

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Molekulární biologie a biochemie organismů

Studijní obor: Speciální chemicko-biologické obory



**Mária Dobřemyslová**

Vzájemné ovlivnění růstu dvou blízkých bakteriálních kolonií - vliv signálních molekul a živin

Interactions of two nearby bacterial colonies - the effect of signaling molecules and nutrients on the colony growth

**Bakalářská práce**

Školitel: RNDr. Radovan Fišer, Ph.D.

Praha, 2015



**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 13.8.2015

.....  
Mária Dobřemyslová

Na tomto místě chci poděkovat svému školiteli Radovanu Fišerovi, Ph.D. za podnětné připomínky a cenné rady, které mi poskytl při psaní této bakalářské práce. Dále pak děkuji i své rodině, bez jejíž podpory by tato práce nemohla vzniknout.

# Obsah

Obsah.....	V
Abstrakt .....	VII
Seznam použitých zkratk .....	VIII
1 Úvod .....	1
2 Faktory obecně ovlivňující růst kolonií .....	2
2.1 Dostupnost živin.....	2
2.2 Tuhost média (rychlost difuze).....	2
2.3 Pohyblivost bakterií.....	3
3 Vnitrodruhové interakce bakterií .....	5
3.1 Quorum Sensing .....	5
3.1.1 systém využívající AHL .....	6
3.1.2 Systém založený na oligopeptidech.....	6
3.1.3 systém využívající AI-2.....	7
3.2 Sdílení „veřejných statků“ .....	7
3.3 Odpadní látky .....	8
3.4 Programovaná buněčná smrt .....	8
3.4.1 „Bratrovražda“ .....	9
3.4.2 Kanibalismus .....	9
3.5 Signály šířitelné vzduchem.....	9
3.5.1 Vzduchem šířitelný signál indukující rezistenci k antibiotikům .....	10
3.6 Nechemické způsoby komunikace .....	11
3.6.1 Zvukový signál podporující růst kolonií - <i>Bacillus carboniphilus</i> .....	11
4 Interakce mezi koloniemi stejného druhu .....	14
4.1 Vyhýbání výběžků - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	14
4.1.1 Rhamnolipidy - dráha syntézy a význam .....	15
4.1.2 Mechanismus vyhýbání výběžků .....	16
4.2 Vyhýbání výběžků - <i>Bacillus subtilis</i> .....	17
4.3 Zabíjení sesterských kolonií - <i>Paenibacillus dendritiformis</i> .....	19
4.3.1 Přeměna na Slf-resistentní koky indukovaná nízkou koncentrací Slf .....	20
4.4 Vliv vzájemné blízkosti kolonií na jejich velikost .....	21
5 Hodnocení růstu kolonií.....	22
5.1 Měření plochy kolonie.....	22

5.2	Určování počtu buněk v kolonii .....	22
5.2.1	Měření optické hustoty kolonií.....	23
5.2.2	Trojrozměrná rekonstrukce kolonií .....	24
5.3	Hodnocení vzájemného vlivu blízkých kolonií.....	24
6	Závěr.....	27
7	Přehled použité literatury .....	29

## **Abstrakt**

Mezi blízko sebe rostoucími bakteriálními koloniemi jednoho druhu dochází k vzájemným interakcím ovlivňujícím jejich růst (jak velikost, tak i tvar). Efekty těchto interakcí na růst mohou být jak záporné, tak i kladné, a během vývoje kolonií se mohou proměňovat. Prvotní příčinou vzájemného ovlivnění je často soupeření o dostupné zdroje živin, produkce odpadních látek, či produkce a využívání společných „veřejných statků“. Síla ovlivnění závisí na vnějších faktorech, jako je vzdálenost kolonií, tuhost a složení média, či možnost vzájemné výměny signálních molekul. V této bakalářské práci jsou popsány známé mechanismy vnitrodruhových interakcí, které mohou hrát roli v komunikaci mezi dvěma koloniemi. Blíže popsány jsou pak tři konkrétní případy ovlivnění dvou blízkých kolonií, které byly do dnešního dne jako jedny z mála podrobněji zkoumány. Dále jsou zde shrnuty metody měření velikosti kolonií a algoritmy použitelné k vyhodnocování vzájemného vlivu blízkých kolonií.

**Klíčová slova:** vnitrodruhové interakce, bakteriální kolonie, komunikace mezi koloniemi, vliv blízkosti

## **Abstract**

Between neighbouring bacterial colonies of the same species there occur mutual interactions influencing their growth (both size and pattern). Effects of these interactions on the growth can be both negative and positive, and can change in the course of development of colonies. The primary cause of mutual influence is often competition for available sources of nutrients, production of wastes, and production and utilization of public goods. The intensity of influence depends on external factors like mutual distance of colonies, medium composition and rigidity, or possibility of mutual signal molecule exchange. In this bachelor's thesis there are described known mechanisms of intraspecies interactions that may be of some importance in communication between two colonies. In more detail there are described three particular cases of influence of two nearby colonies that have been up to now studied more intensively. Further on, there have been summarized methods of measuring the sizes of colonies and algorithms applicable to evaluation of mutual influence of nearby colonies.

**Key words:** intraspecies interactions, bacterial colony, communication between colonies, influence of proximity

## Seznam použitých zkratek

AIPs	autoindukující polypeptidy (autoinducing polypeptides)
CFU	kolonii tvořící jednotka (colony forming unit)
CSP	oligopeptid indukující kompetenci u <i>Streptococcus pneumoniae</i> (competence-stimulating peptide)
dfsB	gen kódující protein Dfsb
DfsB	prekurzor proteinu Slf u <i>Paenibacillus dendritiformis</i> (dendritiformis sibling bacteriocin)
di-RLs	di-rhamnolipidy
gsp	general stress protein
HAAs	3-(3-hydroxylalkanoyloxy)alkanové kyseliny
HSL	N-(3-oxohexanoyl)-homoserin lakton
QS	quorum sensing
RhlA	protein potřebný při syntéze HAAs u <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
RhlB	rhamnozyltransferáza potřebná při syntéze mono-rhamnolipidů u <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
RhlC	rhamnozyltransferáza potřebná při syntéze di-rhamnolipidů u <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
SdpC	Sporulation delaying protein C
SkfA	Sporulation killing factor
Slf	protein působící smrt sesterských kolonií u <i>Paenibacillus dendritiformis</i> (sibling lethal factor)

# 1 Úvod

Tato bakalářská práce vznikla v návaznosti na diplomovou práci Mgr. Andrey Moserové “Fyziologické rozdíly mezi r a K-stratégy u bakterií”, která se zabývala především souvislostí mezi životní strategií (r/K) bakterií a schopností jejich adaptace k chladu a k nízké koncentraci živin. (Moserová, 2010)

Koncept r a K strategů byl zaveden ekology při studiu ostrovní biogeografie (MacArthur a Wilson, 1967) a později byl rozveden v práci E. Pianky . Podle tohoto konceptu lze různé životní podmínky zařadit na škálu r - K, kde r je krajní situace, ve které neexistuje konkurence, a nejvýhodnější strategií je investovat co nejvíce energie do vytvoření co největšího počtu potomků. K je druhá krajní situace, kdy je konkurence velmi vysoká, protože v prostředí již nejsou dostupné zdroje pro žádné další jedince. V této situaci je nejvýhodnější strategií investovat energii spíše do konkurence schopnosti potomků, než do jejich množství. Organismy pak označujeme jako r- či K-stratégy podle toho, jakým podmínkám jsou lépe přizpůsobeny. (Pianka, 1970)

Andrea Moserová ve své práci při porovnávání růstových rychlostí r a K strategů narazila u některých kmenů na silnou závislost rychlosti růstu kolonií na hustotě výsevu bakterií na agarovou plotnu. Tato závislost byla podrobněji zkoumána u tří vybraných kmenů. Konkrétně to byli: typický r-stratég *Arthrobacter aureescens*, typický K-stratég *Deinococcus radiourans* a K-stratég nacházející se spíše ve středu škály r/K *Rhodococcus erythropolis*.

Za pomoci pro tento účel vytvořeného skriptu (viz kapitola 5.3) byla u všech tří uvedených bakterií určena závislost plochy kolonie na její vzdálenosti od nejbližší sousední kolonie. U *A. aureescens* (r-stratég) byl vliv blízkých kolonií kladný, ale s časem se snižoval, u *D. radiourans* (K-stratég) byl vliv záporný a u *R. erythropolis* (na rozmezí r a K) nebyl vliv žádný. (Moserová, 2010) Tyto výsledky odpovídají teorii r a K strategů, podle které se u K strategů mnohem více uplatňuje kompetice.

Z chování tří bakteriálních kmenů se samozřejmě dají těžko vyvozovat obecnější závěry, avšak souvislost mezi životní strategií a vlivem vzájemné vzdálenosti na růst kolonií by si v budoucnu jistě zasloužila další zkoumání. V případě, že by se tato závislost potvrdila, mohl by se vzájemný vliv blízkých kolonií stát dalším kritériem při určování životní strategie u bakterií.

Tato bakalářská práce si klade za cíl podat přehled dosud známých mechanismů vyskytujících se u různých bakterií, které prokazatelně hrají nebo by mohly hrát roli při vzájemném ovlivňování růstu dvou blízko sebe rostoucích bakteriálních kolonií stejného druhu. Dalším cílem práce je pak shrnutí dostupných metod a algoritmů použitelných při posuzování vlivu, který na sebe blízké kolonie mají.

## **2 Faktory obecně ovlivňující růst kolonií**

Následující odstavce budou věnovány vybraným faktorům, které mají často velmi silný vliv na velikost bakteriálních kolonií. Kromě toho, že tyto faktory samy o sobě ovlivňují růst jednotlivých kolonií, ovlivňují i vzájemné působení mezi koloniemi.

### **2.1 Dostupnost živin**

Bakterie, tak jako všechny živé organismy, k růstu bezpodmínečně potřebují zdroj energie. Proto je dostupnost živin, především v prvních fázích růstu, hlavním faktorem ovlivňujícím velikost bakteriální kolonie. Podobně jako v tekuté kultuře je i při růstu na pevném médiu často jedna látka či skupina látek limitující živinou, která omezuje rychlost růstu. Vliv koncentrace ostatních živin pak již není tak výrazný. (Pirt, 1966)

Na tom, které živiny a v jakém množství mají buňky k dispozici, mimo jiné závisí i to, jaké metabolity buňky produkují (Soo et al., 2009). Prostřednictvím těchto metabolitů pak může docházet mezi koloniemi k dalšímu ovlivnění.

### **2.2 Tuhost média (rychlost difuze)**

Pro pěstování bakteriálních kolonií bývá v převážné většině případů používáno médium zpevněné agarem, od jehož koncentrace se odvíjí tuhost média. Na tuhosti média závisí rychlost, jakou difundují médiem látky, jako jsou živiny, či nejrůznější sekundární metabolity. Obecně platí, že rychlost difuze určité látky je tuhostí média ovlivněna tím více, čím vyšší je její molekulová hmotnost (Samprovalaki et al., 2012). Rychlost difuze nízkomolekulárních látek jako je glukóza, není koncentrací agaru téměř ovlivněna, avšak bylo prokázáno, že způsob, jakým kolonie reagují na měnící se koncentraci těchto látek, je na tuhosti média i přesto značně závislý. (Stecchini et al., 1998)

Tuhost média u některých bakterií také určuje mechanismus, kterým jsou za daných podmínek schopné pohybu po povrchu média. (Henrichsen, 1972; Kohler et al., 2000; Rashid a Kornberg, 2000)

Díky těmto skutečnostem tuhost média zásadně ovlivňuje rychlost růstu, morfologii i vzájemnou komunikaci bakteriálních kolonií.

## 2.3 Pohyblivost bakterií

Pohyblivost bakterií může zásadně ovlivňovat rychlost, jakou se kolonie rozrůstá po povrchu média. Následující kapitola bude proto věnována možnostem pohybu a faktorům, které tento pohyb ovlivňují.

Již poměrně dlouho je rozlišováno šest základních mechanismů pohybu, kterých jsou bakterie schopné na pevném/polopevném médiu. Stručné charakteristiky v následujícím přehledu vycházejí především z práce „Bacterial Surface Translocation: a Survey and a Classification“ (Henrichsen, 1972), ve které byly tyto typy pohybu poprvé souhrnně definovány.

