



铜绿假单胞菌在液滴界面的二维和三维运动特征

朱晓艳^{1,2}, 韩苗², 韩天富³, 韩峥², 王钢^{2*}

1 郑州大学物理学院, 河南 郑州 450001

2 中国农业大学土地科学与技术学院, 北京 100193

3 中国农业科学院农业资源与农业区划研究所, 北京 100081

朱晓艳, 韩苗, 韩天富, 韩峥, 王钢. 铜绿假单胞菌在液滴界面的二维和三维运动特征. 微生物学报, 2022, 62(8): 3124–3136.
Zhu Xiaoyan, Han Miao, Han Tianfu, Han Zheng, Wang Gang. Two-dimensional and three-dimensional motion of *Pseudomonas aeruginosa* at the droplet interface. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(8): 3124–3136.

摘要:【目的】环境中无处不在的气-液界面能够影响细菌的运动和养分的传输扩散, 进而调控微生物的种群互作和群落结构。因此, 系统地认知微生物在微观界面的运动特征对于理解和解析微生物多样性的产生、维持机制以及生态功能至关重要。【方法】本文基于微流体显微系统(超高速荧光显微镜和数字全息显微镜), 以具备主动运动能力的模式菌株铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa* PAO1)为研究对象, 观测并解析了细菌细胞在气-液界面的二维运动特征和气-液-固界面的二维与三维运动特征。【结果】PAO1 既能在气-液界面处执行近似直线轨迹的运动, 也能在气-液界面下方执行顺时针或逆时针旋转的圆周运动(最小曲率半径 $R_{\min}=3 \mu\text{m}$)。在气-液-固界面处, 6.45%的不运动细胞聚集于气-液-固界面边缘处, 并在该处完成不可逆附着; 同时, 游动细胞由于受到液滴内部毛细管流和马拉戈尼(Marangoni)涡流运动的综合作用, 直线游动至距界面约 $40 \mu\text{m}$ 内的区域后, 其运动轨迹转变为垂直界面方向返回或以近似界面平行方向运动并附着, 这些行为显著调节了 PAO1 的空间分布, 促使其朝向气-液-固界面的迁移, 表明个体 PAO1 的鞭毛在此处的主动游动作用较弱。【结论】PAO1 在气-液界面处能够执行与固-液界面类似的运动轨迹, 且能够在各种作用力下朝向气-液-固界面运动并附着。

关键词: 气-液界面; 气-液-固界面; 数字全息显微镜; 铜绿假单胞菌; 细菌运动性

基金项目: 国家自然科学基金(41877412); 中国农业大学 2115 人才培育发展支持计划(1191-00109012); 国家高层次青年人才项目(21968001)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (41877412), by the 2115 Talent Development Program of China Agricultural University (1191-00109012) and by the Scholarship of the ‘National Thousand (Young) Talents Program’ of China (21968001)

*Corresponding author. E-mail: gangwang@cau.edu.cn

Received: 7 December 2021; Revised: 17 February 2022; Published online: 28 February 2022

Two-dimensional and three-dimensional motion of *Pseudomonas aeruginosa* at the droplet interface

ZHU Xiaoyan^{1,2}, HAN Miao², HAN Tianfu³, HAN Zheng², WANG Gang^{2*}

1 School of Physics and Microelectronics, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, Henan, China

2 Collage of Land Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100193, China

3 Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

Abstract: [Objective] The ubiquitous air-liquid interfaces affect bacterial motility and nutrient transport, thereby regulating the interaction among microbial populations and microbial community structure. Therefore, it is of vital importance for understanding and elucidating the mechanisms of microbial diversity generation and maintenance as well as the ecological functions to clarify the movement characteristics of microorganisms at microscopic interfaces. [Methods] With microfluidic microscopes (ultra-high speed fluorescence microscope and digital holographic microscope), we quantified the movement patterns of *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1) cells near air-liquid-solid and air-liquid interfaces of droplet. [Results] Below the air-liquid interfaces, the trajectories of PAO1 are as follows: straight lines, clockwise circles, or counterclockwise circles with R_{\min} (minimum radius of curvature)=3 μm . At the air-liquid-solid interfaces, 6.45% of the immobile cells accumulated at the edge of the interfaces and completed irreversible attachment directly. Meanwhile, due to capillary flow and Marangoni effect inside the droplet, mobile cells returned in the direction perpendicular to the interface or moved in the direction approximately parallel to the interface and attached after swimming in a straight line to a region within about 40 μm from the interface. These behaviors significantly modulated the spatial distribution of PAO1, promoting the migration toward the air-liquid-solid interface. Therefore, the active flagellar motility played a little role in the process. [Conclusion] With similar trajectories in both the solid-liquid interfaces and the air-liquid interfaces, PAO1 can move towards and subsequently attach onto the air-liquid-solid interfaces under the complex cell-surface interfacial forces.

Keywords: air-liquid interfaces; air-liquid-solid interfaces; digital holographic microscope; *Pseudomonas aeruginosa*; bacterial motility

细菌作为促进土壤内部能量流动和物质循环的主要推动力, 常常以生物膜的形态存在于土壤内各种各样的生物或非生物界面上, 对土壤中多个关键生物过程至关重要, 例如有机物降解、氮循环和细菌种间互作等^[1-2]。细菌由自由悬浮状态趋向于界面运动并附着是生物膜启动形成的重要一步^[3-4]。大量研究表明, 土壤界面能够通过影响细菌运动, 调控其微尺度空间分布及后续生物膜形成, 进而改变土壤中相关

的生物过程以及影响其生态功能的发挥^[5-6]。

固-液界面能够促使运动细菌大量聚集到其附近, 从而影响细菌的空间分布^[7]。当周生鞭毛的大肠杆菌(*Escherichia coli*)朝向固-液界面运动时, 细菌的运动轨迹将由近似的直线变为顺时针(clockwise, CW)旋转的圆形^[8](从溶液中看, 下同), 而当 *E. coli* 靠近气-液界面运动时, 则变成逆时针(counterclockwise, CCW)旋转的圆周运动(circular motion)^[9]。此外, 单根极性

鞭毛的铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa* PAO1)在靠近固-液界面时既能 CW 旋转也能 CCW 旋转,且轨迹还能在高曲率曲线与直线间转换。这些现象可能与细菌鞭毛推进理论、界面水动力学理论及布朗作用有关^[10-11]。目前关于界面对细菌运动影响的研究大多聚焦于固-液界面,气-液界面对细菌运动的影响机制尚不清晰。土壤中的水分是微生物生存的物质基础,由于常常处于周期性或持续的不饱和状态,水分蒸发时常在土壤界面发生。因此,量化土壤水膜界面内细菌运动的轨迹特征对于其后续相关功能的发挥极其重要。

