



单细菌表型的高通量表征和控制

杨帅, 金帆*

中国科学院深圳先进技术研究院, 深圳合成生物学创新研究院, 中国科学院定量工程生物学重点实验室, 深圳 518055

* 联系人, E-mail: fan.jin@siat.ac.cn

2020-04-27 收稿, 2020-08-03 修回, 2020-08-03 接受, 2020-08-04 网络版发表

国家自然科学基金(31901028, 21774117)和中国博士后科学基金(2020M672881)资助

摘要 致病菌在感染宿主的过程中需要精确调控自身的基因表达, 从而完成对宿主的入侵、适应等过程, 例如形成生物被膜, 所以对病原菌在生物被膜形成过程中表型、行为的定量分析是联系其基因特定表达与感染性疾病如何发生的纽带, 具有重大科学意义. 本文首先综述了如何通过发展一些高通量的原位表征方法去量化分析病原菌在单细胞层次的表型, 其中包括细菌运动行为、黏附行为和社会行为相关的表型, 并讨论了如何在单细菌水平上去理解这些表型在生物被膜发展过程中扮演的角色. 之后, 简单介绍如何通过引入光遗传学技术结合定量工程生物学的方法去控制这些与感染性疾病发生密切相关的表型, 如控制细菌的黏附、生物被膜的形成、细菌在宿主内的定殖, 以及细菌在宿主内感染模式的转变等.

关键词 细菌生物被膜, 光遗传学, 铜绿假单胞菌, 高通量显微镜

细菌生物被膜(biofilms)由基质和细菌个体组成: 细菌自身分泌的胞外聚合物(胞外多糖、蛋白质、DNA等)形成生物被膜的基质, 细菌个体之间相互接触并被包裹在基质中形成膜状的微生物细胞聚集物^[1,2]. “聚集”是生物被膜的基本特征, 代表了细菌在生物被膜中的群体生活方式. 这种生活方式完全不同于自由状态的浮游细菌, 生物被膜中的细菌个体具有依赖于空间位置的生长模式和生活习性, 并且相互之间可以建立联系构建出新的信号传导系统^[1,3,4]. 因此, 生物被膜更像是一种由多个细菌个体构成的空间异构生态系统^[5]. 更重要的是, 生物被膜的形成可以保护细菌在不利的环境中存活, 包括对抗生素的耐受性明显提高和对宿主的免疫系统具有高的抗性, 这极大地增加了人们治疗细菌感染疾病的难度^[6,7]. 据估计, 人体中约80%的细菌感染由生物被膜造成. 可以说, 生物被膜的形成是大多数细菌造成感染的关键^[8,9]. 因此, 对细菌生物被膜的认识、防治、清除以及如何治疗细菌生物被膜引

起的感染是有关全人类健康的重要研究方向.

在众多病原菌中, 铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)是许多院内感染和术后感染的病原, 该菌属于机会致病菌, 极易感染患有潜在医学病症或免疫力低下的患者, 如囊性纤维化患者(cystic fibrosis, CF)^[10,11]. 在临床情况下, 80%~90%的CF病人其肺部有铜绿假单胞菌定殖, 并且难以被宿主免疫系统直接清除, 也无法用抗生素得到有效治疗^[7,12,13]. 铜绿假单胞菌极强的生存能力依赖于其可以在不同营养条件下形成不同形态的生物被膜^[14], 而生物被膜的强大保护能力使细菌能免受物理、化学或机体免疫反应的攻击, 从而导致很多由生物被膜引起的感染难以被治愈^[15].

在基础科学研究领域, 铜绿假单胞菌是研究生物被膜的模式生物之一. 以该菌的生物被膜研究为切入点, 在精确的基因和分子表达水平上研究生物被膜的形成、发展过程, 多层次探究细菌在入侵、感染宿主过程中的基因、表型、行为调控, 以期最终找到可以

引用格式: 杨帅, 金帆. 单细菌表型的高通量表征和控制. 科学通报, 2021, 66: 367-383

Yang S, Jin F. Characterization and control of bacterial phenotypes at the single cell level (in Chinese). Chin Sci Bull, 2021, 66: 367-383, doi: 10.1360/TB-2020-0486

解决生物被膜引起的临床感染问题的治疗方案。

欲防治生物被膜,就需对病原菌在生物被膜形成过程中所呈现的表型(phenotype)、行为以及其中涉及的精确基因调控进行定量分析,理解其在感染过程中所扮演的角色,以更深入地理解细菌的感染机制和生存策略。这有助于为解决生物被膜引起的感染问题提供新的理论和思路。本文主要以铜绿假单胞菌为对象,首先介绍高通量原位表征方法的建立,以及近期对生物被膜形成过程中细菌相关表型、行为进行单细菌表征的研究成果,主要包括蹭行运动、黏附行为以及生存相关的社会行为的单细菌研究;其次,介绍如何通过引入光遗传学技术结合定量工程生物学的方法去控制这些与感染性疾病发生密切相关的表型;最后,简单讨论应对生物被膜问题的新策略。

1 单细菌表型的高通量原位表征方法的建立

建立单细菌表型的高通量原位表征方法包括软件和硬件两方面:软件指的是利用算法或程序开发实现对细菌显微图像的分析以获得细菌表型的表征参数;硬件包括显微成像系统的搭建和细菌培养平台的开发。首先介绍单细菌追踪算法是如何通过图像分析实现对细菌表型或行为的定量表征的。

1.1 基于图像分析的单细菌追踪算法

顾名思义,此算法的目的是通过图像识别实现对单个细菌的追踪。图像的获取主要依赖于显微镜成像

技术,此部分将着重围绕细菌追踪算法展开。

细菌追踪算法起源于胶体粒子追踪技术。在胶体科学领域,通过算法追踪球状胶体粒子是最早研究胶体动力学的一种标准方法,一直被广泛应用至今^[16-20]。伴随着不同形状胶体粒子制备技术的成熟,针对非球形胶体系统的追踪算法也被开发出来^[21-23]。而细菌与胶体粒子在微观尺度和尺寸等方面都具有相似性,从这方面讲,细菌可以看作一个特殊的胶体粒子。基于此,在胶体动力学研究中开发的粒子追踪技术,完全可以尝试应用到细菌的研究上。2010年,加州大学洛杉矶分校的Wong课题组^[17,24]首次将单粒子追踪技术应用于铜绿假单胞菌的运动研究中,实现了对其表面运动行为的高通量分析。随后细菌追踪技术不断发展,国内外学者积极开展了适用于不同研究对象的单细菌研究^[25-33]。

单细菌追踪算法的核心内容主要分为3个步骤:首先,根据采集到的图像数据,对细菌进行识别,提取单个细菌的几何信息,如细菌的长度等(图1(a));其次,对细菌进行多维度的拓扑追踪,获得时间或空间尺度的生物信息,如随着时间变化的细菌长度信息等(图1(b));最后,在前面得到的生物信息基础上,利用数学和物理工具对其进行量化,可以实现对细菌特定行为的研究,如细菌的运动和谱系等(图1(c), (d))。

在第一步单细菌识别中,一般通过对识别获得的细菌的二值平面图进行拟合,以得到单个细菌的相关几何参数。例如,对于杆状的铜绿假单胞菌可以使用椭

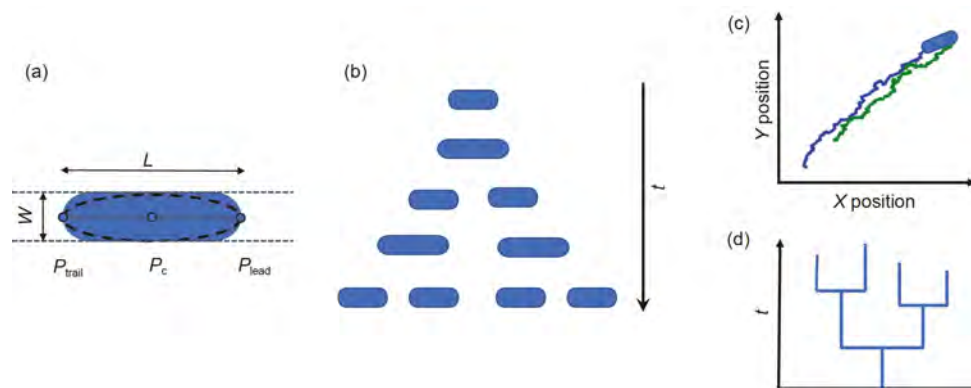


图 1 (网络版彩色)细菌识别追踪算法实现对细菌特定行为的量化。(a)通过图像拟合获得单个细菌的长度(L)、宽度(W)、质心(P_c)、头端位置(P_{lead})、尾端位置(P_{trail})等几何信息。(b)将不同时间的生物信息进行串联,获得细菌的时间演变过程。(c)数据量化实现对单个细菌运动轨迹的描述。(d)根据细菌的空间位置关系及生长分裂获得由细菌分裂的母子关系所确定的亲缘二叉树

Figure 1 (Color online) Single cell tracking algorithms for analyzing cell behaviors. (a) The geometric information of a given bacterium was estimated by fitting an ellipse to the cell body, including the positions of the poles and centroid (P_{lead} , P_{trail} and P_c), cell length (L) and cell width (W). (b) Connection of the biological information at different time points to obtain the time evolution process. (c) The positions of cell two poles at different time were linked into motility trajectories. (d) Genealogical tree could be generated using the cell growth and division information

圆拟合的方法,拟合所得的椭圆的长、短轴的长度代表了细菌的长度和宽度,椭圆两个顶点即为细菌两个极端的位置,椭圆的中心就是细菌的中心位置(图1(a)).第二步对细菌的拓扑追踪是为了将细菌不同时间点得到的生物信息进行串联,获得细菌的时间演变过程,例如细菌在表面的生长分裂过程(图1(b)).最后一步的数据量化可以实现对细菌特定行为的参数表征,例如细菌的运动轨迹的获得:将细菌生长过程中不同时间点的头端和尾端的位置信息进行连接,即可得到细菌特定时间内的运动轨迹(图1(c)),而根据轨迹便可计算出细菌的速度等运动信息.同样地,利用数据分析技术也可以获得细菌的分裂时间、生长率、生物被膜形成过程中由细菌分裂的母子关系所确定的亲缘二叉树(图1(d))等.

细菌追踪算法主要是对所采集到的图像数据进行处理分析,属于软件需求.鉴于细菌的多样性和研究问题的复杂性,目前并没有一款算法可以完全通用,一般都需要根据需求针对性地进行算法的开发、编写与调试.另外,算法所依赖的平台也不统一,可以用C、C++、Matlab或IDL等计算机语言进行算法的开发.值得一提的是,开源的免费软件ImageJ已经具备初级的图像识别和统计分析功能,可以用于细菌长度、形貌和运动快慢等基本参数的测量^[34-36].