**Swimming („plavání“)** - Mechanismus aktivního pohybu při kterém je využíván bičík. Buňky se pohybují samostatně, nezávisle na fyzickém kontaktu s ostatními buňkami. K tomuto druhu pohybu je zapotřebí přítomnost dostatečně silné vrstvy kapaliny, ve které se buňky mohou pohybovat. (Henrichsen, 1972)

**Swarming („rojení“)** - Mechanismus aktivního pohybu, při kterém je využíváno většinou větší množství bičíků. Buňky se nepohybují samostatně, ale vždy ve větších shlucích ve směru dlouhých os. Struktura kolonie na mikroskopické až makroskopické úrovni bývá vysoce organizovaná. Často vznikají opakující se motivy, například různé pásy, či víry. (Henrichsen, 1972; Ingham a Ben Jacob, 2008)

**Gliding („klouzání“)** - Mechanismus aktivního pohybu využívaný bezbičíkatými bakteriemi. Při tomto typu pohybu se bakterie pohybují po skupinách ve směru svých dlouhých os a vznikají zde podobné struktury jako při swarmingu. (Harshey, 2003; Henrichsen, 1972)

**Twitching („škubání“)** - Mechanismus aktivního pohybu nezávislý na přítomnosti bičíku, při kterém se bakterie pohybují samostatně, či v menších skupinách. Směr pohybu není závislý na směřování osy bakterií. (Henrichsen, 1972)

**Sliding („sunutí“)** - Mechanismus pasivního pohybu, ke kterému dochází, pokud je tření mezi povrchem a buňkami dostatečně nízké. K pohybu dochází díky pnutí, které vzniká při růstu. Vznikající kolonie jsou často tvořeny pouze jednou vrstvou buněk. (Harshey, 2003; Henrichsen, 1972)

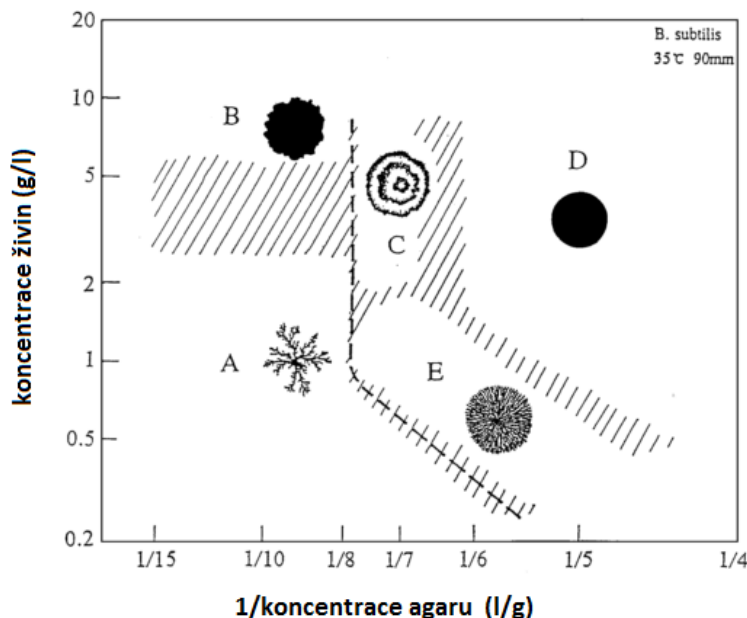
**Darting („odhození“)** - Mechanismus pasivního pohybu popsán jen u několika málo bakterií, při kterém pravděpodobně v důsledku pnutí způsobeného růstem dochází

k občasnému „vymrštění“ několika buněk. Bakterie využívající tento pohyb pak netvoří souvislé kolonie, ale spíše oddělené ostrůvky buněk. (Harshey, 2003; Henrichsen, 1972)

U mnoha bakterií nebyl popsán žádný druh pohybu, avšak existují i takové, které jsou za různých podmínek schopné využívat hned několik různých mechanismů (Rashid a Kornberg, 2000). Hlavními dvěma faktory, které určují, jaký typ pohybu a v jaké míře bude použit, jsou již zmiňovaná dostupnost živin a tuhost média (Pérez-Pascual et al., 2009; Rashid a Kornberg, 2000).

S pohyblivostí bakterií úzce souvisí i schopnost **chemotaxe**, kterou mají mnohé bakterie schopné aktivního pohybu. Jako atraktanty často působí některé živiny (Adler, 1966), jako repelenty pak látky, které jsou pro bakterie škodlivé (Tso a Adler, 1974). Kromě látek z prostředí mohou chemotaxi způsobovat i látky produkované samotnými bakteriemi (Budrene a Berg, 1991).

Schopnost pohybu a chemotaxe umožňuje některým bakteriím tvořit za různých podmínek velmi odlišné typy kolonií (viz **obr. 1**), které se výrazně liší i rychlostí růstu. (Matsushita et al., 1999)



**Obr. 1** Diagram znázorňující různé typy kolonií, které tvoří *Bacillus subtilis* při měnící se koncentraci živin a agaru. (Převzato z Matsushita et al., 1999).

### 3 Vnitrodruhové interakce bakterií

Již dlouho je známo, že mnohobuněčné útvary tvořené bakteriemi jsou často velmi komplexní a můžeme v nich najít diferencované buňky. (Branda et al., 2001; Shapiro, 1988) Tyto struktury pomáhají bakteriím například účinněji se vyrovnávat se s vnějšími podmínkami (Hoyle et al., 1983), či šířit se do okolí. (Branda et al., 2001)

Ke vzniku a správnému fungování těchto struktur je nezbytná komunikace mezi buňkami. Tato komunikace často neprobíhá pouze na úrovni sousedních buněk, ale na vzdálenosti mnohem větší – prokazatelně i v řádu centimetrů. Právě tyto interakce na větší vzdálenosti se budou pravděpodobně promítat i do vzájemného působení dvou blízkých kolonií.

#### 3.1 Quorum Sensing

Bylo zjištěno, že mnohé druhy bakterií produkují signální molekuly - takzvané **autoinduktory**, které jim umožňují vnímat aktuální hustotu populace a reagovat na ni. Jednotlivé buňky uvolňují autoinduktory do prostředí a zároveň vnímají jejich koncentraci, která odpovídá hustotě dané populace. Při dosažení určitých prahových koncentrací buňky reagují změnami v genové expresi. – Tento jev se označuje jako **quorum sensing**.

Quorum sensing (QS) se uplatňuje v situacích, kdy je dané chování výhodné pouze při určité hustotě populace, jako je například bioluminiscence (Nealson et al., 1970), genetická kompetence (Tomasz a Hotchkiss, 1964), produkce antibiotik (Stewartt a Williams, 1992), či surfaktantů (Huber et al., 2001).

Je důležité si uvědomit, že koncentrace autoinduktorů nezávisí pouze na velikosti populace, ale také na velikosti prostoru, ve kterém se nachází, a na rychlosti jakou signální molekuly difundují prostředím. Z této skutečnosti vychází model **diffusion sensing**, podle kterého účelem tohoto chování není primárně spolupráce s ostatními buňkami, ale pouze maximalizace užítku konkrétní buňky. Podle tohoto modelu buňka pomocí autoinduktoru vnímá míru difuze ve svém okolí a tak pozná, zda je pro ni v danou chvíli výhodné uvolňovat sekundární metabolity, jako jsou proteázy a siderofory, či nikoli. V případě, že je difuze těchto molekul pryč od buňky příliš rychlá, buňka z jejich produkce nemá užitek. (Redfield, 2002)

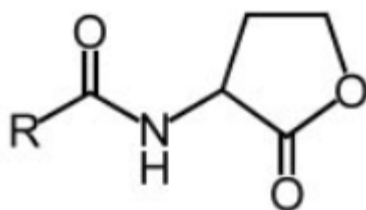
Quorum sensing může být zprostředkován širokým spektrem molekul, avšak byly popsány tři základní typy signalizace, které byly nalezeny u mnoha různých, vzájemně nepříbuzných, bakteriálních druhů. Těmto třem typům budou věnovány následující odstavce.

### 3.1.1 systém využívající AHL

Tento systém byl jako první QS systém popsán u mořských bakterií *Vibrio fischeri*, které žijí ve speciálních „světelných“ orgánech eukaryotických hostitelů, kde produkují světlo. (Nealson a Hastings, 1979)

K produkci světla je zde zapotřebí sedmi lux genů. Pět z nich kóduje proteiny zajišťující samotnou světelnou reakci. Expres těchto genů je regulována pomocí zbylých dvou. Geny zajišťující regulaci jsou **luxI** a **luxR**. (Engebrecht a Silverman, 1984) Protein LuxI je zodpovědný za produkci autinduktoru N-(3-oxohexanoyl)-homoserin laktonu, který volně difunduje buněčnou membránou (Eberhard et al., 1981). Protein LuxR pak váže autinduktor a v závislosti na jeho koncentraci reguluje genetickou expresi. (Engebrecht a Silverman, 1984)

Postupně byly popsány obdobné mechanismy u desítek dalších gramnegativních a dokonce i některých grampozitivních bakterií. (Biswa a Doble, 2013) Tyto mechanismy regulují expresi různých genů, avšak jejich společným znakem je využití homologů genů luxI a luxR a produkce některého z acyl – homoserin laktonů (**AHL**) (viz **obr. 2**) jako autinduktoru. Přehled některých z nich můžeme najít například v práci (Miller a Bassler, 2001)



**Obr. 2** Obecná struktura acyl-homoserin laktonů. R značí postranní řetězec, který se liší u jednotlivých organismů. (Převzato z Taga a Bassler, 2003)

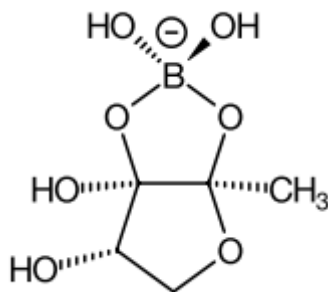
### 3.1.2 Systém založený na oligopeptidech

Převážně u grampozitivních bakterií byly popsány další vzájemně podobné mechanismy QS, které jako autoinduktory využívají krátké, někdy modifikované, oligopeptidy (AIPs). Přehled některých z nich můžeme najít například v práci (Taga a Bassler,

2003) Tyto signální oligopeptidy působí buďto extracelulárně přes receptory v membráně nebo se za pomoci přenašečů dostávají přes membránu a působí intracelulárně (Solomon et al., 1996).

### 3.1.3 systém využívající AI-2

*Vibrio Harveyi* při regulaci bioluminiscence využívá hned dva autoinduktory. (Bassler et al., 1993) Prvním z nich je AHL, tak jako u *V. fischeri*, avšak druhý, označovaný jako autoinduktor 2 (AI-2), je strukturně odlišný. Jedná se o furanosyl-borat-diester (viz obr. 3) a za jeho produkci je zodpovědný gen *luxS*. (Chen et al., 2002)



Obr. 3 Struktura AI-2 (Převzato z Chen et al., 2002)

Bylo prokázáno, že analogy genu *luxS* se vyskytují u mnoha různých gramnegativních i grampozitivních bakterií, které rovněž produkují AI-2. (Surette et al., 1999) AI-2 se proto pokládá za možný prostředek mezidruhové komunikace.

U některých bakterií, například u *Pseudomonas aeruginosa*, funguje i několik paralelních QS systémů využívajících jako autoinduktory různé signální molekuly jednoho nebo více typů. Konkrétně u *P. aeruginosa* je QS systémem regulována exprese více než 6% genů. (Schuster et al., 2003)

## 3.2 Sdílení „veřejných statků“

Produkce a sdílení „veřejných statků“ (v angličtině public goods) je jedna ze základních forem interakce mezi bakteriemi. Veřejnými statky se rozumí buňkou vylučované látky, ze kterých má užitek nejen buňka samotná, ale i buňky v jejím okolí. (West et al., 2006) Mezi

takové látky patří například surfaktanty, proteázy, adhezivní polymery, či siderofory. Přehled těchto látek můžeme najít například v práci (West et al., 2007).

Vzdálenost, na kterou se mohou bakterie (případně dvě kolonie) ovlivňovat prostřednictvím těchto látek, závisí na faktorech jako je tuhost média, či rychlost jejich degradace v daném prostředí. Například pro siderofory je rychlost difuze 1% agarovým médiem cca 6 mm za 24 hodin (Kümmerli et al., 2009), což je rychlost dostačující k vzájemnému ovlivnění blízkých kolonií během růstu. Některé bakterie, například *P. aeruginosa*, jsou však schopné značně omezit rychlost úniku těchto látek ven z kolonie a proto může být ovlivnění blízkých kolonií slabší, než bychom čekali. Mechanismus, jakým toto omezení kolonie provádějí, není známý. Mohlo by však být zapříčiněno afinitou daných látek k některým složkám buněčné stěny, či snížením rychlosti jejich difuze uvnitř kolonie pomocí buňkou vylučovaných polymerů. (Julou et al., 2013)

### 3.3 Odpadní látky

Každá metabolizující bakterie produkuje určité odpadní látky, které uvolňuje do svého okolí. Během vývoje bakteriální kolonie dochází k hromadění těchto látek uvnitř kolonie a v jejím blízkém okolí. Kromě toho, že je tato zvýšená koncentrace odpadních látek jednou z příčin zpomalování a někdy i zastavení růstu samotné produkující kolonie (Pirt, 1966; Wimpenny et al., 1995), může negativně ovlivňovat i růst kolonií v její blízkosti.