本研究以典型的革兰氏阴性菌 PAO1 为模式菌株。该菌株常见于土壤、水体、植物、口腔等含有一定水分的环境中,能够敏捷地运用其单根极性鞭毛(flagellum)和多根极性四型菌毛(type IV pili, TFP) 2 种运动器官(motility organelles),灵活适应微环境变化^[12-13]。基于微流体显微系统(超高速荧光显微镜和数字全息显微镜),我们研究了 PAO1 在气-液和气-液-固界面的二维和三维运动特征,发现细菌在界面附近的运动受限,进而附着到界面上。此外,我们发现细菌在气-液界面的运动与细菌在固-液界面的运动行为存在很多类似之处,这表明细菌在气-液界面处的受力情况同固-液界面类似,同样能够用细菌鞭毛推进理论和界面动力学理论来解释。

1 材料与方法

1.1 细菌培养

细菌的运动模式主要受运动器官类型的影响(鞭毛类型),一般情况下,鞭毛类型相同的菌株采取类似的运动模式。按鞭毛类型进行细菌分类,有如下 4 种:单根极性鞭毛菌、偏端丛生鞭毛菌、两端鞭毛菌和周生鞭毛菌。本研

究以标记绿色荧光蛋白基因的野生型单根极性鞭毛菌 PAO1 为实验对象,首先将菌株接种于 LB 培养液中,在(37±1) °C、150 r/min 的条件下振荡培养 12 h,取该菌液 50 μL 至 5 mL 生长培养液[7.0 g/L K₂HPO₄, 3.0 g/L KH₂PO₄, 1.0 g/L (NH₄)₂SO₄, 0.05 g/L MgSO₄·7H₂O, 2.5 mg/L FeCl₃·6H₂O 和 0.07 g/L L-甲硫氨酸],并于(37±1) °C、150 r/min 的条件下振荡培养 4 h 至对数生长期。随后,将菌液置于 1 000×g、离心 10 min,加入运动缓冲液(11.41 g/L K₂HPO₄, 4.80 g/L KH₂PO₄, 1.22 g/L MgCl₂·6H₂O 和 0.03 g/L EDTA, pH 7.0),并重复 3 次以洗涤菌体,最后将菌液浓度调至约 4.5×10⁶ 个/mL 备用^[14]。

1.2 显微镜配置

显微镜采用数字全息显微镜(Digital Holographic Microscope, DHM T2103 型, Lyncée Tec SA 公司),该显微镜为倒置显微镜,配备全息模式、宽场荧光模式和激光扫描共聚焦模式;高速 CCD 相机,数字自动聚焦,拍摄速率高达 190 帧/秒(frames per second, f/s),物镜使用 5 倍(Leica N Plan EPI, NA 0.12, FOV 1 320 μm²)和 40 倍物镜(Leica HC PL FLUOTAR, NA 0.80);配套高性能计算机及专用数据记录分析软件(Koala 软件和 Spyder 软件)。

1.3 铜绿假单胞菌在气-液和气-液-固界面处运动行为拍摄

运动特征获取过程如图 1A 所示:于洁净无菌的盖玻片(24 mm×40 mm×0.17 mm)上方滴加菌液 0.25 μL,使用宽场荧光模式,采用 40 倍物镜以 30 f/s 速度拍摄 20 s,以记录液体上方气-液界面处和液体边缘气-液-固界面处细菌运动;同等条件下,采用数字全息模式 40 倍以 39.8 f/s 拍摄液滴气-液-固界面,得到 2 000 张照片。为消除拍摄时间和实验条件对实验结果的影响,实验拍摄于液滴滴加 100 s 后开始,

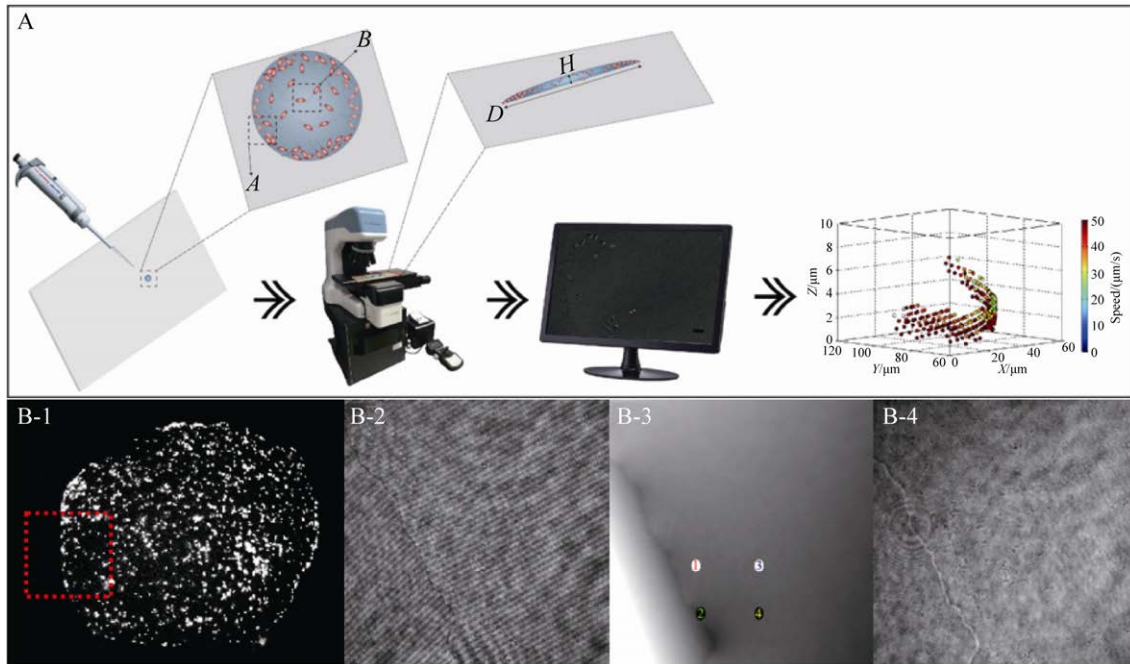


图 1 显微观测过程示意图

Figure 1 Schematic of the experimental process. A: the schematic diagram of acquisition process of interface motility characteristics of *Pseudomonas aeruginosa*; B-1: whole diagram of bacterial liquid droplets; B-2: the hologram of Figure B-1 red area; B-3: the phase diagram of Figure B-1 red area; B-4: the intensity diagram of Figure B-1 red area.

