procesos que los establecidos para las bacterias.

4.3 Análisis de trayectorias

Para caracterizar las trayectorias obtenidas, se calculó la velocidad instantánea ($\vec{v}(t)$) y el ángulo de cambio de dirección ($|\theta(t)|$), junto con el desplazamiento cuadrático medio ($\langle \Delta \vec{r}(t)^2 \rangle$)

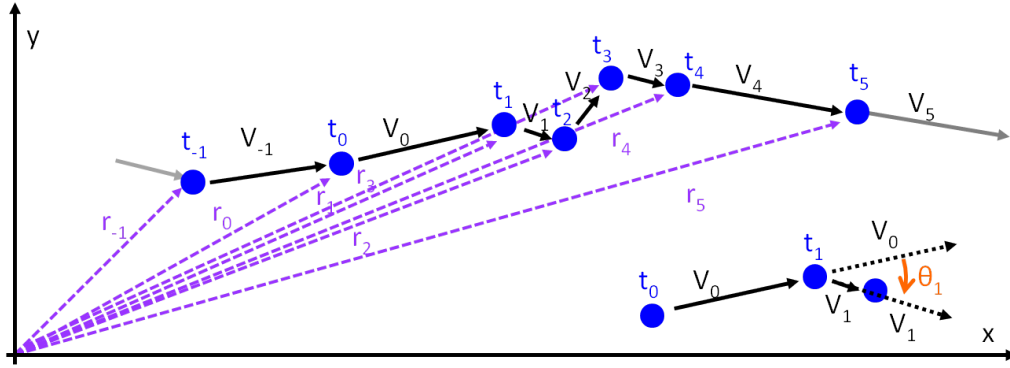


Figura 4.5: Esquema de la trayectoria de un microorganismo cuya posición a diferentes tiempos está representada con círculos azules. Las etiquetas de t , V y r indican el cuadro, velocidad y posición respecto al origen para cada cuadro, respectivamente y en la esquina inferior derecha se presenta una sección de la trayectoria con el ángulo de cambio de dirección θ .

en el tiempo t , por medio de las siguientes ecuaciones:

$$\vec{r}(t) = x(t)\hat{x} + y(t)\hat{y} + 0\hat{z}, \quad (4.4)$$

$$\vec{v}(t) = \frac{\vec{r}(t) - \vec{r}(t - \Delta t)}{\Delta t}, \quad (4.5)$$

$$\theta(t) = \cos^{-1} \left(\frac{\vec{v}(t - \Delta t) \cdot \vec{v}(t)}{|\vec{v}(t - \Delta t)| |\vec{v}(t)|} \right), \quad (4.6)$$

$$\langle \Delta \vec{r}(t)^2 \rangle = \langle (\vec{r}(t) - \vec{r}(0))^2 \rangle, \quad (4.7)$$

donde, la posición al tiempo t está dada por $\vec{r}(t) = x(t)\hat{x} + y(t)\hat{y} + 0\hat{z}$, $\Delta t = 1/30$ s, y $\langle \dots \rangle$ denota el promedio del ensamble. En la Fig. 4.5 se presenta una trayectoria esquemática de un microorganismo donde se incluye el tiempo (t_n), posición respecto al origen (r_n) y velocidad instantánea entre cuadros sucesivos (v_n). Una figura esquemática similar se presenta para el cálculo del desplazamiento cuadrático medio en la Fig. 4.6.

Para discriminar entre los diferentes tipos de modos de nado de un microorganismo, se siguió el razonamiento de Masson [52]. Es decir, que la trayectoria de un microorganismo se divide en dos modos de nado conocidos como corridas y tumbos por medio de un interruptor de Schmitt, en el que la rapidez del microorganismo es tomada en cuenta para establecer dos parámetros umbrales. Para el caso de las bacterias, lo que se hizo fue establecer un umbral superior de 0.65 de la rapidez media en la trayectoria para indicar el inicio de una corrida, y un umbral inferior de 0.6 también de la rapidez media para el inicio de un tumbo. Este análisis se realizó para todas las trayectorias de las bacterias y únicamente para el experimento con la menor fracción de

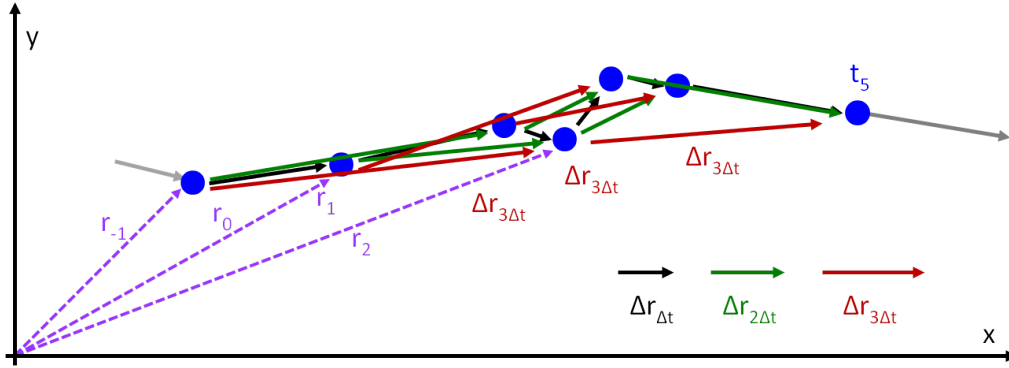


Figura 4.6: Esquema que indica con la misma trayectoria como se obtienen los desplazamientos $\Delta r_{n\Delta t}$ para ser promediados. En color negro podemos ver la colección de desplazamientos a $n = 1, \Delta t$, en verde los correspondientes a $n = 2, 2\Delta t$ y en rojo para $n = 3, 3\Delta t$. En donde n va de la primera posición hasta una posición antes de la final $N - 1$.

área ocupada por obstáculos. Con la información de los inicios de corridas y tumbos se calcula la duración de cada evento junto con su respectiva función de densidad de probabilidad. De manera similar para los parásitos se establecen los umbrales superiores e inferiores de la cepa silvestre y la transformada. En la Fig. 4.7 se presenta un esquema de los dos tipos de nado y la discriminación que se puede realizar en base a la rapidez instantánea de los microorganismos. Los resultados de las distribuciones correspondientes para cada microorganismo se muestran en la sección de resultados.

Para cada trayectoria junto con la clasificación de tipo de nado en cada instante, se realizó un análisis de descomposición de velocidades en longitudinal (\vec{v}_{\parallel}) y transversal (\vec{v}_{\perp}) con respecto al vector de velocidad de un paso previo (Fig. 4.8), las cuales están dadas por las siguientes ecuaciones:

$$\vec{v}_{\parallel} = \vec{v}(t) \cdot \frac{\vec{v}(t - \Delta t)}{|\vec{v}(t - \Delta t)|}, \quad (4.8)$$

$$\vec{v}_{\perp} = \vec{v}(t) \cdot \left(\hat{k} \times \frac{\vec{v}(t - \Delta t)}{|\vec{v}(t - \Delta t)|} \right), \quad (4.9)$$

en donde \hat{k} es el vector unitario en la dirección perpendicular al plano correspondiente al área del espacio cuasi-bi-dimensional.

De dichos cálculos se generaron las funciones correspondientes de distribución de probabilidad para cada uno de los microorganismos. Para la bacteria se realizó el análisis en la concentración más baja de obstáculos y para los parásitos a las dos cepas. Las distribuciones correspondientes se encuentran en la sección de resultados.

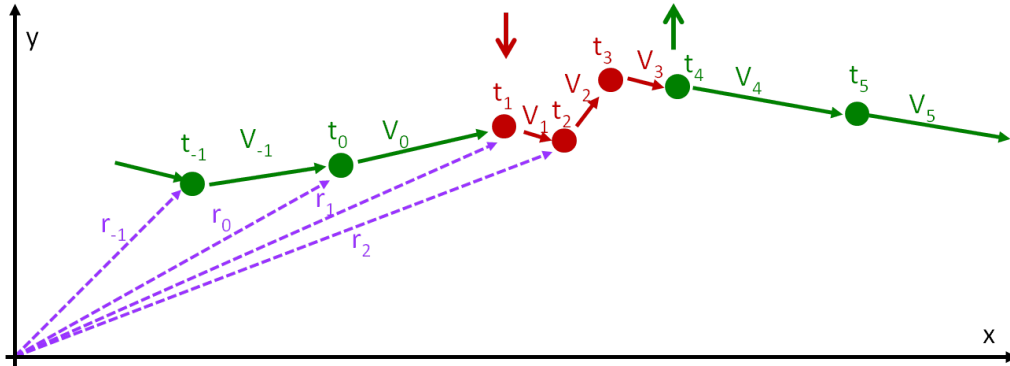


Figura 4.7: Figura esquemática que muestra una trayectoria con los dos tipos de nado de un microorganismo: corridas (círculos verdes) y tumbos (círculos rojos). Los vectores de velocidad en rojo son los que representan el nado en tumbo ya que su valor absoluto es muy inferior con respecto al promedio, lo que refleja la discriminación por el umbral inferior y su contraparte en verde.

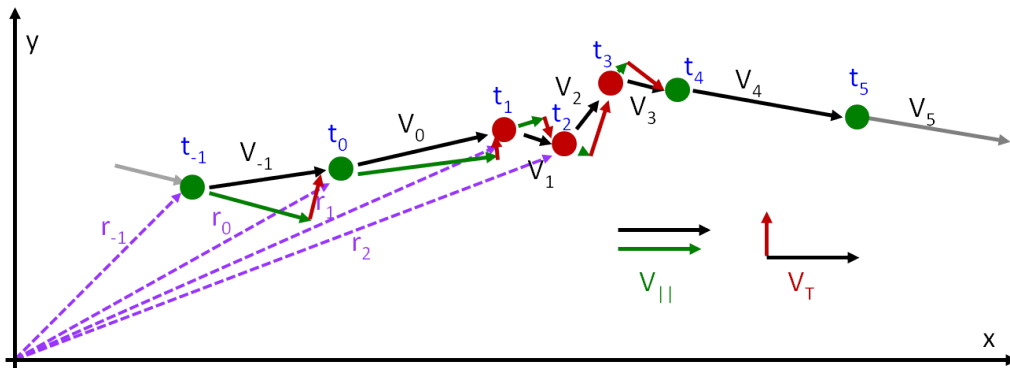


Figura 4.8: Figura esquemática que muestra la descomposición de los vectores de velocidad en sus componentes longitudinal (verde) y transversal (rojo) con respecto a la velocidad en un paso anterior.

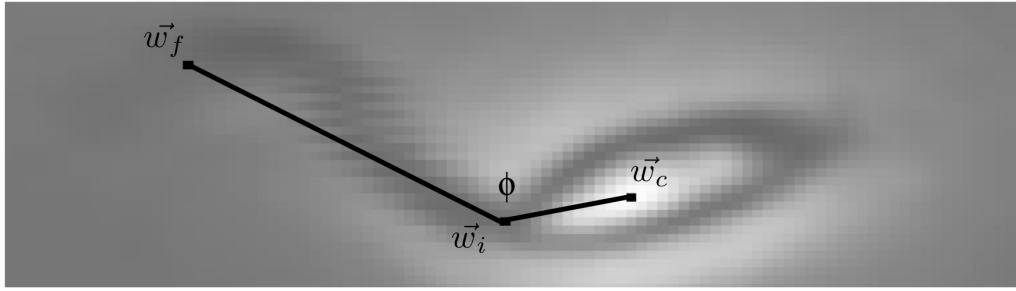


Figura 4.9: Vectores \vec{w}_c y \vec{w}_i que siguen las posiciones del flagelo y el cuerpo para seguir el movimiento del batido del flagelo con respecto al cuerpo.

4.4 Análisis de batido de flagelos del parásito

En las trayectorias típicas de los parásitos silvestres y genéticamente modificadas se observa un movimiento en zig-zag. Para analizar la característica de este efecto, se calculó el ángulo de cambio de dirección para cada paso y a partir del trazo se calculó la densidad del espectro de potencia para cada trayectoria. Para eliminar dicha componente de movimiento en zig-zag se suaviza la trayectorias por medio de un filtro de 5 puntos móvil y se calculó su correspondiente espectro de potencia en el cual se comprueba la eliminación de la componente de movimiento en zig-zag (ver Sección 7.1).

Además del análisis anterior, se llevó a cabo un estudio para determinar la frecuencia del batido del flagelo del parásito *T. cruzi*. Para esto, se identificaron tres vectores para las posiciones de centroide (\vec{w}_c), el punto base del flagelo (\vec{w}_i), y el punto final (\vec{w}_f) (ver Fig. 4.9). Después, se midió el ángulo entre los dos vectores que se forman entre los tres puntos $\vec{\alpha} = \vec{w}_f - \vec{w}_i$ y $\vec{\beta} = \vec{w}_c - \vec{w}_i$ por medio de la Ec. 4.10.

$$\phi = \cos^{-1} \left(\frac{\vec{\alpha} \cdot \vec{\beta}}{|\vec{\alpha}| |\vec{\beta}|} \right). \quad (4.10)$$

Al seguir los cambios en el tiempo del ángulo ϕ fue posible determinar la frecuencia de batido del flagelo, el cual se determinó por medio del cálculo de la densidad del espectro de potencia para cada parásito.

El procedimiento que se siguió para determinar las posiciones de los tres puntos de referencia fue el siguiente:

- Primero, se aplicó un filtro de suavizado a la imagen para evitar discontinuidades en el flagelo. Después, la imagen resultante se binariza con el objetivo de obtener la ubicación

de los píxeles con intensidad alta. El resultado obtenido es de una elipse que ajusta al cuerpo del parásito, definido como el vector \vec{w}_c .

- Una vez identificado el cuerpo, se elimina de la imagen para dejar identificable solo el flagelo. Se calcula el histograma de la imagen y con dicho histograma se encuentra un umbral de niveles de gris que se utiliza para binarizar la imagen. La imagen resultante permite obtener los píxeles pertenecientes al flagelo y el vector \vec{w}_f se define como el punto más distante al centroide del cuerpo.
- Finalmente, de la elipse se encuentra el punto que corresponde al semieje mayor. Se calcula la distancia al vector \vec{w}_f y el punto más cercano.

5

Modelo matemático de un caminante aleatorio

Se desarrolló un modelo matemático fenomenológico simple, basado en la teoría de caminante aleatorio con correlación entre pasos sucesivos. El modelo base se desarrolla en la siguiente sección. Después, se describen las condiciones de frontera y se demuestra la convergencia. Finalmente, se agregan detalles sobre los cambios necesarios para agregar las interacciones directas e hidrodinámicas en el caso de las bacterias, y las mutaciones en el caso de los parásitos.

5.1 Modelo base

A través del análisis de los experimentos en condiciones control pudimos observar las características principales del nado de bacterias *E. coli* y parásitos *T. cruzi*. Una de las principales características del nado de microorganismos en un sistema confinado como el que se utiliza en este proyecto es que podemos considerar una motilidad efectiva en 2 dimensiones, lo que permite comparar los resultados con un modelo de caminante aleatorio bidimensional.

El análisis que se hace de las trayectorias de los microorganismos se ejemplifica con una sola trayectoria (ver Fig.4.8). Entonces, hablando de una trayectoria cualquiera que se pueda identificar como nado con dos fases de desplazamiento, uno a gran velocidad y otro a muy baja velocidad. Tales fases se identifican en la trayectoria definidas aquí como corridas y tumbos. Después para cada fase cada vector de velocidad instantáneo se descompone en dirección longitudinal y transversal con respecto al vector de velocidad de un paso anterior.