Příkladem může být negativní ovlivnění růstu blízkých kolonií *Listeria monocytogenes* způsobené kyselinou mléčnou. Kyselina mléčná produkovaná metabolismem zde působí snížení pH v okolí kolonií. Nízké pH pak má za následek právě zpomalení růstu. (Thomas et al., 1997)

### 3.4 Programovaná buněčná smrt

Programovaná buněčná smrt je již neodmyslitelnou součástí života mnohobuněčných organismů. U bakterií byly podobné mechanismy popsány teprve docela nedávno, ale ukazuje se, že mají velmi důležitou úlohu v mnohobuněčných bakteriálních útvech, jako jsou kolonie, či biofilmy. Cest, kterými dochází k navození smrti některých jedinců ve prospěch celé populace je známých hned několik. Zde budou blíže popsány takové, které jsou

zprostředkovávány látkami uvolňovanými do prostředí, a tedy by mohly hrát roli při ovlivňování dvou kolonií.

### 3.4.1 „Bratrovražda“

Transformace je proces, během kterého bakterie přijímají extracelulární DNA ze svého okolí. V přírodě se tato schopnost vyskytuje jen u některých druhů bakterií, a to pouze za určitých podmínek. Stav, kdy jsou buňky schopné transformace, se označuje **kompetence**.

U *Streptococcus pneumoniae* je kompetence indukována při zvýšené hustotě populace pomocí QS mechanismu. (Tomasz a Hotchkiss, 1964) Signální molekulou je zde oligopeptid CSP (Håvarstein et al., 1995). Bylo prokázáno, že CSP kromě indukce kompetence také spouští produkci faktorů, které působí lyzi nekompetentních buněk. Při lyzi buňky uvolňují živiny, některé virulenční faktory a především DNA, která je následně přijata kompetentní částí populace. (Moscoso a Claverys, 2004) Tento jev, který se v literatuře označuje jako bratrovražda (v angličtině fratricide), může například umožňovat vznik multirezistentních kmenů a tak přispět k přežití aspoň části populace za stresových podmínek. (Gilmore a Haas, 2005)

### 3.4.2 Kanibalismus

U *Bacillus subtilis* byl popsán mechanismus, kterým jsou za nedostatku živin některé buňky schopny navodit autolýzu sesterských buněk. Účelem tohoto chování je získání uvolněných živin a oddálení vlastní sporulace. Kanibalismus je stejně jako sporulace řízen DNA vazebným proteinem Spo0A. Buňky s aktivovaným regulonem Spo0A produkují faktory SkfA a SdpC, které pak navozují autolýzu buněk s neaktivním Spo0A. Samotné Spo0A aktivní buňky jsou vůči těmto faktorům rezistentní. (González-Pastor et al., 2003)

## 3.5 Signály šířitelné vzduchem

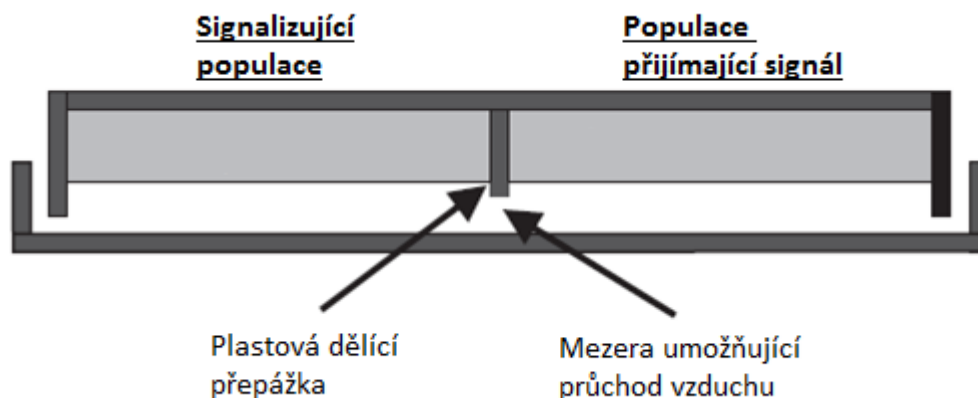
Molekuly, jimiž se bakterie vzájemně ovlivňují, nemusí pouze difundovat médiem, ale mohou se přenášet i plynnou fází. V posledních letech bylo takových případů popsáno několik desítek. Jejich přehled můžeme najít například v práci B. Audraina a jeho spolupracovníků (Audrain et al., 2015). Ve většině studovaných případů se jednalo o interakce mezi bakteriemi různých druhů, ale byly zaznamenány i případy, kdy se pomocí plynných signálů ovlivňovaly bakterie i v rámci jednoho kmene.

Příkladem může být 2-amino acetofenon, který při infekci oportunním patogenem *Pseudomonas aeruginosa*, snižuje virulenci a zprostředkuje přechod ke chronické infekci (Kesarwani et al., 2011), či signál indukující rezistenci k antibiotikům u *E. coli*. - viz dále (Bernier et al., 2011).

### 3.5.1 Vzduchem šířitelný signál indukující rezistenci k antibiotikům

Heal a Parson (2002) se zabývali otázkou, zda mezi dvěma oddělenými populacemi *E. coli* může docházet k signalizaci. Zjistili, že rostoucí populace produkuje signál, který podporuje růst kolonií stejného kmene na médiu obsahujícím ampicilin. Tento signál vydávaly bakterie především během stacionární fáze růstu. Maximální vzdálenost, na kterou signál prokazatelně působil mezi populacemi rostoucími na agarových plotnách, byla cca 2,5 cm.

Pomocí experimentů na dělených Petriho miskách, kde nemohlo docházet k výměně signálních molekul skrze médium (viz **obr. 4**), došli k závěru, že signálem je s největší pravděpodobností molekula šířitelná vzduchem. Pokud bylo výměně vzduchu mezi částmi misky zamezeno pomocí parafilmu, k přenosu signálu již nedocházelo. (Heal a Parsons, 2002)



**Obr. 4** Signalizující a přijímající kultura byly odděleny pomocí plastové přepážky tak, že nemohlo docházet k difuzi signálních molekul agarovým médiem. Výměna vzduchu byla možná díky mezeře mezi přepážkou a víkem Petriho misky. (Převzato z Heal a Parsons, 2002)

Jako molekula zodpovědná za přenos signálu byl o několik let později identifikován amoniak. Zároveň bylo prokázáno, že signál způsobuje zvýšenou rezistenci rovněž vůči tetracyklinu, a že kromě *E. coli* se stejný jev vyskytuje i u dalších bakterií, konkrétně u *P. aeruginosa*, *S. aureus* a *B. subtilis*. (Bernier et al., 2011)

Bylo navrženo vysvětlení, podle kterého přítomnost amoniaku zvyšuje intracelulární koncentraci polyaminů. Zvýšená koncentrace aminů pak snižuje permeabilitu buněčné membrány pro některá antibiotika. (Bernier et al., 2011).

Jiné vysvětlení bylo navrženo J. Čeplem a spolupracovníky. Jejich výsledky naznačují, že spíše než samotné bakterie jsou přítomným amoniakem ovlivňována beta-laktamová antibiotika, která jsou v amoniakem vytvořeném alkalickém prostředí nestabilní. (Čepl et al., 2014) Další výzkumy napovídají, že by se mohlo jednat o souhru obou těchto mechanismů (Létoffé et al., 2014).

### **3.6 Nechemické způsoby komunikace**

Když se zabýváme možnými způsoby komunikace mezi bakteriálními koloniemi, je vhodné uvážit i výzkumy, ve kterých byly popsány fyzikální způsoby komunikace mezi různými eukaryotickými i prokaryotickými buněčnými kulturami. Jednalo se o signalizaci pomocí zvuku (Matsubishi et al., 1998) - viz **kapitola 3.6.1**, či elektromagnetického záření o různých frekvencích.

Podle Reguera (2011) připadá z celé škály elektromagnetického záření pro komunikaci mezi bakteriemi v úvahu především interval od cca 200 nm (blízké ultrafialové záření) do 2500 nm (blízké infračervené záření). Záření o nižší vlnové délce, které má příliš vysokou energii, bakterie při vyšších intenzitách poškozuje, zatímco vlnové délky nad 2500 nm jsou příliš vysoké vzhledem k běžným velikostem bakteriálních buněk. (Reguera, 2011)

Nejrůznější buňky záření z uvedeného intervalu opravdu emitují a v několika případech bylo popsáno jeho uplatnění v bakteriální signalizaci. – např. (Trushin, 2003).

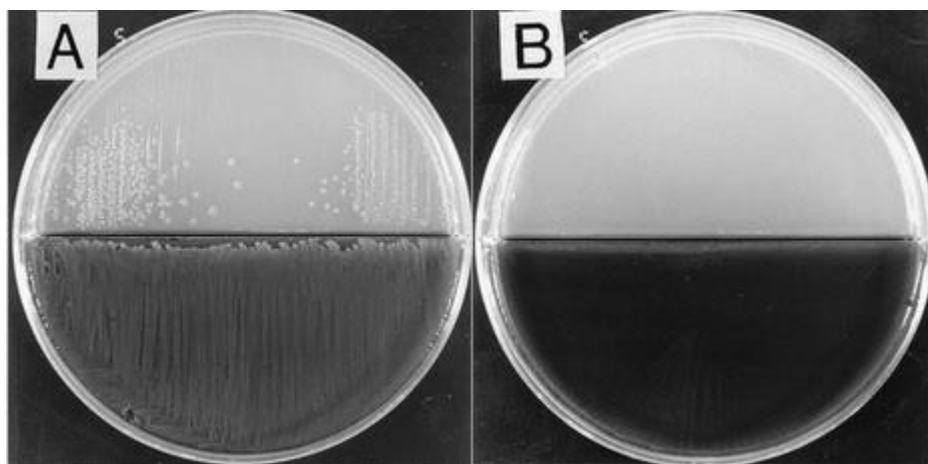
#### **3.6.1 Zvukový signál podporující růst kolonií - *Bacillus carboniphilus***

Matsubishi et al., (1995) izolovali bakteriální kmeny, které při vysokých koncentracích KCl a vysoké teplotě (44°C) - (dále nepermissivní podmínky) vyžadovaly ke svému růstu přítomnost jemných krystalků grafitu. Izolované kmeny náležely k rodu *Bacillus*, byly nazvány *Bacillus carboniphilus* a později byli detailněji popsány. (Fujita et al., 1996)

Kultura *B. carboniphilus* byla dále pěstována na miskách rozdělených v polovině přepážkou. V obou částech misek bylo stejné médium s vysokou koncentrací KCl, avšak pouze v jedné části byl do média přidán grafit.

Na grafitovou část takové misky byla vyseta kultura *B. carboniphilus*, která začala na této části růst. Po jednom dni byla kultura vyseta i na druhou část a miska byla inkubována při 44°C. Kultura začala růst také na této části a to i přesto, že zde nebyl žádný grafit přítomen (viz **obr. 5**). Obdobné experimenty byly se stejným výsledkem zopakovány i v jiném uspořádání, kdy kultury nebyly umístěny v jedné dělené misce, ale ve dvou samostatných uzavřených Petriho miskách, které byly pouze položeny na sobě. Tyto výsledky vedly výzkumníky k závěru, že mezi kulturou s grafitem a kulturou bez grafitu dochází k přenosu signálu. (Matsushashi et al., 1995)

Při dalších pokusech pak byly jako signální použity jiné kultury (*B. subtilis*, *E. coli*, *M. luteus*). V těchto případech byl pozorovaný efekt dokonce silnější, než při použití *B. carboniphilus*. Také se ukázalo, že k dosažení pozitivního účinku na růst kolonií za nepermissivních podmínek není nutná přítomnost grafitu v signál vysílající kultuře. - Stačí, když tato kultura roste na jiném pro ni příznivém médiu, avšak efekt je o něco slabší (Matsushashi et al., 1996)



**Obr. 5** Přenos signálu stimujícího růst kolonií: Grafit obsahující část byla inokulována cca 107 buňkami *B. subtilis* (A) nebo vůbec neinokulována (B). Petriho misky byly inkubovány jeden den a poté byly v obou miskách (A i B) části bez grafitu inokulovány různými kmeny *B. carboniphilus*. Inkubováno další 2 dny při 44°C (Převzato z Matsushashi et al. 1995)

(Matsushashi et al., 1995) z těchto a dalších pozorování vyvozují existenci signálu emitovaného rostoucími bakteriemi, který umožňuje růst kolonií *B. carboniphilus* i na médiu grafit neobsahujícím za podmínek za kterých by bez tohoto signálu růst nemohly. - Signál je tím účinnější, čím vyvinutější jsou emitující kolonie.