并在相同实验湿度、温度下进行[实验环境空气湿度为 40%、温度为(25.0±0.5) °C]。

1.4 液滴形貌及水分蒸发过程中气-液-固界面水膜高度测定

使用宽场荧光模式, 于 5 倍物镜拍摄液滴形貌, 用于液滴扩展面积分析; 同时, 使用数字全息模式 40 倍拍摄液滴气-液-固界面, 并使用 Koala 软件选择 4 个观测区域(自气-液-固界面逐渐向液滴中心靠近), 依次记录观测区域质点液滴高度的实时变化, 具体过程如图 1B 所示。

1.5 轨迹追踪、分析与筛选

1.5.1 轨迹追踪

采用 Fiji 软件插件 TrackMate 自动追踪初始时刻界面上所有细菌细胞的二维轨迹^[15], 联合使用 Spyder 和 Koala 进行细菌三维运动轨迹追踪。

1.5.2 轨迹分析

采用瞬时速度(speed)、均方位移斜率(K_{MSD})、回旋半径(R_{gyr})和滞留时间(residence time)来表征每个细胞的运动轨迹。Speed 由任意两个相邻点的移动距离除以间隔时间定义。单个细菌细胞平均均方位移斜率(K_{MSD})由公式(1-3)计算。

$$MSD_N = \sum_{i=1}^N \frac{(X_N - X_i)^2 + (Y_N - Y_i)^2 + (Z_N - Z_i)^2}{n-i} \quad (1)$$

$$K_{MSD_N} = \frac{\ln(MSD_N) - \ln(MSD_{N-1})}{\ln(t_N) - \ln(t_{N-1})} \quad (2)$$

$$\overline{K_{MSD_N}} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N K_{MSD_N} \quad (3)$$

其中, (X_i, Y_i, Z_i) 是轨迹上初始点($i=1$)坐标, (X_N, Y_N, Z_N) 是轨迹上任意点坐标。 $K_{MSD} = 1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ 表示纯布朗扩散(Brownian diffusion),

$K_{\text{MSD}}=2 \mu\text{m}^2/\text{s}$ 表示纯弹道运动(ballistic motion), 即自由运动, $1 < K_{\text{MSD}} < 2 \mu\text{m}^2/\text{s}$ 表示该运动存在主动运动, 但运动受到了一定的束缚^[16-18]。

瞬时速度(本文统称为速度)^[19]按公式(4)计算。

$$v_N = \frac{(X_N - X_{N-1})^2 + (Y_N - Y_{N-1})^2 + (Z_N - Z_{N-1})^2}{t_N - t_{N-1}} \quad (4)$$

R_{gyr} 由公式(5-6)定义^[20]。

$$R_{\text{gyr}}^2 = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (\bar{R}_i - \bar{R}_{\text{cm}})^2 \quad (5)$$

$$\bar{R}_{\text{cm}} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (\bar{X}_N, \bar{Y}_N, \bar{Z}_N) \quad (6)$$

其中, N 是轨迹中的点数, \bar{R}_i 是轨迹上第 i 个点的位置向量, \bar{R}_{cm} 是所有点位置向量的平均值。

1.5.3 轨迹筛选

挑选出主动运动细胞, 即满足如下条件的细菌细胞: (a) 焦平面停留时间大于 1 s; (b) 1 s 内的最小位移不小于一个细胞长度; (c) 均方位移斜率(K_{MSD})大于 $1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ^[20]。

1.6 数据处理

每个实验 3 次重复, 结果以平均值和标准差表示。数据间显著性差异采用 t 检验, 认为 $P < 0.05$ 为有统计学意义。试验数据结果采用 Excel 2007 整理。细菌运动参数 MSD 和 R_{gyr} 采用 R 软件计算, 采用 Matlab 和 Origin 进行图形绘制^[21-22]。

2 结果与分析

2.1 细菌在气-液界面处的运动轨迹特征

图 2 展示了 PAO1 在气-液界面上的运动轨迹, 包括近似直线的线段、近似圆形的曲线以及在两者之间转换的复杂形状。其中, 在近似圆形的轨迹中, 圆的半径(R_{cur})范围为 $3 \mu\text{m} \leq R_{\text{cur}} \leq 25 \mu\text{m}$ 。同时, PAO1 能在气-液界面上产生多

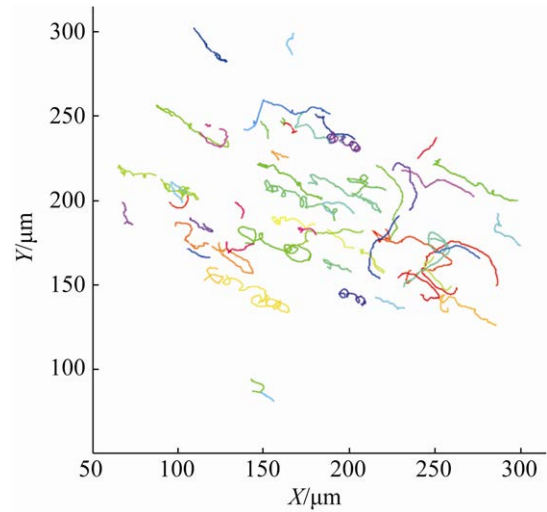


图 2 铜绿假单胞菌在气-液界面上的二维运动轨迹

Figure 2 Two-dimensional trajectories of *Pseudomonas aeruginosa* at air-liquid interface. Color was only used to distinguish between bacterial cells.

个 CW 或 CCW 旋转的类似圆形轨迹, 且能在 CW 旋转和 CCW 旋转间灵活转换。此外, 部分 PAO1 细胞在界面上运动了半个圆形轨迹。就单个运动轨迹而言, PAO1 存在类似对号形状的运动轨迹。

根据 1.5.3 轨迹筛选, 我们筛选出气-液界面上 PAO1 的特征运动轨迹, 主要分为 4 种类别, 分别如图 3A-D 所示。其中: (A) CW 旋转到 CW 旋转(倒置显微镜从溶液中看), 简称 CW-CW; (B) CCW 旋转到 CCW 旋转, 简称 CCW-CCW; (C) CCW-CW 和(D) CW-CCW。轨迹 A、B、C 和 D 类似乎手性对称图形。此外, 我们还观察到上述运动之间的转换(如图 3E 所示)。另一方面, PAO1 在界面上的特征运动属于变速运动, 且运动 K_{MSD} 呈现实时动态变化, 其中, PAO1 轨迹越接近圆形、其 K_{MSD} 越小, 轨迹接近直线、其 K_{MSD} 越大, 这说明 PAO1 的圆形运动很可能在一定程度上是由外界因素介导。

