

运动细胞的三维轨迹追踪及分析

BY 赵智宇 孙全超 詹超

1 实验目标

1. 了解液体粘性等特性
2. 了解细胞在液体中的运动基本原理以及一些基本分析方法。
3. 了解细胞在不同边界条件下的运动情况。
4. 设计相关程序，对实验观测到的相关数据进行分析。
5. 对建立的跟踪模型进行分析评估。
6. 对已建立模型的改进方案

2 实验原理

2.1 液体的粘性与细胞运动分析

流体在运动时由于液体内部各个流层之间速度不同，相邻的流层之间存在相对运动，从而产生了内部摩擦力，称为粘滞力。当细胞在液体中运动时，如果液体内部不存在粘滞力或粘滞力很小时，则细胞由于动量守恒，不能产生任何定向移动。当液体存在一定粘滞性时，由于液体总是阻碍细胞与液体发生相对运动，经过一个冲程后可以获得一个净速度。从而产生定向移动。

对于类似大肠杆菌的单细胞生物来说，其主动的定向运动依靠鞭毛与液体之间的相互作用实现。一个单细胞生物存在多条鞭毛，在细胞进行定向运动，或加速时，细胞会将多条鞭毛合成一束，进行螺旋转动，形成一个向前的净动量。当细胞进行制动时，则会张开所有鞭毛增大前进的阻力进行减速。

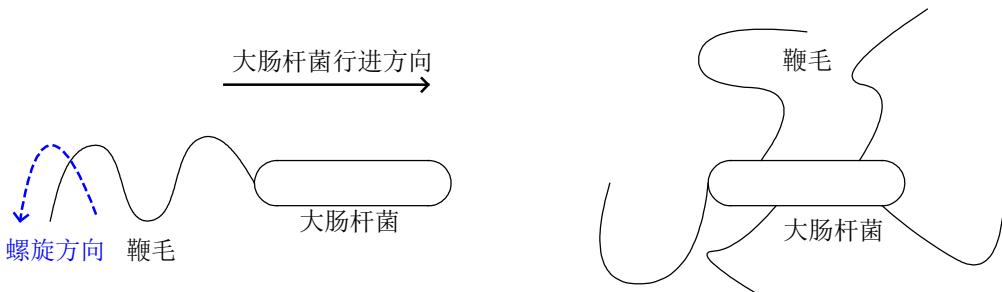


图 1. 细胞通过螺旋转动鞭毛前进，通过张开鞭毛减速

由于细胞与细胞之间的长程相互作用，长程密度涨落会得到有效抑制。从而使得细胞在较长范围内密度相对均匀，形成了无序超均匀态¹（大尺度上，它们类似于晶体、抑制密度涨落；小尺度上，它们类似于液体、各向同性、没有空间序）。而液体中的细胞运动表现为在局域内做圆周运动。

1. 无序超均匀态的定义为 $\lim_{R \rightarrow \infty} \frac{\sigma_N^2(R)}{R^d} = 0$ ，其中 σ_N^2 为单位圆面积内的粒子数涨落 $\langle N^2 \rangle - \langle N \rangle^2$ ，而 R 代表单位圆面积的半径。

对于 $\sigma_N^2 \sim \begin{cases} R^{d-1}, & \alpha > 1 \quad (\text{Class I}) \quad \text{对应普通液体} \\ R^{d-1} \ln R, & \alpha = 1 \quad (\text{class II}) \quad \text{对应晶体} \\ R^{d-\alpha}, & 0 < \alpha < 1 \quad (\text{class III}) \quad \text{对应无序超均匀态} \end{cases}$

此外，由于细菌附着在固体表面更有利于生存，经过生物进化的选择作用，细胞进化出多种附着机制，如通过改变细胞的电荷分布使细胞部分位置带正电荷与固体表面的负电区域通过范德瓦尔斯力结合在一起，通过细胞表面形成氢键与固体表面结合等等。主要影响细菌细胞能否成功附着于固体表面取决于细胞表面能与结合能之间的关系。

