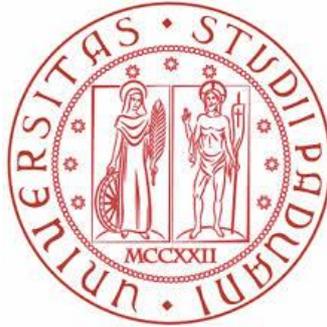


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Fisica e Astronomia "Galileo Galilei"



CORSO DI LAUREA TRIENNALE IN FISICA

Studio del confinamento spaziale di batteri in soluzione

Relatore: Prof. GIAMPAOLO MISTURA

Laureanda: GIULIA COLZANI

Anno Accademico 2015/2016

I now saw very distinctly that these were little eels or worms... lying huddled together and wriggling, just as if you saw with your naked eye a whole tubful of very little eels and water, the eels moving about in swarms: and the whole water seemed to be alive with the multitudinous animalcules. For me this was among all the marvels that I have discovered in nature the most marvelous of all, and I must say that, for my part, no more pleasant sight has yet met my eye than this of so many thousand of living creatures in one small drop of water, all huddling and moving, but each creature having its own motion.

Letter to the Royal Society of London, 1676, Antoni van Leeuwenhoek

INDICE

INTRODUZIONE	7
1. VITA A BASSI NUMERI DI REYNOLDS	9
1.1 CENNI DI FLUIDODINAMICA	9
1.2 VITA A BASSI NUMERI DI REYNOLDS	10
1.3 I BATTERI	10
1.4 LA MATERIA ATTIVA	11
2. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE	14
2.1 PREPARAZIONE DEL CAMPIONE BIOLOGICO	14
2.2 ASSEMBLAGGIO DEL CAMPIONE	16
3. APPARATO SPERIMENTALE E SOFTWARE	17
3.1 PREPARAZIONE DEL MICROSCOPIO E DELLA TELECAMERA.....	17
3.2 SOFTWARE PER L'ANALISI DEL CAMPIONE	18
3.3 SOFTWARE PER L'ANALISI DELLE IMMAGINI	19
4. ANALISI DEI DATI	20
4.1 DATI SPERIMENTALI	20
4.2 CONFRONTO CON LA SIMULAZIONE.....	23
4.3 PROBLEMATICHE.....	23
CONCLUSIONI	25
BIBLIOGRAFIA	27

INTRODUZIONE

Stormi di uccelli, banchi di pesci e sospensioni batteriche sono sistemi che apparentemente non hanno nulla a che fare l'uno con l'altro. Questo però non è vero: sono tutti composti da individui simili che interagiscono tra di loro, e tale interazione permette il manifestarsi di sorprendenti comportamenti collettivi, che consentono a questi organismi di adattarsi meglio alla particolare situazione in cui si trovano, sia essa una migrazione, la difesa da un predatore o la ricerca del cibo. Sistemi di questo genere ricadono all'interno della categoria della materia attiva, che comprende i sistemi formati da singoli individui che assorbono energia dall'ambiente circostante e la utilizzano, oltre che per le funzioni metaboliche, per muoversi e scambiare informazioni gli uni con gli altri.

Studiare sistemi macroscopici di materia attiva costituisce chiaramente una sfida ardua, dato che è quasi sempre impossibile riprodurre i comportamenti in laboratorio e sono quindi necessarie osservazioni all'aperto, caratterizzate da imprevisti, lunghe attese e tempestività: bisogna trovarsi al posto giusto nel momento giusto. Più semplice, d'altra parte, è avere a che fare con sistemi le cui dimensioni sono ridotte, ad esempio le sospensioni batteriche: le colture sono facilmente gestibili e crescono in fretta, e le misure possono essere condotte in laboratorio. Sistemi di questo genere sono quelli con cui avremo a che fare durante questa tesi.

Entrando nel dettaglio, alcuni dei comportamenti più interessanti si manifestano quando i batteri si trovano in prossimità di pareti con geometrie ben definite oppure quando la sospensione è confinata in uno spazio molto ridotto. Sarà proprio questo aspetto quello che analizzeremo in profondità. In particolare, se si racchiude una goccia di sospensione batterica tra due vetrini molto vicini (lo spessore è di qualche centinaia di micrometri), si osserva che i batteri tendono ad accumularsi alle pareti. È bene precisare che, dato che abbiamo a che fare con materia attiva, tali batteri devono essere motili, ovvero in grado di muoversi autonomamente grazie a qualche meccanismo di propulsione, e non essere delle particelle passive. Infatti, se nella goccia di sospensione ci fossero solo batteri non motili, non ci sarebbe nessun effetto degno di nota, ma la densità sarebbe costante in tutta la goccia.

In questa tesi ci proponiamo quindi di studiare l'effetto del confinamento spaziale di batteri in soluzione, riproducendo la curva che indica il numero di batteri in funzione della distanza dal vetrino inferiore, e di verificare se e come lo spessore del campione analizzato e la sua densità influiscono sul comportamento del sistema.

CAPITOLO 1

Vita a bassi numeri di Reynolds

Nell'esperienza di tutti i giorni abbiamo a che fare con corpi immersi in liquidi: pensiamo ad esempio ad un pesce in un laghetto. Il nostro pesce, per nuotare, non deve far altro che flettere periodicamente la coda. Cosa accadrebbe però se il pesce diventasse sempre più piccolo? Raggiunta una certa dimensione, pur continuando a muovere la coda, non riuscirebbe più a spostarsi. Una situazione analoga si ottiene sostituendo l'acqua del laghetto con un liquido ben più viscoso, per esempio con della glicerina: le dimensioni del pesce rimarrebbero invariate, ma ogni suo tentativo di nuotare sarebbe comunque vano (ammesso che possa sopravvivere nella glicerina). Cos'è successo?

1.1 Cenni di fluidodinamica

Prima di continuare, diamo alcuni cenni di fluidodinamica. Un parametro fondamentale per questo campo è il numero di Reynolds, una combinazione adimensionale delle grandezze caratteristiche del problema che si sta trattando, ovvero lunghezza del corpo (L), velocità del corpo rispetto al fluido (U), viscosità (η) e densità (ρ) del fluido:

$$Re = \frac{\rho UL}{\eta} = \frac{\text{termine inerziale}}{\text{termine viscoso}}.$$

Quando tale numero assume valori molto maggiori o molto minori di 1, il flusso entra, rispettivamente, nel regime turbolento o in quello laminare, mentre nel mezzo stanno i regimi intermedi tra i due. Un flusso turbolento è, per esempio, l'acqua che scorre in un fiume, oppure il fumo che esce da una ciminiera (Fig 1). I flussi di tipo laminare, invece, sono più difficili da osservare; vengono in genere riprodotti in laboratorio facendo scorrere molto lentamente del liquido viscoso in un tubo.

Dato che il numero di Reynolds esprime il rapporto tra la forza inerziale e quella viscosa, è evidente che, per i regimi laminari, l'inerzia sarà del tutto trascurabile rispetto al contributo delle forze viscosi. Scrivendo quindi l'equazione di Navier-Stokes, che è una sorta di equazione di Newton per i fluidi, si possono dedurre le proprietà del regime laminare:



Fig 1: Una ciminiera che fuma è un esempio di flusso turbolento

$$\rho \left(\frac{\partial v}{\partial t} + v \cdot \nabla v \right) = -\nabla P + \eta \nabla^2 v.$$

Nel limite di bassi numeri di Reynolds, la parte inerziale dell'equazione diventa trascurabile, e si ottiene l'equazione di Stokes:

$$-\nabla P + \eta \nabla^2 v = 0.$$

Quest'ultima equazione è lineare nella velocità, e, di conseguenza, le soluzioni saranno invarianti per inversione temporale: ciò significa che non c'è nulla che ci permette di distinguere la direzione reale in cui scorre il fluido dal senso inverso, ovvero che due filmati del flusso, uno riprodotto in avanti e uno all'indietro, sono identici. Questo non vale ovviamente per i flussi turbolenti: guardando al contrario il filmato di una ciminiera, si capisce subito che il fumo sta rientrando.

