

Señalización quimiotáctica en la proximidad de los motores flagelares de *Escherichia coli* y su relación con la motilidad individual y dispersión en medios líquidos

por

Lic. Fier Guido

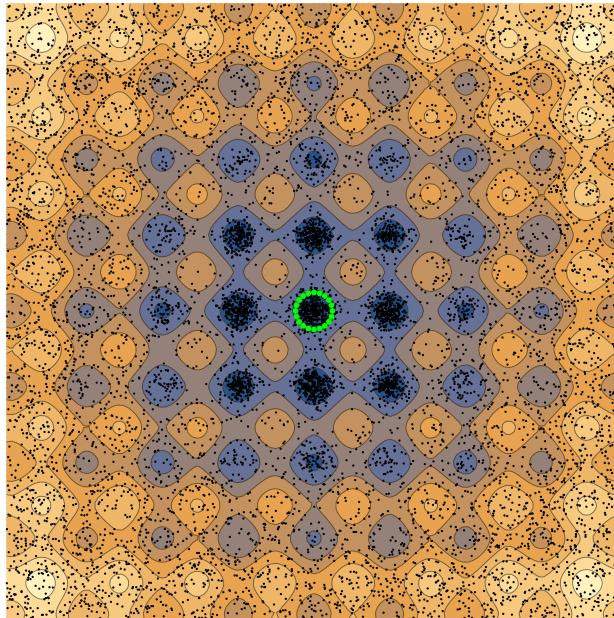
Tesis para optar por el título de

Doctor en Ciencias área Biología

en la

UNMDP

Mayo 2020



Dirigida por

Dr. Hansmann David

-
Director de tesis



I F I M A R

**Señalización quimiotáctica en la proximidad de los motores
flagelares de *Escherichia coli* y su relación con la motilidad
individual y dispersión en medios líquidos**

por

Lic. Fier Guido

el 25 de septiembre de 2020, Tesis para optar por
el título de
Doctor en Ciencias área Biología

Resumen

La motilidad de los microorganismos fue una de las principales cualidades que llevó a van Leeuwenhoek a la conclusión de que las estructuras que él observaba, con sus microscopios, eran de hecho entidades vivas. Sin embargo, tuvieron que pasar varios siglos para el estudio detallado de la motilidad de los microbios. Bacterias entéricas, como *Escherichia coli*, se desplazan en medios líquidos siguiendo un comportamiento denominado *Run & Tumble*, tanto en presencia como ausencia de estímulos. Recién en la década de 1970 H. Berg & D. Brown analizaron, con herramientas de la Física estadística, estos comportamientos. Estudios complementarios con un enfoque molecular sobre el sistema de señalización, como los trabajos pioneros de J. Adler, permitieron un estudio global de la motilidad de las bacterias entéricas. En la actualidad, uno de los principales objetivos en este campo de estudio es entender como los procesos internos de las bacterias en la escala nanoscópica que controlan los comportamientos a nivel individuo en la escala microscópica impactan en la dispersión de los microorganismos en la escala macroscópica. A su vez, es de gran interés comprender el efecto de la dispersión en el desarrollo de las comunidades microbianas y como puede modificar los procesos bacterianos de interés para el hombre. En esta tesis, desde un enfoque computacional, se modelarán procesos a diversas escalas para estudiar la dispersión de *E. coli*, mediante el comportamiento de *Run & Tumble*, ante distintos escenarios quimiotácticos con el fin de contribuir a los objetivos actuales de la comunidad científica.

Director de tesis: Dr. Hansmann David

Agradecimientos

Quiero agradecer al grupo de sistemas biológicos del IFIMAR por haberme dado la posibilidad de realizar mi tesis doctoral en un ambiente próspero y creativo. Quiero agradecer a mi director, el Dr. Hansmann, por haberme introducido en la programación y enseñado como utilizar esta poderosa herramienta en la investigación. A colegas, como el Lic. Lautaro Vassallo y el Dr. Marcos Torres, por los gratos intercambios en el día a día. Especialmente un profundo agradecimiento al director del grupo, el Dr. Rubén C. Buceta, que me enseño una incommensurable cantidad de herramientas y guio a lo largo del camino sinuoso del doctorado. Esta tesis no hubiese sido posible sin su ayuda y colaboración. Por otro lado, quiero agradecer a todo el grupo de sistemas complejos encabezado por la Dra. Lidia Braunstein. También agradecer a todos en el instituto de Física de Mar del Plata (IFIMAR), por aceptar a un colega Biólogo como uno más.

Finalmente, quiero agradecer a todas aquellas personas que estuvieron a distintas etapas de mi formación académica; amigos, compañeros y docentes que contribuyeron y apoyaron en este largo camino.

Un eterno agradecimiento a mi familia que me apoyaron e impulsaron durante tantos años para poder cumplir mis metas y sueños.

"...Yeah, nine times out of ten I get it wrong
That's why I wrote this song, told myself to hold on
I can feel my fingers slippin', in a motherf*** instant I'll be gone
Do you want it all if it's all mediocre
Staring at the wall and the wall's full of posters
Lookin' at my dreams, and who I wanna be
I guess you gotta see it to believe
Oh, I been a fool, but that's cool, that's what human beings do
Keep your eyes to the sky, never glued to your shoes
Guess there was a time when my mind was consumed
But the sun's coming out now, clouds start to move
Don't tell me nothing but the truth
I'm tired, I don't gotta spare a second
Win or lose, win or lose
I don't keep count, nobody checkin'..."

Small Words por Mac Miller (1992-2018)

Índice general

1. Introducción	9
1.1. Flagelos: Motores moleculares rotatorios	9
1.2. Sistema de señalización quimiotáctico	11
1.3. Dispersión: Desde los coloides a los organismos	16
1.4. Movimiento individual de bacterias flageladas	23
1.4.1. <i>Run & Tumble</i>	26
1.5. Hidrodinámica	31
1.6. Objetivos de la tesis	39
2. Sistema de señalización quimiotáctico	41
2.1. Transiciones entre rotaciones CW y CCW en un solo motor flagelar .	42
2.2. Transiciones entre <i>Runs & Tumbles</i>	61
2.3. Feedback negativo por ruta de metilación	72
2.4. Fluctuaciones	80
2.5. Estímulos con dependencia temporal	83
2.6. Discusión	88
3. Run & Tumble	91
3.1. Sistema de referencia	92
3.2. Ecuaciones de movimiento	98
3.3. Análisis estadístico del <i>Run & Tumble</i>	104
3.4. Persistencia direccional	112
3.4.1. Tumbles	113

3.4.2. Runs	114
3.5. Correlación direccional	116
3.6. Desplazamiento cuadrático medio	119
3.7. Dispersión de la concentración de bacterias en el medio líquido	121
3.8. Discusión	125
4. Quimiotaxis	127
4.1. Escenario isótropo y constante	128
4.2. Gradientes constantes	136
4.3. Escenario con dependencia temporal	150
4.4. Escenario con múltiples gradientes	153
4.5. Discusión	165
5. Conclusiones Generales	169

Capítulo 1

Introducción

1.1. Flagelos: Motores moleculares rotatorios

Dentro del diverso dominio de organismos Procarionte, existe dos grandes grupos muy distintos entre sí: bacterias y arqueas. Ambos poseen flagelos, accionados por motores rotatorios, utilizados principalmente para la locomoción celular. Los motores flagelares son estructuras complejas formadas por múltiples componentes proteicas que atraviesan la envoltura celular. La morfología y alta complejidad son similitudes que comparten los flagelos de las bacterias y las arqueas aunque la evidencia sugiere una evolución paralela [1]. Mientras que los flagelos bacterianos comparten su evolución con el sistema de secreción tipo III (TTSS¹), sus análogos en arqueas provienen del pili tipo IV [2]. Los motores flagelares, al igual que los motores eléctricos rotatorios inventados por el hombre, están formados por dos subunidades: un rotor y un estator. Estas dos subunidades se diferencian ya que el rotor gira con respecto a la célula mientras que el estator está anclado a la pared celular.

Los sistemas más estudiados en relación a la motilidad son aquellos pertenecientes a las bacterias Gram negativas, como *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* o *Vibrio alginolyticus*. Para este grupo, un diagrama generalizado (ver figura 1-1) de un flagelo consta de un rotor unido a un filamento por un gancho, ambos formados por proteínas

¹Acrónimo en inglés, Type III secretion systems.

tubulares, y de un estator anclado a la pared celular [3]. El núcleo del flagelo está formado por un conjunto de anillos que atraviesan toda la envoltura celular desde el exterior hacia el interior donde se encuentra el anillo MS. Este último anillo interactúa con el anillo C, constituido por las proteínas FliN, FliG y FliM, el cual se presume ser el generador del torque. Además, en el anillo C ocurre la interacción entre el sistema quimiotáctico y el flagelo, permitiendo a las bacterias Gram negativas cambiar su comportamiento ante estímulos fisicoquímicos.

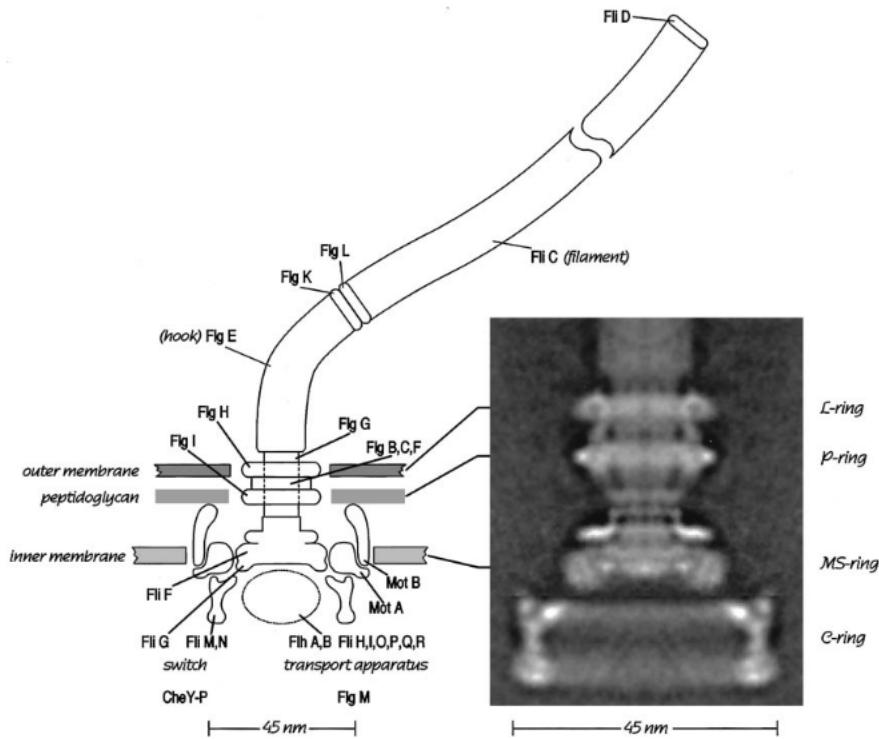


Figura 1-1: Diagrama flagelo bacterias Gram negativas tomado de [3].

Una similitud que comparten todos los motores flagelares a diferencia de otros motores moleculares rotatorios (i.e. ATPasas²) es que existe una dirección preferencial de los iones que generan la fuerza motriz iónica (IMF³). La IMF es generada por una diferencia de potencial entre el exterior y el interior celular resultante de una distribución inhomogénea de cargas más fuerzas generadas por corrientes de cargas

²ATPasa: Acrónimo para adenosintrifosfatasa, enzimas que hidrolizan el ATP.

³Acrónimo en inglés, Ion motive force

a través de los canales iónicos del flagelo. En cambio, la F-ATPasa presente en mitocondrias, cloroplastos, o membranas plasmáticas de bacterias es un motor rotatorio extensamente estudiado formado por dos subunidades F0 y F1, que posee la capacidad de funcionar reversiblemente [4]. Esto implica que puede sintetizar ATP o utilizar el ATP para funcionar como bomba de iones. En los flagelos de las bacterias Gram negativas, se supone que la corriente de partículas cargadas genera fuerzas inducen cambios conformacionales en las proteínas MotA y MotB del estator. A su vez, estos cambios en las proteínas inducidos por corrientes, producen interacciones cíclicas de origen electrostático entre residuos cargados de las proteínas que forman el estator y los residuos de las proteínas FliG. Esto constituye un modelo posible para la generación de torque que se transfiere al rotor vía la interacción de FliG con el anillo MS [5]. Se estima que los motores moleculares rotatorios poseen una alta eficiencia [6], aunque esto está sujeto a la definición de eficiencia adoptada. Una medida, no termodinámica, denominada eficiencia de Stokes se calcula como el cociente de la energía libre de Gibbs (Trabajando a Presión y Temperatura constante) para la hidrolisis de ATP, $\Delta G = 90 \text{ pNm}$, con respecto al trabajo medido experimentalmente que genera la hidrolisis de una molécula de ATP para rotar 120 grados el rotor, $\Delta W = 80 - 90 \text{ pNm}$. Así la eficiencia de Stokes $e = \frac{\Delta G}{\Delta W} \approx 1$ [6]. Sin embargo, no es trivial definir eficiencias desde las leyes de la Termodinámica. Otro aporte teórico desde la Termodinámica, concluyó que la eficiencia depende de la transferencia entre energías mecánicas y químicas, pudiéndose obtener eficiencias tanto altas (≈ 0.8) como bajas (≈ 0.2) [7]. Aquí no estudiaremos la maquinaria interna de los motores flagelares y como se genera la propulsión, sino que se propondrá un modelo que describa los cambios en el sentido de rotación de dichos flagelos. La escala espacial de los motores rotatorios ($\approx 40 \text{ nm}$) será la cota inferior para las escalas espaciales en los estudios de esta tesis.

1.2. Sistema de señalización quimiotáctico

Los microorganismos y las células eucariontes exhiben un comportamiento denominado taxis, movimiento dirigido que surge como respuesta a estímulos fisicoquímicos.

cos medioambientales. Por ejemplo, *E.coli* puede responder tanto a estímulos físicos, como a cambios en la presión de oxígeno o químicos, así como la presencia de aminoácidos. En esta tesis abordaremos la taxis modulada por el sistema de señalización quimiotáctico. Esta ruta de señalización está compuesta, en términos generales, por un sistema fosforilador histidina-aspartato (HAP) con propiedades de adaptación. El HAP está formado por una autotrans-histidin-kinasa de transmembrana (MCP-CheA) que fosforila a una de las proteínas reguladora de respuesta (CheY-P) en un residuo de aspartato. Las proteínas aceptoras de metilos (MCPs⁴) y las proteínas asociadas a ellas (CheW y CheA) tienen una distribución espacial particular, se encuentran únicamente en los polos de la célula [8]. CheY-P se encuentra libre por el citoplasma al igual que CheZ, una fosfatasa que desfosforila a CheY-P disminuyendo en un orden de magnitud su vida media. Aunque CheZ puede localizarse en los polos donde están los receptores, se ha encontrado que la actividad de esta fosfatasa depende de la concentración de la proteína reguladora de respuesta. Esto se debe a que la actividad de la fosfatasa depende del grado de oligomerización, siendo dependiente de la concentración de CheY-P en el citoplasma [9].

⁴Acrónimo en inglés, Methyl-accepting chemotaxis proteins

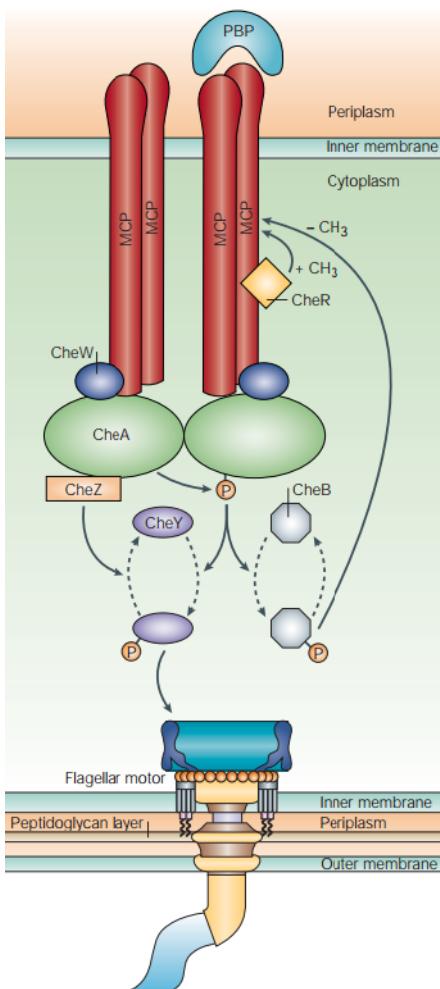


Figura 1-2: Sistema de señalización quimiotáctico, diagrama tomado de [8].

La otra proteína reguladora de respuesta que aún no hemos mencionado, es la enzima metilesterasa CheB. Esta proteína fosforilada actúa sobre otra proteína unida a los MCPs, llamada CheR. La enzima CheR transfiere grupos metilos a los residuos de glutamato de los MCPs. Mientras que CheB, tiene la función opuesta retirando estos grupos metilos. Como la actividad de CheB depende de la actividad de la cinasa CheA, vía fosforilación, este es un proceso adaptativo que vuelve insensible a los receptores ante estímulos prolongados en el tiempo.

Distintos tipos de químicos se unen a la región periplasmática de los MCPs induciendo una cadena de señalización. Existen dos tipos de respuesta que actúan sobre la actividad cinasa de CheA. Los químicos denominados atractores generan una disminución en la actividad de CheA mientras que los llamados repelentes producen un aumento en la actividad de CheA. Los cambios en la capacidad de fosforilar a CheY impactan directamente en la concentración citoplasmática de CheY-P.

Los atractores producen una disminución en la concentración mientras que los repelentes un aumento. Este efecto es modulado a distintas escalas temporales por la oligomerización de CheZ y por la fosforilación de CheB.

La afinidad de CheY con FliM, una de las proteínas del anillo C, cambia drásticamente cuando esta fosforilada. El complejo CheY-P-FliM modula el sentido de rotación del flagelo, estimándose alrededor de 30-40 subunidades FliM por an-

llo C [10]. Verificaciones experimentales *in vivo* han sido posibles por técnicas de fluorescencia como FRET⁵ o TIRF⁶ [10, 11].

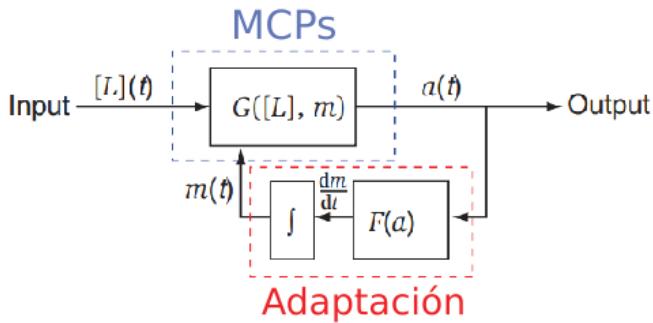


Figura 1-3: Diagrama del sistema de señalización quimiotáctico adaptado de [12].

Como la ruta de señalización quimiotáctica modula el sentido de rotación de los flagelos, se puede utilizar esta conexión para realizar mediciones experimentales para sondar los mecanismos internos. Se define al CW_{bias} como el cociente entre el tiempo que un flagelo rota sentido horario con respecto al tiempo total de observación. En el experimento llamado “bead-assay”, con un anticuerpo de antiflagelina, se pegan a los flagelos de las bacterias micro-esferas de latex [15] & [16]; a través de análisis de imágenes se puede observar las trayectorias de micro-esferas en el fluido, medir el sentido de rotación y calcular el CW_{bias} . De este modo se puede estimular la ruta de señalización

Como la cantidad de uniones CheY-P-FliM controla el sentido de rotación, se investigó cuantas uniones eran necesarias para inducir la transiciones entre los sentidos de rotación [13]. Inesperadamente se obtuvo que para hacer la transición de sentido horario a anti-horario, la cantidad de uniones difiere de la

transición opuesta. Es decir, ocurre un ciclo de histéresis para los cambios en el sentido de transición en función de la concentración de CheY-P. Este resultado experimental que sugiere la existencia de dos concentraciones límites para inducir las transiciones, ya había sido previamente sugerido por el trabajo de Morton & Fifth desde un enfoque computacional [14]. Adicionalmente otro mecanismo de adaptación en este robusto sistema de señalización fue encontrado en los flagelos. En una escala temporal del orden de $10^2 s$ se ha encontrado que, en presencia de atractores, *E.coli* modifica la cantidad de subunidades FliM en el anillo C de cada flagelo [10].

⁵ FRET: Transferencia de energía de resonancia de Förster

⁶TIRF: Fluorescencia de reflexión interna total

y evaluar su comportamiento dinámico a través del CW_{bias} . Además, como se vera más adelante, el sentido de rotación de los flagelos determina el tipo de movimiento que efectúan las bacterias. Los estímulos en el sistema de señalización se pueden estudiar desde el análisis de trayectorias de células individuales. Una propiedad que fue descubierta analizando el CW_{bias} es la ultra sensibilidad de los motores flagelares ante la concentración de CheY-P [16]. Utilizando plásmidos, en mutantes carentes de fosfatasa, con genes para la síntesis de CheY-P (con una larga vida media) se pudo controlar artificialmente la concentración de esta enzima y ver su impacto en el CW_{bias} . Como se observa en la figura 1-4, al aumentar la concentración citoplasmática de CheY-P aumenta el CW_{bias} es decir la probabilidad que los flagelos roten sentido horario. Lo sorprendente es el estrecho rango de concentración de CheY-P donde ocurren los cambios en el CW_{bias} . Esto se puede cuantificar matemáticamente usando la ecuación de Hill cuyos parámetros son la constante de actividad media (k_A) y la pendiente de Hill (N_H). El parámetro N_H observado para *E. coli* es el mayor valor hallado dentro de los complejos alostericos proteicos [10].

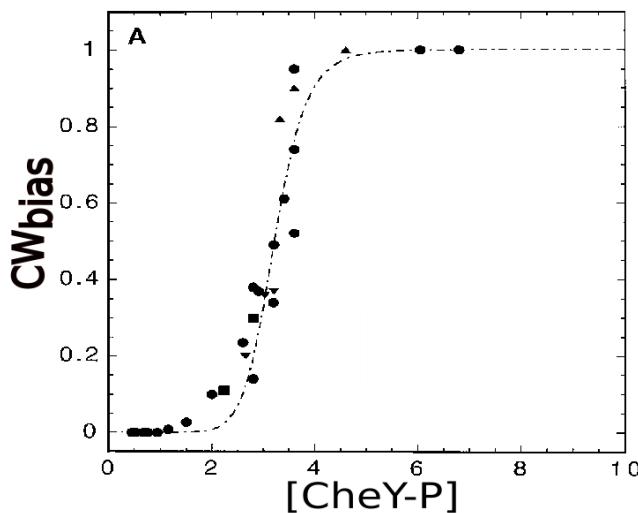


Figura 1-4: Ultrasensibilidad del sistema de señalización, imagen modificada de [16].

Este sistema de señalización es ultrasensible a la concentración de CheY-P. La respuesta es casi nula para bajas concentraciones y se activa de forma abrupta a medida que la concentración aumenta. Una vez que se activa, la respuesta permanece casi constante independientemente de la concentración adicional de CheY-P.

En conclusión, es la concentración de CheY-P en los entornos de los flagelos la que determina el sentido de rotación de los motores rotatorios. Esta concentración depende de la actividad de la kinasa CheA en los polos de la célula que, a su vez, dependerá de los estímulos externos. En una escala temporal mayor, todas estas variables serán sesgadas por la metilación de los receptores MCPs mediante la otra proteína reguladora de respuesta CheB. Estos componentes del sistema de señalización serán las variables a tomar en cuenta para modelar la quimiotaxis en el

próximo capítulo.

1.3. Dispersión: Desde los coloides a los organismos

Una de las principales propiedades que llamó la atención a Anton van Leeuwenhoek al observar muestras de agua en su microscopio fue la motilidad de los protozoos [17]. Su capacidad de autopropulsarse fue determinante en el descubrimiento del mundo de los microorganismos. Sin embargo, aproximadamente un siglo después el botánico Robert Brown observó que granos de polen (o partes de ellos) sumergidos en agua tenían un comportamiento errante (ver figura 1-5) similar a la propiedad que llamó la atención de van Leeuwenhoek. Este comportamiento, hoy conocido como movimiento Browniano, y el comportamiento individual de muchos microorganismos u organismos que son idénticos en la escala macroscópica, es un fenómeno conocido como difusión.

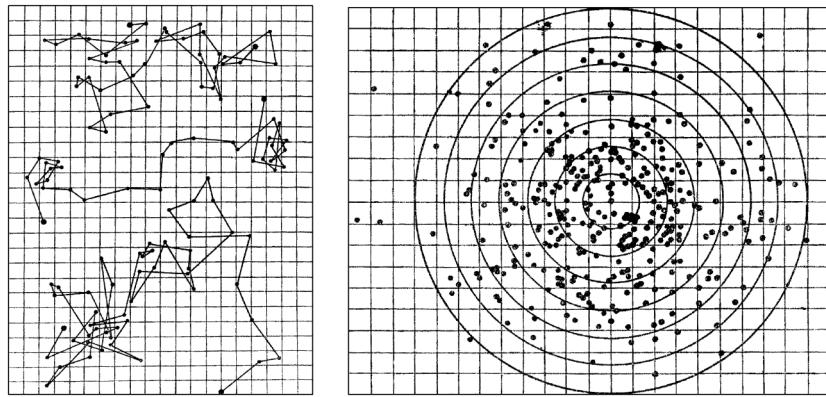


Figura 1-5: Análisis de trayectorias de coloides por Perrin [18].

La ecuación de difusión:

$$\frac{\partial \rho}{\partial t}(\bar{r}, t) = D \nabla^2 \rho(\bar{r}, t), \quad (1.1)$$

donde ρ puede ser tanto la densidad de una población o de un coloide, puede obtenerse desde diferentes escalas espaciales y temporales. Desde la perspectiva macroscópica, los cambios temporales de la densidad dentro de un volumen arbitrario Γ encerrado por una superficie Ω ocurren únicamente por el flujo \bar{J} a través de Ω . Luego, la densidad satisface la ecuación de continuidad:

$$\frac{\partial \rho}{\partial t}(\bar{r}, t) = -\nabla \cdot \bar{J}(\bar{r}, t). \quad (1.2)$$

Introduciendo la ley fenomenológica conocida como ley de Fick [19], donde el flujo \bar{J} es proporcional al gradiente espacial de la densidad de la población, se llega a la ecuación 1.1. La ley de Fick es:

$$\bar{J}(\bar{r}, t) = -D \nabla \rho(\bar{r}, t), \quad (1.3)$$

donde la constante de proporcionalidad D es el coeficiente de difusión. En este enfoque, no se toman en cuenta los individuos de la población, tampoco las fluctuaciones, y la constante de difusión es simplemente una constante fenomenológica. A medida que disminuye la escala se pueden incorporar más detalles de las poblaciones y las fluctuaciones.

En 1911 Einstein desarrolló un enfoque mesoscópico para la teoría del movimiento Browniano [20]. En este enfoque, la población está formada por individuos que se desplazan efectuando saltos de una longitud arbitraria. La longitud de saltos es una variable aleatoria que se describe por su función de densidad $\phi(z)$ (en una dimensión). Para un punto espacial particular x la densidad de individuos a un tiempo $t + \tau$ es igual a la densidad de individuos a una distancia z a un tiempo t previo que salten a la posición x . Sumando sobre todos los lugares posibles de donde pueden saltar los individuos:

$$\rho(x, t + \tau) = \int_{-\infty}^{\infty} dz \rho(x - z, t) \phi(z), \quad (1.4)$$

donde la función $\phi(z)$ se conoce como núcleo de dispersión en Ecología. Si las escalas espaciales y temporales donde interesa estudiar la densidad de individuos son lo suficientemente grande con respecto a z y τ se pueden desarrollar en serie de Taylor a $\rho(x, t + \tau)$ y $\rho(x - z, t)$. Además, suponiendo que no hay una dirección preferente, como resultado de un movimiento isotrópico, el núcleo de dispersión es simétrico y se anulan todos los términos impares del desarrollo en serie. La ecuación 1.4 resulta:

$$\rho(x, t) + \tau \frac{\partial \rho}{\partial t} + O(\tau^2) = \rho(x, t) + \frac{\partial^2 \rho}{\partial x^2} \int_{-\infty}^{\infty} dz \frac{z^2}{2\tau} \phi(z) O(z^4). \quad (1.5)$$

Dividiendo por τ y haciendo los límites macroscópicos $z \rightarrow 0$ y $\tau \rightarrow 0$, donde se asume que $\lim_{z,\tau \rightarrow 0} \frac{z^2}{\tau} < \infty$, es decir es acotado, se llega nuevamente a la ecuación de difusión en 1-D⁷:

$$\frac{\partial \rho}{\partial t}(x, t) = D \frac{\partial^2 \rho}{\partial x^2}(x, t). \quad (1.6)$$

En este contexto la constante de difusión se define como:

$$D \doteq \frac{1}{2\tau} \int_{-\infty}^{\infty} dz z^2 \phi(z) = \frac{\langle z^2 \rangle}{2\tau}, \quad (1.7)$$

donde al hacer los límites macroscópicos se redujo toda la información de la función de densidad $\phi(z)$ a solo su segundo momento no centrado $\langle z^2 \rangle$. Además, independientemente de la función de densidad para la longitud de saltos, siempre y cuando tenga un segundo momento no centrado finito, se puede obtener una ecuación de difusión cuya solución sera una distribución normal, con las mismas condiciones necesarias del teorema central del límite [21]. Al ir disminuyendo la escala de donde se deriva la ecuación de difusión, el único parámetro efectivo es D , el cual se puede relacionar con propiedades a nivel población, como en el enfoque de Einstein, o inclusive a nivel individuo, siguiendo el enfoque microscópico de las ecuaciones de Langevin. Este último enfoque incluye las fluctuaciones y será desarrollado a continuación. Desde el punto de vista de los coloides las fluctuaciones surgen de la agitación térmica del fluido.

En el movimiento de coloides observado por Brown y cuantificado por Perrin [18], como se muestran en las trayectorias de la figura 1-5, el comportamiento errante surge de la interacción entre el coloide y los frecuentes choques con las moléculas del fluido. Una descripción que involucre tanto al coloide como al fluido tendría que incluir la posición y los momentos de cada molécula, es decir un número inmesurable de variables. Por ello, Langevin [22] en 1908 introdujo una ecuación estocástica para la velocidad de una partícula browniana en la que el efecto del fluido se representa

⁷1-D: 1-dimensión.

por un término de fricción y otro de origen estocástico. Al igual que en el enfoque de Einstein por simpleza trabajaremos en una dimensión:

$$m\dot{v}(t) = -m\gamma v(t) + f(t). \quad (1.8)$$

Cada uno de estos términos representa procesos de diferente escala temporal. El término estocástico $f(t)$ representa todas las variables rápidas del sistema subsumidas en la dinámica. Una solución particular a esta ecuación dependerá de la realización de ruido y sera diferente a otras soluciones. Por ello, se estudia estadísticamente esta ecuación, la cual va a depender de la definición de $f(t)$; Langevin asumió un valor medio nulo y una correlación temporal tipo delta, es decir $\langle f(t) \rangle = 0$ y $\langle f(t_1)f(t_2) \rangle = Q\delta(t_1 - t_2)$. La correlación temporal de la fuerza estocástica a distintos tiempos se representa por la “función” de Dirac si los tiempos característicos verifican $\tau_{col} \ll \tau_{fr}$; siendo τ_{col} el tiempo característico de los choques entre moléculas del fluido y el coloide y $\tau_{fr} = \frac{1}{\gamma}$ el tiempo característico de la fricción del coloide. Las fuerzas estocásticas con estos dos comportamientos se denominan ruido blanco, por la similitud entre su espectro y el de la luz blanca. Por ventajas prácticas, $f(t)$ sigue una distribución normal con $\mu = 0$, como se asumió antes, y una varianza $\sigma^2 = Q < \infty$, siendo Q la intensidad de ruido.

A través del parámetro Q se puede relacionar la constante de difusión con el coeficiente de fricción. De la solución a tiempos largos de la ecuación 1.8 se obtiene que $\langle v(t) \rangle = 0$ y $\langle v(t)^2 \rangle = \frac{Q}{2\gamma m^2}$. Lo primero que se observa es una velocidad promedio nula y una velocidad cuadrática media lineal con la intensidad de ruido. Al tomar tiempos largos se satisface la condición de equilibrio térmico para los coloides y permite aplicar el teorema de equipartición, por el cual $\frac{1}{2}m\langle v(t)^2 \rangle = \frac{1}{2}k_B T$. Este importante teorema de la Mecánica Estadística de equilibrio establece la relación entre la intensidad de ruido y la temperatura $Q = 2\gamma m k_B T$. Esta es un versión particular del teorema fluctuación-disipación para variables no pares ante inversión temporal, que permite caracterizar al fluido donde se encuentra el coloide. Para poder hallar la relación entre Q y D , hay que volver a la ecuación de difusión en una dimensión (ec. 1.6) y calcular

el desplazamiento cuadrático medio definido como:

$$MSD(t) \doteq \langle |\bar{r}(t) - \bar{r}(t_0)|^2 \rangle = \int_0^t dt_1 \int_0^t dt_2 \langle \bar{v}(t_1) \bar{v}(t_2) \rangle. \quad (1.9)$$

En una dimensión, haciendo uso de 1.6:

$$\frac{\partial}{\partial t} \langle x(t)^2 \rangle = \frac{\partial}{\partial t} \int_{-\infty}^{\infty} dx x^2 \rho(x, t) = \int_{-\infty}^{\infty} dx x^2 \frac{\partial \rho(x, t)}{\partial t} = \int_{-\infty}^{\infty} dx x^2 D \frac{\partial^2 \rho}{\partial x^2}(x, t) = 2D \quad (1.10)$$

integrando con condición inicial $x(0) = 0$, se llega a $\langle x(t)^2 \rangle = 2Dt$. Finalmente, si en la ecuación 1.9 se utiliza la solución de la ecuación 1.8, a tiempos largos, se obtiene $\langle x(t)^2 \rangle = \frac{Q}{\gamma^2 m^2} t$. Igualando estas dos últimas expresiones y reemplazando Q , obtenemos

$$D = \frac{Q}{\gamma^2 m^2} = \frac{k_B T}{m \gamma} \quad (1.11)$$

conocida como relación de Einstein, donde vemos que (desde el enfoque microscópico de la ecuación de Langevin) la constante de difusión depende de la temperatura y de la fricción del coloide. Nuevamente concluimos que la constante de difusión es proporcional al segundo momento no centrado de la componente estocástica, usando la relación para la varianza $\sigma^2 = \langle f(t)^2 \rangle - \langle f(t) \rangle^2 = \langle f(t)^2 \rangle = Q$, como se vio en el enfoque mesoscópico.

La solución a la ecuación 1.1 en un dominio sin bordes y con condición inicial puntual $\rho(\bar{r}_0, 0) = \delta(\bar{r} - \bar{r}_0)$ se llama solución fundamental :

$$\rho(\bar{r}, t) = \frac{1}{\sqrt{(4\pi D t)^3}} e^{-\frac{|\bar{r} - \bar{r}_0|^2}{4Dt}} \quad (1.12)$$

Esta solución puede ser utilizada mediante el método de la función de Green o el método de las imágenes para obtener la solución al problema de difusión con condiciones iniciales no homogéneas o con condiciones de borde más complejas. El cambio en la densidad $\rho(\bar{r}, t)$ depende únicamente de la distancia radial (es decir del modulo de la distancia al cuadrado) desde la condición inicial, $\bar{r} \cdot \bar{r} - \bar{r}_0 \cdot \bar{r}_0 = |\bar{r} - \bar{r}_0|^2$. Como se ve,

no presenta ninguna dirección preferencial, es decir un movimiento isotrópico, lo cual para densidades de poblaciones no siempre es el fenómeno observado. Las anisotropías en el movimiento pueden ser introducidas en las distintas escalas: modificando el flujo (ecuación 1.3) [19], la densidad de saltos arbitrarios (ecuación 1.4) [21] o considerando fuerzas con dependencia espacial (ecuación 1.8) [23]. Inclusive se pueden incorporar términos de fuentes o sumideros, los cuales describen dinámicas poblacionales, en la ecuación de continuidad que se conocen como sistemas de reacción-difusión [24].

Independientemente, a si hay direcciones preferentes en el movimiento de la densidad de individuos, el desplazamiento cuadrático medio a tiempos largos tendrá un comportamiento lineal con el tiempo si la dispersión es difusiva, $MSD(t) \sim t$. No es una coincidencia que la difusión sea un modelo recurrente de transporte en diversos campos de estudio. Sino que es una consecuencia del teorema central del límite, si tomamos a los desplazamientos de una trayectoria de un individuo como variables aleatorias independientes idénticamente distribuidas. Definiendo una nueva variable aleatoria

$$S_n = r_1 + r_2 + \dots + r_n \quad (1.13)$$

la función de densidad de probabilidad de S_n converge (en distribución) a una distribución normal en el límite $n \rightarrow \infty$. Esto valdrá siempre que se satisfagan las condiciones de media y varianza finitas. Cuando alguna de estas condiciones no se cumple, por ejemplo:

1. Correlaciones dirigionales de largo alcance, cuyos tiempos característicos deben ser del orden de los procesos de interés.
2. Los desplazamientos individuales no están idénticamente distribuidos y gradualmente se acortan o alargan.
3. Los desplazamientos de las trayectorias tienen funciones de densidad de probabilidad con momentos no finitos.

emerge el fenómeno conocido como difusión anómala donde el desplazamiento cuadrático medio sigue una ley de potencia, $MSD(t) \sim t^\alpha$ con $0 \leq \alpha < 1$ o $\alpha > 1$. Existe

verificación experimental de sistemas biológicos con difusión anómala como el caso de los motores moleculares lineales. Sin embargo, la hipótesis de vuelos de Levy, para los cuales la función de densidad de saltos sigue una ley de potencia con momentos no finitos, ha generado controversia. Esto se debe a la dificultad de probar experimentalmente la presencia de leyes de potencia. En muchos casos, existen regímenes transitorios donde el desplazamiento cuadrático medio cambia de comportamiento de un régimen balístico a uno difusivo. En este transitorio, se cumple un comportamiento anómalo pero no es estacionario y dependiendo del tiempo característico de este régimen transitorio puede ocurrir en una escala de tiempo mucho menor al proceso de interés. Por ejemplo, en la ecuación 1.5 si no se desprecian los términos de segundo orden en τ :

$$\rho(x, t) + \tau \frac{\partial \rho}{\partial t} + \frac{\tau^2}{2} \frac{\partial^2 \rho}{\partial t^2} + O(\tau^3) = \rho(x, t) + \frac{\partial^2 \rho}{\partial x^2} \int_{-\infty}^{\infty} dz \frac{z^2}{2\tau} \phi(z) O(z^4) \quad (1.14)$$

tomando los mismos límites macroscópicos que antes, se obtiene la ecuación

$$\frac{\partial \rho}{\partial t}(x, t) + \frac{\tau}{2} \frac{\partial^2 \rho}{\partial t^2}(x, t) = D \frac{\partial^2 \rho}{\partial x^2}(x, t). \quad (1.15)$$

En esta ecuación, dependiendo de la escala temporal de t , si $t \ll \tau$ tenemos una ecuación de onda

$$\frac{\partial^2 \rho}{\partial t^2}(x, t) = \frac{2D}{\tau} \frac{\partial^2 \rho}{\partial x^2}(x, t), \quad (1.16)$$

o si $t \gg \tau$ recuperamos la ecuación de difusión

$$\frac{\partial \rho}{\partial t}(x, t) = D \frac{\partial^2 \rho}{\partial x^2}(x, t). \quad (1.17)$$

Por lo tanto tenemos dos comportamientos para el desplazamiento cuadrático medio:

$$\langle x^2 \rangle = \begin{cases} (vt)^2 & \text{si } t \ll \tau \\ 2Dt & \text{si } t \gg \tau \end{cases} \quad (1.18)$$

y un comportamiento anómalo de transición entre los dos regímenes. Los comportamientos balísticos a tiempos pequeños y difusivos a tiempos largos también se

obtienen desde la perspectiva de ecuaciones de Langevin como la ecuación 1.8.

1.4. Movimiento individual de bacterias flageladas

La motilidad bacteriana impulsada por flagelos está presente en distintas especies cuyos microambientes, donde habitan, difieren sustancialmente. No obstante, los comportamientos de locomoción en medios líquidos son en términos generales similares. Entre las especies mencionadas *E. coli*, *S. enterica*, *V. alginolyticus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudoalteromonas haloplanktis* o del género *Rhizobium*, todas comparten un comportamiento dividido en secuencias de trayectorias con persistencia direccional y eventos de reorientación rápidos.

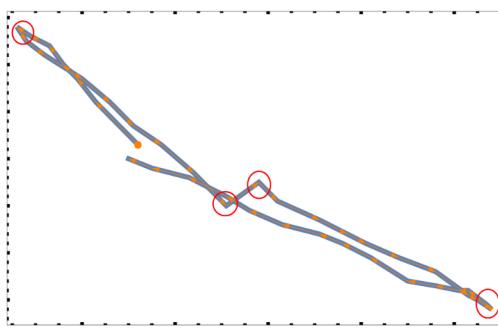


Figura 1-6: Trayectoria de *P. aeruginosa*, con flechas naranjas se marca la dirección de avance y con los círculos rojos marcan los eventos de fuertes re-orientaciones. Datos obtenidos en colaboración con la Dra Melina Nisenbaum del grupo de Ingeniería Bioquímica de la UNMdP.

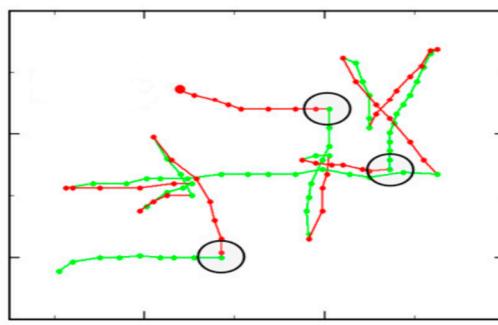


Figura 1-7: Trayectoria de *V. alginolyticus*, en rojo se marcan los *Runs*, en verde los *Reverse* y con círculos los *Flicks*. Imagen adaptada de [25].

Lo más conveniente para analizar las trayectorias estocásticas que realizan estos microorganismos es utilizar un sistema de referencia intrínseco. La forma de la mayoría

de las bacterias flageladas estudiadas se puede aproximar a la forma de un cigarro o de un esferoide prolato, caracterizandolas por dos semiejes. El semieje mayor se denomina s_{\parallel} mientras que los dos semiejes menores idénticos s_{\perp} . El cociente entre estos semiejes se conoce como relación de aspecto donde se satisface $a = \frac{s_{\parallel}}{s_{\perp}} > 1$. El eje z del sistema de referencia se alinea con el mayor semieje de la bacteria (s_{\parallel}) y los desplazamientos angulares se miden con respecto a este eje, es decir se mide el ángulo zenital θ . Una vez situado un sistema de referencia podemos analizar las trayectorias. Como se ve en las figuras 1-6 & 1-7 para las trayectorias de *P.aeruginosa* [26] y *V.alginolyticus* [27] se dividen en secuencias alternadas. Un tipo de secuencias se caracteriza por tener pequeños desplazamientos angulares (e.g. con colores rojos y verdes en figura 1-7 o en azul en la figura 1-6) interrumpidos por otro tipo de secuencias caracterizadas por rápidas reorientaciones (e.g. marcadas con círculos en las figuras 1-6 & 1-7). Un observable estadístico para medir las deflexiones angulares es la persistencia direccional definida por

$$\langle \cos \theta \rangle = \int_0^{\pi} d\theta \cos \theta p(\theta). \quad (1.19)$$

En la figura 1-6 vemos como se traslada la bacteria con poca reorientación o en términos de la persistencia $\langle \cos \theta \rangle \lesssim 1$. En los círculos rojos se observa como hay poca translación y fuerte reorientación, $\langle \cos \theta \rangle \gtrsim 0$. Esta correlación negativa entre translación y orientación surge de cambios abruptos en la rapidez de las bacterias. Con la dinámica temporal de la rapidez $v(t)$ y la persistencia direccional pueden definirse en términos generales los conceptos de *Runs* (corridas) y de *Tumbles* (tumbos).

Los *Runs* se caracterizan por una rapidez promedio no nula $\langle v(t) \rangle \gtrsim 30\mu\text{m}/\text{s}$ y persistencia $\langle \cos \theta \rangle \lesssim 1$; mientras que los *Tumbles* por lo opuesto $\langle v(t) \rangle \lesssim 30\mu\text{m}/\text{s}$ y $\langle \cos \theta \rangle \lesssim 0$. Analizando la rapidez y el ángulo cenital para la figura 1-6 se obtiene:

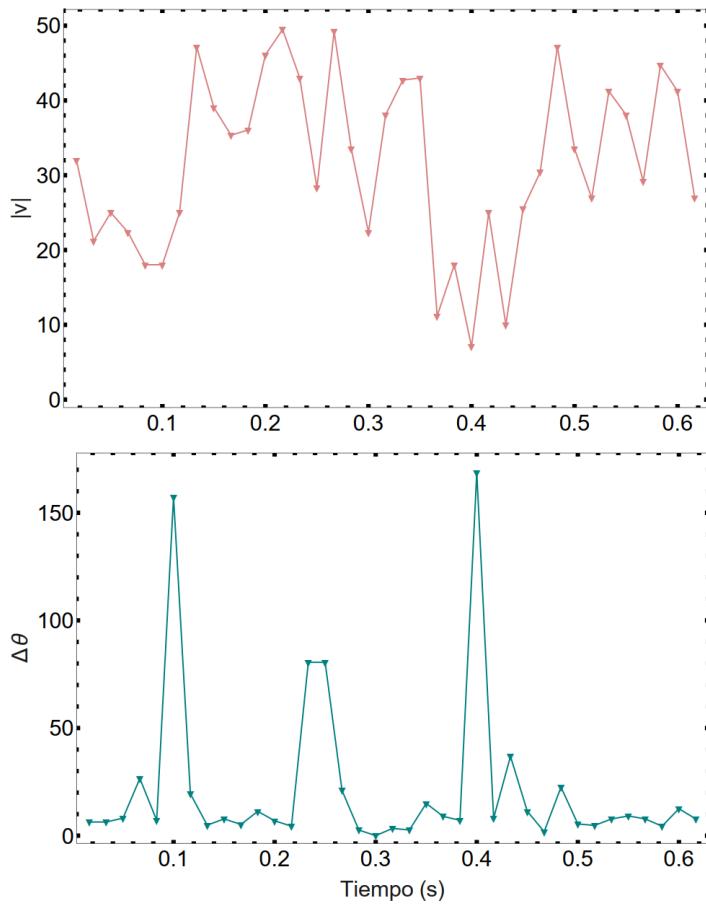


Figura 1-8: rapidez y ángulo zenital en función del tiempo para *P.aeruginosa* obtenida de la trayectoria de la figura 1-6.

donde es evidente la correlación negativa entre rapidez y reorientación. De esta manera, en la figura 1-8 tenemos *Runs* con $|v| > 30$ y $\Delta\theta < 10^\circ$ mientras que para los *Tumbles* $|v| < 30$ y $\Delta\theta > 70^\circ$.

Análogamente, se pueden comparar los *Runs* con los desplazamientos libres de colisiones para coloides y los *Tumbles* con las colisiones entre las moléculas del fluido y la partícula browniana. Hay diferencias pero son sutiles, los *Runs* son un movimiento persistente pero con pequeñas desviaciones. Mientras que, los *Tumbles* son reorientaciones que producen un decaimiento más rápido en la persistencia que la agitación térmica. ¿Porqué los microorganismos han elegido mecanismos de traslación similares a los que ya existen en el mismo ambiente en el que habitan dado por la agitación térmica? Quizás, una respuesta plausible es que poseen, vía los sistemas de señalización, la capacidad de modificar su comportamiento. Como veremos, vía taxis modifican sus

comportamientos difusivos, es decir sus constantes de difusión, de una manera similar a como cambia la constante de difusión con la temperatura siguiendo la relación de Einstein (ecuación 1.11).

Los movimientos de *Runs* o *Tumbles* de cada especie dependen de los procesos flagelares involucrados y la denominación de dichos movimientos suele cambiar con la especie. *P.aeruginosa* y *V.alginolyticus*, son bacterias con un único flagelo; los cambios en el movimiento surgen al modificarse el sentido de rotación de este flagelo. *P.aeruginosa* sigue un comportamiento denominado *Run-Reverse*. Cuando efectúa un *Run* avanza hacia adelante, esto es en dirección cola-cabeza, con el flagelo rotando en el sentido antihorario. Al modificarse el sentido de rotación sufre un desviación angular y al girar el flagelo en sentido horario se mueve en dirección cabeza-cola, es decir al revés. Esta secuencia se repite al volver a cambiar el sentido de rotación de antihorario a horario dando una nueva desviación angular. Adicionalmente, para *V.alginolyticus*, una especie oceánica, en el cambio de rotación de antihorario a horario el flagelo se mueve como un latigo generando una fuerte reorientación conocido como *flick*. Este comportamiento denominado *Run-Reverse-flick* es el principal comportamiento de las bacterias oceánicas uniflageladas y también de bacterias del suelo del género *Rhizobium*. En la figura 1-7, en una trayectoria de *V.alginolyticus*, con los *Runs* en rojo, los *Reverse* en verde y los *flicks* marcados por círculos.

1.4.1. *Run & Tumble*

Para las bacterias multiflageladas como *E.coli* el comportamiento de *Run & Tumble* es el resultado de la interacción colectiva de todos sus flagelos [3]. Los flagelos de esta bacteria entérica se sincronizan cuando todos rotan en sentido antihorario formando un manojo, dando como resultado una traslación persistente; conocido como *Run*. Cuando por lo menos un flagelo modifica su sentido de rotación a sentido horario, este se desestabiliza y se separa del manojo, este fenómeno produce una fuerte reorientación de la bacteria. Luego, cuando el o los flagelos que se desincronizaron vuelven al sentido de rotación antihorario se re establece el manojo y comienza un nuevo *Run* (ver figura 1-9).

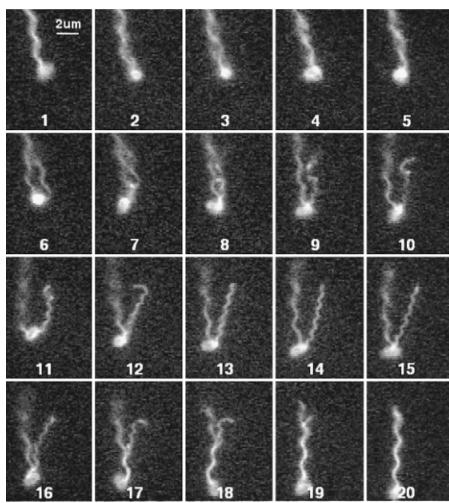


Figura 1-9: Análisis de flagelos fluorescentes por imágenes, imagen tomada de [28].

En el transcurso en el cual el flagelo modifica su sentido de rotación de antihorario a horario sufre modificaciones en su forma. Como se ve en la figura 1-9 desde el cuadro 6 hasta el cuadro 17 un flagelo sufre una transformación del estado normal al estado rizado (denominado *curly 1*), luego en los últimos cuadros al revertirse el sentido de rotación vuelve a su conformación normal y se forma nuevamente el manojo [28]. En el diagrama de la figura 1-10 se ve como ocurre el cambio en la orientación de la bacteria

cuando se desestabiliza el manojo de flagelos, siendo el tiempo de reorientación menor que el tiempo total donde el flagelo rota en sentido horario. Esta es la verificación empírica de como el comportamiento de las bacterias flageladas depende del sentido de rotación de los motores rotatorios [3]. Procesos que ocurren en la escala nanoscópica en los entornos de los motores rotatorios modifican el comportamiento microscópico de las células, que a tiempos largos determinan su comportamiento macroscópico.

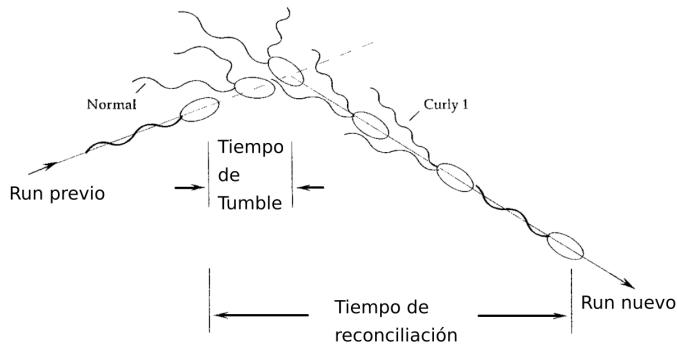


Figura 1-10: Diagrama del proceso de sincronización del manojo flagelar y tumbeo obtenido de [3].

Antes de determinar cuales son las principales variables del movimiento *Run* & *Tumble* que se modifican en presencia de taxis es conveniente analizar el caso en

medios libres de estímulos. Esto fue realizado y publicado en el trabajo pionero de H.Berg & D.Brown [29] de 1972, donde primero desarrollaron un microscopio capaz de seguir a una bacteria moviéndose en tres dimensiones como se ve en la figura 1-11.

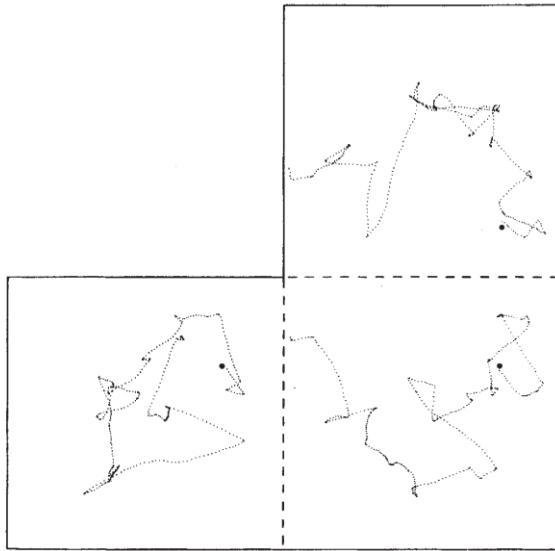


Figura 1-11: Proyecciones de la trayectoria de *E.coli*, imagen obtenida de [29].

Para ello, utilizaron una cuba de vidrio móvil cerrada donde las bacterias nadan en agua [30]. Cuando un sistema electrónico detecta una célula en la cuba, se sitúa su posición coincidente con el origen del sistema de referencia en la cuba. Al moverse la bacteria se mueve la cuba para que la bacteria siempre esté situada en el origen. Simplemente, midiendo la posición de la cuba se obtiene la posición de la bacteria y se logra reconstruir su trayectoria en el fluido. De este modo, por primera vez en los principios de los años setenta del siglo pasado, se pudo obtener una análisis estadístico del comportamiento de *E.coli*. Al igual que en el caso de las bacterias uniflageladas se observó la correlación negativa entre rapidez y grandes desviaciones angulares. A diferencia de los casos de *P.aeruginosa* y *V.alginolyticus* donde la distribución de ángulos de las reorientaciones son distribuciones normales [26, 27], *E.coli* tiene una distribución asimétrica para los cambios de orientación durante los *Tumbles* con un $\langle\theta\rangle \approx 68^\circ$ [29]. A esta distribución de ángulos la llamaremos TAD⁸, la observamos en la figura 1-12.

⁸Acrónimo en inglés de *Turning angle distribution*

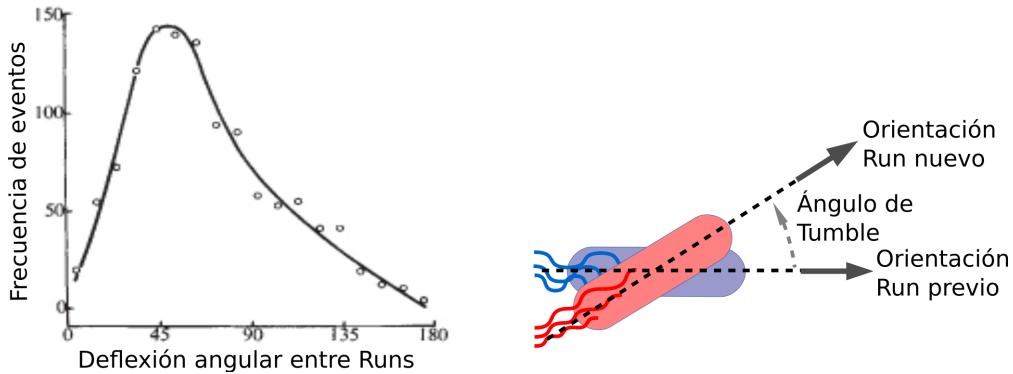


Figura 1-12: Izquierda: *E.coli* TAD obtenida de [29]. Dado que dos *Runs* siempre están separados por un *Tumble*, el ángulo de *Tumble* se mide entre la orientación del *Run* previo y la orientación del nuevo *Run* (derecha).

La asimetría en la distribución se ve claramente donde el valor máximo o moda, no equivale al valor medio. Esto es, el valor más probable no es el valor medio. Del mismo modo, se puede definir una TAD para las desviaciones durante los *Run*, de la cual aunque no fúe medida experimentalmente se conoce su valor medio $\langle \theta \rangle = 23^\circ$ y desviación estándar $\sigma = 23^\circ$ [29]. La rapidez en función del tiempo de la bacteria en la trayectoria de la figura 1-11 muestra la correlación negativa como se observa en la figura 1-8:

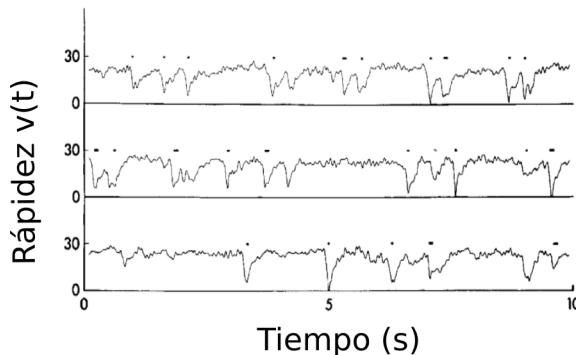


Figura 1-13: Rápidez en función del tiempo para *E.coli* para tres secuencias, imagen obtenida de [29].

Durante los *Runs* *E.coli* tiene una rapidez promedio de $\langle v \rangle = 14.2 \mu\text{m}/\text{s}$ y durante los *Tumbles* $\langle v \rangle \gtrsim 0 \mu\text{m}/\text{s}$, aunque estos valores son sensibles a las condiciones de crecimiento y a la cepa utilizada. Las variables rapidez y desviaciones angulares son suficientes para reproducir la velocidad de la bacteria en un sistema coordenado esférico como se verá más adelante. Una característica interesante es que estas variables tienen poca variación en medios líquidos con estímulos. Las principales variables

que se modifican en presencia de taxis son los tiempos para cada sentido de rotación de los flagelos *CW* o *CCW*. Dado que los modos de locomoción son el resultado del comportamiento colectivo de los flagelos, también se modifican ante taxis los tiempos de duracion de los *Run* y los *Tumble*. Estos tiempos se definen como el tiempo que pasa la bacteria en cada modo y con ellos se calcula el $Tumble_{bias}$, el cual se obtiene sumando todos los tiempos de *Tumbles* sobre el tiempo total de observación. Este observable nos permite analizar el comportamiento celular del mismo modo que el CW_{bias} nos permite analizar el comportamiento de un flagelo. Como todas las variables que se han analizado, los tiempos de duración de cada modo y los tiempos de *CW* & *CCW*, son variables aleatorias cuyas distribuciones han sido medidas experimentalmente. En la figura 1-14 se muestran las distribuciones obtenidas con el microscopio desarrollado por H.Berg [29] para los tiempos de *Run* y los tiempos *Tumble*.

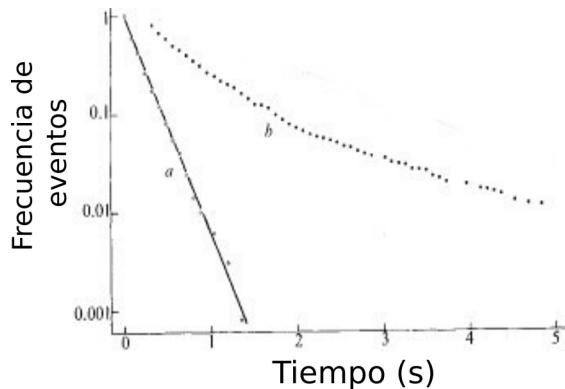


Figura 1-14: Distribución de tiempos de *Run* (b) y de *Tumble* (a) para la cepa **AW405** obtenidas en referencia [29].

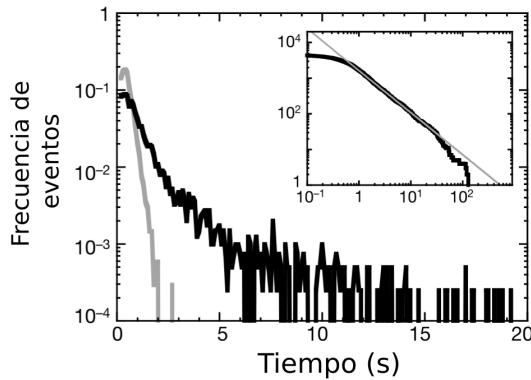


Figura 1-15: Distribución de tiempos de *CCW* en negro y de *CW* en gris para la cepa **RP437** obtenidas en referencia [31].

