

铜绿假单胞菌蹭行运动单细胞分析方法的建立及应用

倪磊¹, 金震宇¹, 杨帅¹, 金帆^{1,2}

1 中国科学技术大学 合肥微尺度国家实验室, 安徽 合肥 230026

2 中国科学技术大学 中国科学院软物质化学重点实验室, 安徽 合肥 230026

倪磊, 金震宇, 杨帅, 等. 铜绿假单胞菌蹭行运动单细胞分析方法的建立及应用. 生物工程学报, 2017, 33(9): 1611–1624.
Ni L, Jin ZY, Yang S, et al. Single-cell analysis method for twitching motility of *Pseudomonas aeruginosa*. Chin J Biotech, 2017, 33(9): 1611–1624.

摘要: 蹭行运动在生物被膜形成过程中对细菌适应表面环境以及后续生物被膜三维结构的形成起重要作用。因此, 对蹭行运动的原位表征、量化是生物被膜研究中的重要科学问题之一。我们通过高通量数据采集、自动化图像处理、数据库建立以及图形化输出等技术手段, 建立了一整套基于单细菌的统计分析方法。利用这一方法对蹭行运动中的行走、弹射过程进行了详细分析, 发现弹射运动过程中存在以 0.9 s 为周期的周期性弛豫。并定量比较了群体感知信号分子对蹭行运动的影响, 发现加入信号分子后蹭行运动在高速区明显增强。该方法的建立为后续蹭行运动分子机制以及调节方式的研究奠定了基础。

关键词: 蹭行运动, 生物被膜, 铜绿假单胞菌, 新方法与新技术

Received: March 31, 2017; **Accepted:** May 19, 2017

Supported by: National Basic Research Program of China (973 Program)(No. 2012CB933802), National Natural Science Foundation of China (Nos. 21274141, 21474098, 91013009).

Corresponding author: Lei Ni. Tel: +86-551-63606925; E-mail: nilei@mail.ustc.edu.cn

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2012CB933802), 国家自然科学基金 (Nos. 21274141, 21474098, 91013009) 资助。

网络出版时间: 2017-06-19

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20170619.1535.002.html>

Single-cell analysis method for twitching motility of *Pseudomonas aeruginosa*

Lei Ni¹, Zhenyu Jin¹, Shuai Yang¹, and Fan Jin^{1,2}

¹ Hefei National Laboratory for Physical Sciences at the Microscale, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, Anhui, China

² CAS Key Laboratory of Soft Matter Chemistry, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, Anhui, China

Abstract: Twitching motility is very important for *Pseudomonas aeruginosa* in the adaptation of surface environment and in the 3-D structure formation of mature biofilm. To quantitatively characterize twitching motility *in situ*, we developed a method by combining high-throughput data acquisition, automatic image processing and database establishment. This method is based on single cell analysis and big data visualization. A periodic relaxation of 0.9 second was resolved during slingshot motility analysis. Twitching motilities of bacteria under addition of two quorum sensing signaling molecules were studied, cells moved faster after signal addition. This method may help understand the molecular mechanism and regulatory circuits of twitching motility.

Keywords: twitching motility, biofilm, *Pseudomonas aeruginosa*, new method and new technology

蹭行运动特指细菌利用四型菌毛在固体表面上爬行,在假单胞菌和奈瑟菌属中十分常见^[1]。虽然发现的早,但对蹭行运动早年研究不多,直到发现其与生物被膜的紧密联系后才获得广泛关注。细菌生物被膜是细菌粘附于表面,通过分泌多种多糖基质、蛋白、DNA等胞外聚合物,将其自身包裹起来而形成的大量细菌聚集膜状物。生物被膜会在人体器官和医疗移植的器官表面形成而造成感染和移植手术失败^[2],在工业管道内部产生后易导致管道堵塞而大大增加能耗成本。某些细菌产生的生物被膜已经成为危害人类健康的重要杀手,据估计人体中约80%的细菌感染由生物被膜造成^[3],其中铜绿假单胞菌的感染尤为常见,常引起肺炎、尿道炎和中耳炎等疾病。铜绿假单胞菌形成的生物被膜也是许多院内感染和术后感染的病原,由于其对很多抗生素天生抗药且易在治疗中产生抗药性,很多感染难以治愈^[4]。欲防治生物被膜,

需首先理解生物被膜形成的关键因素以及生物被膜难以铲除的原因,部分研究者把目光聚焦于细菌的蹭行运动。

近两年,不断出现蹭行运动研究领域的突破性工作^[5-8]。细菌蹭行运动与生物被膜形成的关系主要体现在3个方面:1)细菌通过四型菌毛的收缩和释放,增强与表面之间的粘附并促进细菌之间的相互接触。Comolli等发现拥有四型菌毛但菌毛无法收缩的 *pilT*、*pilU* 突变株对人上皮细胞和小鼠组织表面的粘附均明显减弱^[9];2)如何进行蹭行运动决定了细菌的表面扩张能力和生物被膜的三维结构。低流场下的成熟生物被膜通常以蘑菇状的形态存在于表面,O'Toole等发现细菌粘附到表面之后会首先形成微菌落,这些微菌落对最终的生物被膜结构具有决定性作用,而对细菌基因组进行大范围筛选发现无法合成四型菌毛的相关突变株无法在表面形成小菌落,最后只能形成薄薄的单层^[10]。

Klausen 等利用荧光共聚焦的方法对生物被膜进行长时间跟踪观测,发现蹭行运动突变株丧失了从微菌落向外继续扩散的能力,因此无法完成整个生物被膜的动态演化过程,最终无法形成成熟生物被膜^[11]。Zhao 等通过细菌追踪和 Psl 染色的方法证明,铜绿假单胞菌的蹭行运动协助细菌胞外多糖 Psl 在表面上的分布并反过来引导细菌的运动、改变粘附行为,从而导致微菌落的形成^[12]。3) 蹭行运动主导了细菌在表面上粘附之后的表型转变。Persat 等发现铜绿假单胞菌粘附表面后其四型菌毛的伸缩过程启动了甲基化蛋白 PilJ,进而经过 cAMP、Vfr 通路完成了从表面机械信号到细菌内部基因表达信号的转化^[5]。Luo 等证明 PilY1 蛋白可以调节鸟苷二磷酸 (c-di-GMP) 的合成,同时环腺苷一磷酸 (cAMP)、Vfr、AlgR 路径可调节 PilY1 的表达,以此将整个菌毛机械感应机制引向 c-di-GMP 调节系统^[13]。由此可见,蹭行运动既决定了生物被膜成熟结构的形成,又在细菌粘附表面后介导表型转变,对生物被膜的形成十分关键。有学者已经开始尝试通过加入诱导剂和合成不同微结构的材料来改变细菌的蹭行行为,从而达到抗菌的目的^[14-15]。因此对蹭行运动的系统性表征在生物被膜构成原理的理解及防治方法的探索中都至关重要。

