

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra filosofie a dějin přírodních věd



Diferenciace bakteriálních kolonií
Serratia marcescens

Diplomová práce

Michal Schmoranz

Vedoucí diplomové práce: **Prof. RNDr. PhDr. Zdeněk Neubauer, CSc.**

PRAHA, 2008

Prohlašuji, že práce byla vypracována samostatně, s použitím citované literatury a pod vedením vedoucího diplomové práce.

Michal Schmoranz

Poděkování:

Děkuji vedoucímu mé diplomové práce Prof. RNDr. PhDr. Zdeňku Neubauerovi, CSc. za úžasný zážitek, kterým pro mne byly všechny konzultace této práce. Jeho inspirativní a trpělivý přístup pro mne zůstává neopakovatelnou životní zkušeností. Za ochotu zabývat se veškerými metodickými problémy a otázkami, vzniklými v průběhu psaní diplomové práce a za čas, který mi věnovali, děkuji RNDr. Anně Blahůškové a doc. RNDr. Antonu Markošovi, CSc., kterému rovněž děkuji za poskytnutí výborných studijních podmínek.

Obsah:

Abstract.....	5
1. Úvod: Serratia - makroskopický mikroorganismus?	7
1.1 Taxonomie, nomenklatura a historie zkoumání.....	7
1.1.1 Taxonomie a nomenklatura	7
1.1.2 Historie zkoumání.....	10
1.2 Bakteriální kolonie Serratia marcescens.....	12
1.2.1 Fenotyp bakteriální kolonie.....	12
1.2.2 Fenomenologie bakteriálních supertěl.....	15
1.2.2.1 Tělo bakteriální kolonie.....	16
1.2.2.2 Bakteriální kolonie a komunikace.....	16
1.3 Estetika bakteriálních kolonií.....	19
1.3.3 Portmannovské pojetí.....	22
2. Materiály a metody.....	25
2.1 Materiály.....	25
2.2 Metody.....	27
3 Experimentální část.....	32
3.1 Fenotypová diferenciac e a variabilita.....	32
3.1.1 Rozdělení získaných fenotypů a popis morfologie kolonií.....	34
3.1.1.1 Stabilizované fenotypy.....	38
3.1.1.2 Přehled některých dalších fenotypů, získaných při kultivaci v podmínkách bohatých a chudých na živiny.....	63
3.1.2 Makrorestrikční analýza na pulzní gelové elektroforéze.....	64
3.1.3 Diferenciac e cfu podle médií.....	65
3.1.4 Diferenciac e klonů v různých médiích.....	68
3.2 Ontogeneze kolonií: diferenciac e, morfogeneze, komunikace.....	64
3.2.1 Diferenciac e buněk v kolonii.....	64
3.2.1.1 Dělení buňky zakládající kolonii.....	64
3.2.1.2 Sporulace.....	79
3.2.2 Diferenciac e funkcí – stavba kolonie.....	80
3.2.2.1 Barvivo v kolonii.....	80
3.2.2.2 Diferenciac e funkcí při formování tvaru kolonie.....	87
3.2.2.3 Kibuc ve vztahu ke stavební diferenciac i.....	90
3.2.2.4 Identita a mezikoloniální komunikace.....	94
3.2.2.5 pH aktivita v koloniích.....	100
3.2.2.6 Vzájemná diferenciac e mezi různými fenotypy.....	101
3.2.2.7 Fenotyp WPsurround.....	106
3.2.2.8 Krystalogeneze v koloniích.....	114
4. Diskuze.....	118
4.1 Vznik makroskopických kolonií.....	118
4.2 Estetické a teleologické otázky.....	123
5. Souhrn.....	129
6. Použitá literatura.....	130
7. Seznam zkratk.....	133

Abstract

We explain the typical shape and appearance of bacterial monocolonies grown on rich medias as an active effort of cooperating individuals. This puts each colony into the light of biological aesthetics and shows it as a unique piece of art. We understand the appearance of colonies as a manifestation of the most general dimension of Life, enabled by domestication and relaxing of the stress of natural selection. That is, what allows the colonies to experiment in their morfogeny and to resign on the functional morfogenesis.

When kept in convenient conditions, aerobic bacteria tend to build complex colonies with strain specific patterns. The colonies are suprisingly well organised considering that they are built by more than 10 000 times smaller primitive unicellular organisms. In microbiology the colour and shape pattern of the colonies used to be called „the secondary metabolism“. Nowadays we consider them to be an effect of the efficient microbial communication and we know, that bacteria have utilized for communication hundreds of different biochemical messages. However, we still do not understand the relevance or the aim of the formation of the colonies and their pattern. Moreover, we are also able to detect a complicated intercolonial behaviour including in some cases cooperation, agressiveness or restraint. The individuality of the colony should be therefore considered dependent on other colonies nearby, besides the effect of the culture media. The behaviour of the colony clearly shows an affiliation of the simple unicellular organism to the whole colony.

We do not need to suggest any environmental function or adressness (in accordance with A. Portmann, 1960) of the phenomena observed. It is possible to see it as an expression illustrating the autonomy and authenticity of organisms as tiny as the bacteria. Such an aesthetical way of view supposes the freedom of expression which can lead to an artistic ornamentalism, perfectionism, hypertelia or decadence. All these we call a *self representation of an organism*.

Bacterial social life is limited to a biofilm cooperation in nature. Despite this, they are able to build pure monocolonies. Defined laboratory conditions support the research of morphology and morphogenesis of the colonial body and show us the bacterial monocolony as an organism which creates *complex communication environment of unicellular organisms resulting in macroscopic pattern objects*. On our model organism *Serratia marcescens* we would like to demonstrate that bacteria strive to cooperate in

building a colony of a *typical shape and appearance* and if grown on rich media they take advantage of relaxing of the nutrition stress and enhance the complexity and specificity of each colony made. This shows each colony as a unique piece of art. We understand the *appearance* of colonies as a manifestation of the most general dimension of Life, enabled by domestication which also allows the colonies to experiment in their morphogeny and to partly resign on its functional aspects.

Motto: „...porozumíte snadno, jak taková nesmyslná obmezení asi zdržela v té době postup pravé vědy, která činí své největší pokroky – jak celé dějiny učí – zjevně intuitivními skoky. Tyto zastaralé ideje nutily bádání, aby se plazilo, a nemusím vás upozorňovati, že plazení, mezi různými druhy pohybu, je znamenitá věc svého druhu; ale musíme ustříhovati orlí křídla, protože želva jde bezpečně?“

E. A. Poe, Eureka, 1848

1. Úvod: *Serratia* - makroskopický mikroorganismus?

Při studiu bakteriálních kolonií nás zaujala možnost biologicko-estetické interpretace jejich zjevu jako projevu vyššího řádu organizace, postaveného na *sebevyjádření*, tedy zcela jiné hodnotě než je *užitečnost pro přežití*. V sebevyjádření živého organismu je možné spatřovat projev formy života, jež „se pozvedla nad makromolekulární úroveň a jejíž vzhled se včleňuje do oblasti ústrojného formování (...), která se nejen udržuje při životě a rozmnožuje svůj vlastní druh, nýbrž ve svém vzhledu a počínání nejrozmanitějším způsobem manifestuje právě tuto jedinečnou druhovou existenci.“ (Portmann, 1960).

Zaujati představou vzhledu bakteriálních kolonií jako jedinečných projevů života jsme se rozhodli sledovat morfologii a morfogenezi kolonií bakterie *Serratia marcescens* s cílem stanovit, zda je možné na základě výsledků experimentální práce s těmito koloniemi hovořit o bakteriální kolonii jako o utvářeném *těle* a mnohobuněčném organismu, který by se projevoval význačným eidetickým vztahem vůči svému okolí a případnou diferenciací podob jedinců stejného druhu.

1.1 Taxonomie, nomenklatura a historie zkoumání

1.1.1 Taxonomie a nomenklatura

Serratia marcescens je gram-negativní bakterií řazenou do kmene *Klebsielleae* z široké rodiny *Enterobacteriaceae*. *Serratia* patří do skupiny bakterií, jejichž vzájemná příbuznost zakládá vlastní rod s dlouhou, složitou a někdy až chaotickou taxonomickou a nomenklaturní historií. Ještě v roce 1977 se mezi mikrobiology uvažovalo o tom, zda v širším pojetí nečítá rod *Serratia* až 156 druhů (Grimont, 1977). Nejbližším příbuzným *Serratie* by v takovém případě byly bakterie druhů *Enterobacter liquefaciens*,

Enterobacter cloacae, *Enterobacter aerogenes*, *Erwinia carotovora*, *Erwinia chrysanthemi*, *Erwinia herbicola* a *Erwinia nimipressuralis*. Závěry řady morfologických a biochemických testů nakonec v sedmdesátých letech stanovily čtyři výchozí druhy rodu *Serratia*: *S. marcescens*, *S. plymuthica* a *S. marinorubra*, které tvoří u *Enterobakterií* méně obvyklé barvivo a antibiotikum *prodigiosin* a druh *S. liquefaciens*, který *prodigiosin* netvoří a je bezbarvý. Další biotypy byly v sedmdesátých letech popisovány jako poddruhy zmíněných druhů *Serratie*. Zdánlivě jediným problémem této taxonomie zůstávají až do devadesátých let *divoké typy*, netvořící *prodigiosin* a i jinak fenotypicky se významně lišící od čtyř druhů výchozích. Určitá nejistota při popisu nových i stávajících druhů *Serratii* pramenila v minulém století ze spojení nedokonalých biochemických testů a nekonzervativního chování bakterií rodu *Serratia*. I proto se můžeme setkat s několika případy mnohonásobného popisu stejného druhu a naopak různé jiné druhy byly několikrát vedené ve sbírkách pod stejným názvem (např. *Serratia proteamaculans*, později *liquefaciens*, či třeba *Serratia quinovora*, později *marinorubra*, nyní *rubidea*, které řadily některé sbírky vedle sebe jako odlišné druhy¹).

V současné době řadí mezinárodně uznávaná klasifikace² do rodu *Serratia* celkem 15 druhů a poddruhů bakterií. Provedeme-li malý historicko-taxonomický exkurz do údajů sesbíraných ve sbírkách ATCC, DSMZ, CCM, WFCC³ a časopise IJSEM⁴ a budeme přitom brát druhy *Serratie* v abecedním pořadí, byl by to druh *Serratia entomophila*, popsáný jako nový druh v roce 1988 a od té doby stále jako samostatný druh vedený, *Serratia ficaria*, jako nový druh popsána a vedena od roku 1981, *Serratia fonticola*, popsána 1979 a od té doby vedena ve statutu „*schváleného*“⁵ druhu, *Serratia grimesii*, od roku 1983 nový druh, *Serratia liquefaciens*, popsána Bascombem teprve roku 1971, i když byla v minulosti vedená v mikrobiologických sbírkách, ovšem jako druh totožný s druhem popsáným již v roce 1931 a původně pojmenovaným *Serratia proteamaculans*, *Serratia marcescens subsp. marcescens*, podle různých zdrojů popsána buď v roce 1819 nebo 1823 italským farmaceutem Bartolomeem Biziem jako první *Serratia*, *Serratia marcescens subsp. sakuensis*, předposlední schválený popis nového druhu *Serratie* z roku

¹ Podle údajů v American Type Culture Collection (ATCC)

² Podle německé sbírky mikroorganismů a buněk DSMZ v roce 2008, viz. www.dsmz.de; Tato sbírka *Serratii* koreluje s údaji veřejně dostupnými i v ATCC, www.lgcpromochem-atcc.com/

³ CCM – Czech Collection of Microorganisms, WFCC – World Federation for Culture Collections

⁴ International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology

⁵ item, ve sbírce vedeno jako „approved“ species

2003, který je zajímavý tím, že se jedná o první doložené pozorování sporulace u *Serratii*. Jde o kmen izolovaný z odpadní vody v japonském městě Saku. Dalšími popsánymi druhy jsou *Serratia odorifera*, *Serratia plymuthica*, popsána roku 1948, o které bylo později zjištěno, že je totožná s bakterií popsanou již roku 1896, *Serratia proteamaculans*, popsána roku 1919 a poté znovu jako nový druh roku 1978, *Serratia quinivorans* popsána Grimontem v roce 1983 jako *quinivora* a poté roku 2002 upravena v názvu, při popisu zdánlivě nového druhu *Serratie*, podobně jako v případě *Serratia marinorubra*, popsané Stappem v roce 1940, která je dnes popsána jako *Serratia rubidaea*. Posledním popsáným druhem *Serratii* je druh *Serratia ureilytica* teprve z roku 2005. V literatuře mohou tedy být občas zmiňovány poddruhy *S marinorubra* a *S quinivora*, které jsou ale sbírkami v současnosti brány jako basonyma k *S rubidea* a *S quinivorans*. Další, v neodborné literatuře občas zmiňovaný druh *Serratie*, *Serratia cutirubra*, je synonymem staršího názvu *Serratia salinaria*, která je ovšem dnes považována za totožnou s druhem *Halobacterium salinarum*, stejně jako dřívější *Serratia rosea* je dnes považována za druh *Rhodococcus rhodochorus*.⁶ *Serratie*, vedené dnes ve sbírkách ATCC a DMS, jsou všechny testované na příbuznost 16S RNA sekvence což dává relativní jistotu, že jejich příslušnost k rodu *Serratia* a vzájemná příbuznost je již definitivně ověřená. Systematika postavená na metodě srovnání podobnosti primární struktury 16S RNA. Evolučně bližší druhy by měly mít podobné sekvence RNA konstruující malou ribozomální podjednotku 16S RNA. Lze vypočítat přibližný počet mutací, potřebný k tomu, aby (při průměrné mutační rychlosti) došlo k rozdílu v těchto sekvencích u srovnávaných organismů. Metoda 16S RNA umožňuje konstrukci fylogenetického stromu všech organismů a bývá proto nazývána *univerzálním evolučním chronometrem* (Woese, 1990).

Serratia je v současnosti stále intenzivněji zkoumána, zejména kvůli vlastnostem důležitým pro biomedicínský výzkum. *Serrapeptáza*, proteolytický enzym izolovaný ze *Serratii*, má výrazné fibrinolytické, protizánětlivé a antiedematózní vlastnosti (Panagariya, 1999). Jednou z jeho vlastností je i tlumení bolesti díky schopnosti blokovat uvolňování histaminů. To je také důvodem několikaletého komerčního výzkumu a dnes prodeje léčiv jako *Fytozym* či *Serrapeptáza*. Enzym prodigiosin, vylučovaný *Serratiami*, je také zkoumán kvůli možnému protinádorovému působení (Montaner, 2001). O faktu, že se *Serratia* pro své proteolytické enzymy stává velmi populárním mikroorganismem,

⁶ ATCC

svědčí i články o *zázračném enzymu Serrapeptase* (Ross, 2005). Ovšem Serratia má i své zarputilé odpůrce (což také může svědčit o její atraktivitě), tvrdící například, že v padesátých letech minulého století, v rámci pokusů s ovlivňováním počasí a regulací populace, tajně vypouštěla armáda USA na obyvatelstvo San Francisca Serratii marcescens, aby vyzkoušela účinnost možného bioteroristického útoku⁷.

1.1.2 Historie zkoumání



Obr. 1. **Katedrála v Orvietu, Itálie**

Serratia má schopnost dělit se a růst do podoby mnohobuněčných kolonií. V těch může tvořit velké množství specifických (výše zmíněných) proteinů, zjevných mimo jiné jako pouhým okem viditelné, výrazné, většinou červené barvivo. Mimo laboratoře je tato její vlastnost zřídka pozorovatelná, nejlépe snad na potravinách obsahujících škrob (Ania, 2007). Když v roce 1819 (publikace 1823) Bartolomeo Bizio, farmaceut z Italského města Padua a později přední benátský farmaceut a chemik a objevitel mnoha podivuhodných vlastností látky prodigiosinu (Ghiretti, 1994), objevil a pojmenoval první *Serratii*, *S. marcescens*, bylo to při prostudování skvrn na tradiční italské potravine obsahující právě škrob, na kukuřičné kaši polenta. Jakmile Bizio identifikoval v původci zázračného krvavého zbarvení skvrn bakterii, okamžitě byla spojena se slavným zázrakem v Bolseně. Tam v roce 1263 Petr Pražský, kněz na cestě do Vatikánu, kde chtěl

⁷ <http://www.osud.cz/cs/clanek.php?id=6383>

lépe porozumět otázce Kristovy přítomnosti v eucharistiích, rozlomiv během bohoslužby hostii, našel na ní jasné červené skvrny připomínající kapky krve (Ania, 2007). Na počátku 13.století používala západní eucharistie nekvašený chléb, podobný dnešnímu arabskému chlebu⁸. Bakteriální působení uvnitř dutiny tohoto pečiva nemuselo být nijak ovlivněno působením jiných mikrobů – kvasinek. Na počest této události ustanovil papež Urban IV. o rok později v červnu 1264 církevní svátek *Božího Těla* (Corpus Domini). Předměty bohoslužby byly později přeneseny do města Orvieto, kde byly uloženy do vznikající katedrály, jejíž stavbě tak bylo možno církevně požehnat.

Výklad světsky obtížně vysvětlitelných jevů, jako náhlé objevení krve (typu stigmat na obrazech a theofanií krev plačících Madon), kterých je po světě opravdu požehnaně, může být postaven právě i na tezi o mikrobech vytvářejících kolonie a produkujících červené barvivo. Teorie, vykládající zmíněné zázraky jako působení bakteriálního typu, popisují náhle se objevující *krev* jako rostoucí biomasu například právě *Serratii*. Několik vědců-mikrobiologů se v minulosti na experimenty s bakteriálními koloniemi na hostiích a obrazech zaměřilo a pokusilo se prokázat působení mikrobů jako klíčové pro vznik těchto jevů. Průběh a výsledky pokusů v terénu – na místě zázraku, však dopadly vesměs katastrofálně, do velké míry i vlivem faktu, že obyvateli v dotčených regionech byl výzkum tohoto typu považován za zcela nepřijatelný a dokonce přímo sabotován.⁹



Obr. 2. *Zázrak v Bolseně*, Raffaello Sanzio (1483~1520)- „Rafael“, Vatikán

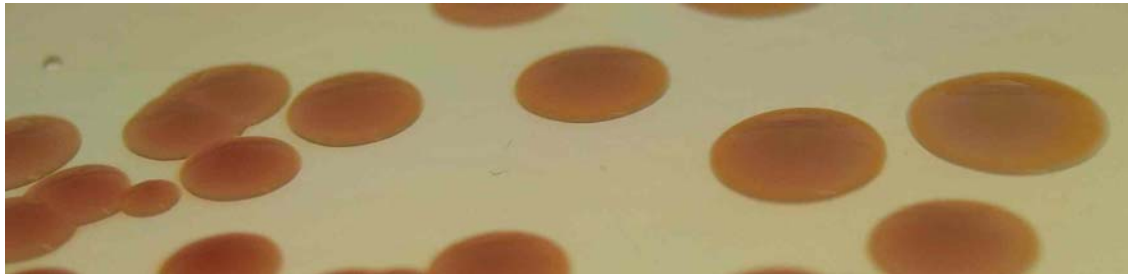
Bartolomeo Bizio pojmenoval *Serratii* na počest italského fyzika Serafina Serratiho, který v roce 1787 vynalezl parní člun. Adjektivum *marcescens* (marcesco: vadnu,

⁸ (viz. www.getsemany.cz)

⁹ Alix Kirsta, *The Crying Game*, *The Guardian*, December, 2000,

chabnu, mdlím, rozpadám se) použil, protože barvivo červené pigmentace – prodigiosin (Ghiretti, 1994, Graevenitz, 1980, Giri, 2004) – z kolonií na kukuřičné kaši poměrně rychle mizelo (Wei, 2006). To, že se vůbec objevilo a že díky jeho výrazné barvě byla *Serratia* studována již před 190 lety, však ukazuje spíše na schopnost zviditelnit se, než rozpadat se. Není náhodou, že první popsanou *Serratii* byl druh *marcescens*, který je skromný a oportunistický co do životního prostoru a přitom až marnivý co do svého vzhledu. Jak uvidíme později, právě jistá marnivost je předpokladem ještě výraznějšího vzhledového projevu za příznivých podmínek.

1.2 Bakteriální kolonie *Serratia marcescens*

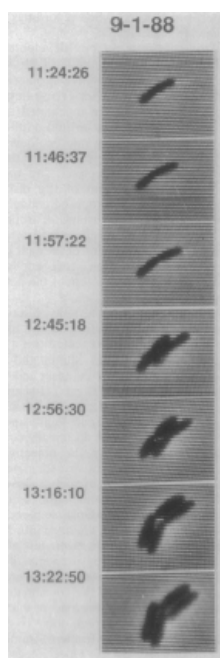


Obr. 3. Kolonie *Serratia marcescens*

1.2.1 Fenotyp bakteriální kolonie

Bakterie je tradičním pohledem mikrobiologů organismus jednobuněčný. Všechny biologický materiál, který potřebuje k tomu, aby si jako živý systém udržela schopnost přežití a množení, je ukryt v malém těle jedné buňky, u *Serratia marcescens* o délce tří až šesti mikrometrů¹⁰. Množí se dělením, což lze popsat tak, že nachází-li se buňka ve vhodném prostředí, naroste a rozdělí se na dva autonomní organismy. Takto se mohou bakterie v optimálním prostředí pomnožit téměř nesčíslněkrát.

¹⁰ viz. Experimentální část,



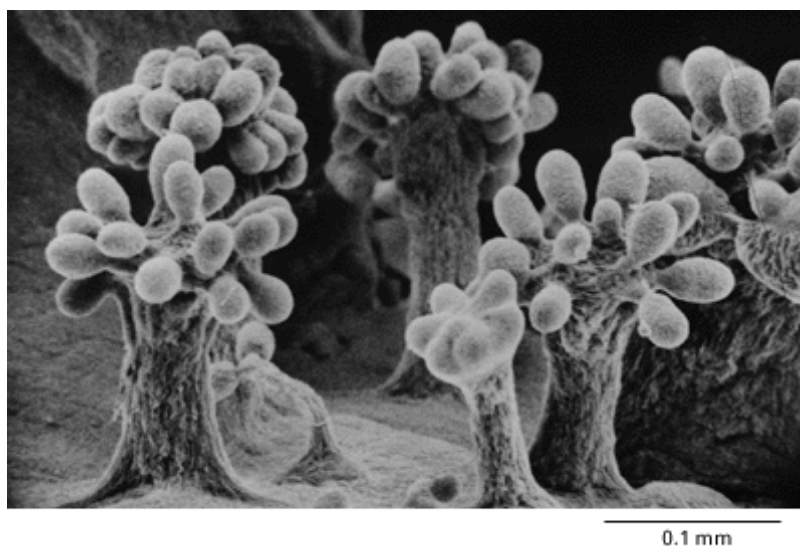
Obr. 4. Postupné dělení bakterie *E.coli* (Shapiro, 1989)

Na agarových miskách s živným médiem¹¹ mají různé bakteriální druhy tendenci vytvořit při růstu a dělení útvary z biomasy buněk. Různé druhy vytvářejí kolonie různých fenotypů a často je lze podle fenotypů těchto kolonií rozlišit. V současné době je *fenotyp* kolonie pouze pomocným identifikačním znakem. Bakterii je možné identifikovat přesněji na základě toho, na jakém médiu bakteriální kolonie roste, než jak fenotyp kolonie vypadá (Němec, 1999). Charakteristický tvar kolonií tedy mikrobiologie užívá jako jeden z prvních odkazů na možný druh sledované bakterie, užívá tedy kolonií jako nástrojů umožňujících vědcům rychle se zorientovat v některých vlastnostech bakterií, projevujících se právě pouze v kolonii čítající miliony jedinců. Například jasně červené barvivo na povrchu kolonie je důležitým ukazatelem schopnosti tvořit některé proteiny, které mnoho jiných druhů bakterií tvořit nedokáže a slouží tak jako jeden z prvních znaků pro zařazení bakterie do systému. Ukázku indikace vlastností z fenotypu mikrobiální kolonie lze najít například v (Ajithkumar, 2003).

Druhý způsob vnímání bakteriálních kolonií může vycházet z předpokladu nutriční výhody existence forem bakteriální aglomerace a díky tomu efektivnější diferenciace do spor (Grilione, 1975), schopných přežít i v extrémních podmínkách, jako je tomu

¹¹ Pro popisovaný růst v laboratoři je důležité živné médium se specifickým zdrojem energie, živin, optimální pH a teplota, při které roste kolonie předvídatelně.

například u myxobakterií (*Chondromyces crocatus* viz. obr. 5). V příznivějším prostředí spory znovu vytvoří populaci bakterií (Kunert a Kaiser, 1982).



Obr. 5. Plodničky myxobakterií pod elektronovým mikroskopem. (Grilione, 1975)

Některé buňky v kolonii mohou svůj tvar částečně upravit, jako to vidíme u buněk na okraji kolonie, které mohou být až dvakrát větší než buňky v centru kolonie a získávat větší počet bičíků než buňky v centru kolonie (Kohler, 2000). Podle některých zdrojů se informují o svém postavení vzhledem k ostatním členům kolonie vzájemným kontaktem (pilus či flagella) (Azakami, 2006) , podle jiných gradientem signálních molekul a chemotaxí (Thar, 2005). Bakterie sice mění vzhledem ke své funkci v kolonii svou velikost či tvar, tak jako buňky ve tkáních mnohobuněčných organismů, ovšem vratně a navíc zůstávají však všechny potenciálně na úrovni téměř identických zárodečných buněk, které jsou schopné dát opakovaně vznik celému organismu kolonie vysetím kterékoliv jednotlivé buňky na živnou půdu. Chápeme-li tělo celé bakteriální kolonie jako funkčně komplexní mnohobuněčný útvar, máme na mysli *mnohobuněčnost* zejména ve smyslu velkého počtu buněk nikoliv typu buněk, tedy fakt, že bakterie svou spoluprací díky vzájemné komunikaci (Greenberg, 2003, Rice, 2005, Labbate, 2004) vytvoří makroskopický útvar, nikoliv však útvar mnohobuněčný ve smyslu mnoha *nevratně* různých typů buněk specifického tvaru a vlastností, vytvořených v rámci buněčné diferenciace způsobující například odlišnost kostní buňky od nervové buňky či epidermální buňky okvětních lístků od buňky primární kůry kořene.

Protože jedna kolonie může vyrůst z jedné buňky, usuzovalo se vždy z počtu vyrostlých kolonií na počet a typ buněk přítomných ve vzorku. Kolonie nebyly považovány za individuální seskupení, společenství k sobě náležejících jednotlivců, ale pouze za směsnání či nakupení dělicích se buněk. Výsledek růstu kolonie typu *složitost* či *intenzita* zbarvení byl vnímán jako jev druhotný, podobně jako teorie komunikace mezi koloniemi byla považována pouze za nadinterpretaci jednoduchých metabolických regulací. Obvyklým využitím bakteriální kolonie bývá tedy právě její využití jako *nástroje* mikrobiologického zkoumání.

Studium mikrobiálních společenství pro ekologický, hygienický či biomedicínský význam jejich účinků, však pomalu vede ke zjištění složité mnohavrstevné komunikace a nejspíše i dělby práce v rámci kolonií (Shapiro, J.A., 1997, 1998; Ben Jakob, E., 2003; Ben Jakob, E., Shapira, Y., 2003; Greenberg, E.P., 2003). K tomuto poznání mikrobiologie přivádí až sofistikované metody a technické vybavení, dostupné v posledních desetiletích.

1.2.2 Fenomenologie bakteriálních supertěl

„Že buňky volně žijící mají schopnost rozhodovat se k účelnému jednání, že dovedou jednat, dokazují nejlépe jejich čisté kultury. Čisté kultury jednotlivých rodů mikrobiálních – tedy jednobuněčných tvorů volně žijících – nejsou pouhými jen shluky jedinců dotyčných, jak by se na první pohled zdát snad mohlo, nýbrž útvary záměrně vytvořenými. Že tomu tak jest, vyplývá nejjasněji z fakta, že útvary ty mají pro ten který rod mikrobů zcela typický vzhled. Typický tak, že my ze vzhledu útvaru takového, ze vzhledu pouhého takové čisté kultury, můžeme bezpečně poznat, o jaký druh tvorů jednobuněčných v případě daném běží.“ (Šamberger, 1936)

V současné vědě se na bakteriích snažíme vidět to neviditelné - studujeme jejich nitrobuněčné procesy, genetiku patologických jevů a vzájemnou interakci. Již jsme naznačili výše, že jen pomalu dochází také k chápání bakterií jako primárně společenských tvorů – *mnohobuněčných mikroorganismů*. Projevy, které si ukážeme v této kapitole, korespondují s jednobuněčným a čistě metabolickým výkladem mikrobiálního života jen obtížně.

Ve všeobecně zařité představě jsou bakterie pár tisícín milimetru dlouhá jednotvárná stvoření válcovitého tvaru. Takto jsou těla individuálních bakterií významná nanejvýše

z hlediska ekologického – viditelné jsou jejich *projevy*, ze kterých teprve odvozujeme na jejich přítomnost – hovoříme o nich jako o tvorech, kteří dali planetě Zemi kyslík a stojí za mnoha podstatnými jevy v biosféře a většinou průmyslově významných přírodních jevů (Markoš, 2007). Bakterie zajišťují zdravé fungování těl vyšších organismů zevnitř (umožňují nám efektivně využít mnoho nestravitelných látek) i na jejich povrchu - například povrch lidské kůže ve zdravém stavu pokrývají asi čtyři druhy *dobrých* bakterií (Šíma, 2008). Také tvoří obrovskou pozemskou biomasu a „váhově představují asi polovinu živé hmoty na Zemi“, (Kaprálek, F, Úvod do bakteriologie) nicméně jednotlivé bakterie nabízejí co do tvaru příliš málo a navíc nepozorovatelného.

1.2.2.1 Tělo bakteriální kolonie

Pojem „*tělo*“ kolonie používáme pro označení společenství miliard autonomních a ve schopnosti založit kolonii nejspíš rovnocenných buněk, podvolujících se životu v koordinované skupině. Barva, tvar a velikost těla bakteriální kolonie jsou dány vhodnými podmínkami pro množení jednotlivých buněk a jejich genetickou dispozicí – tedy druhem bakterie, zakládající kolonii.

Z různých fenotypů kolonií lze usoudit na odlišné metody stavby kolonie u různých druhů bakterií. Tento fakt by mohl svádět k domněnce, že bakterie je svou druhovou příslušností determinována ke konkrétnímu fenotypovému projevu. Taxonomie však mnohdy tentýž druh bakterie rozlišuje na různé klony stejného druhu, které se svými vlastnostmi mohou specificky lišit.¹² Vedle mnoha jiných jsou to i vlastnosti fyziologické (Biotyp) a specifické vlastnosti morfologické (Morfortyp), které odlišují různé klony bakterie stejného druhu podle jejich koloniální morfologie dané složením prostředí a dispozicí konkrétní buňky zakládající kolonii.

1.2.2.2 Bakteriální kolonie a komunikace

V přírodě se bakterie běžně stýkají a komunikují spolu například přímou výměnou genetického materiálu. Bakteriální fimbrie kódované konjugativním plasmidem mohou sloužit jako dutý můstek, kterým se od donorové buňky k buňce recipientní dostane plasmidová DNA, čímž rozšiřuje možnosti buňky ke konjugaci a urychluje tvorbu

¹² Pojem *druh bakterií* je kontroverzní už proto, že biologický druh bývá definován jako „soubor jedinců schopných vzájemného plodného křížení se vznikem plodných jedinců“ a tedy vázán na sexualitu. (viz Kaprálek, F, Úvod do bakteriologie, Karolinum)

biofilmů (Ghigo, 2001). Další informace, které přenesená DNA obsahuje, se pak přenosem mohou rychle dostat do velké vzdálenosti od původního šířitele. Bakterie se často spojují na delší dobu a vytvářejí biofilmy, plaky a konsorcia, ve kterých se dělí o živiny a navzájem si k nim symbioticky pomáhají, nebo na sobě parazitují (Denis, 2003). Někdy tak mohou vzniknout prostředí velmi bohatá na konkrétní druh metabolitu, bakteriemi houfně vylučovaného.



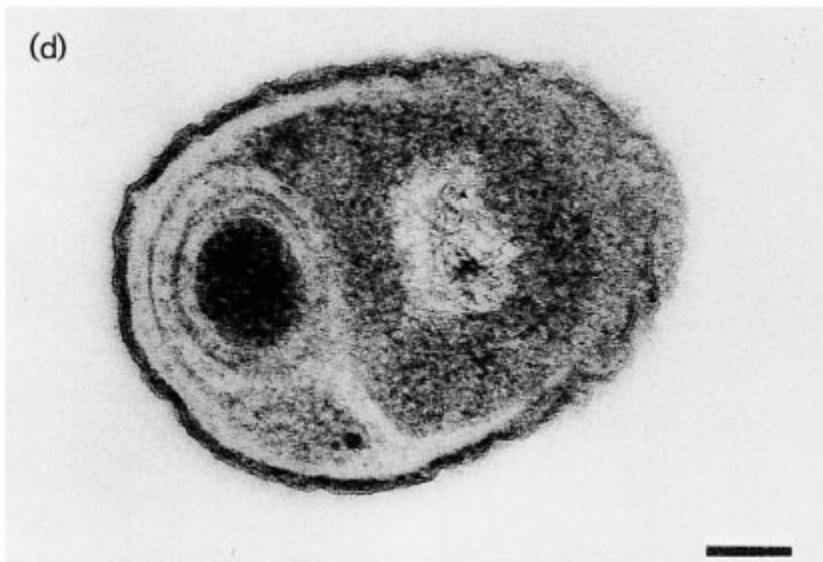
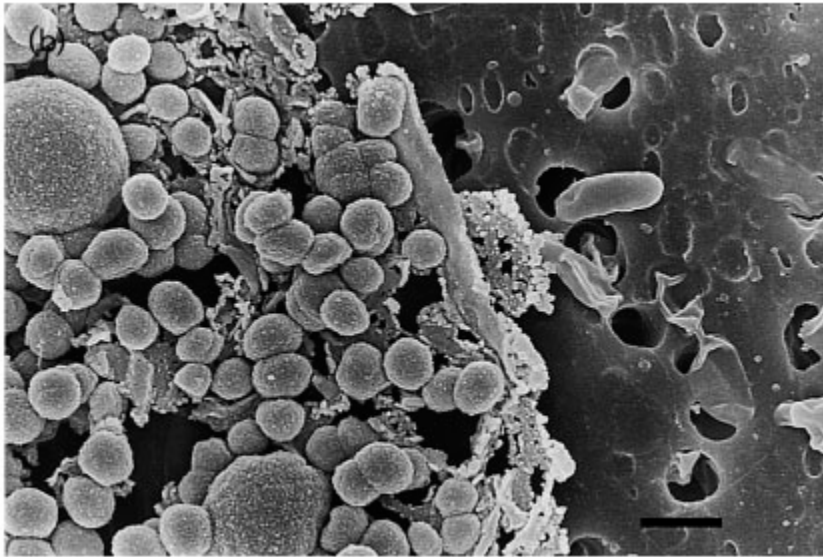
Obr. 6. **Fotosyntetické bakterie v horkém prameni.** Bílá oblast je příliš horká pro jejich přežití, bakterie si svá konsorcia a plaky budují v části, kde je již teplota vody nižší. Zde, v prostředí termofilních bakterií, je fialová barva způsobena přítomností bakteriálního metabolitu (Todar's textbook of bacteriology, internet).

Bakterie mají z mnohobuněčné kooperace v kolonii, povlaku či plaku prokazatelný prospěch. Například tvorba bakteriocinů, umožňujících odražení nepřátelské buňky (či buňky objevící se v prostředí jako rival) může vést (a většinou vede)¹³ k lyzi buňky, která bakteriocin do prostředí produkuje. Pokud je však tato buňka na okraji rozsáhlejší kolonie, může vyloučit větší množství látek perforujících cytoplasmatické membrány, degradujících DNA (endonukleázy), zastavujících proteosyntézu či syntézu peptidoglykanu (princip antibiotik působících na rostoucí buňky – při pokračujícím

¹³ Kaprálek, F, Úvod do bakteriologie, Karolinum,

řízeném štěpení peptidoglykanu dojde k lyzi buňky) a přitom zachovat většinu buněk ve středu kolonie. Jinou utilitaristickou hypotézu pro vznik kolonie můžeme vidět ve tvorbě kolonie jako přípravě zásob energie a živin v buňkách středu kolonie, schopných na daný signál svým rozpadem poskytnout živiny buňkám na okraji kolonie (Palková Z., Forstová J., 2000). Větší množství buněk a navíc druhů, vedoucí k vytvoření složitého systému biofilmu, může také bakteriím zpřístupnit zdroje, které by samostatně žijící bakterie nemohly využít. Diferenciace na různé typy může optimalizovat přežití větší části populace (Shapiro, 1998). Možnost komunikace v kolonii navíc poskytuje bakteriím stupeň plasticity a flexibility, který je potřebný pro lepší přizpůsobivost a schopnost přežití kolonie vůči okolnímu dynamickému prostředí (Ben Jakob, 2003). Schopnost spolupráce, komunikace a organizace života v kolonii je tak důležitým aspektem a výzvou i pro zkoumání bakteriální evoluce. Z výše uvedeného totiž vyplývá, že bakterie schopné žít v koloniích a spolupracovat na jejich rozvoji a obraně mají větší šance na přežití v měnícím se prostředí (Palková, 2004).

Serratia jsou obecně považovány za nesporulující bakterie (Ajithkumar, 2003), nicméně z teplotních a biochemických testů a elektronmikroskopických snímků, prováděných na *Serratia marcescens subsp. sakuensis*, zveřejněných v (Ajithkumar 2003) vyplývá, že některé poddruhy *Serratie* jsou schopné vytvářet endospory. Ke sporulaci dochází během sedmi dnů od vzniku kolonie a to hromadně na některých konkrétních místech v kolonii (obr. 7).



Obr. 7. Endospory *Serratia marcescens*. Spory sporulujícího kmene SM KREDT po 18 dnech inkubace na nutričním agaru (b), měřítko 1 μ m (d) Spora SM obarvená uranylacetátem, měřítko 0,1 μ m; zdroj: Ajithkumar et al, (2003)

1.3 Estetika bakteriálních kolonií

Jak jsme již ukázali, bakteriální kolonie jsou ve výzkumu obvykle studovány pouze v rámci instrumentálních a funkčních představ. Prožitek *vnímání samotného vzhledu* kolonií by bylo možno považovat za druhotné *kouzlo nechtěného*. I přes studium účelné spolupráce bakterií na *tvorbě* kolonie se koloniím nepřisuzuje samostatná tvarová hodnota, jelikož nenabízí jev, který by byl chápán jako jednotný projev. Není totiž známo

ani představitelné, že by „vnímat a být vnímán navenek“ bylo součástí utilitární ekonomie a funkční ekologie těchto společenství. Zkoumání estetické rozmanitosti bakteriálních kolonií jako jejich bytostného sebeprojevu není obvyklým cílem badatelů. Veškeré mikrobiologické výzkumy se dosud pohybují nanejvýš v rámci instrumentálních a funkčních představ o výhodě kolonií pro množení, šíření a přežívání mikroorganismů (Palková, 2004). Pokud však soustředíme náš pohled na bakteriální kolonie do již naznačené roviny vnímání samotného vzhledu kolonií, naskytne se nám příležitost vidět v nich nejčistší formu sebeprojevu života.

Právě v této kapitole se pokusíme vyložit charakteristický zjev bakteriální kolonie bakterie *Serratia marcescens* jako činný projev řízeného seskupení svébytného společenství k sobě náležících jednotlivců. Takto viděna je bakteriální kolonie právě tak jedinečný výsledek jako umělecké dílo. Jeví se primárně jako předmět smyslového vnímání, nikoli jako projev neviditelných procesů probíhajících v genomu mikroorganismů tvořících kolonii. Vzhled kolonie chápeme jako projev živých bytostí, které díky uvolnění ‚selektivního tlaku‘, tj. konkurence a nároků prostředí, opouští ve své morfogenezi požadavky funkčnosti a ukazují na bytostný a obecný rozměr Života. Příznivé podmínky dovolí bakteriím ‚náročně experimentovat‘ a ke kolonii, její barevnosti, mnohotvárnosti a proměnlivosti se pak lze vztahovat jako k předmětu estetického zájmu.

Už od antiky poukazovali myslitelé na estetickou stránku živých bytostí (Plotinos, Augustin). Předmětem zájmu byly jevy samotné, estetická stránka živých bytostí byla pojmána čistě jako prožitek, nijak odlišný od prožitku neživé přírody (minerály, krajina atp.). Na základě kvality těchto prožitků byly vyvozovány hodnotící soudy. Estetické projevy života jim tak splývaly s estetickou stránkou přírody vůbec do zobecněné estetiky.

Ve snaze objektivizovat estetické hledisko začali vědci hledat význam, který by se za těmito jevy skrýval. Jevy tedy začali považovat za projevy jistého účelu (např. přežití, krytí, výstraha, nápodoba, pohlavní výběr). Vzhled živých bytostí byl tedy hodnocen jako znak, sloužící k vzájemnému dorozumívání, signalizaci a přežívání. Teprve Adolf Portmann přišel s myšlenkou, že projevy živých bytostí nejsou nutně znaky skrytého účelu, ale že jde o sebeprojev, který je obecným rozměrem Života. Portmann dokonce tvrdí, že anatomická a fyziologická funkčnost je podřízena estetickým kvalitám jevů (Portmann, 1960).

Pod baštou estetiky v přírodních vědách si tradičně představujeme obory jako třeba entomologie, zabývající se organizmy mnohobuněčnými, u nichž je možné snadno a bezprostředně sledovat jevy buněčné diferenciaci a analyzovat je za pomoci pojmového aparátu estetiky. Buněčnou diferenciací zde rozumíme specifický vývoj buněk, způsobující podstatnou změnu jejich charakteru a vedoucí posléze ke vzniku mnohobuněčných tvarů a výtvarů o mnoha druzích buněk, což dává výslednému tělu vlastnosti klíčové pro estetické soudy - teprve tehdy můžeme hovořit o velikostech, barvách, vzorech a tvarech vzniklých shlukováním určitého typu buněk.

Snad pouze Haeckel (1904) v historii biologické estetiky nepomíjel jednobuněčná stvoření, pozorovatelná pouze pod mikroskopem a nemající v estetice okolní přírody možnost prosadit se. Dokonce i bakteriální kolonie stály vždy zcela mimo estetiku v nejširším smyslu. Bakteriální kolonie byly sice považovány za vnímatelný projev neviditelného života, jejich vznik však byl považován za pouhé nahromadění jednotlivých mikroskopických tvorů, tedy projev mající vztah pouze k typologii bakteriálních jedinců. Nebyly tedy vnímány jako jev, ve kterém by bylo rozpoznáváno společné utváření vzhledu a výsledné podoby.

Jednou ze schopností bakterií v kolonii je komunikace (Wei, 2006) a o kolonii se proto dá hovořit jako o výsledném projevu dorozumívání a spoluvytváření (Greenberg, 2003, Bassler, 2002). Makroskopický útvar kolonie je tedy vyjádřením tvarové sounáležitosti mikroskopických tvorů. Jev, založený na tak jemné a citlivé komunikaci, jakou vyžaduje spolupráce mikroskopických tvorů, je však velmi citlivý na prostředí a prostor ve kterém ke komunikaci dochází. Aby mohlo dojít alespoň k minimální harmonii a souladu při spolupráci na tvorbě kolonie, je třeba mít k dispozici optimální prostředí, které nebude v žádném ohledu limitovat životní pochody.

Bakterie nejsou schopné tvořit kolonie kdekoliv, nýbrž pouze v prostředí bohatém na živiny. Mnoho bakteriálních druhů tvoří i v tomto prostředí kolonie pouze mikroskopické, při tvorbě kolonie tedy nejde pouze o bezuzdné dělení biomasy na energeticky bohaté půdě. Daleko spíše jde o využití možnosti realizovat schopnost dorozumívání, signalizace a teleologických morfologických funkcí. Schopnost komunikace přitom přechází skrze tvorbu složitého mnohobuněčného těla z mikroskopického prostředí do makrosvěta, kde mohou komunikovat celé kolonie (Palková, 1997, 2003). Celistvost, dokonalost a působivost bakteriální kolonie je pak nejvyšším naplněním smyslu mikrobiální komunikace a schopnosti bakterií

spolupracovat vůbec.

Při estetické analýze sledovaných jevů se částečně opíráme o biologicko-estetické teorie výše zmíněného Adolfa Portmanna (Portmann, 1960), které doplňujeme o úvahy vycházející ze závěrů našich experimentů (experimentální část; Rieger, 2008) a úvahy založené na poznatcích Zdeňka Neubauera (Neubauer, 1979).