En la figura 1-15 se muestran las distribuciones de tiempo, obtenidas varias décadas después y para otra cepa, para los intervalos de CW & CCW [31] vía el metodo de bead-assay, mencionado previamente. En las mediciones de 1972 Berg & Brown [29] concluyeron que las distribuciones eran exponenciales mientras que en las mediciones del 2004 Korobkova et.al [31] concluyeron que para los flagelos las distribuciones de CCW siguen una distribución de ley de potencia. Al igual que en el caso de las distribuciones de vuelos de Levy, es difícil poder asegurar desde datos experimentales leyes de potencia y esto a generado una discusión abierta sobre cual es la distribución correcta. En el próximo capítulo propondremos una tercera explicación a este problema abierto. Ambas mediciones concuerdan en que las distribuciones de tiempos de *Tumbles* y de CW siguen una distribución exponencial como se ve el comportamiento lineal en los log-plots de las figuras 1-14 & 1-15, respectivamente. En medios libres de estímulos el tiempo medio de *Runs* es $\langle t_R \rangle = 0.86$ y el tiempo medio de *Tumbles* es $\langle t_T \rangle = 0.14$, con el $Tumble_{bias} = 0.15$ [29]. En presencia de estímulos como pueden ser aminoácidos como serina o aspartato, vía la ruta de señalización de la sección 1.2, se modifica la frecuencia de las transiciones $CCW \leftrightarrow CW$ cambiando las distribuciones de tiempos de duración de cada modo [11]. Los quimioatractores disminuyen la frecuencia de *Tumbles*, consecuentemente el $\langle t_R \rangle$ aumenta, mientras que los quimiorepelentes generan lo opuesto, aumentando la frecuencia de *Tumbles* y disminuye $\langle t_R \rangle$. Es por esta razón que a *E.coli* se la denomina una bacteria ‘optimista’; si encuentra una dirección favorable aumentara el tiempo en el que se mueve en este sentido [3]. Por otro lado, si censa un ambiente no favorable buscara nuevas direcciones aumentando la frecuencia de *Tumbles*. Cuando estudiemos la quimiotaxis veremos que hay una cualidad del sistema de señalización que le permite tener una eficiente respuesta quimiotáctica.

1.5. Hidrodinámica

Esta última sección esta dedicada a establecer desde una perspectiva general como es el ambiente donde nadan las bacterias flageladas. En esta tesis se estudia únicamente el caso de *E. coli*.

mente el movimiento de bacterias en medios líquidos, por ello se recurre a la hidrodinámica para caracterizar el hábitat de estos microorganismos. La dinámica de fluidos esta descrita por la ecuación de Navier-Stokes, la cual pertenece al conjunto de ecuaciones hidrodinámicas. Para obtener esta ecuación se analizan variables conservadas como: cantidad de partículas (o agentes), cantidad de movimiento y energía, cuyas variaciones se describen por ecuaciones de balance. El sistema queda descripto por el comportamiento de campos de densidades de velocidad y temperatura. Mediante las ecuaciones de balance, la termodinámica de no equilibrio y las leyes fenomenológicas para las relaciones entre fuerzas y corrientes, se obtiene para un fluido incompresible ($\nabla \cdot \bar{u} = 0$) [32] la ecuación:

$$\rho D_t \bar{u}(\bar{r}, t) = -\nabla P + \rho \bar{g} + \eta \nabla^2 \bar{u}(\bar{r}, t), \quad (1.20)$$

donde $D_t \doteq \frac{\partial}{\partial t} + \bar{u} \cdot \nabla$ es la derivada convectiva. Para poder resolver la ecuación, en caso de ser posible, se debe poseer información adicional sobre la presión. Esta ecuación no lineal en derivadas parciales describe el campo de velocidades del fluido donde se mueven los microorganismos, aunque para su deducción se ha utilizado la hipótesis de equilibrio local [33]. Esta hipótesis es necesaria dado que se está describiendo un sistema fuera del equilibrio a partir de la termodinámica clásica de equilibrio. Para ello, se divide el volumen del sistema a estudiar en pequeñas celdas, la magnitud de las celdas depende de la escala de las variaciones de las variables de estado. Por otro lado, las celdas deben ser lo suficientemente grandes para incluir un gran número de partículas o agentes, condición necesaria donde valen las leyes termodinámicas. Es decir, que hay una cota inferior dada por el número de partículas incluidas en la celda y una cota superior dada por las variaciones espaciales y temporales de las variables de estado. Se asume que estas celdas están en equilibrio y en ellas valen las leyes termodinámicas, donde es posible definir una temperatura. Como las variaciones de las variables de estado son suaves, las celdas se encuentran en equilibrio con su entorno (las otras celdas vecinas). En la deducción de la ecuación 1.20 se toma a cada celda como un punto en el espacio, lo pertinente relativo a los microorganismos es

que dimensiones tienen estas celdas con respecto a las dimensiones de dichos organismos. Si los apartamientos con respecto al equilibrio del fluido se encuentran en una escala macroscópica se puede asumir que el tamaño de la celda es significativamente mayor que el tamaño de las bacterias flageladas. Los comportamientos estudiados microscópicamente en esta tesis ocurren en un “punto” del espacio, los resultados en medios isótropos y estacionarios son válidos para medios líquidos con perturbaciones a escala macroscópica. Es decir, todo el volumen del fluido y el microorganismo en si, se desplazan en conjunto siendo invariantes. A continuación se analizan algunos números adimensionales y escalas espaciales útiles para caracterizar los procesos de mezcla y homogeneización que ocurren en los cuerpos de agua.

Utilizando la longitud L_c , tiempo T_c y velocidad características U_c la ecuación 1.20 puede llevarse a una versión adimensional:

$$\frac{1}{St} \frac{\partial \bar{u}^*}{\partial t^*} + \bar{u}^* \cdot \nabla^* \bar{u}^* = \frac{-1}{Re} \nabla^* P^* + \frac{1}{Fr^2} \bar{f}^* + \frac{1}{Re} \nabla^{*2} \bar{u}^*. \quad (1.21)$$

Donde se definen tres números adimensionales:

- El número de Strouhal, que compara la escala temporal de un forzado externo con la escala temporal del flujo del fluido, $St \doteq \frac{T_c U_c}{L_c}$.
- El número de Froude que está definido como el cociente entre la inercia del flujo y un campo externo, $Fr \doteq \frac{U_c}{\sqrt{FL_c}}$.
- El número de Reynolds, que es el cociente entre fuerzas iniciales y fuerzas viscosas, $Re \doteq \frac{\rho U_c L_c}{\eta}$.

En la ecuación 1.21 cada término tiene la misma magnitud que los demás, y ahora la predominancia de un término sobre los demás depende únicamente de las magnitudes de los números adimensionales. Además, se cambia el forzado externo gravitacional por un forzado arbitrario \bar{f}^* . La selección de las de las variables características no es trivial y depende específicamente del caso a tratar. Desde la perspectiva de los microorganismos se elige como longitud característica al semieje mayor del microorganismo,

la velocidad característica como la rapidez promedio, y el tiempo característico como el período de la rotación flagelar [34]. Utilizando $U_c \approx 10^{-3} \text{ cm/s}$, $L_c \approx 10^{-4} \text{ cm}$, $T_c \approx 10^{-2} \text{ s}$, $\rho \approx 1 \text{ g/cm}^3$ y $\eta \approx 10^{-2} \text{ g/cm}$ se obtiene $Re \approx 10^{-5}$ y $St \approx 10^{-1}$, es decir un número de Reynolds muy bajo.

En la ausencia de campos externos, bajo la condición de $Re \ll 1$ con $\frac{Re}{St} \approx 10^{-4} \ll 1$ la ecuación 1.21 se reduce a la ecuación de Stokes

$$0 = -\nabla^* P^* + \nabla^{*2} \bar{u}^*. \quad (1.22)$$

Aunque el estudio dimensional a permitido convertir una ecuación diferencial no lineal en una ecuación lineal que puede ser resuelta con una gran variedad de técnicas, no continuaremos hacia las soluciones sino hacia las restricciones que surgen de la ecuación de Stokes en la vida de un microorganismo en tales ambientes líquidos. Se desprecia la variación temporal dado que $\frac{Re}{St} \ll 1$, esto implica que los flujos de Stokes son “cuasi-estacionarios”. No significa que el campo de velocidad del fluido no cambie consecuentemente a variaciones en la velocidad de los microorganismos sino que los tiempos característicos dados por la disipación viscosa del fluido son muy rápidos en comparación con los tiempos característicos para los cambios en la rapidez del organismo. Es decir, el campo de velocidad a un tiempo dado depende únicamente de la rapidez instantánea del microorganismo en ese tiempo. Una consecuencia de la linealidad y la cuasi-estacionariedad es la reversibilidad. Si un microorganismo nadador cambia su dirección en sentido contrario, los campos de presión y velocidad invierten su signo. Esto es la base del “Teorema de la viera” desarrollado por Purcell [35], el cual asegura que un microorganismo debe tener un método de propulsión no recíproco. Por ejemplo, si un microorganismo quisiera propulsarse por dos “brazos” que suben y bajan, en cada aleteo hacia arriba el organismo avanzaría pero cada vez que sus “brazos” bajan, por el mismo camino, retrocede a su posición inicial. Como se mencionó en la sección 1.4.1, los flagelos de las bacterias cambian de forma cuando rotan en distintos sentidos, esto evita que las bacterias flageladas usen movimientos recíprocos y “caigan” en el Teorema de la viera. Por último, como se mencionó en

la definición del número de Reynolds, que los microorganismos viven en un mundo a $Re \ll 1$ implica que no conocen la inercia, esto es si dejan de auto-propulsarse se desplazan unos pocos nanómetros antes de frenarse. Para las bacterias flageladas en medios líquidos la segunda ley de Newton es inútil [35], para ellas la Física Aristotélica es la que mejor describe el mundo que las rodea.

El fluido no solo limita físicamente el mundo en el que viven las bacterias, sino que además modula la distribución espacial y temporal de los recursos que precisan los microorganismos para vivir [36]. Fluctuaciones aleatorias en la velocidad del fluido son las responsables de la mezcla de aguas y determinan propiedades escalares como transferencia de calor y nutrientes [37]. En las condiciones más energéticas que se pueden encontrar en cuerpos de agua, desde lagos hasta océanos, los procesos de mezcla dependientes de la intensidad de turbulencia son procesos cuya escala espacial es igual o superior a la escala milimétrica. La energía de los movimientos aleatorios se manifiesta en *eddies* (“remolinos”) en una escala de 1 a 10 metros [38]. Luego la energía comienza a transferirse hacia escalas espaciales menores, en cascadas vía fuerzas iniciales, con poca disipación de energía cinética. Sin embargo, al disminuir la escala espacial la viscosidad comienza a disipar la energía en forma de calor hasta al punto que los efectos de la turbulencia se vuelven despreciables aunque se mantienen los procesos de corte entre las capas del fluido. A esta escala en los micro ambientes de las bacterias, las corrientes advectivas y la difusión son los principales mecanismos de mezcla y homogenización. La escala de los eddies más pequeños es proporcional a la longitud de Kolmogorov, dado por $L_v \doteq (\frac{\nu}{\epsilon})^{\frac{1}{4}}$; donde ν es la viscosidad dinámica y ϵ es la tasa de disipación de energía cinética turbulenta. En los océanos la cota inferior $\epsilon \approx 10^{-6} W Kg^{-1}$ resulta en una cota inferior $L_v \approx 1 mm$. La cota inferior para S el tamaño de los eddies pequeños, obtenido experimentalmente esta en el rango de $S \approx 0.1 - 1 cm$ [34]. Por lo tanto, por debajo de la escala, de los milímetros, donde viven la mayoría de los microorganismos, se observan únicamente procesos de corte lineales que varían aleatoriamente en dirección e intensidad [37]. En la escala de la longitud de una bacteria flagelada el único proceso resultante es la homogenización por difusión [38]. Para evaluar hasta que punto se observan los procesos advectivos se

utiliza la escala de Batchelor [39]. Esta escala se define como $L_B \doteq (\frac{\nu D^2}{\epsilon})^{\frac{1}{4}}$, siendo para las situaciones más turbulentas ($\epsilon \approx 10^{-6} W K g^{-1}$) en el océano $L_B \approx 30 - 300 \mu m$. A medida que se disminuye la intensidad de la turbulencia en el cuerpo de agua, la escala de Batchelor aumenta, siendo mayor el volumen donde solo se homogeneiza el medio vía difusión.

La concentración de un soluto C , en un campo de velocidades en un fluido esta gobernada por una ecuación advección-difusión [40]. Si en la ley de Fick, ecuación 1.3, se incorpora un término $\bar{u}\rho$, vía la ecuación de continuidad 1.2, se obtiene:

$$\frac{\partial C}{\partial t} + \bar{u} \cdot \nabla C = D_c \nabla^2 C. \quad (1.23)$$

Nuevamente se puede operar como en la ecuación de Navier Stokes (ec 1.20) usando las mismas constantes para obtener una versión adimensional:

$$\frac{Pe}{St} \frac{\partial C^*}{\partial t^*} + Pe \bar{u}^* \cdot \nabla C^* = \nabla^{*2} C^*. \quad (1.24)$$

Donde St es el número de Strouhal definido antes y ahora

- Pe es el número de Peclet, que estima la magnitud relativa de transporte por flujo del fluido y transporte por difusión, $Pe \doteq \frac{U_c L_c}{D_c}$.

En el límite $U_c \rightarrow 0$ el número de Peclet $Pe \rightarrow 0$ mientras que el cociente $\frac{Pe}{St} \rightarrow \frac{L_c^2}{T_c D}$. Es decir, cuando el flujo tiende a cero recuperamos la ecuación de difusión. Mientras que en el límite $U_c \gg \frac{L_c}{D}$ se puede despreciar el término difusivo.

El término $Pe \bar{u}^* \cdot \nabla C^*$ es el causante de generar distribuciones inhomogéneas de solutos en los micro ambientes de las bacterias flageladas, donde \bar{u}^* es una variable cuya dirección e intensidad tienen comportamiento aleatorio. Se estima que los comportamientos quimiotácticos que poseen las bacterias flageladas oceánicas han surgido como una herramienta para explotar estos recursos efímeros [39]. Otro número adimensional utilizado para evaluar la incorporación de nutrientes por flujo del fluido es el número de Sherwood [34]. Aunque este número no posee una expresión única simple se define como el cociente entre la captación de nutrientes por flujo y

la captación de nutrientes únicamente por difusión. Desde la perspectiva de flujos laminares dominados por la ecuación de Stokes se ha analizado como la turbulencia y la motilidad pueden llegar a aumentar el número de Sherwood. Sin embargo, para las dimensiones de las bacterias flageladas ($\approx 1 - 10\mu m$) se calcula que la captación no aumenta más allá del 5% por lo tanto es despreciable [37]. En el 2011 Drescher *et al.* [41] midieron por primera vez el flujo de velocidades inducido por una bacteria flagelada, en este caso *E.coli*. Como se ve en la figura 1-16, las líneas de campo no son tangenciales como en el flujo laminar. Desde la teoría hidrodinámica, se concluye que *E. coli* es un “pujador” aunque, a su vez, se observa que las líneas de flujo se cierran sobre el cuerpo de la bacteria. Este resultado podría modificar las conclusiones sobre la tasa de captación desde la perspectiva de flujo laminar, dando incrementos mayores en el número de Sherwood. Rusconi *et al.* [42] probaron que los comportamientos individuales descriptos en la sección 1.4 solo ocurren en medios con fuerzas de corte en el fluido de intensidad pequeña o nula. Luego el aumento en el número de Sherwood ante situaciones turbulentas ocurren únicamente por cambios en la concentración del soluto y no por taxis bacteriana. Además, diversos trabajos muestran como la intensidad de turbulencia puede ser un parámetro para maximizar la tasa de crecimiento y la generación de biomasa de bacterias en líquidos [43,44]. Se estima que los aumentos en la biomasa y tasa de crecimiento por efectos turbulentos a pequeñas escalas se deben a la capacidad de las bacterias de formar filamentos [43] y a la mezcla de los nutrientes como se mencionó previamente.

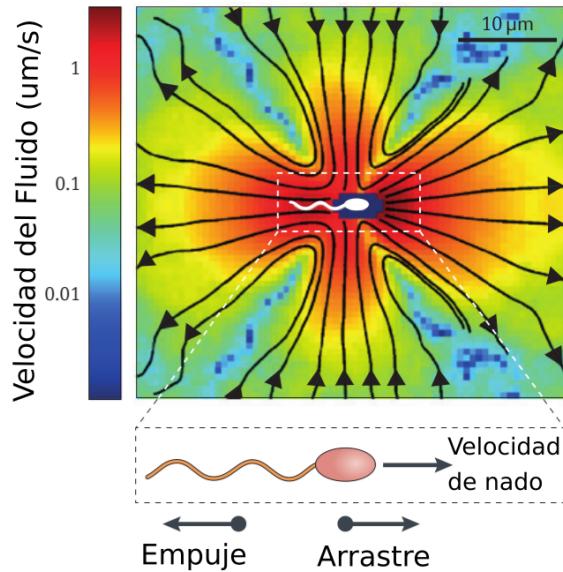


Figura 1-16: Flujo de velocidades del fluido inducido por el nado de *E.coli*, imagen modificada de [41].

El campo de velocidades inducido por *E.coli* al realizar un *Run* se aproxima muy bien al de un campo dipolar ya que se comporta radialmente como $\approx \frac{1}{r^2}$ [41]. Este resultado es de gran importancia ya que prueba que en condiciones de bajas densidades las bacterias, nadando en medios líquidos tridimensionales, poseen interacciones de corto alcance, $r \approx 1 - 10\mu m$. La situación contraria se observa cuando las bacterias flageladas nadan sobre superficies en líquidos quasi-bidimensionales con altas densidades donde principalmente las interacciones son vía repulsión por exclusión de volumen [41] y colisiones [45] que predominan sobre los comportamientos individuales.

1.6. Objetivos de la tesis

El objetivo de esta tesis es modelar la dispersión de bacterias flageladas en medios líquidos teniendo en cuenta procesos que ocurren a diversas escalas temporales y espaciales. Para ello, se presentará un conjunto de ecuaciones diferenciales estocásticas que representan a los distintos procesos que ocurren en simultáneo, con el fin de conectar observables macroscópicos con variables micro-o nanoscópicas. En el primer capítulo se introducirá un modelo a la escala nanoscópica en los entornos de los flagelos para determinar el comportamiento celular en presencia y ausencia de estímulos. Luego, en el segundo capítulo se introducirá otro juego de ecuaciones que gobiernan el desplazamiento del centro de masa de las bacterias en el líquido. A partir del formalismo de las ecuaciones de Langevin se busca generar un marco teórico sencillo donde todas las ecuaciones sean simuladas en simultáneo bajo la misma escala temporal. Implementando este conjunto de ecuaciones en un código desarrollado en el lenguaje de programación C se simularon distintos escenarios quimiotácticos para analizar estadísticamente la dispersión de *E. coli*, resultados presentados en el último capítulo.

Capítulo 2

Sistema de señalización quimiotáctico

En la sección 1.2 y 1.4 de la introducción se introdujo como una de las proteínas reguladoras de respuesta (CheY-P) modula el sentido de rotación de los flagelos. Morton-Firth & Bray [14] en 1998 computacionalmente simularon las fluctuaciones citoplasmáticas de CheY-P. Con el fin de reproducir las distribuciones de tiempos de *Runs & Tumbles*, probaron la hipótesis de que estas fluctuaciones alrededor de un umbral crítico disparaban las transiciones en el sentido de rotación de los flagelos. Sin embargo, concluyeron que no era posible utilizando un único umbral crítico y propusieron la necesidad de dos umbrales. Posteriormente, Bren & Eisenbach [13] en 2001 experimentalmente probaron que el CW_{bias} tiene un ciclo de histérsis que va desde una inactivación completa del anillo C a una activación completa del mismo y viceversa. Esto es, la cantidad de unidades FliM-Chey-P para la transición CW a CCW no es la misma que la transición inversa CCW a CW . Concluyeron que sus resultados eran compatibles con la hipótesis de los dos umbrales críticos propuesta previamente por Morton-Firth & Bray. Por otro lado, Duke, Novére & Bray [46] en 2001 probaron como un anillo de N protómeros idénticos puede funcionar como un interruptor si existe acoplamiento entre los protómeros del anillo. Si se supera cierto umbral energético, el estado del anillo se comporta como un switch, donde el acoplamiento produce una activación (o inactivación) completa de todo el anillo. Este enfoque establece un único umbral por el cual las fluctuaciones permiten que el anillo cambien entre los dos sentidos de rotación. Este tipo de modelo conformacional fue

reutilizado por Bai *et al.* [47] donde reproducen correctamente las velocidades angulares y la ultrasensibilidad de los motores flagelares. Ambas propuestas del modelo conformacional no han mostrado si son capaces de reproducir las distribuciones de tiempos de *CW & CCW* y las distribuciones de tiempos de *Runs & Tumbles*. En este capítulo introduciremos una ecuación diferencial estocástica con dos umbrales críticos intentando reproducir satisfactoriamente las distribuciones de tiempos de *Run & Tumble* a partir de las propuestas de las referencias [13, 14]. En apoyo a esta hipótesis, en 2005 Tu & Grinsteinst desarrollaron un modelo lineal de campo medio con dos niveles energéticos que reproducen cualitativamente la forma funcional de las distribuciones de tiempos de *CW & CCW*, aunque no estudian los valores experimentales de tiempos de *Runs & Tumbles* [48]. El objetivo de este capítulo es obtener un modelo que permita reproducir los tiempos de cada modo; *Runs & Tumbles*, en presencia y ausencia de químicos para luego ser vinculados con un modelo que reproduzca las trayectorias de *E. coli* y así estudiar la quimiotaxis a diversas escalas.

2.1. Transiciones entre rotaciones CW y CCW en un solo motor flagelar

Los componentes del sistema de señalización quimiotáctico están distribuidos por distintas zonas del volumen celular. Por un lado, los receptores y las kinasas se encuentran en los polos, las proteínas reguladoras de respuesta y las fofatasas libres en el citoplasma, y los flagelos distribuidos aleatoriamente en la superficie de la bacteria. Una descripción cuantitativa a nivel célula debería incluir las dinámicas enzimáticas además de los cambios por transporte de los componentes libres en el citoplasma. Este enfoque puede ser abordado desde los modelos reacción-difusión [49, 50]. Sin embargo estos modelos, por un lado no incluyen las fluctuaciones y por otro lado existe evidencia que las proteínas reguladoras de respuesta poseen difusión anómala [51]. El número de flagelos para *E. coli* es variable entre cepas y entre células, es dependiente del medio de crecimiento [52], y en promedio siempre es menor a 10. Como se men-

cionó en la sección 1.1 el motor flagelar tiene geometría cilíndrica con un diámetro aproximado de 50 nm . Tomando la geometría del bacilo como un cigarro con un diámetro de $1\text{ }\mu\text{m}$ y un largo entre 1 y $10\text{ }\mu\text{m}$, el cociente entre superficies indica que la célula tiene superficie suficiente para tener alrededor de 10000 flagelos. Esta disparidad entre escalas puede verse desde otro ángulo, la superficie que ocupa un motor flagelar sobre la superficie total celular es un área muy pequeña. Si el comportamiento de los motores flagelares esta controlado por la concentración de CheY-P, es suficiente modelar la concentración en estos pequeñas áreas y no en toda la célula, donde el modelado presenta grandes desafíos. Por lo tanto, en esta tesis se modelara la salida del sistema quimiotáctico en los entornos de los motores flagelares. Introducimos una ecuación diferencial estocástica (ecuación de Langevin) para la concentración molar de CheY-P (denotada $[\text{CheY-P}]$) en el entorno de un motor flagelar. La ecuación fenomenológica, propuesta aquí para reproducir con la mejor exactitud posible los resultados experimentales es

$$\dot{c}(t) = \kappa(\mu - c)c^\beta + \sqrt{2Q_c}\eta(t). \quad (2.1)$$

Solo se consideran cambios temporales en la concentración molar de CheY-P asumiendo que en el entorno del motor flagelar no hay variaciones espaciales en la concentración. El parámetro μ representa la molaridad estacionaria promedio mientras que el parámetro β , un entero positivo, caracteriza la no linealidad. El parámetro $\kappa = 1$ asegura un correcto manejo de unidades. El término estocástico, con intensidad de ruido $\sqrt{2Q_c}$, tiene valor medio cero y está delta correlacionado.

Ya que $c(t)$ es un proceso estocástico, la simulación de una realización, durante cierto tiempo, de la evolución temporal de dicha variable nunca será igual a otra. En la figura 2-1 se muestra una realización de la ecuación 2.1, es decir un experimento aleatorio. Las rectas punteadas naranja y roja son los umbrales críticos que disparan la transición en el sentido de rotación del motor flagelar. Cuando la $[\text{CheY-P}]$ aumenta y supera la concentración C_{RT} el motor flagelar pasa de rotar de sentido CCW a CW. El flagelo continuará rotando en este sentido hasta que la concentración disminuya

por debajo de la concentración C_{TR} y vuelve a rotar en sentido CCW. Como se ve en la figura 2-1 en verde se muestra el intervalo de tiempo que el flagelo rota CW mientras que en transparente vemos los intervalos donde rota CCW.

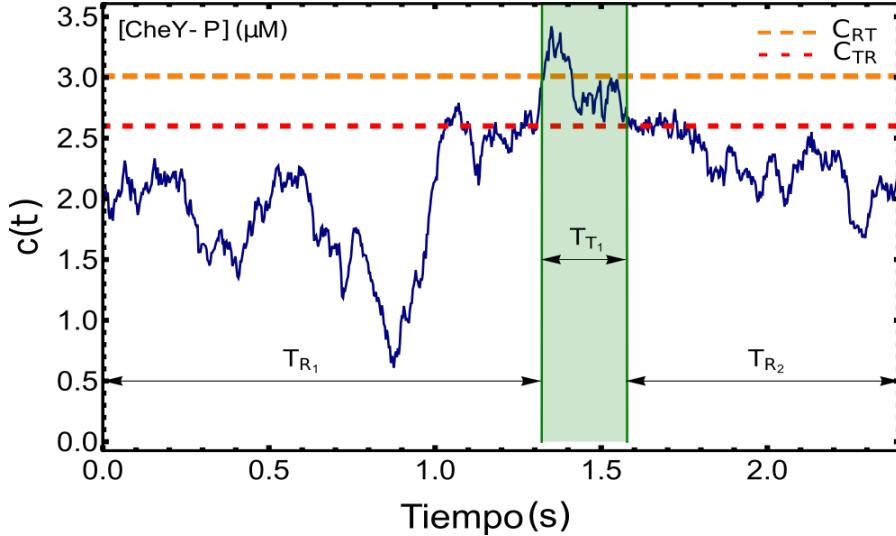


Figura 2-1: Concentración molar de CheY-P en el entorno de un flagelo en función del tiempo, mostrada en azul. Las rectas punteadas naranja y roja son los umbrales críticos para las transiciones $CCW \rightarrow CW$ y $CW \rightarrow CCW$, respectivamente

Para poder calcular los tiempos durante los cuales el motor rota en sentido CCW o CW debemos calcular los tiempos de primer pasaje. Esto es, calcular cual es la probabilidad de que la $[CheY - P]$ pase un umbral dada cierta condición inicial. Siempre el umbral de un sentido de rotación es la condición inicial del otro sentido de giro. Es decir, para la rotación CCW la condición inicial es el umbral C_{TR} y para CW es C_{RT} . Cuando el flagelo rota CCW, continuará en este modo solo si $0 \leq [CheY - P] < C_{RT}$. Mientras que el flagelo rotará CW solo si $C_{TR} \leq [CheY - P] < \infty$. De este modo tenemos establecidos los límites para calcular las probabilidades de supervivencia:

$$S_{CCW}(t) = \int_0^{C_{RT}} dc \rho(c, t | c_{TR}, t_0). \quad (2.2)$$

$$S_{CW}(t) = \int_{C_{TR}}^{\infty} dc \rho(c, t | c_{RT}, t_0). \quad (2.3)$$

Las ecuaciones 2.2 y 2.3 contemplan todos los caminos posibles que puede tomar la $[CheY - P]$ mientras se mueve dentro los límites que definen cada sentido de rotación.

ción. A su vez, cada camino tiene un peso, es decir hay caminos más probables que otros. Esto esta determinado por la función de densidad de probabilidad condicional $\rho(c, t|c_X, t_0)$, donde X representa ambos umbrales críticos. Podemos analizar cualitativamente el comportamiento de la ecuación 2.1 antes de ver su conexión con la función de densidad de probabilidad.

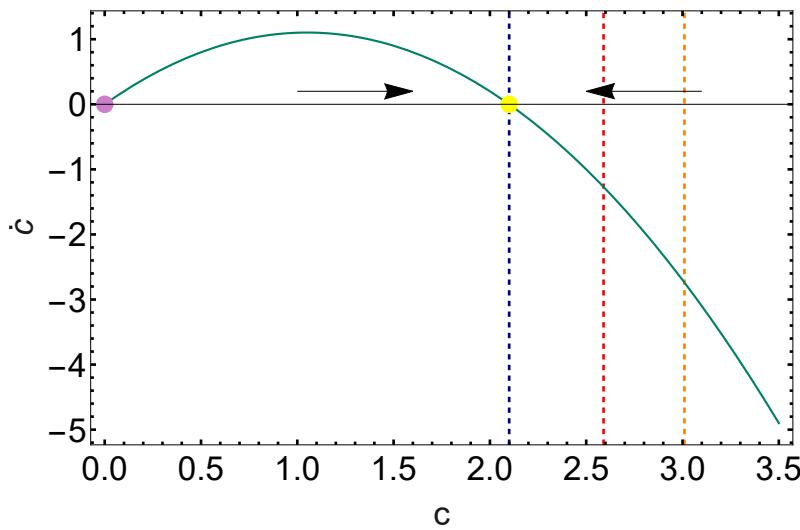


Figura 2-2: Análisis de estabilidad de la ecuación 2.1 en el régimen determinista ($Q_C = 0$). La recta vertical azul punteada determina la molaridad estacionaria promedio mientras que las rectas verticales punteadas roja y naranja son los umbrales críticos C_{TR} y C_{RT} respectivamente.

Si en la ecuación 2.1 tomamos $Q_C = 0$ tenemos una ecuación diferencial no lineal ordinaria. Haciendo un simple análisis de estabilidad podemos ver que esta ecuación tiene dos puntos fijos, es decir puntos en los cuales la concentración se vuelve constante. Como se ve en la figura 2-2, el punto fijo violeta $c = 0$ es inestable, cualquier perturbación hace que el sistema se aleje de este valor. Mientras que el punto fijo $c = \mu$ es estable, cualquier condición inicial (excepto $c = 0$) evolucionará hacia el punto amarillo como indican las flechas negras. Para todo el espacio de parámetros utilizado en esta tesis la estabilidad de los puntos de equilibrio no cambiará ya que siempre se tomará $\mu > 0$, entonces no analizaremos desde la teoría de las bifurcaciones a la ecuación 2.1.

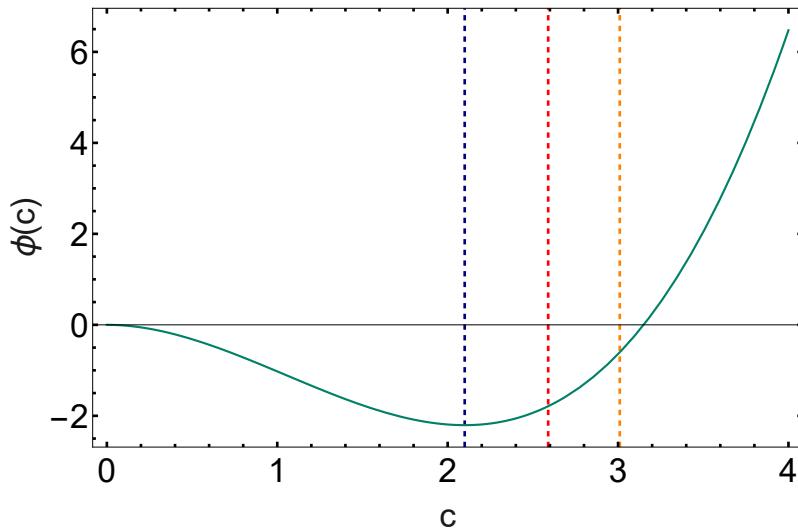


Figura 2-3: Análisis del potencial del término determinista de la ecuación 2.1. La recta vertical azul punteada determina la molaridad estacionaria promedio mientras que las rectas verticales punteadas roja y naranja son los umbrales críticos C_{TR} y C_{RT} respectivamente.

Otro modo de analizar el comportamiento, cuando $Q_C = 0$, es mediante el método del potencial. Este método es análogo al análisis energético, donde el pozo del potencial representa el mínimo de energía hacia el cual siempre evoluciona el sistema. Los mínimos del potencial se caracterizan por tener pendiente nula y curvatura convexa, siendo $c = \mu$ un punto de equilibrio y $c = 0$ un estado inestable. Esto se puede observar en la figura 2-3, donde además vemos en rojo y naranja las concentraciones críticas que disparan las transiciones en el sentido de rotación del flagelo. Aunque el sistema quiera evolucionar hacia el punto de equilibrio (o punto fijo estable) el ruido actúa como perturbación sacando al sistema del equilibrio. Son estas fluctuaciones estocásticas las que hacen que la $[CheY-P]$ oscile entre los umbrales críticos y ocurran las transiciones entre CCW y CW. Cuanto más cerca del punto de equilibrio estén estos umbrales, más probable es que la concentración los cruce, es por ello que el umbral C_{TR} (naranja) es menos probable que el C_{RT} (rojo).

En la ecuación 2.1 se definió al término estocástico como un ruido con una correlación tipo delta. La interpretación de tal correlación, es que los tiempos característicos en los cuales una fluctuación influye sobre otra, a distintos tiempos, es mucho menor que el tiempo característico del proceso estudiado. Es decir, el tiempo característico con el cual el sistema relaja, cuando $Q_C = 0$, es mucho menor que el tiempo carac-

terístico donde las fluctuaciones no son independientes. Por lo tanto, la correlación tipo delta hace que el futuro solamente este determinado por el presente. Todos aquellos procesos que cumplan tal propiedad se llaman procesos de Markov. Para toda ecuación de Langevin, como la ecuación 2.1, con ruido aditivo y delta correlacionado se tiene una ecuación asociada llamada ecuación de Fokker-Planck. Esta ecuación modela la evolución temporal de la función de densidad de probabilidad condicional:

$$\frac{\partial}{\partial t} \rho(c, t|c_0, t_0) = -\frac{\partial}{\partial c} [A(c)\rho(c, t|c_0, t_0)] + Q_c \frac{\partial^2}{\partial c^2} \rho(c, t|c_0, t_0), \quad (2.4)$$

con $A(c) \doteq \kappa(\mu - c)c^\beta$. Se puede reescribir la ecuación 2.4 definiendo la corriente de probabilidad :

$$J(c, t|c_0, t_0) = [A(c) - Q_c \frac{\partial}{\partial c}] \rho(c, t|c_0, t_0), \quad (2.5)$$

resultando en una ecuación de continuidad igual a la utilizada en la sección 1.3 (ecuación 1.2):

$$\frac{\partial}{\partial t} \rho(c, t|c_0, t_0) + \frac{\partial}{\partial c} J(c, t|c_0, t_0) = 0. \quad (2.6)$$

Para analizar la implicancia de esta ecuación en las transiciones en el sentido de rotación de los flagelos, primero analizamos su comportamiento sin los umbrales críticos. Para que el problema diferencial 2.6 este correctamente planteado debemos establecer la condición inicial y las condiciones de contorno. Como la [CheY-P] esta definida en el intervalo $[0, \infty)$ y el potencial de la figura 2-3 tiende a infinito cuando la concentración tiende al infinito, las condiciones de contorno son reflectantes en cero¹ y en el infinito²:

$$J(0, t|c_0, t_0) = J(\infty, t|c_0, t_0) = 0. \quad (2.7)$$

La corriente de probabilidad se conserva dentro del dominio donde esta definida la [CheY-P]. Tiene un término determinista dado por $A(c)$ y el otro término $Q_c \frac{\partial \rho}{\partial c}$, es una corriente difusiva dada por las fluctuaciones.

¹ Condición de borde que se exige para que la concentración molar sea una cantidad positiva.

² Una condición de borde reflectante en el infinito es igual que una condición natural ya que la concentración molar es una cantidad finita, $\rho(\infty, t|c_0, t_0) = 0$.

Las condiciones de contorno reflectantes aseguran que existe una solución de equilibrio que se obtiene con la condición $\frac{\partial}{\partial t} \rho(c, t|c_0, t_0) = 0$. Esta solución de equilibrio conocida como solución potencial es

$$\rho_{ST}(c) = N e^{\phi(c)} \quad (2.8)$$

donde $\phi(c) \doteq - \int_a^c ds \frac{A(s)}{Q_C}$ es el potencial de la figura 2-3 y N la constante de normalización. Esta solución estacionaria es independiente de la condición inicial y para los parámetros de la figura 2-3 resulta en la función de la figura 2-4.

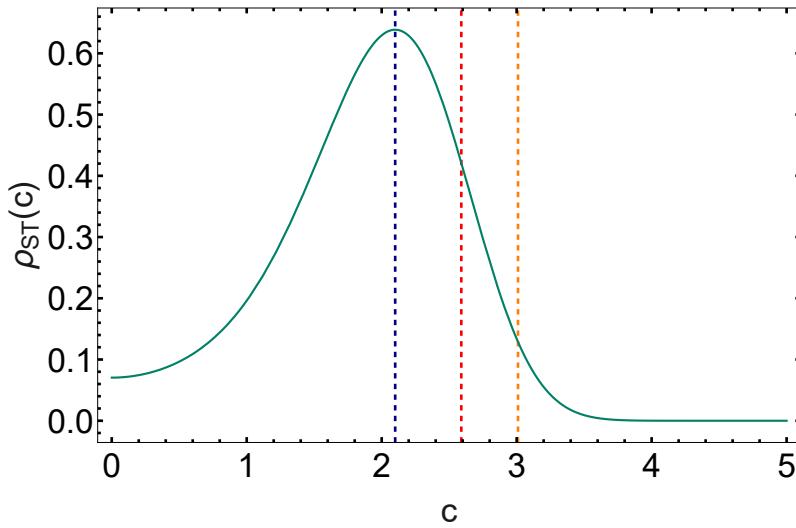


Figura 2-4: Solución potencial para la ecuación 2.4 asociada a la ecuación 2.1 sin las condiciones de umbrales críticos. Los umbrales se muestran como referencia para entender cuán probables son cuando se los considera. La recta vertical azul punteada determina la molaridad estacionaria promedio mientras que las rectas verticales punteadas roja y naranja son los umbrales críticos C_{TR} y C_{RT} respectivamente.

Con este análisis sin tomar en cuenta los umbrales críticos obtenemos la distribución estacionaria de la [CheY-P] en el entorno de un motor flagelar. Los valores de los parámetros utilizados serán explicados más adelante. Con este resultado podemos calcular el valor medio $\langle c \rangle = 1.89 \mu M$ y la desviación estándar $\sigma = 0.67 \mu M$. Obtenemos que la solución es una distribución asimétrica donde los umbrales críticos están dentro de dos desviaciones estándar con respecto a la media.

La probabilidad de que a cierto tiempo un flagelo este rotando en sentido CCW dado que comenzó con una condición inicial $c_0 = C_{TR}$ esta dada por la ecuación 2.2.

Para calcular dicha probabilidad se necesita conocer la función de densidad de probabilidad condicional que satisface la ecuación de Fokker-Planck (2.4) pero modificando las condiciones de contorno 2.7, incluyendo los umbrales. Es decir se modifica el problema diferencial y por ende la solución. Ahora la condición reflectante para $c = 0$ se mantiene pero se modifica la otra condición donde hay una condición absorbente³ en $c = C_{RT}$, siendo las condiciones de contorno:

$$J(0, t|c_0, t_0) = 0 \quad \wedge \quad \rho(C_{RT}, t|c_0, t_0) = 0. \quad (2.9)$$

Es importante remarcar que el proceso estocástico sigue siendo el mismo y satisface la ecuación diferencial 2.4 con condiciones de contorno 2.7, sin embargo ahora se está analizando desde otra perspectiva para calcular las probabilidades de supervivencia. Para los parámetros utilizados en las figuras 2-3 y 2-4 la condición de contorno absorbente hace que la corriente de probabilidad ahora no se conserve y por lo tanto no habrá una solución de equilibrio no nula. Es decir, se puede asegurar con probabilidad igual a uno que tarde o temprano la concentración va a llegar al umbral C_{RT} . Que tan rápido ocurre esto, en promedio, es lo que nos indica exactamente la probabilidad de supervivencia. Aunque no obtendremos la solución exacta a este nuevo problema, si podremos saber como es su comportamiento temporal. Vía el ansatz de separación de variables proponemos que la solución a este problema es:

$$p(c, t|c_0, t_0) = \sum_{n=0}^{\infty} C_n(c) T_n(t) \quad (2.10)$$

donde $T_n(t) = A_n e^{-\alpha_n t}$ con $\alpha_n \neq 0 \forall n$. Usando esta solución en la ecuación 2.2 obtenemos una expresión para la probabilidad de supervivencia:

$$S_{CCW}(t) = \sum_{n=1}^{+\infty} b_n e^{-\alpha_n t} \quad (2.11)$$

³ Una condición de borde absorbente implica que la $p(c_{RT}, t|c_0, t_0) = 0$, es decir una vez que el proceso llega a este valor se termina. En este modelo aunque el proceso sigue empieza un nuevo modo, en este caso sería una transición a *CW*.

donde $b_n = \int_0^{C_{RT}} ds C_n(c)$. Podemos ver de la solución para la probabilidad de supervivencia de CCW que al ser una serie infinita de exponenciales $S_{CCW}(t \rightarrow \infty) = 0$, es decir que la transición es inevitable. Ahora si queremos saber como se distribuyen los tiempos a los cuales ocurren las transiciones tenemos que calcular lo que se conoce como función de densidad de primer pasaje, la cual es definida por $f_{CCW} = -\frac{\partial S}{\partial t}$. Así explícitamente

$$f_{CCW}(t) = \sum_{n=1}^{+\infty} b_n \alpha_n e^{-\alpha_n t} \quad (2.12)$$

La distribución para tiempos de rotación de CCW (figura 2-5) muestra que las transiciones instantáneas no son posibles, existe un valor más probable para la transición distinto al valor medio. Además, en el grafico inserto semi-log de esta figura vemos como la cola de la distribución es una recta. Al ser un grafico semi-logarítmico esto indica que la f_{CCW} decae exponencialmente a cero. Ambas propiedades $f_{CCW}(0) = 0$ y $f_{CCW}(\infty) = 0$ aseguran que sea una función de densidad bien comportada. En la figura 2-6 se muestra la distribución de tiempos de CW (la cual se define similarmente que la CCW)⁴. En esta última predomina la exponencial con un lapso mayor de decaimiento como se puede ver en el grafico inserto. En ambas figuras en rojo se muestra un ajuste realizado con una serie finita de exponenciales como se obtiene desde la propuesta del ansatz de separación de variables. Es importante remarcar que esta propuesta tiene limitaciones ya que no explica el comportamiento a tiempos pequeños, es por ello que el ajuste pierde fidelidad cerca del máximo y hacia tiempos cercanos a cero.

Hasta el momento se utilizó un juego de parámetros que luego será el más adecuado para explicar ciertas propiedades medidas en *E.coli*. Estos parámetros son aquellos que responden al sistema de señalización en ausencia de estímulos, es decir cuando la bacteria está en un medio donde no hay sustancias que puedan estimular a los receptores MCPs. Los valores tomados para esta condición libre de estímulos son: $\mu = 2.08 \mu M$, $C_{RT} = 3.01 \mu M$, $C_{TR} = 2.59 \mu M$, $Q = 0.7 \mu M^2 s^{-2}$ y $\beta = 1$.

⁴La diferencia es que en este caso los coeficientes son $b_n = \int_{C_{TR}}^{\infty} ds C_n(c)$

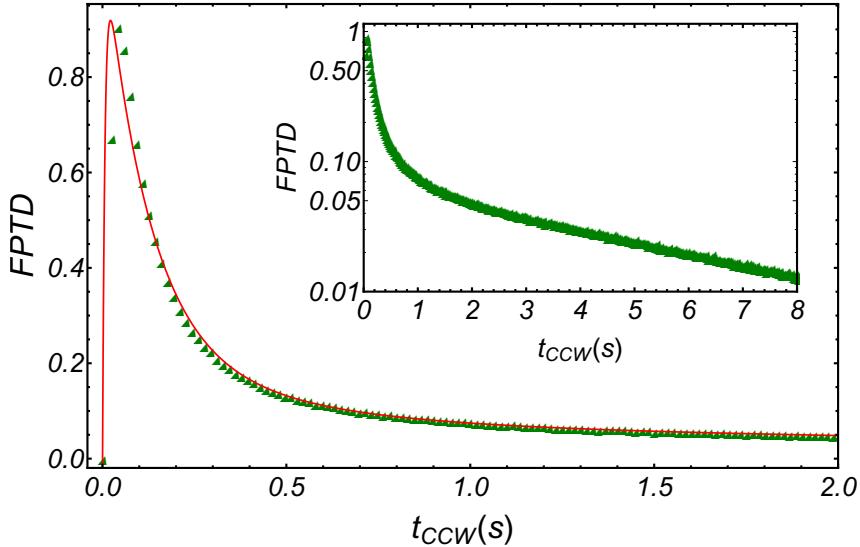


Figura 2-5: Función de primer pasaje para tiempos de rotación CCW obtenida vía simulación numérica de la ecuación 2.1 con las condiciones 2.9. En verde se observan los datos numéricos y en rojo un ajuste a partir de la ecuación 2.12. En el grafico inserto se muestran los datos numéricos en un grafico semi-log.

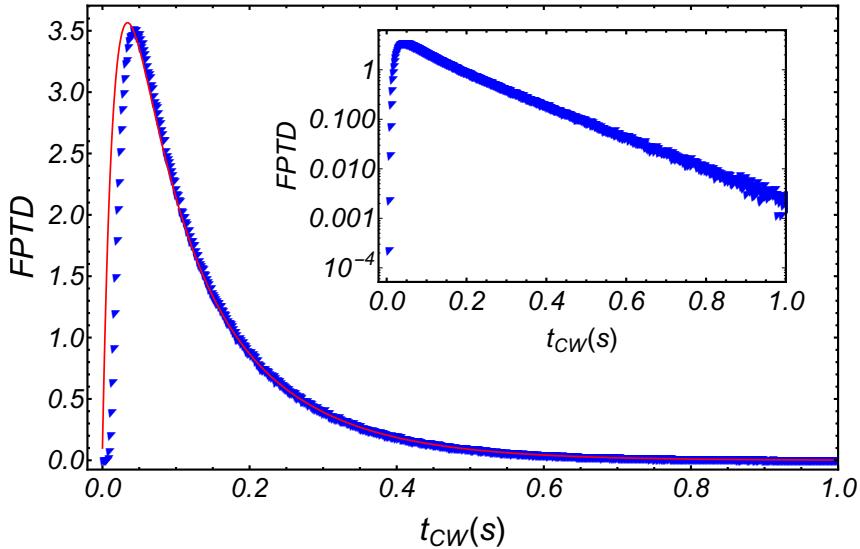


Figura 2-6: Función de primer pasaje para tiempos de rotación CW obtenida vía simulación numérica de la ecuación 2.1 con las condiciones 2.9. En azul se observan los datos numéricos y en rojo un ajuste a partir de la ecuación 2.12. En el grafico inserto se muestran los datos numéricos en un grafico semi-log

Experimentalmente fue observado que existe una actividad basal de la kinasa (CheA) y por ende una concentración basal de la proteína reguladora de respuesta CheY-P [11]. El parámetro μ usado en esta sección representa esta concentración basal de CheY-P en el entorno de un flagelo. En el año 2000 Cluzel *et al.* [16] encontraron que cada motor flagelar posee una respuesta ultrasensitiva con respecto a las

variaciones en la [CheY-P]. Para poder realizar tal experiencia se requieren una serie de mutaciones en alguna cepa salvaje de *E.coli*. Primero se debe anular el sistema de adaptación vía metilación de los receptores MCPS para que los niveles de CheY-P sean estables (mutantes CheRCheB). Más aún, se requiere poder modificar gradualmente la [CheY-P]. Esto se logra anulando la síntesis endógena de esta proteína e introduciendo un plásmido con el gen para la síntesis de CheY, con una larga vida media, fusionada a una proteína con propiedades fluorescentes. Para poder controlar el nivel de expresión del gen se utiliza un promotor Lac⁵ inducible via IPTG⁶. Al ir aumentando la concentración de IPTG en el medio aumenta la expresión del gen, lo cual se mide analizando la señal de fluorescencia. Por último, se utiliza un anticuerpo que permite pegar todos menos un flagelo a un vidrio dejando fija la posición de la bacteria. El flagelo restante, vía el mismo anticuerpo, tiene pegada una micro-esfera de latex. Analizando las trayectorias de la micro esfera vía análisis de video se obtiene el sentido de rotación del flagelo y se calcula el CW_{bias} definido en la sección 1.2 de la Introducción. Todavía no hemos incorporado en la ecuación 2.1 el sistema de adaptación por lo tanto es análogo a modelar las mutantes CheRCheB. Al modificar el parámetro μ estamos modificando la concentración basal de CheY-P en el entorno de cada motor molecular, lo cual es lo mismo que se logra al ir modificando gradualmente la concentración de IPTG en el medio. Para analizar como se comporta el modelo presentado ante los cambios graduales de la [CheY-P] únicamente se fue aumentando el parámetro μ en pasos de $0.1 \mu M$ dejando el resto de los parámetros constantes.

⁵ El promotor del Operon Lac se utiliza como un regulador del nivel de expresión en plasmidos u otros vectores. Su actividad es inducida por un análogo no degradable de la lactosa, el IPTG.

⁶ IPTG: Isopropil-b-D-tiogalactósido

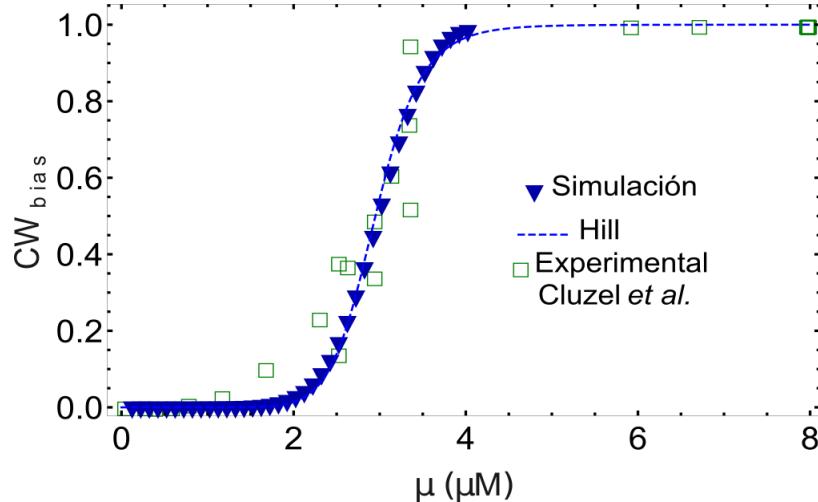


Figura 2-7: CW_{bias} en función de μ ([CheY-P]). Triangulos azules resultados de la simulaciones numéricas. Curva azul segmentada muestra el ajuste via función de Hill. Los cuadrados verdes muestran resultados experimentales de [16].

La figura 2-7 muestra como sin modificar ningún parámetro el modelo reproduce en buena manera la ultrasensibilidad del motor flagelar. Los datos de la simulación numérica (triángulos azules) pasan entre medio de los valores experimentales obtenidos en [16]. Para cuantificar esta ultrasensibilidad se ha implementado en la literatura el uso de la función de Hill, utilizada comúnmente para enzimas con regulación alos-térica:

$$CW_{bias} \simeq \frac{1}{1 + \left(\frac{K_{1/2}}{\mu}\right)^{N_h}}. \quad (2.13)$$

Como se ve en la ecuación 2.13 este ajuste tiene dos coeficientes, el $K_{1/2}$ que es la concentración para la cual hay una respuesta media y N_h mide la pendiente de la respuesta. Experimentalmente se obtuvieron un $K_{1/2} = 3.1 \mu M$ y $N_h = 10.3 \pm 1.1$ [16]. Los coeficientes obtenidos a partir del modelo presentado son $K_{1/2} = 2.95$ y $N_h = 11.0$, estando dentro del error de los datos experimentales.

En la figura 2-8 podemos ver como se modifican los tiempos medios de rotación CCW y CW al ir variando el CW_{bias} . Es decir, al cambiar la molaridad de equilibrio μ , cambia el CW_{bias} y a su vez los tiempos medios en el sentido de rotación. Es otra manera de ver la ultrasensibilidad de los motores ante la [CheY-P]. Como se ve en la figura 2-9 tanto los tiempos medios de CCW y CW siguen una ley de potencia con

respecto al CW_{bias} y CCW_{bias} . El CCW_{bias} se define como $CCW_{bias} = 1 - CW_{bias}$. Podemos volver a analizar lo que ocurre en la ecuación 2.1 cuando cambiamos el parámetro μ para tener una perspectiva desde los cambios en la [CheY-P].

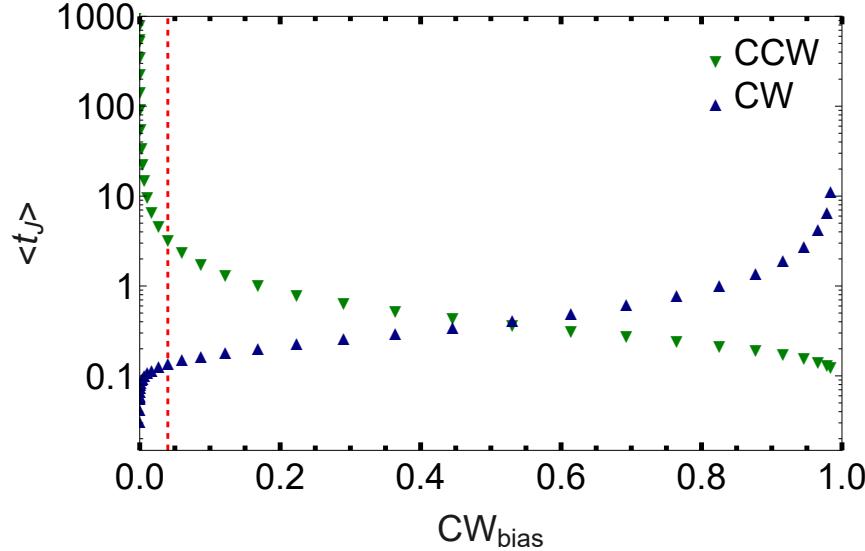


Figura 2-8: Tiempos medios de CCW y CW en función del CW_{bias} . Linea vertical punteada roja marca el CW_{bias} sin estímulos.

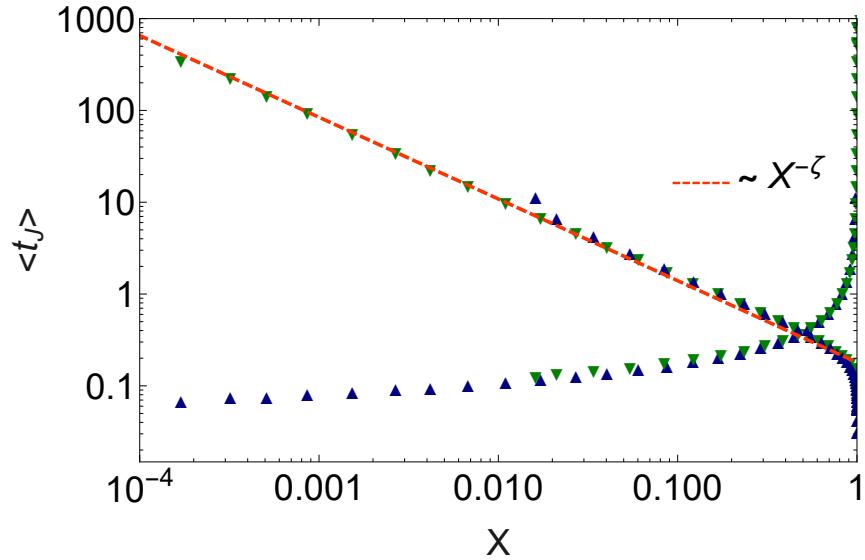
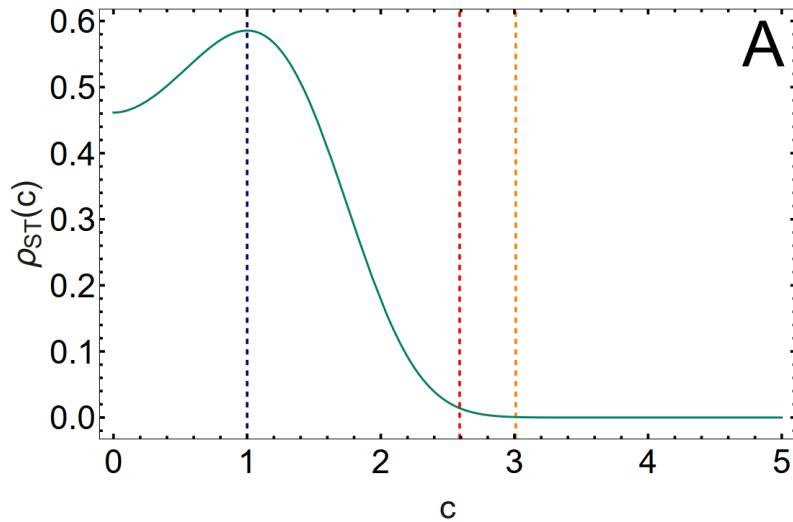


Figura 2-9: Tiempos medios de CCW y CW en función del CW_{bias} y CCW_{bias} respectivamente en gráfico doble logarítmico. Los triángulos verdes corresponden al CCW y los azules al CW . Cuando $X = CW_{bias}$ los tiempos medios de CCW crecen con una ley de potencia y los de CW decrecen. Por el otro lado, cuando $X = CCW_{bias}$ los tiempos medios de CCW decrecen y los tiempos medios de CW crecen siguiendo la misma ley de potencia. La recta punteada roja es la ley de potencia $X^{-\zeta}$ con $\zeta = 0.89$ donde X representa CW_{bias} o CCW_{bias} .

En los gráficos de la figura 2-10 se muestran los casos $\mu = 1.0$, $\mu = 2.95$ y $\mu = 4.0$

respectivamente. Lo que vemos en el grafico A es que la función $\rho_{ST}(C_{RT}) \approx 0$, esto se interpreta como la probabilidad de que la $[CheY-P] = C_{RT}$ es prácticamente nula⁷. Esto significa que la intensidad de las fluctuaciones no es suficiente para generar una transición $CCW \rightarrow CW$. Por lo tanto, si el sistema comienza en CCW siempre permanecerá en este modo de rotación y por esto $CW_{bias} = 0$, como vemos en la figura 2-7. En el caso $\mu = 4.0$ grafico C de la figura 2-10 tenemos lo opuesto, si el sistema comienza en CW la probabilidad $P(c \leq C_{TR}) \approx 0$ y nunca cambia el sentido de rotación siendo $CW_{bias} = 1.0$. Por último, en el grafico B de la figura 2-10 se muestra el caso $\mu = 2.95$ que corresponde al $CW_{bias} = 0.5$ como vemos en la figura 2-7 y 2-8. Este es un valor particular con $K_{1/2} = 2.95$, es la situación donde los tiempos medios de rotación CCW y CW son iguales. En este modelo al estimular el sistema de señalización de manera constante se modifica el parámetro μ generando cambios en $\rho_{ST}(c)$. Esto modifica la probabilidad con la cual las fluctuaciones hacen que la $[CheY-P]$ supere los umbrales críticos. Siendo este el mecanismo por el cual se logra reproducir satisfactoriamente la ultrasensibilidad de los motores flagelares.



⁷ Recordar que la $\rho_{ST}(c)$ es la solución de equilibrio obtenida al tomar las condiciones de borde libre de los umbrales críticos (ec. 2.7).

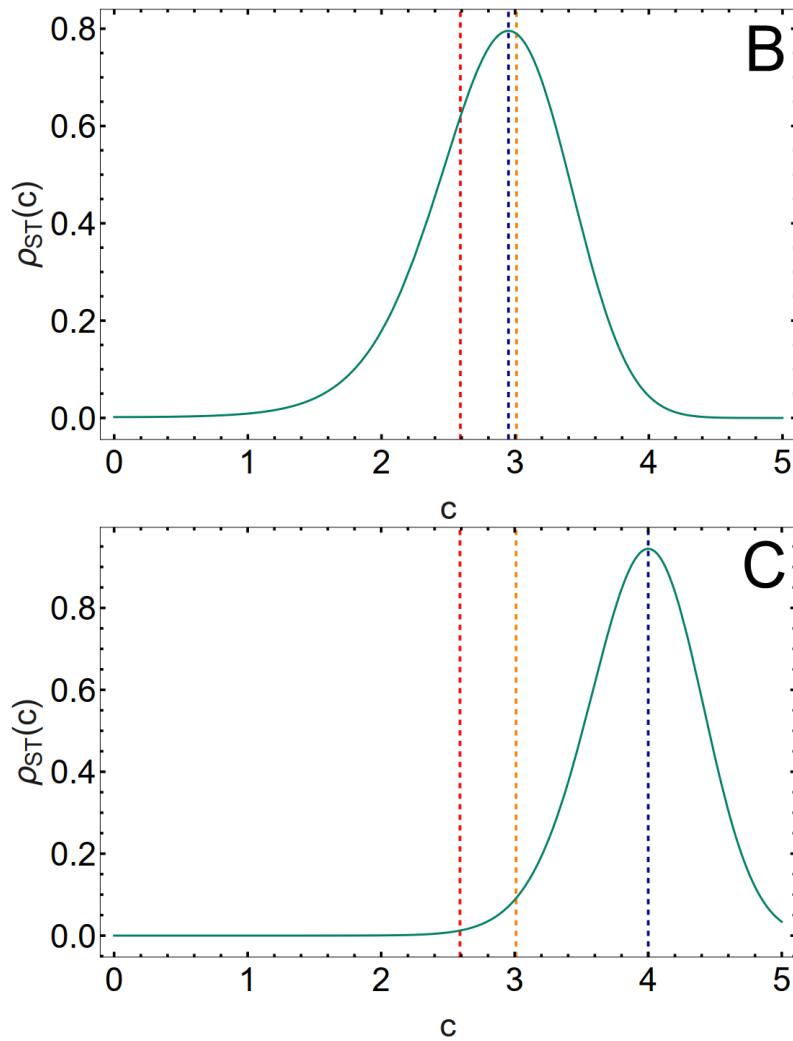


Figura 2-10: Solución potencial para la ecuación 2.4 asociada a la ecuación 2.1 sin las condiciones de umbrales críticos para A: $\mu = 1.0$, B: $\mu = 2.95$ y C: $\mu = 4.0$. La recta vertical azul punteada determina la molaridad estacionaria promedio mientras que las rectas verticales punteadas roja y naranja son los umbrales críticos C_{TR} y C_{RT} respectivamente.

