

POLITECNICO DI TORINO

Laurea Triennale in Ingegneria Aerospaziale



**Politecnico
di Torino**

Laurea Triennale

Fluidodinamica della propulsione dei microrganismi marini

Relatori

Prof.ssa Stefania SCARSOGLIO

Ing. Davide PERRONE

Candidato

Riccardo NEGRO

Anno Accademico 2021-2022

Indice

Elenco delle tabelle	IV
Elenco delle figure	V
Glossario	VIII
Acronimi	IX
Introduzione	1
1 Aspetti biologici	4
1.1 Flagello	5
1.1.1 Flagello procariote	5
1.1.2 Flagello eucariote	6
1.2 Ciglia	7
2 Flussi di Stokes	9
2.1 Proprietà dell'autopropulsione a bassi numeri di Reynolds .	11
2.1.1 Teorema della reciprocità	11
2.1.2 Reversibilità cinematica	12
2.1.3 Proporzionalità lineare tra forza e velocità	15
2.1.4 Spinta basata sulla resistenza	15
2.2 Metodi di risoluzione	16
2.2.1 Metodo dei valori al contorno	17
2.2.2 Metodo delle singolarità	18
3 Studi storici	23
3.1 Foglio di Taylor	23
3.2 Flagello rotante	25

3.3	Idrodinamica flagellare	27
4	Altre funzioni regolate dalla fluidodinamica	30
4.1	Interazioni idrodinamiche	30
4.1.1	Interazioni cellula-cellula	31
4.1.2	Interazioni cellula-parete	33
4.2	Assorbimento dei nutrienti	34
4.3	Locomozione passiva	36
4.4	Locomozione nei fluidi complessi	37
5	Nuovi strumenti d'indagine e loro applicazioni	38
5.1	PIV	38
5.1.1	Studio di una fase collettiva tramite PIV	39
5.2	CFD	41
5.2.1	Studio CFD di un balzo a bassi Reynolds	43
6	Microrobot per la biomedicina	49
6.1	IRONSperm	50
6.2	Microrobot orientabili magneticamente	53
	Conclusioni	56
	Bibliografia	57

Elenco delle tabelle

1.1	Tabella riassuntiva delle proprietà dei flagelli eucarioti e procarioti	6
2.1	Grandezze caratteristiche del flusso di microrganismi marini	9

Elenco delle figure

1	Immagini SEM di alcuni microrganismi planctonici	3
1.1	Struttura interna delle due tipologie di flagello presenti in natura	7
1.2	Immagine al SEM di un microrganismo ricoperto di ciglia . .	7
2.1	Movimento reciproco tipico della capasanta. L'apertura e chiusura dei due gusci segue la stessa sequenza di forme, risultando, secondo il teorema 1 in uno spostamento netto pari a zero.	14
2.2	Movimenti non reciproci	14
2.3	Visualizzazione dell'effetto propulsivo dovuto all'anisotropia delle forze	16
2.4	Visualizzazione delle linee di flusso generate dalle tre tipologie di singolarità; L'intensità della velocità del flusso tende a zero seguendo le rispettive leggi di decadimento spaziale.	19
4.1	Traiettorie circolari in prossimità delle pareti.	34
4.2	Linee di corrente che si sviluppano intorno a un micronotatore. Con a_c si denota il raggio del predatore mentre a_p indica il raggio della preda. Si nota come la distanza delle linee di flusso in grado di catturare la preda sia minore di a_p	35
5.1	Istantanea del campo vettoriale della velocità ottenuto dall'analisi PIV in cui si notano le zone turbolente	40
5.2	Immagine al microscopio ottico del <i>Mesodinium rubrum</i> in cui si notano la ECB, i cirri e la suddivisione del corpo in due emisferi.	44

5.3	In alto è raffigurato il dominio nella sua interezza, con indicazioni sulle dimensioni; in basso è presente il particolare della sfera racchiusa esternamente dallo strato ciliare e poi dalle celle che compongono il dominio restante.	45
5.4	Campi di velocità calcolati per i quattro casi di propulsione. Le frecce nella metà inferiore mostrano il campo vettoriale della velocità mentre le linee nella metà superiore indicano zone a velocità costante; in particolare le linee grigie e continue indicano, a intervalli regolari, velocità inferiori a quelle del salto fino a $0,1 U_{jump}$, quelle nere indicano velocità uguali a U_{jump} e quelle grigie punteggiate velocità maggiori di U_{jump} fino a $2 U_{jump}$	47
6.1	Immagini al microscopio elettronico raffiguranti la distribuzione di nMPs sull'intero microrganismo (A) e il dettaglio dei quattro segmenti (B, C, D, E). In basso due condizioni di potenziale elettrico (con 10 e 48 nanoparticelle) intorno al microrganismo	51
6.2	Immagini al microscopio raffiguranti quattro casi diversi di distribuzione delle nMPs sullo spermatozoo. La forma del flagello è determinata dal valore di ϕ in funzione della coordinata curvilinea s e del tempo t	52
6.3	Rendering grafico in cui compaiono i microrobot di <i>Escherichia coli</i> indirizzati da un campo magnetico esterno verso una cellula cancerogena, sulla sinistra dell'immagine.	54

Glossario

nuotatori qualsiasi organismo vivente o non vivente in grado di ottenere una forza propulsiva da una deformazione della propria superficie seguendo una specifica sequenza temporale [1]

forza viscosa Forza che si sviluppa tangenzialmente tra due superfici fluide adiacenti dotate di moto relativo

anisotropia proprietà per cui in una sostanza il valore di una grandezza fisica dipende dalla direzione che si considera

diffusione trasporto di materia nello spazio per effetto di un gradiente di concentrazione o anche di un gradiente di temperatura o di forze applicate esternamente

drug delivery insieme di tecniche messe in atto per far arrivare in maniera controllata agenti terapeutici dentro il corpo umano.

equazioni di Navier-Stokes sistema di tre equazioni di bilancio della meccanica dei continui che risolte permettono di ottenere i campi di velocità e pressione per un fluido viscoso lineare.

squirmer oggetto sferico che si muove in un fluido a seguito dello sviluppo di velocità di slittamento sulla sua superficie.

flusso laminare flusso in cui i filetti fluidi scorrono l'uno affianco all'altro senza rimescolarsi tra di loro.

Acronimi

SEM scanning electron microscopy

DOM materia organica disciolta

CFD computational fluid dynamics

MEMS micro electro mechanical systems

PIV particle image velocimetry

DNS direct numerical solutions

RANS Reynolds averaged Navier-Stokes equations

LES large eddies simulations

ECB cintura ciliare equatoriale

nMPs magnetic nanoparticles

NLs nanoliposomes

NIR near infrared

RFT resistive force theory

SBT slender body theory

ZBN zooming bioNematic

Introduzione

Lo studio dei microrganismi marini, di cui sono riportati alcuni esemplari in figura 1, per la varietà di fenomeni coinvolti, si colloca in un contesto multidisciplinare, al crocevia tra fisica, ingegneria, biologia e matematica applicata. Le ricerche su questo argomento sono pertanto numerose e articolate.

Con il mio lavoro ho ripercorso storicamente gli studi più accreditati che nel corso degli ultimi anni hanno cercato di spiegare la teoria dei meccanismi propulsivi dei microrganismi marini, oggi alla base di interessanti ricerche per le possibili applicazioni in ambito medico. L'analisi si è concentrata sugli aspetti legati alla fluidodinamica in alcune delle ricerche condotte a partire dagli anni '50 fino agli studi più recenti pubblicati nel luglio 2022.

Dopo una prima lettura degli articoli scientifici, volta ad avere un quadro generale sugli argomenti, ho preso in esame gli studi con particolare attenzione all'impostazione teorico-matematica al fine di cogliere eventuali elementi di continuità e/o sviluppo. Successivamente ho messo in relazione i contenuti delle varie ricerche con l'obiettivo di individuare la presenza di aspetti comuni e differenze. Le mie considerazioni relative a questi confronti sono presentate nei capitoli 2 e 3 in cui, nello specifico, ho affrontato la fisica che governa gli spostamenti a bassi numeri di Reynolds e, in seguito, le teorie matematiche utilizzate nel corso degli anni per determinare, oltre al campo di moto, le forze necessarie alla locomozione dei microrganismi.

Nella stesura di questo lavoro, ho però voluto introdurre la propulsione dei microrganismi marini da un punto di vista biologico delineando, nel capitolo 1, le modalità implementate in natura per l'autopropulsione, rappresentate dalle appendici fluidodinamiche.

Per offrire un quadro più completo, nel capitolo 4 ho presentato altre

funzioni regolate dalla fluidodinamica con impatto non solo sulla locomozione, ma anche sulle capacità di alimentarsi proprie dei microrganismi.¹ Dall'analisi e dal confronto delle ricerche ho anche riscontrato l'importanza dei progressi tecnologici che ha accompagnato e assistito il loro evolversi. Ho pertanto dedicato il quinto capitolo alla presentazione di due particolari tecniche di calcolo e analisi, la PIV e la CFD, determinanti per ottenere risultati più precisi e rappresentativi della realtà. Nell'ultimo capitolo ho riportato i recenti studi di carattere biomedico che, utilizzando le conoscenze acquisite sulla propulsione dei microrganismi, hanno permesso ai ricercatori di sviluppare dispositivi microbiorobotici.

¹Didascalia delle immagini di figura 1. (a) Il coccolitoforo *Emiliania huxleyi* rivestito da scaglie di carbonato di calcio, dette coccoliti, appartenenti al nanoplancton calcareo. (b) Alga coloniale *Volvox carteri*. (c) *Thalassiosira pseudonana* rivestita da un muro cellulare, chiamato frustola, tipico delle diatomee. (d) L'alga verde biflagellata *Chlamydomonas reinhardtii*. (e) Il copepoda *Pareuchaeta norvegica* in cui sono ben visibili le antenne per il mechanosensing. (f) Catena di diatomee del tipo *Thalassiosira pseudonana*. (g) Il dinoflagellato *Ornithocercus thumii*. (h) Il dinoflagellato *Ceratium ranipes*. (i) Immagine del ciliato *Paramecium caudatum*. (j) Batterio immobilizzato di *Escherichia coli*. (k) Sperma del riccio di mare nel tentativo di fecondare un uovo. (l) Assemblaggio naturale di fitoplancton dal Golfo del Maine. (m) Immagine SEM del batterio *Vibrio parahaemolyticus*. (n) Immagine SEM del cianobatterio marino *Prochlorococcus*, uno degli organismi fotosintetici più abbondanti sulla terra.

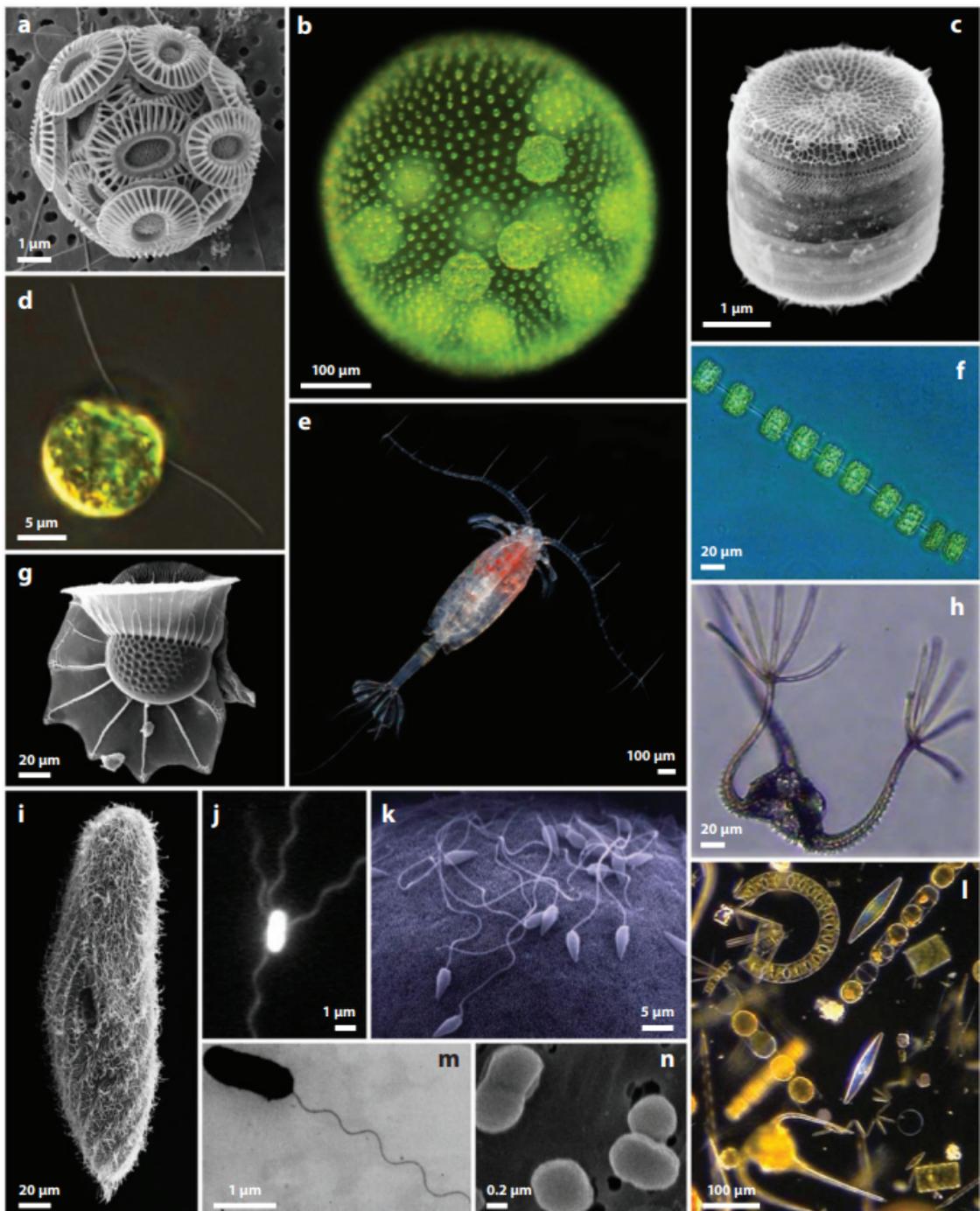


Figura 1: Immagini SEM di alcuni microrganismi planctonici

Capitolo 1

Aspetti biologici

I microrganismi sono una delle più importanti forme di vita sul pianeta Terra, non solo per la loro vasta biodiversità ed elevata biomassa quanto per l'adempimento di funzioni di primaria importanza negli ecosistemi [2]. Uno dei bacini con il più alto tasso di microrganismi è rappresentato dagli oceani. In essi si trovano, per l'appunto, i microrganismi marini. Fanno parte di questa specie il fitoplancton, che sta alla base della catena alimentare e produce quasi la metà dell'ossigeno mondiale attraverso meccanismi di fotosintesi su larga scala. È poi presente lo zooplancton, specie eterotrofa, che riveste il ruolo di fertilizzatore in quanto ricicla la DOM (materia organica disciolta) e la trasferisce ad organismi più grandi, alimentando in questo modo uno dei più importanti cicli biogeochimici, quello del carbonio [3].

Gli organismi trattati in questa tesi fanno parte del plancton microbico, termine con cui si identifica una delle tre categorie con cui vengono classificati gli organismi marini insieme a necton e benthos. Plancton in greco significa vagabondo. I microrganismi marini devono infatti i loro movimenti su larga scala al trascinarsi imposto dalle correnti marine e dai moti ondosi, a differenza del necton di cui fanno parte, ad esempio, i pesci e del benthos, che comprende gli organismi adattatisi a vivere nei fondali marini. Ciò nonostante, soffermandosi sulle scale micrometriche, oltre ai microrganismi viventi passivi, si può constatare anche la presenza di organismi, detti micronuotatori, in grado di dirigere attivamente il proprio moto, eseguendo spostamenti locali grazie ai meccanismi di autopropulsione. Questi consentono loro di adempiere a svariate funzioni biologiche in ottica di conservazione della specie che consistono principalmente nella ricerca di zone ricche di nutrienti o nella caccia e nella regolazione del proprio galleggiamento.

Ruolo della fluidodinamica

La fluidodinamica governa molte funzioni assolve dai microrganismi marini, quali la propulsione, l'assorbimento di nutrienti e la fertilizzazione. Lo studio di queste specie deve pertanto inevitabilmente coinvolgere considerazioni di tipo fluidodinamico.

Alcune specie di plancton, nonostante l'etimologia, hanno sviluppato nel corso dei millenni appendici superficiali che gli permettono di nuotare attivamente, compiendo piccoli spostamenti per riorientarsi, controllare il galleggiamento, predare e cercare nutrienti.

Ciglia e flagelli sono due tipologie di appendici sfruttate dal plancton per la locomozione. In base al tipo di appendice presente in superficie, si possono distinguere i microrganismi in ciliati e flagellati. Gli stessi flagellati possono presentare un flagello procariote o eucariote.

Le ciglia sono morfologicamente simili ai flagelli, ma rispetto a questi hanno un diametro maggiore e una lunghezza inferiore. Sfruttano inoltre un diverso meccanismo per la propulsione.

1.1 Flagello

Il flagello è un organo a forma di bastoncino affusolato che si protrae dalla superficie del microrganismo. La sua lunghezza è maggiore di quella del corpo al quale è ancorato. Spesso è presente in numero superiore all'unità, distribuito equamente sulla superficie. In questo caso si parla di flagelli peritrichi. Nel momento in cui essi vengono attuati e generano spinta [4], per effetto della resistenza idrodinamica dovuta al fluido in movimento, tendono ad accumularsi sul retro rispetto al senso di marcia dell'organismo. Inoltre, a causa delle forze di interazione fluidodinamica che si sviluppano tra i flagelli, si uniscono tra di loro in una sorta di treccia (bundle). Tipici batteri flagellati sono l'*Escherichia coli*, la *Chlamydomonas* e il *Bacillus subtilis*.