Ve snaze určit podstatu tohoto signálu bylo zamezeno výměně vzduchu mezi kulturami, čímž byl vyloučen přenos plynného signálu. V dalších pokusech byly mezi Petriho misky vkládány železné destičky o průměru 30 cm a tloušťce 0.5 až 2 mm. - I přes tyto

destičky bylo zaznamenáno výrazné ovlivnění růstu na nepermissivním médiu. Na základě těchto experimentů autoři vyloučili, že by se jednalo o chemický, tepelný, či elektromagnetický signál a zaměřili se na možnost, že jde o signál zvukový. (Matsushashi et al., 1996)

Měření pomocí velmi citlivého mikrofону potvrdila, že rostoucí kolonie vydávají měřitelný zvuk, který má například pro *B. subtilis* nejvyšší intenzitu při frekvencích cca 8.5, 19, 29 a 37 kHz. Intenzita naměřeného zvuku se pohybovala mezi -120 a -80 dB.

Kultura *B. carboniphilus* byla poté vyseta do nepermissivních podmínek a postupně vystavena zvukovým signálům o různých frekvencích z reproduktoru. Při některých frekvencích byl opravdu zaznamenán zvýšený počet kolonií vyrostlých na médiu. - Efekt byl nejsilnější v rozmezích 6–10, 18–22 a 28–38 kHz, což odpovídá frekvencím vysílaným *B. subtilis* a tedy podporuje hypotézu o růst podporujícím zvukovém signálu. (Matsushashi et al., 1998) Autoři zmiňují, že proběhly i podobné experimenty s jinými bakteriálními kmeny, potvrzující tyto hypotézy, které však nebyly publikovány.

Na publikaci těchto výsledků reagovali (Norris a Hyland, 1997), kteří zpochybňují, že by dané uspořádání experimentů vylučovalo přenos elektromagnetického záření. Skutečnost, že emitující kulturu lze nahradit reproduktorem, podle nich rovněž nutně neznamená, že samotný signál by byl zvukový.

V dostupné literatuře není popsán žádný podobný případ komunikace pomocí zvuku. Několik pozdějších výzkumů prokázalo ovlivnění bakteriálního metabolismu zvukem o srovnatelných frekvencích, avšak intenzita použitého zvuku je vždy řádově vyšší (cca 100 dB), než intenzita zvuku vydávaného koloniemi *B. carboniphilus*. (Sarvaiya a Kothari, 2015; Shaobin et al., 2010)

## 4 Interakce mezi koloniemi stejného druhu

Studií, které by se zabývaly přímo vzájemným ovlivněním dvou bakteriálních kolonií stejného druhu, zatím nevzniklo příliš mnoho. Společným znakem těch, které vznikly, je to, že se všechny týkaly kolonií, které se rozrůstaly pomocí výběžků. Důvodem může být skutečnost, že právě u tohoto typu kolonií je vzájemný vliv nápadný a dobře pozorovatelný.

### 4.1 Vyhýbání výběžků - *Pseudomonas aeruginosa*

Gramnegativní bakterie *Pseudomonas aeruginosa* dokáže využívat v závislosti na prostředí a schopnosti exprese potřebných genů nejméně tři různé mechanismy pohybu. Prvním mechanismem, který bakterie využívá na pevných médiích - například na agarových plotnách s koncentrací agaru vyšší než 0,7% je “**twitching motility**” za použití pilů typu IV (Henrichsen, 1972). Dalším způsobem pohybu, využitelným naopak na velmi vlhkém povrchu, například na médiu s koncentrací agaru do 0,4%, je “**swimming motility**”, při kterém se uplatňuje bičík. (Rashid a Kornberg, 2000) a konečně pak “**swarming motility**” který je využíván na polotuhých médiích - za laboratorních podmínek na plotnách s koncentrací agaru 0,5 - 0,7%.

K indukci pohybu mechanismem swarming motility je u *P. aeruginosa* potřeba souhra několika faktorů. Kromě bičíku jsou zapotřebí pily typu IV, přítomnost určitých aminokyselin (například: glutamátu, aspartátu, hisidinu, či prolinu) jako výhradního zdroje dusíku a přítomnost **rhamnolipidů** - biosurfaktantů produkovaných většinou samotnými buňkami. (Kohler et al., 2000)

Za podmínek, které bakteriím umožňují pohyb mechanismem swarming motility se kolonie rozrůstají do charakteristických vzorů, tvořených nepravidelně se rozvětvojícími výběžky. Bylo prokázáno, že tyto výběžky, které za jiných okolností (u samostatné, prostorově neomezené kolonie) rostou víceméně přímo směrem od středu kolonie, v případě vzájemného přiblížení dvou kolonií mění svůj směr růstu tak, aby se s výběžky sousedních kolonií nesetkaly (viz **obr. 6**). (Caiazza et al., 2005) Tento typ růstu umožňuje komunikace pomocí rhamnolipidů a jejich prekurzorů. Této komunikaci budou věnovány následující odstavce.



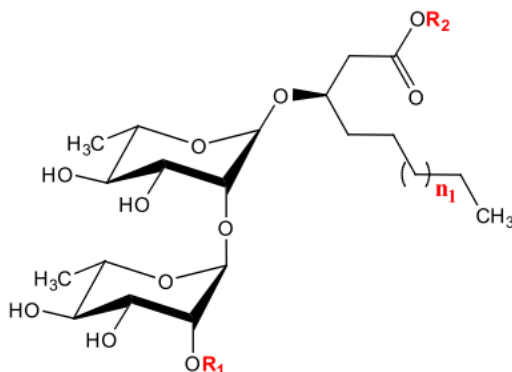
**Obr. 6** Vzájemně se vyhýbající výběžky dvou blízkých kolonií *P. aeruginosa*. - Makrokolonie na 0.5% agaru umožňujícím swarming vyfocené po 24 hodinách růstu. (Převzato z Caiazza et al., 2005)

#### 4.1.1 Rhamnolipidy - dráha syntézy a význam

Rhamnolipidy byly poprvé popsány právě u *P. aeruginosa*, avšak jsou produkovány i mnoha dalšími bakteriemi, nejen rodu *Pseudomonas* (Rooney et al., 2009). Kromě toho, že umožňují swarming, plní i další funkce. Usnadňují příjem těžko rozpustných živin, inhibují růst některých mikroorganismů, působí jako faktory virulence a plní důležitou roli při stavbě biofilmů. (Abdel-Mawgoud et al., 2010)

Struktura rhamnolipidů a dráha jejich syntézy úzce souvisí s jejich vlastnostmi a funkcí a proto se jim zde budu věnovat podrobněji.

Rhamnolipidy jsou glykolipidy složené z L-rhamnózy a 3-hydroxyalkanové kyseliny (HAA). (Jarvis a Johnson, 1949) Podle počtu rhamnóz v molekule rozlišujeme mono-rhamnolipidy a di-rhamnolipidy (viz **obr. 7**), které se pak mezi sebou dále liší v délce a struktuře HAA skupiny. (Déziel et al., 2000)



**Obr. 7** Obecná struktura dirhamnolipidů. (Převzato z Abdel-Mawgoud et al., 2010)

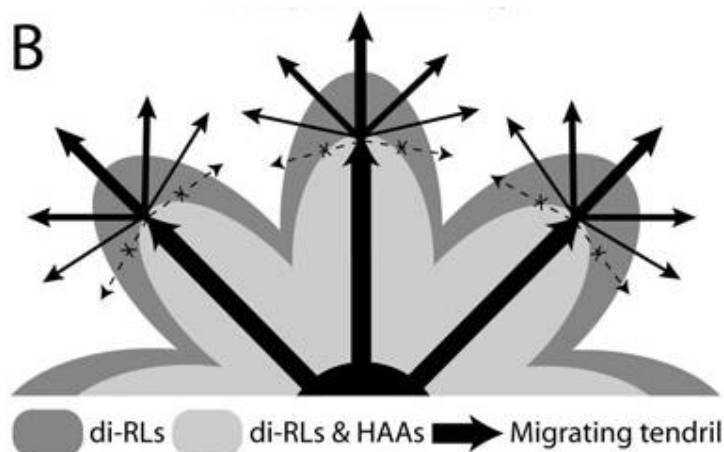
Syntéza rhamnolipidů je u *P. aeruginosa* řízena hned dvěma quorum sensing systémy RhII/RhIR a LasI/LasR (analogickými k systému LuxI/LuxR u rodu *Vibrio*). (Kohler et al., 2000)

Za poslední tři kroky syntézy dirhamnolipidů jsou zodpovědné geny *rhlA*, *rhlB* a *rhlC*. Protein *RhlA* umožňuje vznik molekul HAA, jakožto prekurzorů rhamnolipidů. (Déziel et al., 2003) Rhamnoziltransferáza *RhlB* katalyzuje vznik monorhamnolipidu z HAA a dTDP-L-rhamnózy. (Ochsner et al., 1994) Rhamnoziltransferáza *RhlC* pak katalyzuje vznik di-rhamnolipidu z mono-rhamnolipidu a další dTDP-L-rhamnózy. (Rahim et al., 2001)

#### 4.1.2 Mechanismus vyhýbání výběžků

(Caiazza et al., 2005) prokázali, že vyhýbání výběžků je závislé na syntéze rhamnolipidů a jejich prekurzorů 3-(3-hydroxylalkanoyloxy)karboxylových kyselin (HAAs). Zároveň navrhli model, podle kterého di-rhamnolipidy zabraňují růstu výběžků, zatímco jejich prekurzory HAAs působící jako surfaktanty jsou k jejich růstu nezbytné. Tento model byl o dva roky později přepracován skupinou E. Déziela. Experimenty této skupiny ukazují, že di-rhamnolipidy rostoucí výběžky přitahují, zatímco zvýšené koncentrace HAAs jejich růstu brání. Mono-rhamnolipidy pak slouží čistě jako surfaktant umožňující swarming. Zjevný rozpor s předešlým výzkumem vysvětlují tím, že při něm nebyly použity čisté látky, ale směsi produkované kmeny s dráhou syntézy di-rhamnolipidů (di-RLs) přerušenu v různých částech. (Tremblay et al., 2007)

Dirhamnolipidy, které jsou díky přítomnosti rhamnozové skupiny lépe rozpustné ve vodě, difundují médiem mnohem rychleji než HAAs, proto směrem od kolonie narůstá poměr koncentrací di-RLs/HAAs. (viz **obr. 8**) Díky tomuto gradientu rostou výběžky tak, aby byly v co největší možné vzdálenosti od ostatních výběžků (ať už stejné nebo jiné kolonie).



**Obr. 8** Model růstu výběžků řízeného koncentrací di-rhamnolipidů a HAAs. Výběžky rostou tím směrem, kterým roste poměr koncentrací di-RLs/HAAs. di-RLs difundují mnohem rychleji, než HAAs a proto výběžky rostou směrem od místa inokulace a nikdy se nesetkávají s jinými výběžky. (Převzato z Tremblay et al., 2007)

Při pátrání po genu zodpovědném za popsané chování byl identifikován gen *sadB* jehož mutace měla za následek změnu tvaru kolonií a neschopnost vyhýbaní jejich výběžků. Příčinou byla pravděpodobně snížená schopnost reagovat na HAAs a rhamnolipidy. (Caiazza et al., 2005) Produktem genu *sadB* je cytoplasmatický protein SadB, který hraje mimo jiné i důležitou roli v prvních fázích vzniku biofilmů (Caiazza a O'Toole, 2004). Podle (Caiazza et al., 2007) se SadB společně s proteiny chemotaktického klastru CheIV účastní volby mezi pohybem mechanismem swarming motility a tvorbou biofilmu. Je tedy patrné, že mechanismy, které řídí stavbu biofilmů a komunikaci mezi koloniemi, jsou zde úzce provázané.