1.2 Vita a bassi numeri di Reynolds

Come conseguenza, gli organismi che vivono a queste scale, per riuscire a nuotare, non possono muoversi a loro piacimento (1) (2): il nostro pesce ne è un esempio lampante. Precisiamo anzitutto il significato di nuotare: consiste nel modificare ciclicamente il proprio corpo in maniera tale da ottenere uno spostamento. A bassi numeri di Reynolds, un teorema, il cosiddetto *teorema della capasanta*, introduce una limitazione alle deformazioni eseguibili per avanzare: se la sequenza dei movimenti compiuti rimane la stessa sotto inversione temporale, il nuotatore non si sposterà. Quindi, né la capasanta né il nostro pesce possono nuotare a bassi numeri di Reynolds, per quanto il movimento sia veloce. Moti di questo tipo vengono detti moti reciproci. Ci sono due maniere per ovviare a questo problema: la prima consiste nell'aggiungere gradi di libertà al sistema (ovvero giunti flessibili all'organismo) in maniera da ottenere deformazioni più complesse ed eliminare l'invarianza sotto inversione temporale (si pensi, ad esempio, alla coda di uno spermatozoo). In alternativa, si può dotare l'animale di strutture chirali (ovvero la cui immagine speculare non è sovrapponibile a sé, come avviene per le mani), ad esempio delle spirali: forniscono la spinta necessaria al moto ruotando attorno al proprio asse e, in virtù della loro chiralità, sotto inversione temporale cambiano verso di avvolgimento (si pensi ad un cavatappi: se girato in un verso si infila nel sughero, se girato nell'altro, invece, ne viene estratto).

La natura ci fornisce molti esempi di esseri viventi adatti a questi regimi: i microrganismi, come batteri e alghe unicellulari (3). Queste cellule sono fornite di flagelli, sottili filamenti attaccati alla loro membrana cellulare: nel caso di alcune alghe d'acqua dolce, i due flagelli posti nella parte anteriore della cellula si muovono come se stessero nuotando a rana, mentre i batteri, in genere, hanno flagelli rigidi che si sviluppano elicoidalmente e ruotano attorno al proprio asse, propellendo la cellula (Fig 2).

1.3 I batteri

I batteri sono cellule di dimensione micrometrica dotate di flagelli che ne rendono possibile il moto. È necessario precisare che non stiamo trattando di esseri dotati di intelligenza propria, quindi non si deve pensare che possano decidere la direzione del loro moto.

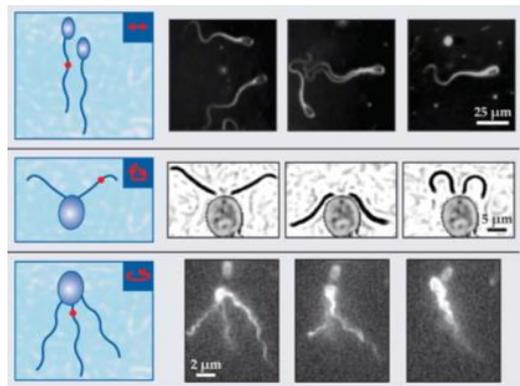


Fig 2: Moto non reciproco di microrganismi (3)

A seconda della specie di batterio con cui abbiamo a che fare, il movimento del flagello, e quindi la traiettoria del batterio, possono essere di tipi diversi (4). La prima distinzione va fatta tra il numero di flagelli posseduti: batteri con un unico flagello sono detti monotrichi, con più di uno peritrichi. Per i primi, il flagello può muoversi solo in due modi: avvolgendosi in senso antiorario o in senso orario, e quindi, rispettivamente, spingendo il batterio in avanti o tirandolo indietro (come se stesse nuotando in retromarcia); tale moto è detto *run and reverse* (Fig 3). Per i batteri peritrichi, invece, la situazione è diversa: quando tutti i flagelli ruotano nello stesso verso, formano una sorta di matassa e sospingono il batterio (*run*); quando poi uno solo dei flagelli cambia verso, la matassa si disfa e il batterio ruota su se stesso (*tumble*), fino a che tutti i flagelli tornano alla sincronia e l'avanzamento riprende; tale moto è detto *run and tumble* (Fig 3). Ricordiamo che siamo a bassi numeri di Reynolds, quindi l'inerzia non conta: prendiamo di nuovo il pesce nel laghetto, se improvvisamente smettesse di nuotare non si arresterebbe immediatamente ma, per inerzia, avanzerebbe ancora un po'; quando il batterio fa la stessa cosa, passando dalla fase di *run* a quella di *tumble*, invece, si ferma nel punto esatto in cui è finita la fase di *run*.

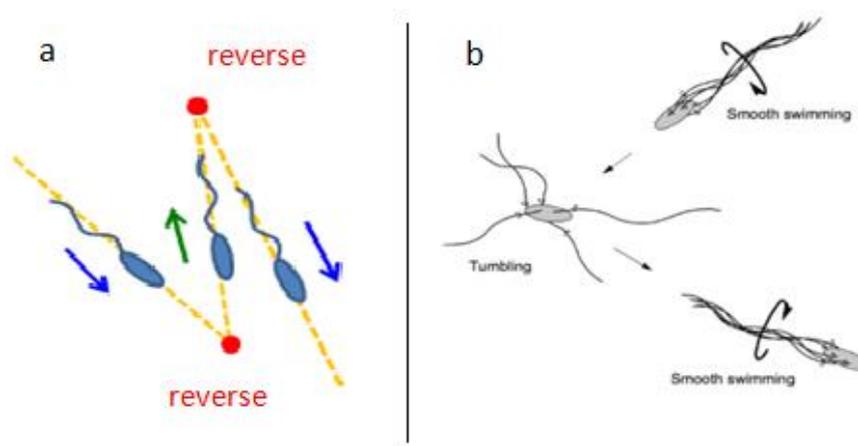


Fig 3: *Run and reverse* (*Pseudomonas Aeruginosa*) (a), *run and tumble* (*Escherichia Coli*) (b)

Il tempo delle fasi di *run* e di *tumble* dipende sia dal tipo di batterio (alcuni batteri, detti *smooth swimmers*, vengono geneticamente modificati per sopprimere il *tumbling*) che dalla concentrazione di sostanze nutritive e nocive presenti: questo fenomeno è detto chemiotassi. Se i recettori posti sulla sua membrana cellulare avvertono la presenza di più zuccheri (o di sostanze tossiche), lo segnalano al motore flagellare che quindi modula i tempi di *run* e di *tumble*, consentendo al batterio di avvicinarsi (o allontanarsi) dalle sostanze rilevate.

1.4 La materia attiva

Le dimensioni caratteristiche dei microrganismi dispersi in mezzi acquosi danno alla sospensione la natura di un colloide. In un sistema di tal genere, il moto browniano, legato al moto di agitazione termica delle particelle e quindi alla temperatura, è il principale responsabile della diffusione delle particelle, e il suo contributo è quantificato dal coefficiente di diffusione (il valore dato si riferisce ad una sospensione di sferette micrometriche in acqua a temperatura ambiente):

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta L} \sim 0,1 \mu m^2/s.$$

Tuttavia, come abbiamo detto sopra, i microrganismi non sono particelle passive, ma sono in grado di assorbire energia dall'ambiente circostante e muoversi autonomamente: questo fa di loro delle *self-propelled particles* (SPP). Per quantificare quale tra il contributo diffusivo e quello dovuto alla propulsione propria della SPP sia quello dominante si ricorre al numero di Peclet:

$$Pe = \frac{UL}{D} = \frac{\text{moto attivo}}{\text{diffusione}},$$

che, come il numero di Reynolds, va confrontato con 1.

Vediamo quindi quali sono le velocità in gioco: un batterio raggiunge velocità di decine di micrometri al secondo, e significa che, in un secondo, può percorrere circa 50 volte la sua lunghezza; d'altra parte, un ghepardo può raggiungere i 110 chilometri orari, ma in un secondo percorre "solo" 25 volte la sua lunghezza: i batteri, alle loro scale, sono molto veloci. Questo ha importanti conseguenze di natura biologica, consente infatti al batterio di procacciarsi in maniera efficace le sostanze necessarie alla sua sopravvivenza. Calcolando quindi il numero di Peclet del sistema di batteri in acqua si ottengono valori intorno al migliaio: il contributo del moto browniano è trascurabile.

Un sistema di questo tipo viene detto colloidale attivo (2), e ricade all'interno della ben più vasta categoria della materia attiva, che raggruppa tutti i sistemi formati da individui simili e dotati di meccanismi di propulsione autonoma. Il moto del singolo individuo non è di particolare interesse, ma il sistema nella sua totalità presenta comportamenti peculiari: basti pensare ai banchi di pesci (Fig 4) e agli stormi di storni (Fig 5) che, pur essendo composti da molti individui che agiscono più o meno indipendentemente l'uno dall'altro, sembrano comportarsi come un'entità unica.