Esistono due tipologie distinte di flagello: flagello procariote ed eucariote.

1.1.1 Flagello procariote

Il flagello più semplice concettualmente e strutturalmente è quello procariote, mostrato in figura 1.1a. Alla sua base c'è un motore a gradiente protonico, inserito nella membrana interna del microrganismo, che comunica la rotazione ad un gancio flessibile terminante con il flagello vero e proprio. Il motore

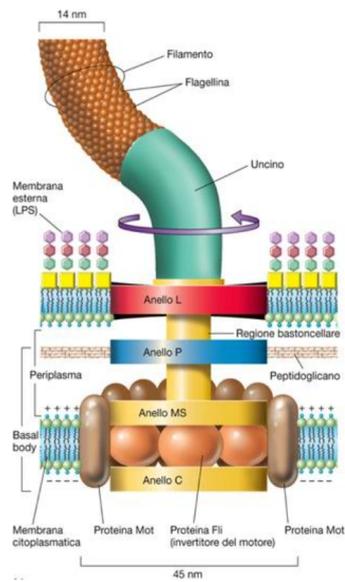
protonico sfrutta un gradiente di ioni idrogeno all'interno della cellula per generare una rotazione che viene trasmessa, tramite il gancio, al flagello. Il movimento alla base della propulsione è pertanto rotatorio. La proteina di cui è composto il flagello procariote è la flagellina; essa si avvolge in un motivo elicoidale a costituire un rigido e stretto cilindro. Per invertire il senso di avanzamento del microrganismo è sufficiente invertire il senso di rotazione del flagello.

1.1.2 Flagello eucariote

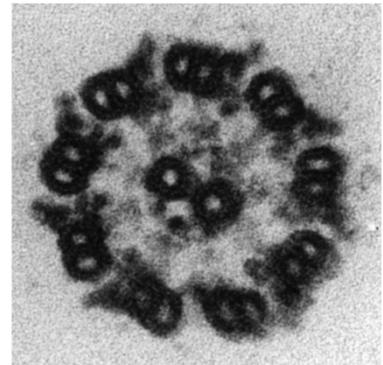
Il flagello eucariote invece, pur essendo esternamente molto simile a quello procariote, si differenzia da quest'ultimo in quanto a composizione, struttura interna e tipologia di attuazione meccanica. E' costituito infatti da 9 coppie perimetrali di microtubuli disposti in modo da formare una struttura circolare e una doppietta di microtubuli centrale, a costituire la struttura tipica degli organismi eucarioti denominata assonema, raffigurata in figura 1.1b. Ad ogni filamento è ancorato un motore lineare a base proteica, la dineina, che ricava energia dalla scissione della molecola di ATP e forza le doppiette di microtubuli a scorrere le une sulle altre. In questo modo le doppiette, flettendosi alternativamente sul dorso e sul ventre, modificano globalmente la forma del flagello. I microrganismi dotati di flagello eucariote sviluppano la forza propulsiva facendo quindi ondeggiare il proprio apparato locomotore.

Tabella 1.1: Tabella riassuntiva delle proprietà dei flagelli eucarioti e procarioti

	Eucariote	Procariote
Movimento	flessione	rotazione
Energia	pompa ATP	pompa protonica
Struttura	9 + 2	elica cava
Proteina	tubulina	flagellina



(a) Flagello procariote



(b) Struttura 9+2 tipica dell'assonema

Figura 1.1: Struttura interna delle due tipologie di flagello presenti in natura

1.2 Ciglia

La seconda tipologia di organo di propulsione è costituita dalle ciglia, di cui è proposta un'immagine in figura 1.2.

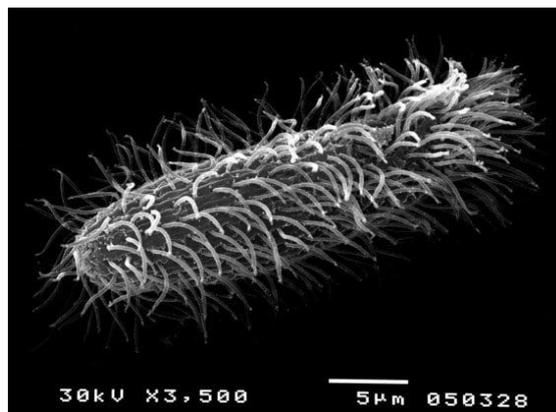


Figura 1.2: Immagine al SEM di un microrganismo ricoperto di ciglia

Le ciglia sono analoghe ai flagelli eucarioti, rispetto ai quali hanno una

lunghezza inferiore, pochi μm in confronto alle centinaia dei flagelli, e una distribuzione superficiale più uniforme a formare un fitto strato ciliare.

Svolgono inoltre funzioni quali la percezione e il trasporto di fluidi. Il movimento che le ciglia adottano per generare spinta sfrutta il concetto, ripreso in seguito, di anisotropia della resistenza. Il movimento infatti consiste in un battito all'indietro, detto in gergo "power stroke", durante il quale viene esposta al fluido l'area superficiale maggiore (il ciglio è allungato nella sua interezza) per generare il massimo della resistenza e quindi della spinta. Nel battito di ritorno, "return stroke", il ciglio si ripiega invece su se stesso, esponendo meno superficie e generando di conseguenza meno resistenza. Si riesce così a evitare la reversibilità del flusso di Stokes, discussa nel capitolo 2.1.2. Questo tipo di movimento è riprodotto in sequenza da tutte le ciglia a formare un'onda metacronica. L'avanzamento di tale onda sulla superficie ha l'effetto di generare un impulso propulsivo in maniera continuativa nel tempo, permettendo ai ciliati di raggiungere velocità di spostamento superiori a quelle dei flagellati. L'attivazione in sequenza dei battiti avviene per un fenomeno spontaneo di sincronizzazione [5] che coinvolge fenomeni di interazione idrodinamica tra ciglia. Per studiare l'origine fisica della coordinazione dei battiti sono stati proposti vari approcci. Uno di questi prevede un'accurata modellazione della meccanica di ogni ciglio e, in particolare, della generazione di forza nell'assonema in funzione del carico fluidodinamico esterno, calcolando il battito collettivo tramite una simulazione numerica di tipo CFD. I risultati mostrano che due ciglia attuate con una differenza di fase iniziale raggiungono una condizione di sincronia dopo due battiti. Nel caso in cui ci sia un elevato numero di ciglia invece le onde metacroniche compaiono naturalmente come risultato delle interazioni idrodinamiche. Studi successivi hanno dimostrato che in questo contesto ha un ruolo determinante anche l'aspetto energetico: a causa delle forze viscosive, è energeticamente favorita la presenza di una piccola differenza di fase tra i battiti di due ciglia vicine, in modo tale che il campo di moto generato dal battito di un ciglio non contrasti l'attuazione viscoelastica del ciglio adiacente ma sia, appunto, in concordanza di fase.

Capitolo 2

Flussi di Stokes

Le dimensioni dei microrganismi, unite alla loro velocità di locomozione e al tipo di fluido in cui sono immersi fanno sì che il numero di Reynolds che caratterizza il flusso da loro generato sia molto inferiore all'unità. Tale parametro è definito come il rapporto tra forze inerziali e forze viscosse presenti nel sistema di interesse. Una sua stima permette di discriminare tra flussi laminari e turbolenti. Nel caso in cui $Re \gg 1$ il flusso è considerato inerziale e si possono trascurare le forze viscosse, approssimazione adoperata ad esempio nello studio aerodinamico di profili alari al di fuori dello strato limite. Per numeri di $Re \ll 1$, a essere trascurate sono le forze inerziali, e la situazione è quella di flusso laminare.

Tipici flussi a basso numero di Reynolds si riscontrano nella lubrificazione, nei canali di apparecchi MEMS e, in natura, per l'appunto, nei microrganismi marini, nelle colate laviche e nei moti del mantello terrestre.

Concentrandoci sui microrganismi marini, vengono qui di seguito presentati alcuni tra i parametri caratteristici.

Tabella 2.1: Grandezze caratteristiche del flusso di microrganismi marini

Grandezza	Simbolo	Unità di misura	Valore
Velocità	U	$\frac{\mu m}{s}$	~ 10
Lunghezza	L	μm	$1 \div 10$
Densità	ρ	$\frac{kg}{m^3}$	10^3
Viscosità	μ	$Pa \cdot s$	10^{-3}

Tali valori restituiscono un numero di Reynolds pari a

$$Re = \frac{\rho UL}{\mu} \sim 10^{-5} \div 10^{-4}$$

È quindi verificata l'ipotesi di $Re \ll 1$.

Nel limite di $Re \rightarrow 0$ è possibile operare una semplificazione delle equazioni di Navier-Stokes, in cui scompaiono di fatto i termini inerziali, responsabili delle non linearità dovute alle derivate parziali di secondo grado [6]. La linearizzazione porta alle equazioni di Stokes

$$\begin{aligned} -\nabla p(\mathbf{r}) + \mu \nabla^2 \mathbf{v}(\mathbf{r}) &= 0, \\ \nabla \cdot \mathbf{v} &= 0. \end{aligned} \tag{2.1}$$

Applicando l'operatore di divergenza e rotore rispettivamente alla prima e alla seconda equazione delle 2.1, si ottiene

$$\nabla^2 p = 0; \tag{2.2}$$

e

$$\nabla^2 \boldsymbol{\omega} = 0 \tag{2.3}$$

Risulta quindi che la pressione e la vorticità, rispettando l'equazione di Laplace, sono funzioni armoniche. La soluzione di un flusso di Stokes si riduce quindi alla determinazione delle variabili $\boldsymbol{\omega}$ e p che soddisfino 2.3 e 2.2. In particolare, dalla 2.3, si ricava che il flusso è dovuto alla sola diffusione molecolare della vorticità all'infinito in tutte le direzioni [6]. La sorgente di tale vorticità è rappresentata dal corpo mediante la condizione di aderenza a parete.

Qualsiasi flusso potenziale $\mathbf{u} = \nabla \phi$ soddisfa le 2.1 con la pressione costante dal momento che si annulla il termine viscoso. I flussi potenziali associati alle equazioni di Stokes sono determinati unicamente dalle condizioni al contorno in campo lontano e a parete, rappresentate in quest'ultimo caso dal requisito di tangenza per la velocità superficiale. Vengono esclusi quindi tutti i casi di non-slittamento tra fluido e parete, compresi quelli generati dall'autopropulsione di un microrganismo marino. Per ampliare il set di soluzioni ai flussi di Stokes si includono i casi in cui la pressione non è uniforme. Nel fare ciò si introduce nel campo di moto la presenza di una forza esterna che agisce in un singolo punto del fluido \mathbf{F} , rappresentata da una funzione di distribuzione a delta di Dirac. Così facendo si modifica

l'equilibrio di forze e, di conseguenza, l'equazione di Stokes che assume la seguente forma

$$\mathbf{F}\delta(\mathbf{r}) - \nabla p + \mu\nabla^2\mathbf{v} = 0 \quad (2.4)$$

Come sarà analizzato in seguito, \mathbf{F} rappresenta la soluzione fondamentale dei flussi di Stokes e prende il nome di stokeslet.

2.1 Proprietà dell'autopropulsione a bassi numeri di Reynolds

Trascurare le forze inerziali ha diverse conseguenze sulla fluidodinamica che, a loro volta, si ripercuotono sui meccanismi di propulsione dei microrganismi [5].

2.1.1 Teorema della reciprocità

La linearità delle 2.1 consente di ricavare relazioni utili alla risoluzione di problemi legati ai flussi di Stokes. Tra queste rientra il teorema della reciprocità, del quale Brenner ha ricavato la versione generalizzata per il caso di flussi a differente viscosità [7].

Si tratta di un principio dei lavori virtuali, applicato a un dominio fluido di volume V racchiuso da una superficie S con normale n , che assume una forma semplice. Ammettendo l'esistenza di due soluzioni non banali \mathbf{u}_1 e \mathbf{u}_2 delle 2.1 che soddisfino le medesime condizioni al contorno, per il teorema della reciprocità i lavori virtuali misti, ottenuti come prodotto del campo di stress del sistema 1 sul campo di moto del sistema 2 e viceversa, coincidono.

$$\mu_1 \iint_S \mathbf{u}_1 \cdot \boldsymbol{\sigma}_2 \cdot n dS = \mu_2 \iint_S \mathbf{u}_2 \cdot \boldsymbol{\sigma}_1 \cdot n dS \quad (2.5)$$

La relazione 2.5, se applicata al problema del nuoto di un microrganismo, permette di ricavare una relazione utile ad esplicitare il rapporto tra la velocità di nuotata e la velocità di deformazione nel caso di geometrie sferiche. Attraverso successive semplificazioni si ottengono i seguenti risultati:

$$\begin{aligned} U &= -\frac{1}{4\pi R^2} \iint_S u_s dS, \\ \Omega &= -\frac{3}{8\pi R^3} \iint_S n \times u_s dS \end{aligned} \quad (2.6)$$

2.1.2 Reversibilità cinematica

Dalle 2.1 si osserva l'indipendenza dal tempo che, insieme alla linearità, porta alla reversibilità cinematica. Secondo tale proprietà, un istantaneo cambiamento del campo di forza non modifica la geometria del flusso ma solo la direzione in cui avviene. Se infatti la velocità di traslazione \mathbf{U} e la velocità di rotazione $\mathbf{\Omega}$ del microorganismo venissero ridimensionate di una costante α , di modo che $\mathbf{U} \rightarrow \alpha\mathbf{U}$ e $\mathbf{\Omega} \rightarrow \alpha\mathbf{\Omega}$, per la linearità delle 2.1 l'intero campo di moto si ridimensionerebbe della stessa costante, per cui $p \rightarrow \alpha p$ e $\mathbf{u} \rightarrow \alpha\mathbf{u}$. La reversibilità si osserva ponendo $\alpha^1 = -1$.

Applicando la reversibilità dei flussi di Stokes alla locomozione dei microrganismi si giunge a due importanti proprietà: indipendenza dello spostamento dalla velocità di deformazione e teorema della capasanta.

Indipendenza dello spostamento dalla velocità di deformazione

Questa prima proprietà stabilisce che la distanza percorsa da un microorganismo durante un cambio di configurazione superficiale è invariante rispetto alla velocità di deformazione del corpo, dipendendo solo dalla sequenza geometrica adottata. Di seguito viene proposta una breve dimostrazione matematica di quanto esposto a parole.

Rimaneggiando l'equazione 2.5 si può ricavare la funzione che lega la velocità istantanea di spostamento del corpo rigido $\mathbf{U}(t)$ alla velocità di movimento delle appendici superficiali, che prende il nome di *swimming gait* e si indica con \mathbf{u}_S . Risulta quindi che

$$\mathbf{U}(t) = \iint_{f(\mathbf{r}_S)} \mathbf{r}'_S \cdot \mathbf{g}(\mathbf{r}_S) dS. \quad (2.7)$$

Integrando nel tempo la 2.7 ricavo lo spostamento

$$\Delta\mathbf{X} = \int_{t_0}^{t_1} \mathbf{U}(t) dt \quad (2.8)$$

Si consideri ora di percorrere la stessa sequenza di forme ma a una velocità diversa, ottenendo per cui una nuova storia temporale delle geometrie $\mathbf{r}'_S(t')$.

¹Con $\alpha = 0$, $\mathbf{u} = 0$. Se il campo di forza cessasse istantaneamente, il microorganismo risponderebbe con una brusca interruzione del moto. In altre parole, quando $Re \rightarrow 0$ la $d_c \rightarrow 0$. Per d_c si intende il parametro che descrive la distanza necessaria al microorganismo per arrivare a una condizione di velocità nulla a seguito dell'interruzione di spinta o, in altre parole, l'inerzia del sistema

Una mappatura lega univocamente gli istanti temporali $t' = f(t)$ mentre $\mathbf{r}'_S(t') = \mathbf{r}_S(t)$ in ogni momento. Il nuovo spostamento diventa

$$\Delta \mathbf{X}' = \int_{t_0}^{t_1} \mathbf{U}'(t') dt' = \int_{t_0}^{t_1} \mathbf{U}'(f(t)) f'(t) dt. \quad (2.9)$$

Sviluppando il termine all'interno dell'integrale e applicando la regola della catena si ottiene

$$\mathbf{U}'(t') f'(t) = \iint_{f(\mathbf{r}'_S)} \frac{d\mathbf{r}'_S}{dt'} f'(t) \cdot \mathbf{g}(\mathbf{r}_S) dS = \iint_{f(\mathbf{r}_S)} \frac{d\mathbf{r}_S}{dt} \cdot \mathbf{g}(\mathbf{r}_S) dS \quad (2.10)$$

Risulta che $\mathbf{U}'(t') f'(t) = \mathbf{U}(t)$ e quindi $\Delta \mathbf{X}' = \Delta \mathbf{X}$. E' quindi confermato, come si voleva dimostrare, che la distanza netta percorsa da un micronotatore dipende solo dalla sequenza di forme e non dalla velocità con cui viene attuata.