2.2 对于无障碍环境下的细胞运动情况

细菌细胞在液体中运动时，不仅会受到宏观流体力学作用，也会受到细胞作为具有自主运动系统的影响。通过对于相关文献的学习，我们了解到如果简单的把细菌在液体中的流动看作时流体场中的一个标志主要受流体力学的作用效果，则根据流体力学可知，液体在靠近固体表面时的斯托克斯流线(stokes let)应该平行于固体表面，而在实验中可以观测到细胞与固体表面发生正碰，即细胞不会完全遵循液体流通方向运动。

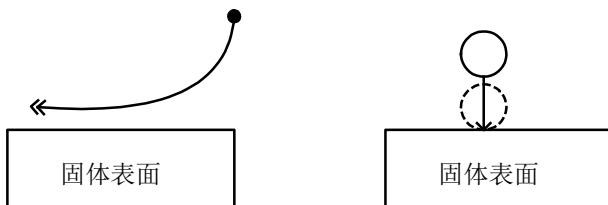


图 2. 流体力学中的流线在接近固体表面时应该平行表面，而细胞在运动过程中会与固体表面发生对心碰撞（运动垂直于表面）

根据相关研究分析，大肠杆菌等单细胞生物在液体中进行流动时，在远离固体表面与在靠近固体表面时产生的细菌流场不同，在远离固体表面时，细胞之间的主要相互作用是空间碰撞和近场润滑力(steric collisions and near-field lubrication forces)细胞的运动附近的液体流线大致同电偶极的电场线分布，细胞之间存在长程的排斥相互作用。当细胞靠近固体表面时，短程力将起到主导作用，细胞会与固体表面发生正碰，并会沿着表面附近的几微米内游动。因为在界面处受到其他细菌细胞的影响较小，在界面位置由于鞭毛螺旋转动且角动量守恒头部会沿着相反方向旋转，产生的扭矩改变着细菌前进的方向，进而使得细菌按照圆弧轨迹运动。

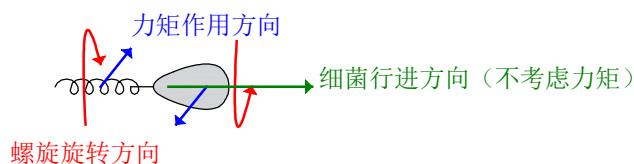


图 3. 由于力矩的作用使得细菌细胞在固体表面按照圆弧轨迹运动。

2.3 对于液体中存在障碍的细胞运动情况

细胞在液体中的运动主要受流体力学和局部纳米力学两种主要的相互作用类型。对于液体是否空间受限，对于细胞运动同样会由不同的影响。

当空间大小（横向宽度）约为细胞（直径）的20倍及以上时，细胞可能会表现出沿着墙壁运动，硬表面碰撞运动，圆周运动，随机运动等等。

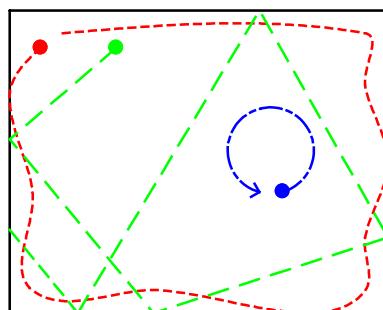


图 4. 当空间不受限制或受限较小时，细胞可以多种运动方式。

但当空间足够逼仄时，横向宽度不足5个细胞直径时(strictly confined)，细胞运动将会根据通道的间隙运动。同时，细胞的运动形态还要考虑到细胞的碰撞情况，边界形状，所处液体的流速等多方因素。以下对几种作用较大的因素进行分析。

1. 当细胞与边界碰撞时，一般为弹性碰撞。

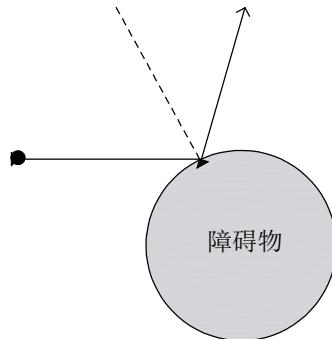


图 5.