传统的表征方法是将细菌戳到琼脂板的底部,通过测量细菌群落边界的大小来描述其蹭行运动的能力^[16]。这种方法只能从宏观上粗略地定量,无法得到蹭行运动的细节信息,且观察到的菌斑是由多细菌集群化协同运动形成,与细致观测的目标相去甚远。欲深入理解蹭行运动如何决定生物被膜的结构以及介导细菌表

型转变,必须从单细菌层面出发,对表面上细菌从粘附到长成生物被膜的过程进行长期细致的跟踪观测和定量分析。另一种方法是选取少数细菌用显微镜记录其运动过程,然后引入粒子追踪算法进行运动轨迹的分析^[14,16]。这种方法可以在单细菌水平上定量研究蹭行运动,但只能进行少量细菌的统计且低效率时,更无法进行推广。且已有的研究发现蹭行运动具有多样性的特点,在表面上细菌之间运动表型差距非常大,运动有快有慢,有站立行走有贴伏爬行,弹射运动或频繁或稀少^[17-19],因此对少数细菌的观测无法真正全面理解蹭行运动的本质,必须进行高通量统计分析。

我们在此建立一套集成自动化数据采集和图像处理、图形化输出的方法,系统地描述细菌运动速度、运动轨迹、方向以及转动、弹射运动等情况。同时,改变以往的实验方法以实现大量运动数据的高速采集,从而最终完成对细菌在固体表面蹭行运动的全面统计分析,并利用这一方法对群体感知机制与蹭行运动的关系进行了定量表征。

1 方法

1.1 对铜绿假单胞菌在固体表面的蹭行运动行为进行原位、高通量、自动化的数据采集

1.1.1 细菌培养

实验中使用的菌种为铜绿假单胞菌 (ATCC15692) $\Delta fliM$ 和 $\Delta fliC\Delta pilA$ 菌株,均由美国圣母大学 Joshua D. Shrout 实验室提供,敲除 *fliM* 基因是为了消除细菌鞭毛对蹭行运动的干扰。首先从 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中取出冻存的菌种,在含有 1.5% 琼脂的 LB 培养板上划线,放在恒温培养箱中

37 °C 孵育 18 h。待长出菌斑后,挑一个单克隆菌斑接种于 1 mL 限制性培养基 FAB+30 mmol/L 谷氨酸钠,在 37 °C 恒温条件下、200 r/min 摇菌培养 10 h。在对数期 OD_{600} 约 0.8 收集细菌,按体积比 1:30 稀释到 1 mL 新鲜 FAB 中。LB 培养基成分:氯化钠 10 g/L,酵母提取物 5 g/L,蛋白胨 10 g/L。FAB 培养基成分:硫酸铵 2 g/L,十二水合磷酸氢二钠 12 g/L,磷酸二氢钾 3 g/L,氯化钠 3 g/L,氯化镁 93 mg/L,二水合氯化钙 14 mg/L,二水合硫酸钙 200 μ g/L,七水合硫酸亚铁 200 μ g/L,一水合硫酸锰 20 μ g/L,五水合硫酸铜 20 μ g/L,七水合硫酸锌 20 μ g/L,七水合硫酸钴 10 μ g/L,钼酸钠 Na_2MoO_4 10 μ g/L,硼酸 5 μ g/L。

连接好装置后,向 flow cell (丹麦科技大学) 中提供 FAB+0.6 mmol/L 谷氨酸钠培养基。在群体感知实验中则首先使用纯化后的 DMSO 分别配制一级 (3-oxo-C₁₂-HSL)、二级 (C₄-HSL) 信号分子 (购自 Sigma Aldrich 公司) 的 10 mmol/L 母液,按终浓度 10 μ mol/L 加入到 FAB+0.6 mmol/L 培养基中。先除去装置中的气泡,再将稀释好的菌液用 1 mL 无菌注射器注入通道中,用玻璃胶黏住注菌孔。将整个装置放在显微镜载物台上静置约 20 min,待玻片表面上粘附足够数目的细菌后,快速冲走上方悬浮的细菌,然后将注射器泵流速设置为 3 mL/h。

1.1.2 细菌蹭行运动视频的自动化采集

在显微镜上加载 ZDC2 连续自动对焦防漂系统,保证高速拍照时焦平面的稳定;加载 Ludl XY 反馈载物台,防止样品在水平方向的漂移;加载 Tokai Hit 快速反馈加热台以最大限度减小温度涨落;亮场照明采用稳定、可控的 LED 灯作为光源,并加入长波滤光片以减轻光照对细

菌的损伤。图像采集使用 Andor sCMOS 相机,像素 2 560×2 160,可高速地采集图像。显微镜机架为 Olympus IX81 光学系统,配备 100×Olympus 油镜,数值孔径 1.4。使用 Andor IQ 3.1 软件来集成以上设备,使各设备同步运行。实验中控温 30 °C,图像采集帧率为 10 帧/s,先将焦面移到远离细菌的位置,拍摄一张照片作为背景图像,用作后期的图像校正。选定一个细菌数目适中的视野拍摄 20 000 张照片,然后移动到下一个视野再拍一张背景图像,继续拍摄 20 000 张照片。如此重复拍照 8 个视野,实验结束。每次实验共计可获得 10 000 张照片约 1 000 个细菌运动轨迹,将近 1 000 万个瞬时速度点。

1.2 基于 MATLAB 图像处理平台编写程序包,对蹭行运动原始图像进行高速、自动化的定量分析

1.2.1 原始图像的背景校正

在每个视野观测前,首先将焦面向下方调节 200 μ m,拍摄一张没有细菌的照片作为背景照片,然后把所有拍摄的照片用单个视野的背景照片做除法校正。

1.2.2 细菌的识别

第一步,对背景校正后的图像做高斯滤波,使图像更加平滑,降低图像噪音;第二步,用边缘滤波器使图像增强,细菌边缘的明暗区分更显著;第三步,用高斯滤波减小边缘滤波造成的噪音;第四步,调节图像的亮度阈值,把第三步得到的图像转化为二值图像;第五步,根据细菌的大小,把明显小于细菌通常尺寸的二值连通区域删除掉,再补全细菌轮廓上可能的空洞。

1.2.3 图像基本信息的获取

MATLAB 使用的是椭圆拟合的方法,根据

所得的椭圆给出待测连通域的各个参数,细菌可以看作是一个长圆形,椭圆拟合之后,椭圆的长轴、短轴的长度代表细菌的长度和宽度,椭圆两个顶点 AB 即为细菌的两个极端的位置,椭圆的中心就是细菌的投影中心位置。椭圆的长轴与水平方向的夹角 (-90° – 90°) 即为细菌在平面上的取向角。

1.2.4 细菌的追踪

将二值平面图像时间序列在空间重组,生成三维图像矩阵,再逐层扫描矩阵,确定三维空间中的连通域和连通域中的节点。根据三维连通性重组、拆分原始图像,自动生成分叉的拓扑数据结构。