算法分析处理图像,而图像的获得依赖于拍摄图像所需的硬件.单个细菌的高通量原位图像采集需要显微镜技术的支持,另外培养平台(或容器)也属于硬件系统,它决定了细菌生长所处的条件或环境,可实现不同目的的研究.

1.2 显微镜技术

为了更精确地分析细菌的表型、行为,除了开发高效精细的图像处理算法外,更高分辨率的显微图像和更高帧率的图像采集是数据获取的最初限制,而这依赖于显微镜技术的发展.

传统生物被膜的观测依赖于宏观的染色法、试管法等,但无法做到在单个细菌层次上的观测.电子显微镜(扫描电子显微镜、透射电子显微镜以及原子力显微镜)虽然可以在纳米级的空间分辨率上观察到生物被膜的微观形貌以及单个细菌的形态,但制样过程一般需要固定、染色、干燥和喷涂导电涂层等.这些预处理过程改变了生物被膜原先生长的环境以及有可能改变生物被膜本来的结构,进而无法做到对细菌生物

被膜发展过程以及细菌状态的实时原位观测,以致得到的结果与真实情况可能会有一定的偏离.在过去的20多年里,随着激光共聚焦扫描显微镜^[37,38]、多光子激光扫描显微镜^[39]、全内反射成像^[40]、超分辨成像^[41,42]等技术的不断发展和完善,人们已经可以在单细菌层次上对生物被膜的形成进行原位实时观察,这将生物被膜的研究引领到了更精细的微观水平上^[33,43].

要实现在单细菌层次上对细菌生物被膜发展过程中细菌行为、表型的高通量表征,显微镜技术的硬件主要涉及光学显微镜、光源和相机.光学显微镜需要配备自动锁焦和光学防漂移系统,如Andor公司的ZDC系统或ASI公司的CRISP系统等.细菌生物被膜的培养周期相对较长,几天至几周不等,自动锁焦系统可以保证焦平面长时间的稳定,且自动化程度高,省时又高效.显微镜还需配备自动化的XYZ台,X与Y轴位置的精确控制可实现多视野的数据采集,以提高数据的采集通量;成熟的生物被膜具有立体化的三维结构,Z轴方向的移动可用于获取生物被膜形成过程的整体形貌,而不局限于某一高度的XY二维平面.光源可以根据需求选择LED或者激光:LED光源适用于大视野的宽场拍摄,激光更适用于荧光的拍摄.另外,滤光系统的选择也会影响图像的成像质量.对于相机,要求具有较高的分辨率和拍摄速度.例如,研究细菌在表面的运动,需要图像的采集频率至少达到20帧/s;而要观察溶液中细菌的游泳运动,一般的相机已经无法满足要求,需要配备高速相机才能捕获运动细节.如果需要采集荧光,相机还需具有较高的量子效率,以便探测弱的荧光信号.在多个荧光拍摄时,也可以根据需求配备双相机或者多相机进行多个荧光通道的同时拍摄,以减少光毒性对细菌的损伤.总之,硬件设施的配备越好,获得的图像质量就越高,后期图像处理就会越容易;而越高的时间分辨率,所获得的数据包含的信息也会越丰富.图2展示了由金帆课题组设计并搭建的多功能显微镜的光路示意图,此设备集成了转盘共聚焦,高速相机和全内反射系统,可用于不同需求的单细菌表征.

除了显微镜技术的硬件要求外,研究者们设计制作了众多新颖的培养平台(或容器)用于研究生物被膜.最常用的是流动池方法(flow cell system)^[44,45].细菌黏附在流动池内的平面上生长,上方的流动营养液环境保证了营养供给的稳定.细菌生长的平面一般为玻璃表面,细菌可在表面生长发展成为生物被膜,玻璃的透明性提供了显微镜观察的窗口.因此,借助于培养平台

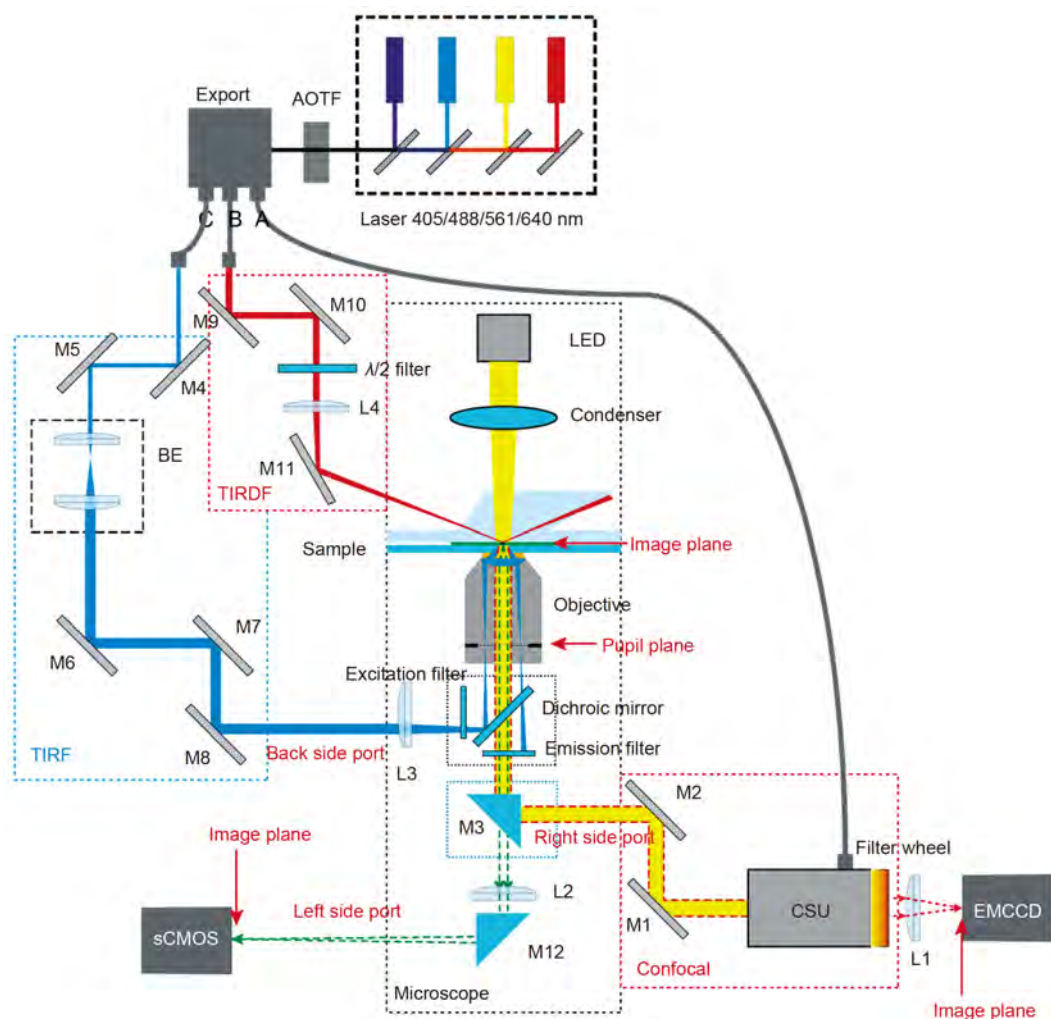


图2 (网络版彩色)金帆课题组搭建的用于高通量表征单细菌表型、行为的显微镜. 该显微镜集成了转盘共聚焦(CSU)、高速相机(sCMOS)和全内反射系统(TIRF), 可用于高信噪比的荧光成像、高速拍摄和全内反射成像

Figure 2 (Color online) Schematic drawing of the high-throughput microscope system designed and built by Fan Jin's group. The microscope was integrated with a spinning-disk confocal device, a sCMOS camera and a TIRF system for different applications including fluorescence, high-speed and TIRF imaging

(或容器), 显微镜技术不仅可以做到对生物被膜中细菌个体的原位观测, 而且可以实现长时间的在线实时观测. 对于一般的生物被膜培养及观测, 流动池可以从丹麦科技大学进行购置, 无需自己设计制作. 而对于一些苛刻条件, 如高剪切力环境、差异环境(不均匀的梯度营养物质环境等)下, 则需要结合微流控技术针对性地设计个性化的培养装置来对细菌的特定表型、行为进行研究.

1.3 微流控技术

微流控(microfluidics)技术是一种使用微管道(尺寸为数十到数百微米)处理或操纵微小流体的科学技术,

将其应用于微生物的研究领域, 一方面可以为细菌提供微尺度的生长空间; 另一方面可以产生极端的生长环境. 此外, 微流控技术的高度定制化特点, 使得研究者可以根据需求个性化设计、制作微流控装置以用于不同的研究用途.

微流控技术可以创造诸多宏观尺度难以实现的生长空间和环境, 结合显微镜技术可以实现在单细胞水平上对细菌的特定行为或表型进行研究. 2006年, 哈佛大学谢晓亮课题组^[46]设计制备了可以将细菌“困”在一个100 pL腔室的微流控装置, 实现了对单细胞水平上的蛋白表达随机性的观测(图3(a)). 2010年, Suckjoon Jun课题^[47]利用其设计制备的“mother machine”微流控

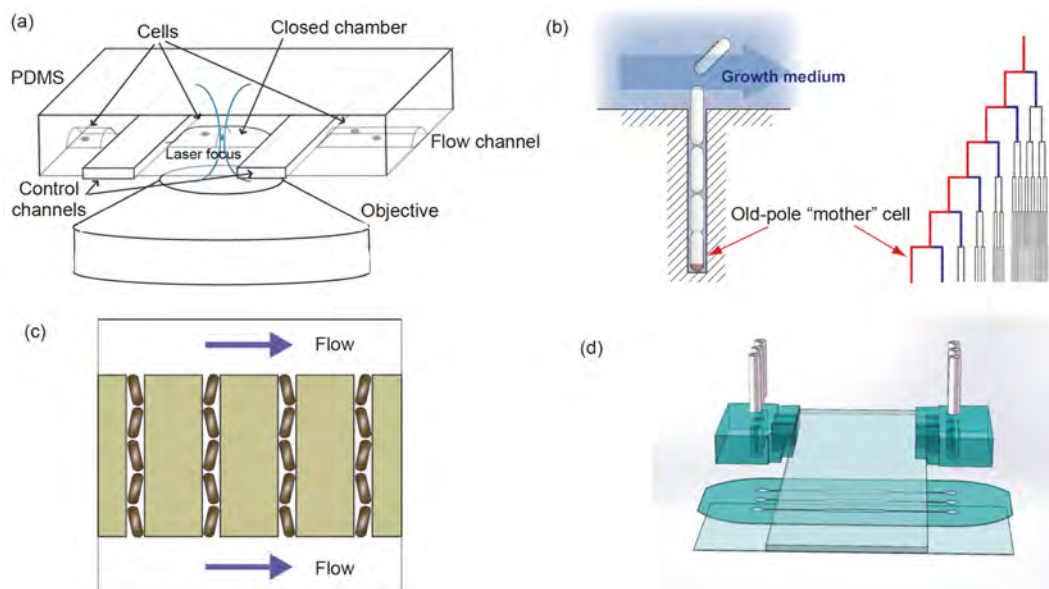


图 3 (网络版彩色)微流控装置用于单细菌的表型、行为研究. (a) 通过两个控制通道挤压流体通道形成的100 pL微空间封闭腔室^[46]. (b) 可用于细菌长时间生长观测的“mother machine”装置示意图^[47]. (c) 微流控技术制备用于控制细菌在表面单层生长的图案化琼脂胶块, 细菌被固定为由琼脂胶块构成的通道内沿着通道单层生长^[52]. (d) 通过将超薄PDMS芯片夹在载玻片和盖玻片中间制备的可用于全内反射成像的双面玻璃型流动样品池^[40]

