

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD MONTERREY

INTERACCIONES HIDRODINÁMICAS DE
BACTERIAS *Escherichia coli* EN UN
SISTEMA CUASI BIDIMENSIONAL

TESIS QUE PRESENTA

MOISÉS ALFONSO CHÁVEZ NAVARRO

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

EN

INGENIERÍA Y FÍSICA BIOMÉDICAS

Director de la Tesis: Dr. Jesús Manuel Santana Solano

Sinodales:

Dr. Moisés Santillán Zerón

Dr. Gabriel Caballero Robledo

Apodaca, N.L.

Septiembre

Resumen

El presente trabajo tiene como propósito investigar el efecto que tienen las interacciones hidrodinámicas y el papel que desempeñan en la dinámica de la bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*) de la cepa MG1655 en un medio altamente confinado entre dos superficies de vidrio paralelas y con una separación de $2.8 \mu\text{m}$, de tal manera que se puede estudiar como un sistema efectivo bidimensional.

Mediante la técnica de video microscopía de contraste de fases se obtuvieron las imágenes y trayectorias de las bacterias a distintas concentraciones. Estas trayectorias se analizaron para caracterizar el movimiento individual de las bacterias, así como el acoplamiento en la motilidad celular mediado por las interacciones hidrodinámicas. En particular se obtuvieron resultados para la velocidad media, desplazamiento cuadrático medio y ángulo de giro. Además se hicieron mediciones para el ángulo de encuentro, la rapidez de aproximación y alejamiento, y la correlación de velocidades entre pares de bacterias. En particular, nuestro análisis de la correlación de velocidades es consistente con el modelo cuadrupolar para el campo de velocidades.

Abstract

We study the effect of hydrodynamic interactions on bacterial dynamics of *Escherichia coli* MG1655 in a highly confined medium between two parallel glass surfaces with a height separation of $2.8 \mu m$, making it an effective two dimensional system. Bacteria trajectories from different area fraction were obtained using phase contrast microscopy. Trajectories were analyzed to characterize the individual motion of bacteria and the coupled cellular motion that arises from hydrodynamic interactions. In particular we report mean velocity, mean square displacement, and angular change. Furthermore, encounter angle, approaching speed, leaving speed, and the pair velocity correlations were also calculated. Our results for the pair velocity correlations are consistent with a quadrupolar velocity field.

Índice general

1. Introducción	9
1.1. Hipótesis	12
1.2. Objetivos	12
2. La bacteria <i>Escherichia coli</i>	13
2.1. Motilidad	14
2.2. Motor molecular	15
2.3. Interacciones hidrodinámicas	16
2.3.1. Bacterias como singularidades puntuales de flujo	16
2.3.2. Interacción ente bacterias <i>E. coli</i> debido a un cuadrupolo hidrodinámico	18
3. Materiales y métodos	23
3.1. Cultivo de bacterias	23
3.2. Técnica experimental	25
3.2.1. Lavado de vidrios	25
3.2.2. Confinamiento	25
3.2.3. Microscopía de contraste de fases	26
3.2.4. Montaje experimental	27
3.3. Análisis de imágenes	27
4. Resultados	33
4.1. Propiedades dinámicas de bacterias <i>E. coli</i> en un medio cuasi bidimensional	33
4.1.1. Rapidez promedio de las bacterias	33
4.1.2. Distribución de ángulos de giro	34
4.1.3. Desplazamiento cuadrático medio	35
4.2. Interacciones hidrodinámicas entre pares de bacterias	37

4.3. Dispersión entre pares de bacterias	41
5. Discusion	47
6. Conclusiones	49
7. Perspectivas	51

CAPÍTULO 1

Introducción

La presencia de microorganismos nadadores es ubiqa en la naturaleza y juegan un papel importante en ecosistemas marinos, reproducción animal y enfermedades infecciosas. En estos procesos, la motilidad celular es crucial. La mayoría de los microorganismos nadadores involucrados en funciones biológicas humanas y enfermedades son encontrados en ambientes heterogéneos y con algún grado de confinamiento. Por ejemplo, los espermatozoides en el tracto reproductivo femenino nadan en un ambiente complejo que contiene una red de fibras de glicoproteínas con diámetros de aproximadamente 100 nm que forman una red de poros con tamaños que van desde decenas de nanómetros hasta $25\ \mu\text{m}$ [1]. Otro ejemplo lo constituyen bacterias que invaden células huésped, las cuales atraviesan tejidos [2] y se agregan en superficies en forma de biofilms [3]. Se conoce que el confinamiento, así como las propiedades mecánicas como la rigidez interfacial de las fronteras biológicas afecta estéricamente a los microorganismos. La motilidad de bacterias cerca de una superficie es relevante para un gran número de aplicaciones biológicas y biomédicas, influyendo de manera importante en las particularidades de procesos como la formación de biofilms sobre instrumentos médicos y heridas [4], la contaminación de superficies, y la bioremediación de contaminantes en el ambiente [5, 6]. Además, las fronteras confinantes pueden estar involucradas en el transporte de nutrientes y en consecuencia, pueden afectar el movimiento de los microorganismos. Por ejemplo, los niveles de oxígeno pueden ser diferentes cerca de las superficies alterando el movimiento de los organismo[7, 8]. Otro interés práctico de la motilidad de microorganismos, es la posibilidad de fabricar sistemas artificiales autopropulsados que lleven a cabo tareas específicas en sistemas microfluídicos [9].

Como consecuencia de la motilidad de los microorganismos en medios fluidos, es que al propulsarse por el medio, estos imparten momento y energía al fluido que la rodea. Como resultado el fluido circundante al cuerpo de la bacteria sufre una perturbación, resul-

tando en un cambio de la velocidad del fluido. Esta perturbación a su vez es propagada por el medio líquido y paredes, siendo capaz de transferir el momento que recibió a microorganismos vecinos. Estas interacciones mediadas por el fluido, son conocidas como *interacciones hidrodinámicas*. El alcance de estas perturbaciones y el efecto que tienen sobre la dinámica de las bacterias u otros microorganismos bajo alto confinamiento es poco conocida.

La bacteria *Escherichia coli* es uno de los ejemplos más representativos de microorganismos nadadores, la cual utiliza un manojito de flagelos que la propulsa a través del fluido. Esta bacteria se ha estudiado a muchos niveles, pero en particular se ha estudiado en medios bidimensionales, mediante aproximaciones teóricas y simulaciones, buscando identificar el impacto que la pérdida de dimensionalidad tiene en las interacciones directas y en las interacciones hidrodinámicas. [10–15]. Los únicos estudios experimentales de *E. coli* en confinamiento se han enfocado en estudiar el movimiento colectivo de estas células. Debido a la alta concentración requerida para lograr fenómenos de movimiento colectivo, sigue siendo desconocido cual es la importancia relativa de las interacciones hidrodinámicas con respecto a interacciones estéricas y otro tipo de contribuciones en estas geometrías.

En un medio viscoso, la razón entre la fuerza requerida para acelerar una masa de diferente composición al medio fluido (fuerzas inerciales) con respecto a la fuerza necesaria para generar estrés de corte (fuerzas viscosas) es conocido como número de Reynolds, Re . Para un objeto en nado, $Re = lv\rho/\eta$, donde l es el tamaño del objeto, v su velocidad, ρ es la densidad del medio, y η es la viscosidad del medio. El número de Reynolds asociado al nado de microorganismos es pequeño, y para *E. coli* es del orden de $Re \approx 10^{-4}$. En este límite, el flujo generado por un microorganismo nadador satisface las ecuaciones lineales de Stokes, las cuales permiten realizar una expansión multipolar del flujo. Esta expansión multipolar, con la identificación de las propiedades características de cada multipolo, permite representar el flujo creado por un microorganismo usando las singularidades de los multipolos como singularidades de flujo. La manera de representar un flujo creado por una combinación de singularidades es similar y, en algunos casos, análogo a lo que se hace en electrostática cuando se dibuja el flujo de campo eléctrico creado por un conjunto de cargas puntuales. Como veremos más adelante, en este trabajo de tesis se hace uso del comportamiento general de los multipolos para identificar los rasgos más importantes de las interacciones hidrodinámicas que se presentan en nuestros sistemas de bacterias bajo alto confinamiento. Unos de los ejemplos más ilustrativos de los efectos dramáticos que una superficie puede inducir sobre una bacteria nadadora se pueden encontrar en las Refs. [11, 16–18] en donde se reporta el atrapamiento espontáneo de bacterias *E. coli* cuando se encuentran en regiones cercanas a una superficie de vidrio plana, las cuales permanecen nadando, una vez atrapadas, en trayectorias circulares, como se puede ver en la Figura 1.

El efecto del atrapamiento cerca de una pared sólida también se ha reportado para otras bacterias como *Caulobacter crescentus*, así como para espermatozoides de toro, ratón,

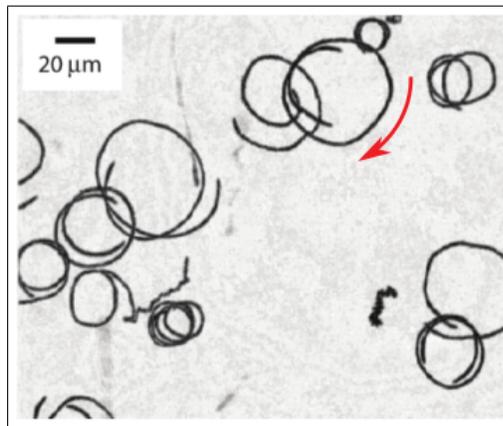


Figura 1.1: Atrapamiento de *E. coli* cerca de una superficie de vidrio. Imagen adaptada de la referencia [19].

erizo de mar y humano [20]. Recientemente se ha encontrado que estos efectos se deben a una atracción generada por las interacciones hidrodinámicas entre las células móviles y la pared. El campo de flujo alrededor de la mayoría de las células flageladas (incluyendo bacterias y espermatozoides) se puede aproximar como un dipolo hidrodinámico.

En un trabajo experimental realizado por S.A. Biondi [13] se estudió el papel que juega el confinamiento en la motilidad de bacterias *E. coli*. Para llevar a cabo dicho estudio se fabricaron poros bidimensionales construidos con dos placas de vidrio separadas por una distancia entre 2 y 20 μm . El estudio fue llevado a cabo en célula única midiendo la rapidez, probabilidad de tumbos, y ángulo de giro (ángulo entre dos corridas sucesivas). Las células fueron observadas en el plano ubicado en la mitad de la distancia entre dos superficies. Es de llamar la atención que excepto para el caso de una separación de 2 μm , dichos parámetros prácticamente no cambian respecto al resultado para el bulto (sin ningún confinamiento). Lo que según los autores demuestra que las bacterias pueden nadar en poros ligeramente mayores que su tamaño sin modificar significativamente su motilidad. Incluso para el caso de una separación entre superficies de 3 μm la rapidez de las células es aproximadamente 10% mayor que la del bulto. Este resultado es contra intuitivo debido ya que se esperaría una reducción en la rapidez respecto al bulto debido a una resistencia hidrodinámica debido a las paredes.

Así mismo, en analogía con el método de imágenes en electrostática, la presencia de una pared sólida se puede tomar en cuenta con otro dipolo hidrodinámico (más contribuciones menores de cuadrupolos) al otro lado de la superficie, la cual da lugar al atrapamiento de células. Sin embargo, otros estudios han mostrado que el atrapamiento de células móviles (*Caulobacter crescentus*) en superficies sólidas también puede ser explicado como una simple colisión (a números de Reynolds bajos) de las células con la superficie. Una vez que ocurre la colisión las células tienden a nadar paralelamente a la superficie hasta que el movimiento browniano rotacional induce un cambio de dirección que hace que se separen de la pared [21, 22]. En un estudio experimental

se confirmó que el campo de velocidades de bacterias *E. coli* está dado por un dipolo hidrodinámico, pero que el ruido (debido al movimiento browniano rotacional y a la estocasticidad intrínseca de nado) atenúa los efectos hidrodinámicos para distancias mayores a $\sim 3 \mu m$. Así, mientras que en el trabajo anterior se considera que las interacciones hidrodinámicas sólo son relevantes para altas concentraciones, otros estudios (de modelos computacionales) muestran que este tipo de interacción es crucial para reproducir efectos colectivos en la motilidad de bacterias [23].

Por lo tanto, en este trabajo se propone estudiar bacterias *E. coli* bajo un confinamiento cuasi bidimensional. Buscando entender el efecto que tiene el confinamiento sobre la dinámica de las bacterias. En particular, se buscará conocer el efecto y alcance de las interacciones hidrodinámicas de bacterias *E. coli* mediante la correlación de velocidad entre pares de bacterias.

1.1. Hipótesis

La correlación de velocidades en un sistema cuasi-dos-dimensional permite obtener información sobre las interacciones hidrodinámicas entre las células.

1.2. Objetivos

Objetivo General:

Estudiar el efecto de las interacciones hidrodinámicas en la dinámica de bacterias *E. coli* en un sistema cuasi bidimensional utilizando la técnica de Video Microscopía de contraste de fases.

Objetivos Particulares:

- Estudiar la dinámica de las bacterias por medio de la distribución de rapidez, distribución de los ángulos de giro, y del desplazamiento cuadrático medio.
- Medir las interacciones hidrodinámicas entre pares de bacterias con la función de correlación de las velocidades.
- Estudiar la dispersión entre pares de bacterias mediante el ángulo de encuentro y la rapidez de encuentro y alejamiento.

CAPÍTULO 2

La bacteria *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) es un organismo unicelular diminuto que fue descubierto en 1885 por el pediatra alemán Theodor Escherich. Posee forma de esfero-cilindro, con un largo aproximado de $2.5 \mu\text{m}$ y con un diámetro $\sim 1.0 \mu\text{m}$. Este organismo toma residencia comúnmente en el intestino de animales de sangre caliente.

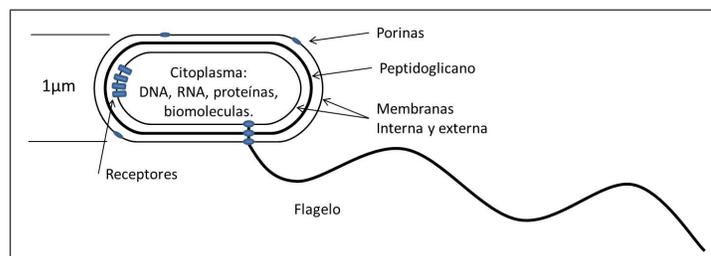
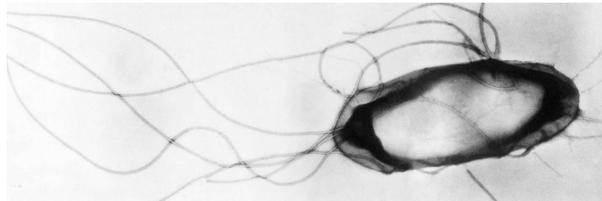


Figura 2.1: Diagrama ilustrativo de la estructura física de *E. coli*. Imagen tomada de la referencia [24]

Este microorganismo posee una triple membrana que aísla el contenido intracelular del medio externo. A diferencia de otro tipo de células, *E. coli* es un organismo procarionte, es decir, no posee un núcleo definido ni organelos cubiertos por membranas. Aunque hacia el interior de la membrana *E. coli* no posee organelos, en cambio, hacia el exterior posee dos tipos de estructuras filamentosas: La primera de ellas, conocida como pili o fimbrias. Estos filamentos rectos permiten a la célula adherirse a sustratos específicos. El segundo tipo de filamento se conocen como flagelo, estos son más gruesos y largos que las fimbrias, los flagelos otorgan a la célula la capacidad de nadar. Ambas estructuras pueden verse en la Figura (2.2).