Pequeños incrementos en las concentraciones de los ligandos generan fuertes cambios en el CW_{bias} , fenómeno llamado paradoja de la “ganancia” [3]. Es decir, el sistema quimiotáctico posee la capacidad de responder ante pequeñas variaciones y para ello son necesarios pasos de amplificación en la cascada de señalización. El primer paso ocurre en los receptores y da una posible respuesta a porque se encuentran concentrados en los polos. Su distribución en los polos no es para maximizar la probabilidad de captación [35] sino para arreglarse en clusters permitiendo interacciones entre los receptores [53]. Esta interacción permite que un receptor estimulado active otros receptores sin la necesidad de tener uniones con ligandos, así se genera una fuerte

amplificación en la actividad de la kinasa [54]. La actividad de la kinasa impacta rápidamente en la concentración de CheY-P y da lugar al segundo paso de amplificación, la alta respuesta cooperativa de los motores flagelares. Luego, el modelo presentado, hasta ahora sin el sistema de adaptación, reproduce satisfactoriamente el segundo paso de la amplificación. Para incluir el primer paso de amplificación se incorporará el modelo presentado por [12, 55] para la actividad de la kinasa y la tasa de metilación. Debido que la transferencia del grupo fosfato desde el *ATP* hacia *CheA* es mucho más lenta que la transferencia del fosfato de *CheA-P* a *CheY*, la tasa de producción de CheY-P es proporcional a la actividad de *CheA* [54]. Por otro lado, los tiempos característicos para la unión de ligando a los receptores (τ_l) son mucho menores a los tiempos característicos de la kinasa (τ_k), $\tau_k \gg \tau_l$ [12]. Adicionalmente, los transitorios en la actividad de la kinasa son rápidos comparados con las escalas temporales propias de los experimentos, alcanzando rápidamente un estado de equilibrio. Debido a esto podemos tomar la [CheY-P] en un estado de equilibrio, como en el equilibrio las tasas de fosforilación son iguales a las de hidrólisis, la actividad de la kinasa es proporcional a la concentración del complejo *CheY – CheZ*. Usando este complejo con dos fotofosforiladores diferentes vía la técnica FRET se pudo medir indirectamente la actividad de la kinasa y de este modo se desarrollaron las ecuaciones fenomenológicas de [12, 55] que utilizamos en esta tesis. Dado que las mediciones vía FRET miden la [CheY-CheZ], esto es proporcional a la actividad de *CheA* y al, mismo tiempo, proporcional a la [CheY-P], por lo tanto denominando a a la actividad de la kinasa vale la relación $a = C\mu$. Esto significa que la molaridad estable μ en la vecindad de los motores flagelares es proporcional a la actividad de la kinasa, de este modo se complementan el modelo presentado en esta tesis y los de [12, 55]. Por el momento seguiremos sin incorporar el feedback negativo por metilación. La actividad de la quinasa, en estas condiciones, es [12]

$$a = G([L], m) = \frac{1}{1 + (\frac{e^{\alpha(m_0 - m)}}{c} (\frac{k_I + [L]}{k_A + [L]}))^N} \quad (2.14)$$

donde $[L]$ es la concentración del ligando, m el nivel de metilación, k_I y k_A son

las constantes de disociación para receptores inactivos y activos, m_0 y α constantes fenomenológicas y $c = \frac{k_L}{k_A}$. Es importante remarcar que esta ecuación para la actividad de los receptores MCPs fue publicada en [56] un año antes que la publicación [12].

Como se ve los cambios en la actividad de la kinasa responden a una ecuación algebraica y no a una ecuación diferencial. Esto asume que los cambios en la actividad de la kinasa son instantáneos. Esto es válido si se trabaja en la escala temporal del sistema de metilación el cual está en el orden de la duración promedio de los Runs en situaciones sin estimular. Es decir, los tiempos característicos de la adaptación (τ_m) son mucho mayores que los tiempos característicos de la kinasa, resultando entonces en tres procesos bien definidos a distintas escalas temporales $\tau_m \gg \tau_k \gg \tau_l$ [12].

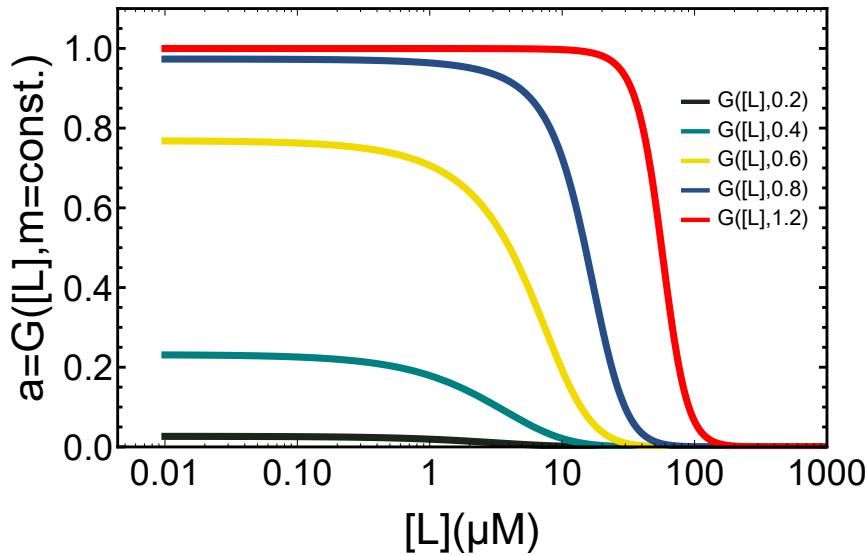


Figura 2-11: Actividad de la kinasa en función de la concentración del ligando para diferentes niveles constantes de metilación.

Como se muestra en la figura 2-11 la actividad de la kinasa disminuye al ir aumentando la concentración del ligando en el medio exterior. Esto se debe a que se está modelando el efecto de un atractor como por ejemplo aspartato o serina. Los atractores disminuyen la actividad de la kinasa, bajando la $[\text{CheY-P}]$, disminuyendo la probabilidad del sentido de rotación CW , en otras palabras aumenta los tiempos medios de rotación CCW . Este efecto es el que ya se mostró en la figura 2.8 pero en función del CW_{bias} . Además en la figura 2-11 se puede observar como los diferentes niveles de metilación generan mayor o menor sensibilidad en la actividad de la kinasa

con respecto al ligando; la metilación es un mecanismo que le da robustez al sistema de señalización quimiotáctico. Usando la relación de proporcionalidad entre la actividad de la kinasa y la concentración molar estable μ podemos vincular los cambios en el CW_{bias} en función de la concentración del ligando.

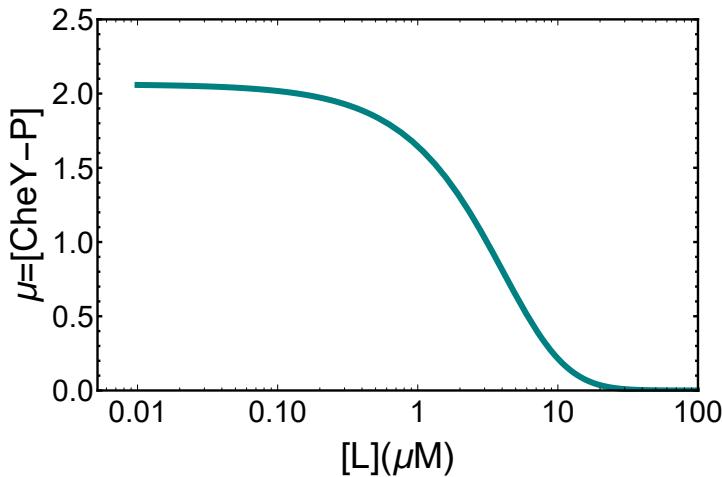


Figura 2-12: Concentración molar estable μ en función de la concentración del ligando.

Como podemos ver en la figura 2-12 los cambios en μ empiezan a ser significativos a partir de concentración mayores $[L] > 0.1 \mu M$ y dejan de serlo para $[L] > 10 \mu M$. Para un dado nivel de metilación este es el rango de respuesta quimiotáctica o la robustez de cada flagelo. Es importante notar, dado que no se ha modelado el sistema adaptativo vía metilación de los receptores, que todos los escenarios quimiotácticos analizados hasta el momento se efectuan con el nivel de metilación no estimulado⁸. En los gráficos de la figura 2-13 se muestra el cambio de una situación libre de estímulos ($tiempot < 150 s$) a una concentración de $1 \mu M$ de aspartato. Como se ve hay saltos discontinuos en la actividad de la kinasa, la concentración molar estable y el CW_{bias} . De este modo, se esta modelando desde el input (que es la concentración de ligando en el medio exterior) hasta finalmente el output (que es el sentido de rotación de los motores flagelares), pasando por los principales intermediarios del sistema de señalización.

⁸ El nivel de metilación (≈ 0.44) se mantiene constante, cuyo valor es aquel que determina que la actividad de la kinasa este en el estado basal (≈ 0.33) en medios libres de estímulos.

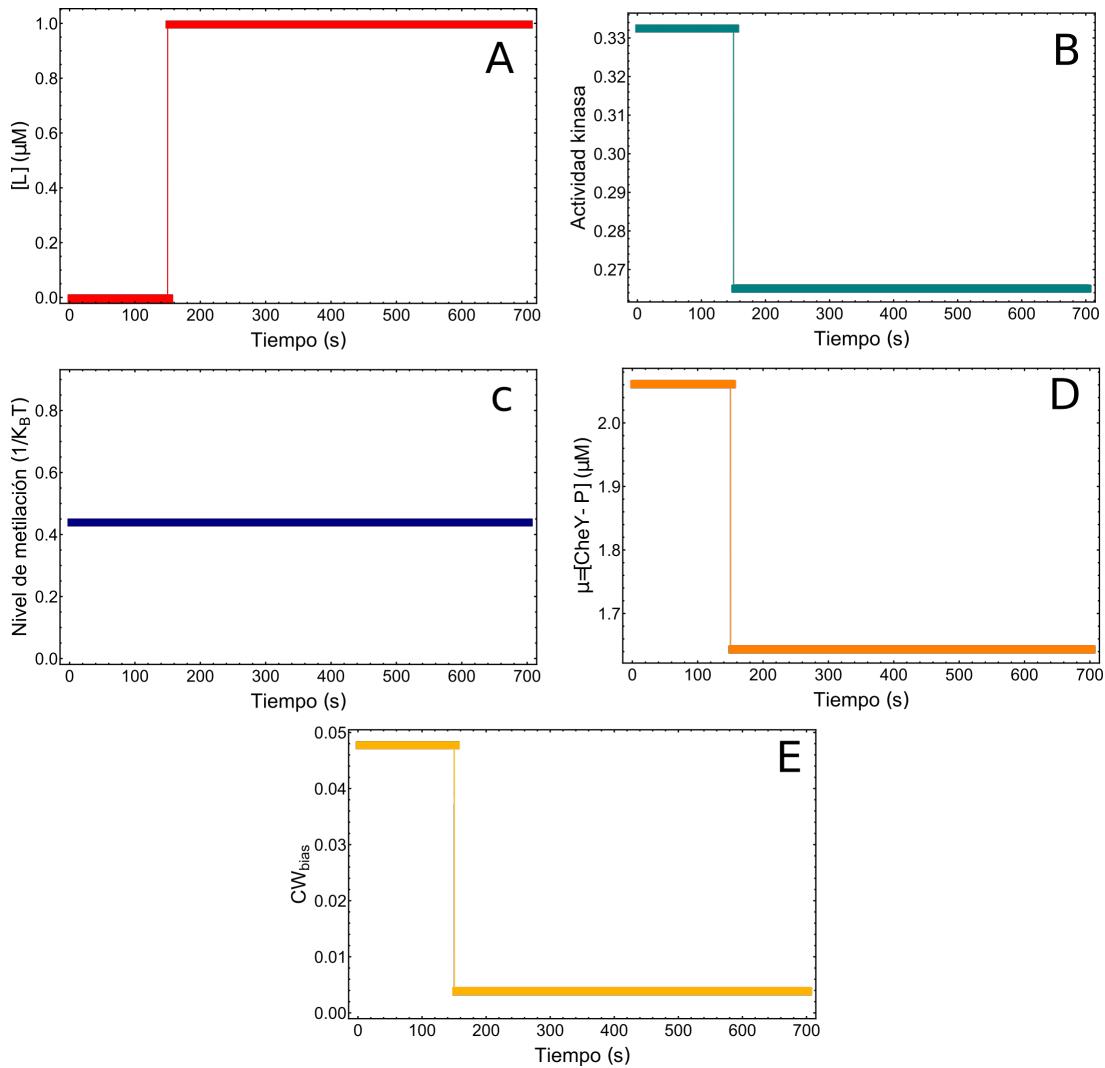


Figura 2-13: Concentración de ligando (A), Actividad de la kinasa (B), Nivel de metilación (C); Concentración molar estable (D), CW_{bias} (E) en función del tiempo.

Finalmente, con este conjunto de ecuaciones podemos analizar el efecto del input del sistema (atractores) en el output (CW_{bias}). La respuesta en el cambio de probabilidad de rotación CW que se observa en la figura 2-14 tiene como punto de partida el valor determinado por la metilación, la actividad basal de la kinasa, y la concentración molar estable. Todos estos parámetros se ajustan a partir de mediciones experimentales que pueden variar entre distintas cepas. La respuesta del sistema de señalización siempre será en referencia al medio al cual estaba adaptada previamente la bacteria. Para los valores utilizados hasta el momento, que tendrán sentido más adelante, vemos que la robustez de la respuesta está en el rango ($0 - 5 \mu\text{M}$). Luego

cada flagelo puede cambiar hasta tres órdenes de magnitud al CW_{bias} en un estrecho rango de concentración de aspartato.

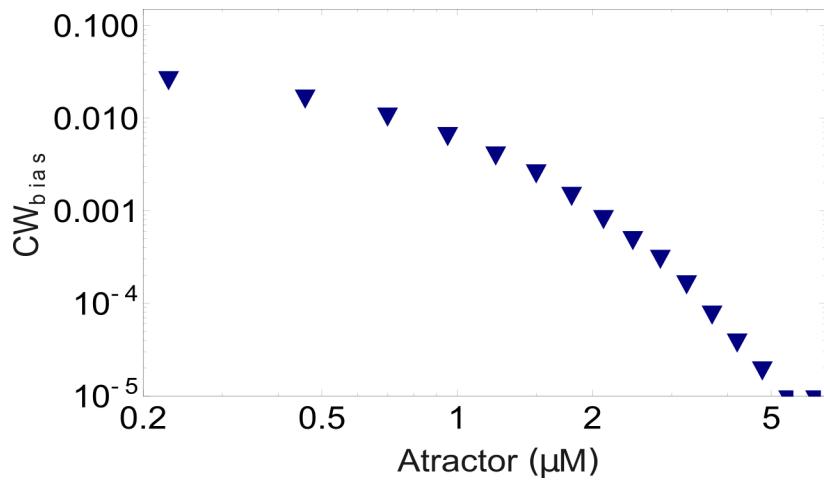


Figura 2-14: CW_{bias} en función de la concentración de aspartato.

2.2. Transiciones entre *Runs & Tumbles*

E.coli es una bacteria perítrica, es decir posee más de un flagelo distribuidos aleatoriamente por su superficie celular. Para poder comprender el efecto de los inputs en el sistema de señalización, atractores o repelentes, se debe analizar lo que ocurre en todos los flagelos en simultáneo. Esto se ha podido observar experimental vía la incorporación de fluoroforos en los filamentos flagelares [28]. La técnica de pinzas ópticas permite, vía la presión de radiación de láseres, atrapar a la bacteria y observar sus flagelos fluorescentes sin el inconveniente de que la bacteria se vaya del campo de visión [57]. Individualmente la bacteria tiene dos modos de movimiento: *Runs* o *Tumbles*. Analizaremos el comportamiento celular con el $Tumble_{bias}$ análogo al CW_{bias} para cada motor. Se define el $Tumble_{bias}$ como la suma de todo el tiempo que la bacteria pasó en este modo sobre el tiempo total de observación. A partir de la evidencia experimental es admisible asumir la regla del veto [57]: si al menos un flagelo rota en sentido *CW* ocurre un *Tumble*. Para que la bacteria efectúe un *Run* es necesario que todos sus flagelos rotan en sentido *CCW*. Dado que *E.coli* tiene pocos flagelos distribuidos aleatoriamente por toda su superficie lo más intuitivo sería considerar que, en escenarios sin estimular, lo que ocurre en el entorno de cada flagelo

es independiente de lo que ocurre en el entorno de otro flagelo. Si aceptamos la regla del Veto y la independencia de flagelos se puede relacionar el CW_{bias} con el $Tumble_{bias}$ a través de la relación [57]:

$$Tumble_{bias} = 1 - (1 - CW_{bias})^{N_f} \quad (2.15)$$

donde N_f es el número de flagelos. Sin embargo, la evidencia experimental muestra lo contrario donde se ha medido un grado de correlación entre los distintos flagelos [57] & [58]. No obstante, considerando un número efectivo de flagelos (N_{ef}) la relación 2.15 es válida si se reemplaza N_f por N_{ef} [57]. Esto significa que la relación se cumple si se toma un número menor de flagelos. Además, la relación 2.15 es válida para aquellas cepas mutantes cuya [CheY-P] sea inducida desde un plásmido; es decir, es válida cuando se disocia la [CheY-P] de los receptores en los polos si son independientes los entornos de los flagelos. Esto sugiere que la correlación podría generarse por el ruido en los receptores MCPs, lo cual discutiremos más adelante. A partir de ahora se tomara como el número de flagelos al número efectivo obtenido en [57], que para una *E.coli* con tres flagelos el $N_{ef} \approx 2$, mientras que con 4 y 5 flagelos es $N_{ef} \approx 3$. Trabajar con el número efectivo de flagelos nos permite considerar a este subconjunto de flagelos como independientes, simplificando el desarrollo matemático.

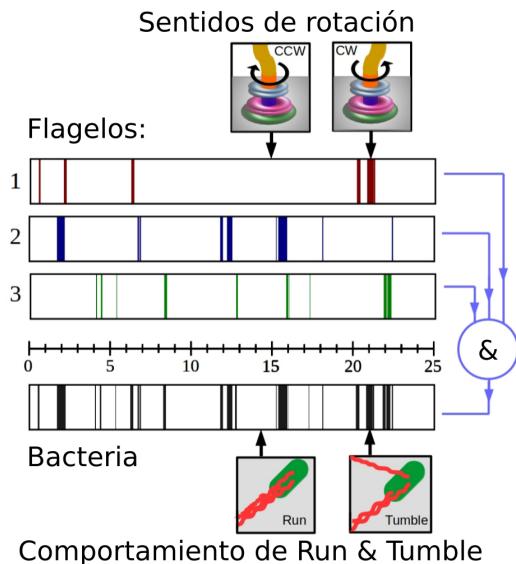


Figura 2-15: Esquema para una bacteria con tres flagelos descorrelacionados e independientes. Se muestran los intervalos de CCW & CW para cada flagelo y la combinación de los tres flagelos para dar los intervalos de Run & Tumble.

<i>Run</i>	<i>Tumbles</i>
$e_1 = CCW - CCW - CCW$	$e_2 = CCW - CCW - CW$
	$e_3 = CCW - CW - CCW$
	$e_4 = CW - CCW - CCW$
	$e_5 = CCW - CW - CW$
	$e_6 = CW - CW - CCW$
	$e_7 = CW - CCW - CW$
	$e_8 = CW - CW - CW$

Cuadro 2.1: Espacio muestral Ω para los resultados posibles de tener tres flagelos con la regla del voto.

En esta sección analizaremos como la regla del voto modifica los resultados de la sección previa. En la figura 2-15 se muestra un esquema para una bacteria con tres flagelos efectivos. Si una bacteria posee un único flagelo, su $CW_{bias} = Tumble_{bias}$. Al aumentar el número de flagelos esta igualdad ya no es válida, este incremento hace que la probabilidad de que un flagelo rote CW sea mayor y por ende aumenta la probabilidad de que ocurra un *Tumble*. Por ejemplo, para el juego de parámetros que se viene utilizando y sin estímulos el $CW_{bias} = 0.04$. Si la bacteria tuviese un solo flagelo este sería su $Tumble_{bias}$, sin embargo, sin modificar los parámetros solo aumentando el número de flagelos a tres se obtiene $Tumble_{bias} = 0.15$. Justamente este valor de $Tumble_{bias}$ es el que midieron Berg & Brown [29]. Tomaremos este valor como el de referencia para situaciones libres de estímulos, ya que los observables cinemáticos, con los cuales se definió el comportamiento de *Run* & *Tumble*, corresponden a este valor. Es importante remarcar que este valor de referencia varía de cepa en cepa.

Ya que asumimos que lo que ocurre en un flagelo es independiente de los demás: $P(CCW \cap \dots \cap CCW) = P(CCW) \dots P(CCW)$. La probabilidad de supervivencia de un *Run* es la probabilidad de supervivencia de que todos los flagelos estén rotando sentido *CCW*:

$$S_{Run}(t) = S_{CCW}(t)^{N_f} \quad (2.16)$$

donde N_f es el número de flagelos (efectivos). Para calcular la probabilidad de supervivencia de los *Tumbles* hay que analizar el espacio muestral, que consiste en el conjunto

de todos los resultados posibles, como se ve en la tabla 2.1. Dado que no importa el orden, tenemos ocho combinaciones posibles para un sistema de tres flagelos. Cada uno de estas combinaciones es un evento elemental, que todos en conjunto, hacen al espacio muestral $\Omega = \{e_1, e_2, e_3, e_4, e_5, e_6, e_7, e_8\}$, donde satisfacen $e_i \cap e_j = \emptyset$ para $i \neq j$. Como cada flagelo es independiente e idéntico a otro, los eventos elementales con un único flagelo rotando *CW* tienen la misma probabilidad, del mismo modo los eventos con dos flagelos rotando *CW* también tendrán la misma probabilidad. Dado que tenemos un conjunto numerable finito de eventos elementales, la probabilidad de supervivencia para un *Tumble*, si $N_f = 3$, será:

$$\begin{aligned} S_{Tumble}(t) &= \sum_{i=2}^8 P(e_i) = 3S_{CW}(t)S_{CCW}(t)^2 + 3S_{CW}(t)^2S_{CCW}(t) + S_{CW}(t)^3 \\ &= (S_{CCW}(t) + S_{CW}(t))^3 - S_{CCW}(t)^3. \end{aligned} \quad (2.17)$$

Al usar el teorema del binomio podemos generalizar la probabilidad de supervivencia de los *Tumble* a N_f :

$$S_{Tumble}(t) = (S_{CCW}(t) + S_{CW}(t))^{N_f} - S_{CCW}(t)^{N_f}. \quad (2.18)$$

Ahora no tenemos más funciones de densidad de primer pasaje. Para poder calcular las funciones de densidad de probabilidad para los *Run & Tumbles* hay que notar que la probabilidad de supervivencia $S_X(t) = P(T_X > t) = 1 - F_{T_X}(t)$. Donde F_{T_X} es la función de distribución acumulada y X representa *Run* o *Tumbles*. Por la relación de la función de distribución acumulada y la función de densidad de probabilidad se cumple que $f_{T_X}(t) = -\frac{d}{dt}P(T_X > t) = -\frac{d}{dt}S_X(t)$. Si se reemplazan las probabilidades de supervivencia 2.11, se deriva y se agrupan los términos se obtiene que las funciones de densidad de probabilidad para los *Run & Tumbles* siguen siendo una serie infinita de exponenciales:

$$f_X(t) = \sum_{n=1}^{+\infty} B_{X_n} e^{-\beta_{X_n} t} \quad (2.19)$$

donde X representa *Run* o *Tumbles*.

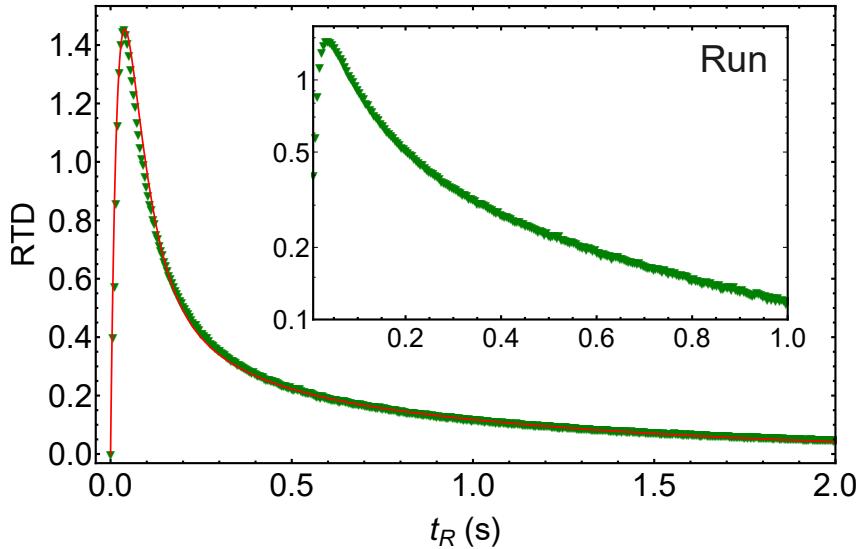


Figura 2-16: Función de densidad de probabilidad (RTD) para tiempos de *Runs* obtenida vía simulación numérica de la ecuación 2.1 con las condiciones 2.9 y la regla de voto. En verde se observan los datos numéricos y en rojo un ajuste a partir de la ecuación 2.18. En el inset se muestran los datos numéricos en un grafico semi-log.

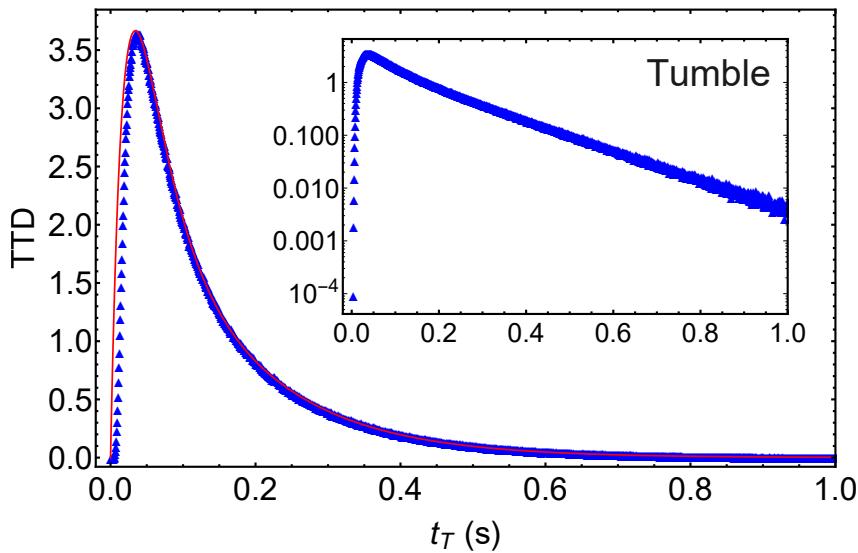


Figura 2-17: Función de densidad de probabilidad (TTD) para tiempos de *Tumbles* obtenida vía simulación numérica de la ecuación 2.1 con las condiciones 2.9 y la regla de voto. En azul se observan los datos numéricos y en rojo un ajuste a partir de la ecuación 2.18. En el inset se muestran los datos numéricos en un grafico semi-log

En las figuras 2-16 y 2-17 se muestran las funciones de densidad de probabilidad para *Run* y *Tumbles* conocidas como RTD y TTD⁹, obtenidas al combinar la hipótesis de los dos umbrales críticos más la regla del voto. Experimentalmente

⁹RTD: acrónimo en inglés de Run times distribution.

TTD: acrónimo en inglés de Tumbles times distribution

se obtuvo para los tiempos de *Run* que $\langle t_R \rangle_E = 0.86 \pm 1.18$ y para los *Tumbles* que $\langle t_T \rangle_E = 0.14 \pm 0.19$ [29]. Mientras que en nuestras simulaciones obtenemos $\langle t_R \rangle_S = 0.86 \pm 1.21$ y $\langle t_T \rangle_S = 0.14 \pm 0.14$. Los parámetros utilizados hasta el momento se ajustan particularmente para reproducir con la mayor exactitud posible estos valores medios y sus respectivas desviaciones estándar. Observamos de la figura 2-17, luego del máximo de la TTD, tenemos una distribución prácticamente mono-exponencial. Además el valor medio es idéntico a la desviación estándar, propiedad característica de la distribución exponencial. Esto está en completo acuerdo con los resultados experimentales obtenidos en referencia [29], aunque en dichos resultados no se visualiza un máximo. La TTD es cualitativamente similar a la distribución de tiempos *CW* obtenida en la sección anterior (figura 2.6) y es funcionalmente similar a la obtenida por Korobkova *et al.* [31]. Por otro lado, para la RTD se observa un comportamiento multi-exponencial a tiempos intermedios y un decaimiento mono-exponencial en la cola hacia tiempos largos. Los valores obtenidos en las simulaciones son muy similares a aquellos obtenidos experimentalmente. En este caso no vale la igualdad entre el valor medio y la desviación estándar, otra prueba más de que las distribuciones se alejan del comportamiento mono-exponencial. Una propiedad interesante surge cuando se analiza la figura 2-16 en un grafico doble logarítmico .

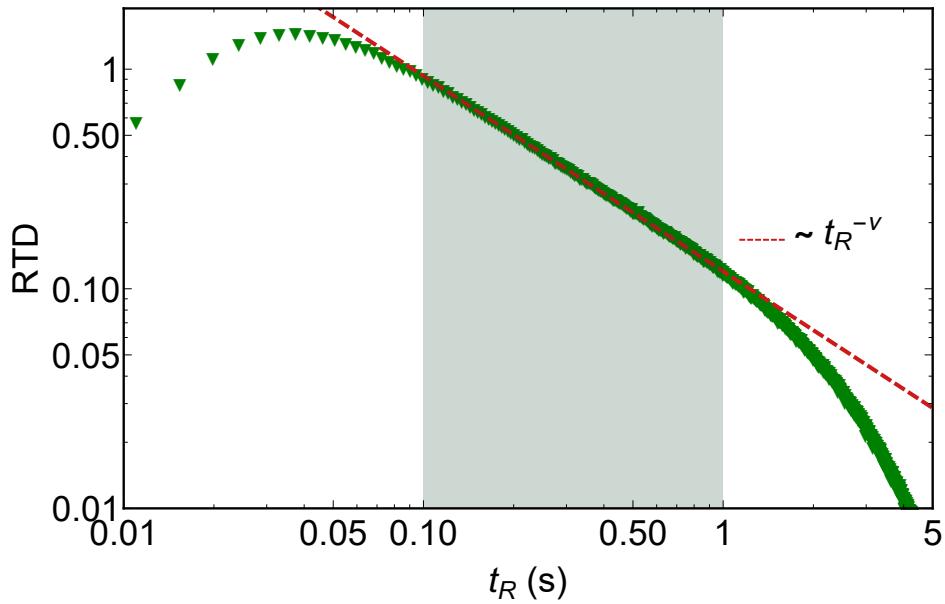


Figura 2-18: Función de densidad para tiempos de *Runs* en grafico doble logarítmico. El exponente vale $\nu \approx 0.89$.

La serie de exponenciales en cierto intervalo de tiempo, en este caso en la década $0.1 - 1s$, reproduce una ley de potencia. Este resultado no es novedoso ya que a sido reportado previamente en otros sistemas [59, 60]. La presencia de leyes de potencia en núcleos de dispersión (sección 1.3 de la Introducción) es encontrada en diversas especies de predadores marinos como tiburones, peces, tortugas, pingüinos o krill [61], [21]. La aparición de leyes de potencia desde procesos exponenciales interrumpidos ha sido probado para otros sistemas [62] y para distribuciones de tiempos de CCW a partir de modelos lineales de campo medio [48]. Como se ve en la figura 2-18 luego del régimen de potencia hay un cutoff exponencial. Existe una gran controversia si las distribuciones de los núcleos de dispersión son realmente leyes de potencia dada la dificultad de probar tales comportamientos [21]. Una característica en común es la presencia del cutoff exponencial, lo cual evita que los momentos de la distribución sean divergentes. Este mismo comportamiento de ley de potencial con cutoff exponencial ha sido medido experimentalmente para la distribución de tiempos de CCW en *E. coli* [31] para la cepa **RP437**. Para la distribución de tiempos de CCW obtenida en la figura 2-5 no encontramos un régimen de ley de potencia, más aún la ley de potencia de [31] ocurre en décadas mayores a $1s$. De todos modos, la ley de potencia para tiempos de CCW de [31] y para los tiempos de Runs en la figura 2-18 comparten las mismas características generales. Donde el comportamiento lineal en un log-log tiene a su izquierda, a tiempos cortos, un máximo y a su derecha, a tiempos largos, un cutoff exponencial. Sin embargo, el CW_{bias} sin estimular para la cepa utilizada en ese trabajo es significativamente diferente al obtenido con el juego de parámetros aquí utilizados, esto implica que para poder ser cuantitativamente comparables se debería re-parametrizar el modelo para reproducir estos resultados. No hay ninguna evidencia que indique que las distribuciones de tiempos ya sean para un flagelo o para los modos de locomoción se conserven entre cepas, por lo tanto, sólo se pueden compararse resultados entre cepas cualitativamente. Las distribuciones de tiempos obtenidas en esta tesis, en las figuras 2-7, 2-8, 2-16 & 2-17, reproducen satisfactoriamente las propiedades de las distribuciones experimentales [29, 31]; las colas con decaimientos mono-exponentiales, la presencia de máximos a tiempos cortos y la probabilidad nula

de eventos instantáneos. En este punto hemos logrado cumplir unos de los principales objetivos de este capítulo: generar un modelo que pueda reproducir con gran exactitud los tiempos medios de *Runs & Tumbles*. Para cumplir los objetivos pendientes debemos aún modelar el comportamiento celular ante estímulos químicos.

Nuevamente se puede variar el parámetro μ en pasos de $0.1 \mu M$ como se realizó en la figura 2-7. Dado que ahora estamos evaluando el impacto sobre un sistema de N_f flagelos asumiremos que las variaciones en μ ocurre simultáneamente en cada flagelo. Es decir, se asume que los flagelos se correlacionan en la presencia de estímulos. Esto fue observado experimentalmente en [63] donde se encontró que ante la presencia de estímulos el sistema de señalización responde generando transiciones que anulan el efecto de las fluctuaciones.

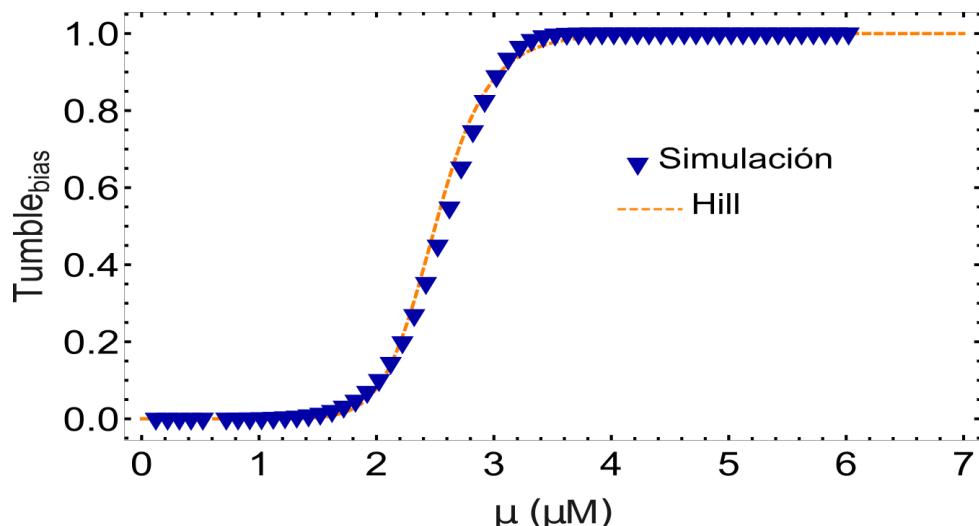


Figura 2-19: $Tumblebias$ en función de la molaridad estable μ . Los triángulos azules muestran los resultados obtenidos por simulación numérica al modificar μ en incrementos de $0.1 \mu M$. La línea punteada naranja corresponde al ajuste de Hill con $N_h = 11.0$ y $K_{1/2} = 2.65$.

En la figura 2-19 vemos como la respuesta sigue siendo ultrasensitiva con respecto a la $[CheY-P]$. Más aún, se obtiene que la pendiente del ajuste Hill sigue siendo aproximadamente la misma que la del CW_{bias} donde únicamente se modifica la concentración con respuesta media, siendo ahora $K_{1/2} = 2.65$. Por lo tanto, vemos que la regla del voto mantiene invariante la respuesta celular ante la $[CheY-P]$. El aumento del número de flagelos permite que la célula tenga el mismo cambio en el comportamiento pero requiriendo concentraciones menores de la proteína reguladora de respuesta

fosforilada. Dado que la fosforilación de *CheY* es un proceso ATP dependiente, esto resulta una ventaja energética. Al mantenerse invariante el comportamiento ultrasensitivo con respecto a la $[CheY\text{-P}]$ frente al número de flagelos, también se mantiene invariante el comportamiento de los tiempos medios de *Run* y *Tumbles* en función del $Tumble_{bias}$; esto puede observarse de las similitudes entre las figuras 2-20 y 2-8. Cuando se estudió el efecto de la presencia de aminoácidos en el medio, como aspartato, la principal variable que se modifica es el tiempo medio de *Runs* [29]. Es por esto que cuando *E.coli* encuentra un ambiente “agradable” disminuye la probabilidad de *Tumble*, razón por la cual se acuñó el término de bacteria “optimista” [3] para describirla; a su vez los tiempos medios de *Tumble* se mantienen quasi-constantes como también fue reportado.

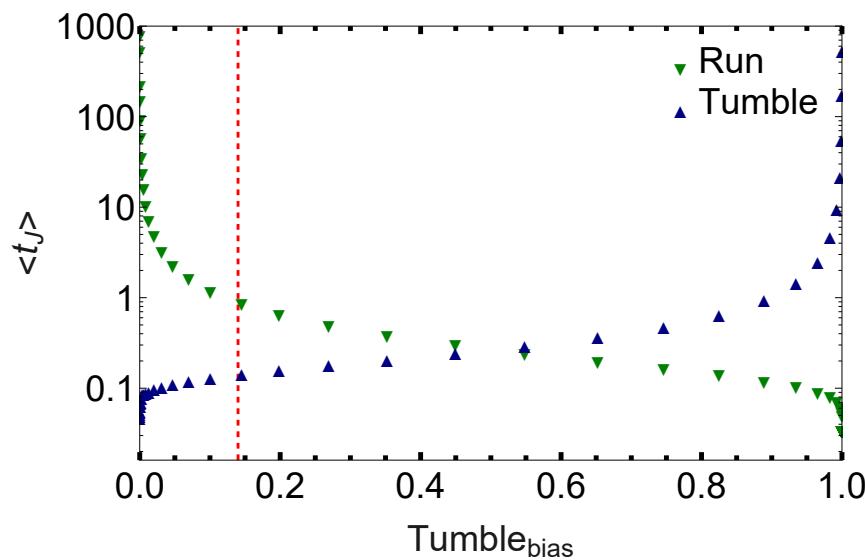


Figura 2-20: Tiempos medios de *Runs* y *Tumbles* en función del $Tumble_{bias}$. Línea vertical punteada roja indica el valor del $Tumble_{bias}$ correspondiente al caso sin estímulos.

Exactamente esta respuesta “optimista” es la que se observa cuando se ve el efecto del $Tumble_{bias}$ hacia la izquierda de la recta vertical roja que marca la condición sin estímulos. Vemos que los tiempos medios de *Runs* aumentan (siguiendo una ley de potencia como muestra la figura 2-21) y los tiempos medios de *Tumble* se mantienen aproximadamente constantes alrededor de 0.1 s. Interesantemente, se ve que para $Tumble_{bias} = 0.8$ el efecto es opuesto, los *Tumbles* se comportan como *Runs* y viceversa.

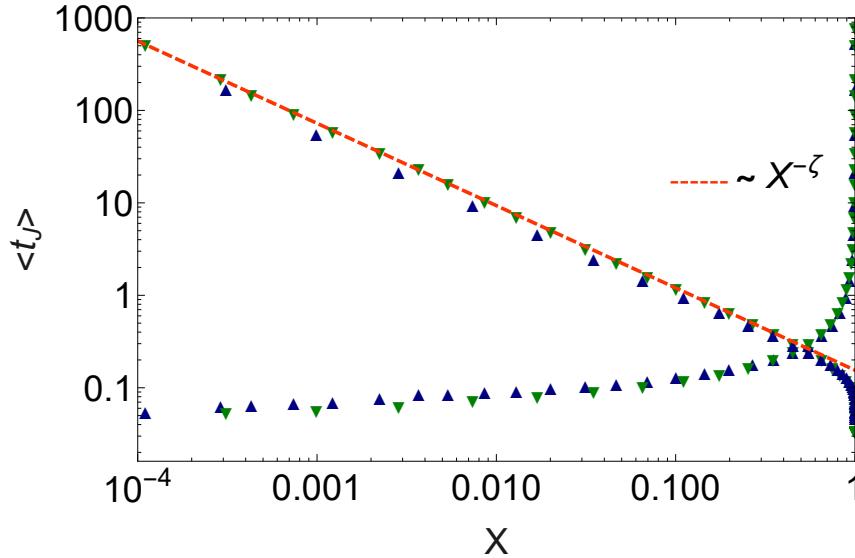


Figura 2-21: Tiempos medios de *Runs* y *Tumbles* en función del *Tumble_{bias}* y *Run_{bias}* respectivamente en grafico doble logarítmico. Los triángulos verdes corresponden al *Run* y los azules al *Tumble*. Cuando $X = \text{Tumble}_{bias}$ los tiempos medios de *Run* crecen siguiendo una ley de potencia y los de *Tumble* decrecen. Por el otro lado, cuando $X = \text{Run}_{bias}$ los tiempos medios de *Run* decrecen y los tiempos medios de *Tumble* crecen siguiendo la misma ley de potencia. La recta punteada roja es la ley de potencia $X^{-\zeta}$ con $\zeta = 0.89$ donde X representa *Tumble_{bias}* o *Run_{bias}*.

Cuando se analizan los resultados de la figura 2-20 en escala doble logarítmica (veáse la figura 2-21) vuelve a aparecer la ley de potencia que se obtuvo en la figura 2-9 donde el exponente medido es el mismo que para los tiempos medios de *CCW* y *CW*. En la figura 2-22 se muestra un grafico paramétrico donde se contrastan el *CW_{bias}* y el *Tumble_{bias}*, siendo el parámetro la molaridad estable μ . En esta figura se analiza como cambia el *bias* con el número de flagelos. Cuando $N_f = 1$ ocurre que el *Tumble_{bias}* = *CW_{bias}*, siendo la función identidad. Pero cuando aumentamos el número de flagelos el *Tumble_{bias}* es mayor que el *CW_{bias}*. Esta es la razón por la cual se disminuye el valor operacional de la $[\text{CheY-P}]$ para tener la misma respuesta ultrasensible. El mismo comportamiento fue obtenido experimentalmente para otra cepa de *E.coli* con distintos números de flagelos en [57] .

Por último, falta analizar el cambio del *bias* en función de la concentración del ligando al incrementar el número de flagelos (veáse figura 2-23). Lo primero que se observa es el cambio del *bias* en la condición $[L] \mapsto 0$. Esto muestra que el *bias* tiene un mayor rango de respuesta al aumentar el número de flagelos. Nótese que el número de flagelos esta aumentando la amplificación de la respuesta cerca de un

orden de magnitud. Concluimos entonces que el número de flagelos es una variable que podría contribuir en la amplificación en la cascada de señalización.

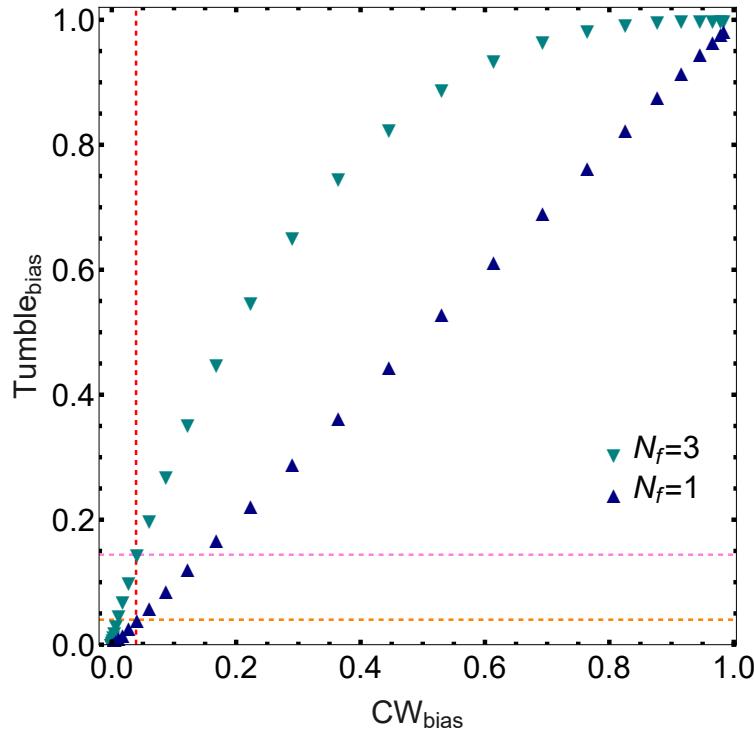


Figura 2-22: Grafico paramétrico de $Tumblebias$ versus CW_{bias} , siendo el parámetro la molaridad estable μ . La recta vertical roja punteada muestra el $CW_{bias} = 0.04$ que se intercepta con la recta horizontal punteada violeta en el $Tumblebias$ no estimulado y la recta horizontal punteada amarilla en el CW_{bias} no estimulado.

El número de flagelos no solo genera amplificación en nuestras simulaciones sino que además aumenta considerablemente el rango de respuesta con respecto a la presencia de aminoácidos en el medio, como ser aspartato. Esto implica a su vez que el incremento en el número de flagelos aumenta la robustez del sistema de señalización quimiotáctico. Es importante remarcar que este rango de robustez es congruente con los valores medios de la concentración de aspartato utilizados para el estudio en gradientes para la cepa **AW405** [29].

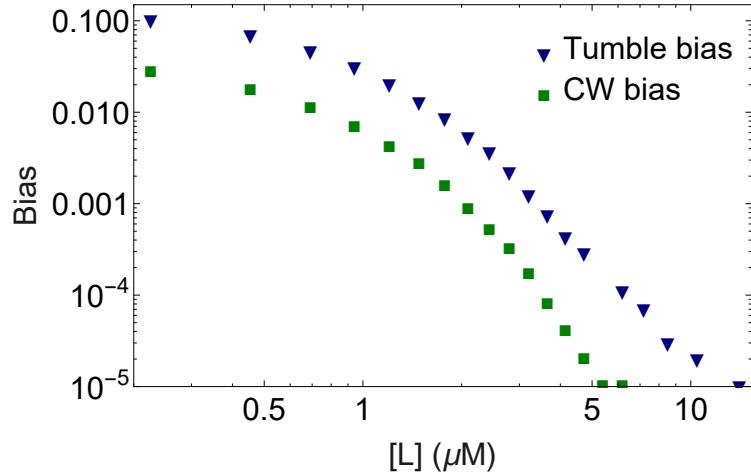


Figura 2-23: Comparación del $Tumble_{bias}$ y CW_{bias} ambas en función de la $[L]$. Los valores del $Tumble_{bias}$ corresponden a $N_f = 3$.

2.3. Feedback negativo por ruta de metilación

Los escenarios estimulados donde se simuló el efecto de atractores en las respuesta del CW_{bias} o $Tumble_{bias}$ no representan situaciones realistas para una cepa salvaje. Esto no implica que los resultados no sean válidos ya que nos permiten analizar el comportamiento del sistema evitando la continua adaptación que enmascara la respuesta. Sin embargo, para poder modelar correctamente el comportamiento de una cepa salvaje debemos incorporar al sistema de metilación. Como se mencionó cuando incorporamos la actividad de la kinasa, para modelar el primer paso de amplificación, utilizaremos la dinámica de metilación propuesta en [12] y [55]. Dado que tomamos como escala temporal la escala de la metilación, el nivel de metilación $m(t)$ tiene un comportamiento dinámico dependiente de la actividad de la kinasa a , siguiendo la ecuación diferencial fenomenológica [12, 55]:

$$\frac{dm}{dt} = F(a) = V_R \frac{1-a}{K_R + 1-a} - V_B(a) \frac{a}{K_B + a}, \quad (2.20)$$

con $V_B(a) = V_B(0)(1 + H[a - a_B] r_B \frac{a - a_B}{1 - a_B})$. La forma funcional de $F(a)$ son dos funciones sigmoides vinculadas vía una función escalón de Heaviside $H[a - a_B]$, la que es igual a 0 si $a < a_B$ e igual a 1 si $a \geq a_B$, donde a_B es el umbral de la actividad

de la kinasa a partir de la cual aumenta la tasa de desmetilación. Cada sigmoidea representa la cinética enzimática propuesta por Michaelis-Mentis [64] para la metilación y desmetilación. K_R y K_B son las constantes de Michaels, mientras que V_R y $V_B(a)$ son las velocidades de la metilación y desmetilación respectivamente. Como la velocidad de desmetilación es controlada por la proteína reguladora de respuesta *CheB*, la velocidad $V_B(a)$ es función de la actividad de la kinasa ya que depende de la fosforilación de CheB-P. El parámetro r_B representa el valor máximo para la velocidad de desmetilación. Es importante remarcar que esta ecuación es puramente fenomenológica y fue ajustada en [55] a partir de datos experimentales.

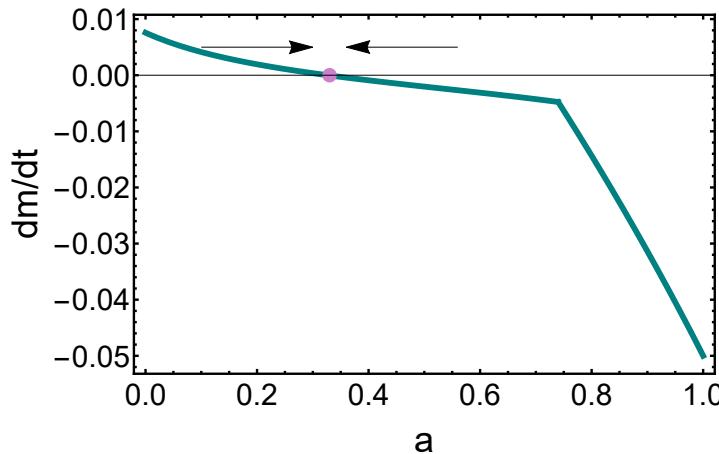


Figura 2-24: Tasa de metilación $\frac{dm}{dt}$ en función de la actividad de la kinasa a .

En la figura 2-24 se ve el comportamiento de la tasa de metilación $F(a)$ (ecuación 2.19) en función de la actividad de la kinasa. Como muestran las flechas negras existe un único punto fijo para todo el dominio de a . El punto violeta es globalmente estable y corresponde al valor $a_c = 0.33$. Para cualquier condición inicial el sistema siempre evolucionara al punto a_c , esto es exactamente la adaptación. En la figura 2-25 se muestra como para distintas concentraciones de ligando se corre la respuesta de la kinasa en función del nivel de metilación. Con las líneas punteadas se marca para la condición $[L] = 0$ el nivel de metilación que satisface el punto fijo, este nivel de metilación es el que se utilizó en las secciones previas m_c (ver figura 2-13).

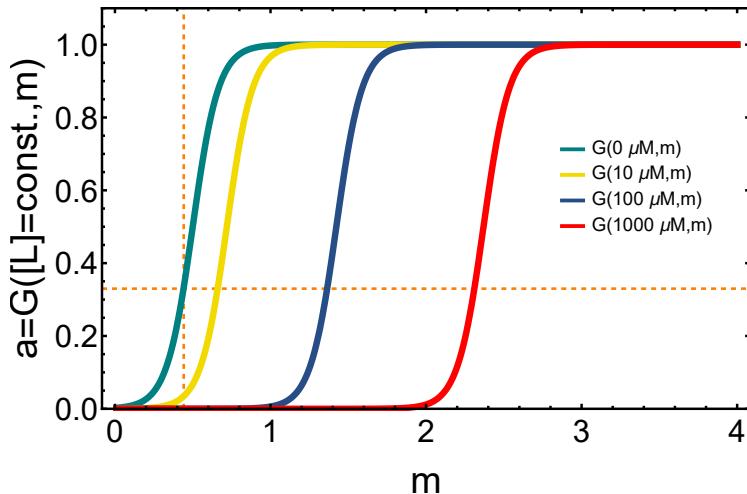


Figura 2-25: Actividad de la kinasa en función del nivel de metilación.

Además, mediante esta figura podemos entender lo que ocurre en la presencia de atractores. Si comenzamos en la condición $[L] = 0$ y cambiamos drásticamente a una condición $[L] = 100\mu M$ esto hace que la actividad de la kinasa se desplome a cero repentinamente. Justamente en $G([L], m < m_c) = 0$ se interceptan todas las curvas. Ahora como cambió la actividad de la kinasa, se desplazó $F(a_c)$ a $F(0)$ (el cual no es un punto fijo). Por lo tanto, el nivel de metilación va a comenzar a cambiar hasta llegar al punto fijo. En la figura 2-25 esto corresponde a ir subiendo por la curva azul hasta llegar a la intersección con la recta horizontal punteada que marca el punto fijo. Si volvemos a cambiar rápidamente la concentración del ligando a cero, rápidamente la actividad de la kinasa irá a $G = a = 1$ (véase figura 2-25) ya que para este nivel de metilación está saturada la respuesta. Nuevamente, este valor de la actividad de la kinasa ($F(1)$) no es un punto fijo y el nivel de metilación evolucionará hacia a_c . En la figura 2-25 esto corresponde a ir bajando por la curva turquesa $G(0\mu M, m)$ hasta nuevamente interceptar la recta naranja horizontal. Una representación en función del tiempo para la kinasa, la metilación, el ligando, la molaridad μ , la $[CheY-P]$ en un flagelo y el $Tumble_{bias}$ se muestra en los gráficos de la siguiente figura:

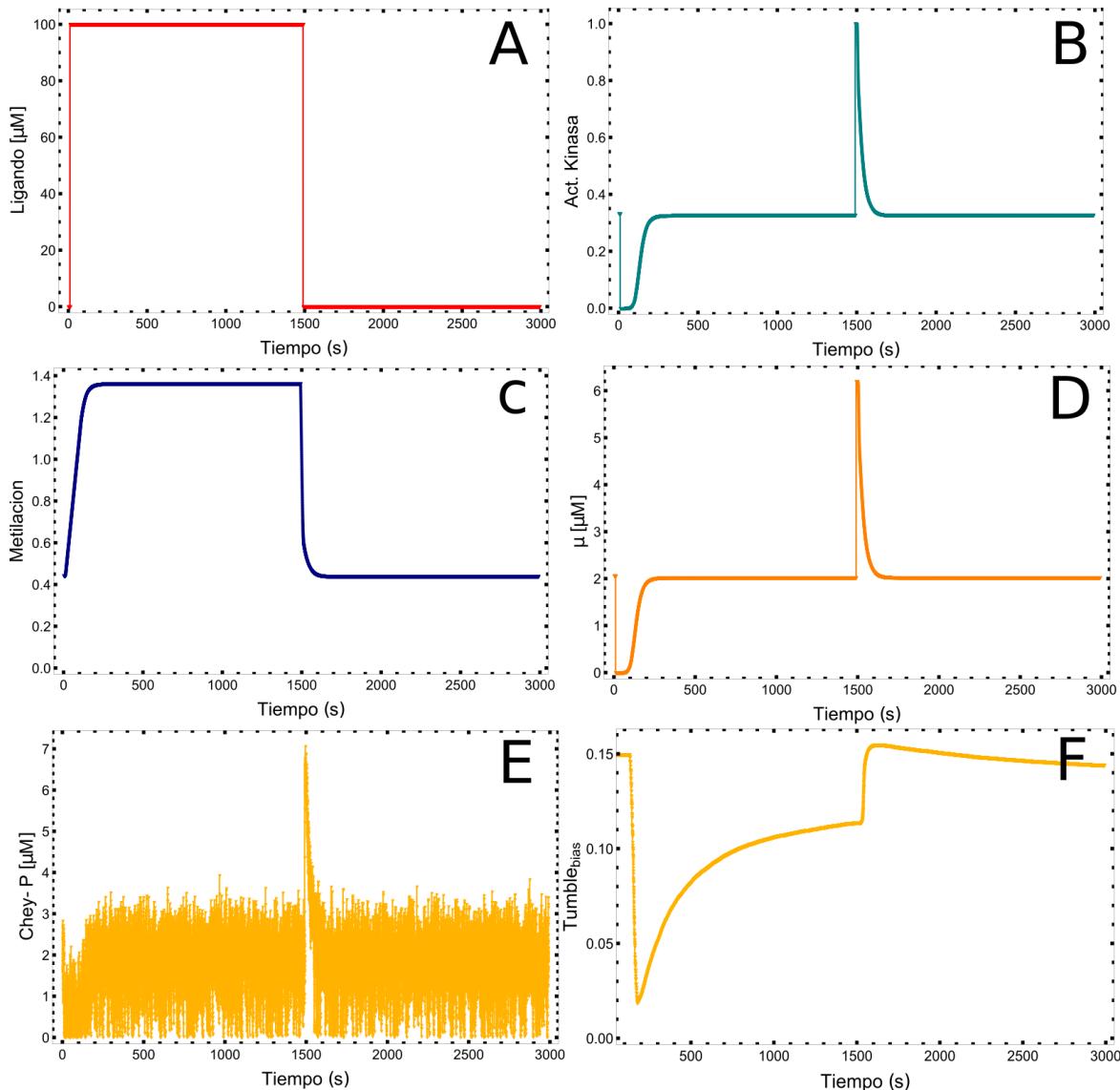


Figura 2-26: A: Concentración de ligando en función del tiempo. B: Actividad de la kinasa en función del tiempo. C: Nivel de metilación en función del tiempo. D: Concentración molar estable en función del tiempo. E: [CheY-P] en el entorno de un flagelo en función del tiempo. F: *Tumblebias* en función del tiempo.

En la figura 2-27 se muestra el ciclo que realiza la actividad de la kinasa en función del nivel de metilación como se mencionó antes. Como se puede ver en este gráfico paramétrico, hay un ciclo de histeresis. Esto implica que la kinasa cambia su actividad desde $[L] = 0 \mu M$ hacia $[L] = 100 \mu M$ por un camino distinto que si lo hace a la inversa (desde $[L] = 100 \mu M$ hacia $[L] = 0 \mu M$).

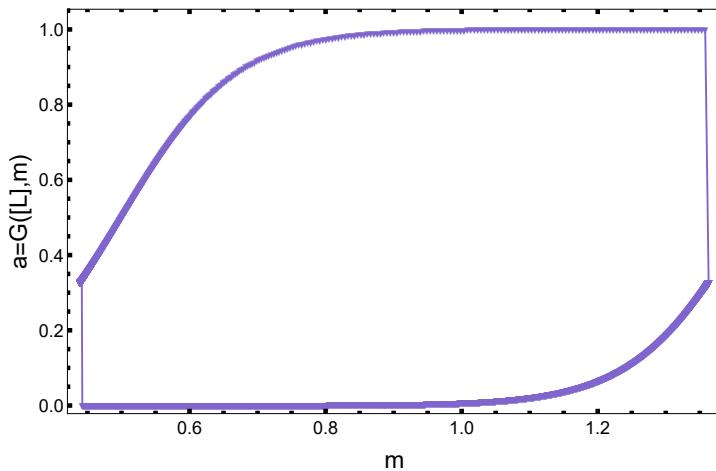


Figura 2-27: Actividad de la kinasa en función del nivel de metilación cuando la concentración de ligando sigue el comportamiento de la figura 2-26.

En el grafico B de la figura 2-26 se observa el efecto en la actividad de la kinasa cuando se modifica el nivel de metilación, a diferencia de lo observado en el grafico B de la figura 2-13. Además, se ve que al quitar el atractor el sistema posee una respuesta similar a lo que ocurre en un caso con repelente. Esto es consecuencia que al quitar el ligando el nivel de metilación estable genera una respuesta saturada de la kinasa. Analizando lo que ocurre con la [CheY-P] en el entorno de un flagelo (véase grafico E de la figura 2-26) vemos que las fluctuaciones pierden el protagonismo cuando ocurren los cambios en la concentración del ligando. Al ir actuando la adaptación las fluctuaciones recuperan su rol principal. Por último, el $Tumble_{bias}$ (grafico F de la figura 2-26) tiene dos particularidades: la primera es que se observa un retraso temporal en la respuesta y segundo que el retorno al valor de equilibrio sin estímulos es mucho más lento que cualquier otra variable del sistema de señalización. Ambas se deben a la manera de calcular el $Tumble_{bias}$, el cual se obtiene sumando los tiempos de duración de los $Tumble$ dividido por el tiempo total de observación. Cuando la actividad de la kinasa cae a cero (véase grafico B de la figura 2-26) la bacteria va estar en un *Run* y no habrá una transición a un *Tumble* hasta que la actividad de la kinasa aumente. Esto produce que hasta que no ocurra ese *Tumble* no se actualice el *bias* y por lo tanto genera un retraso temporal. Como al calcular el $Tumble_{bias}$ se van tomando en cuenta todos los *Tumbles*, cuando cae la kinasa la probabilidad de *Tumble* es prácticamente nula y esto hace que la restauración al equilibrio sea

lenta. Por ejemplo, si uno empezara a calcular el $Tumble_{bias}$ a un tiempo $T = 500\text{ s}$ se obtendría un valor de 0.15 y no el de 0.08 ya que se omitiría el pasado (véase grafico F de la figura 2-26). Esto se puede observar en el resto de las figuras, como por ejemplo, para la concentración molar estable, la actividad de la kinasa o la [CheY-P] en el flagelo, donde todas estos observables están en sus valores sin estimular ya que el sistema se adapto por completo.