Fig 4: Banco di pesci



Fig 5: Stormo di storni

Anche in sistemi costituiti da batteri si possono osservare fenomeni peculiari, dovuti proprio alla loro natura di SPP, specialmente se li si racchiude in ambienti confinati oppure vicino a pareti con particolari geometrie (5) (6) (7): i batteri, infatti, tendono a nuotare parallelamente alle pareti e ad accumularsi in loro prossimità. Questo diventa di particolare interesse se l'ambiente confinato è un interstizio tra i ripiegamenti dell'intestino oppure negli alveoli polmonari: la possibilità di accumularsi consente ai batteri di formare sottili pellicole, dette biofilm, resistenti agli antibiotici e quindi di proliferare indisturbati; il biofilm può crescere anche su superfici non biologiche, per esempio su protesi e dispositivi medici, con tutte le complicazioni legate al caso. D'altra parte, i biofilm possono anche essere impiegati a fini utili: in alcuni depuratori le acque nere vengono trattate facendole passare attraverso filtri ricoperti di biofilm che metabolizzano la maggior parte dei composti organici nocivi.

La causa dell'accumulo non è ancora compresa pienamente, ma si pensa sia dovuta a motivi idrodinamici (3) (5) (6) (7). Nuotando, il batterio modifica il campo di velocità del liquido che lo circonda in un campo di dipolo; per mantenere la condizione di velocità nulla alla parete, si deve assumere che al di là della stessa, dove in effetti non c'è liquido, ci sia comunque un campo immagine fittizio, la cui sovrapposizione con il campo di dipolo dà il campo totale che interagisce con il batterio. Di conseguenza, il batterio sente una forza che lo attira alla parete e lo allinea ad essa. A questo punto, prosegue il suo moto parallelamente ad essa, fino a che il *tumbling* non gli farà cambiare direzione.

Questa tendenza a nuotare lungo le pareti permette di costruire dispositivi che per funzionare sfruttano l'energia fornita dai batteri. Un primo esempio è quello dell'ingranaggio micrometrico di Fig 6 (8): l'asimmetria dei denti unita al moto dei batteri lungo le pareti porta ad una forza netta (su ciascun dente) che fa girare l'ingranaggio. Un altro esempio, invece, è quello della camera mostrata in Fig 7 (9), che è divisa in due da un setto costituito da tanti piccoli imbuti. Il moto lungo le pareti fa sì che ci sia uno spostamento di batteri da una parte all'altra della camera; inoltre, gli imbuti fungono anche da valvole perché, a meno che il batterio non passi esattamente attraverso il buco, verrà rispedito indietro.

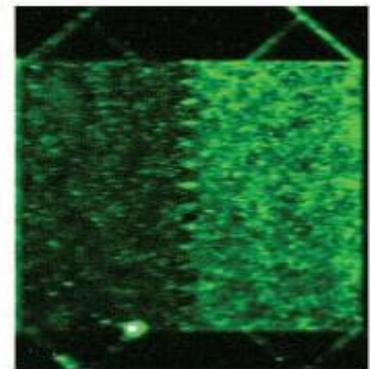
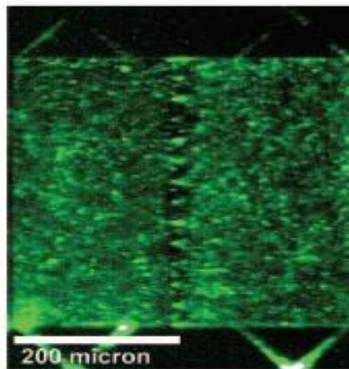
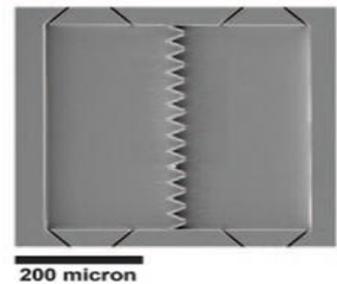
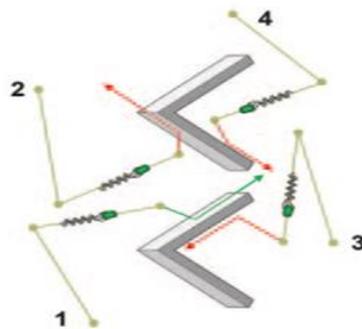
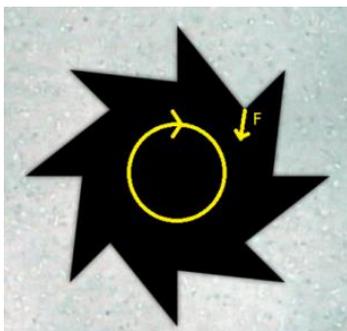


Fig 6: Ingranaggio micrometrico; nella seconda immagine si vede chiaramente come il moto dei batteri può far girare il dispositivo. (8)

Fig 7: La geometria della parete centrale permette la segregazione dei batteri in una delle due camere. (9)

Ciò che ci proponiamo di fare in questa tesi consiste nell'analizzare, tramite metodi di microscopia ottica e software appositamente sviluppati, il profilo di densità di batteri in una goccia di soluzione racchiusa tra due vetrini, variando di volta in volta la spaziatura, al fine di visualizzare l'accumulo alla parete e confrontare i nostri dati con quelli della letteratura (7).

CAPITOLO 2

Preparazione del campione

Il campione biologico su cui siamo andati ad effettuare le misure era costituito da una sospensione di batteri (*Escherichia Coli* e *Pseudomonas Aeruginosa*) in soluzione acquosa, con concentrazioni più o meno elevate. Per entrambi i batteri abbiamo scelto il fenotipo *wild type*, ovvero il ceppo selvatico, quello più frequente in natura.

Gli step eseguiti, ed in seguito spiegati nel dettaglio, sono i seguenti:

1. Preparazione della piastra di agar
2. Crescita delle colonie
3. Inoculo di singola colonia in LB
4. Crescita overnight
5. Diluizione 1/100 in TB (sviluppo dei flagelli)
6. Misura dell'OD
7. Centrifuga
8. Dispersione in BMB

2.1 Preparazione del campione biologico

La parte che ha richiesto più tempo ed energie è stata la preparazione del materiale biologico su cui effettuare le misure: ciò che più ci interessava era la motilità dei batteri, ovvero quella che dà loro il carattere di SPP. Ottenere soluzioni con elevate concentrazioni (di $1 \times 10^8 \div 1 \times 10^9$ cfu/ml, dove cfu sta per unità formanti colonia e indica il numero di batteri) di batteri vivi non ha mai costituito un problema, la difficoltà stava tutta nella motilità dei batteri che, una volta analizzato il campione, risultava assente o ridotta.

Tutte le prove effettuate avevano in comune i primi step, di seguito elencati. Per far crescere i batteri, siamo sempre partiti da una fialetta di batteri congelati a -80° centigradi: con un'ansa sono stati strisciati su di una piastra di agar (un terreno di coltura solido molto usato in biologia, al quale si aggiungono sostanze nutrienti) affinché iniziassero a duplicarsi formando le colonie. Il giorno dopo le colonie erano cresciute e visibili; tra queste si è prelevata una colonia pura (quelle circolari in Fig 8) e la si è dispersa in una fialetta

contenente LB (Luria Broth), una soluzione con aminoacidi ed estratti di lieviti che la rendono ricca di carboidrati, per una notte.

Da questo punto in poi abbiamo provato molte varianti, alcune delle quali hanno richiesto diversi giorni per essere portate a termine. La soluzione è stata trovata quando abbiamo replicato la procedura descritta in (10): un certo volume della soluzione di batteri in LB è stata inoculata in una fialetta contenente TB (Tryptone Broth) in diluizione 1/100, che è simile all'LB ma più povero (non ha gli estratti di lievito), e di conseguenza stimola il processo di formazione flagellare nelle cellule.

La diluizione e i tempi scelti sono molto importanti perchè la crescita dei batteri è fortemente correlata alla quantità di nutrienti disponibile (Fig 9). La fase iniziale consiste in duplicazioni molto veloci (fase esponenziale); successivamente si entra in un regime in cui il numero di nuove cellule prodotte è bilanciato dal numero di cellule che muoiono (fase stazionaria); infine, le cellule iniziano a morire (fase di morte). Passando dall'una all'altra fase, la soluzione si impoverisce sempre più di nutrienti, fino a portare, appunto, alla morte delle cellule (4).