5.1.1 Modelo matemático fenomenológico

El modelo desarrollado en éste estudio para representar el nado de microorganismos es un modelo fenomenológico de caminante aleatorio. En este modelo la bacteria se considera como un disco sólido sin flagelo mientras que los obstáculos son simulados como discos sólidos. En el caso de los parásitos sólo se toma en cuenta el centroide como un punto en el espacio sin flagelo ya que no se considera ninguna interacción externa. Se consideran pasos con duración de $1/30$ segundos que corresponden a la resolución temporal de la grabación de los videos. El pseudo código para generar las trayectorias simuladas por el modelo propuesto sigue los pasos:

1. Se establece el tiempo de paso $\Delta t = 1/30$ s.
2. Se inicia la simulación en tiempo $t = 0$, y de forma aleatoria se seleccionan las posiciones iniciales con sus coordenadas x y y de una distribución uniforme en los rangos de $[0, 160]$ μm y $[0, 120]$ μm , respectivamente.
3. Aleatoriamente se selecciona el modo de motilidad: considerando una probabilidad del 0.5 para cada modo.
4. Se calcula de manera aleatoria a partir de las distribuciones de probabilidad el tiempo T de duración del modo de motilidad. Se consideran los valores de los parámetros correspondientes (Ver la sección de Resultados).
5. Se calcula el número de pasos apropiados para el tiempo de duración del modo de motilidad con la parte entera de $N = T/\Delta t$.
6. Para cada paso, aleatoriamente se calculan las velocidades longitudinales y transversales a partir de las distribuciones de probabilidad experimentales (ver sección de Resultados). Después, se multiplican las velocidades por Δt para obtener el desplazamiento correspondiente.
7. Se actualiza el tiempo de simulación, $t := t + N\Delta t$.
8. Se cambia el modo de motilidad.
9. Se itera desde el paso 4.

5.2 Condiciones de frontera y convergencia

Las condiciones de frontera son distintas para las bacterias y los parásitos. En el caso de las bacterias *E. coli* se consideran condiciones periódicas para tomar en cuenta, de forma aproximada, el efecto de la matriz porosa fuera del área de visión, lo cual genera una dinámica compleja entre las bacterias que salen y entran del área de estudio. En cambio, el estudio de la dinámica de los parásitos no se realizó con condiciones periódicas debido a que la fracción de área ocupada por los obstáculos fue de $\phi \approx 0.001$, por lo que se considera que nadan en un medio totalmente homogéneo en 2D.

En el caso de la simulación para las bacterias, el número de bacterias se mantiene constante por medio de una condición que garantiza la presencia de 10 bacterias durante toda la simulación. Se toma en cuenta las posiciones de los obstáculos al momento de generar una nueva posición para garantizar que el evento no sea erróneo, es decir, que no haya traslape entre las bacterias simuladas y los obstáculos. El inicio de las trayectorias se da desde las fronteras del área de muestreo.

Para considerar convergencia en los resultados, se realizaron simulaciones a distintos números de pasos del nado independiente de 10 microorganismos, es decir, que no tienen ningún tipo de interacción. La exploración de la convergencia se realizó con el desplazamiento cuadrático medio utilizando un rango de pasos desde 10^3 hasta 10^6 , y como se puede ver en la Fig. 5.1 los resultados convergen a partir de 10^4 pasos.

5.3 Variantes del modelo

5.3.1 Interacciones entre bacterias y obstáculos

Las interacciones principales entre bacterias y obstáculos pueden ser de dos tipos, hidrodinámicas y directas. Las interacciones hidrodinámicas son interacciones mediadas por el líquido y se producen debido a las perturbaciones que generan los microorganismo al desplazarse, por tal motivo son más complejas de integrar de manera explícita en las simulaciones de un sistema confinado. En éste sentido sólo se consideran las interacciones como el resultado de una reducción en la rapidez de las bacterias que se encontró en los resultados experimentales obtenidos en éste trabajo. Por otro lado, las interacciones directas que afectan la motilidad de las bacterias ocurre principalmente debido a los choques con los obstáculos, en donde existe un contacto entre las superficies de la bacteria y el obstáculo.

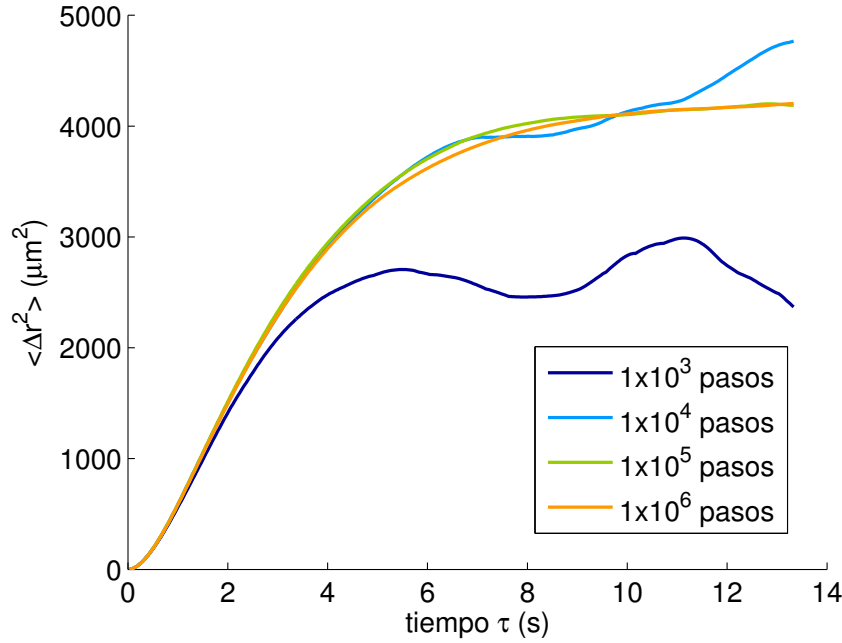


Figura 5.1: Se muestra el parámetro de desplazamiento cuadrático medio de las simulaciones a distintos números de pasos. La convergencia se alcanza con 1×10^4 .

Las interacciones hidrodinámicas se toman en cuenta en el presente trabajo de manera aproximada al cambiar la media de la componente de la velocidad longitudinal con respecto a la correlación que se encuentra en la rapidez media y la fracción de área ocupada por los obstáculos, la cual está dada por $\langle v \rangle = \langle v \rangle_{\phi_{min}} (1 - m\phi)$ que se presenta en resultados en donde m es la constante de proporcionalidad entre la rapidez media $\langle v \rangle$ y la fracción de área ocupada por los obstáculos ϕ .

Las interacciones directas se toman en cuenta en el modelo al considerar la presencia de obstáculos como discos con un diámetro efectivo igual al diámetro de las partículas utilizadas en los experimentos. La consideración se realiza al calcular continuamente la aproximación de las bacterias a los obstáculos. Cuando la bacteria simulada entra en contacto con un obstáculo, se decide entre dos posibles tipos de choques, “arco” y “tangente” (ver Fig. 5.2). En el caso de choque de tipo “arco”, la bacteria sigue una trayectoria sobre el borde del obstáculo describiendo un movimiento en forma de arco. En el caso de choque en tipo “tangente”, la bacteria sigue una trayectoria rectilínea en la dirección tangente al punto de choque. La distancia que se recorre en dichos choques antes de continuar en su nado natural corresponde solamente a la distancia que le falta recorrer en la corrida actual. Para tomar en cuenta una posible disminución en la distancia recorrida por una bacteria durante un choque, dicha distancia es reducida por un

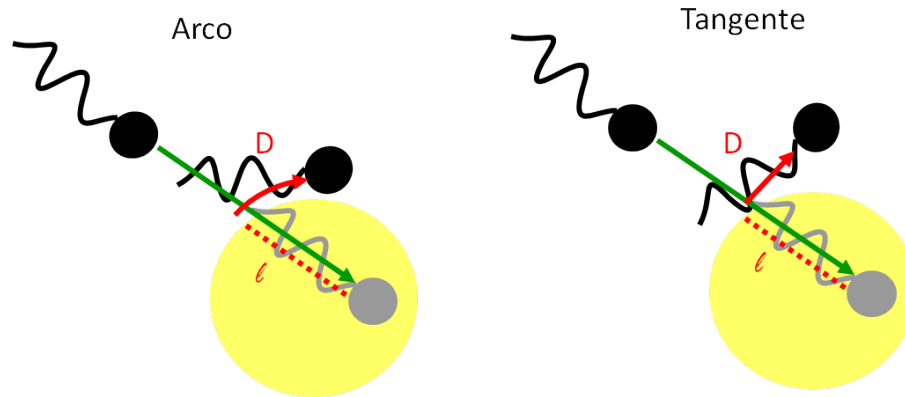


Figura 5.2: Esquema que muestra los dos tipos de choques (arco y tangente) que realizan las bacterias (discos negros) después de un choque con un obstáculo (discos amarillos). La distancia perdida l en la línea punteada roja y la distancia D recorrida por el choque en la línea sólida con su respectivo retraso.

factor α de manera aleatoria siguiendo una distribución uniforme en el intervalo $[0.8, 1.0]$ lo cual esta en concordancia con trabajos previos [45, 47, 48, 68]. La proporción entre choques es de $7/9$ y $2/9$ correspondientes a “arco” y “tangente” respectivamente. Dichas proporciones se obtuvieron por prueba y error.

Los choques se representan en la Fig.5.2 y se introducen al pseudo código después del paso 6 por medio de los siguientes pasos:

1. Si una bacteria va a realizar un paso que la lleve a traslaparse con un obstáculo, primero se le permite llegar al límite del obstáculo y posteriormente recorre la distancia faltante $D \leq l$ (en donde l es la distancia que recorrería en la ausencia del obstáculo) ya sea por el contorno del obstáculo (llamado choque de “arco”), o de manera tangencial al obstáculo (llamado choque de “tangente”).
2. En cada caso que una bacteria choca con un obstáculo, la bacteria pausa su movimiento en la superficie del obstáculo por un instante de tiempo, antes de continuar su nado. Este efecto se toma en cuenta con una reducción de la distancia recorrida por un factor α , es decir, la distancia que va recorrer la bacteria después del choque es $D = \alpha l$, donde α es un número aleatorio en el rango de $[0.8, 1.0]$.
3. La proporción obtenida de choques se obtuvo por medio de prueba y error. Las razones $7/9$ y $2/9$, ajustan adecuadamente el modelo a los resultados experimentales. Lo anterior concuerda con [69], en donde los autores aseguran que la contribución más importante en

las interacciones entre bacterias y obstáculos se deben al nado en paralelo a las superficies que es semejante a lo que ocurre en el choque de “arco”.

5.3.2 Modelo variante que incluye cepa transformada

Las mutaciones afectan directamente los parámetros para las distribuciones, pero manteniendo las mismas distribuciones. En este caso si queremos considerar una mutación en donde se altera solo los parámetros, entonces no se modifica el tipo de nadador sólo las capacidades del nado. Para considerar otro tipo de mutaciones es probable que se requiera cambiar el tipo de distribución lo cual alterará drásticamente las características del nado.

6

Motilidad de *E. coli* en un medio poroso cuasi-bi-dimensional

El presente capítulo se presentan los resultados obtenidos para el caso de la motilidad de la bacteria *E. coli*. Primero se realizó un análisis de la motilidad bajo condiciones de confinamiento cuasi-bi-dimensional a una fracción de área baja que permite garantizar que la separación de las paredes sólidas sea uniforme e igual al diámetro de las partículas separadoras ($2.98 \mu\text{m}$). Con dicho análisis se generó un modelo matemático fenomenológico que sirvió para contrastar con los resultados experimentales. Los siguientes experimentos se realizaron incrementando la cantidad de obstáculos para estudiar los efectos que tiene una matriz porosa cuasi-bi-dimensional heterogénea sobre la motilidad de la bacteria. El rango de porosidad del medio se midió a través de la fracción de área ocupada por los obstáculos y va desde 0.001 hasta 0.39.

6.1 Motilidad bajo confinamiento sin obstáculos

Cuando existe un confinamiento de dos superficies paralelas las trayectorias dejan de seguir círculos para combinar a líneas rectas cuando nadan en el punto de equilibrio (distancia media entre las superficies) y secciones circulares con distintos radios de curvatura dependiendo de la superficie a la que se acercan de acuerdo con los resultados obtenidos en el trabajo teórico de H. Shum [65]. En el presente trabajo se utilizó una fracción de área de 0.01 para obtener un sistema confinado con dos superficies sólidas paralelas con una separación de $2.98 \mu\text{m}$ en donde la cantidad de obstáculos es baja y la interacción de bacterias con obstáculos es mínima. Como se ha descrito con anterioridad, se obtuvieron trayectorias de las bacterias de los videos grabados

en 88 experimentos en donde en promedio se registraron 2690 trayectorias. En la Fig. 6.1 se muestran ejemplos representativos de las trayectorias obtenidas para un experimento a una fracción de área de obstáculos de $\phi = 0.01$. En estas trayectorias podemos ver que los resultados descritos por Shum concuerdan con nuestros resultados puesto que se obtuvieron trayectorias rectilíneas, curvas a la derecha y a la izquierda, y trayectorias más complejas. Además, se puede ver en las trayectorias de las bacterias que la interacción con los obstáculos es muy baja en éstas condiciones y los efectos en las características de las trayectorias sólo se deben a las interacciones hidrodinámicas descritas por Lauga y Shum.

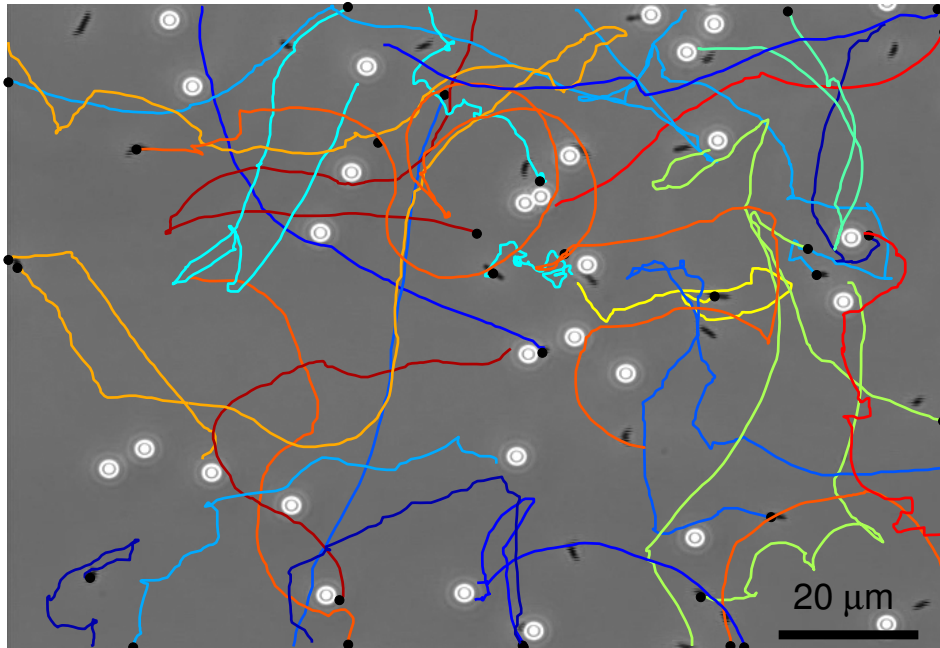


Figura 6.1: Trayectorias de bacterias (líneas continuas de colores) en un sistema quasi-bidimensional con esferas de $2.98 \mu\text{m}$ de diámetro (círculos blancos) que actúan como separadores que forman una matriz porosa que ocupa una fracción de área de 0.01. Cada inicio de trayectoria esta indicado por un círculo negro que en algunas casos se puede ver que coincide con la posición de una bacteria.