Hasta el momento solo se han contemplado escenarios para químicos atractores. Esto se debe a que los modelos implementados de las propuestas [12] y [55] han sido desarrollados para estos escenarios únicamente; es decir, no se ha caracterizado experimentalmente algún químico repelente. Lo que si se ha medido cualitativamente es el efecto de la adición de repelentes en la actividad de la kinasa vía la técnica FRET [54], como se muestra en la figura 2-28. Interesantemente, se ve que el efecto de agregar un repelente es similar al efecto de quitar un atractor. Del mismo modo, agregar un atractor es similar a quitar un repelente. Al quitar un atractor, disminuye la unión de estas moléculas con los MCPs. Esto genera un aumento en la actividad de autofosforilación de la proteína CheA. Lo cual no solo incrementa la concentración libre de CheY-P sino que además la de CheB-P. Esta metilestearasa disminuye el nivel de metilación de los MCPs, razón por la cual la actividad de la kinasa vuelve al valor sin estímulos al quitar el atractor [8].

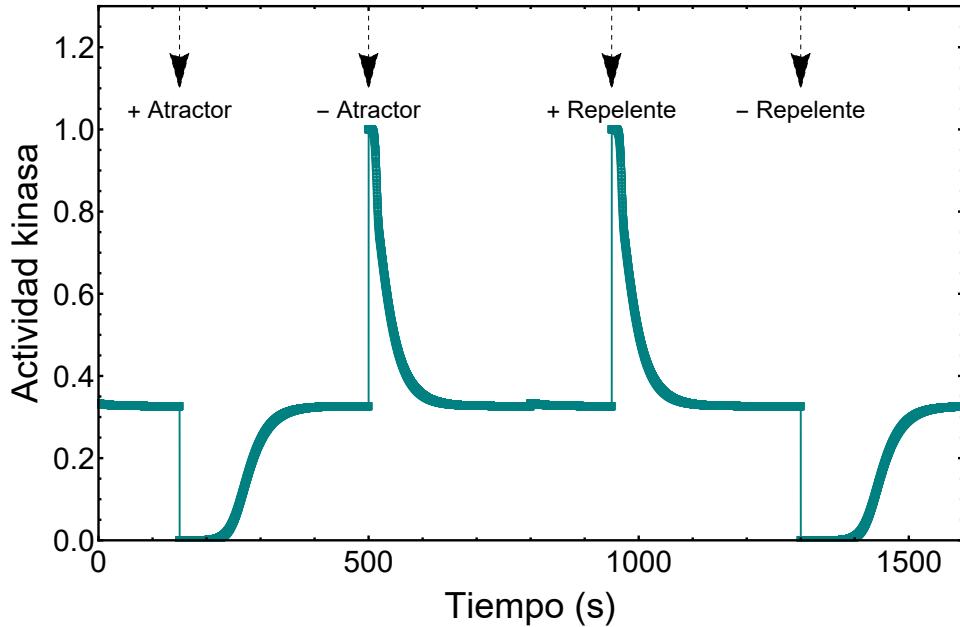


Figura 2-28: Actividad de la kinasa en función del tiempo al agregar o quitar atractor o repelente. Las concentraciones de ambos químicos son funciones escalón como la que se muestra en la figura 2-26.

La ecuación 2.14 para la actividad de la kinasa propuesta por Tu, Shimizu, y Berg en [12, 55] es el modelo alosterico de Monod-Wyman-Changeux [65]. Este modelo fue desarrollado para describir los cambios en la afinidad de los sustratos de enzimas vía otros ligandos efectores. El modelo se basa en que cada proteína alostérica esta formada por N subunidades idénticas denominadas protómeros. Cada protómero puede estar en dos estados posibles, en este contexto han sido llamados activos o inactivos. La capacidad de autofosforilación de CheA (sustrato) depende del nivel de metilación (ligando efector) de los MCPs. Por lo tanto, los estados activo e inactivo dependen directamente del nivel de metilación. Para poder reproducir el correcto comportamiento que se mostró en la figura 2-28 se propone en esta tesis modificar la relación entre las constantes de disociación para los estados activos e inactivos. Para el aspartato (químico atractor) se ha ajustado a partir de datos experimentales $K_a = 2900.0 \mu M$ & $K_i = 18.0 \mu M$, $c = \frac{K_i}{K_a} \ll 1$. Esto implica que el aspartato es altamente afín al estado activo. Para un repelente (e.g. $NiCl_2$) proponemos el caso opuesto donde $c = \frac{K_i}{K_a} \gg 1$ ¹⁰. Consecuentemente los repelentes tendrán mayor afinidad al estado inactivo que el

¹⁰Este cambio para el estudio de repelentes ha sido sugerido en [56] pero no solo proponen in-

activo.

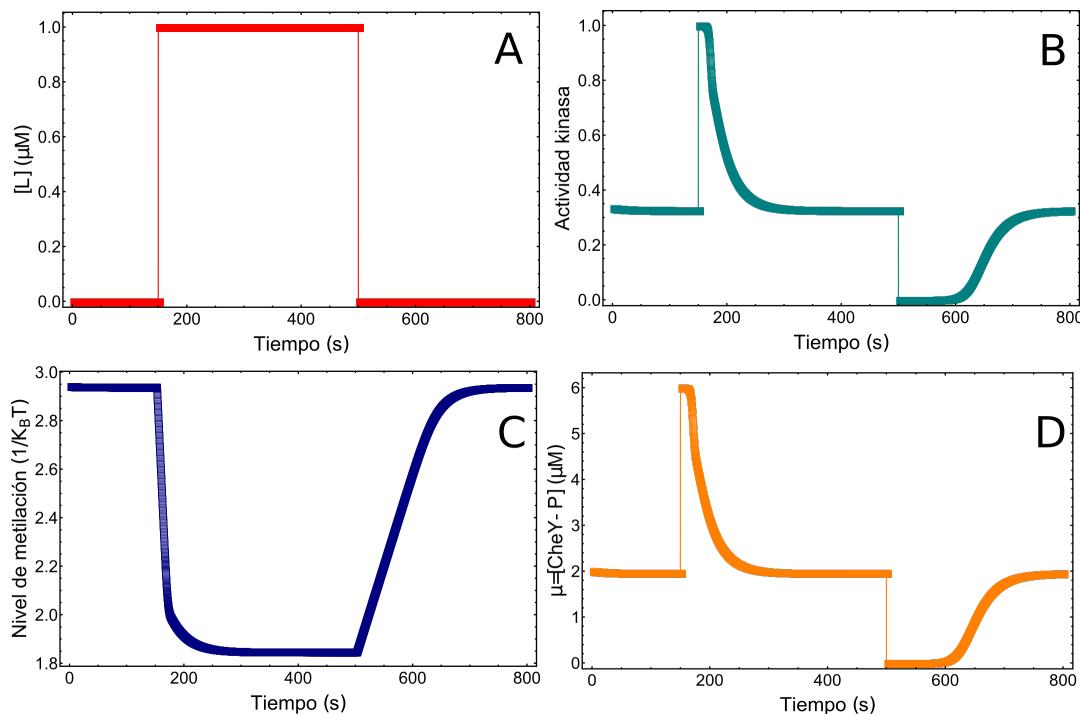


Figura 2-29: Concentración de repelente (A), actividad de la kinasa (B), Nivel de metilación (C) y concentración molar estable de CheY-P (D) en función del tiempo.

En los gráficos de la figuras 2-29 se muestra como se comportan la actividad de la kinasa, el nivel de metilación y la concentración molar estable ante una concentración barrera de un repelente. Como se puede ver, la adición del repelente genera un cambio abrupto en la actividad de la kinasa. Este cambio empieza a atenuarse al ir disminuyendo el nivel de metilación como una consecuencia del aumento de CheB-P, del mismo modo que ocurre al quitar un atractor. Por otro lado, al quitar el repelente la actividad de la kinasa se desploma por el bajo nivel de metilación. Esto genera una disminución en la concentración de CheB-P. Por lo tanto, CheR aumentará el nivel de metilación de los MCPs llevando el sistema nuevamente al valor de equilibrio, similarmente a lo que ocurre al agregar un atractor.

tercambiar las constantes de disociación sino además cambiar en signo al parámetro α . En nuestra propuesta mantenemos el mismo parámetro α ya que reproduce correctamente la disminución del nivel de metilación ante repelentes.

2.4. Fluctuaciones

La esencia del modelo utilizado en este capítulo son las fluctuaciones. Aquí se propuso una ecuación diferencial estocástica que modela las variaciones en la concentración de la proteína reguladora de respuesta CheY-P. Se han medido fluctuaciones a distintos niveles del sistema de señalización. Estos resultados muestran que las fluctuaciones en la actividad de la kinasa tienen un origen compuesto debido a la dinámica de CheR-CheB, la cooperatividad y los re-arreglos lentos en los clusters de receptores [66,67]. Una manera de caracterizar el ruido generado en los MCPs es mediante la densidad espectral de potencia (PSD). Diferentes caminos se utilizan para calcular la PSD dependiendo de la aplicación. En esta tesis utilizaremos el teorema de Wiener-Khintchine [33] el cual establece la relación entre la función de autocorrelación y la densidad espectral de potencia vía la transformada de Fourier. La función de autocorrelación se define como $r(\tau) = \langle x(t + \tau)x(t) \rangle$ donde x es un proceso estocástico estacionario en el sentido amplio¹¹. El teorema implica que:

$$S(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} d\tau r(\tau) e^{-2\pi i \omega \tau}, \quad (2.21)$$

siendo $PSD(\omega) = |S(\omega)|^2$. Entonces, la PSD nos explica cuanta varianza (o potencia en términos energéticos) aportan las distintas frecuencias. Para la actividad de la kinasa se encontró que la mayor amplitud en la PSD se debe a la región de bajas frecuencias ($\leq 0.2 \text{ Hz}$) [66,67]. Los períodos asociados a estas frecuencias resultan en tiempos característicos del orden de los 100 s , los cuales están en el orden de magnitud de los tiempos de adaptación. Las frecuencias altas, como aquellas mayores a 0.1 Hz , son atribuidas al ruido en la medición [67]. Por ejemplo, para la cepa **AW405** [29] el tiempo promedio de los *Tumbles* es de 0.15 s y el de los *Runs* es de 0.86 s . Las escalas temporales de las fluctuaciones con más aporte a la varianza de la actividad de la kinasa difieren en varios ordenes de magnitud a los de los modos de locomoción. Como estos tiempos medios dependen directamente de las fluctuaciones de la

¹¹ Un proceso estocástico, $x(t)$, se denomina estacionario en el sentido amplio cuando $\langle x(t) \rangle = \langle x(t + \tau) \rangle \forall \tau \in R$ y $\langle x(t_1)x(t_2) \rangle = \langle x(t_1 - t_2)x(0) \rangle$. El análisis también es válido para funciones deterministas.

[CheY-P] en los flagelos no responden a frecuencias con mayor amplitud en la PSD. En el trabajo de Mears *et al.* [57] se buscó reproducir los resultados obtenidos con el modelo del voto utilizando una ecuación de Langevin lineal para la [CheY-P]. En esa propuesta se tomó el tiempo característico de las fluctuaciones como $\tau = 0.2\text{ s}$. No queda muy claro como se aplica esta ecuación para cada flagelo y pareciera haber un rescaleo en el término estocástico que no concuerda con el método para simular correctamente dicha ecuación [68]. Sin embargo, sus resultados numéricos explican los resultados experimentales al ser comparados con el CW_{bias} o $Tumble_{bias}$. La ecuación de Langevin, corresponde a un proceso de Ornstein-Uhlenbeck (O.U.), el cual se obtiene tomando $\beta = 0$ en la ecuación 2.1 propuesta en esta tesis. La razón de porque se agrego un termino no lineal ($\beta = 1$) en esta tesis es que la version lineal o proceso O.U. ($\beta = 0$) es insuficiente para reproducir satisfactoriamente los valores medios y desviaciones estándar de los *Runs & Tumbles*. Pero si es suficiente para explicar los CW_{bias} o $Tumble_{bias}$, ya que al ser un cociente de dichos tiempos medios no es necesario reproducir las desviaciones estándar también. En conclusión, la propuesta de Mears *et al.* [57] muestra que para reproducir los tiempos medios y el bias es necesario tomar la escala temporal de las fluctuaciones correspondientes a frecuencias mucho mayores a 0.2 Hz . Es decir, esto indicaría que las transiciones en el sentido de rotación de los flagelos son consecuencia de fluctuaciones con frecuencias altas y no a las frecuencias bajas que aportan la mayoría de la varianza en la señal. En otras palabras, las transiciones en los sentidos de rotación ocurren en lapsos muy breves. A continuación se muestra la autocorrelación para la ecuación 2.1 y su correspondiente PSD.

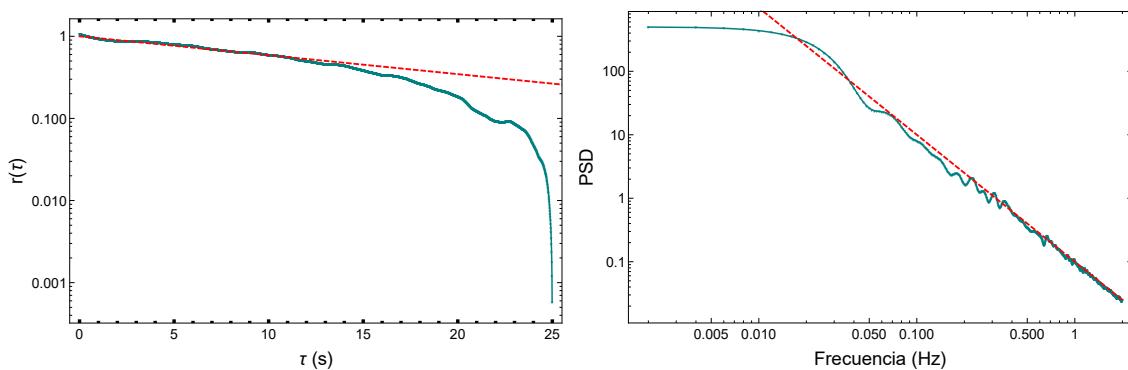


Figura 2-30: Izquierda: Grafico semi-log de la función de autocorrelación. Para obtener dicha figura se utilizaron datos de una corrida de la ecuación 2.1 cuando el sistema alcanzo el equilibrio en el sentido amplio. Se normalizó sobre el valor cuadrático medio y la ventana temporal total de los datos utilizados (estimación sesgada). Derecha: Grafico log-log de la PSD obtenida vía la transformada de Fourier discreta (DFT) de la función de autocorrelación.

Como se ve en la figura 2-30, la autocorrelación no es una simple exponencial por su comportamiento no lineal en un semi-log hacia tiempos grandes. Sin embargo, la PSD es funcionalmente similar a la de un O.U. (función lorentziana). Para la región de bajas frecuencias se ve un plateau, región denominada de ruido blanco. Luego del cambio en la pendiente hay una región que sigue un comportamiento $PSD(\omega) \propto \omega^{-2}$ (recta punteada roja en el grafico derecho de figura 2-30). Este mismo tipo de comportamiento para la PSD se obtuvo para la actividad de la kinasa en [66]. En la región de ruido blanco de la PSD se puede utilizar el límite de frecuencia tendiendo a cero para calcular el tiempo característico correspondiente de la función de autocorrelación, $\sqrt{\frac{PSD}{2Q_c}} = \tau$ si $\omega \ll 1$, donde Q_c es la intensidad de ruido de la ecuación 2.1. Con tiempo característico $\tau = 18.85\text{ s}$ se ajustó la región exponencial de $r(\tau)$ en la figura 2-30 izquierda como muestra la recta punteada roja. Este valor de τ da una magnitud de la escala temporal de las fluctuaciones en la ecuación 2.1, aunque se puede ver como para luego de los 15 s la autocorrelación cae mucho mas rápido que un comportamiento exponencial. Keegstra *et al.* [66] ajustaron la PSD de la actividad de la kinasa, en condiciones de buffer, con un proceso de O.U. cuyos tiempos característicos siguen una distribución con un máximo entre los $10 - 20\text{ s}$. Esto aporta más evidencia que las transiciones en el sentido de rotación se deben a fluctuaciones con altas frecuencias¹². Por lo tanto, esto prueba que la escala espacial utilizada para las fluctuaciones en la ecuación 2.1 concuerda con aquellas obtenidas experimentalmente. Las frecuencias bajas, consecuencia de fluctuaciones lentas en la kinasa CheA, podrían tener poco impacto en las distribuciones de tiempos medios para un flagelo o el comportamiento celular.

Es importante remarcar que en el trabajo de Korobkova *et al.* [15] se observó para

¹² Recordemos que la técnica FRET utilizada para medir la actividad de la kinasa es una medida indirecta a partir del complejo CheY-P-CheZ, luego es una medida directa sobre las fluctuaciones de Chey-P.

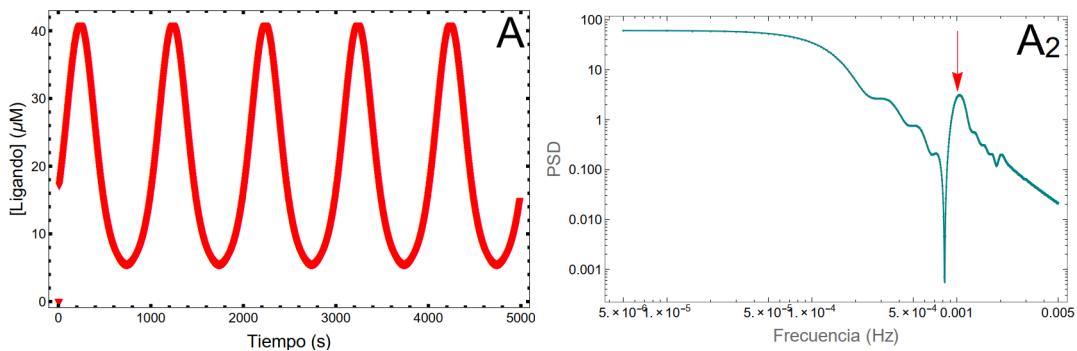
la PSD de la salida del motor flagelar un comportamiento a bajas frecuencias del tipo $1/\omega$. En el trabajo teórico de [48] se simula al motor flagelar con dos niveles energéticos y una concentración fluctuante de CheY-P mediante un O.U.; para niveles de ruido altos logran reproducir este tipo de comportamiento en la PSD. Con los parámetros considerados en este capítulo para la cepa **AW405** no se observa tal comportamiento, siendo la PSD para el CCW_{bias} y el $Tumble_{bias}$ funcionalmente similar a la obtenida en la figura 2-30 (derecha). Nótese que los valores de CW_{bias} de la cepa **RP437** [15] son significativamente mayores a aquellos de la cepa **AW405** [29]. Otra parametrización de los umbrales críticos y la intensidad de ruido, utilizados en esta tesis, podría dar un comportamiento de ley de potencia en los tiempos de rotación de CCW de los motores flagelares, lo cual podría explicar la región $1/\omega$ en la PSD. En [48] se observa esta evidencia ya que al tener más intensidad de ruido se aumenta la escala espacial de la ley de potencia para los tiempos de CCW y además se hace más evidente el comportamiento $1/\omega$ de la PSD. Desafortunadamente, desconocemos hasta el momento más mediciones de la PSD para la salida de los motores flagelares en otras cepas. Esto permitiría aclarar si lo observado por Korobkova et al [15] es particular de esa cepa o es una característica general de los motores flagelares. Sin embargo, debemos remarcar que las distribuciones de tiempos medios de CCW y CW no se conservan entre cepas, evidencia que indicaría que la densidad de energía espectral (PSD) tampoco debería conservarse entre cepas.

2.5. Estímulos con dependencia temporal

El estudio de estímulos con dependencia temporal comenzó con el trabajo de Block *et al.* [69]. La metodología implementada en ese trabajo fue reutilizada con la técnica de FRET en [55]. Estos trabajos permitieron analizar el efecto de estímulos periódicos en el sistema de señalización de *E. coli*. Los estímulos utilizados siguen el comportamiento $[L](t) = L_0 e^{A_L \sin(2\pi\nu t)}$, donde el parámetro ν es la frecuencia de oscilación del estímulo y el parámetro A_L permite, en el régimen $A_L \ll 1$, obtener un estímulo sinusoidal alrededor del valor L_0 . Se obtuvo que la actividad de la kinasa responde

sinusoidalmente con la misma frecuencia pero con un cambio de fase. Por esta razón, se le atribuye a que los receptores toman la derivada del logaritmo de la concentración de ligando, siendo el corrimiento de fase de 90° para bajas frecuencias [12]. En este capítulo se han vinculado los modelos fenomenológicos utilizados para caracterizar la respuesta de la kinasa y el nivel de metilación con el comportamiento de la proteína reguladora de respuesta en los entornos de los flagelos. Ahora analizaremos para ciertas condiciones de estímulos oscilantes como se comporta el sistema, estudiando el $Tumble_{bias}$.

Como se vio en las secciones anteriores, luego de estimular a los MCPs con concentraciones constantes, los cambios en la metilación llevan a las variables a los valores previos al estímulo. La pregunta que surge naturalmente es si esto también ocurre cuando los estímulos oscilan en el tiempo, situación probable en los microambientes donde habitan las bacterias flageladas. Para ello se simuló una concentración oscilante de aspartato con una frecuencia de 0.001 Hz y $A_L = 1$ (equivalente a un período de 1000 s). En los gráficos de la figura 2-31 se muestran los cambios en el tiempo de las variables modeladas del sistema de señalización y sus correspondientes PSD. En la figura 2-31 se ve que vía la PSD podemos detectar claramente la frecuencia dominante (flecha roja) del input simulado. Luego, al analizar la PSD con las demás variables podemos ir analizando como se propaga la contribución de esta frecuencia en el sistema de señalización.



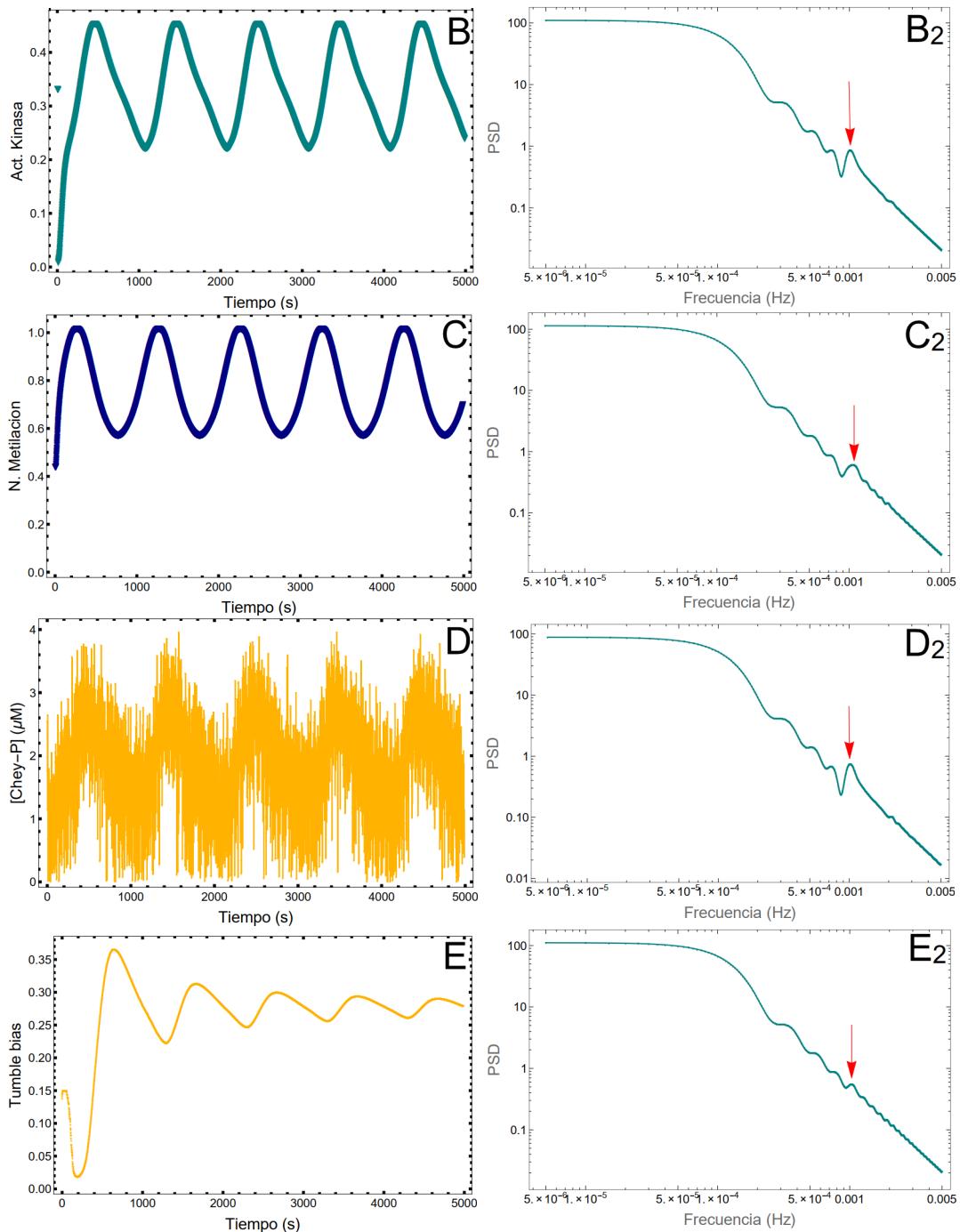


Figura 2-31: Izquierda: Concentración del ligando aspartato (A), actividad de la kinasa (B), nivel de metilación (C), $[\text{CheY-P}]$ en el entorno de un flagelo (D), $Tumble_{bias}$ (E) en función del tiempo. Derecha: PSD para la concentración del ligando aspartato (A₂), actividad de la kinasa (B₂), nivel de metilación (C₂), $[\text{CheY-P}]$ en el entorno de un flagelo (D₂), $Tumble_{bias}$ (E₂) en función del tiempo, vía la función de autocorrelación.

En todas las variables modeladas se ve a simple vista en los gráficos en función del tiempo la oscilación debida a la concentración del ligando oscilante. Dado que en

los estímulos sinusoidales se observó un corrimiento de fase, debemos analizar si la frecuencia de las oscilaciones se mantiene o también hay un corrimiento en ellas. Todas las PSD muestran un pico de frecuencia correspondiente a 0.001 Hz , coincidente con la frecuencia estímulo. Sin embargo, hay una marcada diferencia en la amplitud para esta frecuencia. Todas las PSD tienen el máximo de amplitud cuando las frecuencias tienden a cero. Esto se debe a que el límite $\omega = 0$ corresponde a la amplitud del valor medio de la señal. Como se ve en la figura 2-31 para la concentración de ligando la amplitud toma un valor alto para la frecuencia estímulo. Para el resto de las frecuencias se ve una significativa disminución de la amplitud. Se ha calculado la PSD vía la transformada de Fourier de la función de autocovarianza donde se resta el valor medio de la señal para una mejor resolución de la frecuencia estímulo. Aunque no se muestran estos resultados en todos los casos el máximo de amplitud corresponde a la frecuencia 0.001 Hz . Por lo tanto, se concluye que para esta frecuencia particular de estímulo el sistema responde oscilando a la misma frecuencia que el estímulo.

Por otro lado, resta analizar el efecto de estas oscilaciones en el comportamiento celular viendo su efecto en el $Tumble_{bias}$. Al comenzar, el estímulo hace decaer la actividad de la kinasa rápidamente a cero efecto que se replica en el $Tumble_{bias}$. A medida que transcurre el tiempo el nivel de metilación aumenta restaurando la actividad de la kinasa hacia el valor de equilibrio. A su vez, las oscilaciones mantienen al sistema fuera del equilibrio lo cual produce que la [CheY-P], en los entornos de los flagelos, varíe periódicamente en el tiempo. Como muestra el gráfico D de la figura 2-31 sólo en una fracción del tiempo las fluctuaciones son suficientes para poder cruzar el umbral crítico y producir una transición en el sentido de rotación de los flagelos. Esto ocurre cuando la actividad de la kinasa está cercano a los valores máximos. Al inicio del estímulo, el $Tumble_{bias}$ se comporta similarmente al proceso de agregar y quitar un atractor, dado que es lo que ocurre al oscilar la concentración del ligando. Esto se ha comprobado experimentalmente observándose que ante situaciones de estímulos la respuesta de los receptores anulan el efecto de las fluctuaciones en las transiciones [63]. Sin embargo, este efecto luego de un tiempo de exposición comienza a atenuarse.

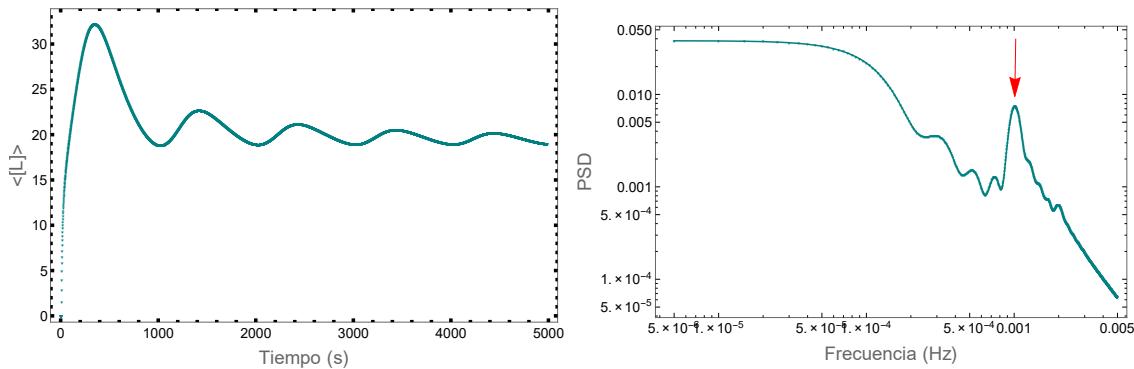


Figura 2-32: Izquierda: Valor medio de la concentración de ligando en función del tiempo. Derecha: PSD para el $Tumble_{bias}$ utilizando la función de autocovarianza. La flecha roja marca la frecuencia del input donde en este caso la amplitud es significativamente superior que al utilizar la función de autocorrelación.

Si se compara el gráfico E de la figura 2-31 y el gráfico izquierdo de la figura 2-32 se ve que ambos comportamientos son similares. La primer figura muestra como converge en el tiempo el cálculo del valor medio de la concentración de ligando simulada. Esto nos indica que el comportamiento del $Tumble_{bias}$ es similar a la de un promedio en función del tiempo. Recordamos que el $Tumble_{bias}$ se calcula como:

$$Tumble_{bias}(t) = \frac{\sum_{i=1}^N t_{Ti}}{t} = \frac{N}{t} \langle t_T \rangle = f_T \langle t_T \rangle \quad (2.22)$$

donde N es el número total de *Tumbles* medidos y t es el tiempo total de observación. Como muestra la ecuación 2.22 el $Tumble_{bias}$ es proporcional al valor medio de *Tumbles* cuya constante de proporcionalidad es la frecuencia de *Tumbles* f_T . Lo más interesante es que el $Tumble_{bias}$ ante un estímulo oscilante converge a un valor que no es el de equilibrio. Esto significa que en este caso el sistema de adaptación no “lleva de vuelta” a la bacteria a comportarse como en la situación libre de estímulos. En el último capítulo de esta tesis se estudiara el impacto de este comportamiento del $Tumble_{bias}$ en la dispersión de *E.coli* en medios líquidos. En la figura 2-33 se muestra el $Tumble_{bias}$ obtenido para distintas frecuencias donde se ve que luego de 0.01 Hz se vuelve independiente del período de las oscilaciones en la concentración de ligando.

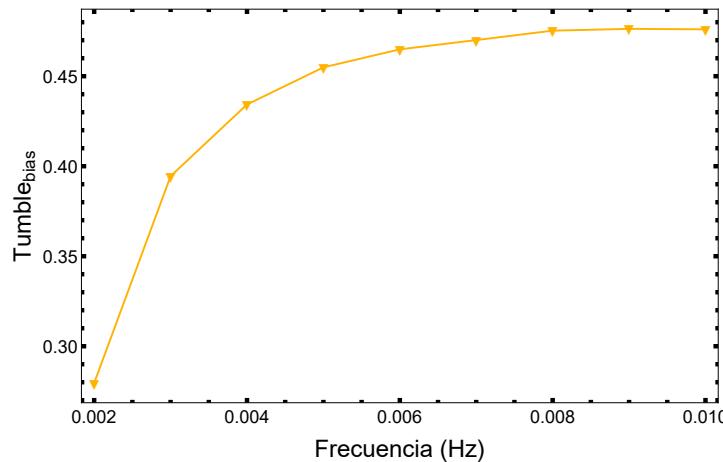


Figura 2-33: Valor del $Tumblebias$ estacionario en función de la frecuencia del estímulo.

2.6. Discusión

En este capítulo se presentó un modelo para el sistema de señalización de *E.coli* en presencia y ausencia de estímulos químicos en los entornos de los flagelos. A diferencia de otros modelos, como aquellos que toman en cuenta ecuaciones lineales con un enfoque de campo medio [48,57], se propuso simular el output del sistema en pequeñas regiones de la superficie celular, los entornos de los flagelos. Como el objetivo global de este capítulo era poder reproducir correctamente los tiempos de *Run & Tumbles* con sus respectivas desviaciones estándar de la cepa **AW405**, cuyas variables cinemáticas han sido medidas detalladamente, fue necesario para ello introducir una ecuación no lineal. Incorporar los modelos para la actividad de la kinasa y el nivel de metilación [12, 55] permiten aumentar el rango de validez del modelo siendo aplicable a condiciones de estímulos. Dado que se está simulando en el final del sistema de señalización, el análisis de fluctuaciones de la sección 2.4 nos permite comprender si la ruta de señalización “rio arriba” fue correctamente descripta. Comparando con los resultados experimentales para la actividad de la kinasa [66, 67] se concluyó que se simulan correctamente las fluctuaciones en la escala temporal de las transiciones entre los sentidos de rotación de los flagelos. Sin embargo, no se reproducen los picos cuyos tiempos característicos son mayores a 100 s. Estos abruptos cambios en la actividad de la kinasa pueden ser fácilmente incorporados como un tren de impulsos en la actividad de la kinasa.

En este modelo se interpretan los tiempos de rotación *CCW* & *CW* como tiempos de primer pasaje entre dos umbrales críticos. Esta hipótesis tomada de los trabajos [13, 14] fue corroborada como válida para explicar los tiempos *Runs* & *Tumbles*. Existen propuestas con una mayor resolución espacial donde se simulan los protómeros FliM del anillo C con los cuales interactúa CheY-P [46, 47]. Estos modelos de cambios conformacionales corroboran que en un enfoque de grano grueso los flagelos se comportan como un interruptor alternando entre dos estados. Cuando el número de mediciones es grande el $CW_{bias} = \frac{1}{1 + \frac{\langle t_R \rangle}{\langle t_T \rangle}}$. Esto muestra que un CW_{bias} puede ser obtenido con distintos tiempos medios *Runs* & *Tumbles*. Esto implica que distintas cepas con el mismo bias pueden tener distintos tiempos medios. En el trabajo de Bai *et al.* [47] se obtuvo experimentalmente los tiempos medios en función del CW_{bias} para otra cepa diferente que la **AW405**. Sorprendentemente el comportamiento funcional es similar al de la figura 2-8. Más aún, en este mismo trabajo se obtiene el comportamiento ultrasensible de los motores flagelares con respecto a CheY-P con una pendiente de Hill de $N_h = 9.1$. Ambas constantes de Hill (Bai *et al.* y esta tesis $N_h = 11.0$) están dentro del error experimental $N_h = 10.3 \pm 1.1$. Por lo tanto, se puede concluir que el enfoque menos detallado presentado en esta tesis reproduce las principales propiedades en las transiciones de los flagelos.

Mediciones de las distribuciones de tiempos de rotación *CCW* – *CW* y de *Runs* – *Tumbles* han sido efectuadas en distintas cepas. No hay evidencia que indique que estas sean conservadas en la misma especie. Para los tiempos de *CW* y *Tumbles* para distintas cepas se obtuvo un comportamiento funcional similar, luego de un máximo la distribución es exponencial. Mientras que para los *CCW* y *Runs* ambas tienen un comportamiento multi-exponencial sin embargo difieren en los regímenes donde se encuentran leyes de potencia. Con el modelo presentado se pueden reproducir correctamente los comportamientos funcionales para cada flagelo y para el comportamiento celular. Un resultado interesante que no ha sido medido experimentalmente es el cambio del *Tumble_{bias}* con respecto a la [CheY-P]. Con lo obtenido en este capítulo se sugiere que el comportamiento ultrasensible se mantiene, es decir el mismo N_h , sin embargo se reduce el rango de concentración necesaria para tener la misma sensibili-

lidad. Otro resultado inesperado es que ante estímulos periódicos la adaptación el *Tumblebias* no retorna al valor previo al estímulo. Sino que el valor al cual se adapta el sistema puede ser inclusive dependiente de la frecuencia de oscilación. Esto puede tener un impacto en la dispersión de *E.coli* en microambientes fluctuantes lo cual se estudiará más en detalle en el último capítulo.

Concluyendo, se logró desarrollar un modelo que permite describir las principales cualidades de la respuesta quimiotáctica de *E.coli*. En el próximo capítulo vincularemos este modelo con otras ecuaciones que gobiernan la locomoción de *E.coli* que en conjunto permiten simular la dispersión de esta bacteria flagelada en medios líquidos.

Capítulo 3

Run & Tumble

En este capítulo se profundizará sobre como modelar la locomoción de *E.coli*. No se abordara como son los mecanismos por los cuales la bacteria logra propulsarse sino que el abordaje será hacia el análisis de su comportamiento. En primer instancia, se estudiará como modelar este tipo de movimientos desde la perspectiva de las ecuaciones diferenciales estocásticas. Al poder modelar sus trayectorias se analizará estadísticamente su comportamiento a tiempos largos, lo cual es muy difícil de realizar experimentalmente. En este capítulo nos limitaremos a estudiar únicamente escenarios libres de quimiotaxis. Como se vio en el capítulo anterior en muchos escenarios quimiotácticos la adaptación lleva a la bacteria al comportamiento sin estimular, en cierto modo se puede pensar al comportamiento de *Run & Tumble* como el comportamiento de equilibrio del sistema de señalización. Por esta misma razón, es que le dedicaremos un capítulo entero. Schienbein & Gruler [70] en la década de 1990's utilizaron, por primera vez, ecuaciones diferenciales estocásticas para modelar la velocidad de un microorganismo. Durante las siguientes décadas diversos aportes han sido realizados por diferentes grupos, los cuales se podrán utilizar para comparar los resultados obtenidos en este capítulo. Desarrollar un modelo para el comportamiento de *Run & Tumble* que este controlado por el modelo de señalización interno nos permitirá en el próximo capítulo modelar el impacto de la presencia de químicos en la dispersión de este microorganismo.

3.1. Sistema de referencia

Como se mencionó en la sección 1.4 de la Introducción, lo más conveniente para analizar y modelar las trayectorias de las bacterias flageladas es utilizar un sistema de referencia intrínseco (SRI). Esto es, utilizar un sistema de referencia situado sobre el cuerpo del microorganismo. Como la forma de bacilo es común dentro de las bacterias flageladas estudiadas, se representará el cuerpo del microorganismo como un elipsoide.

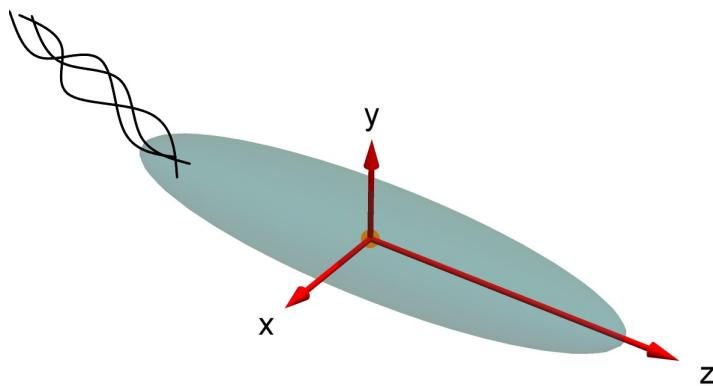


Figura 3-1: Representación de un bacilo con sistema de referencia intrínseco, en naranja se marca el centroide o centro de masa del microorganismo.

En la figura 3-1 se ve un elipsoide donde el semieje mayor esta alineado con el eje \hat{z} del sistema de referencia. Asumiremos que el desplazamiento será paralelo al semieje mayor del bacilo, esto implica que el ángulo de propulsión es cero. Para determinar las rotaciones se utiliza un sistema de referencia intrínseco caracterizado por dos ángulos. El ángulo de inclinación θ medido con respecto al eje \hat{z} y el ángulo azimutal ϕ medido con respecto al eje \hat{x} . Esto es diferente a las rotaciones utilizadas, por ejemplo, en cuerpos rígidos donde se utilizan tres ángulos (ángulos de Euler) para definir las rotaciones que puede efectuar el cuerpo sobre cada eje. Para analizar las rotaciones tenemos que además establecer el sistema de referencia de laboratorio y la orientación del sistema de referencia intrínseco con respecto al primero.

Asumiremos que la platina del microscopio, ejes \hat{x}_{Lab} e \hat{y}_{Lab} , son perpendiculares al eje \hat{y} de la bacteria. Es decir el eje \hat{z}_{Lab} es paralelo al eje \hat{y} . Cuando se modifica únicamente el ángulo θ ($\phi = 0$) es lo que se conoce como cabeceo (*Pitch*), esto genera un cambio en la dirección de movimiento dentro del mismo plano donde la bacteria se desplaza.

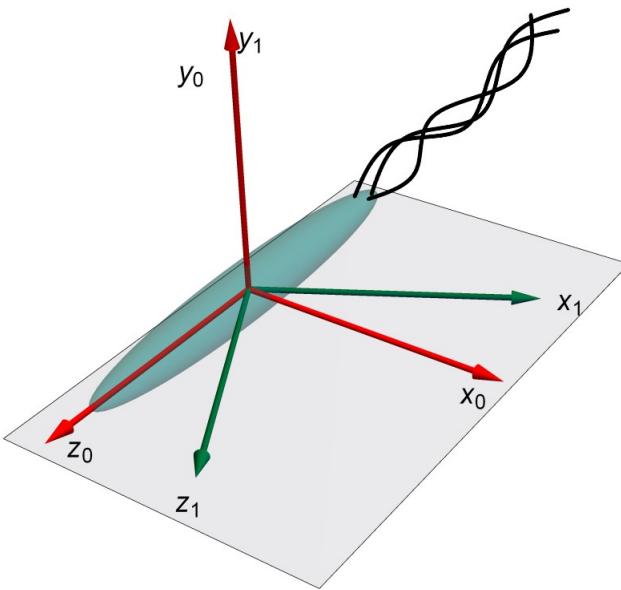


Figura 3-2: Rotación alrededor del eje \hat{y} llamado cabeceo, los ejes rojos representan el sistema de referencia antes de la rotación y los ejes verdes después de la rotación. En este ejemplo se mantuvo constante ϕ por simplicidad.

Por ejemplo, cuando se miden trayectorias con un microscopio óptico, en un plano fijo, este tipo de rotación es la que podemos ver sin que la bacteria abandone el campo de visión. Análogamente, es lo que realiza un avión al despegar pero con la diferencia que el eje \hat{x} es el que apunta hacia el cielo. Si, además se modifica el ángulo ϕ los vectores desplazamiento antes y después de la rotación no pertenecerán más al plano zx . Si, por lo contrario, θ toma un valor constante y ϕ varía uniformemente la bacteria realiza un movimiento de precesión alrededor de la dirección de desplazamiento sin modificar hacia donde se dirige. Cuando $\phi = \frac{\pi}{2}$, el ángulo θ rota a la bacteria sobre el plano zy , esto hace que la bacteria rote alrededor de su eje \hat{x} . Este tipo de rotación se conoce como guiñada (*Yaw*) y es la causante en este caso de que la bacteria abandone el plano de observación ver figura 3-3. El último ángulo de Euler, rotación sobre el eje \hat{z} , se obtiene si $\theta = 0$ y ϕ libre conocido como alabeo (*Roll*). Esta rotación deja

invariante al versor \hat{z} , el cual determina la dirección de desplazamiento y por ello no se la toma en cuenta.

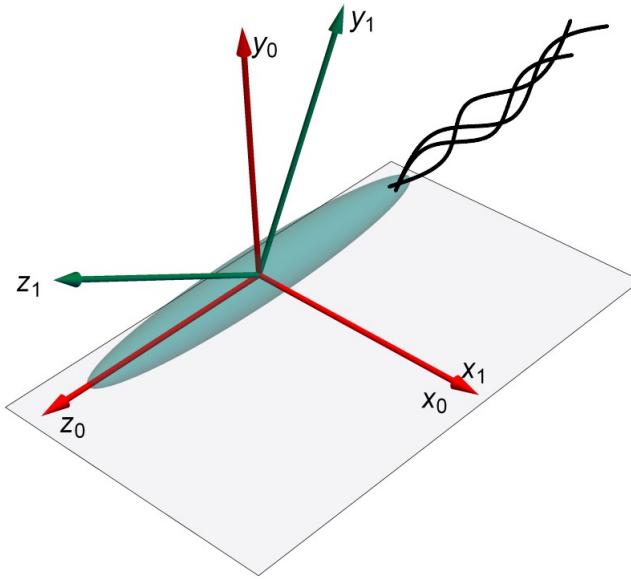


Figura 3-3: Rotación alrededor del eje \hat{x} denominado guiñada, los ejes rojos representan el sistema de referencia antes de la rotación y los ejes verdes después de la rotación. Se ve que la rotación cambia el plano de desplazamiento, lo cual hace que la bacteria se pierda del plano de visión.

Con los ángulos del sistema de referencia esférico intrínseco podemos definir el versor orientación $\mathbf{e}(t)$ vía la relación:

$$\mathbf{e}(t) = \sin \theta(t) \cos \phi(t) \hat{x} + \sin \theta(t) \sin \phi(t) \hat{y} + \cos \theta(t) \hat{z}. \quad (3.1)$$

Este versor no es nada más ni nada menos que la ubicación de un punto en coordenadas esféricas, pero al ser un versor esta situado sobre la esfera unidad como se ve en la figura 3-4. Seguiremos la hipótesis propuesta en [70], y muy utilizada en otros modelos, donde la rapidez $v(t)$ es independiente de la orientación:

$$\mathbf{v}(t) = v(t) \mathbf{e}(t). \quad (3.2)$$

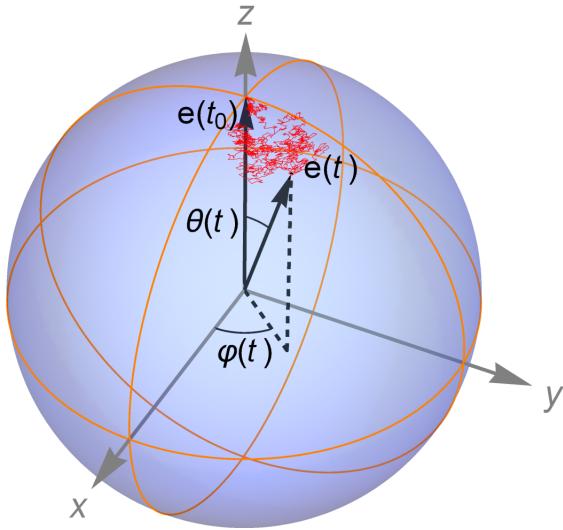


Figura 3-4: Vensor orientación $\mathbf{e}(t)$ sobre la esfera unidad. El vensor \hat{z} es el semi-eje mayor del microorganismo, en rojo se simula la trayectoria que realiza el vensor orientación sobre la esfera unidad para el modo de *Run*. Desde la condición inicial a un tiempo t , siguiendo las ecuaciones que se introducirán más adelante.

De este modo el sentido de la velocidad de la bacteria esta completamente determinada por el vensor orientación. Como se mostró en la introducción hay una fuerte correlación entre rapidez y desviación angular cuando algún flagelo cambia su sentido de rotación. Este fenómeno lo incluiremos al proponer las ecuaciones para cada variable del sistema de referencia esférico y para cada modo: *Run* o *Tumble*. Al poder obtener una expresión para la velocidad de la bacteria, se integra numéricamente esta velocidad para obtener la posición del centro de masa en función del tiempo del microorganismo¹:

$$\mathbf{r}_{Lab}(t) = \mathbf{r}_{Lab}(t_0) + \int_{t_0}^t ds \mathbf{v}_{I/G}(s). \quad (3.3)$$

Para poder obtener la posición en el sistema de referencia de laboratorio² (e.g. sistema de referencia del microscopio) antes de integrar la posición se debe obtener la velocidad en el *SRG* vía la matriz cambio de base $\mathbf{A}_{I/G}$. Por ejemplo, si la simulación comienza con la bacteria en un *Run* donde se alinea su velocidad inicial con el eje \hat{z}_{Lab} resulta que *SRG* coincide con el *SRI*. Por lo tanto, la matriz cambio de base $\mathbf{A}_{I/G}$ es

¹ $\mathbf{v}_{I/G}(t)$: Es la velocidad de la bacteria en el *SRG* obtenida mediante el cambio de base que se introducirá más adelante en la ecuación 3.6

²que denominaremos *SRG*

la matriz identidad y el vector velocidad esta en el *SRG* como se ve en la figura 3-5 izquierda. El versor orientación evolucionará en el tiempo, bajo ciertas ecuaciones, hasta que termine el tiempo de *Run*. Cuando ocurre una transición, ya sea de *Run* a *Tumble* o viceversa, el versor orientación al tiempo de corte sera el nuevo versor \hat{z}_{SRI} .

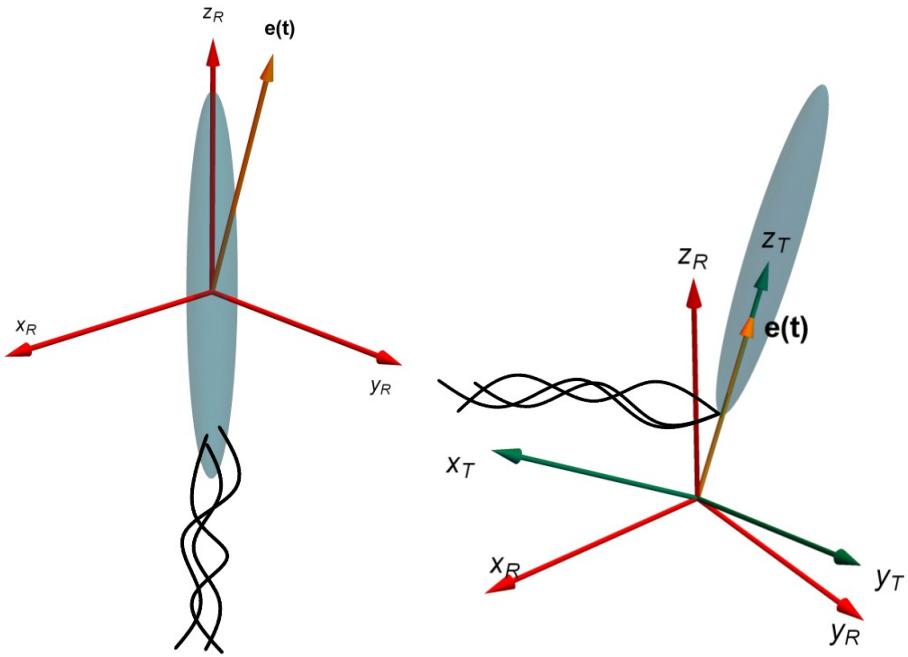


Figura 3-5: Izquierda: Sistema de referencia de laboratorio al iniciar la simulación con un *Run*, donde el $SRG = SRI$. En naranja se muestra como evoluciona el versor orientación durante este modo. Derecha: Al ocurrir la primera transición ya el nuevo *SRI* difiere del *SRG*. El versor orientación al tiempo de corte determina el versor \hat{z}_{SRI} del próximo modo.

A partir de ese versor se arma una nueva base ortonormal tal que satisfaga la correcta orientación. Si por ejemplo ocurre una transición al tiempo t , vía el versor en naranja de la figura 3-5 izquierda obtenemos el nuevo *SRI* para el modo de *Tumble* (ver figura 3-5 derecha). Si definimos a \mathbf{v}_I como al vector velocidad en el *SRI* y $\{\mathbf{e}_{SRI_1}, \mathbf{e}_{SRI_2}, \mathbf{e}_{SRI_3}\}$ como los versores de esta base:

$$\mathbf{v}_I(t) = \sum_{j=1}^3 \alpha_j(t) \mathbf{e}_{SRI_j}(t) \quad (3.4)$$

Aquí podemos ver que tanto las coordenadas de este vector como los versores mismos dependen del tiempo. Sin embargo, los versores varían en el tiempo solo cuando hay una transición en el comportamiento de la bacteria mientras que las coordenadas

cambiaran en cada paso de tiempo ya que dependerán de las ecuaciones de movimiento que veremos más adelante. En este modo de *Tumble* el versor orientación evolucionará como muestra la figura 3-6.

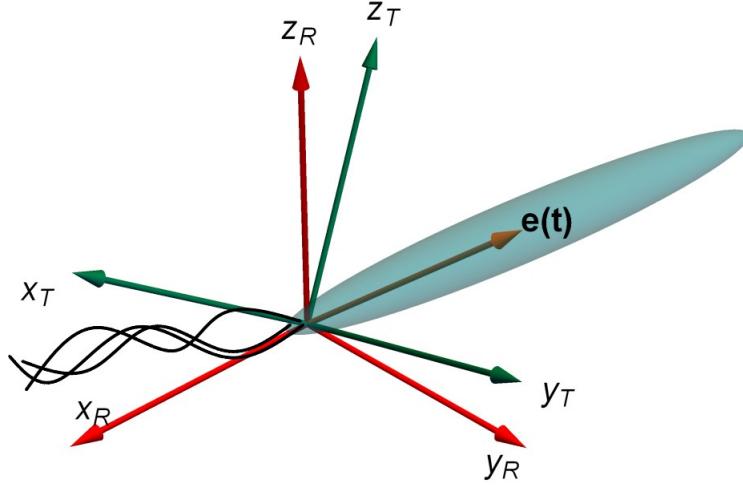


Figura 3-6: EL versor orientación $\mathbf{e}(t)$ durante un *Tumble* calculado en el *SRI* y graficado con respecto al *SRG*.

Para poder obtener el vector velocidad en el *SRG* expresado en la base del sistema de referencia de laboratorio $\{\mathbf{e}_{SRG_1}, \mathbf{e}_{SRG_2}, \mathbf{e}_{SRG_3}\}$:

$$\mathbf{v}_{I/G}(t) = \sum_{j=1}^3 \beta_j(t) \mathbf{e}_{SRG_j} \quad (3.5)$$

necesitamos obtener las nuevas coordenadas $\beta_j(t)$. Esto se obtiene vía la matriz de cambio de base $\mathbf{A}_{I/G}$:

$$\mathbf{v}_{I/G}(t) = \mathbf{v}_I(t) \cdot \mathbf{A}_{I/G}(t). \quad (3.6)$$

Es importante remarcar que tanto la matriz cambio de base como los ejes del *SRI* se modifican únicamente en la presencia de una transición *Run* \rightleftharpoons *Tumble*. Por el otro lado, las coordenadas α_j y β_j cambian en cada paso de tiempo vía la dinámica que se presentara en la próxima sección. Este proceso se repite a medida que van ocurriendo las transiciones entre ambos modos de locomoción, los tiempos de duración de cada modo están determinados por el modelo presentado en el capítulo anterior

(ver figuras 2-17 y 2-18). Además, es importante notar que esta metodología empleada puede ser aplicada a cualquier microorganismo u organismo que se desplace con un ángulo de propulsión nulo con comportamientos alternados, ya que aún no hemos cargado las ecuaciones que caracterizan el comportamiento de *Run & Tumble*, las cuales únicamente determinaran la dinámica de $\alpha_j(t)$.

3.2. Ecuaciones de movimiento

Las ecuaciones de Langevin para coloides o agentes autopropulsados suelen plantearse a partir de la segunda ley de Newton con un término de fuerza estocástica como se vio en la sección 1.3 de la introducción. La ecuación de movimiento es

$$\frac{d\mathbf{v}}{dt} = -\gamma \mathbf{v} - \nabla U(\mathbf{r}, \mathbf{v}) + \mathbf{F}(t) \quad (3.7)$$

donde el primer término de la parte derecha de la ecuación representa la disipación por fricción con el fluido, el segundo término una fuerza derivada de un potencial dependiente de la velocidad y posición, mientras que el último término es la fuerza estocástica [71]. En éste enfoque se utiliza un sistema de referencia global como podría ser el sistema de referencia del laboratorio. Si se iguala el lado derecho de la ecuación 3.7 con la derivada de la ecuación 3.2 se obtiene, después de algunas manipulaciones algebraicas, ecuaciones para cada componente esférica $\{v, \theta, \phi\}$. Cada una de estas ecuaciones posee ruido multiplicativo y no aditivo como la ecuación 3.7. En esta tesis utilizaremos el enfoque inverso, dado que la principal meta es obtener ecuaciones fenomenológicas fieles a los comportamientos observados, propondremos ecuaciones de Langevin para las variables $\{v, \theta, \phi\}$ con ruido aditivo, ajustadas a partir de las mediciones experimentales. Además, el sistema de referencia para las componentes esféricas será el intrínseco. Nuevamente se utilizarán potenciales que se pueden relacionar con las funciones de densidad de probabilidad experimentales en el régimen estacionario. Estos potenciales pueden describir satisfactoriamente los modos de *Run & Tumble*, cada uno con su respectivo conjunto de parámetros. Las transiciones entre

estos conjuntos de parámetros y los cambios en el sistema de referencia son controlados por el modelo de la concentración molar de CheY-P con los dos umbrales críticos y la regla del voto presentados en el capítulo anterior.

Se tomara cada variable, del sistema de referencia esférico, independiente de las demás. La dinámica se obtendrá de un potencial generalizado aditivo dado la independencia de las variables, es decir no hay términos cruzados. Se define a este potencial como

$$\chi(v, \theta, \phi) = V(v) + \Theta(\theta) + \Phi(\phi). \quad (3.8)$$

Las ecuaciones de movimiento para cada variable del sistema esférico son:

$$\dot{v}(t) = -\frac{\partial \chi}{\partial v} + \sqrt{2Q_v} \epsilon_v(t), \quad (3.9)$$

$$\dot{\theta}(t) = -\frac{\partial \chi}{\partial \theta} + \sqrt{2Q_\theta} \epsilon_\theta(t), \quad (3.10)$$

$$\dot{\phi}(t) = -\frac{\partial \chi}{\partial \phi} + \sqrt{2Q_\phi} \epsilon_\phi(t). \quad (3.11)$$

Desafortunadamente, no se conocen todas las funciones de densidad de probabilidad para las variables; rapidez, ángulo de inclinación y ángulo azimutal. La distribución de ángulos cenitales θ fue medida en [29], resultado mostrado en la sección 1.3 de la Introducción. Más adelante probaremos, en el cálculo de observables estadísticos, que este ángulo tiene más importancia que el ángulo azimutal ϕ . Aunque en el trabajo pionero de Berg & Brown [29] no están publicadas las funciones de densidad para las otras variables, si están disponibles los valores medios y varianzas de la rapidez. Estos resultados fueron obtenidos para otra cepa de *E. coli* en [72], donde el comportamiento de *Run & Tumble* observado fue estadísticamente el mismo.

El potencial ajustado a partir de estos resultados experimentales para la cepa **AW405** [29] es:

$$\chi(v, \theta) = \frac{\gamma_v}{2}(v - v_s)^2 - \rho[\cos(\theta) - \frac{\beta}{\delta} \cosh(\delta \cos(\theta))]. \quad (3.12)$$

El término $V(v) = \frac{\gamma_v}{2}(v - v_s)^2$ es el modelo de fricción propuesto en [70] el cual es un proceso de Ornstein-Uhlenbeck cuyo valor de equilibrio v_s depende de cada modo de movimiento: *Run* o *Tumble*. Como la rapidez esta definida en el intervalo $[0, \infty)$ hay una condición de borde reflectante en $v = 0$. El parámetro γ_v es un coeficiente de fricción, por unidad de masa, independiente de la rapidez. Para el coeficiente de fricción de una bacteria como *E. coli* es común usar el correspondiente a un elipsoide en la dirección del semieje mayor $\gamma_v = \frac{\Gamma}{m} = \frac{3\eta}{ab\rho \ln[(\frac{2a}{b}) - \frac{1}{2}]} \approx 10^6 [\frac{1}{s}]$ [73], donde m es la masa, Γ el coeficiente de fricción para un elipsoide prolato, ρ la densidad de la bacteria, η la viscosidad del agua, b los semiejes menores y a el semieje mayor del elipsoide. Esta expresión permite que, en ausencia de la propulsión, la rapidez decaiga a cero muy rápidamente por las fuerzas viscosas congruente con el número bajo de Reynolds. Los parámetros del potencial $\Theta(\theta) = -\rho[\cos(\theta) - \frac{\beta}{\delta} \cosh(\delta \cos(\theta))]$ se ajustan para cada modo a partir de datos experimentales. Para el *Tumble* se ajustan a partir de la distribución de ángulos de *Tumble* como mostraremos más adelante. Pero, para el modo de *Run* no se encuentra disponible la función de densidad de ángulos experimental pero si su valor medio y varianza. De este modo se puede ajustar los parámetros $\{\rho, \beta, \delta\}$ para el *Run* que satisfacen correctamente los datos medidos en [29]. Dado que el potencial de la ecuación 3.12 no depende de ϕ , la ecuación resultante para esta variable es puramente ruido, siguiendo un proceso de Wiener para ambos modos, como fue propuesto en [3]. Los ruidos de las ecuaciones 3.9, 3.10 y 3.11 son ruidos blancos gaussianos que satisfacen; $\langle \epsilon_i(t) \rangle = 0$ y $\langle \epsilon_i(t_1)\epsilon_j(t_2) \rangle = \delta_{ij}\delta(t_1 - t_2)$ con $\{i, j\} = \{v, \theta, \phi\}$.