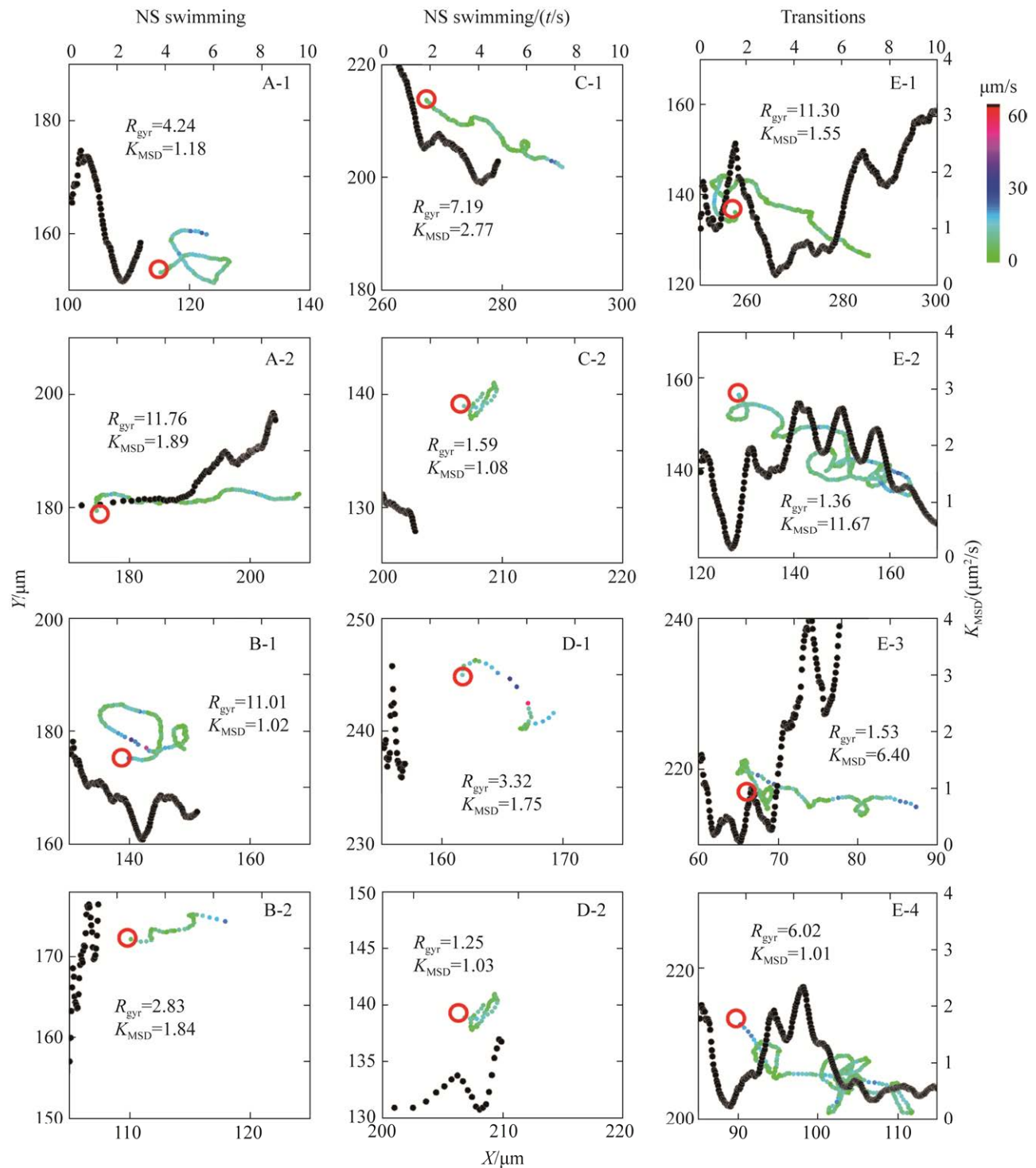


图 3 铜绿假单胞菌在近气-液界面上(NS)的典型二维运动轨迹

Figure 3 Typical two-dimensional trajectories of *Pseudomonas aeruginosa* near the air-liquid interface (NS). The lower and left coordinates respectively represented the horizontal and vertical coordinates of the trajectories, and the upper and right coordinates represented the changes of K_{MSD} over time. The red circle indicated the starting point of the trajectories; the track color indicates the speed of the bacteria.

结合细菌运动轨迹和 K_{MSD} 来看, 直线线段轨迹处的 K_{MSD} 往往大于曲线轨迹的 K_{MSD} , 且 K_{MSD} 会随着细菌运动轨迹的改变而降低, 且降低幅度与转角角度有关。对于类似圆形的轨迹, K_{MSD} 均值略大于 $1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (近似于布朗运动)。此外, 我们发现细菌一般运动 1 s 后改变轨迹运动或旋转的方向(图 3A-E 黑色曲线的螺旋线半径约为 1); 细菌完成一次完整的圆周运动约耗时 2 s (图 3A-1)。

2.2 细菌在气-液-固界面处的运动轨迹特征

2.2.1 气-液-固界面水膜高度变化

将 $0.25 \mu\text{L}$ 菌液滴加到盖玻片上 100 s 后, 液滴形貌参数如图 4A 所示, 铺展成一个半径约 $500 \mu\text{m}$ 、高度约 $40 \mu\text{m}$ 的半球形, 与固体界面接触角大约 30° 。同时, $0.25 \mu\text{L}$ 菌液滴加到盖玻片 100 s 后, 数字全息模式 40 倍拍摄菌落边缘全息图用于分析液滴高度变化和细菌三维运动轨迹, 拍摄部位如图 1B-1 所示。其中, 选择的 4 个代表点如图 1B-3 所示。全息图和光强图分别见图 1B-2 和 1B-4, 图中可以明显看出边界处存在的水膜聚集着大量细菌细胞。拍

摄期间(接种后 100–125 s), 4 个点相位信息变化如图 4B 所示, 可见, 处于气-液-固边界的 P1 和 P2 均表现为 Z 轴呈逐渐上升的趋势、约提高 $0.065 \mu\text{m}$, 其中前 12 s 增长速率明显高于后 12 s。距离 P1 和 P2 分别约 $2.5 \mu\text{m}$ 的 P3 和 P4 大体呈先上升、随后趋于平稳的趋势, 其中, 上升的趋势在前 12 s 内, 约上升 $0.020 \mu\text{m}$ 。对比 P1、P2 和 P3、P4 可知, 距离气-液-固界面较远的 P3 和 P4 上升速率明显降低。

2.2.2 气-液-固界面对细菌二维运动的影响

气-液-固界面的存在显著影响着细菌的空间分布, 约 6 500 个 PAO1 细胞在气-液-固界面附近的运动轨迹如图 5A 所示。近界面区域处, 6.45% 的不运动细胞聚集于气-液-固界面边缘处, 并在该处完成不可逆附着。剩余细胞 (93.55%) 均朝气-液-固界面做直线运动, 当游动至距界面约 $40 \mu\text{m}$ 内的区域后 ($SD < 40 \mu\text{m}$): (a) 一部分细胞以近似与界面垂直的方向运动, 运动至近界面 $5 \mu\text{m}$ 的区域后直接附着; (b) 还有一部分细胞以近似界面垂直方向返回; (c) 极个别细胞以近似与界面平行的方向运动。

