УДК 577.359+579.262

ВОЗНИКНОВЕНИЕ УПОРЯДОЧЕННЫХ СТРУКТУР В РАСТУЩИХ КОЛОНИЯХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Л. Ш. Цимринг*

BioCircuits Institute, University of California, San Diego, USA

В статье обсуждаются механизмы образования упорядоченных структур в колониях микроорганизмов, связанные с неустойчивостями их коллективного движения. Рассматривается формирование нематического порядка при росте бактерий *E.coli* внутри открытой микропотоковой камеры, а также описываются причудливые «цветочные» паттерны, возникающие при росте бинарной смеси двух типов бактерий (мотильных *A.baylyi* и немотильных *E.coli*) на поверхности агара в чашке Петри. В обоих случаях описываются эксперименты и модели, объясняющие обнаруженные явления.

ВВЕДЕНИЕ

В конце 1970-х годов под руководством Л. А. Островского я начал изучать неустойчивости гидродинамических течений в приложении к океанографическим проблемам. Наша первая совместная статья «Излучательная неустойчивость сдвиговых течений в стратифицированной жид-кости» вышла в 1981 году [1]. Она и последующая работа [2] положили начало нашему циклу работ по изучению свойств волн с отрицательной энергией. Основные их результаты отражены в обзоре [3]. Как показано в [3], волны с отрицательной энергией, которые возникают только в движущихся средах, при наличии диссипации приводят к возникновению неустойчивостей.

Позднее мне пришлось иметь дело с течениями и их устойчивостью при изучении гранулированных сред [4]. Ситуация в этой области осложнялась тем, что общепринятых уравнений для описания гидродинамики сыпучих сред не существовало (их не существует и по сей день).

При занятиях биологической физикой с уклоном в описание нелинейной динамики внутриклеточных генетических цепочек динамика течений также оказалась важна. Она играет большу́ю роль в коллективных процессах, происходящих в популяциях простейших одноклеточных организмов — бактериях. Оказывается, что помимо коллективных биохимических процессов (например, синхронных колебаний количества определённых белков в клетках), мотильность, размножение, и механическое взаимодействие бактерий приводят к их коллективному движению, которое на больши́х масштабах имеет характер весьма специфических течений. В определённых ситуациях эти течения могут стать неустойчивыми и привести к возникновению нетривиальных структур.

Надо отметить, что изучение этих структур представляет не только академический интерес. Оказывается, коллективное поведение даёт бактериям серьезное селективное преимущество и помогает им конкурировать в борьбе за выживание [5, 6]. Многие виды бактерий образуют биоплёнки на различных поверхностях для того, чтобы успешно бороться со стрессом в неблагоприятной окружающей среде [6–8]. В биоплёнках бактерии плотно примыкают друг к другу и взаимодействуют не только путём биохимической сигнализации или через конкуренцию за ограниченные ресурсы питания, но и через прямые физические контакты. Эти контакты приводят к формированию сложных пространственно-временных структур, которые до сих пор с трудом поддаются экспериментальному наблюдению и теоретическому описанию.

^{*} ltsimring@ucsd.edu

В данной статье описаны два примера коллективных течений, приводящих к образованию структур в плотных бактериальных колониях.