1.3.3 Portmannovské pojetí

Adolf Portmann (1897-1982) byl významným Švýcarským biologem. Zabýval se živočišnou morfologií mimo jiné z hlediska estetické stránky *Života* a byl ideovým zakladatelem *biologické estetiky*. Zavedl pro naši úvahu klíčový pojem „vlastní jev“, který používá k interpretaci biologických struktur. Vlastní jevy jsou výjimečnými pro svůj vztah ke smyslovému vnímání (člověka, případně i živočichů přicházejících se strukturou do styku¹⁴). Jsou to jevy ilustrované distinkcí vnitřního, neviditelného prostoru těl živočichů a vnějšího neprůhledného povrchu. Povrch těl je zbarven často i symetrickým charakterem, kdežto jejich vnitřek je zcela nerespektuje jakékoli zákony jevení. Je-li tělo symetrické a pohledné i svými vnitřnostmi, pak tomu tak bývá u živočichů s průsvitnou tělní schránkou¹⁵ a jde tedy opět o podřízení morfologie fenoménu jevení.

Vlastní jevy Portmann dělí ještě na adresné a neadresné vlastní jevy. Do oblasti adresných vlastních jevů řadí veškerou fenotypovou komunikaci, která je předmětem zkoumání biosémantiky a etologie. Jde tedy o tvarovou a barevnou rozmanitost živočichů, sloužící ke komunikaci a předávání signálů, vždy se specifickým respondentem těchto signálů¹⁶. Neadresné vlastní jevy, kterým se budeme věnovat ještě dále v této kapitole, jsou předmětem dohadů mnoha biologů, protože jde o jevy respektující zákony vidění, ale nemající známého respondenta, tedy o jevy jsoucí zdánlivě bezdůvodně, „jen tak“, a bývají proto chápány jako pouhé sekundární výsledky metabolické aktivity.

¹⁴ Pak to mohou být také *adresné vlastní jevy*, viz níže.

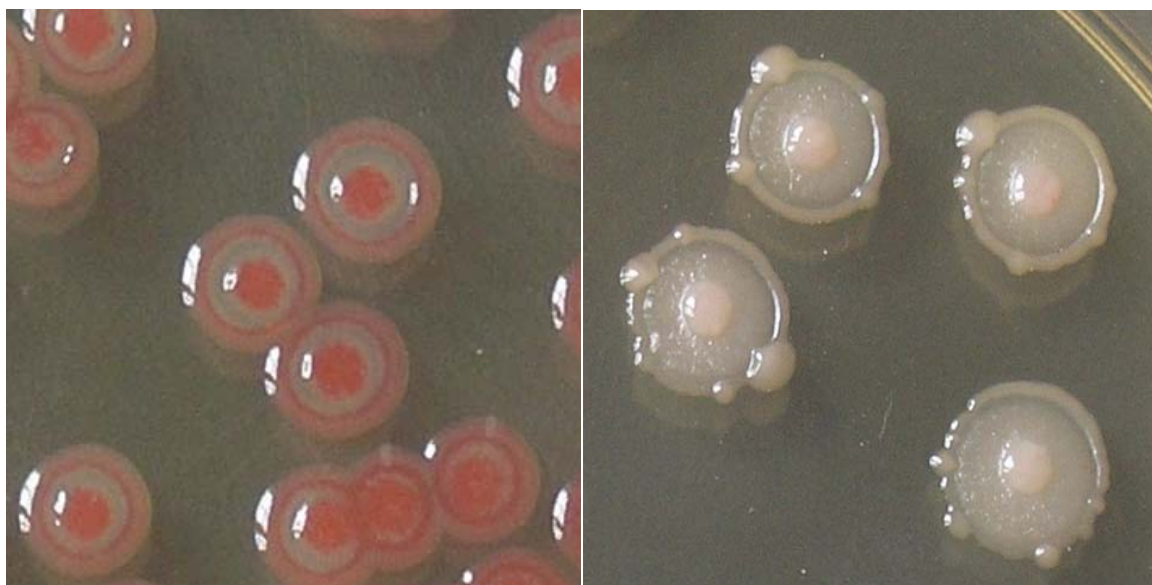
¹⁵ Kýlonožci, křídlatky, kýlnatky.

¹⁶ viz. také Jakob von Uexkull a problematika *Umweltu*, prostředí, ve kterém se život pohybuje a orientuje a kde existuje bez potřeby porozumění podnětu majícího smysl pro tvora z jiného *Umweltu*, tudíž podnětům nespádajícím do svého *Umweltu* ani nerozumí, ovšem podnětům do něj spadajícím rozumí specifickým a intenzivním způsobem (Uexkull, 1921)

Portmannovské neadresné vlastní jevy jsou smyslově vnímatelnými jevy bez známého adresáta – není tedy zjevná příčina (selekčního charakteru), proč by měl daný organizmus těmito jevy disponovat. Stejně tak bakteriální schopnost vnitrokoloniální komunikace a vytvoření mnohobuněčného útvaru musí být založena již v mikroskopické buňce, která však po většinu své existence nemá příležitost tuto svou schopnost využít. Neviditelný mikroorganismus v sobě tedy nosí nejspíše již po miliardy let potenciál vytvořit makroskopický objekt a projevit se ve viditelném světě často složitě strukturovaným tělem.

Je-li schopnost vytvořit sledované jevy nutně přítomna *odvěků* a navíc v buňce neviditelné, je laboratorní umožnění tvorby rozličných kolonií na živném médiu v Petriho misce neadresný vlastní jev par excellence.

V našich podmínkách má pozorovaný tvor možnost vyjádřit se esteticky výrazněji než v přírodě. Jde totiž o proces energeticky náročný a riskantní.



Obr. 8. Kolonie bakterií *Serratia marcescens*; vlevo typ *Rwrw* pigmentován prodigiosinem (Thomson, 2000), vpravo *Fw*, viz experimentální část.

Portmannovy představy tak doplňujeme o naše pojetí biologické niky, tedy životního prostoru, ve kterém může živý tvor rozvíjet svůj estetický potenciál. Vlastní jevy mohou vznikat kdykoliv se naskytne příležitost. Nika pro vytvoření vlastních jevů se otevírá na ploše motýlích křídel i na velké ploše dorsa zadožábřých plžů. V případě námi sledovaného rodu *Serratia* tvoří ideální životní niku Petriho misky. Bakteriální buňka, jejímž přirozeným světem je lidským okem neviditelný vesmír, dostává v námi

poskytnuté nice prostor zviditelnit se v průběhu několika set generací (v lidském měřítku několik desítek hodin) ve viditelném světě v čisté monokoloniální formě, svou estetickou povahou jakoby určené k vnímání. V čisté podobě mohou bakterie svůj potenciál vytvoření strukturovaného těla s mnoha esteticky poutavými prvky realizovat v podobě monokolonií nejlépe v Petriho misce, která je unikátním prostředím hojnosti a klidu, umožňujícím prosperitu kolonie a její realizaci v estetických projevech. Ve srovnání s lidskou kulturou můžeme vzpomenout na rčení *Inter arma silent musae*.

Na teorii o bezstarostnosti, vedoucí k diferenciaci a rozpadu do mnoha barevných a tvarových výrazů upozornil už v sedmdesátých letech Neubauer. Všiml si, že tvarová pestrost je charakteristická pro stabilní a blahobytné ekosystémy jako korálové útesy a deštné pralesy proti polárním krajům a pouštím. Byl inspirován pestrostí vzhledu živočišných druhů vyskytujících se v oblastech s velkou saturací životních potřeb. Zdá se, že i bakterie, pokud jsou ve svém životním cyklu podpořeny optimálním vnějším prostředím, jsou puženy k bohatšímu estetickému projevu. Společensky žijící bakterie tak dává kolonií vznik jevově vyššímu a bohatšímu celku.

Na základě těchto úvah jsme se rozhodli blíže sledovat principy morfogeneze a diferenciaci kolonií *Serratia*.

2. Materiály a metody

2.1 Materiály

a) Použité mikroorganismy

Pro náš výzkum jsme používali bakterii *Serratia marcescens*, sbírkový kmen z mikrobiální sbírky katedry genetiky a mikrobiologie PřFUK.

b) Média a pufry

Pevná média:

ŽA+G: Živný agar s glukózou - obsahuje 40g živného agaru č.2 (Imuna), 5g glukózy (Sigma) v 1000 ml destilované vody.

ŽA: Živný agar - obsahuje 40g živného agaru (Imuna) v 1000 ml destilované vody.

Výše uvedená média obsahují 1,5 % agaru.

Tekutá média:

ŽB: Živný bujon s glukózou - obsahuje 25g živného bujónu (Imuna), 5 g glukózy (Sigma) v 1000 ml destilované vody.

FP: Fosfátový pufr (pH 7,2) – obsahuje 17,9 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$, 3,0 g KH_2PO_4 , 0,5 g NaCl , 1,0 g NH_4Cl v 1000 ml destilované vody.

MM: Minimální médium – obsahuje 2 g glukózy, 0,2 g MgSO_4 , 13,6 g KH_2PO_4 , 2 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 4,2 g KOH , 0,5 mg FeSO_4 , v 1000 ml destilované vody.

ZM: Zamrazovací médium – obsahuje 15 g glycerolu p.a. (Lachema), 2,5 g živného bujónu č.2 (Imuna). Médium bylo doplněno destilovanou vodou do konečného objemu 100 ml

Vpichový agar: Totožný s ŽA.

c) Sklo a pomůcky

Pro práci s kulturami bakterií:

Bakteriologická klička platinová, bakteriologická jehla platinová.

Laboratorní sklo:

K přípravě a uchování pufrů a médií:

Láhve se šroubovacím uzávěrem zn. Duran – 500ml, 250ml; odměrné válce - 200 ml.

Pro práci se suspenzí bakteriální kultury:

Skleněná tyčinka s koncem ve tvaru hokejky (k roztírání suspenze na plotně), skleněné kyvety pro spektrofotometry - 1ml, Erlenmeyerovy baňky 100 ml

Jiné pomůcky:

Petriho misky polystyrénové – průměr 90 mm (ke kultivaci na tuhém médiu), mikroskopické zkumavky Eppendorf s bezpečnostním uzávěrem - 1,5 ml, zkumavky zamrazovací – 2 ml, pH indikační papírky.

Přístroje:

Biological termostat BT 120; spektrofotometr Spekol 11; váhy – ADAM AQT – 200; laminární box GEMINI; fotoaparát Olympus C – 5050 ZOOM; fotoaparát Canon Powershot; binokulární lupa Olympus S240; třepačka Vortex ZX3; nastavitelné mikropipety Socorex Acura 825, objemy 1 – 5000 μ l; magnetická míchačka; centrifuga Eppendorf Minispin; mikroskop Zeiss Axioskop s vrchním a spodním osvětlením a polarizačním filtrem; mikroskop s časosběrnou kamerou; objektivy Zeiss Neofluar 40x, 20x, Zeiss Epiplan 10x, Olympus 100x; mikroskopovací software Axiovision 4.6 a Olympus

d) Sterilizace

Pro zajištění sterilní práce byl používán ajatin a denaturovaný líh. Používané sklo, laboratorní pomůcky, pufrů i kultivační média byly sterilizovány klávováním při 121°C po dobu 20 minut. Práce s bakteriemi byly prováděny sterilním náčiním v laminárním boxu.

2.2 Metody

Teplota a doba inkubace *Serratia marcescens*:

Pro běžná sledování experimentů jsme zvolili dobu inkubace v termostatu 48 - 72 hodin při teplotě 27°C, poté byly misky přeneseny do pokojové teploty a do tmy.

Měření OD:

Optickou denzitu OD jsme měřili na spektrofotometru Spekol 11 ve viditelném světle při vlnové délce 450 nm ve skleněných jednomililitrových kyvetách v intervalu hodnot OD 0 až 1,0. Takovéto uspořádání zajišťuje lineární závislost OD na množství biomasy v suspenzi. Kalibrační vztah mezi hodnotami OD a množstvím buněk, které po vysetí na agarovou plotnu dají vznik koloniím, jsme stanovili experimentálně. V našem uspořádání odpovídá koncentraci buněk cca 108/ml optická denzita pohybující se v rozmezí 0,18 až 0,22. Buňky byly po naměření OD v suspenzy ředěny desítkovou ředící řadou.

Výsev:

Buňky byly resuspendovány, naředěny ve FP a vysety na Petriho misky s agarem (100 µl suspenze na 9 cm P.m.). Na povrchu misky byly buňky rovnoměrně rozprostřeny skleněnou hokejkou.

Takto jsme získali prostředí s rostoucími *monokoloniemi*, tedy bakteriálními koloniemi vzniklými dělením jedné mateřské buňky. V některých experimentech jsme používali biomasu většího množství buněk, které byly ve skupině vysazeny na agarovou plotnu a dělením a růstem vytvořily tzv. *kibuc*. V drtivé většině případů není podstatný morfologický rozdíl mezi *monokolonií* a *kibucem*. Pokud to není pro interpretaci výsledku nezbytně nutné, používáme v práci pro oba typy bakteriálních aglomerací výraz „kolonie“.

a) Izolace jednotlivých klonů a základní metodický postup experimentu

Vypálenou a vychladlou kličkou jsme nabrali část vybrané kolonie určené k izolaci, a několika tahy kličkou jsme ji rozetřeli po agaru na okraji plotny. Kličku jsme vysterilizovali vypálením v plameni, nechali jsme ji vychladnout a rozetřeli okraj prvního roztěru do volného prostoru agarové půdy. Toto jsme opakovali několikrát a v posledním

roztěru jsme získali po inkubaci jednotlivé kolonie.

Purifikace – reselekce a pasážování klonů, probíhala opakovaným vyséváním a pěstováním buněk, získaných z kolonií konkrétní požadované morfologie. Při opakovaném pěstování jsme sledovali procentuální obsazení misky koloniemi udržujícími požadovaný morfotyp. Z těchto kolonií byla vždy znovu odebrána a vyseta biomasa, čímž jsme u mnoha klonů po několika takovýchto pasážích získali purifikovaný klon se stabilní morfologií kolonie – stabilní koloniový fenotyp *Serratia marcescens*.

Izolace klonů určených k purifikaci a uložení jako stabilát specifického fenotypu probíhala v několika krocích. Nejprve napěstováním konkrétních kultur v živném bujónu, fosfátovém pufru a minimálním médiu až do stacionární fáze. Poté byly kultury v určitých intervalech vysévány vždy v několika různých hustotách. Při výsevech jsme sledovali životnost bakterií pocházejících z různých zaočkování a diferenciací tendence fenotypu.

Zdrojová kultura bakterií *Serratia marcescens* byla do počátku našeho experimentu po 4 měsíce uložena v -80 °C jako stabilát 1/1 výsevu kolonií fenotypu Rmi. Pro náš experiment byla mikrobiální biomasa nejprve na ŽA+G namnožena a po 48mi hodinách ve 27 °C v termostatu a dalších dvou dnech růstu při pokojové teplotě vyseta ve 100 µl suspenzích různé hustoty na ŽA+G. Po dalších 48mi hodinách při teplotě 27 °C a 48 hodinách v pokojové teplotě jsme si ověřili, že získaný fenotyp se neliší od fenotypu kultury, ze které stabilát pochází. Tím jsme dostali větší množství Rmi monoklonií.

Z výsevů jsme vybrali monokolonie námi požadovaného tvaru a jejich biomasu použili k zaočkování do Erlenmayerových baněk s ŽB+G. Výsledná optická hustota této suspenze byla 0.04. Z roztoku živného bujónu byly připraveny tři bakteriální zaočkování po 10 ml roztoku živného bujónu – A, B a C. Vzorke A, B i C stály 48 hodin v termostatu při 27 °C.

Inokulum jsme zaočkovali do různých médií (ŽB, MM, FP) tak, aby hodnota OD byla 0,045. Pro převádění buněk do MM a FP jsme suspenzi centrifugovali při 10 000 G.

Pro vysévání na P.m. byla použita desítková ředící soustava.

Při objevení *diferenciačních projevů* kolonií ve výsevu – tedy růstu kolonií jiného

fenotypu, než z jakého pocházela biomasa k vysévání či než jaký byl původně inokulován, byly vybrané diferující kolonie spolu s koloniemi bez zjevných známek změn fenotypu znovu vysety. Sledovali jsme tendence k rozpadu fenotypu a tendence k udržení změněného fenotypu. Při zřetelném vzniku nového fenotypu byly kolonie, které jej nesly, postupným pasážováním purifikovány. Ve většině případů se podařilo získat alespoň z jedné kolonie nesoucí nový fenotyp takový výsev, který tento fenotyp udržel ve třech pasážích po sobě totožný a zahrnující více 85% vyšetých kolonií. Biomasa kolonií, udržujících totožný fenotyp v takovém měřítku i po druhé pasáži, byla vždy uložena jako stabilát do -80 °C a případně do vpichu.

b) Další metody

Pulzní gelová elektroforéza:

Metoda i materiály modifikováno podle (Birren, 1993). Provedeno na pracovišti Státního zdravotního ústavu laboratoří bakteriální genetiky Centra mikrobiologie a epidemiologie. Princip analýzy byl založen na lýze DNA, štěpení agarózových disků restričním enzymem *SpeI* a sledování separace vzorků na pulzní gelové elektroforéze.

Nárůst bakteriální kultury do stacionární fáze:

Bakteriální suspenze byla zaočkována do ŽB tak, aby OD byla v rozmezí 0,03 až 0,05. Dostatečná aerace kultury byla dosažena zaočkováním 10 ml bakteriální suspenze v Erlenmeyerově baňce o objemu 100ml. Takto zaočkována suspenze byla ponechána 24 hod v 27°C.

c) Zamražování a rozmrazování bakteriální suspenze, ukládání do vpichů, dokumentace

Zamražování:

Bezpečné dlouhodobé uchovávání mikroorganismů při fenotypové a genotypové neměnnosti jak pro vědecké, tak pro technologické účely, je jedním z největších problémů současného mikrobiologického výzkumu. Pro různé druhy mikroorganismů se osvědčily různé techniky, přičemž obecně nejspolehlivějším způsobem, jak zachovat po dlouhou dobu genetickou totožnost a životaschopnost mikroorganismů je zamražení a udržování při ultra nízkých teplotách -60 °C až -80 °C a nebo v kryogenických zařízeních při méně než -140 °C. Tyto metody jsou celosvětově stále používanější

(Hubálek, 1996) v mikrobiologických a mykologických sbírkách i genovými inženýry v biotechnologických laboratořích. Nejefektivnější způsob zamražení je u všech mikroorganismů spojen s nalezením odpovídajícího média, se kterým v suspenzi buňky po zamražení sice zastaví své životní pochody, ale přitom udrží svou životaschopnost. Protože mikroorganismy obsahují velké množství vnitrobuněčné vody (*Serratia marcescens* kolem 70%) je třeba aby médium podporovalo její částečné vyloučení z buňky a tím zabránilo jejímu osmotickému poškození, zároveň by však nemělo vést buňku k osmotické dehydrataci a sražení. Za tímto účelem byla také vyvinuta technika ultrarychlého zmražení, které nedovolí buňkám všechnu vodu vyloučit.

Serratia marcescens byla jako testovací organismus kryoprezervace použita vícekrát v suspenzi s různými médii a při různých teplotách. Například (Harrison, 1956) při teplotách kolem $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ v roztoku soli a v roztoku peptonu s výsledky horšími než při uchovávání v destilované vodě, přičemž tyto roztoky jiným prokaryotním organismům vyhovovaly. Nicméně nejúspěšnější při udržení vysokého procenta životaschopnosti zmražené *Serratie marcescens* byli mikrobiologové, používající k jejímu zmražení tekutý dusík a případně ultrarychlý pokles teploty (Hubálek, 1996). Pro udržení růstových charakteristik *Serratie marcescens* (83% buněk přežívá bez jakékoli změny v růstové charakteristice) byli úspěšné také pokusy s glycerolem (Hubálek, 1996), který jsme v množství 15g/100ml média používali při zamrazování i v naší laboratoři.

Médium bylo nejprve naváženo a rozmícháno na magnetické míchačce, poté 20 minut klávkováno bylo při $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ a nakonec po alikvotech (0,1 – 1ml) sterilně rozplněno do zamrazovacích zkumavek a uchováno v $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ zmrzlé. Do zkumavky s vhodným objemem byla při zamrazování mikroorganismů přenesena sterilní platinovou klíčkovou při pokojové teplotě jedna konkrétní kolonie či směs biomasy dvou kolonií stejného fenotypu. Před uložením do boxu s $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, byla vzniklá směs resuspendována na třepačce Vortex.

Rozmražení stabilátů:

Z $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ byl stabilát vyjmut a rozmražen při pokojové teplotě. Část stabilátu byla naředěna ve FP a vyseta, eventuálně přenesena na Petriho misku a vyčárkována.

Některé ze stabilátů byly uloženy do 4 ml ŽA+G do vpichových konzerv.

Fotografování:

Fotografovali jsme fotoaparátem Olympus C – 5050 ZOOM za denního světla ze vzdálenosti cca. 30 cm nad požadovaným objektem.

Fotoaparát Olympus jsme případně upevnili na binokulární lupu a fotografovali požadované objekty se zvětšením. Fotoaparát Canon byl uchycen do redukce fotografického tubusu mikroskopu *Axioskop* a připojen k počítači, na kterém byl spuštěn snímací program AxioVision. Fotografování časosběrných snímků a filmování probíhalo CCD kamerou.

Všechny výsledky uvedené v experimentální části jsou podloženy více (min. dvěma) pozorováními. Každý pokus či pozorování má chronologicky zpracovanou fotografickou dokumentaci po dobu 10 – 20 dnů podle typu sledovaného děje. Fotografie uvedené v obrázkových tabulích Experimentální části jsou vybranými soubory, které daný děj v tom jistém čase nejlépe dokumentují. Fotodokumentace obsahuje téměř 4000 fotografií, prezentované výsledky jsou demonstrativním vzorkem.

3. Experimentální část

3.1 Fenotypová diferenciaci a variabilita

Pro sledování fenotypové diferenciaci bakteriálních kolonií *Serratia marcescens* jsme použili kmen z mikrobiální sbírky katedry genetiky a mikrobiologie, u kterého jsme sice v minulosti diferenciaci děje nesledovali, nicméně předpokládali jsme, že pokud zvolíme odpovídající způsoby kultivace, budeme časem jejich svědky. Klon kmene z mikrobiální sbírky katedry genetiky a mikrobiologie byl získán jako biomasa uchovávaná v -80 °C v podobě nejtypičtějšího fenotypu *Rmi*, tedy v červené mutaci (obr. níže).

V pokusu jsme sledovali rozrůznění fenotypu bakteriálních kolonií, způsobené diferenciaci procesy. Diferenciaci se ve většině případů odvíjela přímo od výsevů biomasy inokulované do médií bohatých či chudých na živiny. Sledované fenotypy procházely i diferenciaci změnami, týkajícími se inokulace jen nepřímo. Například pocházely ze zdrojů, získaných diferenciaci při výsevu inokulované suspenze ale sami se diferenciovaly bez potřeby inokulace.

Diferenciaci děje byly analyzovány z hlediska procentuálního obsazení a rozrůznění fenotypů ve sledovaných výsevech. Spolu s tím byly klony zároveň sledovány z hlediska své schopnosti být donory různých fenotypů, ve smyslu:

R donor W → W donor P → P donor G → G donor Y ...

nebo

R donor W, P, G, Y...

případně donory pro fenotypy opakující celou sekvenci a vykazující diferenciaci v kruhu - kruhový diferenciaci spád ve smyslu:

R donor W → W donor P → P donor R → R donor W ...

nebo

R donor W → W donor R → R donor W ...

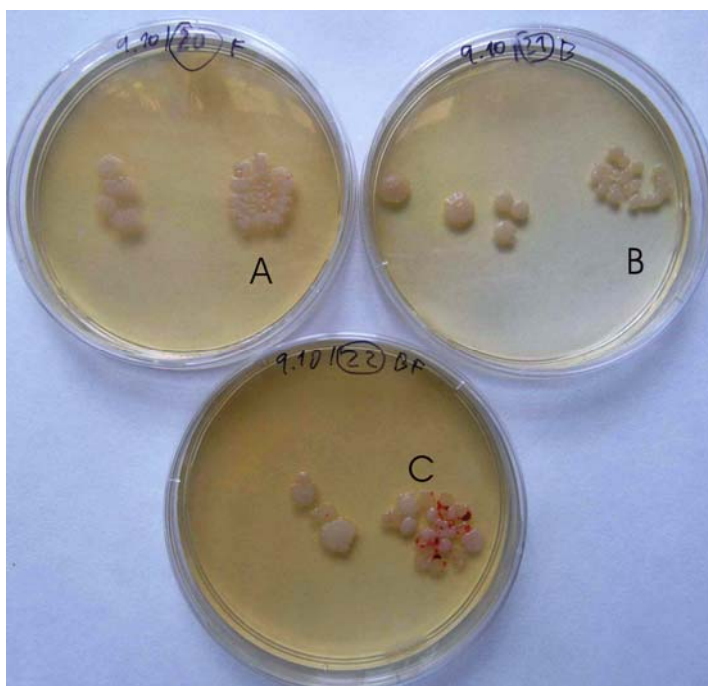
Reselekce, tedy opakovaný výběr fenotypů s nejsilněji vyjádřenými požadovanými znaky za účelem došlechtění některých znaků diferenciovaných kolonií, probíhala v souladu s našimi zkušenostmi ze *společenského života* (Rieger, 2007) bakterie *Serratia marcescens*. Například snahy získat stabilizované fenotypy mikrokoloniového typu či nekonečně rostoucího typu a typů vybarvujících konkrétním způsobem svůj lem

vycházely zejména ze zkušenosti s chováním kolonií. Téměř všechny fenotypy mění až po určitou fenotypově specifickou velikost svůj dospělý průměr podle množství kolonií v jejich okolí. V hustém výsevu byla většina kolonií malých, i když se jednalo o typy při menším počtu kolonií na Petriho misku s normální velikostí (cca 50 – 100 kolonií na misku).



Obr. 9. **Reselektování a pasážování mikrokolonií a makrokolonií.** Vybírali jsme kolonie rostoucí v malém počtu na misce s menším průměrem těl kolonií než je normální průměr při větším počtu kolonií na misku, tedy rostoucí obráceně k našim zkušenostem společenského života kolonií. Tím jsme získali typy s tendencí tvořit malé kolonie.

Stejně tak vybarvování některých fenotypů nebylo znakem diference, nýbrž *společenského chování*. Některé fenotypy pigmentují postupně, dominovým efektem od jedné kolonie dozrávající jako první většinou v oblasti středu misky (Rieger, 2007). U jiných je pigmentace potlačena či naopak indukována přítomností odlišného fenotypu (viz. část „Morfogeneze bakteriálních kolonií“). Na základě různé pigmentace nemusí tedy vždy jít o různé fenotypy, pouze o fenotypy nalézající se na misce v přítomnosti různých odlišných klonů. Ke zjištění vlastností fenotypu je třeba jej pasážovat a při růstu udržovat v určitém počtu kolonií v konstantních podmínkách.

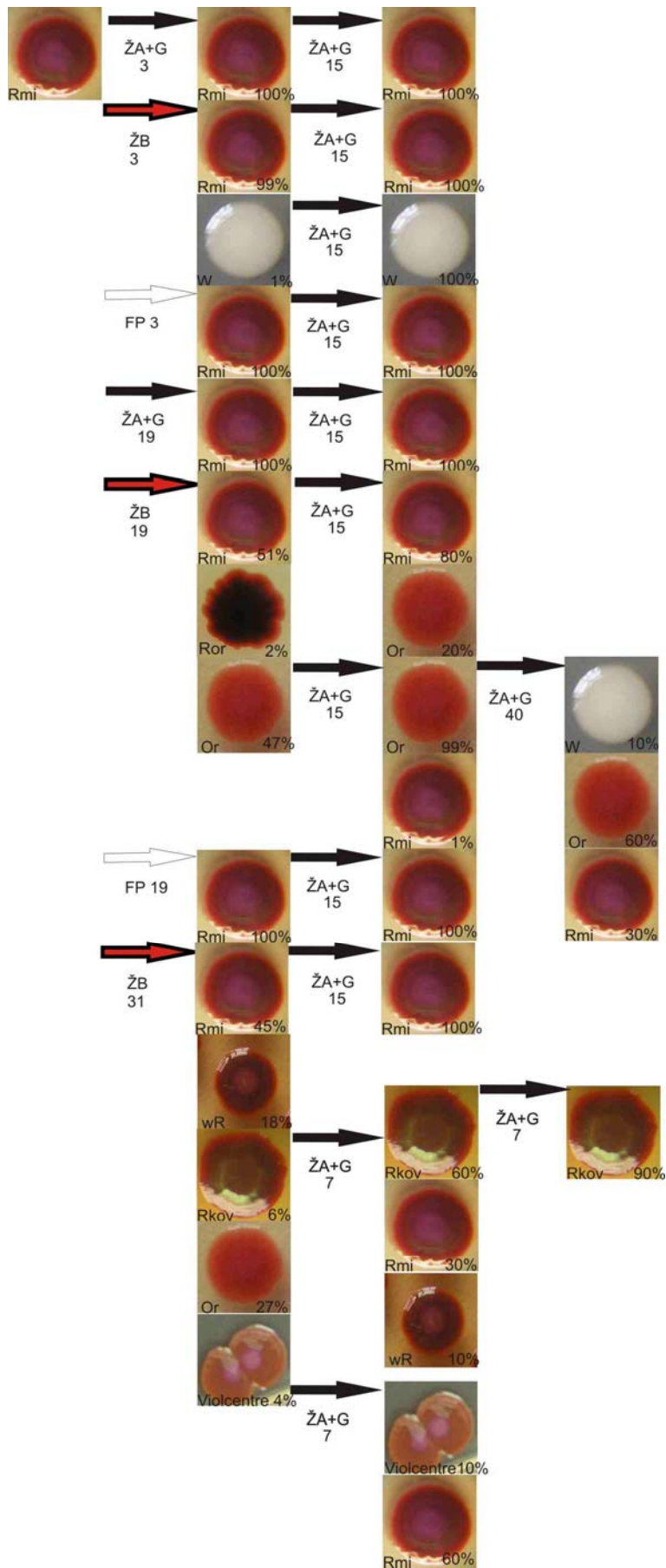


Obr. 10. **Tři výsevy stejného stáří.** Místo výsevu „A“ obsahuje kolonie fenotypu *F*, místo výsevu „B“ obsahuje kolonie fenotypu *W*, místo výsevu „C“ obsahuje směs kolonií obou fenotypů, což způsobuje dřívější pigmentaci kolonií fenotypu *F*.

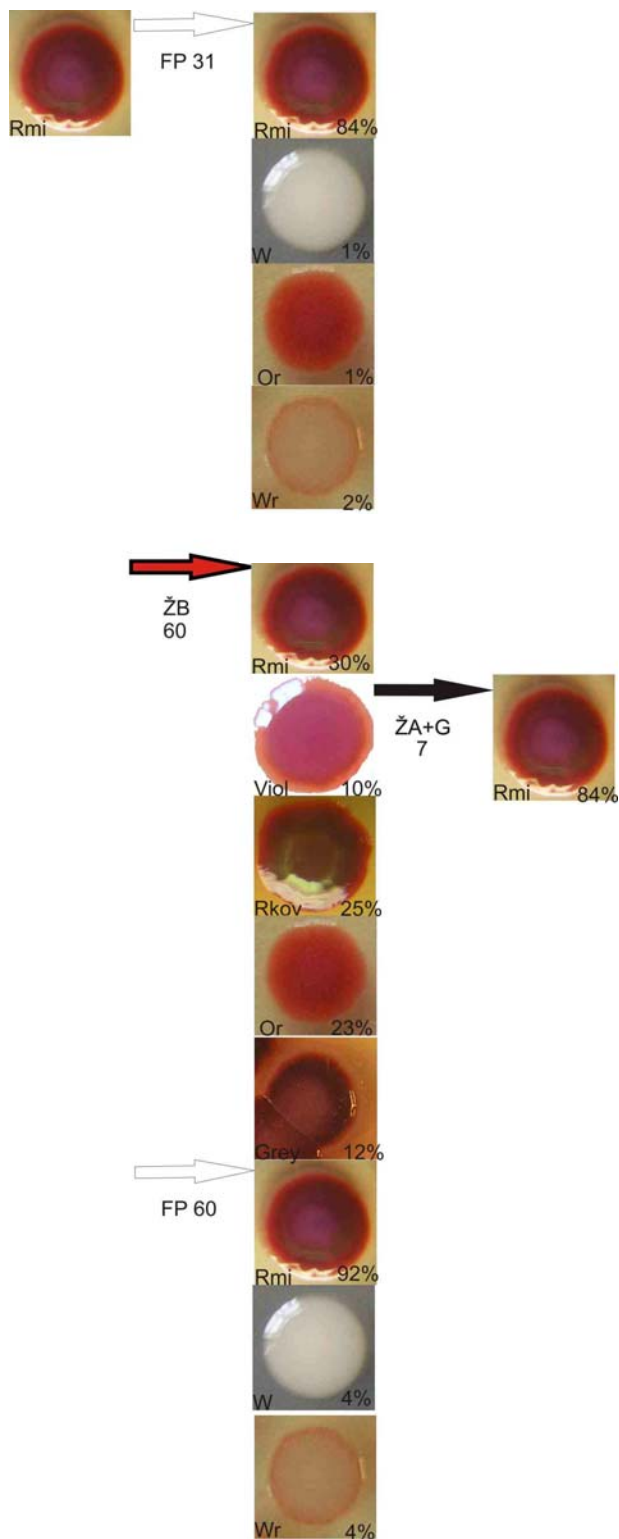
3.1.1 Rozdělení získaných fenotypů a popis morfologie kolonií

Při diferenciálních procesech se nám podařilo získat více než 35 různých fenotypů, z čehož 21 bylo uloženo do -80°C a 10 paralelně také do vpichových konzerv. Celkem 20 z těchto fenotypů bylo uloženo do -80°C jako stabilizované fenotypy, které jsou nyní vedeny pod evidenčními čísly jako klony *Serratia marcescens*, udržující si po vysetí na specifické živné médium specifický fenotyp (všechny klony byly dokumentovány na médiu ŽA+G, některé prošly pasáží přes médium ŽA). Jeden klon (18/5) byl uložen do -80°C jako typ s nestálým fenotypem a přímý zdroj několika různých ustálených fenotypů. Nové fenotypy, získané z fenotypů s vysokou frekvencí variability, měly tendenci udržet v různé míře původní fenotyp donoru a přitom dávat vznik i novým fenotypům. Čím dále od původního fenotypu donoru jsme se dostávali reselekcí, tím méně pevné byly poměry vzniklých nových fenotypů k původnímu fenotypu donoru a tím méně se také při opakovaném výsevu stejného fenotypu dalo určit, jaké nové fenotypy vzniknou. U většiny fenotypů jsme však reselekcí pouze nově diferencovaného fenotypu (pro

selekcí jsme vybírali pouze kolonie nejpodobnější tomuto diferenciací získanému fenotypu) výrazně upevnili jeho procentuální zastoupení ve výsevech. U klonů, které nebyly stabilizovány, k tomu docházelo také, ovšem při druhé či třetí pasáži se reSelekcí - purifikací dosud zvyšované procento obsazení výsevu diferencovaným fenotypem náhle zhroutilo k 0% (viz klony *Grey* či *mikrokolonie W*).



Obr. 11a (viz obr. 11b)

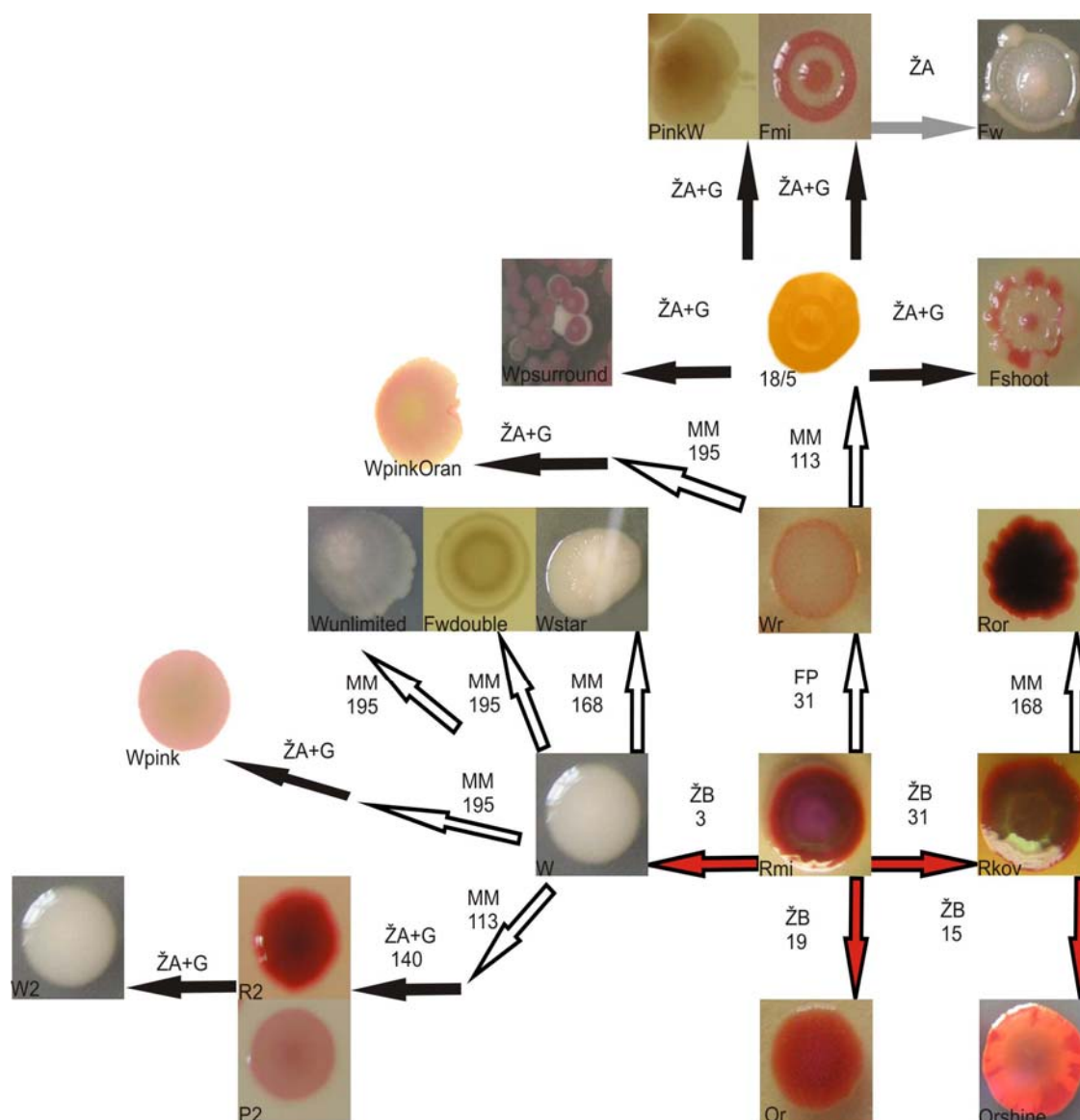


Obr. 11b. **Příklad získání nových fenotypů z fenotypu *Rmi*.** V levém dolním rohu každého obrázku znázorňujícího konkrétní fenotyp je název fenotypu. Šipka značí směr vývoje ve vztahu *donor diferenciace* → *nový diferencovaný fenotyp*. Zkratky u těchto šipek a barva šipek značí typ kultivačního média, ve kterém byl donor pěstován či uchováván (ŽB = živný bujón s glukózou, FP = fosfátový pufr, MM = minimální médium, ŽA = pěstování na živném agaru, ŽA+G = pěstování na živném agaru obsahujícím glukózu; viz „Materiály a metody“), číslo značí počet dní kultivace v médiu.

3.1.1.1 Stabilizované fenotypy

Stabilizované fenotypy byly získány z výsevů selekcí a šlechtěním plynule proměnných znaků, v některých případech (R→ W, W→ R, Wr→ 18/5) náhodným objevením nového fenotypu ve výsevu a jeho pasážováním. Pasážování kolonií, jako metoda pro zvýšení četnosti výskytu pasážovaného fenotypu, je popsáno již v dřívějších pracích s tématem fenotypu bakteriálních kolonií (Čechová, 1976), opakovaná reSelekce jako metoda vedoucí ke zdůraznění a extremizaci fenotypových znaků však příliš rozšířena nebyla, kvůli nestabilnímu chování takto získaných fenotypů ve sbírkách. Násilně, za účelem zesílení některých fenotypových znaků vyšlechtěný klon, měl tendenci k větší mutabilitě a při uchování ve vpichové sbírce k rychlému rozpadu fenotypu¹⁷. Uchovávání reSelekcí vyšlechtěných fenotypů Serratii při nízkých teplotách se ukázalo jako mnohem spolehlivější metoda pro udržení fenotypu než vpichové konzervy. Naše současná sbírka v -80°C obsahuje všechny níže popsané stabilizované fenotypy a jejich stabilita v čase byla opakovaně ověřena. Oproti tomu při výsevech ze vpichových konzerv po době delší než dva měsíce jsme získali uložený fenotyp pouze ve 30% výsevu. Nicméně stále je třeba ověřit stabilitu některých reSelekcí získaných fenotypů uložených v -80 °C a to zejména z hlediska možnosti dlouhodobého pěstování za podmínek obsazenosti výsevů jinými fenotypy či v prostředí se střídavou hustotou výsevu. U klonů stabilních před zmrazením, jsme poté, co byly vysety z -80°C a výsevy měly 100% obsazení původního pasážovaného fenotypu, zjistili při zvýšených nárocích na udržení fenotypu (například vytváření kibuců) postupnou tendenci k návratu k původnímu mateřskému fenotypu, ze kterého byli reSelekcí do stabilních fenotypů vyšlechtěny (konkrétně fenotyp *Fmi* získaný reSelekcí fenotypu vzniklého náhodně z fenotypu *18/5*, se při vytváření kibuců často navrácí k fenotypu *Rmi*). Z fenotypů inokulovaných do chudých a bohatých médií byly pořizovány opakované výsevy. Vzniklé kolonie byly dokumentovány, pasážovány a sledovány z hlediska morfologických změn interpretovatelných jako diferenciační projevy. Některé výsevy však neobsahovaly žádné nové fenotypy či žádné takové fenotypy, které by se pasážováním podařilo stabilizovat. Mapa znázorňující genezi fenotypů, které se podařilo stabilizovat, tak obsahuje pouze ty nově vzniklé fenotypy, které jsou schopné si dlouhodobě udržet svou koloniální morfologii a jde s nimi pracovat jako se specifickými morfotypy.

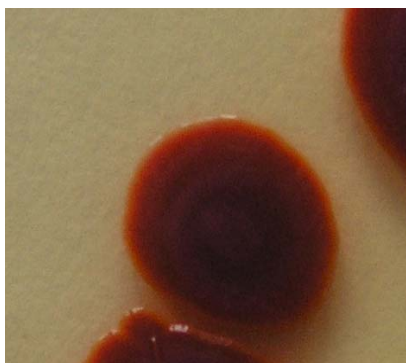
¹⁷ Podle výsledků Z. Neubauera, který v Bull.čs.spol.mikrobiol. 1979 (viz. Biomoc 2002) dokonce píše, že klony vyšlechtěné v plynule proměnných znacích udržovat ve sbírce nelze.



Obr. 12. **Mapa geneze stabilátů.** V levém dolním rohu každého obrázku znázorňujícího konkrétní fenotyp je název příslušného fenotypu. Šipka značí směr vývoje ve vztahu *donor diferenciace* → *nový diferencovaný fenotyp*. Zkratky u těchto šipek a barva šipek značí typ kultivačního média, ve kterém byl donor udržován (ŽB = živný bujón s glukózou, FP = fosfátový pufr, MM = minimální médium, ŽA = pěstování na živném agaru, ŽA+G = pěstování na živném agaru obsahujícím glukózu; viz „Materiály a metody“), číslo značí počet dní kultivace v médiu. Totožnost klonů Rmi, R2, W2 a Wpsurround byla ověřena metodou makrorestrikční analýzy na PFGE.

Následující výčet obsahuje evidenční číslo stabilátu uloženého v -80 °C, název fenotypu, označení fenotypu (*kurzívou*), fotografií fenotypu, popis morfologie a popis diferenciace výsevů. Výsevy označené jako *husté* obsahovaly 450 kolonií na Petriho misku, výsevy označené jako *řídke* obsahovaly 100 kolonií na Petriho misku. Velikost konkrétního fenotypu byla naměřena z množství 10 kolonií alespoň tří výsevů.

9/4 Červená zdrojová - Rmi



Červená kolonie kulatého tvaru, střed může po 14 dnech získávat světlejší barvu a fialový odstín. Je celistvá a lesklá, od počátku růstu zvýšeného až konvexního profilu. Kolonie v hustém výsevu (450 kolonií na Petriho misku) i v řidším výsevu (100 kolonií na Petriho misku) jasně vymezují svůj prostor vůči okolním koloniím a v drtivé většině případů nedojde ke vzájemnému dotyku. V hustém výsevu dochází k dřívějšímu zastavení růstu a kolonie tak mohou mít poloměr o více než 50% menší než v řidkém výsevu. Růst kolonie se během stárnutí kolonie zpomaluje.

Průměr kolonie *Rmi* fenotypu v řidším výsevu

Stáří kolonie v hodinách (dnech)	Velikost v milimetrech
120 (5)	6
336 (14)	7
720 (30)	9

Výsevy z kolonií fenotypu *Rmi* pěstovaného na ŽA+G byly variačně jednotné. Při opakovaných výsevech jsme získávali fenotyp shodující se se zdrojovým klonem 9/4.