6.1.1 Corridas y tumbos, descomposición de velocidad del nado de *E. coli* y parámetros para modelar la motilidad

Con el propósito de tener un punto de referencia, se empezó analizando las trayectorias a la fracción de área baja de 0.01. Para tal fin, se calculó la rapidez instantánea que se utilizó para clasificar el nado de las bacterias en corridas y tumbos. Una trayectoria típica se puede ver en la Fig. 6.2(a), con los inicios de corridas y tumbos marcados con triángulos verdes y rojos, respectivamente. El trazo de rapidez en función del tiempo correspondiente se muestra en la Fig. 6.2(b).

Después de medir los tiempos de duración de corridas y tumbos para todas las trayectorias, se estimaron las funciones de densidad de probabilidad (PDF) y se encontró que ambas se ajustan a distribuciones exponenciales. Las PDFs experimentales y sus ajustes correspondientes se muestran en la Fig. 6.2(c). Los parámetros de mejor ajuste se presentan en la Tabla 6.1. La diferencia de un orden de magnitud entre la duración promedio de corrida y de tumbo es consistente con un trabajo reportado previamente [6]. El incremento en el tiempo de corrida obtenido en este trabajo (1.2 s) comparado con lo reportado previamente de 1 s, puede ser debido a las interacciones con las superficies sólidas. Dicha aseveración puede explorarse con más detalle en [11, 26, 32, 42, 54], en donde se observan interacciones hidrodinámicas con superficies sólidas que generan corridas más largas.

Para comprender de una mejor manera la motilidad de la bacteria, la velocidad fue descompuesta en cada paso de la trayectoria en las direcciones longitudinal y transversal con respecto a la velocidad en el paso previo (ésto se realizó de manera separada para la trayectoria en corrida y tumbo). De las componentes se calcularon las respectivas funciones de distribución de probabilidad en cada estado. En este caso, se encontró que las distribuciones se ajustan a distribuciones Gaussianas. Las distribuciones experimentales de la componente longitudinal se pueden observar en la Fig. 6.2(d), junto con los mejores ajustes. Los resultados respectivos para la componente transversal se muestran en la Fig. 6.2(e). Los valores de los parámetros que mejor ajustan las 6 distribuciones se muestran en la Tabla 6.1.

En las Figs. 6.2(d) y (e) se aprecia que ambos valores medios de las distribuciones de la componente longitudinal de la velocidad para corridas y tumbos son positivos. Además, como era de esperarse las velocidades longitudinales en corridas son mayores en comparación con las de tumbos. Esto es consistente con el hecho de que en promedio el desplazamiento neto de la bacteria sucede en la corrida y en la dirección longitudinal. También se observa que, de acuerdo con ambas distribuciones, la probabilidad de tener valores negativos en la componente

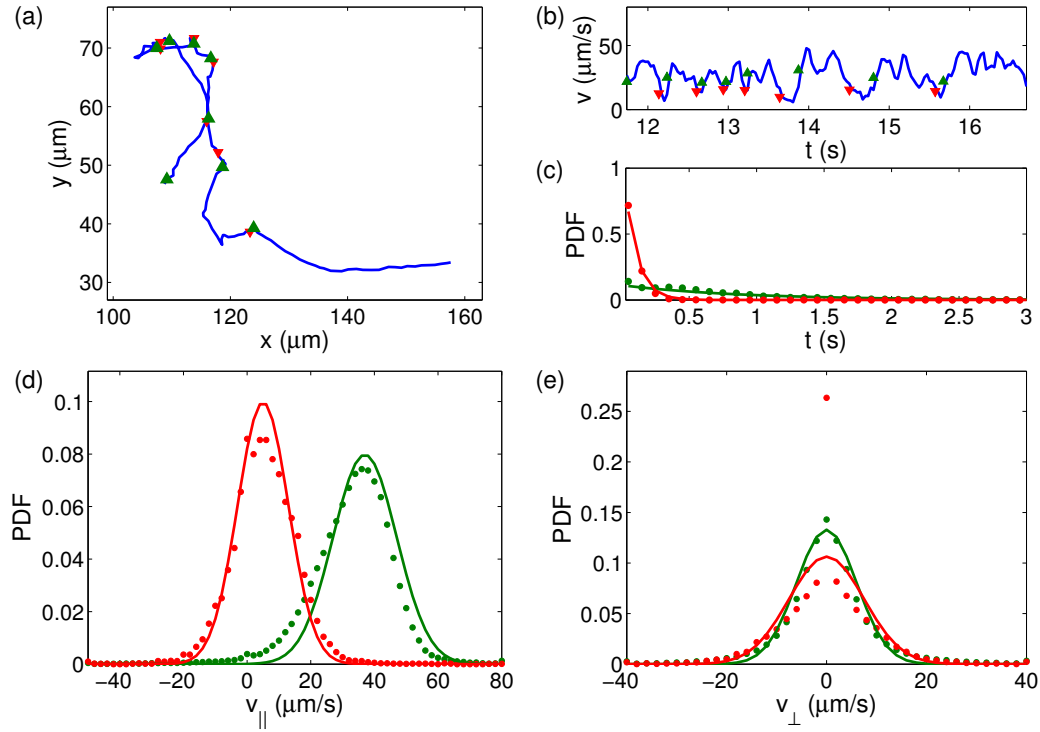


Figura 6.2: (a) Trayectoria experimental típica, donde el inicio de las corridas y tumbos se etiqueta con triángulos de color verde y rojo, respectivamente. El inicio de la trayectoria esta marcado con un triángulo verde. (b) Trazo de rapidez correspondiente de la trayectoria en (a). (c) PDFs experimentales (puntos) y líneas de mejores ajustes (líneas continuas) para corridas (verde) y tumbos (rojo). (d) PDFs experimentales para la velocidad longitudinal (puntos verdes) y tumbos (puntos rojos), y sus correspondientes ajustes Gaussianos (líneas continuas verdes y rojas). (e) Igual que en (d), pero para la componente transversal.

longitudinal no es despreciable. Dichos valores negativos hacen posible que la bacteria de vueltas de 180° o nade en reversa. Tal posibilidad permite a las bacterias salir de las trampas generadas por la configuración de los obstáculos, como se describe en [8, 12, 19, 72, 73]. Por otro lado las distribuciones de probabilidad de la componente transversal de velocidad son simétricas y tienen media cero. Aún así, la distribución correspondiente a los tumbos es más ancha que la de corrida lo que significa que el desplazamiento es mayor en la dirección transversal. La simetría de las distribuciones significa que la bacteria no tiene predilección por girar en un sentido, y que la distribución de tumbos sea más ancha porque no existe desplazamiento neto en dicho modo de motilidad.

		Tiempo de duración			
		Corrida		Tumbo	
τ		1.2 s		0.1 s	
		Componentes de velocidad			
		v_{\parallel} ($\mu m/s$)		v_{\perp} ($\mu m/s$)	
		Corrida	Tumbo	Corrida	Tumbo
μ		37.84	5.99	0	0
σ		10.68	8.53	6.09	7.59

Tabla 6.1: Valores de los parámetros de las distribuciones que mejor ajustan las funciones de distribución de probabilidad exponenciales para los tiempos de duración de corridas y tumbos, y las Gaussianas para la velocidad longitudinal y transversal en corridas y tumbos.

6.2 Motilidad de bacterias a diferentes fracciones de área de obstáculos

Como se puede apreciar en las Figuras 6.3(a) y (b), las trayectorias de las bacterias muestran cambios notables conforme la fracción de área de obstáculos se incrementa. Por ejemplo, a una fracción de área pequeña, el nado de las bacterias es más persistente que cuando se incrementa la fracción de área. Por otro lado, el acomodo de las partículas a altas fracciones de área hace posible encontrar algunas configuraciones como pasillos, cámaras y áreas inaccesibles para las bacterias, lo cual provoca que las bacterias encuentren un ambiente heterogéneo a escalas que son menores al tamaño de la propia bacteria.

Para investigar el efecto de incrementar la fracción de área de los obstáculos, se grabaron videos del nado de bacterias inmersas en medios porosos cuasi-bi-dimensionales con diferentes fracciones de áreas en el rango de $[0.01, 0.4]$. Se obtuvieron todas las trayectorias posibles de las bacterias, y se analizaron con las técnicas previamente mencionadas en la Sección de Análisis.

Primero, se calcularon los promedios de rapidez para cada experimento, y se graficaron contra la fracción de área de obstáculos (ϕ) en la Fig. 6.4. Se observa que los puntos se ajustan bien a la recta:

$$\langle v \rangle = \langle v \rangle_{\phi_{min}} (1 - m\phi), \quad (6.1)$$

en donde $\langle v \rangle_{\phi_{min}}$ es el promedio de la rapidez de las bacterias a la fracción de área más baja, y $m \approx 1.22$.

A continuación, se comparan los resultados de las trayectorias experimentales y las simuladas con el modelo descrito. En los cambios en la simulación para agregar las interacciones en el paso

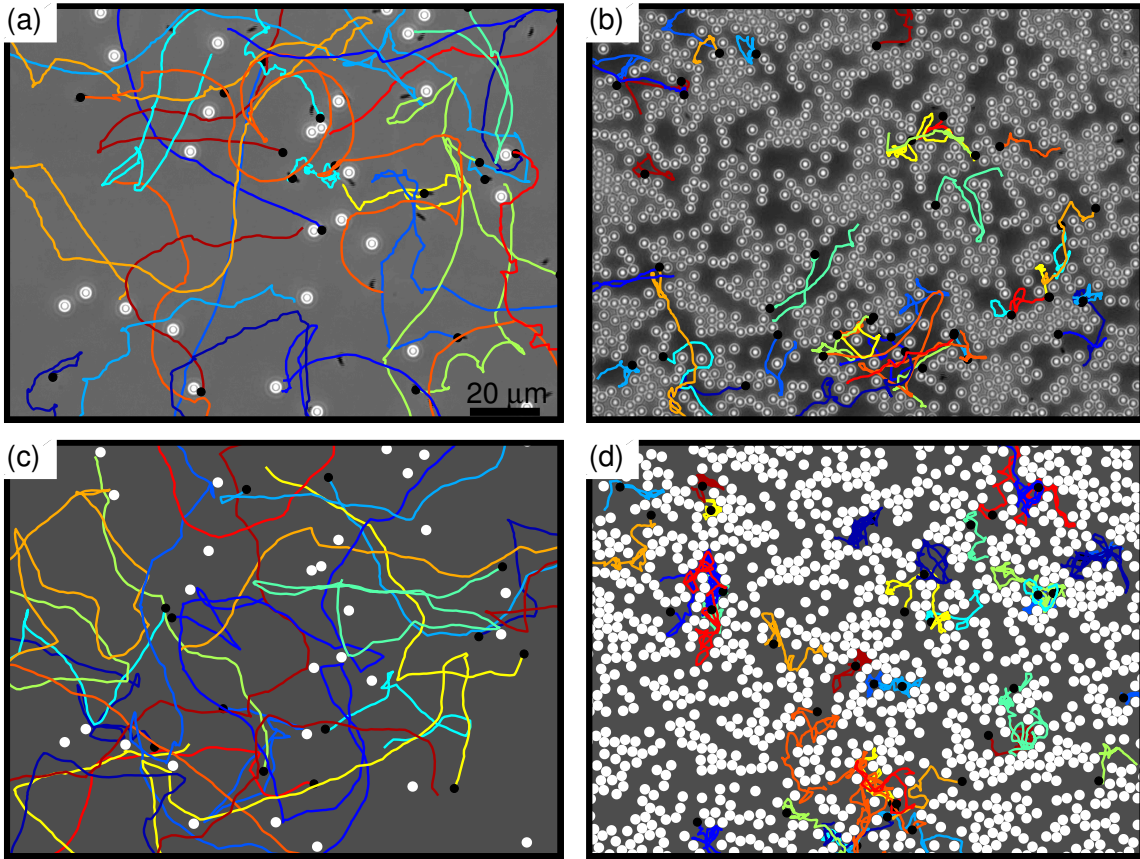


Figura 6.3: Experimentales—(a) y (b)—y simuladas—(c) y (d)—trayectorias a 0.01—(a) y (c)—y 0.39—(b) y (d)—fracción de área. En todos los casos los obstáculos están representados por los discos blancos.

6 del pseudo código de modo corrida, en vez de utilizar la media reportada en la Tabla 6.1 para la distribución Gaussiana se toma:

$$\mu = \mu_0(1 - m\phi),$$

donde $\mu_0 \approx 37.84 \mu\text{m/s}$, y m es la pendiente descrita anteriormente entre $\langle v \rangle$ vs ϕ . Para la desviación estándar se emplea el mismo valor reportado en la Tabla 6.1. Finalmente, cada simulación se realiza con 10 bacterias en un área de $120 \times 160 \mu\text{m}$, con condiciones de frontera periódicas. En las Figs. 6.3(c) y (d) se muestran algunas trayectorias representativas obtenidas para una baja y alta fracción de área ocupada por obstáculos, respectivamente.

Con el objetivo de probar que no existen flujos externos y/o quimiotaxis se miden las componentes de velocidad horizontales (v_x) y verticales (v_y) de cada paso en las trayectorias

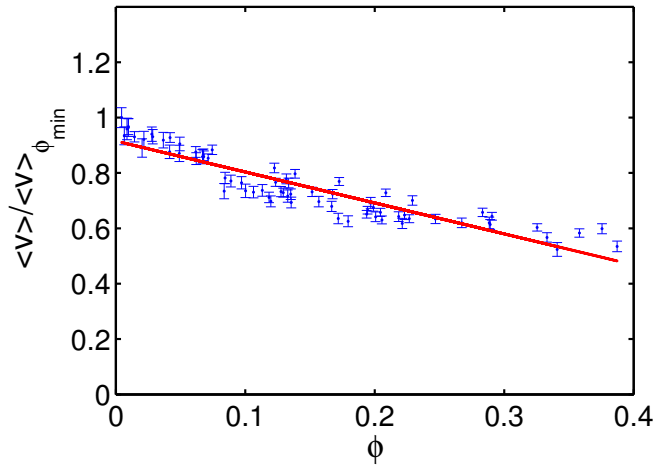


Figura 6.4: Gráfica de la rapidez promedio experimental (normalizada contra el valor de la rapidez a fracción de área $\phi = 0.001$) contra la fracción de área para cada experimento.

experimentales y simuladas, y se calculan las funciones de distribuciones de probabilidad correspondientes. Los resultados en la Fig. 6.5 muestran simetría y las distribuciones de probabilidad en ambas direcciones son muy parecidas. Basado en éstos resultados podemos decir que no existen flujos externos ni quimiotaxis en nuestro arreglo experimental. Otra observación importante es el hecho de que las distribuciones se adelgazan al incrementar la fracción de área. El último hecho concuerda con los resultados obtenidos en la relación rapidez contra fracción de área. Finalmente, se enfatiza en el hecho de que las distribuciones obtenidas de las trayectorias simuladas concuerdan con los resultados experimentales.