(a) Micrografía electrónica de *E. coli* muestra fimbrias. Imagen tomada por Sokurenko lab, Universidad de Washington.



(b) Micrografía electrónica de *E. coli* muestra flagelos. Imagen tomada de la referencia [25].

Figura 2.2: Se muestran los dos tipos de estructuras filamentosas (a) fimbrias y (b) flagelos que posee *E. coli* hacia el exterior de su membrana.

2.1. Motilidad

E. coli posee la capacidad de autopropulsarse por medio de un conjunto organizado de flagelos conocido como manojos. Cada flagelo es impulsado en su base por un motor rotatorio reversible que depende de un flujo de protones. La direccionalidad que pueda tener la bacteria es controlada por un conjunto de señales intracelulares generadas por receptores en la pared celular que cuentan moléculas de interés en la superficie de la membrana.

Con la capacidad de propulsarse alrededor de 10 cuerpos por segundo, o bien como $25\text{-}30 \mu\text{m/s}$. *E. coli* se desplaza preferencialmente en línea recta en dirección paralela a su semieje mayor durante un intervalo de tiempo del orden de un segundo, se mueve erráticamente por una fracción de segundo, en promedio 0.1 segundos, lo que genera un cambio en la orientación del eje principal de la bacteria, después de lo cual vuelve a nadar de manera rectilínea en una dirección. A los desplazamientos rectilíneos se les denomina ‘corrida’, mientras que al movimiento errático de la bacteria se le conoce como ‘tumbo’ y sucede de manera aleatoria. En conjunto, estos dos movimientos componen

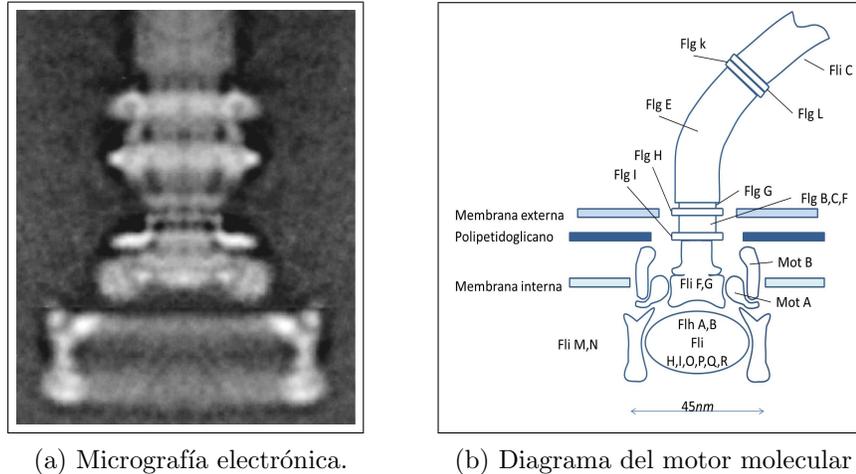


Figura 2.4: Motor molecular de *E. coli*. Imágenes tomadas de la referencia [24].

un "interruptor", Fli G, M y N, controla la dirección de rotación. Estos componentes también están asociados con la generación de torque. La interacción entre CheY-P y FliM estabiliza el estado en el cual el filamento (visto por un observador desde la parte frontal de la bacteria) gira a favor de las manecillas del reloj. A temperatura ambiente el estado nulo es en contra de las manecillas del reloj. Comúnmente es un flujo de protones del exterior al interior de la bacteria es la energía que mueve el motor, sin embargo existe otro mecanismo debido al pH en el medio.

2.3. Interacciones hidrodinámicas

Para comprender el fenómeno del nado en escalas microscópicas desde el punto de vista físico del movimiento del cuerpo en el medio y los efectos que se producen por el desplazamiento del fluido, es necesario simplificar el nado del microorganismo, de tal manera que el nado se modele con lo mínimo necesario. Con este principio en mente, estudios anteriores han reportado modelos que reproducen algunas propiedades dinámicas de bacterias. Estas teorías se basan en singularidades de flujo. Una explicación de estas teorías puede encontrarse en la referencia [19], a continuación se explicará de manera breve los desarrollos y consideraciones que contemplan la teoría previamente mencionada.

2.3.1. Bacterias como singularidades puntuales de flujo

Una explicación de la teoría hidrodinámica para bacterias *E. coli* en 3D puede encontrarse en la referencia [19], a continuación se explicará de manera breve los desarrollos y consideraciones que contemplan esta teoría.

Las singularidades de flujo son derivadas de la función de Green para flujos de Stokes,

\mathbf{G}_S , donde las fuerzas inerciales advectivas son pequeñas comparadas con las fuerzas viscosas, la cual nos da el flujo en la posición \mathbf{x} generado por una fuerza puntual \mathbf{F} localizada en \mathbf{x}_0 y orientada en la dirección del vector unitario \mathbf{a} como

$$\mathbf{u}(\mathbf{x}) = \frac{1}{8\pi\eta}\mathbf{G}_S(\mathbf{x} - \mathbf{x}_0; \mathbf{a}), \quad \mathbf{G}_S(\mathbf{r}; \mathbf{a}) = \frac{\mathbf{a}}{r} + \frac{\mathbf{a}\cdot\mathbf{r}}{r^3}\mathbf{r}, \quad (2.1)$$

donde $\mathbf{r} = \mathbf{x} - \mathbf{x}_0$ y $r = |\mathbf{r}|$. La solución se conoce como Stokeslet, y singularidades de orden superior son derivadas de esta singularidad fundamental. Ahora se introducirá el Stokeslet dipolar, \mathbf{G}_{SD} , y cuadrupolar, \mathbf{G}_{SQ} ,

$$\mathbf{G}_{SD}(\mathbf{r} : \mathbf{a}, \mathbf{b}) = (\mathbf{b}\cdot\nabla_0)\mathbf{G}_S(\mathbf{r}; \mathbf{a}), \quad (2.2)$$

$$\mathbf{G}_{SQ}(\mathbf{r} : \mathbf{a}, \mathbf{b}, \mathbf{c}) = (\mathbf{c}\cdot\nabla_0)\mathbf{G}_{SD}(\mathbf{r}; \mathbf{a}, \mathbf{b}), \quad (2.3)$$

donde \mathbf{b} es la dirección en que se toma la derivada, y ∇_0 denota el gradiente tomando como origen el lugar de la singularidad, \mathbf{x}_0 . Una combinación de dipolos de Stokes es el dipolo rotatorio o rotlet, \mathbf{G}_R , el cual es la parte anti-simétrica del Stokeslet dipolar, y modela el flujo generado por una torca puntual.

$$\mathbf{G}_R(\mathbf{r}; \mathbf{c}) = \frac{1}{2} [\mathbf{G}_{SD}(\mathbf{r}; \mathbf{b}, \mathbf{a}) - \mathbf{G}_{SD}(\mathbf{r}; \mathbf{a}, \mathbf{b})] = \frac{\mathbf{c} \times \mathbf{r}}{r^3}, \quad (2.4)$$

donde $\mathbf{c} = \mathbf{a} \times \mathbf{b}$. La parte simétrica de un Stokeslet dipolar es llamada stresslet, $\mathbf{G}_{SS}(\mathbf{a}, \mathbf{b}) = \frac{1}{2} [\mathbf{G}_{SD}(\mathbf{r}; \mathbf{a}, \mathbf{b}) + \mathbf{G}_{SD}(\mathbf{r}; \mathbf{b}, \mathbf{a})]$. Nótese que todas estas singularidades son n -funciones lineales de sus n vectores de orientación. Una singularidad orientada a lo largo de direcciones arbitrarias, puede ser, por lo tanto expresada como una combinación de singularidades similares a lo largo del espacio.

Organismos simétricos a lo largo de un eje, en la dirección indicada por el vector unitario \mathbf{e} , como *E. coli*, con su centro en \mathbf{x}_0 , genera movimiento del fluido en el campo lejano de la forma

$$\mathbf{u}(\mathbf{x}) = \alpha\mathbf{G}_D(\mathbf{e}, \mathbf{e}) + \beta\mathbf{G}_{SD}(\mathbf{e}) + \gamma\mathbf{G}_Q(\mathbf{e}, \mathbf{e}, \mathbf{e}) + \tau\mathbf{G}_R(\mathbf{e}, \mathbf{e}) + \mathcal{O}(|\mathbf{x} - \mathbf{x}_0|^{-4}), \quad (2.5)$$

donde \mathbf{G}_D es el dipolo fuerza, \mathbf{G}_Q el cuadrupolo fuerza y \mathcal{O} el octupolo fuente. Se introduce la notación $\mathbf{G}_D(\mathbf{x} - \mathbf{x}_0; \mathbf{e}, \mathbf{e}) = \mathbf{G}_D(\mathbf{e}, \mathbf{e})$. El coeficiente α tiene unidades de $[\text{Velocidad}] \times [\text{Longitud}]^2$, mientras que β, γ y τ tienen unidades de $[\text{Velocidad}] \times [\text{Longitud}]^3$. Los coeficientes α, β, γ y τ deben ser determinados para cada microorganismo, y dependen de la geometría específica y el mecanismo de propulsión. En el caso de *E. coli* se aproxima a un esfero-cilindro.

Como primera aproximación, el nado de una bacteria *E. coli* puede ser modelado como un dipolo fuerza (decae como $1/R^2$) Figura 2.6(a). Esta aproximación ha sido utilizada por varios autores considerando el efecto de superficies sólidas cercanas en 3D [27], y la interacción entre varios nadadores [18]. En el siguiente término de importancia en la

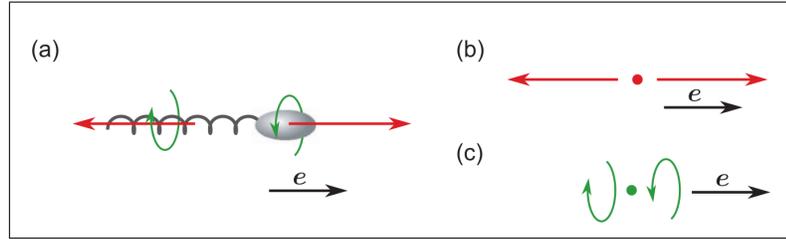


Figura 2.5: (a) Singularidades de flujo indicadas sobre el cuerpo de *E. coli*. (b) En flechas rojas se observa el dipolo fuerza. (c) En verde se ilustra el dipolo rotatorio. En conjunto tienen como resultado el desplazamiento de la bacteria en la dirección del vector unitario e . Imagen adaptada de la cita [19].

aproximación (decae como $1/R^3$) Figura 2.6(b), el flujo en el campo lejano varía debido a la asimetría en longitud entre el helicoides que empuja hacia atrás el fluido y el cuerpo celular que empuja el fluido hacia delante (produciendo un Stokeslet cuadrupolar). Para el caso de *E. coli* las fuerzas producidas por el nado característico de la bacteria se muestran en la Figura (2.5).

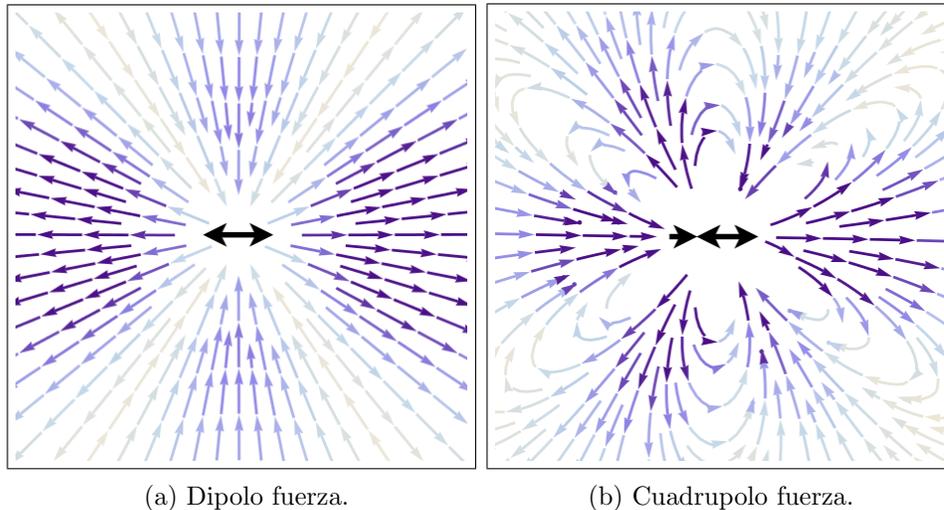


Figura 2.6: Decaimientos principales de un microorganismo que empuja el fluido al nadar. (a) Muestra el flujo producido por un dipolo fuerza. (b) Patrón de flujo creado por un cuadrupolo fuerza. Imagen adaptada de la cita [19].

2.3.2. Interacción ente bacterias *E. coli* debido a un cuadrupolo hidrodinámico

Debido a que aún no existe una teoría que describa las interacciones hidrodinámicas entre bacterias *E. coli* confinadas en un sistema cuasi bidimensional como el del presente

trabajo, en esta sección se va a describir la teoría desarrollada por Liao y colaboradores [28] para las interacciones hidrodinámicas entre pares de bacterias *E. coli* en 3D. Sin embargo, se ha mostrado que los campos de velocidades alrededor de la mayoría de los microorganismos, y en diferentes condiciones de confinamiento, están dadas como una combinación de dipolos y cuadrupolos hidrodinámicos [19]. Dicha teoría se basa en calcular la correlación de velocidades entre pares de bacterias. Así mismo, se considera que el centroide de los cuerpos de las bacteria se encuentren en un mismo plano horizontal. La correlación entre pares de bacterias pueden surgir como consecuencia de dos efectos hidrodinámicos: la convección directa de una bacteria debido la velocidad del fluido producida por una bacteria vecina y el cambio en la velocidad de nado por el flujo producido por la rotación de una bacteria vecina. Por simplicidad, solo se considera el primer efecto y se asume que la probabilidad de orientación del par de bacterias es isotrópica.

$$\mathbf{u}_i = U\mathbf{p}_i + \mathbf{u}_{ij}(\mathbf{x}_i|\mathbf{p}_j, \mathbf{x}_j), \quad (2.6)$$

donde se asume que la la velocidad de la bacteria \mathbf{u}_i , es un resultado de una velocidad de nado U paralela a su orientacion \mathbf{p}_i y la velocidad del fluido $\mathbf{u}_{ij}(\mathbf{x}_i|\mathbf{p}_j, \mathbf{x}_j)$ en la posición de la bacteria i debido a la bacteria j . Como se mencionó anteriormente el número de Reynolds es pequeño $O(10^{-4})$ para una bacteria que nada a una velocidad U con una longitud L del cuerpo más el manajo de flagelos. Por lo tanto, la velocidad del flujo producido por una bacteria puede ser evaluada a partir de las ecuaciones de Stokes. La razón entre L y el diámetro ($\kappa \approx 8$) implica que una teoría de cuerpo delgado es una buena aproximación a las perturbaciones creadas por una bacteria al desplazarse por el fluido. Como consecuencia, es razonable aproximar la varianza (un factor de normalización para la correlación de las velocidades) de la bacteria como U^2 y la función de correlación como

$$\mathbf{R}(r) = \frac{3}{(4\pi)^2 U} \int d\mathbf{p}_1 d\mathbf{p}_2 [\mathbf{p}_2 \mathbf{u}_{12} + \mathbf{p}_1, \mathbf{u}_{21}] \quad (2.7)$$

$$\mathbf{R}(r) = \frac{3}{2\pi U} \int d\mathbf{p}_1 \mathbf{p}_1 \mathbf{u}_{21}. \quad (2.8)$$