Po 80 hodinách kultivace v ŽB+G jsme ve výsevu 450 kolonií na misku našli jednu bílou kolonii (fenotyp *W*, stabilát 10/4). Výsevy kolonie fenotypu *W* měli zastoupení fenotypu *W* 100%.

Po 80 hodinách kultivace ve FP jsme získali 100% klon *Rmi*.

Po 19 dnech kultivace v ŽB+G jsme získali klon *Or* (stabilát 11/4) ve 47% výsevu a klon *Ror* ve 2% výsevu, ostatní kolonie byly fenotypu *Rmi*.

Po 19 dnech kultivace ve FP jsme získali 100% klon *Rmi*

Po 31 dnech kultivace v ŽB+G jsme získali klony *wR* (18%, nestabilní), *Rkov* (6%, stabilát 13/4) *Or* (27%, totožný s 11/4) a *Violcentre* (4%, stabilní v 10% ale pouze v 1. výsevu, poté *Rmi*) Tyto klony se při výsevech objevily vždy v kombinaci s koloniemi fenotypu *Rmi* (45%).

Po 31 dnech kultivace ve FP jsme získali klon *W* (1%), *Or* (1%) a *Wr* (2%, stabilát 14/4),

Ostatní kolonie byly fenotypu *Rmi* (84%).

Po 60 dnech kultivace v ŽB+G jsme získali klony *Viol* (10%, nestabilní), *Rkov* (25%, totožný s 13/4) *Or* (23%, totožný s 11/4) a *Grey* (12%, nestabilní), vždy v kombinaci s koloniemi fenotypu *Rmi* (45%).

Po 60 dnech kultivace ve FP jsme získali klon *W* (4%), *Wr* (4%, totožný se 14/4) a *Rmi* (92%).

10/4 Bílá – W



Bílá kolonie kulatého tvaru. Je celistvá a lesklá, od počátku růstu konvexního profilu. Kolonie v hustém výsevu i v řidším výsevu méně jasně vymezují svůj prostor vůči okolním koloniím a přibližně v polovině případů dojde ke vzájemnému dotyku ale ne splynutí. V hustém výsevu zřídka dochází k dřívějšímu zastavení růstu. Růst kolonie se během stárnutí

kolonie zpomaluje a kolonie má tendenci vytvářet z biomasy lem s vyšší průsvitností.

Průměr kolonie *W* fenotypu v řidším výsevu

Stáří kolonie v hodinách (dnech)	Velikost v milimetrech
120 (5)	5
336 (14)	8
720 (30)	10

Výsevy z kolonií fenotypu *W* byly variačně jednotné. Při opakovaných výsevech jsme získávali fenotyp shodující se se zdrojovým klonem *W* 10/4 se 100% četností. Ani při mnohonásobném vysévání na ŽA+G se nám nepodařilo z tohoto fenotypu získat jiný fenotyp.

Při zaočkování klonu *W* do ŽB+G a následném převedení do MM (viz. metodika) jsme při všech přímých výsevech získávali pouze klon *W*, teprve po 113 dnech kultivace a poté dalších 140 dnech růstu na ŽA + G jsme získali ve výsevu z *W* biomasy 8% jasně červených kolonií *Rmi* (stabilát *R2*), které byly při pěstování na ŽA+G opět donorem *W*.

Při kultivaci v MM jsme ve všech výsevech a pasážováních vyseté biomasy získávali pouze klon *W*. Teprve po 168 dnech kultivace v MM obsahoval výsev následující po dvou pasážích fenotypu *W* na ŽA + G klon *Wstar* (30%, stabilát 19/5). Výsevy přímo z MM obsahovaly vždy 100% *W*.

Po 195 dnech kultivace jsme při výsevu získali klon *Fwdouble* (30%, stabilát 26/5) a pasážováním a následnou opakovanou reSelekcí několika klonů *W* ve zbylých 70% výsevu klon *Wunlimited* (stabilát 28/5) a klon *Wpink* (stabilát 23/5).

11/4 Oranžová - Or



Oranžová kolonie kulatého tvaru s nepravidelným okrajem, celistvá a lesklá, od počátku růstu lehce zvýšená. Kolonie v hustém výsevu i v řidším výsevu nevymezují svůj prostor vůči okolním koloniím a často dojde ke vzájemnému dotyku a splynutí. V hustém výsevu zřídka dochází k dřívějšímu zastavení růstu. Růst kolonie se během stárnutí kolonie zpomaluje a kolonie má tendenci o několik

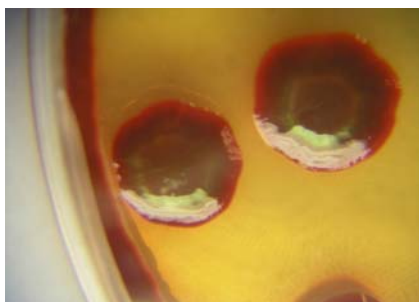
stupňů ztmavnout k červenooranžovému odstínu.

Průměr kolonie *Or* fenotypu v řidším výsevu

Stáří kolonie v hodinách (dnech)	Velikost v milimetrech
120 (5)	6
336 (14)	7
720 (30)	12

Výsevy z kolonií fenotypu *Or* byly variačně jednotné. Při opakovaných výsevech jsme získávali fenotyp shodující se se zdrojovým klonem *Or* 11/4 s více než 80% četností v kombinaci s *R* (1 – 5%) a *Rkov* (15 – 19%).

13/4 Červená s kovově zeleným leskem - Rkov



Tmavě červená kolonie kulatého tvaru. Je celistvá, konvexní a lesklá, od počátku růstu s jasně zeleným nádechem viditelným zejména v kruhu koncentrickému ke středu kolonie a vzdálenému od něj u 30 dní staré kolonie cca 2mm. Kolonie v hustém výsevu i v řidším výsevu jasně vymezují svůj prostor

vůči okolním koloniím a v 80% případů nedojde ke vzájemnému dotyku. Růst kolonie se během stárnutí kolonie zpomaluje.

Průměr kolonie *Rkov* fenotypu v řidším výsevu

Stáří kolonie v hodinách (dnech)	Velikost v milimetrech
120 (5)	5
336 (14)	8
720 (30)	11

Výsevy z kolonií fenotypu *Rkov* byly variačně jednotné. Při opakovaných výsevech jsme získávali fenotyp shodující se se zdrojovým klonem 13/4 při více než 75% obsazení výsevu (zejména v kombinaci s klonem fenotypu *R* a *Or*). Reselekcí jsme během dvou pasáží získali 100% obsazení výsevu fenotypem *Rkov*.

Při zaočkování klonu *Rkov* do ŽB+G jsme získali po 15 dnech kultivace klon *Wr* (5%, totožný se stabilátem 11/4), *W* (37%), *Viol* (9%) a *Pink* (2%), ostatní kolonie byly fenotypu *Rkov* (47%).

Po 15 dnech kultivace v MM jsme získali 18% *W*, 1% *Wr*, 81% *Rkov* a po jedné kolonii fenotypu *Pink* a *wR*.

Po 45 dnech kultivace v ŽB+G jsme získali 29% *Pink*, 29% *W* a 42% *Rkov*.

Po 45 dnech kultivace v MM jsme získali 3% *Pink*, 37% *W* a 60% *Rkov*.

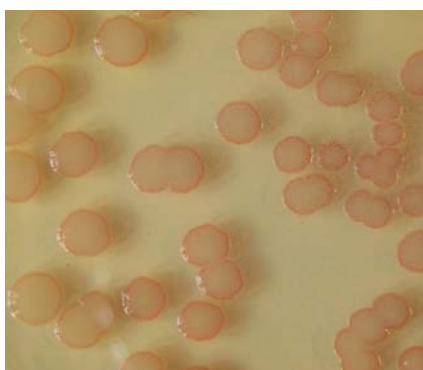
Po 93 dnech kultivace v ŽB+G 100% klon *DarkrR* (nestabilní).

Po 113 dnech kultivace v ŽB+G jsme získali klony 33% *DarkrPw* a 67% *Rpink*.

Po 113 dnech kultivace v MM klony 83% *W* a 17% *Rkov*.

Po 168 dnech kultivace v MM jsme získali *Ror* (6%, stabilát 22/5) a 94% *W*.

14/4 Bílá s červeným lemem - *Wr*



Bílá kolonie kulatého tvaru, okraj po 6ti dnech získá na okraji červený odstín. Je celistvá, hladká a lesklá, od počátku růstu konvexní. Kolonie v hustém výsevu i v řidším výsevu jasně vymezují svůj prostor vůči okolním koloniím jiného fenotypu. S koloniemi stejného fenotypu poměrně často tvoří snadno rozlišitelné soukolonií. Růst kolonie se během stárnutí kolonie zpomaluje. Rychlost nástupu červené barvy okraje kolonie je vždy dána barevným trendem v jejím bezprostředním okolí.

Průměr kolonie *Wr* fenotypu v řidším výsevu

Stáří kolonie v hodinách (dnech)	Velikost v milimetrech
120 (5)	6
336 (14)	7
720 (30)	11

Výsevy z kolonií fenotypu *Wr* byly variačně jednotné. Při opakovaných výsevech jsme získávali fenotyp shodující se se zdrojovým klonem 14/4 při více než 85% obsazení výsevu.

Při zaočkování klonu *Wr* do ŽB+G jsme získali po 15 dnech kultivace 4% *W*, 2% *Pink*, 76% *wR*, 9% *Wr* a 9% *Wyellow*.

Po 15 dnech kultivace v MM jsme získali 100% *Wr*.

Po 45 dnech kultivace v ŽB+G jsme získali 65% *Pink* a 35% *W*.

Po 45 dnech kultivace v MM jsme získali 20% *W* a 80% *Wr*.

Po 93 dnech kultivace v MM jsme získali 25% *W* a 75% *Wr*.

Po 113 dnech kultivace v ŽB+G jsme získali 57% *W*, 3% *ragged*, 3% *Wpink* a 37% *Wr*.

Po 113 dnech kultivace v MM jsme získali 19% *W*, 11% *wRor* a 70% *Wr*. Jediná kolonie fenotypu *W bílá s kroužkem* byla uložena do stabilátu pod číslem 18/5, protože výsevy z této kolonie neobvyklého fenotypu byly velmi variabilní a diferenciacně bohaté.

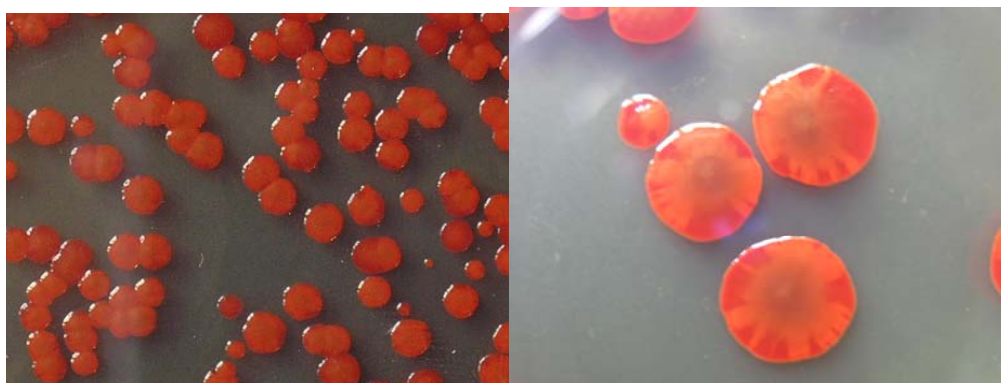
Po 168 dnech kultivace v ŽB+G jsme získali 100% *W*.

Po 168 dnech kultivace v MM jsme získali 20% *W*, 13% *Wor*, 6% *Wviol* a 1% *yellow*.

Po 195 dnech kultivace v MM byl proveden pokusný výsev, který obsahoval velmi malý počet světlých kolonií, ovšem ze kterého se nám podařilo vypurifikovat klon se zcela normální životností a nezvykle zbarveným – proužkovaným – tělem kolonie, stabilát *WpinkOran 24/5* .

Při mnohonásobném vysévání neinokulované biomasy na ŽA+G se nám nepodařilo z fenotypu *Wr* získat jiný fenotyp.

16/4 Oranžově svítící kolonie - *Orshine*



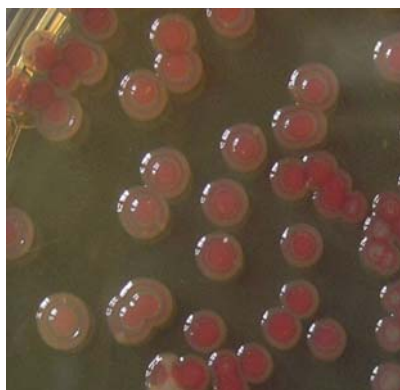
Oranžová kolonie kulatého tvaru. Již v průběhu prvních dvou dnů se svítivě jasnými dostřednými pruhy. Je celistvá a lesklá, od počátku růstu mírně konvexní až vyvýšená. Kolonie v hustém výsevu i v řidším výsevu jasně vymezují svůj prostor vůči okolním koloniím stejného i jiného fenotypu. Růst kolonie se během stárnutí kolonie zpomaluje.

Průměr kolonie *Orshine* fenotypu v řidším výsevu

Stáří kolonie v hodinách (dnech)	Velikost v milimetrech
120 (5)	5
336 (14)	8
720 (30)	10

Výsevy z kolonií fenotypu *Orshine* byly variačně jednotné. Při opakovaných výsevech jsme získávali fenotyp shodující se se zdrojovým klonem 16/4 při více než 85% obsazení výsevu.

17/5 Fontánka - Fmi



Bílo-červená až růžovo-červená lesklá kolonie kulatého puklicového tvaru se středem a okrajem jasně vypouklými. Kolonie mají nepravidelný profil. Kolonie v hustém výsevu i v řidším výsevu jasně vymezují svůj prostor vůči okolním koloniím stejného i jiného fenotypu. Při množství 10 a méně na 9cm misku tvoří výhřezky směrem do volného prostoru i k sousedním koloniím, podobně jako klon 20/5. Růst kolonie se během stárnutí kolonie rychle zpomaluje. Rychlost nástupu červené barvy do okraje a středu kolonie je dána barevným trendem v jejím bezprostředním okolí. I samostatné kolonie během 3 dnů zružoví v oblasti středu a lemu kolonie a během dalšího týdne v této oblasti zčervenají. Právě oblast středu a lemu vytváří zvláštní profil kolonie (obr. níže vlevo), který nás vedl k jejímu pojmenování. Kibucy tohoto klonu, mohou mít tendenci okrajový lem zcela ztrácet (obr. vpravo).



Při hustém výsevu mohou tyto kolonie svůj profil ztrácet a jsou pak pouze hladké a konvexní. Pokud jsou přesazeny do volného prostoru, opět členitý profil získají. Kolonie *Fmi* také ztrácejí svůj typický profil při pěstování na ŽA (bez glukózy).

Průměr kolonie *Fmi* fenotypu v řidším výsevu

Stáří kolonie v hodinách (dnech)	Velikost v milimetrech
120 (5)	5
336 (14)	7
720 (30)	8

Výsevy z kolonií fenotypu *F* byly variačně jednotné. Při opakovaných výsevech jsme získávali fenotyp shodující se se zdrojovým klonem 17/5 při více než 95% obsazení výsevu.

Při vysetí na ŽA jsme získali malé procento kolonií fenotypu W. Ty jsme purifikovali na ŽA a při 100% obsazení výsevu koloniemi fenotypu W jsme získanou biomasu vyseli na ŽA+G, kde se tentokrát bílý fenotyp vrátil k fontánkovitému profilu, čímž jsme získali fenotyp *F_w* (stabilát 25/5).

18/5 *Bílá s kroužkem*



Bílá kolonie kulatého puklicového tvaru jasným středovým kruhem. Je celistvá, hladká a lesklá, od počátku růstu mírně konvexní. Růst kolonie se během stárnutí kolonie rychle zpomaluje.

Průměr kolonie fenotypu *Bílá s kroužkem* v řidším výsevu

Stáří kolonie v hodinách (dnech)	Velikost v milimetrech
120 (5)	5
336 (14)	8
720 (30)	10

Výsevy z kolonií fenotypu *Bílá s kroužkem* byly variačně nejednotné. Při opakovaných výsevech jsme získávali fenotyp shodující se klonem *Fmi 17/5* při více než 60% obsazení výsevu.

Opakované výsevy ze středu kolonie byly zdrojem pouze pro fenotyp *Fmi*, několik opakovaných výsevů z jejího okraje však při výsevu alespoň 50 cfu na misku dalo vznik alespoň jedné kolonii fenotypu *Wpsurround*, ta byla pasážována a uložena jako stabilát 27/5.

Další pasáže fenotypu *Fmi* vytvořily jako vedlejší produkt reselektce stabilní fenotyp *Fshoot* (stabilát 20/5). Výsevy z 18/5 byly později znovu reselektovány na ŽA+G, kde jsme takto vypurifikovali fenotyp *PinkW* (stabilát 21/5).

18/5 byla také zdrojem několika purifikačních linií, které obsahovaly fenotypy s tendencí k nepravidelnému růstu. Nepravidelnost však nebyla reselekcí rozšiřitelná na více než 10% výsevu a ve více než polovině případů se po vysetí neobjevila vůbec.

19/5 Hvězdicovité kolonie - *Wstar*



Bílá kolonie kulatého tvaru s jasnými dostřednými vlnami vystupujícími nízko nad povrchem kolonie a vytvářejícími vzor hvězdy. Je celistvá a lesklá, od počátku růstu mírně vystouplá. Kolonie v hustém výsevu i v řidším výsevu jasně vymezují svůj prostor vůči okolním koloniím stejného i jiného fenotypu. Růst kolonie se během stárnutí kolonie zpomaluje.

Průměr kolonie fenotypu *Wstar* v řidším výsevu

Stáří kolonie v hodinách (dnech)	Velikost v milimetrech
120 (5)	6
336 (14)	10
720 (30)	14

Výsevy z kolonií fenotypu *Wstar* byly variačně jednotné. Při opakovaných výsevech jsme získávali fenotyp shodující se se zdrojovým klonem 19/4 při více než 95% obsazení výsevu.

20/5 Rozlézavé výhonkovité F kolonie - Fshoot



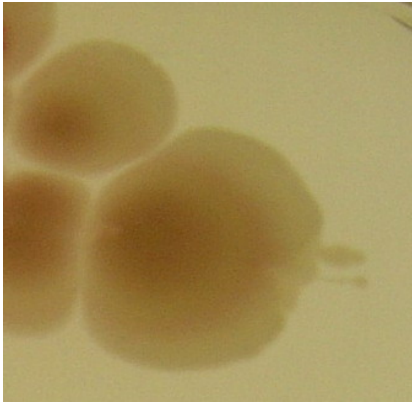
Bílo-červená až růžovo-červená lesklá kolonie nekulatého puklicového tvaru se středem a okrajem jasně vypouklými. Je roztrhaného tvaru, od počátku růstu na středu mírně konvexní. Kolonie v hustém výsevu i v řidším výsevu jasně vymezují svůj prostor vůči okolním koloniím stejného i jiného fenotypu. Intenzivně a již od časného stádia růstu (3 dny) tvoří výhřezky, což způsobuje její necelistvost. Růst kolonie se během stárnutí kolonie zpomaluje. Rychlost nástupu červené barvy okraje a středu kolonie není dána barevným trendem v jejím bezprostředním okolí tak silně jako u klonu 17/5. I samostatné kolonie během 2 dnů růstu růžoví a během čtyř dnů růstu zčervenají. I starší několikátýdenní kolonie však mají po obvodu množství bílých výhřezků.

Průměr kolonie fenotypu *Fshoot* v řidším výsevu

Stáří kolonie v hodinách (dnech)	Velikost v milimetrech
120 (5)	6
336 (14)	7,4
720 (30)	7,5

Výsevy z kolonií fenotypu *Fshoot* byly variačně jednotné. Při opakovaných výsevech jsme získávali fenotyp shodující se se zdrojovým klonem 20/5 při více než 95% obsazení výsevu.

21/5 Rostoucí - *PinkW*



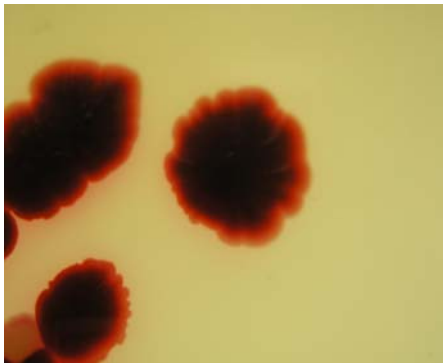
Bílá, na středu světle růžová kolonie kulatého tvaru. Je celistvá a lesklá, od počátku růstu lehce vystouplá, nekonvexní. Kolonie v hustém výsevu i v řidším výsevu si příliš nevymezují svůj prostor vůči okolním koloniím stejného fenotypu. Růst kolonie se během stárnutí kolonie příliš nezpomaluje a kolonie má tendenci k nekonečnému růstu v nízké kobercovité biomase.

Průměr kolonie fenotypu *PinkW* v řidším výsevu

Stáří kolonie v hodinách (dnech)	Velikost v milimetrech
120 (5)	6
336 (14)	10
720 (30)	16

Výsevy z kolonií fenotypu *PinkW* byly variačně jednotné. Při opakovaných výsevech jsme získávali fenotyp shodující se se zdrojovým klonem 21/5 při více než 75% obsazení výsevu.

22/5 Roranžokraj - Ror



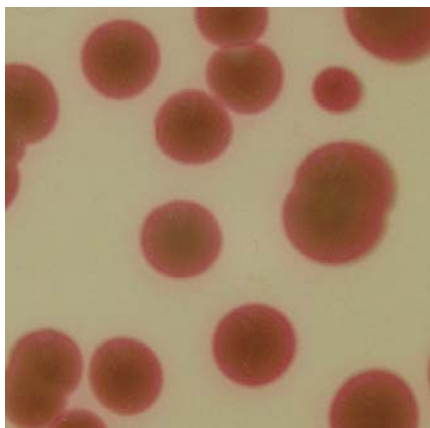
Červená kolonie nekulatého tvaru se svítivě jasným pruhem na okraji. Je celistvá s dostřednými vlnami a matná, od počátku růstu mírně konvexní. Růst kolonie se během stárnutí kolonie zpomaluje.

Průměr kolonie fenotypu *Ror* v řidším výsevu

Stáří kolonie v hodinách (dnech)	Velikost v milimetrech
120 (5)	5
336 (14)	9
720 (30)	11

Výsevy z kolonií fenotypu *Ror* byly variačně jednotné. Při opakovaných výsevech jsme získávali fenotyp shodující se se zdrojovým klonem 22/5 při více než 85% obsazení výsevu.

23/5 Špinavě bílá s růžovým okrajem - *Wpink*



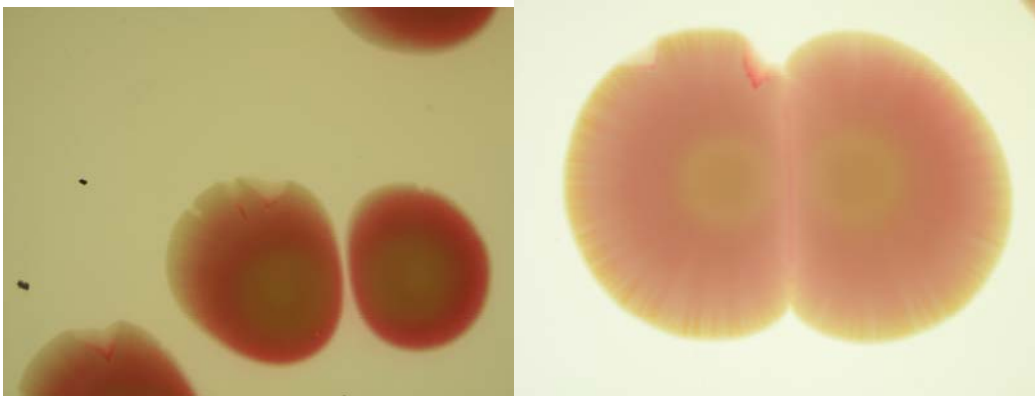
Světlá až bílá kolonie s růžovým okrajem, kulatého tvaru. Je celistvá a lesklá, od počátku růstu mírně konvexní. Kolonie v hustém výsevu i v řidším výsevu si příliš nevymezují svůj prostor vůči okolním koloniím stejného fenotypu. Růst kolonie se během stárnutí kolonie zpomaluje.

Průměr kolonie fenotypu *Wpink* v řidším výsevu

Stáří kolonie v hodinách (dnech)	Velikost v milimetrech
120 (5)	5
336 (14)	9
720 (30)	10

Výsevy z kolonií fenotypu *Wpink* byly variačně jednotné. Při opakovaných výsevech jsme získávali fenotyp shodující se se zdrojovým klonem 23/5 při více než 85% obsazení výsevu.

24/5 *Wpink oranžlem*



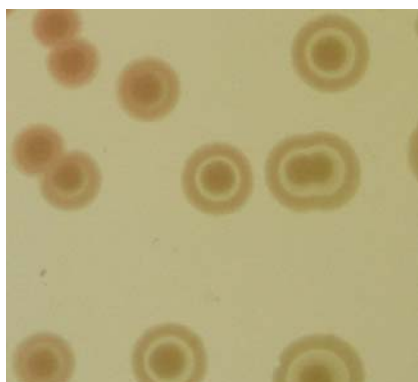
Světlá až bílá kolonie s růžovým a oranžovým okrajem, kulatého tvaru. Je celistvá a lesklá, od počátku růstu mírně konvexní. V kolonii jsou jasně viditelné růžové dostředné pruhy a na jejím okraji časté klínovité nepravidelnosti lemované červenou biomasou. Kolonie v hustém výsevu i v řidším výsevu jasně vymezují svůj prostor vůči okolním koloniím stejného fenotypu. Růst kolonie se během stárnutí kolonie zpomaluje.

Průměr kolonie fenotypu *Wpink oranžlem* v řidším výsevu

Stáří kolonie v hodinách (dnech)	Velikost v milimetrech
120 (5)	6
336 (14)	10
720 (30)	14

Výsevy z kolonií fenotypu *Wpink oranžlem* byly variačně jednotné. Při opakovaných výsevech jsme získávali fenotyp shodující se se zdrojovým klonem 24/5 při více než 90% obsazení výsevu.

25/5 – bílá F kolonie – Fw



Bílá kolonie kulatého tvaru s jasně viditelným širším středovým puklicovým nárůstem a odděleným valem. Je celistvá a lesklá, na počátku růstu spojená v bílou biomasu, která se během tří dnů při velikosti 4-5mm začne diferencovat. Kolonie v hustém výsevu i v řidším výsevu jasně vymezují svůj prostor vůči okolním koloniím stejného fenotypu. Růst kolonie se během stárnutí kolonie zpomaluje.

Během sedmi dnů se v nejhustším výsevu mění barva celé kolonie na růžovou. Rychlost nástupu růžové barvy kolonie je vždy dána barevným trendem v jejím bezprostředním okolí.

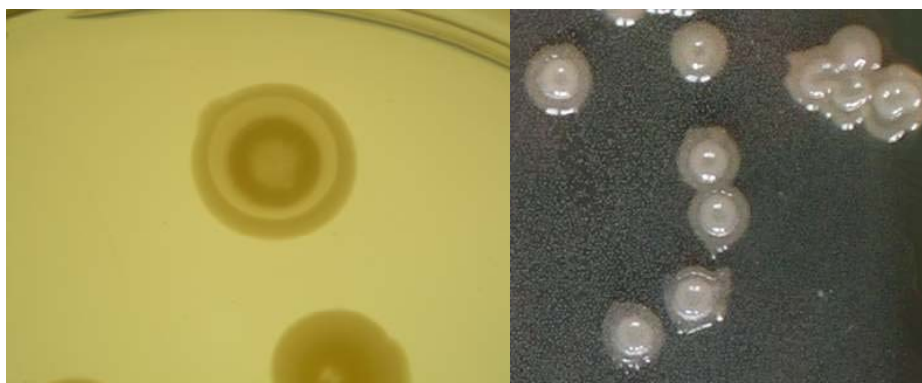
Při vysévání *Fmi* na půdu chudší na živiny (ŽA bez glukózy) jsme získali světlé a později purifikací až bílé konvexní kolonie, které po přesetí na půdu s glukózou udržely bílý barevný fenotyp a okamžitě získali tvarový fenotyp Fontánek *Fmi*.

Průměr kolonie fenotypu *Fw* v řidším výsevu

Stáří kolonie v hodinách (dnech)	Velikost v milimetrech
120 (5)	5
336 (14)	7
720 (30)	7,6

Výsevy z kolonií fenotypu *Fw* byly variačně jednotné. Při opakovaných výsevech jsme získávali fenotyp shodující se se zdrojovým klonem 25/5 při 99% obsazení výsevu.

26/5 Bílá Fdvoilem – Fwdouble



Bílá kolonie kulatého tvaru s jasně viditelným širším středovým valem a odděleným okrajovým valem. Je celistvá a lesklá, na počátku růstu spojená v bílou biomasu, která se během tří dnů při velikosti 4-5mm začne diferencovat. Růst kolonie se během stárnutí kolonie zpomaluje. Profil této kolonie je podobný profilu *Fmi*, jen středový výstupek nemá tvar homole, nýbrž kroužku. Celou kolonii tak při pohledu shora tvoří dva koncentrické plastické kruhy.

Průměr kolonie fenotypu *Fwdouble* v řidším výsevu

Stáří kolonie v hodinách (dnech)	Velikost v milimetrech
120 (5)	5
336 (14)	7
720 (30)	9

Výsevy z kolonií fenotypu *Fwdouble* byly variačně jednotné. Při opakovaných výsevech jsme získávali fenotyp shodující se se zdrojovým klonem 26/5 při více než 85% obsazení výsevu.

27/5 Bílá obklopující – *Wpsurround*



Bílá kolonie kulatého tvaru, celistvá a lesklá, od počátku růstu konvexní. Má tendenci obrůstáním obklopovat objekty a biomasu kolonií jiných fenotypů ve svém okolí. Růst se během stárnutí kolonie ve všech jejích částech – v mateřském těle původní kolonie i v biomase obklopující okolní objekty – zpomaluje a kolonie má tendenci

vypouštět z biomasy svého okraje kratší lem s vyšší průsvitností. Při pěstování klonů pouze tohoto fenotypu na jedné misce v řidším a v hustším výsevu, nedochází k obrůstání kolonií. Kolonie starší než 60 dní obsahují výrazně větší množství bradavicovitých výrůstků a krystalků než jiné klony.

Průměr kolonie fenotypu *Wpsurround* v řidším výsevu

Stáří kolonie v hodinách (dnech)	Velikost v milimetrech
120 (5)	5
336 (14)	7
720 (30)	8

Výsevy z kolonií fenotypu *Wpsurround* byly variačně jednotné. Při opakovaných výsevech jsme získávali fenotyp shodující se se zdrojovým klonem 27/5 při více než 85% obsazení výsevu.

28/5 Bílá nekonečně rostoucí - *Wunlimited*



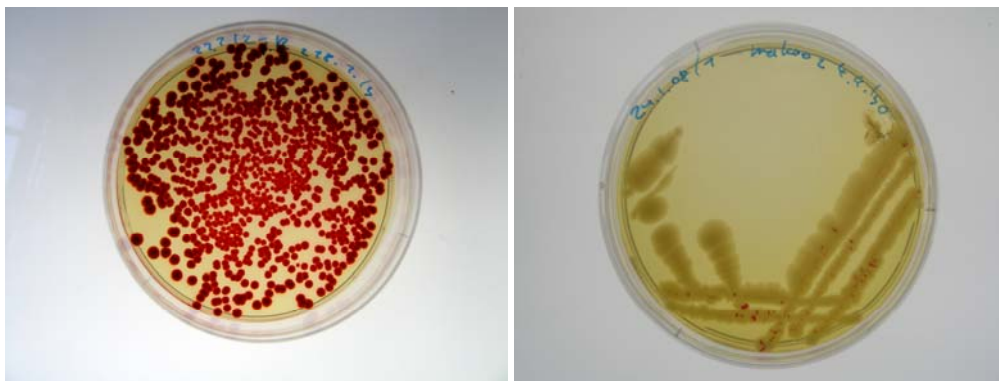
Bílá kolonie kulatého tvaru, celistvá a matná, od počátku růstu mírně vystouplá. Kolonie v hustém výsevu i v řidším výsevu jasně vymezují svůj prostor vůči okolním koloniím stejného fenotypu, ovšem při řidším výsevu obsazují největší možnou plochu agaru ve svém okolí. Růst se během stárnutí kolonie příliš nezpomaluje a kolonie má tendenci vytvářet z biomasy po dlouhou dobu lem s vyšší průsvitností.

Průměr kolonie fenotypu *Wunlimited* v řidším výsevu

Stáří kolonie v hodinách (dnech)	Velikost v milimetrech
120 (5)	6
336 (14)	10
720 (30)	17

Výsevy z kolonií fenotypu *Wunlimited* byly variačně jednotné. Při opakovaných výsevech jsme získávali fenotyp shodující se se zdrojovým klonem 28/5 při více než 90% obsazení výsevu.

29/5 Červená kolonie z *W* (návrát) – R2



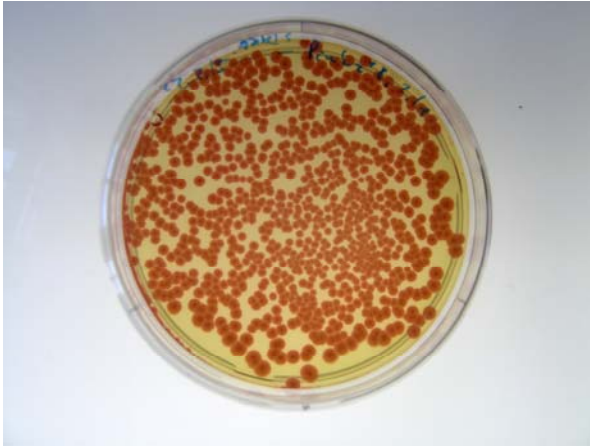
R2 je klasická červená kolonie fenotypu totožného s *Rmi*, po opakovaném výsevu drží fenotyp 1500 *Rmi* ku 50 *W* koloniím.

Geneze

Mateřská kolonie *Rmi* byla tři dny kultivována v ŽB+G. Ve výsevech se objevily velmi řídké *W* kolonie ($W/Rmi = 1/200$). Vyšetí těchto kolonií dalo opakovaně 100% *W* kolonií a jako stabilní klon byl tento *W* fenotyp uložen pod číslem 10/4. Další vyšetí stabilátu dala vždy ve 100% fenotyp *W* bez jakýchkoliv variací. Kolonie *W* byla poté na 113 dní zaočkována do ŽB+G s výsledným vyšetím 100% kolonií *W* fenotypu na ŽA+G. Biomasa jedné z takto získaných kolonií byla nanesena v linkách na ŽA+G a zde se v nárůstu objevilo červené mramorování.

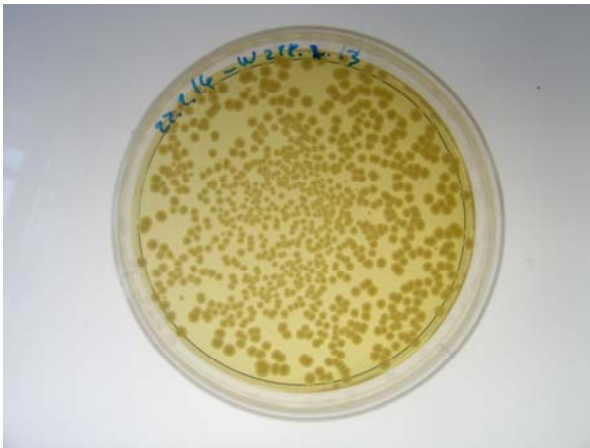
Větší množství biomasy obou barev z mramorování bylo vyseto v hustém ředění na misky a získali jsme přes 100 bílých *W*, jednu růžovou (předek P2) a sedm klasických sytě červených *Rmi* kolonií. Ty byly následně purifikovány, přičemž nedošlo k variačním změnám.

30/5 Růžová kolonie z W (návrát) – P2



Výsevy z kolonií fenotypu *P2* byly variačně jednotné. Při opakovaných výsevech tohoto fenotypu jsme získávali fenotyp shodující se se zdrojovým klonem 30/5 z více než 99% obsazení výsevu

31/5 Bílá kolonie z W (návrát) – W2

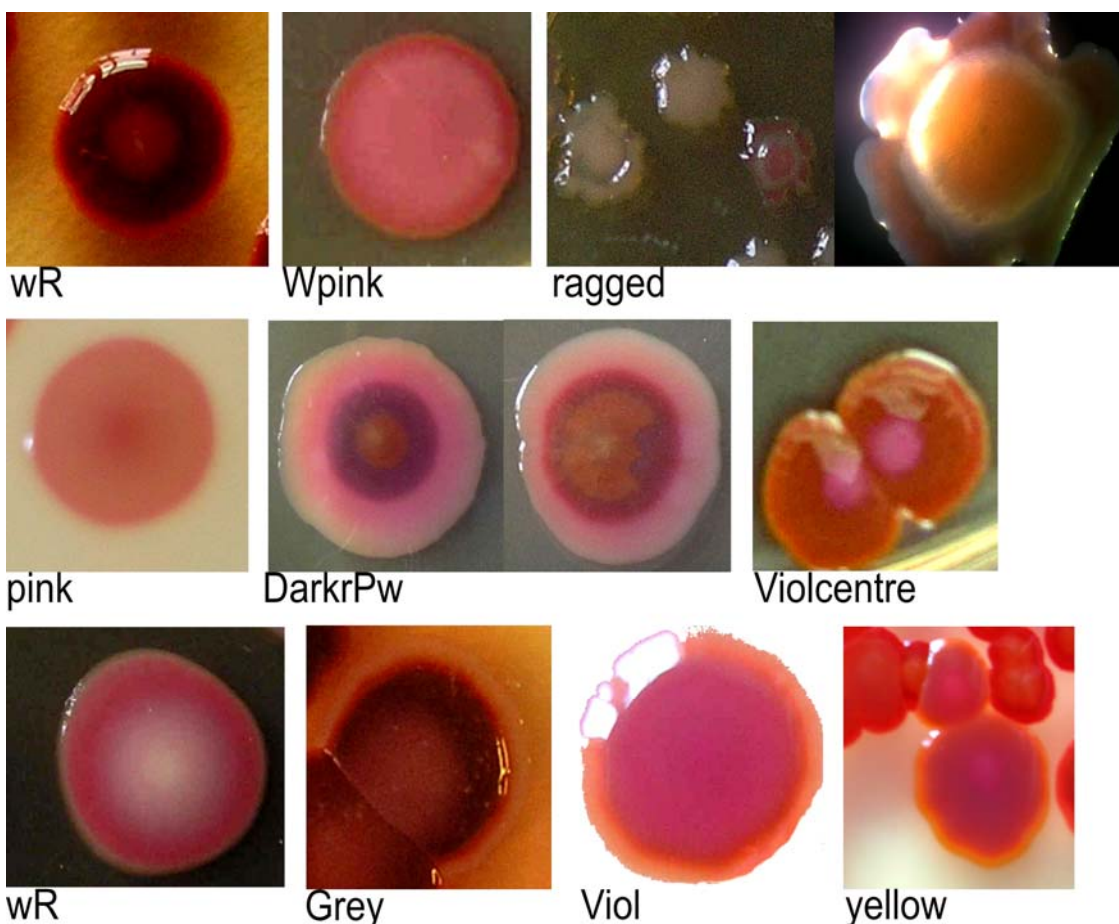


Výsevy z kolonií fenotypu *W2* byly variačně jednotné. Při opakovaných výsevech jsme získávali fenotyp shodující se se zdrojovým klonem 31/5 při 100% obsazení výsevu.

3.1.1.2 Přehled některých dalších fenotypů, získaných při kultivaci v podmínkách bohatých a chudých na živiny

„V armádách i mezi námořnictvem, v městech nebo v rodinách – i v samé přírodě – nic tak neuvolňuje patřičný řád jako krajní nouze.“ (Melville, 1978)

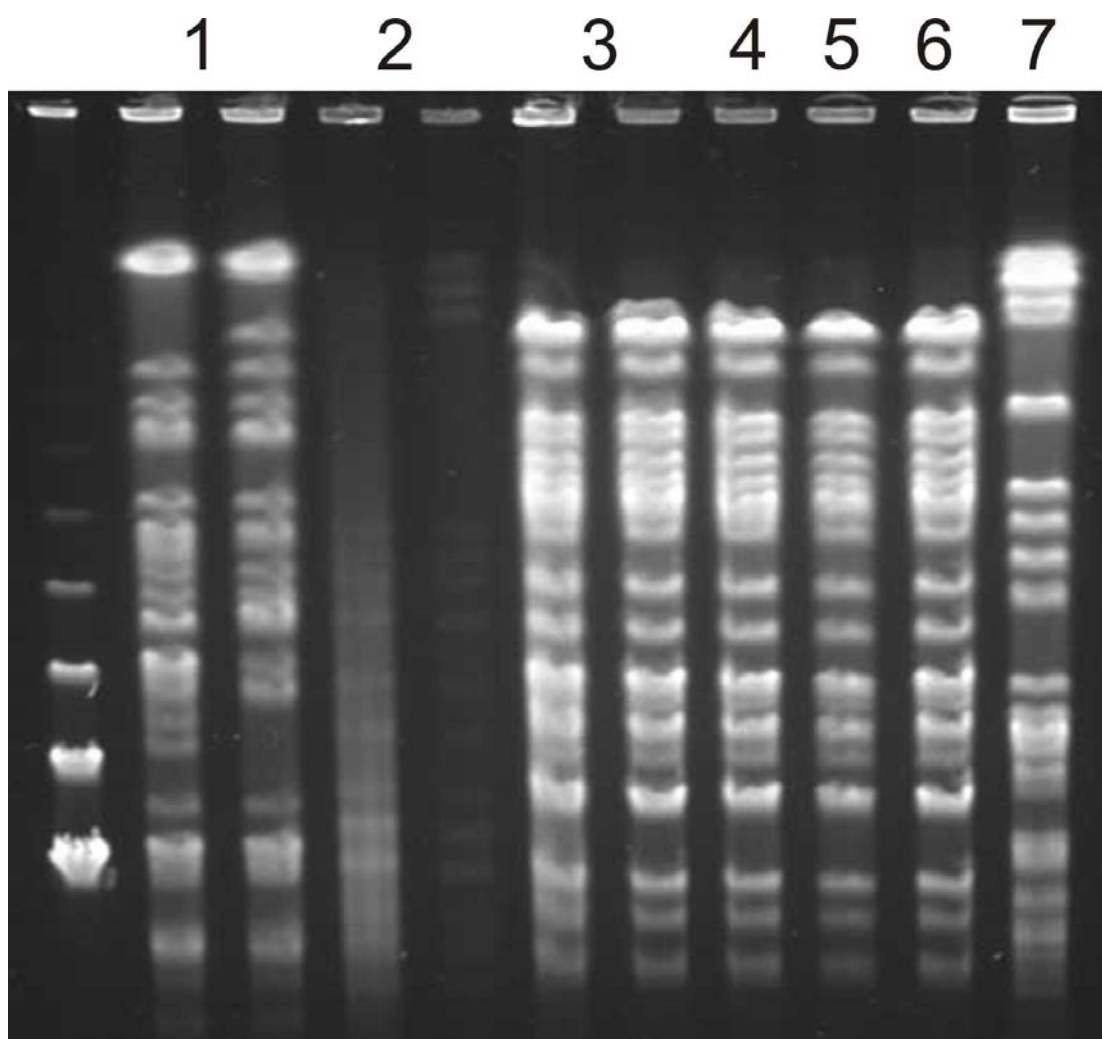
Zde jsou zdokumentovány některé časté fenotypy, které se opakovaně alespoň v malém procentu výsevů objevily ale nepodařilo se nám je stabilizovat. Názvy fenotypů podléhají v drtivé většině jednotné nomenklatuře, kdy písmena jsou zkratkou anglického názvu barvy (R- red, W- white...), jejich pořadí značí posloupnost od středu kolonie a velikost značí velikost plochy, kterou zabírají.



Některé z opakovaně se objevujících fenotypů. Pod každým jedním či dvěma snímky je název, který pro označení tohoto fenotypu používáme.