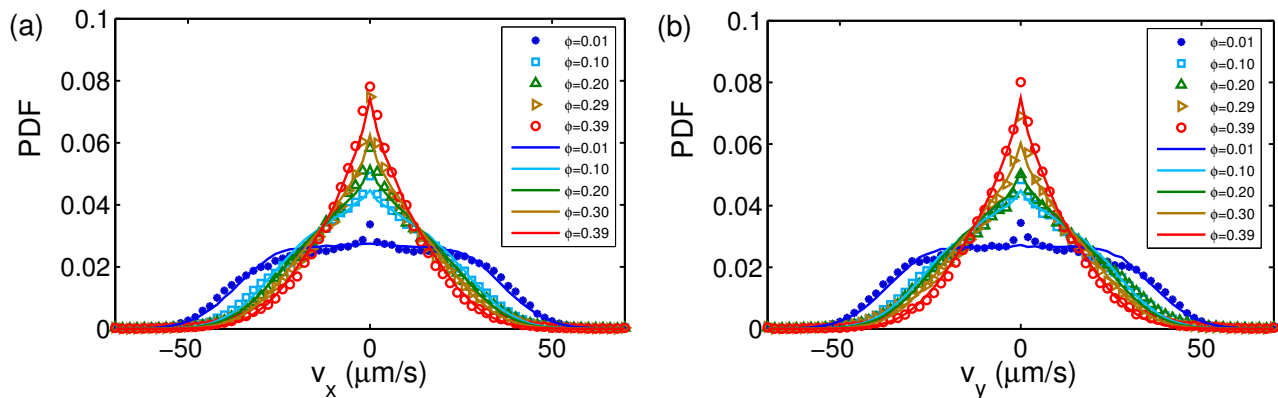


Figura 6.5: Funciones de densidad de probabilidad en la componente horizontal (v_x) y vertical (v_y) calculadas de los experimentos (símbolos) y simulaciones (líneas continuas), a diferentes fracciones de área(ϕ).

Después de confirmar que, en los experimentos, las bacterias nadan sin tendencia a una dirección en particular, se caracterizó cómo se afecta la motilidad de la bacteria por la presencia de obstáculos a distintas fracciones de área ocupada por obstáculos. Se calcularon las funciones de distribución de probabilidad de la rapidez de las trayectorias experimentales y simuladas (una por cada una de las cinco fracciones de área representativas). Los resultados se muestran en la Fig. 6.6(a). Se obtiene buena concordancia entre los resultados experimentales y simulados. También, la funciones de distribución de probabilidad de rapidez son monomodales, y que al incrementar la fracción de área hace que la moda disminuya su valor. Por otra parte, se observa que en todas las distribuciones existe una probabilidad no despreciable de que la bacteria nade a alta rapidez ($50 \mu\text{m/s}$) aún a altas fracciones de área. Creemos que tal hecho está asociado a la presencia de largos corredores en los que las bacterias nadan en forma rectilínea.

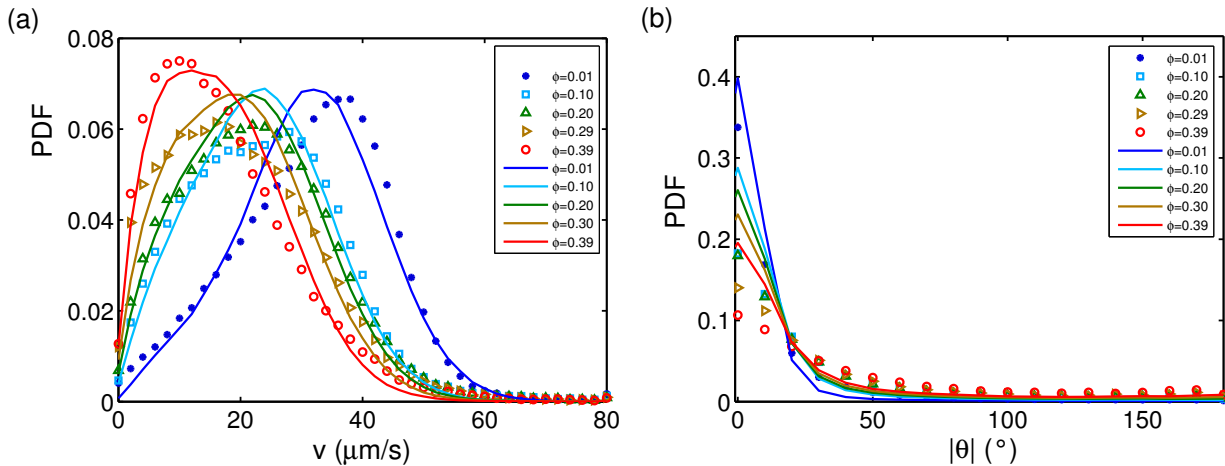


Figura 6.6: (a) Distribuciones de rapidez calculadas de trayectorias experimentales (símbolos) y simuladas (línea continua) a varias fracciones de área (ϕ). (b) Distribuciones del valor absoluto ángulo de cambio de dirección calculadas de trayectorias experimentales (símbolos) y simuladas (línea continua) a varias fracciones de área.

El valor absoluto de los ángulos de los vectores de velocidad entre pasos consecutivos es otro parámetro importante para caracterizar la complejidad de las trayectorias, como los que se obtuvieron en éste trabajo. Se midió este parámetro para las trayectorias experimentales y simuladas, se calcularon las distribuciones de probabilidad (correspondientes para todas las fracciones de área), y se presentan en la Fig. 6.6(b). Las distribuciones tienen un máximo en cero y conforme se incrementa la fracción de área el valor máximo disminuye incrementando la probabilidad de encontrar ángulos mayores. Lo que indica que el ángulo de cambio de dirección aumenta en promedio con la fracción de área. Por otro lado, cuando se

contrastan las distribuciones de los resultados experimentales y simulados, los correspondientes a los experimentos tienen una menor probabilidad de girar en ángulos pequeños que los correspondientes a los simulados. Aún así, ésta diferencias se incrementa con la fracción de área. Para explicar estos resultados con profundidad se requiere más trabajo. Sin embargo, consideramos que las diferencias se deben a las interacciones entre obstáculos y bacterias no consideradas en el modelo.

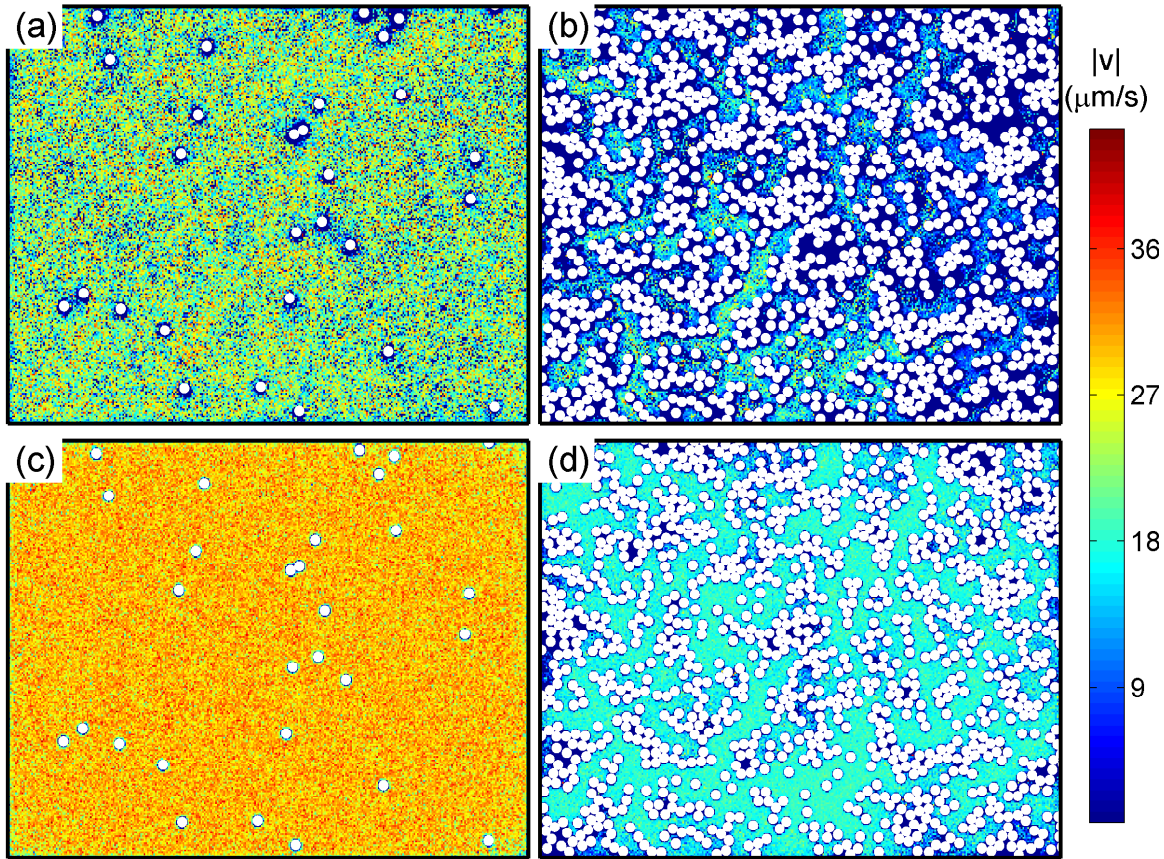


Figura 6.7: Mapa de rapidez media (promediada en el tiempo sobre todas las trayectorias en cada micra cuadrada) calculados de las trayectorias experimentales—(a) y (b)—y simuladas—(c) y (d)—a diferentes fracciones de área (mismos experimentos que en Figura. 6.3). El código de color está dado en la barra adyacente. Los obstáculos esféricos están representados por los discos blancos.

El primer intento de recuperar mayor información sobre los choques incluye un análisis de trayectorias de bacterias que interaccionan con las partículas de forma directa. Se consideraron entonces las trayectorias de las bacterias que se acercan a los obstáculos a una distancia de la superficie menor a 3 micras y se revisa la rapidez de cada trayectoria (análisis mostrado en

el Apéndice A). Después, se analiza el vector de dirección promedio de las trayectorias antes y después del choque para calcular el cambio en dirección del nado y se divide entre ángulos pequeños (menores a 50 grados) y grandes (mayores a 50 grados). Con ésta información se pueden apreciar algunos cambios en el nado de las bacterias, pero tales cambios no fueron concluyentes por lo que se propuso hacer un estudio general considerando todas las trayectorias como se explica a continuación.

Con el propósito de entender mejor los resultados expuestos con anterioridad, se midió la rapidez promedio (la rapidez de todas las trayectorias sobre todo el tiempo de experimento) en cada micra cuadrada del campo, y se grafican los resultados en la Fig. 6.7 para las trayectorias experimentales y simuladas. Se aprecia que, en las trayectorias experimentales, la rapidez promedio de las bacterias cerca de obstáculos decrece, y que dicho fenómeno es más notorio cuando la fracción de área incrementa. Por ejemplo, cuando dos o tres obstáculos se encuentran muy cercanos, la rapidez promedio es menor que cuando se encuentra un único obstáculo. Además, cuando se tiene una concentración grande de obstáculos se pueden formar corredores, cámaras y áreas inaccesibles (ver Fig. 6.7(b)) Debido a esta característica se puede observar que la rapidez en corredores y cámaras es aproximadamente $25 \mu\text{m/s}$ y $15 \mu\text{m/s}$, respectivamente. Ésto es consecuencia del incremento de la fracción de área que afecta severamente la motilidad pero no la detiene por completo, y las bacterias pueden escapar de trampas y explorar todo el espacio disponible. En cambio, para las trayectorias simuladas mostradas en las Figs. 6.7(c) y (d), la rapidez promedio es mayormente homogénea en todo el espacio libre de obstáculos, aún en la vecindad de los obstáculos. Adicionalmente, no existe diferencia en la rapidez comparando corredores y cámaras a grandes fracciones de área. En resumen, éstos resultados corroboran que, como se predijo, las interacciones de las bacterias con los obstáculos son complejas y no están totalmente incluidas en el modelo.

Finalmente, se calculó también el desplazamiento cuadrático medio (DCM), y los resultados son presentados en la Fig. 6.8. En dicha gráfica se puede apreciar que en ambos casos la pendiente del DCM se correlaciona negativamente con la fracción de área ocupada por los obstáculos. Además, a tiempos cortos, todos los DCMs denotan movimiento super-difusivo, como se espera de una bacteria autopropulsada. Como consecuencia de los choques de las bacterias con los obstáculos, el tiempo de duración del movimiento superdifusivo disminuye con el incremento en la fracción de área; esto ocurre debido a que la distancia que la bacteria puede nadar sin interactuar con los obstáculos disminuye conforme aumenta la concentración de obstáculos. Cabe resaltar, los resultados del modelo representan a los experimentales durante el movimiento super-difusivo para todas las fracciones de área. Pero solo a bajas fracciones de área los resultados de

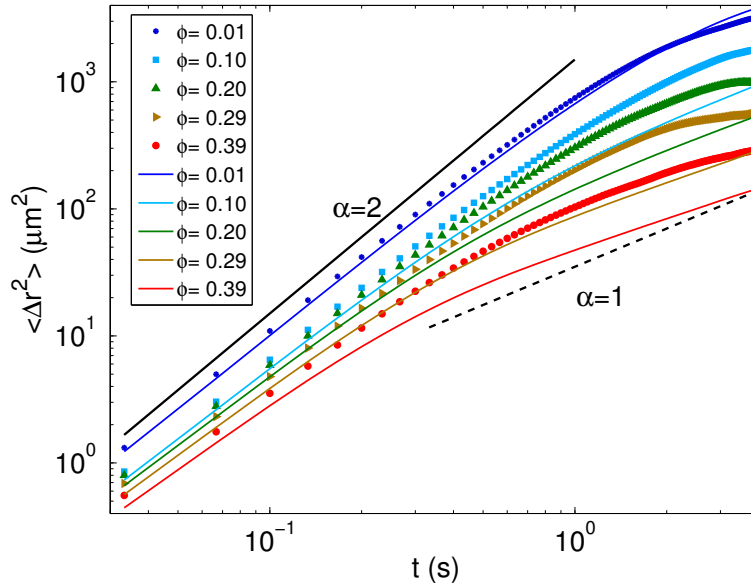


Figura 6.8: Desplazamiento cuadrático medio (DCM) calculado de las trayectorias experimentales (símbolos) y simuladas (líneas continuas) a diferentes fracciones de área ocupada por obstáculos (ϕ).

las trayectorias simuladas concuerdan a todo momento con las experimentales en el DCM. Una vez más, pensamos que faltan considerar en el modelo algunas interacciones entre bacterias y obstáculos.

7

Motilidad de *T. cruzi* en un medio cuasi-bi-dimensional

En el presente capítulo se presentan los resultados obtenidos para el caso de la motilidad del parásito *T. cruzi* en su forma epimastigote dentro de un espacio cuasi-bi-dimensional, construido de igual forma que el que se usó para las bacterias pero utilizando partículas de latex de 10 μm de diámetro. Se estudió de manera comparativa la motilidad del parásito entre una cepa silvestre y una genéticamente modificada que presenta una motilidad disminuida. También se compararon los resultados obtenidos con un modelo desarrollado en este trabajo y se corroboró el modo de nado propuesto.

7.1 Suavizado de las trayectorias de los parásitos

Se capturaron videos de parásitos de una cepa silvestre CL-Brener y genéticamente modificados de la misma cepa, los parásitos transformados sobre expresan la proteína LYT1 que provoca una disminución en la motilidad. Se obtuvieron las trayectorias por medio de análisis de imágenes para calcular la rapidez, ángulo de cambio de dirección, componentes de velocidad longitudinal y transversal con respecto a la velocidad del paso anterior y desplazamiento cuadrático medio. Una trayectoria representativa de los parásitos silvestre y transformado se muestran en las Figs. 7.1(a) y 7.2(a). En ambos casos se observa una componente de movimiento en zig-zag sobre la trayectoria. De las trayectorias originales se calculó el ángulo de cambio de dirección de la velocidad para cada paso y a partir del trazo se calcula la densidad del espectro de potencia para ambas trayectorias. En las Figs. 7.1(c) y 7.2(c), se ven las densidades de espectro

de potencia correspondientes a las trayectorias en las Figs. 7.1(a) y 7.2(a). Este análisis muestra que hay picos de amplitud con una frecuencia entre 10 y 15 Hz.