2. 细胞在障碍间隙的岔路处，差角越大，从通道进入岔路的概率就越低。即细胞运动的速度偏角存在不同分布。

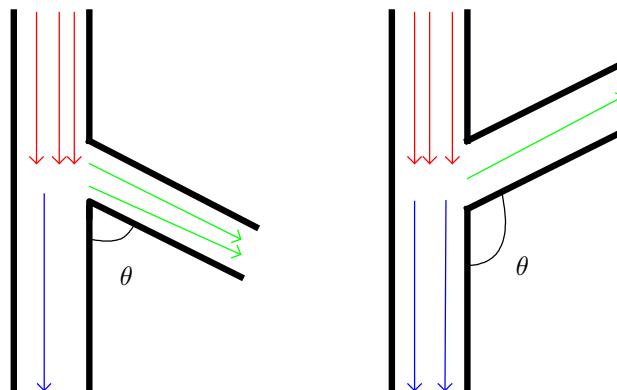


图 6. 随着岔路的角度增大，进入岔路的细胞数量减少

3. 细胞在固体表面运动时，细胞在与障碍物碰撞后会倾向于贴附与障碍物运动。特别是在固体凸面时，由于细胞在贴附过程中需要保持与表面的夹角 $\theta_R > 0$ ，会更容易被吸附(trap)，当夹角 $\theta_R < 0$ 时，细胞才能够脱离固体表面。在固体凸面，细胞与表面接触后会在较长距离内保持 $\theta_R > 0$ ，表现为细胞绕着固体凸面运动的现象。

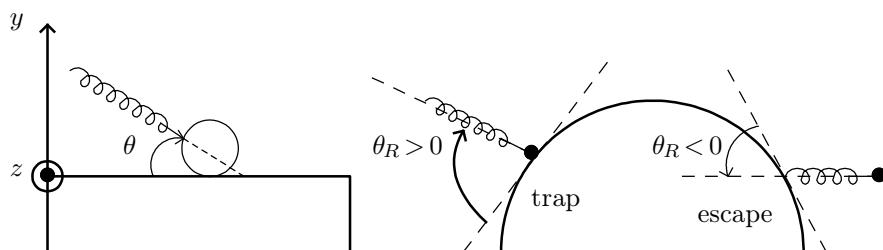


图 7. 细胞由于吸附作用会贴附于障碍表面运动。

4. 在多孔介质中的细胞运动可以类比于渗透效应，随着渗透率减小，随着障碍物半径的增大，细胞沿着直线的运动的距离变短。

3 实验仪器以及相关的软件使用

ECLIPSE Ti2显微镜倒置显微镜、Excel、Python、matlab、Java。

4 实验内容

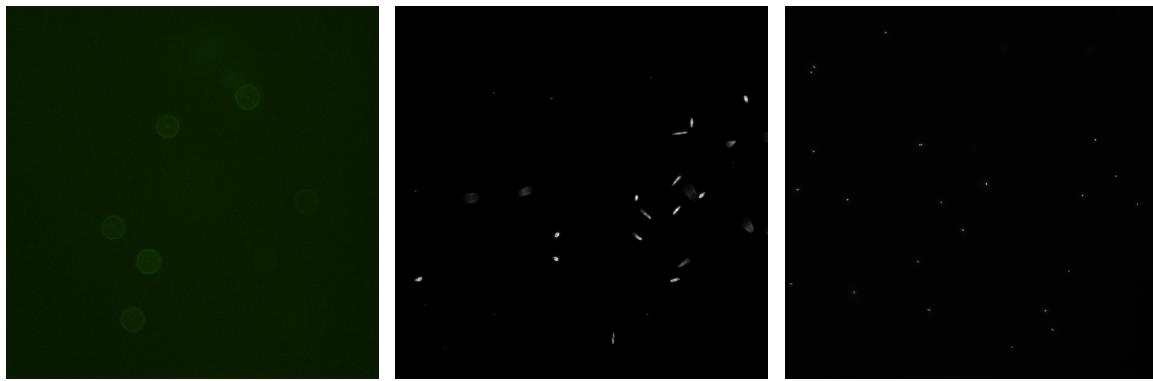
通过使用ECLIPSE Ti2显微镜倒置显微镜采集多种细胞的运动图像数据(.nd格式)， 使用相应软件将.nd格式转换为.tif格式， 使用Java或Python进行图像识别， 数据分析， 得到细胞运动情况的有关数据。以下为相关代码的分析。