3.1.2 Makrorestrikční analýza na pulzní gelové elektroforéze

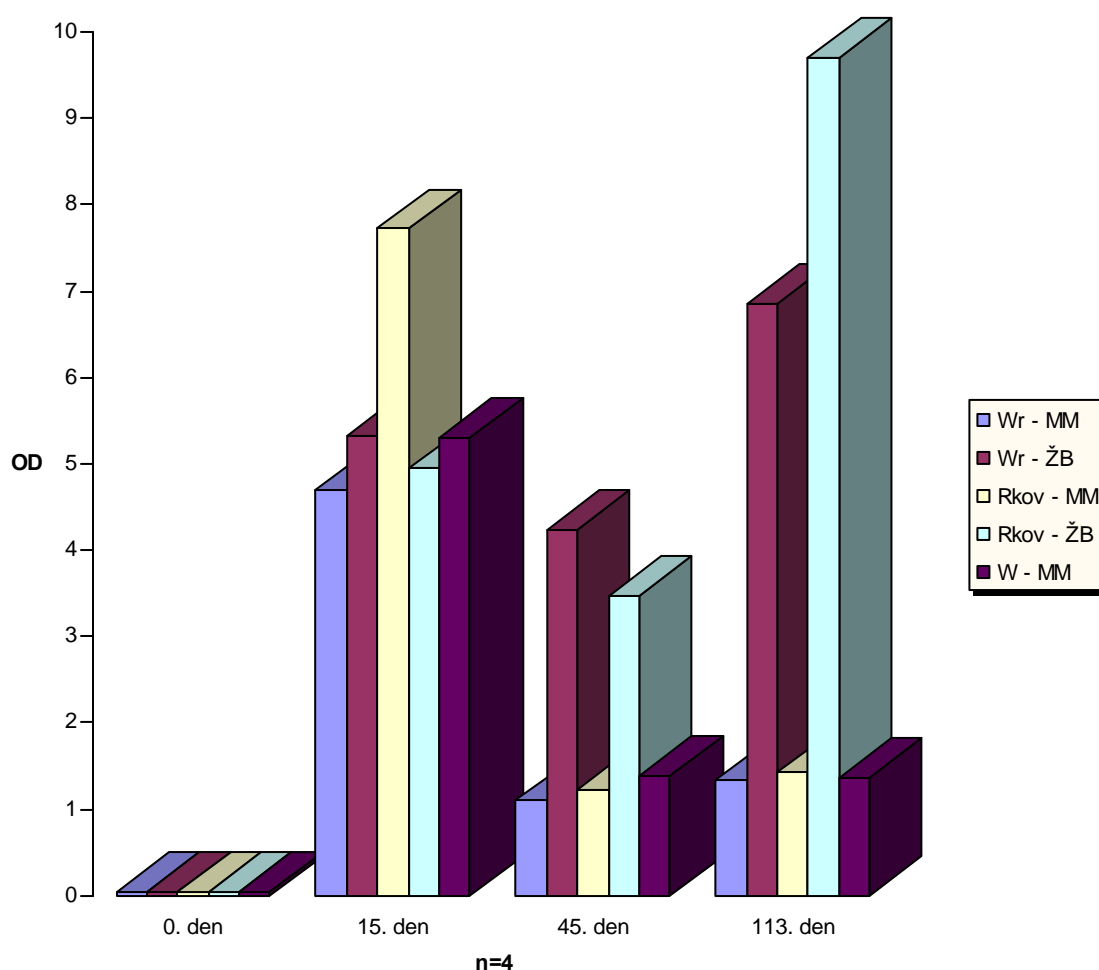
Ve spolupráci s Laboratoří bakteriální genetiky Centra mikrobiologie a epidemiologie Státního zdravotního ústavu (SZÚ), jsme provedli restriční analýzu fenotypů, která ukázala genetickou podobnost vybraných fenotypů *Wpsurround*, *W2*, *R2* a zdrojové *Rmi* a jejich příslušnost k jednomu laboratornímu klonu. U klonů *Zdrojová Rmi 9/4*, *R2 29/5*, *W2 31/5* a *Wpsurround 27/5* nebyla prokázána srovnatelnost s klonem *Bílá fontánka 42/2* a kontrolním klonem *Serratia marcescens* (získaným pro tento pokus jako klinický izolát). V tomto směru budeme pokračovat v analýzách, zvláště proto, že předběžné biochemické testy na rozklad sorbitolu naznačují, že námi studovaná bakterie by nemusela být druhem *Serratia marcescens* ale spíše *Serratia rubidea*.



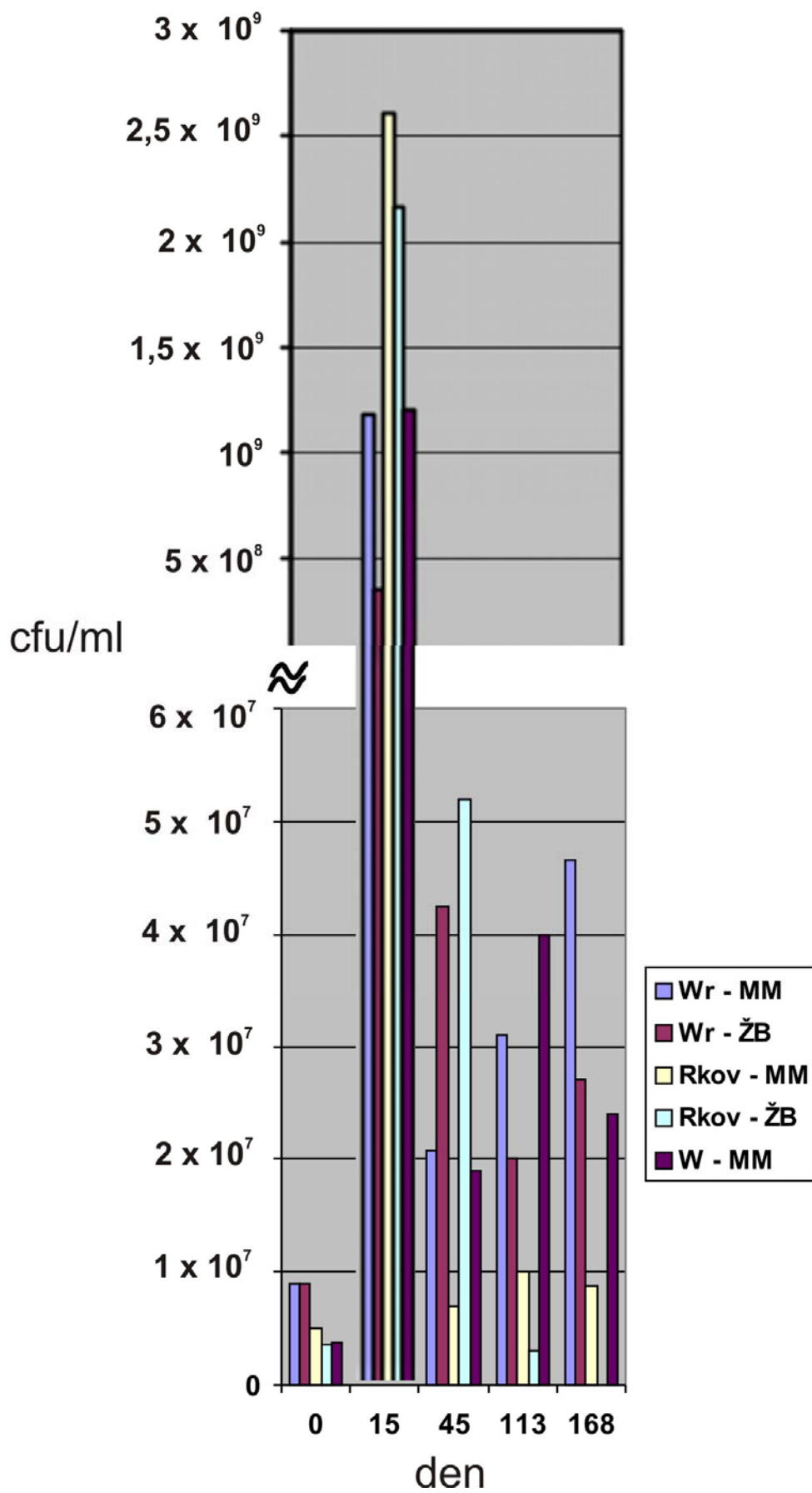
Obr.13 **Mapa PFGE.** Vzorky 1 – *P. aeruginosa*, použita jako referenční bakteriální klon, u kterého bylo známo rozvržení PFGE mapy, 2 - *Bílá fontánka 42/2* je klonem, se kterým jsme nepracovali, 3 - *Zdrojová Rmi 9/4*, 4 - *R2 29/5*, 5 - *W2 31/5*, 6 - *Wpsurround 27/5*, 7 - *Serratia marcescens*, použita jako kontrolní referenční bakteriální klon, u kterého bylo známo, že jde o druh *Serratia marcescens*. Analýza byla provedena v SZÚ pod vedením doc. RNDr. Alexandra Němce, PhD.

3.1.3 Diferenciace cfu podle médií

Bakteriální biomasa pocházející z kolonií různých fenotypů byla zaočkována do fosfátového pufru, živného bujonu či minimálního média. Počáteční optická hustota (OD) inokula bakteriální suspenze byla upravena na 0,045. Při dlouhodobém uchovávání v suspenzních kulturách jsme sledovali změnu OD a cfu (množství buněk schopných vytvořit kolonii). Před vyséváním suspenzí a měřením OD byly kultury homogenizovány.



Z hlediska OD dlouhodobě lépe prospívala bakteriální suspenze v ŽB. Množství buněk schopných tvořit kolonie však bylo vyšší v MM, což jsme prokázali opakovanými výsevy z obou médií. Velikost naměřené OD v ŽB byla ovlivněna již mrtvou biomasou, která na rozdíl od biomasy v MM nebyla žijícími buňkami rozložena a využita jako prekurzory biosyntetických reakcí.

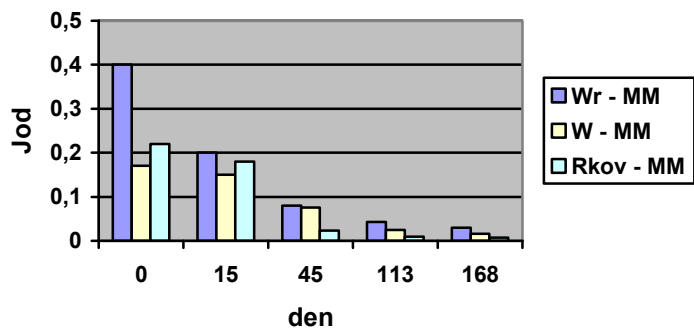
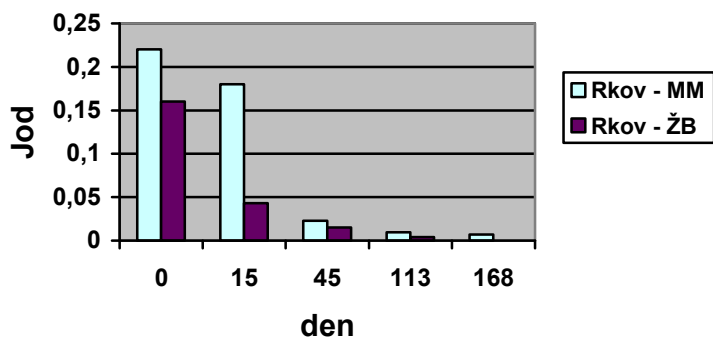
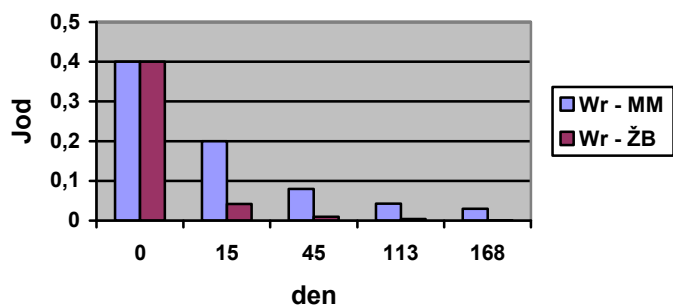


Obr. 14 Hodnoty cfu/ml v konkrétní den od inokulace

Experimentálně jsme si definovali *množství cfu v 1ml suspenze při její optické hustotě 0,2*. Pro popis používáme jednotku $OD = J_{OD}$. Poté jsme vytvořili grafy vztahu J_{OD} ke konkrétnímu výsevu v určitý den zaočkování. Výsledky ukázaly vyšší životnost buněk pěstovaných v minimálním médiu než buněk v živném médiu.

J_{OD} / den od zaočkování

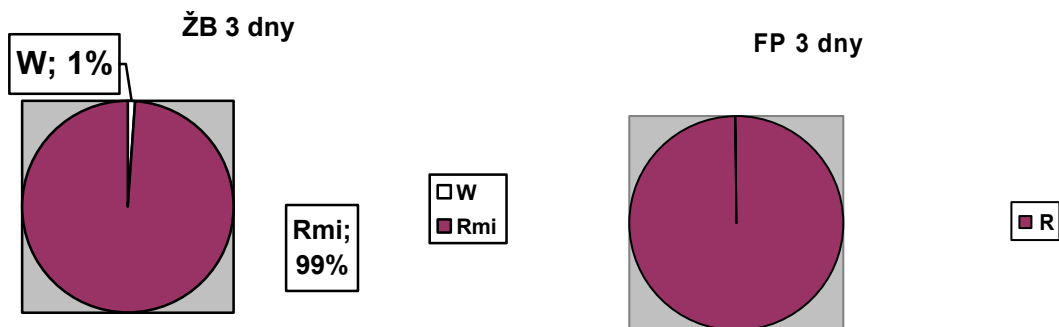
Grafy vyjadřují hodnotu $J_{OD} \times 10^{-8}$



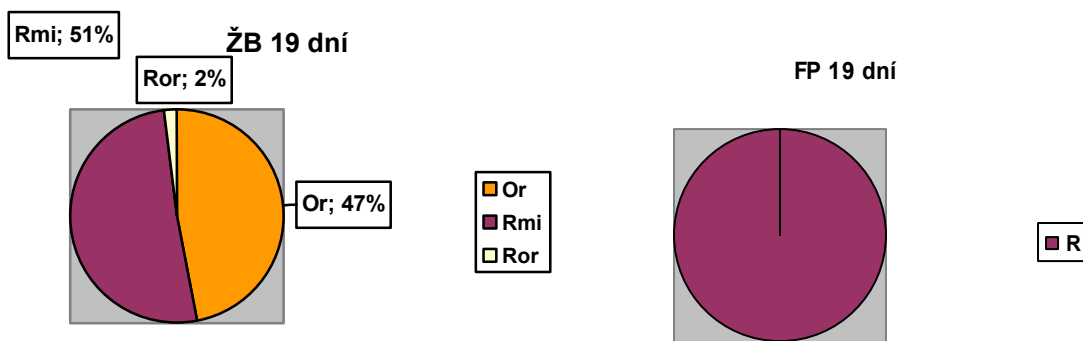
3.1.4 Diferenciace klonů v různých médiích

V koláčových grafech je přehledně znázorněna změna, probíhající při inokulaci klonu do ŽB (živného bujónu s glukózou), FP (fosfátového pufru) a MM (minimálního média) při výsevu po určitém čase.

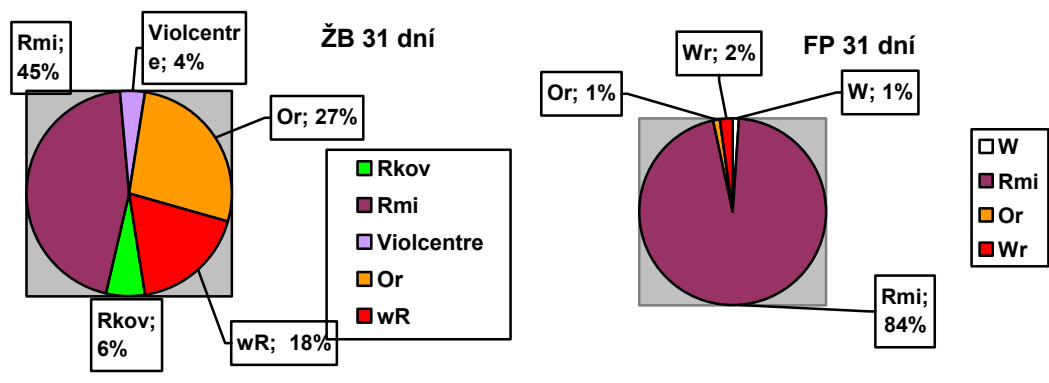
Diferenciace *Rmi* klonu



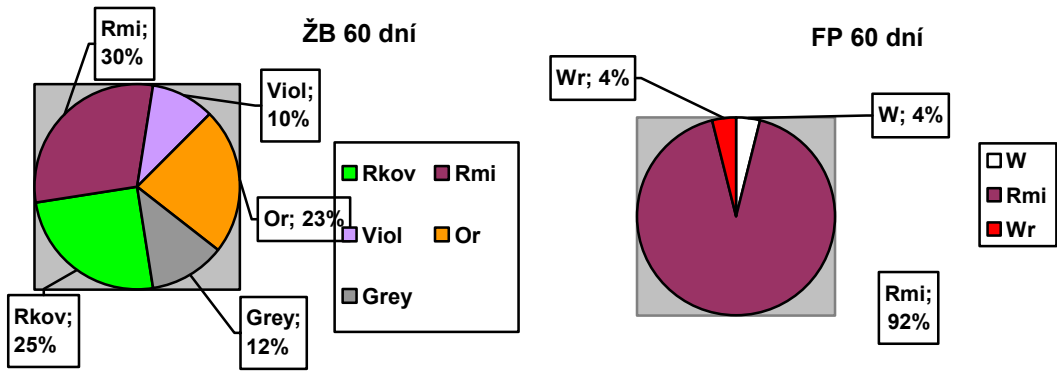
Vidíme, že po prvních dnech v bohatém médiu již došlo k diferenciaci na 2 fenotypy.



Po dalších cca 2 týdnech se klon v bohatém médiu diferencuje na tři a celková diferenciace zasahuje polovinu cfu.

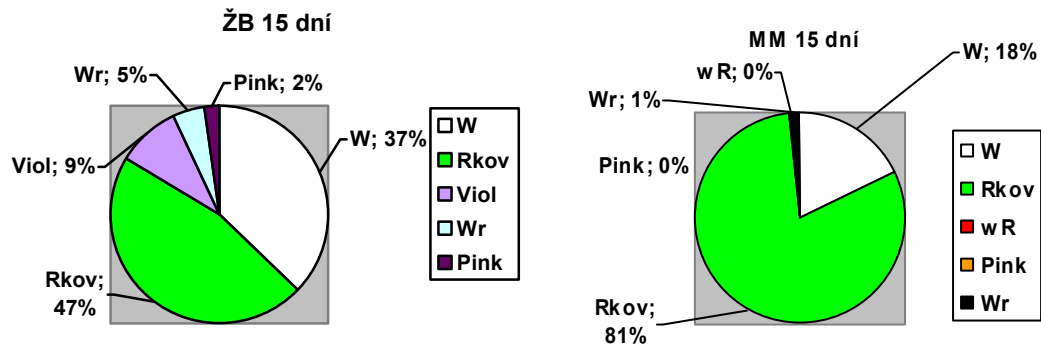


Po měsíci uchovávání v suspenzích se již diferencuje i klon v chudém médiu a to dokonce do několika fenotypů, procento diferenciace s klonem v bohatém médiu je však nesrovnatelné.

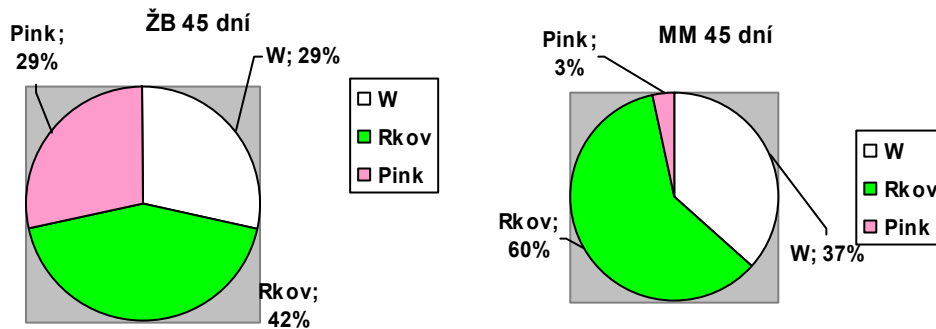


Po 60 dnech uchovávání klonu *Rmi* v bohatém a chudém médiu jsme získali jasně diferencovaný klon v bohatém médiu, kde každý z fenotypů obsahoval přes 10% výsevu a nové fenotypy celkem 70% výsevu. Oproti tomu v chudém médiu jsme získali 8% diferencovaného výsevu obsahujícího pouze dva nové klony.

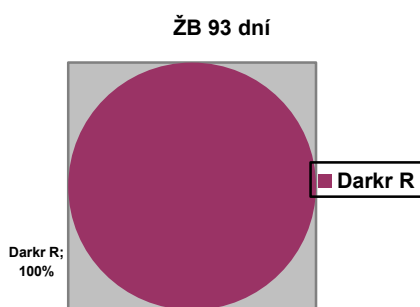
Diferenciace *Rkov* klonu



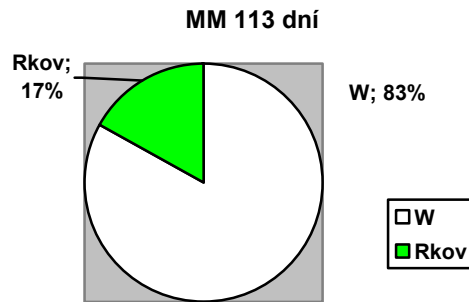
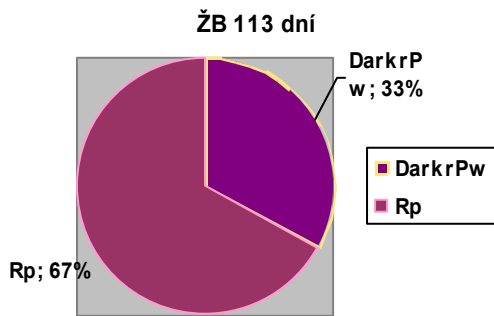
Po dvou týdnech jsme získali téměř polovinu výsevu z bohatého média diferencovánu, chudý výsev neobsahuje nové fenotypy ani z 20%. 18% tvoří bílý fenotyp *W*, zbylé fenotypy jsou spíše náhodné a na misce obtížně naležitelné jednotlivé kolonie.



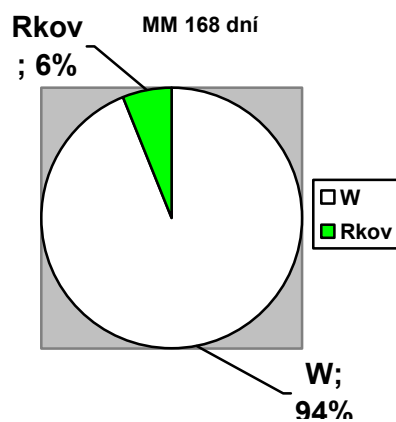
Po šesti týdnech jsme získali z obou médií stejné jasně definovatelné fenotypy, přičemž z bohatého média již obsahovali tyto diferencované typy přes polovinu výsevu.



Po třech měsících byl výsev klonu *Rkov* z bohatého média 100% diferencován, ovšem vše pouze v jednom fenotypu.

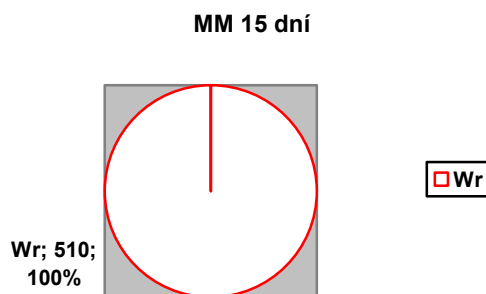
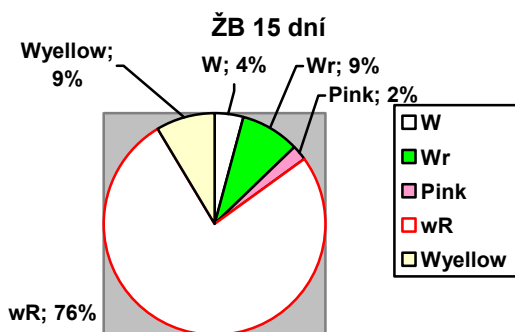


Po 113 dnech jsme získali z bohatého média dva velmi zajímavé fenotypy, přičemž výsev byl 100% diferencován, z chudého média jsme získali nový fenotyp pouze opět v podobě *W* fenotypu.

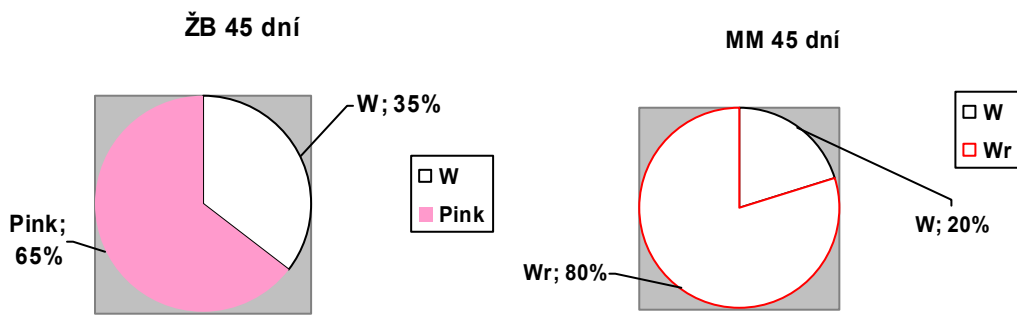


Po 168 dnech byl v chudém médiu stále ještě přítomen původní fenotyp *Rkov*.

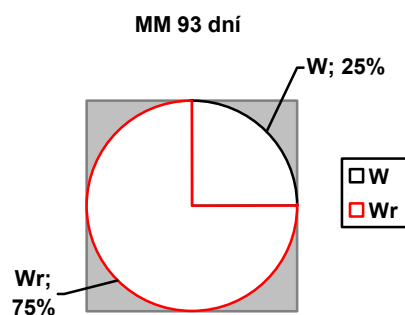
Diferenciace *Wr* klonu



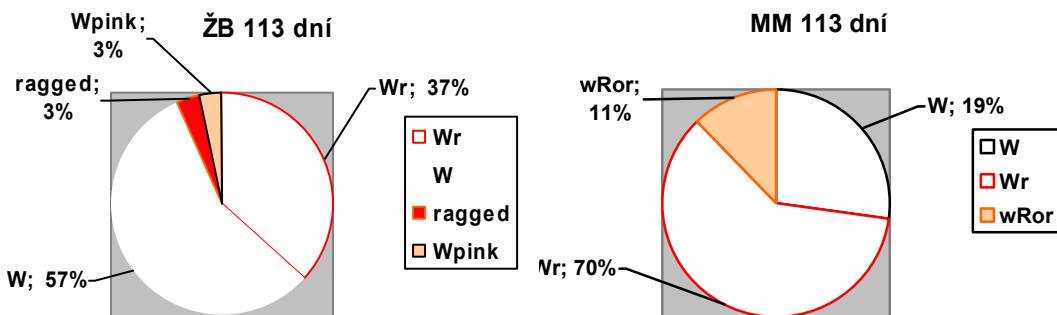
Po dvou týdnech jsme dostali diferencovaný výsev pouze z bohatého média a to ve čtvrtině obsazení.



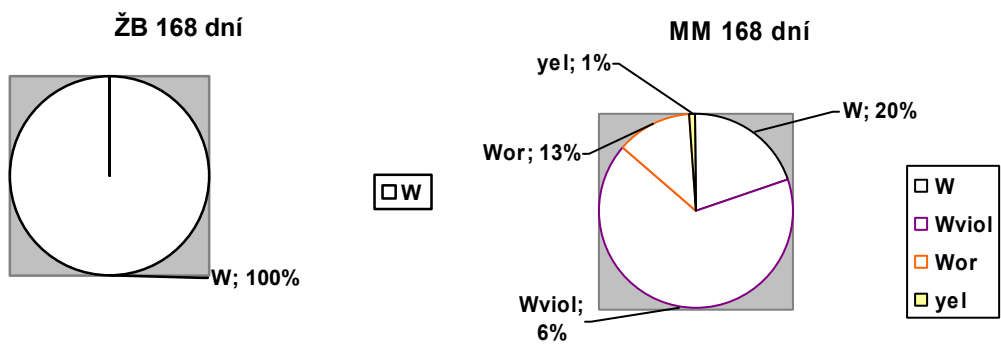
Po šesti týdnech uchovávání fenotypu Wr v bohatém médiu jsme získali 100% výsevu diferencovaného.



Po 93 dnech se diferencoval výsev z chudého média pouze ze čtvrtiny.



Po 113 dnech jsme získali z bohatého média několik neobvyklých fenotypů, chudé médium obsahovalo pouze 2 přičemž většina výsevu byl stále původní klon.



Po 168 dnech pěstování obsahovalo chudé médium stále původní Wr klon, z bohatého jsme získali jen bílé kolonie.

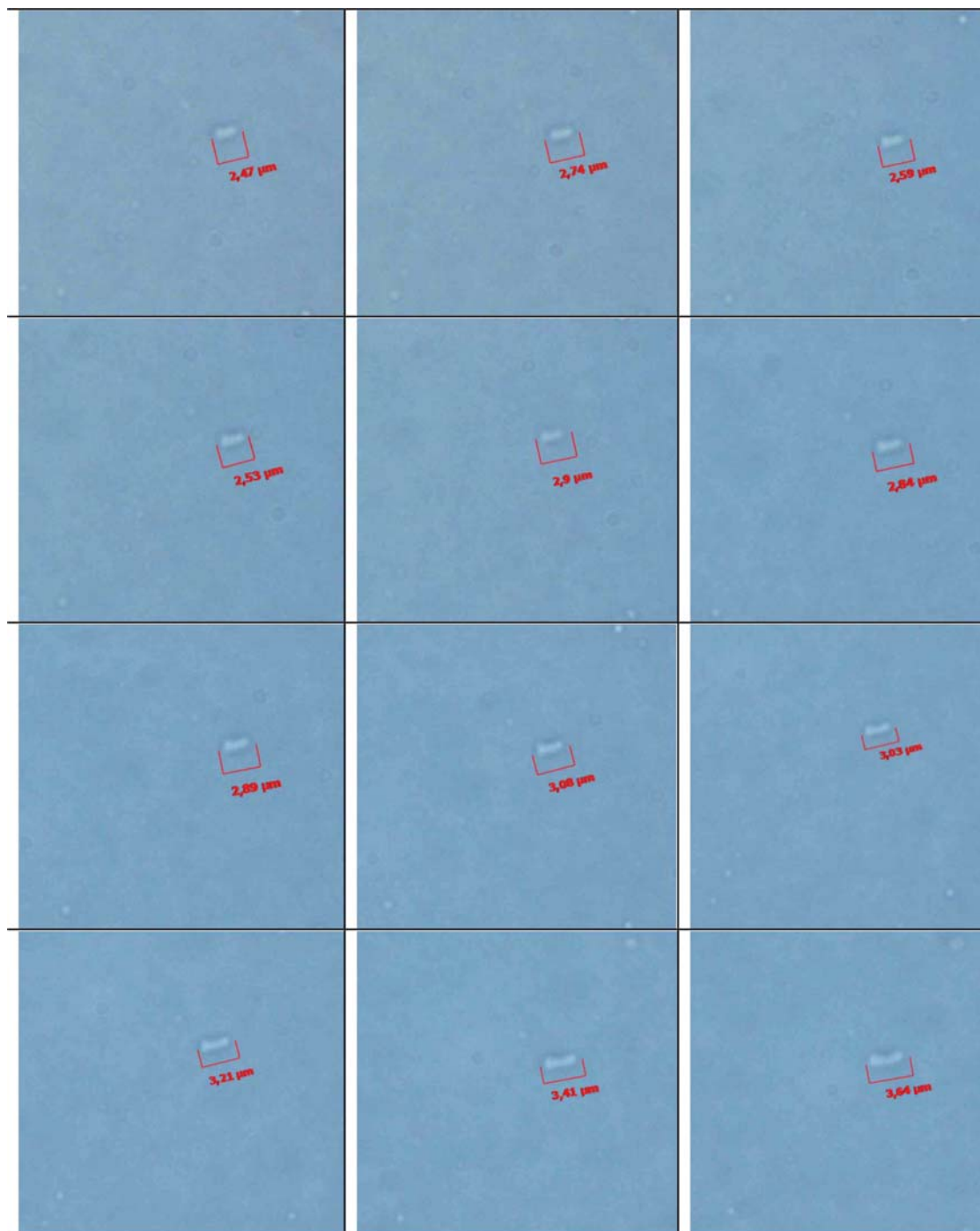
3.2 Ontogeneze kolonií: diferenciacce, morfogeneze, komunikace

3.2.1 Diferenciacce buněk v kolonii

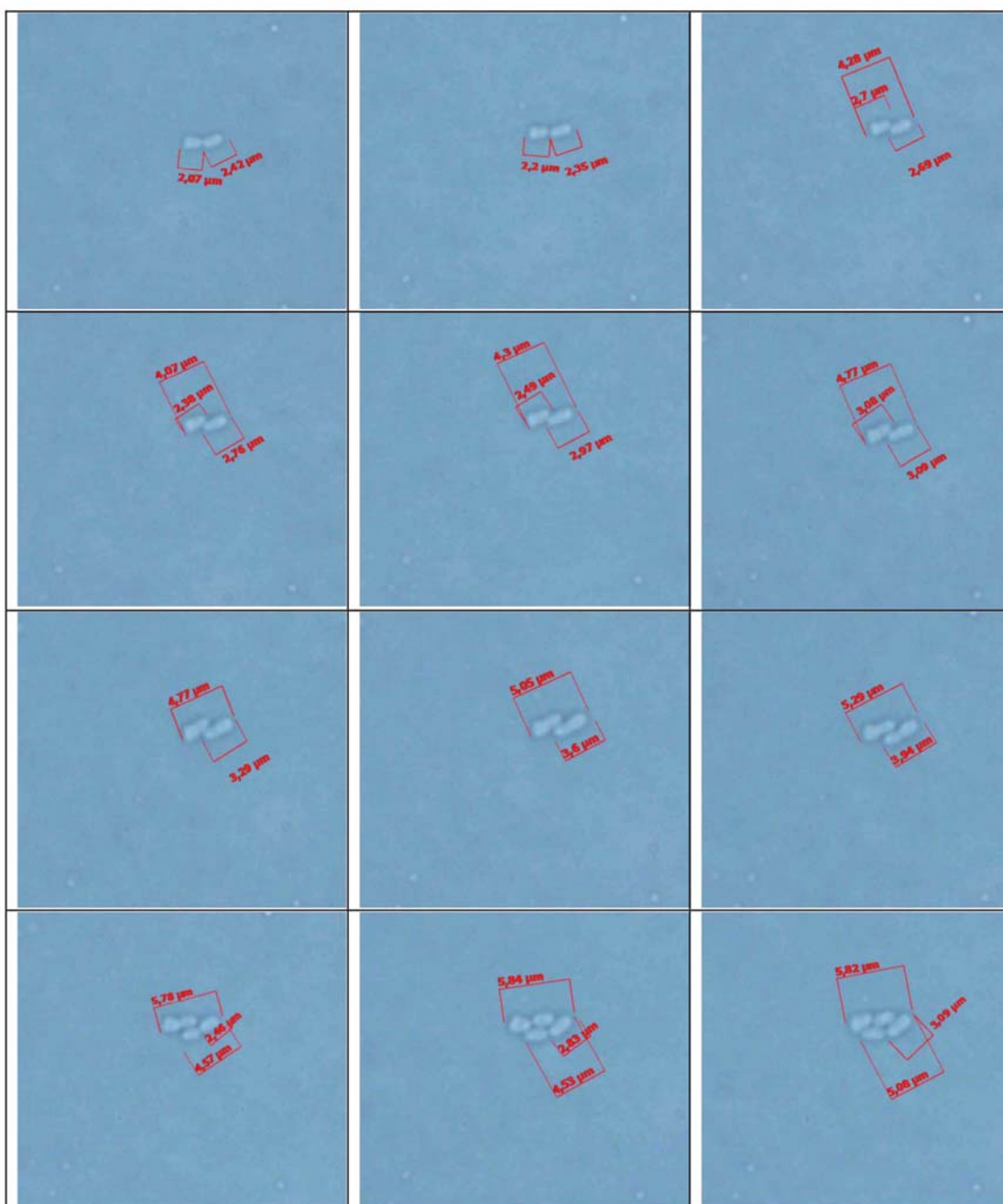
3.2.1.1 Dělení buňky zakládající kolonii

Na sterilní podložní sklíčko pokryté 3mm vrstvou tuhého ŽA + G jsme pipetou umístili 10 μ l suspenze obsahující 10-100 cfa buněk *Serratii*. Při 100x zvětšení jsme sledovali dělení buněk. Všechny pozorované buňky procházely nejprve více než dvouhodinovou aklimatizací lag fází. Teprve poté došlo k pozorovatelnému prodloužení a dělení. Při dělení prvních buněk jsme naměřili dobu zdvojení $T=130$ minut. Životní cyklus druhé generace trval již pouze $T=90$ minut. Po 12 děleních, se životní cyklus buňky zkrátil ještě o polovinu na 40 minut.

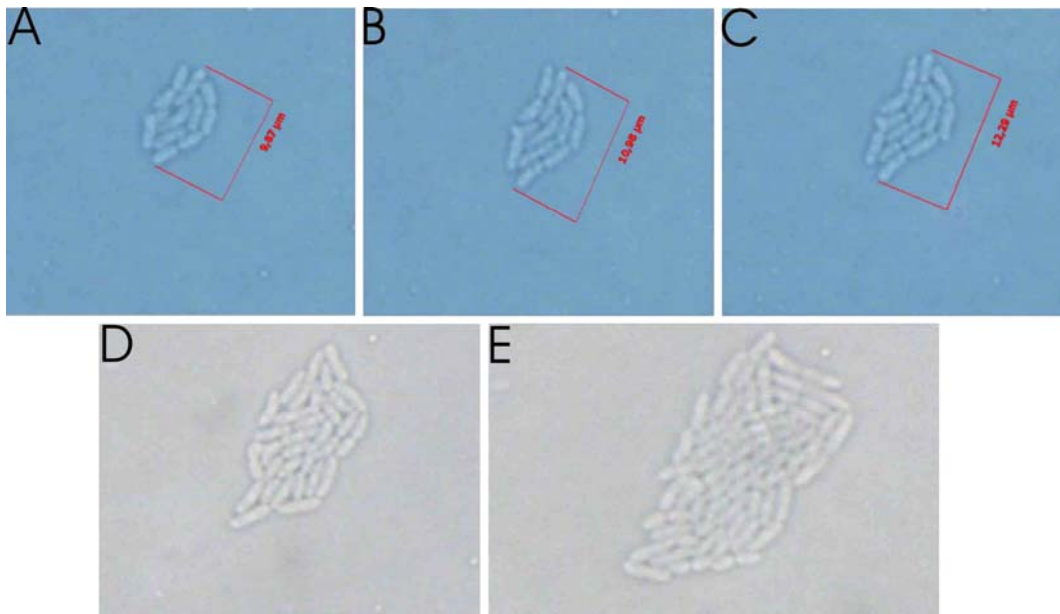
Na snímcích pořizovaných s desetiminutovým intervalem (obr. 15 a 16) můžeme sledovat jedno takové dělení buněk, porovnat velikost buněk s velikostí celého vznikajícího objektu a sledovat formování uzavřeného útvaru. Žádné z pozorovaných patnácti až dvaceti dělení buňky zakládající kolonii neprobíhalo takovým způsobem, že by se rozdělené buňky vázaly do řetízku za sebe (obr. 18), ačkoli tento způsob dělení je u bakterií *Serratie* možný a sledovali jsme jej u kolonií starých 3 a více dní. Dělení a růst bakterií zvětšuje množství biomasy a ústí ve vznik okem viditelné kolonie o průměru několika milimetrů až několika desítek milimetrů. Velikost kolonie se odvíjí od dvou proměnlivých faktorů: je dána jednak vnějším prostředím a jeho podmínkami, například prostorem, živinami a signály, jednak genetickou dispozicí bakterie zakládající kolonii. U většiny klonů *Serratii* lze předpovědět dospělou – konečnou velikost rostoucí kolonie, včetně času, za který kolonie (za konstantních podmínek) této velikosti dosáhne. Na obrázku 19 je graf znázorňující průměr z dat popisujících růst kolonie klonu *Fshoot* zaznamenávaných denně v průběhu dvou měsíců. Na obrázku 20 je graf růstu více různých kolonií, z dat naměřených v sedmi časech od vysazení. Z výsledku je patrné, že dělení bakterií nezpůsobuje ani na živné půdě a za vhodných podmínek nekonečný růst biomasy.



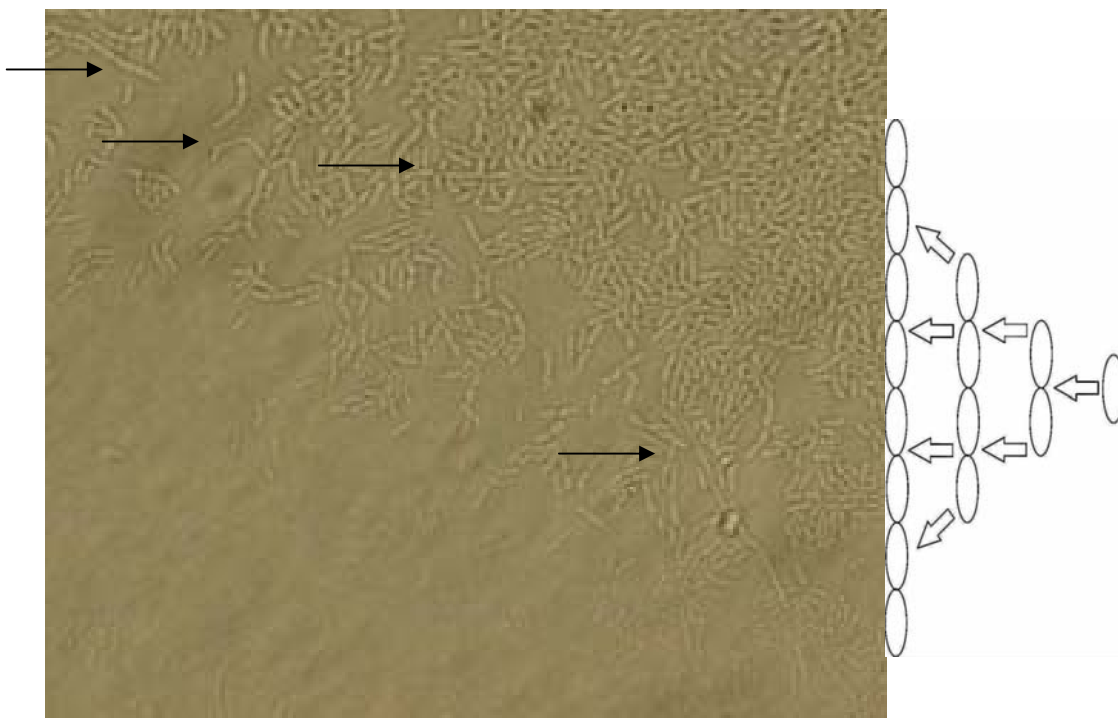
Obr. 15 10.-120. minuta po umístění buňky *Serratie* na agar, interval 10 minut. Velikost je naměřena programem AxioVision Rel. 4.6.



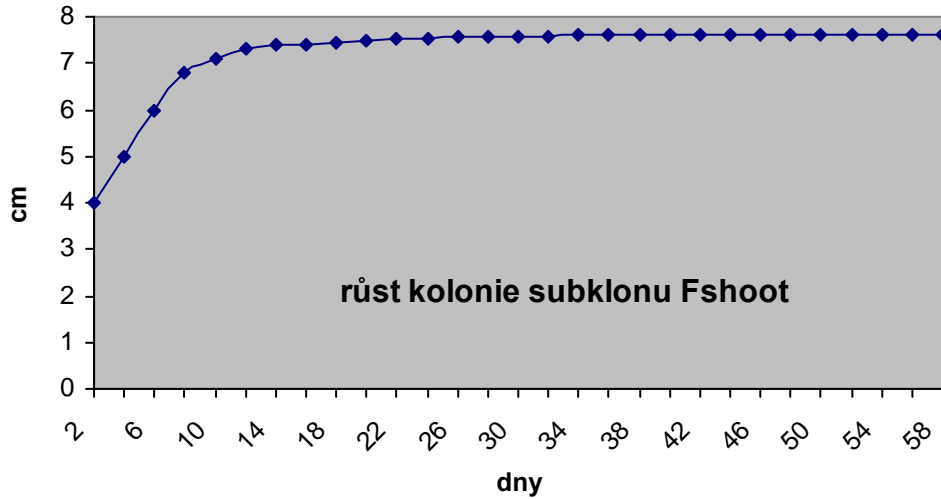
Obr. 16 130.-140. minuta po umístění buňky *Serratie* na agar, interval 10 minut.