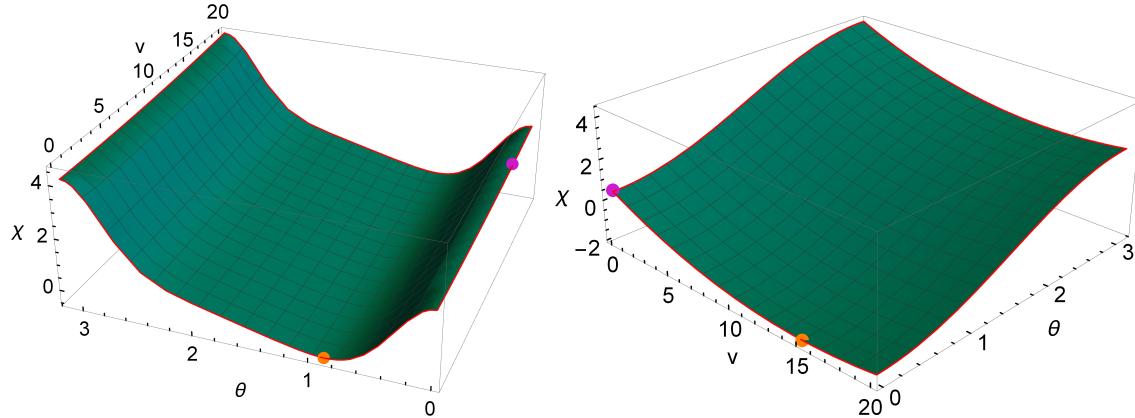


Figura 3-7: Potencial $\chi(v, \theta)$ donde la condición inicial esta representada por el punto violeta y el mínimo del potencial por el punto naranja. Izquierda: Potencial de Tumble con parámetros $\{\rho_T = 1.0, \beta_T = 0.0063, \delta_T = 9.0625, v_{ST} = 0.0, Q_\theta = 25, Q_\phi = 10, Q_v = 10000.0, \gamma = 21640.0\}$. Derecha: Potencial de Run con parámetros $\{\rho_R = 2.0, \beta_R = 0.0, \delta_R = 1.0, v_{SR} = 15.0, Q_\theta = 0.25, Q_\phi = 10, Q_v = 240000.0, \gamma = 21640.0\}$.

En la figura 3-7 se muestran los potenciales para *Run* o *Tumble* para la cepa **AW405**. El punto violeta marca la condición inicial con la cual arranca cada modo. Para la variable θ siempre la condición inicial sera $\theta(t_0) = 0$, mientras que para la variable v la condición inicial sera la rapidez al tiempo de corte del modo previo. En esta figura (3-7) para la rapidez, se eligió ilustrativamente el valor de equilibrio del modo previo. Como muestran las ecuaciones 3.9, 3.10 y 3.11, si $Q_i = 0$ con $i = \{v, \theta, \phi\}$, las ecuaciones de movimiento evolucionan siguiendo la pendiente del potencial hasta llegar al punto de pendiente nula el cual es un punto fijo (punto naranja en la figura 3-7). Esta dinámica es modificada al incorporar el ruido en el sistema el cual se encargara a todo tiempo de sacar al sistema del punto fijo. A partir de estas ecuaciones podemos obtener las coordenadas $\alpha_j(t)$ siendo:

$$\alpha_1(t) = v(t) \sin(\theta(t)) \cos(\phi(t)),$$

$$\alpha_2(t) = v(t) \sin(\theta(t)) \sin(\phi(t)),$$

$$\alpha_3(t) = v(t) \cos(\theta(t)).$$

Usando la ecuación 3.6 se obtienen las coordenadas $\beta_j(t)$ en el sistema SRG; además con la ecuación 3.3 podemos obtener la posición en función del tiempo en el

sistema de referencia de laboratorio. En la figura 3-8 se muestra un resultado de la simulación numérica donde se simulan 15 minutos de la vida de una bacteria utilizando la metodología descripta hasta el momento.

Derivando la ecuación 3.2 se obtiene:

$$\dot{\mathbf{v}}(t) = \dot{v}(t)\mathbf{e}(t) + v(t)\dot{\mathbf{e}}(t) \quad (3.13)$$

Reemplazando la ecuación 3.12 en las las ecuaciones 3.9, 3.10 y 3.11, luego de algunas manipulaciones algebraicas se llega a

$$\dot{\mathbf{v}}(t) = -\gamma_v(\mathbf{v} - \mathbf{v}_s) + \mathbf{F}(\eta_\theta, \eta_\phi, \frac{\partial \Theta}{\partial \theta}) + \sqrt{2Q_v}\eta_v \mathbf{e}. \quad (3.14)$$

Si comparamos las ecuaciones 3.7 y 3.14 vemos que en ambas el primer término corresponde a la componente de fuerza disipativa por fricción con el medio líquido, el segundo término ahora es un torque con componentes deterministas y estocásticas, mientras que el último término es una componente estocástica aditiva en la dirección de desplazamiento. Esta ecuación de Langevin es válida únicamente para cada modo, es decir vale en el sistema de referencia intrínseco y cada vez que este es actualizado cambian las componentes y sus condiciones iniciales. Este es el punto de partida para incorporar al modelo otras fuerzas como interacciones hidrodinámicas o colisiones entre organismos e interacciones hidrodinámicas con el medio debido a cambios en el campo de velocidades del mismo. Esto esta más allá del objetivo de estas tesis, donde no se consideraran interacciones entre los individuos y se asumirá que el campo de velocidades no varia en las escalas espaciales del desplazamiento.

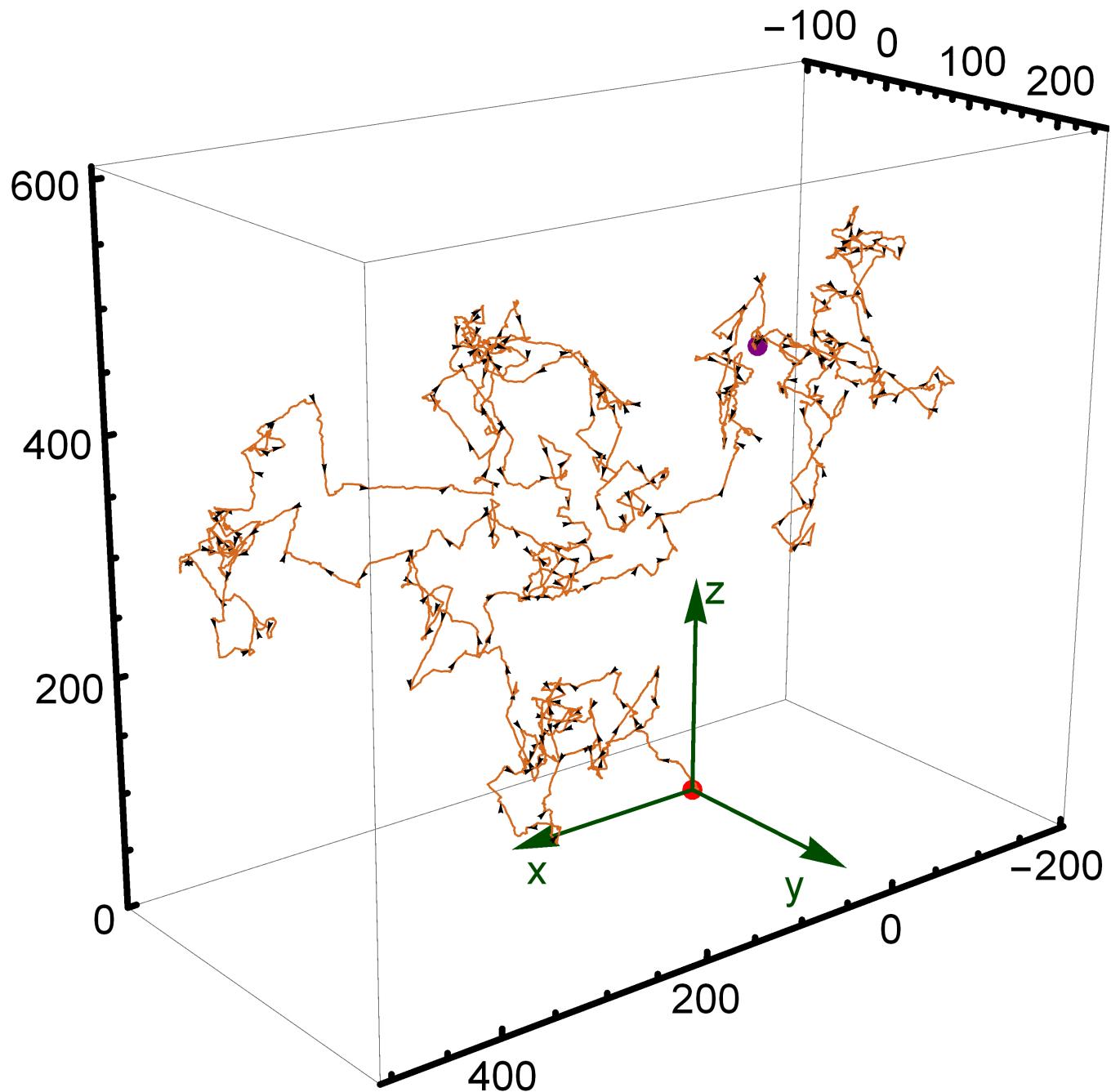


Figura 3-8: Trayectoria 3D de *Run & Tumble* sin estimular durante 15 minutos. En naranja se muestra la posición del centro de masa de la bacteria mientras que con flechas negras se muestra dirección (versor \hat{z} del SRI). El punto naranja marca el punto de inicio siendo este el centro del SRG y el punto violeta el punto final. Las flechas verdes determinan el SRG.

3.3. Análisis estadístico del *Run & Tumble*

Desde el estudio estadístico de las trayectorias de *E.coli* en 1972 por Berg & Brown [29] han sido desarrolladas diversas propuestas para modelar el comportamiento de *Run & Tumble*. La propuesta de Lovely & Dalhquist [74] inspirada en la Física de polímeros propuso tomar los *Runs* como trayectorias rectas y los *Tumbles* como eventos de reorientación instantáneos. De esta manera las trayectorias se asemejan a un polímero de N monómeros unidos por enlaces rígidos. Además, se asumió que los tiempos de duración de los *Runs* siguen una distribución exponencial y la bacteria posee una rapidez constante. Ese trabajo pudo demostrar por primera vez que, a partir de resultados analíticos de la Física de polímeros, el comportamiento de *Run & Tumble* es un comportamiento difusivo. Esto implica que aunque microscópicamente la motilidad de una bacteria flagelada como *E.coli* no se asemeja al comportamiento de un coloide, macroscópicamente sus comportamientos obedecen la misma ecuación de difusión. Más aún, esto permite obtener la constante de difusión que caracteriza al comportamiento, como se vio en la sección 1.3 de la Introducción. Un enfoque alternativo propuesto por Schnitzer [75] ha sido tomar los *Tumbles* como reorientaciones instantáneas análogas a las colisiones por efectos térmicos. Este enfoque busca caracterizar las tasas de colisión dependientes de la posición y la dirección de movimiento. Este formalismo alternativo reafirma el comportamiento difusivo encontrado en [74]. Taktikos *et al.* propusieron correlaciones de velocidades para calcular los desplazamientos medios cuadráticos de los comportamientos de *Run & Tumble*, *Run & Reverse*, y *Run & Reverse & Flick*. Las correlaciones y el desplazamiento medio cuadrático (MSD) se relacionan vía la relación de Kubo [33]

$$\langle [\mathbf{r}(t) - \mathbf{r}(0)]^2 \rangle = \int_0^t dt_1 \int_0^t dt_2 \langle \mathbf{v}(t_1) \cdot \mathbf{v}(t_2) \rangle. \quad (3.15)$$

El modelo de Taktikos *et al.* asume rapidez constante y que las distribuciones de ángulos son funciones de Dirac centradas en los valores medios de las distribuciones experimentales. Esto se interpreta pensando que la bacteria siempre se reorienta con el mismo ángulo. Además se toman los *Tumbles* como instantáneos y la duración

de los *Runs* como variables aleatorias con distribución exponencial. Estas simplificaciones permitieron a los autores obtener los MSD analíticamente, donde para los tres comportamientos estudiados se obtuvieron comportamientos difusivos a tiempos largos. Condat *et al.* [76] también obtuvieron las correlaciones de velocidad para el comportamiento de *Run & Tumble* desde la perspectiva de ecuaciones de Langevin desde un sistema de referencia intrínseco. En este enfoque la rapidez ya no es constante y los *Runs* son curvos, coincidiendo con lo observado experimentalmente. En esta propuesta se mantienen los *Tumbles* como eventos instantáneos y como en las demás propuestas, los tiempos de *Runs* siguen una distribución exponencial. Dado que en esta propuesta los *Runs* son trayectorias curvas, es la primera vez que los *Runs* fueron analizadas individualmente y luego se evaluó el impacto de interrumpir los *Runs* con *Tumbles* instantáneos. En ambos casos los autores obtienen comportamientos difusivos a tiempos largos. La incorporación de *Tumbles* no instantáneos fue propuesta por Saragosti et.al. [77]. Este trabajo propuso modelar las reorientaciones como un proceso difusivo rotacional que es interrumpido a tiempos que siguen una distribución exponencial, no se modela la secuencia completa de *Run & Tumble*. En esta tesis proponemos un modelo para estudiar el comportamiento de *E.coli* donde los *Runs* son trayectorias curvas cuya rapidez no es constante, donde los *Tumbles* son no instantáneos y siguen un proceso difusivo con deriva. Las distribuciones de tiempo no son distribuciones mono-exponentiales sino que son distribuciones multi-exponentiales obtenidas a partir de modelar la concentración molar de *CheY-P* en el entorno de cada motor flagelar. Una de las principales razones por las cuales la mayoría de los autores han modelado los *Tumbles* como eventos instantáneos se debe a que en la cepa **AW405** los tiempos de *Run* son casi un orden de magnitud mayor que los tiempos de *Tumble*. Sin embargo, en otras cepas [57] los tiempos de *Tumble* son mayores y no pueden ser despreciados. Más aún, en el capítulo anterior en la figura 2-20 se ve claramente que el tiempo medio de *Tumble* para la cepa **AW405** es dependiente del *Tumble_{bias}*. Para situaciones de químicos repelentes los tiempos de *Tumble* pueden ser inclusive mayores que los tiempos de *Runs*, para poder modelar el *Run & Tumble* en escenarios quimiotácticos es necesario modelar los *Tumbles* como

no instantáneos. Al ir aumentando la complejidad en la descripción del comportamiento que realiza *E.coli* las herramientas analíticas son más difíciles de aplicar, es por eso que en esta tesis se resuelven las ecuaciones vía simulaciones numéricas. De todos modos, bajo ciertas condiciones con cálculos analíticos podremos verificar el correcto funcionamiento de dichas simulaciones.

A partir de las ecuaciones de movimiento 3.9, 3.10 y 3.11 se pueden obtener sus ecuaciones de Fokker-Planck asociadas. Como estas variables son coordenadas esféricas; la rapidez está definida en el intervalo $[0, \infty)$, el ángulo de inclinación en el intervalo $[0, \pi]$ y el ángulo azimutal en $[0, 2\pi)$. En todos los casos la corriente de probabilidad se conserva [23]. Existen funciones de densidad de probabilidad estacionarias para cada variable, por ejemplo para el ángulo cenital de inclinación $P_{ST}(\theta) = Ne^{-\Theta(\theta)}$ donde N es la constante de normalización y $\Theta(\theta)$ el potencial de la ecuación 3.12.

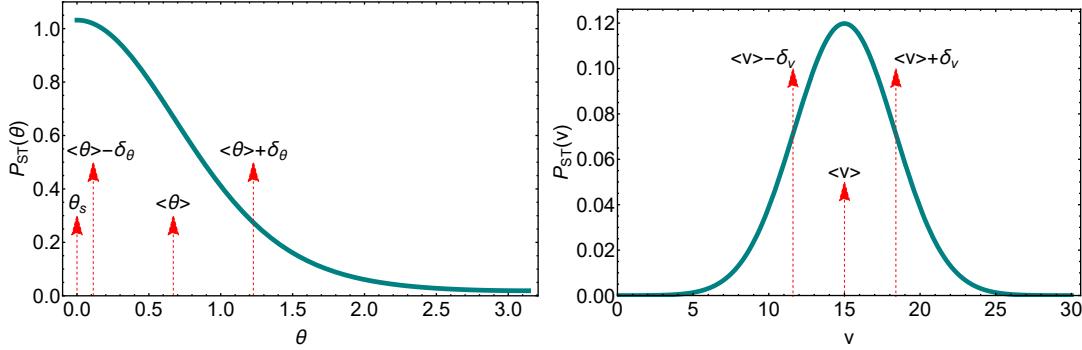


Figura 3-9: Funciones de densidad de probabilidad estacionarias para ángulo de inclinación y rapidez para *Runs*. Izquierda: $P_{ST}(\theta)$ donde $\langle\theta\rangle \pm \sigma = 38^\circ \pm 18^\circ$ y $\theta_s = 0.0$. Derecha: $P_{ST}(v)$ donde $\langle v \rangle \pm \sigma = 15 \pm 3.4 \mu\text{m}/\text{s}$.

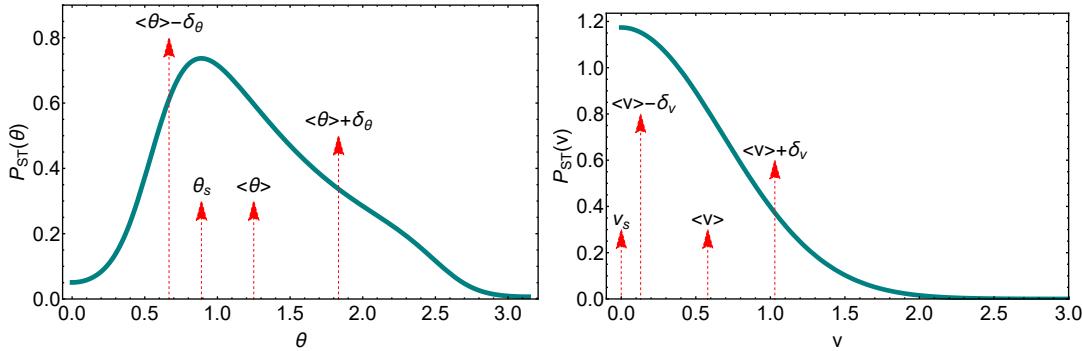


Figura 3-10: Funciones de densidad de probabilidad estacionarias para ángulo de inclinación y rapidez para *Tumbles*. Izquierda: $P_{ST}(\theta)$ donde $\langle\theta\rangle \pm \sigma = 71^\circ \pm 33^\circ$ y $\theta_s = 51^\circ$. Derecha: $P_{ST}(v)$ donde $\langle v \rangle \pm \sigma = 0.58 \pm 0.45 \mu\text{m}/\text{s}$ y $v_s = 0 \mu\text{m}/\text{s}$.

En las figuras 3-9 & 3-10 se muestran las funciones de densidad de probabilidad estacionarias para las variables v y θ . Dado que la variable ϕ tiene una distribución uniforme estacionaria, no se muestra. Si se comparan los valores de estas funciones con los de la tabla 3.1 podemos ver que los valores son muy cercanos a los experimentales excepto para la desviación angular de los *Runs* y la rapidez de los *Tumbles* que no ha sido medida.

	<i>Run</i>	<i>Tumble</i>
rapidez promedio	$14.2 \pm 3.4 \mu\text{m}/\text{s}$	-
desviación angular	$23 \pm 23^\circ$	$68 \pm 33^\circ$
duración	$0.86 \pm 1.18 \text{ s}$	$0.14 \pm 0.19 \text{ s}$

Cuadro 3.1: Parametros cinematicos obtenidos para la cepa **AW405** [29]

La gran diferencia es que los valores de la tabla están promediados con respecto a los tiempos de duración de cada modo y los de las figuras no. Es decir, los modos para una cepa salvaje son procesos estocásticos interrumpidos dando una secuencia alternada entre cada comportamiento. Los promedios de las distribuciones estacionarias cambiarán o no al ser promediados con los tiempos de duración dependiendo del tiempo que tarda cada variable en llegar a su valor estacionario. Para la rapidez, dado que estamos en un mundo donde el número de Reynolds tiende a cero, se obtuvo que $\gamma_v \approx 10^6 [\text{s}^{-1}]$. La inversa del coeficiente de fricción es el tiempo característico al cual relaja la rapidez y esta en el orden de una millonésima de segundo. Por lo tanto, las distribuciones estacionarias tanto para los *Runs* como para los *Tumbles* no se modifican al ser promediada con los tiempos de duración de cada modo.

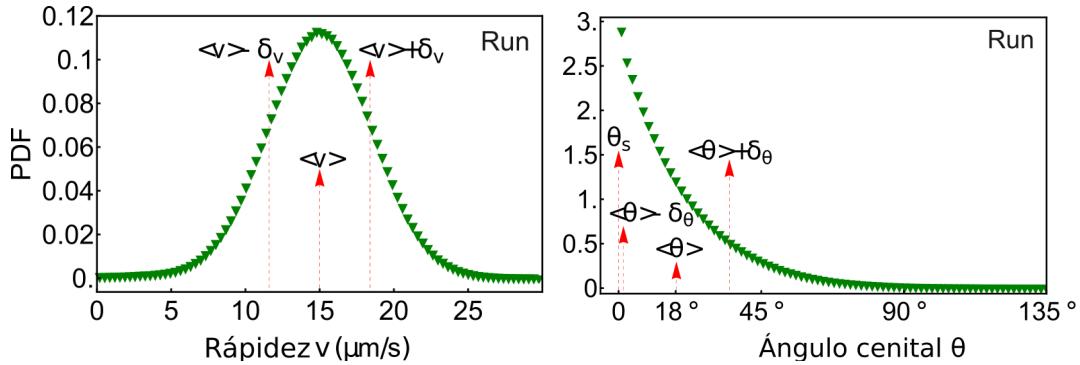


Figura 3-11: Funciones de densidad estacionarias para rapidez, ángulo azimutal para los *Runs* del comportamiento de *Runs & Tumbles* donde los tiempos de cada modo se obtienen del capítulo anterior. Izquierda: $P(v)$ donde $\langle v \rangle = 15.0 \pm 3.4 \mu\text{m/s}$. Derecha: $P(\theta)$ donde $\langle \theta \rangle = 17.7^\circ \pm 16.7^\circ$. Nuevamente, la distribución para ϕ no se muestra al ser una distribución uniforme.

En las figuras 3-11 y 3-12 se muestran las funciones de densidad de probabilidad para las variables de las componentes esféricas promediadas con los tiempos de corte de cada modo de las figuras 2-17 & 2-18 del capítulo anterior. Para las funciones de densidad de probabilidad estacionarias (figuras 3-9 y 3-10) se espera que las variables lleguen al comportamiento estacionario, a partir de este momento se guardan los valores que toma la variable y se construyen dichas funciones. En contraste, ahora solo se toma el valor de la variable al tiempo de corte, es decir cuando ocurre una transición, y con estos valores se obtiene su función de densidad de probabilidad promediadas con los tiempos de corte. Vemos que las únicas distribuciones que se modifican son las del ángulo cenital de inclinación. Para los *Runs* ahora los valores del ángulo de inclinación θ son cercanos a los de la tabla 3.1. Esto muestra que para los tiempos de duración de *Run* el proceso 3.10 es un proceso no estacionario, sobre lo cual se profundizara más en la sección siguiente. En el caso de los *Tumbles* la distribución de ángulos de inclinación se modifica levemente, lo cual muestra que es un proceso cuasi-estacionario. Las figuras 3-9 y 3-10 corresponden a mutantes que no poseen la capacidad de efectuar las transiciones entre los modos de locomoción teniendo un *Tumble bias* = {0, 1} respectivamente. Mientras que las figuras 3-11 y 3-12 corresponden a la cepa salvaje **AW405** con un *Tumble bias* = 0.15, es decir, el escenario libre de estímulos. Estos resultados se obtiene al analizar desde el sistema de referencia intrínseco a las trayectorias simuladas como se mostró en la figura 3-8.

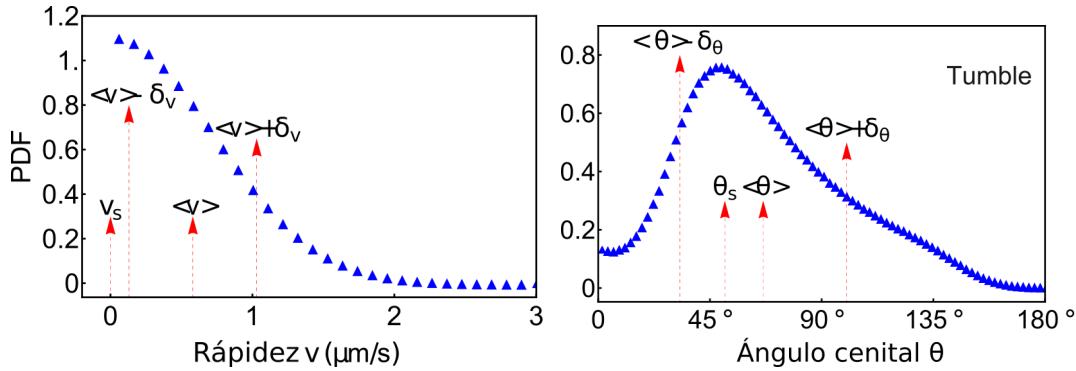


Figura 3-12: Funciones de densidad estacionarias para rapidez, ángulo azimutal *Tumbles* del comportamiento de *Runs & Tumbles* donde los tiempos de cada modo se obtienen del capítulo anterior. Izquierdo: $P(v)$ donde $\langle v \rangle = 0.58 \pm 0.45 \mu\text{m/s}$. Derecho: $P(\theta)$ donde $\langle \theta \rangle = 66.5^\circ \pm 33.4^\circ$. Nuevamente, la distribución para ϕ no se muestra al ser una distribución uniforme.

Al analizar las distribuciones de las componentes esféricas en el sistema de referencia intrínseco no es necesario contemplar las condiciones iniciales. Esto se debe a que al alinear el sistema de referencia con el semieje mayor del bacilo, las condiciones iniciales se cambian al inicio de cada modo. Si se quiere analizar como son las distribuciones de las componentes del vector velocidad en el sistema de referencia global se debe tomar en cuenta que condición inicial se utiliza. Para ello, se toma una condición inicial donde los versores orientación se distribuyen uniformemente sobre la esfera unidad (ver figura 3-13). Si analizamos como se distribuyen los vectores del SRG en coordenadas esféricas tenemos las distribuciones para las componentes θ & ϕ de los versores orientación iniciales. Estos son los ángulos que toman cada flecha de la figura 3-13 izquierda, mostrados en la figura 3-14. En la figura 3-13 derecha vemos que en el espacio $\theta - \phi$ estos ángulos se distribuyen uniformemente.

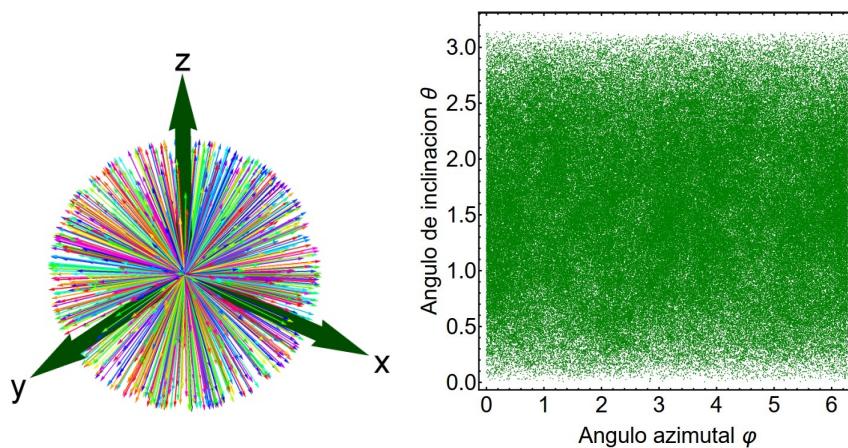


Figura 3-13: Izquierda: Orientaciones iniciales $\mathbf{e}(t_0)$ para 1000 bacterias sobre la esfera unidad en el SRG. Derecha: Distribución uniforme en el espacio $\theta - \phi$.

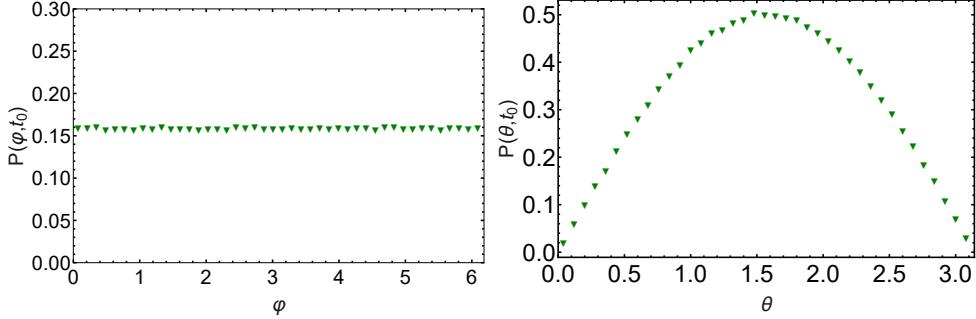


Figura 3-14: Izquierda: Función de densidad inicial para ángulo ϕ en el SRG. Derecha: Función de densidad inicial para ángulo θ en el SRG.

En la figura 3-15 se analiza como se distribuyen las componentes del vector velocidad de los *Runs* en el SRG en coordenadas esféricas (gráficos superiores) y cartesianas (gráficos inferiores). En coordenadas esféricas se obtiene que la distribución de la rapidez es la misma que en el SRI, resultado esperado dado que la rapidez no puede depender del sistema de referencia utilizado. Para los ángulos que determinan la orientación en el SRG durante los *Runs*, se obtienen las mismas distribuciones que para las condiciones iniciales. Esto prueba que dada una situación inicial isótropa, donde no hay una dirección preferente para la velocidad, se mantiene la isotropía con el comportamiento de los *Run & Tumble*. En coordenadas cartesianas (figura 3-15, gráficos inferiores) se observa nuevamente la isotropía ya que cada componente tiene la misma distribución centrada en cero.

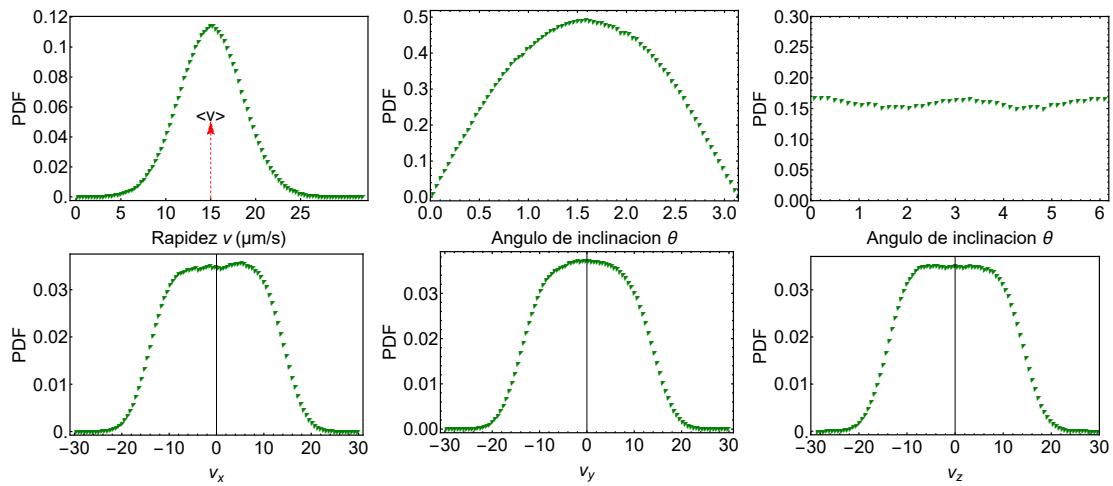


Figura 3-15: Funciones de densidad de probabilidad para la velocidad de los *Runs* en coordenadas esféricas (arriba) y cartesianas (abajo) en el SRG.

Del mismo modo repitiendo el análisis para los *Tumbles* se obtienen las mismas conclusiones; la distribución de la rapidez es independiente del sistema de referencia, las condiciones iniciales se mantienen confirmando la propiedad de isotropía del *Run & Tumble*. En este caso, las distribuciones de las componentes de la velocidad en cartesianas son distribuciones de Laplace centradas en el cero.

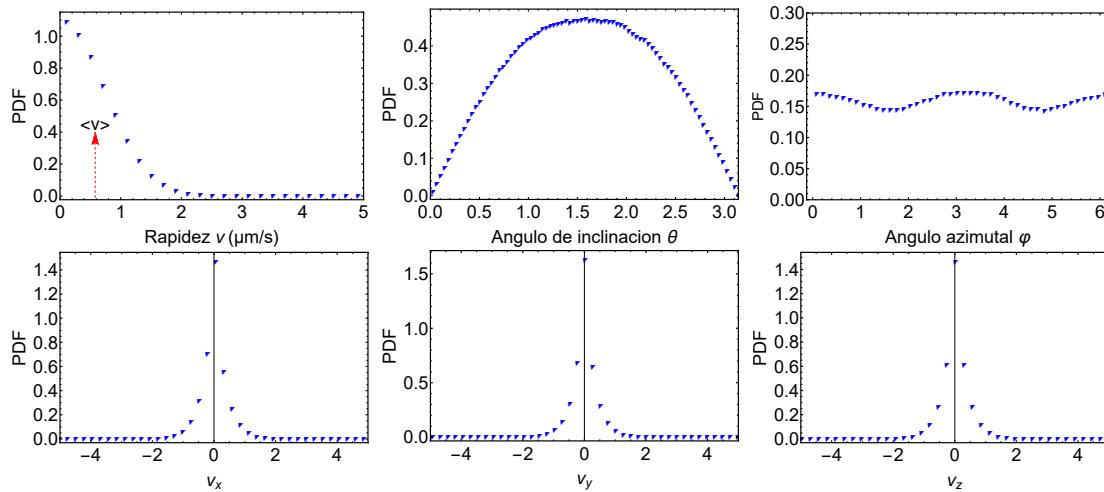


Figura 3-16: Funciones de densidad de probabilidad para la velocidad de los *Tumbles* en coordenadas esféricas (arriba) y cartesianas (abajo) en el SRG.

Cuando *E.coli* elige una nueva dirección haciendo las rotaciones de guiñada y cabeceo (figuras 3-2 y 3-3) lo hará con una preferencia hacia ángulos menores a 90° siguiendo la distribución de la figura 3-10. Como las reorientaciones son independientes entre ellas, al ir sumando eventos de *Tumbles* la bacteria no tiene preferencia por ninguna dirección en particular. Esta es la razón por la cual el comportamiento de *Run & Tumble* es un comportamiento isótropo, lo cual quedó demostrado por la invarianza en las distribuciones iniciales de los ángulos de la orientación. Hasta el momento solo estamos evaluando como se dispersa *E.coli* en un medio líquido libre de estímulos, es de esperar que su comportamiento, al ser un método de búsqueda, le de la misma probabilidad a cada dirección posible.

Luego de analizar individualmente cada modo de locomoción desde los sistemas de referencia intrínseco y global resulta claro que información nos da cada uno. El sistema SRI nos permite analizar el comportamiento con una visión desde "los zapatos" de la bacteria mientras que el SRG nos da una visión más intuitiva sobre su dispersión en

el medio. A continuación se analizarán distintos observables estadísticos que permiten caracterizar el comportamiento de *E.coli*.

3.4. Persistencia direccional

La persistencia direccional a un tiempo t se define como el promedio del producto escalar del versor orientación al tiempo inicial con el mismo versor al tiempo t :

$$\alpha(t) \doteq \langle \mathbf{e}(t) \cdot \mathbf{e}(0) \rangle. \quad (3.16)$$

Este observable nos indica cuánto cambia la dirección la bacteria con respecto a su orientación inicial. Por ejemplo si $\alpha = 1$ entonces la bacteria no cambia su orientación, lo cual ocurre en las propuestas donde los *Runs* son rectos. Por otro lado, $\alpha = 0$ corresponde a la situación donde la bacteria olvidó completamente hacia dónde se dirigía inicialmente. Si se analiza este observable desde el SRI ocurre que las condiciones iniciales para los ángulos θ y ϕ son; $\theta(0) = 0$ y $\phi(0) = 0$. Si se utiliza la misma propuesta usada por Onsager para el cálculo de las relaciones que llevan su nombre, partiendo siempre de la misma condición inicial se puede simplificar el cálculo de $\alpha(t)$. Para ello, primero se utiliza la relación entre las funciones de densidad de probabilidad condicionales y conjuntas; $P(\mathbf{e}, t; \mathbf{e}_0, t_0) = P(\mathbf{e}, t | \mathbf{e}_0, t_0)P(\mathbf{e}_0, t_0)$. El siguiente paso es promediar con respecto a la condición inicial $\mathbf{e}(t_0)$. Por último, como la condición inicial siempre es aquella que está alineada al eje \hat{z}_{SRI} resulta que $P(\mathbf{e}_0, t_0) = \delta(\mathbf{e}_0 - \hat{z})$. La persistencia direccional resulta:

$$\begin{aligned} \langle \mathbf{e}(t) \mathbf{e}_0(t_0) \rangle &= \int d\mathbf{e}_0 \int d\mathbf{e} \mathbf{e}(t) \mathbf{e}_0(t_0) P(\mathbf{e}, t; \mathbf{e}_0, t_0) \\ &= \int d\mathbf{e}_0 \int d\mathbf{e} \mathbf{e}(t) \mathbf{e}_0(t_0) P(\mathbf{e}, t | \mathbf{e}_0, t_0) P(\mathbf{e}_0, t_0) \\ &= \int d\mathbf{e}_0 \langle \mathbf{e}(t) \rangle_{\mathbf{e}_0} P(\mathbf{e}_0, t_0) \\ &= \int d\mathbf{e}_0 \mathbf{e}_0 \langle \mathbf{e}(t) \rangle_{\mathbf{e}_0} \delta(\mathbf{e}_0 - \hat{z}) \\ &= \langle \cos \theta(t) \rangle \end{aligned} \quad (3.17)$$

Lo interesante es que independientemente de como son las ecuaciones para los ángulos y el tipo de comportamiento que realiza el microorganismo, este observable depende únicamente del ángulo de inclinación θ . Primero, es conveniente analizar cada modo, *Runs* o *Tumbles*, por separado, para luego estudiar la secuencia *Run & Tumble* completa.

3.4.1. Tumbles

Dado que al analizar el comportamiento de la función de densidad de probabilidad para θ se obtuvo que para los tiempos de corte de los *Tumbles* el proceso esta muy cercano a la estacionariedad, se puede proponer:

$$\alpha_T(t) = \bar{\alpha}_T + (1 - \bar{\alpha}_T)e^{-at}. \quad (3.18)$$

El parámetro $\bar{\alpha}_T$ corresponde al valor estacionario de la persistencia direccional:

$$\bar{\alpha}_T = \int_0^\pi d\theta \cos(\theta) Ne^{-\Theta(\theta)}. \quad (3.19)$$

Numéricamente para la cepa **AW405** obtenemos $\bar{\alpha}_T = 0.28$, implicando que un *Tumble* no es suficiente para que la bacteria se reorienté completamente. Es una consecuencia directa del sesgo hacia ángulos menores a $\frac{\pi}{2}$ en la distribución de ángulos.

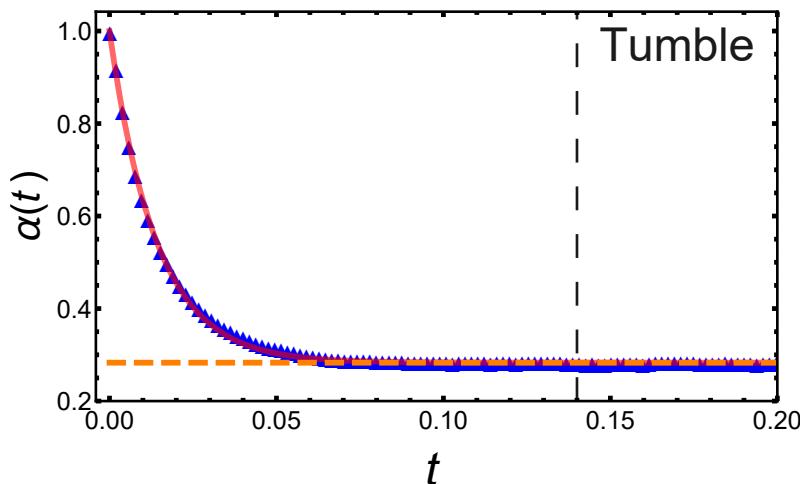


Figura 3-17: Persistencia direccional para *Tumbles*. La recta vertical cortada muestra la duración promedio de los *Tumbles*, la recta horizontal cortada marca el valor estacionario. Los triángulos azules son los resultados obtenidos de las simulaciones numéricas donde la bacteria tiene un *Tumble bias* = 1.0 y la curva en rojo es el ajuste por la ecuación 3.18.

3.4.2. Runs

En el grafico izquierdo de la figura 3-9 para la $P_{ST}(\theta)$ se ve que la función de densidad de probabilidad es la mitad derecha de una distribución normal centrada en cero, conocida como distribución semi-normal. La razón de esto es que el potencial de θ , para los parámetros ajustados, es $\Theta(\theta) = \rho \cos(\theta)$ y θ al tomar valores pequeños permite el desarrollo en serie de Taylor $\cos(\theta) \approx 1 - \frac{\theta^2}{2}$. Por lo tanto, $\Theta(\theta) \approx \rho(1 - \frac{\theta^2}{2})$ el cual es el potencial de un proceso de Ornstein-Uhlenbeck (O.U) definido en $[0, \pi]$. Dado que se conoce la solución al problema de O.U en el intervalo $(-\infty, \infty)$ se puede utilizar esta solución con el método de las imágenes para hallar la solución en el intervalo buscado. Siendo esta solución:

$$W(\theta, t | 0, 0) = \frac{2}{\sqrt{2\pi h(t)}} \sum_{n=-\infty}^{\infty} e^{-\frac{(\theta-2n\pi)^2}{2h(t)}} \quad (3.20)$$

donde la función $h(t) \doteq \frac{1}{\rho}(1 - e^{-2Q_\theta \rho t})$. Conocer la solución de la Fokker-Planck nos permite calcular la persistencia direccional a todo tiempo para los *Runs* vía:

$$\alpha_R(t) = \int_0^\pi d\theta \cos(\theta) W(\theta, t | 0, 0) = e^{-\frac{h(t)}{2}}. \quad (3.21)$$

Esta ampliamente aceptado que las desviaciones angulares durante los *Runs* son un proceso difusivo rotacional el cual satisface un proceso de Weiner, cuya persistencia³ es $\alpha(t) = e^{-2D_R t}$. El coeficiente de difusión rotacional generalmente utilizado es $D_R = 0.062 [\frac{rad^2}{2}]$ [29]. En las mediciones realizadas por Berg & Brown se analizan tanto cepas salvajes como mutantes que tienen distintos *Tumble bias*, por ejemplo la cepa **CheC497** cuyos *Tumbles* tienen una duración de 0.1 s mientras que los *Runs* duran 6.3 s en promedio. Esta cepa mutante cuyos *Runs* duran aproximadamente diez veces

³Para evitar confusiones denominamos la persistencia desde el enfoque de la difusión rotacional como α y con el enfoque de esta tesis como α_R

más, tienen una desviación angular de $33 \pm 15^\circ$. Calculando $\alpha(t = 6.3) \approx 0$, lo cual es consistente con una desviación angular media de 90° y no de 33° . Esto implica que considerar las desviaciones angulares de los *Runs* como un proceso difusivo rotacional solo es válido para las situaciones donde los tiempos medios de duración son pequeños. El valor estacionario de la ecuación 3.20 es $\bar{\alpha}_R = e^{-\frac{1}{2\rho}} = 0.78$ correspondiente a $\langle \theta \rangle = 39^\circ$. Esto permite a la propuesta de esta tesis modelar correctamente las desviaciones angulares para *Runs* cuyos tiempos de duración sean grandes como ocurre en los escenarios quimiotácticos de atractores. Además, vía este cálculo el parámetro ρ se interpreta físicamente como la persistencia estacionaria, siendo $\rho = -(2 \ln \bar{\alpha}_R)^{-1}$. Se concluye que tanto en las rotaciones para los *Runs* o *Tumbles* se deben incluir, además de ruido, términos de deriva lo cual en esta tesis se incluyen mediante los potenciales.

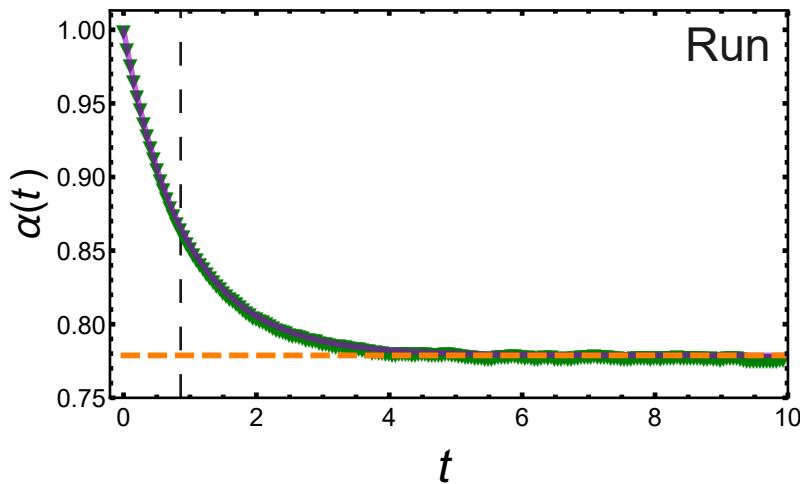


Figura 3-18: Persistencia direccional para *Runs*. La recta vertical cortada muestra la duración promedio de los *Runs*, la recta horizontal cortada marca el valor estacionario de la persistencia. Los triángulos verdes son los resultados obtenidos de la simulaciones numéricas donde la bacteria tiene un *Tumble bias* = 0.0 y la curva en violeta el ajuste por la ecuación 3.21.

3.5. Correlación direccional

Un observable que extiende los resultados de la persistencia direccional es la correlación direccional. Esto es el promedio del producto escalar del versor orientación a tiempos arbitrarios:

$$C(t_1, t_2) \doteq \langle \mathbf{e}(t_1) \cdot \mathbf{e}(t_2) \rangle. \quad (3.22)$$

Este observable en la escala temporal de interés es directamente proporcional a la correlación de la velocidad, como consecuencia del tiempo característico de relajación de la rapidez:

$$\langle \mathbf{v}(t_1) \cdot \mathbf{v}(t_2) \rangle \approx C(t_1, t_2) \langle v(t_1) v(t_2) \rangle \approx C(t_1, t_2) \langle v \rangle^2. \quad (3.23)$$

La correlación de la velocidad permite obtener el MSD vía la relación de Kubo 3.15 y analizar el comportamiento de las trayectorias. Si se utiliza la ecuación 3.1, promediando y usando la independencia entre las variables θ y ϕ se llega a:

$$C(t_1, t_2) = \langle \sin(\theta(t_1)) \sin(\theta(t_2)) \rangle [\langle \cos(\phi(t_1) - \phi(t_2)) \rangle] + \langle \cos(\theta(t_1)) \cos(\theta(t_2)) \rangle. \quad (3.24)$$

Tomando la relación $\langle \cos(\phi(t_1) - \phi(t_2)) \rangle = e^{-Q_\phi|t_1-t_2|}$ [76], si $Q_\phi|t_1 - t_2| \gg 1$, la correlación direccional es:

$$C(t_1, t_2) \approx \langle \cos(\theta(t_1)) \cos(\theta(t_2)) \rangle. \quad (3.25)$$

donde a tiempos largos se simplifica al producto de las persistencias direccionales:

$$C(t_1, t_2) \approx \alpha(t_1) \alpha(t_2). \quad (3.26)$$

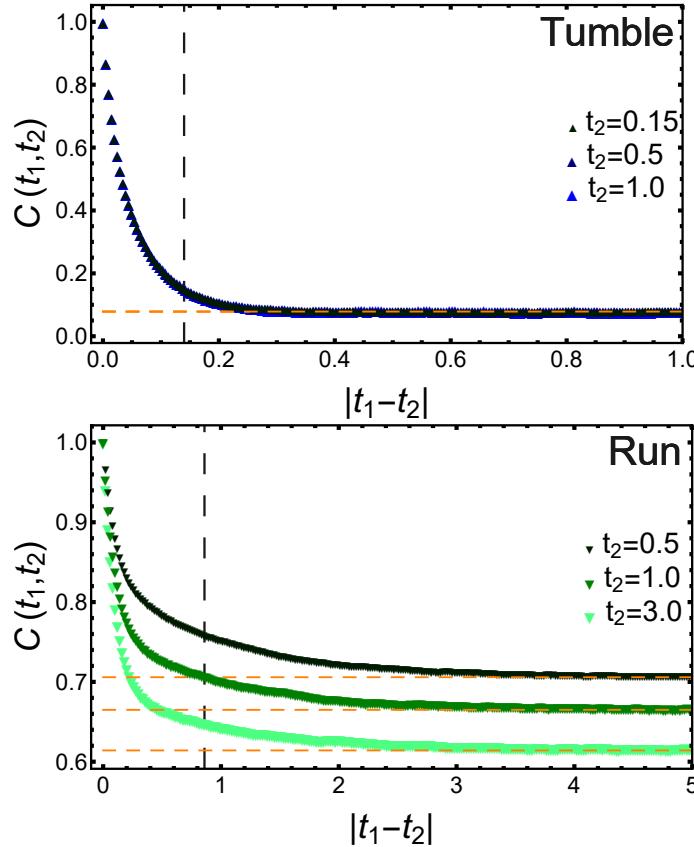


Figura 3-19: Arriba: Correlación direccional para *Tumbles*. La recta vertical cortada muestra la duración promedio de los *Tumbles*, la recta horizontal cortada marca el valor estacionario obtenido con la ecuación 3.26. Los triángulos azules son los resultados obtenidos de la simulaciones numéricas donde la bacteria tiene un *Tumble bias* = 1.0 para distintos tiempos. Abajo: Correlación direccional para *Runs*. La recta vertical cortada muestra la duración promedio de los *Runs*, la recta horizontal cortada marca el valor estacionario obtenido con la ecuación 3.26. Los triángulos verdes son los resultados obtenidos de la simulaciones numéricas donde la bacteria tiene un *Tumble bias* = 0.0 para distintos tiempos.

En la figura 3-19 superior vemos que para los *Tumbles* no hay diferencia en las correlaciones tomadas a distintos tiempos. Sino que solo dependen de la diferencia temporal por lo tanto podemos concluir que el proceso es estacionario en el sentido amplio para tiempos iguales o mayores a la duración de los *Tumbles*. Más aún, el valor de convergencia concuerda con el predicho por la ecuación 3.26 utilizando los cálculos previos de la persistencia. En la parte inferior de la figura 3-19 para los *Runs* se observa lo opuesto, las correlaciones son dependientes de los tiempos a los cuales fueron medidas. Por lo tanto, los *Runs* son no estacionarios para los tiempos de duración de este modo. Este mismo resultado sobre la no estacionariedad se había observado en la figura 3-11. Nuevamente los valores a los cuales converge la correlación

direccional corresponden a aquellos predichos por las ecuaciones 3.21 y 3.26.

Hasta el momento solo se han analizado los observables persistencia y correlación direccional para cada modo por separado sin considerar las transiciones y las bacterias no realizan la secuencia de *Runs & Tumbles*. Sin embargo, analizar cada modo individualmente nos permite describir estos comportamientos y estudiar como se modifican cuando se realiza una secuencia alternada de ellos. Concluyendo, cada comportamiento individual es un movimiento persistente donde la bacteria no logra perder su orientación completamente. En la figura 3-20 a continuación se muestra la correlación direccional para el comportamiento de *Run & Tumble* con un $Tumble_{bias} = 0.15$, es decir sin estímulos para la cepa **AW405**.

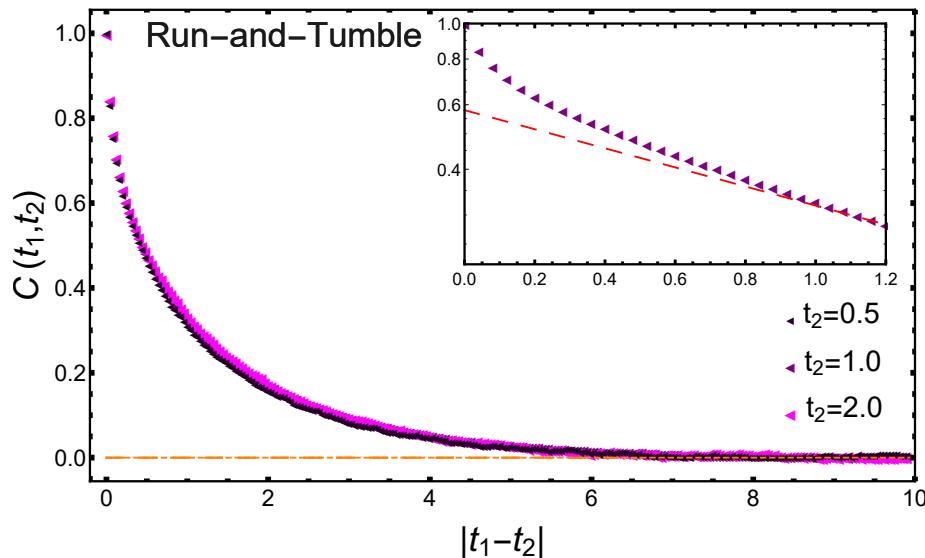


Figura 3-20: Correlación direccional para *Run & Tumble* con un $Tumble_{bias} = 0.15$ para distintos tiempos. Grafico inserto: Mismos resultados en escala semi-logarítmica donde la recta punteada roja marca a que tiempo la correlación direccional decae exponencialmente.

A diferencia de las correlaciones para los modos individuales vemos que para la secuencia alternada de los modos la correlación decae a cero. Esto implica que después de aproximadamente de 5 s, en promedio, *E.coli* realizando el comportamiento de *Run & Tumble* olvida completamente hacia donde se dirigía inicialmente. Le toma en promedio cinco *Tumbles* para encontrar una dirección nueva. Además, se observa en el inset de la figura que a tiempos cortos el decaimiento de la correlación se aleja del comportamiento exponencial. Para los caminantes al azar que realizan

movimientos persistentes cuyas duraciones son exponenciales se han obtenido correlaciones direccionales puramente exponenciales [21]. Sin embargo, la presencia de un comportamiento anómalo se ha encontrado en aquellos caminantes al azar cuyos desplazamientos tienen duraciones que siguen distribuciones de Levy truncadas [21]. Los caminantes de Levy son aquellos que mantienen una dirección de movimiento siguiendo una ley de potencia. Esto resulta en patrones donde se observan muchos desplazamientos cortos con frecuentes reorientaciones con repentinos desplazamientos largos con una sostenida dirección persistente. Estos desplazamientos largos son improbables con distribuciones exponenciales y son lo que hacen que las distribuciones de leyes de potencia tengan colas pesadas y momentos no finitos. Interesantemente, obtenemos que para el comportamiento de *Run & Tumble* la correlación direccional se asemeja más a la de un caminante de Levy truncado que a la de un caminante al azar persistente.

3.6. Desplazamiento cuadrático medio

Como último observable que analizaremos es el tan mencionado Desplazamiento Cuadrático Medio (MSD). Este se calcula a partir de la correlación de la velocidad vía la relación de Kubo 3.15. Como se vio a partir de la relación 3.23 se puede simplificar a:

$$F_{MSD}(t) = \langle [\mathbf{r}(t) - \mathbf{r}(0)]^2 \rangle = \int_0^t dt_1 \int_0^t dt_2 \langle \mathbf{e}(t_1) \cdot \mathbf{e}(t_2) \rangle \langle v \rangle^2. \quad (3.27)$$

Para los modos de *Run* o *Tumble* se puede calcular el comportamiento asintótico a tiempos largos usando los resultados obtenidos para las correlaciones direccionales (ecuación 3.26):

$$F_{MSD}(t) = \langle [\mathbf{r}(t) - \mathbf{r}(0)]^2 \rangle \approx (\langle v \rangle \bar{\alpha} t)^2. \quad (3.28)$$

Con el fin de poder visualizar el MSD para los *Runs* o *Tumbles* en un mismo grafico comparativo, en la figura 3-21 se grafica $\frac{F_{MSD}(t)}{\langle v \rangle^2}$. Las rectas rojas punteadas marcan el

ajuste obtenido con la ecuación 3.28 donde se utilizan los resultados de las persistentes y correlaciones direccionales. Ambos modos son movimientos persistentes lo que resulta en desplazamientos cuadráticos medios balísticos, esto es $\sqrt{[\mathbf{r}(t)]^2} = \langle v \rangle \bar{\alpha} t$. A tiempos largos, la media cuadrática para el desplazamiento es proporcional al tiempo donde se puede definir la rapidez $v_B = \langle v \rangle \bar{\alpha}$.

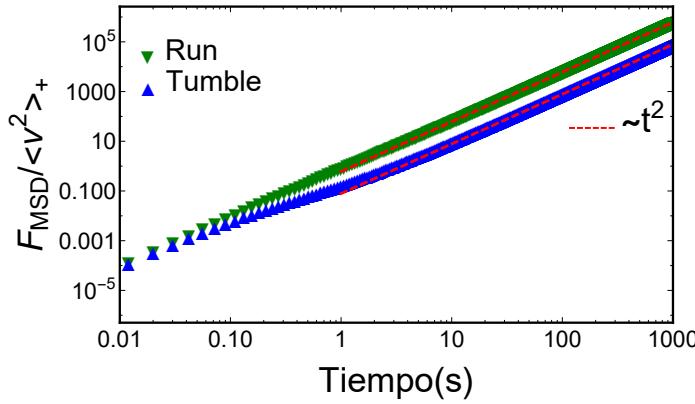


Figura 3-21: MSD para *Run* o *Tumble* con un $Tumble_{bias} = \{0.0, 1.0\}$ respectivamente. Triángulos verdes resultados para *Run* y triángulos azules para *Tumble*. Las rectas rojas cortadas marcan el ajuste de la ecuación 3.28.

El MSD obtenido para el comportamiento de *Run & Tumble* con un $Tumble_{bias} = 0.15$ difiere completamente al de los modos individuales. Como se ve en la figura 3-22 a tiempos largos el desplazamiento cuadrático medio es lineal con el tiempo, esto es un MSD difusivo. Este resultado prueba que el modelo de esta tesis esta en acuerdo con los modelos propuestos en la literatura donde siempre a tiempos largos se han obtenido comportamientos difusivos.

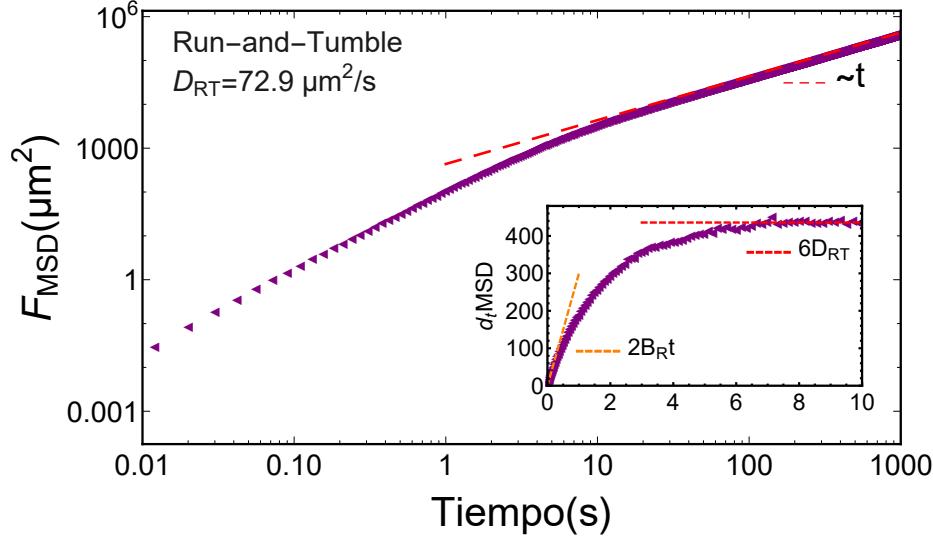


Figura 3-22: MSD para *Run & Tumble* con un $Tumble_{bias} = 0.15$. Triángulos violetas muestran los resultados obtenidos desde la simulación numérica promediando la posición cuadrática de cada bacteria simulada en función del tiempo. La recta cortada naranja marca el comportamiento balístico a tiempos cortos mientras que la recta roja cortada el comportamiento difusivo a tiempos largos. En el grafico inserto se muestra la $\frac{\partial}{\partial t} \langle \vec{r}^2 \rangle (t)$, al llegar al comportamiento constante se ajusta la constante de difusión siendo $m = 6D_{RT}$.