Teorema della capasanta

La seconda proprietà è racchiusa nell'enunciato del teorema della capasanta, proposto da Edward Mills Purcell nella rivista scientifica "Life at low Reynolds number" nel 1977 [8]:

Teorema 1. *Un nuotatore che esibisce un movimento simmetrico nel tempo non può ottenere uno spostamento netto in un fluido Newtoniano a basso numero di Reynolds come ad esempio un fluido altamente viscoso. Un tale nuotatore deforma il proprio corpo verso una forma particolare tramite una sequenza di movimenti e quindi ritorna alla forma di partenza attraversando la stessa sequenza al contrario. Questo moto viene definito reciproco ed è invariante rispetto all'inversione temporale.*

In sostanza Purcell, sulla base delle proprietà delle equazioni di Stokes applicate ai microrganismi afferma che un nuotatore, per spostarsi in un fluido Newtoniano a bassi Re, deve praticare delle sequenze di movimenti che non siano reciproche se osservate in seguito a un'inversione temporale. L'unico organismo costretto ad eseguire movimenti reciproci è quello dotato di un solo grado di libertà, come ad esempio la rotazione attorno ad una cerniera. Ne è un esempio la capasanta in figura 2.1, dalla quale il teorema prende il nome. Secondo il teorema 1 un tale organismo non riuscirebbe ad auto propellersi in questi ambienti dal momento che può eseguire solo movimenti reciproci dovuti alla rotazione dei suoi due semigusci attorno ad

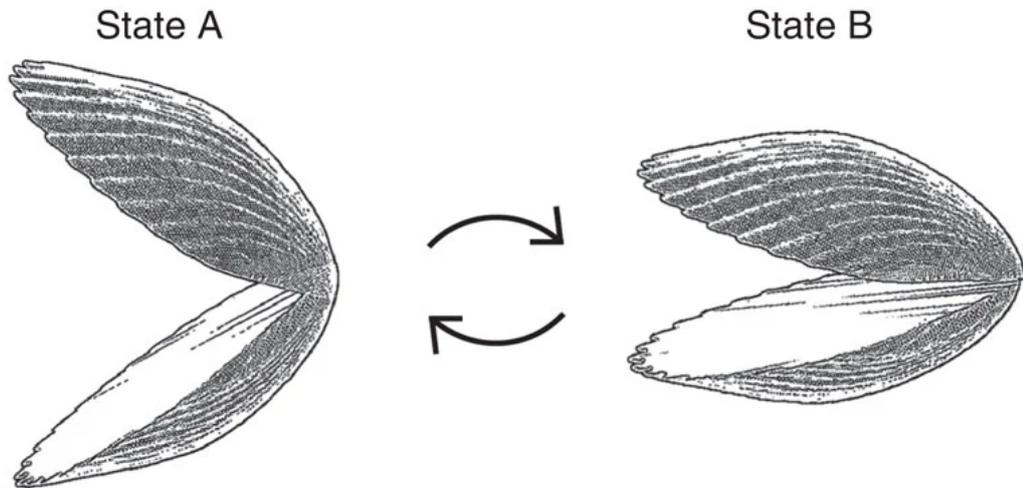


Figura 2.1: Movimento reciproco tipico della capasanta. L'apertura e chiusura dei due gusci segue la stessa sequenza di forme, risultando, secondo il teorema 1 in uno spostamento netto pari a zero.

una cerniera centrale. In pratica però, date le dimensioni centimentriche, l'assunzione di $Re \ll 1$ non è verificata per la capasanta, che riesce infatti ad autopropellersi.

Al contempo, risulta relativamente semplice per un microrganismo sviluppare forze propulsive, dovendo solamente praticare delle sequenze di deformazioni non reciproche. Purcell, con particolare riferimento al batterio *Escherichia coli*, individuò come non reciproci i movimenti ottenuti dall'agitazione del flagello in funzione di remo o elica,

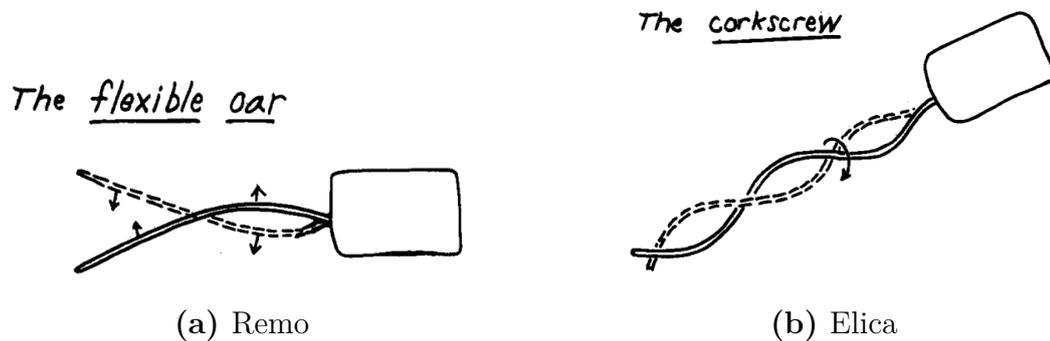


Figura 2.2: Movimenti non reciproci

2.1.3 Proporzionalità lineare tra forza e velocità

Altra immediata conseguenza dell'assenza di forze inerziali è che ogni azione, compresa la propulsione, è riconducibile unicamente ad un'interazione viscosa tra corpo e fluido. Questa è la più grande differenza tra microrganismi e macrorganismi che si muovono in un fluido (sia esso aria, acqua o di altro tipo). Se per i secondi è possibile isolare con buona approssimazione l'origine delle forze propulsive, dovute alla cessione di quantità di moto e quindi all'accelerazione di un corpo dotato di inerzia, dall'origine delle forze di resistenza, per i primi una separazione così netta non è praticabile. Trascurando infatti le forze d'inerzia, le forze propulsive e di resistenza sono della stessa natura, ovvero viscosa. Come vedremo in seguito, per questo motivo vengono imposte restrizioni sui meccanismi di generazione della spinta.

Con riferimento alle equazioni cardinali della dinamica [9] qui riportate,

$$\begin{aligned}\sum \mathbf{F}_{ext} + \mathbf{F}_i &= 0 \\ \sum \mathbf{M}_e + \mathbf{M}_i &= 0\end{aligned}\tag{2.11}$$

trascurando le forze e i momenti d'inerzia \mathbf{F}_i e \mathbf{M}_i , esse si riducono a

$$\begin{aligned}\sum \mathbf{F}_{ext} &= 0 \\ \sum \mathbf{M}_e &= 0\end{aligned}\tag{2.12}$$

Nelle \mathbf{F}_{ext} sono comprese le forze agenti sul sistema dall'esterno, come ad esempio le forze di campo gravitazionale \mathbf{g} , e quelle esercitate sul fluido dal microrganismo $\mathbf{F}(t)$.

Ipotizzando che il sistema sia isolato, le uniche forze agenti sono quelle esercitate sul fluido, pertanto

$$\mathbf{F}(t) = 0\tag{2.13}$$

Come già discusso, tali forze sono dovute all'interazione viscosa tra fluido e microrganismo sia per quanto riguarda la propulsione che per quanto riguarda la resistenza. Per questo motivo, dalla definizione di forza viscosa, la dinamica del sistema dipenderà da una relazione lineare tra forza e velocità.

2.1.4 Spinta basata sulla resistenza

Dalle considerazioni appena fatte sui flussi di Stokes, è possibile comprendere intuitivamente l'origine della propulsione a bassi numeri di Reynolds dei

microrganismi marini. Poiché le uniche forze non trascurabili sono di natura viscosa, la spinta deve basarsi sulla resistenza. Inoltre il microrganismo è costretto ad eseguire movimenti che gli permettano di evitare la reversibilità cinematica e che al contempo possano essere ripetuti nel tempo. Tutto ciò porta allo sviluppo di movimenti ciclici che sfruttano l'anisotropia della forza, ottenuta variando la geometria esposta al flusso. Molte teorie, supportate da esperimenti, individuano un fattore di proporzionalità tra il coefficiente di resistenza normale e quello tangenziale al flusso. Per molti microrganismi il valore di tale coefficiente è stimato essere pari a 2.

L'anisotropia fa sì che le forze nelle direzioni normali e tangenziali, se sommate, non si annullino ma diano una componente risultante nella direzione del moto, come in figura

$$\mathbf{f}_{prop} = (\eta_t - \eta_n)u \sin \theta \cos \theta \mathbf{e}_x \quad (2.14)$$

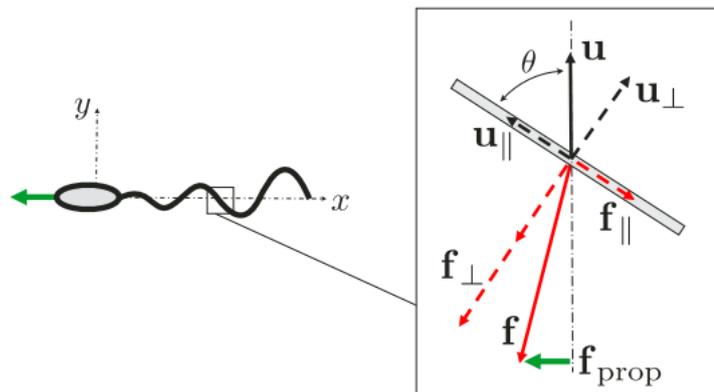


Figura 2.3: Visualizzazione dell'effetto propulsivo dovuto all'anisotropia delle forze

2.2 Metodi di risoluzione

La propulsione a bassi numeri di Reynolds, per la sua natura fisica, si presta a essere risolta analiticamente. Di seguito verranno discussi due metodi di risoluzione: il metodo dei valori al contorno, qui esposto sinteticamente, e quello delle singolarità, affrontato in maniera più rigorosa.

2.2.1 Metodo dei valori al contorno

A partire dalle considerazioni sulle equazioni di Stokes e, nello specifico, dall'indipendenza dello spostamento dalla velocità di deformazione si evince la natura geometrica dell'auto-propulsione a bassi numeri di Reynolds. Questo suggerisce la presenza di una struttura puramente matematica su cui impostare la risoluzione del problema fluidodinamico. Applicando ragionamenti algebrici è possibile studiare gli effetti causati dallo sviluppo di una sequenza di deformazioni superficiali sul moto del microrganismo.

A ogni deformazione del corpo corrisponde infatti una specifica forma, intesa come una serie di punti geometrici delimitati da un contorno chiuso. L'insieme di tutte le possibili forme costituisce lo spazio delle configurazioni. È qui necessario distinguere le forme localizzate nello spazio da quelle non localizzate. Queste ultime sono ottenute assumendo che due forme localizzate nello spazio che differiscono solo per una rotazione rigida sono identiche.

In assenza di forze esterne, possiamo affidare a ogni forma localizzata nello spazio un sistema di riferimento a essa solidale centrato nel suo baricentro. Conoscendo la sequenza di forme non orientate nello spazio assunte dal microrganismo, S_0 , il problema consiste nel ricavare la corrispondente sequenza di forme localizzate S in funzione dello spostamento rigido.

In altre parole, poiché il microrganismo deforma la propria superficie per muoversi nel mezzo fluido, una possibile soluzione del flusso prevede di determinare lo spostamento netto di rototraslazione subito da un microrganismo, in assenza di forze esterne, risolvendo le equazioni di Stokes in aggiunta a condizione sul contorno imposte dalla geometria assunta dal corpo a seguito di deformazioni superficiali infinitesime.

Per determinare la relazione esistente tra i due spazi configurazionali ci si avvale di una matrice di spostamenti rigidi \mathbb{R} , per cui $S(t) = \mathbb{R}S_0(t)$ in cui S è l'impulso propulsivo, qui inteso come una sequenza di forme. Dal momento che i movimenti avvengono continuamente su piccole scale temporali, è conveniente determinare \mathbb{R} integrando nel tempo gli spostamenti infinitesimali $\frac{d\mathbb{R}}{dt}$. Si procede in questo senso con la determinazione del potenziale di gauge A , definito come la roto-traslazione netta risultante da una deformazione infinitesimale del corpo. Analiticamente A si ottiene dalla seguente equivalenza

$$\frac{d\mathbb{R}}{dt} = \mathbb{R}(\mathbb{R}^{-1}\frac{d\mathbb{R}}{dt}) = \mathbb{R}A \tag{2.15}$$

Per determinare A si fa riferimento al seguente ragionamento. Di per sé, la sequenza di forme S_0 non genera alcun movimento perché richiederebbe la presenza di forze e momenti che agiscano sul corpo dall'esterno, contraddicendo le ipotesi iniziali di corpo libero. Per ovviare a questo problema allora si sovrappone alla sequenza di forme S_0 il contro flusso che si originerebbe se il microrganismo si spostasse rigidamente. Tale flusso è determinato dalla risoluzione delle equazioni di Stokes con la condizione di velocità a parete imposta dalla sequenza S_0

$$\begin{aligned}\nabla \cdot \mathbf{v} &= 0, \\ \nabla^2 \boldsymbol{\omega} &= 0, \\ \mathbf{v}|_{S_0} &= \frac{\delta S_0}{\delta t}.\end{aligned}\tag{2.16}$$

La condizione che deve rispettare tale flusso è quella di cancellare asintoticamente all'infinito le forze e i momenti esercitati dal fluido sul corpo, ripristinando così le ipotesi di corpo non soggetto a forze dall'esterno.

Questo primo metodo analizzato sfrutta quindi considerazioni matematiche e si avvale delle condizioni al contorno per determinare il flusso di Stokes. Può essere applicato però solo ai microrganismi che, tramite contrazioni, possiedono il controllo della propria forma, S_0 , e non esercitano direttamente forze e momenti sul fluido. Rientrano in questa categoria gli squirmers, modelli matematici che simulano i microrganismi ciliati, mentre ne sono esclusi i flagellati.

2.2.2 Metodo delle singolarità

Un altro metodo, risalente ai lavori pionieristici di Lorentz (1897), Oseen (1927) e Burgers (1938) è quello delle singolarità. Tale metodo si basa sulla linearità delle equazioni di Stokes per cui, se f è una funzione, x e y sono due incognite e $A, B \in \mathbb{R}$, allora

$$f(Ax + By) = Af(x) + Bf(y).$$

Da questa proprietà deriva un'importante risultato, ovvero il principio di sovrapposizione degli effetti. Secondo tale principio, se \mathbf{u}_1 e \mathbf{u}_2 sono due soluzioni, allora una loro combinazione lineare, $A\mathbf{u}_1 + B\mathbf{u}_2$ è ancora una soluzione dell'equazione.

Grazie alla proprietà di linearità deriva la possibilità di individuare campi di moto singolari come soluzioni fondamentali delle equazioni di Green a essi associati. Sfruttando poi il principio di sovrapposizione degli effetti è possibile ottenere una soluzione a un problema complesso, quale la propulsione di un microrganismo marino, sommando tra loro poche soluzioni fondamentali [10].

Riferendosi ai microrganismi flagellati, la snellezza caratteristica del loro organo propulsivo consente di disporre sulla sua linea media che corre lungo il flagello una distribuzione di singolarità di campo. Sovrapponendo il flusso generato da ogni singolarità si può ricreare una distribuzione continua di densità di forza che simuli gli effetti del flagello sul fluido.

E' necessario, a questo punto, fare un richiamo sulle singolarità di campo, quali lo Stokeslet, la sorgente/pozzo e la doppietta, le cui linee di campo generate sono raffigurate in figura 2.4. Di seguito mi soffermo sulla descrizione dello Stokeslet, dal quale derivano poi tutte le singolarità di ordine superiore al secondo come, ad esempio, i termini quadrupolari.

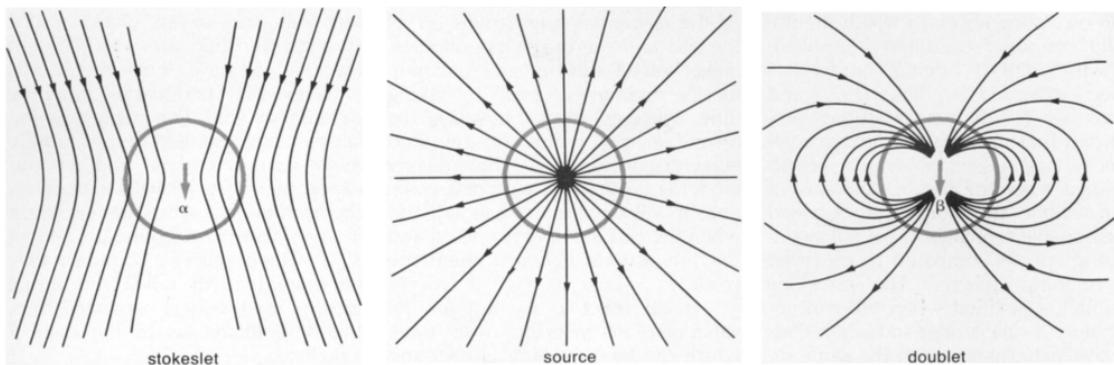


Figura 2.4: Visualizzazione delle linee di flusso generate dalle tre tipologie di singolarità; L'intensità della velocità del flusso tende a zero seguendo le rispettive leggi di decadimento spaziale.

Stokeslet

Lo Stokeslet è la soluzione fondamentale delle equazioni di Stokes. Fisicamente rappresenta l'effetto che una forza puntiforme F , posizionata in r' , eserciterebbe sul fluido. Si chiama fondamentale perché costituisce, per i problemi descritti dalle equazioni di Stokes, il mattoncino di base con il quale costruire una loro qualsiasi soluzione.

Dal punto di vista matematico invece lo Stokeslet rappresenta la funzione di Green associata all'equazione di Stokes. Si può parlare di funzione di Green in quanto gli operatori differenziali in questione sono lineari, a seguito della semplificazione apportata dall'aver considerato $Re = 0$, caso limite di situazioni in cui $Re \ll 1$. La funzione di Green è una funzione ausiliaria che permette, se integrata, di risolvere un'equazione differenziale lineare. Solitamente è indicata con la lettera \mathbf{G} ed è funzione del punto \mathbf{r}' in cui è posizionato l'oggetto di interesse, in questo caso la forza puntiforme, e del punto in cui essa è calcolata, \mathbf{r} . Risulta quindi che $\mathbf{G}(\mathbf{r}', \mathbf{r})$. In questo specifico caso \mathbf{G} prende il nome di tensore di Oseen, in onore del fisico che per primo lo ha calcolato. Conoscendo $\mathbf{G}(\mathbf{r}', \mathbf{r})$ posso risolvere il campo di velocità generato da una forza puntiforme nel caso di flusso di Stokes, anche detto "creeping motion".