1.2.5 数据的初步筛选和减噪

首先删除追踪时间低于 200 s 的数据,这些短的数据多是由于接触碰撞导致某些细菌被反复重新识别,或是细菌在将要分裂又未能完全分离时反复被识别,对统计分析的贡献不大;然后删除 0.1 s 内细菌长度变化超过 10 个像素的数据,这些数据是由于拍照时焦面发生波动或者细菌之间的相互接触。筛选后记录的位置和长度数据都包含着巨大的噪音,采用小波减噪,减噪后的结果很好保留了高频和低频的信号。先对细菌的长度、方向角、细菌中心的横纵坐标做小波减噪,再根据以上结果算出细菌两端的位置,进而完成对运动速度、轨迹的计算。

1.2.6 生长、运动等各参数的计算

对端点轨迹坐标做差分可得细菌两端点横纵坐标的速度分量,合成得到速度矢量。根据细菌主轴所在的方向,将速度矢量在平行和垂直于主轴的两个方向分解得切向速度分量和法向速度分量。对其中一个端点所有时刻的切向位移求和可得该细菌在观测时间窗口内沿着主

轴方向的总位移。若该值大于零,则将该端定为头端,反之则将另一端定为头端。切向速度分量沿着头端方向定为正,法向速度分量自主轴顺时针方向定为正。

细菌生长速率分两类计算,对于贴伏于表面的细菌对不同时间菌长值进行线性拟合得到生长速率,这种情况下倾角定为 0° 。对于翘起的细菌先估计其实际长度,得到估计的生长速率。根据细菌的长度和宽度算出翘起的倾角: $\alpha = \arccos((l_e - b)/(l - b))$,其中 l_e 为估计菌长, l, b 为实际观测所得菌长和菌宽。

1.2.7 对单细菌蹭行运动的轨迹和速度时间序列进行分析

首先作运动轨迹均方末端距 (MSD) 与时间间隔 τ 的关系图,各取对数后线性拟合得到均方末端距斜率 k_{MSD} 值,作为评价细菌运动轨迹曲折程度的参量。对细菌运动速度矢量进行相关性分析,计算细菌在蹭行运动过程中速度矢量在时间上的自相关函数数值, $corrV(\tau) \equiv \langle v(t) \cdot v(t+\tau) \rangle$,速度自相关函数用双指数拟合之后可得特征衰减时间。

1.2.8 建立蹭行运动数据库

将所有采集到的蹭行运动参数抽提出来,包括运动速度模量、 k_{MSD} 、弹射频率、生长速率、转动速度、行走细菌比例等,生成总数据列表。获得数据库之后,对各运动参数进行两两作图,具体做法是将限制条件之内的数据点画在二维图上,每个数据点代表一个细菌的平均坐标位置。然后对各数据点做二维高斯卷积,得到较为平滑的热图。此外,将所有符合条件的细菌样本中的分布数据提取出来并加以合并,归一化之后作速度模量分布、角度分布、速度自相关函数图等。增加筛选功能,以比较实验中不

同细菌群体的运动情况。

2 结果与分析

2.1 蹭行运动速度分布的柯西拟合

首先将细菌的运动速度在切向和法向进行分解,如图 1A 所示。然后分别计算切向速度和法向

速度的概率密度分布,用柯西分布拟合。细菌在蹭行运动时处于小雷诺数的力学环境中,菌毛输出功率 W 基本上完全消耗于细菌与表面摩擦中,运动速度为菌毛输出功率 P 与摩擦力 f 的比值。 P 和 f 均有符合正态分布的特性,因此运动速度呈柯西分布。柯西分布关系式: $f(x,a,b)=b/(\pi(x-a)^2+b^2)$ 。

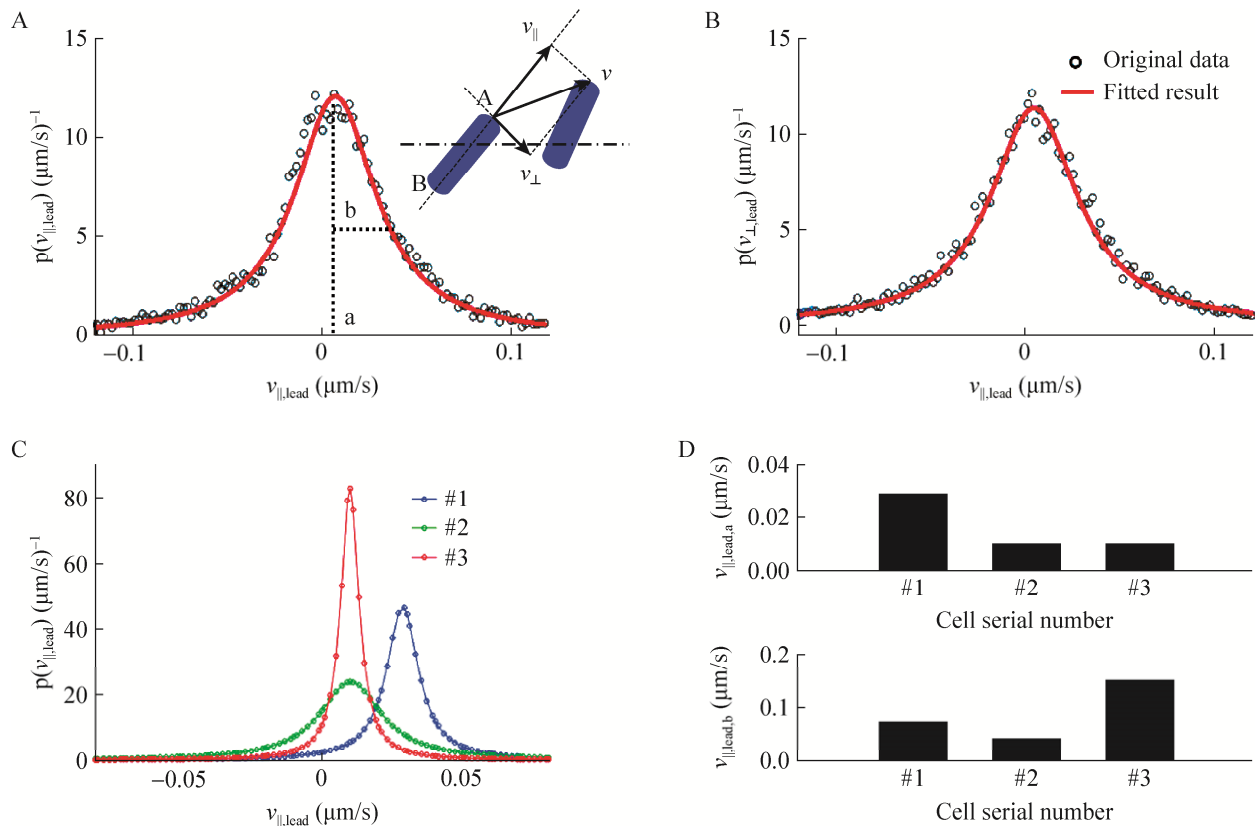


图 1 细菌蹭行运动速度分布的柯西分布拟合 (对单一示例细菌的切向速度分布 (A) 和法向速度分布 (B) 原始数据的柯西分布拟合; 3 个不同细菌的切向速度分布 (C) 和柯西分布拟合参数比较 (D)). (A) 图右上方插图 为细菌运动速度矢量分解示意图. (A)、(C) 图横坐标为细菌运动速度切向分量大小, 纵坐标为对应切向速度分量的概率密度值. (B) 图横坐标为细菌运动速度法向分量大小, 纵坐标为对应法向速度分量的概率密度值. (D) 图横坐标为细菌的序号, 纵坐标为切向速度分量分布的中值或半峰宽)

Fig. 1 Cauchy distribution fitting of the velocity distribution of bacterial twitching motility. Cauchy distribution fitting of the distribution of tangential velocity (A) and normal velocity (B) of a example bacterial cell. Comparation of the tangential velocity distribution (C) and fitting parameters (D) of three bacteria with different twitching motility type. The illustration of velocity vector decomposition was shown upright to caption (A). The X axis of (A) and (C) is the value of tangential velocity, Y axis is the probability density. The X axis of (B) is the value of normal velocity, Y axis is the probability density. The X axis of (D) is the cell serial number and Y axis is the medium value or pick width at half height of the distribution of tangential velocity.