4.1 细胞的识别与三维跟踪

通过使用ECLIPSE Ti2显微镜倒置显微镜采集多种细胞的运动图像数据(.nd格式)， 使用相应软件将.nd格式转换为.tif格式， 使用Java或Python进行图像识别， 数据分析， 得到细胞运动情况的有关数据。

4.1.1 原始数据的收集

我们利用Nikon Ti2显微镜分别观察了大肠杆菌、眼虫的细菌培养玻片， 记录其原始的实验图像。并在其中一组玻片中加入了半径一致的球形圆珠， 用于高度坐标的标定。



定标所使用的圆珠数据图样

眼虫原始数据图样

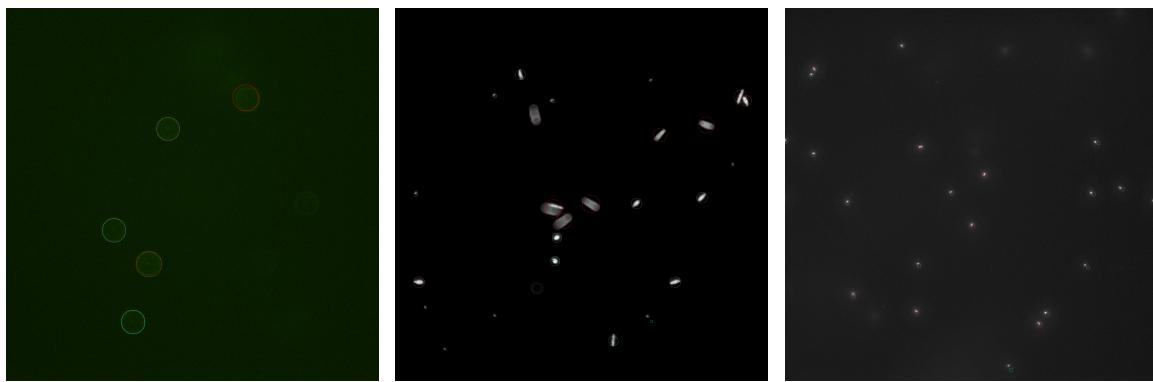
大肠杆菌原始数据图样

图 8. 原始数据采集

4.1.2 数据初步分析

(a) 确定细胞位置

将原始的视频数据格式逐帧读取为.tif格式方便软件读取， 使用Python处理数据时， 可以通过调用OpenCV中的中值滤波， 以及腐蚀膨胀算法进行降噪， 再通过轮廓判定得到一系列联通区域， 通过对联通区域进行筛选， 选出真正属于细菌细胞的影像， 选取联通区域的形心位置作为细胞所在的位置。对于所在的位置。



定标圆珠的定位效果

眼虫原始的定位效果

大肠杆菌的定位效果

图 9. 确定各个细胞的位置并使用圆进行标注

(b) 关联相邻两帧之间的同一目标

根据前一帧每个细胞的位置坐标 (x, y) ，对应下图的黑色点，选择合适距离 r 为半径(该半径经过反复调试得到最优参数)，以下一帧的 (x, y) 位置为圆心，以 r 为半径作圆，在圆内所有的点，下图例子中圆内的绿色点，都有可能为上一帧圆心坐标处的细胞的新位置。我们选定距离圆心最近的绿色点为细胞的新位置，以此来关联两帧之间同一目标细胞。