Derivazione analitica dello Stokeslet

Esistono vari approcci per determinare $\mathbf{G}(\mathbf{r}', \mathbf{r})$. Quello più intuitivo dal punto di vista fisico sfrutta le potenzialità della funzione di Green. Si tratta del metodo presentato da Dhont [11] il quale dapprima considera una forza \mathbf{F} che agisce sul fluido in un punto \mathbf{r}' , per cui si ha che

$$\mathbf{F}(\mathbf{r}) = \mathbf{F}\delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}')$$

In questa espressione compare la funzione delta di Dirac $\delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}')$, che possiede le seguenti caratteristiche:

$$\begin{aligned} \mathbf{F}(\mathbf{r}) &= \int_{\mathbb{R}^3} \mathbf{f}(\mathbf{r}')\delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}')d\mathbf{r}' \\ \mathbf{r} \neq \mathbf{r}' : \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}') &= 0 \\ \mathbf{r} = \mathbf{r}' : \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}') &= \infty \\ \int_{\mathbb{R}^3} \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}')d\mathbf{r}' &= 1 \end{aligned} \tag{2.17}$$

dove $\mathbf{f}(\mathbf{r}')$ indica la forza per unità di massa. Il ruolo della funzione delta è quello di riprodurre analiticamente una forza puntiforme.

Dalla linearità delle equazioni di Stokes segue che $\mathbf{v}(\mathbf{r}) \propto \mathbf{F}(\mathbf{r}')$ e dipende dalla direzione della forza e dalla distanza dal punto in cui essa è applicata. Si individua nel tensore di Oseen $\mathbb{T}(\mathbf{r} - \mathbf{r}')$ la costante di proporzionalità che lega forza e velocità. Lo stesso ragionamento si applica alla pressione, messa in relazione alla forza dalla quantità vettoriale $\mathbf{g}(\mathbf{r} - \mathbf{r}')$. Risulta quindi che

$$\mathbf{v}(\mathbf{r}) = \mathbb{T}(\mathbf{r} - \mathbf{r}') \cdot \mathbf{F} \tag{2.18}$$

$$p(\mathbf{r}) = \mathbf{g}(\mathbf{r} - \mathbf{r}') \cdot \mathbf{F} \quad (2.19)$$

Considerando ora un campo in cui è presente una distribuzione uniforme di forza con densità $\mathbf{f}(\mathbf{r}')$, in virtù della linearità delle equazioni di Stokes, è possibile applicare il principio di sovrapposizione degli effetti per cui le precedenti espressioni assumono la seguente forma

$$\mathbf{v}(\mathbf{r}) = \int d\mathbf{r}' \mathbb{T}(\mathbf{r} - \mathbf{r}') \cdot \mathbf{f}(\mathbf{r}') \quad (2.20)$$

$$p(\mathbf{r}) = \int d\mathbf{r}' \mathbf{g}(\mathbf{r} - \mathbf{r}') \cdot \mathbf{f}(\mathbf{r}') \quad (2.21)$$

Noto il campo di forze e la funzione di Green, da queste relazioni risulta immediato ottenere tramite integrazione, i valori di velocità e pressione.

L'obiettivo dichiarato di questo paragrafo è invece quello di ricavare la funzione di Green, ovvero lo Stokeslet.

Si procede a tal fine sostituendo nell'equazione di Stokes

$$\begin{aligned} -\nabla p(\mathbf{r}) + \mu \nabla^2 \mathbf{v}(\mathbf{r}) &= -\mathbf{F} \delta(\mathbf{r}), \\ \nabla \cdot \mathbf{v} &= 0. \end{aligned} \quad (2.22)$$

le relazioni di velocità e pressione precedentemente ottenute e si considera un campo di forze specifico, ovvero quello generato da una forza puntiforme

$$\mathbf{F} = \int d\mathbf{r}' \mathbf{f}(\mathbf{r}') \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}') \quad (2.23)$$

Da tale sostituzione ottengo le seguenti espressioni, comprensive di alcuni passaggi algebrici

$$\begin{aligned} \int d\mathbf{r}' [\nabla \cdot \mathbb{T}(\mathbf{r} - \mathbf{r}')] \cdot \mathbf{f}(\mathbf{r}') &= 0, \\ \int d\mathbf{r}' [\nabla \mathbf{g}(\mathbf{r} - \mathbf{r}') - \mu \nabla^2 \cdot \mathbb{T}(\mathbf{r} - \mathbf{r}') - \mathbb{I} \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}')] \cdot \mathbf{f}(\mathbf{r}') &= 0 \end{aligned} \quad (2.24)$$

Poiché la densità di forza esterna è arbitraria, tali relazioni sono soddisfatte annullando il termine tra parentesi quadre, ottenendo in definitiva le espressioni delle funzioni di Green:

$$\nabla \cdot \mathbb{T}(\mathbf{r} - \mathbf{r}') = 0, \quad (2.25)$$

$$\nabla \mathbf{g}(\mathbf{r} - \mathbf{r}') - \mu \nabla^2 \cdot \mathbb{T}(\mathbf{r} - \mathbf{r}') - \mathbb{I} \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}') = 0 \quad (2.26)$$

Applicando l'operatore di divergenza a 2.26 e la condizione di incompressibilità ottengo l'equazione di Poisson (equazione di Laplace non omogenea) per il vettore della pressione

$$\nabla^2 \mathbf{g} = -\nabla \cdot \mathbb{I} \delta(\mathbf{r}) \quad (2.27)$$

Ci siamo ricondotti in questo modo a una forma nota, la cui soluzione rappresenta la soluzione fondamentale dell'equazione di Laplace, per cui

$$\mathbf{g} = -\nabla \left(\frac{1}{4\pi r} \right)$$

Sostituendo questa relazione nell'equazione per la pressione ottengo, dopo alcuni passaggi, l'espressione per il tensore di Oseen:

$$\mathbb{T}(\mathbf{r}) = \frac{1}{8\pi\mu r} \cdot \left(\mathbb{I} + \frac{\mathbf{r}\mathbf{r}}{r^2} \right) \quad (2.28)$$

Il campo di velocità generato dallo Stokeslet decade nello spazio come $\frac{1}{r}$. Le altre singolarità invece, essendo sue derivate, hanno un decadimento spaziale più rapido. Se consideriamo che un microrganismo nuoti in assenza di forze esterne, di conseguenza le forze che esso genera devono dare risultante nulla all'infinito (force and torque free). Sono adatti a descrivere questo comportamento, pertanto, i termini di dipolo simmetrici o gli stresslets, con decadimento spaziale pari a $\frac{1}{r^2}$ e non le sorgenti puntiformi di forza o momento quali Stokeslets e rotlets, usati per descrivere delle situazioni in cui si considerano gli effetti della gravità.

Capitolo 3

Studi storici

Le ricerche sulla propulsione dei microrganismi hanno mosso i loro primi passi in contemporanea agli sviluppi delle teorie sui flussi di Stokes. Oltre a essere un argomento di notevole interesse per la biologia marina infatti rappresentava, e tuttora rappresenta, un campo di ricerca nello sviluppo di teorie e modelli matematici per lo studio di fenomeni tipici della micro/nano scala, in cui si possano trascurare le forze inerziali.

A riprova del rapporto di simbiosi tra la propulsione dei microrganismi e le teorie sui flussi di Stokes, è la caratura degli studiosi che se ne sono occupati. Si ritrovano infatti nomi influenti del panorama scientifico tra XIX e XX secolo, in particolare di quello riguardante la fluidodinamica, come Taylor, Lighthill, Purcell, Blake, Lamb e Hancock.

Storicamente parlando, la propulsione dei microrganismi è stata studiata, con metodi al contorno, prendendo come modello di locomozione l'onda planare generata dal flagello ondulante. Va intesa in questo senso la teoria del foglio di carta oscillante proposta da sir Geoffrey Taylor [12].

3.1 Foglio di Taylor

La teoria del foglio di carta, proposta nel 1951 da Taylor, studia il moto di un fluido vicino a un foglio lungo il quale vengono fatte propagare onde di spostamento laterale.

L'obiettivo è di verificare se onde di questo tipo riescano a produrre sul fluido sforzi di tipo viscoso, unici responsabili del moto a bassi numeri di Reynolds.

La scelta delle onde di spostamento laterali come mezzo propulsivo rispecchia le osservazioni naturali fatte sui microrganismi. Questi, nella maggior parte dei casi, sfruttano per muoversi organi detti flagelli che compiono oscillazioni, qui simulate da un foglio ondulante.

Lo stesso meccanismo è adottato anche dai pesci su scala più larga. La fisica che però spiega i due fenomeni è diversa. I pesci, trasmettendo onde di spostamento laterali lungo il proprio corpo, stabiliscono attorno a loro una circuitazione non nulla, responsabile nei fluidi a bassa viscosità della generazione di forze d'inerzia sfruttate ai fini della propulsione. In questo caso la viscosità non è direttamente responsabile della propulsione ma ha il ruolo, marginale, di determinare l'intensità della circuitazione instauratasi. Diversamente dai pesci, i microrganismi, sfruttano la viscosità a loro favore per sviluppare forze propulsive.

Descrizione della teoria

Per simulare il movimento ondulatorio del flagello viene presa come riferimento la seguente forma d'onda

$$y_0 = b \sin(kx - \sigma t) \tag{3.1}$$

In cui $\frac{\sigma}{k}$ è la velocità di propagazione dell'onda e b l'ampiezza.

Una particella sul flagello si muove con una velocità che, scomposta nelle direzioni x ed y vale

$$\begin{aligned} u_0 &= 0, \\ v_0 &= \frac{\partial y_0}{\partial t} = -b\sigma \cos(kx - \sigma t). \end{aligned} \tag{3.2}$$

Il flusso che si sta cercando deve essere tale da rispettare i valori di u_0 e v_0 come condizione al contorno su 3.1.

Introducendo la funzione di corrente ψ , legata alle velocità u e v dalla seguente relazione

$$\begin{aligned} u &= -\frac{\partial \psi}{\partial y}, \\ v &= \frac{\partial \psi}{\partial x} \end{aligned} \tag{3.3}$$

si dimostra che, per un flusso di Stokes, soddisfa la funzione biarmonica

$$\nabla^4 \psi = 0 \quad (3.4)$$

In prima approssimazione, ipotizzando piccoli valori per il prodotto bk , un modello di funzione d'onda che soddisfi la 3.4 assume la seguente espressione

$$\psi = (A_1 y + B_1) e^{-ky} \sin(kx - \sigma t) - Vy \quad (3.5)$$

in cui V è la velocità della corrente all'infinito. Imponendo le condizioni al contorno si trovano i valori di A_1 , B_1 e V ; risulta che

$$\psi = -\frac{b\sigma}{k} (1 + ky) e^{-ky} \sin(kx - \sigma t) \quad (3.6)$$

$$V = 0 \quad (3.7)$$

Si verifica che con quest'approssimazione il flagello non riesce ad esercitare una forza propulsiva sul fluido dato che la velocità di movimento relativa è nulla.

Assumendo ora l'ipotesi di ampie oscillazioni, non si possono più trascurare i termini contenenti $b^2 k^2$. La funzione d'onda è quindi ricavata da uno sviluppo in serie fino a ordini di grandezza che contengano potenze quarte del parametro bk .

Procedendo con i calcoli, similmente a quanto svolto in precedenza, si ottiene una formula che lega U , velocità di propagazione delle onde a V , velocità del fluido all'infinito rispetto al foglio

$$\frac{V}{U} = \frac{2\pi^2 b^2}{\lambda^2} \left(-\frac{19}{4} \frac{\pi^2 b^2}{\lambda^2} \right) \quad (3.8)$$

Risulta in questo caso che la velocità V è non nulla, pertanto è dimostrata l'efficacia propulsiva a bassi Re di un onda trasmessa lungo un corpo.

3.2 Flagello rotante

Nel 1975 Howard Berg dichiarò nella rivista *Nature* di essere giunto alla conclusione che, in base alle prove allora disponibili, batteri come l'*Escherichia coli* dovessero far ruotare e non ondeggiare il proprio flagello per muoversi.

Su questa osservazione vennero avviati diversi studi sperimentali. Tra questi riporto il lavoro di Purcell sulla determinazione della matrice di

resistenza che mette in relazione le grandezze di forza e velocità proprie di un microrganismo propulso da un'elica rotante a $Re \ll 1$

$$\begin{pmatrix} \mathbf{F} \\ \mathbf{M} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \mathbf{A} & \mathbf{B} \\ \mathbf{B} & \mathbf{C} \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} \mathbf{U} \\ \boldsymbol{\Omega} \end{pmatrix} \quad (3.9)$$

A è il coefficiente di resistenza che sentirebbe l'elica se venisse fatta traslare a una velocità \mathbf{U} senza la possibilità di ruotare; C invece rappresenta la resistenza caratteristica nella situazione opposta, in cui l'elica viene fatta ruotare senza traslare. Infine B può essere ricavato esaminando il momento richiesto per trainare un'elica a velocità \mathbf{U} senza ruotare.

La simmetria della matrice dei coefficienti deriva dall'aver assunto che gli effetti di due eliche coassiali, abbastanza distanziate da non interagire tra di loro, si sommino. Il termine B è nullo nella stragrande maggioranza dei casi eccetto per i corpi privi di un piano di simmetria, anche detti a geometria chirale. In questi casi, infatti, i termini di accoppiamento tra forza e velocità angolare e tra momento angolare e velocità non si annullano, permettendo a tali organismi di traslare a seguito dell'applicazione di una forza angolare, come nel caso del flagello rotante.

Da questo studio Purcell stimò che i valori di efficienza propulsiva dei microrganismi marini a bassi numeri di Reynolds si aggirassero sull'1%. Ciononostante, la potenza specifica richiesta risultava di $0.5 \frac{W}{kg}$, in confronto ai $30 - 40 \frac{W}{kg}$ necessari per sostenere il metodo di propulsione adottato dagli esseri umani. Da questa osservazione Purcell trasse la conclusione che la strategia adottata per nuotare non fosse importante dal momento che anche una bassa efficienza di nuotata richiede un piccolo dispendio energetico.

In concreto, è importante riuscire ad incrementare l'apporto di nutrienti disciolti nel mezzo fluido rispetto a quelli assorbiti, in ogni caso, grazie alla diffusione molecolare. Purcell individuò la grandezza caratteristica di tale fenomeno nel rapporto tra il tempo di diffusione $t_D = \frac{l^2}{D}$ e il tempo di locomozione $t_l = \frac{l}{v}$, in cui D è il coefficiente di diffusione. A questo parametro adimensionale diede il nome di "Stirring number", a ricordare l'effetto dell'agitazione di un fluido sulla concentrazione molecolare, e lo indicò con la lettera S

$$S = \frac{t_D}{t_l} = \frac{lv}{D} \quad (3.10)$$

Affinchè la locomozione sia efficace, $S > 1$. Questo requisito permette di individuare la distanza minima che i micronuotatori devono percorrere per sfuggire all'influenza spaziale della diffusione

$$l > \frac{D}{v}$$

Sostituendo il valore della diffusione delle molecole in acqua $D = 10^{-5}$ e quello della velocità di locomozione, risulta un valore di $l = 30\mu m$, in accordo con quanto osservato da Purcell.

3.3 Idrodinamica flagellare

Negli anni seguenti vennero formulate teorie più accurate che tenessero in considerazione nei calcoli le oscillazioni di grande ampiezza provocate dal flagello, in precedenza trascurate sia dalla teoria del foglio di Taylor, che dalle sperimentazioni condotte da Purcell.

Vennero sviluppate, a questo scopo, teorie come la “Resistive force theory” e la “Slender body theory” il cui approccio è quello di simulare l'effetto del microrganismo sul flusso, e viceversa, utilizzando come strumenti analitici le soluzioni fondamentali delle equazioni di Stokes.

Resistive force theory

La RFT (resistive force theory) è una teoria sviluppata per studiare le forze e i momenti totali esercitati su un fluido dalla presenza di un flagello, basandosi sulla proporzionalità tra forza e velocità tipica dei flussi a $Re \ll 1$. In particolare essa considera che la forza esercitata sul fluido da un segmento del flagello sia proporzionale alla velocità $\mathbf{V}(\mathbf{s}, t)$ della linea media locale dello stesso segmento, in cui s è la coordinata che corre lungo l'asse del flagello [13]. La forza totale sul fluido è calcolata integrando le forze locali per unità di lunghezza, a partire dai coefficienti di resistenza in direzione normale e tangenziale C_n e C_t . Risulterà quindi che

$$f_n = \mu C_n u_n, f_t = \mu C_t u_t$$

Una stima di questi coefficienti proviene dai lavori di Gray e Hancock (1955) i quali elaborarono e verificarono l'idea, ripresa poi con più dettaglio dal teorema 2, secondo la quale gli effetti del flagello sul fluido sono imputabili

a una distribuzione di Stokeslets di forza \mathbf{f}_s per unità di lunghezza. I valori ottenuti sono i seguenti

$$C_t = \frac{2\pi}{\ln \frac{2\lambda}{a} + \frac{1}{2}}, C_n = 2C_t$$

La differenza tra i due coefficienti è indice dell'anisotropia delle forze alla base della spinta dovuta alla resistenza.

La resistive force theory descrive gli effetti del movimento flagellare sul fluido limitandosi ai fenomeni locali. Per sua natura invece, in un flusso di Stokes sono importanti anche gli effetti a lungo raggio, quali le interazioni tra i vari segmenti in cui è stato suddiviso il flagello e quelle tra il corpo e il flagello stesso, dal momento che lo stokeslet - la soluzione fondamentale delle equazioni di Stokes - ha un lento decadimento spaziale, pari a r^{-1} .

Slender body theory

Come già accennato, l'approccio della RFT allo studio dell'idrodinamica flagellare presenta delle limitazioni dovute ai termini logaritmici dell'espansione in serie che restringono il campo di applicabilità della teoria a filamenti esponenzialmente lunghi, tali per cui vale la relazione $\frac{a}{L} \sim e^{-\frac{1}{\epsilon}}$. La RFT inoltre non cattura gli effetti di interazione idrodinamica tra parti distanti di un filamento curvilineo, usando gli stessi coefficienti di resistenza per descrivere la sedimentazione di un filamento rettilineo e di un filamento a forma di anello. Per il secondo, infatti, le interazioni tra i vari segmenti in cui è scomposto il filamento sono amplificate dalla minore distanza reciproca, incrementandone la velocità di sedimentazione.