Nuevamente, la recta cortada roja marca el comportamiento a tiempos largos cuya pendiente es $m(t) = 6 D_{RT}$. Como se observa en la figura con esta pendiente podemos obtener el coeficiente de difusión siendo $D_{RT} = 72.9[\frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}]$. Además, se observa un comportamiento balístico a tiempos cortos. Este mismo tipo de comportamiento de balístico a difusivo con un régimen transitorio se ha obtenido para los caminantes al azar persistentes [78]. Mientras que para los caminantes de Levy truncados exponencialmente se observa un MSD anómalo a tiempos cortos y luego un comportamiento difusivo [78]. Si tomamos en cuenta estos resultados en conjunto con los de la correlación direccional vemos que el comportamiento de *Run & Tumble* tiene propiedades mixtas de ambos tipos de caminantes al azar.

3.7. Dispersión de la concentración de bacterias en el medio líquido

Un desplazamiento cuadrático medio lineal en el tiempo sugiere un comportamiento difusivo. En la sección 1.3 de la introducción en la ecuación 1.10 se calculó el MSD

a partir de la ecuación de difusión en $1D$. En este resultado se vio claramente que calculando el MSD se obtiene el valor del coeficiente de difusión. Sin embargo, para la ecuación de advección-difusión isótropa:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = -\nabla \cdot \bar{v}(t)C + D\nabla^2 C, \quad (3.29)$$

si la velocidad de deriva depende únicamente del tiempo, repitiendo el procedimiento⁴ se obtiene un MSD:

$$\langle r^2(t) \rangle = 6Dt + 2 \int_0^t ds \bar{v}(s) \cdot \langle \bar{r}(s) \rangle. \quad (3.30)$$

Si por ejemplo la velocidad de deriva es una función monótona decreciente en el tiempo, como $v(t) \approx \frac{1}{t}$ y además $\langle r(t) \rangle \approx \sqrt{t}$:

$$\langle r^2(t) \rangle = 6Dt + A\sqrt{t} \approx (6D + 2C)t \quad (3.31)$$

donde la constante C es el producto de las constantes de proporcionalidad de $v(t)$ y $\langle r(t) \rangle$. La última aproximación es válida a tiempos largos, donde justamente los procesos se vuelven difusivos. Este comportamiento advectivo-difusivo, un proceso que, además de sufrir un ensanchamiento, posee un corrimiento en el tiempo de su valor medio, y además posee un MSD asintóticamente lineal a tiempos largos. Por lo tanto, ajustar a partir del MSD el coeficiente de difusión podría ser en realidad un coeficiente efectivo ($D_{ef} = 6D + 2C$) y no el verdadero coeficiente de difusión del proceso D . La verificación del comportamiento difusivo o advectivo-difusivo se obtiene calculando la concentración de bacterias en el espacio a distintos tiempos. La concentración de bacterias $c(t)$ se relaciona con la densidad de probabilidad P de encontrar una bacteria en cierto punto a cierto tiempo t usando la relación $c(\bar{r}, t) = NP(\bar{r}, t)$ donde N es el número total de bacterias. A continuación se muestran para

⁴Aplicando el mismo procedimiento de la integración por partes al término advectivo: $\int_{\Gamma} d\Gamma \nabla \cdot [r^2 \bar{v} c] = \int_{\Gamma} d\Gamma r^2 \nabla \cdot \bar{v} c + 2 \int_{\Gamma} d\Gamma c \bar{v} \cdot \bar{r}$, donde Γ es el volumen. Aplicando el Teorema de la divergencia al término izquierdo y notando que no hay flujo de la concentración a través de las paredes en el infinito se obtiene: $-\int_{\Gamma} d\Gamma r^2 \nabla \cdot \bar{v} c = 2 \int_{\Gamma} d\Gamma c \bar{v} \cdot \bar{r} = 2\bar{v} \cdot \langle \bar{r} \rangle$ si la velocidad de deriva solo depende del tiempo.

cada eje del SRG en coordenadas cartesianas la $P(r_i, t)$. En cada eje se ajusta a la función de densidad con una distribución normal de la forma:

$$P(r_i, t) = \frac{1}{\sqrt{4\pi D_{RT}t}} e^{-\frac{-r_i^2}{4\pi D_{RT}t}} \quad (3.32)$$

donde $i = \{x, y, z\}$. Se utilizó el coeficiente de difusión $D_{RT} = 72.9$ obtenido vía el MSD de la sección previa.

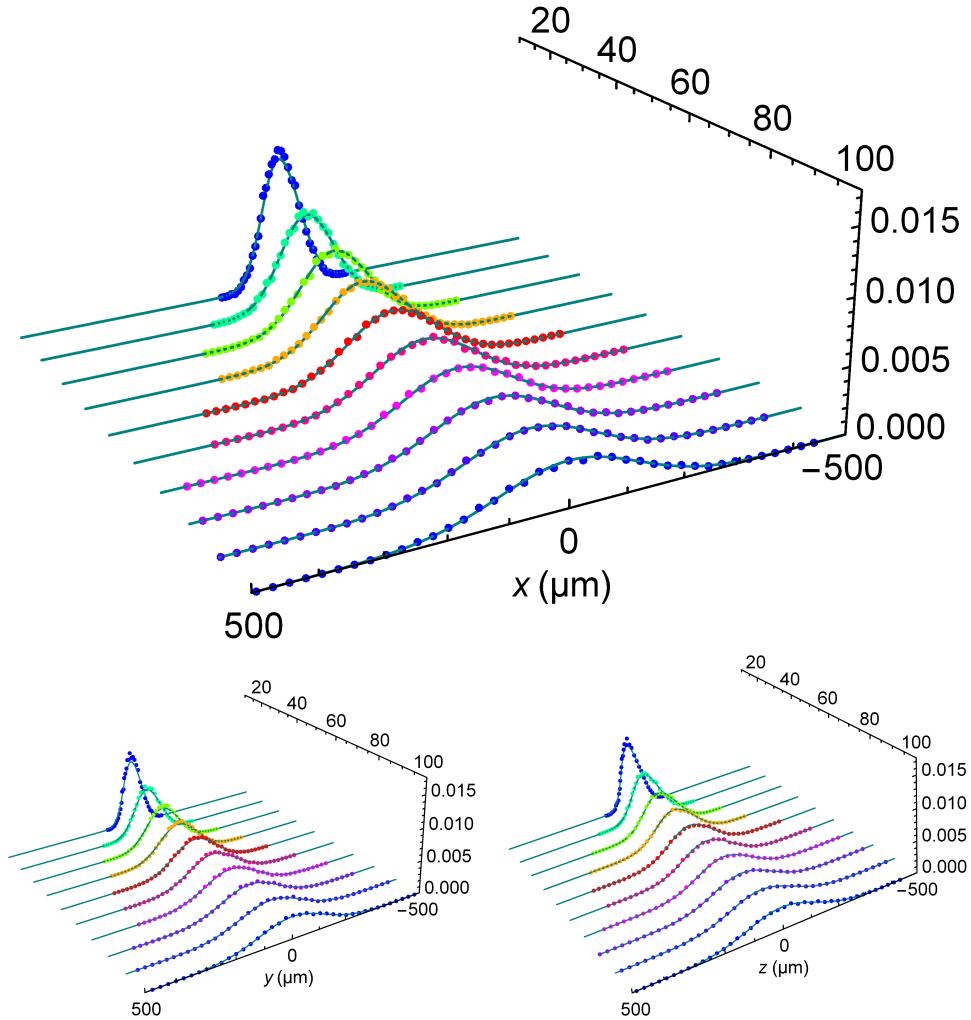


Figura 3-23: Funciones de densidad de probabilidad para cada eje dirección del SRG. En altura se muestra la probabilidad de ocurrencia y en profundidad el tiempo. Los puntos son los resultados obtenidos de las simulaciones numéricas, donde el color marca el avance del tiempo mientras que la linea continua es el ajusta con la ecuación 3.32.

Los resultados de la figura 3-23 verifican que el comportamiento de *Run & Tumble* a tiempos mayores que diez segundos es un comportamiento difusivo isótropo. La

isotropía resulta en que la constante de difusión es la misma en todos los ejes. Es importante remarcar que este resultado que nos permite obtener el comportamiento macroscópico de la concentración de *E.coli* se obtuvo a partir de una propuesta microscópica. El excelente ajuste entre los resultados numéricos y la ecuación 3.32 corrobora que por dos caminos diferentes se obtiene el mismo resultado. De este modo, la ecuación que satisface la concentración de bacterias es:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D_{RT} \nabla^2 C, \quad (3.33)$$

cuya solución se obtiene vía $C(\bar{r}, t) = N_x P(r_x, t)N_y P(r_y, t)N_z P(r_z, t)$, siendo:

$$C(\bar{r}, t) = \frac{N}{\sqrt{(4\pi D_{RT}t)^3}} e^{-\frac{-\bar{r}^2}{4\pi D_{RT}t}}. \quad (3.34)$$

donde $C(\bar{r}, t = 0) = N\delta(\bar{r})$. Es importante analizar que el valor medio de la concentración estará siempre, a todo tiempo, en el punto de inoculación, por esta misma razón es que se analiza el desplazamiento cuadrático medio. Este observable es el que nos da una medida de cuanto se ha desplazado cada microorganismo. Para poner en contexto la constante de difusión de *E.coli* para el *Run & Tumble* en medios líquidos libres de estímulos se muestran en la siguiente tabla constantes de difusiones para moléculas o bacterias no motiles en agua a 25°C.

Molécula u Organismo	Constante de Difusión ($\mu m^2/s$)
O_2	2000
Amino-Ácidos	1000
Proteína 30 kDa	100
tRNA	100
<i>E. coli</i> R&T	72.9
<i>E. coli</i> No Motil	0.1

Cuadro 3.2: Comparación de la constante de difusión

Sorprendentemente, el comportamiento de *Run & Tumble* le permite a *E.coli* aumentar casi tres ordenes de magnitud su constante de difusión con respecto a una cepa no motil. Inclusive la constante de difusión de *E.coli* es cercana a la de

macromoléculas como proteínas o ácidos nucleicos. Como mencionamos al inicio de la sección de este capítulo diversas propuestas han obtenido el comportamiento difusivo del *Run & Tumble*. A continuación se muestra una comparación entre estas propuestas y los resultados obtenidos en esta tesis.

Modelo	<i>Runs</i>	<i>Tumbles</i>	Distribución de T_R	Distribución de T_T	$D (\mu\text{m}^2/\text{s})$
Lovely <i>et al.</i>	Rectos	análogos a C.M.	Exp.	Ins.	87
Taktikos <i>et al.</i>	Rectos	análogos a C.M.	Exp.	Ins.	112
Saragosti <i>et al.</i>	no consideran	P.D.	-	Exp.	no se calcula
Condat <i>et al.</i>	Curvos	análogos a C.M.	Exp.	Ins.	82
Esta tesis	Curvos	P.D. con deriva	multi-Exp.	cuasi-mono-Exp.	72.9

Cuadro 3.3: Comparación entre el modelo propuesto y los enfoques por otros autores. C.M.: colisiones moleculares, Exp. : exponencial, Ins: instantáneo., P.D.: proceso difusivo.

Cada una de las distintas propuestas posee diferentes tipos de simplificaciones y enfoques que resultan en constantes de difusión aproximadamente dentro del mismo orden de magnitud. El efecto de incorporar los *Runs* como trayectorias curvas disminuye el coeficiente de difusión e incluir los *Tumbles* como no instantáneos tiene el mismo efecto. Es por este motivo que el valor obtenido en esta tesis es el valor más pequeño obtenido hasta el momento. En el capítulo siguiente se estudiara como cambia el comportamiento de *Run & Tumble* ante distintos escenarios quimiotácticos utilizando el sistema de señalización descripto en el capítulo previo.

3.8. Discusión

En este capítulo se simuló el comportamiento de *Run & Tumble* en tres dimensiones mediante ecuaciones de Langevin en un sistema de referencia intrínseco. Dado que para ciertas condiciones quimiotácticas los *Tumbles* no pueden ser despreciados con respecto a los *Runs*, se tomaron a los *Tumbles* como no instantáneos. Cada modo de movimiento por separado resulta en un comportamiento persistente con un desplazamiento cuadrático medio balístico. Al interrumpir cada modo, en una secuencia alternada entre estos modos, emerge un desplazamiento cuadrático medio difusivo. Resultando congruente con las demás propuestas descriptas donde sí son instantáneos

los *Tumbles*. Caracterizando los vuelos de Levy y caminantes al azar persistentes vía la correlación direccional y el MSD se encontró que el *Run & Tumble* comparte propiedades mixtas de ambos tipos de dispersión. Además, se probó que al iniciar con condiciones isótropas en la dirección de desplazamiento este comportamiento de locomoción que efectúa *E.coli* en ausencia de estímulos no tiene preferencia por ninguna dirección particular. Finalmente, se pudo obtener a partir de la simulación de trayectorias individuales la ecuación de difusión, resultado que pareciera ser trivial pero no había sido corroborado por otras propuestas. Más aún, es un resultado que prueba el vínculo entre el comportamiento microscópico de *Run & Tumble* y la ecuación para la evolución de la concentración de bacterias en la escala macroscópica. En el siguiente capítulo se buscará encontrar relaciones entre el coeficiente macroscópico (constante de difusión) y variables microscópicas (e.g. $Tumble_{bias}$) similar a la relación de Einstein. Dado que los *Tumbles* no son instantáneos permite extender este modelo a incluir interacciones entre individuos o con el mismo fluido en el cual se desplazan. Dado que las transiciones en el juego de parámetros que determina cada modo de locomoción están controlados por el modelo del capítulo anterior se puede estudiar como se modifica la dispersión de *E.coli* ante estímulos, otro objetivo del siguiente capítulo.

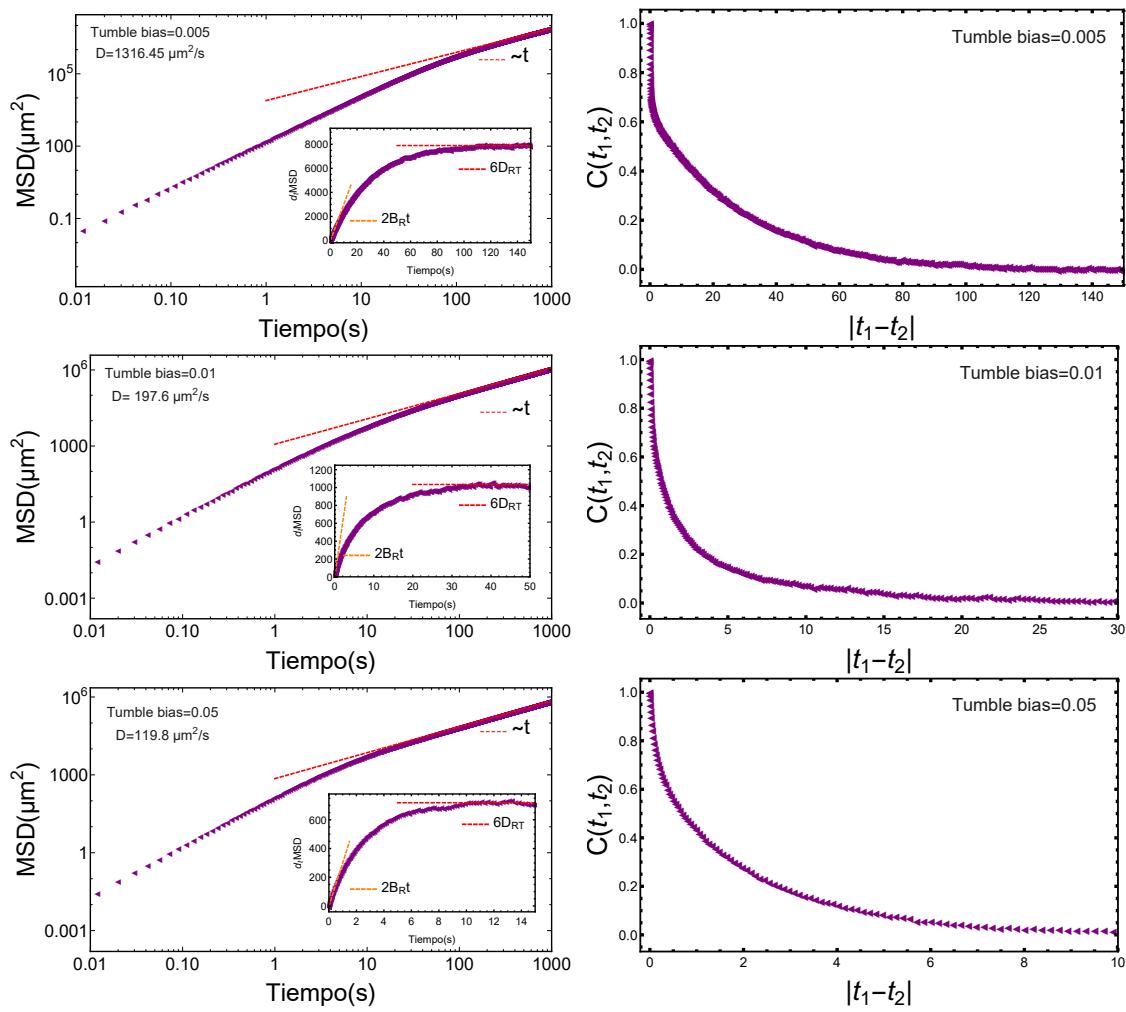
Capítulo 4

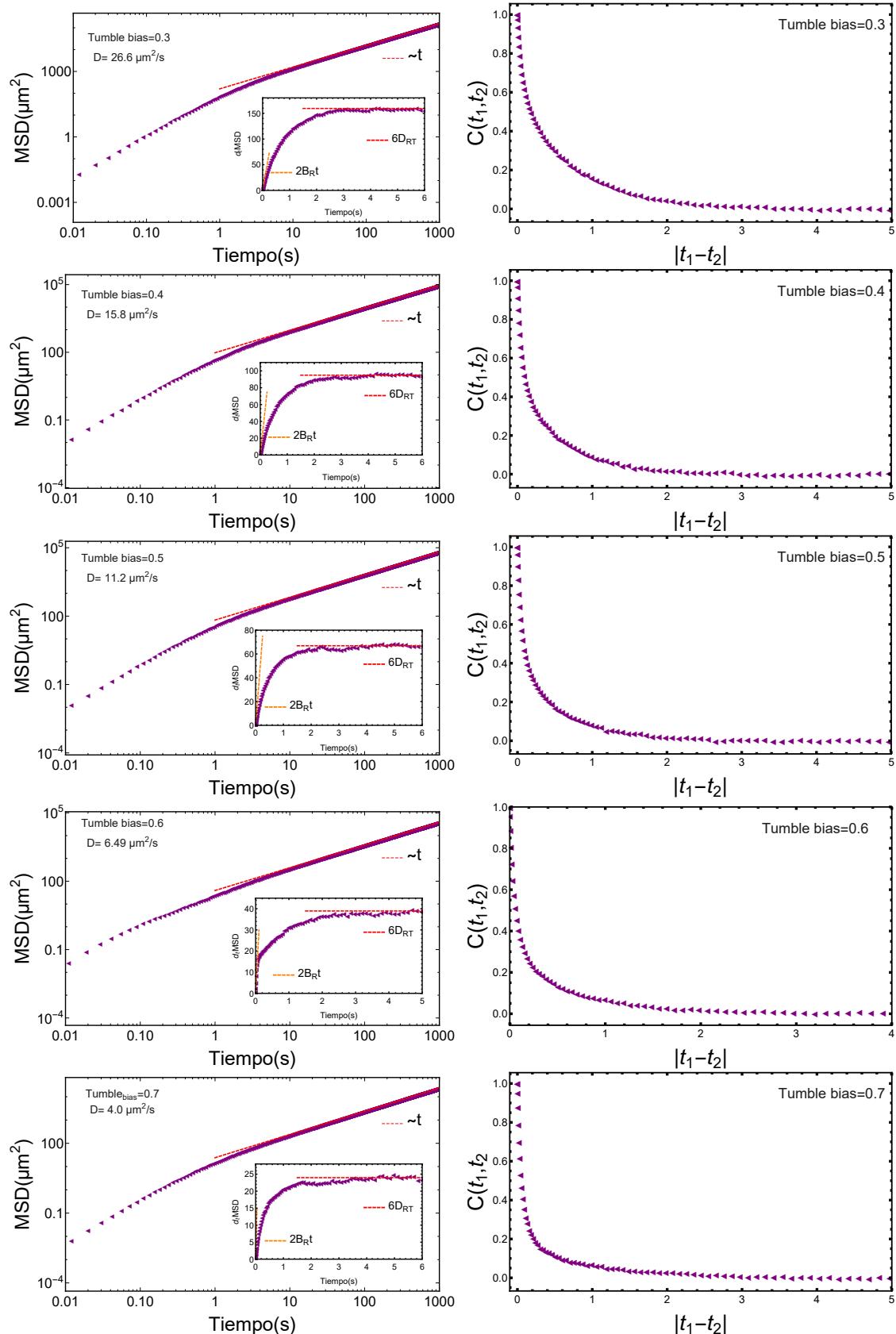
Quimiotaxis

En este capítulo se analizará como se modifica el comportamiento de *Run & Tumble* en la presencia de químicos y como esto impacta en su dispersión en los medios líquidos. Para ello se combinaran los modelos presentados en los dos capítulos anteriores, lo que permite estudiar la quimiotaxis a diferentes escalas espaciales en simultáneo. Se considerarán distintos escenarios quimiotácticos. Primero, se estudiará la quimiotaxis ante concentraciones constantes e isotrópicas de algún repelente o atractor. Esta situación poco realista será de ayuda para comprender los escenarios más complejos. Luego, se analizará el efecto de un gradiente químico en la motilidad de *E. coli* estudiando en simultáneo los procesos que ocurren en el interior de la bacteria en escala nanoscópica y los observables estadísticos que caracterizan la dispersión macroscópica de los microorganismos. Por otro lado, se simularán escenarios donde la concentración de los químicos varía temporalmente y no espacialmente. Los ambientes donde habitan las bacterias flageladas que utilizan la motilidad para incrementar su capacidad de incorporar nutrientes o migrar hacia microambientes más favorables son altamente variables espacial como temporalmente. Dado la complejidad de tales ambientes, se ha optado en esta tesis por estudiar las variaciones temporales y espaciales por separado como un primer enfoque. Por último, se simularán escenarios con distribuciones inhomogéneas de químicos con los cuales indagaremos porque ciertos químicos generan un aumento de la concentración (attractores) y otros generan el efecto opuesto (repelentes).

4.1. Escenario isótropo y constante

Una pregunta que surge naturalmente es si para los diferentes $Tumbles_{bias}$ el comportamiento de *Run & Tumble* sigue siendo difusivo y, si este es el caso, como se modifica la constante de difusión en función del $Tumbles_{bias}$. Para responder esta pregunta se realizaron las mismas simulaciones que en el capítulo previo pero se modificó el parámetro μ de la concentración estacionaria de CheY-P. Se determinó el desplazamiento cuadrático medio (MSD) y la correlación direccional para diferentes valores del $Tumbles_{bias}$ sin tener en cuenta la adaptación vía metilación (véase figura 4-1).





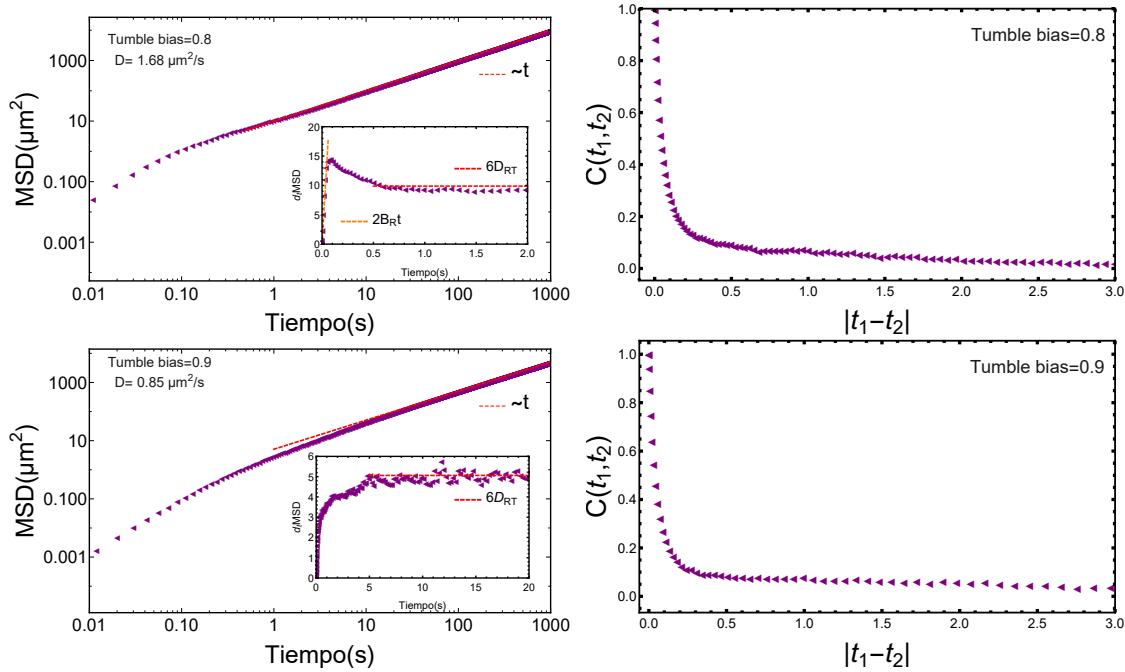


Figura 4-1: Izquierda: MSD para diferentes valores de $Tumble_{bias}$. Derecha Correlación direccional para los diferentes valores de $Tumble_{bias}$.

Como se muestra en los gráficos de la figura 4-1 se observa que para todos los $Tumble_{bias}$ el comportamiento obtenido es difusivo después de cierto tiempo. Además, vemos que el comportamiento funcional del MSD sigue siendo el mismo que para el escenario libre de estímulos. Esto es, inicialmente un comportamiento balístico y finalmente un comportamiento lineal separados por un régimen transitorio. La principal diferencia entre los distintos casos es el tiempo en que la bacteria tarda en tener un comportamiento difusivo y el tiempo al cual la correlación direccional tiende a cero. Estos tiempos tienen aproximadamente la misma magnitud para cada $Tumble_{bias}$. El MSD obtenido de la trayectoria de una bacteria alcanza el comportamiento difusivo cuando ha realizado suficientes *Tumbles* tal que ha perdió por completo la dirección original que tenía. Estos resultados nos dan dos respuestas diferentes. Al no tener en cuenta la metilación obtenemos una cota superior para la constante de difusión para la cepa **AW405** en escenarios quimiotácticos isótropos. Por otro lado, obtenemos la constante de difusión para otras cepas cuyos $Tumble_{bias}$ no estimulado sean diferentes al de la cepa **AW405** (esto es un $Tumble_{bias} \neq 0.15$).

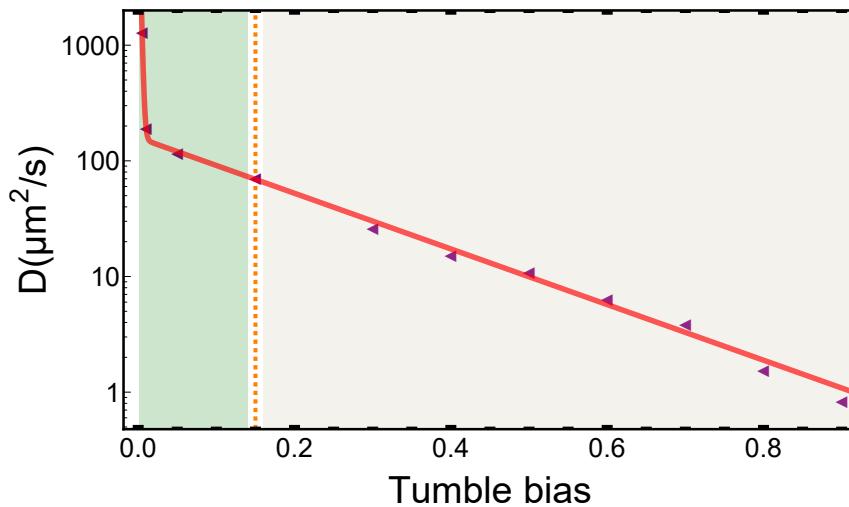


Figura 4-2: Constante de difusión en función del $Tumble_{bias}$. A partir de los ajustes de la figura 4-1 se obtuvo cada triángulo violeta. La recta cortada naranja marca el $Tumble_{bias}$ para las situaciones libres de estímulos de la cepa **AW405**. En verde a la izquierda de esta recta naranja se muestran los escenarios para atractores mientras que a la derecha en gris los escenarios para repelentes. La curva en rojo es un ajuste vía una doble exponencial: $D(x) = \alpha_1 e^{-\beta_1 x} + \alpha_2 e^{-\beta_2 x}$ con $x = Tumble_{bias}$. Donde $\alpha_1 = 28437 \mu\text{m}^2/\text{s}$, $\alpha_2 = 158.7 \mu\text{m}^2/\text{s}$, $\beta_1 = 639.5$ y $\beta_2 = 5.5$.

Estos resultados se resumen en la figura 4-2 donde cada triángulo violeta es el coeficiente de difusión obtenido de los MSD graficados en la figura 4-1. El valor del $Tumble_{bias}$ no estimulado para la cepa **AW405** se muestra con la recta vertical punteada naranja. Hacia la izquierda de esta recta con fondo verde se encuentran los escenarios quimiotácticos de atractores donde se disminuye la probabilidad de ocurrencia de los *Tumbles*. Los distintos modelos presentados en el capítulo anterior, donde se toman los *Tumbles* como instantáneos, pueden ser aplicados en este contexto. Por otro lado, hacia la derecha de la recta, con fondo gris, se encuentran los escenarios quimiotácticos de repelentes. Las duraciones de los *Tumbles* se vuelven en magnitud similares o mayores que los *Runs* y no pueden ser despreciados. Lo más llamativo en este resultado es el rango que puede tomar la constante de difusión, esto es cuatro ordenes de magnitud. Esto implica que *E.coli* tiene una gran plasticidad en su comportamiento difusivo. Por ejemplo, una célula no motil se dispersa en un medio líquido al igual que un coloide. En el capítulo anterior se probó que, luego de cierto el tiempo, el *Run & Tumble* satisface la misma ecuación de difusión que los coloides. La respuesta a porque la evolución, en esta especie, ha desarrollado un mecanismo de dispersión igual al que ocurre por colisiones moleculares podría atribuirse

al amplio rango que puede tomar su constante de difusión. Esto es, una célula no motil tendrá, a cierta temperatura, una constante de difusión invariante que depende de su geometría y sus dimensiones. El comportamiento de *Run & Tumble* le permite a una *E.coli* la capacidad de difundir como una célula no motil ($D \approx 1 \mu\text{m}^2/\text{s}$) o como una molécula pequeña ($D \approx 1000 \mu\text{m}^2/\text{s}$). Este escenario quimiotáctico no es un escenario realista ya que difícilmente un microambiente pueda ser constante e isótropo por mucho tiempo, sin embargo muestra la potencialidad del comportamiento del *Run & Tumble*. Un resultado poco intuitivo es que la constante de difusión en medios repelentes es menor que en medios atractores. Esto implica que la dispersión es menor en los repelentes lo cual uno esperaría lo contrario ya que es un ambiente no agradable para la bacteria. Este resultado tendrá sentido en la última sección 4.4. Al mismo tiempo, la correlación direccional nos muestra que al ir incrementando el $Tumble_{bias}$ hacia uno, la bacteria pierde su orientación cada vez más rápido. En un ambiente espacialmente anisótropo esto permite a la bacteria encontrar nuevas direcciones más favorables en menor tiempo. Por otro lado, cuando la bacteria esta en presencia de un atractor permanecerá más tiempo en esa dirección disminuyendo la probabilidad de ocurrencia de los *Tumble*, como muestran las correlaciones direccionales para $Tumble_{bias}$ menores al valor correspondiente al escenario no estimulado. Este “optimismo” de *E.coli* ante microambientes favorables podría tener una explicación hidrodinámica. Como se mostró al final de la introducción, recientemente, se ha podido obtener el campo de velocidad para el fluido cuando *E.coli* realiza *Runs* [41]. Lo llamativo es que las lineas de flujo se cierran sobre el cuerpo de la bacteria, es decir al nadar persistentemente en cierta dirección maximiza el flujo de fluido sobre el cuerpo de la bacteria. Esto podría tener un impacto en el número de Sherwood¹. Se sugiere que el disminuir la probabilidad de ocurrencia de los *Tumble* no sea únicamente “optimismo” sino que además podria generar un incremento en la captación de nutrientes. Esta hipótesis ha sido descartada décadas atras [79], sin embargo el principal argumento para descartarla fue el considerar un flujo laminar alrededor de

¹ El número de Sherwood se introdujo en la sección 1.5 de la Introducción. Este número se define como el cociente entre la captación de nutrientes por flujo y la captación de nutrientes únicamente por difusión

una célula esférica. Esta suposición ha sido refutada por la medición del campo de velocidad en el reciente trabajo de Drescher et.al [41]. La curva roja en la figura 4-2 es un ajuste vía dos funciones exponenciales utilizada como guía para poder calcular la constante de difusión para cualquier $Tumbles_{bias}$, siendo éste una fuente de referencia de la constante de difusión para otras cepas. Los valores del ajuste se muestran en la leyenda de la figura. Por último, se analizó como cambia el MSD para un $Tumbles_{bias}$ particular tomando en cuenta la adaptación.

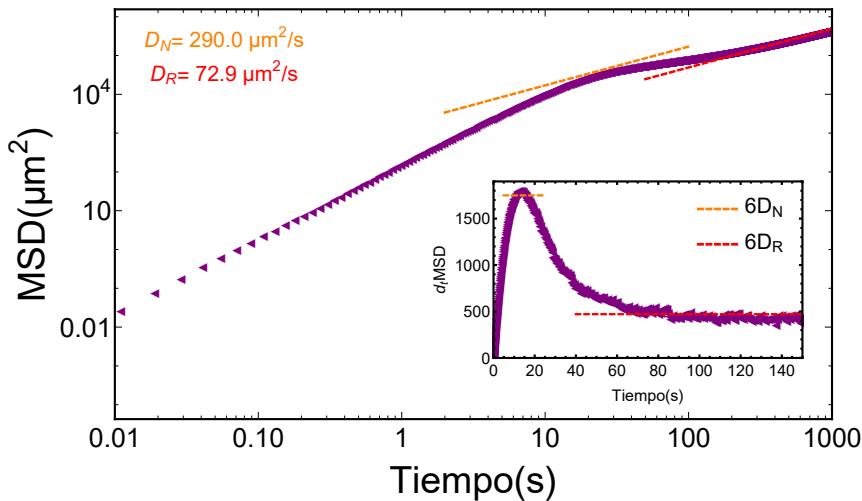


Figura 4-3: Desplazamiento medio cuadrático incorporando la adaptación. En naranja se muestra el régimen lineal previa a la adaptación ($6D_N$) mientras que en rojo el comportamiento difusivo adaptado retornando al valor previo al estímulo obtenido en el capítulo anterior ($6D_R$). En el inset se muestra la derivada temporal del MSD.

En la figura 4-3 se observa lo que ocurre al incluir la adaptación vía el sistema de metilación. Para un $Tumble_{bias} \approx 0.0085$ el tiempo que tarda el MSD en convertirse en difusivo es similar al tiempo en el cual empiezan a adaptarse los MCPs. Esto produce que haya un comportamiento difusivo de breve duración, con constante $D_N = 290.0 \mu m^2 s^{-1}$, y luego un transitorio que finaliza en otro régimen difusivo, cuya constante de difusión ($D_R = 72.9 \mu m^2 s^{-1}$) es la misma que para el caso no estimulado, como era de esperarse.

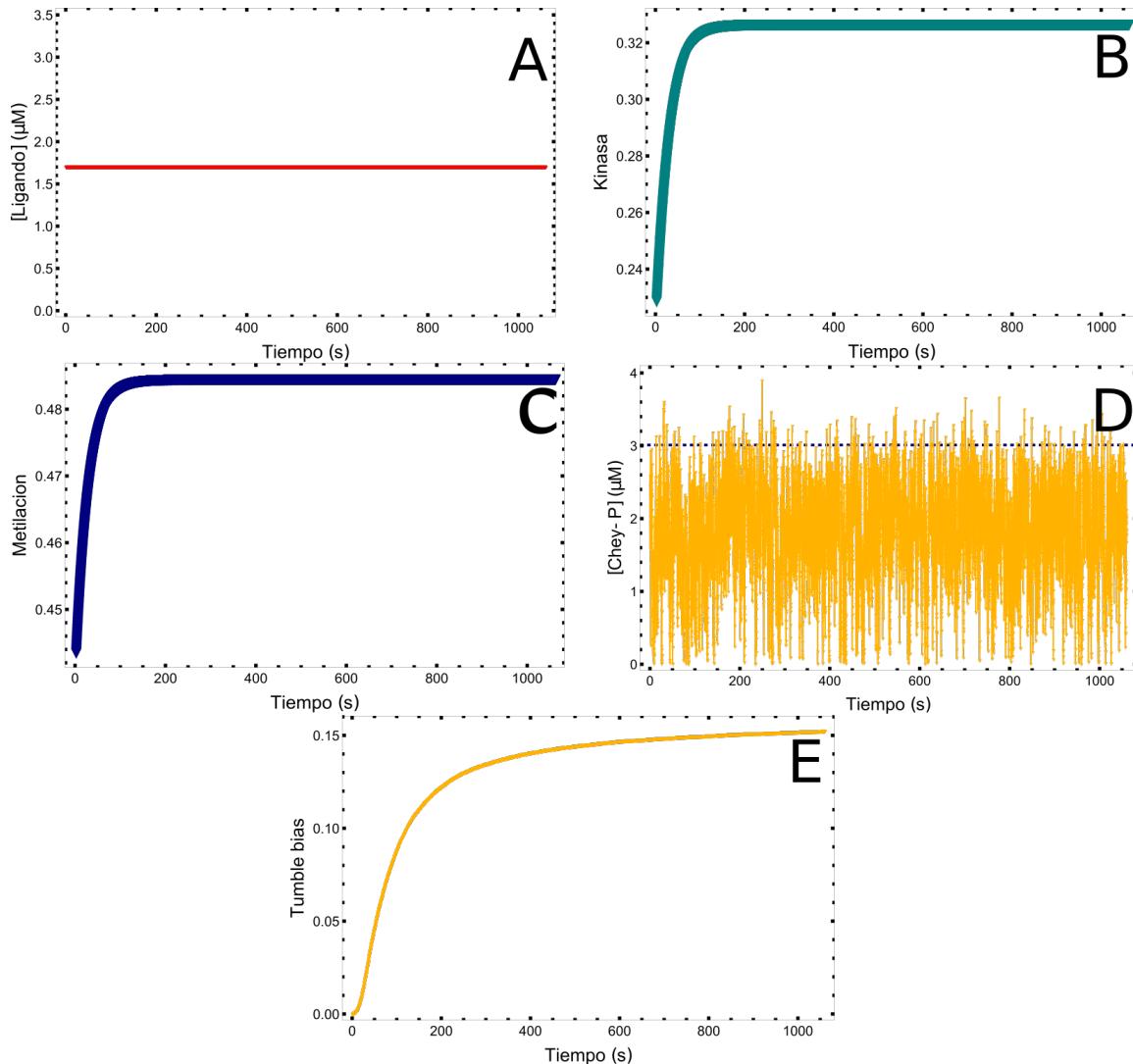


Figura 4-4: A: Concentración constante de aspartato. B: actividad de la kinasa CheA. C: Nivel de metilación en función del tiempo. D: [CheY-P] en el entorno de un flagelo. La recta cortada horizontal marca el umbral critico para la transición de *CW* a *CCW*. E: Efecto de la adaptación en el *Tumble_{bias}* en función del tiempo.

En la figura 4-4 se muestra la concentración de aspartato, actividad de la kinasa, el nivel de metilación, la [CheY-P] en el entorno de los flagelos y el *Tumble_{bias}*. Estos resultados muestran el tiempo característico que le lleva al sistema de señalización interno, vía la adaptación, volver a los valores sin estimular. Como se ve aproximadamente a los 100 s ya todos los valores han retorna prácticamente a sus valores sin estimular. El primer régimen difusivo se obtiene después de los primeros 10 s de exposición al aspartato. En este intervalo temporal la adaptación aun no ha modificado la actividad de la kinasa vía la metilación entonces se puede observar una constante

de difusión similar que en las simulaciones sin la adaptación (ver figura 4-1). En el gráfico inserto de la figura 4-3 se ve que el segundo régimen difusivo, donde el MSD es constante, se obtiene a partir de los 100s. Esto implica que los tiempos de adaptación a escala nanoscópica del sistema de señalización son comparables con los tiempos de adaptación en los regímenes difusivo del MSD. En el grafico E de la figura 4-4 nuevamente se observa un retraso en el tiempo que demora el $Tumble_{bias}$ en volver al valor sin estimular. Dado que el tiempo que tarda en llegar el MSD al régimen difusivo disminuye al ir incrementando el $Tumble_{bias}$ hacia 1.0. Para todos los $Tumble_{bias}$ mayores a este valor, es decir todos los puntos a la derecha del segundo triangulo de la figura 4-2, el MSD tendrá un régimen difusivo, previo a la adaptación, cuya constante de difusión es la obtenida en la figura 4-1. Recordamos que en el primer capítulo se realizó un experimento similar donde se fue aumentando la concentración molar estable μ de CheY-P. Dicho experimento reprodujo satisfactoriamente la hipersensibilidad de los motores flagelares ante la [Chey-P] y se encontró el mismo comportamiento para el $Tumble_{bias}$. La figura 4-2 es el mismo experimento donde ahora se esta evaluando la constante de difusión. Por lo tanto, pequeños cambios en la concentración de [Chey-P] generan grandes cambios en la dispersión de la bacteria. Aunque esta gran plasticidad de la dispersión tiene una breve duración temporal veremos en la sección 4.4 que es fundamental en ambientes heterogéneos. Se concluye que la cepa **AW405** puede modificar su constante de difusión por lo menos en un rango de tres ordenes de magnitud. Además, se pudo encontrar una relación no lineal entre el parámetro microscópico $Tumble_{bias}$ con la constante de difusión la cual caracteriza la dispersión macroscópicamente.

4.2. Gradientes constantes

Hasta el momento se ha visto que en ambientes isotrópicos el comportamiento de *Run & Tumble* es difusivo, donde no hay propagación de la concentración de bacterias. Es decir solo hay homogenización, caso contrario ocurre experimentalmente cuando se inocula a esta especie ante gradientes químicos. En estos escenarios se observa una migración de la concentración de bacterias a favor del gradiente químico si este es un atractor [80]. La invasión de una población hacia ambientes no poblados es un fenómeno que ocurre a toda escala espacial en la biología [21]. Se ha estudiado estos fenómenos mediante ecuaciones de reacción-difusión como por ejemplo la ecuación de Fisher (o Ecuación de Kolmogorov-Petrovsky-Piscounov):

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} = r\rho(1 - \rho) + D\nabla^2\rho. \quad (4.1)$$

En esta ecuación para la densidad de individuos ρ , tiene un término de reacción, que es un crecimiento logístico y un término de dispersión difusivo. Lo interesante es que el término de reacción genera un frente de invasión como se ve en la figura 4-5.

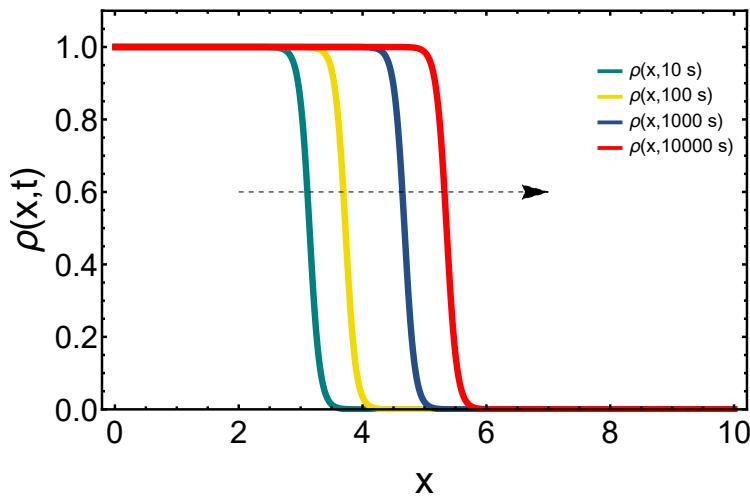


Figura 4-5: Frente de propagación 1-D correspondiente a la ecuación de Fisher. Nótese que en este caso hay una fuente infinita de organismos.

En este caso se ve como hay una transición de una región cuya densidad es uno hacia una región cuya densidad es cero. Se puede calcular como avanza el frente de propagación calculando la velocidad del frente. Esta velocidad nos determina que tan

rápido la población invade el ambiente.

Otro tipo de invasión biológica puede ocurrir cuando la población obedece una ecuación de advección-difusión:

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} = \bar{v} \cdot \nabla \rho + D \nabla^2 \rho. \quad (4.2)$$

En este caso la velocidad de deriva desplaza toda la población como se ve en la figura 4-6 mientras que al mismo tiempo la difusión homogeneiza la población sobre el territorio.

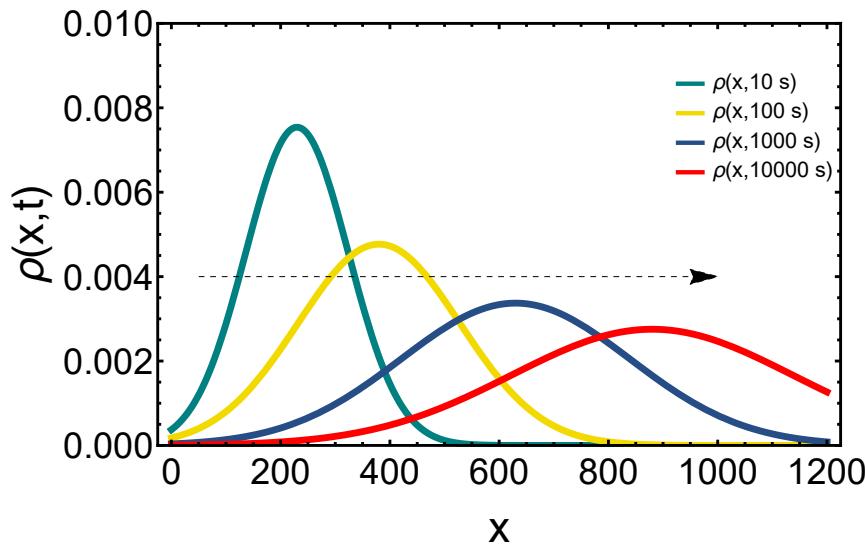


Figura 4-6: Avance de una población que obedece un proceso advectivo-difusivo en 1-D. A diferencia del caso de la figura 4-5, en esta situación la cantidad de individuos se conserva.

Para estudiar el efecto en la dispersión de *E.coli* en un medio anisótropo se simuló un gradiente de aspartato constante en la dirección z del SRG (figura 4-7). Experimentalmente estos gradientes se realizan gracias a las técnicas de microfluídica en conjunto de las técnicas de litografía. Se simuló una concentración de aspartato $L(z) = mz$, siendo el gradiente $m = 0.875 \frac{\mu M}{\mu m}$, tal como se utilizó experimentalmente en [81].

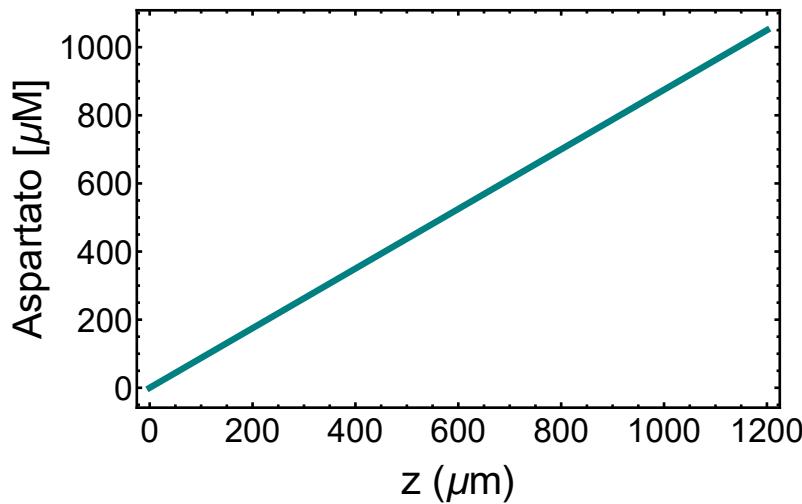


Figura 4-7: Gradiente lineal simulado en la dirección z del SRG.

En nuestro enfoque estamos simulando lo que ocurre a nivel nanoscópico en el entorno del flagelo, a nivel microscópico en los desplazamientos del centro de masa de cada bacteria, y a nivel macroscópico en los cambios en la concentración de bacterias en el medio líquido. Se busca visualizar los cambios que ocurren a escala nanoscópica en los observables macroscópicos, ya que estos últimos son los más sencillos de medir experimentalmente. Para ello, empezaremos desde la mayor escala espacial hacia la menor. En las figuras 4-8 y 4-9 se muestran las funciones de densidad de probabilidad para la posición para el eje x (perpendicular al gradiente) y el eje z (paralelo al gradiente). Para una mejor visualización se eligió mostrar desde el tiempo inicial hasta los 330 s en la figura 4-8 y desde 330 s hasta 1000 s en la figura 4-9.

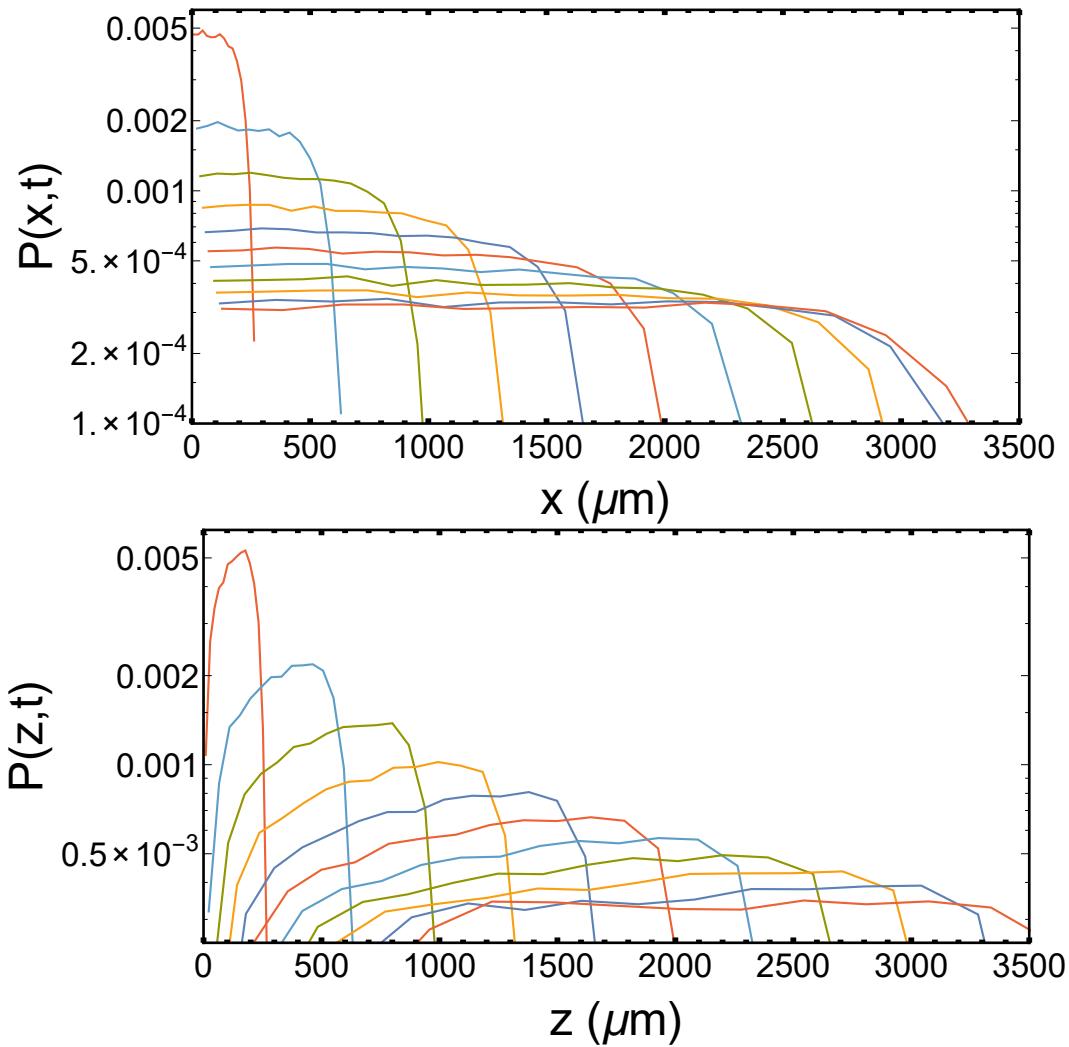


Figura 4-8: Arriba: Función de densidad de probabilidad para la posición para un eje perpendicular al gradiente lineal hasta los 330 s. La curva inicial roja corresponde al tiempo 10 s y luego las demás curvas fueron obtenidas cada 30 s. Abajo: Función de densidad de probabilidad para la posición para el eje paralelo al gradiente lineal hasta los 330 s. La curva inicial roja corresponde al tiempo 10 s y luego las demás curvas fueron obtenidas cada 30 s.

Dado que en los ejes x e y se obtuvo el mismo comportamiento solo se muestran los resultados para el primer eje, en el primer grafico de la figura 4-7 se observa un avance similar al de un frente de propagación. La única diferencia es que la función de densidad de probabilidad va disminuyendo al irse propagando el frente dado que el número de bacterias es constante. Por otro lado, en la dirección z , sobre la cual esta el gradiente químico, vemos funciones de densidad viajeras; cuyo valor medio y ancho van aumentando con el tiempo similar al comportamiento advectivo-difusivo. Después de aproximadamente 300 s se ve que no hay más propagación de los frentes

de onda en los ejes x e y , mientras que en el eje z continua un avance lento de la función de densidad.

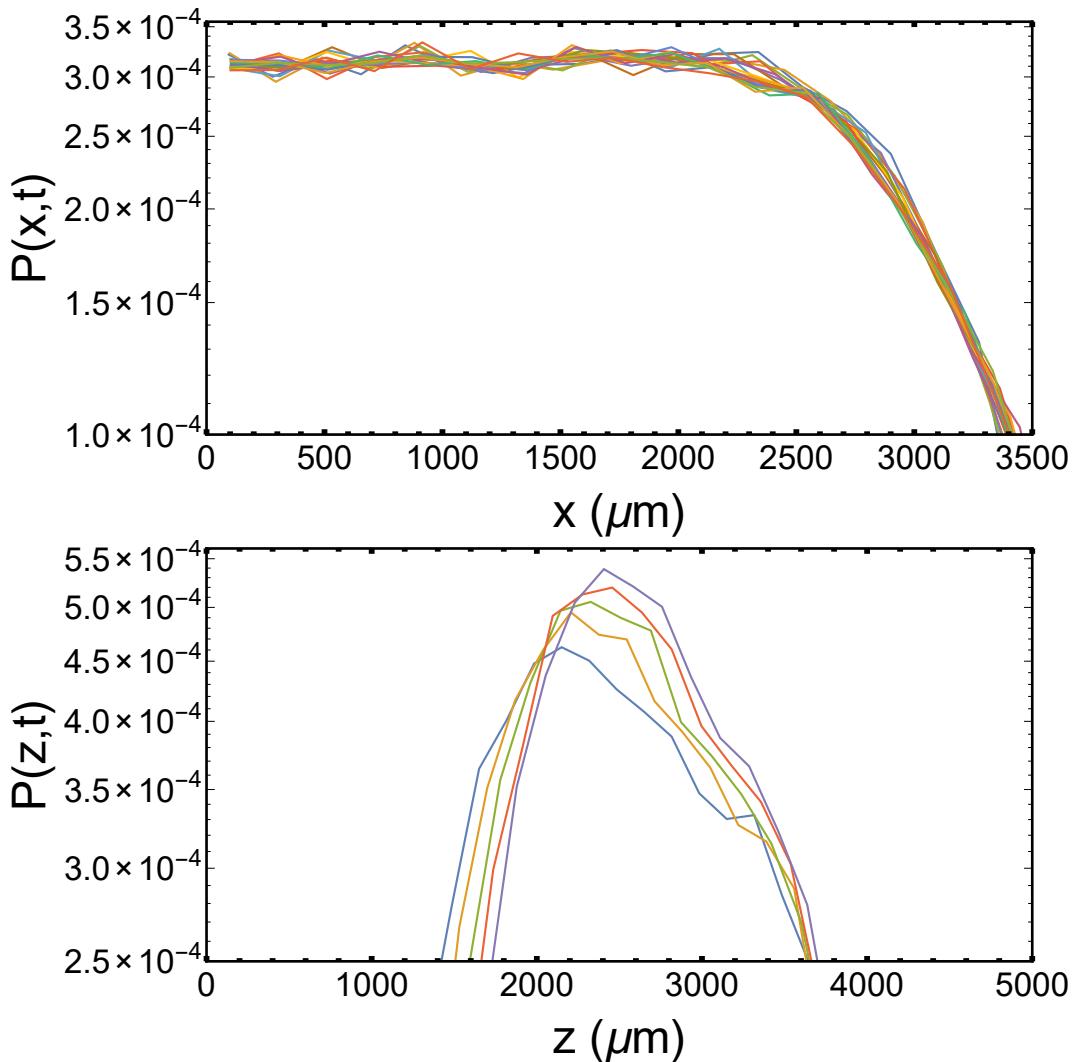


Figura 4-9: Arriba: Función de densidad de probabilidad para la posición para un eje perpendicular al gradiente lineal desde 330 s hasta 1000 s. La curva inicial corresponde al tiempo 330 s y luego las demás curvas fueron obtenidas cada 30 s. Abajo: Función de densidad de probabilidad para la posición para el eje paralelo al gradiente lineal desde 430 s hasta 1000 s. La curva inicial azul corresponde al tiempo 430 s y luego las demás curvas fueron obtenidas cada 100 s.

Si analizamos como varían en función del tiempo las variables del sistema de señalización introducidas en el capítulo 2, se pueden buscar correlaciones entre los cambios en los observables microscópicos y nanoscópicos. En la figura 4-10 se ve que, para una bacteria elegida al azar, en los primeros 200 s la actividad de la kinasa es nula. Esto implica que las fluctuaciones en la concentración de CheY-P no son suficientes para generar una transición. Por lo tanto, esto producirá que la bacteria

efectuó un *Run* hasta que el nivel de metilación sea lo suficientemente alto para insensibilizar a los receptores y elevar la actividad de la kinasa. Esta adaptación ocurre entre los 200 y 300 s donde ocurre recién el primer *Tumble* (ver gráficos B y C de la figura 4-10).

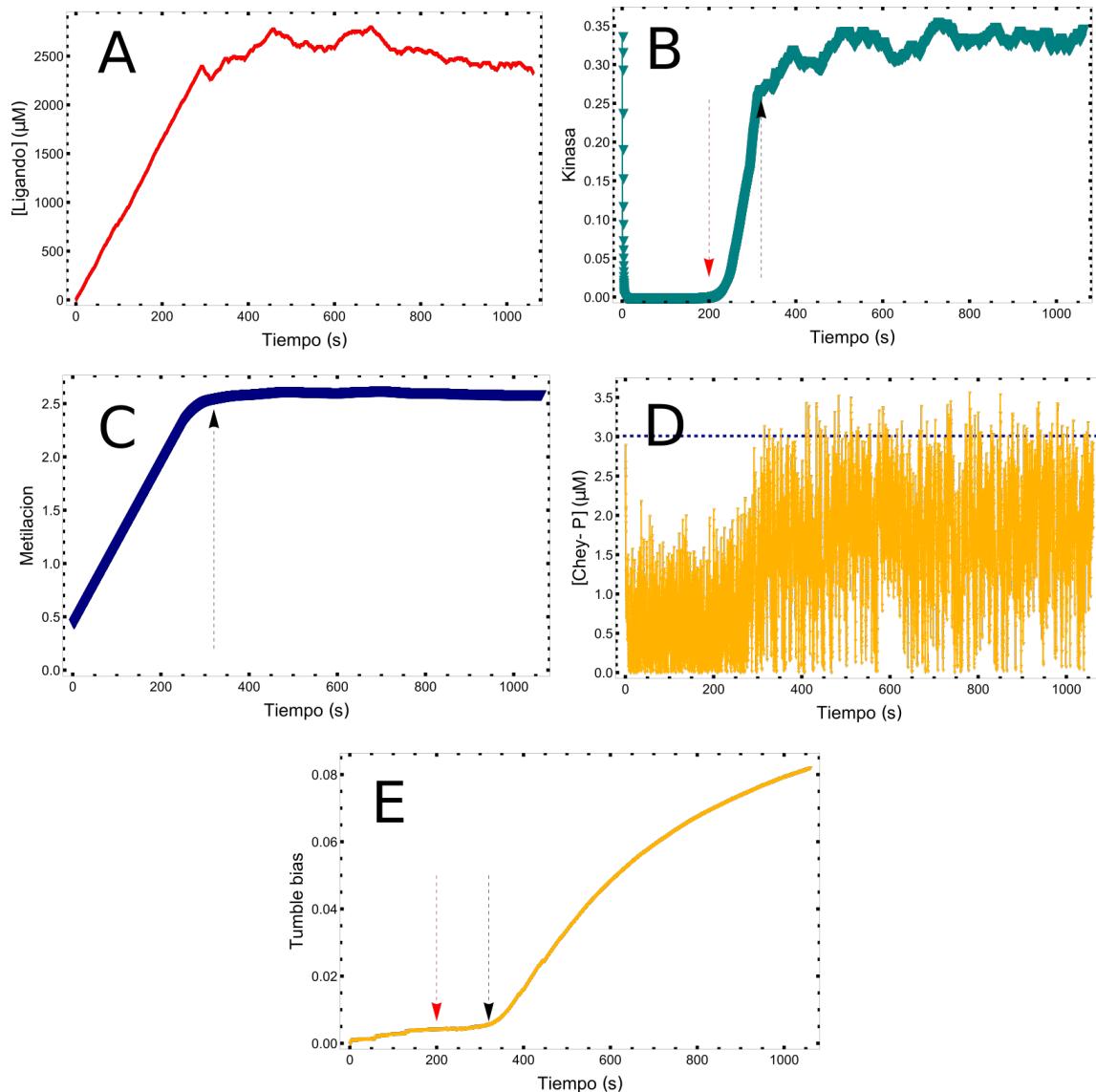
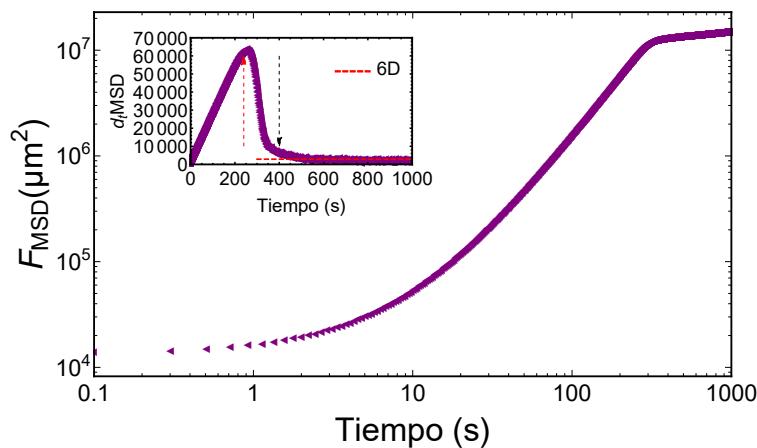


Figura 4-10: A: Concentración de aspartato que experimentó una bacteria al “subir” por el gradiente. B: Actividad de la kinasa donde la flecha roja marca donde comienza a modificarse por la adaptación y la flecha negra donde ya se adapto. C: Cambios en el nivel de metilación al ir “subiendo” por el gradiente. D: [CheY-P] (μM) en el entorno de un flagelo. La recta cortada horizontal marca el umbral critico para la transición de CW a CCW. E: Cambios en el *Tumble_{bias}* promediado sobre 1000 bacterias en el gradiente simulado.