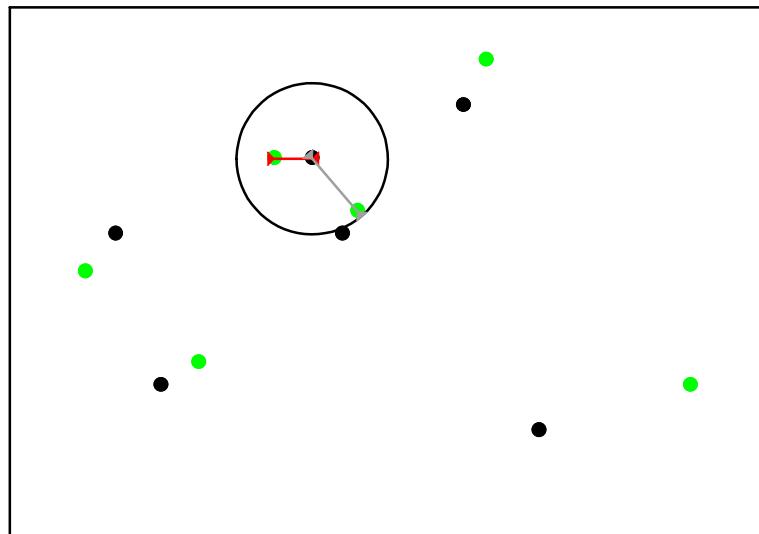


图 10. 关联两帧之间同一个目标细菌细胞的示意图

(二维平面内跟踪细胞运动)

通过将细胞一系列位置按照时间先后顺序连接起来，可以得到跟踪细胞运动的效果。



图 11. 大肠杆菌二维运动轨迹跟踪效果



图 12. 眼虫二维运动轨迹跟踪效果

4.1.3 三维成像的构建

将焦平面在竖直方向上移动，记录一系列随高度变化的平面图像。记录参考圆珠的面积大小，线性拟合获得面积变化比与竖直方向相对距离的关系。如果我们粗略地将细菌竖直方向上的运动导致的面积变化