Queste problematiche sono affrontate dalla SBT (slender body theory), tradotto "teoria dei corpi snelli". La SBT si propone come la naturale estensione della RFT. Per risolvere il campo di moto generato da un corpo in condizioni di flusso di Stokes si avvale, al pari della RFT, della teoria di Lorentz. Descrive quindi qualsiasi tipo di flusso a bassi numeri di Reynolds come una sovrapposizione di campi di moto elementari.

Esistono vari approcci alla SBT. Il più completo e intuitivo, proposto da James Lighthill, [14] pone le basi del concetto di idrodinamica flagellare. Sfruttando la proprietà di snellezza, egli ebbe l'intuizione di predisporre le singolarità di campo e, nello specifico gli stokeslets, lungo la linea media del flagello. Introdusse quindi una nuova singolarità - il dipolo - sovrapposta

allo stokeslet con l'obbiettivo di soddisfare le condizioni a parete di non slittamento, al pari di quanto accade per la sfera.

Lighthill riassunse questi risultati stipulando il seguente teorema:

Teorema 2. *Se \mathbf{f}_s è la forza per unità di lunghezza con la quale un flagello di piccolo raggio a agisce su un fluido, dove la variabile s indica la distanza misurata lungo la linea mediana del flagello da una data sezione trasversale, allora il flusso risultante può essere rappresentato da una distribuzione di stokeslet luno la linea mediana di forza \mathbf{f}_s per unità di lunghezza, accompagnati da dipoli di forza*

$$-\frac{a^2 \mathbf{f}_n(s)}{4\mu} \quad (3.11)$$

per unità di lunghezza; \mathbf{f}_n è il vettore normale alla linea centrale ottenuto risolvendo \mathbf{f}_s sul piano normale alla linea centrale. Questo campo di velocità del fluido \mathbf{u} combacia strettamente il movimento flagellare \mathbf{w} così che l'intera sezione trasversale in cui $s = s_0$ si muove con la velocità

$$\mathbf{w}(s_0) = \frac{\mathbf{f}_n(s_0)}{4\pi\mu} + \int_{r_0 > \delta} \frac{r_0^2 \mathbf{f}(s) + [\mathbf{f}(s) \cdot r_0] r_0}{8\pi\mu r_0^3} ds \quad (3.12)$$

dove $\delta = \frac{1}{2}a\sqrt{e}$ e r_0 è il vettore posizione del punto s_0 sulla linea centrale relativo al punto s .

Per risolvere più agevolmente il problema, Lighthill propose di spezzare i contributi alla velocità superficiale del flagello in due regioni: la regione interna in cui sono presenti distribuzioni di stokeslet e dipoli e una regione esterna, in cui compaiono solo stokeslet, per via del loro minor decadimento spaziale. La scelta della distribuzione dei dipoli deve essere tale da ottenere una soluzione indipendente dalla lunghezza q con cui si è distinta la regione interna da quella esterna. Per provare la validità di questa scelta Lighthill risolse il caso di un flagello di sezione cilindrica su cui agisce una forza vettoriale costante $\mathbf{F}(s) = (f_x, f_y, f_z)$, verificando che effettivamente la 3.12 racchiude i contributi di tutte le componenti di $\mathbf{F}(s)$ sia nella zona interna che in quella esterna.

Capitolo 4

Altre funzioni regolate dalla fluidodinamica

Le considerazioni svolte finora non tengono in considerazione gli effetti della fluidodinamica sulla locomozione passiva, nè tantomeno le interazioni reciproche tra più microrganismi o tra microrganismi e pareti. La fluidodinamica, inoltre, non interessa solo la propulsione di un microrganismo, rivestendo funzioni di primaria importanza anche nella sfera ecologica; ne è un esempio la nutrizione. Un'altro fattore non ancora preso in considerazione è l'effetto sulla propulsione di un fluido complesso. Rientrano in questa categoria i fluidi per i quali il modello di fluido viscoso Newtoniano non è più valido.

4.1 Interazioni idrodinamiche

Finora si è considerato il microrganismo come un'entità a sé stante, trascurando gli eventuali disturbi che si possono presentare in condizioni più complesse, presenti ad esempio nel mondo reale.

Solitamente, infatti, i batteri vengono mantenuti in soluzione sotto forma di popolazioni ad alta densità, risentendo quindi dei campi di moto da loro generati.

Si è osservato che le interazioni idrodinamiche giocano un ruolo importante in vari aspetti biologici, quali ad esempio la riproduzione. Gli spermatozoi che compongono il liquido seminale del topo selvatico, infatti, si aggregano con il risultato di nuotare più velocemente. Altri, invece, accoppiandosi aumentano l'efficienza propulsiva in fluidi altamente viscosi.

Esistono poi particolari tipi di interazione in prossimità di pareti solide. In queste circostanze si osserva il batterio eseguire delle traiettorie circolari, attirato verso la parete dalle forze idrodinamiche.

La fenomenologia delle interazioni richiede pertanto una particolare menzione; di seguito verranno trattate le interazioni tra microrganismi e tra microrganismi e pareti.

4.1.1 Interazioni cellula-cellula

Quando si vuole studiare la dinamica di un gruppo più o meno folto di nuotatori bisogna tenere in considerazione le interazioni reciproche. Ogni microrganismo interagisce con il flusso circostante che, a sua volta, può essere modificato dalla presenza di altri microrganismi agendo in questo senso come mezzo di trasmissione dei segnali fluidodinamici.

Dato che gli organismi sono force-free, il campo di moto in lontananza dal batterio è descritto da una distribuzione di dipoli indicati con \mathbf{p} diretto come l'asse lungo il quale si sviluppa la propulsione.

A seconda di come è orientato il dipolo, invece, si possono distinguere due tipologie di nuotata.

Pushers

Il primo caso, in cui il verso di locomozione del batterio è concorde al dipolo, indicato con il versore che corre lungo il suo asse longitudinale, costituisce la tipologia dei pushers. Il dipolo, considerato positivo per convenzione, ha lo stesso verso del versore con cui si indica l'asse longitudinale del microrganismo, per cui $\mathbf{p} \parallel \mathbf{e}$. Questa è la situazione, descritta nei paragrafi precedenti, che si verifica per l'*Escherichia Coli* e per gli spermatozoi del topo e prevede che la propulsione avvenga a seguito di una quantità di fluido repulsa dal flagello mentre, per la conservazione del volume, dai lati si verifica un flusso entrante.

In questo caso, due micronuotatori posti ad una certa distanza iniziale tendono ad avvicinarsi.

Pullers

Esiste poi un secondo caso, di cui fanno parte le alghe unicellulari *Chlamydomonas*, in cui si verifica la situazione opposta a quella precedentemente

descritta. Il dipolo ha verso discorde rispetto alla direzione di locomozione e il nuotatore prende il nome di puller; in questo caso $p < 0$.

Per questa tipologia di nuotatori, i flagelli si trovano nella parte anteriore e, attraverso un movimento detto a "rana", attirano il fluido all'interno, generando spinta, e lo espellono dai lati. Le direttrici della forza sono entranti lungo l'asse longitudinale e uscenti dai lati. L'interazione che si genera tra due pullers è di tipo repulsivo.

Interazioni latero-direzionali

Per studiare le interazioni latero-direzionali si considera il flusso generato dal dipolo, ottenuto derivando lo Stokeslet, che risulta essere

$$\mathbf{u}(\mathbf{r}) = \frac{p}{8\pi\mu r^3} [3 \cos^2 \theta - 1] \mathbf{r} \quad (4.1)$$

in cui p è il modulo del dipolo e θ l'angolo tra la direzione del moto e la posizione nel dominio \mathbf{r} .

Dall'analisi fisica dimensionale risulta che $p \sim \mu UL^2$. Due pushers affiancati, per cui $\theta = \frac{\pi}{2}$, possiedono allora una velocità relativa di attrazione $\Delta u_{rel} \sim -\frac{p}{\mu r^2}$ mentre due pullers affiancati si respingono.

Interazioni rotazionali

Un altro tipo di interazione che si verifica riguarda il cambio di orientamento.

Un nuotatore risente infatti del campo vorticoso generato dal suo corrispettivo che lo induce, attraverso una rotazione ad una velocità angolare Ω , a cambiare direzione di spostamento. Per definizione $\Omega = \frac{1}{2}\omega$, dove

$$\omega = \text{Rot}(u) = \frac{3p}{4\pi\mu} \frac{(\mathbf{e} \cdot \mathbf{r})(\mathbf{e} \times \mathbf{r})}{r^5} \quad (4.2)$$

La velocità di rotazione dipende quindi dalla posizione angolare e dalla distanza tra i due nuotatori. Risulta che due pushers affiancati e non paralleli, ruotino al fine di riallinearsi mentre due pullers tendono a disporsi in posizione antiparallela.

In entrambi i casi la configurazione finale risultante è quella in cui si sviluppano forze attrattive reciproche.

4.1.2 Interazioni cellula-parete

Oltre a interagire tra di loro, i micronuotatori rispondono anche alla presenza ravvicinata delle pareti solide [15]. Questa interazione, di recente interesse, ha in realtà notevoli implicazioni biologiche. Ad esempio, l'effetto attrattivo che ha una parete verso i batteri ne aumenta la probabilità di adesione ad un substrato, influenzando le prime fasi di formazione di un biofilm e di un'infezione patogenica.

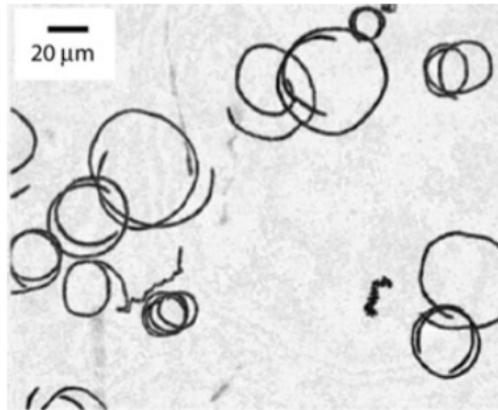
Nella seguente trattazione è stato preso come riferimento biologico il batterio *Escherichia Coli*, rientrante nella categoria dei pusher. Esso è dotato di un corpo a geometria prolata e un flagello elicoidale attuato da un motore rotativo. Quando il flagello ruota con una velocità angolare ω_y , genera un momento torcente che, non potendo essere contrastato dalle forze esterne assenti per ipotesi, deve essere bilanciato da una rotazione del corpo Ω_y in direzione opposta. Un ragionamento analogo vale per la determinazione della velocità di avanzamento U_y .

Quando non sono presenti disturbi, come le pareti, il micronuotatore procede mediamente in linea retta. Per la condizione al contorno di no-slip imposta da una superficie solida, invece, si osserva un intensificarsi delle forze viscosive che interagiscono con il batterio al diminuire della distanza a parete. Il risultato, molto intuitivamente, porta a una coppia di forze parallele alla parete e perpendicolari alla direzione del moto che, applicate sul corpo e sul flagello, costringono il microrganismo a seguire una traiettoria circolare.

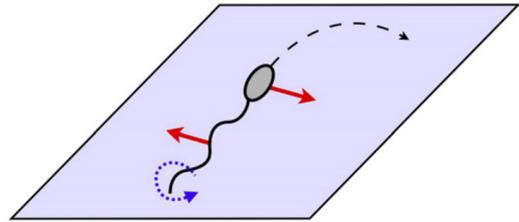
Brevemente viene qui riportata la spiegazione fisica dell'origine di tali forze.

Il corpo, come si è già discusso, ruota nella direzione positiva dell'asse y . Quando si trova particolarmente vicino a parete, risente di un effetto fluidodinamico di distorsione delle linee di campo - studiato per un corpo a simmetria sferica - facente sì che si sviluppi una forza di rotolamento in direzione x .

Al contempo il flagello di forma elicoidale, ruotando, offrirà una porzione di elica più vicina alla parete e una più lontana. Si viene a generare quindi una differenza di forza viscosa dovuta alla condizione di no-slip che, poiché $\omega_y < 0$, è diretta nel verso negativo delle x e quindi è discorde rispetto alla forza sviluppata dal corpo.



(a) Esposizione della durata di 8 secondi di esemplari di *E. coli* che nuotano vicino a una parete.



(b) Visualizzazione delle forze a parete che agiscono sul corpo e sul flagello responsabili della rotazione a parete

Figura 4.1: Traiettorie circolari in prossimità delle pareti.

4.2 Assorbimento dei nutrienti

L'attenzione dei fisici verso la fluidodinamica dei microrganismi marini, storicamente, è stato per lo più rivolto agli aspetti propulsivi; raramente le scoperte in questo ambito vennero declinate in termini ecologici. In realtà la fisica dei fluidi governa molti aspetti di interesse biologico; uno di questi, forse il più importante, è rappresentato dalla nutrizione [16].

Prima di procedere oltre bisogna distinguere i microrganismi in base alla natura del loro sostentamento. Sono osmotrofi tutti i microrganismi autotrofi (fitoplancton) ed i batteri eterotrofi che si nutrono assorbendo molecole organiche disciolte. I restanti organismi eterotrofi, chiamati genericamente zooplancton, si nutrono assorbendo materiale particellare, cellule eterotrofiche o particelle organiche morte. Per quanto riguarda questi ultimi, la nutrizione dipende esclusivamente da processi avvettivi. Per nutrirsi, infatti, lo zooplancton può creare una corrente di alimentazione o, così come le sue prede, nuotare; il trasporto dei nutrienti può anche avvenire ad opera del flusso ambientale. Si capisce così la stretta relazione, a livello di fluidodinamica, esistente tra locomozione e nutrizione.

Se è pur vero che molti fenomeni li accomunano, spesso non è detto che una tecnica sia efficiente per entrambi. Poiché l'ambiente in cui i microrganismi nuotano è caratterizzato da un numero di Reynolds tendente

a zero, l'effetto sul fluido viscoso decade molto lentamente (per lo Stokeslet si ha un decadimento $\sim \frac{1}{r}$).

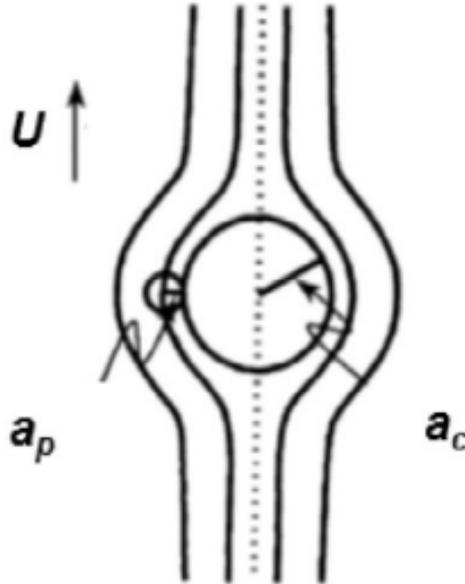


Figura 4.2: Linee di corrente che si sviluppano intorno a un micronuotatore. Con a_c si denota il raggio del predatore mentre a_p indica il raggio della preda. Si nota come la distanza delle linee di flusso in grado di catturare la preda sia minore di a_p .

Quando si nutre, pertanto, è molto probabile che lo strato viscoso che riveste il microrganismo respinga la preda, a meno che questa non si trovi tra due linee di corrente di flusso separate da una distanza pari a un raggio della preda, come in figura 4.2. In questo caso le due linee di flusso riuscirebbero a trattenere la preda. A questo scopo sarebbe quindi preferibile avere molte linee di corrente che si infittissero intorno al nuotatore. Al contempo però ciò significherebbe una maggiore resistenza viscosa e una minore efficienza.

Come è stato accennato lo zooplancton ha a disposizione principalmente due modalità di caccia:

- imboscata → Ci sono due tipi di imboscata: passiva e attiva. L'imboscata passiva prevede che il microrganismo resti immobile annullando così lo strato limite viscoso responsabile della sua individuazione e aspetti che la preda si imbatta in lui. E' attiva invece quando il microrganismo

partecipa in prima persona alla caccia sviluppando una serie di balzi per sorprendere la preda. Questa tecnica, se eseguita bene, gli consente di cacciare in maniera indiscreta. Infatti, acquisendo grande rapidità con il balzo, il numero di Reynolds aumenta notevolmente e si riduce, di conseguenza, lo spessore dello strato limite. L'esecuzione ottimale prevede che il salto sia tale da permettere al microrganismo di raggiungere la sua preda prima che si sviluppi lo strato limite, il cui spessore dipende dal tempo secondo la relazione $\delta = \sqrt{\nu t}$;

- correnti di alimentazione \rightarrow Quando il microrganismo è in movimento, oltre al flusso generato dalla propulsione, può anche creare delle correnti di risucchio. Queste correnti hanno il ruolo principale di facilitare il convoglio di nutrienti verso la bocca. Svolgono inoltre la funzione secondaria di regolare il galleggiamento contrastando la forza di gravità, nel caso in cui essa sia rilevante.

4.3 Locomozione passiva

Non tutti i microrganismi sono in grado di muoversi attivamente nei fluidi in cui sono immersi. Molti tra i batteri più piccoli, infatti, si affidano solamente alle correnti di trascinamento o alle spinte idrostatiche. La fluidodinamica ha comunque impatto sulla locomozione dei microrganismi non dotati di motilità propria interagendo con la loro morfologia. Un parametro determinante in questo senso è l'allungamento. Si riscontra che un *aspect ratio* maggiore dell'unità favorisce la mobilità fornendo una direzione di locomozione privilegiata e un migliore rilevamento dei gradienti chimici. La stragrande maggioranza degli organismi mobili è infatti allungata, con valori di AR che si aggirano intorno a 3 per i batteri e a 5 per i fitoplancton. L'allungamento modifica inoltre la rotazione delle cellule indotta dal flusso.