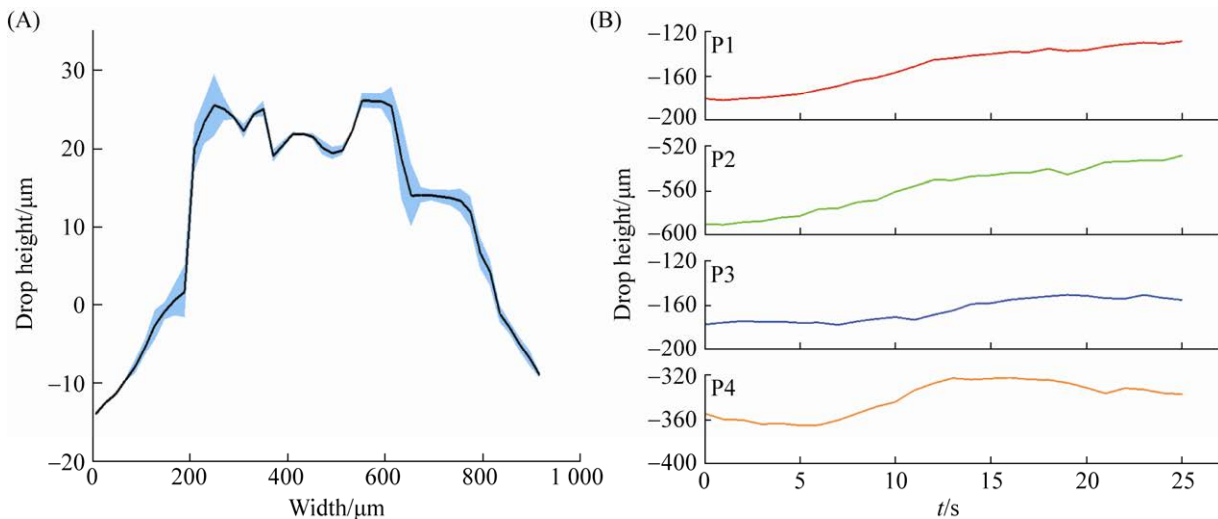


图 4 在固体表面上接种菌液后的菌滴液面高度变化

Figure 4 The changes of drop height on solid surface. A: two-dimensional information of bacterial drop; B: the changes of drop height at characteristic point of bacterial drop.

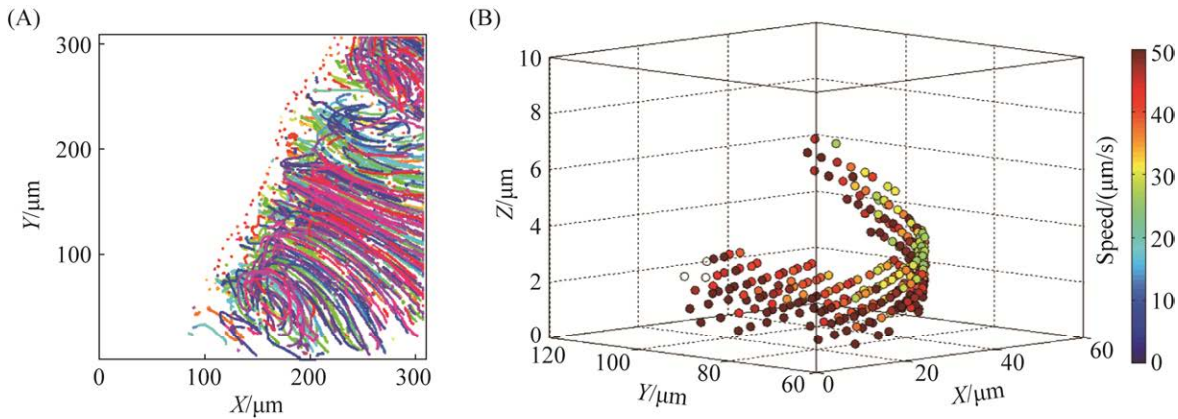


图 5 铜绿假单胞菌在气-液-固界面处的二维(A, 不同细菌个体的轨迹用不同颜色区分)和三维(B, 界面在右侧)运动轨迹

Figure 5 Two-dimensional (A, different trajectories were distinguished by color) and three-dimensional (B, interface on the right) trajectories of *Pseudomonas aeruginosa* at air-liquid-solid interface.

2.2.3 气-液-固界面对细菌三维运动的影响

为了解细菌在近气-液-固界面区域的真实运动轨迹, 我们对细菌进行了三维轨迹追踪(图 5B), 当细菌接近气-液-固界面时, 其运动方向出现逆转。

2.3 细菌界面运动轨迹的量化和对比

为了量化 PAO1 在界面上运动轨迹的特征, 我们计算了界面上停留时间超过 1 s 的所

有运动轨迹的速度、均方位移斜率和回旋半径(图 6)。由图 6 可知, 气-液界面处细菌的平均速度为 9.57 μm/s, 中值比平均值略低, 且 95%的轨迹速度小于 20 μm/s。平均 K_{MSD} 为 1.60 μm²/s, 轨迹 $K_{MSD}>2$ 或 $K_{MSD}<1$ μm²/s 的细菌也存在, 说明细菌鞭毛旋转驱动的主动运动存在, 但该运动受到了外界因素的影响, 此外, 平均 R_{gyr} 值为 9.72 μm, 95%轨迹的 R_{gyr} 小于 20 μm。

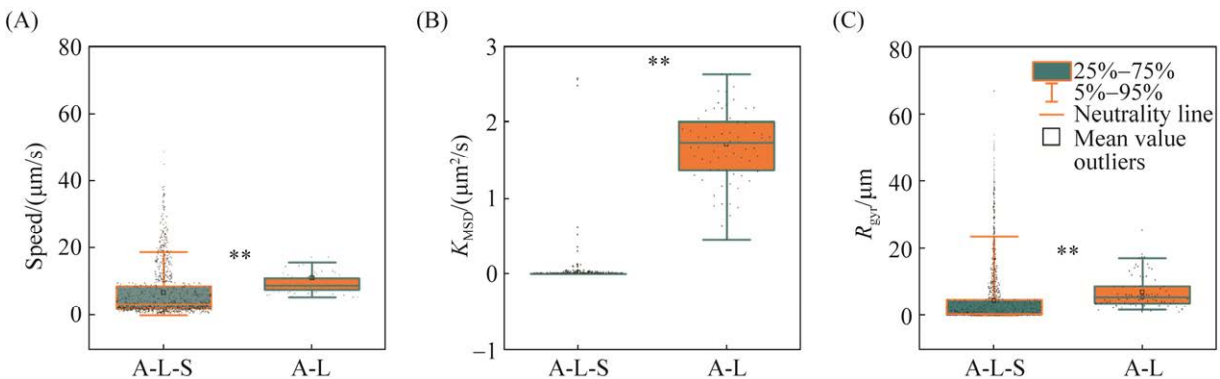


图 6 铜绿假单胞菌在气-液(A-L)和气-液-固(A-L-S)界面处的二维轨迹参数

Figure 6 Two-dimensional trajectories parameters of *Pseudomonas aeruginosa* at air-liquid (A-L) and air-liquid-solid (A-L-S) interfaces. Double asterisks (**) represent significant differences ($P<0.01$) between two types of surfaces, based on Student's *t*-test.