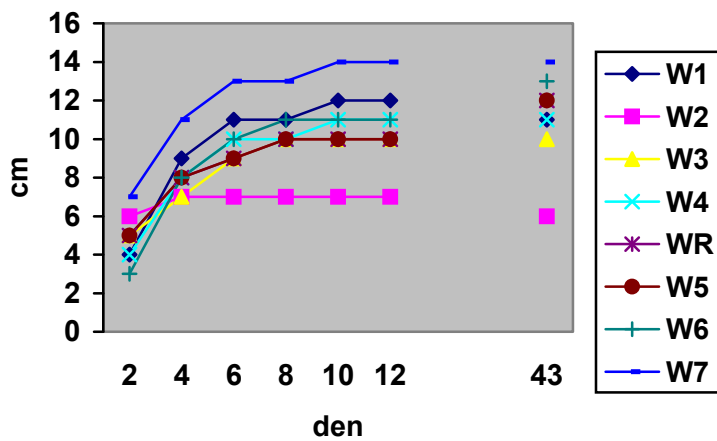
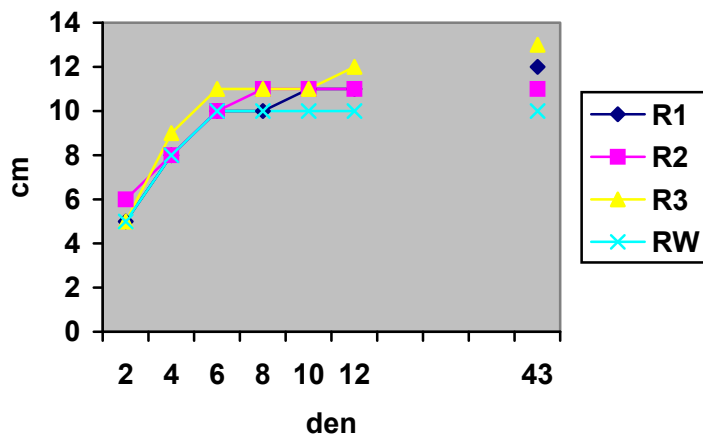
Obr. 17 **Shluk dělicích se buněk.** A – 350, B – 360, C – 370, D – 470, E – 570 minut od vysazení buňky *Serratie* na agar



Obr. 18 **Řetízky Serratii.** Na levém obrázku vidíme řetízky bakterií *Sm* pozorované ve třídenní kolonii. Pravé schéma ukazuje předpokládaný možný způsob dělení bakterií *Serratia*.



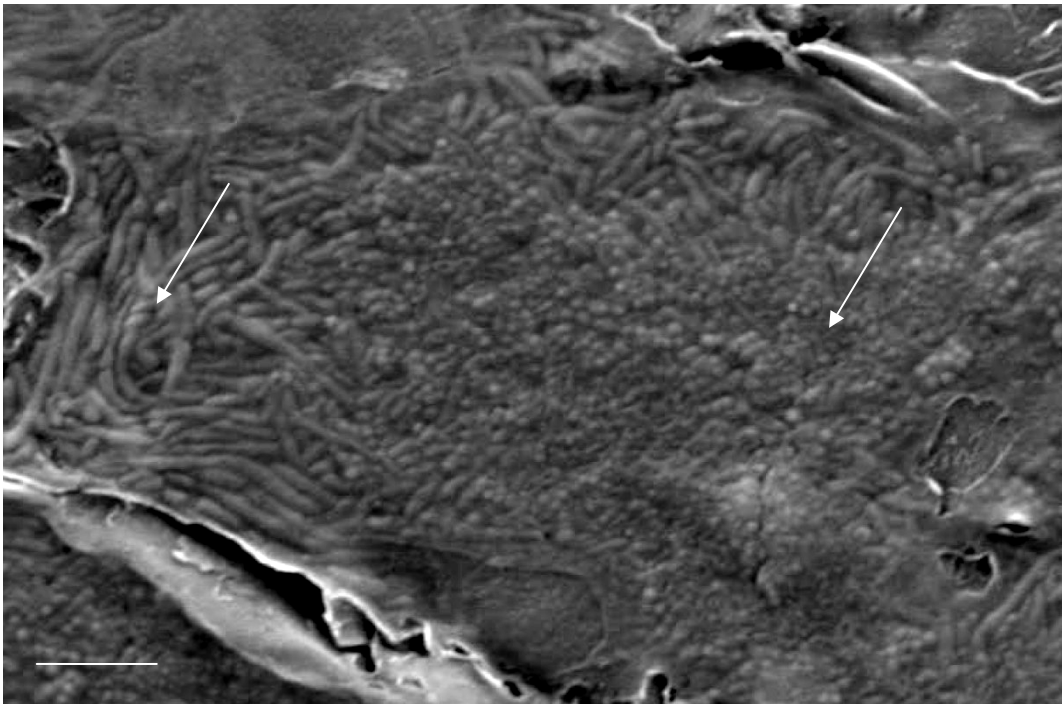
Obr. 19 Růst měřený od druhého dne po umístění buňky na agar. Růst kolonie je nejintenzivnější v prvních deseti dnech od vysetí zdrojové buňky na živnou půdu. Graf začíná druhým dnem růstu.



Obr. 20 Průměry kolonií různých typů v čase.

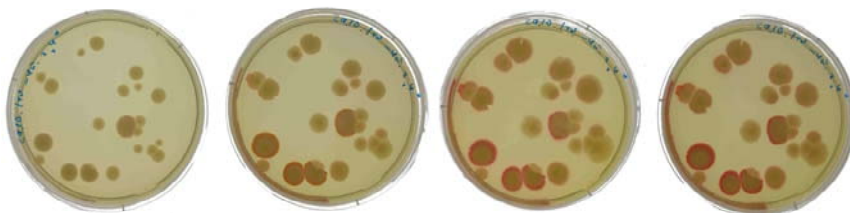
3.2.1.2 Sporulace

Při práci v laboratoři jsme se neseťkali s jevy, které by nasvědčovaly sporulaci v koloniích a uvolňování spor z kolonií *Serratii* (např. bakteriální kontaminace bakteriemi *Serratii*). Životnost bakterií v kolonii málokdy přesáhla hranici 6ti měsíců a pouze 10x ředěné suspenze z biomasy starších kolonií obsahovaly ve výsevech jen několik buněk schopných vytvořit kolonii. Provedli jsme podrobnou analýzu SEM snímků 7 dní staré kolonie *Serratii*, pořízených RNDr. O. Benadou v laboratoři MBÚ AV. Na jedné fotografii povrchu jsme po zvětšení skutečně našli oblast (obr. 21), která by svým zjevem odpovídala popisu části kolonie se sporujícími buňkami jak je uveden v (Ajithkumar, 2003). Součástí dalšího výzkumu bude například analýza na přítomnost kyseliny dipikolinové.



Obr. 21 **Různé typy buněk v kolonii.** Na EM fotografii čtyři dny staré kolonie fenotypu *Rmi* rostoucí na celofánu na ŽA+G jsou pozorovatelné dva druhy buněk či dva typy organizace buněk, podlouhlé buňky (délka 3-6 μ m) a kulovité útvary (délka 0,5-1 μ m) (velikost měřítka = 6 μ m), autorem SEM snímku je RNDr. O. Benada, MBÚ AV.

3.2.2 Diferenciace funkcí – stavba kolonie



Obr. 21 **Růst a vybarování.** Růst kolonií klonu *WpinkOran* starých 3,4,7 a 11 dní.

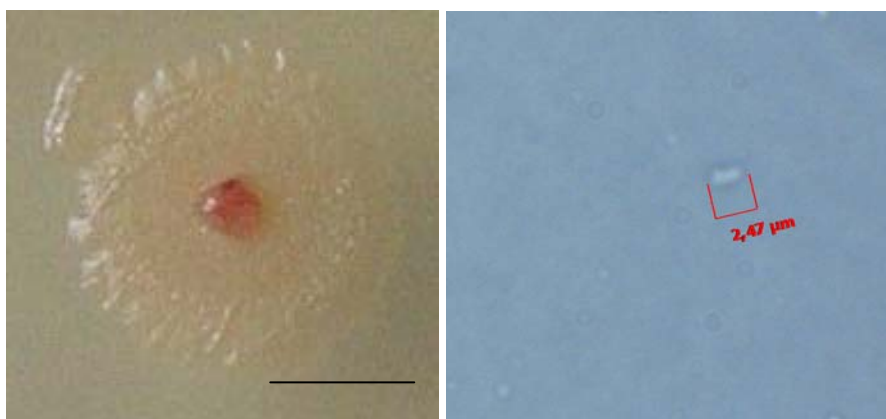
3.2.2.1 Barvivo v kolonii

Barevné kolonie *Serratie*, bývají na mnoha místech barevně diferencované často v korespondenci se svým tvarovým rozvrhem. Srovnáme-li velikost buněk *Serratie* formujících kolonii a velikost kolonie *Serratie*, získáme poměr 1:10000, což vede spolu se zjevem kolonie k otázce, jakým způsobem je barevné segregace docíleno a zda se barvivo objevuje na konkrétních místech kolonie pouze jako vnitřní součást buněk (je lokalizováno v buněčné stěně) či zda je produkováno také v rámci extracelulárního matrixu kolonie (obr. 31). Centrifugací suspenze FP a biomasy z barevných míst kolonie po dobu 2 minut při 10 000 G jsme získali supernatant světlé barvy a výrazně tmavě zabarvený sediment, což by nasvědčovalo barevné segregaci umožněné barevným odlišením buněk spíše než barevným odlišením extracelulární matrix, do které by bylo barvivo buňkami vylučováno. Mikroskopická pozorování však umožňují u barevných kolonií v oblastech se zvýšenou pigmentací sledovat množství krystalků a kulovitých útvarů velikosti několika mikrometrů (obr. 29). Tyto útvary je někdy možné tlakem narušit.

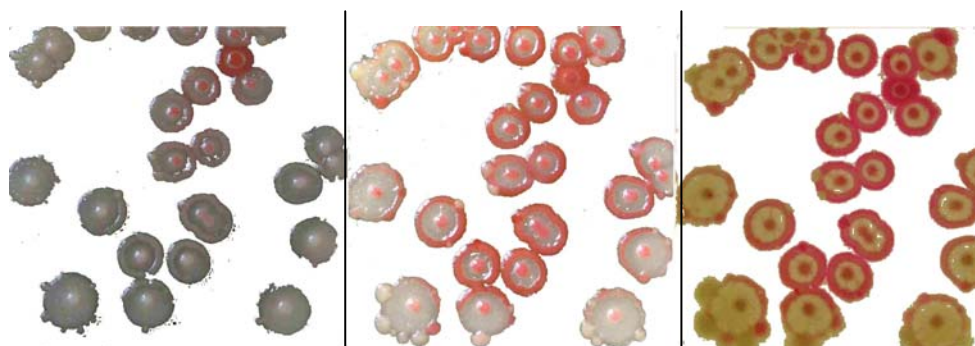
Barevné biokrystalické útvary v koloniích nejsou co do své barvy způsobené čistě vlivem média a případné barvy média. Za účelem sledování vlivu média na barevnou odlišnost útvarů jsme v mikroskopu při 100x zvětšení analyzovali objekty v koloniích netvořících a v koloniích tvořících červené barvivo, pěstovaných na médiích klasických a médiích obarvených bromthymolovou modří. Kolonie rostoucí na modrozeleně obarveném médiu obsahují v nějaké formě zelené barvivo, neboť je na nich v místech obvykle nepigmentovaných viditelný zelený odstín a to na pigmentujících i nepigmentujících koloniích (obr. 30). Z makroskopického hlediska jsou na obarveném médiu tmavě zelené,

pod mikroskopem však v pigmentujících ani nepigmentujících koloniích nenalezneme žádné zelené či vůbec barevně tmavší biokrystalické útvary, ani zelené či vůbec barevně tmavší kulovité objekty. V červeně pigmentujících koloniích pěstovaných na obarveném médiu však pod mikroskopem zůstávají ve strukturně barevně diferencovaných a v makroskopickém měřítku červeně pigmentujících oblastech jasně červené tmavší útvary a kulovité objekty (obr. 30b). Ke zbarvení kolonií pěstovaných na médiu obsahujícím bromtymolovou modř tedy nedochází stejným způsobem jako ke zbarvení u přirozeně barevných kolonií pěstovaných na neobarvených médiích, u kterých zbarvení přímo souvisí se vznikem pod mikroskopem viditelných barevných útvarů, detekovatelných na všech pigmentujících částech biomasy.

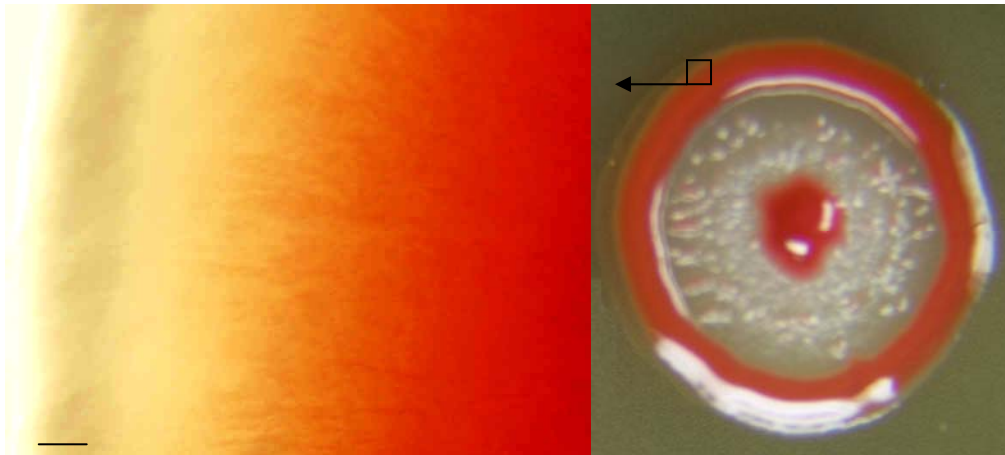
20 dní starou kolonii fenotypu Fmi jsme hluboce zmrazili a oddělili od povrchu agaru. Kolonii jsme poté zlomili a pozorovali vertikální distribuci barviva. Barvivo se zdálo být koncentrováno v horní polovině (místy v horní třetině) pigmentujícího lemu, zatímco spodní polovina byla bez pigmentace (obr. 33).



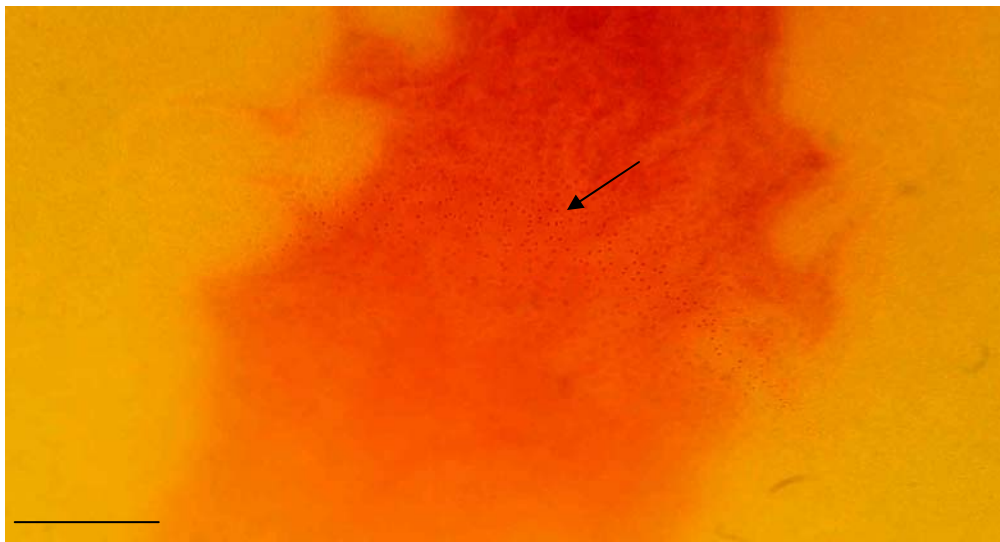
Obr. 22 **Poměr kolonie a buňky.** Měřítka na levém obrázku je cca 10 000 μ m.



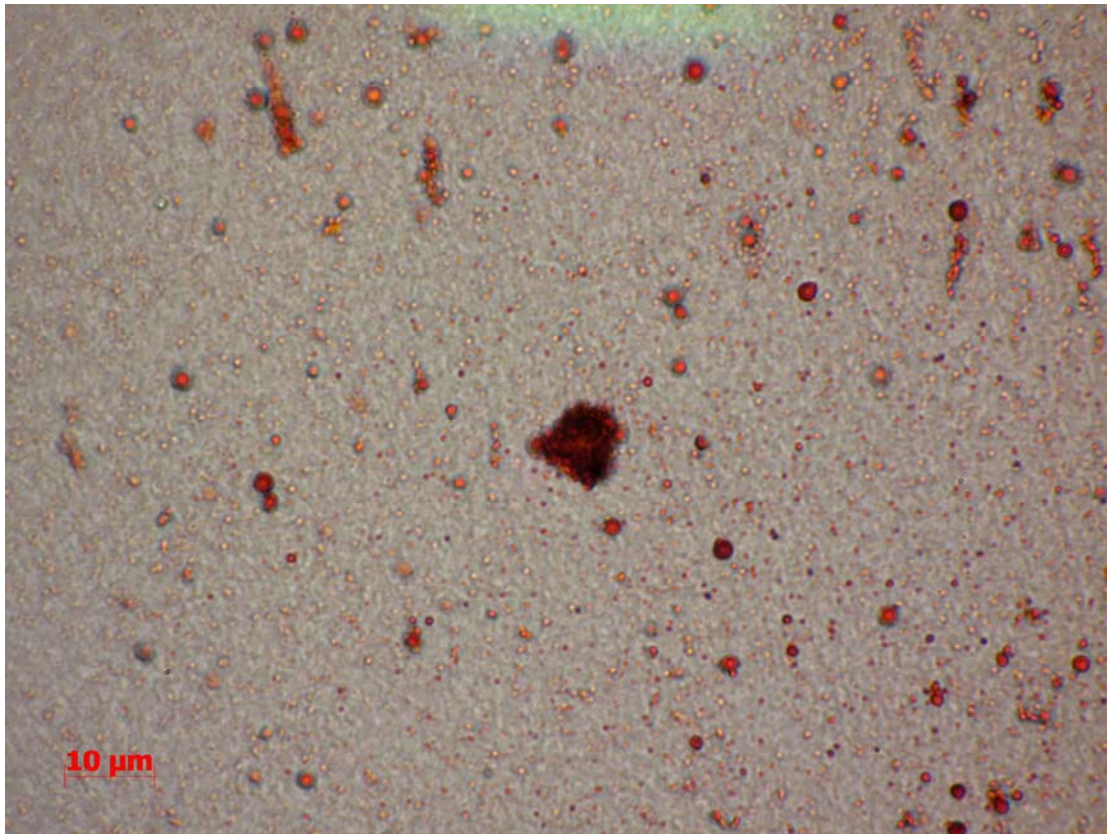
Obr. 23 **Změna pigmentace kolonií fenotypu Fmi.** Snímky po 3, 4 a 7 dnech růstu. Na třetím obrázku je miska s koloniemi podsvětlena, takže jsou na něm viditelné jemné barevné struktury i mimo lem a střed.



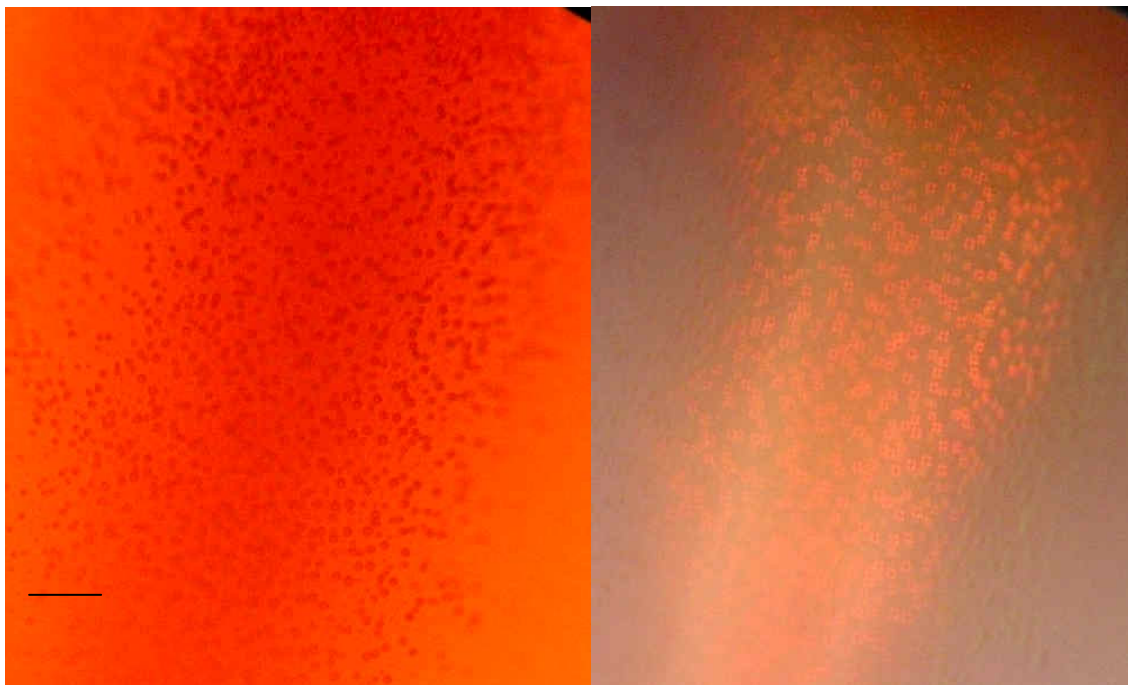
Obr. 24 **Struktury pigmentu.** Na levém obrázku jsou patrné pásy pigmentu, slábnoucí směrem k okraji kolonie, měřítko 100 μ m; na pravém obrázku je celá kolonie fenotypu *Fmi* o průměru 1,4 cm.



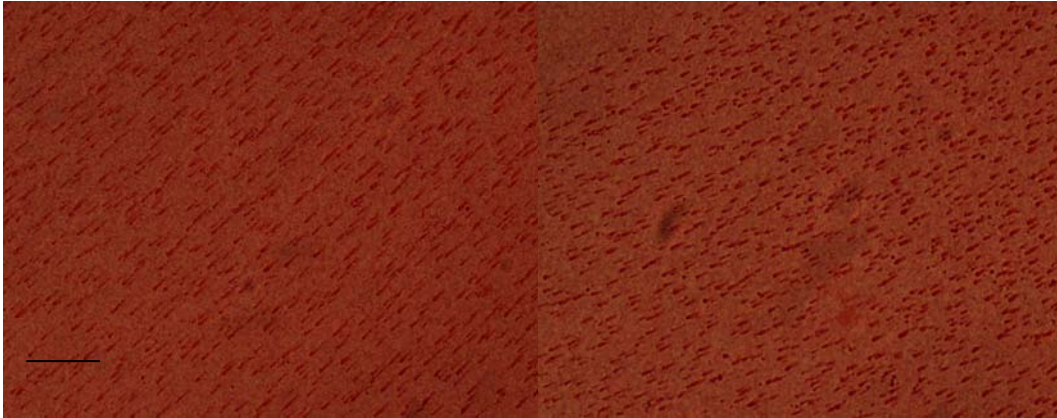
Obr. 25 **Pás pigmentu.** Zde s viditelnými shluky kulovitých útvarů (viz šipka), měřítko 100 μ m.



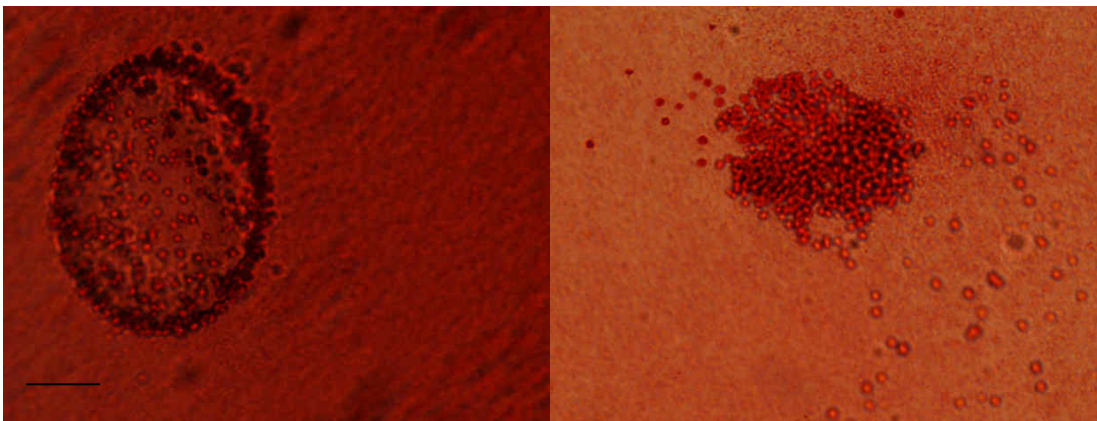
Obr. 26 **Pigmentové shluky**. Kulovité útvary v kolonii klonu *Rmi*, na středu obrázku je vidět shluk útvarů.



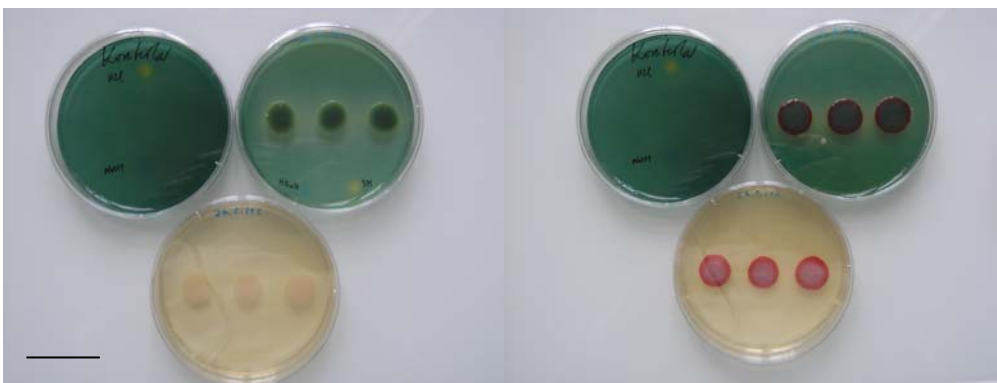
Obr. 27 **Kulovité útvary v kolonii klonu *Rmi***. Levá fotografie byla vytvořena s dolním osvětlením preparátu, pravá fotografie reflektovaným světlem a přes polarizační filtr, totožnost na rozložení bodů. Měřítka 10μm.



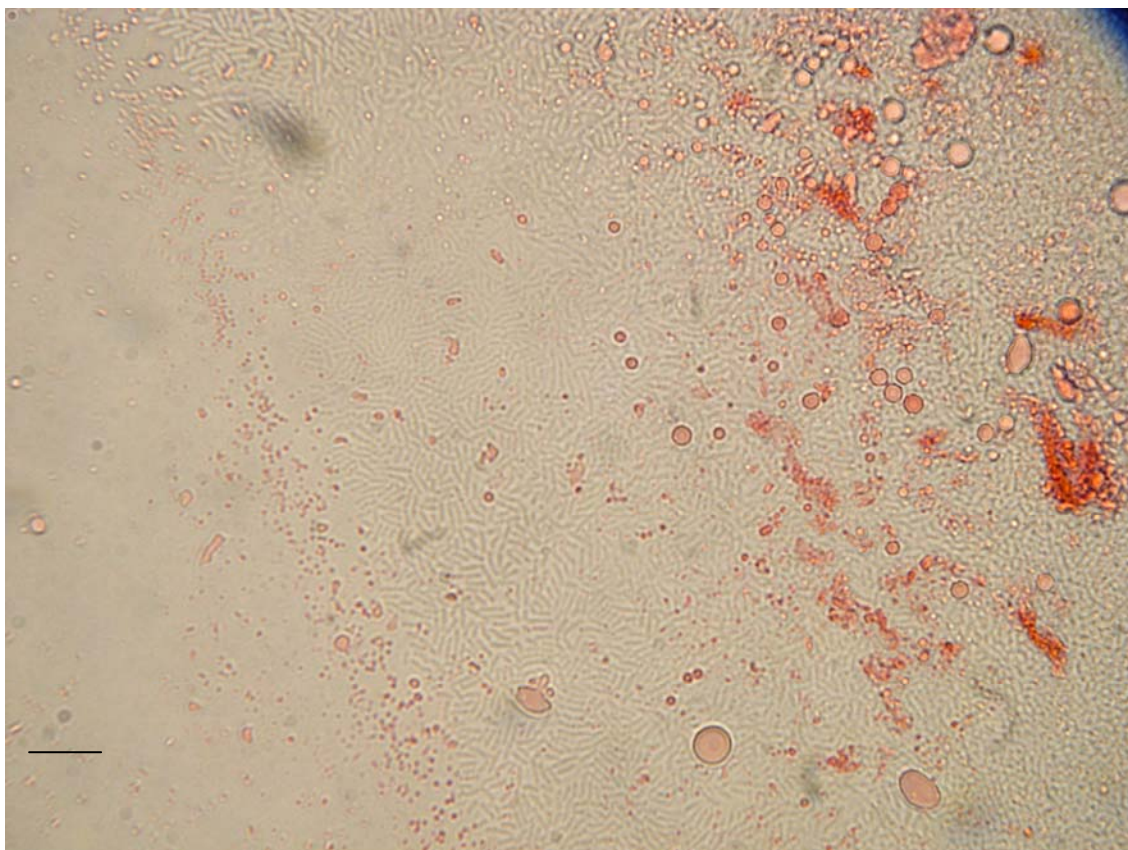
Obr. 28 **Pigmentové shluky v koloniích se rozpouštějí a roztírají.** Kulovité útvary v kolonii typu *Rmi*, na fotografiích je patrný jejich rozpad, měřítko 10 μ m.



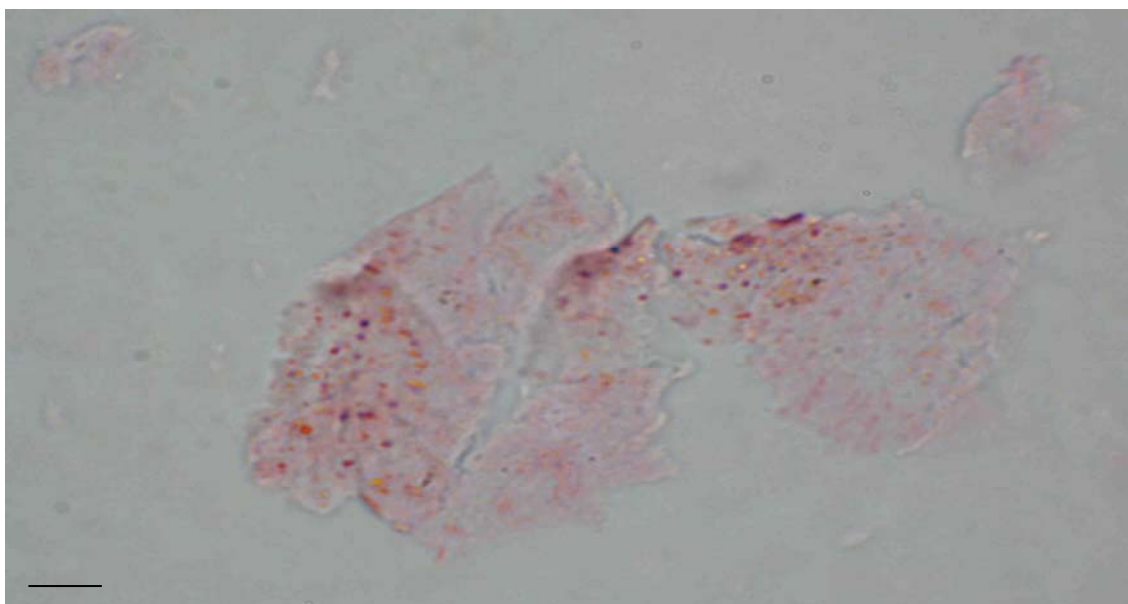
Obr. 29 **Pigmentové shluky v koloniích.** Kulovité útvary v kolonii typu *Rmi*, na fotografiích je oblast s výrazně větší koncentrací, měřítko 10 μ m



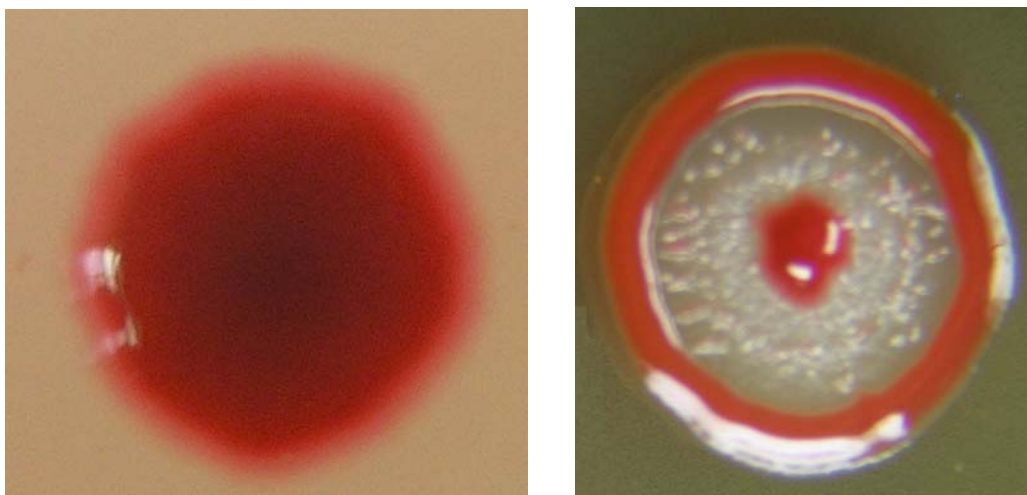
Obr. 30a **Kolonie rostoucí na obarveném a neobarveném médiu** (měřítko = 4cm).



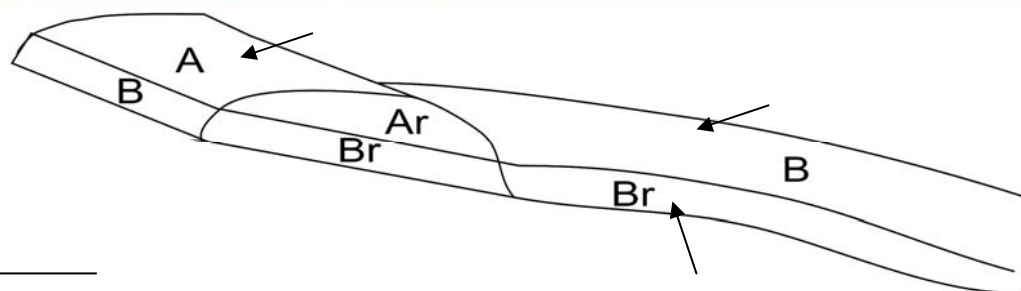
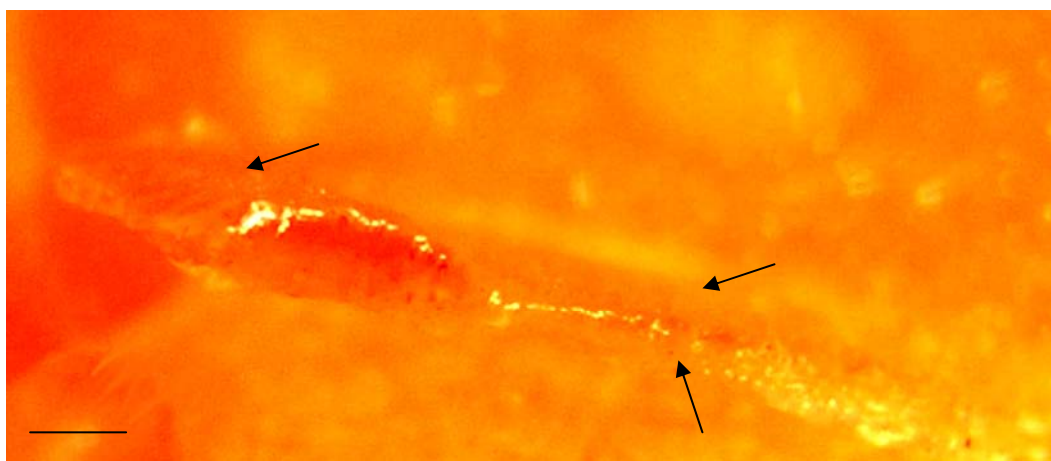
Obr. 30b Mikroskopický snímek: **Červeně pigmentující kolonie pěstovaná na obarveném médiu.** I tyto kolonie obsahují ve svých tmavých pasážích červené objekty. Obrázek je zesvětlen. (měřítko = 10 μ m)



Obr. 31 **Extracelulární hmota – plášt' kolonie.** Část pláště kolonie (viz. následující kapitola) se zbytky shluků kulovitých útvarů, měřítko 10 μ m.

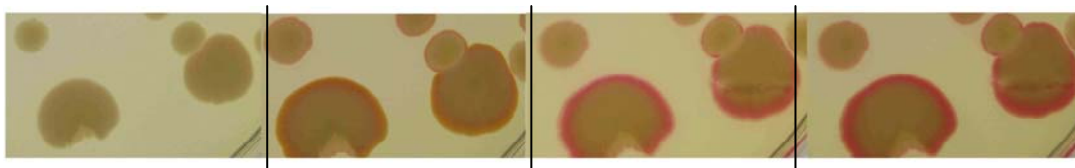


Obr. 32 **Distribuce pigmentu u fenotypu klonu *Fmi***. Změna fenotypu probíhá při výsevu zakládající buňky na jiné médium, zde je fenotyp vzniklý při růstu na ŽA (vlevo) a na ŽA+G (vpravo).



Obr. 33 **Řez kolonií fenotypu *Fmi***. Spodní schéma přehledněji znázorňuje svrchní část lemu (A) a lemu v řezu (Ar) a spodní část lemu (B) a lemu v řezu (Br). Při pohledu shora, tvoří část B se šipkou plochu středového nepigmentovaného prstence uvnitř kolonie fenotypu *Fmi* (viz obr. 32 vpravo). Část Br se šipkou reprezentuje i na obrázku viditelný řez středovým nepigmentovaným prstencem uvnitř kolonie. Výrazně největší pigmentaci lze pozorovat v oblastech svrchní části lemu, označených na obrázku jako A a Ar. Měřítko = 500 μ m.

3.2.2.2 Diferenciace funkcí při formování tvaru kolonie



Obr. 34 Růst kolonií klonu s tendencí k nepravidelnému tvaru, 3, 4, 7, 11 dní

Kolonie studovaná pod mikroskopem se ukazuje jako morfologicky složitý útvar, který obsahuje různé typy buněk projevující se funkční specializací (Shapiro 1985, 1987, 1988, 1994). Například na povrchu kolonie jsme pozorovali buňky různého typu a velikosti, které se pravděpodobně účastní procesu tvorby opláštění, které kolonii v různě silných vrstvách pokrývá. Toto opláštění, jehož stopy lze nalézt až téměř na okraji kolonie (v oblasti méně než 1mm od okraje), je možné shrnout a pod mikroskopem sledovat jeho kompaktní a viditelně tuhou strukturu (tab. 1, obr. D, E).

Okraje kolonie jsou při 100x zvětšení viditelné jako netriviální soustava diferencovaných buněk, obklopujících kolonii rozšiřujících ji *swarming* pohybem (organizovaný pohyb ve velkých skupinách jedním směrem, pravděpodobně zefektivňující energetickou spotřebu, popsali jej Albertit, 1990; Fraser and Hughes, 1999; Harshey, 2003 a částečně Henrichsen, 1972; video z našeho pozorování je na přiloženém CD). U různých koloniálních fenotypů je možné najít různým způsobem diferencované fenotypy buněk tvořících pásy na okraji kolonie. Například u fenotypu *Rmi* jsou tyto pásy často viditelné i ve vzdálenosti až 100 μ m od kolonie a tvoří tak kolem kolonie prstenec buněk (tab. 1, obr. B, C). U fenotypu *Wmi* jde o pás okraje kolonie o šířce cca 20 μ m, v němž probíhá rychlejší pohyb než na jiných pozorovatelných místech kolonie a který je složen pouze z jedné vrstvy buněk (tab. 1, obr. A).

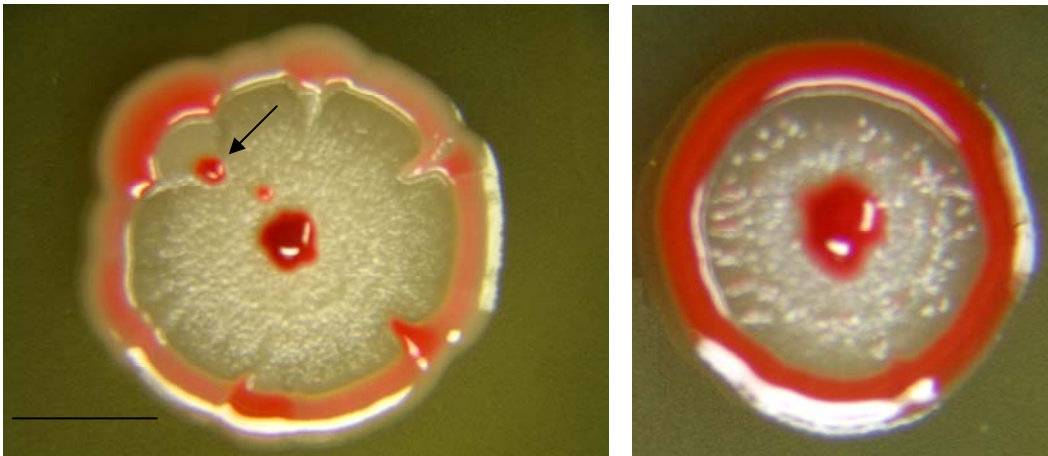
V makroskopickém měřítku je okraj kolonií některých fenotypů prostorově oddělen od vnitřní části kolonie a vytváří jasný vysoký lem (klon *Fmi*, viz obr. 32 vpravo, obr. 36 a seznam stabilizovaných klonů).

Na lemu a středu kolonie klonu *Fmi* je možné snadno sledovat funkční buněčnou diferenciaci vedoucí ke vzniku naddiferenciačních jevů. U dvou či více kolonií stejného fenotypu vyrostlých zároveň v dostatečné blízkosti (Rieger, 2007) je možné sledovat spojení lemů vedoucí ke vzniku soukolonií (obr. 35) u kterého je přináležitost konkrétní části společného lemu ke konkrétní kolonii téměř neurčitelná a oddělení jednotlivých

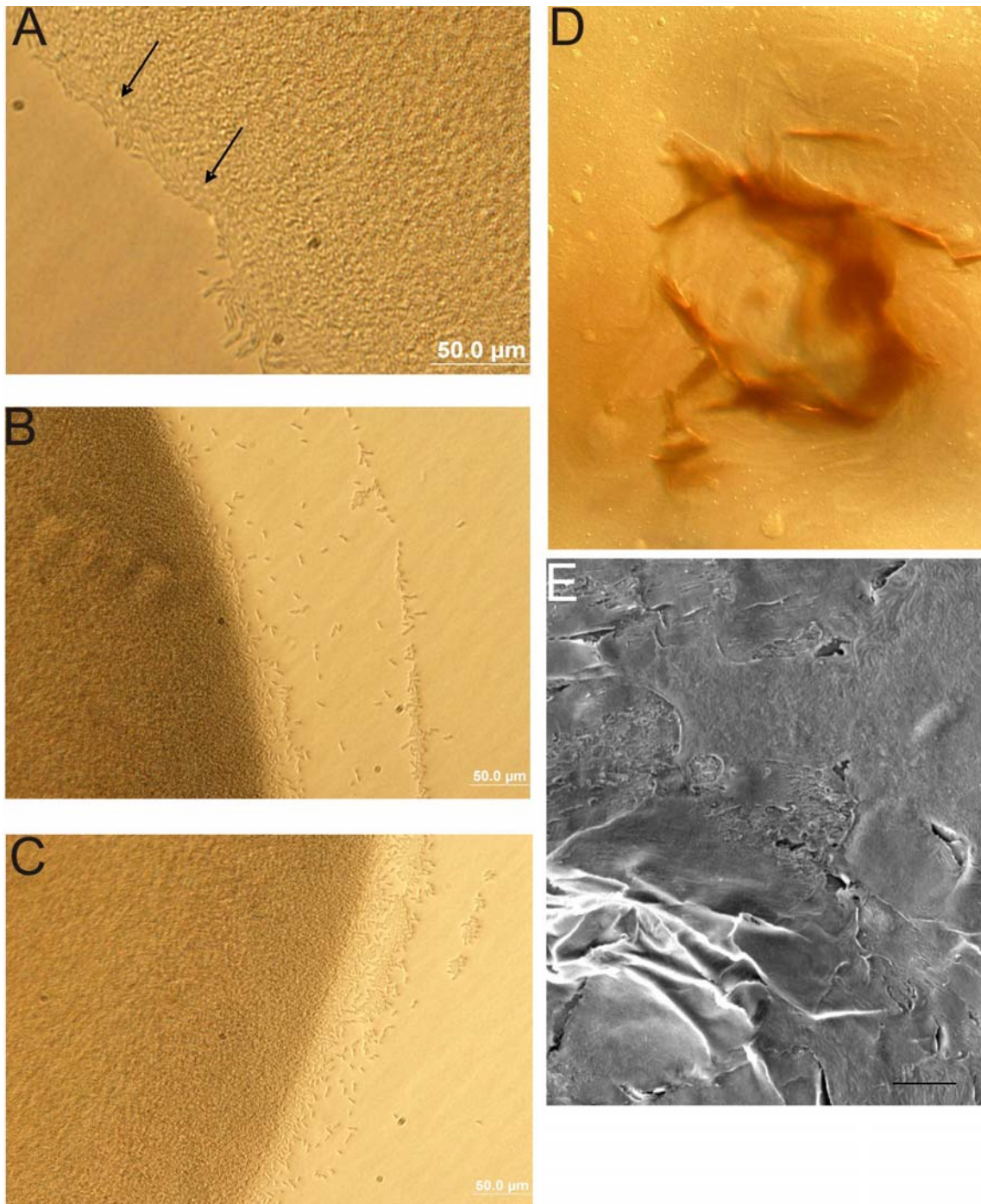
kolonií skrze lemy nepostřehnutelné. V jedné jediné monokolonii přitom může někdy dojít ke strukturně chybné buněčné diferenciaci při stavbě těla kolonie, vedoucí ke vzniku více středů s vlastními lemy a tím k jevu stavební naddiferenciace a nepravidelnosti vzniklé kolonie (obr. 36).