实验中我们用柯西分布中值 ($v_{||,lead,a}$) 来描述细菌运动的快慢程度,柯西分布半峰宽 ($v_{||,lead,b}$) 来描述细菌运动速度的波动程度。图 1A、1B 为分别对切向速度和法向速度分布进行柯西分布拟合,图 1C、1D 所示为实验中采集到的 3 个不同细菌的速度分布图及柯西分布拟合参数的比较。由图 1D 可知,1 号、3 号细菌速度波动较为接近,但 1 号细菌明显运动更快;2 号、3 号细菌运动速度大小接近,但 2 号细菌运动速度的波动性更大。

2.2 蹭行运动运动速度矢量的自相关函数

细菌蹭行运动速度时间自相关函数 $corrV(\tau) \equiv \langle v(t) \cdot v(t+\tau) \rangle$ 服从双指数衰减 ($corrV(\tau) = A_1 \cdot \exp(-\tau/\tau_1) + A_2 \cdot \exp(-\tau/\tau_2) + A_3$), 做拟合之后可得特征衰减时间。如图 2A 所示,该细菌运动速度的快衰减特征时间为 0.48 s,预示着单根菌毛拉伸的持续时间。慢衰减特征时间为 4.07 s,预示着多根菌毛协同拉伸的持续时间。两衰减幅值

(A_1, A_2) 较为接近。图 2B 比较了不同细菌的速度时间自相关函数,可见不同细菌速度衰减过程有着显著差别。值得注意的是,细菌的自速度相关函数曲线上常出现箭头所指的突出部分,在后面弹射运动分析时再做讨论。

2.3 多细菌蹭行运动的统计分析

建立蹭行运动数据库之后,设定不同的筛选条件可以实现对不同细菌群体的蹭行运动情况进行比较。图 3A 比较了细菌粘附表面之后在不同时间段的运动速度和运动轨迹情况。 k_{MSD} 基本一致,说明不同时间段细菌的运动轨迹无明显区别。但在粘附表面之初的 1.6 h 内,细菌蹭行运动速度明显小于后期,提示在初始粘附阶段可能存在着表面适应的过程。图 3B 给出了细菌蹭行运动在高速区域(弹射)和低速区域(平移)的分布情况,可见弹射运动主要沿着细菌的两侧法向方向,而平移则主要沿着细菌长轴方向。

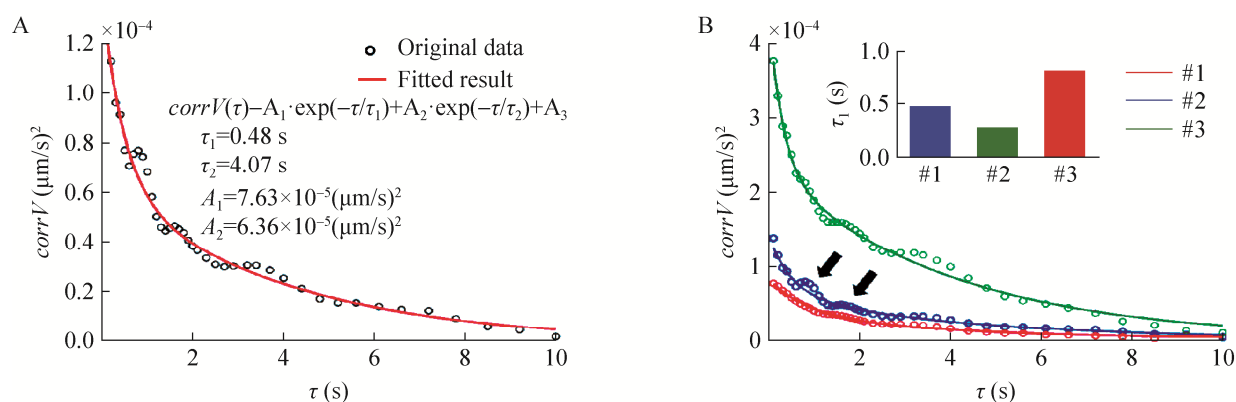


图 2 细菌蹭行运动速度矢量的时间自相关函数以及双指数拟合。(A) 单一细菌蹭行运动速度矢量的自相关函数以及双指数拟合;(B) 比较 3 个不同细菌的自相关函数,右上小图为 3 个细菌各自的快衰减过程特征衰减时间 (τ_1)。 (A)、(B) 图横坐标为时间间隔,纵坐标为相应时间间隔下的速度相关函数值

Fig. 2 Temporal autocorrelation function of the velocity vector of bacteria twitching motility. (A) Temporal autocorrelation function and double-exponential fitting of velocity vector of one single bacterial cell. (B) Comparison of temporal autocorrelation function of three different bacteria, top right graph is the comparison of the characteristic time of fast decay process (τ_1). The X axis of (A) and (B) is the time interval, Y axis is the corresponding value of autocorrelation function.