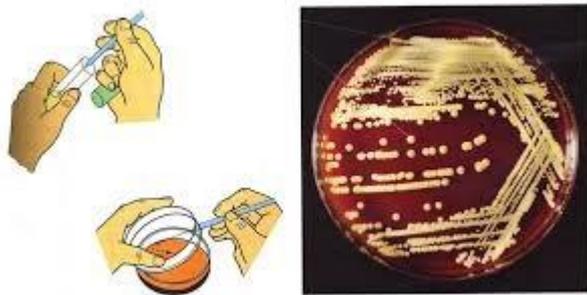


Fig 8: Preparazione della piastra di agar. Con un'ansa sterilizzata, si preleva un'ansata di inoculo dalla provetta. Lo striscio è effettuato su una piastra di agar, distribuendo l'organismo con strisci successivi. Seguendo lo striscio iniziale, quelli successivi sono eseguiti angolati, risterilizzando l'ansa tra uno striscio e l'altro.

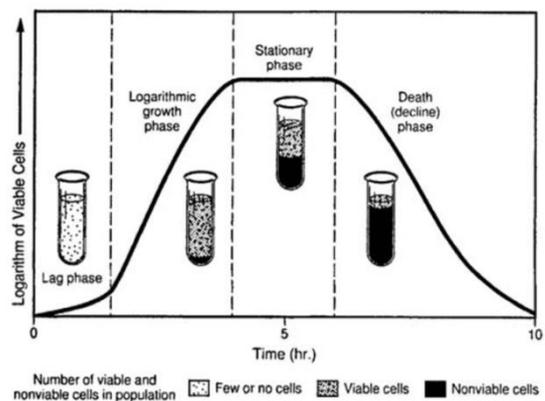


Fig 9: Curva di crescita di batteri in soluzione. In ordinata è indicata l'OD della soluzione.

Per sapere a quale punto della curva di crescita sono i batteri in soluzione, viene fatta una misura di turbidimetria: ci si serve di uno spettrofotometro, uno strumento che fa passare la luce attraverso la sospensione cellulare e misura la quantità di luce emergente. Quanto maggiore è il numero di cellule presenti, tanto più la luce è riflessa e quindi tanto maggiore sarà la torbidità. La quantità misurata, espressa in unità di OD (optical density), non è altro che l'opposto dell'esponente nella legge di Lambert-Beer, ovvero l'assorbanza:

$$I = I_0 e^{-k_\lambda l},$$

dove k_λ è il coefficiente di attenuazione e dipende dalla lunghezza d'onda scelta (e che in genere è di 540 nm, 600 nm o 660 nm). Prima di impiegare l'OD come stima del numero di cellule, è necessario ricavare per ogni microrganismo la costante di proporzionalità che mette in relazione le misure dirette del numero di cellule (ottenute ad esempio per conta diretta a microscopio) con le misure indirette di OD (4). Per gli *Escherichia Coli*, ad esempio, ad un valore di OD pari ad 1 corrispondono circa 8×10^8 cellule per millilitro di soluzione.

A seconda della densità desiderata, quindi, quando la misura di OD nella soluzione di TB raggiungeva un valore compreso tra 0.5 e 1.5, la soluzione veniva centrifugata e i batteri che precipitavano sul fondo della fialetta venivano ridispersi in brodo di motilità (BMB, *Berg Motility Buffer*), un'altra soluzione che contiene i nutrienti sufficienti affinché i batteri rimangano in vita ma non si duplicano. La sospensione è ora pronta per essere analizzata.

2.2 Assemblaggio del campione

Prima di procedere all'assemblaggio del campione da osservare al microscopio sono necessarie due operazioni preliminari: anzitutto bisogna pulire per quanto possibile la superficie dei vetrini, rimuovendo aloni e granelli di polvere, in maniera da rendere ottimale la loro trasparenza alla luce; poi bisogna trattare i vetrini così da evitare che i batteri vi aderiscano. La membrana cellulare dei batteri, infatti, è dotata di carica negativa, che viene attratta dalla carica positiva propria delle superfici di vetro. Al fine di limitare questo effetto, dato che non è possibile eliminarlo del tutto, si immergono per una notte i vetrini in una soluzione all'1% di BSA (*Bovine Serum Albumin*), una proteina che forma catene molto lunghe e con carica negativa: saranno queste, e non i batteri, a ricoprire i vetrini (*coating*). Dall'analisi dati si nota che tale strategia limita effettivamente il numero di batteri che aderiscono alla superficie.

Come detto prima, siamo interessati al profilo di densità di batteri al variare della distanza tra i vetrini: per controllare con precisione abbastanza buona questa distanza, si interpongono tra i due vetrini uno o più ritagli di fogli di acetato oppure dei vetrini copricampione, spessi rispettivamente circa 100 e 150 micrometri, e varie combinazioni dei due, ottenendo spaziature che vanno dai 100 ai 250 micrometri. Per fissare gli spaziatori tra loro e ai vetrini è sufficiente bagnarli con piccole gocce d'acqua e sovrapporli: l'adesione capillare farà il resto. Lo step finale consiste quindi nel depositare il campione biologico sul vetrino così da poterlo analizzare. È bene notare che i batteri nel brodo di motilità, se lasciati a se stessi, poco a poco tenderanno a sedimentare sul fondo della fialetta dato che la densità propria di tali microrganismi è maggiore, anche se di poco, della densità del brodo di motilità. Si diluisce quindi la soluzione in rapporto 1:1 con il Percoll (una sospensione di nanoparticelle di silice) in maniera da bilanciare le due densità. A questo punto, con una micropipetta, si preleva una goccia di quest'ultima soluzione e la si deposita sul vetrino precedentemente preparato. Infine, si appoggia il secondo vetrino, facendo attenzione che non si formino bolle e che la goccia sia regolare (Fig 10).

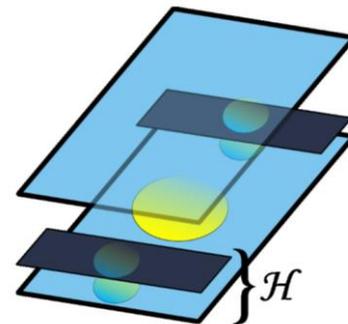


Fig 10: Campione assemblato. La distanza H tra i vetrini viene fissata interponendo degli spaziatori, e per far aderire gli uni agli altri si usano piccole gocce d'acqua che, per capillarità, fanno da collante. In giallo è rappresentata la goccia di soluzione batterica.

CAPITOLO 3

Apparato sperimentale e software

Per le misure abbiamo usato un microscopio provvisto di una telecamera che registra le immagini e collegati ad un software appositamente sviluppato per controllare l'acquisizione.

3.1 Preparazione del microscopio e della telecamera

La telecamera è una Mikrotron EoSense CL con risoluzione massima di 1.3 Mpixel e velocità massima di acquisizione a full frame di 506 frame al secondo (fps). Il microscopio è un Nikon Eclipse-Ti-E, ed ha la particolarità di essere un microscopio rovesciato, ovvero l'obiettivo si trova sotto al campione, mentre il condensatore sopra di esso. La regolazione della posizione del campione sul piano orizzontale si effettua tramite due manopole, mentre il posizionamento nella direzione verticale è molto più preciso: il movimento è comandato da un motore, su cui si può agire sia tramite delle manopole che attraverso l'input dato dal software collegato al microscopio, e il cui passo minimo è di 0.025 micrometri. L'obiettivo utilizzato per le misure è un Olympus 100x ad immersione in acqua (in questo modo si elimina l'interfaccia aria-vetro che potrebbe causare un effetto lente). Le misure sono prese in campo chiaro, ma l'ingrandimento dell'obiettivo permette comunque di distinguere agevolmente i batteri e il contrasto è sufficiente per permettere anche al software per l'analisi di individuare i pixel che corrispondono ai batteri.