Figure 3 (Color online) Microfluidic devices for studying single bacterial cell dynamics. (a) Cells are trapped inside a volume of 100 pL, formed by compression of a flow channel by two control channels^[46]. (b) Mother machine for following a large number of cells inheriting the same pole and their progeny for many generations^[47]. (c) An agarose-based, microfluidic device corrals cells into defined tracks to direct bacterial colony growth in single layer^[52]. (d) Ultrathin microfluidic device was designed with a PDMS stamp sandwiched between a glass slide and a coverslip, where total internal reflection was generated on the lower surface of the glass slide and the cover glass provided a window to image^[40]

装置, 实现了对单个细菌在均匀营养环境中长达数周的生长观测(图3(b)), 这在宏观实验中是不可能实现的. “mother machine”装置此后被广泛采用和改进, 极大地推进了细菌老化、生长模式、周期性等的研究^[48~51]. 2012年, Moffitt等人^[52]利用微流控芯片技术在琼脂糖胶块上构建了类似于“mother machine”的培养通道, 命名为“单细胞恒化器(single-cell chemostat)”细菌被束缚在线性通道内单层生长, 可以培养至30~40代, 以用于长时间的单细胞研究(图3(c)). 2016年, Durhama课题组^[53]利用微流控微通道中液体的层流行为创造了微观的梯度营养环境, 研究了单个细菌的趋化行为. 金帆课题组^[54]于2017年利用微流控装置产生的强剪切力, 对细菌在极端剪切环境下的黏附等行为进行了研究, 并于2019年制备了双面玻璃型微流控流动样品池, 实现了细菌生物被膜的在线培养以及对黏附细菌的全内反射成像(图3(d))^[40]. 此外, 研究者们还设计了不同的微流控装置, 结合显微镜技术, 在单个细菌水平上对细菌的演化、营养适应性、分裂不对称性, 与宿主相互作用, 抗生素耐受性等开展了研究, 加深了对生物被膜及

细菌其他行为的理解^[55~58]. 可以预见, 随着显微镜技术的发展以及微流控装置的开发, 许多未知的细菌表型、行为将会被发现和研究, 进而推动生物被膜相关研究的发展.

2 单细菌表型的高通量表征

在宏观的群体水平上, 生物被膜中细菌运动能力可以用菌落整体的延伸速度来表征, 黏附能力可通过统计残余细菌的生物量(biomass)进行表征. 类似这些的表征方法得到的信息是对生物被膜中群体细胞平均后的结果. 以单细菌追踪算法为软件设施, 显微镜技术为主要硬件设施, 结合微流控等装置制备技术, 发展出的高通量原位表征方法可以同时追踪大量单个细菌的行为演变, 从而可以在单细菌水平上对生物被膜发展过程中细菌的表型、行为进行观测, 因此受到科研工作者的青睐, 并使生物被膜的研究取得突破.

2.1 细菌蹭行运动的单细菌表征

蹭行运动(twitching motility)是指细菌利用四型菌

毛(Type IV pili, TFP)在固体表面上爬行的运动方式^[59]. 早在1980年, Bradley^[60]就提出铜绿假单胞菌的蹭行运动是通过细菌的菌毛系统完成的, 菌毛被发射伸出, 像“抓手”一样抓住表面, 然后菌毛开始收缩, 细菌受到收缩的牵引向牵引方向进行运动, 而这一过程直至2001年才被Skerker和Berg^[61]通过菌毛染色的方法利用全内反射成像显微镜观察到.

蹭行运动引起研究者的兴趣始于其在生物被膜发展、形成过程中扮演的重要角色. 对铜绿假单胞菌而言, 四型菌毛首先有助于其与表面之间的黏附, 而其驱使的表面运动不仅可以帮助细菌在表面上分散, 同时也是生物被膜三维形貌形成的必要条件^[62,63]. 借助于高通量的原位表征方法, 科学家们可以在单细菌水平上对铜绿假单胞菌的蹭行运动进行追踪并进一步量化. 图4(a)展示了基于显微图像识别实现对细菌蹭行运动的实时追踪分析, 图4(b)展示了经过量化分析获得的细菌的头端和尾端的运动轨迹. 更进一步的深入研究使得人们对细菌的蹭行运动有了新的认知和理解. Wong课题组^[24]对铜绿假单胞菌在表面的蹭行运动进行了单细菌的追踪研究, 发现了细菌蹭行运动的一种独特的“直立(walking)”行走模式, 相比“匍匐(crawling)”前进的爬行模式, “直立”行走的方向随机性强、运动速率快, 同时也更利于细菌从表面脱离, 从而为细菌寻找新的定殖环境提供了可能(图4(c)). 更精细的量化分析发现, 铜绿假单胞菌的“匍匐”爬行由两种不同的动作交替完成: 恒速平移和组合平移旋转, 后者的瞬时速度大约是前者的20倍. 这种像“弹弓”释放一样的高速弹射运动被形象地称为“slingshot”(图4(b)箭头指示). 通过对运动细节的精确量化表明, 恒速平移是由多个四型菌毛的拉动完成, 而“slingshot”是由于单个四型菌毛的释放导致的快速“弹弓”运动, 此运动可使细菌快速地转动身体进而改变运动方向^[25,64]. 这种表面弹射运动机制对理解细菌在表面的适应行为有很大启发性, 它的阐明为控制细菌在表面上的传播提供了全新思路. 随后, 金帆课题组^[65]利用类似的原位表征方法对细菌在不同黏弹性表面的蹭行运动进行了原位研究. 研究发现, 铜绿假单胞菌对表面黏弹性具有主动适应的反应机制. 细菌会利用四型菌毛对高分子刷表面进行主动响应, 从而产生更高频次的表面弹射运动(slingshot), 迫使所接触的高分子刷进入剪切变稀状态. 细菌能够对材料表面的软硬性质进行主动适应的机制, 说明细菌可以通过调节自身的运动策略完成在不同表面

上的传播和扩散, 这为许多医学和抗菌表面材料设计的研究提供了重要的理论指导. 在另外一项重要的研究工作中, Ni等人^[32]完成了上千个细菌在固体表面蹭行运动的长时间追踪和统计研究, 并根据速度进行了分类分析, 最终建立了铜绿假单胞菌的蹭行运动数据库. 运用此数据库可以实现对细菌运动、适应模式的自动分类和检索, 此研究将为系统地研究蹭行运动分子机制以及调控原理打开新局面.

同时, 细菌在表面黏附后, 蹭行运动是其主要的运动方式, 细菌可能已经进化出特定的表面运动策略使他们能够在不同的自然环境中生存繁衍. 通过高通量追踪分析铜绿假单胞菌在营养条件不同的表面上的蹭行运动, 根据其运动行为确定了4种不同表面运动类型: 单极黏附型、两极黏附快速爬行型、两极黏附原地挣扎型和原地不动型. 在营养有限的环境中, 细菌优先使用单向爬行占领表面, 具有强的搜索效率; 相反, 在营养丰富的培养基中, 细菌优先停止平移运动, 倾向于尽快形成菌落聚集体. 重要的是, 细菌在不同营养条件下都保持着上述4种运动类型, 只是比例有所差异. 这种运动策略不仅可使细菌适应不同的营养环境, 又保证了种群表面运动的多样性^[32]. 自然环境中, 细菌形成生物被膜的环境常常具有局部的异质性. 已有研究通过宏观实验发现, 铜绿假单胞菌可以通过蹭行运动形成偏向于化学诱导源的不对称菌落, 很大程度上证实了蹭行运动的趋化性, 但并未得到单细菌的直接观察和表征^[66,67]. 借助于精巧的微流控装置设计, Oliveira等人^[53]观察到了单个细菌可以通过蹭行运动有效地趋向趋化因子, 进一步的单细菌追踪阐明了这种表面趋化行为的机制: 当远离趋化因子时, 细菌会通过高频的方向反转进行纠正, 这种纠正性操作可以很快触发, 具有亚微米的空间精度(图5(a), (b)).

这些关于铜绿假单胞菌蹭行运动研究, 使我们能更好地理解蹭行运动在细菌生长、生存过程中扮演的角色, 也为我们理解整个生物被膜的发展提供了科学指导. 当然, 除蹭行运动外, 这些单细菌表征技术还可用于细菌其他运动方式的研究, 例如, 香港中文大学的吴艺林团队^[68]和哈佛大学的Berg团队^[69]各自建立了大肠杆菌的群集运动(swarming)的单细胞研究体系, 可以研究群体扩张过程中单个细菌的运动.

2.2 细菌黏附行为的单细菌表征

细菌从浮游状态黏附到表面是形成生物被膜的首

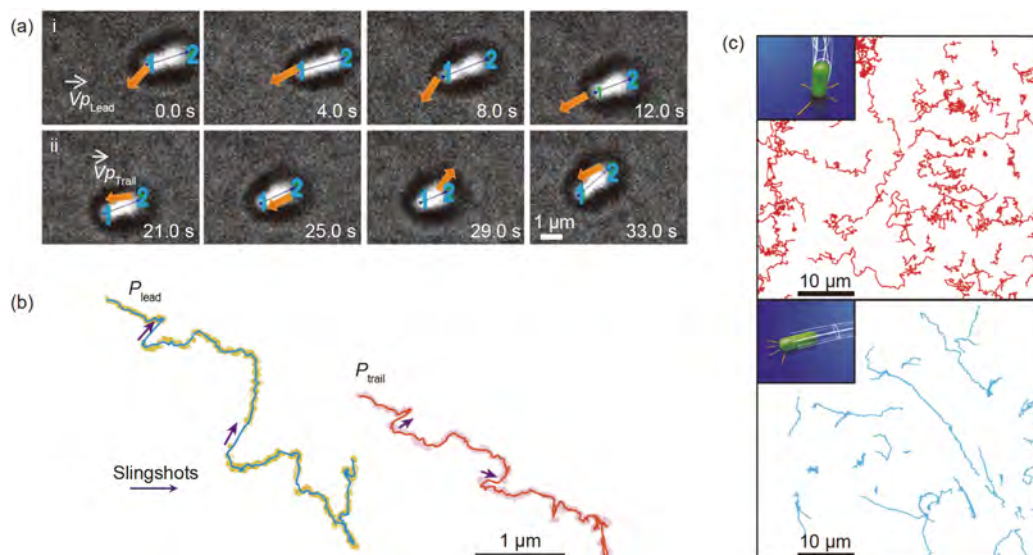


图 4 (网络版彩色)细菌蹭行运动的单细胞水平研究。(a) 基于细菌在表面爬行时的显微图像进行识别实现细菌运动的追踪分析。(i) 细菌头端的运动;(ii) 细菌末端的运动。标识的1点代表图像识别得到的头端,2点代表尾端^[25]。(b) 一组实例展示了经量化分析获得的细菌的头端和尾端的运动轨迹,箭头指示代表细菌发生了“slingshot”^[64]。(c) 铜绿假单胞菌的“直立”行走(上)和“匍匐”爬行的蹭行运动的轨迹,“直立”行走细菌的瞬时速度快(71 ± 2 nm/s),轨迹短而曲折;“匍匐”爬行运动瞬时速度慢(41 ± 2 nm/s),轨迹长而平滑^[24]