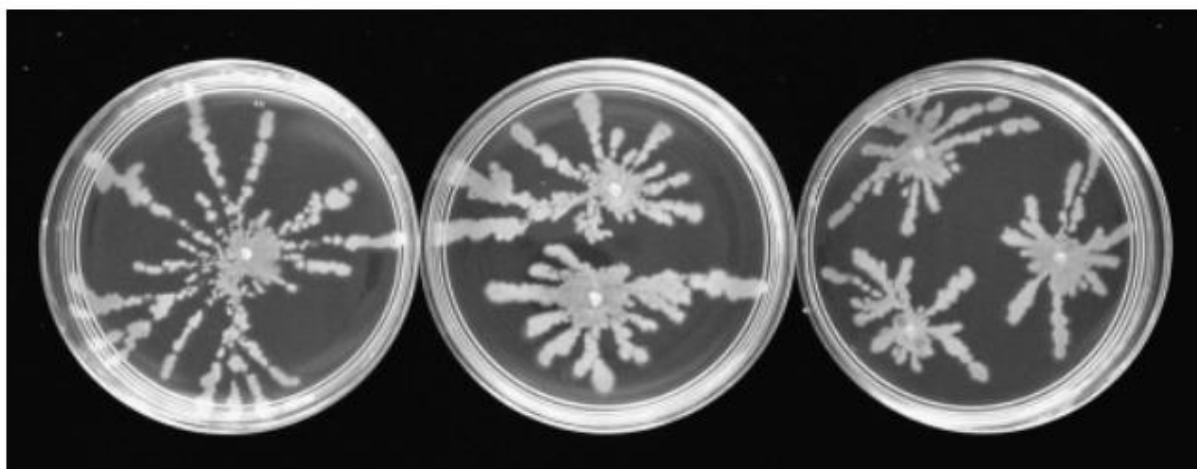
## 4.2 Vyhýbání výběžků - *Bacillus subtilis*

Bylo prokázáno, že schopnost kolonizovat povrchy je u bakterií rodu *Bacillus subtilis* závislá na schopnosti produkovat **surfaktin**. (Kinsinger et al., 2005)

Surfaktin je exolipopeptid produkováný kmeny *B. subtilis* poprvé izolovaný v roce 1968 (Arima et al. 1968). Je to silný surfaktant, obecně se skládající z heptapeptidu a beta-hydroxy mastné kyseliny, který se v přírodě vyskytuje v mnoha izoformách, lišících se jak v sekvenci aminokyselin, tak i v typu a délce mastné kyseliny. (Kowall et al., 1998) Surfaktin je schopný narušovat strukturu a funkci lipidických membrán. Na způsob a míru narušení má vliv jak koncentrace surfaktinu, tak jeho konkrétní izoforma a složení cílové membrány. (Grau et al., 1999)

Za přítomnosti surfaktinu jsou bakterie rodu *B. subtilis* schopny tvořit kolonie s četnými výběžky. Pokud médium obsahuje i dostatek živin, vyplňují se postupně i prostory mezi výběžky a sousední kolonie splývají ve spojitý biofilm. Pokud je nedostatek některé z potřebných živin (například: glycerolu, glutamátu,  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$  a dalších), zůstává prostor mezi výběžky volný. (Fall et al., 2006)

U mutantního bezbičíkatého kmene hag DS64, který při kolonizaci povrchu využívá pohyb zvaný “sliding motility”, bylo při nedostatku živin pozorováno, že výběžky dvou blízkých kolonií se vzájemně vyhýbají a pouze výjimečně dochází k jejich styku. (viz **obr. 9**)



**Obr. 9** Vyhýbající se výběžky *B. subtilis*. (Převzato z James et al. 2009).

Bylo prokázáno, že signálem pro změnu směru růstu výběžků je zvýšená koncentrace surfaktinu v oblasti přibližujících se výběžků. Kolonie kmenů neschopných produkce surfaktinu nevyvolávaly u ostatních kolonií žádnou odpověď, zatímco gradient syntetického surfaktinu vytvořený pomocí surfaktinem napuštěného papírového disku vyvolal obdobnou reakci výběžků okolních kolonií jako přítomnost běžné, surfaktin produkující kolonie.

Dále byl také pomocí transposonové mutagenese identifikován gen *gspA*, který je zodpovědný za schopnost výběžků vyhýbat se místům se zvýšenou koncentrací surfaktinu. Kmeny, mutantní v tomto genu nejsou tohoto vyhýbání schopny. (James et al., 2009)

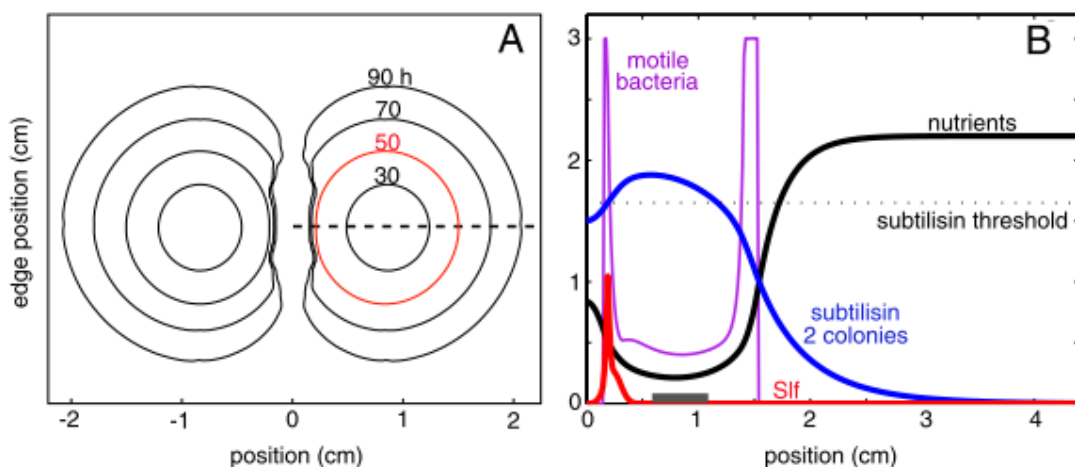
Gen *gspA* (general stress protein A) patří mezi stresové geny závislé na  $\sigma^B$  promotoru. Produktem tohoto genu je protein GspA (33.5 kDa), jehož syntéza se výrazně zvyšuje při vystavení buněk vysoké teplotě, koncentraci solí, či etanolu. (Antelmann et al., 1995; Bernhardt et al., 1997)

### 4.3 Zabíjení sesterských kolonií - *Paenibacillus dendritiformis*

Bakterie rodu *Paenibacillus dendritiformis* jsou schopné vylučovat látky, pomocí kterých ovlivňují morfologii jednotlivých buněk (Be'er et al., 2011) i celé své kolonie a zároveň inhibují růst sousedních kolonií stejného druhu (Be'er et al., 2009). Vylučování a účinky těchto látek jsou do velké míry závislé na přítomnosti různých stresových faktorů, jako je například nízká dostupnost živin či přítomnost některých antibiotik. (Ben-Jacob et al., 2000)

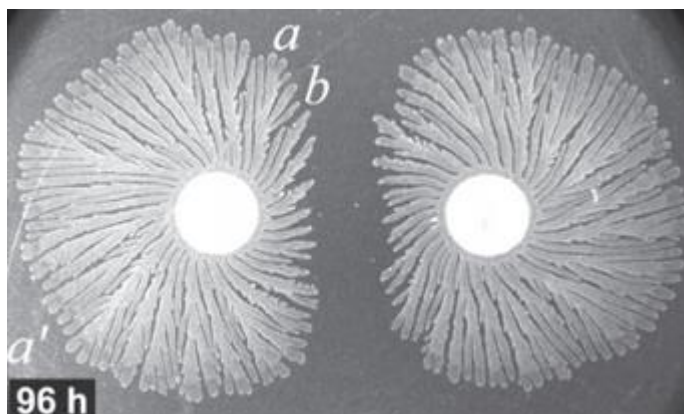
Bylo prokázáno, že buňky *P. dendritiformis* ve stadiu pohyblivých tyčinek rostoucích na nízkovýživném agaru produkují dva proteiny difundující agarem: proteázu **subtilisin** a 20.4kDa protein **DfsB**. Ani jeden z těchto proteinů sám o sobě nepůsobí inhibičně. Subtilisin dokonce díky proteolytické aktivitě podporuje množení buněk a růst kolonií. Avšak nad určitou hranicí koncentrace subtilisin štěpí 20 kDa DfsB na 12 kDa Slf (sibling lethal factor), který působí smrt většiny buněk (Be'er et al., 2010).

V samostatně rostoucí kolonii funguje zpětnovazební mechanismus, který udržuje v částech kolonie, kde se nacházejí pohyblivé bakterie produkující DfsB, takové hladiny subtilisinu, aby nedošlo ke vzniku aktivního Slf. Model tohoto mechanismu byl navržen v práci (Be'er et al., 2010). Přiblížením dvou kolonií se však tento mechanismus naruší, na sousedících stranách kolonií dojde ke zvýšení koncentrace subtilisinu nad prahovou hodnotu a tím k tvorbě Slf (viz **obr. 10**). (Be'er et al., 2010) K podobnému efektu může docházet i v rámci jedné kolonie, například při vysetí do tvaru písmene S (Be'er et al., 2009).



**Obr. 10** (A) Pozice okrajů kolonie po 30, 50, 70 a 90 hodinách růstu. (B) Koncentrace pohyblivých bakterií (fialově), subtilisinu (modře), živin (černě) a Slf (červeně) v kolonii po 50 hodinách růstu. Měřeno podél přerušované čáry naznačené v obrázku A. (Převzato z Be'er et al. 2010)

V důsledku výše popsaných mechanismů tedy při vysetí dvou kolonií do vhodné vzdálenosti dochází nejprve k urychlení růstu na přilehlých stranách díky zvýšené koncentraci subtilisinu a až poté k jeho postupnému zastavení (viz **obr. 11**). Vzájemná vzdálenost, při které k interakcím dojde, závisí na mnoha faktorech jako je složení a tuhost média, přítomnost surfaktantu a antibiotik, či teplota. (Be'er et al., 2010; Ben-Jacob et al., 2000)



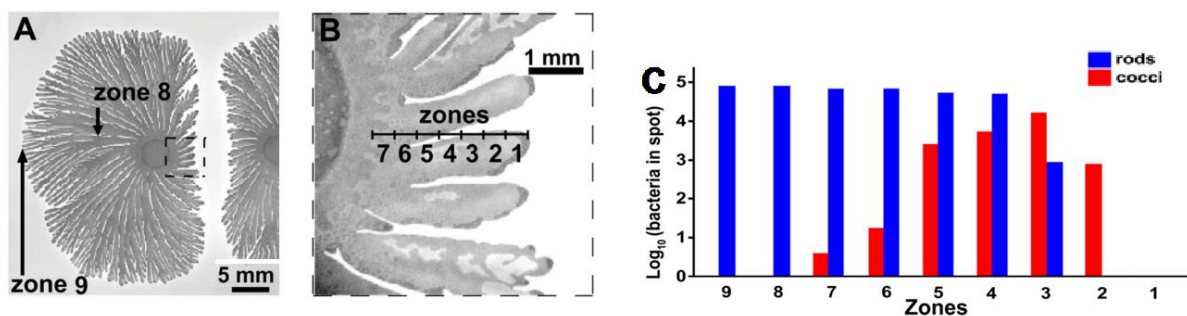
**Obr. 11** Fotografie vedle sebe rostoucích bakteriálních kolonií po 96 hodinách od inokulace. V regionech „a“ růst pokračuje, zatímco v regionu „b“ je zastaven. Konce výběžků v regionu „b“ obsahují pouze mrtvé buňky. (Převzato z Be'er et al., 2009)

#### 4.3.1 Přeměna na Slf-resistantní koky indukovaná nízkou koncentrací Slf

Protein Slf zabíjí všechny buňky ve stádiu pohyblivých tyčinek pouze nad určitou koncentrací. Pod touto koncentrací může způsobovat jejich přeměnu na nepohyblivé koky, které jsou vůči Slf resistantní (viz **obr. 12**). Koky jsou odolnější i vůči osmotickému stresu a penicilinům, což může ukazovat a odlišnosti v struktuře membrány a buněčné stěny.

V porovnání se sporiemi, které dokáže *P. dendritiformis* za jiných podmínek také tvořit, jsou koky sice méně odolné vůči různým vnějším stresům, avšak na rozdíl od nich jsou schopny replikace a průběžného monitorování míry kompetice.

Za podmínek vhodných pro pohyblivé tyčinky dochází k přeměně koků zpět na tyčinky. Tato přeměna je umožněna nepřítomností Slf a indukována faktorem Ris, který produkují za příznivých podmínek v menší míře samotné koky a ve větším množství již přeměněné tyčinky. Izolovaný faktor Ris pravděpodobně není protein, protože se nebarví ninhidrinem ani neabsorbuje záření o vlnové délce 280 nm. (Be'er et al., 2011)



**Obr. 12** (A) Fotografie soupeřících blízko sebe rostoucích kolonií. (B) Zvětšený výřez z fotografie A. (C) Počty CFU na ploše 250x250  $\mu\text{m}$  v zónách označených na obrázcích A a B. (Převzato z Be'er et al. 2011)

#### 4.4 Vliv vzájemné blízkosti kolonií na jejich velikost

Zatímco předchozí odstavce popisují převážně vliv blízkosti dvou kolonií na jejich morfologii, vliv na celkovou velikost zde nebyl uvažován.