A seconda della direzione di allungamento rispetto all'asse di rotazione si possono distinguere organismi dalla forma prolata se presentano l'allungamento in direzione parallela all'asse di rotazione o, viceversa, oblata. Per i microrganismi prolata immersi in una corrente si riscontra un particolare fenomeno dinamico caratterizzato da un'oscillazione delle estremità allungate a descrivere delle orbite ellittiche, dette "orbite di Jeffrey", mentre il centro della particella segue il flusso.

4.4 Locomozione nei fluidi complessi

In molte situazioni i microrganismi si ritrovano a dover nuotare in ambienti caratterizzati dalla presenza di fluidi altamente viscosi con comportamenti non descrivibili dal modello di fluido Newtoniano, come ad esempio il muco cervicale. In genere gran parte dei fluidi corporei sono di questo tipo.

Si definisce complesso un fluido che mostra comportamenti non-Newtoniani, quali ad esempio il rilassamento degli sforzi e la variazione di viscosità in funzione della velocità di taglio.

Il rilassamento degli stress in particolare prevede che ci sia un ritardo nella risposta del fluido alla sollecitazione esterna con la conseguenza che non è più valida la reversibilità cinematica.

La dipendenza dello stress dalla velocità di deformazione, invece, introduce termini non lineari nelle equazioni costitutive. Poichè tutti i risultati ricavati per i fluidi Newtoniani si basavano sulla linearità delle equazioni di Stokes, per i fluidi complessi perdono di validità. Non è più valido il teorema di Purcell, nè tantomeno il metodo delle singolarità. Cambiano anche le interazioni idrodinamiche tra microrganismi, in quanto varia anche il comportamento in campo lontano della velocità.

Tutto ciò comporta notevoli complicazioni nella risoluzione del flusso in fluidi in complessi, la cui discussione esula dal seguente lavoro.

Capitolo 5

Nuovi strumenti d'indagine e loro applicazioni

Recentemente, grazie alla potenza di calcolo messa a disposizione dai computer, è possibile studiare in maniera accurata molti aspetti legati alla propulsione dei microrganismi difficilmente descrivibili usando approcci analitici. In questo capitolo vengono presentate due tecniche di indagine insieme ad alcune loro applicazioni in ambito scientifico che, in maniera diversa, sfruttano le potenzialità introdotte dai calcolatori elettronici. Le tecniche in questione sono la PIV (particle image velocimetry) e la CFD (computational fluid dynamics).

5.1 PIV

La PIV è una tecnica sperimentale di visualizzazione e analisi del campo di moto di un flusso. Il set-up prevede la presenza di una camera chiusa all'interno della quale si sviluppa il flusso che si vuole studiare. Nella camera vengono quindi inserite delle particelle, dette *seedings*, dalla densità quanto più possibilmente simile a quella delle sostanze che compongono il fluido di interesse in modo tale da non influenzare lo sviluppo del flusso. Un fascio laser dalla lunghezza d'onda compresa tra i $400 \div 500$ nm illumina la camera e, rifrangendosi sulle particelle per effetto Tyndall, evidenzia una sezione del flusso. Una videocamera riprende la scena scattando dei frame distanziati di

un tempo pari a $t = \frac{1}{f}$, dove f è la frequenza di scatto della videocamera (f si aggira tra i 50 ÷ 100 Hz).

Calcolando la distanza percorsa da una particella illuminata dal laser in due frame consecutivi e dividendola per il tempo intercorso tra i due scatti si ottiene una misura del modulo della velocità. Tale valore si avvicina a quello della velocità istantanea quanto più la frequenza degli scatti è alta (un valore accettabile è di 100 Hz). Estendendo questo calcolo a ogni particella che compone la sezione, si ottiene una misura del modulo del campo di velocità globale. Direzione e verso della velocità invece si ottengono sovrapponendo i due frame e tracciando un vettore che colleghi ogni particella con il suo analogo nel frame sovrapposto. A svolgere queste operazioni è una funzione di autocorrelazione. Generalmente essa fornisce una stima della variazione di un valore calcolato in due istanti successivi e, nel caso si tratti del campo di velocità assume la seguente espressione

$$J_v(\mathbf{x}, t) = \frac{\langle \mathbf{v}(\mathbf{x}, s+t) \cdot \mathbf{v}(\mathbf{x}, s) \rangle_s - \langle \mathbf{v}(\mathbf{x}, s) \rangle_s^2}{\langle \mathbf{v}^2(\mathbf{x}, s) \rangle_s - \langle \mathbf{v}(\mathbf{x}, s) \rangle_s^2} \quad (5.1)$$

Come si può osservare, se il flusso è stabile, la funzione di autocorrelazione si attesta su un valore costante unitario, ad indicare che non c'è variazione di campo tra due istanti successivi. Se il flusso invece è caotico, la funzione di autocorrelazione tende a zero più o meno rapidamente. Per agevolare i tempi di calcolo, si fornisce di volta in volta in input alla funzione di autocorrelazione solo una frazione della sezione illuminata.

5.1.1 Studio di una fase collettiva tramite PIV

Uno degli studi in cui è stato fatto uso della PIV riguarda la caratterizzazione delle proprietà fluidodinamiche dalla fase batterica collettiva ZBN (zooming bioNematic), costituita da un gruppo ad alta densità di microrganismi [17]. La ZBN appare come una regione in continua evoluzione in cui delle celle chiamate falangi, composte da microrganismi che nuotano nella stessa direzione e con la stessa velocità, si costituiscono e si disfano nel giro di pochi secondi originando una dinamica turbolenta estremamente affascinante fatta di vortici e getti. La formazione della ZBN è imputabile al meccanismo biologico della respirazione, per cui il microrganismo tende a muoversi, seguendo il gradiente di ossigeno, verso la superficie di contatto acqua-aria dove si accumula. Un film superficiale di microrganismi così formato, essendo

più denso dell'acqua circostante, è soggetto all'instabilità di Rayleigh-Taylor che porta alla formazione di popolazioni ad alta concentrazione.

Per studiare il fenomeno è stato scelto il *Bacillus subtilis*. A differenza dell'*Escherichia coli*, con il quale condivide le dimensioni (2 - 8 μm), la forma - a bastoncino - e la tipologia di propulsione (flagellare), il *Bacillus subtilis* non è patogenico. Queste caratteristiche lo rendono particolarmente adatto alla conduzione di esperimenti i cui risultati possono essere estesi, per similarità, ad altre forme batteriche di maggiore interesse come l'*Escherichia coli* e la *Salmonella Typhymurium*. In questo esperimento il batterio, immerso in un ambiente di coltura (terrific broth), è stato utilizzato come indicatore in sostituzione delle particelle traccianti.

Ogni individuo che compone la ZBN, risponde alle dinamiche di interazione cella-cella e cella-parete discusse nei paragrafi precedenti per cui, trattandosi di nuotatori di tipo "pusher", se affiancati o allineati ad altri esemplari, ne saranno attratti. Subiranno lo stesso tipo di interazione anche nuotando in prossimità di una parete solida. Le interazioni idrodinamiche, insieme ai processi di taxis e all'ingombro sterico, sono responsabili della formazione delle falangi.

Osservando la ZBN nel suo insieme emergono fenomeni dinamici complessi, quali l'instabilità alle perturbazioni ad alte lunghezze d'onda, che portano alla formazione di getti e mulinelli indici della presenza di zone turbolente. Teoricamente ciò non dovrebbe verificarsi a bassi numeri di Reynolds dal momento che lo sviluppo del flusso è laminare. Per comprendere questo fenomeno allora bisogna introdurre un parametro alternativo al numero di Reynolds che tenga conto delle peculiarità della ZBN. Tra queste, la presenza nella colonia batterica di strutture coerenti dette falangi composte da più individui che nuotano nella stessa direzione a velocità maggiori di quelle proprie dei singoli batteri. Il parametro in

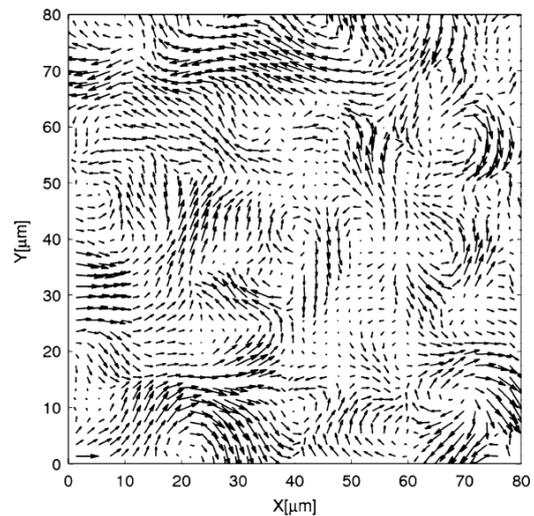


Figura 5.1: Istantanea del campo vettoriale della velocità ottenuto dall'analisi PIV in cui si notano le zone turbolente

questione prende il nome di Bacterial swimming number.

Bacterial swimming number

Per costruire un numero di Reynolds alternativo per descrivere la ZBN si parte considerando la generica forza di Stokes richiesta a un microorganismo per muoversi in un fluido viscoso

$$F = c\mu av$$

in cui c è un fattore geometrico di ordine 10^1 (pari a 6π per la sfera), μ è la viscosità, v la velocità e a una lunghezza caratteristica. Nel caso di n microorganismi tale valore va moltiplicato per n fornendo una forza pari a

$$F_n = cn\mu av$$

A questo punto si opera una stima dello sforzo di taglio che fornisce l'elemento di dissipazione viscosa per la ZBN

$$F_\mu = \frac{\mu U}{L^2}$$

È quindi possibile costruire un parametro, simile al numero di Reynolds, che tenga conto delle caratteristiche del fenomeno in esame

$$Bs = \frac{F_n}{F_\mu} = cna^3 \left(\frac{L}{a}\right)^2 \left(\frac{v}{U}\right) \quad (5.2)$$

Tale parametro prende il nome di “Bacterial swimming number”. Sostituendo gli opportuni valori alle grandezze che compaiono si ottiene $Bs \sim 10^4$. Si noti come, nonostante la fluidodinamica si sviluppi a livello individuale tramite l'immissione localizzata di energia nel fluido da parte del flagello, si osservino fenomeni turbolenti su una scala più larga di quella caratteristica del complesso batterio-flagello.

5.2 CFD

Con il termine CFD (computational fluid dynamics) si intende l'approccio computazionale ad un problema fluidodinamico che consiste nella risoluzione numerica delle equazioni di Navier-Stokes. Eccezion fatta per alcune tipologie

di flusso laminare, quali il flusso di Poiseuille, non è infatti possibile risolverle per via analitica, trattandosi di equazioni alle derivate parziali di secondo grado. La CFD può utilizzare diversi modelli teorici per semplificare i calcoli e ridurre il tempo macchina; tra questi si possono individuare la DNS, le RANS o le LES.

In sintesi, un codice di CFD risolve iterativamente, secondo il modello scelto dall'utente, le equazioni di Navier-Stokes in forma algebrica. Per rendere possibile questa operazione viene usato il metodo ai volumi finiti. Questo metodo consiste nella discretizzazione geometrica del dominio tramite delle celle, nel cui centro vengono determinati e memorizzati i valori di pressione, temperatura e velocità che caratterizzano il flusso. Le celle possono essere di varie forme e la loro scelta dipende dal metodo di interpolazione che si vuole usare per determinare i valori del flusso all'interfaccia cella-cella [18]. L'insieme delle celle, che in gergo viene detto "mesh", costituisce il dominio. La creazione della "mesh" è un passaggio fondamentale per la correttezza dei calcoli.

Il generico software di CFD, una volta definita la griglia di calcolo e il metodo di soluzione, ha poi bisogno delle condizioni al contorno e, qualora venissero usati i metodi RANS o LES, necessita ulteriormente di un modello di chiusura costituito da una serie di equazioni che forniscono condizioni aggiuntive su parametri della turbolenza quali l'energia cinetica e la velocità di dissipazione turbolenta. Tra questi si ritrovano i modelli $k - \epsilon$ e $k - \omega$. Il problema fluidodinamico viene risolto iterando i calcoli un numero prefissato di volte oppure a tolleranza. Infine un post-processore mostra i risultati tramite delle finestre grafiche e permette l'extrapolazione di qualsiasi dato fornendo dei report specifici.

Diversi metodi analitici permettono una soluzione ai flussi che si sviluppano in condizioni di bassi numeri di Reynolds. Ciononostante nella realtà si possono verificare casi in cui sono presenti geometrie complesse o, addirittura, situazioni per cui il numero di Reynolds non è più approssimabile a zero. E' quindi richiesto un approccio con metodi più accurati per avere un grado di validità della soluzione che rispecchi la realtà.

Di seguito verrà descritta l'applicazione della CFD al caso di un flusso il cui l'approssimazione di basso numero di Reynolds non è più accettabile.

5.2.1 Studio CFD di un balzo a bassi Reynolds

Tra i vari meccanismi di autopropulsione e, in particolare, di alimentazione rientra quello del balzo. Si tratta di una tecnica che permette ad alcuni microrganismi di sviluppare una forza impulsiva, responsabile di una brusca accelerazione, che consente loro di attaccare o fuggire dai predatori e di nuotare in maniera rapida ed efficiente. D'altro canto, però, il balzo genera dei flussi turbolenti che aumentano la visibilità del microrganismo nei confronti delle sue prede. Queste ultime infatti, disponendo di una serie di recettori reotattici sensibili alla corrente fluida, riescono a orientarsi nella direzione di sviluppo del flusso avvicinandosi o allontanandosi dai loro predatori. In questo frangente è possibile riscontrare valori di velocità relativamente elevati responsabili dell'incremento del numero di Reynolds che, non essendo più trascurabile, limita l'uso delle equazioni di Stokes.

Uno studio, pubblicato sul *Journal of plankton research* [19], si è occupato della modellazione CFD in regime instazionario tramite il software **ANSYS FLUENT**, del flusso propulsivo associato al balzo per comprenderne la dinamica. In seguito, un confronto con altre tipologie di propulsione quali il trascinamento, la trazione posteriore (pusher) e la trazione anteriore (puller) ha permesso di individuare la tecnica più efficiente energeticamente e, soprattutto, meno invasiva.

Introduzione

Il microrganismo marino in questione è il *Mesodinium rubrum* in figura 5.2, principale responsabile del colore rosso delle acque di alcune aree costiere. Le sue dimensioni si aggirano sui $15 \sim 17 \mu m$. Il suo corpo è suddiviso in due emisferi: quello frontale, in cui sono presenti i tentacoli orali e quello posteriore. Una serie di cirri è posizionata simmetricamente nei due emisferi, alla cui intersezione è presente una ECB (cintura ciliare equatoriale).

Il movimento del salto, osservato per la prima volta grazie a registrazioni video alla velocità di 1000 frame al secondo, è reso possibile grazie all'azione congiunta dell'apparato ECB con i cirri. Dalle registrazioni risulta che, durante la locomozione, i tentacoli orali non impattano frontalmente sulla corrente bensì vengono trascinati, escludendo così l'ipotesi secondo la quale il balzo abbia funzione predatoria.

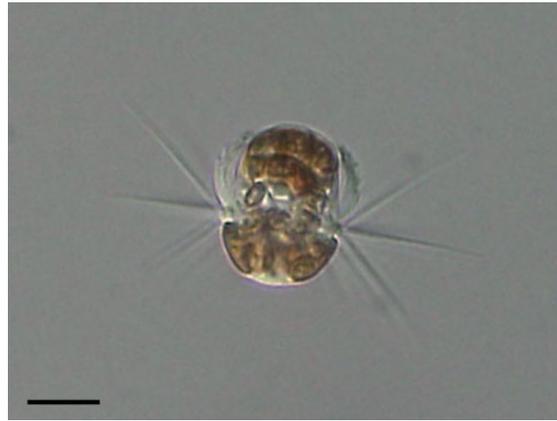


Figura 5.2: Immagine al microscopio ottico del *Mesodinium rubrum* in cui si notano la ECB, i cirri e la suddivisione del corpo in due emisferi.

Set-up sperimentale

Il corpo del microrganismo è stato simulato con una sfera di raggio a , collocata al centro del dominio, rivestita da una regione a forma di corona circolare dello spessore l a rappresentare la ECB. Il dominio fluido, mostrato in figura 5.3, si estende per una lunghezza di $100 a$ e un'altezza di $50 a$ in modo tale da cogliere al meglio gli sviluppi della corrente.

La regione di dominio al di fuori della sfera è stata discretizzata con celle di diversa geometria. L'area adiacente alla sfera, in cui agisce la ECB, è modellata con celle a geometria quadrilatera sottili e allungate, tipicamente usate per studiare i fenomeni viscosi a parete. La restante regione di dominio invece è stata discretizzata con celle triangolari. Per ridurre il numero di celle, e quindi i tempi di calcolo, si è sfruttata la simmetria assiale del problema individuando un piano orizzontale che tagliasse contemporaneamente a metà il dominio e la sfera. A questo piano è stata imposta la condizione di symmetry plane per simulare la presenza del dominio sottostante seppur non presente. I piani anteriore, posteriore e superiore sono stati invece modellati come pressure outlet. Si è inoltre scelto un sistema di riferimento in coordinate cilindriche, stazionario e solidale al corpo e allo strato ciliare a esso collegato. Per simulare ciò che avviene nella realtà, è stata imposta una velocità $U(t)$ alla parete solida e alla regione composta dalle celle quadrilatere. In figura 5.3 è mostrato in dettaglio quanto appena descritto.