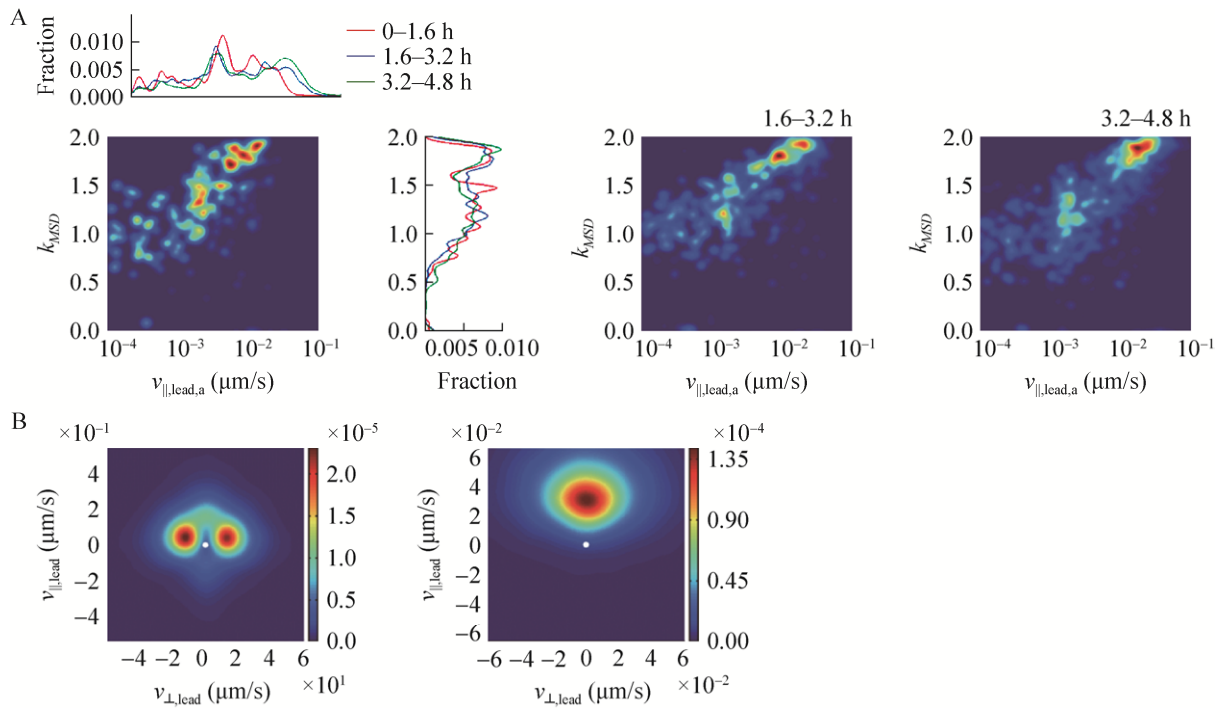


图3 多细菌蹭行运动参数的统计分析。(A) 对1 000个细菌在粘附表面后不同时间段的蹭行运动速度和轨迹的统计分析;横坐标为对运动速度统计后进行柯西分布拟合所得切向速度分量的中值,纵坐标为对运动轨迹均方末端距随时间变化在双对数坐标下线性拟合所得斜率值。(B) 对1 000个细菌蹭行运动速度矢量在高速部分(左图)和低速部分(右图)的统计热图。横坐标为细菌运动速度的法向分量值,纵坐标为细菌运动速度的切向分量值。该热图是首先把所有细菌每一个时刻的运动速度矢量画在平面上,然后逐个做二维高斯卷积后再累加,数值越大代表出现频率越高。中间白色斑点为(0,0)位置

Fig. 3 Statistical analysis of paramers of multicellular twitching motility. (A) Statistical analysis of twitching velocity and motional tracks of 1 000 bacterial cells at different stage after adhesion to surface. The X axis is the medium value of Cauchy distribution fitting of tangential velocity, Y axis is the linear fitting slope of MSD at bi-logarithmic coordinate. (B) Statistical heat map of twitching velocity of 1 000 bacterial cells at high speed scale (left map) and low speed scale (right map). The X axis is the normal velocity value and Y axis is the tangential velocity value. The heat map were created by first plot velocity vector at all time points of all bacteria on the map, then do Gaussian convolution for all points and accumulation, bigger value on the map represent a bigger probability of occurrence. The white spot in the center represent coordinate position (0,0).

2.4 对细菌行走过程的表征

细菌行走是指细菌其中一极上的菌毛完全释放,另外一极的菌毛将细菌拉起来在表面上运动,细菌行走对生物被膜后期成熟结构的形成有重要意义^[18]。我们在实验中详细记录了细菌行走过程以及平移和行走间的切换,如图4A所示。细菌先是微微翘起在表面上快速平移,到2处后发生

了快速的转变,直立起来。从3到5一直处于直立状态,6到7过程中经历了上下晃动。图4B中记录了该过程细菌倾角的变化情况。细菌整体的运动速率比较大,在一个很宽的速度范围内波动(图4C)。细菌行走过程中投影长度随着细菌立起来反复摇晃而有较大波动,在直立时投影长度接近于细菌的横截面直径(图4D)。