Debido a que las bacterias son pequeñas y tienen aproximadamente la misma densidad que el medio, la fuerza neta producida por el cuerpo celular y los flagelos es despreciable. Por lo tanto, la fuerza producida por el cuerpo sobre el fluido es balanceada por la fuerza ejercida por el manajo de flagelos. Si f_B es la fuerza por unidad de longitud que la bacteria uno ejerce sobre el fluido entonces \mathbf{u}_{21} y el campo de presión correspondiente \mathbf{p}_{21} satisface las siguientes ecuaciones :

$$-\mu \nabla \mathbf{u}_{21} + \nabla \mathbf{p}_{21} = f_B \int_{-\frac{\alpha L}{2}}^{\frac{\alpha L}{2}} \mathbf{p}_1 \delta(r - s\mathbf{p}_1) ds - \frac{\alpha}{1 - \alpha} f_B \int_{-\frac{1-\alpha L}{2}}^{-\frac{\alpha L}{2}} \mathbf{p}_1 \delta(r - s\mathbf{p}_1) ds, \quad (2.9)$$

$$\nabla \cdot \mathbf{u}_{21} = 0, \quad (2.10)$$

donde la bacteria es considerada como una distribución lineal de fuerzas y μ es la viscosidad del medio. En estas ecuaciones se consideró que el origen del sistema de referencia se encuentra en el centroide del cuerpo de la bacteria. El primer término del lado derecho de la ecuación 2.9 corresponde a las fuerzas producidas por el cuerpo mientras que el segundo término es la fuerza producida por el flagelo. En la ecuación 2.9 el parámetro α es la razón de tamaño entre la longitud del cuerpo y la longitud total de la bacteria. Así, para distancias mayores a $O(L)$, la distribución de fuerzas en la ecuación 2.9 puede ser expandida en término de sus momentos. Los primeros dos términos de la expansión corresponden a las singularidades del dipolo (D) y cuadrupolo (Q). Así, los campos correspondientes de velocidad están dados por:

$$\mathbf{u}_{21}^D = -\frac{\alpha f_B L^2}{2} \mathbf{p}_1 \cdot \nabla [\mathbf{J}(r) \cdot \mathbf{p}_1], \quad (2.11)$$

$$\mathbf{u}_{21}^Q = -\frac{\alpha f_B L^3 \alpha (2 - \alpha)}{6} \mathbf{p}_1 \mathbf{p}_1 : \nabla \nabla [\mathbf{J}(r) \cdot \mathbf{p}_1], \quad (2.12)$$

donde

$$\mathbf{J}(x) = \frac{1}{8\pi\mu} \left(\frac{\mathbf{I}}{|x|} + \frac{\mathbf{x}\mathbf{x}}{|x|^3} \right), \quad (2.13)$$

es el tensor de Oseen.

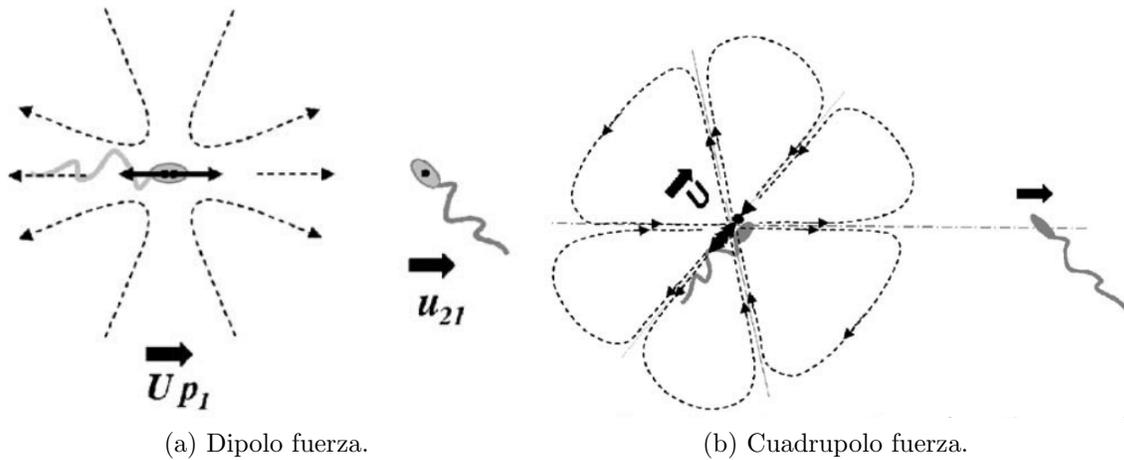


Figura 2.7: Decaimientos principales de *E. coli*. en 3D. (a) Muestra el flujo producido por un dipolo fuerza. (b) Patrón de flujo creado por un cuadrupolo fuerza. Esquemas adaptados de la referencia [28].

Usando las ecuaciones 2.7 y 2.11, e integrando sobre todas las posibles orientaciones \mathbf{p}_1 , como consecuencia de la simetría del campo dipolar (ver figura 2.7), se presenta una invarianza con respecto a la orientación de la bacteria. De lo anterior se encuentra que la correlación producida por la contribución dipolar es cero. Por lo tanto, la correlación entre pares de bacterias surge debido a la singularidad cuadrupolar, que puede ser obtenida tomando las ecuaciones 2.12 y 2.7 e integrando sobre todas las orientaciones para obtener:

$$\mathbf{R}(r) = \frac{f_B \alpha L^3 \alpha (2 - \alpha)}{15U} \nabla^2 \mathbf{J}(r) = \mathbf{R}_{NN} + (\mathbf{R}_{LL} - \mathbf{R}_{NN} \frac{\mathbf{r}\mathbf{r}}{r^2}), \quad (2.14)$$

donde las componentes longitudinal y transversal de la correlación de velocidad entre pares son:

$$\mathbf{R}(r)_{LL} = \frac{5,7\alpha(2 - \alpha)}{60\pi} \left(\frac{r}{L}\right)^{-3}, \quad \mathbf{R}(r)_{NN} = -\mathbf{R}_{LL}/2, \quad (2.15)$$

claramente, debido a que $\alpha < 1$, \mathbf{R}_{LL} es positivo y \mathbf{R}_{NN} es negativo.

3.1. Cultivo de bacterias

Nuestro estudio se enfoca en la capacidad de nado de *E. coli*, por lo tanto el mecanismo que tiene como resultado la motilidad del organismo debe encontrarse en óptimas condiciones, para esto, a partir de un inóculo de 200 μl de la cepa MG1655 de *E. coli* se crecieron bacterias en 4 ml de medio de cultivo Luria-Bertani (LB) a 37 °C y con una agitación de 150 revoluciones por minuto (RPM) durante 3.5 *hrs*. Este medio de cultivo cuenta con fuentes de carbono y sin azúcares que afecten la motilidad pero si con los aminoácidos necesarios para su proliferación, el medio consta de: 10 *gr* de triptona, 5 *gr* de extracto de levadura, 10 *gr* de NaCl, disueltos en un litro de agua miliQ. Esterilizado en autoclave a 120°C por 30 min. A continuación, se crece a las bacterias en placas de agar suave al 0.4% de agar en LB durante toda la noche en incubadora a una temperatura de 37 °C.

Posteriormente con una asa estéril se tomaron bacterias de la periferia del halo y se crecieron en 4 ml de medio LB durante 3.5 horas. Enseguida se prosiguió a centrifugar las bacterias y resuspenderlas en medio LB + 30% glicerol, con lo cual se generó un acopio de ~80 muestras de bacterias con un volumen de 200 μl que fueron almacenados a -80°C.

Para hacer uso de los inóculos generados para el acopio es necesario, primero, crecer bacterias a partir del inóculo, una vez que hay suficientes bacterias estas se lavan para remover el medio en el que se crecen las células y reemplazarlo por un medio de motilidad que evita que las bacterias se sigan dividiendo. Para lograr lo anterior se realizó el siguiente protocolo.

Dejamos crecer un inóculo de 200 μl de bacterias en 4 ml de medio LB en una incubadora

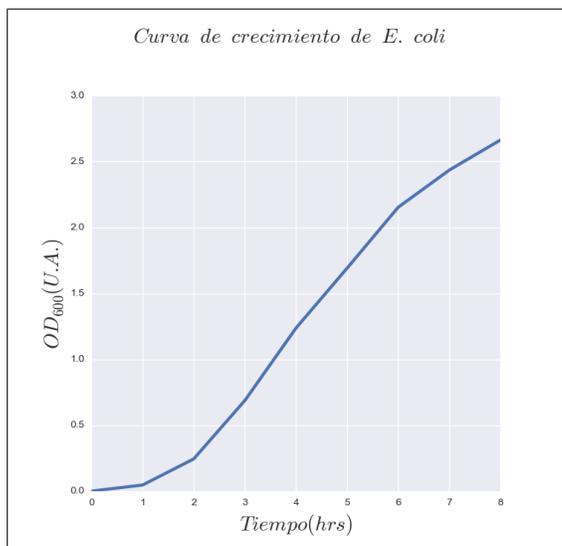


Figura 3.1: Curva de crecimiento OD_{600} para *E. coli*.

por 3.5 horas a 37°C con agitación de 150 RPM. Al término de este cultivo, se toma 1.0 ml de la solución y es centrifugada a $2 * 10^3$ g, se retira el sobrenadante y las bacterias son resuspendidas en 200 μl de una solución amortiguadora o buffer de motilidad, dicha solución fue desarrollada para permitir estudiar la motilidad de la bacteria *E. coli* MG1655. Este último proceso de lavado se realizó en dos ocasiones para remover todo residuo del medio de cultivo, para que finalmente las bacterias queden suspendidas en un volumen de 200 μl de buffer de motilidad.

A diferencia del medio LB, el buffer de motilidad no tiene fuentes de carbón para que las bacterias se alimenten, es decir, no cuenta con aminoácidos. Así el metabolismo continúa activo y la falta de alimento tiene como consecuencia que la bacteria se vea obligada a buscar alimento dentro de su ambiente, generándose de esta manera motilidad. El buffer de motilidad remueve los quelantes que puedan ser encontrados en el agua utilizada para disolver las sales necesarias para garantizar la vida de las bacterias, además es necesario un pH de 7.0 del medio acuoso. Es por lo tanto necesaria una fuente de energía endógena, la cual requiere de la presencia de oxígeno para su utilización [29–31].

La composición de este buffer químico para la motilidad es 10 mM de buffer de fosfato de potasio, 10 mM de NaCl y 0.1 mM de ácido etildiaminotetraacético también conocido como EDTA, a pH 7.0 disueltos en agua bi-destilada.

3.2. Técnica experimental

Con el propósito de cumplir los objetivos planteados, se propuso confinar diferentes concentraciones de una suspensión de bacterias entre superficies de vidrio utilizando esferas de poliestireno con diámetro de $2.8 \mu m$ para separar una superficie de otra.

3.2.1. Lavado de vidrios

Es importante que las superficies que confinan la suspensión de bacterias estén libres de impurezas, en nuestros experimentos se utilizaron portaobjetos y cubreobjetos de vidrio. Con el propósito de librar las superficies de contaminantes que puedan perjudicar la calidad de los experimentos se sometieron a un tratado para limpiar el material. Primeramente, los vidrios (portaobjetos y cubreobjetos) son colocados en las ranuras verticales de una base de teflón, la cual se coloca dentro de un vaso de precipitado junto con una solución limpiadora formada por agua desionizada miliQ (resistividad 18.2 MOhms-cm) y 0.05% (v/v) detergente líquido (Micro Cole-Parmer). El proceso de limpieza se lleva a cabo al colocar los vidrios en un sonicador por un periodo de 30 minutos. A continuación se retira la solución de agua con jabón y se enjuagan los vidrios varias veces con agua miliQ para eliminar los rastros de jabón para volverse a colocar en un sonicador por otros 30 minutos. Para finalizar se reemplaza nuevamente el agua del recipiente y se sella con parafilm para evitar una contaminación del exterior.

3.2.2. Confinamiento

Uno de los objetivos del trabajo es conocer la dinámica de la bacteria *E. coli* bajo confinamiento. Estudios previos[13] encuentran que el máximo confinamiento que pueden tener estas células sin afectar el movimiento del flagelo, es de $3 \mu m$. Seleccionamos una separación de 2.8 micras para tener un movimiento efectivo bidimensional. Se ha observado que con esta separación la rapidez promedio de las células no se ve perjudicada por la distancia de separación entre superficies, permitiendo un desplazamiento suave del organismo.

La muestra final a confinar es una mezcla de partículas separadoras y bacterias. Al igual que las bacterias, las partículas de poliestireno son lavadas en buffer de motilidad, con el objetivo de eliminar el tensoactivo de la suspensión original ya que esto puede afectar la dinámica de las células. Es por eso que $500 \mu l$ de partículas de poliestireno son centrifugadas con $500 \mu l$ de buffer de motilidad por 4 minutos a 2 mil revoluciones por minuto, se remueve el sobrenadante y son resuspendidas en 1 ml de buffer de motilidad. La muestra confinada es una mezcla de coloides separadores y bacterias. El volumen final de la muestra es de $50 \mu l$, de los cuales de la fase sólida el 60% son bacterias y 40% son partículas de poliestireno.

Para confinar la suspensión de bacterias entre dos superficies de vidrio realizamos el siguiente procedimiento.

Se seca un portaobjetos y un cubreobjetos con gas nitrógeno y se sumergen por un minuto en solución de polivinilpirrolidona 40 (PVP40) al 0.04%, teniendo como función neutralizar la carga de las superficies de vidrio, dado que *E. coli* posee una carga negativa en su membrana externa, esta solución evita que las bacterias se adhieran a las superficies de vidrio. Se remueven los vidrios de la solución de PVP40 para secarse nuevamente con gas nitrógeno.

Sobre el portaobjetos se coloca una gota de $1.7 \mu\text{l}$ que contiene la suspensión de coloides y bacterias, se presiona la muestra en el centro para asegurar el confinamiento de la misma, posteriormente es sellado con polidimetilsiloxano (PDMS). Este último es un polímero permeable a oxígeno, esto es importante ya que el oxígeno es necesario para la generación de motilidad de las bacterias en la muestra. Una disminución en la concentración de oxígeno tiene como consecuencia la disminución de la motilidad y eventualmente todas las bacterias quedarían inmóviles.

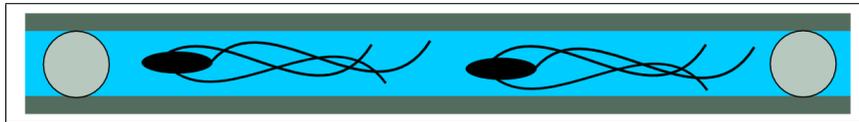


Figura 3.2: Diagrama del confinamiento de la muestra, los discos en gris esquematizan a las partículas de poliestireno de $2.8 \mu\text{m}$ que sirven como separadores entre las superficies de vidrio superior e inferior ejemplificada por rectángulos verdes, mientras que las elipses negras ejemplifican bacterias nadando en el espacio entre superficies sin ser aplastadas debido a las partículas de poliestireno.

3.2.3. Microscopía de contraste de fases

El microscopio utilizado en nuestros experimentos es un modelo Olympus BX51 Figura(3.3), con un objetivo Olympus de 40x Ph2 o de contraste de fases, que permite una mejor observación de las bacterias. A continuación se describe de manera breve el funcionamiento de la técnica de contraste de fases.