Questo obiettivo è stato scelto perché lo spessore della "fetta" di materiale che è a fuoco ad una fissata z , detto profondità di campo, è limitato a 2 micrometri, e permette quindi di sezionare il volume della goccia in piani molto vicini tra loro. Tuttavia, un ingrandimento così elevato comporta anche degli svantaggi: anzitutto, il campo di vista (*field of view*) è limitato ad un rettangolo di $160 \times 128 \mu\text{m}^2$, e di conseguenza i batteri visualizzati saranno poche decine. Inoltre, i batteri, oltre ad essere pochi, entrano ed escono in continuazione dal campo di vista, perché si spostano sia orizzontalmente sul piano che verticalmente passando da un piano focale all'altro, quindi il loro numero fluttua. È quindi necessario mediare il numero di batteri relativo ad immagini prese a diversi istanti di tempo sullo stesso piano focale per avere risultati statisticamente significanti. In secondo luogo, per le misure che dobbiamo effettuare, la *working distance*, cioè la distanza che l'obiettivo può coprire in z , è di 1.5 millimetri, il che la rende piuttosto ridotta. Per costruire il campione non conviene quindi utilizzare i normali vetrini portacampione, che sono spessi circa 1 millimetro, ma vetrini più sottili (circa 100 micrometri); d'altra parte, questi vetrini sono molto fragili e flessibili, quindi, per impedire che si incurvino per effetto dell'adesione capillare dovuta alla goccia di soluzione, bisogna avere cura che gli spaziatori siano abbastanza vicini tra loro ma, allo stesso tempo,

sufficientemente lontani per evitare che la suddetta goccia venga risucchiata dagli interstizi tra i vari spaziatori.

3.2 Software per l'analisi del campione

Per analizzare il campione abbiamo utilizzato un apposito software che permette di impostare diversi parametri sia sulla telecamera che sul microscopio. Ci interessa registrare brevi filmati dei batteri e fare delle scansioni in z per analizzare la distribuzione di batteri nella goccia. A seconda dell'operazione da svolgere, vanno quindi impostati i parametri per l'acquisizione delle immagini: il *frame rate* scelto per registrare un video è di 30 fps, mentre per la scansione in z si abbassa a 2 fps. Si imposta poi il numero di frame da registrare per piano focale, in maniera da avere una buona statistica: in genere, abbiamo scelto 150 frame per i video e 100 per le scansioni. La scansione di un campione richiede quindi diversi minuti: per analizzare ciascun piano focale sono necessari 50 secondi, moltiplicati per il numero di piani focali in cui si ha suddiviso il volume della goccia.

Il programma per la raccolta dei dati si occupa di acquisire le immagini trasmesse dalla telecamera al computer; per visualizzare la distribuzione spaziale dei batteri si procede sezionando la goccia in "fette" parallele ai vetrini. Come detto sopra, la profondità di campo dell'obiettivo 100x è di 2 micrometri, questo significa che tale valore corrisponde allo spessore della fetta (così si evita di sovrastimare il conteggio); l'area della fetta è invece pari al campo di vista del microscopio (Fig 11): il microscopio riesce a vedere tutto ciò che è qui contenuto, e si potrebbe analizzare l'intero spessore della goccia campionando ogni 2 micrometri, ma si otterrebbero così molti più punti di quelli necessari per una buona statistica, aumentando inoltre di molto il tempo di acquisizione e quindi la probabilità che il sistema venga in qualche maniera perturbato. Bisogna quindi impostare sul programma per l'acquisizione delle immagini i parametri che definiscono la maniera ottimale per campionare il volume, riducendo per quanto possibile i tempi di misura. Ci interessa raccogliere tanti punti vicino alle pareti per meglio osservare l'eventuale addensamento, quindi qui camperemo ogni 2 micrometri, mentre nella zona centrale, che corrisponde alla zona di densità costante, camperemo ogni 10 micrometri (Fig 12).

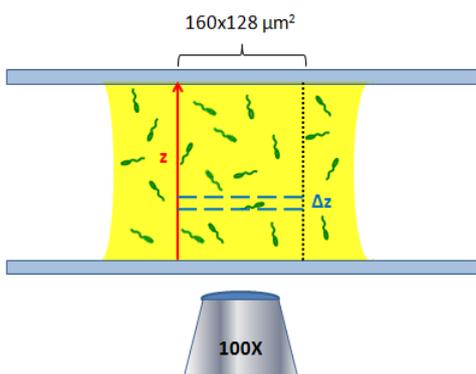


Fig 11: Scansione in z . Il campo di vista dell'obiettivo è compreso tra l'asse z e la linea tratteggiata verticale; i piani focali sui quali il microscopio effettua la scansione sono paralleli ai vetrini, e lo spessore scansionato, Δz , equivale alla profondità di campo dell'obiettivo ($2 \mu\text{m}$) e corrisponde alla zona compresa tra le due linee tratteggiate in azzurro. (Lo spessore della goccia e quello dei vetrini non sono in proporzione.)

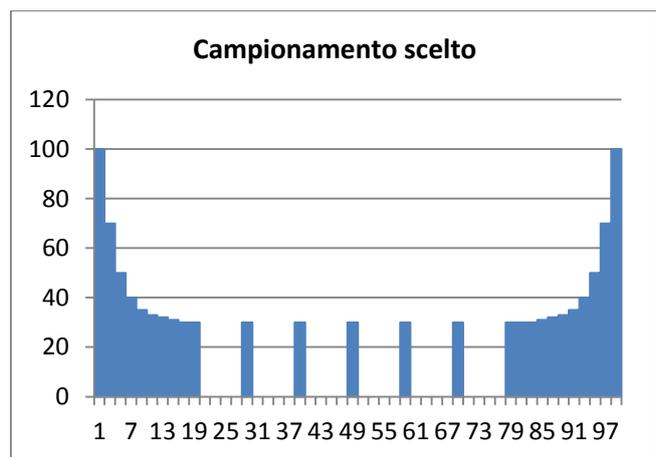


Fig 12: La larghezza delle colonne dell'istogramma è di 2 micrometri e ciascuna colonna è centrata sul suo valore di ascissa, cioè è compresa tra $x-1$ e $x+1$ (la colonna di ascissa 1 va da 0 a 2, quella di ascissa 3 va da 2 a 4, e così via); il valore di ordinata indica il numero di batteri contenuti in ciascuna colonna dell'istogramma. I valori sono indicativi.

3.3 Software per l'analisi delle immagini

L'input del software è costituito dalle immagini acquisite in precedenza con il microscopio, sulle quali si eseguono delle operazioni preliminari di imaging: bisogna anzitutto ricostruire il background, ovvero il fondo rispetto al quale i batteri si muovono; una volta trovato, il programma si occuperà di sottrarlo ad ogni immagine. Si imposta poi la soglia di contrasto, che permette di distinguere i batteri a fuoco da quelli fuori fuoco, in modo da contare effettivamente solo i batteri contenuti in uno spessore pari a quello della profondità di campo del microscopio. In questa maniera, il programma può agevolmente individuare i batteri presenti in ciascun frame di ciascun piano; per ciascun piano verrà poi effettuata una media sul numero totale di batteri per ciascun frame. Si ottiene così il numero medio di batteri per ciascun piano.

A questo punto, con un'operazione detta *tracking*, si opera una distinzione tra i batteri motili e quelli passivi, soggetti alla sola diffusione browniana: noto il coefficiente di diffusione D , dalla formula di Stokes-Einstein, otteniamo una stima molto grossolana della distanza percorsa da un batterio passivo in mezzo secondo (ovvero tra due frame successivi):

$$x \sim \sqrt{\langle x^2 \rangle} = \sqrt{2nDt},$$

dove n indica la dimensione del sistema (e nel nostro caso vale 3 dato che siamo nello spazio tridimensionale), t è l'intervallo di tempo tra due frame successivi (0.5 secondi) e D è il coefficiente di diffusione. Per calcolare quest'ultimo valore, dobbiamo stimare il "raggio efficace" del batterio, e lo facciamo mediando sulle dimensioni del batterio, approssimandolo ad un cilindro lungo 2.5 micrometri e di diametro 0.8 micrometri:

$$r = \frac{1}{2} \frac{2.5 + 0.8 + 0.8}{3} = 0.68 \mu\text{m},$$

che, sostituito nella formula per D , fornisce

$$D = 0.32 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}.$$

Calcolando infine x , otteniamo un valore di 0.98 micrometri. Abbiamo poi confrontato questo risultato con quello riportato in (7), dove come discriminare tra i due tipi di batteri si usa la velocità dei browniani: i batteri che si muovono più velocemente di 2.5 micrometri (ovvero la lunghezza del batterio) al secondo sono i motili. Calcolando da questa velocità la distanza percorsa in mezzo secondo, si ottengono 1.25 micrometri; tra i due valori c'è un buon accordo, quindi possiamo stabilire la distanza di *tracking* a 1.25 micrometri.