在气-液-固界面区域处, 平均速度为 $7.00 \mu\text{m/s}$, 低于气-液界面处的细菌运动速度。平均 K_{MSD} 值为 $0.006 \mu\text{m}^2/\text{s}$, 远低于气-液界面处的细菌, 且 95% 的轨迹 K_{MSD} 小于 $1 \mu\text{m}^2/\text{s}$, 表明细菌在近气-液-固界面区域几乎不存在主动运动。此外, R_{gyr} 平均值为 $4.43 \mu\text{m}$, 中值略高于平均值, 且 95% 的轨迹 R_{gyr} 小于 $23 \mu\text{m}$, 说明与气-液界面相比, 细菌在近气-液-固界面区域的旋转角度较广泛。

计算细菌三维轨迹平均速度为 $42.72 \mu\text{m/s}$, 平均 K_{MSD} 值为 $(1.43 \pm 0.11) \mu\text{m}^2/\text{s}$, 平均 R_{gyr} 值为 $(13.42 \pm 0.76) \mu\text{m}$ (未展示)。三维轨迹参数与细菌的二维轨迹参数差异较大, 说明细菌在朝气-液-固界面运动时, Z 轴波动不可忽略。

3 讨论

3.1 铜绿假单胞菌在气-液界面处的二维运动特征

与固-液界面处的运动类似, PAO1 能够在气-液界面下方进行 CW 和 CCW 的圆周运动。然而, 具有周生鞭毛的 *E. coli* 仅能在气-液界面进行 CW 圆周运动^[23-24], 这 2 类细菌的差异可以用介导细菌游动(swimming)的鞭毛推进理论和界面水动力理论解释^[25-27]。在界面(尤其是距离细胞几个身体长度范围内)附近, 鞭毛旋转引起的水分流动会受到界面的影响, 从而反过来影响微生物自身的运动, 这种机制被称为细胞和界面间的水动力学相互作用, 能够促使细菌类似圆形轨迹的产生^[28]。由于 PAO1 是单根极性鞭毛菌, 鞭毛 CCW 旋转推动细胞体向前游动(run), 而在界面和细菌间的水动力学相互作用下, 细菌前进时会进行 CW 的圆周运动; 而当鞭毛 CW 旋转时拉动细胞体后退(reverse); 细菌在其与界面间的水动力学相互作用下进行 CCW 的圆周运动; 但对于具有周生鞭毛的

E. coli 来说, 细胞游动模式为 run-tumble, 周生鞭毛拧成一束 CCW 旋转时推动细胞体向前游动(run), 而当有任意一个鞭毛马达顺时针旋转时就会导致鞭毛束散开, 细胞体随机挑选方向进行翻滚(tumble), 并没有后退运动的趋向, 只能进行 CW 的圆周运动^[29-31]。

同时, 我们还发现 PAO1 也能够连续执行多个 CW 或 CCW 旋转的圆周运动。当细胞体前进(run)时, 鞭毛 CCW 旋转, 细胞体 CW 旋转, 导致鞭毛和细胞体分别受到向左和向右的旋转力(从细胞体后方看)。因此, 从气-液界面下方来看, 细胞体在气-液界面下方 CW 旋转; 反之, 当细胞体后退时(reverse), 鞭毛 CW 旋转, 细胞体 CCW 旋转, 鞭毛和细胞体分别受到向右和向左的旋转力(从细胞体后方看), 此时从气-液界面下方来看, 细胞体在气-液界面下方 CCW 旋转^[9]。同时, 由于距离界面较近的细胞部位(细胞体或鞭毛)周围溶液的粘滞系数较其它部位大, 而粘滞系数与粘滞阻力线性正相关, 以致该部位受到的粘滞阻力也较大^[32]。所以, 细胞距离界面较近部位的转向功能很可能由于粘滞阻力而被抑制, 从而导致细胞连续执行多个 CW 或 CCW 旋转的圆周运动^[8,31]。

此外, 我们还观测到了细胞在“近似直线运动”与“圆周运动”间转换的复杂运动。对于细胞运行轨迹的转换, 很可能是由于布朗运动显著改变了细胞体与气-液界面间的距离所引起的^[33]。从时间角度考虑, 我们还发现 PAO1 一般运动 1 s 后改变运动轨迹或旋转方向, 且完成一次完整的圆周运动约耗时 2 s。此结果说明细菌 run 或 reverse 的持续时间大约为 1 s, 与 Qian 等^[31]的报道一致, 且可以发现 PAO1 进行 run 或 reverse 的时间与 *E. coli* 进行 run 的时间(0.8 s)相差不大^[12]。

此外, PAO1 在气-液界面处的游动速度显

著低于饱和自由水体(bulk liquid)处(约降低3倍), 且 K_{MSD} 显著降低, 说明细菌的主动运动在一定程度上被束缚了^[17], 这很可能是气-液界面捕获细菌并诱导生物膜形成的根本原因。我们推测细胞运动速度在气-液界面的降低受到了多种作用力的影响, 包括水动力学相互作用力^[25,28]、布朗运动^[33]以及胞外运动附属物(鞭毛和IV型菌毛)与界面间的摩擦力^[34]等。轨迹 K_{MSD} 数值作为判定分子、胶体颗粒或细菌细胞等运动自由度的指标, 我们发现直线线段轨迹处的 K_{MSD} 往往大于曲线轨迹处的 K_{MSD} , 说明 PAO1 在界面处运动方向的改变受到了外界环境的影响。同时, K_{MSD} 会在细菌改变运动轨迹时降低, 且降低幅度与转角角度相关。而 Qian 等^[31]也报道了 PAO1 在自由溶液中运动时会出现短暂的静止, 且静止时间与细胞的转角大小呈正相关, 这表明该现象并不只是存在于界面附近。PAO1 圆形轨迹的 K_{MSD} 均值略大于 1 (1.02–1.08) $\mu\text{m}^2/\text{s}$, 表明细胞体执行圆周运动时受到的强烈束缚几乎主导了其运动速度和方向, 也进一步证实了我们的猜测。在 PAO1 近似的圆形轨迹中, 圆的半径(R_{cur})大小不一, 其中, 我们测定的 PAO1 在气-液界面的近似圆周运动的最小曲率半径($R_{\text{min}}=3 \mu\text{m}$), 与前人^[21,32,35]基于力矩平衡理论(force and torque balance theory)推导的细菌在固-液界面上圆周运动的最小曲率半径公式(7)结果非常接近。

$$R_{\text{min}} \sim \frac{\pi d}{\frac{b \log(d/r_{\text{flag}})}{L \log(d/r_{\text{head}})} + \frac{d}{L}} \quad (7)$$

其中, π 为圆周率(取 3.14); d 为细胞体中心到界面的高度; b 为鞭毛螺旋半径(flagellar helix radius); L 为鞭毛长度; r_{flag} 为鞭毛丝半径(radius of flagellum filament); r_{head} 为细胞体或称细胞头部(radius of cell head)半径。上述

参数取值如下: $d=0.80 \mu\text{m}$, $b=0.40 \mu\text{m}$, $L_{\text{min}}=5.00 \mu\text{m}$, $r_{\text{flag}}=0.02 \mu\text{m}$, $r_{\text{head}}=0.50 \mu\text{m}$, $R_{\text{min}}=3.18 \mu\text{m}$ 。

3.2 铜绿假单胞菌在气-液-固界面处的二维和三维运动特征

当细菌细胞朝气-液-固界面运动时, 可呈现不同的运动行为(图 5), 最终表现为气-液-固界面能诱导细菌大量聚集。推测原因是液滴蒸发过程引起的由中心向外的毛细管流动(即“咖啡环效应”), 促使内部细菌朝向液滴气-液-固界面运动聚集^[36–39]。本研究进一步印证了“咖啡环效应”不仅能够导致胶体在蒸发液滴边缘的沉积, 还进一步表明了运动细菌的参与下具有强烈的时间依赖性^[40–41]。Deegan 等^[36]表明在蒸发过程中, 除了引发向外的水流运动, 液滴的溶剂损失(loss of solvent)以及几何约束(geometrical constraint)也驱动其保持具有固定边界的平衡液滴形状, 这些因素均导致细菌朝向气-液-固界面的迁移。