Vliv vzájemné blízkosti kolonií na jejich velikost byl zaznamenán mnohokrát, ale nebyla mu věnována zvláštní pozornost. Byl brán spíše jako efekt, kterému je vhodné se vyhnout, aby nezkrášloval výsledky jiných měření. Zaznamenaný vliv byl zpravidla záporný. Vysvětlován byl vzájemným odčerpáváním živin a produkcí odpadních látek. (Guillier et al., 2006; Thomas et al., 1997)

Jako jedni z mála se tomuto vlivu blíže věnovali Chapuis et al., (1995). Sledovali závislost rychlosti růstu kolonií devíti bakteriálních a dvou kvasinkových kmenů na hustotě výsevu. Průběh závislosti se mezi kmeny někdy i celkem výrazně lišil, ale vždy platilo, že čím byla hustota vyšší, tím byl průměr kolonií nižší. Na základě těchto výsledků byl odvozen vztah pro poloměr kolonie, ve kterém kromě počtu kolonií na plotně vystupují i 4 parametry vztahující se ke konkrétním kmenům. Prvními dvěma parametry jsou minimální a maximální průměr kolonií. Další dva parametry nemají přímý biologický význam a vycházejí z tvaru křivky závislosti poloměru kolonií na hustotě výsevu u daného kmene. (Chapuis et al., 1995)

## 5 Hodnocení růstu kolonií

### 5.1 Měření plochy kolonie

Měření plochy kolonií je dnes již převážně věcí za tímto účelem vytvořených softwarů. Přehled některých z nich můžeme najít například v práci (Puchkov, 2010). Obraz plotny s koloniemi je většinou získán pomocí fotoaparátu (Guillier et al., 2006; Moserová, 2010), či skeneru, který zaznamenává odražené světlo (Ernebjerg a Kishony, 2012). Byly však představeny i metody, při kterých je pomocí skenovacího paprsku měřena optická denzita v jednotlivých bodech plotny (Mertens et al., 2012).

Obraz plotny, ať už získaný jakkoli, je poté zpravidla převeden pomocí obrazového softwaru na obraz černobílý (binární), kde je každému bodu (pixelu) jednoznačně přiřazeno, zda je, či není součástí nějaké kolonie. Plocha kolonie je pak určena počtem bodů této kolonie. Obdobně bývá určena i vzájemná vzdálenost kolonií. (Guillier et al., 2006; Mertens et al., 2012)

### 5.2 Určování počtu buněk v kolonii

Plochu, kterou daná kolonie zaujímá, lze snadno měřit a porovnávat mezi jednotlivými koloniemi, avšak není to veličina, která by vždy plně vypovídala o počtu buněk či množství biomasy. Vztahy mezi těmito veličinami závisí jak na konkrétním kmenu, tak i na použitém médiu a dalších podmínkách. (Palumbo et al., 1971)

V některých případech je vztah mezi plochou kolonie a počtem buněk poměrně jednoduchý. Například u *Listeria monocytogenes* a *Yersinia enterocolitica* byla prokázána přímá úměra mezi dekadickým logaritmem plochy kolonie a dekadickým logaritmem počtu jednotek tvořících kolonii (CFU). (Guillier et al., 2006; Harrison et al., 2000) Jindy může být tento vztah výrazně složitější, zvláště pokud kolonie nejsou ploché. V následujících odstavcích budou proto stručně popsány některé metody, které se dají využít při určování počtu buněk v kolonii, či při určování celkové biomasy.

Většina metod, kterými je určován počet buněk v jednotlivých koloniích, spočívá v převedení kolonie do formy tekuté suspenze a následném určení počtu buněk metodami,

které jsou běžné pro tekuté kultury. Kolonie jsou většinou setřeny z povrchu (Harrison et al., 2000), či vyříznuty i s částí média (Guillier et al., 2006) a homogenizovány v malém množství vody, či média, podle toho, jaké metody mají být dále použity.

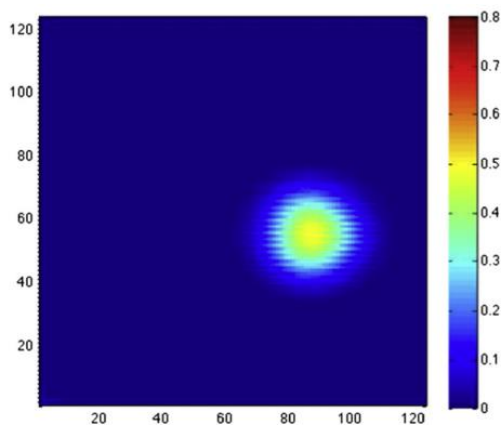
Poté je nejčastěji určeno množství živých buněk pomocí **určení počtu kolonií tvořících jednotek** (v angličtině colony forming units – **CFU**). Tato metoda vychází z předpokladu, že při vysetí buněčné suspenze na vhodné živné médium dá každá živá buňka vzniknout právě jedné kolonii. Metoda je většinou poměrně přesná, avšak její nevýhodou je pracnost a časová náročnost. (Guillier et al., 2006; Harrison et al., 2000; Stecchini et al., 1998)

Další používanou metodou je určení počtu buněk pomocí měření **optické denzity** suspenze (Begot et al., 1996; Pérez-Pascual et al., 2009). Tato metoda je podstatně méně časově náročná, avšak není tak přesná jako předchozí a vypovídá spíše o množství vytvořené biomasy, než o počtu živých buněk.

V rámci různých studií zabývajících se bakteriálními, či kvasinkovými koloniemi byly vyvinuty i další metody, které by mohly být využity i při sledování a vzájemném porovnávání jejich růstu. Některé z nich zde budou také stručně popsány.

### 5.2.1 Měření optické denzity kolonií

Tato metoda spočívá v měření optické denzity v jednotlivých bodech plotny. Výstupem je pak mapa optické denzity kolonie (viz **obr. 13**). Tato metoda byla využívána při určování plochy kolonie (Mertens et al., 2012), či při porovnávání morfologie kolonií různých bakterií (Kim et al., 2014), ale jak navrhuje Mertens, mohla by být v budoucnu využita i k přibližnému určení výšky kolonie v jednotlivých bodech.



**Obr. 13** Mapa optické denzity kolonie. (Převzato z Mertens et al., 2012)

## 5.2.2 Trojrozměrná rekonstrukce kolonií

Do dnešní doby vzniklo vícero prací, které se zabývaly 3D rekonstrukcí bakteriálních či kvasinkových biofilmů a kolonií. Většina z nich se zabývala spíše uspořádáním buněk v kolonii, avšak metody v nich použité by mohly být u některých kolonií využity i k poměrně přesnému určení jejich celkového počtu.

Tyto metody využívají různé typy mikroskopie jako je například skenovací elektronová mikroskopie (Afrikian et al., 1973), skenovací konfokální laserová mikroskopie (Kim et al., 2014; Lawrence et al., 1991), či dvoufotonová excitační konfokální mikroskopie (Váchová et al., 2009)

Nevýhodou těchto metod je kromě vysokých požadavků na přístrojové vybavení především to, že je lze použít pouze pro kolonie do určité tloušťky.

## 5.3 Hodnocení vzájemného vlivu blízkých kolonií

Nejjednodušší metodou používanou k určení vzájemného vlivu blízkých kolonií je určení závislosti plochy kolonií na hustotě výsevu (průměrné vzájemné vzdálenosti). Tento přístup byl využit v převážné většině prací, které se tímto vlivem zabývaly. (Chapuis et al., 1995; Thomas et al., 1997).

Mnohem přesnější výsledky však můžeme získat, pokud budeme posuzovat vliv ostatních kolonií na každou kolonii jednotlivě. Takový přístup byl kromě již zmiňované práce A. Moserové i v práci L. Guillera.

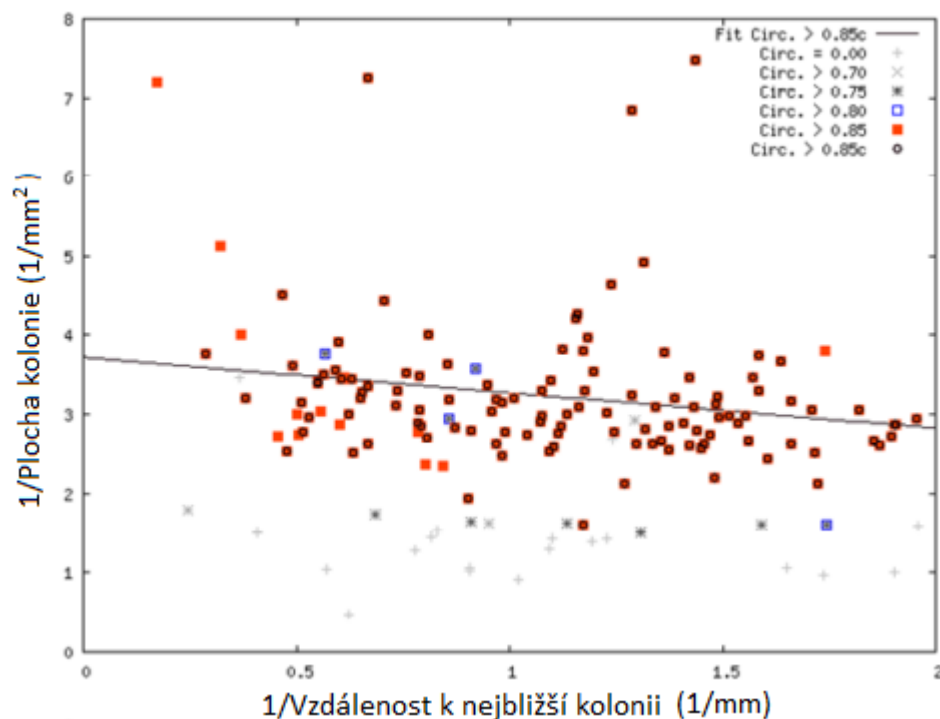
V práci A. Moserové byl vzájemný vliv blízkých kolonií hodnocen pomocí skriptu napsaného R. Fišerem. Pro každou kolonii byla určena její plocha a její vzdálenost od nejbližší kolonie. Poté byl sestaven graf, ve kterém byla **reciproká plocha** kolonie vynesena proti její **reciproké vzdálenosti** od nejbližší kolonie (viz obr. 14). Body grafu byla následně proložena přímkou, jejíž směrnice pak byla odečtena.

Kladná směrnice odpovídala pozitivnímu ovlivnění blízkými koloniemi, záporná ovlivnění negativnímu.

Aby se předešlo zkreslení způsobenému koloniemi mimo záběr snímku a koloniemi vzniklými spojením více kolonií, byly do analýzy zařazeny pouze dostatečně cirkulární kolonie nacházející se dostatečně daleko od okraje snímku. - Vliv nevyhovujících kolonií však byl zahrnut pro hodnocení ostatních kolonií. (Moserová, 2010)

Výhodou tohoto přístupu je jeho jednoduchost a především to, že pro daný bakteriální kmen získáme jednu konkrétní hodnotu směrnice, kterou pak můžeme mezi kmeny snadno porovnávat. Navíc lze z grafu jednoduše vyčíst, jakou průměrnou velikost by měly kolonie, pokud by od sebe byly tak daleko, že by se vzájemně vůbec neovlivňovaly.

Nevýhodou pak je chyba, která může vzniknout, pokud se v blízkosti posuzované kolonie nachází více podobně vzdálených kolonií. Otázkou je, jak významná tato chyba je pro výslednou hodnotu směrnice.



**Obr. 14** Příklad získaného grafu. - Graf závislosti recipročních hodnot ploch kolonií na recipročních hodnotách jejich vzdálenosti od nejbližšího souseda u *A. aureus* po 11 hodinách po objevení prvních viditelných kolonií. (Převzato z Moserová, 2010)

Guillier a kolektiv ve své práci představili metodu, kterou lze měřit trvání lag fáze bakterií rostoucích na pevném povrchu. V rámci této práce zaznamenali významný vliv vzdálenosti dvou blízkých kolonií bakterie *Listeria monocytogenes* na rychlost jejich růstu.

K posouzení vlivu blízkých kolonií byl použit algoritmus, který každé kolonii přiřadil koeficient získaný jako součet ploch blízkých kolonií dělených jejich vzdáleností. - Jako blízké kolonie zde byly brány všechny kolonie vzdálené méně než 1 cm od středu posuzované kolonie. Vzdálenější kolonie běžné velikosti by podle výsledků získaných ve stejné práci neměli mít na růst kolonií výraznější vliv. (Guillier et al., 2006)

Zde je výhodou především to, že tento algoritmus bere v úvahu všechny blízké kolonie a jejich plochu. Nenabízí však žádnou veličinu, která by se dala použít při vzájemném porovnávání kmenů.

## 6 Závěr

Výsledné vzájemné působení dvou blízko sebe rostoucích bakteriálních kolonií je zpravidla dáno více vlivy. Tyto vlivy mohou na růst kolonií působit jak negativně tak i pozitivně. Mezi vlivy působící na růst kolonií jednoznačně negativně patří soupeření o dostupné zdroje živin a produkce odpadních látek inhibujících růst. Pozitivně je růst kolonií ovlivněn především sdílením takzvaných veřejných statků.