1. ВОЗНИКНОВЕНИЕ НЕМАТИЧЕСКОГО ПОРЯДКА В ПОПУЛЯЦИЯХ РАСТУЩИХ БАКТЕРИЙ

В экспериментах, которые ведутся в нашей лаборатории, в основном используются немотильные штаммы бактерии E.coli, которые по одиночке двигаться не могут ввиду отсутствия у них спиральных жгутиков (flagellae). Но если по мере роста популяция достигает плотного состояния, в котором бактерии касаются друг друга (это типично, например, для биоплёнок), то они начинают расталкивать соседей, те в свою очередь толкают своих соседей, и в результате возникает коллективное движение. В большинстве наших экспериментов мы помещаем бактерии в прозрачные микропотоковые чипы, в каналы с толщиной порядка 1 мкм, так что бактерии могут там располагаться только горизонтально (в один слой). Это даёт значительное преимущество по сравнению со стандартными макроскопическими сосудами, которые традиционно используют биологи (пробирки, фляжки, чашки Петри и т. д.). В микропотоковых чипах каждая бактерия хорошо видна, и её положение и динамика могут быть прослежены в течение долгого времени. Кроме того, подаваемая по капиллярам непосредственно в чип питательная среда позволяет сохранять постоянными условия для роста и жизнедеятельности бактерий. В работе [9] мы обратили внимание на то, что в процессе движения соседние бактерии, имеющие форму палочек с длиной 3÷5 мкм и диаметром 1 мкм, движутся преимущественно в одном и том же направлении и при этом в этом же направлении ориентируются. Таким образом, в популяции бактерий возникает нематический порядок, напоминающий жидкие кристаллы (см. рис. 1).

Механизм фазового перехода от изотропного к нематическому состоянию в популяции растущих бактерий не имеет ничего общего с классическими энтропическими механизмами де Жена и Онзагера, которые отвечают за нематический порядок в жидких кристаллах [10]. В отличие от жидких кристаллов, упорядочивание происходит не из-за тепловых флуктуаций (бактерии гораздо больше молекул и сами по себе не движутся, поэтому их эффективная температура равна нулю), а из-за движения в результате размножения и расталкивания соседей. Для того, чтобы пролить свет на этот механизм, мы смоделировали бактерии как экспоненциально растущие в длину сфероцилиндры, которые делятся пополам, как только достигают определённой максимальной длины. Для того, чтобы избежать синхронного деления, у каждой бактерии эта максимальная длина слегка отличается от её значений для других бактерий. Сфероцилиндры подчиняются ньютоновским законам механики и движутся под влиянием действующих на них сил, которые включают давление со стороны соседей и боковых стенок, а также трение о дно. Ввиду малого размера бактерий и их медленного движения, инерцией в этой модели можно пренебречь. Самая трудная и вычислительно дорогая часть алгоритма — это эффективное вычисление сил, действующих на клетку со стороны соседей. На рис. 2 показаны четыре момента в росте колонии компьютерных «бактерий». Цвет каждой бактерии соответствует её ориентации относительно оси канала (красный — вдоль оси, синий — перпендикулярно). Как видно из результатов расчётов, после того, как клетки заполнили канал и начали толкать друг друга вдоль него, они быстро сориентировались по оси канала.

Теоретически в непрерывном пределе (т. е. на масштабах, много бо́льших размера бактерии) этот процесс нематической ориентации может быть описан модифицированными уравнениями нематодинамики для плотности бактериальной жидкости ρ , параметра порядка q, и z-компоненты

Л. Ш. Цимринг



Рис. 1. Нематическое ориентирование колонии бактерий вдоль направления экспансии во время роста внутри микрогидродинамического канала. Три микрофотографии: 60 (*a*) 90 (*б*) и 138 (*в*) минут с начала эксперимента [9]

скорости перемещения клеток v:

$$\partial_t \rho + \partial_x (\rho v) = \alpha \rho; \tag{1}$$

$$\partial_t q + v \partial_x q = B(1 - q^2) \partial_x v; \tag{2}$$

$$\partial_t(\rho v) + \partial_x(\rho v) = -\partial_x p - \mu \rho v. \tag{3}$$

Здесь t — время, x — координата вдоль оси канала, α — скорость роста клеток, μ — коэффициент трения о дно (предполагается, что сила трения пропорциональна скорости клетки и не зависит от её ориентации), а давление p удовлетворяет условию

$$p = P \exp[s(\rho - \rho_{\rm c})]. \tag{4}$$

Это соотношение подразумевает, что давление экспоненциально мало при $\rho < \rho_c$, и экспоненциально велико при $\rho > \rho_c$ (параметр $s \gg 1$). Соответствующая плотной упаковке предельная плотность ρ_c сама является функцией параметра порядка q: чем более упорядочена колония, тем больше эта предельная плотность. Для того, чтобы учесть этот эффект, мы использовали



Рис. 2. Нематическое ориентирование колонии бактерий в компьютерном эксперименте в четыре последовательных момента времени: (a) t = 3,8, (b) t = 6,5, (c) t = 8, (c) t = 18 (единица времени — это интервал, за который палочка удваивает свою длину).