关系，近似为与圆珠的面积变化相同，即可构建细菌运动的三维图像。

在凸透镜成像过程中，当接收屏的位置发生移动时，像影（未必对焦）大小变化与接收屏变化的距离接近于正比关系：

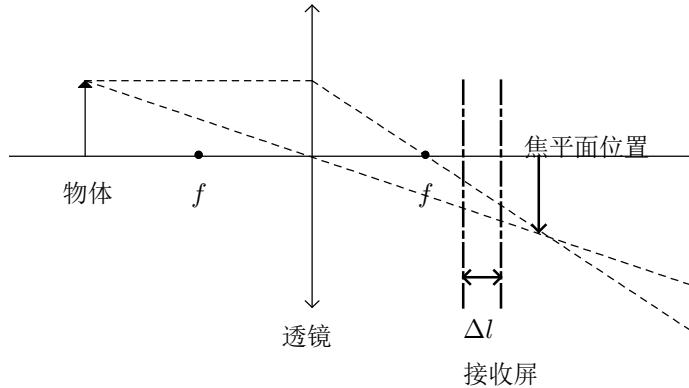


图 13. 由相似三角形可知，当接收屏位置移动时，像影的大小变化与接收屏的变化的距离成正比

通过对不同高度的定位圆珠的像影面积与高度的数据进行拟合，因为存在多个圆珠，可以得到各个圆珠微粒分别拟合得到的高度与像影面积的函数关系，最后对斜率取平均。

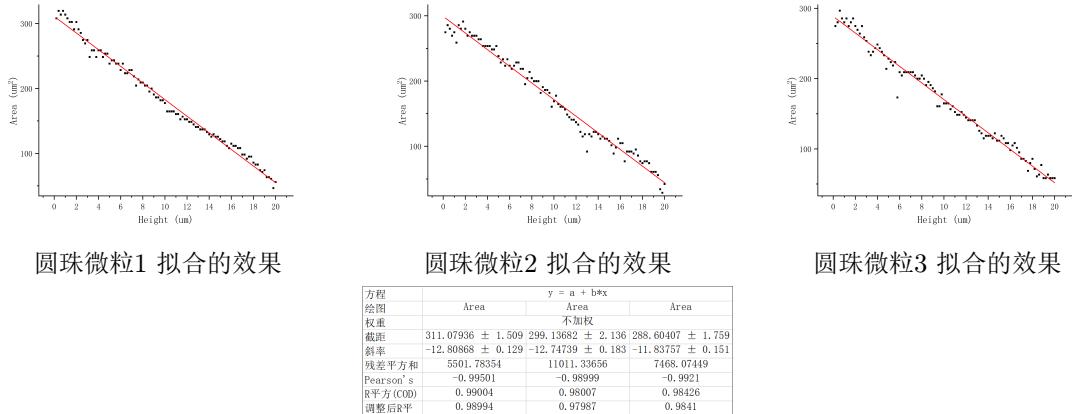


图 14. 高度与影像面积的拟合

经过相关拟合结果，得到散射斑面积 S 与细胞相对焦平面高度 h 的关系（定标微粒非常小，忽略截距）

$$S = (12.46455 \mu\text{m}) \cdot h$$

4.1.4 估计所有细菌的三维运动轨迹

每个联通区域所占的像素点数为细胞影像的大小，并将每一帧的所有图像信息单独保存为一个.txt文件，在绘制细胞运动轨迹时，分别读出对每个细胞的相邻两帧的位置信息 (x, y, S) ，其中， x, y 代表在二维平面内的位置，而 S 代表每帧该细胞的影像大小，通过拟合信息，将 S 转换为 z 轴坐标，从而得到每个细胞在每一帧的三维信息。通过连接每个细胞在相邻帧之间的坐标，我们可以绘制出细菌细胞的三维轨迹图样。

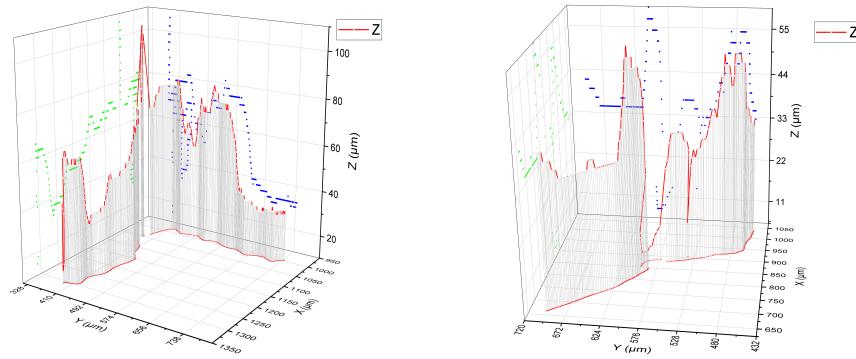


图 15. 眼虫细胞三维跟踪效果

4.2 细菌运动轨迹的运动学统计分析

在使用图像识别时，我们利用代码分别完成了识别物体，跟踪算法等相关程序，并初步得到了相应的轨迹图像。通过收集细胞的相邻帧之间的运动距离与曝光时间作比值得到细胞速度的分布情况。通过利用细菌细胞相邻帧之间的速度角度变化可以得到细菌细胞的角速度分布（二维）。