Es conocido que cuando atraviesa una célula, la fase de la onda luminosa varía en relación al índice de refracción de la célula: la luz que pasa a través de una zona relativamente gruesa o densa de la célula, como por ejemplo el núcleo, se retrasa y su fase queda desplazada de forma correspondiente respecto a la de la luz que ha pasado a través de una región más delgada adyacente del citoplasma. El microscopio de contraste de fases aprovecha los efectos de interferencia que se producen cuando se combinan estos dos grupos de ondas, generando de esta forma una imagen de la estructura celular [32].

3.2.4. Montaje experimental

Al microscopio está acoplado una cámara CCD watec modelo: W105B que permite una resolución temporal $1/30 \text{ seg}$ entre imágenes. Por su parte, la cámara está conectada a un DVD sony modelo: dr-hx910, que a su vez transmite la información capturada por la cámara a una PC Dell precision 470 para ser grabada a disco duro con ayuda del software *Virtual VCR*. Los equipos utilizados se muestran a continuación en la Figura(3.3).

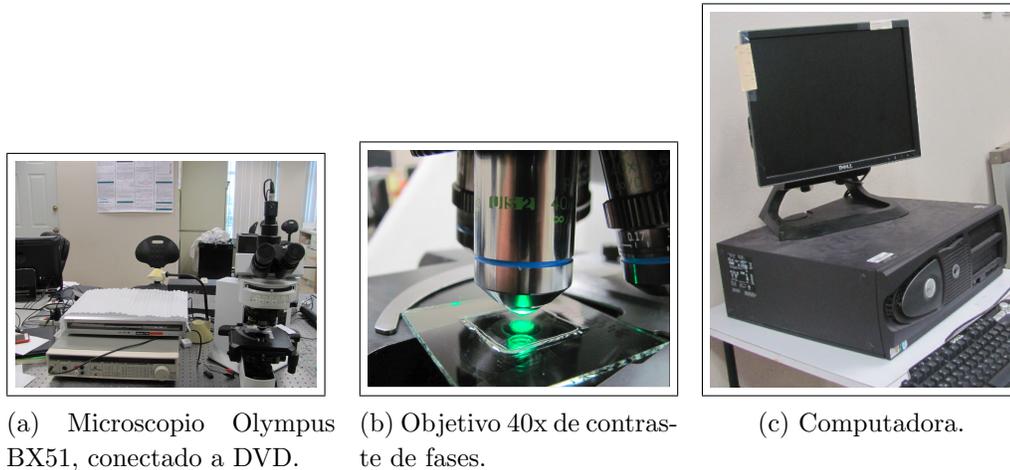


Figura 3.3: Montaje experimental.

3.3. Análisis de imágenes

Las grabaciones de video tienen la capacidad de almacenar grandes cantidades de información, la cual es posible extraer mediante el uso de técnicas de procesamiento digital de imágenes. Típicamente para esto se fragmenta la grabación en secuencias de imágenes conocidas como cuadros. En el presente trabajo el procesamiento se hace directamente con los videos, disminuyendo el uso de memoria generada por el análisis mediante cuadros, disminuyendo así el tiempo de análisis.

En nuestras imágenes el arreglo matricial es de $N = 640$ y $M = 480$, con 256 niveles de gris (imágenes de 8 bits), donde el cero representa al negro y el 255 representa al blanco. En nuestro caso a partir de estos videos son obtenidas trayectorias de bacterias haciendo una adaptación del algoritmo de seguimiento de partículas esféricas de Crocker et. al [33].

Para generar las trayectorias de las bacterias al igual que el caso de partículas esféricas se requiere realizar cinco etapas en el análisis de las imágenes: 1) Restauración de imágenes para corregir la calidad y contraste. 2) Filtrado para quitar el fondo y dejar solo los puntos con mayor intensidad que son las bacterias. 3) Localización de los picos

de intensidad en la imagen. 4) Refinación de la posición de las bacterias localizando los centroides dentro de la zona de mayor intensidad. 5) Unión en el tiempo de las posiciones de las bacterias para crear las trayectorias.

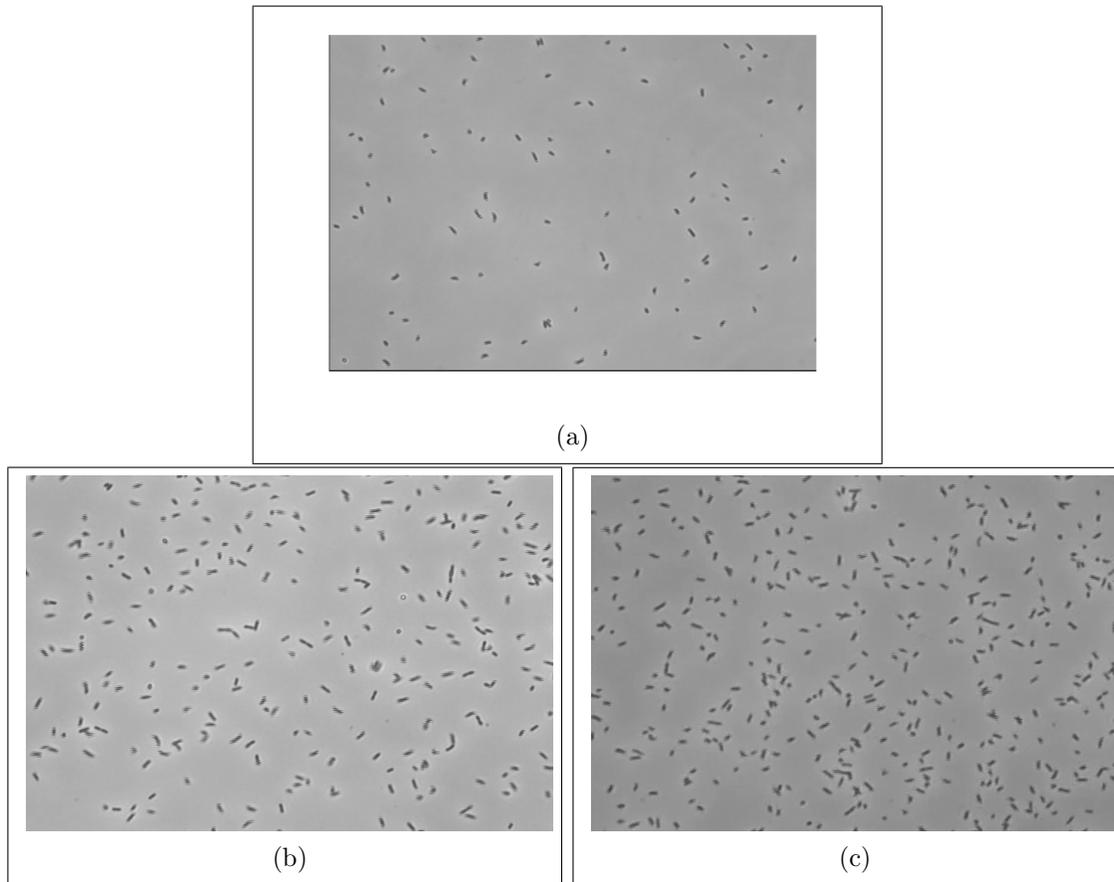


Figura 3.4: Se muestran las imágenes para fracciones de área de $\Phi_1 = 0.01$ (a), $\Phi_2 = 0.03$ (b) y $\Phi_3 = 0.06$ (c).

La Figura 3.4 muestra tres imágenes correspondientes a las concentraciones utilizadas en nuestros experimentos. Con el objetivo de explicar el procesamiento, se tomará como ejemplo la concentración más diluida (Figura 3.4 a) y se le aplicará la secuencia de pasos previamente mencionados, para obtener las trayectorias de las bacterias.

La restauración de imágenes se llevó a cabo por medio de una corrección del contraste ya que los niveles de gris entre el fondo y las bacterias no es suficiente para una localización precisa de las posiciones de las bacterias. El cambio de contraste se realizó por medio de la función ‘imadjust’, que utiliza a su vez una función gamma para resaltar la imagen con parámetros de intensidad entre cero y 255.

Primeramente a la imagen se le aplica un filtro espacial que suaviza la imagen y suprime el fondo. Esto se consigue haciendo una convolución de la imagen con un núcleo gaussiano cuyo ancho es igual al diámetro de la mancha luminosa. Una convolución es un proceso general que puede ser usado para varios tipos de suavizado, procesamiento

de señales, corrimientos, etc. Así, este proceso resalta los objetos que tengan un perfil gaussiano y suprime los que lo tengan.

$$A(x, y) = \frac{1}{2w + 1} \sum_{i,j=-w}^w A(x + i, y + i) \quad (3.1)$$

La convolución para hacer la separación del fondo de la superficie Gaussiana se genera con la ecuación (3.1) con normalización $B = [\sum_{i=-w}^w \exp(-(i^2/4\lambda_n^2))]^2$ en donde λ_n es la correlación del ruido o longitud en pixeles del ruido presente en la imagen. Como ambas ecuaciones se implementan como convolución se pueden hacer en el kernel siguiente.

$$A_{\lambda_n} = \frac{1}{B} \sum_{i,j=-w}^w A(x + i, y + j) \exp(-\frac{i^2 + j^2}{4\lambda_n^2}) \quad (3.2)$$

$$K(x, y) = \frac{1}{K_0} \left[\frac{1}{B} \exp(-\frac{i^2 + j^2}{4\lambda_n^2}) - \frac{1}{(2w + 1)^2} \right] \quad (3.3)$$

La constante de normalización $K_0 = \frac{1}{B} \sum_{i=-w}^w \exp(i^2/2\lambda_n^2)$ facilita la comparación de imágenes con distinto w y junto con el parámetro λ_n se pueden analizar los videos de distinta resolución y diferentes problemas de ruido.

La localización de las bacterias se hace a partir de los puntos con mayor intensidad localizados en el paso anterior como candidatos para ser centroides de las bacterias si no hay otro en el radio de w con una intensidad mayor del treinta por ciento superior.



Figura 3.5: Puntos con mayor intensidad en blanco son las bacterias que superaron el umbral.

Una refinación de la posición del centroide se realiza con el punto de máxima intensidad local en (x,y) , que se presume se encuentra en el centro de la bacteria en (x_0, y_0) .

La refinación de la posición del centroide se lleva a cabo calculando los momentos del nivel de gris en las direcciones x y y con la ecuación (3.5) en donde $m_0 = \sum_{i^2+y^2 \leq w^2} A(x +$

$i, y + j$) es la integral de la intensidad de la bacteria. Si cada una de las magnitudes de los errores $|\epsilon_x|$, $|\epsilon_y|$ de posición es mayor a 0,5 la posición es redefinida con $(x_0, y_0) = (x + \epsilon_x, y + \epsilon_y)$. El índice i se utiliza para calcular ϵ_x con una posición inicialmente medida en (x, y) y j para ϵ_y :

$$\begin{pmatrix} \epsilon_x \\ \epsilon_y \end{pmatrix} = \frac{1}{m_0} \sum_{i^2+j^2 \leq w^2} \begin{pmatrix} i \\ j \end{pmatrix} A(x+i, y+j) \quad (3.4)$$

El seguimiento de la bacteria se crea al calcular los momentos de cada una de las bacterias por medio de sus distribuciones de intensidad como las ecuaciones (3.5) y (3.6) en donde (x, y) son la posición de los centroides.

$$m_0 = \sum_{i^2+j^2 \leq w^2} A(x+i, y+j) \quad (3.5)$$

$$m_2 = \frac{1}{m_0} \sum_{i^2+j^2 \leq w^2} (i^2 + j^2) A(x+i, y+j) \quad (3.6)$$

De estos momentos se tiene entonces que m_0 es la integral de la intensidad de la mancha brillante que representa a la bacteria y m_2 es una medida de que tan lejos se encuentra la distribución de pixeles del centro, o bien el cuadrado del radio de giro. El centroide marcado con un punto de color sobre las bacterias contabilizadas se muestra en la Figura (3.6).

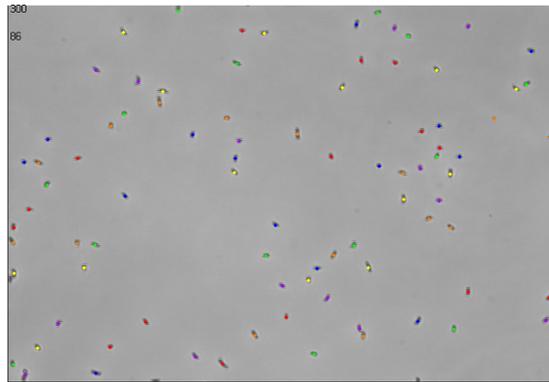


Figura 3.6: Imagen de bacterias identificadas.

Para ligar las posiciones de las bacterias entre la imagen tomada un instante de tiempo t y la imagen adquirida un tiempo anterior t_0 se hace una determinación de correspondencia, es decir, que las trayectorias se construyen tomando en cuenta los objetos más próximos entre si entre dos cuadros consecutivos y considerando que no hay traslape entre las 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 siguiente ecuación:

$$P(\delta|\tau) = \frac{1}{\sqrt{4\pi D\tau}} \exp\left(-\frac{\delta^2}{4D\tau}\right) \quad (3.7)$$

donde D es el coeficiente de motilidad aleatorio (en analogía con el coeficiente de difusión browniano) dado por $D = \frac{V_0^2\tau}{2}$, donde V_0 es la velocidad media de las bacterias, y τ es el tiempo medio de corrida de una bacteria. Para un ensamble similar de N bacterias idénticas, la probabilidad correspondiente es como se representa en la siguiente ecuación:

$$P(\delta|\tau) = \left(\frac{1}{\sqrt{4\pi D\tau}}\right)^N \exp\left(-\sum_{i=1}^N \frac{\delta_i^2}{4D\tau}\right) \quad (3.8)$$

Lo más parecido a la asignación de etiquetas o indicadores de 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 en casos en que las bacterias salgan del campo de visión se toman como "perdidas" para evitar conflictos. Ligar las trayectorias es posibles sólo si la resolución temporal entre las imágenes es adecuada para distinguir entre la separación de bacterias a y su desplazamiento máximo entre dos cuadros consecutivos.

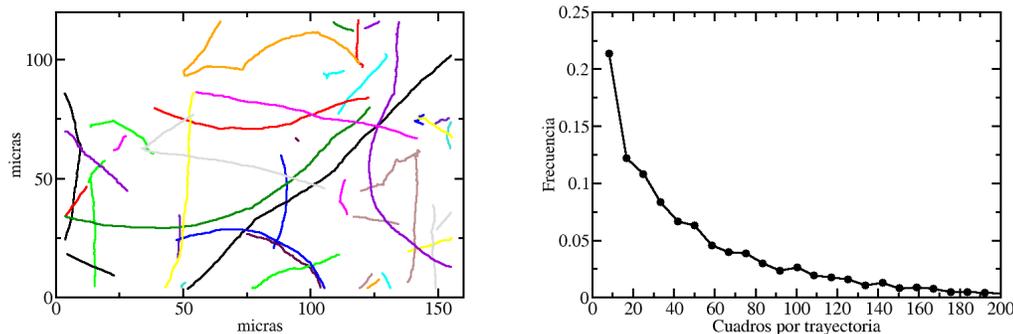


Figura 3.7: (a) Ilustración de las trayectorias de las bacterias. Los distintos colores identifican a bacterias diferentes. (b) Distribución de número de cuadros por trayectoria.

Los análisis de las trayectorias para obtener los parámetro de velocidad y ángulos de giro, toman en cuenta el sistema de referencia de la esquina superior izquierda como el cero, a la derecha el eje X positivo y hacia abajo el eje Y positivo.