Рис. 3. Изгибная неустойчивость нарушает нематический порядок в колонии растущих бактерий внутри микропотокового канала (эксперимент). Две микрофотографии: 60 (*a*) и 90 (*б*) минут с начала эксперимента. Красный цвет показывает участки с пониженным параметром порядка

соотношение $\rho_{\rm c} = \rho_{\rm c}^{\rm d} + (r_{\rm c}^{\rm o} - r_{\rm c}^{\rm d})q^2$. Таким образом, рост клеток увеличивает плотность, что вызывает резкий рост давления, как только плотность достигает критического значения $\rho_{\rm c}$, и затем градиент давления приводит к движению клеток, которое балансирует их рост и стабилизирует локальную плотность вблизи $\rho_{\rm c}$.

Скалярный параметр порядка q в действительности представляет собой компоненту xx симметричного и бесследового тензорного параметра порядка

$$Q_{ij} = \langle u_i u_j - \frac{1}{2} \,\delta_{ij} \rangle,\tag{5}$$

где u_i — компоненты вектора ориентации индивидуальной клетки в мезоскопическом объёме, по которому проводится усреднение, δ_{ij} — символ Кронекера. Параметр порядка q может варьиро-



Рис. 4. Изгибная неустойчивость нарушает нематический порядок в колонии бактерий в достаточно длинных каналах (компьютерный эксперимент): структура колонии и поле скоростей в коротком (a, δ) и длинном (e, s) канале в асимптотическом режиме $(t \gg 1)$

ваться в интервале от нуля (неупорядоченный режим) до единицы (полностью упорядоченный режим).

Уравнения нематодинамики были изначально сформулированы в теории жидких кристаллов [10, 11], где основную роль в упорядочении молекул играют тепловые флуктуации и минимизация свободной энергии системы. В нашем случае тепловые флуктуации роли не играют, поэтому вкладом свободной энергии в динамику параметра порядка можно пренебречь.

Система уравнений (1)–(3) позволяет показать формирование нематического порядка в системе растущих бактериальных клеток. В простейшем случае можно предположить, что клетки равномерно заполняют открытый с обоих концов канал, так что плотность и параметр порядка не зависят от координаты x вдоль оси канала, скорость является антисимметричной относительно середины канала линейной функцией $x: v = v_0(t)x$, а давление — параболической функцией $x: p = p_0(t)(1 - x^2/L^2), L$ — полудлина канала. Нетрудно убедиться, что эта подстановка удовлетворяет уравнениям (1)–(3). В результате система упрощается до уравнений в обыкновенных производных:

$$\dot{\rho} = \rho (1 - v_0); \tag{6}$$

$$\dot{q} = B(1 - q^2)v_0;$$
(7)

$$\dot{v}_0 = 2\rho^{-1}p_0 - (\mu + 1)v_0. \tag{8}$$

Здесь точкой обозначена полная производная по времени, все переменные нормированы на масштабы времени α^{-1} и длины *L*. Легко видеть, что после переходного процесса в системе устанавливается упорядоченный стационарный режим с $\rho = \rho_c, v_0 = 1, q = 1, p_0 = \rho_c(\mu + 1)/2$. Сравнение этой теории с результатами численного моделирования показало хорошее качественное и количественное согласие (см. [9])¹.

И эксперимент (рис. 3), и компьютерные расчёты (рис. 4) продемонстрировали, что полный нематический порядок устанавливается только в сравнительно малых системах, а в достаточно больши́х всегда остаются зоны беспорядка. Более детальный анализ [12] показал, что в больши́х системах полностью упорядоченное состояние становится изгибно неустойчивым (buckling instability) за счёт спонтанно возникающей сильной поперечной анизотропии тензора стресса. Действительно, в предыдущем непрерывном описании мы предположили, что давление в системе изотропно, что справедливо только в неупорядоченном состоянии. После того, как клетки ориентируются в одну сторону и продолжают удлиняться в том же направлении, возникающий по этой причине тензор стресса σ будет анизотропен. Изгибная неустойчивость упорядоченного состояния возникает, когда анизотропия стресса (σ_{xx}/σ_{yy}) превосходит некое критическое значение. Поскольку величина стресса в центре канала растёт как квадрат его длины (см. выше), то анизотропия стресса в длинных каналах существенно больше, чем в коротких.