Inizia ora la vera e propria operazione di *tracking*: su ogni piano, tutti i batteri individuati nel primo frame vengono etichettati con un numero crescente. Passando al frame successivo, la posizione dei batteri passivi sarà in un raggio di 1.25 micrometri dalla posizione precedente; il programma quindi riconosce che alcuni dei batteri nel secondo frame sono gli stessi batteri del primo, e ci attribuisce quindi la medesima etichetta; l'operazione viene ripetuta per ogni frame del piano, ottenendo così la traiettoria (e il numero) dei batteri browniani di quel piano. Noti quindi per ogni piano il numero totale di batteri e il numero dei browniani, si ottiene per sottrazione il numero dei motili. Si procede quindi salvando il file di testo dato in output dal programma, che riporta, organizzati in colonne, il numero di batteri totali, motili e non motili, con relativo errore, per ogni piano scansionato.

CAPITOLO 4

Analisi dei dati

In questo capitolo vengono esposti i risultati derivanti dall'analisi dei dati raccolti: viene graficato il numero di batteri in funzione della distanza dalla parete inferiore. Per garantire un facile confronto tra misure diverse, in particolare quelle relative a campioni con spessori differenti, in quasi tutti i grafici riportati i valori di ascissa sono normalizzati sullo spessore effettivo del campione. Solo nei grafici in cui ci interessa mostrare la pendenza della curva non è stata effettuata alcuna normalizzazione in maniera tale da evitare lo schiacciamento dei profili. Un discorso simile va fatto per i valori di ordinata, che sono sempre normalizzati sul numero medio di batteri presenti nel plateau.

4.1 Dati sperimentali

Il confronto tra misure effettuate a distanza di giorni su campioni diversi garantisce la ripetibilità dell'esperimento. Viene riportato come esempio la Fig 13, dove si mostrano i dati relativi a 4 campioni diversi (dello stesso spessore): sia i profili che le pendenze delle curve in prossimità delle pareti sono, entro l'errore sperimentale, sovrapponibili.

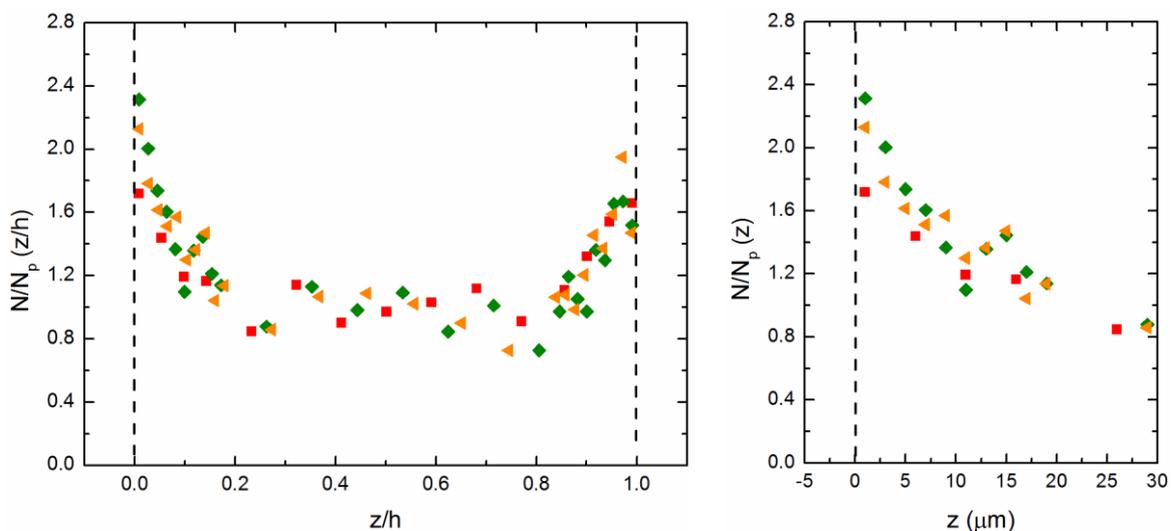


Fig 13: I batteri a cui si riferiscono i dati sono *Pseudomonas Aeruginosa*. Ad ogni colore corrisponde una serie di misure fatta in giorni diversi e su campioni diversi. Lo spessore di ciascun campione era di circa $100 \mu\text{m}$, ed in ogni campione la percentuale di motili era del $50 \pm 60\%$. È evidente l'ottima compatibilità tra le serie di dati, sia per i profili di densità che per le pendenze delle curve vicino alle pareti. Gli errori, non riportati in figura, sono tutti entro il 20%.

Un secondo risultato è l'indipendenza del profilo della curva dallo spessore del campione: in tutti i casi, la zona centrale presenta un plateau orizzontale, mentre la zona più vicina alle pareti è caratterizzata da un aumento di densità. Inoltre, l'effetto di accumulo è limitato ai primi 20 micrometri oltre la parete: lo si può vedere chiaramente nei grafici di destra, in cui l'asse delle ascisse non è normalizzato e le curve hanno la loro effettiva pendenza (Fig 14).

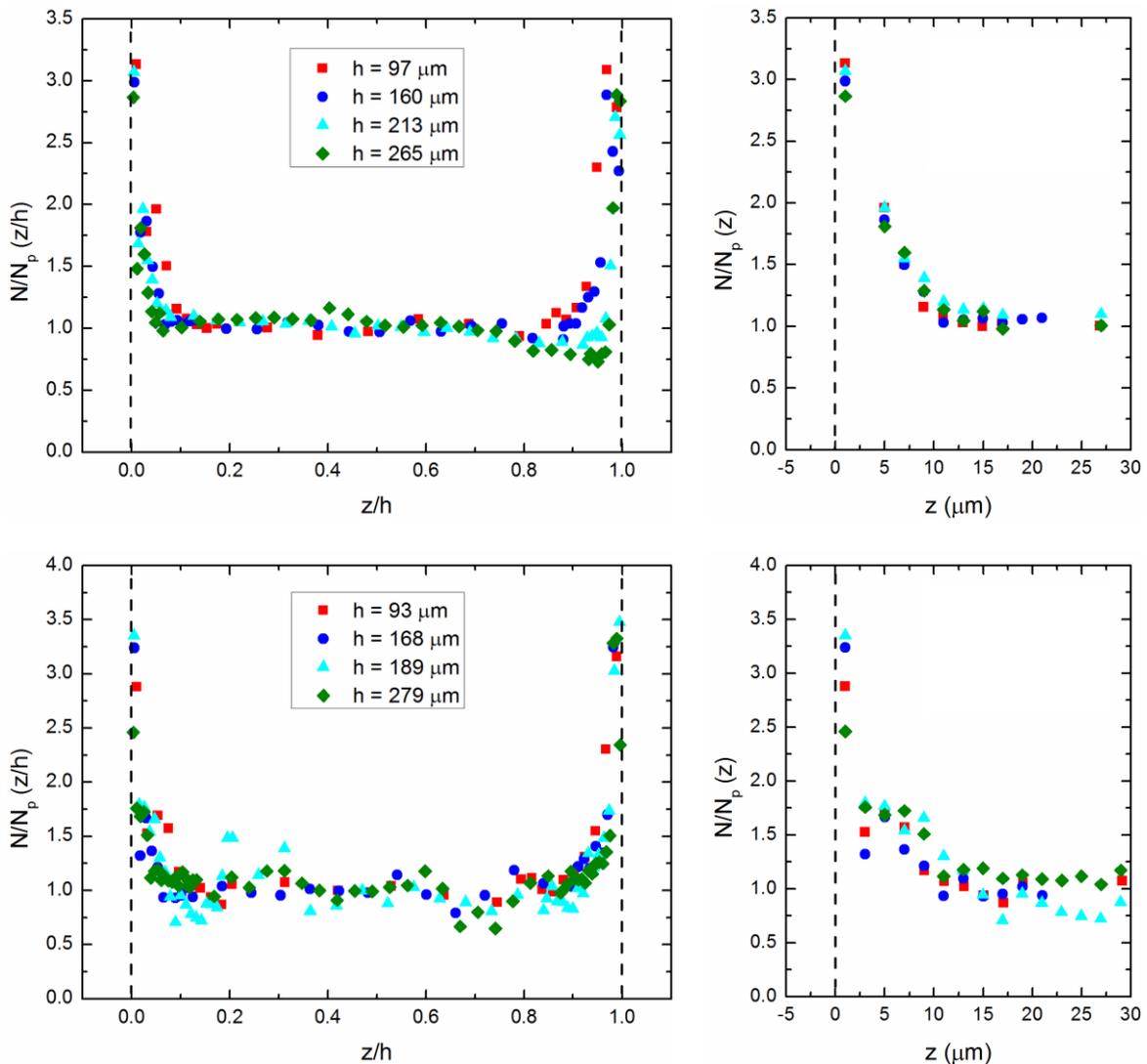


Fig 14: Tutti i grafici si riferiscono a misure fatte al variare dello spessore su soluzioni di *Escherichia Coli*. Si vede che il profilo di densità non ha nessuna correlazione con lo spessore del campione. Gli errori, non riportati in figura, sono tutti entro il 20%.