En las Figs. 7.1(b) y 7.2(b) se puede ver las mismas trayectorias que en las Figs. 7.1(a) y 7.2(a), después de ser suavizadas con un filtro móvil de cinco puntos, y en las Figs. 7.1(d) y 7.2(d) sus correspondientes densidades de espectro de potencia. Como era de esperarse, el movimiento en zig-zag desaparece, junto con sus correspondientes picos en su densidad de espectro de potencia. Se revisaron los videos en detalle al reproducir a una menor velocidad los cuadros y se observó que el movimiento en zig-zag se debe al batido del flagelo. Si dicha observación es cierta, se puede asumir que la frecuencia del batido del flagelo debe estar entre 10 y 15 Hz.

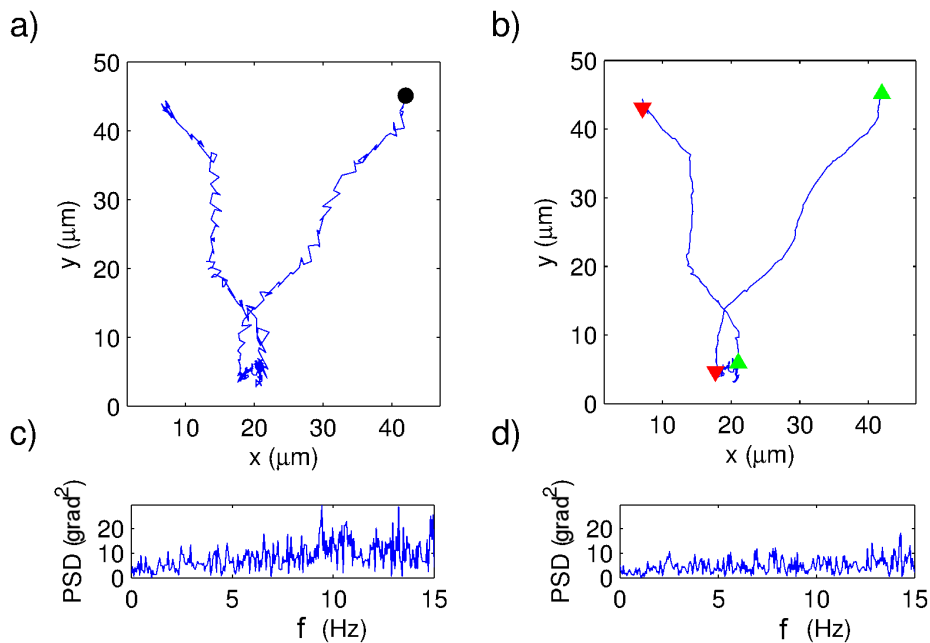


Figura 7.1: a) Trayectoria típica del parásito silvestre en su forma epimastigote (el punto inicial de la trayectoria se indica con el punto negro) y b) la misma trayectoria suavizada con un filtro de media de 5 puntos móvil. El inicio de segmentos de nado en modo persistente y modo tumbo se indican con triángulos verdes y rojos, respectivamente. En c) y d), la densidad de espectro de potencia del ángulo de cambio de dirección correspondiente a las trayectorias en a) y b), respectivamente.

Para corroborar esta premisa, se midió la frecuencia del batido del flagelo de los parásitos siguiendo el procedimiento descrito en el Capítulo de Análisis, en el cual se describió como es que se mide el ángulo ϕ entre el flagelo y el semieje mayor del cuerpo del parásito—ver

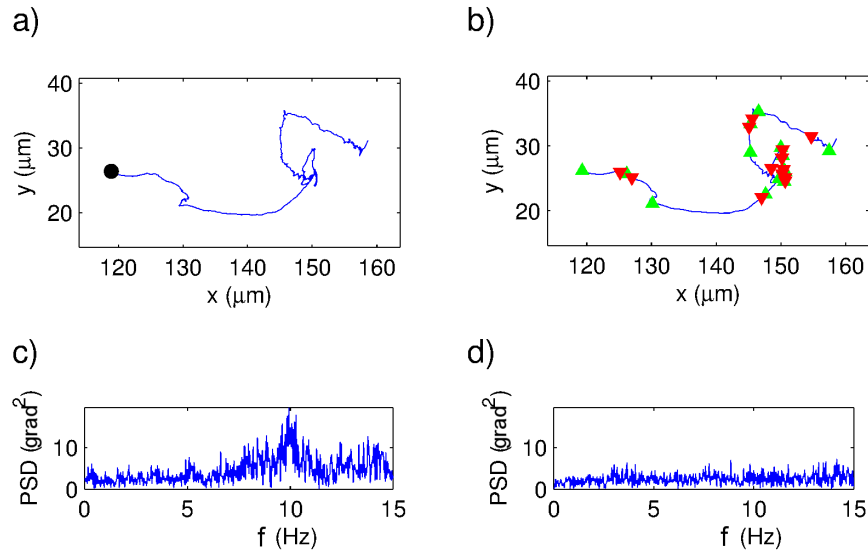


Figura 7.2: a) Trayectoria típica del parásito genéticamente modificado en su forma epimastigote (el punto inicial de la trayectoria se indica con el punto negro) y b) la misma trayectoria suavizada con un filtro de media de 5 puntos móvil. El inicio de segmentos de nado en modo persistente y modo tumbo se indican con triángulos verdes y rojos, respectivamente. En c) y d), la densidad de espectro de potencia del ángulo de cambio de dirección correspondiente a las trayectorias en a) y b), respectivamente.

Fig. 7.3(a). En la Fig. 7.3(b) se presenta un trazo típico de ϕ contra t , y en la Fig. 7.3(c) su correspondiente densidad de espectro de potencia. Como se esperaba, la densidad del espectro de potencia presenta picos en el rango de 10 a 15 Hz. Resultados similares se obtuvieron para otros 25 parásitos analizados.

Dado que se suavizaron todas las trayectorias de los parásitos en sus coordenadas X e Y por medio de un filtro móvil de media de 5 puntos. Al realizar ésto se filtraron las fluctuaciones con frecuencias mayores a 6 Hz ya que se grabaron los videos a una frecuencia de 30 cuadros por segundo. Como se puede observar en las trayectorias suavizadas se obtuvieron los desplazamientos netos de los parásitos sin tomar en cuenta el batido del flagelo.

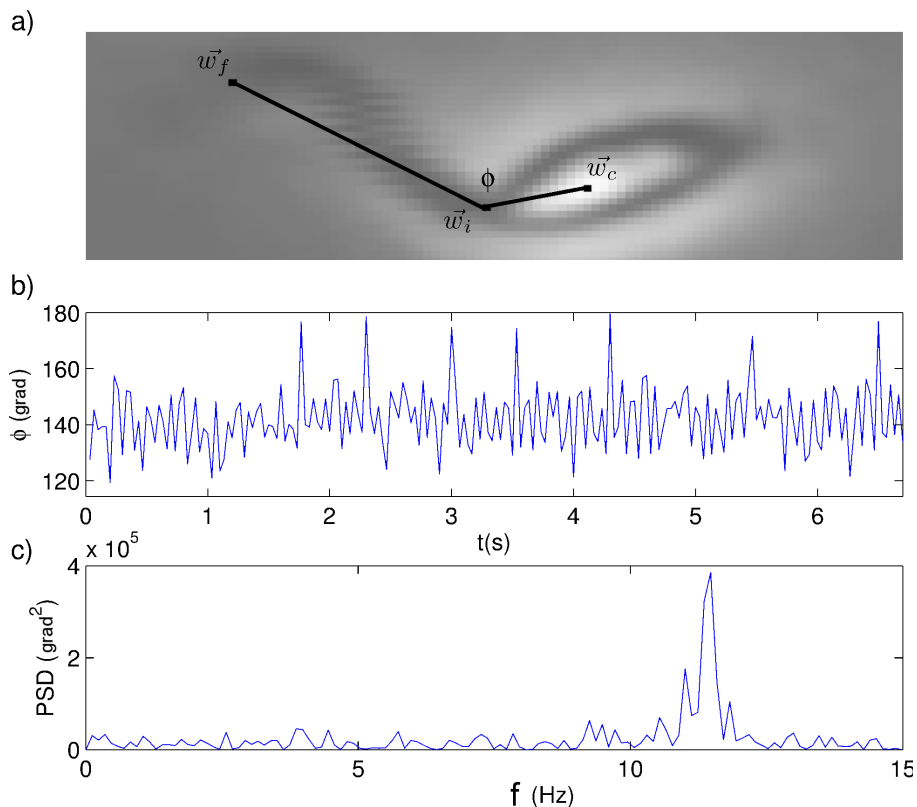


Figura 7.3: a) Imagen del parásito silvestre con los puntos que identifican el centroide (\vec{w}_c), la base del flagelo (\vec{w}_i), y su punta (\vec{w}_f), los cuales fueron utilizados para medir el batido del flagelo utilizando la variación temporal del ángulo ϕ . b) Trazo de ϕ en función del tiempo t en el batido del flagelo. c) Densidad del espectro de potencia de ϕ contra t .

7.2 Modos de movimiento persistente y de tumbo

Con todas las trayectorias de los parásitos suavizadas, se calcularon la distancia de paso (Δr_i), y la rapidez instantánea (entre cuadros sucesivos) $v_i = \Delta r_i / \Delta t - \Delta t = 1/30$ s. En la Figura 7.4(a), se muestra un trazo típico de la rapidez contra el tiempo, correspondiente al parásito silvestre, mientras que en la Fig. 7.5(a) igual un trazo típico de la rapidez contra el tiempo del parásito genéticamente modificado. Por comparación visual con las trayectorias del parásito, se aprecia que, en ambos casos existen dos rangos de rapidez correspondientes a dos modos de motilidad que, en concordancia con estudios previos sobre *T. brucei* [74, 75], se han llamado persistentes y tumbos.

Con base en las observaciones presentadas en el párrafo anterior, se programó un interruptor de Schmitt con el propósito de identificar los segmentos de movimiento persistente y de tumbos

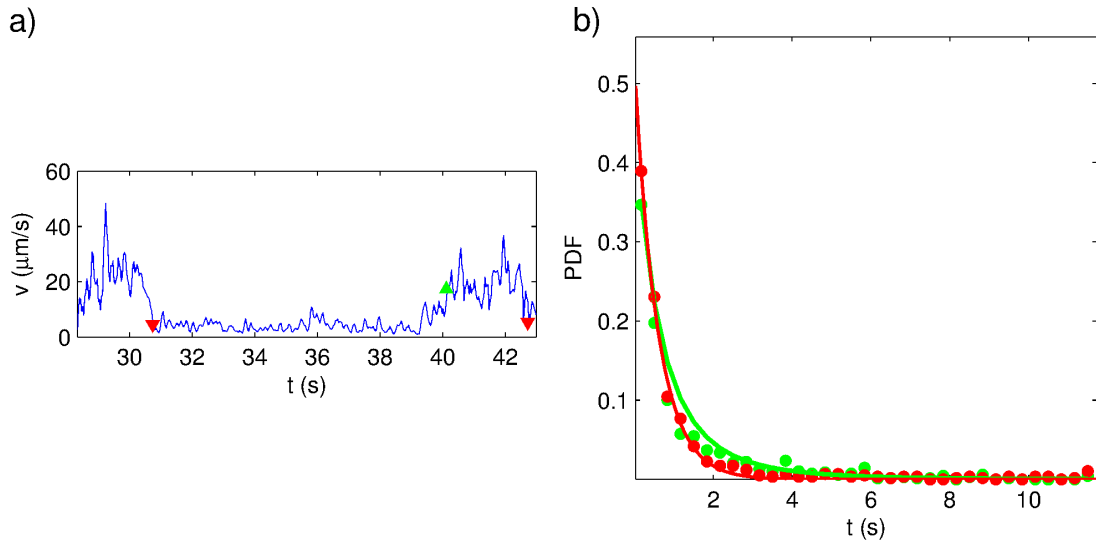


Figura 7.4: a) Trazo de la rapidez como función del tiempo de una trayectoria representativa de la cepa silvestre que ilustra los modos de movimiento persistente y de tumbo. Los triángulos rojos y verdes indican el inicio de los modos de movimiento de tumbo y persistente, respectivamente. b) Distribuciones de los tiempos de duración del nado persistente (círculos verdes) y tumbos (círculos rojos) y sus respectivos ajustes (líneas continuas). Se utilizó un ajuste exponencial para la distribución de tumbo y de cola pesada para la distribución de nado persistente.

en cada trayectoria. El interruptor funciona como se describió en el capítulo de Análisis de trayectorias. Recordando que, si en algún momento la rapidez del parásito es mayor a v_{max} se establece que se encuentra en su modo de nado persistente. Si no, se encuentra en modo de tumbo. Además, considera que el parásito nada en modo persistente y cambia a modo de tumbo cuando la rapidez es menor a v_{min} . Con dicho análisis se encontró que los valores de $v_{min} = 5 \mu\text{m/s}$ y $v_{max} = 12 \mu\text{m/s}$ funcionan bien para la cepa silvestre, mientras que $v_{min} = 4 \mu\text{m/s}$ y $v_{max} = 6 \mu\text{m/s}$ son adecuados para la cepa genéticamente modificada.

Los trazos representativos de la rapidez para ambas cepas se muestran en las Figs. 7.4(a), y 7.5(a) en donde el inicio de modo persistente se marcan con triángulos verdes y los tumbos con triángulos rojos. En las Figs. 7.4(b) y 7.5(b) se graficó las funciones de densidad de probabilidad para la duración de nado en modo persistente y tumbo de los datos medidos para la cepa silvestre y la genéticamente modificada, respectivamente. En estas figuras también se incluyen las curvas de mejor ajuste. Las funciones de densidad de probabilidad para la duración del modo tumbo se ajustaron a funciones exponenciales,

$$\rho(t) = \lambda e^{-\lambda t}. \quad (7.1)$$

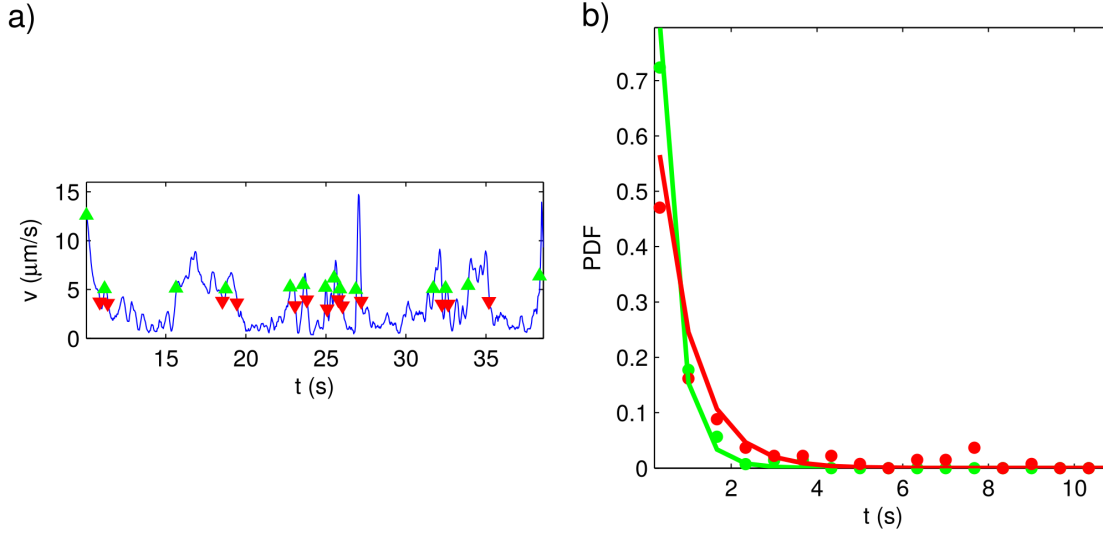


Figura 7.5: a) Trazo de la rapidez como función del tiempo de una trayectoria representativa de la cepa genéticamente modificada que ilustra los modos de movimiento persistente y de tumbo. Los triángulos rojos y verdes indican el inicio de los modos de movimiento de tumbo y persistente, respectivamente. b) Distribuciones de los tiempos de duración del nado persistente (círculos verdes) y tumbos (círculos rojos) y sus respectivos ajustes (líneas continuas). Se utilizó un ajuste exponencial para la distribución de tumbo y de cola pesada para la distribución de nado persistente.