La actividad de la kinasa debe verse reflejada en el desplazamiento cuadrático medio y en la correlación direccional (ver figura 4-11). En la derivada temporal del

MSD se observa que inicialmente hay un régimen lineal hasta llegar a un máximo. Este comportamiento lineal implica un comportamiento balístico en la locomoción de las bacterias en los primeros 200 s, acorde a la actividad nula de la kinasa. En la correlación direccional se ve un comportamiento tipo escalera, donde el primer escalón se alcanza antes de 1 s (flecha roja figura 4-11) y permanece quasi constante hasta poco después de los 200 s (flecha azul figura 4-11). Este primer escalón se debe a que las bacterias están en un modo de *Run* mientras que la actividad de la kinasa sea nula. El valor que toma la correlación direccional en este intervalo temporal esta entre el valor de la correlación direccional de los *Runs* y los *Tumbles* (sección 3.5 del capítulo 3). Lo cual es correcto dado que algunas bacterias han efectuado algún *Tumble* previamente a “subir” por el gradiente. Después del máximo en la derivada temporal del MSD, el cual indica desde el análisis de trayectorias un efecto significativo en la metilación de los receptores, decae hacia un valor constante, característico de un comportamiento difusivo. Este posible régimen difusivo es un indicador de que las bacterias para un tiempo alrededor de los 400 s ya se adaptaron completamente. Aproximadamente para este tiempo (400 s) justamente se observa que la correlación direccional decae a cero (flecha naranja figura 4-11). Si comparamos estos intervalos temporales con los obtenidos en el sistema de señalización interno vemos que son congruentes. Es decir, los cambios en el comportamiento temporal de los observables obtenidos al analizar trayectorias individuales son una consecuencia de los cambios en las variables internas.



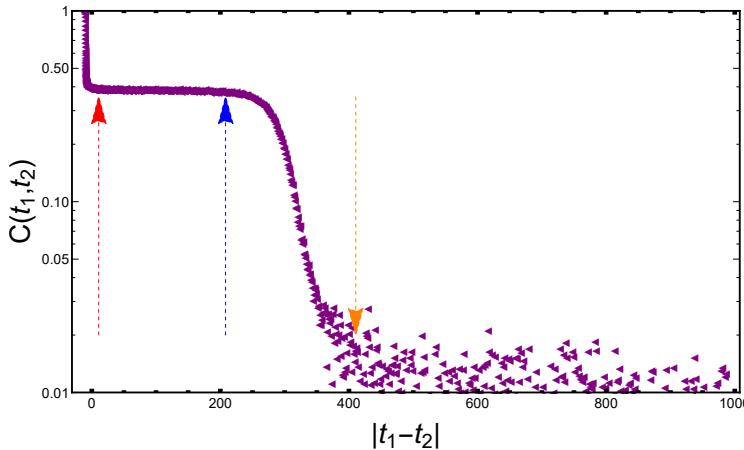


Figura 4-11: Arriba: Desplazamiento cuadrático medio en función del tiempo. En el gráfico insertado se muestra la derivada temporal del MSD (mostrado en mayor detalle en la figura 4-15). La flecha roja marca el máximo de la derivada temporal y la flecha negra cuando se vuelve constante. Abajo: Correlación direccional en función del tiempo. Las flechas de color marcan los tiempos donde ocurren los cambios en la correlación.

La obtención de medidas experimentales de las variaciones en la concentración o actividad de proteínas del sistema de señalización en células en movimiento aún no ha sido logradas. Sin embargo, la medición de las trayectorias de bacterias es una metodología ampliamente aplicada pero tiene sus limitaciones. Generalmente se emplea en cortes bidimensionales y dado la rapidez de los microorganismos duran poco en el campo de visión. Esto hace que la técnica de trackeo no permita calcular observables como el MSD o la correlación direccional por tiempos prolongados. Por último, quedan las mediciones a nivel macroscópico que miden el avance de toda la población, las cuales se pueden realizar mediante técnicas ópticas. Entre ellas se utiliza bacterias con algún fluoroforo [82], vía iluminación de transmisión de baja intensidad en campo oscuro [80], o vía la técnica laser de speckle [83]. Es por eso que ahora se analizarán momentos (no centrados, centrados y estandarizados) de las funciones de densidad de probabilidad (PDFs) para la posición (figuras 4-8 y 4-9) en busca de cambios que estén causados por las variaciones en los procesos a escalas espaciales menores. Calcular momentos de las PDFs requiere menos estadística obteniéndose resultados con poco error. Como se verá, para las mismas PDFs de las figuras 4-8 y 4-9 que poseen bastante ruido sus momentos con la misma estadística son resultados más exactos y menos ruidosos.

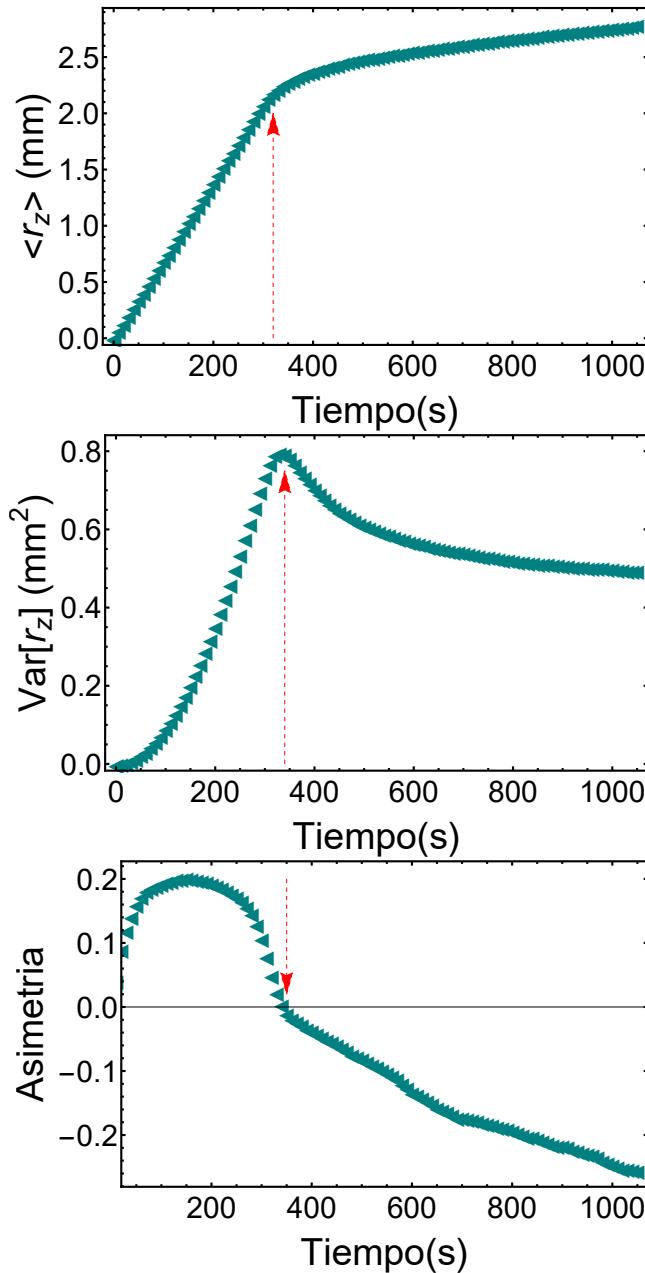


Figura 4-12: Momentos de la distribución de bacterias en el eje z . Arriba: valor medio de la posición en función del tiempo. Medio: Varianza de la posición en función del tiempo. Abajo: Asimetría de la distribución de la posición en función del tiempo.

Ya que la PDF para el eje z difiere de las PDFs de los ejes x e y , primero se muestran el valor medio, varianza y asimetría para el eje z del SRG en la figura 4-12. El primer momento calculado es el valor medio, el cual vemos que tiene un cambio de comportamiento alrededor de los 320 s (recordando que la adaptación en la actividad de la kinasa ocurría entre los 200 y 400 s aproximadamente). El segundo momento

centrado comúnmente conocido como varianza también posee un cambio en el comportamiento llegando a un máximo cercano a los 320 s. Interpretando a la varianza como una medida del ancho de la distribución podemos ver que el comportamiento balístico genera un aumento en el ancho de la distribución de bacterias sin límite. Pero, al haber una transición a un comportamiento difusivo como consecuencia de la adaptación vía la metilación después de cierto tiempo el ancho se vuelve constante. Por último se analiza a la asimetría de la distribución. Experimentalmente se han observado que estos pulsos viajantes de bacterias tienen una asimetría positiva [80] y [82]. Esto implica que el valor medio es menor que la moda, lo cual ocurre en la PDF para el eje z como se ve en la figura 4-8. Esto le da a la PDF la forma de onda viajera donde la mayor cantidad de bacterias están sobre el borde que avanza hacia el ambiente no colonizado. Interesantemente esta asimetría se transforma cuando los receptores se han vuelto insensibles al gradiente de aspartato. En el régimen donde el MSD es lineal se ve una asimetría negativa.

El estudio de las bandas viajeras de bacterias quimiotácticas, al ser un enfoque macroscópico, es más antiguo que el estudio microscópico del *Run & Tumble*. En 1966 Adler [84] midió estas bandas viajeras, y a partir de ellas diversos modelos han sido desarrollados como el trabajo pionero de Keller-Segel [85]. Diversas modificaciones han sido incorporadas a dicho modelo, donde no solo se modela a la densidad de bacterias con una ecuación de reacción-advección-difusión sino que además se modelan las concentraciones de atractores, autoinductores, o nutrientes [82], [86], [87] y [88]. El primer enfoque que ha tomado en cuenta la dinámica microscópica es la propuesta de Saragosti et al. [80]. En dicho trabajo se hace un enfoque mesoscópico donde se modifica la ecuación de Boltzmann de la teoría cinética de gases [33]. Los términos integrales de la ecuación integro-diferencial corresponde a los *Tumbles* y no a colisiones moleculares como en el trabajo original de Boltzmann, similar a la propuesta desarrollada en [75]. Un factor común en todas estas propuestas es un término advecutivo $\nabla[\bar{v} c(\bar{r}, t)]$, donde la velocidad de deriva \bar{v} puede depender de la concentraciones de químicos en el ambiente. Este término es el principal causante de la traslación de las bandas de bacterias. A partir de la propuesta en esta tesis, utilizando los puntos

del valor medio de la posición en función del tiempo podemos calcular la velocidad de deriva. Se define a la velocidad de deriva en la dirección \hat{z} como $v(t) = \frac{d\langle r_z \rangle}{dt}$ [89]. Es decir se obtiene una velocidad de deriva a partir de una descripción microscópica del *Run & Tumble*; siendo, en conjunto con la constante de difusión, el segundo parámetro macroscópico que se ha podido caracterizar. Es importante remarcar en este punto que ésta velocidad de deriva surge únicamente en el contexto de gradientes y no se observa en los escenarios libres de estímulos o isótropos. La velocidad de deriva en el eje dirección \hat{z} se muestra en la figura 4-13.

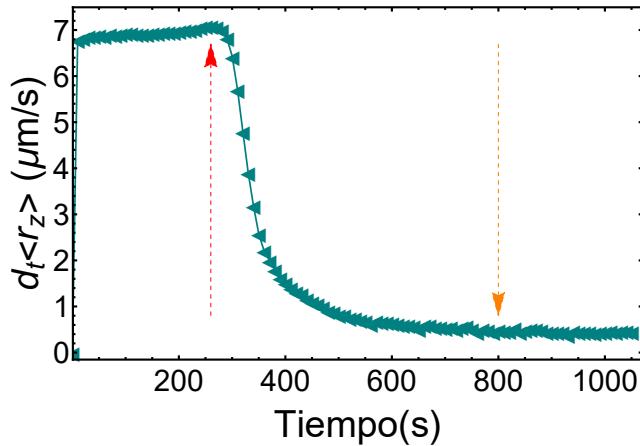


Figura 4-13: Velocidad de deriva en función del tiempo, definida como la derivada temporal del valor medio de la posición para el eje z .

Se puede ver que al mismo tiempo que la actividad de la kinasa es nula y las bacterias realizan un modo de *Run* de larga duración, la rapidez de deriva es aproximadamente constante con un valor de $v_z(t) = 7 \mu\text{m}/\text{s}$. Las mediciones experimentales de la rapidez de deriva están entre 1.8 y $4.2 \mu\text{m}/\text{s}$ [82], [80] y [77]. Por lo tanto, la rapidez obtenida en esta tesis está en el mismo orden de magnitud que las medidas experimentalmente para otras cepas y condiciones quimiotácticas diferentes a las modeladas en esta sección. Valores similares han sido obtenidos para *Serratia mars- cecens* que realiza el mismo comportamiento de *Run & Tumble* [90]. Luego, al iniciar el proceso de adaptación, empiezan a ser probables los *Tumbles* y la rapidez de deriva decrece lentamente hacia un valor aproximadamente constante de $0.5 \mu\text{m}/\text{s}$.

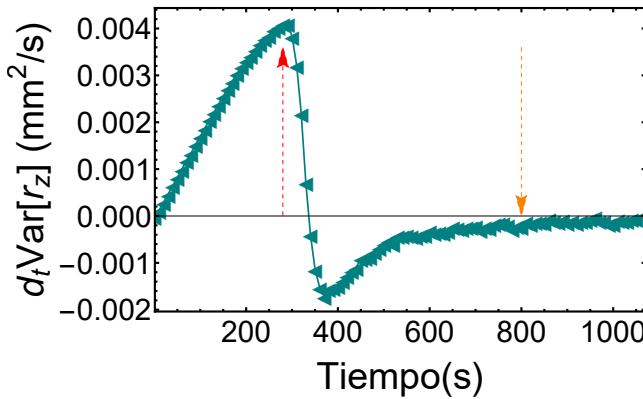


Figura 4-14: Cambios en función del tiempo de la varianza de la posición para la distribución de bacterias en el eje z .

En la figura 4-14 se muestra como la rapidez de la varianza aumenta hasta que los receptores comienzan a insensibilizarse. Al comenzar a adaptarse las bacterias hace que en la dirección \hat{z} la concentración se concentre más sobre el valor medio. Del mismo modo que la rapidez de deriva, el ancho de la banda de bacterias toma un valor quasi-estacionario.

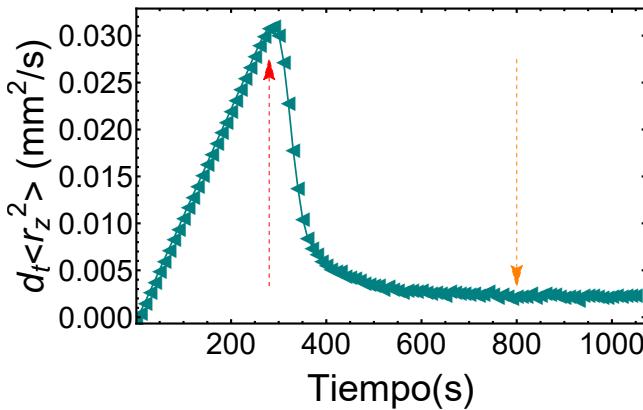


Figura 4-15: Derivada temporal del MSD.

Luego de la metilación de los receptores, la actividad de la kinasa retorna al nivel basal. Si analizamos la derivada temporal del MSD (figura 4-15), correspondiente a estos tiempos, se observa una pendiente constante evidencia de un régimen difusivo. Sin embargo, la velocidad de deriva tiene un valor quasi-estacionario no nulo lo cual no es compatible con tal comportamiento. Como se mostró en la última sección del capítulo anterior (ver sección 3.6) cuando la velocidad de deriva decrece con el tiempo el MSD se comporta asintóticamente lineal, donde la pendiente es una combinación

del coeficiente de difusión, el valor medio del desplazamiento, y la velocidad de deriva. Por esta misma razón, el régimen difusivo que se ve a tiempos largos en la figura 4-15 es superior al valor del escenario libre de estímulos.

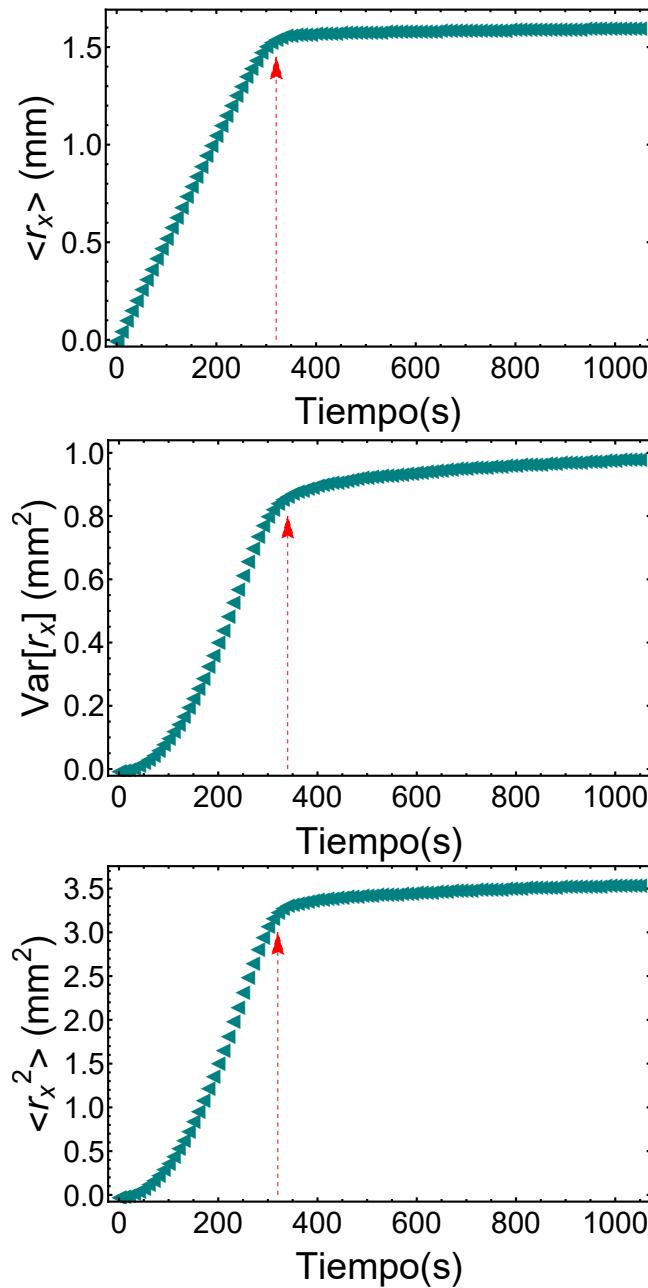


Figura 4-16: Momentos de las distribución de bacterias en el eje x . Arriba: valor medio de la posición en función del tiempo. Medio: Varianza de la posición en función del tiempo. Abajo: asimetría de la distribución de la posición en función del tiempo. Resultados similares se obtuvieron para el eje y .

Dado que el comportamiento de la concentración de bacterias en los ejes \hat{x} e \hat{y} son idénticos se analizará solo una de las dos direcciones. Como se ve en la figura 4-16 en

en este caso se observa un aumento del valor medio en la posición hasta que las bacterias se insensibilizan ante el gradiente químico. Justamente, este mismo comportamiento se ve cuando el frente de propagación se vuelve estático como se muestra en la figura 4-9. Los cambios en el comportamiento de la varianza y el MSD ocurren al mismo tiempo que el cambio del valor medio. Por otro lado, estudiamos como son los cambios en la rapidez del frente de propagación y los cambios temporales en la derivada temporal de la varianza. Por un lado, vemos que el comportamiento funcional de la rapidez en estos ejes es similar al eje \hat{z} . Sin embargo, hay dos grandes diferencias, la rapidez en la fase balística es de $5 \mu\text{m}/\text{s}$ (flecha roja) y a tiempos largos la rapidez tiende a cero (flecha naranja). Por otro lado, la rapidez de la varianza posee un máximo cuando la adaptación comienza a generar cambios y, luego de la completa adaptación, el ancho de la concentración de bacterias se mantiene constante.

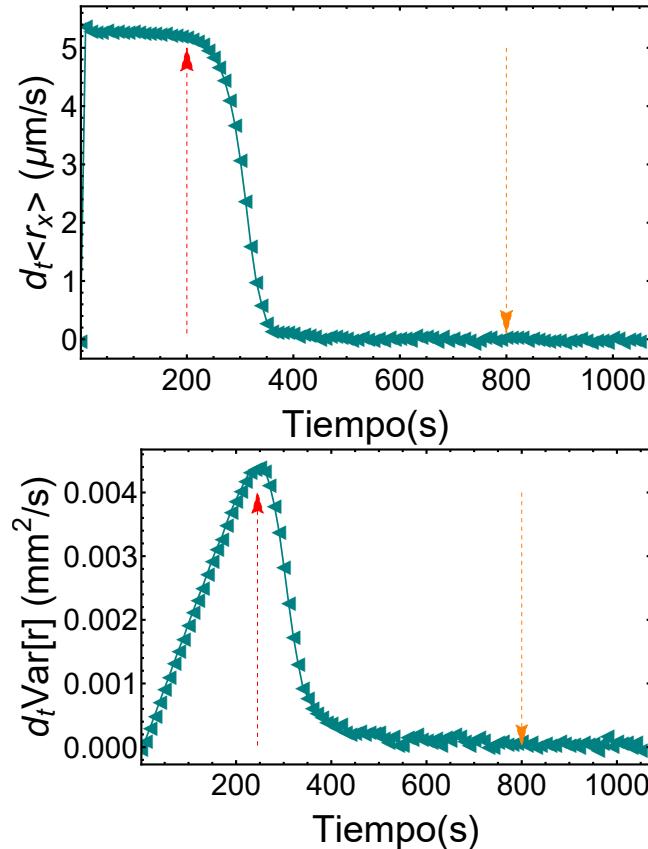


Figura 4-17: Arriba: Velocidad de deriva para el eje x . Abajo: Cambios en el tiempo para la varianza de la posición.

4.3. Escenario con dependencia temporal

En la última sección (2.5) del primer capítulo, se analizó el comportamiento de las variables del sistema de señalización con respecto a estímulos oscilantes. Para la frecuencia analizada en detalle ($\omega = 0.001 \text{ Hz}$), mediante la densidad de potencia espectral (PSD), se pudo identificar oscilaciones con la misma frecuencia en todas las variables. Es decir, la oscilación del input se propagó por todas las variables internas de la señalización hasta ser observada en el output celular, el $Tumble_{bias}$. Dado que en el capítulo previo se vinculó el comportamiento colectivo de los flagelos con la locomoción celular estamos en condiciones de evaluar si las oscilaciones tienen un impacto en los observables utilizados para analizar la dispersión. Al igual que antes se simuló el sistema con el mismo estímulo (ver figura 4-18).

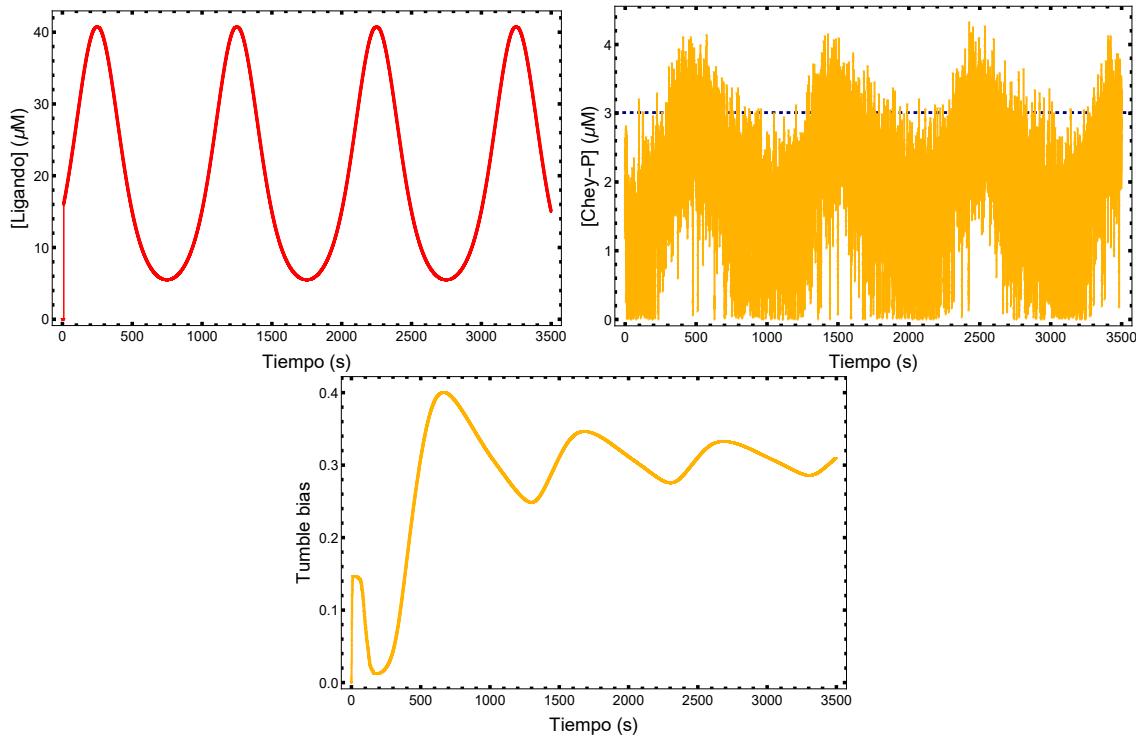


Figura 4-18: Arriba izquierda: Concentración oscilante de aspartato simulada con una frecuencia de $\omega = 0.001 \text{ Hz}$. Arriba derecha: $[\text{Chey-P}]$ en función del tiempo para un flagelo de una bacteria simulada, la recta cortada horizontal marca el umbral crítico que dispara las transiciones $CCW - CW$. Abajo: $Tumble_{bias}$ obtenido al promediar sobre todos los agentes simulados.

Como se había observado previamente, las oscilaciones de la concentración de aspartato generan intervalos temporales donde las fluctuaciones no son suficiente para inducir

transiciones dando a lugar a *Runs* de larga duración. Del mismo modo, ocurre que en ciertos momentos cuando la [Asp]² es máxima ocurren *Tumbles* de larga duración y luego, con elevada frecuencia. Sin embargo, el *Tumble_{bias}* tiene una fuerte caída en la primer oscilación del aspartato. Luego, mediante la adaptación comienza a converger lentamente a un valor estacionario. Esto implica que este observable microscópico se volverá constante mientras que la [Chey-P] continuara con el interjuego entre oscilaciones deterministas y fluctuaciones por ruido (ver figura 4-18 arriba-derecha). Por otro lado, si analizamos lo que ocurre en el MSD se ve reflejado el patrón que sigue la [Chey-P]. En el gráfico exterior de la figura 4-19 izquierda hay inicialmente un régimen balístico correspondiente a la caída de la actividad de la kinasa. Al comenzar a disminuir la [Chey-P] los *Tumbles* se vuelven frecuentes, aumenta el *Tumble_{bias}* y el MSD relaja a un comportamiento difusivo (ver gráfico inserto de la figura 4-19 izquierda). Este proceso ocurre periódicamente como muestra la flecha roja en la figura 4-19 derecha, donde la única frecuencia que posee un máximo es la frecuencia correspondiente al estímulo. En otras palabras, el MSD nos muestra que el comportamiento periódico en la [Chey-P] por las oscilaciones del aspartato generan oscilaciones periódicas entre regímenes balísticos y difusivos.

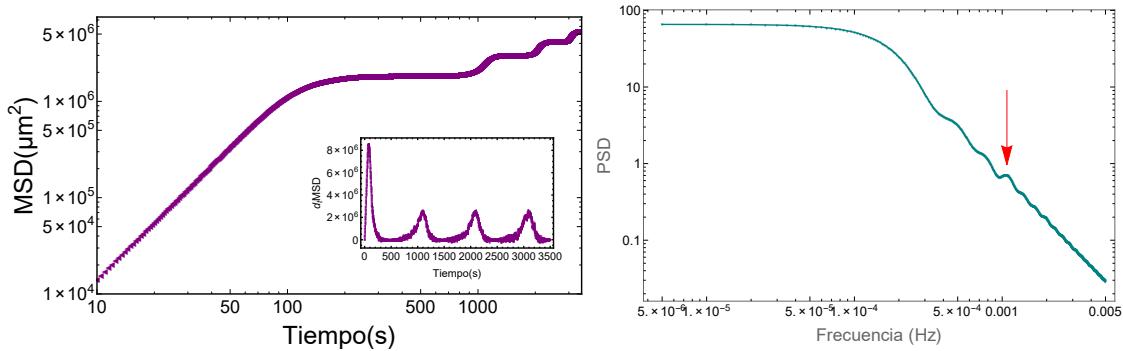


Figura 4-19: Izquierda: Desplazamiento cuadrático medio en función del tiempo. En el grafico inserto se muestra la derivada temporal del MSD. Derecha: PSD correspondiente al MSD donde la flecha roja marca el único máximo local encontrado justamente en la frecuencia del estímulo, $\omega = 0.001 \text{ Hz}$.

El ambiente oscilante simulado genera pulsos donde la concentración de bacterias invadirá el espacio con una elevada tasa; mientras que entre estos pulsos la difusión homogeneizará la población sobre el espacio. Dado que solo estamos simulando

²Asp: Aspartato

cambios temporales en el aspartato y no espaciales, el comportamiento resultante es isótropo. Analizar lo que ocurre en una dirección particular es suficiente, a continuación se muestra para la dirección z como se comporta el valor medio de la posición de la concentración de bacterias. Además, se muestra la velocidad de deriva obtenida a partir del valor medio como en la sección previa. Como se ve en la figura 4-20 para la velocidad de deriva inicialmente se ve una velocidad cuya magnitud es similar a la obtenida para el gradiente constante de la sección anterior ($v_d \approx 6 \mu\text{m}/\text{s}$). Después de los primeros 1000 s, congruente con el periodo entre máximos para la [Asp], la velocidad de deriva vuelve a tomar un valor no nulo. Sin embargo, este valor es un orden de magnitud menor al anterior. Esto es resultado de la adaptación mediante la proteína reguladora de respuesta *CheB*. Esta velocidad de deriva no nula aparece periódicamente cada 1000 s como nos muestra la PSD de la figura 4-20.

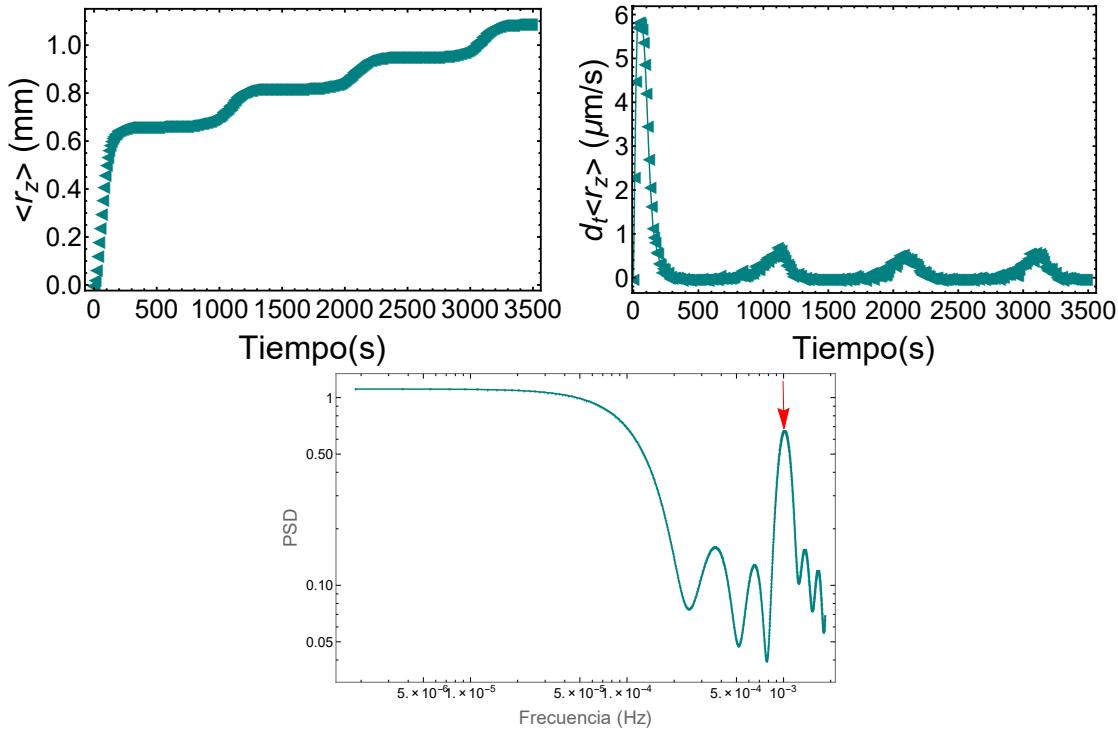


Figura 4-20: Izquierda arriba: Valor medio para la concentración de bacterias en función del tiempo, en la dirección z . Arriba derecha: Velocidad de deriva definida como $v_D = \frac{d\langle r_z \rangle}{dt}$. Abajo: PSD correspondiente a la velocidad de deriva donde la flecha roja marca la frecuencia correspondiente al estímulo, $\omega = 0.001 \text{ Hz}$.

A diferencia de lo obtenido en las secciones anteriores donde fue necesario una anisotropía espacial para la aparición de la velocidad de deriva, resulta que los escenarios

isótropos variables con el tiempo también producen un cambio en el modo de dispersión de *E.coli*.

4.4. Escenario con múltiples gradientes

Se simuló un escenario para el aspartato distribuido en distintas regiones delimitadas del espacio, como se muestra la figura 4-21.

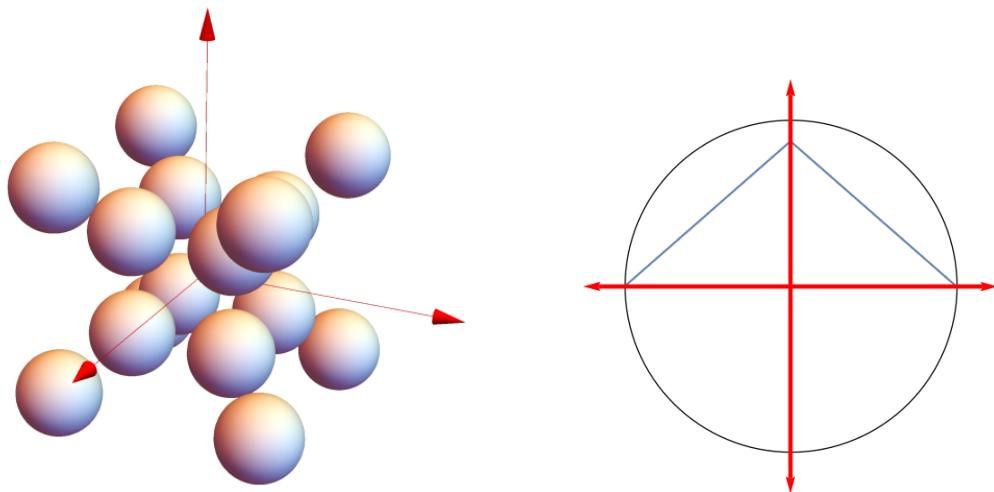


Figura 4-21: Arriba: Esferas donde se encuentra la concentración de aspartato distribuido en el líquido. Abajo: Corte por un plano de una de las esferas que muestra en azul el perfil lineal de aspartato donde la pendiente es la misma que la simulada en la sección 4.2.

Cada esfera representa una fuente de atractor donde la [Asp] aumenta linealmente hacia el centro de la esfera con pendiente $m = 0.875 \frac{\mu M}{\mu m}$. Se busca en este escenario analizar si realmente el efecto que genera el aspartato es aumentar la concentración de bacterias en estas zonas con respecto a las regiones sin estímulo. Si el modelo permite reproducir satisfactoriamente tal efecto, se busca analizar, en función de las variables internas del sistema de señalización, que le confiere tal capacidad.

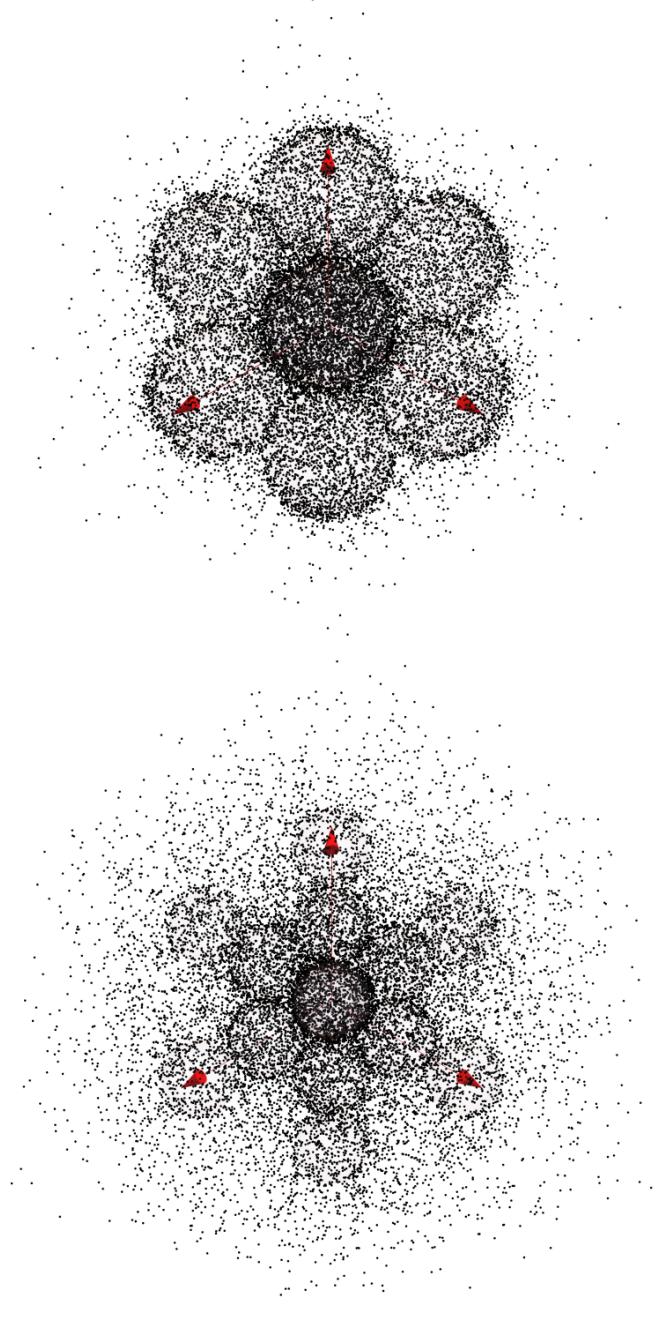


Figura 4-22: Izquierda: En puntos negros se muestran las posiciones de las bacterias a los 100 s. Derecha: Posiciones de las bacterias a los 850 s. En un tono bajo en ambas figuras se muestran las esferas de atractor de la figura 4-21.

Dado que los atractores con perfiles lineales aumentan los tiempos de *Runs* hasta que se alcance a la adaptación, si el rango espacial donde se encuentra el gradiente es tal que la bacteria no logra adaptarse, uno pensaría que el aumento en los tiempos de *Runs* produce que la bacteria atraviese la esfera de aspartato sin efectuar un *Tumble*

y deje atrás esta región. Pero, un detalle no menor ocurre cuando la bacteria deja la región donde se encuentra el estímulo. Esto es que quitar el estímulo es similar al agregar un repelente, fenómeno que había sido descripto en el primer capítulo, ver sección 2.3. En la figura 4-23 se ve que cada vez que la bacteria encuentra una región con aspartato la actividad de la kinasa decae rápidamente, pero al salir de esta región la actividad de la kinasa aumenta fuertemente. Esto produce que luego de prolongados *Runs* ocurran prolongados *Tumbles*. Dado que la rapidez durante los *Tumbles* es dos órdenes de magnitud menor que para los *Runs* produce que la bacteria se aleje lentamente de la región con aspartato. En simultáneo, la adaptación comienza a disminuir la actividad de la kinasa volviendo al comportamiento difusivo de *Run & Tumble* pero con una tasa alta de *Tumbles*. Esto es la causa de porque el *Tumblebias* toma valores por encima del valor sin estímulos cuando estamos en un escenario de atractores donde uno espera el comportamiento opuesto.

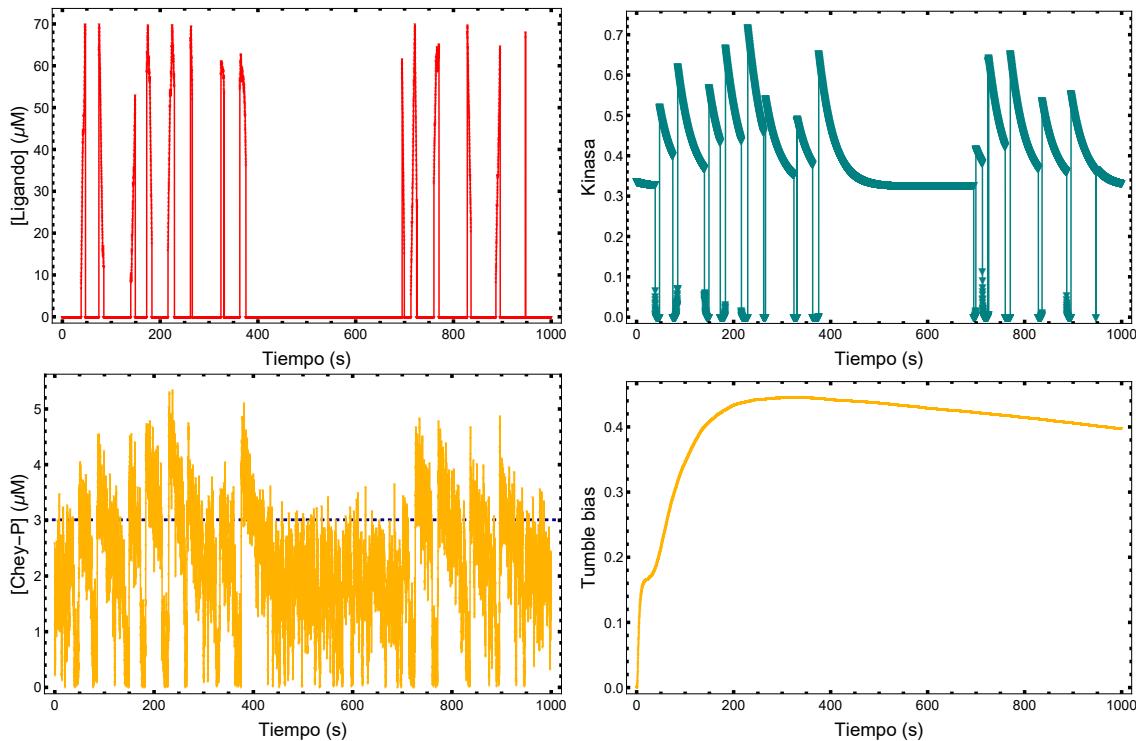


Figura 4-23: Izquierdo arriba: Concentración de ligando que experimenta una bacteria en función del tiempo. Derecha arriba: Actividad de la kinasa en función del tiempo. Izquierdo abajo: Concentración de Chey-P en función del tiempo para un flagelo de la bacteria. Derecha abajo: *Tumblebias* en función del tiempo promediado sobre todas las bacterias simuladas.

El aumento en el *Tumblebias* al salir de la esfera del atractor incrementa conside-

derablemente la capacidad de *E.coli* de volver a encontrar este ambiente favorable, como se ve en la cambios de la concentración de aspartato que encontró la bacteria. Si se compara con la actividad de la kinasa vemos que la bacteria volvió a entrar a una esfera previamente a que la kinasa vuelva al valor de equilibrio. Esto implica que al salir y volver a entrar a una esfera la frecuencia de *Tumbles* es alta, indicando que probablemente haya vuelto a la misma esfera previamente de visitar otra. Luego de los 400 s se ve que la bacteria por un tiempo prolongado estuvo sin entrar a una esfera. Estas suposiciones pueden corroborarse analizando la trayectorias de las bacterias. En la figura 4-24 se puede ver que la bacteria realiza trayectorias altamente persistentes dentro de las esferas y luego al salir, inmediatamente, tumbea. Estos tumbos frecuentes son los causantes de que reiteradas veces vuelva a entrar a la misma esfera.



Figura 4-24: En esta figura se muestra la trayectoria de la bacteria a la cual le corresponde la figura 4-21. Las flechas marcan su posición cada 10 s en el tiempo total de simulación de 1000 s. Se dejaron únicamente las esferas que la bacteria visitó para una mejor visualización.

Por lo tanto, estos resultados prueban que los modelos presentados en esta tesis describen correctamente el comportamiento de químicos como el aspartato que

aumentan la concentración de bacterias. Es por esta razón que se los denominan atractores. Además, indican que es la “adaptación” mediante la metilación de los MCPs la que le confiere la capacidad a *E.coli* de aglomerarse en las regiones donde se encuentra el atractor.

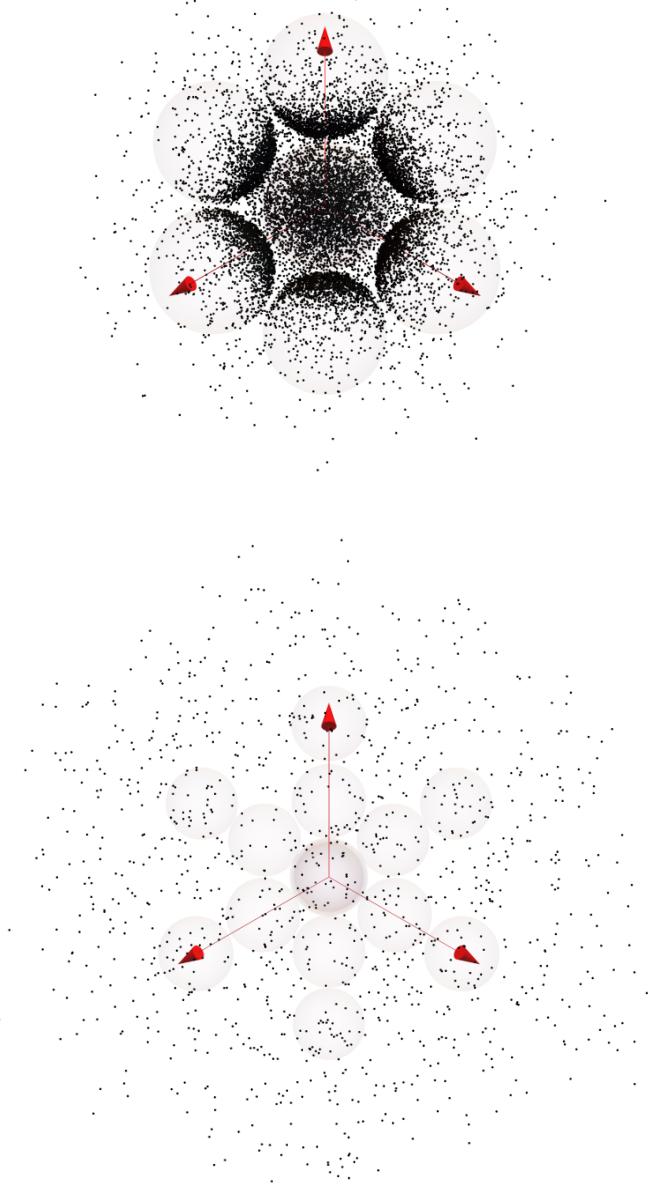


Figura 4-25: Izquierda: En puntos negros se muestran las posiciones de las bacterias a los 100 s. Derecha: Posiciones de las bacterias a los 850 s. En un tono bajo en ambas figuras se muestran las esferas de repelente simuladas de la figura 4-21.

Por último, nos falta analizar que ocurre con químicos que generan el comportamiento

to contrario. Se repitieron las simulaciones con esferas que poseen gradientes de un químico repelente (e.g. $NiCl_2$). El objetivo ahora es analizar si las bacterias logran detectar y alejarse de estas zonas desfavorables y si es la adaptación, nuevamente, la que permite esta respuesta quimiotáctica. Como se observa en las figura 4-25 las bacterias al encontrarse con las esferas de repelente rápidamente se frenan cerca de su superficie sin atravesarlas como en el caso del aspartato. Vemos en la misma figura que a los 850 s prácticamente todas las bacterias han logrado alejarse de las zonas de repelentes. Para comprender mejor lo que sucede, nuevamente volvemos a analizar las variables del sistema de señalización.

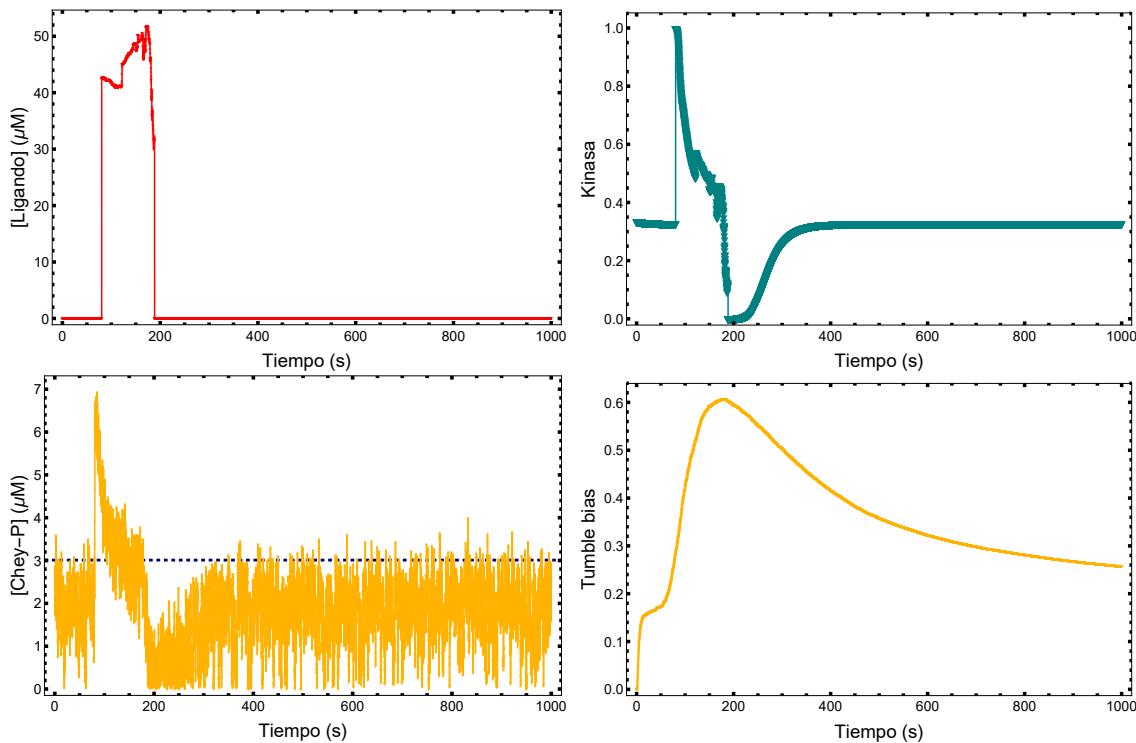


Figura 4-26: Izquierdo arriba: Concentración de repelente que experimenta una bacteria en función del tiempo. Derecha arriba: Actividad de la kinasa en función del tiempo. Izquierdo abajo: Concentración de Chey-Pi en función del tiempo para un flagelo de la bacteria. Derecha abajo: $Tumble_{bias}$ en función del tiempo promediado sobre todas las bacterias simuladas.



Figura 4-27: En esta figura se muestra la trayectoria de la bacteria a la cual le corresponde la figura 4-26. Las flechas marcan su posición cada 10 s en el tiempo total de simulación de 1000 s. Se dejó únicamente la esfera que la bacteria visitó para una mejor visualización.

De la figura 4-26 podemos observar que al entrar la bacteria a la esfera de repelente, primero ejecuta un *Tumble* de larga duración y luego comienza a realizar *Tumbles* frecuentemente. De este modo es que no penetran y atraviesan las esferas, como en los escenarios de aspartato. Esto es congruente a los escenarios isótropos de repelentes, donde se obtuvo que la constante de difusión decrece fuertemente con respecto al escenario sin estímulo o de atractores. Por lo tanto, lo podemos interpretar como un freno en su dispersión para, al mismo tiempo, comenzar a buscar nuevas direcciones más favorables. Disminuir la frecuencia de *Tumbles* mediante la adaptación permite que los *Runs* luego de varias re-orientaciones tengan la longitud necesaria para sacar a la bacteria de la esfera de repelente. La adaptación cumple un rol principal cuando la bacteria abandona la esfera. Esto es, quitar un repelente es como agregar un atractor. Al salir de la esfera, la actividad de la kinasa se desploma produciendo un *Run* de larga duración.

Del mismo modo, que para el aspartato, mostramos la trayectoria de la bacteria correspondiente a la figura 4-26 para sostener las conclusiones obtenidas a partir de las variables del sistema de señalización. La figura 4-27 es una prueba de como los modelos presentados logran explicar como las bacterias responden a los químicos denominados repelentes. Nuevamente, el sistema de “adaptación” vía la metilación

del mismo modo, que para el aspartato, mostramos la trayectoria de la bacteria correspondiente a la figura 4-26 para sostener las conclusiones obtenidas a partir de las variables del sistema de señalización. La figura 4-27 es una prueba de como los modelos presentados logran explicar como las bacterias responden a los químicos denominados repelentes. Nuevamente, el sistema de “adaptación” vía la metilación

de los MCPs es crucial para la respuesta quimiotáctica. Como última prueba de que el aumento de la concentración de bacterias en las zonas de aspartato se debe a la adaptación, se realizaron las mismas simulaciones donde se desactivo la adaptación. Esto es, similar a una cepa mutante en la metilación de los MCPs. En la figura 4-28 vemos claramente como se pierden las zonas de máximos de concentración en las esferas de los atractores.

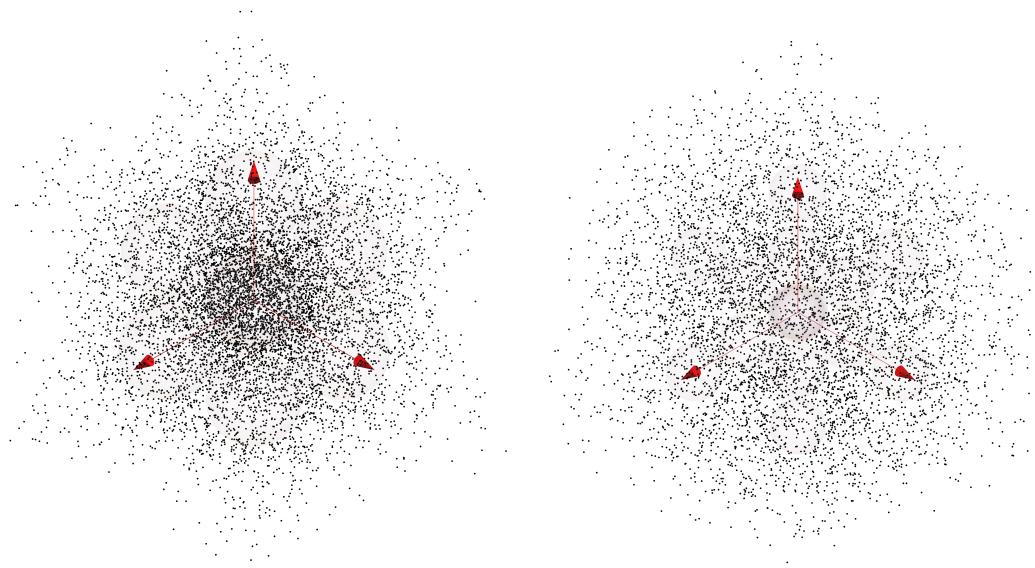


Figura 4-28: Izquierda: En puntos negros se muestran las posiciones de las bacterias mutantes en la metilación a los 100 s. Derecha: Posiciones de las bacterias a los 850 s. En un tono bajo en ambas figuras se muestran las esferas de atractor simuladas de la figura 4-21.

Repitiendo la misma metodología para las esferas de repelentes con las mutantes en la adaptación, podemos observar como en la figura 4-29 los repelentes generan un efecto similar al de los atractores. Por lo tanto, concluimos nuevamente que el correcto comportamiento ante repelentes se debe principalmente a la adaptación de los receptores MCPs. A simple vista, pareciera que cuando no se posee un sistema de adaptación se invierten los roles de los quimioefectores. Los atractores generaron un efecto en la concentración de bacterias similar a los repelentes y, del mismo modo, los repelentes un efecto similar a los atractores. En realidad, en ambos casos para estas “mutantes” ocurre que al entrar en las esferas poseen un comportamiento balístico. Esto es, altas concentraciones de atractores o repelentes y sin adaptación, llevan a la concentración molar estable μ a los extremos generando *Runs* o *Tumbles* de larga

duración. La única diferencia es que la velocidad en el primer caso es mucho mayor al segundo, como se vio en la figura 3-21 del capítulo anterior. Luego, al abandonar las regiones con quimioefectores volverán al comportamiento difusivo sin estímulos como si nada hubiera ocurrido.

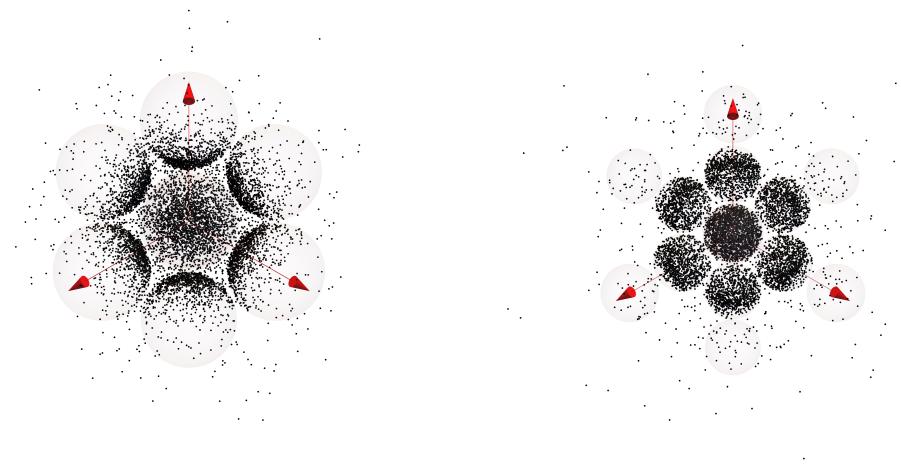


Figura 4-29: Izquierda: En puntos negros se muestran las posiciones de las bacterias para mutantes en la metilación a los 100 s. Derecha: Posiciones de las bacterias a los 850 s. En un tono bajo en ambas figuras se muestran las esferas de atractor simuladas de la figura 4-21.

Finalmente, para terminar esta sección nos queda analizar como la “memoria” que le confiere la adaptación a *E.coli* determina la probabilidad de encontrar reiteradas veces la misma fuente del quimioefector. Para cuantificar este efecto sobre el forrajeo de la bacteria analizaremos el número de ingresos a una esfera antes de visitar otra. Dado que esta variables es discreta, obtendremos la función de masa de probabilidad (PMF³) la cual es el análogo discreto de la PDF. En la figura 4-30 se muestra la PMF para los casos de atractores y repelentes. Para variables discretas, la probabilidad de un evento es el valor de la PMF evaluada en dicho valor⁴, luego los valores que vemos en la figura 4-30 son, de hecho, la probabilidad para ese número de visitas consecutivas a una esfera.

³Acrónimo en inglés para Probability mass function.