Figure 4 (Color online) Studies of bacterial twitching motility at the single cell level. (a) Time-lapse images of the *P. aeruginosa* moving on a glass surface. (i) and (ii) show motion of the two poles of lead (marked with 1) and trail (marked with 2), respectively, and the arrows indicate the velocity vectors corresponding to each pole^[25]. (b) Single cell two-points tracking of a representative trajectory from a crawling *P. aeruginosa* cell^[64]. (c) TFP-mediated vertical walking (top) and horizontal crawling (bottom) trajectories in *P. aeruginosa*. Walking bacteria exhibited a higher instantaneous velocity (mean 71 ± 2 nm/s (SEM) versus 41 ± 2 nm/s), but crawling bacteria moved further on long time scales. Crawling enabled directional motion; walking enabled rapid local exploration^[24]

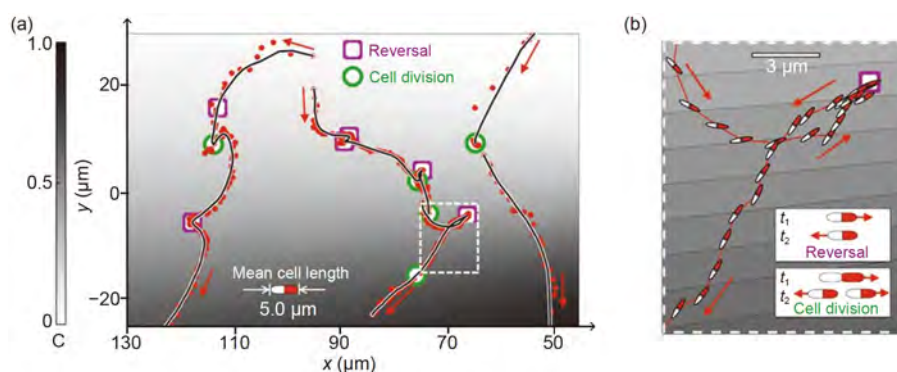


图 5 (网络版彩色)铜绿假单胞菌蹭行运动趋化行为的单细菌研究^[53]。(a) 细菌通过主动急速调转方向向浓度梯度高的方向运动(方块标识),圆圈表示细菌分裂时运动方向被迫发生改变的情况。灰度代表趋化物质的梯度,实心点为质心位置,连续曲线表示平滑后的运动轨迹。(b) 放大展示的细菌急速调转方向的过程视图

Figure 5 (Color online) Single-cell twitching chemotaxis of *P. aeruginosa*^[53]. (a) Twitching bacteria chemotax by reversing their motility when traveling away from the chemoattractant source. The dots show positions of cell centroids and the lines show smoothed trajectories. Cells navigate up chemoattractant gradients by actively performing reversals (open squares), although sharp changes in direction can also occur passively during cell division (open circles). (b) Magnified view of a reversal shows a cell whose movement begins to veer toward decreasing chemoattractant concentration. The cell quickly performs a reversal sending it back up the chemoattractant gradient

要和必要条件,是生物被膜发展的第一阶段^[5,70,71]。传统对细菌黏附行为的表征方法是:用一定浓度的细菌悬浮液浸泡表面器皿,取出后冲走未黏附的细菌,然后

统计表面残留的细菌数目来表征黏附能力;或者允许其生长一段时间,然后通过染色的方法来测量生物量,用生物量的大小来评价细菌黏附能力的强弱。这种方

法只能从宏观上进行粗略地定量,无法得到初始黏附的细节信息,而且所得到的残留数目或者生物量都是经过了人为加工后的参数:残留数目的获得需要额外引入外力冲洗,生物量是黏附细菌适应表面进行分裂生长的结果,这都不是原位的观察.想要深入地理解细菌的初始黏附行为是如何影响生物被膜发展的,需要从单细菌层面出发,对细菌的黏附行为进行原位地跟踪观察和细致地定量分析.

一般认为生物被膜发展初期,表面的胞外聚合物分泌较少,细菌处于黏附-脱落的平衡状态,也就是在表面-溶液间来回切换,属于可逆黏附,细菌个体之间并无表型差异.近期,结合高通量的显微镜技术和精细的细菌追踪算法,研究者们通过对细菌的黏附动力学进行分析发现,在均匀环境中生长的细菌群体,无论处于生长的对数期还是稳定期,都包含两种不同的黏附表型:快黏附表型和慢黏附表型.二者的黏附能力相差很大,分析数据显示黏附率相差20倍.由于高的黏附率,快黏附表型的细菌可以在短时间内(约15 min)黏附到表面,导致细菌的初始黏附主要由快黏附表型的细菌完成(图6(a)).进一步的细菌追踪分析发现,在生物被膜的发展过程中,初始黏附到表面细菌可以分化出慢黏附表型的细菌以脱落表面,为细菌提供了寻找更优环境的可能^[72].运用类似的研究方法还发现,在流场环境下,细菌在初始黏附表面后,大多数的细菌在表面的停留时间很短(远小于其分裂时间),导致生物被膜初期表面细菌数目并不增加,而等细菌感知并适应表面后,其子代开始牢固地黏附在表面上使表面细菌数目快速增长以促进生物被膜的发展^[73].

对于铜绿假单胞菌,细菌黏附到表面后开始分泌胞外多糖Psl,以帮助细菌更牢固地黏附促使在表面形成菌落聚集体,但对于表面细菌形成这些菌落聚集体的机制并不清晰.通过原位表征方法发现,在细菌生物被膜形成前中期,铜绿假单胞菌黏附在表面后开始蹭行运动,并在运动过程中将自身分泌的多糖Psl“打印”在表面上.这些表面残留的多糖印迹能够引导其他细菌通过主动运动的方式到访此区域,这些细菌的到访会使此区域积累更多的Psl,引导更多的细菌到访,如此形成一个正反馈系统促进细菌聚集形成微菌落.进一步的量化分析和计算机模拟也证实了微菌落是根据“富者愈富(rich get richer)”的行为模式自组织形成的(图6(b))^[30].更深入的研究发现,在生物被膜形成过程中,细菌出现了明显的分工现象.一部分细菌运动能力

弱,容易停留在表面发展为微菌落;另外一部分细菌运动能力强,去探索新的表面,甚至脱离表面.这揭示了细菌在生物被膜发展过程中的扩张机制^[74],与细菌在表面可以分化出不同黏附表型的研究不谋而合^[72].

此外,借助微流控技术,研究还发现,即使在剪切强度为2000 Pa的流场下(实际环境清洁或操作生物医学设备时,剪切强度在10~2700 Pa之间),仍有15%~25%的细菌可以耐受并持久性地黏附在表面上,这些具有耐强剪切表型细菌可以快速地在表面发育形成可以耐受高剂量氨基糖苷类抗生素的独特生物被膜.这种高剪切流场下细菌呈现出的独特黏附表型为制备防污生物医学材料提供了理论指导^[54].结合微流控技术与全内反射成像,研究者实现了对单个细菌黏附到表面时身体距离表面高度信息的精确成像.成像显示,细菌初始黏附到表面是采用身体中部的一个接触点“点躺”在表面上的,而身体的两个极端部位有相对于接触点200 nm的距离;伴随着细菌在表面上分裂,细菌的单个接触点也会逐渐地分离并最终分裂成两个,以分配给自己的两个子代^[40](图6(c)).同步地分析细菌离表面的距离与蹭行运动的速度发现,蹭行运动快的细菌,其离表面的距离相对较远,并且波动很大,而运动慢的细菌其距离则较近,并且波动小.此项研究建立了细菌黏附行为与生物被膜形成过程中细菌其他表面行为的联系,更重要的是,提供了全内反射成像结合微流控技术研究单细菌表面行为的范例.

这些对细菌黏附行为的单细菌原位研究更新了我们对生物被膜发展的认知,而这些基础知识的完善将有助于我们更好地理解生物被膜,并寻找其所带来问题的解决方案.

2.3 细菌其他行为的单细菌表征

细菌从浮游状态的自由个体到生物被膜的群体生活方式,经历了从溶液到表面,从低密度到高密度,从无组织状态到有组织状态的转变.自然环境中生物被膜的发展,细菌还需要寻找好的栖息环境,适应不同的营养环境,与其他细菌竞争或合作,对宿主的入侵和感染等.这其中不仅与上文提到的细菌的运动和黏附行为有关,还涉及细菌的公共物质的分配与使用策略、攻击与防御策略等.得益于高通量原位表征方法的建立与发展,研究者们可以在单细菌水平上进行相关研究,并取得了不小的进展.