Por otra parte, debido a que las funciones de densidad de probabilidad para la duración del nado persistente son de cola pesada, se emplearon distribuciones generalizadas de Pareto para ajustar los datos experimentales:

$$\rho(t) = \frac{1}{\sigma} \left(1 + k \frac{t - \mu}{\sigma} \right)^{-1 - \frac{1}{k}}. \quad (7.2)$$

Los valores de los parámetros de mejor ajuste para la cepa silvestre fueron:

$$\lambda = 2,0 \text{ s}^{-1}, \quad k = 0,6, \quad \sigma = 1,2 \text{ s}, \quad \mu = \frac{1}{6} \text{ s}.$$

Los valores de los parámetros de mejor ajuste para la cepa genéticamente modificada fueron:

$$\lambda = 1,7 \text{ s}^{-1}, \quad k = 0,3, \quad \sigma = 0,3 \text{ s}, \quad \mu = \frac{1}{6} \text{ s}.$$

Al contrastar las Figs. 7.4(b) y 7.5(b), podemos ver que, para las cepas silvestre y la

genéticamente modificada, las funciones de densidad de probabilidad son muy similares. Lo que significa que las modificaciones genéticas hechas a la cepa no alteran la manera en que el parásito cambia entre modos de nado persistente y de tumbo.

También es importante resaltar que las distribuciones de tiempo de tumbo son exponenciales, mientras que las de nado persistente son de cola pesada. El hecho de que la duración del modo de nado tumbo tenga una distribución exponencial significa que el cambio de modo tumbo a persistente es completamente aleatorio, y que la probabilidad de que el parásito deje el modo tumbo es la misma en cualquier momento. Por otro lado, el hecho de que la duración de modo persistente tenga una distribución de cola pesada significa que mientras más tiempo pase el parásito en modo persistente la probabilidad de que cambie a modo tumbo disminuye.

7.3 Componentes de velocidad longitudinal y transversal

Se ha reportado que el *T. cruzi* epimastigote se mueve a lo largo de su eje longitudinal, propulsado por medio de su flagelo [2]. De éste hecho, se asume que, a un paso dado, la velocidad del parásito es paralela a dicho eje, y que la orientación del eje longitudinal cambia de paso a paso. Basados en ésta suposición, decidimos descomponer la velocidad del parásito en cada paso, en componentes longitudinales y transversales con respecto a la velocidad de paso previo, con el propósito de estudiar con mayor profundidad la manera en la que el parásito se mueve.

Por medio de las Ecs. (4.8) y (4.9), se calcularon las componentes de velocidad longitudinal y transversal para todas las trayectorias obtenidas de cada cepa. Después, se agruparon todos los resultados en los intervalos de modo de nado persistente, y se repitió el procedimiento para el modo de nado tumbo. Con los resultados, se calcularon las funciones correspondientes de densidad de probabilidad para la cepa silvestre y genéticamente modificada junto con su mejor ajuste (ver Figs. 7.6 y 7.7). Se encontró que, en todos los casos, las distribuciones correspondientes para la componente longitudinal se ajustan a distribuciones de valor extremo de la forma:

$$\rho(x) = \frac{e^{\frac{a-x}{b}} - e^{-\frac{a-x}{b}}}{b}, \quad (7.3)$$

mientras que las distribuciones para la componente transversal se ajustan a la distribución T de Student con 2 grados de libertad:

$$\rho(x) = \frac{1}{\sqrt{8\pi\alpha^2}} \left(1 + \frac{(x)^2}{2\alpha^2}\right)^{-3/2}. \quad (7.4)$$

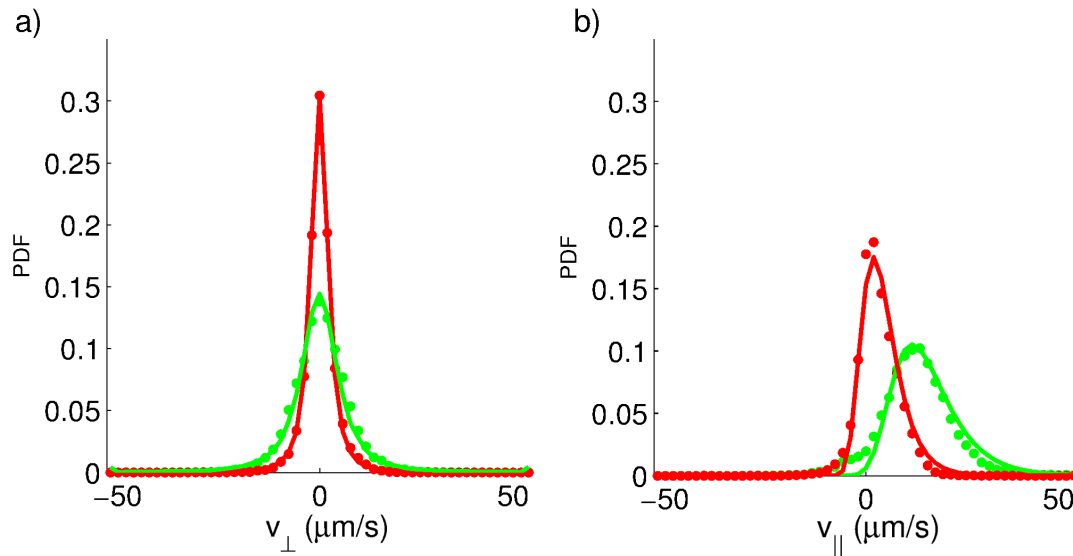


Figura 7.6: Histogramas de las componentes de velocidad longitudinales y transversales de la cepa silvestre. a) Función de densidad de probabilidad experimental (círculos verdes para el modo de corrida y círculos rojos para el modo de tumbos) y su mejor ajuste (líneas continuas) para la componente transversal, durante el modo de nado persistente (línea continua verde) y de tumbo (línea continua roja). b) Función de densidad de probabilidad experimental (círculos verdes para el modo de corrida y círculos rojos para el modo de tumbos) y su mejor ajuste (líneas continuas) para la componente longitudinal, durante el modo de nado persistente (línea continua verde) y de tumbo (línea continua roja).

Los valores de los parámetros de los ajustes para ambas cepas y para ambos modos de nado se resumen a continuación:

- Cepa silvestre, modo de nado persistente,

$$a = 11,0 \mu\text{m/s}, \quad b = 6,5 \mu\text{m/s}, \quad \alpha = 2,0 \mu\text{m/s}.$$

- Cepa silvestre, modo de nado tumbo,

$$a = 1,0 \mu\text{m/s}, \quad b = 3,0 \mu\text{m/s}, \quad \alpha = 1,5 \mu\text{m/s}.$$

- Cepa genéticamente modificada, modo de nado persistente,

$$a = 6,3 \mu\text{m/s}, \quad b = 3,0 \mu\text{m/s}, \quad \alpha = 0,57 \mu\text{m/s}.$$

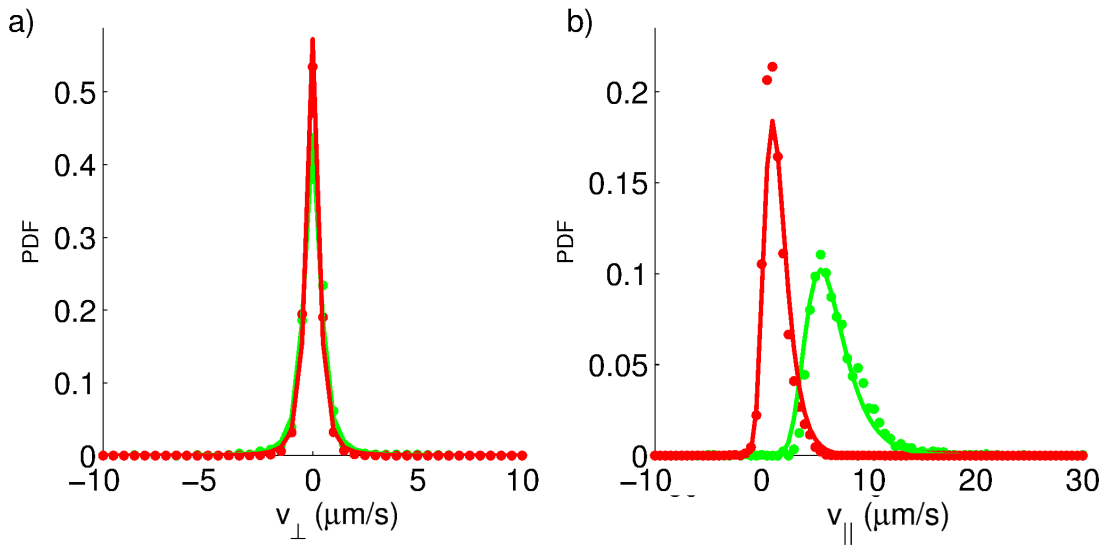


Figura 7.7: Histogramas de las componentes de velocidad longitudinales y transversales de la cepa genéticamente modificada. a) Función de densidad de probabilidad experimental (círculos verdes para el modo de corrida y círculos rojos para el modo de tumbos) y su mejor ajuste (líneas continuas) para la componente transversal, durante el modo de nado persistente (línea continua verde) y de tumbo (línea continua roja). b) Función de densidad de probabilidad experimental (círculos verdes para el modo de corrida y círculos rojos para el modo de tumbos) y su mejor ajuste (líneas continuas) para la componente longitudinal, durante el modo de nado persistente (línea continua verde) y de tumbo (línea continua roja).

- Cepa genéticamente modificada, modo de nado tumbo,

$$a = 0,95 \mu\text{m/s}, \quad b = 1,29 \mu\text{m/s}, \quad \alpha = 0,37 \mu\text{m/s}.$$

Ahora, se resaltan los hechos interesantes encontrados en las gráficas de las Figs. 7.6 y 7.7.

- Primero, todas las distribuciones correspondientes a las componentes de velocidad transversal son simétricas y centradas en cero. Por lo contrario, las distribuciones de las componentes de velocidad longitudinal son asimétricas, y la cola derecha es más pesada que la izquierda y tiene una sola moda positiva. Lo anterior está en concordancia con la suposición de que la propulsión del parásito afecta la componente de velocidad longitudinal, mientras que las componentes de velocidad transversales se explican como factores aleatorios distintos a la propulsión debida al flagelo.
- Al contrastar las distribuciones de las cepas silvestre y genéticamente modificada, se

aprecia que todas las distribuciones de la cepa genéticamente modificada son más angostas. Además, en el caso de la distribución de la componente de la velocidad longitudinal, las modas de la cepa genéticamente modificada tienen valores menores comparadas con la cepa silvestre. Tales observaciones son consistentes con el hecho de que la cepa genéticamente modificada se desplaza más lentamente que la cepa silvestre.

Las observaciones anteriores indican que las únicas diferencias entre las dos cepas con respecto a la motilidad, es que la cepa genéticamente modifica es más lenta que la silvestre. Sin embargo, la manera en que se mueven es muy similar.

7.4 Validación del modelo

Como se ha discutido previamente, los resultados indican que el parásito *T. cruzi* tiene dos modos de motilidad: persistente y tumbo. De primera impresión, el movimiento persistente es prácticamente rectilíneo. Por otro lado, el tumbo es más complejo, pero en general se puede caracterizar por tener una rapidez muy inferior al persistente. Las diferencias también se pueden observar en las funciones de densidad de probabilidad presentadas en las Figs. 7.6 y 7.7. A pesar de las diferencias, el análisis sugiere que ambos modos de movimiento pueden ser simulados al agregar pasos consecutivos, con las componentes paralelas y perpendiculares a el paso previo seleccionadas aleatoriamente de las distribuciones experimentales.

Debido a que el parásito se impulsa a lo largo de su eje longitudinal por medio del batido del flagelo, se propone que la componente de velocidad longitudinal se puede explicar por la propulsión, mientras que la componente de velocidad transversal se explica por causas distintas al batido del flagelo y su orientación. Éstas suposiciones concuerdan con las características de las distribuciones mostradas en las Figs. 7.6 y 7.7. Para corroborar que el parásito se desplaza como se propone, se desarrolló y utilizó el modelo descrito en el Capítulo Modelo de un caminante aleatorio (sección 5.1.1) para compararlo con los resultados experimentales.

Al utilizar el algoritmo descrito anteriormente, se simularon trayectorias largas de los parásitos para cada cepa. Después, se calcularon la rapidez para cada paso, el ángulo de cambio de dirección entre cada paso—por medio de la Ecs. (4.5) y (4.6). Finalmente, se estimaron las funciones de densidad de probabilidad para cada variable y se repitió el procedimiento para las trayectorias grabadas de los experimentos. Los resultados se presentan en las Figs. 7.8 y 7.9. Es importante resaltar que se consiguió concordancia entre los resultados experimentales y los simulados. En consideración de éste trabajo, todos los resultados validan las suposiciones previas en las que se basa en el modelo. Para profundizar en la validación del modelo se calculó

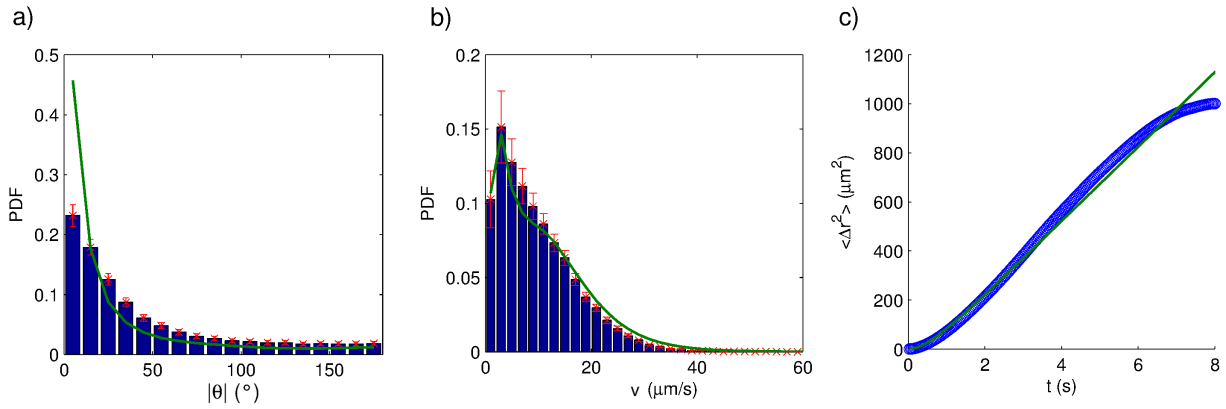


Figura 7.8: Comparación entre los resultados experimentales (barras o círculos) y los obtenidos mediante la simulación computacional (líneas continuas) para la cepa silvestre. a) Función de densidad de probabilidad para el ángulo de cambio de dirección entre pasos consecutivos. b) Función de densidad de probabilidad para la rapidez instantánea. c) Desplazamiento cuadrático medio.

el desplazamiento cuadrático medio—ver Ec. (4.3)—para las trayectorias experimentales y simuladas que se muestran en las Figs. 7.8 y 7.9. La concordancia entre las curvas experimentales y simuladas también es muy bueno en éste caso. A partir de todos estos resultados, se tiene confianza en que el modelo propuesto es capaz de proveer de una descripción adecuada de la manera en que los parásitos de ambas cepas se desplazan.