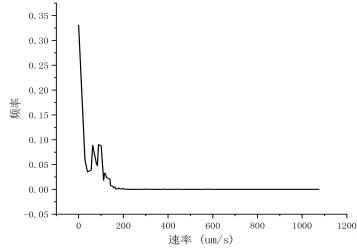


图 16. 眼虫速度分布

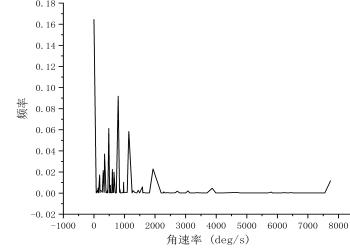


图 17. 眼虫的角速度分布

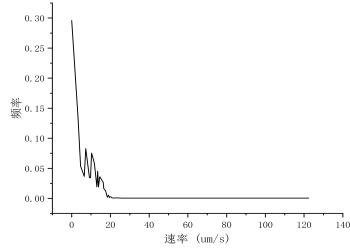


图 18. 大肠杆菌速度分布

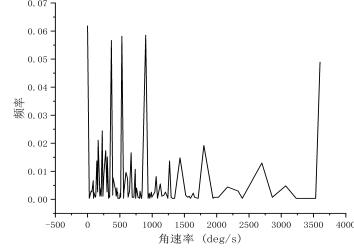


图 19. 大肠杆菌角速度分布

5 实验反思

1. 对于本次实验，可能对于物理方面的分析存在不足，一些数据的采集情况不能够总结出一些新奇的规律。
2. 对于相关的程序实现上依然存在部分不足，例如仍然不能够很好的解决细胞之间相互遮挡的问题。

3. 对于求取角速度分布的过程中还有很多不足，例如由于选取的往往是两帧之间细胞的运动情况，细胞在进行图像分析时，由于像素的锯齿效应可能会使得角速度会出现实际上不存在的高角频率。

6 实验改进

1. 对于本次的程序而言，可能部分程序仍有较大的改善空间，由于时间有限，可能部分分析做的并不够完整。
2. 对于程序的可视化方面还可以有进一步的提升，可以进一步完成一个可以自动进行分析的完整程序。
3. 对于所遇到的例如细胞-细胞之间的遮挡问题，有可能通过相关的计算机技术实现进一步优化工作，例如深度学习等工具。
4. 对于角速度分布的分析可以选取相邻两三帧进行逐差法取平均，可以很大程度上减小像素锯齿效应所带来的误差。

7 实验总结

本次实验，通过对于流体中的细菌细胞运动的相关文献进行调研，对于细胞在流体中的运动情况有了更深一步的理解与认识。

通过使用Java、Python OpenCV等程序，对于采集到的细胞运动信息进行识别与分析，得到了细胞的运动速率与偏转角度的分布情况。

参考文献

- (1) Huang, M.; Hu, W.; Yang, S.; Liu, Q.-X.; Zhang, H. P. Circular swimming motility and disordered hyperuniform state in an algae system. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2021, 118 (18), e2100493118. DOI: doi:10.1073/pnas.2100493118.
- (2) Torquato; Salvatore. Hyperuniformity and its Generalizations. Physical Review E 2016, 94 (2-1), 022122.
- (3) Cao, D.; Dvoriashyna, M.; Liu, S.; Lauga, E.; Wu, Y. Reduced surface accumulation of swimming bacteria in viscoelastic polymer fluids. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2022, 119 (45), e2212078119. DOI: doi:10.1073/pnas.2212078119.
- (4) Taute, K., Gude, S., Tans, S., & Shimizu, T. (2015). High-throughput 3D tracking of bacteria on a standard phase contrast microscope. Nature Communications, 6, 8776. doi:<https://doi.org/10.1038/ncomms9776>
- (5) Drescher, K., Dunkel, J., Cisneros, L. H., Ganguly, S., & Goldstein, R. E. (2011). Fluid dynamics and noise in bacterial cell-cell and cell-surface scattering. Ithaca: Cornell University Library, arXiv.org. doi:<https://doi.org/10.1073/pnas.1019079108>
- (6) Giuliani, N., Rossi, M., Noselli, G., & DeSimone, A. (2021). How euglena gracilis swims: Flow field reconstruction and analysis. Physical Review E, 103(2-1), 023102. doi:<https://doi.org/10.1103/PhysRevE.103.023102>