Las trayectorias que se obtuvieron Figura 3.7 (a) fueron analizadas con el sistema de referencias mencionado para obtener las velocidades y los ángulos de giro, la velocidad se calcula como $\mathbf{V} = \mathbf{V}_x + \mathbf{V}_y$ y estas a su vez como $V_x = \frac{x_{i+1} - x_i}{\Delta t}$ y $V_y = \frac{y_{i+1} - y_i}{\Delta t}$, y por último el ángulo de giro como $A = \arctan\left(\frac{V_{y_{i+1}} - V_{y_i}}{V_{x_{i+1}} - V_{x_i}}\right)$.

En la Fig. 3.7(a) ilustramos algunas de las trayectorias que se obtuvieron en una suspensión de bacterias con una fracción de área $\Phi_1 = 0.001$. Como se puede observar, algunas trayectorias son cortas, mientras que otras cubren casi por completo el área

de observación. En la Fig. 3.7(b) mostramos la distribución del número de cuadros o longitud temporal para las trayectorias de este experimento en particular. Como se puede apreciar, las trayectorias que dominan son cortas. Por otra parte, las trayectorias en los experimentos se pueden agrupar principalmente en dos clases: 1) Trayectorias rectilíneas y 2) trayectorias circulares.

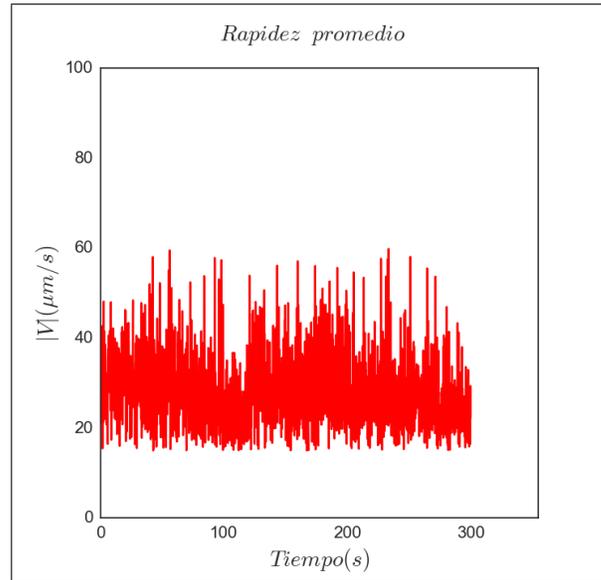


Figura 3.8: Rapidez promedio en el tiempo.

A partir de los datos recolectados es posible conocer la rapidez promedio como función del tiempo durante nuestros experimentos (5 mins, o 300 segundos). Lo anterior se muestra en la Figura 3.8. Como es de observarse, la rapidez promedio en todo el intervalo de tiempo es estable, esto es un indicativo de que en la muestra no hay presencia de flujos en la muestra o quimotaxis de oxígeno por parte de las bacterias. Dichos fenómenos tienen como incrementos o decrementos abruptos en la rapidez media de toda la muestra. Por lo tanto, todos los experimentos seleccionados para nuestra estadística tienen como característica una rapidez estable en el tiempo que dura el experimento. Se grabaron un total de 18 videos de 5 minutos correspondientes a las fracciones de área mencionadas. Reportamos el número de grabaciones por cada fracción de área las cuales corresponden a 11 grabaciones para un total de 55 *min*, 4 videos con un tiempo de grabación de 20 *min* y 3 experimentos con total de 15 *min* para las fracciones de área Φ_1 , Φ_2 y Φ_3 , respectivamente.

En este capítulo se reportan los resultados de las mediciones realizadas en suspensiones de bacterias *E. coli* altamente confinadas entre dos placas paralelas y a diferentes concentraciones. Como se indicó anteriormente, el procesamiento de imágenes que se utiliza permitió conocer las trayectorias de las bacterias a tres diferentes fracciones de área $\Phi_1 = 0.01$, $\Phi_2 = 0.03$ y $\Phi_3 = 0.06$. De las trayectorias de bacterias extraídas de las grabaciones procedimos a hacer un análisis de las mismas a varios niveles, con el fin de caracterizar el comportamiento de las bacterias bajo confinamiento.

4.1. Propiedades dinámicas de bacterias *E. coli* en un medio cuasi bidimensional

4.1.1. Rapidez promedio de las bacterias

En la Fig. 4.1 se presenta la distribución de valores de la rapidez para tres fracciones de área Φ por parte de las bacterias. Las fracciones de área Φ_1 , Φ_2 y Φ_3 corresponden a concentraciones de $c = 1 * 10^9$, $c = 3 * 10^9$ y $c = 7 * 10^9$ células/ mL , respectivamente. La rapidez promedio en estos tres casos toma los valores $\langle v \rangle = 25,58 \mu m/s$, $\langle v \rangle = 28,05 \mu m/s$ y $\langle v \rangle = 20,91 \mu m/s$, respectivamente. Aunque estos valores son consistentes con los reportados en la literatura [34], nótese que, intuitivamente, se esperaría que la rapidez promedio disminuyera conforme aumenta la fracción de área debido a los choques entre bacterias, pero nuestros resultados indican que existen condiciones en las que la rapidez aumenta cuando la fracción de área aumenta. Este es un efecto anómalo que también se ha reportado en la literatura [34]. En el trabajo anteriormente mencionado estudian la dinámica de bacterias *E. coli* en tres dimensiones como función

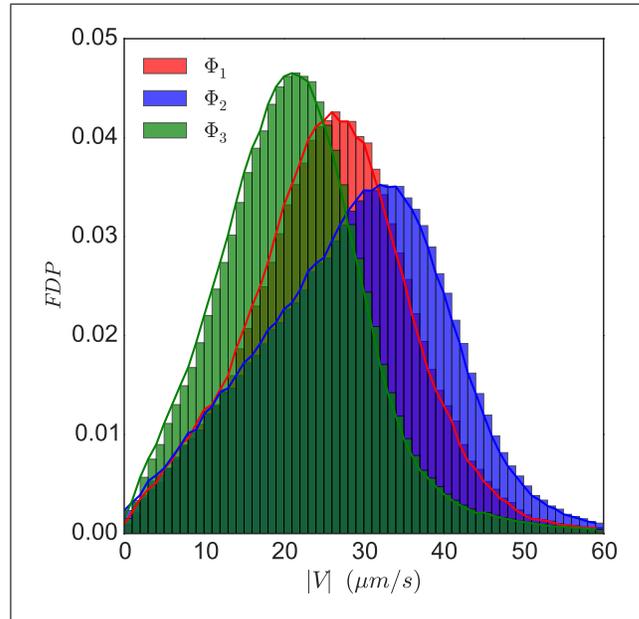


Figura 4.1: Distribución de rapidez para fracciones de área $\Phi_1 = 0.01$, $\Phi_2 = 0.03$ y $\Phi_3 = 0.06$.

de la concentración. Ellos reportan una concentración crítica en la cual se observa un cambio notorio en la difusión de las bacterias. En su trabajo el comportamiento anterior es justificado debido a que las bacterias están separadas a distancias menores a $10 \mu\text{m}$. A estas distancias, las interacciones directas o hidrodinámicas podrían ocasionar alineaciones nemáticas entre pares de bacterias.

4.1.2. Distribución de ángulos de giro

Por otro lado, vemos que las bacterias no siguen una trayectoria estrictamente rectilínea, sino que tienden a desviarse. Una forma de caracterizar este comportamiento es a través de la desviación angular entre dos saltos consecutivos. Dadas las posiciones $\vec{r}(i)$, $\vec{r}(i+1)$ y $\vec{r}(i+2)$ de una bacteria en tres cuadros consecutivos, el ángulo θ entre los dos segmentos de recta entre los dos saltos se puede determinar mediante el producto punto $\cos(\theta) = \vec{A} \cdot \vec{B} / |\vec{A}| |\vec{B}|$, donde $\vec{A} = \vec{r}(i+1) - \vec{r}(i)$ es el vector que representa el primer salto, $\vec{B} = \vec{r}(i+2) - \vec{r}(i+1)$ representa el vector del segundo desplazamiento, y donde $|\vec{A}|$ y $|\vec{B}|$ son las magnitudes de los vectores.

Los resultados para la distribución de estos ángulos, a las tres fracciones de área estudiadas, se presentan en la Fig. 4.2. De esta figura vemos que la desviación dominante es alrededor de cero grados, es decir, en promedio la trayectoria de las bacterias se desvía poco de una línea recta siendo el valor absoluto de la media de 22.19, 28.80 y 31.13 grados para fracciones de área de Φ_1 , Φ_2 y Φ_3 . Las principales diferencias se aprecian más claramente en la región central de las distribuciones, en donde podemos apreciar que el

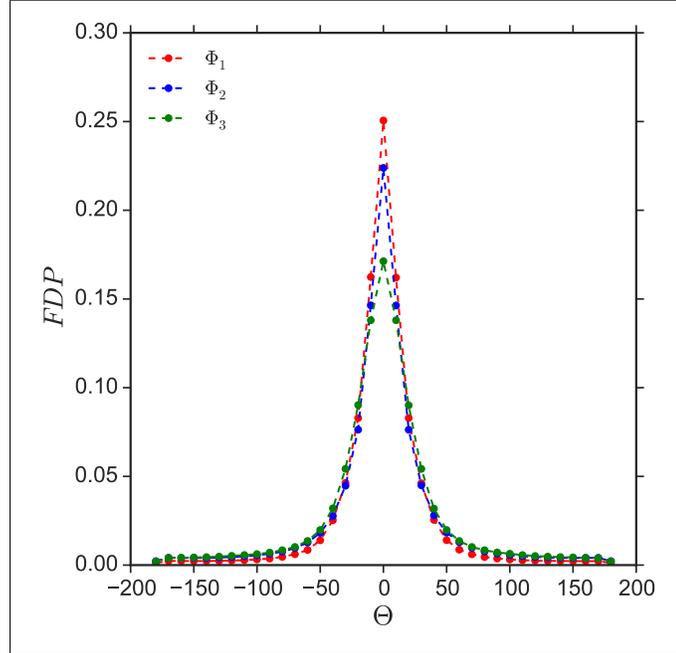


Figura 4.2: Distribución de la desviación angular para fracciones de área $\Phi_1 = 0.01$, $\Phi_2 = 0.03$ y $\Phi_3 = 0.06$.

pico disminuye conforme aumenta la fracción de área. En comparación con mediciones en el bulto [35], los valores para los ángulo de giro parecen disminuir. Al parecer esto se debe a la geometría de confinamiento.

4.1.3. Desplazamiento cuadrático medio

Una de las cantidades físicas más importantes en el área de la ciencia coloidal es el desplazamiento cuadrático medio (DCM), el cual se define como

$$W(t) = \langle (\Delta \vec{r}(t))^2 \rangle = \langle \Delta \vec{r}(t) \cdot \Delta \vec{r}(t) \rangle \quad (4.1)$$

donde $\Delta \vec{r}(t) = \vec{r}(t_0 + t) - \vec{r}(t_0)$ es el desplazamiento vectorial de una bacteria que tiene lugar entre los tiempos t_0 y $t_0 + t$. La notación $\langle A(t) \rangle$, para alguna variable dinámica $A(t)$ cualquiera, representa el promedio de $A(t)$ tanto en el tiempo como en el número de células en el sistema.

Para nuestros sistemas de bacterias, el DCM a diferentes concentraciones se presenta en la Fig. 4.3. De estos datos vemos que, efectivamente, el comportamiento del DCM no es lineal en el tiempo a tiempos cortos, sino que tiene un comportamiento superdifusivo es decir de la forma $W(t) \sim t^\alpha$, con $1 < \alpha < 2$. De nuestros experimentos tenemos que el DCM de las bacterias manifiesta dos comportamientos claros, uno a tiempos cortos y el otro a tiempos largos. A tiempos cortos es superdifusivo con $1,5 < \alpha < 2$, y a tiempos largos es difusivo, es decir, $\alpha \approx 1,0$.

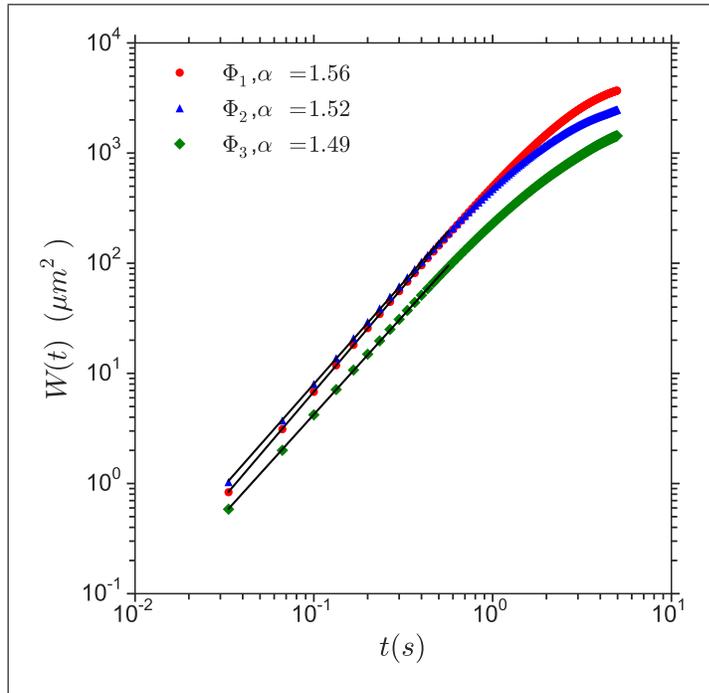


Figura 4.3: Desplazamiento cuadrático medio para fracciones de área $\Phi_1 = 0.01$, $\Phi_2 = 0.03$ y $\Phi_3 = 0.06$.

En la Fig. 4.3 vemos que el DCM experimenta una disminución al aumentar la fracción de área en la muestra, debido a que la distancia promedio entre bacterias, d_m , disminuye al aumentar la fracción de área. Esta distancia característica pasa de $d_m = 17.88 \mu m$ para $\Phi_1 = 0.01$, a $d_m = 9.25 \mu m$ para $\Phi_2 = 0.03$, y para $\Phi_3 = 0.06$, reportamos una distancia promedio entre células de $d_m = 6.36 \mu m$. Además, en la figura se reporta el exponente de difusión α para cada concentración. Como vemos, todos los exponentes α reportados son mayores a uno, lo que corresponde al régimen superdifusivo. Es conocido que a partir de la pendiente del desplazamiento cuadrático medio se puede conocer los tiempos de corrida [10]. Por lo tanto se realizó un ajuste sobre el régimen superdifusivo de cada concentración con el propósito de conocer los tiempos de corrida. A partir de los ajustes reportamos los tiempos de corrida para cada fracción de área con valores de $\tau = 1.5 s$, $\tau = 1.16 s$ y $\tau = 1.03 s$ para las fracciones de área que se indican en la figura. Debido a que durante una corrida las bacterias se mueven en promedio a una velocidad constante, podemos entonces relacionar los tiempos de corrida τ de la fracción de área, la velocidad promedio en la fracción de área v_0 y la distancia de corrida promedio d_c mediante la expresión $d_c = v_0 \tau$. De esta manera es posible obtener los valores para la distancia de corrida promedio en cada una de las fracciones de área. Los valores característicos corresponden a: $d_c = 38.37 \mu m$ para Φ_1 , $d_c = 32.54 \mu m$ y $d_c = 21.53 \mu m$, para las fracciones de área Φ_2 y Φ_3 respectivamente. Como podemos ver, las distancias recorridas decaen como función de la fracción de área, esto es de

esperarse ya que al aumentar la fracción de área por parte de las bacterias recorren una menor distancia antes de encontrarse con una bacteria vecina.