2. ЦВЕТОЧНЫЕ СТРУКТУРЫ В БИНАРНЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КОЛОНИЯХ



Рис. 5. Цветочный паттерн из смеси E.coli (зелёный) и A.baylyi (красный) после 3 дней роста на поверхности агара 0.5%

Как было отмечено во Введении, физические свойства бактерий (их форма, мотильность, коэффициент трения, скорость роста и частота деления) играют принципиальную роль в формировании бактериальных течений и структур. Новые интересные эффекты возникают, если в одной и той же колонии присутствуют бактерии различных видов. Это типичная ситуация в естественных биоплёнках, где сосуществуют десятки различных видов микроорганизмов. В микробиоте, которая населяет кишечник животных и человека, насчитывается до тысячи видов бактерий. Если эти бактерии обладают существенно разными физическими свойствами, это может привести к неожиданным последствиям. В недавней работе [13] мы исследовали динамику роста по-

верхностных колоний, в которых, наряду с немотильными бактериями E.coli (такими же, как и в предыдущем разделе), присутствуют мотильные бактерии $A.baylyi^2$.

¹Интересно отметить, что, по словам Ю.А.Степанянца, весьма близкий эффект нематической ориентации брёвен, сплавляемых вниз по течению реки в случае сужения её русла (и, следовательно, ускорения её течения) рассматривался в неопубликованной работе И.В.Зверева и Л.А.Островского.

 $^{^{2}}$ В отличие от мотильных вариантов *E.coli*, которые плавают за счёт вращения жгутиков из спиралевидных волокон позади бактерии, действующих как винт у корабля, бактерии *A.baylyi* предпочитают двигаться по поверхности, используя микроскопические «лапки» — pili.



Рис. 6. Рост цветочного паттерна из E.coli и A.baylyi за 20 часов на поверхности LB-агара $0.75\,\%$

На этот раз мы поместили каплю жидкости со смесью дух типов бактерий в центр чашки Петри с диаметром 9 см с полужидким (0,5%) агаром, на поверхности которого они могли размножаться и расползаться. К нашему удивлению, растущая колония бактерий вскоре приобрела удивительную, доселе не описанную форму, напоминающую цветок (см. рис. 5). На рис. 5 зелёный цвет соответствует бактериям *E.coli*, в которых синтезировался зелёный флюоресцентный белок (GFP), а красный цвет отвечает бактериям *A.baylyi*, в которых синтезировался красный белок mCherry. Такого типа структуры устойчиво наблюдались при различных начальных концентрациях двух типов бактерий и при различных плотностях агара. На рис. 6 показан пример развития цветочной структуры за 20 часов с начала эксперимента. Самое интересное, что по отдельности ни бактерии *A.baylyi*, ни бактерии *E.coli* таких структур не формируют, мотильные бактерии *A.baylyi* распространяются по поверхности агара в виде расширяющегося круга, а немотильные бактерии *E.coli* остаются в центре чашки. Таким образом, появление паттернов безусловно связано с взаимодействием этих двух видов бактерий. Измерения показали, что

Л. Ш. Цимринг



Рис. 7. Отрицательная кросс-корреляция между локальной концентрацией *E.coli* на границе колонии и локальной скорости её продвижения *v*

бинарная смесь A.baylyi и E.coli расширяется со скоростью, слегка меньшей, но близкой к скорости колонии, состоящей только из A.baylyi. Наличие немотильных E.coli в смешанной колонии на большом удалении от места начальной инокуляции говорит о том, что бактерии E.coli попали туда «автостопом», с помощью мотильных бактерий A.baylyi.