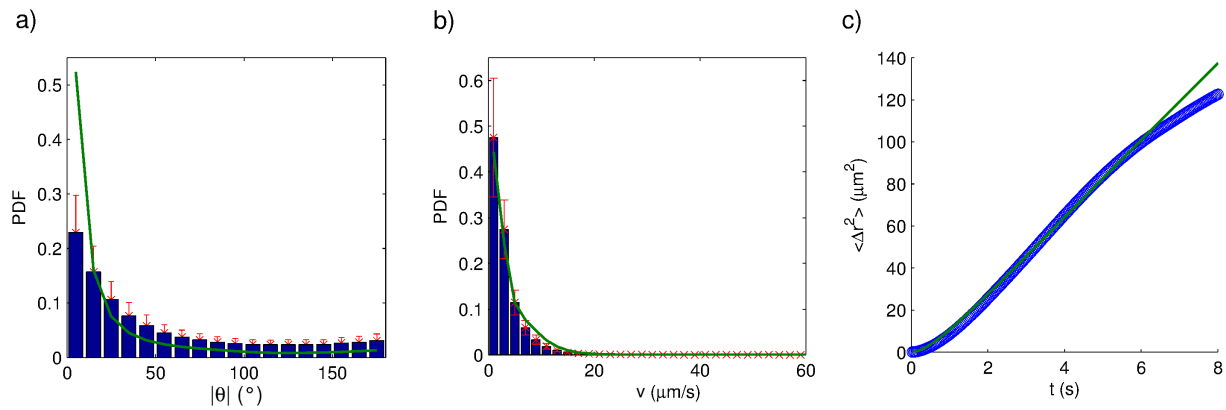


Figura 7.9: Comparación entre los resultados experimentales (barras o círculos) y los obtenidos mediante la simulación computacional (líneas continuas) para la cepa genéticamente modificada. a) Función de densidad de probabilidad para el ángulo de cambio de dirección entre pasos consecutivos. b) Función de densidad de probabilidad para la rapidez instantánea. c) Desplazamiento cuadrático medio.

8

Conclusiones y perspectivas

8.1 Conclusiones

En el presente trabajo se realizó un estudio realista de la motilidad de la bacteria *E. coli* dentro de un sistema poroso cuasi-bi-dimensional [23] y la motilidad del parásito *T. cruzi* en un sistema cuasi-bi-dimensional. Para caracterizar la motilidad de las bacterias y los parásitos se grabaron videos en donde se registra su movimiento. Dicho estudio se hizo a través de técnicas de análisis de imágenes para calcular parámetros como: rapidez, velocidad, ángulo de cambio de dirección, desplazamiento cuadrático medio, etc. Para el caso de las bacterias, los experimentos se realizaron cubriendo un rango de fracciones de área ocupada por obstáculos entre 1 y 39 %. En el caso de los parásitos se realizaron experimentos con una cepa silvestre y una genéticamente modificada. En ambos casos también se construyó un modelo matemático fenomenológico para realizar un estudio comparativo con los resultados experimentales.

Las preguntas planteadas en este trabajo se enfocan en la motilidad de microorganismos en medios confinados. En especial, los efectos en la motilidad de las bacterias *E. coli* en un medio poroso cuasi-bi-dimensional al variar la fracción de área ocupada por obstáculos. Además de, la caracterización de la motilidad del parásito *T. cruzi* en confinamiento de una cepa silvestre con motilidad normal y una genéticamente modificada con la motilidad disminuida. Por último, proporcionar una descripción de la motilidad a través de un modelo matemático en el que se incluyen los cambios tanto de porosidad del medio y la modificación genética con un caminante aleatorio correlacionado.

Dado que las distribuciones de rapidez obtenidas de los resultados simulados por el modelo para todas las fracciones de área ocupadas por obstáculos concuerdan con los resultados

experimentales, mientras que los resultados simulados para las distribuciones de ángulo de cambio de dirección y el desplazamiento cuadrático medio concuerdan de forma cualitativa, se concluye que el modelo puede reproducir de manera semi-cuantitativa la motilidad de las bacterias en un modelo poroso cuasi-bi-dimensional.

Con respecto a las diferencias observadas entre las curvas del desplazamiento cuadrático medio y las distribuciones de ángulo de cambio de dirección, el análisis presentado sugiere que las interacciones deben ser de naturaleza hidrodinámica, o debidas a el contacto físico entre los flagelos de las bacterias con los obstáculos [23, 50, 72, 73]. Demostrar dichas suposiciones requieren de trabajo futuro experimental y de modelado matemático.

Para los resultados del análisis de la motilidad del parásito *T. cruzi* en su forma epimastigote se adaptó una metodología previa para otros estudios [9, 10, 74? ? ?]. Un análisis visual del trazo de la rapidez contra el tiempo denota la existencia de dos modos de nado muy similar a los resultados de estudios previos en el parásito *T. brucei* [74, 75], llamados nado persistente y en tumbos. Después de calcular los tiempos de residencia en cada uno de los modos, se estimaron las funciones de densidad de probabilidad de permanencia en nado persistente y de tumbo. En el caso del nado en tumbo dicha función se ajusta a una distribución exponencial, mientras que para el nado persistente se ajusta a una distribución de cola pesada. Ésto significa que la propensión (o probabilidad por unidad de tiempo) de que el parásito cambie de nado tumbo a persistente es constante, sin embargo la propensión de que cambie de nado persistente a tumbo es una función decreciente en el tiempo. En otras palabras, los parásitos tienen algún tipo de memoria cuando su nado es persistente, mientras más tiempo permanezcan en ese tipo de nado es menos probable que cambien a tumbo.

De manera interesante, cambiar entre los modos de nado ha sido observado en otros organismos de tamaños distintos por varios ordenes de magnitud. En el caso de la bacteria estudiada también en el presente trabajo cambia de orientación cuando uno o más de sus flagelos cambia la dirección del giro para obtener una nado de corridas y tumbos [9, 10]. Generalmente éste tipo de nado está relacionado a fenómenos de quimiotaxis o algún otro tipo de taxis. Además, sin que esto se haya probado de forma experimental, los presentes resultados sugieren que el parásito *T. cruzi* en su forma epimastigote presenta taxis. Dado que la forma epimastigote del parásito se encuentra presente en el estomago del insecto triatomino vector, en donde deben anclarse a la pared celular o epitelio para reproducirse, deben ser sensibles a quimioatrayentes secretados por células epiteliales.

Durante el nado persistente el parásito se mueve prácticamente en una línea recta. Contrario a lo que sucede en el tumbo que presenta un movimiento más complejo y difícil de describir. La

característica más notable es que la rapidez durante el tumbo es mucho menor que en el nado persistente. A pesar de dichas dificultades, fue posible descomponer los desplazamientos entre pasos en velocidades longitudinales y transversales con respecto al paso anterior. El análisis de descomponer los desplazamientos permitió describir la motilidad del parásito. Se desarrolló el modelo presentado con anterioridad para simular las trayectorias de los parásitos que reproducen fielmente características experimentales tales como: las funciones de densidad de probabilidad para la rapidez y cambio de ángulo entre pasos consecutivos, así como el desplazamiento cuadrático medio.

El modelo propuesto es alimentado con las funciones de densidad de probabilidad de velocidad en las componentes longitudinal y transversal, obtenidas de los resultados experimentales para ambos modos de nado (persistente y tumbo). La manera en que se simulan las trayectorias en éste modelo es más detallado que el presentado por el proceso de saltos en velocidad introducido originalmente en [58]. A pesar de la capacidad para reproducir las trayectorias de los parásitos, el modelo es fenomenológico y por ende no puede explicar el origen de características interesante de la motilidad del *T. cruzi* epimastigote. Por ejemplo, el hecho de que las distribuciones de probabilidad para la componente de velocidad longitudinal sea asimétrica y que la moda sea positiva puede explicarse por la propulsión del flagelo. Mientras que no es claro porque las distribuciones de probabilidad para la componente de velocidad transversal son de cola pesada.

Finalmente, al comparar el análisis desarrollado en las dos cepas del parásito, una silvestre y otra genéticamente modificada que sobre expresa ambas isoformas de la proteína LYT1. Se encontró que ambas cepas esencialmente se mueven igual, excepto que la cepa transformada es más lenta. Hecho que concuerda con la posibilidad de un efecto provocado por la sobre expresión de la proteína LYT1 sobre la motilidad del parásito *T. cruzi*. Aún así, es necesario desarrollar el trabajo para demostrar dicha afirmación.

En resumen, en éste trabajo se estudiaron dos modelos biológicos que se encuentran en ambientes muy distintos, las bacterias tienen un papel simbiótico con los mamíferos mientras que el parásito es patógeno. Además, la bacteria *E. coli* se ha utilizado ampliamente en la industria. Por otra parte, una diferencia importante es la ubicación del mecanismo de impulso, mientras que para la bacteria se tiene un manojito de flagelos en la parte posterior del cuerpo, para el parásito sólo tiene un flagelo en la parte anterior del cuerpo. En ambos casos de estudio, bacterias y parásitos las causas que alteran la motilidad son distintas. Es decir, para la bacteria se cambian las condiciones del medio poroso como una alteración externa y para el parásito la modificación genética representa una alteración interna de la motilidad. A pesar de las

diferencias encontradas en el presente trabajo sobre la motilidad en *E. coli* y *T. cruzi*, se aplicó el mismo principio de modelo de caminante aleatorio con correlación de manera exitosa tomando en cuenta las consideraciones pertinentes en cada caso. Lo que nos deja con un modelo matemático fenomenológico con un gran potencial para realizar más estudios *In silico*.

8.2 Perspectivas

En concreto, como perspectivas se propone profundizar el análisis de la motilidad bajo confinamiento considerando los siguientes estudios:

- Experimentos capaces de identificar las interacciones hidrodinámicas por medio de técnicas de partículas trazadoras para medir flujos [28] y teñir flagelos para analizar su interacción con los obstáculos [72].
- Analizar las interacciones entre parásitos a diferentes concentraciones y en un medio poroso bi-dimensional.
- Incluir en el modelo parámetros responsables de quimiotaxis y flujos externos para ambos modelos biológicos.
- Analizar la motilidad del *T. cruzi* en su forma tripomastigote.

A

Apéndice A

Análisis de trayectorias 10 puntos antes y 10 puntos después de un choque entre bacterias y obstáculos. Se calcula la rapidez de los 20 puntos y se grafican contra el tiempo $t - t_0$ en donde se muestra el impacto de una bacteria contra un obstáculo. Se puede apreciar que la rapidez tiene cambios antes y después de impactar el obstáculo como se muestra en las Fig. A.1 y A.2.

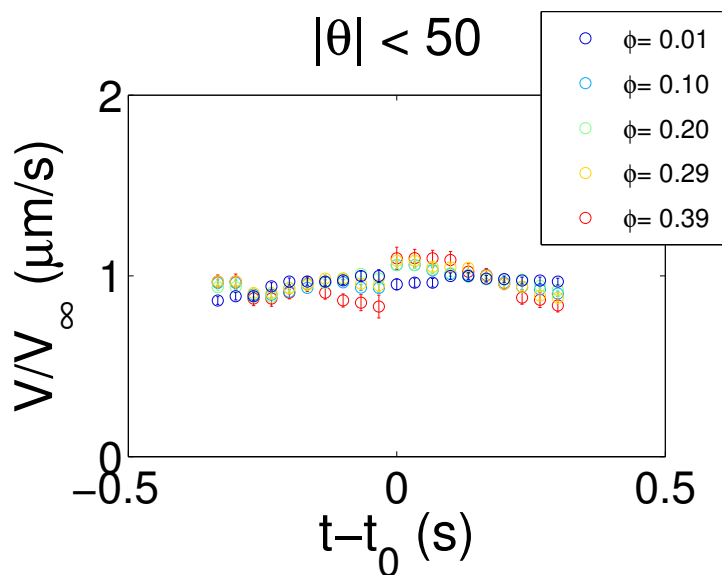


Figura A.1: Rapidez normalizada con la rapidez en el infinito (considerada como la rapidez media del intervalo 10 pasos anteriores y 10 posteriores a la interacción) contra el tiempo $t - t_0$ en donde t_0 es el tiempo en el choque en donde el cambio de dirección promedio $|\theta|$ entre antes y después del choque es menor a 50 grados.

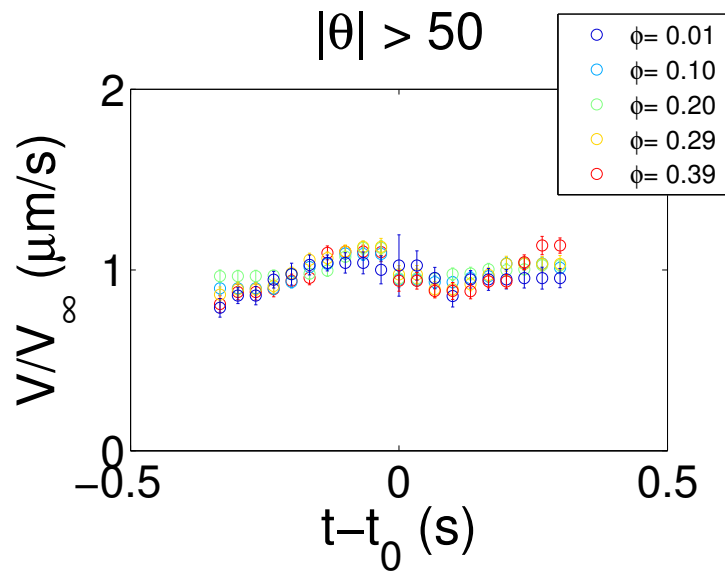


Figura A.2: Rapidez normalizada con la rapidez en el infinito (considerada como la rapidez media del intervalo 10 pasos anteriores y 10 posteriores a la interacción) contra el tiempo $t - t_0$ en donde t_0 es el tiempo en el choque en donde el cambio de dirección promedio $|\theta|$ entre antes y después del choque es mayor a 50 grados.

A partir de éstas observaciones se hizo un análisis que incluye el promedio de la rapidez de todas las trayectorias por medio de un mapa de rapidez junto con un mapa de ángulo de cambio de dirección.