Významnou roli při interakci blízkých kolonií hraje také signalizace, která často probíhá mechanismem quorum sensing - tedy je zprostředkovávána extracelulárními signálními molekulami (autoinduktory), které vyvolávají odpověď až po dosažení určité prahové koncentrace. K dosažení této koncentrace je zpravidla zapotřebí většího množství signalizujících buněk. Signalizace většinou umožňuje jednotlivým buňkám reagovat na danou situaci tak, aby to bylo výhodné pro celou populaci.

Z několika málo podrobněji popsanych případů ovlivňování dvou kolonií plyne, že mechanismy působící na růst kolonií pozitivně a negativně mohou být velmi úzce provázané. Pozitivní i negativní efekty dokonce mohou být dokonce zprostředkovány jednou a tou samou látkou, pouze v rozdílné koncentraci. Tento jev byl zřetelně zaznamenán například u *Peñibacillus dendritiformis*, kde zvýšená koncentrace subtilisinu nejprve podporuje růst na přilehlých stranách blízkých kolonií, avšak později je příčinou vzniku Slf (sibling lethal factor), který růst zastavuje.

V přírodě bakterie většinou žijí v rámci společenství složených z mnoha různých druhů, proto zde interakce mezi koloniemi jednoho druhu téměř nemůžeme pozorovat. Přesto může být jejich objasnění velmi přínosné k pochopení chování bakterií v širším kontextu. Samotné interakce mezi blízkými koloniemi jsou pak zajímavé například v souvislosti s ušlechtilými bakteriemi pěstovanými záměrně na povrchu některých potravin.

Jak již bylo řečeno, práci zabývajících se přímo vzájemným vlivem blízkých bakteriálních kolonií vzniklo do dnešního dne relativně málo a téměř žádná z nich se tento vliv nesnažila porovnávat napříč kmeny. Jako jediný s větším množstvím kmenů pracoval Chapuis et al., (1995). V této práci byl u všech sledovaných kmenů zaznamenán pouze negativní vliv vzájemné blízkosti. V průběhu závislosti průměrného poloměru kolonie na hustotě výsevu však byly mezi kmeny značné rozdíly.

I když se má práce zabývala výhradně koloniemi bakteriálními, za pozornost stojí i několik výzkumů, které se zabývaly interakcemi mezi koloniemi kvasinkovými, jelikož jejich

stavba i fungování je v určitých ohledech velmi podobná. (Flagfeldt et al., 2009; Palková et al., 1997)

Souvislostí mezi životní strategií a vlivem blízkosti kolonií na jejich růst se podle dostupné literatury dosud nikdo nezabýval, proto si myslím, že metoda navržená v práci A. Moserové by mohla v budoucnu přinést velmi zajímavé výsledky. Je však třeba mít na paměti několik věcí. Zaprvé to, že plocha kolonie nemusí být vždy úměrná počtu buněk (zvláště u bakterií schopných pohybu a chemotaxe, či u těch, které tvoří vystouplé kolonie). Dále pak to, že vzájemný vliv dvou kolonií se může během jejich růstu a vývoje značně proměňovat a že tento vliv nezávisí pouze na daném kmenu a vzdálenosti, ale také na podmínkách, ve kterých jsou kolonie pěstovány.

## 7 Přehled použité literatury

- Abdel-Mawgoud, A.M., Lépine, F., Déziel, E., 2010. Rhamnolipids: Diversity of structures, microbial origins and roles. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86, 1323–1336. doi:10.1007/s00253-010-2498-2
- Adler, J., 1966. Chemotaxis in Bacteria. *Adv. Sci.* 153, 708–716.
- Afrikan, E.G., St Julian, G., Bulla, L. a, 1973. Scanning electron microscopy of bacterial colonies. *Appl. Microbiol.* 26, 934–937.
- Antelmann, H., Bernhardt, J., Schmid, R., Hecker, M., 1995. A gene at 333° on the *Bacillus subtilis* chromosome encodes the newly identified sigma(B)-Dependent general stress protein GspA. *J. Bacteriol.* 177, 3540–3545.
- Audrain, B., Farag, M. a., Ryu, C.-M., Ghigo, J.-M., 2015. Role of bacterial volatile compounds in bacterial biology. *FEMS Microbiol. Rev.* doi:10.1093/femsre/fuu013
- Bassler, B.L., Wright, M., Showalter, R.E., Silverman, M.R., 1993. Intercellular signalling in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes regulating expression of luminescence. *Mol. Microbiol.* 9, 773–786. doi:10.1111/j.1365-2958.1993.tb01737.x
- Be'er, A., Ariel, G., Kalisman, O., Helman, Y., Sirota-Madi, A., Zhang, H.P., Florin, E.-L., Payne, S.M., Ben-Jacob, E., Swinney, H.L., 2010. Lethal protein produced in response to competition between sibling bacterial colonies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 6258–6263. doi:10.1073/pnas.1001062107
- Be'er, A., Florin, E.L., Fisher, C.R., Swinney, H.L., Payne, S.M., 2011. Surviving bacterial sibling rivalry: Inducible and reversible phenotypic switching in *paenibacillus dendritiformis*. *MBio* 2, 1–6. doi:10.1128/mBio.00069-11
- Be'er, A., Zhang, H.P., Florin, E.-L., Payne, S.M., Ben-Jacob, E., Swinney, H.L., 2009. Deadly competition between sibling bacterial colonies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 428–433. doi:10.1073/pnas.0811816106
- Begot, C., Desnier, I., Daudin, J.D., Labadie, J.C., Lebert, A., 1996. Recommendations for calculating growth parameters by optical density measurements. *J. Microbiol. Methods* 25, 225–232. doi:10.1016/0167-7012(95)00090-9
- Ben-Jacob, E., Cohen, I., Golding, I., Gutnick, D.L., Tcherpakov, M., Helbing, D., Ron, I.G., 2000. Bacterial cooperative organization under antibiotic stress. *Phys. A Stat. Mech. its Appl.* 282, 247–282. doi:10.1016/S0378-4371(00)00093-5
- Bernhardt, J., Völker, U., Völker, a, Antelmann, H., Schmid, R., Mach, H., Hecker, M., 1997. Specific and general stress proteins in *Bacillus subtilis*--a two-dimensional protein electrophoresis study. *Microbiology* 143, 999–1017. doi:10.1099/00221287-143-3-999
- Bernier, S.P., Létoffé, S., Delepierre, M., Ghigo, J.M., 2011. Biogenic ammonia modifies antibiotic resistance at a distance in physically separated bacteria. *Mol. Microbiol.* 81, 705–716. doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07724.x
- Biswa, P., Doble, M., 2013. Production of acylated homoserine lactone by Gram-positive bacteria isolated from marine water. *FEMS Microbiol. Lett.* 343, 34–41. doi:10.1111/1574-6968.12123

- Branda, S.S., González-Pastor, J.E., Ben-Yehuda, S., Losick, R., Kolter, R., 2001. Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 11621–6. doi:10.1073/pnas.191384198
- Budrene, E.O., Berg, H.C., 1991. Complex patterns formed by motile cells of *Escherichia coli*. *Nature* 349, 630–633. doi:10.1038/349630a0
- Caiazza, N.C., Merritt, J.H., Brothers, K.M., O’Toole, G. a., 2007. Inverse regulation of biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *J. Bacteriol.* 189, 3603–3612. doi:10.1128/JB.01685-06
- Caiazza, N.C., O’Toole, G. a., 2004. SadB is required for the transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *J. Bacteriol.* 186, 4476–4485. doi:10.1128/JB.186.14.4476-4485.2004
- Caiazza, N.C., Shanks, R.M.Q., O’Toole, G. a., 2005. Rhamnolipids modulate swarming motility patterns of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 187, 7351–7361. doi:10.1128/JB.187.21.7351-7361.2005
- Čepl, J., Blahůšková, A., Cvrčková, F., Markoš, A., 2014. Ammonia produced by bacterial colonies promotes growth of ampicillin-sensitive *Serratia* sp. by means of antibiotic inactivation. *FEMS Microbiol. Lett.* 354, 126–132. doi:10.1111/1574-6968.12442
- Déziel, E., Lépine, F., Milot, S., Villemur, R., 2003. rhlA is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiology* 149, 2005–2013. doi:10.1099/mic.0.26154-0
- Déziel, E., Lépine, F., Milot, S., Villemur, R., 2000. Mass spectrometry monitoring of rhamnolipids from a growing culture of *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1485, 145–152. doi:10.1016/S1388-1981(00)00039-1
- Eberhard, a, Burlingame, a L., Eberhard, C., Kenyon, G.L., Nealson, K.H., Oppenheimer, N.J., 1981. Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. *Biochemistry* 20, 2444–2449. doi:10.1021/bi00512a013
- Engbrecht, J., Silverman, M., 1984. Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 4154–4158. doi:10.1073/pnas.81.13.4154
- Ernebjerg, M., Kishony, R., 2012. Distinct growth strategies of soil bacteria as revealed by large-scale colony tracking. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 1345–1352. doi:10.1128/AEM.06585-11
- Fall, R., Kearns, D.B., Nguyen, T., 2006. A defined medium to investigate sliding motility in a *Bacillus subtilis* flagella-less mutant. *BMC Microbiol.* 6, 31. doi:10.1186/1471-2180-6-31
- Flagfeldt, D.B., Siewers, V., Huang, L., Nielsen, J., 2009. Characterization of chromosomal integration sites for heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 26, 545–551. doi:10.1002/yea
- Fujita, T., Shida, O., Takagi, H., Kunugita, K., Pankrushina, a. N., Matsushashi, M., 1996. Description of *Bacillus carboniphilus* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 116–118. doi:10.1099/00207713-46-1-116

- Gilmore, M.S., Haas, W., 2005. The selective advantage of microbial fratricide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 8401–8402. doi:10.1073/pnas.0503828102
- González-Pastor, J.E., Stevick, P.T., Soule, M., Ayala, F.J., 2003. Cannibalism by Sporulating Bacteria. *Science* (80- ). 301, 510–513.
- Grau, A., Gómez Fernández, J.C., Peypoux, F., Ortiz, A., 1999. A study on the interactions of surfactin with phospholipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1418, 307–319. doi:10.1016/S0005-2736(99)00039-5
- Guillier, L., Pardon, P., Augustin, J.C., 2006. Automated image analysis of bacterial colony growth as a tool to study individual lag time distributions of immobilized cells. *J. Microbiol. Methods* 65, 324–334. doi:10.1016/j.mimet.2005.08.007
- Harrison, W.A., Peters, A.C., Fielding, L.M., 2000. Growth of *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* colonies under modified atmospheres at 4 and 8 degrees C using a model food system. *J. Appl. Microbiol.* 88, 38–43. doi:10.1046/j.1365-2672.2000.00848.x
- Harshey, R.M., 2003. Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annu. Rev. Microbiol.* 57, 249–273. doi:10.1146/annurev.micro.57.030502.091014
- Håvarstein, L.S., Coomaraswamy, G., Morrison, D. a, 1995. An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 11140–11144. doi:10.1073/pnas.92.24.11140
- Heal, R.D., Parsons, a. T., 2002. Novel intercellular communication system in *Escherichia coli* that confers antibiotic resistance between physically separated populations. *J. Appl. Microbiol.* 92, 1116–1122. doi:10.1046/j.1365-2672.2002.01647.x
- Henrichsen, J., 1972. Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriol. Rev.* 36, 478–503.
- Hoyle, B., Jass, J., Costerton, J.W., 1983. The biofilm glycocalyx as a resistance factor. *J. Antimicrob. Chemother.* 12, 529–532.
- Huber, B., Riedel, K., Hentzer, M., Heydorn, a., Gotschlich, a., Givskov, M., Molin, S., Eberl, L., 2001. The cep quorum-sensing system of *Burkholderia cepacia* H111 controls biofilm formation and swarming motility. *Microbiology* 147, 2517–2528.
- Chapuis, C., Rosso, L., Flandrois, J.P., 1995. Relationship between colonial surface and density on agar plate. *J. Appl. Bacteriol.*
- Chen, X., Schauder, S., Potier, N., Van Dorsselaer, A., Pelczer, I., Bassler, B.L., Hughson, F.M., 2002. Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature* 415, 545–549. doi:10.1038/415545a
- Ingham, C.J., Ben Jacob, E., 2008. Swarming and complex pattern formation in *Paenibacillus vortex* studied by imaging and tracking cells. *BMC Microbiol.* 8, 36. doi:10.1186/1471-2180-8-36
- James, B.L., Kret, J., Patrick, J.E., Kearns, D.B., Fall, R., 2009. Growing *Bacillus subtilis* tendrils sense and avoid each other: Research letter. *FEMS Microbiol. Lett.* 298, 12–19. doi:10.1111/j.1574-6968.2009.01665.x