Более детальный анализ растущих колоний показал, что «цветочные» структуры зарождаются на фронте колонии, где находится большое число бактерий *E.coli* (по-видимому, они там скапливаются под давлением расширяющейся колонии, как снег перед отвалом снегоуборочной машины). Этот фронт со временем становится неустойчивым, на нём образуются участки с повышенной концентрацией *E.coli*, которые продвигаются вперед с меньшей скоростью, нежели

участки с меньшей концентрацией *E. coli* (см. рис. 7). Поскольку участки фронта с пониженной концентрацией *E.coli* распространяются быстрее, чем ограничивающие их участки с повышенной концентрацией *E.coli*, из них формируются расширяющиеся «лепестки» и ограничивающий их фронт растягивается, тем самым ещё больше понижая локальную концентрацию *E.coli*. Эта положительная обратная связь и приводит к неустойчивости фронта. Поскольку бактерии *E.coli* на фронте продолжают расти и делиться, средняя концентрация *E.coli* не падает по мере роста колонии и на лепестках возникают новые неоднородности, превращающиеся в новые лепестки, и т. д. Таким образом формируется сложная «цветочная» структура.

Мы сформулировали полуэмпирическую пространственно-временну́ю модель роста колонии, которая включает в себя уравнения для концентрации обоих видов бактерий, ρ_E и ρ_A , и уравнение для фазового поля ϕ , необходимое для локализации области, в которой растут обе популяции:

$$\frac{\partial(\phi\rho_E)}{\partial t} + \nabla \cdot (\phi\rho_E \mathbf{u}) = \alpha_E \phi \rho_E (1 - \rho_A - \rho_E) + \nabla \cdot (\phi D_E \nabla \rho_E); \tag{9}$$

$$\frac{\partial(\phi\rho_A)}{\partial t} + \nabla \cdot (\phi\rho_A \mathbf{u}) = \alpha_A \phi \rho_A (1 - \rho_A - \rho_E) + \nabla \cdot (\phi D_A \nabla \rho_A); \tag{10}$$

$$\frac{\partial \phi}{\partial t} + \mathbf{u} \cdot \nabla \phi = \Gamma(\epsilon \nabla^2 \phi - G'(\phi)/\epsilon + \kappa \epsilon |\nabla \phi|). \tag{11}$$

Здесь $G(\phi) = 18\phi^2(1-\phi^2)$ — бистабильный потенциал фазового поля, штрихом обозначена производная по аргументу, $\kappa = -\nabla \cdot (\nabla \phi/|\nabla \phi|)$ — локальная кривизна фронта, α_E, α_A — скорости роста бактерий, D_E, D_A — коэффициенты диффузии бактерий, Γ — параметр, характеризующий скорость эквилибрации фазового поля. Локально, концентрации бактерий подчиняются логистической динамике роста и насыщения, диффундируют, а также, наряду с фазовой переменной, переносятся полем скорости **u**. Данная скорость подчиняется стационарному уравнению Стокса, в котором можно пренебречь инерций из-за малого числа Рейнольдса:

$$\nabla \cdot [\nu(\nabla \mathbf{u} + \nabla \mathbf{u}^{\mathbf{T}})] + \nabla \cdot (\chi \sigma_A) - [\xi + \beta f(\rho_E)\phi]\mathbf{u} = 0.$$
(12)

В этом уравнении первый член описывает линейную вязкость клеточной «жидкости», второе слагаемое — это градиент стресса, генерируемого мотильными бактериями A.baylyi а послед-

86



Рис. 8. Развитие цветочной структуры в численном решении фазовой кавазигидродинамической системы уравнений (9)–(11). Прошедшее время (в часах) указано на рисунке

ний член отвечает за трение о дно, которое пропорционально локальной скорости и является функцией локальной концентрации бактерий *E.coli* ρ_E .

Численные эксперименты с этой моделью показали, что механизмы, учтённые в ней (адвекция клеток под действием внутреннего стресса растущей колонии, трение, которое зависит от локальной концентрации *E.coli*) достаточны, чтобы в системе спонтанно возникали «цветочные» паттерны, структура которых весьма похожа на ту, которая наблюдается в эксперименте (см. рис. 8).