⁴e.g. la probabilidad de ingresar 3 veces a una esfera es $P(n = 3) = PMF(n = 3)$

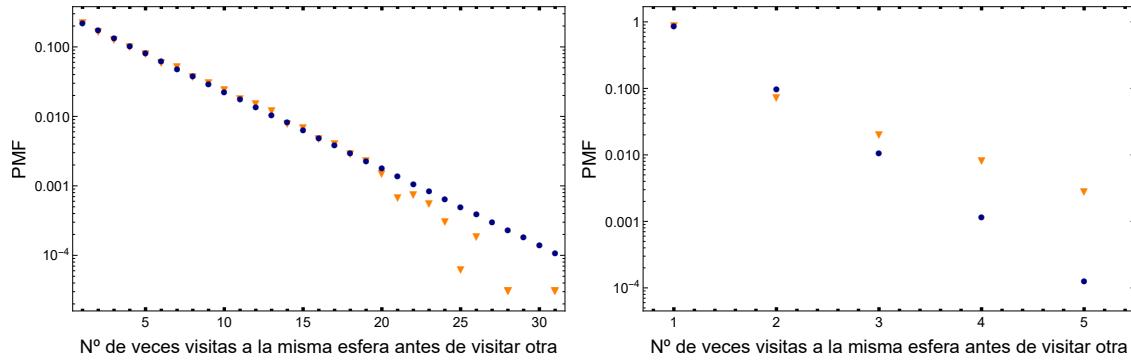


Figura 4-30: Función de masa de probabilidad (PMF) en gráfico semi-log para el número de ingresos a una esfera antes de visitar otra. Los triángulos naranjas son los resultados obtenidos con las simulaciones y los círculos azules el ajuste con una distribución geométrica. Izquierda: PMF para los atractores. Derecha: PMF para los repelentes.

Como vemos en esta figura, para ambos casos, la mayoría de los eventos se ajustan correctamente con una recta en el gráfico semi-log⁵. Esto implica que la PMF tiene un comportamiento exponencial decreciente, similar a la distribución exponencial, pero dado que la variable aleatoria es discreta se ajustó con su análogo discreto la distribución geométrica. La cual tiene un único parámetro que llamaremos p que determina la probabilidad de éxito de abandonar la esfera y visitar otra. La probabilidad de que una bacteria entre k veces consecutivas a una esfera antes de visitar otra es:

$$P(n = k) = (1 - p)^{k-1} p. \quad (4.3)$$

Por lo tanto, la probabilidad es la probabilidad de $k - 1$ fracasos, es decir de reingresos, por la probabilidad de un éxito. Recordando que si la probabilidad de un evento compuesto es igual a la multiplicación de las probabilidades individuales de cada evento, los eventos son independientes. La propiedad de independencia determina una propiedad de sin “memoria”, lo cual indica una supuesta contradicción. Como es posible que de un mecanismo de señalización con “memoria” emerge un comportamiento sin “memoria” donde visitar nuevamente la misma región es independiente de haberla visitado previamente. La respuesta es que una vez que una bacteria ingresa a una esfera, la adaptación modificará el comportamiento de la bacteria cuando salga de esta región. La “memoria” no es más que un comportamiento particular que la

⁵Los ajustes comienzan a perder fidelidad para eventos con muy baja probabilidad.

bacteria realiza cuando abandona la región del quimioefector. Para los atractores este comportamiento se basa en un *Tumble* de larga duración seguido de un comportamiento de *Run & Tumble* con frecuentes *Tumbles*. En contrario, para los repelentes consiste en un *Run* de larga duración y luego la bacteria realizará el comportamiento de *Run & Tumble* con un valor de $Tumble_{bias}$ menor al no estimulado. La diferencia es que para los atractores se obtiene un valor $p = 0.23$ y para los repelentes $p = 0.86$, por esta razón en el primer caso las bacterias visitan reiteradas veces la misma esfera mientras que en el segundo caso no. Por lo tanto, lo que hemos llamado una “memoria”, brindada por el sistema de adaptación mediante la proteína reguladora de respuesta *CheB*, no es una memoria propiamente dicha. Esto resulta claro si realizamos el mismo análisis con las “mutantes” como se muestra a continuación en la figura 4-31:

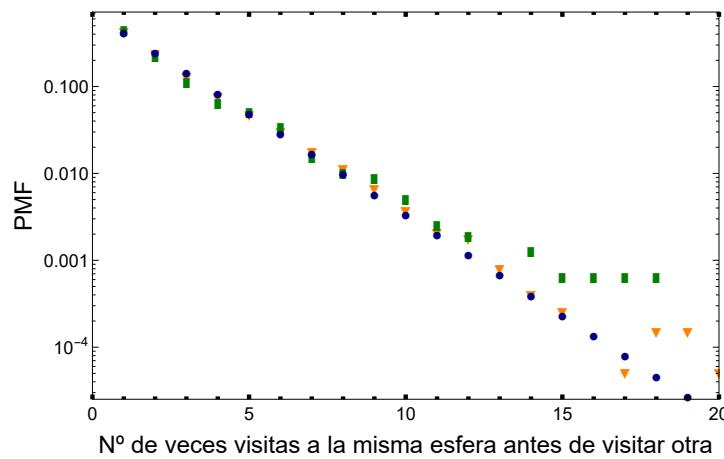


Figura 4-31: Función de masa de probabilidad (PMF) en gráfico semi-log para el número de ingresos a una esfera antes de visitar otra. Los triángulos naranjas son los resultados obtenidos con las simulaciones para mutantes en la adaptación en el caso de atractores mientras que los rectángulos verdes para los repelentes. Los círculos azules el ajuste con una distribución geométrica con $p = 0.415$.

Vemos que para ambos escenarios el ajuste de la distribución geométrica es el mismo donde se obtiene un valor $p = 0.415$. Este valor obtenido determina que tan probable es encontrar una esfera realizando el comportamiento de *Run & Tumble* sin estimular. Nuevamente, reingresar a una esfera es independiente de haber ingresado previamente lo cual es lógico dado que estas “mutantes” no poseen una “memoria”. Comparando los valores obtenidos previamente vemos que los atractores disminuirán

el parámetro p y los repelentes lo aumentarán con respecto al caso de las mutantes. La adaptación simplemente modifica la probabilidad con la cual una *E.coli* permanecerá en una región con un quimioefector donde sus futuras decisiones no dependerán del pasado. El corrimiento en el parámetro p de la distribución geométrica por la adaptación en la respuesta quimiotáctica tiene un significado particular si lo analizamos desde el concepto de entropía de Shannon⁶. Cuando la entropía tiende a cero implica que la incertidumbre también tiende a cero, en caso contrario, cuando aumenta más aumenta la incertidumbre. En la figura 4-32 se muestra como se comporta la entropía de la distribución geométrica con respecto al parámetro p , además se muestran los valores obtenidos para atractores (región sombreada verde), para los repelentes (región sombreada amarilla) y para las “mutantes” (región sombreada gris). Se modificó el radio de las esferas para analizar como varia el parámetro p con respecto al volumen de las regiones de quimioefectores donde se concluye que se observa la misma tendencia independientemente del volumen.

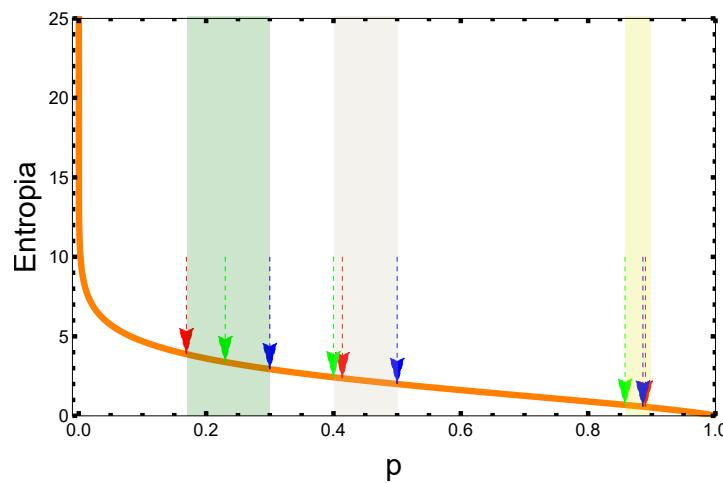


Figura 4-32: Entropía de la distribución geométrica en función del parámetro p . Las flechas rojas son los valores obtenidos para esferas con un radio $R = 160\mu m$, las verdes con un radio $R = 80\mu m$ y las azules con un radio $R = 40\mu m$. La región sombreada verde son los valores obtenidos para el caso de atractores, la región sombreada amarilla para los repelentes y la gris para las “mutantes”.

Lo interesante de este análisis es que cuando *E.coli* encuentra una región de un atractor permanecerá más tiempo en esta zona, sin embargo se vuelve menos predecible. Esto es, sabemos que la bacteria probablemente permanezca en esta zona por

⁶o de la información.

más tiempo pero es más difícil de predecir cuando la abandonará con respecto a los mutantes y los repelentes. Esta medida sobre la incertidumbre es una variable de interés para un predador ya que cuanto mas predecible sea la bacteria mas sencillo sería atraparla. Por el otro lado, vemos que los repelentes disminuyen significativamente la entropía. Por lo tanto, poseemos más información sobre lo que probablemente haga la bacteria (alejarse de la región). Dado que podría salir de la región en cualquier dirección esto podría contrarrestar la baja incertidumbre.

4.5. Discusión

En este capítulo hemos estudiado la potencialidad de los modelos presentados y desarrollados en los capítulos previos para el análisis, en un enfoque multi-escala, de la dispersión de *E.coli* en medios líquidos. En primer lugar, el estudio en medios isótropos libres de adaptación comprobó que la hipersensibilidad en los motores flagelares ante la [Chey-P] permite a *E.coli* tener un amplio rango, de varios ordenes de magnitud, para su constante de difusión. Inclusive, para la mayoría del rango del $Tumble_{bias}$ se encontró la relación fenomenológica $Tumble_{bias} \approx \frac{-1}{\beta_2} \ln \frac{D}{\alpha_2}$ (valores de los parámetros α_2 y β_2 en figura 4-2) que relaciona el *Bias* con la constante de difusión D . Así se establece una relación directa entre parámetros microscópicos y macroscópicos análoga a la relación de Einstein para la temperatura y la constante de difusión de coloides. Por otro lado, estos resultados nos mostraron que la bacteria al encontrarse con la presencia de atractores aumenta considerablemente los tiempos medios de duración de los *Runs*, como fue observado experimentalmente por Berg & Brown [29]. Esto impacta directamente en la extensión del régimen balístico en el MSD del *Run & Tumble*, a su vez aumentando el tiempo que demora la correlación direccional en caer a cero. Contrariamente, en la presencia de repelentes observamos que a medida que aumenta el $Tumble_{bias}$ los *Tumbles* comienzan a ganar protagonismo. Aunque se vio que rápidamente estos observaciones son enmascaradas cuando uno contempla la adaptación mediante la metilación de los MCPs. En presencia de gradientes se obtuvo que la adaptación demora un tiempo considerable en comenzar actuar. Por esta mis-

ma razón, fue que se obtuvieron nuevamente regímenes balísticos de larga duración. Más aún, en presencia de estos gradientes se modifica el comportamiento difusivo obtenido para ambientes isótropos o libres de estímulos. En este caso, aparecen mezclas de procesos advectivos y difusivos, caracterizados ahora por dos parámetros macroscópicos: la velocidad de deriva y la constante de difusión. Por lo tanto, la velocidad de deriva surge cuando hay *Runs* cuyos tiempos medios son significativamente mayores al tiempo medio en ausencia de estímulos ($\approx 1\text{ s}$). Sorprendentemente, luego de la adaptación, en la dirección del gradiente, aún se mantiene una velocidad de deriva no nula donde a su vez se observa un MSD lineal. Como se mostró al final del capítulo anterior, esto indicaría un comportamiento difusivo cuya constante de difusión es en realidad una constante efectiva; cuya magnitud es mayor a la verdadera constante de difusión debido a la contribución del término advectivo.

Cuando se analizó el efecto de oscilaciones periódicas en la concentración de los estímulos del sistema de señalización se obtuvo que el *Tumble_{bias}* enmascara el interjuego entre oscilaciones periódicas y fluctuaciones en la [Chey-P]. Al analizar que ocurre con el MSD, obtuvimos el mismo interjuego entre oscilaciones y fluctuaciones. Es decir, en los intervalos donde la [Asp] es elevada observamos *Runs* de larga duración y velocidades de deriva no nulas. Por el contrario, cuando la [Asp] es baja se observan únicamente comportamientos difusivos que homogeneizan la concentración de bacterias. Sorprendentemente, al igual que para las variables internas, para frecuencias bajas ($\omega < 0.01\text{ Hz}$) los observables macroscópicos oscilan con la misma frecuencia que el estímulo simulado.

Por último, los escenarios con distribuciones inhomogéneas de químicos revelaron una función inesperada de la adaptación en la capacidad quimiotáctica de *E.coli*. El efecto de la metilación sobre la actividad de la kinasa no solo permite la adaptación de la bacteria al medio que se encuentra. Sino que a su vez, en presencia de atractores, le concede la capacidad de encontrar reiteradas veces la misma fuente del químico. Esto es una consecuencia de que retirar un atractor es similar, en efecto, a agregar un repelente. Produciendo intervalos de *Runs* largos cuando se encuentra en la presencia del atractor e intervalos de frecuentes *Tumbles* cuando abandona tal región. Mediante

este mecanismo es que los químicos con tal respuesta en el sistema de señalización generan un aumento de la concentración de bacterias, por ello han sido denominados atractores. Por otro lado, se obtuvo que este sistema de feedback negativo de adaptación es el que le confiere a *E.coli* la capacidad de evitar condiciones desfavorables. Estas conclusiones están sostenidas por las simulaciones de células mutantes, sin esta capacidad adaptativa se pierde por completo la eficiente respuesta quimiotáctica. Concluimos entonces que la ruta de adaptación mediante la proteína reguladora de respuesta *CheB* es fundamental para un correcto comportamiento quimiotáctico como ha sido observado estudiando cepas mutantes [8, 91].

Capítulo 5

Conclusiones Generales

Se eligió como microorganismo de estudio a *E.coli*, ya que al ser un organismo modelo, es la especie más estudiada hasta el momento en los campos de aplicación de la tesis. En particular, su sistema de señalización es el mejor caracterizado dentro de todo el grupo procariante [91]. Sin embargo el estudio a lo largo de las décadas, con diferentes cepas, deja en claro la dificultad para desarrollar modelos válidos para todas las cepas, es decir a nivel especie. Aunque el comportamiento de *Run & Tumble* es conservado a través de las distintas cepas, se presentan grandes diferencias en los observables utilizados para definir tal comportamiento. Por ejemplo, cuando se analiza el caso sin estimular, el tiempo promedio que una bacteria realiza *Runs* o *Tumbles* varía entre las distintas cepas disponibles. Dependiendo la escala elegida en la cual se desarrollan los modelos, los parámetros que los conforman son caracterizados con mediciones experimentales a dichas escalas. Realizar modelos a nivel individuo requiere tener datos experimentales a la escala correspondiente las cuales son variables entre cepa y cepa e inclusive a veces pueden depender del medio de cultivo utilizado [52]. Este es el motivo por el cual se ha modelado íntegramente la cepa **AW405**, la cual posee los mejores datos experimentales con respecto al comportamiento de *Run & Tumble* [29]. El estudio complementario del sistema de señalización y su relación con la rotación de los flagelos fue realizado posteriormente principalmente para otras cepas, como por ejemplo, la **RP437**. Esto implica que los resultados obtenidos en esta tesis son válidos cualitativamente para otras cepas de la misma especie y no pueden

ser validados cuantitativamente, esto requeriría la reparametrización en las constantes de los modelos desarrollados, lo cual escapa de los objetivos de esta tesis. Es notable remarcar que las distribuciones de ángulos que toma la bacteria durante el *Run & Tumble* se conservan a lo largo de distintas cepas [72], permitiendo extrapolar los resultados obtenidos en cuanto a la dispersión en medios líquidos.

La quimiotaxis es la capacidad que tienen ciertas especies de bacterias de censar y modificar su comportamiento en respuesta a gradientes químicos. Los microorganismos juegan un rol fundamental a nivel ecológico, por ejemplo en la transformación y el ciclado de químicos en los ambientes, en la producción primaria de las cadenas tróficas, o en la fijación de nitrógeno atmosférico. La quimiotaxis es un factor que puede afectar considerablemente las tasas de tales procesos. Interesantemente, lo que ocurre a escalas microscópicas en los “zapatos” de las bacterias podría tener un impacto en procesos a grandes escalas, inclusive globales. Es por ello que resulta de gran interés el estudio de la motilidad bacteriana a diversas escalas espaciales y temporales. Particularmente, *E.coli* es una bacteria entérica que habita dentro de organismos más complejos utilizando la quimiotaxis como herramienta de colonización. Aunque no es la única, otras bacterias patógenas también utilizan la quimiotaxis para colonizar a sus huéspedes como *Helicobacter pylori* [92], *Vibrio cholerae* [93] y *Vibrio angillarum* [94]. A su vez, la motilidad es crucial para las bacterias flageladas oceánicas. Los océanos son uno de los mayores reservorios de bacterias en el planeta [39]; en un litro de agua hay en promedio 10^9 bacterias. Las bacterias marinas cumplen roles fundamentales en los ciclos biogeoquímicos que controlan los principales ciclos químicos del océano [95]. Inclusive, son el principal mediador entre la materia disuelta orgánica (DOM) hacia niveles tróficos superiores a través de loop microbiano [96]. En esta tesis se han realizado siempre las simulaciones para bacterias en medios líquidos, los cuales son los escenarios más similares a los ambientes habituales para las bacterias oceánicas que para las entéricas. Sorprendentemente, en un sentido amplio, existe un alto grado de conservación entre las especies a nivel molecular del sistema de señalización [97]. Además, los modos de navegación son similares: *Runs & Reverse* o *Runs*,

Reverse & Flicks, todos resultando en un comportamiento difusivo en ausencia de estímulos. Por lo tanto, esto nos permite hacer un paralelismo entre lo obtenido para *E. coli* y las bacterias flageladas oceánicas.

En esta tesis se ha logrado hacer un estudio a diversas escalas espaciales y temporales, con un enfoque computacional, sobre el comportamiento de *Run & Tumble* en medios líquidos. Esto permitió concluir que variables nano o microscópicas son relevantes en la dispersión en la escala macroscópica. Un punto de vista para entender el sistema de señalización como un procesador de información, y para clasificar los diferentes modelos, es analizar a este sistema como una red neuronal artificial. En 1958 Frank Rosenblatt inventó un algoritmo denominado “Perceptrón”, el cual toma un input y devuelve un output binario. Si nos olvidamos de la ubicación espacial de los componentes del sistema de señalización y solo analizamos sus interacciones podemos armar una red de “Perceptrones” como se muestra en la siguiente figura 5-1:

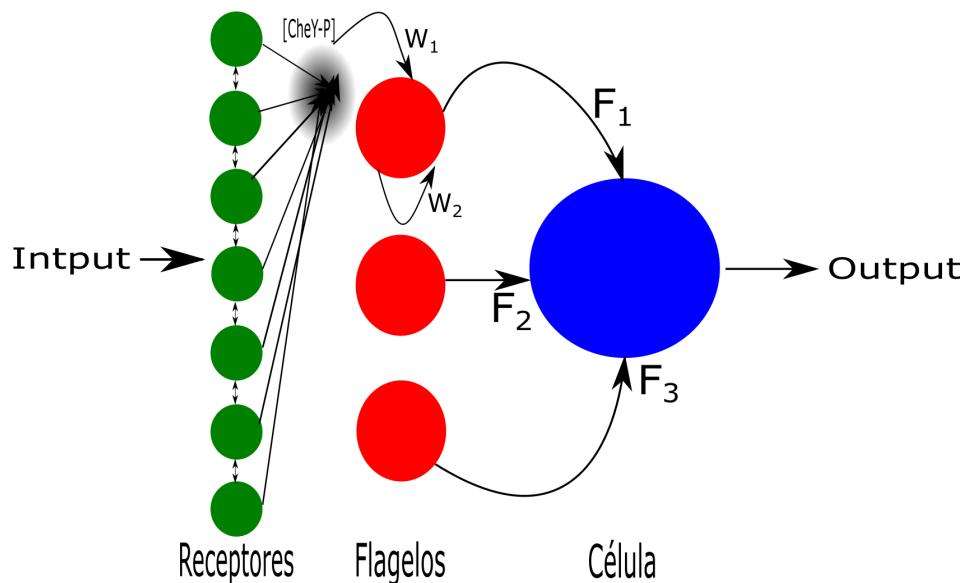


Figura 5-1: Red neuronal para el sistema de señalización quimiotáctico de *E. coli*. Los nodos verdes representan los receptores que son estimulados por quimioefectores (input). El efecto de cada uno de estos nodos se resume en esta tesis en un único proceso estocástico, la [CheY-P] en el entorno de cada flagelo. La segunda capa de nodos rojos son los flagelos que toman como input la [CheY-P] y su sentido de rotación para determinar su futuro sentido de rotación. La última capa de nodos es el comportamiento celular que toma como input al sentido de rotación de cada flagelo dando como Output el comportamiento celular; *Run* o *Tumble*. Los coeficientes W y F son los pesos que utilizan los “Perceptrones”, ver figura 5-2. No se muestran los nexos entre los receptores y los otros flagelos para una mejor visualización.

En la primer capa de nodos tenemos los receptores, los cuales están conectados entre si ya que este es el primer paso de la amplificación. Los estímulos por qui-

mioefectores en la región periplásmatica de los MCPs determinan la actividad de la kinasa *CheA*, la cual determina la concentración citoplásmatica de *CheY-P*. Donde esta última es el input de la segunda capa de nodos, los flagelos. Los flagelos pueden rotar solo en dos sentidos; horario o anti-horario, esto es una respuesta binaria. Luego la similitud entre un flagelo y un “Perceptron” es natural. Para determinar la salida que devuelve un “Perceptron” se utiliza un modelo lineal (en este caso es una recta), si el input da un valor por debajo de la recta el algoritmo devuelve un 1 y, en contrario, si el valor esta por encima de la recta devuelve un 0. A continuación se muestra la recta utilizada en los códigos desarrollados para esta tesis que determinan el comportamiento de un flagelo.

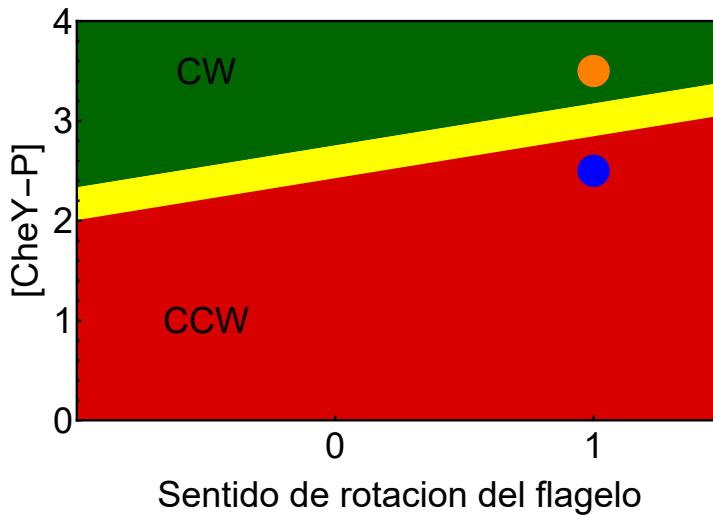


Figura 5-2: La recta amarilla determinada por la ecuación $w_1x_1 + w_2x_2 + b = 0$ establece el sentido de rotación del flagelo. El sentido *CW* se representa por 0 y el *CCW* por 1. Por ejemplo, el punto azul es un flagelo que está en sentido *CCW* y la $[CheY-p]$ es tal que seguirá en este sentido. Luego de un tiempo la $[CheY-P]$ supera la recta amarilla y ahora el flagelo rotará en sentido *CW* como muestra el punto naranja. Los parámetros se obtienen a partir de los umbrales críticos: $w_1 = 1.0$, $w_2 = C_{TR} - C_{TR}$ y $b = -C_{TR}$. La variable x_1 es la $[CheY-P]$ y x_2 es el sentido de rotación.

Como podemos ver siempre que un punto, cuyas coordenadas están determinadas por la $[CheY-p]$ y su sentido actual de rotación, este por debajo de la recta amarilla dictará que el flagelo rote *CCW*, donde el “Perceptron” devolverá un 1. Por el otro lado, si el punto cae por encima el flagelo rotará *CW* y el “Perceptron” devolverá un valor 0. Una vez que la segunda capa de nodos emite una salida a partir de los inputs de la primer capa, esta información se pasa a la tercera y última capa. Esta capa no es nada más ni nada menos que el comportamiento celular, el $Tumble_{bias}$.

Recordando que trabajando con un número efectivo de flagelos se mantiene la regla del voto, nuevamente se utiliza un único “Perceptron” que en función del sentido de rotación de todos los flagelos da una respuesta binaria; *Run* o *Tumble*. En nuestra propuesta la salida de la primer capa de nodos, todo el sistema de señalización desde los receptores hasta la proteína reguladora de respuesta¹, es resumida en una simple ecuación diferencial estocástica con dos ecuaciones adjuntas para la actividad de la kinasa y el nivel de metilación propuestas en las referencias [12,55]. Se mostró como de esta manera se reproducen los pasos de amplificación en la respuesta en los receptores y la ultrasensibilidad de los motores flagelares.

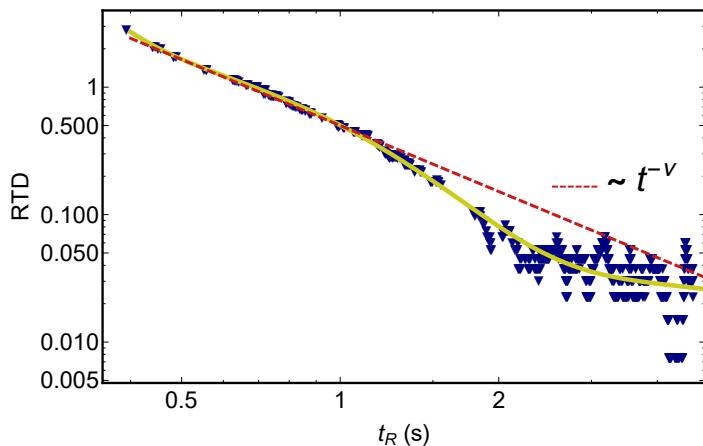


Figura 5-3: Los triangulos azules son los puntos digitalizados de [29] para los tiempos de *Runs*. La linea continua amarilla es un ajuste a partir de tres funciones exponenciales. La recta punteada roja es una ley de potencia con exponente $\nu = 1.72$. Los datos mostrados en esta figura fueron normalizados para poder ser mostrados como una función de densidad de probabilidad.

Inclusive permite reproducir, cualitativamente, el correcto comportamiento funcional de las distribuciones de tiempos de *CCW* & *CW*, y a su vez, de los *Runs* & *Tumbles*. Donde todas las distribuciones de tiempo se ajustan con una serie de exponenciales, permitiendo reproducir comportamientos tanto multi- o mono-exponentiales como leyes de potencia. Por ejemplo, la digitalización de las distribuciones de tiempos de

Runs obtenidas por Berg & Brown [29] permite ajustarlas satisfactoriamente con tres términos exponenciales, como predice la teoría (curva continua amarilla en la figura 5-3). Sin embargo, los tiempos medios y las desviaciones estándar obtenidas de la digitalización no concuerdan con las publicadas². En apoyo a los resultados obtenidos

¹ Se podría diagramar nuevamente la figura 5-1 donde se muestren los MCPs y la kinasa *CheA* como capas independientes donde habría propagación hacia atrás representando el efecto de la adaptación por *CheB*

² Una explicación podría ser que no se utilizaron todos los datos experimentales para una mejor visualización de las curvas obtenidas

en esta tesis se observa un posible comportamiento de ley de potencia en el mismo régimen aunque con otro exponente. Como se ha mostrado en el primer capítulo de resultados, una ley de potencia ha sido encontrada para la distribución de tiempos de *CCW* en la cepa **RP437**. Aunque en este caso difiere el lapso donde se observa³, nuevamente el comportamiento funcional de la ley de potencia es el mismo al obtenido en nuestros resultados⁴. Tu & Grinstein [48] han reproducido satisfactoriamente la ley de potencia utilizando un modelo lineal estocástico de campo medio con dos niveles energéticos, es decir separados por un único umbral. Si vemos en la figura 5-2 la pendiente de la recta está determinada por $w_2 = C_{TR} - C_{TR}$, entonces cuando los umbrales son iguales la pendiente es nula. Esto muestra que el modelo de Tu & Grinstein [48] y el propuesto en esta tesis, desde la perspectiva de redes neuronales son ambos “Perceptrones”. Por otro lado, el modelo conformacional de Duke *et al.* [46] y utilizado por Bai *et al.* [47], con un enfoque más detallado sobre la composición de los motores flagelares, describe con mejor detalle el comportamiento de los flagelos. Desde el punto de vista de las redes neuronales esto sería agregar otra capa más de nodos que representen a las proteínas *FliM* del anillo *C* de los flagelos. Dado que este modelo conformacional no ha sido probado para reproducir las distribuciones de tiempo. Podemos concluir que las ecuaciones diferenciales estocásticas con umbrales críticos permiten modelar satisfactoriamente tanto los tiempos de *CCW* & *CW* como de *Runs* & *Tumbles*, y tienen la ventaja de ser computacionalmente sencillas de implementar para ser anexadas a modelos de locomoción celular. Además, una de las principales características de los algoritmos de “Machine-Learning” es la capacidad de aprendizaje. Tanto las redes neuronales como los Perceptrones pueden ser “entrenados” para encontrar el mejor juego de parámetros. Estos es, que a partir de una distribución de tiempos experimental el algoritmo puede encontrar solo el mejor ajuste para los umbrales críticos.

Incorporando otras tres ecuaciones diferenciales estocásticas para las variables del

³Dado que no hay evidencia que indique que las distribuciones de *CCW* se conserven entre cepas, no hay razón por la cual los regímenes deberían coincidir.

⁴Esto es, una ley de potencia delimitada a tiempos cortos por el máximo de la función y a tiempos largos por un decaimiento exponencial.

sistema de referencia intrínseco se logró modelar exitosamente el comportamiento de *Run & Tumble*, siendo compatible con las mediciones de otras propuestas. Luego, con un reducido número de ecuaciones se ha logrado desarrollar el marco teórico que permite estudiar el impacto de la quimiotaxis en la ecología microbiana de las bacterias flageladas. En la introducción se mostró como, dependiendo de la escala elegida para desarrollar los modelos, el coeficiente de difusión es caracterizado por observables dependientes de esta escala. El enfoque microscópico de las ecuaciones de Langevin nos permitió obtener una relación fenomenológica entre el comportamiento celular, el $Tumble_{bias}$, y la constante de difusión para ambientes isótropos. Es sorprendente observar que teóricamente encontramos que la constante de difusión puede variar cuatro ordenes de magnitud solamente modificando la concentración de Chey-P entre 0 y $5 \mu M$. Además, se pudo reproducir las bandas viajeras de la concentración de bacterias ante la presencia de gradientes o estímulos con oscilaciones periódicas, obteniendo una velocidad de deriva. Es importante notar que en un ninguna situación quimiotáctica simulada se encontró un comportamiento anómalo estable en el desplazamiento medio cuadrático como se propone en la referencia [91]. Por lo contrario, observamos que en la quimiotaxis *E.coli* pasa de regímenes balísticos a difusivos donde solo hay comportamientos anómalos en los breves transitorios. Como se mostró en la sección 1.3 de la Introducción, los enfoques mesoscópicos y microscópicos de Einstein y de Langevin también poseen ambos tipos de regímenes; balísticos y difusivos. Esta capacidad que tiene *E.coli* de utilizar, dependiendo de la situación, cada comportamiento podría ser una respuesta a porque las bacterias flageladas realizan un comportamiento similar al de la materia inanimada como los coloides. El estudio de escenarios con distribuciones inhomogéneas resulta similar a los microambientes heterogéneos que habitan las bacterias oceánicas. Aunque comúnmente se resume el comportamiento quimiotáctico de *E.coli* en un aumento de la duración de los *Runs* en ambientes favorables y un aumento de la frecuencia de *Tumbles* en ambientes desfavorables. En esta tesis probamos que es fundamental la adaptación por metilación de los MCPs para una eficiente respuesta quimiotáctica. Sin embargo, al ir incrementando la complejidad de los escenarios quimiotácticos encontramos que el sistema de adaptación

no retorna el $Tumble_{bias}$ al valor sin estimular, sino que siempre toma valores mayores a este. Por lo tanto, la principal función del feedback negativo es de “memoria” que le proporciona, a la bacteria, una comparación temporal al pasar de zonas con estímulos a regiones libres de tales. Interesantemente, este mecanismo adaptativo le permite responder tanto a situaciones favorables con atractores como desfavorables con repelentes. Dado que, en términos generales, se conserva la maquinaria molecular interna este resultado podría ser válido también para las bacterias marinas.

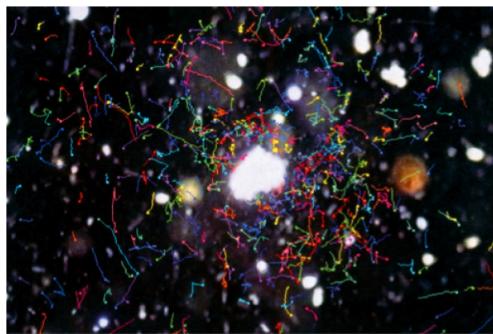


Figura 5-4: Los segmentos de color son las trayectorias de bacterias marinas mientras que los objetos de mayor tamaño corresponden a detritos o fitoplancton. Imagen adaptada de [39].

Por ejemplo, la figura 5-4 muestra el análisis de trayectorias de bacterias flageladas marinas alrededor de detritos y células de fitoplancton [39]. Si comparamos este comportamiento con el de las bacterias simuladas en esta tesis, con respecto a las esferas de atractores, podemos concluir que es suficiente un sistema de señalización adaptativo para que las bacterias flageladas tengan la capacidad de orbitar alrededor de fuentes de químicos favorables. Queda como pregunta

abierta como es la dinámica de sus sistemas adaptativos y en qué se asemejan al de las bacterias entéricas. Por otro lado, se observó a *Pseudoalteromonas haloplanktis* nadando alrededor de algas unicelulares motiles. Con el marco teórico desarrollado estamos en condiciones de evaluar si las esferas también se mueven por el espacio, como impacta la rapidez de las esferas en la capacidad de las bacterias para mantenerse en su vecindad. Aquí, es posible incluir el estudio de la quimioquinesis, que implica modificar las distribuciones de rapidez ante la presencia de químicos. Este tipo de respuesta es comúnmente encontrada en las bacterias marinas flageladas estimándose que es un factor importante para una eficiente búsqueda quimiotáctica [39].

El conjunto de ecuaciones desarrolladas y estudiadas en esta tesis pueden ser aplicadas a contextos más complejos y realistas, por ejemplo: teniendo en cuenta interacciones

entre individuos y con el medio, o la segregación de autoinductores. Solo se deben agregar nuevos términos a las ecuaciones presentadas o introducir ecuaciones adjuntas. Una de las principales razones, es que por primera vez, hemos modelado los *Tumbles* como eventos con duración finita. Esto permite estudiar como el fluido o interacciones con otros individuos modifican la distribución de ángulos y la dispersión de los agentes. A su vez, a medida que se describen y se analizan más especies de bacterias flageladas se pueden encontrar el conjunto de parámetros necesarios para reproducir otros tipos de comportamientos. La metodología implementada en las simulaciones mediante las ecuaciones de Langevin para reproducir las trayectorias en tres dimensiones para *E.coli* no se limita al mundo microscópico. Por ejemplo, Niwa en 1994 introdujo ecuaciones de Langevin, con términos de interacción entre agentes, para modelar las trayectorias de los peces en un cardumen [98]. Ecuaciones con términos estocásticos son ampliamente utilizadas para el modelado de los movimientos colectivos [99, 100]. Más allá de estos fenómenos colectivos, el estudio de la quimiotaxis a nivel individuo es el punto de partida para el estudio de la detección y navegación de organismos multicelulares, ya sean micro o macroscópicos. En los organismos pluricelulares los mecanismos de detección de señales y la toma de decisiones ocurre mediante la interacción colectiva de células especializadas organizadas en tejidos u órganos. Aunque los mecanismos por los cuales los individuos logran censar y analizar el medio en el cual se desplazan difieren ampliamente, los comportamientos emergentes podrían ser similares independiente de la escala del organismo. Se puede englobar estos conceptos como algoritmos de búsqueda [101]. La alta complejidad que tienen los organismos superiores hace que el conocimiento de sus mecanismos para navegar en gradientes químicos tenga un lento progreso, uno de los motivos por los cuales hemos decidido en primer instancia estudiar microorganismos. La búsqueda de alimentos o lugares favorables es similar a la búsqueda de mínimos o máximos comúnmente realizado en la ciencia de la computación. Diversos tipos de algoritmos han sido desarrollados para encontrar eficientemente estos extremos en funciones multi-dimensionales. Un ambiente heterogéneo de un atractor tendrá diversas zonas donde la concentración es máxima, luego el fin de la quimiotaxis es encontrar estas regiones. Lo primero que

requiere un sistema para realizar una búsqueda es una memoria para poder comparar datos. Por ejemplo, el método más simple para hallar raíces de funciones continuas es el método de la bisección. El primer paso de tal algoritmo se basa en que el signo de un valor que este a la derecha de la raíz debe ser opuesto al signo de un valor a la izquierda. Aunque resulte muy sencillo pensar en comparar valores de una función no es nada trivial en como un sistema biológico puede llevar a cabo esta tarea de almacenar información y compararla. Cuando se simuló el escenario con esferas de atractores se obtuvo que las células mutantes no poseen la capacidad de permanecer entre y alrededor de las esferas. Fue por ello, que concluimos que el efecto de quitar un atractor, siendo similar al de agregar un repelente, es fundamental para poder permanecer en estas zonas favorables. Con esfuerzo, podemos hacer una analogía entre las zonas con presencia y ausencia de atractores y los puntos con distinto signo que delimitan la posición de una raíz. Es decir, el mecanismo de adaptación mediante la proteína reguladora de respuesta CheB, le confiere a las células la capacidad de determinar dos regiones con propiedades opuestas siendo el análogo biológico al primer paso del algoritmo de la bisección. Por otro lado, algoritmos para hallar máximos o mínimos, como el Nelder-Mead, comparan distintos valores de la función al mismo tiempo y se “mueven” sobre la función en cuestión. Esta es una gran diferencia con la búsquedas que realizan los organismos, simplemente porque no pueden estar en más de un lugar al mismo tiempo. En consecuencia, los organismos deben realizar mediciones temporales que serán comparadas posteriormente con nuevas mediciones en otra posición del espacio. De todos modos, el algoritmo de Nelder-Mead avanza exponencialmente sobre los puntos que resultan favorables para su tarea y se comprime dramáticamente sobre situaciones no favorables⁵. Siendo este comportamiento análogo a como el *Run & Tumble* alterna entre comportamientos balísticos y difusivos dependiendo de la naturaleza del ambiente. Una de las principales diferencias entre métodos de búsqueda computacionales y biológicos es que en los primeros el

⁵El algoritmo funciona comparando el valor de distintos puntos ubicados a lo largo de la función a estudiar. El peor valor es reemplazado por un nuevo, cuando este nuevo punto es mejor que todos los restantes el algoritmo avanza exponencialmente sobre la dirección de este nuevo valor. Pero, si este nuevo punto no es mejor que los restantes el algoritmo se comprime sobre su mejor punto.

objetivo es encontrar los máximos y mínimos de las funciones. Los pasos lógicos de estos algoritmos hacen que una vez encontrados estos requisitos el algoritmo no pueda escapar de esta región. Desde un punto de vista biológico esto produciría un alto riesgo de predación, es por ello que observamos que una bacteria visita varias de las esferas de atractores, en vez de permanecer siempre en la misma. Por lo tanto, resulta que la quimiotaxis de microorganismos y navegación de organismos multicelulares es un campo en común con las ciencias de la computación. Donde los comportamientos emergentes comparten similitudes con los algoritmos de optimización permitiendo una transferencia de conocimiento en ambas direcciones entre estas dos ciencias.

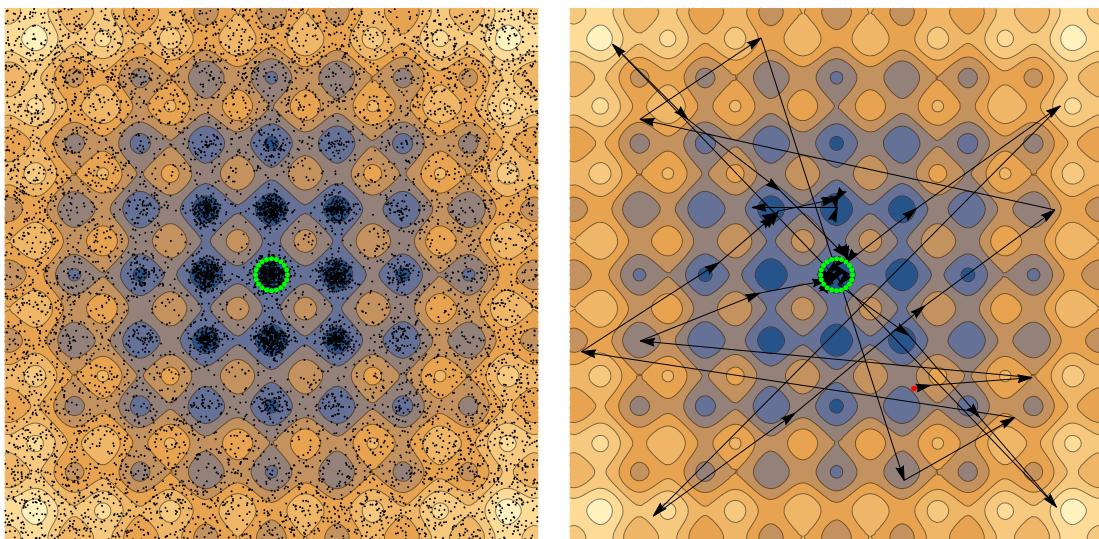


Figura 5-5: Izquierda: Posición de 10000 bacterias sobre los contornos de la función de prueba “Rastrigin”. Dado que esta función determina una superficie, se modificó a un problema 3D y se invirtieron los mínimos por máximos de concentración de un repelente. De este modo se logró obtener un algoritmo que puede encontrar el máximo global situado en la recta sobre el eje z . Reinvirtiendo el problema y llevándolo a 2D se encuentra el mínimo global en el punto $(0,0)$ determinado por el anillo verde. Derecha: Trayectoria, sobre el plano xy , de una única bacteria de la población donde el punto rojo marca su posición inicial.

En el gráfico de la izquierda de la figura 5-5 se muestra como se utilizó una población de 10000 “bacterias quimiotácticas” para hallar el mínimo global de la función de prueba “Rastrigin”. Esta función posee su mínimo global en el centro de coordenadas⁶ justamente región en la cual observamos mayor densidad de bacterias. En el gráfico de la derecha se muestra la trayectoria sobre el plano xy de una única bacteria, donde podemos ver que encuentra varios mínimos antes de encontrar el global. Poder utilizar

⁶En verde se muestra un anillo con un radio de 10 unidades, toda bacteria dentro de el esta en la vecindad del mínimo global

estos algoritmos como métodos eficientes en problemas de optimización no es trivial y se debe trabajar principalmente en su costo computacional. Interesantemente, simulando solo 20 s de esta población es suficiente para que diversas bacterias encuentren el mínimo global. La implementación de algoritmos basados en el comportamiento de *E. coli* es una tema actual en desarrollo [102–104]. Es importante remarcar que los parámetros utilizados en esta búsqueda fueron ajustados a partir de datos experimentales. Esto implica que las bacterias estudiadas experimentalmente están optimizadas por la naturaleza. Sin embargo, sería interesante permitir un auto-entrenamiento de las bacterias para analizar que conjunto dentro del espacio de parámetros permite una eficiente búsqueda. Como conclusión final, las simulaciones implementadas y los observables utilizados para el análisis de ellas poseen un campo de aplicación significativamente mayor al de las bacterias flageladas entéricas. El trabajo presentado en esta tesis puede ser el punto de partida para futuros trabajos en distintas direcciones.

Bibliografía

- [1] Uri Gophna, Eliora Z.Ron, and Dan Graur. Bacterial type iii secretion systems are ancient and evolved by multiple horizontal-transfer events. *Gene*, 312:151–163, 2003.
- [2] Thomas NA, Bardy SL, and Jarrell KF. The archaeal flagellum a different kind of prokaryotic motility. *FEMS Microbiol Rev.*, 25:147–74, 2001.
- [3] Berg H. *E.coli in Motion*. Springer, 2004.
- [4] Wilkens S. Rotary molecular motors. *Adv Protein Chem.*, 71:345–82, 2005.
- [5] Sowa Y. and Berry R.M. Bacterial flagellar motor. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 41:103–132, 2008.
- [6] G. Oster and H. Wang. Why is the mechanical efficiency of f1-atpase so high? *J Bioenergy Biomembr*, 35:459, 2000.
- [7] Challis KJ and Jack MW. Energy transfer in a molecular motor in the kramers regime. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, 88:042114, 2013.
- [8] Wadhams GH and Armitage JP. Making sense of it all: bacterial chemotaxis. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 12:1024–37, 2004.
- [9] Blat Y and Eisenbach M. Mutants with defective phosphatase activity show no phosphorylation-dependent oligomerization of chez. the phosphatase of bacterial chemotaxis. *J Biol Chem.*, 271:1232–6, 1996.

- [10] J. Yuan and H. C. Berg. Ultrasensitivity of an adaptive bacterial motor. *J Mol Biol.*, 425:1760–4, 2013.
- [11] Sourjik V and Berg HC. Binding of the escherichia coli response regulator cheY to its target measured in vivo by fluorescence resonance energy transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99:12669–74, 2002.
- [12] Tu Y, Shimizu TS, and Berg HC. Modeling the chemotactic response of *Escherichia coli* to time-varying stimuli. *PNAS*, 105:14855–60, 2008.
- [13] Bren A and Eisenbach M. Changing the direction of flagellar rotation in bacteria by modulating the ratio between the rotational states of the switch protein flim. *J. Mol. Biol.*, 312:699–709, 2001.
- [14] Morton-Firth CJ and Bray D. Predicting temporal fluctuations in an intracellular signalling pathway. *J Theor Biol.*, 192:117–28, 1998.
- [15] Korobkova E, Emonet T, Vilar JM, Shimizu TS, and Cluzel P. From molecular noise to behavioural variability in a single bacterium. *Nature*, 428:574–8, 2004.
- [16] P. Cluzel, M. Surette, and S Leibler. An ultrasensitive bacterial motor revealed by monitoring signaling proteins in single cells. *Science*, 287:1652–1655, 2000.
- [17] Dobell C. *Antony van Leeuwenhoek and his “little animals”*. Russell and Russell, New York, N.Y, 1958.
- [18] Perrin J. Mouvement brownien et molécules. *J. Phys. Theor. Appl.*, 9:5–39, 1910.
- [19] Murray J. *Mathematical Biology I: An introduction*. Springer, 2002.
- [20] Einstein A. Investigations on the theory of the brownian movement. *Ann. Phys*, 34:591, 1911.
- [21] Vicenç Méndez, Frederic Bartumeus, and Daniel Campos. *Stochastic foundations in movement ecology*. Springer, 2013.

- [22] P. Langevin. Sur la theorie du mouvement brownien. *Acad. Sci. Paris*, 146:530–333, 1908.
- [23] H. Risken. *The Fokker-Planck Equation: Methods of Solution and Applications*. Springer, 1984.
- [24] Murray J. *Mathematical Biology II: Spatial Models and Biomedical applications*. Springer, 2003.
- [25] Taktikos J, Stark H, and Zaburdaev V. How the motility pattern of bacteria affects their dispersal and chemotaxis. *PLoS ONE*, 8(12):e81936, 2013.
- [26] Qixian Cai, Zhaojun Li, Qi Ouyang, Chunxiong Luo, and Vernita D. Gordon. Singly flagellated pseudomonas aeruginosa chemotaxes efficiently by unbiased motor regulation. *mBio*, 7:e00013–16, 2016.
- [27] Xie L1, Altindal T, Chattopadhyay S, and Wu XL. From the cover: Bacterial flagellum as a propeller and as a rudder for efficient chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108:2246–51, 2011.
- [28] L. Turner, W. S. Ryu, and H. C. Berg. Real-time imaging of fluorescent flagellar filaments. *J. Bacteriol.*, 182:2793–2801, 2000.
- [29] Howard C. Berg and Douglas A. Brown. Chemotaxis in *Escherichia coli* analysed by three-dimensional tracking. *Nature*, 239:500, 1972.
- [30] Howard C. Berg. How to track bacteria. *Rev. Sci. Instrum.*, 42:868, 1971.
- [31] E. Korobkova, T. Emonet, J. M. G. Vilar, T. S. Shimizu, and P. Cluzel. From molecular noise to behavioural variability in a single bacterium. *Nature*, 428:574–578, 2004.
- [32] Leal L. *Advanced Transport Phenomena: Fluid Mechanics and Convective Transport Processes*. Cambridge University Press, 2007.
- [33] Hoyuelos M. *Introducción al no equilibrio. Mecánica estadística y termodinámica*. Editorial Reverte, 2017.

- [34] Jeffrey S. Guasto, Roberto Rusconi, and Roman Stocker. Fluid mechanics of planktonic microorganisms. *Annu. Rev. Fluid Mech.*, 44:373–400, 2012.
- [35] E. M. Purcell. Life at low Reynolds number. *American J. of Phys.*, 45:3, 1977.
- [36] Josep M. Gasol and David L. Kirchman. *Microbial Ecology of the Oceans, 3rd Edition*. Wiley-Blackwell, 2018.
- [37] J. R. N. LAZIER and K. H. MANN. Turbulence and the diffusive layers around small organisms. *Deep-Sea Research*, 36:1721–173, 1989.
- [38] Taylor JR and Stocker R. Trade-offs of chemotactic foraging in turbulent water. *Science*, 338:675–679, 2009.
- [39] Roman Stocker and Justin R. Seymour. Ecology and physics of bacterial chemotaxis in the ocean. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76:792–812, 2012.
- [40] Katepalli R. Sreenivasan. Turbulent mixing: A perspective. *Proc Natl Acad Sci*, 201800463, 2018.
- [41] Drescher K, Dunkel J, Cisneros L, Ganguly S, and Goldstein R. Fluid dynamics and noise in bacterial cell–cell and cell–surface scattering. *Proc Natl Acad Sci*, 108:10940–10945, 2011.
- [42] Rusconi R, Guasto J, and Stocker R. Bacterial transport suppressed by fluid shear. *Nature Physics*, 10:212–217, 2014.
- [43] Malits A1, Peters F, Bayer-Giraldi M, Marrasé C, Zoppini A, Guadayol O, and Alcaraz M. Effects of small-scale turbulence on bacteria: a matter of size. *Microb Ecol.*, 48:287–99, 2004.
- [44] Peters F, Marrase C, Havskum H, Rassoulzadegan F, Dolan J, Alcaraz M, and Gasol JM. Turbulence and the microbial food web: effects on bacterial losses to predation and on community structure. *J Plankton Research*, 24, 2002.

- [45] Nicholas C. Darnton, Linda Turner, Svetlana Rojevsky, and Howard C. Berg. On torque and tumbling in swimming *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 189:1756, 2007.
- [46] T. A.J Duke, N. Le Nove're, and D. Bray. Conformational spread in a ring of proteins: A stochastic approach to allostery. *J. Mol. Biol.*, 308:541–553, 2001.
- [47] Fan Bai, Richard W. Branch, Dan V. Nicolau, Teuta Pilizota, Bradley C. Steel, Philip K. Maini, and Richard M. Berry. Conformational spread as a mechanism for cooperativity in the bacterial flagellar switch. *Science*, 327:685, 2010.
- [48] Tu Y and Grinstein G. How white noise generates power-law switching in bacterial flagellar motors. *Phys Rev Lett*, 94:208101–104, 2008.
- [49] Tindall MJ, Maini PK, Armitage JP, Singleton C, and Mason A. Intracellular signalling during bacterial chemotaxis. *SEB Exp Biol Ser.*, 61:161–74, 2008.
- [50] T. Hillen and K. J. Painter. A user's guide to pde models for chemotaxis. *J. Math. Biol.*, 58:183–217, 2009.
- [51] S. Schulmeister, M. Ruttorf, S. Thiem, D. Kentner, D. Lebiedz, and V. Sourjik. Protein exchange dynamics at chemoreceptor clusters in escherichia coli. *PNAS*, 105:6403–6408, 2008.
- [52] M. Sim, S. Koirala, D. Picton, H. Strahl, P. A. Hoskisson, and C. V. Rao. Growth rate control offlagellar assembly inescherichiacolistrain rp437. *SCI REP-UK*, 41189, 2017.
- [53] T. Hillen and K. J. Painter. Heightened sensitivity of a lattice of membrane receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 96:10104–10108, 1999.
- [54] Sourjik V and Berg HC. Receptor sensitivity in bacterial chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99:123–127, 2002.

- [55] Shimizu TS, Tu Y, and Berg HC. A modular gradient-sensing network for chemotaxis in *Escherichia coli* revealed by responses to time varying stimuli. *Mol Syst Biol*, 6:382, 2010.
- [56] Vaknin A and Berg HC. Physical responses of bacterial chemoreceptors. *J Mol Biol*, 366:1416–23, 2007.
- [57] Mears PJ, Koirala S, Rao CV, Golding I, and Chemla YR. Escherichia coli swimming is robust against variations in flagellar number. *eLife*, 3:e01916, 2014.
- [58] Shun Terasawa, Hajime Fukuoka, Yuichi Inoue, Takashi Sagawa, Hiroto Takahashi, and Akihiko Ishijima. Coordinated reversal of flagellar motors on a single escherichia coli cell. *Biophys J.*, 100:2193–22003, 2011.
- [59] Bochud T and Challet D. Optimal approximations of power laws with exponentials: Application to volatility models with long memory. *Quantitative Finance*, 7:585–589, 2007.
- [60] Chu-Shore J, Westover MB, and Bianchi MT. Power law versus exponential state transition dynamics: Application to sleep-wake architecture. *PLoS ONE*, 5:e14204, 2010.
- [61] Sims DW, Southall EJ, Humphries NE, Hays GC, Bradshaw CJ, Pitchford JW, James A, Ahmed MZ, Brierley AS, Hindell MA, Morritt D, Musyl MK, Righton D, Shepard EL, Wearmouth VJ, Wilson RP, Witt MJ, and Metcalfe JD. Scaling laws of marine predator search behaviour. *Nature*, 451:1098–102, 2008.
- [62] W. J. Reed and B. D. Hughes. Power-law distributions from exponential processes: an explanation for the occurrence of long-tailed distributions in biology and elsewhere. *Scientiae Mathematicae Japonicae*, 58:473 – 483, 2003.
- [63] S M Block, J E Segall, and H C Berg. Impulse responses in bacterial chemotaxis. *Cell*, 31:215–226, 1982.

- [64] Albert L. Lehninger and Michael M. Cox. *Principios de Bioquímica*. Ediciones Omega, 2005.
- [65] Monod J, Wyman J, and Changeux JP. On the nature of allosteric transitions: A plausible model. *J Mol Bio.*, 12:88–118, 1965.
- [66] Johannes M Keegstra, Keita Kamino, François Anquez, Milena D Lazova, Thierry Emonet, and Thomas S Shimizu. Phenotypic diversity and temporal variability in a bacterial signaling network revealed by single-cell fret. *Elife*, 6:e27455, 2017.
- [67] Remy Colin, Christelle Rosazza, Ady Vaknin, and Victor Sourjik. Multiple sources of slow activity fluctuations in a bacterial chemosensory network. *Elife*, 6:e26796, 2017.
- [68] Daniel T. Gillespie. The mathematics of brownian motion and johnson noise. *Am. J. Phys.*, 64:225, 1996.
- [69] S M Block, J E Segall, and H C Berg. Adaptation kinetics in bacterial chemotaxis. *J Bacteriol.*, 154:312–323, 1983.
- [70] M. Schienbein and H. Gruler. Langevin equation, fokker-planck equation and cell migration. *Bull. Mathem. Biology*, 55:585, 1993.
- [71] P. Romanczuk, M. Bar, B. Lindner W. Ebeling and, and L. Schimansky-Geier. Active brownian particles: From individual to collective stochastic dynamics. *Eur. Phys. J. Special Topics*, 202:1–162, 2012.
- [72] Cheong FC, Wong CC, Gao Y, Nai MH, Cui Y, Park S, Kenney LJ, and Lim CT. Rapid high-throughput tracking of bacterial motility in 3d via phase-contrast holographic video microscopy. *Biophys J.*, 108:1248–56, 2015.
- [73] Berg H. *Random walks in Biology*. Princeton university Press, 1983.
- [74] Lovely P.S. and Dalhquist F.W. Statistical measures of bacterial motility and chemotaxis. *J. theor. Biol.*, 50:477–496, 1975.

- [75] Schnitzer M.J. Theory of continuum random walks and application to chemotaxis. *Physical Review E*, 48:2553–2568, 1993.
- [76] Condat CA, Jäckle J, and Menchón SA. Randomly curved runs interrupted by tumbling: A model for bacterial motion. *Phys Rev E*, 72:021909, 2005.
- [77] Saragosti J, Silberzan P, and Buguin A. Modeling e. coli tumbles by rotational diffusion. implications for chemotaxis. *PLoS ONE*, 7(4):e35412, 2012.
- [78] Reynolds A.M. Truncated levy walks are expected beyond the scale of data collection when correlated random walks embody observed movement patterns. *J. R. Soc. Interface*, 9:528–534, 2012.
- [79] Berg H. and Purcell E.M. Physics of chemoreception. *Biophys J*, 20:193–219, 1977.
- [80] J. Saragosti, V. Calvez, N. Bournaveas, B. Perthame, A. Buguin, and P. Silberzan. Directional persistence of chemotactic bacteria in a traveling concentration wave. *PNAS*, 108:16235–16240, 2011.
- [81] Kalinin YV, Jiang L, Tu Y, and Wu M. Logarithmic sensing in escherichia coli bacterial chemotaxis. *Biophys J.*, 96:2439–48, 2009.
- [82] Saragosti J., Calvez V., Bournaveas N., Buguin A., silberzan P., and Perthame B. Mathematical description of bacterial traveling pulses. *PLoS Comput Bio*, 6:e1000890, 2010.
- [83] Murialdo SE, Sendra GH, Passoni LI, Arizaga R, Gonzalez JF, Rabal H, and Trivi M. Analysis of bacterial chemotactic response using dynamic laser speckle. *J Biomed Opt.*, 14:064015, 209.
- [84] Adler J. Chemotaxis in bacteria. *Science*, 153:708–716, 1966.
- [85] Keller EF and Segel LA. Traveling bands of chemotactic bacteria: a theoretical analysis. *J Theor Biol*, 30:235–48, 1971.

- [86] M. Ben Amar. Collective chemotaxis and segregation of active bacterial colonies. *Scientific Reports*, 6:21269, 2016.
- [87] Chuan Xue. Macroscopic equations for bacterial chemotaxis: integration of detailed biochemistry of cell signaling. *J. Math. Biol.*, 70:1–44, 2015.
- [88] T. Hillen and K. J. Painter. A user’s guide to pde models for chemotaxis. *J. Math. Biol.*, 58:183–217, 2009.
- [89] Jiang L., Ouyang Q., and Tu Y. Quantitative modeling of escherichia coli chemotactic motion in environments varying in space and time. *PLoS Comput Biol*, 6:e1000735, 2010.
- [90] Zhuang J, Wei G, Wright Carlsen R, Edwards MR, Marculescu R, Bogdan P, and Sitti M. Analytical modeling and experimental characterization of chemotaxis in serratia marcescens. *Phys Rev E*, 89:052704, 2014.
- [91] Colin R and Sourjik V. Emergent properties of bacterial chemotaxis pathway. *Curr Opin Microbiol.*, 639:24–33, 2017.
- [92] Pittman MS, Goodwin M, and Kelly DJ. Chemotaxis in the human gastric pathogen helicobacter pylori: different roles for chev and the three chev paralogues, and evidence for chev2 phosphorylation. *Microbiology*, 147:2493–2504, 2001.
- [93] Freter R and O’Brien PCM. Role of chemotaxis in the association of motile bacteria with intestinal mucosa: chemotactic responses of vibrio cholerae and description of motile nonchemotactic mutants. *Infect. Immun.*, 34:215–221, 1981.
- [94] et al O’Toole R. The chemotactic response of vibrio anguillarum to fish intestinal mucus is mediated by a combination of multiple mucus components. *J. Bacteriol.*, 181:4308–43171, 1999.

- [95] Azam F. Microbial control of oceanic carbon flux: the plot thickens. *Science*, 280:694–696, 1998.
- [96] et al Azam F. The ecological role of water-column microbes in the sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 10:257–263, 1983.
- [97] Szurmaj H. and Ordal G.W. Diversity in chemotaxis mechanisms among the bacteria and archaea. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 68:301–319, 2004.
- [98] Niwa H.S. Self-organizing dynamic model of fishschooling. *J. Theor. Biol.*, 171:123–136, 1994.
- [99] Tamás Vicsek, András Czirók, Eshel Ben-Jacob, Inon Cohen, and Ofer Shochet. Novel type of phase transition in a system of self-driven particles. *Physical Review Letters*, 75:1226–1229, 1995.
- [100] Ugo Lopez, Jacques Gautrais, Iain D. Couzin, and Guy Theraulaz. From behavioural analyses to models of collective motion in fish schools. *Interface Focus*, 2:693–707, 2012.
- [101] Andrew M. Hein, Francesco Carrara, Douglas R. Brumley, Roman Stocker, and Simon A. Levin. Natural search algorithms as a bridge between organisms, evolution, and ecology. *PNAS*, 34:9413–9420, 2016.
- [102] Cuicui Yang aand Junzhong Ji aand Jiming Liu and Baocai Yin. Bacterial foraging optimization using novel chemotaxis and conjugation strategies. *Information Sciences*, 363:72–95, 2016.
- [103] Bao Pang, Yong Song, Chengjin Zhang, Hongling Wang, and Runtao Yang. Bacterial foraging optimization based on improved chemotaxis process and novel swarming strategy. *Applied Intelligence*, 2018.
- [104] Sibylle D. Müller, Jarno Marchetto, Stefano Airaghi, and Petros Koumoutsakos. Optimization based on bacterial chemotaxis. *IEEE TRANSACTIONS ON EVOLUTIONARY COMPUTATION*, 6, 2002.