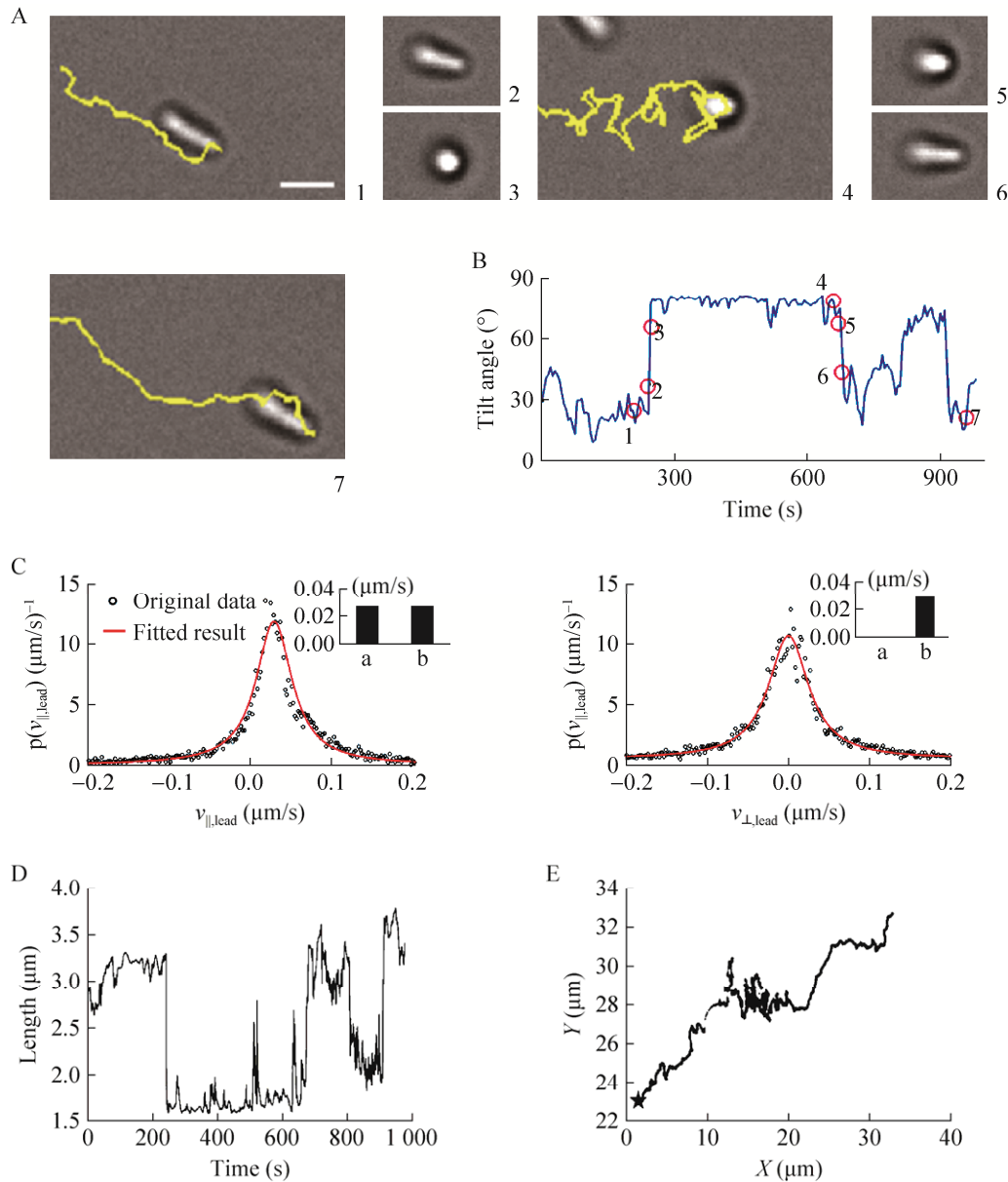


图4 细菌行走过程的示例分析。(A) 单细菌行走过程的展示。(B) 细菌行走过程中菌身与表面夹角随时间变化图。横坐标为时间轴, 纵坐标为细菌菌身与表面之间的夹角, 数字标注的红色圆圈对应(A)图中的各个时刻。(C) 行走细菌的切向速度分布(左图)和法向速度分布(右图)及柯西分布拟合; 横坐标为细菌运动速度切向或法向分量大小, 纵坐标为对应切向或法向速度分量的概率密度值。(D) 细菌行走过程中投影长度随时间变化图。(E) 细菌行走过程中其端点在二维平面上的投影轨迹

Fig. 4 Analysis of bacterial walking of a example cell. (A) photo presentation of the walking process of an example bacteria. (B) Time series of the cell-to-surface tilt angle during walking process. (C) Cauchy distribution fitting of the tangential velocity (left map) and normal velocity (right map) of a walking cell. The X axis is the value of tangential velocity or normal velocity, Y axis is the probability density. (D) Time series of cell projection length during walking. (E) The 2-D projection trajectory of bacterial leading point during walking motility.

2.5 对细菌弹射运动的表征

细菌的弹射运动最早由 Jin 等发现^[17], 表面上的细菌会在两种极为不同的运动模式间切换——长时间的低速运动和短时间的高速运动。高速过程在几秒内完成, 线速度高于低速模式几十倍, 并且伴随着细菌主轴转动和后续运动方向的变化。Jin 等认为低速过程是多根菌毛合力的结果, 而高速过程则是由于单根菌毛的瞬间释放而失去力学平衡所致。实验中, 我们将速度模量高于 $0.1 \mu\text{m/s}$ 的非翘起运动过程划定为弹射运动。我们将弹射事件发生次数对弹射模量在双对数坐标系中作图, 发现一个明显的指数衰减。如图 5A 所示, 随着弹射速度模量的增加, 该种弹射的出现次数逐渐减少, 线性拟合得衰减级数为 2.6。对多个细菌蹠行运动统计后发现弹射行为都有这一指数衰减, 衰减级数在 2.5 到 3 之间。这是一个典型断裂噪音 (Crackling noise) 过程, 在地震和铁磁相变研究中十分常见。图 5B 所示是将 500 个细菌的弹射过程合并后作出的速度方向分布图。细菌倾向于向垂直于菌身方向或者后方弹射运动, 从累计时间权重 (左图) 和累计速度模量权重 (右图) 两张图对比可知细菌向后弹射的幅度相对较大。以上结果还提示细菌运动方向后方的菌毛不易释放。

细菌的蹠行运动速度时间自相关函数常出现图 2B 中箭头所指的突出部分。突出部分出现的位置常在 τ 为 0.9 s、1.8 s 等位置, 说明蹠行运动速度有一定的周期性。我们仔细观察导致突出部分出现的速度序列, 发现其中包含很多弹射运动。而且正好以 0.9 s 为周期, 且大致沿着一个方向。把弹射运动区域速度序列删除后, 突出部分基本消失 (图 6A)。这说明一次大的弹射过程可能包含了若干个子过程。如图 6B 所示为一个细

菌在 200 s 内速度模量的变化情况, 该细菌共经历了 10 次跳弹射过程, 每次速度模量也不一致, 但都有一定的周期性弛豫, 持续时间约 3 s。对其中一个弹射事件的速度模量放大观察, 可清楚看到其中确实包含着若干子过程, 如图 6C 和 6D 所示。

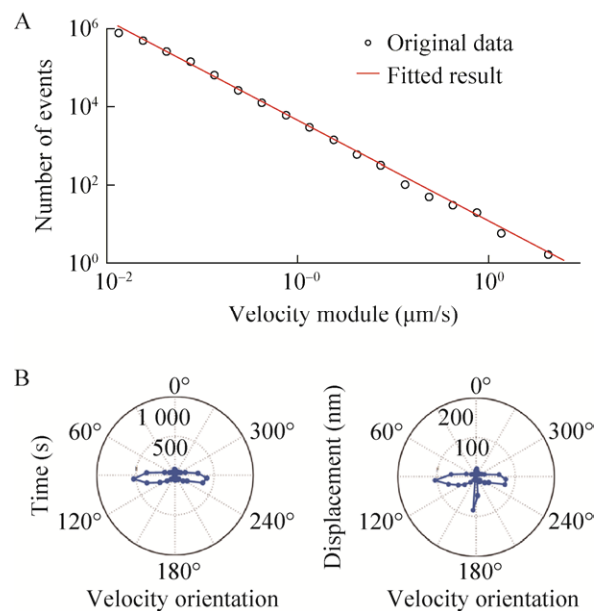


图 5 弹射运动的表征。(A) 双对数坐标下的细菌蹠行运动过程中弹射频率与弹射速度模量的关系图, 红线为线性拟合结果; (B) 在极坐标下显示对 500 个细菌蹠行运动过程中弹射运动方向的累计时间权重统计 (左图) 和累计速度模量权重统计 (右图), 幅角数值标注在坐标系外圈, 对应细菌运动引导点的速度方向。极径数值标记在坐标系半径上, 对应相应的累计时间或累计速度模量值

Fig. 5 Characterization of slingshot motility. (A) bi-logarithmic coordinate plot of slingshot frequency to slingshot velocity module in twitching process, red line is the linear fitting result. (B), Statistical analysis of the slingshot velocity direction with duration time weight (left) or displacement weight (right) of 500 cells at polar coordinates plain. The value of arguments were labelled outside the outer ring of the coordinates, corresponding to the velocity orientation of the cell motility leading points. The value of polar radii were labelled at the radius line, corresponding to the cumulative duration time or cumulative displacement.