4.2. Interacciones hidrodinámicas entre pares de bacterias

Para investigar las interacciones hidrodinámicas entre células motiles consideramos el tensor de correlación de velocidades entre pares de células, considerando un sistema efectivo bidimensional.

A partir de las trayectorias de bacterias, obtenidas con el algoritmo de seguimiento de partículas, se evaluaron las funciones de correlación de velocidades instantáneas (entre dos cuadros consecutivos) para la componente longitudinal (LL , Ecu. 4.2) y transversal (NN , Ecu. 4.3) a la línea que une a los cuerpos de las bacterias en el instante de tiempo t_0 . Para facilitar la medición se descomponen las trayectorias de dos bacterias como se muestra en la Figura 4.4, entre los instantes de tiempo t_0 y t (donde $t - t_0 = 1/30s$), en los cuales las bacterias se desplazan solo una pequeña fracción de su tamaño ($\sim 1 \mu m$ en este trabajo) de tal manera, que no ocurre un cambio significativo en la configuración del sistema. Si consideramos que el centro del cuerpo de una bacteria se encuentra en el origen y la otra bacteria a una distancia \vec{r} cuyo centro se encuentra en el eje y , de tal forma que las velocidades están dadas por $\vec{v}_1 = v_{x1}\hat{x} + v_{y1}\hat{y}$ y $\vec{v}_2 = v_{x2}\hat{x} + v_{y2}\hat{y}$, entonces las componentes longitudinal y transversal de la correlación entre las velocidades está dada por:

$$R_{LL}(r) = \frac{\langle v_{x1}v_{x2} \rangle}{\langle u_0^2 \rangle}, \quad (4.2)$$

$$R_{NN}(r) = \frac{\langle v_{y1}v_{y2} \rangle}{\langle u_0^2 \rangle}, \quad (4.3)$$

En ambas ecuaciones v denota la velocidad de la bacteria en la dirección en x o y , $r = x_2 - x_1$ es el vector de separación entre el par de bacterias, u_0 es la rapidez promedio del par de bacterias y los brackets indican el promedio entre todos los pares de bacterias en el tiempo.

Hacemos uso de un archivo de datos obtenido del programa de seguimiento de partículas, el cual contiene cuatro columnas, posición en X , posición en Y , tiempo en cuadros de $1/30 s$ y una etiqueta de identificación de partícula. A partir de esta información se calculan las velocidades para todas las partículas. Se analiza entre pares de bacterias b_i, b_j las correlaciones de velocidades para todos los pares.

Como se muestra en la Figura 4.4, el primer eje une los centros geométricos de las bacterias y es denominado longitudinal (LL), el segundo eje es perpendicular al primero y se conoce como transversal (NN). Las trayectorias obtenidas del programa de seguimiento de partículas sirven como entrada al código que calcula las correlaciones.

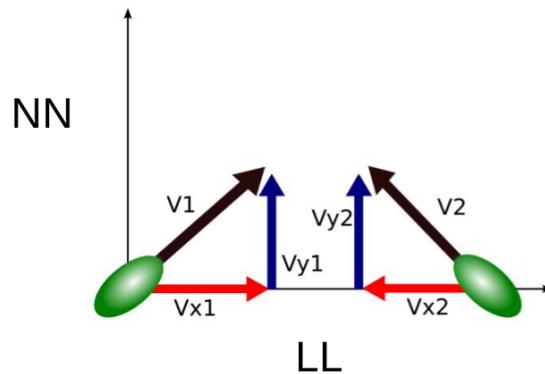


Figura 4.4: Diagrama que ilustra las componentes de la correlación de velocidades.

Nuestros resultados para la correlación longitudinal de la velocidad, $R_{LL}(r)$, para tres concentraciones de células, se muestran en la Figura (4.5), y corresponden a las curvas en símbolos rellenos. Como podemos ver, esta correlación longitudinal es positiva, y se manifiesta de manera importante desde una distancia de $2 \mu m$ hasta una distancia aproximada de $10 \mu m$. En este intervalo, la función de correlación es creciente a las distancias más pequeñas, alcanza un máximo en aproximadamente $r = 3.25 \mu m$, y después decae monótonicamente con la distancia de separación. Un punto notable en estos resultados es que la distancia mínima que se observa es de alrededor de $2 \mu m$.

Interesantemente la función de correlación longitudinal es independiente de la concentración para distancias mayores a $3 \mu m$, lo cual indica que domina la interacción hidrodinámica entre pares de bacterias.

Además, estos resultados experimentales indican que las bacterias se acoplan en configuraciones paralelas a distancias cercanas, pero que las correlaciones longitudinales se maximizan cuando la distancia entre ellas es aproximadamente el tamaño de una de las bacterias, y que finalmente las correlaciones se pierden cuando se han separado una distancia equivalente a 3 cuerpos celulares (y cerca de la longitud combinada del cuerpo celular más el manojito de flagelos). Así mismo, los datos en la figura nos indican que estas características se preservan tanto a fracciones de área bajas como a fracciones de área altas. De manera general, un aumento de hasta 6 veces con respecto a la fracción de área más baja, no tiene un efecto significativo sobre el comportamiento de la función de correlación longitudinal. Sin embargo, para separaciones menores a $3 \mu m$, los resultados muestran que hay una independencia con la concentración de efectos tales como interacciones estéricas e interacciones hidrodinámicas de corto alcance. A estas distancias se llevan a cabo interacciones de contacto entre fimbrinas y flagelos, además de efectos de lubricación.

Por otro lado, en la Figura (4.5) también se presentan nuestros resultados para la componente transversal de la correlación de velocidades, $R_{NN}(r)$, los cuales están representados por las curvas con símbolos vacíos. En esta ocasión notamos que la correlación

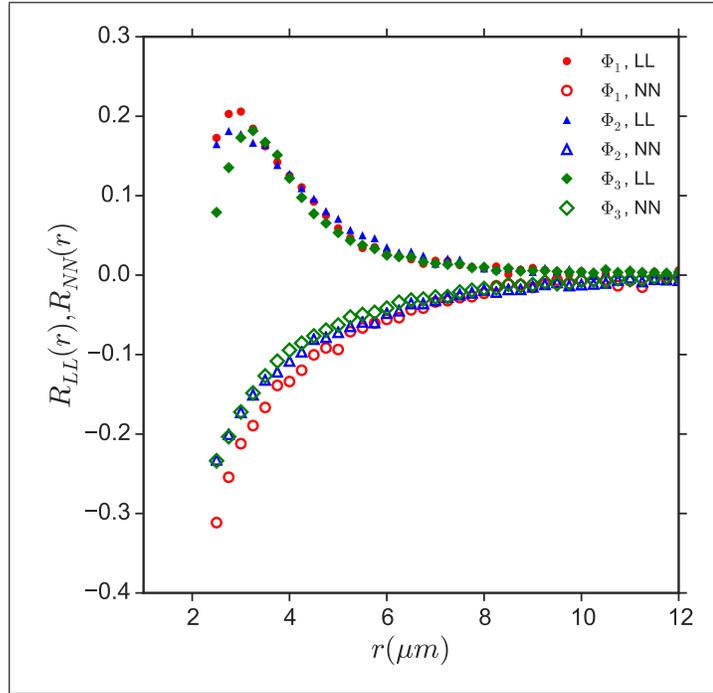


Figura 4.5: Correlación de velocidades para las fracciones de área $\Phi_1 = 0.01$, $\Phi_2 = 0.03$ y $\Phi_3 = 0.06$. Simbolos sólidos: corresponden a la componente longitudinal de la correlación $R_{LL}(r)$. Simbolos vacíos: corresponden a la componente transversal $R_{NN}(r)$.

a lo largo de la componente transversal es negativa, sugiriendo que las bacterias se desplazan en direcciones opuestas en los instantes de tiempo consecutivos. De manera similar a la componente longitudinal, a distancias pequeñas las bacterias manifiestan una alineación de los semi-ejes mayores debido a las restricciones físicas de la bacteria, por otro lado a diferencia de la componente longitudinal, la alineación que presentan sería antiparalela en su máxima correlación y decaería de manera monótonica a lo largo de todo el intervalo de medición. Esto nos indica que la correlación decrece conforme aumenta la distancia de separación entre el par de bacterias. Además observamos que esta correlación también tiene un alcance de aproximadamente $10 \mu m$. Así mismo, podemos ver que la magnitud de la correlación transversal disminuye ligeramente cuando la fracción de área aumenta, sin embargo, esto no afecta el comportamiento global a lo largo de la correlación.

Finalmente, a continuación presentamos, en escala log-log, los resultados tanto para $R_{LL}(r)$ como para $R_{NN}(r)$.

A los resultados obtenidos para la componente longitudinal se les realizó un ajuste por mínimos cuadrados con una función de ajuste que decae como a/r^3 , tal como se muestra en la Figura 4.6a. La manera en que decae la correlación es consistente con lo reportado para un cuadrupolo [28]. Dado que el ajuste es válido para todo el intervalo en que se mantiene el acoplamiento, indicaría que la contribución importante en esta componente

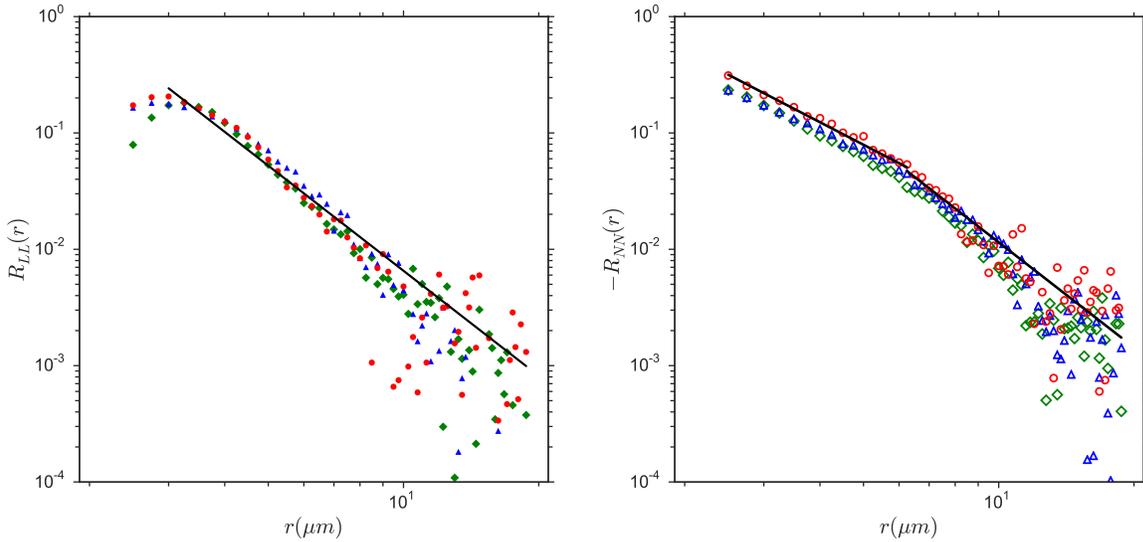
(a) Correlación longitudinal (LL).(b) Correlación transversal (NN).

Figura 4.6: Correlación de velocidades a fracciones de área $\Phi_1 = 0.01$, $\Phi_2 = 0.03$ y $\Phi_3 = 0.06$. (a) La línea negra sólida indica el decaimiento de a/r^3 para la correlación LL conforme aumenta la distancia de separación entre bacterias. (b) La línea negra sólida indica el decaimiento de $-b/r^2$ a distancias menores a $6 \mu m$ y $-a/2r^3$ a distancias mayores a $6 \mu m$ para la correlación NN conforme aumenta la distancia de separación entre bacterias.

sería la de un cuadrupolo.

Por su parte, la correlación transversal presenta dos tipos de comportamientos Figura 4.6(b). A distancias pequeñas se observa un decaimiento del tipo $-b/r^2$, que podría deberse a una mezcla de efectos de contacto entre bacterias y la posible contribución de un dipolo. Sin embargo llama la atención la presencia de una transición en el decaimiento de la correlación a distancias mayores a $6 \mu m$, cuyo ajuste es de $-a/2r^3$.

A partir de los ajustes realizados sobre cada una de los componentes podemos decir que a distancias mayores a $6 \mu m$ el mejor ajuste de los resultados obtenidos corresponden a un decaimiento del tipo $1/r^3$.

4.3. Dispersión entre pares de bacterias

Para entender mejor el efecto que tienen las interacciones hidrodinámicas entre pares de bacterias cuando se aproximan entre sí a distancias comparables con su tamaño (longitud del eje mayor del cuerpo más el manojito de flagelos), se analizarán el ángulo de encuentro, el cambio de ángulo, la distancia mínima de encuentro, y la rapidez de aproximación y alejamiento, los cuales son descritos a continuación.

Considérese el nado de un par de bacterias. Las trayectorias que estas siguen pueden descomponerse en dos etapas: una primera etapa de aproximación entre el par de células, hasta llegar a una distancia mínima de encuentro entre centros de los cuerpos de las bacterias y una segunda etapa de alejamiento. Es decir, consideremos el acercamiento y alejamiento de un par de bacterias, tomando como punto de referencia el instante de tiempo t_0 en el cual las células están lo más cerca una de otra. Bajo estas condiciones, definimos el ángulo de encuentro θ_e a través de la relación $\cos(\theta_e) = \vec{A}_i \cdot \vec{B}_j / |\vec{A}_i| |\vec{B}_j|$, en donde $\vec{A}_i = \vec{r}_i(t_0) - \vec{r}_i(t_p)$ es el vector que representa la trayectoria de la i -ésima bacteria desde el tiempo t_p previo al encuentro hasta el tiempo t_0 en que ocurre el máximo acercamiento (ver figura 4.7). Análogamente, $\vec{B}_j = \vec{r}_j(t_0) - \vec{r}_j(t_p)$ es el vector que representa la trayectoria de la j -ésima bacteria. De nuevo, $|\vec{A}_i|$ y $|\vec{B}_j|$ son las magnitudes de los vectores \vec{A}_i y \vec{B}_j .

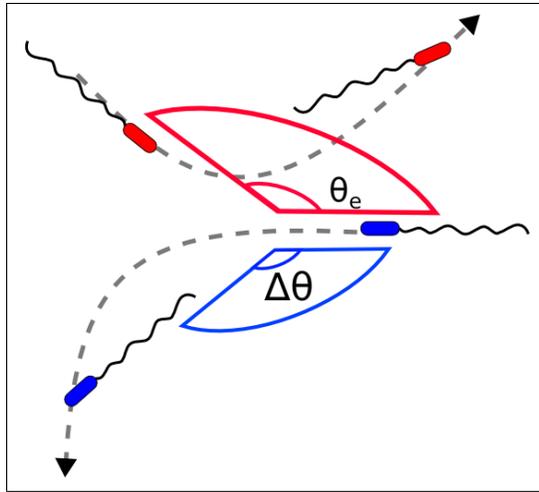


Figura 4.7: Diagrama de encuentro entre dos bacterias: Se muestra la trayectoria (línea gris punteada) que siguen la bacteria azul y la trayectoria de la bacteria roja al encontrarse. Se muestra el cambio de ángulo $\Delta\theta$, para la bacteria azul y el ángulo de encuentro θ_e , entre la bacteria azul y roja.