In tutti i grafici finora riportati, i plateau dei profili sono stati normalizzati ad 1. È però legittimo chiedersi quale effetto produca la variazione di densità della soluzione, e se ci sia una qualche relazione tra la densità della soluzione e l'altezza del plateau. Ci siamo quindi procurati due soluzioni batteriche la cui densità era l'una il doppio dell'altra, e abbiamo confrontato le curve ad esse relative. Entrambe le curve sono normalizzate rispetto al valor medio del plateau della soluzione meno concentrata, e sono riportate in Fig 15 con due assi di ordinata differenti: ci è così possibile sovrapporre le due curve per mostrare che il profilo, oltre che dallo spessore del campione, non dipende nemmeno dalla sua densità. Inoltre, confrontando i valori dei due assi di ordinata, si nota che tra i due plateau, ma anche tra i corrispondenti picchi, c'è un fattore 2: la densità della soluzione e l'altezza della curva sono proporzionali.

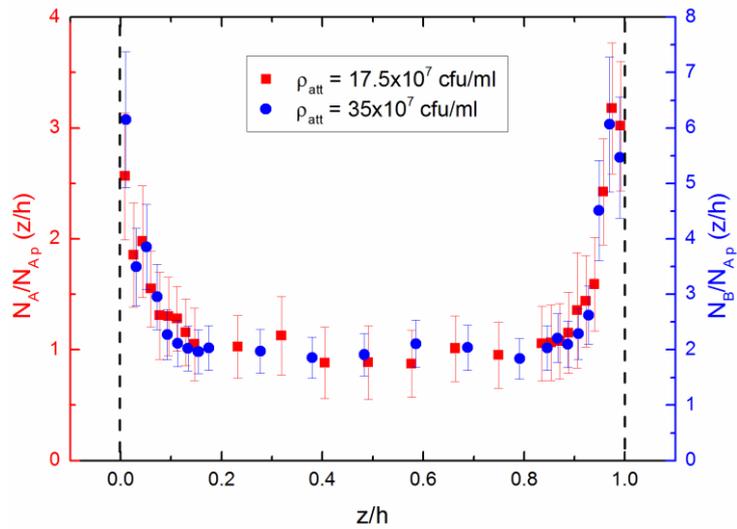


Fig 15: Le serie si riferiscono a misure fatte su soluzioni di *Escherichia Coli* con densità l'una il doppio dell'altra. Entrambe le serie sono normalizzate sul valor medio di batteri nel plateau della serie rossa ($N_{A,p}$). Grazie al doppio asse in ordinata si vede chiaramente che le due curve, oltre ad essere sovrapponibili, scalano l'una rispetto all'altra di un fattore 2, così come le loro densità.

Riportiamo poi il confronto tra i dati riportati in (7) e i nostri (Fig 16); lo spessore dei campioni, in tutti e tre i casi, era di 100 micrometri (nominalmente). Qualitativamente, il comportamento osservato è il medesimo: densità costante nella regione centrale e addensamento alle pareti. Quantitativamente, mentre per le nostre curve il plateau si estende alla maggior parte del volume della goccia e la regione di accumulo è limitata ad una ventina di micrometri per parte, nel caso riportato in letteratura i picchi sono più alti e la pendenza della curva è più dolce e, di conseguenza, il plateau si riduce. Questo è probabilmente attribuibile alla diversa maniera di nuotare dei microrganismi analizzati: dopo essersi allineati alla parete, i *Coli smooth swimmers*, che non effettuano il *tumbling*, se ne allontaneranno solo per l'azione della diffusione browniana, mentre i *Coli wild type* devono solo aspettare che inizi la fase di *tumble*. Alla luce di ciò, sembra possibile che gli *smooth swimmers* siano caratterizzati da un addensamento maggiore rispetto ai *wild type*. Tra le curve dei *Coli wild type* e degli *Pseudomonas* c'è invece un buon accordo.

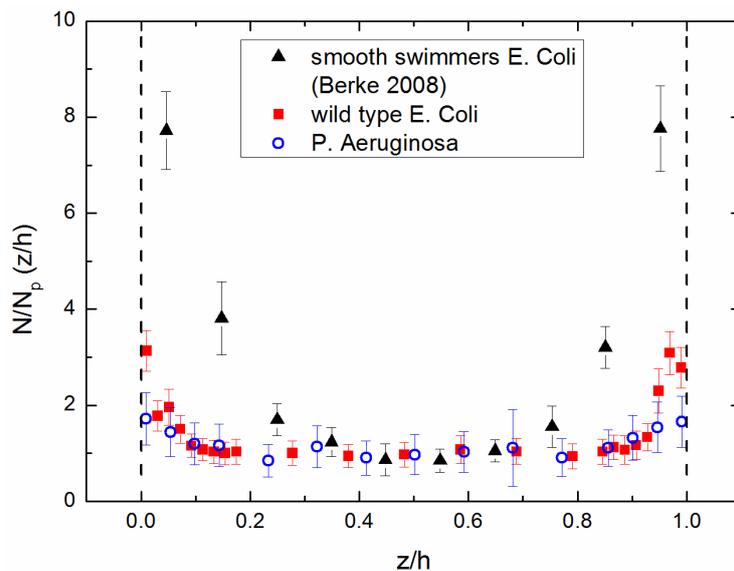


Fig 16: Confronto della curva riportata da Berke (7) con le nostre, ottenute utilizzando due diversi tipi di batteri (entrambe con densità di 5×10^8 cfu/ml).

4.2 Confronto con la simulazione

Nel lavoro del Prof. Orlandini (11), con una semplice modellizzazione del sistema confinato di batteri, si simulano gli effetti prodotti: in questo modello, i batteri attivi e le particelle passive (i batteri browniani) sono rappresentati da un cilindretto rigido costituito, rispettivamente, da 3 e da 2 sferette di diametro σ . Ciascuna sferetta interagisce con le altre attraverso il potenziale di Lennard-Jones, e la propulsione propria dei batteri attivi è introdotta attraverso la forza F_A , che agisce su ciascuna sferetta componente il cilindretto, per un totale di $3 F_A$ su ciascun cilindretto; tale forza è diretta lungo l'asse maggiore del cilindro ed il suo verso ne indica la parte anteriore (la "testa"). I parametri fondamentali di cui tener conto sono il numero di Reynolds e il numero di Peclet del sistema. All'inizio di ogni simulazione vengono scelte arbitrariamente, per ogni cilindretto, la testa e la coda, e si impongono le condizioni al contorno e le condizioni iniziali: posizione ed orientazione dei cilindretti sono casuali, mentre le velocità sono scelte all'interno di una distribuzione uniforme (data la temperatura T). Il modello è molto semplice e non tiene conto delle interazioni idrodinamiche. In Fig 17 si confrontano i dati così ottenuti con i nostri. Nonostante la semplicità del modello (che non tiene conto del diverso modo di nuotare dei batteri), le curve sono sovrapponibili entro l'errore sperimentale.