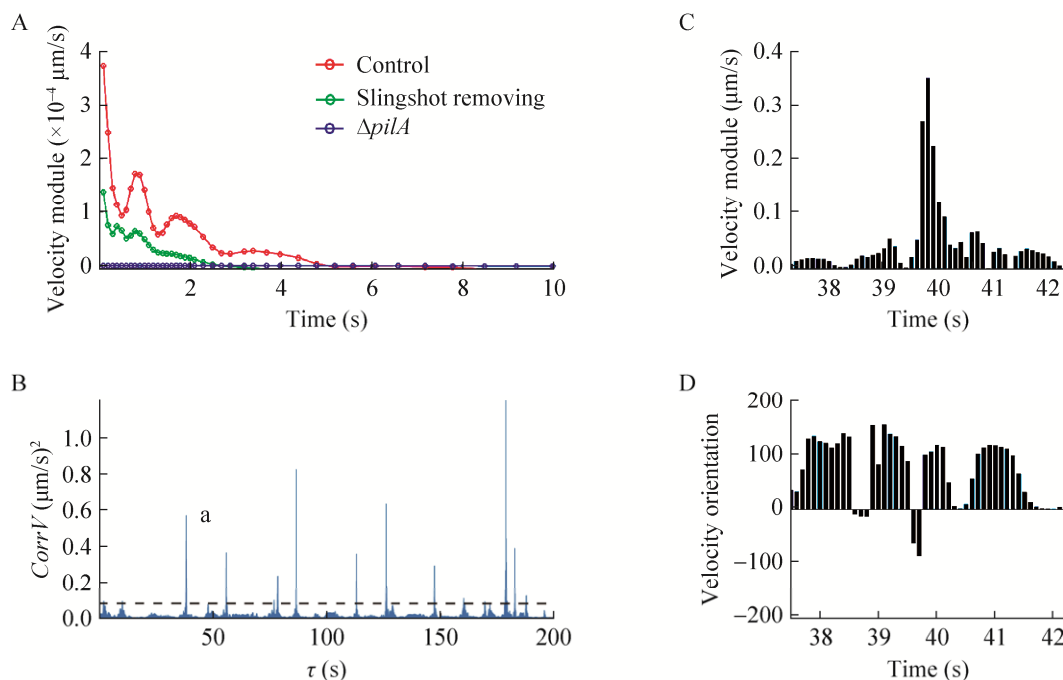


图 6 细菌弹射运动过程的周期性弛豫. (A) 删除弹射过程前后细菌蹭行运动速度时间自相关函数的变化情况, 横坐标为时间间隔, 纵坐标为相应时间间隔下的速度相关函数值. (B) 400 s 内某一细菌的蹭行运动速度模量随时间变化图, 其中速度模量大于 $0.1 \mu\text{m/s}$ 的过程被定为弹射运动; (C) 和 (D), (B) 图中 a 弹射运动事件中速度模量和方向的详细变化过程

Fig. 6 Periodic relaxation of slingshot motility. (A) Comparison of the temporal autocorrelation function of twitching velocity before and after slingshot processes removing. The X axis is the time interval, Y axis is the corresponding value of autocorrelation function. (B) Time series of velocity modulus twitching motility of one single bacterial cell, the velocity modulus bigger than $0.1 \mu\text{m/s}$ were decided as slingshot motility. (C) and (D), detail presentation of changes of the velocity module and orientation of the slingshot event a in (B).

2.6 细菌蹭行运动对群体感知信号分子的响应分析

Fuqua 等首先发现细菌中的群体感知通讯机制^[20], 1998 年首先发现群体感知信号分子合成基因缺失突变株无法产生正常结构的生物被膜, 且形成的平整生物被膜对十二烷基硫酸钠的耐受性明显减弱^[21]. Bjarnsholt 等进一步发现群体感知机制大大增强了生物被膜对妥布霉素的耐受性^[22]. 此后大量研究者开始尝试设计针对群体感知信号分子的抑制剂来对抗生物被膜^[23], 因此细菌群体感知

机制的阐明对生物被膜的防治非常重要。

然而, 当前对群体感知机制与蹭行运动之间的关系尚不清楚, Beatson 等认为群体感知与蹭行运动并无关联, 他们观察铜绿假单胞菌群体感知系统的多个突变株发现细菌蹭行运动行为与野生型基本一致^[24]. 而 Patriquin 等在研究铁元素对细菌蹭行运动的关联时发现铁元素的缺乏促进蹭行运动, 并且是通过二级群体感知系统 *rhIIIR* 完成的^[25]. 后来 Glick 等进一步发现 *rhIIIR* 系统控制的鼠李糖脂的分泌促进了细菌的蹭行运动^[26]. 由此可见群体感知系统在某些条件下会

影响蹭行运动。我们以铜绿假单胞菌为模型，原位观测并定量分析细菌在过量加入一级、二级群体感知信号分子下的蹭行运动行为。

图 7 为加入不同群体感知信号分子后细菌的弹射速度分布情况，图 A 显示加入一级、二级信号分子均可增强细菌的弹射速度模量，图 B 显示加入二级信号情况下细菌弹射运动频率有

所增加。图 C 给出了细菌运动的速率分布，加入两种信号分子均使得细菌运动加快。总体来看，一级、二级群体感知系统对蹭行运动的影响相似，这提示群体感知可能是通过二级信号系统来调节蹭行运动的，一级系统通过开启二级系统而促进蹭行运动，这与 Glick 等的观点一致。