De manera análoga, podemos caracterizar la desviación de la trayectoria de cada célula a través del cambio de ángulo $\Delta\theta$ que experimenta una célula después de un evento de dispersión con otra célula tomando como referencia, el punto de máximo acercamiento. De nuevo, el cambio de ángulo $\Delta\theta$ de la i -ésima célula se puede obtener de la relación

$\cos(\Delta\theta) = \vec{C}_p \cdot \vec{C}_d / |\vec{C}_p||\vec{C}_d|$, donde $\vec{C}_p = \vec{r}_i(t_0) - \vec{r}_i(t_p)$ y $\vec{C}_d = \vec{r}_i(t_d) - \vec{r}_i(t_0)$ son los vectores que caracterizan el desplazamiento de la i -ésima célula en los tiempos t_p , t_0 y t_d , donde t_d es el tiempo transcurrido después del instante de tiempo t_0 . En nuestras mediciones, estos tiempos están considerados en una ventana de análisis de 21 cuadros, es decir, 0.33 *seg* ántes y 0.33 *seg* después del evento de máximo acercamiento en t_0 . En esta ventana de análisis las bacterias se desplazan una distancia aproximada de 20 μm que corresponde a la longitud total de interacción entre dos células.

A partir de la evaluación del ángulo de encuentro, los resultados se dividieron en dos grupos. El primer grupo comprende a las trayectorias de encuentro entre pares de bacterias ocurridos a todos los ángulos de encuentro posibles entre los pares, reportamos el número n , de trayectorias para las fracciones de área Φ_1 , Φ_2 y Φ_3 , respectivamente $n_1 = 766$, $n_2 = 1192$, $n_3 = 2335$. Mientras tanto, el segundo grupo toma en cuenta únicamente trayectorias entre pares de bacterias cuyo ángulo de encuentro fuese entre 150 y 180 grados, buscando analizar encuentros cuasi-frontales, en cuyo caso se reportan un número n de trayectorias $n_1 = 697$, $n_2 = 429$, $n_3 = 768$ para Φ_1 , Φ_2 y Φ_3 , respectivamente.

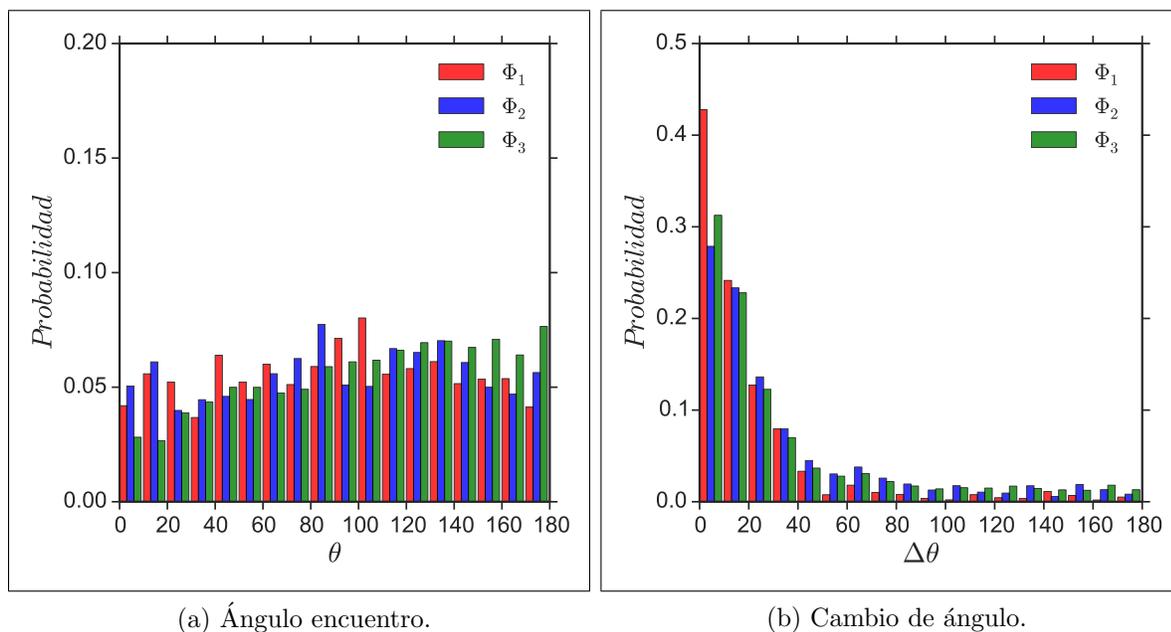


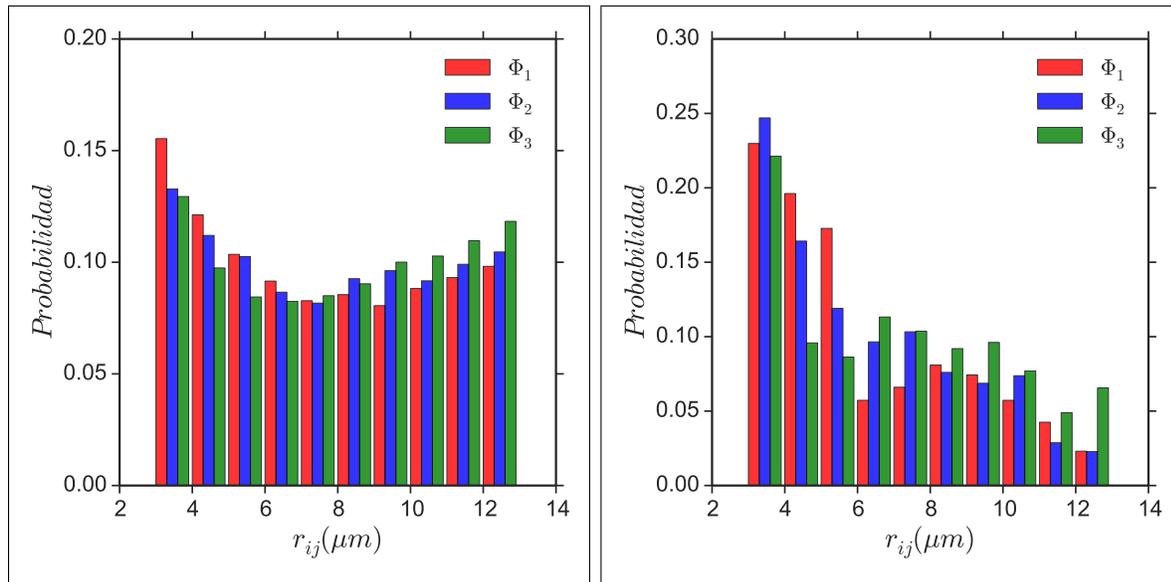
Figura 4.8: (a) Ángulo de encuentro para fracciones de área $\Phi_1 = 0.01$, $\Phi_2 = 0.03$ y $\Phi_3 = 0.06$. El histograma indica que todos los ángulos de encuentro son igualmente posibles, con una desviación estándar $0.004 < s < 0.008$. (b) Cambio de ángulo para las mismas fracciones de área. El histograma indica una tendencia por parte de las bacterias a desviarse muy poco su orientación después de un encuentro, con una desviación estándar $0.0005 < s < 0.01$.

En la Figura 4.8(a) presentamos nuestros resultados para el ángulo de encuentro, en forma de histograma de frecuencia, para las tres fracciones de área $\Phi_1 = 0.01$, $\Phi_2 = 0.03$

y $\Phi_3=0.06$. Esta figura muestra que bacterias en confinamiento pueden acercarse una con otra en cualquier ángulo posible y el aumento en fracción de área no modifica dicho comportamiento. Que no exista una preferencia de encuentro entre las bacterias indica que las interacciones en nuestro sistema no están restringidas a configuraciones de encuentro específicas, y por lo tanto se manifiestan de manera casi uniforme todos los ángulos posibles.

Por su parte, la distribución del cambio de ángulo que presentamos en la Figura 4.8(b) muestra una tendencia por parte de las bacterias a sufrir una reorientación muy baja. Esta tendencia la comparten las tres fracciones de área analizadas, las cuales se muestran en barras rojas, azules y verdes para las fracciones de área $\Phi_1 =0.01$, $\Phi_2 =0.03$ y $\Phi_3=0.06$, respectivamente, teniendo un cambio en la dirección de 18.10, 31.27 y 31.92 grados después de un encuentro con otra bacteria. De hecho, los resultados en la Figura 4.8(b) son muy similares a los mostrados en la Figura 4.2, por lo que se infiere que para estas concentraciones las bacterias siguen trayectorias con desviaciones pequeñas. Esto también parece indicar que, como el comportamiento promedio no se altera, los encuentros entre bacterias no inducen tumbos, lo cual es interesante, ya que se ha reportado que el encuentro entre bacterias puede inducir una reorientación por medio de interacciones estéricas o interacciones hidrodinámicas de corto alcance [12]. Trabajos previos reportan que al interactuar *E. coli* con superficies solidas los tumbos se suprimen un 50 % y las reorientaciones se restringen a direcciones paralelas a la superficie [36]. Por lo tanto, quizá una de las razones de que existe una desviación tan baja por parte de las bacterias puede deberse al afecto de las paredes confinantes que evitan la manifestación del tumbo de las bacterias para poder reorientarse.

A continuación, se presentan los resultados correspondientes de la distancia mínima de encuentro entre pares de bacterias. Como primer análisis, en la Figura 4.9(a) se reporta la distribución de r_{ij} para todos los eventos registrados en los experimentos. Las distintas barras de color identifican las tres fracciones de área de bacterias que se emplearon para estos experimentos. Como se puede apreciar, la forma de la distribución es distintiva, con un primer máximo a la distancia mas pequeña registrada para las trayectorias analizadas. Aunque la mayoría de los eventos suceden en la región cercana a $r_{ij} =3 \mu m$ de separación, los datos indican tres regiones características: en la región $3 \mu m < r_{ij} < 6 \mu m$ la distribución es alta, disminuyendo conforme r_{ij} aumenta. En la región $6 \mu m < r_{ij} < 10 \mu m$ es donde se presentan las distancias de máximo acercamiento menos probales. Finalmente, en la región $10 \mu m < r_{ij} < 13 \mu m$ se observa que la probabilidad de observar estas distancias de acercamiento aumentan con la distancia. Como segundo caso se describe los resultados para la distribución de distancias de máximo acercamiento que corresponden a “encuentros” frontales. Como podemos ver, la distribución es muy diferente que la presentada en la Figura 4.9(a). En este caso, el histograma muestra un máximo bien definido entre 3 y 4 μm y una distribución prácticamente uniforme para distancias mayores a 4 μm . Estos datos sugieren que bajo la restricción en el ángulo de encuentro ($150 < \theta < 180$ grados) la mayoría de las



(a) Distancia de máxima aproximación para todos los ángulos de encuentro. (b) Distancia de máxima aproximación para ángulos de encuentro entre 150 y 180 grados.

Figura 4.9: Histograma de máxima aproximación entre pares de bacterias: (a) para todos los ángulos de encuentro; (b) para ángulos de encuentro en el rango entre 150 grados y 180 grados.

bacterias se aproximan unas a otras a distancias del orden del tamaño de las bacterias y solo una fracción de bacterias se dispersa a distancias mayores a $6 \mu m$. Nótese que estas observaciones y tendencias son las mismas para todas la fracciones de área, lo que sugiere independencia de la concentración.

Para complementar la información de las secciones anteriores, a continuación reportamos nuestros resultados para la rapidez a la que se aproximan y alejan un par de bacterias. En principio, esta sería una manera indirecta de medir el efecto de las interacciones hidrodinámicas sobre el movimiento de las bacterias.

Así, en la Figura (4.10a) reportamos la rapidez de encuentro en color azul, y la velocidad de alejamiento en color rojo, como función del tiempo t , donde $t_0 = 0$ es el tiempo en el que se presenta la distancia mínima entre los pares de bacterias. Para la fracción de área más diluida Φ_1 , los resultados muestran un comportamiento uniforme de la rapidez a lo largo del intervalo de tiempo considerado, que es de 0.66 seg para todos los casos. Las pequeñas oscilaciones que se observan para la velocidad de alejamiento no parecen ser significativas ya que caen dentro de las barras de error. Nótese que los resultados son el promedio de la rapidez de cada trayectoria normalizada con su propia rapidez media en este intervalo de tiempo, por lo tanto oscilan alrededor de la recta $y = 1$. Para efectos de presentación, sin embargo, los resultados para las fracciones de área Φ_2 y Φ_3 se han desplazado en el eje vertical para que oscilen alrededor de las rectas horizontales

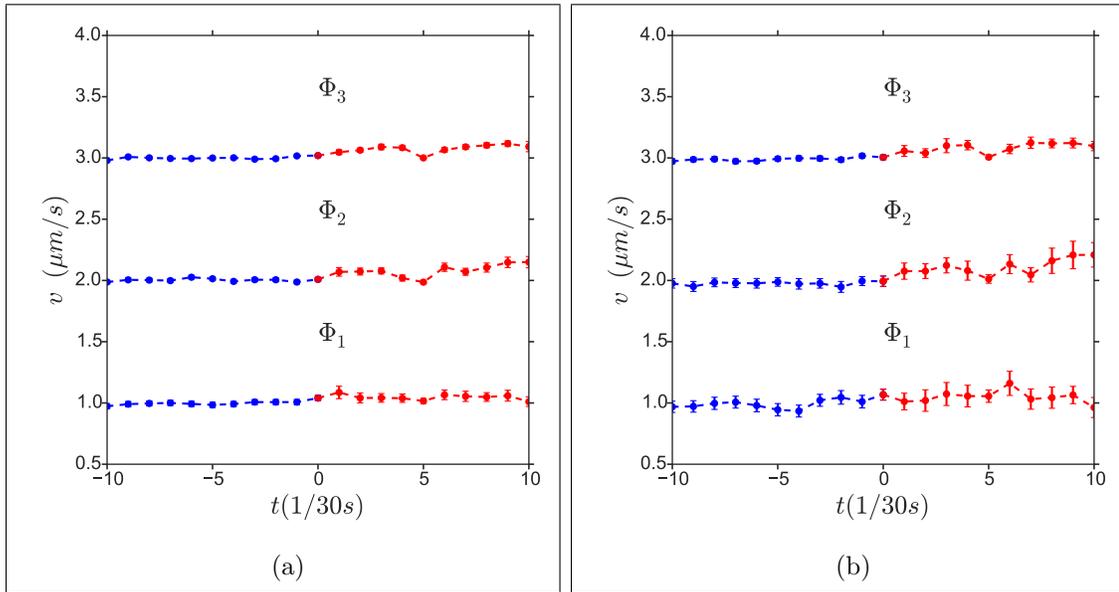


Figura 4.10: Rapidez de aproximación y alejamiento en un lapso de 0.66 seg , centrado en el tiempo en el instante de máximo acercamiento. Se consideran tres fracciones de área: $\Phi_1 = 0.01$, $\Phi_2 = 0.03$ y $\Phi_3 = 0.06$. (a) Rapidez para todos los ángulos de encuentro y para todas las distancias de encuentro entre bacterias. (b) Rapidez para encuentros frontales y para todas las distancias de encuentro entre bacterias.

$y = 2$ y $y = 3$, respectivamente.

Al aumentar la fracción de área, es decir para Φ_2 , se observa que la rapidez disminuye ligeramente justo antes del encuentro, y aumenta de manera no monótona después del encuentro. Un comportamiento similar se observa para la fracción de área más alta de Φ_3 , en donde se ve que la amplitud de oscilaciones y la tendencia de la velocidad a aumentar o a disminuir tienen una menor incertidumbre experimental.