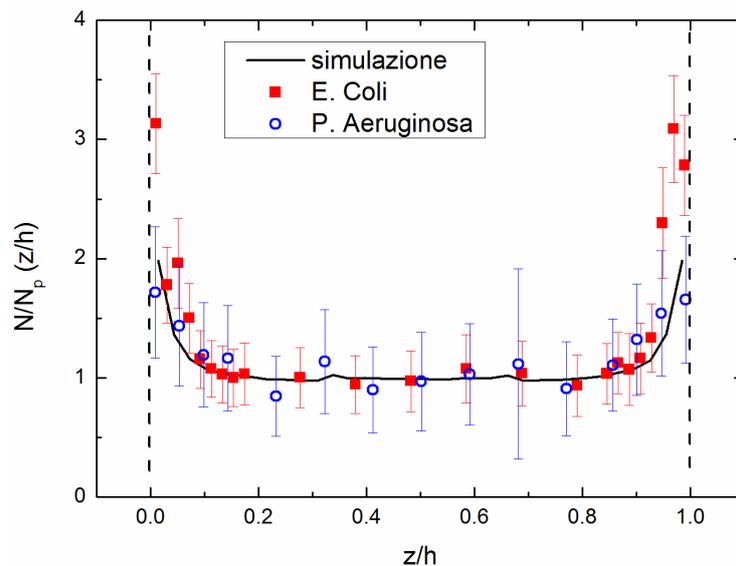


Fig 17: Confronto tra i dati ottenuti dalla simulazione numerica e dall'analisi dei campioni. Le serie sono le stesse riportate in Fig 16. **(11)**

4.3 Problematiche

Come già detto sopra, uno degli aspetti più complicati dell'intero lavoro di tesi è stato procurarsi dei batteri che fossero motili. Per gli Escherichia Coli sembrava che fosse stata trovata la ricetta giusta, purtroppo però non ha sempre prodotto il risultato sperato, anche se è stata l'unica che ci ha fornito più di una volta un campione con i requisiti di motilità richiesti. Con gli Pseudomonas abbiamo invece avuto più fortuna perché, se si escludono i casi in cui (per motivi ignoti) sin dall'inizio le cellule non si sono duplicate, la ricetta ci ha sempre consentito di avere soluzioni con almeno un 50% di batteri motili. Le possibili fonti di errore nella preparazione erano molteplici: la centrifugazione può danneggiare i flagelli, oppure nel percorso dal Dipartimento di Medicina Molecolare al laboratorio la soluzione può subire degli shock termici. Infine, dalla

letteratura (10) sappiamo che la carenza di ossigeno, per gli *Escherichia*, genera delle modifiche a livello metabolico, mentre gli *Pseudomonas* sono molto più sensibili e muoiono: le provette utilizzate al Dipartimento di Medicina Molecolare erano sempre chiuse con appositi tappi che permettono l'ossigenazione del campione, mentre in laboratorio erano tenute chiuse in maniera ermetica, che fosse proprio la mancanza di ossigeno a comportare una drastica riduzione della motilità? Anche la goccia di soluzione racchiusa tra i due vetrini potrebbe risentire di problemi di ossigenazione, soprattutto nella regione centrale.

Nella preparazione del campione, una fase molto delicata era costituita dal *matching* di densità: a seconda della fase di sviluppo raggiunta dal batterio, la sua massa può essere leggermente maggiore o minore. Di conseguenza, la frazione di Percoll da aggiungere può variare, anche se di poco; tuttavia, non ci è possibile rilevare differenze di peso così minime, dunque la diluizione col Percoll è sempre stata fatta in rapporto 1:1. A volte è successo che il plateau delle curve di densità non fosse orizzontale, ma pendesse leggermente o verso destra o verso sinistra, indicando rispettivamente una carenza o un eccesso di Percoll nella soluzione. L'effetto era visibile però solo nelle curve dei totali e dei non motili; i motili, infatti, presentavano un plateau orizzontale e dei picchi anche quando il Percoll era del tutto assente: Il loro carattere di SPP li rende poco sensibili a tali effetti idrostatici, ben visibili invece per le cellule browniane.

CONCLUSIONI

In questo lavoro di tesi si è studiato l'effetto del confinamento spaziale su soluzioni batteriche al variare della specie batterica, dello spessore del campione e della densità della soluzione batterica. È stato mostrato che l'accumulo alle pareti che si verifica quando una goccia di soluzione batterica è confinata tra due vetrini non ha alcuna dipendenza dallo spessore del campione, e che tali esperimenti sono ripetibili. Abbiamo verificato inoltre che a soluzioni con densità diverse corrispondono curve con lo stesso profilo, ma con altezze diverse, in particolare che al raddoppiare della densità raddoppia anche l'altezza della curva.

Abbiamo lavorato con due specie diverse, *Escherichia Coli* e *Pseudomonas Aeruginosa*, e abbiamo verificato che, entro l'errore sperimentale, i risultati relativi all'una e all'altra specie sono simili. Questo significa che la maniera di nuotare non influisce, almeno non in maniera evidente, sugli effetti del confinamento, e che quindi gli effetti idrodinamici possono essere trascurati in favore delle sole interazioni di sfera dura. Il confronto con i dati riportati in letteratura (7), invece, non sono simili ai nostri, e questo è probabilmente dovuto all'utilizzo di un batterio geneticamente modificato che non effettua il *tumbling*.

Lo studio di sistemi del genere è destinato a continuare e svilupparsi, esplorando configurazioni che finora non sono ancora state riprodotte: ad esempio, in sospensioni contenenti sia SPP che particelle browniane, si potrebbe studiare in dettaglio l'interazione delle une con le altre (le simulazioni suggeriscono che si verifichi una superdiffusione delle seconde), e determinare se esistano transizioni tra regimi diversi in funzione del rapporto tra il numero di particelle di un tipo e dell'altro.

In secondo luogo, con tecniche di microfabbricazione, si potrebbero costruire dei canali sufficientemente piccoli, di dimensioni fissate e permeabili all'ossigeno, in maniera tale da eliminare alcune delle complicazioni che abbiamo incontrato (limitato controllo sullo spessore effettivo del campione, problemi di ossigenazione).

Infine, si può far decrescere man mano la spaziatura, fino a farla divenire dell'ordine dei 20 micrometri a cui è limitato l'accumulo: un sistema fortemente confinato come questo potrebbe essere caratterizzato da nuovi interessanti fenomeni. Si può inoltre sostituire il confinamento bidimensionale caratteristico dei vetrini con uno unidimensionale (in capillari) o tridimensionale (in piccoli cubi), oppure spingere le densità della soluzione oltre al miliardo di cellule per millilitro: si potrebbero così osservare comportamenti collettivi più interessanti, come le transizioni di fase. Ottenere densità così elevate rappresenta però un obiettivo difficile da raggiungere dato che in sospensioni così dense la quantità di nutrienti è limitata e c'è quindi il rischio che i batteri inizino a morire.

BIBLIOGRAFIA

1. **Purcell, E. M.** Life at low Reynolds number. *American Journal of Physics*. 1977, Vol. 45, 1.
2. **Poon, W.C.K.** From Clarkia to Escherichia and Janus: the physics of natural and synthetic active colloids. *Proceedings of the International School of Physics "Enrico Fermi"*. 2013.
3. **E. Lauga, R. E. Goldstein.** Dance of the microswimmers. *Physics Today*. 2012, Vol. 65, 9.
4. **M. T. Madigan, J. M. Martinko.** *Brock - Biologia dei microrganismi*. Milano : Casa Editrice Ambrosiana, 2011.
5. **G. Li, J. X. Tang.** Accumulation of swimming bacteria near a solid surface. *Physical Review E*. 2011, Vol. 84, 4.
6. **G. Li, J. X. Tang.** Accumulation of Microswimmers near a Surface Mediated by Collision and Rotational Brownian Motion. *Physical Review Letters*. 2009, Vol. 103, 7.
7. **A. P. Berke, E. Lauga.** Hydrodynamic Attraction of Swimming Microorganism By Surfaces. *Physical Review Letters*. 2008, Vol. 101, 3.
8. **R. Di Leonardo, L. Angelani, D. Dell'Arciprete, G. Ruocco, V. Iebba.** Bacterial ratchet motors. *Proceeding of the National Academy of Science Of the United States of America*. 2009.
9. **P. Galajda, J. Keymer, P. Chaikin, R. Austin.** A Wall of Funnel Concentrates Swimming Bacteria. *Journal of Bacteriology*. 2007, Vol. 189, 23.
10. **J. Schwartz-Linek, J. Arlt, A. Jepsen, A. Dawson, T. Vissers, D. Miroli, T. Pilizota, V. A. Martinez, W. C. K. Poon.** Escherichia coli as a model active colloid: a practical introduction. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2015.
11. **Orlandini, E.** Comunicazione privata. Padova : Dipartimento di Fisica e Astronomia "Galileo Galilei", Università di Padova, 2015.