Rendendo solidale la sfera con la regione ciliare è possibile applicare a

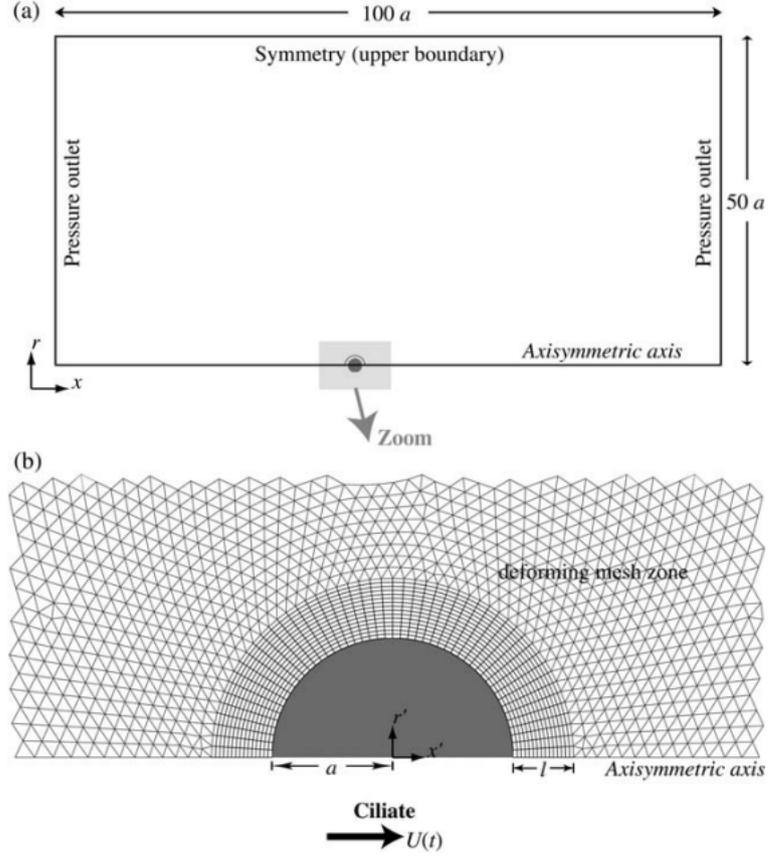


Figura 5.3: In alto è raffigurato il dominio nella sua interezza, con indicazioni sulle dimensioni; in basso è presente il particolare della sfera racchiusa esternamente dallo strato ciliare e poi dalle celle che compongono il dominio restante.

quest'ultima un campo di forza $\mathbf{F}(x, r, t)$ che, nelle sue direzioni assiale e radiale, ha la seguente forma

$$F_x(x, r, t) = -f(t) \sin(\pi\eta) \frac{r'}{\sqrt{x'^2 + r'^2}} \quad (5.3)$$

$$F_r(x, r, t) = f(t) \sin(\pi\eta) \frac{x'}{\sqrt{x'^2 + r'^2}} \quad (5.4)$$

dove $\eta = \frac{\sqrt{x'^2 + r'^2} - a}{l}$, $r' = r$ e $x' = x - x_{ciliato}(t)$. $x_{ciliato}(t)$ è la posizione istantanea a cui si trova il microrganismo determinata dalla sua velocità $U(t)$.

$f(t)$ è invece la densità di forza, determinata analiticamente, che simula l'effetto propulsivo tipicamente sviluppato da uno strato di ciglia. Poiché f dipende dal tempo, il problema è instazionario e richiede pertanto di calcolare la soluzione per ogni step temporale della simulazione con una mesh di volta in volta modificata. Alle 5.3 e 5.4 si aggiunge l'equazione della dinamica

$$m_{ciliato} \frac{dU(t)}{dt} = R(t) + T(t) \quad (5.5)$$

in cui $R(t)$ è la resistenza idrodinamica dovuta agli sforzi di attrito viscoso a parete e al campo di pressione in direzione assiale e $T(t)$ è l'integrale di volume, effettuato sullo strato ciliare, del campo di forza \mathbf{F} .

Il calcolo di $\mathbf{F}(x, r, t)$ è reso possibile risolvendo le equazioni 5.3 e 5.4, in cui sono stati presi come valori del flusso i risultati dello step precedente, e inserendo il risultato nella 5.5 per determinare i nuovi valori dei parametri.

Risultati

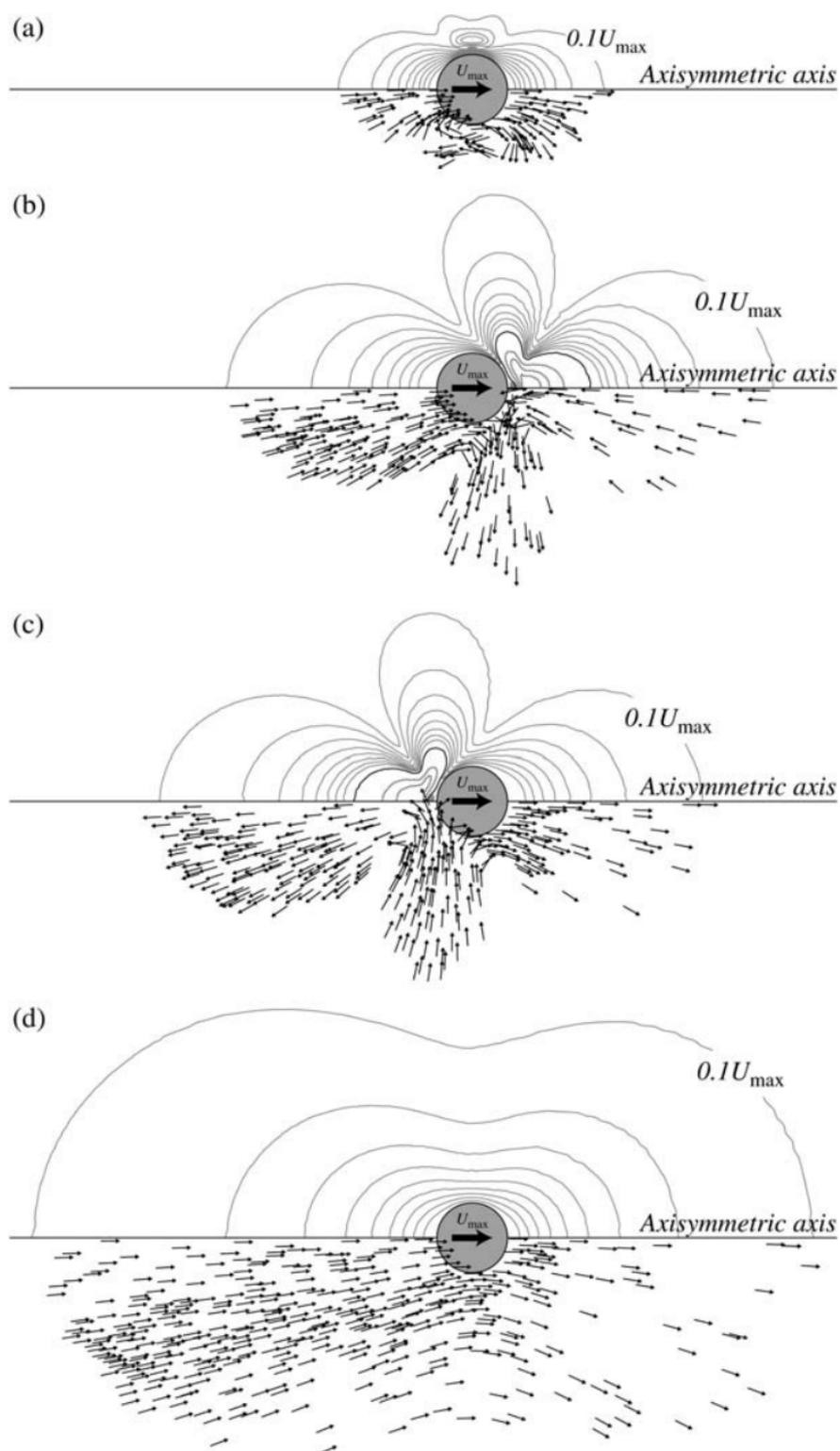


Figura 5.4: Campi di velocità calcolati per i quattro casi di propulsione. Le frecce nella metà inferiore mostrano il campo vettoriale della velocità mentre le linee nella metà superiore indicano zone a velocità costante; in particolare le linee grigie e continue indicano, a intervalli regolari, velocità inferiori a quelle del salto fino a $0,1 U_{jump}$, quelle nere indicano velocità uguali a U_{jump} e quelle grigie punteggiate velocità maggiori di U_{jump} fino a $2 U_{jump}$.

I risultati ottenuti sono stati rielaborati per essere mostrati sulla scena vettoriale del campo di velocità. Si possono osservare evidenti differenze sia in termini di estensione che di intensità del flusso generato nei quattro casi di propulsione proposti. La massima velocità, ottenuta nel primo caso, è di 10.7mms^{-1} con una durata del balzo di 18.6ms .

Il primo flusso in figura 5.4 simula la propulsione per mezzo della ECB e, in accordo con le previsioni, decade con l'inverso del cubo della distanza ($\frac{1}{d^3}$). Il suo comportamento non è quindi assimilabile a quello dovuto ad uno stresslet (doppietta) caratterizzante, invece, i flussi dei modelli pusher e puller. Un decadimento così rapido suggerisce che il salto è la soluzione ideale per minimizzare i disturbi idrodinamici.

Per i modelli di pusher e di puller si ritrova il tipico campo di moto generato da una doppietta, con decadimento pari a $\frac{1}{d^2}$. Per quanto riguarda l'ultimo caso, poichè è presente una forza esterna di trascinamento, il flusso è assimilabile a uno stokeslet ($\frac{1}{d}$). Come è evidente dall'immagine, questa è la situazione in cui si crea il maggiore disturbo idrodinamico.

E' possibile inoltre fare considerazioni energetiche per i quattro casi. Si definisce efficienza propulsiva di Froude, e la si indica con ξ , il rapporto tra la potenza richiesta per trascinare un corpo, in questo caso soggetto alla resistenza idrodinamica, con una velocità U e il lavoro meccanico totale W eseguito nel tempo $t = \tau$

$$\xi = \frac{\int_0^\tau T(t) U(t) dt}{W} \quad (5.6)$$

L'efficienza propulsiva massima si riscontra nel caso banale del corpo trascinato dove, per definizione, il lavoro meccanico totale è proprio quello di trascinamento imposto dall'esterno. Per i restanti casi si osserva una diminuzione dell'efficienza. E' importante osservare però che l'auto-propulsione più efficiente è quella del balzo. In questa situazione si raggiungono efficienze del 70% a fronte di efficienze del 30% e del 10% ottenute con i metodi di trazione anteriore e posteriore rispettivamente.

Capitolo 6

Microrobot per la biomedicina

Grazie ad una consolidata conoscenza delle leggi fisiche che descrivono la propulsione e alla più recente possibilità di ridurre e semplificare i calcoli permessa dalla CFD, negli ultimi anni stanno emergendo numerosi studi volti a trovare applicazioni concrete nell'ambito biomedico. In particolare la branca che riguarda la drug delivery, per la sua rivoluzionaria potenzialità di cura delle malattie oncologiche, unita alle sfide realizzative, è oggetto di studi interdisciplinari promettenti.

La quasi totalità delle ricerche in questo ambito è incentrata sullo sviluppo di microrobot con la funzione di trasportare selettivamente farmaci a determinati tessuti o organi del corpo umano. Le piattaforme microrobotiche sviluppate e testate in laboratorio sono di due tipi: completamente artificiali o ibride. Le prime sono costituite da un micromotore sintetico attuato da uno stimolo esterno di natura magnetica, ottica o acustica. I microrobot ibridi invece abbinano a un microrganismo una componente artificiale così da sfruttarne al meglio le rispettive potenzialità. I microrganismi qui impiegati possono essere dotati di motilità, come l'*Escherichia coli* usato nella ricerca 6.2 oppure svolgere solo la funzione di supporto strutturale al trasporto e al rilascio di farmaci, come nello studio IRONSperm (6.1). In entrambi i casi è richiesta un'approfondita conoscenza dei meccanismi di propulsione per poter manipolare i movimenti in funzione dell'obiettivo.

Di seguito riporto due recenti studi focalizzati sullo sviluppo di microrobot bioibridi.

6.1 IRONSperm

La ricerca IRONSperm, pubblicata da *Science Advances* nel luglio del 2020 [20] si è occupata della realizzazione e caratterizzazione di un microrobot ottenuto applicando sulla superficie di una cellula spermatica nanoparticelle magnetiche (nMPs) e farmaci antitumorali da trasportare al sito di interesse. Al bioibrido così realizzato è stato dato il nome di IRONSperm. Il soggetto scelto è infatti uno spermatozoo di bovino adulto non mobile funzionalizzato con nanoparticelle granulari del diametro di 100 nm ottenute dalla maghemite, un minerale costituito da ossido di ferro Fe_2O_3 .

Un'applicazione simile era già stata testata con scarsi risultati usando però particelle magnetiche di $1\ \mu m$ di diametro depositate sull'intero corpo dello spermatozoo tramite un processo di self-assembly elettrostatico. Con questa tecnica la reazione procede autonomamente fino a che non si ottiene un bilancio elettrostatico tra le cariche elettriche depositate sulle particelle magnetiche e quelle di segno opposto presenti sulla superficie del microrganismo. L'assenza di zone scoperte e le dimensioni delle particelle magnetiche sono però responsabili di una sostanziale riduzione della flessibilità del flagello con diverse ricadute su: riduzione della velocità di locomozione a causa della produzione di onde di piccola ampiezza, compromissione della possibilità di modificare la propria forma per muoversi in spazi ristretti e canali tortuosi e limitazione della capacità di interagire con tessuti morbidi e cellule senza danneggiarli. Quest'ultima è un fattore cruciale per le applicazioni biomediche.

Nella ricerca qui presa in esame, IRONSperm, il problema della flessibilità è stato risolto utilizzando nanoparticelle magnetiche (nMPs) depositate, come nella sperimentazione precedente, con una tecnica di self-assembly elettrostatico concentrandole questa volta solo in zone specifiche dello spermatozoo attraverso l'applicazione di cariche differenti alle nanoparticelle. Evidenze sperimentali hanno dimostrato infatti che nMPs così differenziate presentano una specifica affinità elettrostatica per la creazione di legami in punti diversi dello spermatozoo. In particolare, come si può osservare nella figura 6.1, sono stati individuati quattro segmenti distinti del microrganismo a cui si associano le nanoparticelle con cariche specifiche: testa (h), tratto intermedio (m), parte principale (p) ed estremità distale (d). Si è osservato inoltre che il rapporto tra il materiale magnetico depositato su questi quattro segmenti rispetto al totale è rispettivamente del 31, 8, 51 e 10 %. Viene così garantita, oltre a un'elevata flessibilità dovuta alle zone scoperte, anche

la possibilità di controllare intelligentemente la forma d'onda assunta dal flagello del microrobot.

L'onda che corre lungo il flagello è indotta dalla rotazione della testa secondo una precisa angolazione imposta dal campo magnetico rotante. Ciò avviene perchè le nMPs, assimilate a una distribuzione di dipoli magnetici di momento \mathbf{m}_i , interagiscono con il campo magnetico esterno \mathbf{B} generando un momento torcente $\mathbf{M} = \mathbf{m} \times \mathbf{B}$ che mette in rotazione il microrganismo. Analizzando le prestazioni della nuotata in un range di frequenze di rotazione del campo magnetico compreso tra $3 \leq f \leq 11$ Hz, si è constatato che la propulsione è dovuta al propagarsi di un'onda lungo il flagello e non alla rotazione dell'intero microrganismo.