生物被膜发展过程中细菌个体需要生产大量的公

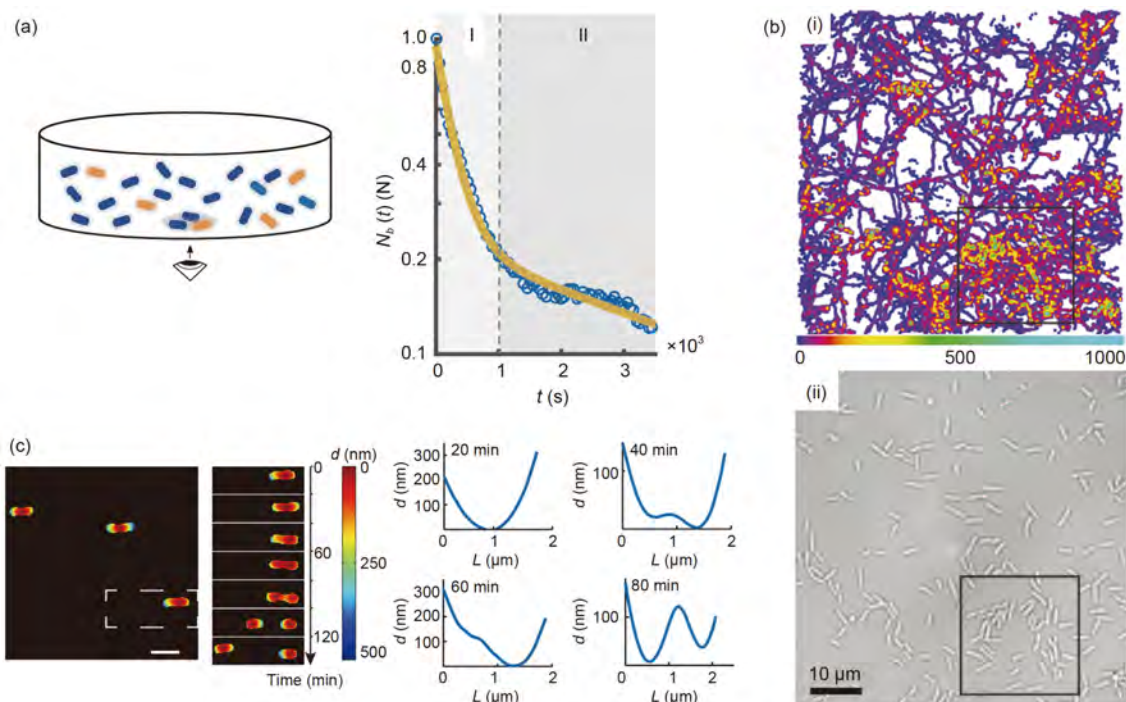


图 6 (网络版彩色)铜绿假单胞菌黏附行为的单细胞研究. (a) 通过实时观测并统计黏附到表面的细菌数目(左), 获得细菌的黏附动力学(右). 动力学曲线展示的两种快慢不同的黏附过程(I与II)代表了两种不同的细菌黏附表型, 二者黏附率相差超过20倍^[72]. (b) 细菌在表面生长时的到访频率分布(i)和细菌分布(ii). 细菌运动残留下的胞外多糖Psl引导其他细菌到访此区域, 使此区域积累更多的Psl, 进而吸引更多的细菌到访, 导致局部细菌到访频率增大(i, 方框区域), 如此形成的正反馈促使细菌形成微菌落(ii, 方框区域)^[30]. (c) 细菌黏附到表面后, 随着生长分裂, 距离表面高度的全内反射成像(左)和量化后不同时间点(20、40、60和80 min时)的细菌距离表面高度的定量数据(右)^[40]

Figure 6 (Color online) Studies of bacterial attaching behavior at the single cell level. (a) Attaching kinetic (right panel) was obtained by counting the attached cell numbers using a high throughput microscopy (left panel). Two distinct attaching phenotypes (I and II) coexist in the planktonic cells, whose attaching rates differ by 20 times^[72]. (b) Psl-dependent visit frequency map (i) and bright-field image (ii) of *P. aeruginosa* cells. Cell deposits a trail of Psl as it moves on a surface, which influences the surface motility of subsequent cells that encounter these trails and thus generates positive feedback^[30]. (c) Relative separation distance image of *P. aeruginosa* cells (left panel). Relative separation distance along the long axis of the cell shown in right panel at 20, 40, 60 and 80 min, respectively^[40]

共物质作为“基础设施”来供全体使用. 在铜绿假单胞菌中, PVDI(pyoverdine)被分泌到胞外作为一种公共物质用于螯合环境中的游离铁, 螯合后的化合物可以被周围所有的细菌摄取并使用^[75]. 这项合作的前提是所有的细菌都应该无私地分泌PVDI, 一旦有不生产PVDI的自私菌出现, 它们可以享受铁载体的好处而又不承担生产成本, 相对于生产PVDI的无私菌就具有选择优势, 最终导致合作无法持续. 细菌是用什么样的策略来应对这种情况呢? 精确的单细菌原位研究表明, 当细菌在外界环境张力较小时, 细菌倾向于分享PVDI, 此时无私菌会受到自私菌的入侵而被取代. 但是一旦外界环境变差, 如紫外线、抗生素、免疫反应等, 细菌会通过主动减少PVDI的外排将其私有化. 这些私有化的PVDI可以帮助细菌抵抗环境张力渡过难关, 自私菌因为没有PVDI的保护而被淘汰^[76]. 由于自然环境不可预知的

危险性, 这种“条件性私有化”的策略可以抵抗非生产性作弊者的入侵, 进而使得合作得以维持. 而在细菌密集生长的菌落里, 公共物质扩散受到限制时, PVDI倾向于留在生产者附近使其能够优先从自己的生产中受益, 从而平衡了非生产细菌的选择优势. 单细菌的原位表征方法同时揭示细菌之间通过接触的相互作用改变PVDI的扩散动力学, 以保证公共物质生产和使用的稳定^[29].

细菌生活在变化多端的环境中, 营养和空间等资源经常受到限制, 因此, 发展了许多生存策略, 例如上述PVDI公共物质的生产使用策略, 既保障了成员的共同利益, 又保障了生产者的个体利益. 但是, 细菌除了应对营养和环境压力外, 它们还处于包含了许多不同菌种的结构化群体中, 其他细菌精心设计的拮抗因子也是细菌必须应对的常见威胁, 包括专门生产针对竟

竞争对手的可扩散因子,如抗生素,接触依赖的拮抗系统(contact-dependent inhibition, CDI)和六型分泌系统(Type VI secretion system, T6SS)^[77-79]. 在这种类型的生长环境中,细菌需要跟其他菌种进行共处,也需要在自身或者同伴受到其他菌种攻击时可以感知,并通过采取防御措施进行应对以提高其生存能力. 高分辨率的荧光显微镜原位追踪观察铜绿假单胞菌和霍乱弧菌的混合培养时的T6SS决斗行为,揭示了细菌“以牙还牙”的攻击策略:铜绿假单胞菌只有在受到霍乱弧菌T6SS系统攻击时,才会发动自己的T6SS系统进行回击;而在对方没有攻击时,铜绿假单胞菌不会主动请战. 这种“敌不犯我,我不犯人;敌若犯我,我必犯人”的御敌策略控制了不同物种之间的社会互动更倾向于合作共处^[80]. 另一方面,当周围的近亲铜绿假单胞菌被攻击时,这些同伴会在死亡时释放出危险信号,这种信号可以触发存活的细菌开启多种拮抗因子的合成途径,做好防御并开始攻击^[81]. 当群体受到有害物质不可避免地损伤DNA时,铜绿假单胞菌可以通过程序性死亡(programmed cell death, PCD)的机制牺牲一小部分细菌以使整个群体受益^[82]. 无论是“以牙还牙”、“危险感知”,还是“牺牲小我”,这些生存策略都是经过演化被自然选择得以保留,最终目的是维持种族的生存和延续. 随着更多持续深入研究的开展,更多细菌生存策略或机制的面纱将会被揭开.

尽管我们对生物被膜已经认识很久,并已知道生物被膜的整体和内部结构是由群落中单个细菌的运动、生长、生理分化、胞外物质的分泌与异质性的微环境相互作用的结果. 但我们对生物被膜3D结构的认知还局限在大量连接起来的生物质. 近期,一项开拓性的研

究工作让我们对单个细胞发展为生物被膜的宏观生长和群体组织规律得以窥见一斑. Bassler课题组^[33,83]通过使用自主改进后的转盘共聚焦显微镜,可以在低剂量的光强下以高精度的Z轴分辨率进行3D成像. 并将此显微镜技术与开发的复杂而又精细的图像分析程序结合使用,成功地可视化和分割了霍乱弧菌生物被膜中数以千计单个细菌(图7(a)),重现了生物被膜在不同发展阶段细菌的精确3D排列、形状、大小、密度和生物被膜的整体形态特征(图7(b)),并表征了其形成3D结构的组织和演化规律. 这项单细胞分辨率的生物被膜光学成像技术为生物被膜的研究提供了新的窗口,这对于理解生物被膜发展的潜在机制具有不可估量的价值.

当然,在单细胞水平上细菌表型的表征不只限于上述论述,其相关的研究还在不断地扩展和深入,并将不断地促进相关领域研究的推进. 例如,黄术强课题组^[51]结合“mother machine”微流控技术与显微成像技术,可以在单细菌水平上获得不同抗生素浓度下大肠杆菌尺寸的变化速率,此平台的建立实现了从统计学角度快速检测细菌的耐药性,可以将商业化临床药敏检测的16~36 h缩短为0.5~2 h. 赵坤课题组^[84]运用单细菌表征技术获得了黄原黏球菌(*Myxococcus xanthus*)捕食大肠杆菌的动态过程. 这为我们理解微生物生态系统中细菌捕食在细菌生存和选择中的作用具有指导意义. 不止于此,更多的研究还在进行中,以促进我们对不同细菌行为的全面理解,而类似的技术平台或方法也在不断开发,以适用微生物的更复杂、更精细的研究.

3 细菌表型的控制

生物体的表型(phenotype)是与其基因型(genotype)

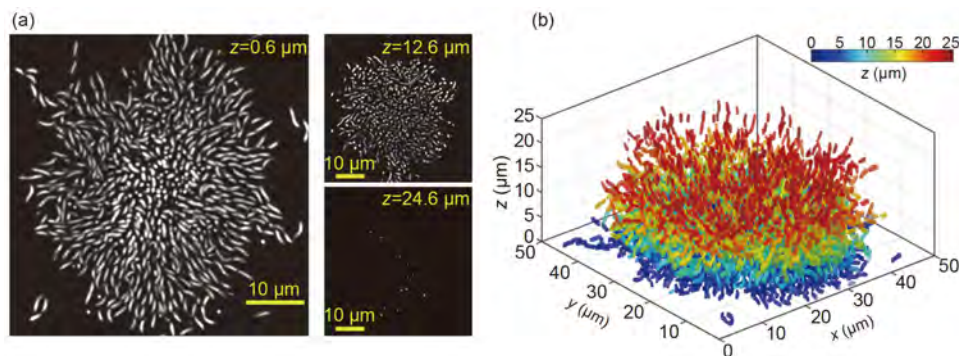


图7 (网络版彩色)生物被膜结构的单细菌分析^[83]. (a) 霍乱弧菌生物被膜不同高度的单细菌截面图; (b) 精细算法实现3D生物被膜内部单个细菌的自动识别与分割

Figure 7 (Color online) Architecture of biofilms was revealed at single-cell resolution^[83]. (a) Planar cross-sections through the biofilm at different heights. (b) All individual cells from biofilms were automatically segmented into separate 3D objects

紧密联系在一起,细菌也不例外。传统对细菌表型的控制依赖于遗传学手段。遗传学手段利用分子生物学技术通过对基因的操控改变细菌的基因型,以达到对细菌表型的控制。例如,要控制细菌达到不能蹭行的表型,通过基因敲除技术敲除编译四型菌毛的核心基因 *pilA* 使其缺失,蹭行运动就无法实现;同样地,要实现细菌胞外多糖Psl的过量表达,可以通过将控制Psl表达的操纵子的启动子替换为强度更高的持续性启动子。表型的控制依赖于与其相关基因的表达,也就是决定于基因型,基因敲除导致的基因表达沉默或者强启动子替换导致的基因过表达代表了两种极端。为了建立基因型与表型的定量关系,研究者们通常会选用诱导性启动子来启动控制某个表型的基因或基因簇的表达。引入诱导性启动子系统使得细胞体内的基因转录能够人为控制,进而达到人为控制相应表型的目的。在诱导性启动子系统中,启动子的活性可以通过调节诱导剂的浓度进行改变,进而达到在一定范围内对基因(或基因簇)转录的动态调控。