Obr. 35 **Soukolonií fenotypu *Fw***, kolonie jsou 3 dny staré, soukolonií bylo vytvořeno biogenní cestou (měřítko = 5mm).



Obr. 36 **Diferenciace a naddiferenciace stavby**. Vlevo strukturně naddiferencovaná monokolonie klonu *Fm* se dvěma středy. Levý, později vytvořený střed (šipka), vytváří nepravidelný částečně autonomní lem. Vpravo obrázek pravidelného fenotypu téhož klonu. (měřítko = 5mm).



Tab. 1 **Diferencované buněčné fenotypy na okraji 2 dny staré kolonie a obal na povrchu kolonie.** Na snímku A vidíme jednovrstevný pás buněk na okraji kolonie fenotypu Wmi, šipky lemují hranici, od které jsou buňky až k úplnému okraji kolonie formovány pouze do jedné vrstvy. Na snímku B a C prstenec diferencovaných buněk ve vzdálenosti až 100 μ m od okraje kolonie fenotypu Rmi. Na snímku D narušený pigmentovaný plášť extracelulární matrix kolonie *Rmi* pod světelným mikroskopem, na snímku E pod elektronovým mikroskopem (autor EM snímku RNDr. Oldřich Benada, měřítko D a E = 10 μ m). Lem kolonie i statický plášť jsou pozorovatelné na přiloženém CD.

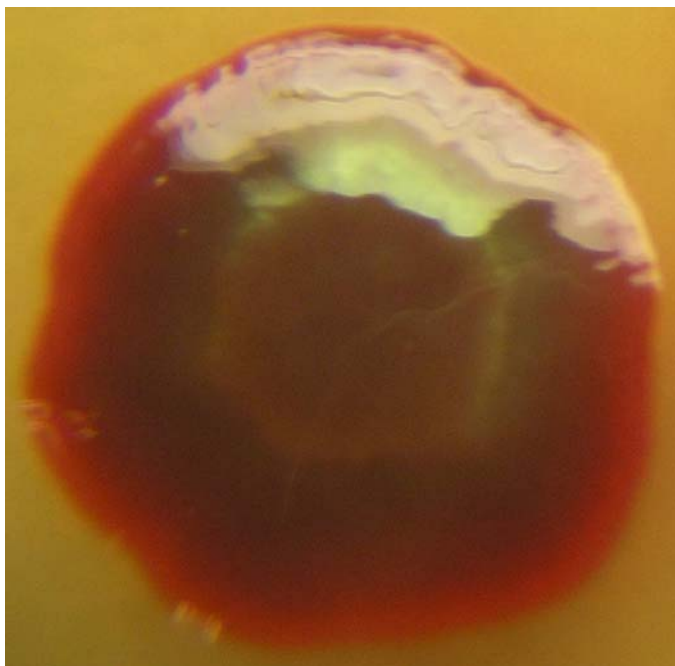
3.2.2.3 Kibuc ve vztahu ke stavební diferenciaci

Vedle monokolonií, vzniklých nárůstem biomasy celé kolonie z jediné původní buňky, je možné získat kolonie typu kibucu, tedy kolonie vzniklé nárůstem biomasy z počátečních buněk, umístěných na jedno místo na pevné médium ve větším množství (Materiály a metody; Rieger, 2007). Fenotyp kibucu je ve většině případů podobný fenotypu monokolonie (či kibucu), ze které pochází biomasa buněk použitá při vysazení kibucu. Je-li však zdrojová biomasa pro vysazení kibucu odebírána ze specifických míst kolonie, je možné najít drobné odlišnosti ve struktuře takto vzniklého kibucu oproti struktuře monokolonie. Kibuc, vzniklý z většího množství buněk, tvořících ve zdrojové kolonii tvarovou či barevnou diferenciací specifický oddíl, může mít ve statisticky významném množství případů fenotyp specificky odlišný od fenotypu monokolonie, vzniklé z jedné buňky z téže specificky diferencované oblasti zdrojové kolonie. Provedli jsme výsev z kolonie fenotypu *Rkov* a při sběru biomasy jsme se soustředili pouze na zeleně fosforeskující prsteneček koncentrický se středem kolonie ve vzdálenosti 2 mm (obr. 37). Výsev obsahoval 100% kolonií fenotypu *Rkov*, které se tvarem či barvou nelišily od zdrojové kolonie (obr. 38). Z téže kolonie jsme klíčkou odebrali malé množství biomasy zeleného prstence a použili ji k vysazení kibuců. Všech osmnáct kibuců vzniklých z biomasy zeleného prstence obsahovalo větší či menší bílé a světlé plastické úseky, žádný neměl zcela hladký povrch (tab. 2 obr. B, D). Z dalších osmnácti kibuců, vzniklých z biomasy jiných částí kolonie (při sběru této biomasy jsme se pokusili vyhnout oblasti zeleného prstence) obsahovalo bílé či světlé plastické úseky jen 6 (tab. 2 obr. A, C).

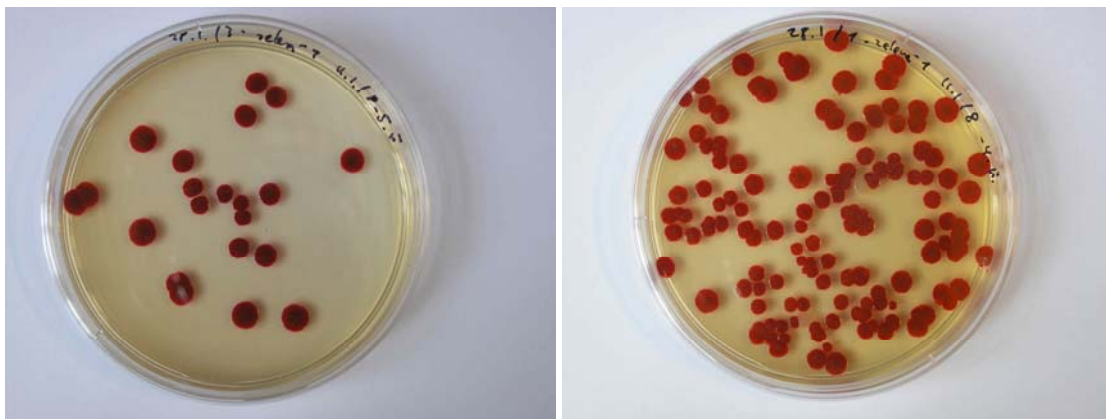
Vliv prostředí, ze kterého pochází zárodečná biomasa, se pravděpodobně odráží na stavbě kibucu (z hlediska struktury vznikajícího útvaru) spíše negativně. Zdá se, že buňky zakládající *monokolonie*, jsou schopné oprostít se od funkční diferenciaci získané pobytem ve skupině buněk na konkrétním místě ve zdrojové kolonii a jsou schopné dát vznik kolonii s normálním stavebním rozvrhem, zatímco buňky, zakládající kibuc ve velké skupině - větším množství jedinců se stejnou stavební diferenciací ze zdrojové kolonie, se nemohou tak snadno jako jediná buňka zbavit diferenciačního kontextu, což může vést ke stavební deformaci vznikajícího kibucu.

Dalším faktorem ovlivňujícím stavbu výsledného kibucu může být i množství (Rieger, 2007) a tvar nánosu zdrojové biomasy. U kibucu, rostoucího z biomasy umístěné na ŽA+G do tvaru podélného nánosu o délce 0,5mm, jsme na dvaceti snímcích sledovali

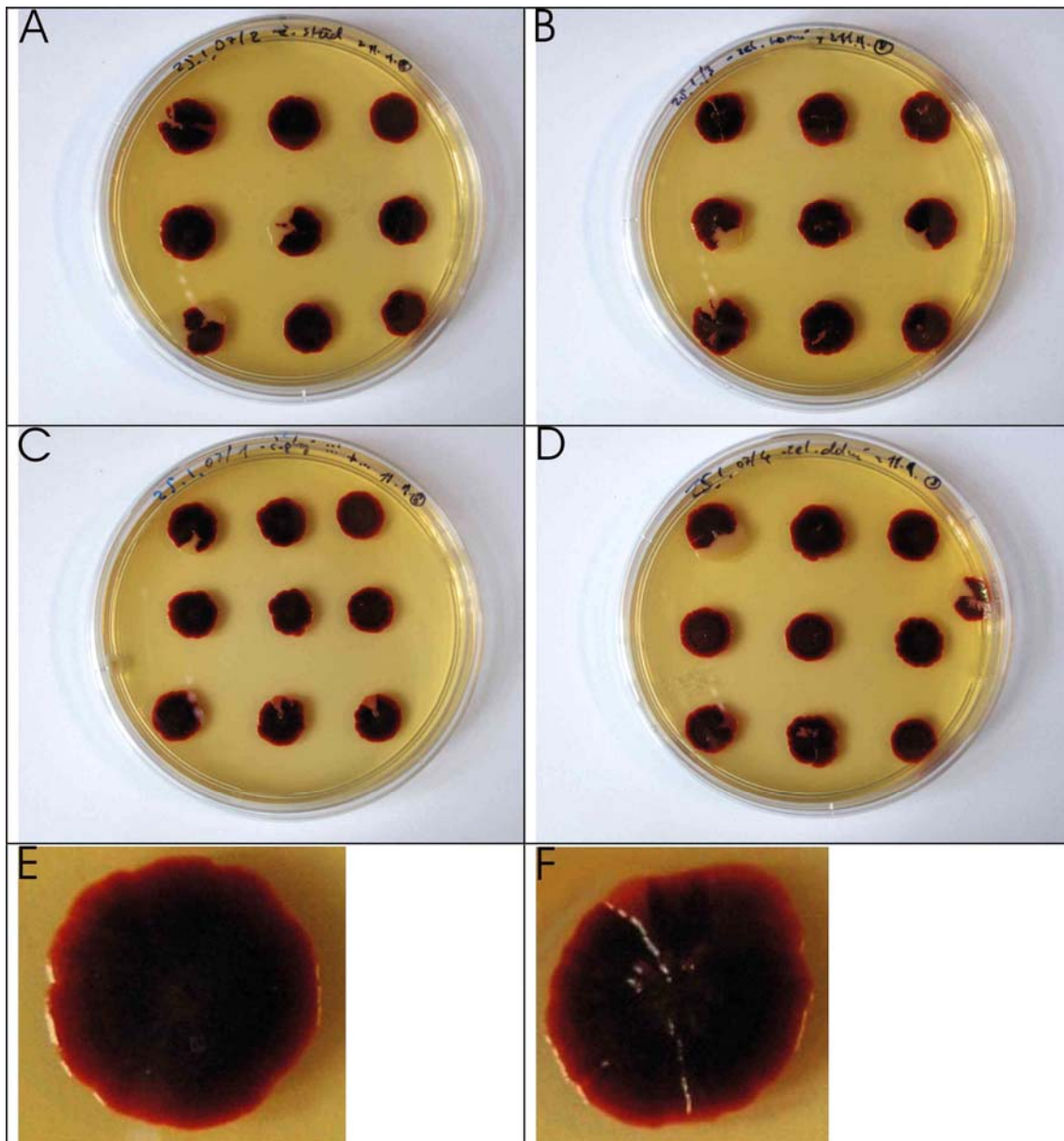
postupný růst kibucu s nepravidelným vychlípěním kopírujícím orientaci osy zakládajícího nánosu biomasy. V dospělosti obsahoval kibuc v ose orientace zakládající biomasy výsek nepravidelného zbarvení (obr. 39). Tento aspekt růstu kibuců však vyžaduje ještě další zkoumání.



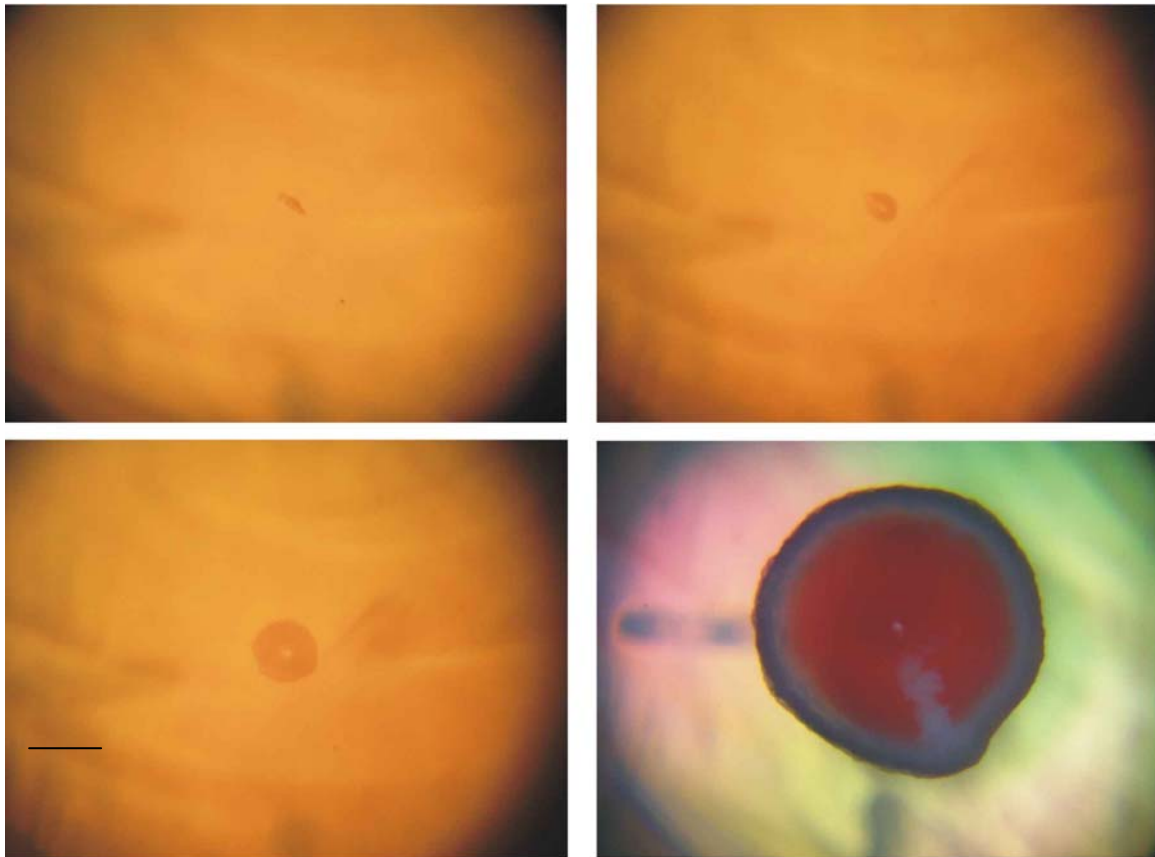
Obr. 37 Klon *Rkov* se zeleným prstencem, prstenec má tvar kruhu a je koncentrický ke středu kolonie.



Obr. 38 Dva z výsevů ze zeleného prstence klonu *Rkov*. Z několika set kolonií vyrostlých z výsevu byla pouze jedna kolonie bílá, ostatní fenotypu *Rkov*. Žádná z kolonií neobsahovala bílé či světlé plastické úseky.

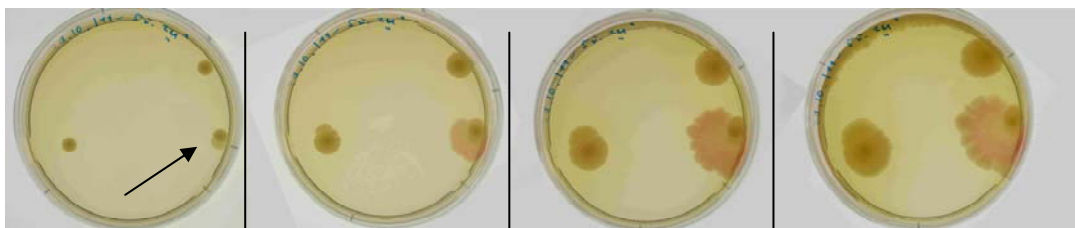


Tab. 2 **Kibucy z různých částí *Rkov* kolonie.** obr. Na miskách A a C je 18 kibuců z různých míst *Rkov* monokolonie. Povrch je u dvanácti hladký, u šesti s jednoznačnými bílými výseky. V pravé části, na miskách B a D je biomasa ze zelených částí. Na spodních výřezech jsou zvětšené kibucy - E reprezentující A a C (vlevo) a F reprezentující B a D (pravé misky). Průměr všech kibuců je 0.9 – 1.2mm



Obr. 39 **Kibuc z orientovaného vysazení.** Od levého horního obrázku růst kibucu po 2 a 8, od levého dolního po 11, 38 hodinách od vysazení na agar, měřítko 0,5 mm; šestisekundové timelapse movie představující dvanáct hodin růstu tohoto kibucu ve stáří dvou dnů je spustitelné na přiloženém CD.

3.2.2.4 Identita a mezikoloniální komunikace



Obr. 40 Růst kolonií s fenotypem s tendencí k neomezenému růstu (viz. šipka) ve 3, 4, 7 a 11ti dnech na 9cm misce.

Monokolonie některých klonů *Serratii* mají tendenci k neomezenému či kobercovitému růstu. Z kolonií kobercovitého růstu se nám nepodařilo vytvořit stabilát. Vzniklý fenotyp může být výsledkem špatně fungující schopnosti komunikace mezi buňkami tvořícími kolonii. Přesto mají tyto buňky relativně diskrétní interkoloniální růst a jsou schopné rozlišit prostor obsazený jinou kolonií od volného prostoru. Dokonce je možné u nich konstatovat schopnost rozlišit biomasu rostoucí z jiné kolonie od vlastní biomasy. Na tab. 3 můžeme pozorovat růst takové monokolonie. Na Petriho misce obsahující více kolonií různého fenotypu včetně kolonie s tendencí ke kobercovitému růstu je možné dobře sledovat interakci vyvinutých kolonií s touto rostoucí kolonií. Na tab. 3 obr. A, B vidíme vzájemný odstup udržovaný mezi koloniemi s normálním růstem a kolonií s nekonečným růstem, v pravé horní části misek a na obr. E je ještě po 3 dnech od vysetí viditelný vznik výhonků na jedné z kolonií s normálním růstem. V detailu je možné sledovat spojování biomasy těchto výhonků, stejně jako spojování biomasy výběžků z nekonečně rostoucí kolonie, přičemž ke vzájemnému spojení mezi těmito výběžky ze dvou různých kolonií nedochází. Pod mikroskopem je možné sledovat jejich přiblížení a opětné odklonění při růstu po čtyřech a pěti dnech (tab. 4 obr. A, B; vpravo kobercovitý fenotyp). Ke vzájemnému kontaktu dochází pouze v jednom místě, ovšem nedochází zde k prolnutí biomasy, pouze k doteku vnějšího okraje kolonie (tab. 4, obr. C, D, E) a rostoucí biomasa výběžků se v pátém dni růstu od tohoto místa maximálně odklání, čímž vzniká kontakt o délce 50 – 100 μm a výšce cca 20 μm , tedy vzájemném odstupu hlavní části biomasy cca 30 μm v místě kontaktu.

Na fotografiích je také patrná odlišná struktura biomasy obou kolonií. Rozdíl je viditelný mikroskopem u výběžků kolonií při spodním osvitě pohledem odspodu (tab.4 obr. C) a při bočním osvitě pohledem svrchu (tab.4 obr. D) a na středech kolonií při průchozím světle pohledem svrchu (tab.4 obr. G - střed kobercovitého fenotypu, H – střed fenotypu

Wr s normálním růstem). Z biomasy výběžků i středů obou kolonií sledovaných v této misce byly opakovaně odebrány vzorky, které byly vyseté na stejnou půdu jako kolonie v této misce. Všechny takto získané vzorky dávali vznik koloniím s normálním růstem.

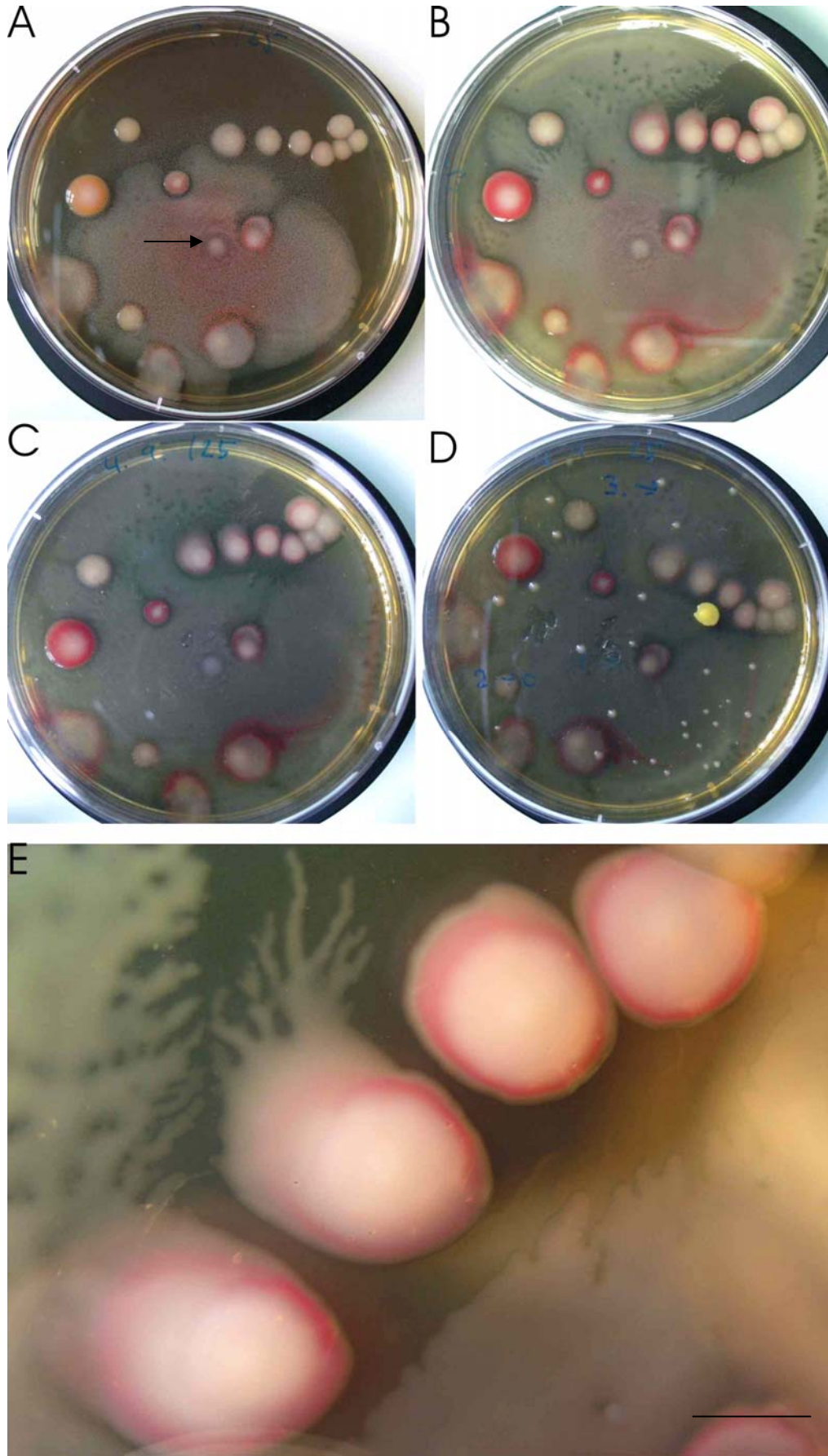
Při pokusech s koloniemi s viditelnou pigmentací v hustých výsevech jsme pozorovali další jev typu mezikoloniální komunikace a to řetězové zbarvování kolonií. Naše pozorování odpovídala výsledkům popsaným v (Rieger, 2007). Zbarvování kolonií může být vyvoláno zbarvením jiných kolonií a tato indukce se šíří od zbarvených kolonií jinak než dotekem, tedy nejspíše vzduchem v Petriho misce (obr. 23, 41).

Legenda k tabuli č. 3

Na obrázku A vidíme šipkou označenou kolonii s tendencí ke kobercovitému růstu. Tato kolonie dosahuje více než trojnásobného průměru oproti jiným koloniím již po 24 hodinách růstu. Na obrázku B je jasně viditelný odstup této kolonie od kolonií *Wr* rostoucích zcela pravidelně. Odstup je patrný i po týdnu a více než třech týdnech růstu (obrázky C a D). Vzájemný odstup udržovaný na misce mezi koloniemi s normálním růstem a kolonií s nekonečným růstem je pozorovatelný ve všech případech růstu nepravidelných kolonií (kromě fenotypu *Wpsurround*).

Na obrázku E je viditelný vznik výhonků na kolonii s pravidelným růstem po třech dnech růstu na misce.

Měřítko u obrázku E = 5 mm, všechny misky mají průměr 90 mm.



Tab. 3

Legenda k tabuli č. 4

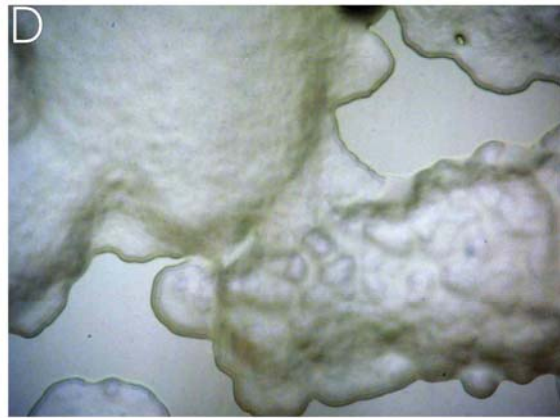
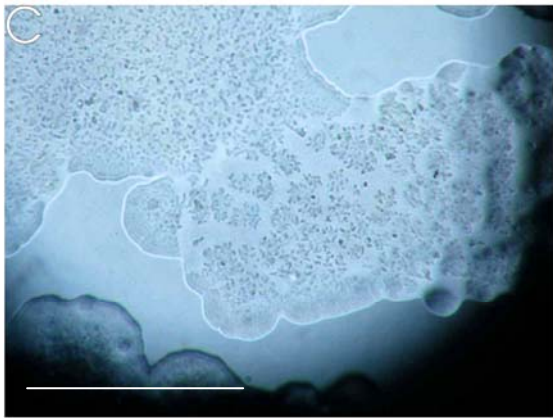
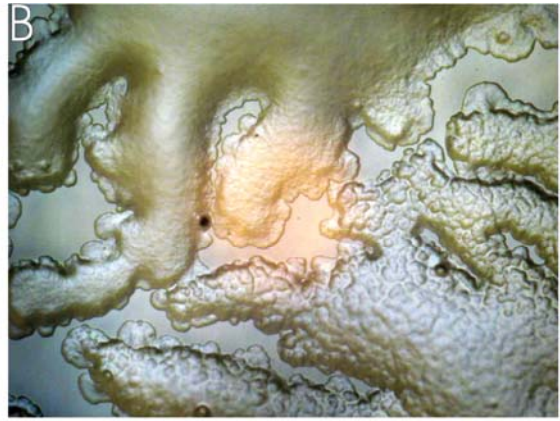
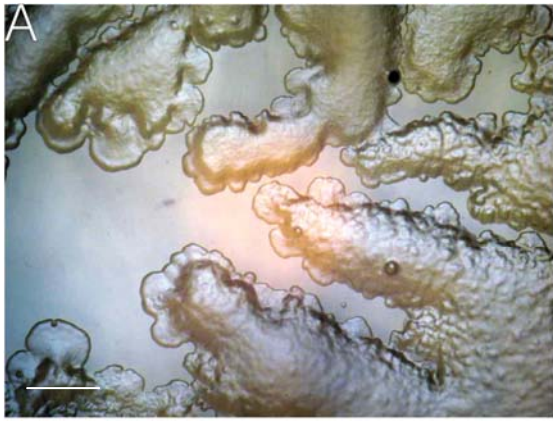
Pod mikroskopem při zvětšení 20x (A,B) a 40x (C – H) je viditelný detail spoje biomasy výhonků z obrázku E tabule 3. Snímky A a B jsou pořízeny reflektovaným světlem s nakloněnou osou a na obou je patrný rozdíl ve struktuře biomasy výběžků kobercovité kolonie vpravo dole a hladších indukovaných výběžků z kolonie Wr s normálním růstem vlevo nahoře.

Na obrázku C je při pohledu odspodu misky v průchozím světle 60x zvětšení viditelná zvláštní struktura krystalků, objevujících se v obou koloniích. V kolonii s kobercovitým růstem však ve výrazně nižší koncentraci. Krystalky jsou pozorovatelné při průchozím světle i na středech kolonií.

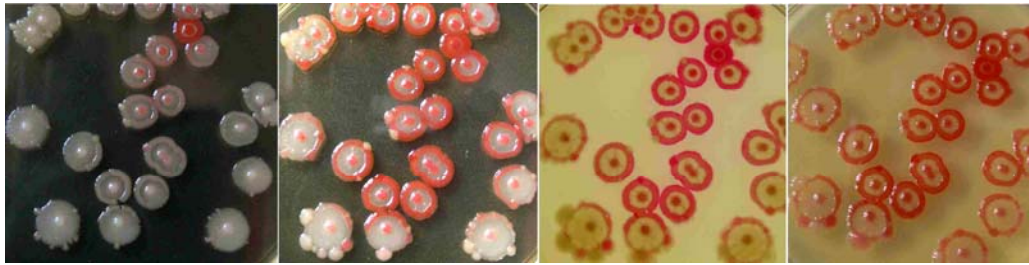
Na obrázku G je střed kolonie s kobercovitým a na obrázku H s normálním růstem. Při srovnání snímků je rozdíl v hustotě krystalů zjevný.

Na obrázku F vidíme výžky obou kolonií rostoucí ve vzdálenosti 30 μm od sebe a na obrázku D a E vidíme místo spojení biomasy výběžků. Spíše než o spojení však jde o letný dotyk, který vede k odklonění výběžků a dalšímu růstu směrem od sebe za srůstu pouze několik málo mikrometrů vysoké vrstvy biomasy na okrajích výběžků. Přitom na obrázku B vpravo je viditelné úplné srůstání mezi výběžky biomasy kolonie s kobercovitým fenotypem..

Měřítka u obrázků A a B = 100 μm , u obrázků C – H = 100 μm



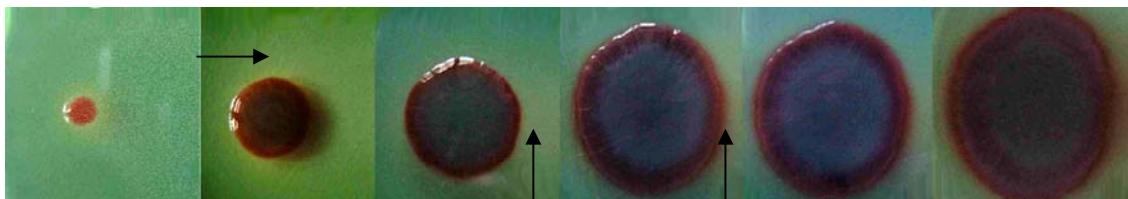
Tab. 4



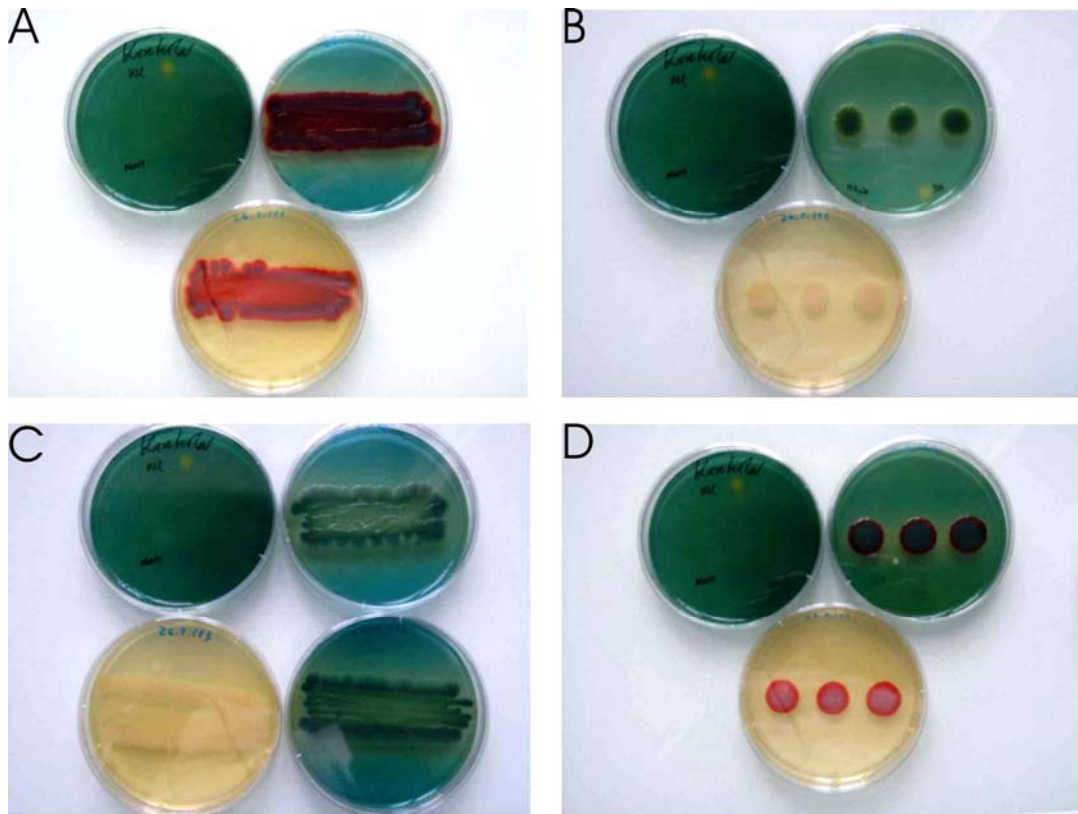
Obr. 41 Šíření zbarvení mezi koloniemi, stáří: 3, 4, 7, 11 dní

3.2.2.5 pH aktivita v koloniích

Na agarových miskách obsahujících bromthymolovou modř jsme sledovali změny pH v okolí rostoucích kolonií. Pokus vychází z předpokladu, že aktivita bakterií v živých koloniích by mohla vést ke změnám kyselosti v bezprostředním okolí kolonií a tím působit na ostatní kolonie jako určitý typ signálu o obsazenosti prostředí. Podle našich pokusů je pH aktivita kolonií *Serratii* kontinuální a intenzivní (obr. 42). V okolí kolonií klonu *Rmi* i *W* je na tmavém agaru od vysazení po cca 14 dní růstu stále viditelná světlá oblast indikující nižší pH. Pokud jsme na kontrolní misku umístili 10 μ l HCl, zbarvila se v oblasti o průměru 0,5 cm do světlé až žluté barvy, ovšem během hodiny se tato světlá skvrna rozpustila a ztratila (obr. 43), zatímco světlé až žluté halo v okolí kolonií je stále viditelné po celou dobu růstu kolonie. Indikuje tedy opravdu nejspíše trvalé snížení pH. Je u něj sice pozorovatelný výkyv v podobě zeslabení ve 3.-4. a 8.-9. dni růstu, nicméně až do 14. dne růstu je jasně rozlišitelné.



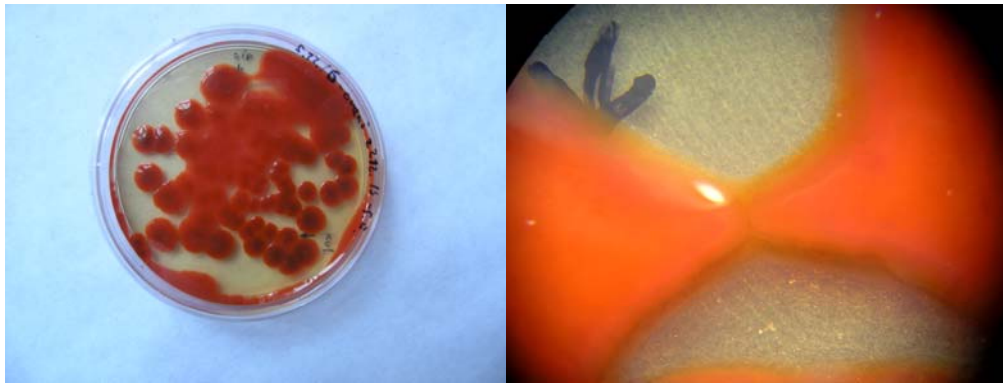
Obr. 42 Změna pH u kibucu starého 1-2-3-5-9-12 dní, některé oblasti nižšího pH jsou označeny šipkou.



Obr . 43 . Misky s pH indikátorem. Na všech snímcích je v levém horním rohu zelená miska se žlutou tečkou- obnovovaná kontrola s HCl. neobarvené misky jsou kontrolami růstu biomasy, Na miskách A a D roste biomasa a kibucy fenotypu Rmi, na miskách C a B biomasa a kibucy fenotypu W.

3.2.2.6 Vzájemná diferenciacce mezi různými fenotypy

Podářilo se nám izolovat několik klonů (*Or*, *Wpsurround*, viz. *Fenotypová diferenciacce*), majících sníženou citlivost na obsazenost prostředí jinými koloniemi. Při výsevu 100 a více kolonií na misku je u nich patrná *indiskrétní* tendence spojovat se. V případě klonu *Or* jsme dokonce sledovali postupný růst fenotypově shodných kolonií směrem k sobě a navazování spojení (obr. 44). Takovéto chování kolonií *Serratii* je však velmi vyjíměčné a v drtivé většině případů je u kibuců i monokolonií patrný vzájemný odstup. Při výsevech 100 a více kolonií na 9cm misku je pozorovatelné diskretní chování vedoucí k udržení menší dospělé velikosti výsledných kolonií, než je velikost, které tyto kolonie dosáhnou v případě, že jsou vyseté do velkého prostoru v menším počtu. Kromě zvláštních případů klonů s tendencí k neomezenému růstu, dosahují kolonie všech klonů kolem desátého dne od vysetí na misky konečné velikosti, která se již nemění, přestože z vysoké cfu u takto starých kolonií i kolonií starých měsíc a více je jasné, že většina buněk je v desetidenních koloniích stále živá a schopná dělení a růstu.



Obr. 44 Srůstající kolonie klonu *Or*

Morfogeneze kolonií zakládá jejich výslednou morfologii a u různých klonů se může lišit. Tím vznikají nejen odlišné fenotypy ale i odlišný způsob vzájemné interakce různých fenotypů během jejich růstu. Během práce s kulturou *Serratii* se nám podařilo získat několik klonů, majících výjimečnou morfogenezi, obecně však pro interakce kolonií různých fenotypů platí, že se kolonie ve své morfogenezi v přítomnosti dalších kolonií jiných fenotypů řídí blízkostí těchto fenotypů, v prostředí hustého výsevu zmenšují svou dospělou velikost a v případě vzájemného kontaktu zůstávají kolonie odlišných fenotypů/klonů z makroskopického pohledu oddělené.

V pokusu zaměřeném na vlastnosti biomasy kolonií v místě jejich doteku, jsme sledovali dvě kolonie fenotypu *Wmi* a *Rmi* (tab. 5 obr. B) se středy biomasy 6 mm vzdálenými, vyrůstající tedy v takové blízkosti, v jaké by se dvě dospělé kolonie tohoto fenotypu nutně museli překrývat (tab. 5 obr. A). K dotyku těchto kolonií došlo přibližně třicet hodin od vysazení na agar, přičemž při analýze fotografií jejich růstu jsme nenalezli zpomalení růstu ve směru k sobě až do okamžiku spojení (ani při tak detailním rozlišení, v jakém jsme růst pod mikroskopem monitorovali – rozlišení na cca 2 μm), kolonie k sobě stále přirůstaly konstantní rychlostí cca 4 μm za minutu (příklad dvou ze snímků přirůstání: tab. 5 obr. C, D).

Kolonie se navzájem prorostly na ose spojující jejich středy do hloubky 150 μm . Biomasa v této oblasti se stala nerozlišitelnou směsí buněk podle barvy pocházejících pravděpodobně od obou kolonií. Na snímcích E, F a J tab. 5 je viditelné prolnutí biomasy obou kolonií. Při zkoumání místa srůstu jsme proostřením na povrch kolonie v záběru oblasti 50 – 100 od okraje srůstu kolonií našli slabě viditelný pruh o šířce několika μm . Tento pruh se nám později podařilo vysledovat podél celého srůstu kolonií (snímky H, I a K). Porovnáme-li strukturu povrchu kolonie *Rmi* (na všech snímcích vpravo) s kolonií *Wmi*, zdá se, že hrubší povrch kolonie *Rmi* je znatelný na povrchu místa srůstu kolonií

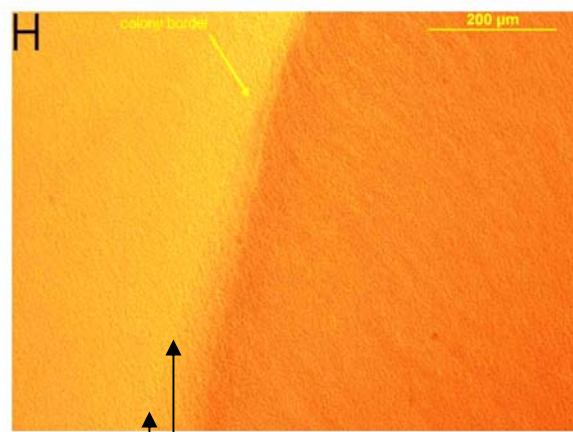
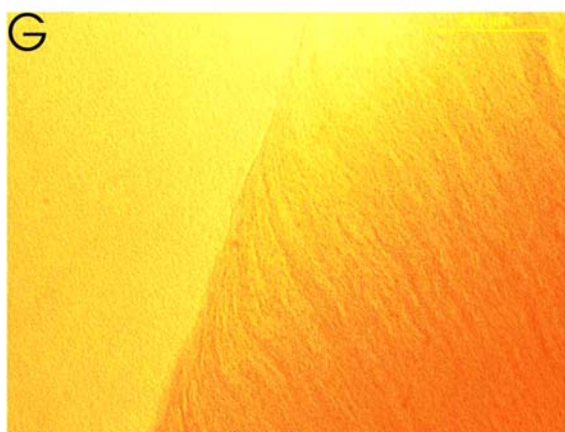
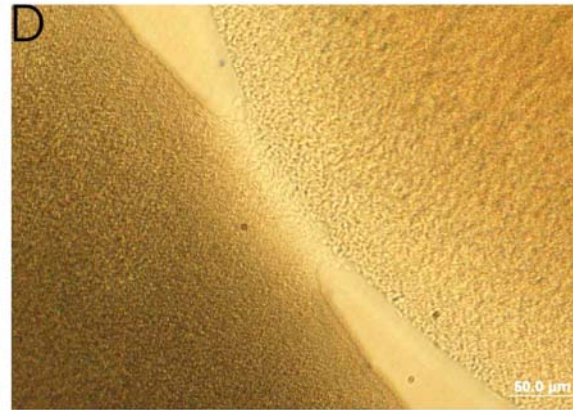
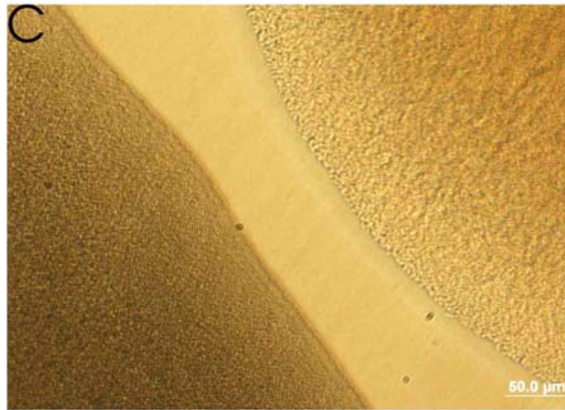
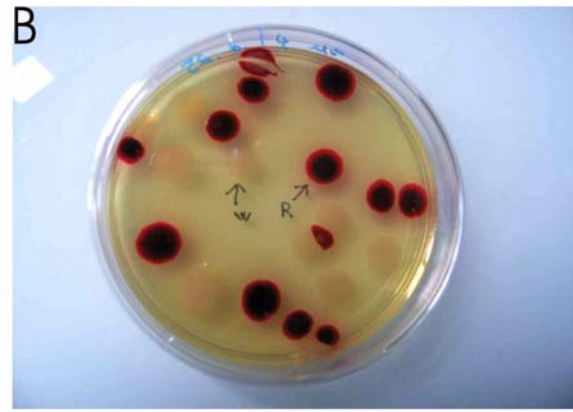
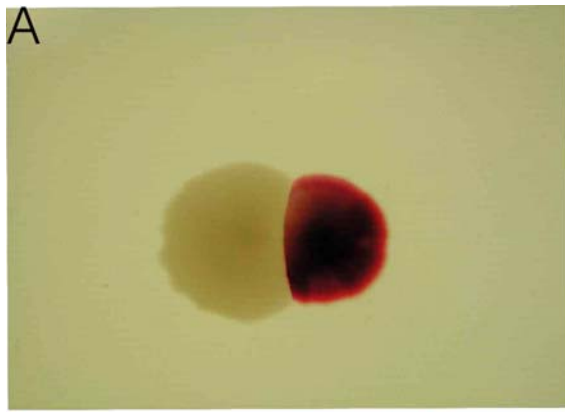
nikoliv pouze do tohoto místa, ve kterém by mohlo být možné nalézt promíšenou biomasu obou klonů, jak je tomu na mnoha záběrech ostřených o několik μm hlouběji pod povrch srůstu (tab. 5 obr. E, F, J), nýbrž že povrch je kompaktní struktury až po zmíněný slabě viditelný několik μm silný pruh na povrchu kolonií v místě srůstu (nejlépe viditelný na tab. 5 obr. K).