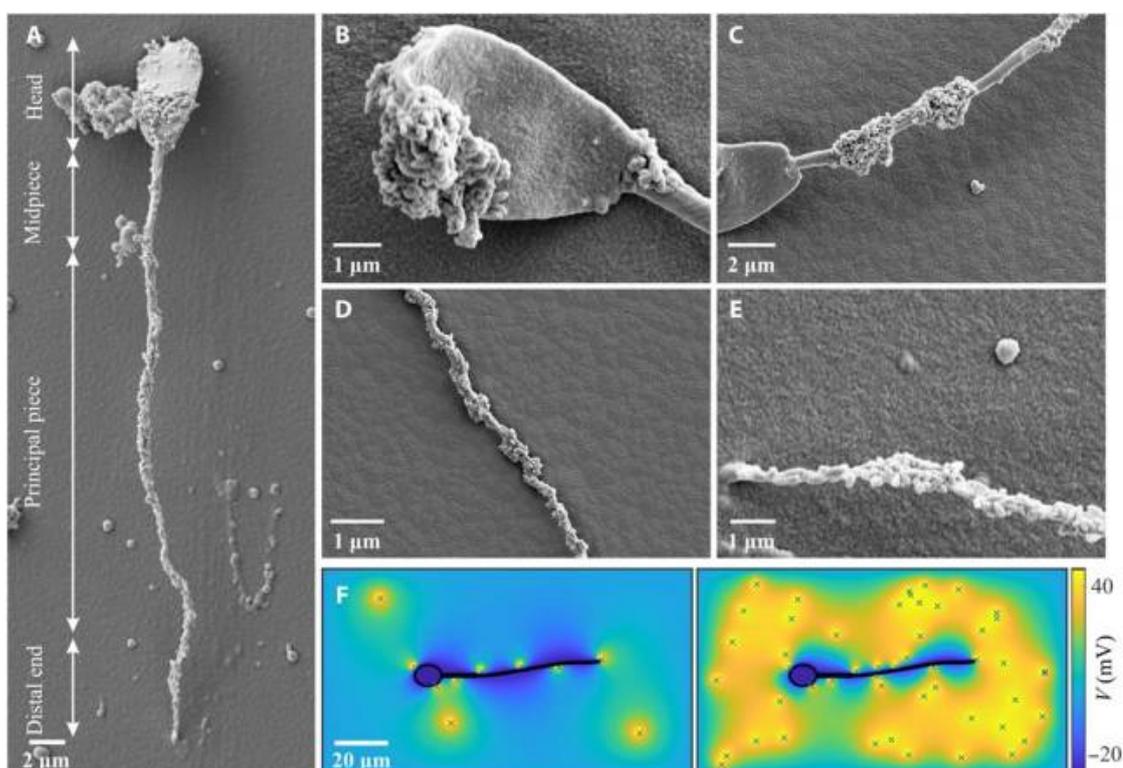


Figura 6.1: Immagini al microscopio elettronico raffiguranti la distribuzione di nMPs sull'intero microrganismo (A) e il dettaglio dei quattro segmenti (B, C, D, E). In basso due condizioni di potenziale elettrico (con 10 e 48 nanoparticelle) intorno al microrganismo

Per studiare la forma assunta dal flagello si fa riferimento all'equazione di bilancio viscoelastica qui riportata

$$k_i \frac{\partial^4 \phi_i}{\partial^4 s}(s, t) + c_{n_i} \frac{\partial \phi_i}{\partial t}(s, t) = 0 \quad (6.1)$$

in cui k_i è la rigidezza flessionale del segmento i -esimo e ϕ_i è l'angolo che forma la tangente al segmento rispetto all'asse $\mathbf{e}_1(t)$ centrato nell'estremità posteriore della testa e diretto secondo il suo asse maggiore, come in figura 6.2. Infine c_{n_i} è il coefficiente di attrito normale dell' i -esimo segmento, per il

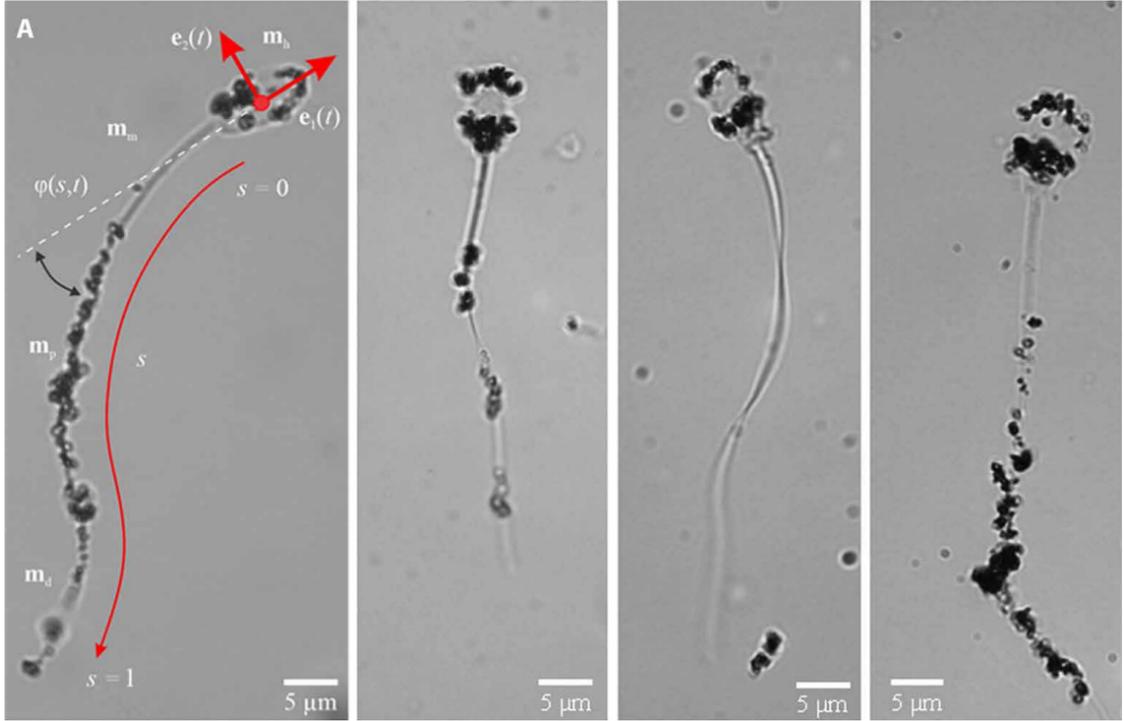


Figura 6.2: Immagini al microscopio raffiguranti quattro casi diversi di distribuzione delle nMPs sullo spermatozoo. La forma del flagello è determinata dal valore di ϕ in funzione della coordinata curvilinea s e del tempo t

quale è stata utilizzata la seguente relazione:

$$c_{n_i} = \frac{4\pi\mu}{\ln\left(\frac{l_i}{r_i}\right) + 0.193} \quad (6.2)$$

Il contributo della coppia magnetica è incluso nell'equazione 6.1 specificando le condizioni al contorno tra ogni segmento in termini di orientamento $\phi(s, t)$.

Nonostante l'IRONSp_{erm} abbia raggiunto una fase di sviluppo avanzata, sono necessarie ulteriori verifiche e sperimentazioni. Per esempio devono essere ancora testate le interazioni tra i diversi microrganismi e tra questi e le pareti solide circostanti. Trattandosi di una tecnica di drug delivery è richiesta inoltre una precisa caratterizzazione dei tempi di rilascio del farmaco e della risposta del tessuto bersaglio. Dato che difficilmente un singolo esemplare riesce a trasportare dosi di farmaco sufficienti da permettere un'analisi esaustiva, è richiesta la presenza di un folto gruppo di microrobot. Per studiare il comportamento collettivo sono però necessarie avanzate tecniche di imaging e di controllo quali la guida magnetica a feedback ultrasonico, ancora in fase di studio e sviluppo. L'utilizzo dell'IRONSp_{erm} come tecnica di drug delivery non potrà quindi procedere finché queste analisi non verranno effettuate.

6.2 Microrobot orientabili magneticamente

Lo studio realizzato dai ricercatori dell'Istituto tedesco Max Planck e pubblicato su *Science Advances* nel luglio 2022 [21] riguarda invece la realizzazione di un microrobot bioibrido per la drug delivery ottenuto a partire da un batterio di *Escherichia coli* rivestito di nMPs per la guida e nanoliposomes (NLs) sensibili al pH e alla luce nella regione del vicino infrarosso (NIR) con la funzione di assorbire il farmaco e proteggerlo fino al rilascio in sito.

Anche in questo caso si sfrutta l'interazione tra il campo magnetico esterno e le nMPs. Questa volta però, dal momento che il batterio è dotato di motilità, il campo magnetico non viene utilizzato per attivare la propulsione, bensì per indirizzarne il moto verso le zone di interesse. Le nMPs e, di conseguenza il microrobot, si allineano al campo magnetico uniforme esterno garantendo così la possibilità di stabilire la traiettoria da seguire nel microambiente fluidico locale. L'immagine in figura 6.3 chiarisce la situazione.

La motilità permette di sfruttare le capacità sensoriali di cui intrinsecamente dispongono i batteri agevolandone la penetrazione e distribuzione all'interno del microambiente tessutale, come può essere un tumore solido. Quest'abilità è supportata e integrata dal campo magnetico esterno il quale, limitandosi a stabilire una direzione, consente al batterio, soggetto per natura a repentini cambi di direzione, di nuotare seguendo una traiettoria costante, precisa e controllabile.

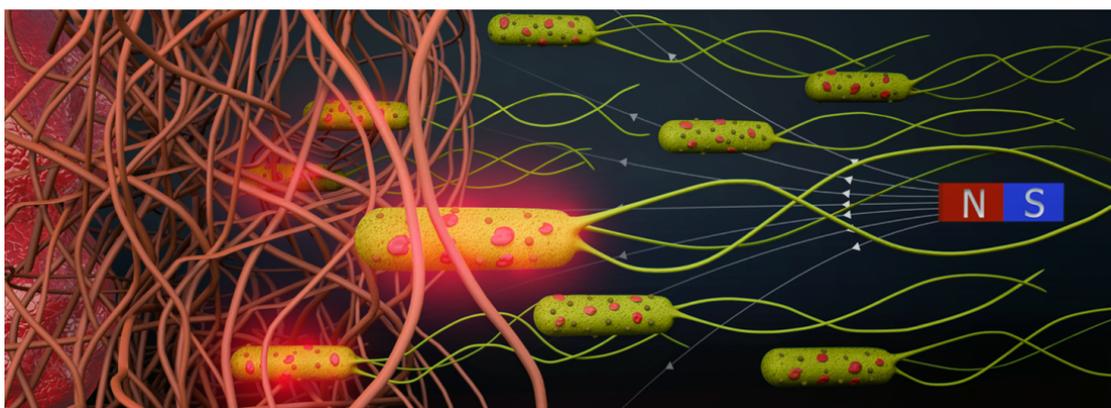


Figura 6.3: Rendering grafico in cui compaiono i microrobot di *Escherichia coli* indirizzati da un campo magnetico esterno verso una cellula cancerogena, sulla sinistra dell'immagine.

Diverso è il caso in cui si vogliono accumulare i batteri in una specifica zona. La soluzione adottata prevede di affidare al flusso sanguigno il trasporto all'interno dell'organismo e di attirare il batterio verso le zone desiderate tramite un gradiente di campo magnetico. Per testare l'efficacia di tale sistema è stata ricreata in laboratorio una situazione analoga a quella reale: un sistema di microcanali ramificati simula l'apparato vascolare e due serbatoi contenenti cellule tumorali sono messi ai lati opposti dello stesso. Un magnete è affiancato a uno solo dei due serbatoi, creando così un gradiente di campo magnetico. Il microrobot, soggetto al flusso, attraversa i canali e, attratto dal campo magnetico, si accumula nel serbatoio in cui è posizionato il magnete. Dopo un tempo di osservazione di un'ora tutti i microrobot risultano occupare solo uno dei due serbatoi, provando così la validità di questa soluzione.

L'intero processo di nanomachining e le dimensioni delle unità artificiali non devono pregiudicare le prestazioni del batterio. I report redatti sulle sperimentazioni di questa tipologia di microrobot hanno confermato il mantenimento di un livello di performance in termini di velocità pari a quello del batterio non modificato.

Nonostante il contributo che l'ingegnerizzazione di un batterio di *Escherichia coli* può offrire alla disciplina della drug delivery, i problemi legati al costo e alla sicurezza a lungo termine dell'uso di questo approccio frenano il passaggio dal laboratorio alla clinica.

Conclusioni

Dagli argomenti presentati e brevemente discussi si evince quanto la fluidodinamica governi molteplici meccanismi dei microrganismi marini, oltre alla loro propulsione.

L'analisi delle ricerche oggetto di questo lavoro ha evidenziato che le diverse tipologie di propulsione non modificano in modo significativo la motilità dei microrganismi capaci di autopropulsione. La misurazione e il confronto dell'efficienza tra i vari meccanismi ha infatti mostrato l'irrelevanza della tecnica di nuoto adottata. Ciononostante, fisici e biologi ritengono che la propulsione abbia importanza dal punto di vista trofico poichè consente loro di diversificare l'ambiente molecolare in cui sono immersi e dal quale traggono nutrimento.

Tuttavia, affinché ciò sia possibile, l'organo propulsivo deve far compiere al microrganismo uno spostamento netto che gli consenta di superare la zona interessata dagli effetti locali della diffusione, aumentando così la probabilità di trovare ambienti più ricchi di nutrienti e quindi di prosperare più a lungo [22]. Si spiegano così i costanti cambi di direzione effettuati durante gli spostamenti in quello che all'apparenza sembra un percorso irregolare, quasi casuale, ma che in realtà cela una meticolosa opera di scandagliamento topografico, coadiuvata dagli stimoli sensoriali.

Dal confronto storico delle ricerche che ho preso in esame si evidenzia inoltre la transizione, avviata nel 1975 da James Lighthill, dagli studi iniziali in ambito fluidodinamico degli anni '50, tradizionalmente incentrati sulla fisica della propulsione, a ricerche interdisciplinari che coinvolgono aspetti biologici ed ecologici. Durante la conferenza di accettazione del John Von Neumann Prize, Lighthill ritenne importante inserire delle connotazioni di tipo ecologico allo studio fluidodinamico dei microrganismi, riferendosi in particolare alla sfera nutritiva e riproduttiva.

L'incessante sviluppo tecnologico ha permesso di utilizzare nuove tecniche di analisi, quali la PIV e la CFD, che hanno fornito dettagli di più elevata

precisione su particolari aspetti della motilità dei microrganismi. In particolare, analizzando alcuni aspetti della propulsione poco studiati quali il nuoto collettivo e della propulsione a seguito di un balzo è emersa la natura turbolenta del primo e l'efficacia biologica della seconda.

Un ulteriore progresso è stato avviato negli ultimi anni grazie alla convergenza di competenze multidisciplinari. Particolarmente significativa è l'attenzione recentemente riposta dai ricercatori verso lo studio dei microrganismi come modello naturale per sviluppare dispositivi tecnologici avanzati, soprattutto in campo biomedico.

Le nuove ricerche, 6.1 e 6.2, stanno infatti utilizzando le conoscenze acquisite con gli studi sui meccanismi di propulsione e sulla fluidodinamica del nuoto dei microrganismi per ingegnerizzare microrobot ibridi con applicazioni nel campo della drug delivery. Entrambe le ricerche presentate necessitano ancora di sviluppi e approfondimenti, ma aprono a nuove possibilità di cura e conoscenza.

Bibliografia

- [1] Howard A Stone e Aravinthan DT Samuel. «Propulsion of microorganisms by surface distortions». In: *Physical review letters* 77.19 (1996), p. 4102 (cit. a p. viii).
- [2] Jeffrey S Guasto, Roberto Rusconi e Roman Stocker. «Fluid mechanics of planktonic microorganisms». In: *Annual Review of Fluid Mechanics* 44 (2012), pp. 373–400 (cit. a p. 4).
- [3] Farooq Azam, Tom Fenchel, John G Field, John S Gray, Lutz-Arend Meyer-Reil e F Thingstad. «The ecological role of water-column microbes in the sea». In: *Marine ecology progress series* (1983), pp. 257–263 (cit. a p. 4).
- [4] Bruce Rodenborn, Chih-Hung Chen, Harry L Swinney, Bin Liu e HP Zhang. «Propulsion of microorganisms by a helical flagellum». In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110.5 (2013), E338–E347 (cit. a p. 5).
- [5] Eric Lauga e Thomas R Powers. «The hydrodynamics of swimming microorganisms». In: *Reports on progress in physics* 72.9 (2009), p. 096601 (cit. alle pp. 8, 11).
- [6] Renzo Arina. *Fondamenti di aerodinamica*. Levrotto & Bella, 2015 (cit. a p. 10).
- [7] Christopher Brennen e Howard Winet. «Fluid mechanics of propulsion by cilia and flagella». In: *Annual Review of Fluid Mechanics* 9 (1977), pp. 339–398 (cit. a p. 11).
- [8] Edward M Purcell. «Life at low Reynolds number». In: *American journal of physics* 45.1 (1977), pp. 3–11 (cit. a p. 13).
- [9] Carlo Ferraresi e Terenziano Raparelli. *Meccanica applicata*. Clut, 1997 (cit. a p. 15).

-
- [10] George T Yates. «How microorganisms move through water: the hydrodynamics of ciliary and flagellar propulsion reveal how microorganisms overcome the extreme effect of the viscosity of water». In: *American scientist* 74.4 (1986), pp. 358–365 (cit. a p. 19).
- [11] Maciej Lisicki. «Four approaches to hydrodynamic Green’s functions—the Oseen tensors». In: *arXiv preprint arXiv:1312.6231* (2013) (cit. a p. 20).
- [12] Geoffrey Ingram Taylor. «Analysis of the swimming of microscopic organisms». In: *Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences* 209.1099 (1951), pp. 447–461 (cit. a p. 23).
- [13] RE Johnson e CJ Brokaw. «Flagellar hydrodynamics. A comparison between resistive-force theory and slender-body theory». In: *Biophysical journal* 25.1 (1979), pp. 113–127 (cit. a p. 27).
- [14] James Lighthill. «Reinterpreting the basic theorem of flagellar hydrodynamics». In: *The centenary of a paper on slow viscous flow by the physicist ha lorentz*. Springer, 1996, pp. 25–34 (cit. a p. 28).
- [15] Eric Lauga, Willow R DiLuzio, George M Whitesides e Howard A Stone. «Swimming in circles: motion of bacteria near solid boundaries». In: *Biophysical journal* 90.2 (2006), pp. 400–412 (cit. a p. 33).
- [16] Thomas Kiørboe. «Fluid dynamic constraints on resource acquisition in small pelagic organisms». In: *The European Physical Journal Special Topics* 225.4 (2016), pp. 669–683 (cit. a p. 34).
- [17] Luis H Cisneros, Ricardo Cortez, Christopher Dombrowski, Raymond E Goldstein e John O Kessler. «Fluid dynamics of self-propelled microorganisms, from individuals to concentrated populations». In: *Animal Locomotion*. Springer, 2010, pp. 99–115 (cit. a p. 39).
- [18] *Fluid Mechanics 101. Learn the fundamentals of Computational Fluid Dynamics*. 2021. URL: <https://www.fluidmechanics101.com/> (cit. a p. 42).
- [19] Houshuo Jiang. «Why does the jumping ciliate *Mesodinium rubrum* possess an equatorially located propulsive ciliary belt?» In: *Journal of plankton research* 33.7 (2011), pp. 998–1011 (cit. a p. 43).
- [20] Veronika Magdanz et al. «IRONSPERM: Sperm-templated soft magnetic microrobots». In: *Science advances* 6.28 (2020), eaba5855 (cit. a p. 50).

- [21] Mukrime Birgul Akolpoglu, Yunus Alapan, Nihal Olcay Dogan, Saadet Fatma Baltaci, Oncay Yasa, Gulsen Aybar Tural e Metin Sitti. «Magnetically steerable bacterial microrobots moving in 3D biological matrices for stimuli-responsive cargo delivery». In: *Science Advances* 8.28 (2022), eabo6163 (cit. a p. 53).
- [22] Howard C Berg. *E. coli in Motion*. Springer, 2004 (cit. a p. 55).