Bibliografía

- [1] G. Ballesteros-Rodea, M. Santillán, Cruz-Aguilar M., C. Márquez-Dueñas, C. I. Lugo-Caballero, S. Martínez-Calvillo, J. Swindle, and R. Manning-Cela. Los productos alternativos de *LYT1* de *Trypanosoma cruzi* tienen un patrón de localización diferencial. *Veterinaria México*, 43:29–43, 2012.
- [2] G. Ballesteros-Rodea, M. Santillán, S. Martínez-Calvillo, and R. Manning-Cela. Flagellar motility of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *J Biomed Biotechnol*, 2012:520380, 2012.
- [3] J W Barton and R M Ford. Determination of effective transport coefficients for bacterial migration in sand columns. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(9):3329–35, sep 1995.
- [4] 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*, 87:052702, 2013.
- [5] H C Berg. Motile behavior of bacteria. *Physics Today*, 53(1):24–29, 2000.
- [6] H. C. Berg. *E. coli in Motion*. Biological and Medical Physics, Biomedical Engineering. Springer New York, New York, NY, 2004.
- [7] H. C. Berg and D. A. Brown. Chemotaxis in *Escherichia coli* analysed by Three-dimensional Tracking. *Nature*, 239(5374):500–504, oct 1972.
- [8] H. C. Berg and L. Turner. Cells of *Escherichia coli* swim either end forward. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(2):477–479, jan 1995.
- [9] H.C. Berg. *Random walks in Biology*. Princeton University Press, Princeton, 1993.
- [10] Howard C. Berg. *E. coli in motion*. Springer, New York, 2003.
- [11] Allison P Berke, Linda Turner, Howard C Berg, and Eric Lauga. Hydrodynamic Attraction of Swimming Microorganisms by Surfaces. *Phys. Rev. Lett.*, 101(3):038102, jul 2008.
- [12] S. Bianchi, F. Saglimbeni, A. Lepore, and R. Di Leonardo. Polar features in the flagellar propulsion of *E. coli* bacteria. *Phys. Rev. E*, 91(6):062705, 2015.

- [13] Marie Binz, Abraham P. Lee, Clive Edwards, and Dan V. Nicolau. Motility of bacteria in microfluidic structures. *Microelectron. Eng.*, 87(5-8):810–813, 2010.
- [14] Sherri a Biondi, John a Quinn, and Howard Goldfine. Random motility of swimming bacteria in restricted geometries. *AIChE Journal*, 44(8):1923–1929, 1998.
- [15] J. R. Blake and A. T. Chwang. Fundamental singularities of viscous flow. *J. Eng. Math.*, 8(1):23–29, jan 1974.
- [16] JR R Blake. A note on the image system for a Stokeslet in a no-slip boundary. *Math. Proc. Cambridge Philos. Soc.*, 70(02):303, 1971.
- [17] DPD CDC. American trypanosomiasis, 2013.
- [18] S Chen and David B Wilson. Construction and characterization of Escherichia coli genetically engineered for bioremediation of Hg(2+)-contaminated environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(6):2442–5, jun 1997.
- [19] Luis Cisneros, Christopher Dombrowski, Raymond E. Goldstein, and John O. Kessler. Reversal of bacterial locomotion at an obstacle. *Phys. Rev. E*, 73:030901, 2006.
- [20] Marilia Coutinho, Olival Freire, and J C Dias. The noble enigma: Chagas’ nominations for the Nobel prize. *Memórias do Inst. Oswaldo Cruz*, 94 Suppl 1(SUPPL. 1):123–9, 1999.
- [21] J Crocker, J Crocker, and D Grier. Methods of Digital Video Microscopy for Colloidal Studies. *Journal of Colloid and Interface Science*, 179(1):298–310, apr 1996.
- [22] Nicholas C Darnton, Linda Turner, Svetlana Rojevsky, and Howard C Berg. On torque and tumbling in swimming Escherichia coli. *Journal of Bacteriology*, 189(5):1756–1764, mar 2007.
- [23] Y Davit, H Byrne, J Osborne, J. Pitt-Francis, D Gavaghan, and M Quintard. Hydrodynamic dispersion within porous biofilms. *Phys. Rev. E*, 87(1):012718, jan 2013.
- [24] W. de Souza and M. Attias. Subpellicular microtubules in apicomplexa and trypanosomatids. In W. de Souza, editor, *Structures and Organelles in Pathogenic Protists*, volume 17 of *Microbiology Monographs*, pages 27–62. Springer Berlin Heidelberg, 2010.
- [25] W R DiLuzio, L Turner, M Mayer, P Garstecki, D B Weibel, H C Berg, and G M Whitesides. Escherichia coli swim on the right-hand side. *Nature*, 435(7046):1271–1274, jun 2005.

-
- [26] K. Drescher, J. Dunkel, L. H. Cisneros, S. Ganguly, and R. E. Goldstein. Fluid dynamics and noise in bacterial cell-cell and cell-surface scattering. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 108(27):10940–10945, 2011.
- [27] K. Drescher, R. E. Goldstein, N. Michel, M. Polin, and I. Tuval. Direct measurement of the flow field around swimming microorganisms. *Phys. Rev. Lett.*, 168101(October):105, 2010.
- [28] Knut Drescher, Jörn Dunkel, Luis H. Cisneros, Sujoy Ganguly, and Raymond E. Goldstein. Fluid dynamics and noise in bacterial cell-cell and cell-surface scattering. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 108(27):10940–10945, jul 2011.
- [29] E. J. Finkelsztein, J. C. Diaz-Soto, J. C. Vargas-Zambrano, E. Suesca, F. Guzmán, M. C. López, M. C. Thomas, M. Forero-Shelton, A. Cuellar, C. J. Puerta, and J. M. González. Altering the motility of *Trypanosoma cruzi* with rabbit polyclonal anti-peptide antibodies reduces infection to susceptible mammalian cells. *Experimental Parasitology*, 150:36–43, 2015.
- [30] Roseanne M Ford and Ronald W Harvey. Role of chemotaxis in the transport of bacteria through saturated porous media. *Advances in Water Resources*, 30(6-7):1608–1617, jun 2007.
- [31] Herbert C Friedmann. *Escherich and Escherichia*, volume 60. Academic Press, 2006.
- [32] Davide Giacché, Takuji Ishikawa, and Takami Yamaguchi. Hydrodynamic entrapment of bacteria swimming near a solid surface. *Phys. Rev. E*, 82:056309, 2010.
- [33] S. Goldstein. ON DIFFUSION BY DISCONTINUOUS MOVEMENTS, AND ON THE TELEGRAPH EQUATION. *Q. J. Mech. Appl. Math.*, 4(2):129–156, 1951.
- [34] Juan P. Hernandez-Ortiz, Christopher G. Stoltz, and Michael D. Graham. Transport and Collective Dynamics in Suspensions of Confined Swimming Particles. *Phys. Rev. Lett.*, 95(20):204501, 2005.
- [35] J P Holman. *Heat transfer; 10th ed.* McGraw-Hill, Boston, MA, 2010. International edition.
- [36] Jinglei Hu, Mingcheng Yang, Gerhard Gompper, and Roland G Winkler. Soft Matter Modelling the mechanics and hydrodynamics of swimming E. coli. *Soft Matter*, 11(40):7843–8020, 2015.

- [37] Celia Jimenez-Sanchez, Lukas Y. Wick, and José-Julio Ortega-Calvo. Chemical Effectors Cause Different Motile Behavior and Deposition of Bacteria in Porous Media. *Environ. Sci. Technol.*, 46(12):6790–6797, jun 2012.
- [38] C. A. Johnson, G. Rachakonda, Y. Y. Kleshchenko, P. N. Nde, M. N. Madison, S. Pratap, Cardenas T. C., C. Taylor, Lima M. F., and F. Villalta. Cellular response to *Trypanosoma cruzi* infection induces secretion of defensin α -1, which damages the flagellum, neutralizes trypanosome motility, and inhibits infection. *Infection and Immunity*, 81(11):4139–4148, 2013.
- [39] L. Kohl, D. Robinson, and P. Bastin. Novel roles for the flagellum in cell morphogenesis and cytokinesis of trypanosomes. *EMBO J*, 22(20):5336–5346, 2003.
- [40] Kevin Kusy and Roseanne M. Ford. Surface Association of Motile Bacteria at Granular Porous Media Interfaces. *Environ. Sci. Technol.*, 43(10):3712–3719, may 2009.
- [41] Gerasimos Langousis and Kent L Hill. Motility and more: the flagellum of *Trypanosoma brucei*. *Nature reviews. Microbiology*, 12(7):505—518, 2014.
- [42] Eric Lauga, Willow R. DiLuzio, George M. Whitesides, and Howard A. Stone. Swimming in Circles: Motion of Bacteria near Solid Boundaries. *Biophys. J.*, 90(2):400–412, 2006.
- [43] Eric Lauga and Thomas R Powers. The hydrodynamics of swimming microorganisms. *Reports Prog. Phys.*, 72(9):096601, 2009.
- [44] A. M. Leshansky. Enhanced low-Reynolds-number propulsion in heterogeneous viscous environments. *Phys. Rev. E*, 80(5):051911, 2009.
- [45] Guanglai Li, Lick-Kong Tam, and Jay X Tang. Amplified effect of Brownian motion in bacterial near-surface swimming. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 105(47):18355–18359, 2008.
- [46] Qian Liao, Ganesh Subramanian, Matthew P. DeLisa, Donald L. Koch, and Mingming Wu. Pair velocity correlations among swimming *Escherichia coli* bacteria are determined by force-quadrupole hydrodynamic interactions. *Phys. Fluids*, 19(6), 2007.
- [47] Jun Liu and Roseanne M Ford. Idling time of swimming bacteria near particulate surfaces contributes to apparent adsorption coefficients at the macroscopic scale under static conditions. *Environ. Sci. Technol.*, 43(23):8874–80, 2009.

- [48] Jun Liu, Roseanne M. Ford, and James A. Smith. Idling time of motile bacteria contributes to retardation and dispersion in sand porous medium. *Environ. Sci. Technol.*, 45:3945–3951, 2011.
- [49] C. Lugo-Caballero, G. Ballesteros-Rodea, S. Martínez-Calvillo, and R. Manning-Cela. Identification of protein complex associated with *lyt1* of trypanosoma cruzi. *BioMed Research International*, 2013:1–11, 2013.
- [50] Enkeleida Lushi, Hugo Wioland, and Raymond E Goldstein. Fluid flows created by swimming bacteria drive self-organization in confined suspensions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 111(27):9733–9738, 2014.
- [51] Jaan Maennik, Rosalie Driessen, Peter Galajda, Juan E Keymer, and Cees Dekker. Bacterial growth and motility in sub-micron constrictions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(35):14861–14866, sep 2009.
- [52] J.-B. Masson, G. Voisinne, J. Wong-Ng, A. Celani, and M. Vergassola. Noninvasive inference of the molecular chemotactic response using bacterial trajectories. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 109(5):1802–1807, jan 2012.
- [53] M Mejare and L Bülow. Metal-binding proteins and peptides in bioremediation and phyoremediation of heavy metals. *Trends Biotechnol.*, 19(2):67–73, 2001.
- [54] Mehdi Molaei, Michael Barry, Roman Stocker, and Jian Sheng. Failed Escape: Solid Surfaces Prevent Tumbling of *Escherichia coli*. *Phys. Rev. Lett.*, 113(6):068103, 2014.
- [55] John J. Molina, Yasuya Nakayama, and Ryoichi Yamamoto. Hydrodynamic interactions of self-propelled swimmers. *Soft Matter*, 9:4923–4936, 2013.
- [56] Ali Najafi, Seyede Somaye Hoseini Raad, and Roghaye Yousefi. Self-propulsion in a low-Reynolds-number fluid confined by two walls of a microchannel. *Phys. Rev. E*, 88(4):045001, 2013.
- [57] Christopher J O’Lenick, Paul R Bienkowski, Paul D Frymier, and Richard N Weinstein. Effect of Bacterial Chemotaxis on Biodegradation in a Porous Medium. *Bioremediation Journal*, 12(3):131–144, 2008.

- [58] H. G. Othmer, S. R. Dunbar, and W. Alt. Models of dispersal in biological systems. *J. Math. Biology*, 26(3):263–298, 1988.
- [59] K. M. Ottemann. Helicobacter pylori Uses Motility for Initial Colonization and To Attain Robust Infection. *Infection and Immunity*, 70(4):1984–1990, apr 2002.
- [60] P. C. M. Pereira and E. C. Navarro. Challenges and perspectives of chagas disease: a review. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*, 19(1):34, 2013.
- [61] Liyan Ping, Vaibhav Wasnik, and Eldon Emberly. Bacterial motion in narrow capillaries. *FEMS microbiology ecology*, 91(2):1–7, 2015.
- [62] A. Rodríguez, P. Webster, J. Ortego, and N. W. Andrews. Lysosomes behave as Ca^{2+} -regulated exocytic vesicles in fibroblasts and epithelial cells. *J Cell Biol*, 137(1):93–104, 1997.
- [63] Eliora Z Ron and Eugene Rosenberg. Enhanced bioremediation of oil spills in the sea. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 27:191–194, jun 2014.
- [64] Jesús Santana-Solano, Angeles Ramírez-Saito, and J L Arauz-Lara. Short-Time Dynamics in Quasi-Two-Dimensional Colloidal Suspensions. *Phys. Rev. Lett.*, 95(19):198301, 2005.
- [65] Henry Shum and Eamonn a Gaffney. Hydrodynamic analysis of flagellated bacteria swimming near one and between two no-slip plane boundaries. *Phys. Rev. E*, 91(3):033012, mar 2015.
- [66] L. David Sibley and Norma W. Andrews. Cell invasion by un-palatable parasites. *Traffic*, 1(2):100–106, 2000.
- [67] Aaron Sim, Juliane Liepe, and Michael P H Stumpf. Goldstein-Kac telegraph processes with random speeds: Path probabilities, likelihoods, and reported Lévy flights. *Phys. Rev. E*, 91(4):042115, apr 2015.
- [68] O. Sipos, K. Nagy, R. Di Leonardo, and P. Galajda. Hydrodynamic Trapping of Swimming Bacteria by Convex Walls. *Phys. Rev. Lett.*, 114(25):258104, jun 2015.
- [69] Saverio E Spagnolie, Gregorio R. Moreno-Flores, Denis Bartolo, and Eric Lauga. Geometric capture and escape of a microswimmer colliding with an obstacle. *Soft Matter*, 11(17):3396–3411, 2015.

-
- [70] Bhushan J. Toley and Neil S. Forbes. Motility is critical for effective distribution and accumulation of bacteria in tumor tissue. *Integr. Biol.*, 4(2):165–176, 2012.
- [71] Nathalie Tufenkji. Modeling microbial transport in porous media: Traditional approaches and recent developments. *Advances in Water Resources*, 30(6-7):1455–1469, jun 2007.
- [72] Linda Turner, William S Ryu, and Howard C Berg. Real-Time Imaging of Fluorescent Flagellar Filaments. *J. Bacteriol.*, 182(10):2793–2801, may 2000.
- [73] Linda Turner, Rongjing Zhang, Nicholas C Darnton, and Howard C Berg. Visualization of Flagella during Bacterial Swarming. *J. Bacteriol.*, 192(13):3259–3267, jul 2010.
- [74] S. Uppaluri, J. Nagler, E. Stellamanns, N. Heddergott, S. Herminghaus, M. Engstler, and T. Pfohl. Impact of microscopic motility on the swimming behavior of parasites: straighter trypanosomes are more directional. *PLoS Comput Biol*, 7(6):e1002058, 2011.
- [75] S. Weiße, N. Heddergott, M. Heydt, D. Pflästerer, T. Maier, T. Haraszti, M. Grunze, M. Engstler, and A. Rosenhahn. A quantitative 3d motility analysis of *Trypanosoma brucei* by use of digital in-line holographic microscopy. *PLoS One*, 7(5):e37296, 2012.
- [76] W B Whitman, D C Coleman, and W J Wiebe. Prokaryotes: the unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95(12):6578–6583, 1998.