Legenda k tabuli č. 5

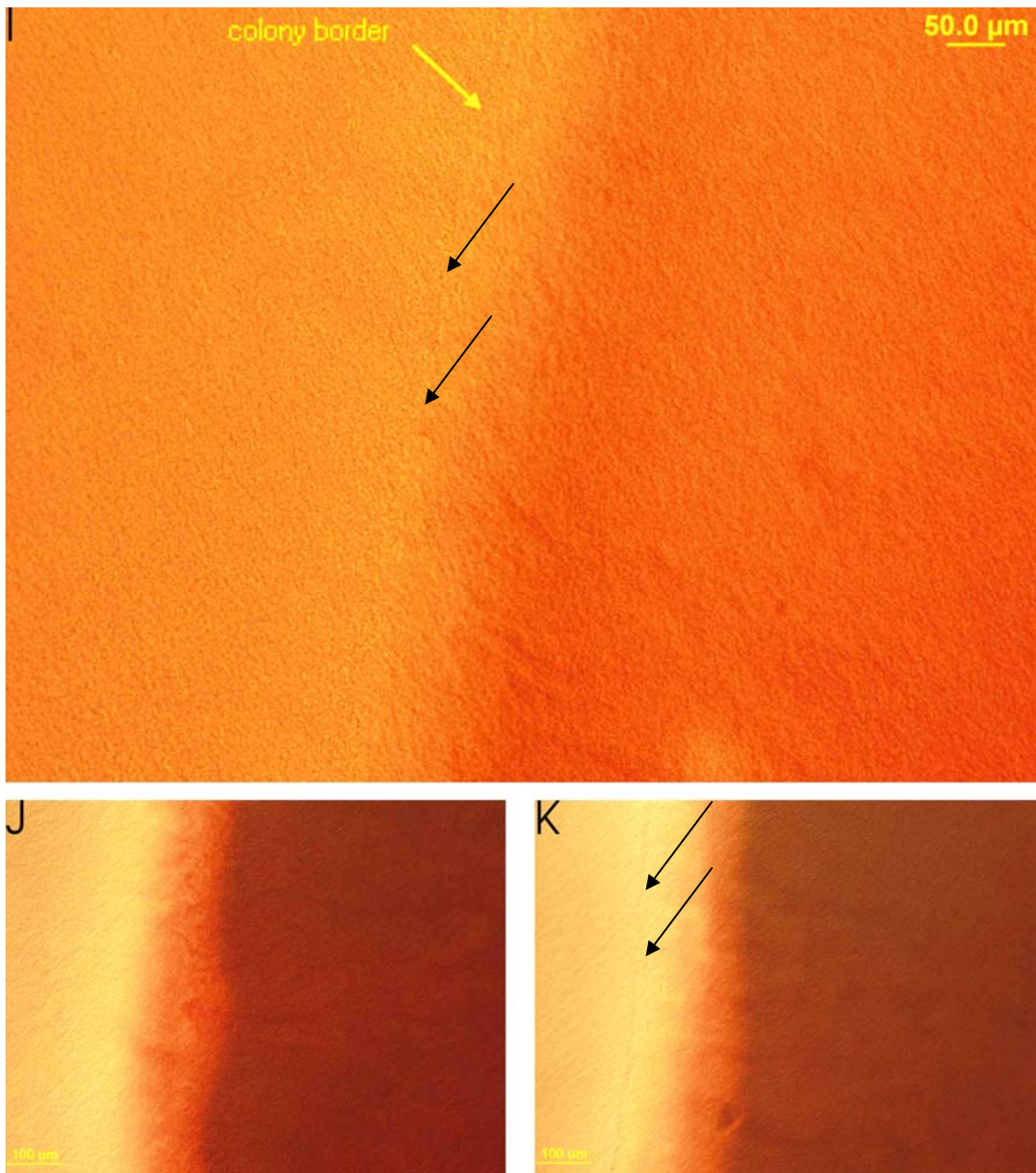
Na obrázku A vidíme celé srostlé kolonie z tohoto pokusu, na obrázku B zdrojová miska kolonií *Wmi* a *Rmi* z tohoto pokusu.

Na obrázku C a D je patrné srůstání kolonií, vpravo fenotyp *Rmi*, vlevo *Wmi*. E a F jsou snímky nerozlišitelné biomasy kolonií v místě jejich srůstu při ostření pod povrch srůstu.

Na snímku G je viditelné srůstání kolonií při ostření několik μm pod povrch a zaměření na srůstání v místě osy středů srůstajících kolonií. Na obrázku H je viditelné srůstání s ostřením na lem - hranu srůstu (označena „colony border“). Šipkami je prošpatnou viditelnost označena ta *pravá* hrana srůstu, cca 50 μm od nejsilnější červeno-žluté linie. Snímky C až F jsou fotografovány jiným mikroskopem než snímky G až K.



Tabule č. 5a obr. A – H (popis na předchozí straně)



Tabule č. 5b **obr. I – K**

Na snímku I vidíme srůstání s ostřením na lem - hranu srůstu (označena „colony border“), J – srůstání dalších dvou Rmi a Wmi kolonií s ostřením pod povrch srůstu, K – srůstání dalších dvou Rmi a Wmi kolonií s ostřením na povrch srůstu s viditelným lemem – hranou srůstu. Lemy jsou pro lepší viditelnost označeny černými a žlutými šipkami. Viditelné jsou nejlépe v digitální verzi snímků, tedy na přiloženém CD.

Na snímcích J a K je viditelné spojení jiných dvou W a R kolonií než na ostatních snímcích.

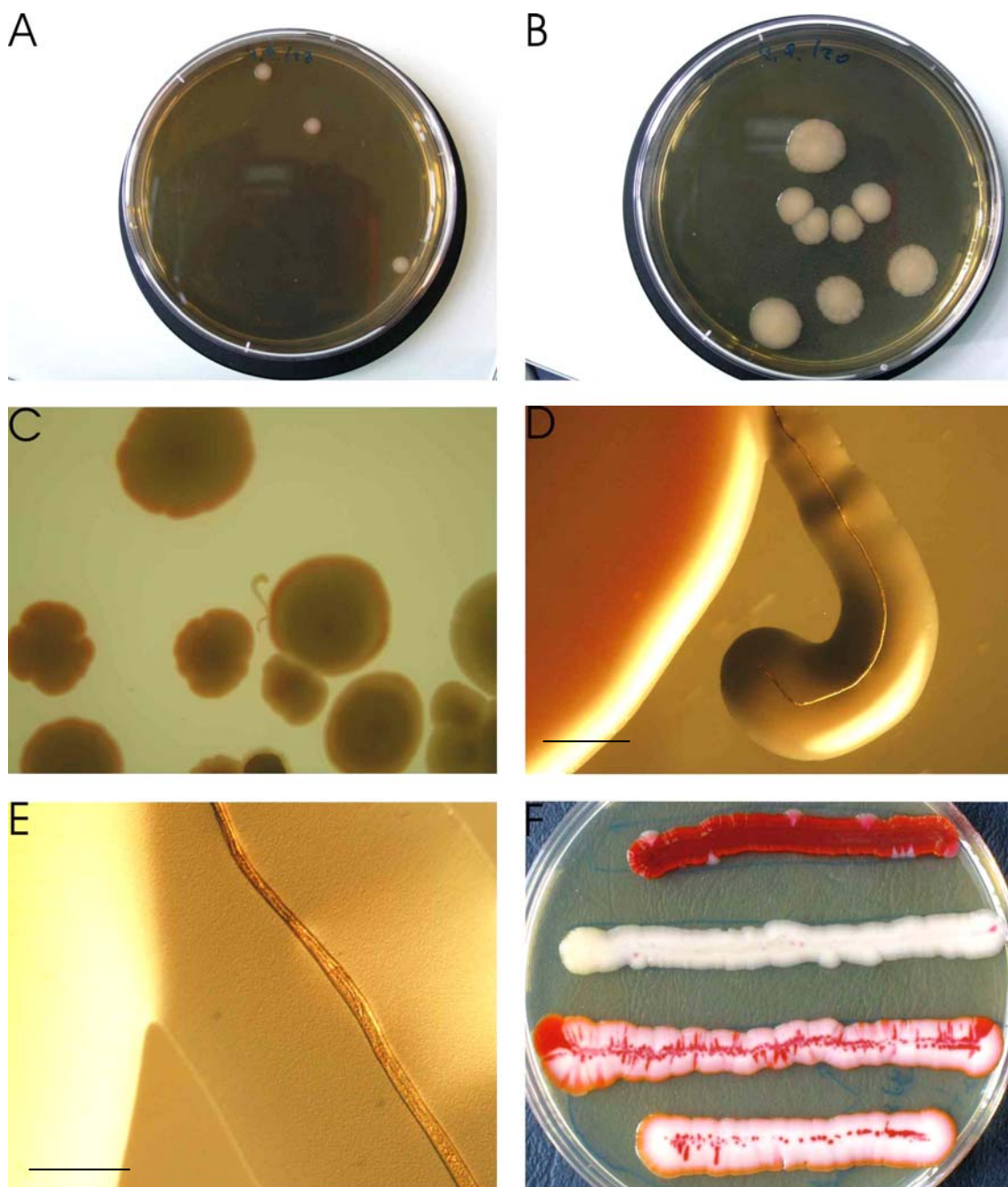
3.2.2.7 Fenotyp *WPsurround*

U většiny klonů různých fenotypů lze sledovat podobné způsoby vzájemné diferenciaci a vzájemné komunikace mezi koloniemi jednoho i odlišných fenotypů ve společném prostředí misky. Například oproti průměru kolonie na misce s jednou až deseti koloniemi je při pěstování v hustých výsevech o počtu 200 a více kolonií na miskou pozorovatelné výrazné zmenšení dospělého průměru kolonie u většiny fenotypů. Při výsevech fenotypu *Rmi* jsme zaznamenali rozdíl ve velikostech více než pětinasobný. Pasážováním nejmenších kolonií nalezených v hustých výsevech fenotypu *W*, se nám podařilo získat fenotyp, udržující (po několik dalších pasáží) malou velikost i na volném prostoru (tab. 6 obr. A). Z tohoto fenotypu jsme sice nezískali klon, ovšem z kolonií stejného původu, u kterých jsme pozorovali menší tendenci k udržování diskrétního odstupu od kolonií stejného i jiného fenotypu, jsme získali klon s výrazně větším průměrem než je u kolonií stejného stáří obvyklé (tab. 6 obr. B). Šlechtěním a pasážováním se nám podařilo tento klon udržet. Na obrázcích A a B tabule č.6 je viditelný rozdíl ve velikostech stejně starých kolonií vyšlechtěných z jednoho zdroje a vlivem šlechtění rostoucích na B jako větší kolonie v hustším výsevu než na A, tedy oproti běžně pozorovatelným trendům růstu kolonií.

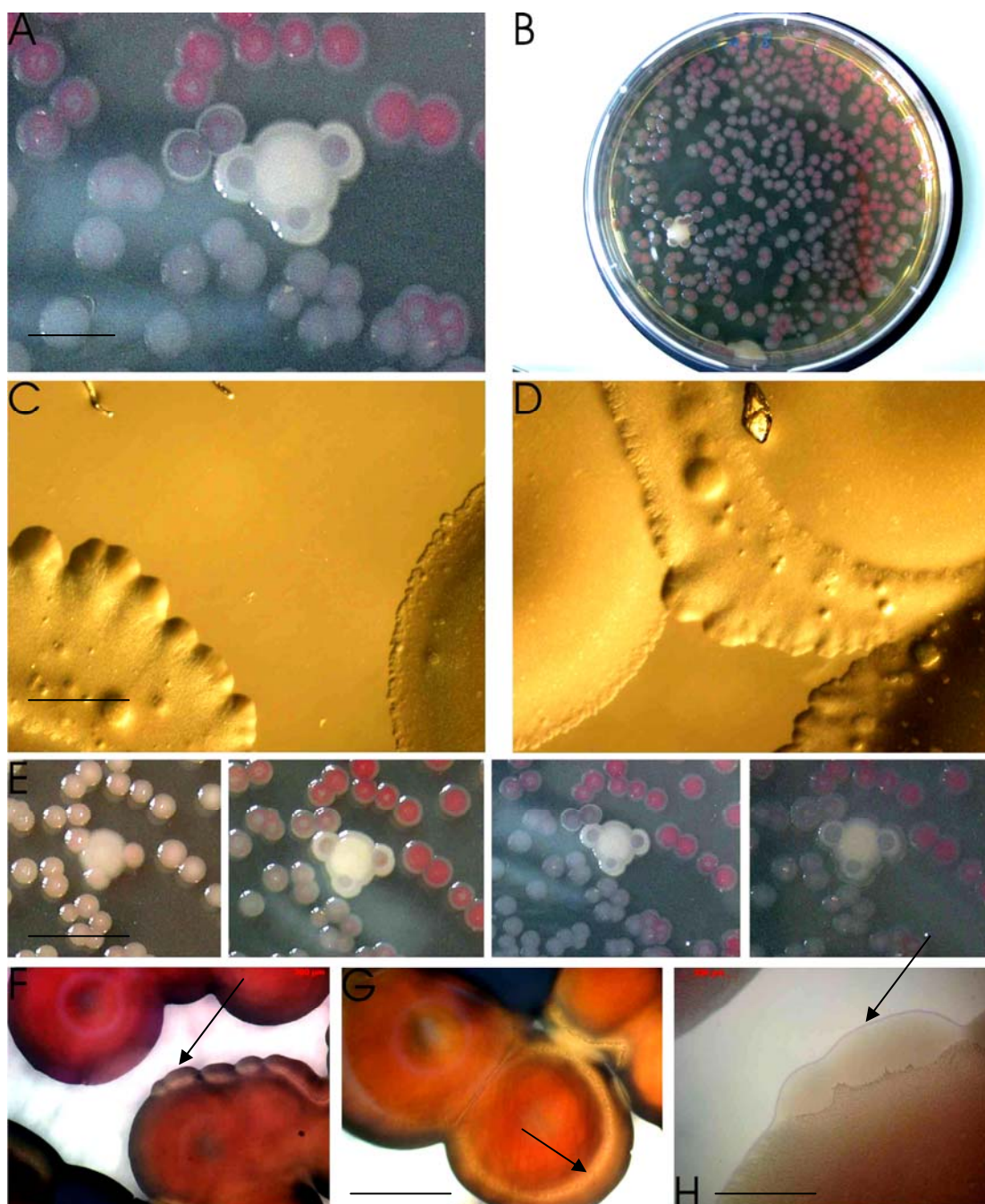
Indiskrétnost jako vlastnost diferenciaci od kolonií odlišných fenotypů se projevila u klonu *Wpsurround*, vzniklého zcela náhle při výsevu z atypické kolonie vyrostlé na ŽA+G z výsevu klonu *Wr* drženého 113 dní v MM. Klon *Wpsurround* má extrémně silnou tendenci využívat objektů včetně fenotypově odlišných kolonií ve svém okolí k rozrůstání biomasy svých kolonií. Využívání objektů v okolí jako lešení usnadňující rozrůstání biomasy je pozorovatelné na agarových miskách s vyšší vlhkostí a to u kolonií většiny fenotypů (do stáří 10 dnů). Tuto vlastnost můžeme pozorovat na misce při výsevu kolonií příliš blízko ke stěně ale i na středu misky, postavíme-li kolonii do cesty malý předmět. Na obrázku C tab. 6 je vidět tři dny stará kolonie fenotypu *Wor*, ke které byl dva dny po vysetí 1cm od jejího středu položen na agarovou plotnu kus syntetické žíně o tloušťce cca 15 μm a délce cca 5 mm. Sledovaná kolonie na snímku C má průměr 7 mm. Na mikroskopických snímcích D a E je viditelný nárůst biomasy v bezprostředním okolí žíně vzniklý během jediného dne. Obrůstání žíně biomasou není interpretačně v rozporu s našimi dosavadními zkušenostmi s růstem kolonií (také Shapiro, 1997). Morfogeneze zmíněného fenotypu *Wpsurround* se však těmto zkušenostem zcela

vymyká. Pokud nanese čistou kulturu klonu *Wpsurround* v silné vrstvě mnoha tisíc buněk do linie na agarovou plotnu, získáme po třech dnech vrstvu biomasy, srovnatelnou svou morfologií se stejným způsobem vzniklou vrstvou jakéhokoliv jiného klonu. Na snímku *F* tabule č.6 můžeme porovnat biomasu klonu *R2* (červený nános), *W2* (bílý nános) a *Wpsurround* (dva spodní nánosy). V útvaru biomasy vzniklém z mnoha tisíc zakládajících buněk nejsou pozorovatelné zvláštní projevy indiskrétního chování. Můžeme však konstatovat větší tendenci k rozrůstání biomasy – na obou koncích každého z nánosů biomasy *Wpsurround* je průměr nánosu téměř dvakrát větší než průměr konců nánosů biomasy *R2* a *W2*. Charakteristický a u jiných klonů méně obvyklý, je také vznik mozaiky uvnitř nánosů čisté kultury z jedné monokolonie fenotypu *Wpsurround*.

Při vysetí 1 – 5 CFU fenotypu *Wpsurround* na hustý výsev jiného fenotypu je možné sledovat vznik monoklonií fenotypu *Wpsurround*, vykazujících zmíněnou tendenci obrůstat okolní kolonie jiných fenotypů. Tohoto jevu lze dosáhnout i vysazením kibucu *Wpsurround* do výsevu jiného fenotypu. Na snímcích A a B tabule č.7 vidíme monokolonii fenotypu *Wpsurround* rostoucí v hustém výsevu *Rw* kolonií. Výsev je starý osm dní, během nichž kolonie *Wpsurround* nejprve během čtyř dnů obrůstáním pohltila tři nejbližší monokolonie a růstem přes jednu z nich se poté dostala k dalším dvěma monokoloniím. Na snímku C a D je vidět biomasa *Wpsurround* s hrubým okrajem (C vlevo) obrůstající kolonii *Rw* (D, vpravo nahoře a vlevo dole jsou kolonie *Rw*, mezi kterými je viditelný pás biomasy rostoucí z kolonie *Wpsurround* vpravo dole).



Tab. 6 Na ilustrativních obrázcích A a B tabule je rozdíl ve velikostech stejně starých kolonií fenotypu *W* z jednoho zdroje rostoucích vlivem šlechtění na B jako větší kolonie v hustším výsevu než na A, tedy oproti běžně pozorovatelným trendům. Na obrázku C je tři dny stará kolonie fenotypu *Wor*, ke které byl dva dny po vysetí 1cm od středu položen na agarovou plotnu kus syntetické žíně o tloušťce cca 15 μm a délce cca 5 mm. Sledovaná kolonie na snímku C má průměr 7 mm. Na snímcích D a E je viditelný nárůst biomasy v bezprostředním okolí žíně vzniklý během jediného dne. Měřítka na snímku D – 300 μm , na snímku E – 50 μm . Na snímku F je viditelný zvláštní charakter biomasy *Wpsurround* (dva spodní mozaikovitě nárůsty), délka všech nárůstů (i *R2* a *W2*) je 7 – 9 cm.



Tab. 7 Na snímcích A a B vidíme monokolonii fenotypu *Wpsurround* rostoucí v hustém výsevu *Rw* kolonií. Kolonie *Wpsurround* nejprve během čtyř dnů obrůstáním pohltila tři nejbližší monokolonie a růstem přes jednu z nich se poté dostala k dalším dvěma monokoloniím (obr. A). Na snímku C je část kolonie *Wpsurround* - s hrubým okrajem (C vlevo) a kolonie *Rw* (C vpravo). Na snímku D vpravo nahoře a vlevo dole jsou kolonie *Rw*, mezi kterými je viditelný pás biomasy rostoucí z kolonie *Wpsurround* vpravo dole. Na snímku E je časový vývoj obrůstání kolonie *Wpsurround* ve výsevu F v čase 1, 3, 5 a 14 dní od vysetí. Snímky F a G ukazují mikroskopický záběr na část biomasy kolonie *Wpsurround* (světlá biomasa, šipky) obrůstající kolonie *Rmi*. Na snímku H vidíme totéž ve větším zvětšení. Na žádném z těchto snímků není viditelná kolonie *Wpsurround*. Měřítka na snímku A – 5 mm; C, D – 400 μm ; na snímku E – 1 cm; G, F – 1000 μm ; H – 800 μm

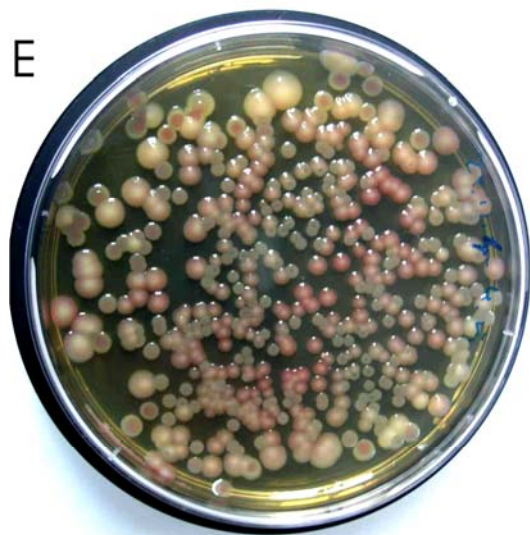
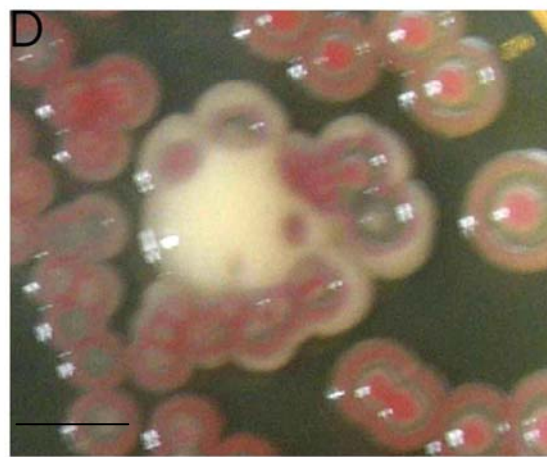
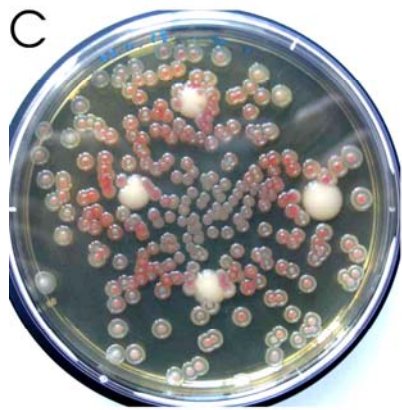
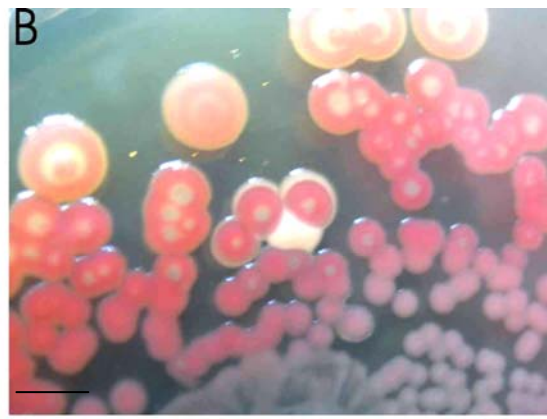
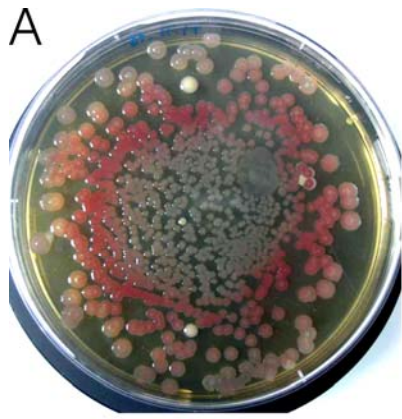
Při práci s kibucy fenotypu *Wpsurround* jsme našli souvislost mezi stářím výsevu, do kterého je kibuc tohoto klonu umístěn a velikostí, jaké v něm může dosáhnout. Umístili jsme čtyři kibucy *Wpsurround* do 24 hodin starého výsevu 300 kolonií *Fmi*. Všechny čtyři kibucy rostly do velikosti 2 – 4 mm (tab. 8 obr A) a v případě, že byly vysazeny do těsné blízkosti kolonií *Fmi*, obklopily tyto kolonie během 24 hodin růstu v termostatu tenkou vrstvou biomasy (tab. 7 obr F, G a H, tab.8 obr. B). To však byl případ pouze jednoho z kibuců, umístěného do vzdálenosti menší než 1 mm od nejbližší kolonie. Další dva byly umístěny do vzdálenosti 1 – 5 mm od nejbližších kolonií a jeden kibuc byl umístěn do vzdálenosti větší než 5 mm od nejbližších kolonií.

Na další plotnu jsme vyseli cca 300 cfu klonu *Fmi* a namátkou umístili čtyři kibucy v podobě stejného množství biomasy *Wpsurround* jako u předchozího pokusu. Po 12 hodinách růstu v termostatu bylo v místě vysazení biomasy jednoho z kibuců zřetelně více prostoru neobsazeného výsevem *Fmi* než v místech ostatních kibuců, všechny přitom dosahovaly velikosti 4 – 5 mm. Během dalších 12 hodin růstu v termostatu se všechny kibucy rozrostly do velikosti 7 – 8 mm (tab.8 obr.C) a obklopily nebo zcela pohltily okolní kolonie (tab.8 obr. D).

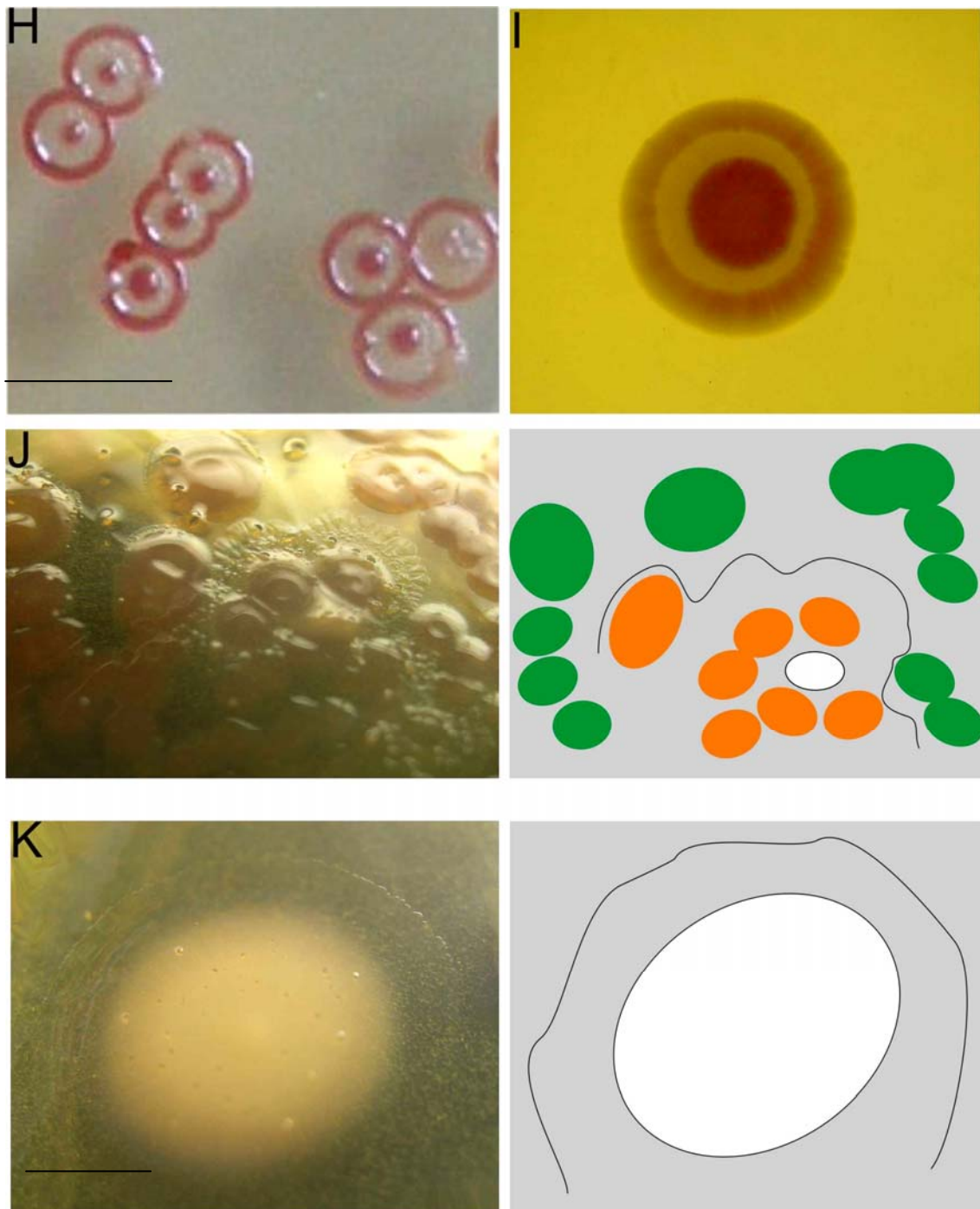
Zcela odlišné chování kolonií fenotypu *Wpsurround* lze pozorovat při kombinovaných výsevech většího množství cfu. Na plotnu jsme vyseli kombinaci 150 cfu klonu *Wpsurround* spolu se stejným množstvím cfu klonu *Fmi*. Ačkoli šlo o fenotyp, u kterého pozorujeme při každém kontaktu s kolonií odlišného fenotypu stejné chování, totiž obklopování kolonií a ve zmíněných výsevech bylo velké množství kolonií obou fenotypů ve vzájemném kontaktu, v žádném z výsevů jsme nenalezli ani jeden případ zmíněného chování (shodné výsledky jsme získali ještě při množství 50 cfu *Wpsurround* spolu s 50 cfu *Fmi* na 9 cm Pm). To mohlo být dáno i faktem, že na případných obklopených koloniích *Fmi* by nemusel být vidět světlý lem biomasy kolonií *Wpsurround*, protože všechny kolonie na miskách měly červeně pigmentující pouze střed a běžně pigmentující lem zůstal bílý. Ovlivnění dozrávání kibuců i kolonií klonu *Fmi*, vysazených do prostoru s výsevem *Wpsurround*, je viditelné na monokoloniích *Fmi* rostoucích i mimo přímý kontakt s koloniemi *Wpsurround* (kolonie *Fmi* na obrázku G tab. 8 oproti koloniím rostoucím na misce bez výsevu *Wpsurround* na obrázku H tab. 8). Nepigmentující zde zůstaly lemy kolonií, které rostly ve vzdálenosti až 5 mm od biomasy *Wpsurround* (tab. 8 obr. G). Naopak kolonie *Wpsurround* získaly v těchto výsevech s *Fmi* mnohem tmavěji červený odstín svého okraje a pohled na misky s těmito

kombinovanými výsevy tak byl červeno-bíle inverzní k výsevům obsahujícím malé množství kolonií *Wpsurround*, kde jsou kolonie *Fmi* jasně červené a *Wpsurround* bílé (tab. 8 obr. A a C oproti obr. E). Pokud jsme umístili do čerstvého výsevu *Wpsurround* kibuc ze suspenze buněk fenotypu *Fmi* a 1 μm FP, vznikl kibuc se strukturou podobou koloniím *Fmi*, který vždy vyrostl a obsahoval jasný lem a středovou vystouplou biomasu, nikdy však u něj nedošlo k obvyklému vybarvení obvodového lemu ani středu, ten byl pouze světle růžový (tab. 8 obr. F), oproti běžnému vybarvení stejně starého kibucu (tab. 8 obr. I).

Biomasa kolonií klonu *Wpsurround* vypouští po pěti až šesti týdnech růstu do okolí průhledný lem a to do vzdálenosti až $\frac{1}{2}$ poloměru kolonie (tab. 8 obr. K + schéma). Lem vzniká ve stejném období u všech monokolonií *Wpsurround*, ale i u biomasy *Wpsurround* obklopující kolonie jiného fenotypu ve větší vzdálenosti od mateřské kolonie. Na tab. 8 obr. J a přilehlém schématu můžeme srovnat lem (černá linka) v okolí obklopených kolonií *Fmi* v sedmém týdnu od vysetí. Kolonie neobklopené (na schématu zelené) žádný lem podobného typu nevytvářejí. Stav před vypuštěním lemu je viditelný na snímku B tab. 8.



Tab. 8 (popis na protější straně), měřítko B = 5 mm; D, F, G = 5 mm

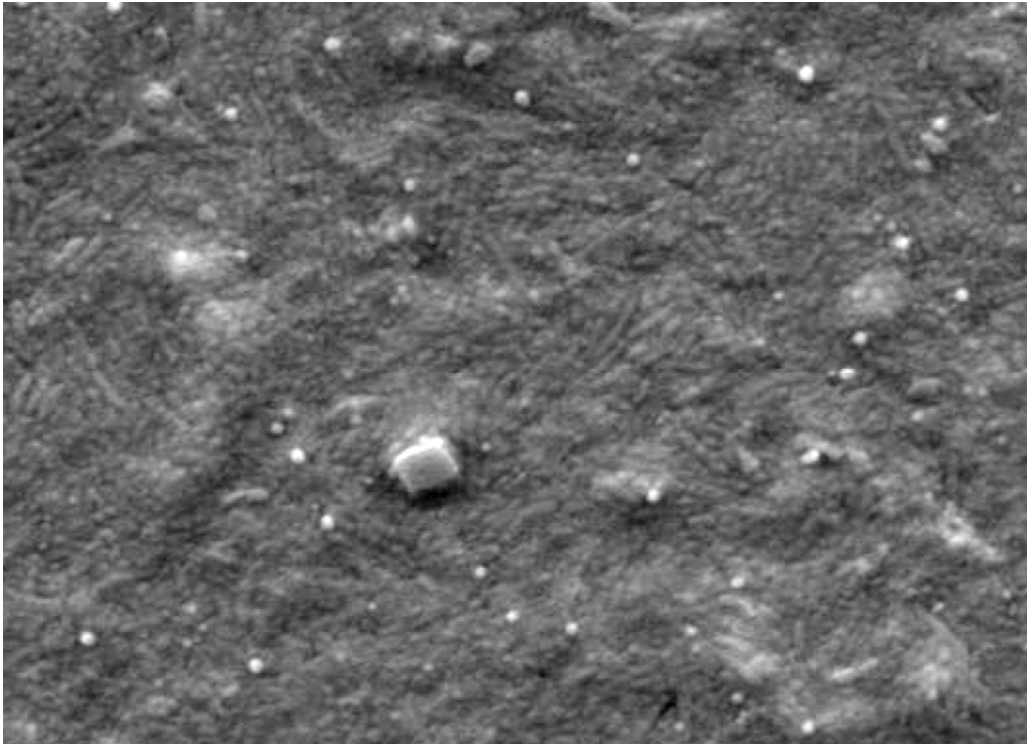


Tab. 8 obr. A, B – kibucy *Wpsurround* vysazené do 24 hodin starého výsevu *Fmi*,
 C, D – kibucy *Wpsurround* vysazené do čerstvého výsevu *Fmi*,
 E – výsev *Fmi* na pozadí výsevu *Wpsurround*,
 F – kibuc *Fmi* ve výsevu *Wpsurround*, G – kolonie *Fmi* ve výsevu *Wpsurround*, H – kolonie *Fmi* bez pozadí
 výsevu *Wpsurround*, I – kibuc *Fmi* bez pozadí výsevu *Wpsurround*,
 J – *Wpsurround* obklopující kolonie *Fmi* vypouští po pěti až šesti týdnech růstu do okolí průhledný lem,
 K – samotná *monokolonie Wpsurround* vypouští po pěti až šesti týdnech růstu do okolí průhledný lem;
 Měřítka H, I, J = 10 mm, K = 5mm.

3.2.2.8 Krystalogeneze v koloniích

„Once we learn to know what to look for, important insights should be forthcoming from this approach“

Jack Dunitz, 1991



Obr. 45 **Krystal v kolonii fenotypu Rmi.** Na pozadí jsou vidět těla bakterií Sm. Autorem EM snímku je RNDr. O. Benada, MBÚ AV

Krystalizace je důležitým přírodním procesem, člověku známým například z odpařování moří či mrznutí vody. V biomedicíně a chemii je hojně využívána k separačním a čistícím účelům. Krystalizace je vždy spojena buď s přechlazením a nebo s přesycením roztoku, což vyvolá změnu orientace molekul z náhodné do uspořádané. Uspořádaná soustava molekul se pak nazývá *supramolekulou* či *krystalem* (Dunitz, 1991).

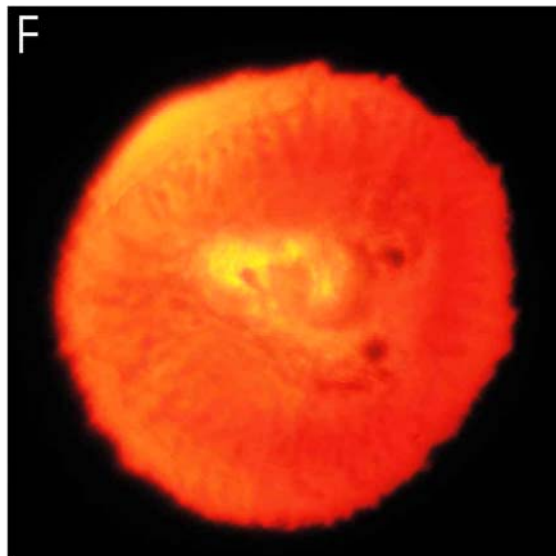
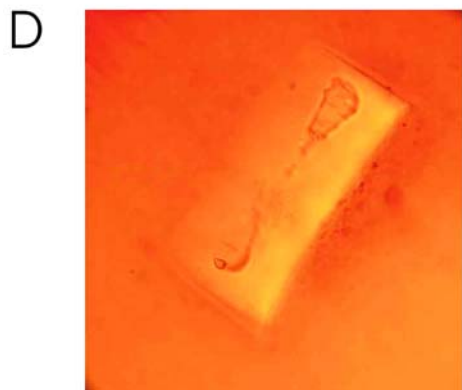
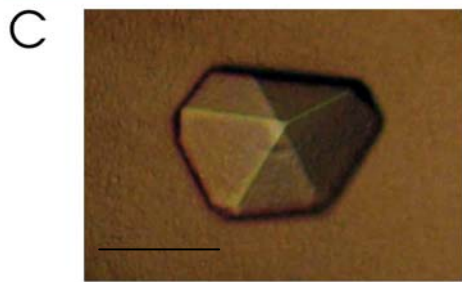
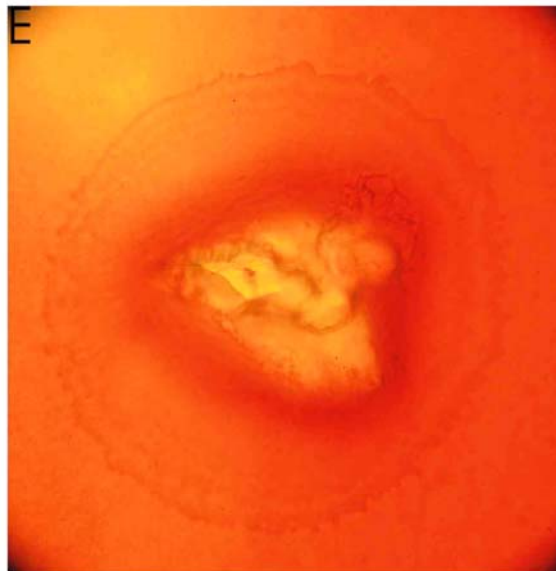
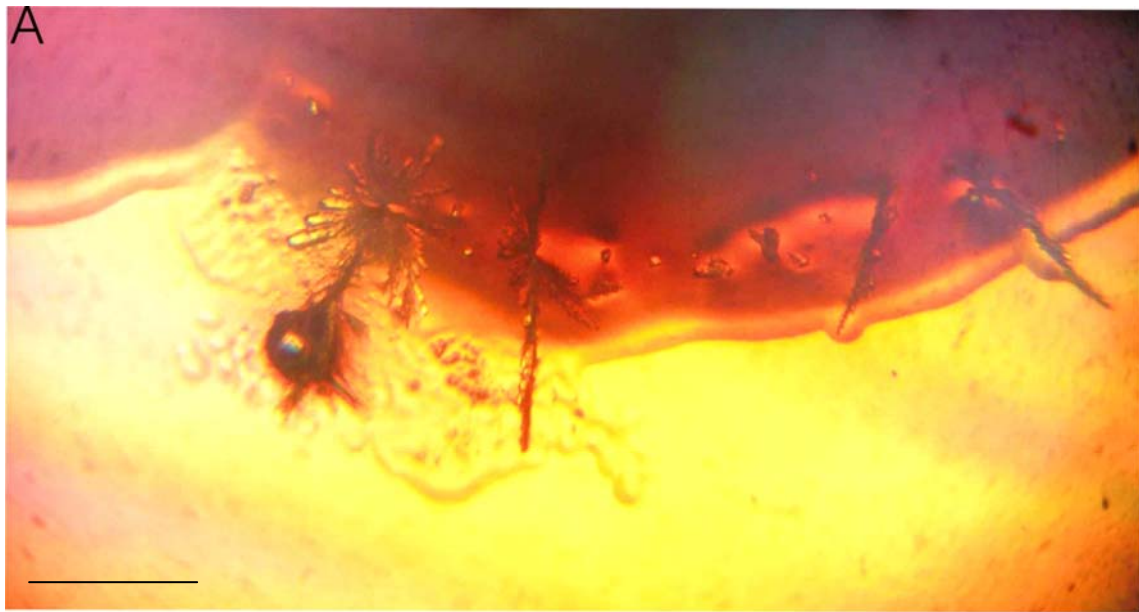
Stejně jako v jakémkoli jiném prostředí je i v koloniích *Serratia* prvním impulzem pro krystalizaci změna. V koloniích, svou vysokou vlhkostí podobných husté suspenzi, mohou být spojeny se změnou vedoucí k nukleaci (vzniku krystalizačních zárodků) faktory a fyzikální fenomény jako například teplota, tlak, rychlost ochlazování či odpařování, stupeň přesycení suspenze, koncentrační a teplotní gradienty či přítomnost nečistot (teoreticky i ultrazvukové, mikrovlnné, akustické a jiné rázy). Za vhodných podmínek vznikne krystalizační zárodek (či nukleační jádro), který je základem pro

vznikající krystal. Krystal může či nemusí podle podmínek v roztoku dosáhnout velikosti nuklea. Pokud jí dosáhne, již se nerozpadá a je schopen růst i za podmínek pro vznik krystalu méně vhodných.