- Jarvis, F.G., Johnson, M.J., 1949. A Glyco-lipide Produced by *Pseudomonas Aeruginosa*. *J. Am. Chem. Soc.* 71, 4124–4126. doi:10.1021/ja01180a073
- Julou, T., Mora, T., Guillon, L., Croquette, V., Schalk, I.J., Bensimon, D., Desprat, N., 2013. Cell-cell contacts confine public goods diffusion inside *Pseudomonas aeruginosa* clonal microcolonies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 12577–82. doi:10.1073/pnas.1301428110
- Kesarwani, M., Hazan, R., He, J., Que, Y., Apidianakis, Y., Lesic, B., Xiao, G., Dekimpe, V., Milot, S., Deziel, E., Lépine, F., Rahme, L.G., 2011. A quorum sensing regulated small volatile molecule reduces acute virulence and promotes chronic infection phenotypes. *PLoS Pathog.* 7. doi:10.1371/journal.ppat.1002192
- Kim, H., Singh, A.K., Bhunia, A.K., Bae, E., 2014. Laser-induced speckle scatter patterns in *Bacillus* colonies. *Front. Microbiol.* 5, 1–9. doi:10.3389/fmicb.2014.00537
- Kinsinger, R.F., Kearns, D.B., Hale, M., Fall, R., 2005. Genetic requirements for potassium ion-dependent colony spreading in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 187, 8462–8469. doi:10.1128/JB.187.24.8462-8469.2005
- Kohler, T., Curty, L.K., Barja, F., Van Delden, C., Pechere, J.C., 2000. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J. Bacteriol.* 182, 5990–5996. doi:10.1128/JB.182.21.5990-5996.2000
- Kowall, M., Vater, J., Kluge, B., Stein, T., Franke, P., Ziessow, D., 1998. Separation and Characterization of Surfactin Isoforms Produced by *Bacillus subtilis* OKB 105. *J. Colloid Interface Sci.* 204, 1–8. doi:10.1006/jcis.1998.5558
- Kümmerli, R., Griffin, A.S., West, S. a, Buckling, A., Harrison, F., 2009. Viscous medium promotes cooperation in the pathogenic bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Biol. Sci.* 276, 3531–3538. doi:10.1098/rspb.2009.0861
- Lawrence, J., Korber, D., Hoyle, B., Costerton, J., Caldwell, D., 1991. Optical Sectioning of Microbial Biofilms. *J. Bacteriol.* 173, 6558–6567.
- Létoffé, S., Audrain, B., Bernier, S.P., Delepierre, M., Ghigo, J.M., 2014. Aerial exposure to the bacterial volatile compound trimethylamine modifies antibiotic resistance of physically separated bacteria by raising culture medium pH. *MBio* 5, 1–12. doi:10.1128/mBio.00944-13
- MacArthur, R.A., Wilson, E.O., 1967. *The theory of island biogeography*, Princeton. Princeton University press, Princeton.
- Matsushashi, M., Pankrushina, a. N., Endoh, K., Watanabe, H., Mano, Y., Hyodo, M., Fujita, T., Kunugita, K., Kaneko, T., Otani, S., 1995. Studies on carbon material requirements for bacterial proliferation and spore germination under stress conditions: A new mechanism involving transmission of physical signals. *J. Bacteriol.* 177, 688–693.
- Matsushashi, M., Pankrushina, A.N., Endoh, K., Watanabe, H., Ohshima, H., Tobi, M., Endo, S., Mano, Y., Hyodo, M., Kaneko, T., Otani, S., Yosimura, S., 1996. *Bacillus carboniphilus* cells respond to growth-promoting physical signals from cells of homologous and heterologous bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* doi:10.2323/jgam.42.315
- Matsushashi, M., Pankrushina, A.N.L., Takeuchi, S., Ohshima, H., Miyoi, H., Endoh, K., Murayama, K., Watanabe, H., Endo, S., Tobi, M., Mano, Y., Hyodo, M., Kobayashi, T., Kaneko, T., Otani,

- S., Yoshimura, S., Harata, A., Sawada, T., 1998. Production of sound waves by bacterial cells and the response of bacterial cells to sound. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 44, 49–55.
- Matsushita, M., Wakita, J., Itoh, H., Watanabe, K., Arai, T., Matsuyama, T., Sakaguchi, H., Mimura, M., 1999. Formation of colony patterns by a bacterial cell population. *Phys. A Stat. Mech. its Appl.* 274, 190–199. doi:10.1016/S0378-4371(99)00328-3
- Mertens, L., Van Derlinden, E., Van Impe, J.F., 2012. A novel method for high-throughput data collection in predictive microbiology: Optical density monitoring of colony growth as a function of time. *Food Microbiol.* 32, 196–201. doi:10.1016/j.fm.2012.04.001
- Miller, M.B., Bassler, B.L., 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 55, 165–199. doi:10.1146/annurev.micro.55.1.165
- Moscoso, M., Claverys, J.P., 2004. Release of DNA into the medium by competent *Streptococcus pneumoniae*: Kinetics, mechanism and stability of the liberated DNA. *Mol. Microbiol.* 54, 783–794. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04305.x
- Moserová, A., 2010. Fyziologické rozdíly mezi r a K-strategií u bakterií. Univerzita Karlova v Praze.
- Nealson, K.H., Hastings, J.W., 1979. Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiol. Rev.* 43, 496–518.
- Nealson, K.H., Platt, T., Hastings, J.W., 1970. Cellular Control of the Synthesis and Activity of the Bacterial Luminescent System I. *J. Bacteriol.* 104, 313–322.
- Norris, V., Hyland, G.J., 1997. Do bacteria sing? *Mol. Microbiol.* 24, 879–883.
- Ochsner, U. a., Fiechter, A., Reiser, J., 1994. Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas aeruginosa* rhlAB genes encoding a rhamnopolysaccharide transferase involved in rhamnolipid biosurfactant synthesis. *J. Biol. Chem.* 269, 19787–19795.
- Palková, Z., Janderová, B., Gabriel, J., Zikánová, B., Pospíšek, M., Forstová, J., 1997. Ammonia mediates communication between yeast colonies. *Nature* 390, 532–536. doi:10.1038/37398
- Palumbo, S. a, Johnson, M.G., Rieck, V.T., Witter, L.D., 1971. Growth measurements on surface colonies of bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 66, 137–143. doi:10.1099/00221287-66-2-137
- Pérez-Pascual, D., Menéndez, A., Fernández, L., Méndez, J., Reimundo, P., Navais, R., Guijarro, J. a., 2009. Spreading versus biomass production by colonies of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*: Role of the nutrient concentration. *Int. Microbiol.* 12, 207–214. doi:10.2436/20.1501.01.100
- Pianka, E., 1970. On r- and K-selection 130, 526–543. doi:10.2307/2678832
- Pirt, S.J., 1966. A kinetic study of the Mode of Growth of Surface Colonies of Bacteria and Fungi. *J. Solid State Chem.* 34, 315–322. doi:10.1016/0022-4596(80)90429-6
- Puchkov, E.O., 2010. Computer image analysis of microbial colonies. *Microbiology* 79, 141–146. doi:10.1134/S0026261710020025
- Rahim, R., Ochsner, U. a., Olvera, C., Graninger, M., Messner, P., Lam, J.S., Soberón-Chávez, G., 2001. Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* rhlC gene that

- encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis. *Mol. Microbiol.* 40, 708–718. doi:10.1046/j.1365-2958.2001.02420.x
- Rashid, M.H., Kornberg, a, 2000. Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 4885–4890. doi:10.1073/pnas.060030097
- Redfield, R.J., 2002. Is quorum sensing a side effect of diffusion sensing? *Trends Microbiol.* 10, 365–370. doi:10.1016/S0966-842X(02)02400-9
- Reguera, G., 2011. When microbial conversations get physical. *Trends Microbiol.* 19, 105–113. doi:10.1016/j.tim.2010.12.007
- Rooney, A.P., Price, N.P.J., Ray, K.J., Kuo, T.M., 2009. Isolation and characterization of rhamnolipid-producing bacterial strains from a biodiesel facility. *FEMS Microbiol. Lett.* 295, 82–87. doi:10.1111/j.1574-6968.2009.01581.x
- Samprovalaki, K., Robbins, P.T., Fryer, P.J., 2012. Investigation of the diffusion of dyes in agar gels. *J. Food Eng.* 111, 537–545. doi:10.1016/j.jfoodeng.2012.03.024
- Sarvaiya, N., Kothari, V., 2015. Effect of audible sound in form of music on microbial growth and production of certain important metabolites. *Microbiology* 84, 227–235. doi:10.1134/S0026261715020125
- Shaobin, G., Wu, Y., Li, K., Li, S., Ma, S., Wang, Q., Wang, R., 2010. A pilot study of the effect of audible sound on the growth of *Escherichia coli*. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 78, 367–371. doi:10.1016/j.colsurfb.2010.02.028
- Shapiro, J.A., 1988. Bacteria as Multicellular Organisms. *Sci. Am.*
- Schuster, M., Lostroh, C.P., Ogi, T., Greenberg, E.P., 2003. Identification, Timing, and Signal Specificity of *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Controlled Genes: a Transcriptome Analysis. *Society* 185, 2066–2079. doi:10.1128/JB.185.7.2066
- Solomon, J.M., Lazazzera, B. a, Grossman, a D., 1996. Purification and characterization of an extracellular peptide factor that affects 2 different developmental pathways in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev.* 10, 2014–2024. doi:10.1101/gad.10.16.2014
- Soo, Y., Lee, Y.J., Lee, Y.H., Kim, J.H., 2009. Effects of Nutrients on Quorum Signals and Secondary Metabolite Productions of *Burkholderia sp.* O33 19, 1142–1149. doi:10.4014/jmb.0801.465
- Stecchini, M.L., Del Torre, M., Sarais, I., Saro, O., Messina, M., Maltini, E., 1998. Influence of Structural Properties and Kinetic Constraints on *Bacillus cereus* Growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1075–1078.
- Stewart, G.S. a B., Williams, P., 1992. N-(3-Oxoheptanoyl)-L-homoserine lactone regulates carbapenem antibiotic production in *Erwinia carotovora* 288, 997–1004.
- Surette, M.G., Miller, M.B., Bassler, B.L., 1999. Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*: a new family of genes responsible for autoinducer production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 1639–1644. doi:10.1073/pnas.96.4.1639

- Taga, M.E., Bassler, B.L., 2003. Chemical communication among bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 Suppl , 14549–14554. doi:10.1073/pnas.1934514100
- Thomas, L. V., Wimpenny, J.W.T., Barker, G.C., 1997. Spatial interactions between subsurface bacterial colonies in a model system: A territory model describing the inhibition of *Listeria monocytogenes* by a nisin-producing lactic acid bacterium. *Microbiology* 143, 2575–2582. doi:10.1099/00221287-143-8-2575
- Tomasz, a, Hotchkiss, R.D., 1964. Regulation of the Transformability of Pheumococcal Cultures By Macromolecular Cell Products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 51, 480–487. doi:10.1073/pnas.51.3.480
- Tremblay, J., Richardson, A.P., Lépine, F., Déziel, E., 2007. Self-produced extracellular stimuli modulate the *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility behaviour. *Environ. Microbiol.* 9, 2622–2630. doi:10.1111/j.1462-2920.2007.01396.x
- Trushin, M. V., 2003. Studies on distant regulation of bacterial growth and light emission. *Microbiology* 149, 363–368. doi:10.1099/mic.0.25825-0
- Tso, W., Adler, J., 1974. Negative Chemotaxis in *Escherichia coli* Negative Chemotaxis in *Escherichia coli* 118, 560–576.
- Váchová, L., Chernyavskiy, O., Strachotová, D., Bianchini, P., Burdíková, Z., Ferčíková, I., Kubínová, L., Palková, Z., 2009. Architecture of developing multicellular yeast colony: Spatio-temporal expression of Ato1p ammonium exporter. *Environ. Microbiol.* 11, 1866–1877. doi:10.1111/j.1462-2920.2009.01911.x
- West, S. a, Griffin, A.S., Gardner, A., Diggle, S.P., 2006. Social evolution theory for microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 597–607. doi:10.1038/nrmicro1461
- West, S. a., Diggle, S.P., Buckling, A., Gardner, A., Griffin, A.S., 2007. The Social Lives of Microbes. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 38, 53–77. doi:10.1146/annurev.ecolsys.38.091206.095740
- Wimpenny, J.W., Leistner, L., Thomas, L. V, Mitchell, a J., Katsaras, K., Peetz, P., 1995. Submerged bacterial colonies within food and model systems: their growth, distribution and interactions. *Int. J. Food Microbiol.* 28, 299–315. doi:10.1016/0168-1605(95)00065-8