在细菌中常见的诱导性启动子系统有乳糖、阿拉伯糖、四环素等小分子诱导的转录调节系统,这些系统中对应的启动子强度依赖于化学小分子的浓度。虽然这些系统已经被广泛使用,但其无法满足对特定(或局部)空间细菌的转录调节。在使用中,化学小分子需要加入到细菌的生长环境中,这就引入了额外的不确定因素。这些小分子在某些实验环境下可能会对细菌的代谢或生长有潜在或无法预估的影响;另外由于小分子的扩散特性,其很难在不影响整个实验系统的前提下进行去除(缓慢失活),想要通过诱导至不诱导的转化实现表型转变很难在短时间内完成。但是,如果用光信号代替化学小分子,就可以克服上述缺点。光是一种理想的诱导剂,没有入侵性,低毒性,重要的是还有化学小分子无法实现的空间分辨率。因此,利用光遗传学技术来控制细菌的表型具有大的潜力和前景。

3.1 细菌光遗传学技术的发展

光遗传学最初是指结合光学和遗传学手段,精确控制特定神经元活动的技术^[85,86]。主要原理是首先采用基因操作技术(转染、病毒转导等)将光感基因的遗传信息传递给神经系统中特定类型的细胞中进行表达;接着通过从时间和空间上控制光的特定性,实现对细胞的精确控制。

光遗传学技术具有微创、精准和时空分辨率的操

纵特点。这些无可比拟的优点使得光遗传学技术在对细菌表型和行为的操控上实现了时间和空间的双精度,进而大放异彩。目前已经实现了从单色到三色操控的应用:早在2005年,在红光转录调控系统开发之时,Levkaya等人^[87]利用显色基因首次实现了细菌菌落的单色光响应成像(图8(a))。随着其他光调节系统的开发,2014年,Olson等人^[88]将红色和绿色光控系统同时导入大肠杆菌中,实现了红、绿光响应系统的正交调控,并利用光信号对基因回路的动力学进行了详细表征与研究;2017年,Fernandez-Rodriguez等人^[89]将红、绿、蓝3种光控系统同时引入到大肠杆菌内,实现了细菌菌落的三色成像(图8(b))。除上述红、绿、蓝光外,光遗传学技术在微生物领域已经发展出了紫外、近红外的光调控系统,并且还在继续扩展^[90-95]。同时,研究者们也在不断开发或优化更优性能的光控系统,如最早适用于微生物的蓝光光控系统(YF1/FixJ)属于双组分系统^[93]。近期,杨弋团队^[96]开发了单组分的蓝光响应调控系统(eLight-On),相比双组分系统,单组分系统更简单,基因调节延迟也会更低,进而可以获得快速的响应动力学。

3.2 光遗传学技术对细菌表型的控制及其应用

光遗传学技术的发展使得研究者们可以通过光信号控制特定的遗传信息在细菌群体中具有时空分辨率的表达,定量工程生物学可以对光信号刺激而发出的生理信号的读出值进行量化分析,二者结合可实现对细菌行为的精确控制。

Miliars-Argeitis等人^[97]将绿光调控系统引入细菌内进行绿光控制荧光蛋白的表达。首先,建立了辐照光强和荧光强度的定量关系,然后搭建实时监测和控制平台,将荧光强度输出给控制平台进行光强控制,如此的反馈平台可实现了光强对荧光蛋白表达的动态控制;将荧光蛋白替换为影响生长的蛋氨酸合成酶,经过优化与定量分析,进一步实现了光信号对细菌生长的控制。类似地,利用光调控系统控制不同功能蛋白的表达,可实现对细菌生产代谢、黏附行为等的光遗传学控制。通过对细菌行为的控制,研究者可以进一步对细菌生物被膜进行控制。例如,Pu等人^[98]引入蓝光双组分转录调节系统控制铜绿假单胞菌的自身功能蛋白PA2133进行时空诱导表达,通过对细菌黏附行为的控制实现了对生物被膜生长的图案化控制。利用光遗传学技术对细菌黏附行为的时空控制还可用于微米精度的生物被膜印刷或活细胞打印(图8(c))^[99,100]。

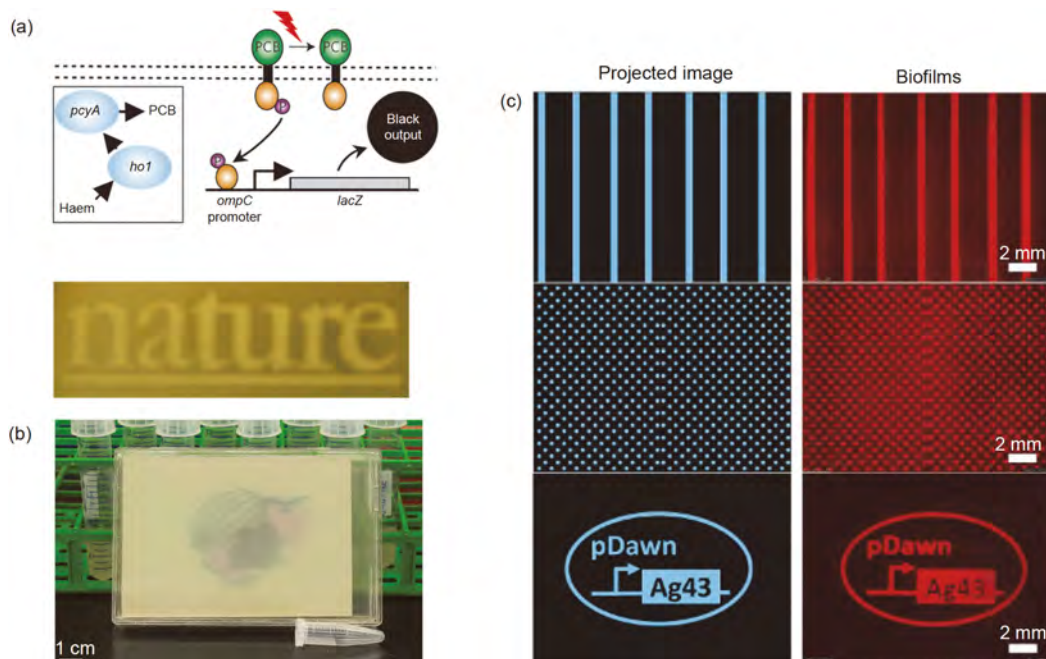


图8 (网络版彩色)光遗传学控制细菌表型。(a) 红光转录调控系统用于细菌的单色成像^[87]。(b) 红绿蓝三色光遗传学系统实现细菌的三色成像^[89]。(c) 利用光遗传学系统控制黏附蛋白的时空表达实现细菌的图案化黏附以用于生物被膜印刷^[100]

Figure 8 (Color online) Optogenetics manipulation of bacterial behaviors. (a) Light imaging by engineered bacterial cells^[87]. (b) RGB patterns of pigment are obtained via projecting colored images onto plates of bacterial containing the RGB optogenetic system^[89]. (c) Optogenetic control of adhesin expression enables high-resolution cell patterning for biofilm lithography^[100]

利用光遗传学技术控制细菌行为的另外一个思路是设计构建新的光感受体。例如,在参与铜绿假单胞菌感染、致病的基因调节回路中,Gac/Rsm系统是具有全局调控能力的核心基因回路,包括HCN毒性、慢性感染相关的定殖和致死相关的毒力因子等。由于Gac/Rsm系统下游众多的分支基因调控回路,引入光调控系统控制某个基因的表达无法完成对整个致病系统的控制。我们可在调控回路的上游,选择某个核心调控蛋白与光敏蛋白进行融合,构建新的光感受体,既可以响应光信号,又具有下游的调控能力,进而实现光信号对整个致病基因回路的控制。通过光信号改变其感染模式的转变可实现光遗传学对细菌定殖能力、感染能力的控制。利用这种针对不同研究目开发新的光效应蛋白的思路,虽然具有高挑战性,但光信号可以直接控制蛋白的功能性,避免了基因表达的时间延迟,所以时间精度更高。目前已经开发出具有酶活性的光感受器,可以参与调节细菌体内信号分子浓度,如参与分解和合成第二信使环鸟苷二磷酸(c-di-GMP)的光感受体BlrP1^[101]和BphS^[102],以及参与合成环腺苷酸(cAMP)的光感受体bPAC^[103]。

受益于光遗传学技术的空间精准度,应用于医学领域可以促进精准医疗和临床转化研究。值得一提的是,2017年,华东师范大学叶海峰团队^[104]开发出远红光调控转基因表达控制系统,实现了光信号控制糖尿病患者血糖的目的;2018年,他们将远红光调控转基因表达控制系统与CRISPR-dCas9基因编辑两大技术相结合,开发出远红光调控的CRISPR-dCas9内源基因转录激活装置(FACE),首次在细胞水平和动物体内实现了利用远红光操控基因组内源基因的表达^[105]。虽然他们的研究依赖于定制的光控哺乳细胞,而非细菌,但原理相似。这些研究为基于光遗传学技术的医学应用奠定了研究基础,也将激发科学家们去开发基于光控细菌的医疗应用。

此外,在光遗传学技术对细菌行为操纵的空间精度方面,虽然众多的实验技术已经达到了微米级的空间分辨率,但多数研究还是在细菌菌落的水平上进行的。目前,研究者已经开始着手建立可在单细菌水平上对细菌光遗传学控制的平台和技术^[74],尽管还未建立系统的方法,但未来可期。我们期待可实现对单个运动细菌的实时追踪光遗传学控制,以进一步挖掘光遗传

学技术的潜力和开拓其应用领域。

4 总结与展望

利用高通量的原位表征方法可以实现对细菌表型、行为的单细胞表征,而光遗传学技术可以实现对细菌表型的时空控制,二者均为生物被膜研究提供了良好的技术平台。在关乎全人类健康的抗生物被膜问题上,在应用研究方面,科学家们致力发展具有杀菌、溶菌或抑菌功能的表面材料。按照这类思路研制的表面材料只能暂时延缓生物被膜的形成,但在中长期(以周或月为单位)使用后的效果均不理想。因为细菌具有不同的适应和调节机制以在不同环境条件下形成生物被膜,而生物被膜的形成又可以改变初始表面性质。这些都充分体现了抗菌或抗生物被膜问题的复杂性和困难性。本研究组一直致力于寻找抵抗生物被膜的“柔