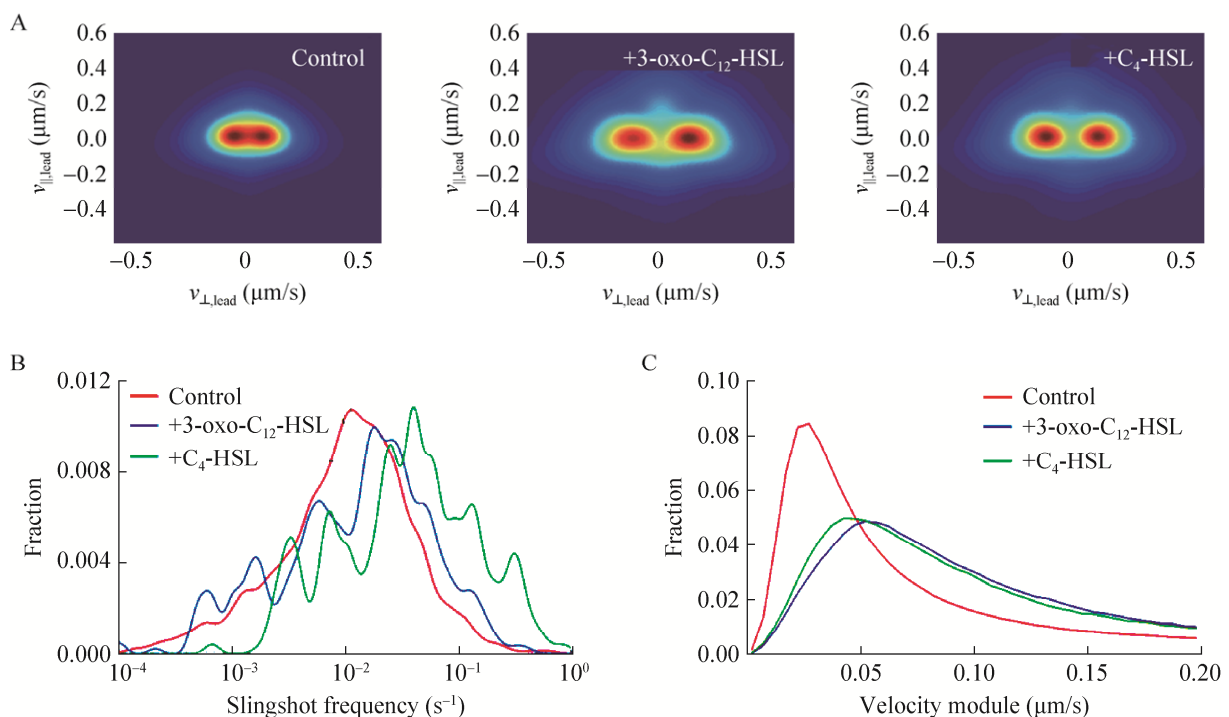


图 7 外源加入群体感知信号分子条件下细菌蹭行运动比较。(A) 分别加入 10 $\mu\text{mol/L}$ 一级和二级群体感知信号分子后对细菌蹭行运动在高速区域的统计分析。横坐标为细菌运动速度的法向分量值，纵坐标为细菌运动速度的切向分量值。该热图是首先把所有细菌每一个时刻的运动速度矢量画在平面上，然后逐个做二维高斯卷积后再累加，数值越大代表出现频率越高。(B) 统计加入群体感知信号分子后细菌蹭行运动的弹射频率；(C) 统计加入群体感知信号分子后细菌在高速区域的速度模量分布

Fig. 7 Comparison of bacterial twitching motility under addition of quorum sensing signaling molecules. (A) Statistical analysis of twitching velocity at high speed scale after addition of 10 $\mu\text{mol/L}$ 3-oxo-C₁₂ HSL or C₄-HSL. The X axis is the normal velocity value and Y axis is the tangential velocity value. The heat map were created by first plot velocity vector at all time points of all bacteria on the map, then do Gaussian convolution for all points and accumulation, bigger value on the map represent a bigger probability of occurrence. (B) Statistical analysis of bacterial slingshot frequency after addition of quorum sensing signaling molecules. (C) Statistical analysis of twitching velocity modulus distribution at high speed scale after addition of quorum sensing signaling molecules.

3 结论

细菌的蹭行运动行为对其形成生物被膜具有重要的作用,对蹭行运动进行统计分析是当前这一领域的重要问题。本文通过对多种显微镜硬件的集成以及自主开发图像处理程序实现了对细菌蹭行运动行为的高通量、自动化的表征,建立了一套标准化的蹭行运动分析工具并利用这一工具对细菌行走、弹射运动进行了细致的表征,并以群体感知机制为例比较了不同条件下细菌蹭行运动情况。相信这一方法将为系统地研究蹭行运动分子机制以及调控原理打开新的局面。

REFERENCES

- [1] Burrows LL. *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility: type IV pili in action. *Annu Rev Microbiol*, 2012, 66(1): 493–520.
- [2] Bruellhoff K, Fiedler J, Möller M, et al. Surface coating strategies to prevent biofilm formation on implant surfaces. *Int J Artif Organs*, 2010, 33(9): 646–653.
- [3] Parsek MR, Singh PK. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annu Rev Microbiol*, 2003, 57(1): 677–701.
- [4] Wolcott RD, Ehrlich GD. Biofilms and chronic infections. *JAMA*, 2008, 299(22): 2682–2684.
- [5] Persat A, Inclan YF, Engel JN, et al. Type IV pili mechanochemically regulate virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(24): 7563–7568.
- [6] Kilmury SLN, Burrows LL. Type IV pilins regulate their own expression via direct intramembrane interactions with the sensor kinase PilS. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(21): 6017–6022.
- [7] Anyan ME, Amiri A, Harvey CW, et al. Type IV pili interactions promote intercellular association and moderate swarming of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(50): 18013–18018.
- [8] Oliveira NM, Foster KR, Durham WM. Single-cell twitching chemotaxis in developing biofilms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(23): 6532–6537.
- [9] Comolli JC, Hauser AR, Waite L, et al. *Pseudomonas aeruginosa* gene products PilT and PilU are required for cytotoxicity *in vitro* and virulence in a mouse model of acute pneumonia. *Infect Immun*, 1999, 67(7): 3625–3630.
- [10] O'Toole GA, Kolter R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol*, 1998, 30(2): 295–304.
- [11] Klausen M, Heydorn A, Ragas P, et al. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Mol Microbiol*, 2003, 48(6): 1511–1524.
- [12] Zhao K, Tseng BS, Beckerman B, et al. Psl trails guide exploration and microcolony formation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature*, 2013, 497(7449): 388–391.
- [13] Luo Y, Zhao K, Baker AE, et al. A hierarchical cascade of second messengers regulates *Pseudomonas aeruginosa* surface behaviors. *mBio*, 2015, 6(1): e02456–14.
- [14] Haley CL, Kruczek C, Qaisar U, et al. Mucin inhibits *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation by significantly enhancing twitching motility. *Can J Microbiol*, 2014, 60(3): 155–166.
- [15] Singh PK, Parsek MR, Greenberg EP, et al. A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature*, 2002, 417(6888): 552–555.
- [16] Oura H, Tashiro Y, Toyofuku M, et al. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility by 1-naphthol and other bicyclic compounds bearing hydroxyl groups. *Appl Environ Microbiol*, 2015, 81(8): 2808–2818.
- [17] Jin F, Conrad JC, Gibiansky ML, et al. Bacteria

- use type-IV pili to slingshot on surfaces. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(31): 12617–12622.
- [18] Gibiansky ML, Conrad JC, Jin F, et al. Bacteria use type IV pili to walk upright and detach from surfaces. Science, 2010, 330(6001): 197.
- [19] Ni L, Yang S, Zhang RR, et al. Bacteria differently deploy type-IV pili on surfaces to adapt to nutrient availability. npj Biof Microb, 2016, 2: 15029.
- [20] Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. J Bacteriol, 1994, 176(2): 269–275.
- [21] Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, et al. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. Science, 1998, 280(5361): 295–298.
- [22] Bjarnsholt T, Jensen PO, Burmølle M, et al. *Pseudomonas aeruginosa* tolerance to tobramycin, hydrogen peroxide and polymorphonuclear leukocytes is quorum-sensing dependent. Microbiology, 2005, 151(2): 373–383.
- [23] O’Loughlin CT, Miller LC, Siryaporn A, et al. A quorum-sensing inhibitor blocks *Pseudomonas aeruginosa* virulence and biofilm formation. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(44): 17981–17986.
- [24] Beatson SA, Whitchurch CB, Semmler ABT, et al. Quorum sensing is not required for twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol, 2002, 184(13): 3598–3604.
- [25] Patriquin GM, Banin E, Gilmour C, et al. Influence of quorum sensing and iron on twitching motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol, 2008, 190(2): 662–671.
- [26] Glick R, Gilmour C, Tremblay J, et al. Increase in rhamnolipid synthesis under iron-limiting conditions influences surface motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol, 2010, 192(12): 2973–2980.

(本文责编 陈宏宇)



倪磊 博士，2010年本科毕业于安徽大学，2016年在中国科学技术大学获博士学位，现在中国科学技术大学微尺度国家实验室做博士后。主要从事铜绿假单胞菌运动学及细菌内部各种信号传导通路等方面的研究。