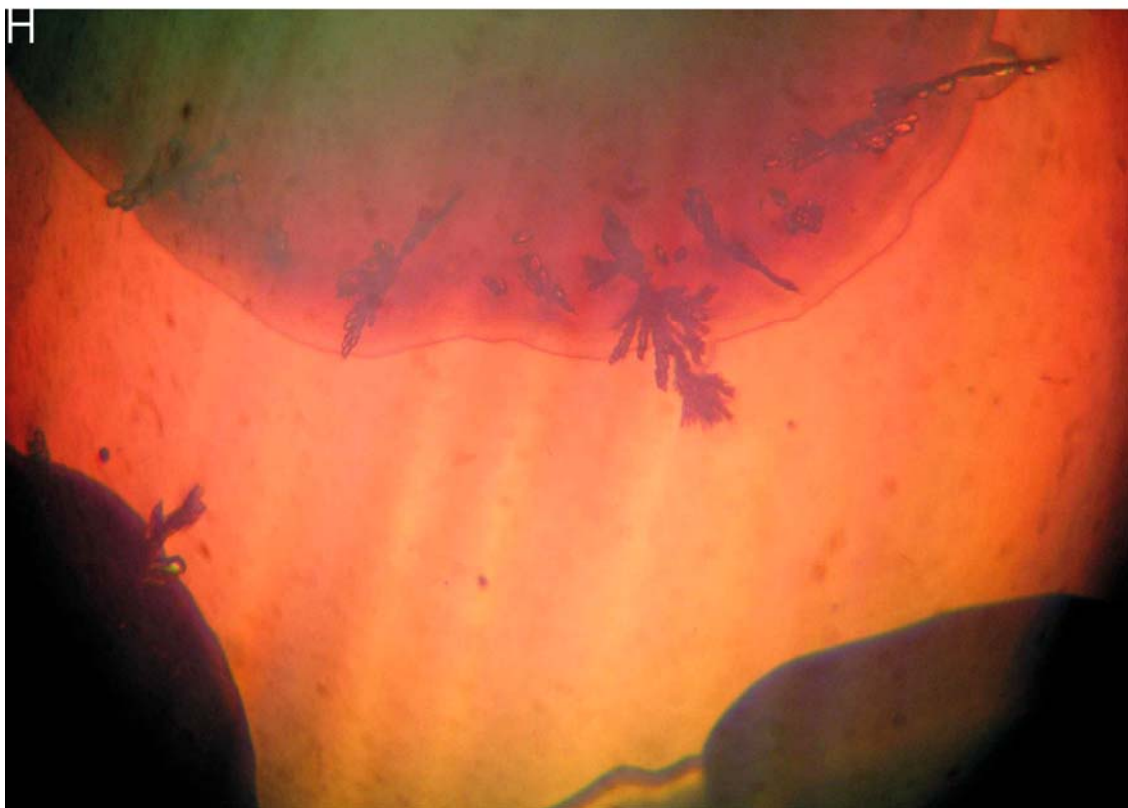
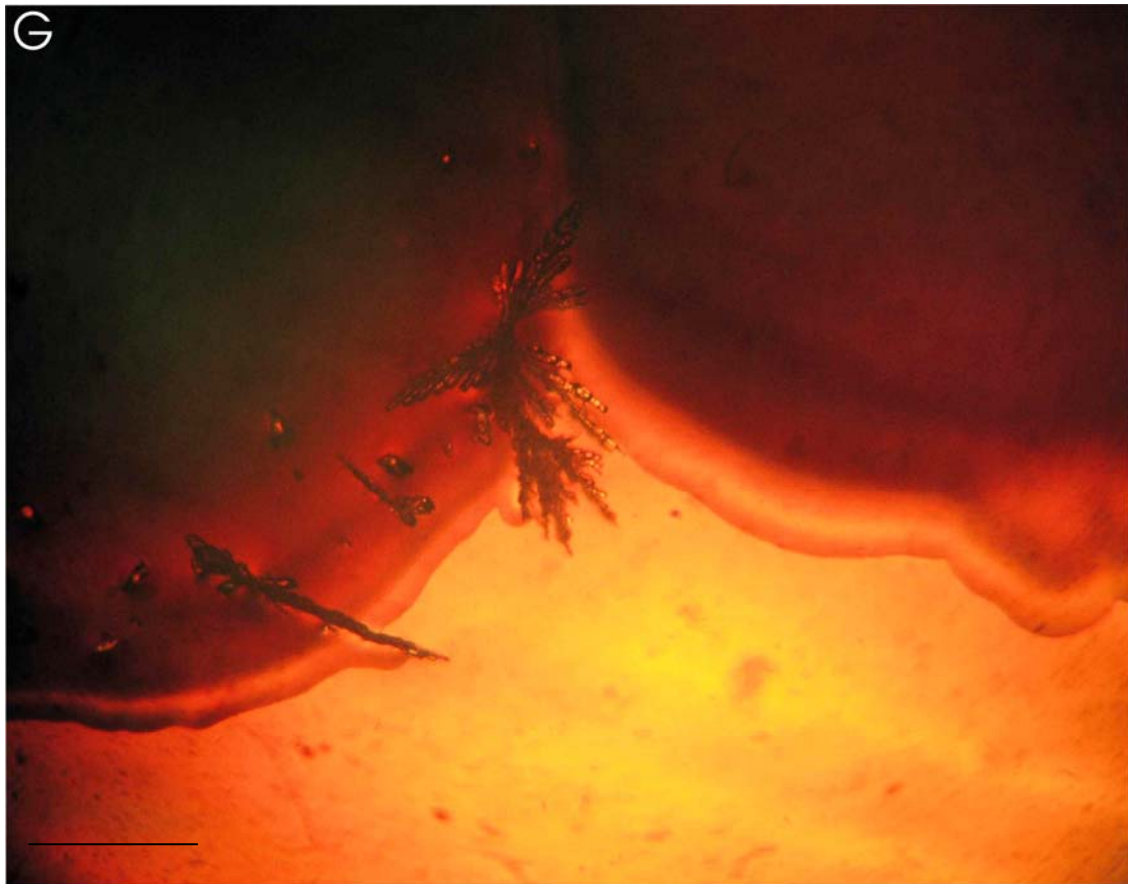
Většina klonů *Serratii* vytváří krystalizační jádra, ze kterých vyrůstají makroskopicky viditelné krystaly nejdříve po třech týdnech růstu na agaru, přičemž u některých klonů (*Fmi*) i později než po pěti týdnech růstu na agaru. Tyto krystaly dosahují velikosti 1–5 mm. Mikroskopováním kolonií při zvětšení 60x a 100x jsme našli v koloniích u všech studovaných klonů velké množství krystalů uvnitř i na povrchu biomasy. Tyto krystaly dosahovaly velikosti 5-100 μm a byly viditelné už po třech dnech růstu na agaru. Při srovnání jejich velkého množství s relativně malým počtem později vyrostlých makroskopicky viditelných krystalů je jasné, že tyto mikrokrystaly nejsou nuklei makrokrystalů a k jejich vzniku dochází buď krystalizací jiné látky než je tomu v případě makrokrystalů, nebo z nich dosáhne velikosti nuklea makrokrystalů pouze malý počet. Během růstu kolonie se však mikrokrystaly nerozpouštějí a je možné je ve velkém množství najít i na několik měsíců starých koloniích. Mikrokrystaly se na rozdíl od makrokrystalů nevětví a nemají stroměčkovitou strukturu. U mnoha mikrokrystalů vzniklých v kolonii je periodicitu složení a pravidelnost tvaru přítomna pravděpodobně v celém objemu krystalu (tab. 9 obr. C a D). Krystalizační jádra pro vznik makrokrystalů se nacházejí po obvodu kolonie v oblasti vzdálené 0,8 – 1,2 mm od okraje (tab. 9 obr. A, G, H). Z těchto center vyrůstají krystaly v drtivé většině případů ve směru ven z kolonie, zřídka i a i tehdy pouze svým kratším koncem směrem ke středu kolonie.

Při 60x - 100x zvětšení jsme v oblasti 50 – 100 μm v okolí některých mikrokrystalů i makrokrystalů sledovali tmavší lemy, ohraničující v oblasti směrem ke krystalu biomasu odlišné struktury, než jsme pozorovali v jiných částech kolonie. Pokud jsme mikroskopovali tuto biomasu lemující krystal v kolonii se 100x zvětšením a reflektovaným světlem přes polarizační filtr, byla jasně viditelná, na rozdíl od biomasy mimo oblast krystalu, která při tomto nastavení mikroskopovací techniky viditelná není (tab. 9 obr. E a F).

Některé klony *Serratii* mají větší tendenci tvořit krystaly v biomase svých kolonií než jiné klony. Právě výše zmíněný klon *Wpsurround* obsahuje v biomase kolonií starých více než osm týdnů až 10x více krystalů o velikosti 0,3-0,6 mm než stejně staré kolonie jiných klonů.



Tab. 9 (popis v kapitole „Krystalogeneze...“), měřítko A, B = 1 mm; C – F = 50 μ m



Tab. 9 (popis v kapitole „Krystalogeneze v koloniích“), měřítko G, H = 1mm

4. Diskuze

4.1 Vznik makroskopických kolonií

Poskytneme-li bakterii vhodnou, energeticky bohatou živnou půdu, a vysadíme ji tak do prostředí, ve kterém nebude nucena syntetizovat základní složky svého těla a nebude vystavena nárokům nedostatku životního prostoru a konkurence, využije své schopnosti exponenciálně se dělit a během několika dnů se rozmnoží na miliardy geneticky identických jedinců, tvořících dohromady přes svůj počet složitě diferencovanou a orientovanou strukturu bakteriální biomasy. Růst takové kolonie trvá řádově stovky generací. Z lidského měřítka je tedy bakteriální kolonie srovnatelná s celou lidskou kulturou. Existuje tedy způsob, jak umožnit i nejjednodušším jednobuněčným tvorům projevit schopnost žít jako barevně i tvarově složitá mnohobuněčná těla a to dokonce s výrazně esteticky působivým dojmem. Z jedné buňky tak dostaneme bakteriální kulturu v podobě až několikacentimetrového mnohobuněčného bakteriálního organismu – těla monokolonie.



Bakteriální kolonie *Serratia marcescens*; klon rWr (F), průměr 12mm; tato monokolonie je

mnohobuněčným útvarům, který založila pouze jedna mateřská buňka.

Vzniklé *tělo* monokolonie sestává z několika miliard bakteriálních buněk, potomků jedné buňky, funkčně se zřejmě diferencují podobně jako buňky mnohobuněčných organismů (Shapiro, 1997, 1998). Rozdíl mezi mnohobuněčnými organismy a bakteriálními koloniemi spočívá v tom, že konkrétní bakterie se podle své pozice v kolonii orientuje na konkrétní funkci, kterou je však schopna vykonávat bez potřeby nevratného zásahu do genotypického a fenotypického charakteru své bakteriální buňky¹⁸. Jde nejspíše o pouze dočasnou úpravu genové exprese za účelem tvorby požadované látky, využitě například v extracelulárním prostředí v kolonii jako stavební materiál obalu kolonie (viz. Experimentální část, elektronmikroskopické snímky kolonie *Serratia marcescens* ukazují obal na povrchu kolonie – str. 85, 89), jako látka urychlující pohyb buněk na okraji kolonie (swarming na okraji kolonie ale ne v nejkrajnějším prstenci, viz. příloha) či jako komunikační molekula.

Z našeho sledování morfotypu *Serratia marcescens* víme, že tento druh je co do svých morfologických vlastností extrémně bohatý a je schopen vytvářet rozmanité kolonie, které se svým fenotypem od nejčastěji popisovaných kolonií tohoto druhu (jednoduché hladké bílé, růžové) podstatně liší (v menší míře viz. Horká, 1975). Tato vlastnost, spolu se sklony k diferenciaci¹⁹ je ideální pro ilustraci chování bakterií v rámci kolonie a pro demonstraci organizace stavby koloniálních těl. Například nápadná symetrie bakteriální kolonie vede často k domněnce, že kolonie je jednoduše výsledkem spontánního růstu bakterií všemi směry. Námi sledované fenotypy a izolované klony s tendencí tvořit kolonie nepravidelné však ukazují, že pravidelnost je výkon a tudíž vyžaduje zřejmě komunikaci jako modulátor schopnosti dohody jedinců napříč celou rostoucí kolonií. *Serratia* dovede existovat v klonech majících kolonie různě barevné, žíhané, nepravidelné, ploché, konvexní a někdy i rostoucí neomezeně do volného prostoru, naprosto netvořící jakékoli kontury vymežující obvod kolonie, čímž vzniká namísto barevného knoflíku bezbarvý a neforemný koberec. U všech typů kolonií přitom můžeme provádět výsevy jejich jednotlivých buněk, zakládajících většinou kolonie fenotypu mateřského, někdy kolonie fenotypu nového, někdy původního, někdy opakujícího

¹⁸ Oproti podstatnému rozdílu mezi leukocytem, osteoblastem, neuronem...

¹⁹ Rozrůznění fenotypu kolonií s vysokou procentuální variabilitou výsevu a tendencemi k předpověditelným fenotypovým řadám – diferenciacním spádům (viz kapitola „Fenotypová diferenciacce a variabilita“). Diferenciaci odlišujeme od mutace podle (Rieger, 2007; Čechová, 1976)

fenotyp ojevující se o několik generací výsevů kolonií dříve a navracející kolonie za které byly odebrány. Valná většina kolonií vytvoří kolonie stejné. U kolonií, při růstu kobercovitě a neomezeně rostoucích do prostoru platí, že jednotlivé bakterie při odebrání z kolonie tento kobercovitý fenotyp neudrží a v novém výsevu jsou vždy základem pro pravidelnou kolonii. Nejde tedy o klony, nýbrž o nahodile vzniklé fenotypy (fenotyp *Wunlimited* je klonem, netvoří ale kolonie s typicky kobercovitou morfologií, rostoucí extrémní rychlostí ihned po vysetí na živnou půdu). Z toho lze usoudit na selhání schopnosti kontroly růstu napříč kobercovitou kolonií, tedy na možnost udržování chybné mezibuněčné komunikace i bakteriemi jinak schopnými pravidelného růstu²⁰. Tendence většiny kolonií o udržení tvarové a barevné struktury se projevuje i při růstu v blízkosti kolonií jiných. Kolonie udržují dostatečný odstup, což patrně umožňuje komunikace buněk, vedoucí posléze k tomu, že jejich výsledný tvar vykazuje určitou pravidelnost i v hustém výsevu, kde volí například menší výslednou velikost²¹.

Vznik kolonií s ustáleným fenotypem náročného tvaru jako je klon F, na první pohled dělá dojem, že je podmíněn schopností komunikace mezi bakteriemi v různých částech kolonie, nedovolujících si navzájem růst v oblasti středního prstence a produkujících červené barvivo prodigiosin pouze v určitých částech kolonie. Na kolonii se přitom můžeme dívat z různých hledisek. Jako na objekt, jehož vznik je umožněn komunikací jednobuněčných tvorů, který je tedy zvláštním typem plaku či bakteriálního konsorcia potomstva jedné buňky, nebo jako na mnohobuněčné tělo, ve kterém neprobíhá složitá komunikace jednoduchých buněk jenom *proto, aby* mělo nějaký tvar. Vymíst'ování buněk z kibuců a jejich zakládání nepravidelných kibuců (viz. „Diferenciace kolonií“) umožňuje vidět v kolonii tělo, kterému se bakterie přizpůsobují a kterým jsou ovlivněny. Přitom se zdá, že každá jednotlivá buňka rostoucí na jakémkoli místě v kolonii je při přesazení do volného prostoru schopna založit novou kolonii stejného fenotypu. Z jakéhokoliv místa v kolonii jsme schopni izolovat cfu, z čehož se dá usuzovat, že jednotlivé buňky jsou živé a svou povahu v koloniích neztrácejí, pouze přizpůsobují. Více buněk, odebraných z jakéhokoliv místa kolonie je při hromadném přesazení na novou živnou půdu často také schopno zachovat specifickou morfologii původní

²⁰ V našich pokusech rostou ve výsevu obsahujícím kobercovité kolonie i kolonie pravidelné, což vylučuje možnost, že kobercovitá kolonie je výsledkem vnějších vlivů typu způsobu přípravy živné půdy.

²¹ viz experimentální část, kapitola morfogeneze bakteriálních kolonií

kolonie²². Podobnost fenotypu *F monokolonie* s fenotypem vzniklým z více mateřských buněk, ukazuje na velmi složitý komunikační aparát, informující buňky o procesu morfogeneze bakteriální. Tím pádem je možno definovat kolonii morfogeneticky, což je myslitelné jako doklad, že v případě kolonií jde o tělo.



Kolonie *Serratii*; uprostřed obrázku je vidět typ WR, udržující si odstup od typu W s vlastností kobercovitého růstu, tedy růstu po celé Petriho misce.

Každá jednotlivá bakterie v kolonii vystupuje jednak jako svébytný jedinec s vlastním zájmem v kolonii, jednak jako uvědomělý spolutvůrce výsledného makroskopického jevu jednotné organizované ornamentální struktury. Přestože jsou jednotlivé bakterie geneticky identické, interpretují své postavení v rámci kolonie a svou situaci při zakládání nové monokolonie svébytným a navzájem odlišným způsobem. Tím dávají vzniknout výsledné morfologické bohatosti.

Ve velmi specifickém prostředí, ve kterém s bakteriemi pracujeme, dochází k nejrůznějším způsobům, kterými povstávají živé tvary. Ač jde o biologicky identický organismus, disponují tvary, kterých v tomto prostředí nabývá, stále novými a původními

²² V nauce Hanse Driesche (1914) jsou to *komplexní ekvipotenciální systémy s prospektivní potencií*.

výrazovými prvky. Tím lze hodnotit toto vyjadřování a sledování jeho svébytnosti.

Součástí vjemu bakteriálních kolonií je jejich podoba (Neubauer, 2002). Ta je vyjádřena tvarem, na jehož tvorbě bakterie pracují a který vyjadřuje také základ identity bakteriální kolonie. Identita se projevuje v diskrétním chování a stojí u základu tvorby individuality, na kterou usuzujeme z mnoha pozorování společenského chování kolonií (viz Experimentální část, „Fenotypová diference a variabilita“).

Díváme-li se na bakteriální kolonie Serratii jako na mnohobuněčné organismy, jejichž barvy a tvary nejsou projevem nahodilého spojení metabolitů individuálních mikroorganismů, nýbrž projevem jednoty a celistvosti organismu tvořeného mnoha bakteriálními buňkami, můžeme ve zjevu kolonie vysledovat způsob sebevyjádření tohoto organismu. Tento způsob pak může u různých klonů jednoho druhu získávat drobné či podstatnější obměny, které dohromady tvoří variabilitu vzhledu druhu *Serratia marcescens*.

4.2 Estetické a teleologické otázky

„*Pulchrum est quod visum placet*“ T.Akvinský²³

Existují estetické předpoklady k rozpoznání estetické stránky jako bytostní dimenze Života. Estetické projevy, mohou přinášet estetický soud vnímajícímu. Přesto jsou jako hodnoty podob, jednání a chování zjevujícího hledícímu smysl stále přehlíženy. Zjev kolonií a jejich tvar bývá stále považován za projev mechanických metabolicko-genetických dějů bez hlubšího smyslu. Pokud však přijmeme Portmannovo hledisko neadresných jevů a sebevyjádření organismu ve svém prostředí, získáme v koloniích *Serratia* naprosto čistý estetický projev.

Portmannovská interpretace povrchu kolonií

“*The eye you see is not an eye because you see it; it is an eye because it sees you.*“ A.Machado²⁴

Zbarvení kolonií není přímo související se zbarvením média, i když složení média (zejména jeho bohatost - obr.32) s barevným rozvrhem pigmentujících kolonií souvisí. Zřejmě však souvisí spíše se schopností tvorby a distribuce tvorby barevných částic, zatímco zelené zbarvení kolonií pěstovaných na obarveném médiu je výsledkem pasivního pronikání mikroskopických barevných částic do těla kolonie.

Barvivo prodigiosin, popisované jako látka tvořící v bakteriálních koloniích *Serratia marcescens* červené odstíny, stojí pouze za malou částí morfogeneze podob kolonií *Serratii*. Přesto zůstává zbarvení kolonií tím prvním vjemem, který nás vede k soustředění na bakteriální kolonie jako na jedinečný projev života.

Na koloniích *S. marcescens* sledujeme tendenci se do určité fáze růstu nijak výrazně esteticky neprojevat. Zprvu je kolonie nebarevná a soustředí svou energii na obsazení životního prostoru. Ve fázi růstu, ve které je již kolonie jasně viditelná, případně strukturovaná, dochází náhle k výraznějšímu tvarovému a barevnému projevu. (viz.

²³ „Krásné je to, co potěší oko“, Akvinský, T., Summa theologiae, I,5,4

²⁴ „Oko není okem protože jej vidíš, je okem protože ono vidí Tebe.“, Times Alone: Selected Poems of Antonio Machado, Wesleyan University Press, 1983

„Experimentální část“, časoběrové snímky obr. 21, 41). Ve stacionární růstové fázi, kdy již celá kolonie dosáhne velikosti zajišťující prostor pro nesení barevného a tvarového výrazu, dojde k uskutečnění tohoto projevu, který jak jsme zmínili nemá jasné evolučně selekční vysvětlení. Na těle bakteriální kolonie můžeme náhle sledovat ornamentální struktury, které nemají smysluplné fyziologické vysvětlení, zato odpovídají zákonům vidění – barevné, lesklé tvary, jsou formovány zejména na povrchu kolonie, nikoliv uvnitř (viz Experimentální část, obr. 33), pigmentace kolonií probíhá nejintenzivněji ve svrchní části biomasy a celkový profil kolonie dodržuje určitou pravidelnost. Navíc je toto utváření časově vymezené specifickou životní fází.

Při mikroskopii plášťů dvou srůstajících kolonií různých fenotypů jsme sledovali zřetelnou tendenci udržet identitu povrchů kolonií. Lesk povrchu dokládá, že u různých fenotypů šlo o eideticky odlišné struktury. Pod mikroskopem je možné pozorovat vzájemný respekt na povrchu kolonií, který je prostorem pro možné estetické tvoření, oproti těm částem kolonií, které tuto potencialitu nenesou. Ostrá hranice mezi pláští – štíty kolonií oproti prorostlým oblastem biomasy pod povrchem kolonií ukazovala, že na povrchu kolonií dochází k mnohem většímu vzájemnému koloniálnímu vymezení a buněčné komunikaci než v těch částech, které nejsou na pohled viditelné. Jasně se zde formuloval portmannovský fenomén distinkce vnitřku a vnějšku. Buněčná komunikace vytvořila čistě oddělené povrchy, udržující obě sledované kolonie na pohled oddělené, zatímco pod těmito jevy probíhala intenzivní spolupráce. Můžeme zde konstatovat existenci štítu s ostrou kresbou. Vzhled kolonie tak lze považovat za „projev, klamoucí pozorovatele“.

Variabilita vnějšího povrchu, tedy výrazových prostředků a vlastních jevů bakteriálních kolonií, je ilustrací Portmannovy představy odlišnosti pravidel konstruujících vnitřek organismu od pravidel stojících u základu konstrukce jeho vnějšku. Zdá se, že vnitřek biomasy kolonií *Serratie* je stále stejný, málokdy s lehce odlišným odstínem téže načervenalé nebo světlé barvy, zatímco vnějšek kolonií je u každé kolonie – každého *jedince* – jedinečný. Obdobné pozorování popisuje Portmann při výkladu vlastních jevů na *vyšších vývojových stupních* takto: „Zkoumáme-li játra deseti antilop nebo kachen a srovnáme-li takovou monotónní řadu s výraznými rozdíly v celkovém vzhledu těchto zvířat, pak vidíme ostrý protiklad vnějšího a vnitřního. Stavba vnějšku se na vyšších vývojových stupních řídí jinými pravidly než stavba nitra.“ (Portmann, 1960).

V knize *Biomoc* (Neubauer, 2002), uvádí Zdeněk Neubauer námitku proti *námitce antropomorfismu* v Portmannově učení. Ukazuje, že kromě myšlenky, že se živé bytosti obracejí ve svém životním prostředí svým zjevem i k lidem, obsahuje Portmannovo učení i myšlenku, že se člověk obrací svými smyslovými orgány k estetickým jevům ve svém okolí. Neubauer se táže, zda nemůže být nejdůležitější funkcí lidského zraku být vnímavý k sebevyjádření živých bytostí a zda interpretace společenského světa jevů není základní kulturní dimenzí člověka.

Změna morfologie kolonií

Kolonie *Serratia* jsou ve své výrazovosti stejně jako jiné bakterie limitovány prostředím, ve kterém se nacházejí a nacházejí-li se v prostředí příznivém, je jejich variabilita a výrazová bohatost extrémně široká. Kolonie, vytvořené bakteriemi mimo prostředí laboratoře, nemohou na pohled dosáhnout takové velikosti a dokonalosti, jsou-li vůbec lidským okem zaznamenatelné. Vhodnost prostředí přitom není k *velikosti* či *rychlosti* nárůstu kolonie v jednoduchém přímoúměrném vztahu. Například bohatství živin nepůsobí tak, že by umožnily bakteriím – buňkám tvořícím kolonii – vytvořit objekt větší, či že by urychlily zmnožení bakteriální biomasy a umožnily vytvořit kolonii rychleji, nýbrž spíše naopak. Kolonie může být i menší, ovšem prostředí dovoluje bakteriím vytvořit její tvar sofistikovanější, složitější, s jemnějšími variacemi na výrazová témata koloniálního fenotypu či výraznějšími fenotypovými vlastnostmi (jako například zelený *odlesk* u klonu *Rkov*, *svítivost* klonu *Orshine* či za všechny typický složitě diferencovaný prstencový tvar kolonie klonu *F*, pokud roste na médiu obohaceném o glukózu).

Na základě srovnání diferenciačních dějů probíhajících u buněk pěstovaných v suspenzích bohatého média a minimálního média lze říci, že suspenze bohatého média byly diferenciačně bohatší. Ze suspenzí minimálního média jsme sice získávali méně nových fenotypů a zejména zjevově méně variabilní fenotypy, to nám ovšem umožnilo tyto fenotypy většinou snadněji stabilizovat a vytvořit z nich klony s vysokým procentem dědivosti.

Také s tím související disociační děje jsme pozorovali častěji u fenotypů procházejících bohatým médiem. Disociace však probíhala vždy až při růstu kolonií na ŽA+G. Nelze

zcela jednoznačně vyloučit možnost, že u klonů získaných ze suspenzí minimálního média by docházelo na chudším pevném médiu také k disociaci.

Stáří kolonií s největší disociací bylo vyšší než měsíc. Nejpřekvapivější disociace, která spustila repetitivní diferenciací spád R donor W → W donor R → R donor W ... byla pozorována u klonu W, pěstovaného na ŽA+G po dobu 140 dní. Z mladších výsevů téže biomasy (stáří 30, 80 a 100 dní) jsme žádné jiné než W fenotypy nezískali.

Změna fenotypu bývá u některých klonů reprodukovatelná a to v přibližně stejném procentuálním obsazení výsevu, týkajícím se až mnoha desítek procent výsevu (klon *Rmi* či *Rkov*). Frekvence, s jakou se změna ve fenotypovém projevu objevuje, spolu s její reprodukovatelností a repetitivností, nás vede k přesvědčení, že je třeba rozumět tomuto fenoménu variability odlišně od běžné genové mutace. Proto používáme pojem „fenotypová diferenciace“²⁵ bakteriálních kolonií.

Potvrzení naší domněnky, že s optimálními podmínkami roste u bakterií bohatost uměleckého vyjádření, nacházíme právě v jevu fenotypové diferenciace. Vedle faktů vedoucích k přesvědčení, že mikroorganismy jsou tvory principiálně schopnými spolupráce založené na určité buněčné speciaci, stojí v našem výzkumu ještě nepochopitelnější fakt diferenciace - jevové speciace na úrovni celých kolonií, která je zdrojem fenotypové variability námi sledovaného druhu *Serratia*.

Podarilo se nám izolovat klony *Serratie*, tvořící kolonie fenotypu diferencovaného a výrazně složitějšího než fenotypy běžné (hladká kulatá bílá růžová). Tyto jevy považujeme za projev fenotypové diferenciace založené na schopnosti individuace. Buňky odebrané ze dvou fenotypově shodných kolonií i dvě různé buňky z jedné kolonie, mohou dávat vznik koloniím zcela odlišného fenotypu a není přitom rozhodující, z jaké části kolonie byla odebrána zdrojová buňka. Bakterie přitom schopnost individuace nesporně nepotřebují za účelem přežití. Jde spíše o projev podstaty vzniku fenotypového vyjádření v ideálních podmínkách.

Fenotypový projev jako neadresný vlastní jev nemající zřejmou selekční výhodu se stává estetickým tématem a souhrn všech fenotypových podob *Serratie* tak odkrývá její specifickou estetiku. Vzniká však otázka, zda můžeme hledat motivy, aspekty a

²⁵ Tento pojem vychází z pojmu „diferenciace“ ve smyslu rozrůznění klonů, jak jej použil Zdeněk Neubauer v textu „Diferenciace a variabilita u mnohobuněčných bakteriálních systémů“, Bull. čs. spol. mikrobiol. 20(6), 2-7, 1979; Biomoc, Malvern, Praha 2002.

morfologické rysy, společné většině fenotypů a snažit se orientovat se v krajině různých podob a určovat, které fenotypy tam patří méně a které naopak přesně odpovídají eidetické povaze *Serratie*.

Vývoj různých fenotypů kolonií neusměřňujeme a nevynucujeme, nýbrž poskytujeme mu příležitost a bakteriím tak dáváme možnost projevit se. Můžeme sledovat jevy, jejichž obsahu se snažíme porozumět z mnoha hledisek, mimo jiné i jako nabídky estetického zážitku. Můžeme v nich vidět případy estetických projevů jako tvoření a zdobení, tedy ornamentalismus. Kolonie se poté stávají mediátorem či jakýmsi oknem, nabízejícím vhled a pochopení mnohem hlubšího a složitějšího prostoru, ukazujícího možnosti výkladu a smyslu zjevů a podob jako základních principů skutečnosti a bytí. Tento přístup nevyžaduje předpokládat ekologické funkce či adresnosti sledovaných jevů. U kolonií bakterií je navíc možné spekulovat o zdobení. Samy jsou totiž předmětem ornamentalismu i objektem ornametu. Není zde žádný další život, který by se zdobil. Ačkoli naše experimenty ukazují na možný výklad povrchu kolonie jako klíčové složky její podoby, kterou si i samy bakterie hájí, bylo by možné uvažovat o kolonii jako o čisté formě estetického vyjadřování. *Serratia* by pak při výkladu svých kolonií dovolila jít až za Portmannovi antropomorfní výklady povrchů živých tvorů a prohloubit povahu života za estetické vyjadřování na čisté estetické bytí.

Setkáváme se často se vznikem fenotypu, který již známe z historie geneze fenotypu (atavismus). Mezi mnoha podobami fenotypu, které nám fenotypová diference odhalila, nacházíme opakující se motivy²⁶ (RdonorW \rightarrow WdonorR \rightarrow RdonorW), fenotypy plodné na další varianty (Rmi, 18/5) i fenotypy, ze kterých již žádné nové varianty bez inokulace nezískáme (tedy pouze vyséváním: Fw, Or, Wr a W). Při dalším vysévání a sledování nově vzniklých fenotypů můžeme někdy konstatovat jisté směřování, například že v potomstvu určitého klonu se objevuje více nových typů kolonií, nebo že je tento mateřský fenotyp velmi stabilní a nové kolonie z jeho výsevu vzniknou jen zřídka. Občas narazíme na vznik fenotypu, který již známe z jiných mateřských kolonií. Wr je právě takový archetyp, který se občas objevuje jako potomek kolonií jiných a pro nás třeba i nových, které svou strukturou tento archetypální fenotyp vůbec nepřipomínaly. Rkov fenotyp je jakýsi kůň Převalského, před třiceti lety (Neubauer, osobní sdělení) šlo

²⁶ kapitola „Rozdělení získaných fenotypů“

o klasického, mateřského a fenotypově typického zástupce ve fenotypální tvorbě *Serratii*, dnes jsme jej museli získat prostřednictvím diferenciačních procesů.

Sledujeme-li podmínky, za kterých *Serratii* pěstujeme, můžeme nejen pozorovat některé přechody ve variabilitě fenotypu kolonií opakovaně, ale navozením správného prostředí či výsevem z kolonie určitého fenotypu specifického přechodu docílit. Pro spuštění takových diferenciačních dějů, ze kterých je možné získat stabilní fenotyp, se nám nejvíce osvědčilo pěstování v chudých médiích a poté vysetí na bohatou živnou půdu či pěstování až 140 dní na a poté husté výsevy biomasy na bohaté živné půdě. Zatím se nám tedy podařilo částečně ovládnout principy tektonických posunů, které mohou být zdrojem nových fenotypů.

Tyto zkušenosti nás vedou k úvahám o směru, jakým se diference vyvíjí, které fenotypy stojí na počátku diferenciačních dějů, které fenotypy z nich lze získat a také jestli je opravdu fenotypová diference dějem, vyvíjejícím se vždy nějakým směrem a zda by bylo možné sestavit mapu krajiny, teritoria, po kterém se diferenciační děje pohybují. Pokud by takový prostor diferenciačních dějů byl uzavřený (fenotypy by vždy skončily ve slepém rameni nebo se vrátily na počátek diferenciačních dějů a tím utvořily kruh) bylo by možné zmapovat potenciální fenotypové realizace a tím získat skrytou podobu fenotypu *Serratie marcescens* – její skrytou estetiku.

5. Souhrn

V našich experimentech ukazujeme, že je možné pozorovat mnohotvárnost, řízenou diferenciací, náročnou výstavbu a eidetickou tvůrčí variabilitu kolonií a je možné na tyto fenomény aplikovat Portmannovské hledisko, čímž se z nich stává projev sebeuskutečnění.

Námi studovaný model je vhodný pro sledování právě těchto fenoménů. Pochopení procesu samoorganizace a povstávání živého tvaru na úrovni bakteriálních kolonií může pomoci lépe pochopit některé aspekty tohoto procesu u jiných organismů i celých ekosystémů.

Účelná regulace buněčných projevů v koloniích je nepopiratelnou skutečností. Je-li bakterie stavěna proti zvířatům a rostlinám jako tvor, který nedokáže vzájemnou spolupráci dát vznik sofistikovanější struktuře, pak neprávem. V koloniích nevidíme jen útvar tvořený z těl, ale výtvar spolupráce a zkušeností generací, otevřený i z hlediska vzhledu a pohlednosti novým událostem. Právě při tvorbě vzhledu jsou přítom *Serratie* podivuhodně tvůrčí a vynalézavé.

Z mikroskopického pozorování povrchu srůstajících kolonií je zjevné, že ačkoliv buňky uvnitř kolonií se při srůstu promíchají a již při doteku dvou srůstajících kolonií nelze jejich buňky vzájemně od sebe odlišit, na povrchu kolonií se buňky nesmísí.

Při mikroskopování *povrchu* srostlých dospělých kolonií majících z makroskopického pohledu odlišný fenotyp je možné v těch částech srůstu kolonií, které jsou fenotypově jasně odlišné (cca 50 -100 μm od okraje) nalézt mezi koloniemi jednoznačnou hranici. Buňky povrchu obou kolonií mezi sebou vzájemně komunikují mnohem intenzivněji než buňky uvnitř biomasy a vytvoří jasnou hranici v opláštění obou kolonií. Tento poznatek bychom mohli interpretovat jako funkci povrchu kolonie zachovat identitu kolonie či alespoň udržet dojem o její identitě pro pohled svrchu.

Diferenční projevy jsou spojeny s přístupem bakterií k živinám v tekutém médiu ve formě homogenní suspenze, ovšem také s morfogenezí kolonií a tedy situací, ve které se bakterie v kolonii nachází. Tato situace nemusí být přímo ovlivněna přístupem k živinám, ale spíše metabolickými jevy spojenými s komunikačními signály uvnitř kolonie.

6. Použitá literatura

- Ajithkumar B et al.** (2003), Spore-forming *Serratia marcescens* subsp. *sakuensis* subsp. nov., isolated from a domestic wastewater treatment tank, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **53**: 253–258
- Akvinský T** (1225-1274), Summa Theologicá, 2004
- Albertit L, Harshey RM** (1990), Differentiation of *Serratia marcescens* into Swimmer and Swarmer Cells, *Journal of Bacteriology*, **274**: 4322-4328
- Ania BJ** (2007) *Serratia* – infectious diseases medical topics, eMedicine Specialties, www.emedicine.com
- Augustinus A**, O boží obci knih XXII, 2007
- Azakami H et al.** (2006), Plasmid-mediated genomic recombination at the pilin gene locus enhances the N-acetyl-Dgalactosamine-specific haemagglutination activity and the growth rate of *Eikenella corrodens*, *Microbiology*, **152**, 815–821
- Bassler BL** (2002), Small talk. Cell-to-cell communication in bacteria, *Cell*, **109**: 421-4
- Ben Jacob E** (2003), Bacterial self-organization: co-enhancement of complexification and adaptability in a dynamic environment, *Philos. Trans. R. Soc. London*, **361**, 1283-1312.
- Ben Jacob E et al.** (1992), Adaptive self-organization during growth of bacterial colonies, *Physica A*, **187**: 378 – 424
- Ben-Jacob E** (2003), Bacterial self-organization: co-enhancement of complexification and adaptability in a dynamic environment, *Philos. Trans. R. Soc. London A*, **361**: 1283-1312.
- Ben-Jacob E et al.** (2003), Communication-based regulated freedom of response in bacterial colonies, *Physica A*, **330**: 218 - 231
- Ben-Jacob E., Becker I., Shapira Y., Levine H.**, (2004) Bacterial linguistic communication and social intelligence, *Trends in Microbiology*, **12**,
- Birren, B, Lai, E** (1993) Pulsed Field Gel Electrophoresis A Practical Guide, *Academic Press, Inc.*
- Čechová J** (1976). Vzájemné ovlivňování barevnosti u *Serratia marcescens*. Diplomová práce Př.f. UK
- Denis, P et al.** (2003), Phylogenetic analysis of bacterial populations in an anaerobic microbial consortium capable of degrading saturation concentrations of tetrachloroethylene *Can. J. Microbiol.* **49**(1), 15–27
- Driesch H** (1914) The history and theory of vitalism, *Macmillan and Co.*, London
- Dunitz JD** (1991) Phase transitions in a molecular crystals from a chemical viewpoint, *Pure Appl. Chem.*, 1991, **63**, 177-185
- Fraser GM, Hughes C** (1999), Swarming motility. *Current Opinion in Microbiology*, **2**, 630-635
- Ghigo JM** (2001), Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development, *Nature*, **26**; 412(6845):442-5.
- Ghiretti F** (1994) Bartolomeo Bizio and the rediscovery of Tyrian purple, *Cellular and Molecular Life Sciences*, **50**, 9
- Giri AV et al.** (2004), A novel medium for the enhanced cell growth and production of prodigiosin from *Serratia marcescens* isolate from soil, *BMC Microbiology*, **4**:11
- Greenberg EP** (2003), Bacterial communication: Tiny teamwork, *Nature*, Vol. **424**, 134
- Grilione PL, Pangborn J** (1975), Scanning Electron Microscopy of Fruiting Body Formation by Myxobacteria, *Journal of Bacteriology*, **124**, 3, 1558-1565
- Grimont PA, Grimont F, De Rosnay HL** (1977), Taxonomy of the genus *Serratia*, *J General Microbiology*, **98**(1):39-66

- Haecel E**, Kunstformen der Natur, 1904
- Harshey RM** (2003), Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal, *Annu. Rev. Microbiol.* **57**, pp. 249–273
- Harrison AP et al.** (1956), Fallacy of crushing death in frozen bacterial suspensions. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **91**, 577-579
- Hubálek Z** (1996) Cryopreservation of microorganisms at ultra-low temperatures, Academia,
- Horká I** (1975) Variabilita v pigmentaci u *Serratia marcescens* jako model diferenciaci buněčných populací, diplomová práce PřFUK
- Henrichsen J** (1972), Bacterial Surface Translocation: a Survey and Classification, *Bacteriological Reviews*, **36**, **4**, 478-503
- International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, u údajů o taxonomii Serratii vycházíme z reakcí v IJSEM na nedostupná čísla 28, 30, 31 a 33, tedy na původní International Journal of Systematic Bacteriology
- Kunert JM, Kaiser D** (1982), Fruiting Body Morphogenesis in Submerged Cultures of *Myxococcus xanthus*, *Journal of Bacteriology*, **151**, **1**, 458-461
- Kohler T et al.** (2000) Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* Is Dependent on Cell-to-Cell Signaling and Requires Flagella and Pili, *Journal of Bacteriology*, 5990–5996
- Machado A** (1983) Times Alone: Selected Poems of Antonio Machado, Wesleyan University Press,
- Markoš A, Hajnal, L** (2007) Staré pověsti (po)Zemské, Mervart
- Melville H**, (1978) Benito Cereno, Vyšehrad
- Montaner B, Ricardo P** (2001), Prodigiosin-induced apoptosis in human colon cancer cells, *Life Sciences* **68** 2025–2036;
- Němec A et al.** (1999), Genotypic and phenotypic similarity of multiresistant *Acinetobacter baumannii* isolates in the Czech republic, *J. Med. Microbiol.* vol **48**, 287-296
- Neubauer Z** (1979), Bull.čs.spol.mikrobiol. (viz. Biomoc 2002)
- Neubauer Z** (2002), Biomoc. Malvern
- Palková Z** (2004), Multicellular microorganisms: laboratory versus nature, *European molecular biology organization reports*, **5**,
- Palková Z, Janderová B, Gabriel J, Zikánová B, Pospíšek M, Forstová J** (1997), Ammonia mediates communication between yeast colonies, *Nature*, **390**(6659), 532-6
- Palková Z, Forstová J** (2000), Yeast colonies synchronise their growth and development, *Journal of Cell Science*, **113**, 1923-8
- Palková Z, Vachova L** (2003), Ammonia signaling in yeast colony formation, *Int Rev Cytol.*, **225**, 229-72
- Panagariya A, Sharma AK** (1999), A preliminary trial of Serrapeptase in patients with Carpal Tunnel Syndrome, *Journal of Assoc. Physicians India*; **47** (12),1170-2
- Plotinos**, Enneady Praha, Rezek, 1997, 1994
- Portmann A** (1960), Nové cesty biologie; <http://apeia.eu/seed/browse/S402880e40dcca6ea010dcca70da000a>; Jůza a Jůzová, Praha
- Rice S et al.** (2005), Biofilm Formation and Sloughing in *Serratia marcescens* Are Controlled by Quorum Sensing and Nutrient Cues, *Journal of Bacteriology*, Vol. 187, No. 10, 3477–3485
- Rieger T** (2007) Morfogenezе mnohobuněčných těl u bakterie *Serratia marcescens*, diplomová práce na PřFUK
- Rieger T et al.** (2008) Bacterial body plans: colony ontogeny in *Serratia marcescens*, podáno k publikaci
- Ross MR, Cho M** (2005) Serratiopeptidase, The Miracle Enzyme, www.purebodiesolutions.com
- Shapiro JA** (1985), Mechanisms of DNA reorganization in bacteria, *Int Rev Cytol.*, **93**, 25-56
- Shapiro JA** (1987), Organization of Developing *Escherichia coli* Colonies Viewed by Scanning Electron Microscopy, *Journal of Bacteriology*, **169**, **1**, 142-156

Shapiro JA , Hsut C (1989), Escherichia coli K-12 Cell-Cell Interactions Seen by Time-Lapse Video, *Journal of Bacteriology*, 171, **11**, 5963-5974

Shapiro JA (1997), Multicellularity: The Rule, Not the Exception, Lessons from Escherichia coli Colonies, in: Shapiro, Dworkin (ed.) *Bacteria as Multicellular Organisms*, OUP 1997

Shapiro JA (1998), Thinking about bacterial populations as multicellular organisms, *Annu Rev Microbiol.*, **52**, 81-104

Šamberger F, O hmotě oživené, vlast. nákl., Praha, 1936

Šíma P, Třebichavský I (2008) Horizontální přenos genomu, *Živa*, **2**,

Thar R, Kuhl M (2005) Complex pattern formation of marine gradient bacteria explained by a simple computer model *FEMS Microbiology Letters*, **246**, 75–79

Thomson NR et al. (2000), Biosynthesis of carbapenem antibiotics and prodigiosin pigment in *Serratia* is under quorum sensing control, *Molecular Microbiology*, **36**(3), 539-556

Uexkull J, Umwelt und Innenwelt der Tiere- 1921 - Julius Springer, Berlin

Von Graevenitz A, Rubin SJ (1980), The genus *Serratia*, CRC press, Florida

Wei, (2006) N-Acylhomoserine lactose-dependent cell-to-cell communication and social behavior in the genus *Serratia*, *International Journal of Medical Microbiology*, **296**, 117-124

Woese CR, Kandler O, Wheelis ML (1990). "Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya." *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 87,4576-4579

7. Seznam zkratek

AHL ... N-acylated homoserine lactone
CFU...*colony forming unit*, buňka schopná vytvořit kolonii
FP ... fosfátový pufr
JOD...Jednotka optické denzity, hodnota cfu pro OD 0,2
MM...minimální médium
OD optická denzita
P.m. ... Petriho miska
SEM ... skenovací elektronová mikroskopie
S.m. ... *Serratia marcescens*
ZM ... zamrazovací médium
ŽA ... živný agar
ŽA + G ... živný agar + glukóza
ŽB, ŽB + G... živný bujón + glukóza

DVD příloha:

Dokumenty pdf:

Diferenciace bakteriálních kolonií.pdf

tabule č 5 str 105.pdf

Snímky:

fenotyp W brzdí mrtvá biomasa Wpsurround 15 min interval

růst kibucu Rmi 20 min interval

Video:

20x zvětšení timelapse 3 min interval – vznik pruhů.avi

20x zvětšení timelapse 5 min interval – klín kibucu.avi

40x zvětšení timelapse 4 min interval – růst kibucu.avi

40x zvětšení video – kolonie s krystaly s strukturálně odlišeným lemem na okraji.avi

40x zvětšení video – swarming na okraji kolonie, viditelný pevný plášť 30 μ m od okraje.MOV (vyžaduje QuickTime)