性”策略,当我们发现铜绿假单胞菌存在快慢两种黏附表型,并且与急慢性感染系统有密切关系时,就思考着一种可能性,是否可以改变细菌的某些表型,使其不易黏附或者主动脱离表面,以阻碍生物被膜的形成。我们不以杀死细菌为目的,通过干扰细菌的行为使其形成的生物被膜处于可控制的水平或者使其感染能力降低到免疫系统可控制的水平。虽然这些想法还需要更多的理论和实验支持,最终很有可能被证明是无法实现的,但不管怎样,面对抗生物被膜这个巨大的挑战,我们需要新的策略和思路来应对,而这种突破性的思路必将来源于对细菌生物被膜形成机制的深刻认知。因此,我们希望借助高通量原位表征方法和光遗传学方法创造的技术平台,加快基础科学发现,以对生物被膜的研究有所突破,然后完善知识体系并从中寻找灵感,探寻抗生物被膜的新策略,并最终转化为应用技术。

参考文献

- 1 Flemming H C, Wingender J, Szewzyk U, et al. Biofilms: An emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol*, 2016, 14: 563–575
- 2 Flemming H C, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol*, 2010, 8: 623–633
- 3 O'Toole G, Kaplan H B, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol*, 2000, 54: 49–79
- 4 Stewart P S, Franklin M J. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Microbiol*, 2008, 6: 199–210
- 5 Stoodley P, Sauer K, Davies D G, et al. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol*, 2002, 56: 187–209
- 6 Costerton J W, Stewart P S, Greenberg E P. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science*, 1999, 284: 1318–1322
- 7 Drenkard E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes Infect*, 2003, 5: 1213–1219
- 8 Parsek M R, Singh P K. Bacterial biofilms: An emerging link to disease pathogenesis. *Annu Rev Microbiol*, 2003, 57: 677–701
- 9 Wolcott R D, Ehrlich G D. Biofilms and chronic infections. *JAMA-J Am Med Assoc*, 2008, 299: 2682–2684
- 10 Wagner V E, Iglewski B H. *P. aeruginosa* biofilms in cf infection. *Clinic Rev Allergy Immunol*, 2008, 35: 124–134
- 11 Weinstein R A, Gaynes R, Edwards J R. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. *Clin Infect Dis*, 2005, 41: 848–854
- 12 Govan J R, Deretic V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev*, 1996, 60: 539–574
- 13 Schaber J A, Triffo W J, Suh S J, et al. *Pseudomonas aeruginosa* forms biofilms in acute infection independent of cell-to-cell signaling. *Infect Immun*, 2007, 75: 3715–3721
- 14 Shrout J D, Chopp D L, Just C L, et al. The impact of quorum sensing and swarming motility on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation is nutritionally conditional. *Mol Microbiol*, 2006, 62: 1264–1277
- 15 Cao B, Wang H, Sun H, et al. Risk factors and clinical outcomes of nosocomial multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J Hosp Infect*, 2004, 57: 112–118
- 16 Mason T G, Weitz D A. Optical measurements of frequency-dependent linear viscoelastic moduli of complex fluids. *Phys Rev Lett*, 1995, 74: 1250–1253
- 17 Crocker J C, Grier D G. Methods of digital video microscopy for colloidal studies. *J Colloid Interface Sci*, 1996, 179: 298–310
- 18 Mason T G, Ganesan K, van Zanten J H, et al. Particle tracking microrheology of complex fluids. *Phys Rev Lett*, 1997, 79: 3282–3285
- 19 Gao P, Xing X C, Li Y, et al. Charging and discharging of single colloidal particles at oil/water interfaces. *Sci Rep*, 2014, 4: 4778
- 20 Gao P, Yi Z, Xing X, et al. Influence of an additive-free particle spreading method on interactions between charged colloidal particles at an oil/water interface. *Langmuir*, 2016, 32: 4909–4916
- 21 Zhao K, Mason T G. Frustrated rotator crystals and glasses of brownian pentagons. *Phys Rev Lett*, 2009, 103: 208302
- 22 Zhao K, Bruinsma R, Mason T G. Entropic crystal-crystal transitions of Brownian squares. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 2684–2687
- 23 Zhao K, Bruinsma R, Mason T G. Local chiral symmetry breaking in triatic liquid crystals. *Nat Commun*, 2012, 3: 801
- 24 Gibiansky M L, Conrad J C, Jin F, et al. Bacteria use type IV pili to walk upright and detach from surfaces. *Science*, 2010, 330: 197

- 25 Jin F, Conrad J C, Gibiansky M L, et al. Bacteria use type-IV pili to slingshot on surfaces. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 12617–12622
- 26 Sun M, Wartel M, Cascales E, et al. Motor-driven intracellular transport powers bacterial gliding motility. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 7559–7564
- 27 Seminara A, Angelini T E, Wilking J N, et al. Osmotic spreading of *Bacillus subtilis* biofilms driven by an extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 1116–1121
- 28 Gloag E S, Turnbull L, Huang A, et al. Self-organization of bacterial biofilms is facilitated by extracellular DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 11541–11546
- 29 Julou T, Mora T, Guillon L, et al. Cell-cell contacts confine public goods diffusion inside *Pseudomonas aeruginosa* clonal microcolonies. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 12577–12582
- 30 Zhao K, Tseng B S, Beckerman B, et al. Psl trails guide exploration and microcolony formation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature*, 2013, 497: 388–391
- 31 Utada A S, Bennett R R, Fong J C N, et al. *Vibrio cholerae* use pili and flagella synergistically to effect motility switching and conditional surface attachment. *Nat Commun*, 2014, 5: 4913
- 32 Ni L, Yang S, Zhang R, et al. Bacteria differently deploy type-IV pili on surfaces to adapt to nutrient availability. *npj Biofilms Microbiomes*, 2016, 2: 15029
- 33 Yan J, Sharo A G, Stone H A, et al. *Vibrio cholerae* biofilm growth program and architecture revealed by single-cell live imaging. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: E5337–E5343
- 34 Collins T J. ImageJ for microscopy. *BioTechniques*, 2007, 43: S25–S30
- 35 Rueden C T, Eliceiri K W. Visualization approaches for multidimensional biological image data. *BioTechniques*, 2007, 43: S31–S36
- 36 Schneider C A, Rasband W S, Eliceiri K W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*, 2012, 9: 671–675
- 37 White J G, Amos W B, Fordham M. An evaluation of confocal versus conventional imaging of biological structures by fluorescence light microscopy. *J Cell Biol*, 1987, 105: 41–48
- 38 Amos W B, White J G. How the confocal laser scanning microscope entered biological research. *Biol Cell*, 2003, 95: 335–342
- 39 Denk W, Strickler J H, Webb W W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, 1990, 248: 73–76
- 40 Xia A, Yang S, Zhang R, et al. Imaging the separation distance between the attached bacterial cells and the surface with a total internal reflection dark-field microscope. *Langmuir*, 2019, 35: 8860–8866
- 41 Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, et al. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science*, 2006, 313: 1642–1645
- 42 Rust M J, Bates M, Zhuang X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (storm). *Nat Methods*, 2006, 3: 793–796
- 43 Berk V, Fong J C N, Dempsey G T, et al. Molecular architecture and assembly principles of *Vibrio cholerae* biofilms. *Science*, 2012, 337: 236–239
- 44 Nielsen M W, Sternberg C, Molin S, et al. *Pseudomonas aeruginosa* and *Saccharomyces cerevisiae* biofilm in flow cells. *J Vis Exp*, 2011, 47: e2383
- 45 Heydorn A, Ersbøll B K, Hentzer M, et al. Experimental reproducibility in flow-chamber biofilms. *Microbiology*, 2000, 146: 2409–2415
- 46 Cai L, Friedman N, Xie X S. Stochastic protein expression in individual cells at the single molecule level. *Nature*, 2006, 440: 358–362
- 47 Wang P, Robert L, Pelletier J, et al. Robust growth of *Escherichia coli*. *Curr Biol*, 2010, 20: 1099–1103
- 48 Long Z, Nugent E, Javer A, et al. Microfluidic chemostat for measuring single cell dynamics in bacteria. *Lab Chip*, 2013, 13: 947–954
- 49 Taheri-Araghi S, Bradde S, Sauls J T, et al. Cell-size control and homeostasis in bacteria. *Curr Biol*, 2015, 25: 385–391
- 50 Tanouchi Y, Pai A, Park H, et al. A noisy linear map underlies oscillations in cell size and gene expression in bacteria. *Nature*, 2015, 523: 357–360
- 51 Bai Y, Gao M, Wen L, et al. Applications of microfluidics in quantitative biology. *Biotechnol J*, 2018, 13: e1700170
- 52 Moffitt J R, Lee J B, Cluzel P. The single-cell chemostat: An agarose-based, microfluidic device for high-throughput, single-cell studies of bacteria and bacterial communities. *Lab Chip*, 2012, 12: 1487–1494
- 53 Oliveira N M, Foster K R, Durham W M. Single-cell twitching chemotaxis in developing biofilms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: 6532–6537
- 54 Zhang R, Xia A, Ni L, et al. Strong shear flow persisters resist mechanical washings on the surfaces of various polymer materials. *Adv Biosys*, 2017, 1: 1700161
- 55 Razinkov I A, Baumgartner B L, Bennett M R, et al. Measuring competitive fitness in dynamic environments. *J Phys Chem B*, 2013, 117: 13175–13181
- 56 Potvin-Trottier L, Luro S, Paulsson J. Microfluidics and single-cell microscopy to study stochastic processes in bacteria. *Curr Opin Microbiol*, 2018, 43: 186–192