而在细菌朝向气-液-固界面垂直运动时, 部分细菌运动至气-液-固界面内部 $5 \mu\text{m}$ 左右的区域后会直接附着, 或者在近界面将运动方向转移至平行界面方向, 并运动约 0.5 s 后附着。该现象主要是由于鞭毛作用丧失导致, 由气-液-固界面附近水膜厚度可知, 在液滴边缘内部 $5 \mu\text{m}$ 左右的区域内液滴高度(即水膜厚度)小于 PAO1 细胞的直径, 说明此时细菌鞭毛旋转被迫暂停, 从而在液滴边缘内部 $5 \mu\text{m}$ 左右的区域附着^[42]。

同时, 由二维和三维运动结果可知部分细菌也在 Marangoni 涡流作用下以垂直于界面的方向返回至自由溶液中。蒸发引起的液滴内部溶质浓度的变化支持界面能的空间变化, 从而导致了 Marangoni 涡流, 促使部分细菌又返回至自由溶液中^[43–44]。且 Sempels 等^[40]还发现生

物表面活性剂的自动生产逆转了细菌系统中的“咖啡环效应”，也支持了我们的观测结果。

3.3 细菌在气-液界面和气-液-固界面处运动特征的生物学意义

土壤环境中气-液界面和气-液-固界面无处不在。本文研究了 PAO1 (研究细菌生物膜和运动性的模式菌株)在气-液界面和气-液-固界面的运动行为，并解析了细菌细胞产生该类运动行为背后的物理机制。与自由水体(bulk-liquid)中的近似直线运动不同^[13]，细菌细胞在气-液界面处进行的 CW 和 CCW 圆周运动，增大了细菌在界面处的停留时间和附着机会^[32]。在气-液-固界面附近，细菌存在如下 2 种行为状态——粘附和运动，而运动时细菌的运动方向有如下 2 种——近似垂直于界面和近似平行于界面，且随着追踪时间延长细菌运动方向会发生变化。可见，通过控制微观水分分布，进而实现细菌空间分布调控的研究大有可为。

此外，与固-液界面类似，气-液界面和气-液-固界面同样具有捕获细菌和限制细菌扩散的作用^[7,25]。那么，细菌在气-液界面和气-液-固界面处运动特征有何生物学意义呢？首先，气-液界面和气-液-固界面均能捕获大量细菌；使其停留在界面附近，有助于细菌获取新鲜氧气资源，提升细菌在界面的附着概率，促使生物膜形成^[9]。其次，由于界面表面张力的作用，界面处养分浓度相对较高，细菌聚集于界面附近有助于细菌细胞对养分的获取。总之，气-液界面和气-液-固界面显著影响细菌空间分布和迁移能力，不仅改变细菌细胞间的接触几率，调节细胞间水平基因转移，也影响细菌种间的互作或竞争、细菌与噬菌体的相互作用、微生物多样性及其生态效应的发挥等。进一步研究不同界面类型对细菌运动行为的影响机制，实现通过改变微观界面环境调节细菌运动

行为的目的，对攻克土壤微生物多样性及其生态效应调控等难题具有关键意义。

4 结论

在气-液界面处，PAO1 能够执行近似直线的轨迹，同时由于“前进-后退”的运动机制也能在气-液界面上进行 CW 旋转和 CCW 旋转的圆周运动，细菌大约游动 1 s 后开始改变运行方向，且完成一次圆周运动大约耗时 2 s。此外，PAO1 还能根据其(细胞体和鞭毛)中心与界面间距的变化灵活转变运动轨迹，执行“近似直线运动”与“圆周运动”间转换的复杂运动。在液滴蒸发过程中，由于受到水膜厚度的限制以及液滴内部毛细管流和 Marangoni 涡流的作用，PAO1 细胞会朝气-液-固界面迁移，且大部分会逐渐在界面附着，该过程中细胞始终为被动迁移，鞭毛作用可忽略。本研究基于铜绿假单胞菌(PAO1)的研究结果可应用于具有极性单根鞭毛的细菌。综上所述，气体存在的界面能够捕获大量细菌使其停留在界面附近，从而改变细菌的运动行为和空间分布，提升细菌在界面的附着概率，促使生物膜的形成。

参考文献

- [1] Retzer JL, Lyon TL, Buckman HO, Brady NC. The nature and properties of soils. *Journal of Range Management*, 1952, 5(6): 420.
- [2] Wu YC, Cai P, Jing XX, Niu XK, Ji DD, Ashry NM, Gao CH, Huang QY. Soil biofilm formation enhances microbial community diversity and metabolic activity. *Environment International*, 2019, 132: 105116.
- [3] Bodenmiller D, Toh E, Brun YV. Development of surface adhesion in *Caulobacter crescentus*. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(5): 1438–1447.
- [4] Berne C, Ellison CK, Ducret A, Brun YV. Bacterial adhesion at the single-cell level. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, 16(10): 616–627.
- [5] Sartori P, Chiarello E, Jayaswal G, Pierno M, Mistura G,