3. ЗАКЛЮЧИТЕЛЬНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

В данной статье приведены только два характерных примера возникновения структур при коллективном упорядоченном движении живых организмов. В действительности, в последние годы возникло целое новое направление в физике по изучению так называемых активных материй, т. е. субстанций, в которых динамические процессы возникают не за счёт внешних воздействий, а за счёт энергии, производимой и выделяемой самой материей [14]. В категорию таких материй обычно включают большие скопления живых организмов: бактерий, насекомых, рыб, животных, которые допускают континуальное рассмотрение. Их описание обычно имеет форму обобщённых уравнений гидродинамики, в которых движение вызывается так называемым активным стрессом. Этот раздел нелинейной гидродинамики быстро развивается, и я уверен, что это развитие принесёт много новых интересных открытий. Я рад, что первые уроки изучения гидродинамических неустойчивостей и нелинейных волн, которые я получил от Льва Ароновича Островского в далёких 70–80-х годах прошлого столетия, продолжают быть полезными в моих биофизических исследованиях сегодня.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Цимринг Л.Ш., Островский Л.А. // Изв. АН СССР: Физика Атмосферы и Океана. 1981. Т. 17, № 7. С. 766–768.
- Ostrovsky L. A., Stepanyants Yu. A., Tsimring L. Sh. // Int. J. Non-Linear Mech. 1983. V. 19, No. 2. P. 151–161. https://doi.org/10.1016/0020-7462(84)90004-0
- 3. Рыбак С. А., Островский Л. А., Цимринг Л. Ш. // Успехи физ. наук. 1986. Т. 150. С. 417–437. https://doi.org/10.3367/UFNr.0150.198611b.0417
- 4. Aranson I.S., Tsimring L.S. // Phys. Rev. E. 2002. V.65, No. 6. Art. no. 061303. https://doi.org/10.1103/PhysRevE.65.061303
- 5. Ben Jacob E., Cohen I., Levine H. // Adv. Phys. 2000. V.49, No. 4. P.395–554. https://doi.org/10.1080/000187300405228
- 6. Donlan R. M. // Emerging Infect. Diseases. 2002. V. 8, No. 9. P. 881–890. https://doi.org/10.3201/eid0809.020063
- 7. Davies D. G., Parsek M. R., Pearson J. P., et al. // Science. 1998. V. 280, No. 5 361. P. 295–298. https://doi.org/10.1126/science.280.5361.295
- Bassler B. L. // Cell. 2002. V. 109, No. 4. P. 421–424. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00749-3
- 9. Volfson D., Cookson S., Hasty J., Tsimring L.S. // Proc. National Academy Sci. 2008. V. 105, No. 40. P. 15 346–15 351. https://doi.org/10.1073/pnas.0706805105
- 10. De Gennes P.-G., Prost J. The physics of liquid crystals, volume 83. Oxford : Oxford University Press, 1993. 597 p.
- 11. Olmsted P.D., Goldbart P. // Phys. Rev. A. 1992. V.46, No. 8. P.4966–4993. https://doi.org/10.1103/PhysRevA.46.4966
- Boyer D., Mather W., Mondragon-Palomino O., et al. // Phys. Biology. 2011. V.8, No. 2. Art. no. 026008. https://doi.org/10.1088/1478-3975/8/2/026008
- 13. Xiong L., Cao Y., Cooper R., Rappel W.-J., et al. // bioRxiv. 2019. Art. no. 550996. https://doi.org/10.1101/550996
- Marchetti M. C., Joanny J.-F., Ramaswamy S., et al. // Rev. Modern Phys. 2013. V.85, No. 3. P.1143–1191. https://doi.org/10.1103/RevModPhys.85.1143

Поступила в редакцию 29 ноября 2019 г.; принята в печать 29 января 2020 г.

FORMATION OF ORDERED PATTERNS IN GROWING COLONIES OF MICROORGANISMS

L. Sh. Tsimring

In this work, we discuss the mechanisms of the ordered-pattern formation in the colonies of microorganisms, which are related to the instabilities of their collective motion. The formation of the nematic order during the E.coli-bacteria growth inside an open microfluidic chamber are considered and beautiful "floral" patterns, which emerge during the growth of the binary mixture of two types of bacteria (motile A.baylyi and nonmotile E.coli) on an agar surface inside Petri dish are described. The experiments and the models, which explain the observed phenomena, are described in both cases.