- 57 Delincé M J, Bureau J B, López-Jiménez A T, et al. A microfluidic cell-trapping device for single-cell tracking of host-microbe interactions. *Lab Chip*, 2016, 16: 3276–3285
- 58 Kara V, Duan C, Gupta K, et al. Microfluidic detection of movements of *Escherichia coli* for rapid antibiotic susceptibility testing. *Lab Chip*, 2018, 18: 743–753
- 59 Mattick J S. Type iv pili and twitching motility. *Annu Rev Microbiol*, 2002, 56: 289–314
- 60 Bradley D E. A function of *Pseudomonas aeruginosa* PAO polar pili: Twitching motility. *Can J Microbiol*, 1980, 26: 146–154
- 61 Skerker J M, Berg H C. Direct observation of extension and retraction of type iv pili. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 6901–6904
- 62 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: 1511–1524
- 63 O’Toole G A, Kolter R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol*, 1998, 30: 295–304
- 64 Conrad J C, Gibiansky M L, Jin F, et al. Flagella and pili-mediated near-surface single-cell motility mechanisms in *P. aeruginosa*. *Biophys J*, 2011, 100: 1608–1616
- 65 Zhang R, Ni L, Jin Z, et al. Bacteria slingshot more on soft surfaces. *Nat Commun*, 2014, 5: 5541
- 66 Kearns D B, Robinson J, Shimkets L J. *Pseudomonas aeruginosa* exhibits directed twitching motility up phosphatidylethanolamine gradients. *J Bacteriol*, 2001, 183: 763–767
- 67 Miller R M, Tomaras A P, Barker A P, et al. *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility-mediated chemotaxis towards phospholipids and fatty acids: Specificity and metabolic requirements. *J Bacteriol*, 2008, 190: 4038–4049
- 68 Zuo W, Wu Y. Dynamic motility selection drives population segregation in a bacterial swarm. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117: 4693–4700
- 69 Zhang R, Turner L, Berg H C. The upper surface of an *Escherichia coli* swarm is stationary. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 288–290
- 70 Berne C, Ellison C K, Ducret A, et al. Bacterial adhesion at the single-cell level. *Nat Rev Microbiol*, 2018, 16: 616–627
- 71 Ma L, Jackson K D, Landry R M, et al. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* conditional psl variants reveals roles for the psl polysaccharide in adhesion and maintaining biofilm structure postattachment. *J Bacteriol*, 2006, 188: 8213–8221
- 72 Yang S, Cheng X, Jin Z, et al. Differential production of psl in planktonic cells leads to two distinctive attachment phenotypes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol*, 2018, 84: e00700
- 73 Lee C K, de Anda J, Baker A E, et al. Multigenerational memory and adaptive adhesion in early bacterial biofilm communities. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115: 4471–4476
- 74 Armbruster C R, Lee C K, Parker-Gilham J, et al. Heterogeneity in surface sensing suggests a division of labor in *Pseudomonas aeruginosa* populations. *eLife*, 2019, 8: e45084
- 75 Banin E, Vasil M L, Greenberg E P. Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 11076–11081
- 76 Jin Z, Li J, Ni L, et al. Conditional privatization of a public siderophore enables *Pseudomonas aeruginosa* to resist cheater invasion. *Nat Commun*, 2018, 9: 1383
- 77 Basler M, Mekalanos J J. Type 6 secretion dynamics within and between bacterial cells. *Science*, 2012, 337: 815
- 78 Andersson D I, Hughes D. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nat Rev Microbiol*, 2014, 12: 465–478
- 79 Hayes C S, Aoki S K, Low D A. Bacterial contact-dependent delivery systems. *Annu Rev Genet*, 2010, 44: 71–90
- 80 Basler M, Ho B T, Mekalanos J J. Tit-for-tat: Type VI secretion system counterattack during bacterial cell-cell interactions. *Cell*, 2013, 152: 884–894
- 81 LeRoux M, Kirkpatrick R L, Montauti E I, et al. Kin cell lysis is a danger signal that activates antibacterial pathways of *Pseudomonas aeruginosa*. *eLife*, 2015, 4: e05701
- 82 McFarland K A, Dolben E L, LeRoux M, et al. A self-lysis pathway that enhances the virulence of a pathogenic bacterium. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 8433–8438
- 83 Drescher K, Dunkel J, Nadell C D, et al. Architectural transitions in *Vibrio cholerae* biofilms at single-cell resolution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: E2066–E2072
- 84 Zhang W, Wang Y, Lu H, et al. Dynamics of solitary predation by *Myxococcus xanthus* on *Escherichia coli* observed at the single-cell level. *Appl Environ Microbiol*, 2020, 86: e02286-19
- 85 Boyden E S, Zhang F, Bamberg E, et al. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci*, 2005, 8: 1263–1268
- 86 Deisseroth K, Feng G, Majewska A K, et al. Next-generation optical technologies for illuminating genetically targeted brain circuits. *J Neurosci*, 2006, 26: 10380–10386
- 87 Levskaya A, Chevalier A A, Tabor J J, et al. Engineering *Escherichia coli* to see light. *Nature*, 2005, 438: 441–442
- 88 Olson E J, Hartsough L A, Landry B P, et al. Characterizing bacterial gene circuit dynamics with optically programmed gene expression signals.

- [Nat Methods](#), 2014, 11: 449–455
- 89 Fernandez-Rodriguez J, Moser F, Song M, et al. Engineering rgb color vision into *Escherichia coli*. [Nat Chem Biol](#), 2017, 13: 706–708
- 90 Ong N T, Olson E J, Tabor J J. Engineering an *E. coli* near-infrared light sensor. [ACS Synth Biol](#), 2018, 7: 240–248
- 91 Ramakrishnan P, Tabor J J. Repurposing *synechocystis* PCC6803 UirS-UirR as a UV-violet/green photoreversible transcriptional regulatory tool in *E. coli*. [ACS Synth Biol](#), 2016, 5: 733–740
- 92 Schmidl S R, Sheth R U, Wu A, et al. Refactoring and optimization of light-switchable *Escherichia coli* two-component systems. [ACS Synth Biol](#), 2014, 3: 820–831
- 93 Ohlendorf R, Vidavski R R, Eldar A, et al. From dusk till dawn: One-plasmid systems for light-regulated gene expression. [J Mol Biol](#), 2012, 416: 534–542
- 94 Jayaraman P, Devarajan K, Chua T K, et al. Blue light-mediated transcriptional activation and repression of gene expression in bacteria. [Nucleic Acids Res](#), 2016, 44: 6994–7005
- 95 Hirose Y, Shimada T, Narikawa R, et al. *Cyanobacteriochrome* CcaS is the green light receptor that induces the expression of phycobilisome linker protein. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2008, 105: 9528–9533
- 96 Li X, Zhang C, Xu X, et al. A single-component light sensor system allows highly tunable and direct activation of gene expression in bacterial cells. [Nucleic Acids Res](#), 2020, 48: e33
- 97 Miliadis-Argeitis A, Rullan M, Aoki S K, et al. Automated optogenetic feedback control for precise and robust regulation of gene expression and cell growth. [Nat Commun](#), 2016, 7: 12546
- 98 Pu L, Yang S, Xia A, et al. Optogenetics manipulation enables prevention of biofilm formation of engineered *Pseudomonas aeruginosa* on surfaces. [ACS Synth Biol](#), 2018, 7: 200–208
- 99 Huang Y, Xia A, Yang G, et al. Bioprinting living biofilms through optogenetic manipulation. [ACS Synth Biol](#), 2018, 7: 1195–1200
- 100 Jin X, Riedel-Kruse I H. Biofilm lithography enables high-resolution cell patterning via optogenetic adhesin expression. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2018, 115: 3698–3703
- 101 Barends T R M, Hartmann E, Griese J J, et al. Structure and mechanism of a bacterial light-regulated cyclic nucleotide phosphodiesterase. [Nature](#), 2009, 459: 1015–1018
- 102 Ryu M H, Gomelsky M. Near-infrared light responsive synthetic c-di-GMP module for optogenetic applications. [ACS Synth Biol](#), 2014, 3: 802–810
- 103 Stierl M, Stumpf P, Udvari D, et al. Light modulation of cellular cAMP by a small bacterial photoactivated adenylyl Cyclase, bPAC, of the soil bacterium *Beggiatoa*. [J Biol Chem](#), 2011, 286: 1181–1188
- 104 Shao J, Xue S, Yu G, et al. Smartphone-controlled optogenetically engineered cells enable semiautomatic glucose homeostasis in diabetic mice. [Sci Transl Med](#), 2017, 9: eaal2298
- 105 Shao J, Wang M, Yu G, et al. Synthetic far-red light-mediated CRISPR-dCas9 device for inducing functional neuronal differentiation. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2018, 115: E6722–E6730

Summary for “单细菌表型的高通量表征和控制”

Characterization and control of bacterial phenotypes at the single cell level

Shuai Yang & Fan Jin*

CAS Key Laboratory of Quantitative Engineering Biology, Shenzhen Institute of Synthetic Biology, Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences (CAS), Shenzhen 518055, China

* Corresponding author, E-mail: fan.jin@siat.ac.cn

Microbial biofilms comprise surface-associated, multicellular, highly structured matrix-enclosed, morphologically complex microbial communities. The subject of biofilms has received much attention, in part owing to scientific communities' acknowledgements that biofilm formation of pathogen can cause many acute or chronic diseases that usually cannot be treated by antibiotic therapies, such as *Pseudomonas aeruginosa*, one of the highly prevalent opportunistic human pathogens, that is the leading cause of morbidity and mortality in immunocompromised patients and in patients suffering from cystic fibrosis (CF). We have learned that biofilm-forming bacteria are phenotypically distinct from those of planktonically grown cells, because they express genes in a pattern differs profoundly from that of their free-swimming, planktonic counterparts. Therefore, understanding the roles played by bacterial behaviors and phenotypes in the development of biofilms is an emerging link to disease pathogenesis.

In the first half of this review, we present how to develop characteristic approaches by using high-throughput microscopical techniques together with automatic image-processing methods and customized microfluidic system to in situ visualize bacterial cells and investigate their behaviors at the single cell scale. We mainly focused on the pathogen of *P. aeruginosa* and provided an overview of recent related progress using those approaches in characterization of bacterial phenotypes at the single cell level in the process of biofilm formation, especially in areas of bacterial twitching motility, attachment phenotypes, social behaviors and architecture of biofilms. For instance, by monitoring single-cell motility behaviors, researchers observed single-cell twitching chemotaxis in developing biofilms and revealed that cells can modulate twitching motility behaviors to survive or thrive in slowly changing and locally heterogeneous natural environments.

We then referred to optogenetics, which is a technology that allows targeted, fast control of precisely defined events in biological systems by expressing exogenous genes coding for light-sensitive proteins. In optogenetics, light as inducer can be applied more precisely in the concentration, time and space dimensions than traditional effectors such as chemical molecules. In the field of microbiology, different light responsive sensors, such as UV, blue, green, red and far-red transcriptional regulation systems, have been engineered, and application of these optogenetic systems enables little perturbations and unprecedented spatiotemporal resolution in controlling bacterial behaviors that can reveal new insights into biological function. For example, researchers have used blue light-switchable gene regulation system to optogenetic control of gene expression to spatiotemporally manipulate biofilm formation and pattern cells with high-resolution. These studies provide the ability to grow structured biofilms, with applications toward an improved understanding of natural biofilm communities, as well as the engineering of living biomaterials and bottom-up approaches to microbial consortia design. In addition, optogenetics enables characterization of bacterial gene circuit dynamics with optically programmed gene expression signals, which could advance understanding of gene circuit dynamics and cell signaling pathways. We also proposed that the development of optogenetics in bacteriology is limited by the requirement of engineered light-sensitive proteins for specific regulation networks and new methods for manipulation of living bacterial cells at the single-cell level.

This review concludes with some expectations on the foreseeable future application of those single-cell analysis approaches in biofilms-related fields, and a discussion of innovative anti-biofilm strategies that are inspired from the studies of characterization and control of single-cell phenotypes.

bacterial biofilms, optogenetics, *Pseudomonas aeruginosa*, high-throughput microscopy

doi: [10.1360/TB-2020-0486](https://doi.org/10.1360/TB-2020-0486)