Los resultados que se muestran en la Figura 4.10(a) muestran el comportamiento de la rapidez sin discriminar el ángulo de encuentro de las trayectorias. Los resultados para la rapidez de encuentro y de alejamiento bajo estas condiciones, es decir, para encuentros cuasi-frontales, se muestran en la Figura 4.10(b). Aquí vemos que las fracciones de área mediana y alta de células se comportan de manera similar al caso en que se estudia la rapidez para todos los ángulos de encuentro. La fracción de área Φ_1 , por otro lado, presenta ahora mayores fluctuaciones debido a una menor estadística (300 trayectorias) por lo que muestra una tendencia similar al caso más diluido en la Figura 4.10(a).

CAPÍTULO 5

Discusion

El presente trabajo se enfocó a estudiar el efecto de las interacciones hidrodinámicas en la dinámica de la cepa bacteriana *Escherichia coli* tipo silvestre MG1655 a diferentes concentraciones bajo alto confinamiento entre dos superficies de vidrio, separadas por partículas coloidales de $2.8 \pm 0.14 \mu m$. Mediante la técnica de video microscopía de contraste de fases fueron obtenidas las trayectorias individuales de bacterias. Analizando las trayectorias fue posible caracterizar la dinámica de las bacterias. En particular, se obtuvieron resultados para la rapidez media, ángulo de giro, desplazamiento cuadrático medio, la correlación de velocidades entre pares de bacterias, ángulos de encuentro entre pares de bacterias, distancia de separación entre bacterias, rapidez de aproximación y alejamiento entre pares de bacterias. En particular la correlación de velocidades se utilizó para medir cuantitativamente las interacciones hidrodinámicas entre las células.

Datos				
Φ	α	τ [seg]	Rapidez [$\mu m/seg$]	r_{ij} [μm]
$\Phi_1 = 0,01$	1.48 ± 0.027	1.0 ± 0.27	25.58 ± 2.95	17.88 ± 0.48
$\Phi_2 = 0,03$	1.57 ± 0.008	0.7 ± 0.13	28.05 ± 0.74	9.25 ± 0.19
$\Phi_3 = 0,06$	1.53 ± 0.0	0.6 ± 0.135	20.91 ± 0.05	6.36 ± 0.14

Cuadro 5.1: Valores característicos para la dinámica de bacterias *E. coli* altamente confinadas.

De los resultados obtenidos y discutidos en el capítulo anterior, se desprenden las siguientes observaciones. Como características generales de los sistemas que se prepararon para nuestros experimentos, principalmente observamos dos tipos de trayectorias: 1) rectilíneas y 2) circulares.

Hemos calculado las componentes longitudinal y transversal de la correlación de velocidad entre pares de bacterias bajo un confinamiento cuasi bidimensional.

Los resultados de este estudio muestran que el alcance de las interacciones hidrodinámicas (debidas a la interacción cuadrupolar) son del orden de $10 \mu m$. Para la componente longitudinal obtenemos una correlación positiva, con un decaimiento no monótono con un máximo en $3 \mu m$ para posteriormente decaer como $1/r^3$. Por su parte, la componente transversal es negativa y manifiesta dos tipos de interacciones, una de corto alcance para distancias menores de $6 \mu m$ que decae como $1/r^2$ y otra de largo alcance a distancias mayores de $6 \mu m$ y decae como $1/2r^3$.

Por su parte, simulaciones de interacciones hidrodinámicas realizadas por Shum y colaboradores [37] para un modelo de bacteria uniflagelar, de las dimensiones de *E. coli* y confinada entre dos superficies sólidas, reportan que las trayectorias de nado se ven afectadas por el grado de confinamiento. A distancias de separación entre superficies mayor al tamaño de la bacteria ($15 \mu m$), existe una tendencia por parte de la bacteria a nadar en trayectorias circulares cerca de la superficie. Si la distancia de separación disminuye ($5 \mu m$), la bacteria presenta 3 tipos de trayectorias: 1) circulares cerca de una superficie, 2) rectilíneas entre las dos superficies y 3) trayectorias oscilatorias, en las que la bacteria ‘transita’ entre una superficie y otra. En el trabajo mencionado previamente, los tres tipos de trayectorias que surgen son un reflejo directo de las interacción de la bacteria modelo con las superficies a través de interacciones hidrodinámicas. Nuestros resultados sugieren, que la interacción hidrodinámica que modifica la estabilidad de estas trayectorias podría deberse a un cuadrupolo hidrodinámico.

Comparando los datos que se presentan en el Cuadro 5.1 con estudios en 3D [24], observamos un aumento tanto en rapidez (del orden de $5 \mu m/seg$) como un efecto sobre el desvío angular de las trayectorias. Como consecuencia de las dimensiones del sistema, nosotros proponemos que los efectos mencionados podrían deberse a el posible efecto estérico con las superficies. Sin embargo, son necesarios estudios orientados a medir específicamente este tipo de fenómenos para dar una respuesta contundente.

Es conocido que, las distancias críticas a las que las interacciones hidrodinámicas (umbrales hidrodinámicos) se llevan a cabo son importantes, estas distancias son relevantes para fenómenos de dispersión entre bacterias y superficies. Valores reportados para el umbral hidrodinámico de un dipolo en 3D y en presencia de una superficie, es del orden de $\sim 3-6 \mu m$ [12]. En contraste, nuestros resultados reflejan que el umbral hidrodinámico en la lejanía a considerarse podría ser el de un cuadrupolo, teniendo un alcance radial del orden de $10 \mu m$.

CAPÍTULO 6

Conclusiones

Las mediciones que se realizaron en el presente trabajo indican que existen dos tipos de interacciones dominantes entre las bacterias. Para distancias menores a $3 \mu m$, posiblemente dominen las interacciones estéricas, mientras que para distancias mayores la interacción pudiera ser puramente hidrodinámica a cual es esencialmente independiente de la concentración de células. . Además, el hecho de que los signos de las componentes longitudinales y transversales decaen radialmente como $1/r^3$, demuestra que las mediciones hechas para las correlaciones de velocidades son consistentes con una interacción cuadrupolar entre pares de bacterias. Por lo tanto, las interacciones hidrodinámicas en sistemas altamente confinados siguen siendo de largo alcance como en el caso sin confinamiento y juegan un papel crucial en procesos de movimiento colectivo que ocurren a altas concentraciones de células como se ha reportado en trabajos recientes [23, 38], así como dentro de medios porosos como es el caso de biofilms [39].

Por otra parte, quienes realizan simulaciones de *E. coli* en medios cuasi bidimensionales, hace la suposición de que las interacciones hidrodinámicas de corto y largo alcance pueden modelarse como un dipolo fuerza [15]. Sin embargo, nuestros resultados indican que la interacción hidrodinámica de largo alcance que debe ser considerada para el modelaje de los sistemas previamente mencionados es el de un cuadrupolo hidrodinámico.

Adicionalmente, las trayectorias de las bacterias obtenidas en este trabajo, apoyan los resultados reportados recientemente [37] de que existe una transición de trayectorias circulares para el caso en que las paredes están muy alejadas a trayectorias rectilíneas en el caso altamente confinado, lo cual permite una migración más rápida de los microorganismos. Para una apropiada separación entre placas, este efecto tiene potenciales aplicaciones para la separación de microorganismos con diferentes características morfológicas.

CAPÍTULO 7

Perspectivas

Como trabajo a realizar, se propone:

- Estudiar las dos clases de trayectorias de las bacterias que fueron identificadas en este trabajo para hacer una comparación con las trayectorias predichas con un modelo hidrodinámico que se reporto recientemente [37].
- Determinar que papel juega el ruido térmico sobre la dinámica del sistema a través del coeficiente de difusión rotacional y compararlo contra las interacciones hidrodinámicas.
- Medir la contribución hidrodinámica del dipolo y determinar la importancia que tiene para la dinámica del sistema.

Bibliografía

- [1] S.S. Suarez and A. A. Pacey. Sperm transport in the female reproductive tract. *Human Reproduction Update*, 12(1):23–37, 2006.
- [2] D. Bray. *Cell Movements: From Molecules to Motility*. Garland Publishing, 2001.
- [3] J W Costerton, Z Lewandowski, D E Caldwell, D R Korber, and H M Lappin-Scott. Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology*, 49(1):711–745, 1995. PMID: 8561477.
- [4] Trevor Dalton, Scot E. Dowd, Randall D. Wolcott, Yan Sun, Chase Watters, John A. Griswold, and Kendra P. Rumbaugh. Polymicrobial biofilm wound infection model to study interspecies interactions. *PLoS ONE*, 6(11):e27317, 11 2011.
- [5] John D. Kessler, David L. Valentine, Molly C. Redmond, Mengran Du, Eric W. Chan, Stephanie D. Mendes, Erik W. Quiroz, Christie J. Villanueva, Stephani S. Shusta, Lindsay M. Werra, Shari A. Yvon-Lewis, and Thomas C. Weber. A persistent oxygen anomaly reveals the fate of spilled methane in the deep gulf of mexico. *Science*, 2011.
- [6] David L. Valentine, John D. Kessler, Molly C. Redmond, Stephanie D. Mendes, Monica B. Heintz, Christopher Farwell, Lei Hu, Franklin S. Kinnaman, Shari Yvon-Lewis, Mengran Du, Eric W. Chan, Fenix Garcia Tigreros, and Christie J. Villanueva. Propane respiration jump-starts microbial response to a deep oil spill. *Science*, 330(6001):208–211, 2010.
- [7] LuisH. Cisneros, Ricardo Cortez, Christopher Dombrowski, RaymondE. Goldstein, and JohnO. Kessler. Fluid dynamics of self-propelled microorganisms, from individuals to concentrated populations. *Experiments in Fluids*, 43(5):737–753, 2007.

- [8] Andrey Sokolov, Igor S. Aranson, John O. Kessler, and Raymond E. Goldstein. Concentration dependence of the collective dynamics of swimming bacteria. *Phys. Rev. Lett.*, 98:158102, Apr 2007.
- [9] Giovanni Volpe, Ivo Buttinoni, Dominik Vogt, Hans-Jurgen Kummerer, and Clemens Bechinger. Microswimmers in patterned environments. *Soft Matter*, 7:8810–8815, 2011.
- [10] Xiao-Lun Wu and Albert Libchaber. Particle diffusion in a quasi-two-dimensional bacterial bath. *Phys. Rev. Lett.*, 84:3017–3020, Mar 2000.
- [11] Eric Lauga, Willow R. DiLuzio, George M. Whitesides, and Howard A. Stone. Swimming in circles: Motion of bacteria near solid boundaries. *Biophysical Journal*, 90(2):400 – 412, 2006.
- [12] 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(27):10940–10945, 2011.
- [13] Sherri A. Biondi, John A. Quinn, and Howard Goldfine. Random motility of swimming bacteria in restricted geometries. *AIChE Journal*, 44(8):1923–1929, 1998.
- [14] Masoud Abkenar, Kristian Marx, Thorsten Auth, and Gerhard Gompper. Collective behavior of penetrable self-propelled rods in two dimensions. *Phys. Rev. E*, 88:062314, Dec 2013.
- [15] Tommaso Brotto, Jean-Baptiste Caussin, Eric Lauga, and Denis Bartolo. Hydrodynamics of confined active fluids. *Phys. Rev. Lett.*, 110:038101, Jan 2013.
- [16] R. Di Leonardo, D. Dell’Arciprete, L. Angelani, and V. Iebba. Swimming with an image. *Phys. Rev. Lett.*, 106:038101, Jan 2011.
- [17] P D Frymier, R M Ford, H C Berg, and P T Cummings. Three-dimensional tracking of motile bacteria near a solid planar surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(13):6195–6199, 1995.
- [18] Saverio E. Spagnolie and Eric Lauga. Hydrodynamics of self-propulsion near a boundary: predictions and accuracy of far-field approximations. *Journal of Fluid Mechanics*, 700:105–147, 6 2012.
- [19] Diego Lopez and Eric Lauga. Dynamics of swimming bacteria at complex interfaces. *Physics of Fluids*, 26(7):–, 2014.
- [20] Jens Elgeti, U. Benjamin Kaupp, and Gerhard Gompper. Hydrodynamics of sperm cells near surfaces. *Biophysical Journal*, 99(4):1018 – 1026, 2010.

- [21] Guanglai Li and Jay X. Tang. Accumulation of microswimmers near a surface mediated by collision and rotational brownian motion. *Phys. Rev. Lett.*, 103:078101, Aug 2009.
- [22] Guanglai Li, James Bensson, Liana Nisimova, Daniel Munger, Panrapee Mahautmr, Jay X. Tang, Martin R. Maxey, and Yves V. Brun. Accumulation of swimming bacteria near a solid surface. *Phys. Rev. E*, 84:041932, Oct 2011.
- [23] Enkeleida Lushi, Hugo Wioland, and Raymond E. Goldstein. Fluid flows created by swimming bacteria drive self-organization in confined suspensions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(27):9733–9738, 2014.
- [24] Howard C. Berg. *E. coli in Motion*. Springer-Verlag, 2004.
- [25] Tomoya Baba, Takeshi Ara, Miki Hasegawa, Yuki Takai, Yoshiko Okumura, Miki Baba, Kirill A Datsenko, Masaru Tomita, Barry L Wanner, and Hirotada Mori. Construction of escherichia coli k-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the keio collection. *Molecular Systems Biology*, 2(1), 2006.
- [26] 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, 2007.
- [27] Allison P. Berke, Linda Turner, Howard C. Berg, and Eric Lauga. Hydrodynamic attraction of swimming microorganisms by surfaces. *Phys. Rev. Lett.*, 101:038102, Jul 2008.
- [28] 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. *Physics of Fluids*, 19(6):–, 2007.
- [29] J. ADLER and BONNIE TEMPLETON. The effect of environmental conditions on the motility of escherichia coli. *Microbiology*, 46(2):175–184, 1967.
- [30] C. Douarche, A. Buguin, H. Salman, and A. Libchaber. *E. Coli* and oxygen: A motility transition. *Phys. Rev. Lett.*, 102:198101, May 2009.
- [31] Z Liu and K D Papadopoulos. Unidirectional motility of escherichia coli in restrictive capillaries. *Applied and Environmental Microbiology*, Oct 1995.
- [32] F. Zernike. Phase contrast, a new method for the microscopic observation of transparent objects. *Physica*, 9(7):686 – 698, 1942.
- [33] John C. Crocker and David G. Grier. Methods of digital video microscopy for colloidal studies. *Journal of Colloid and Interface Science*, 179(1):298 – 310, 1996.

- [34] Mingming Wu, John W. Roberts, Sue Kim, Donald L. Koch, and Matthew P. DeLisa. Collective bacterial dynamics revealed using a three-dimensional population-scale defocused particle tracking technique. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(7):4987–4994, 2006.
- [35] HOWARD C. BERG and DOUGLAS A. BROWN. Chemotaxis in escherichia coli analysed by three-dimensional tracking. *Nature*, pages 500–504, 1972.
- [36] Mehdi Molaei, Michael Barry, Roman Stocker, and Jian Sheng. Failed escape: Solid surfaces prevent tumbling of *Escherichia coli*. *Phys. Rev. Lett.*, 113:068103, Aug 2014.
- [37] H. Shum, E. A. Gaffney, and D. J. Smith. Modelling bacterial behaviour close to a no-slip plane boundary: the influence of bacterial geometry. *Proceedings of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 466(2118):1725–1748, 2010.
- [38] Andreas Zöttl and Holger Stark. Hydrodynamics determines collective motion and phase behavior of active colloids in quasi-two-dimensional confinement. *Phys. Rev. Lett.*, 112:118101, Mar 2014.
- [39] Y. Davit, H. Byrne, J. Osborne, J. Pitt-Francis, D. Gavaghan, and M. Quintard. Hydrodynamic dispersion within porous biofilms. *Phys. Rev. E*, 87:012718, Jan 2013.