- Brun P, Tiribocchi A, Orlandini E. Wall accumulation of bacteria with different motility patterns. *Physical Review E*, 2018, 97(2): 022610.
- [6] Watnick PI, Lauriano CM, Klose KE, Croal L, Kolter R. The absence of a flagellum leads to altered colony morphology, biofilm development and virulence in *Vibrio cholerae* O139. *Molecular Microbiology*, 2001, 39(2): 223–235.
- [7] Wu KT, Hsiao YT, Woon WY. Entrapment of pusher and puller bacteria near a solid surface. *Physical Review E*, 2018, 98(5): 052407.
- [8] Molaei M, Barry M, Stocker R, Sheng J. Failed escape: solid surfaces prevent tumbling of *Escherichia coli*. *Physical Review Letters*, 2014, 113(6): 068103.
- [9] Bianchi S, Saglimbeni F, Frangipane G, Dell’Arciprete D, Leonardo RD. 3D dynamics of bacteria wall entrapment at a water-air interface. *Soft Matter*, 2019, 15(16): 3397–3406.
- [10] Holwill MEJ, Burge RE. A hydrodynamic study of the motility of flagellated bacteria. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1963, 101(2): 249–260.
- [11] Li GL, Tang JX. Accumulation of microswimmers near a surface mediated by collision and rotational Brownian motion. *Physical Review Letters*, 2009, 103(7): 078101.
- [12] Jin F, Conrad JC, Gibiansky ML, Wong GCL. Bacteria use type-IV pili to slingshot on surfaces. *PNAS*, 2011, 108(31): 12617–12622.
- [13] 朱晓艳, 沈重阳, 陈国炜, 张伟, 李保国, 王钢. 土壤细菌趋化性研究进展. *土壤学报*, 2019, 56(2): 259–275.
Zhu XY, Shen CY, Chen GW, Zhang W, Li BG, Wang G. Advancement in research on bacterial chemotaxis in soil. *Acta Pedologica Sinica*, 2019, 56(2): 259–275. (in Chinese)
- [14] Hook AL, Flewellen JL, Dubern JF, Carabelli AM, Zaid IM, Berry RM, Wildman RD, Russell N, Williams P, Alexander MR. Simultaneous tracking of *Pseudomonas aeruginosa* motility in liquid and at the solid-liquid interface reveals differential roles for the flagellar stators. *mSystems*, 2019, 4(5): e00390-19.
- [15] Tinevez JY, Perry N, Schindelin J, Hoopes GM, Reynolds GD, Laplantine E, Bednarek SY, Shorte SL, Eliceiri KW. TrackMate: an open and extensible platform for single-particle tracking. *Methods*, 2017, 115: 80–90.
- [16] Qian H, Sheetz MP, Elson EL. Single particle tracking. Analysis of diffusion and flow in two-dimensional systems. *Biophysical Journal*, 1991, 60(4): 910–921.
- [17] Saxton MJ, Jacobson K. Single-particle tracking: applications to membrane dynamics. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 1997, 26: 373–399.
- [18] Roberts G. Encyclopedia of biophysics. Berlin: Springer, 2012.
- [19] Magariyama Y, Ichiba M, Nakata K, Baba K, Ohtani T, Kudo S, Goto T. Difference in bacterial motion between forward and backward swimming caused by the wall effect. *Biophysical Journal*, 2005, 88(5): 3648–3658.
- [20] Utada AS, Bennett RR, Fong JCN, Gibiansky ML, Yildiz FH, Golestanian R, Wong GCL. *Vibrio cholerae* use pili and flagella synergistically to effect motility switching and conditional surface attachment. *Nature Communications*, 2014, 5: 4913.
- [21] 杨杰. 数字图像处理及 MATLAB 实现. 北京: 电子工业出版社, 2010.
- [22] 杨丹, 赵海滨, 龙哲, 徐彬, 张志美, 赵薇. MATLAB 图像处理实例详解. 北京: 清华大学出版社, 2013.
- [23] Lemelle L, Palierne JF, Chatre E, Place C. Counterclockwise circular motion of bacteria swimming at the air-liquid interface. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(23): 6307–6308.
- [24] Di Leonardo R, Dell’Arciprete D, Angelani L, Iebba V. Swimming with an image. *Physical Review Letters*, 2011, 106(3): 038101.
- [25] Berke AP, Turner L, Berg HC, Lauga E. Hydrodynamic attraction of swimming microorganisms by surfaces. *Physical Review Letters*, 2008, 101(3): 038102.
- [26] Spagnolie SE, Lauga E. Hydrodynamics of self-propulsion near a boundary: predictions and accuracy of far-field approximations. *Journal of Fluid Mechanics*, 2012, 700: 105–147.
- [27] 韩苗, 朱晓艳, 陈国炜, 万小铭, 王钢. 解钾菌及其释钾微观机制的研究进展. *土壤学报*, 2022, 59(2): 334–348.
Han M, Zhu XY, Chen GW, Wan XM, Wang G. Advances on potassium-solubilizing bacteria and their microscopic potassium solubilizing mechanisms. *Acta Pedologica Sinica*, 2022, 59(2): 334–348. (in Chinese)
- [28] Desai N, Shaik VA, Ardekani AM. Hydrodynamic interaction enhances colonization of sinking nutrient sources by motile microorganisms. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 289.
- [29] Berg HC, Turner L. Chemotaxis of bacteria in glass

- capillary arrays. *Escherichia coli*, motility, microchannel plate, and light scattering. *Biophysical Journal*, 1990, 58(4): 919–930.
- [30] Goto T, Nakata K, Baba K, Nishimura M, Magariyama Y. A fluid-dynamic interpretation of the asymmetric motion of singly flagellated bacteria swimming close to a boundary. *Biophysical Journal*, 2005, 89(6): 3771–3779.
- [31] Qian C, Wong CC, Swarup S, Chiam KH. Bacterial tethering analysis reveals a “run-reverse-turn” mechanism for *Pseudomonas* species motility. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(15): 4734–4743.
- [32] Lauga E, Di Luzio WR, Whitesides GM, Stone HA. Swimming in circles: motion of bacteria near solid boundaries. *Biophysical Journal*, 2006, 90(2): 400–412.
- [33] Li GL, Tam LK, Tang JX. Amplified effect of Brownian motion in bacterial near-surface swimming. *PNAS*, 2008, 105(47): 18355–18359.
- [34] Gordon VD, Wang LY. Bacterial mechanosensing: the force will be with you, always. *Journal of Cell Science*, 2019, 132(7): jcs227694.
- [35] Shum H, Gaffney EA, Smith DJ. Modelling bacterial behaviour close to a no-slip plane boundary: the influence of bacterial geometry. *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 2010, 466(2118): 1725–1748.
- [36] Deegan RD, Bakajin O, Dupont TF, Huber G, Nagel SR, Witten TA. Contact line deposits in an evaporating drop. *Physical Review E, Statistical Physics, Plasmas, Fluids, and Related Interdisciplinary Topics*, 2000, 62(1 Pt B): 756–765.
- [37] Cazabat AM, Guéna G. Evaporation of macroscopic sessile droplets. *Soft Matter*, 2010, 6(12): 2591.
- [38] Pandey K, Hatte S, Pandey K, Chakraborty S, Basu S. Cooperative evaporation in two-dimensional droplet arrays. *Physical Review E*, 2020, 101(4-1): 043101.
- [39] Ruan C, Ramoneda J, Chen G, Johnson DR, Wang G. Evaporation-induced hydrodynamics promote conjugation-mediated plasmid transfer in microbial populations. *ISME Communications*, 2021, 1: 54.
- [40] Sempels W, De Dier R, Mizuno H, Hofkens J, Vermant J. Auto-production of biosurfactants reverses the coffee ring effect in a bacterial system. *Nature Communications*, 2013, 4: 1757.
- [41] Chauveau C, Birouk M, Halter F, Gökalp I. An analysis of the droplet support fiber effect on the evaporation process. *International Journal of Heat and Mass Transfer*, 2019, 128: 885–891.
- [42] Dechesne A, Wang G, Gülez G, Or D, Smets BF. Hydration-controlled bacterial motility and dispersal on surfaces. *PNAS*, 2010, 107(32): 14369–14372.
- [43] Still T, Yunker PJ, Yodh AG. Surfactant-induced Marangoni eddies alter the coffee-rings of evaporating colloidal drops. *Langmuir: the ACS Journal of Surfaces and Colloids*, 2012, 28(11): 4984–4988.
- [44] Abo Jabal M, Homede E, Zigelman A, Manor O. Coupling between wetting dynamics, Marangoni vortices, and localized hot cells in drops of volatile binary solutions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2021, 588: 571–579.

(本文责编 张晓丽)