

*Karlova Univerzita
Fakulta přírodních věd
Katedra filosofie a dějin přírodních věd*

Teoretická a evoluční biologie



RNDr. Jaroslav Čepl

Morfogeneze bakteriálních kolonií

Disertační práce

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Anton Markoš, CSc.

Praha 2013

Prohlašuji, že tato práce byla vypracována samostatně a všechny zdroje, které byly použity při psaní této práce byly řádně citovány. Tato práce nebyla dříve předložena za účelem získání stejného nebo jiného akademického titulu v rámci této, nebo jiné instituce. Autorovo zapojení do výzkumu prezentovaném v této práci ukazuje pořadí na uvedených publikacích.

Jaroslav Čepl

Říjen 2013

Poděkování

Rád bych poděkoval doc. RNDr. Anton Markošovi, CSc. za jeho vynikající a inspirativní vedení, RNDr. Anně Blahůškové za vytrvalou pomoc a podporu a Prof. RNDr. PhDr. Zdeňkovi Neubauerovi, CSc. za nesmírně inspirativní konzultace. Děkuji také všem kolegům a kolegyním z Katedry filosofie a dějin přírodních věd za vytváření podnětného a otevřeného prostředí. Děkuji rodičům, Mirce a Kátě za podporu a pomoc.

Abstrakt

Tato disertace svým tématem navazuje na předchozí práce naší skupiny, zejména Rieger et al. 2008 a Čepel et al. 2010. Popisovali a zkoumali jsme pravidelnosti morfogeneze kolonií *S. marcescens* morfotypu F (od „fontána“, kterou nám kolonie svým tvarem připomínaly). Kolonii tvoří červený vystouplý střed, nízké nepigmentované mezikruží a znovu vystouplý červený lem, jehož vytvořením kolonie ukončuje svůj růst. Jasně strukturovaný profil kolonie tohoto morfotypu, společně se změnami pigmentace struktur v průběhu vývoje, bez nutnosti umělé vizualizace, poskytuje pro pozorování morfogeneze značnou výhodu.

Naším cílem se postupně stalo (i) najít další faktory, které ovlivňují tuto morfogenezi a pokusit se blíže popsat; (ii) druhým cílem byla charakterizace interakcí kolonií *S. marcescens* s jinými bakteriálními kmeny (*S. rubidaea* a *E. coli*) a konečně (iii) studovat fenomén indukované resistance k antibiotikům popsáný v (Heal and Parsons 2002; Lu 2004; Bernier et al. 2011) u našich modelových organismů.

(i) Vzájemné vztahy kolonií na misce ukazují, že morfogeneze kolonie je ovlivněna autokinnými signály, které difundují do media a do atmosféry a ovlivňují vývoj i okolních kolonií. Během vývoje kolonie jsme také pozorovali změny pH media v jejím okolí - nejprve acidifikaci okolí (pH 7,2 -> pH 6) do vzdálenosti několika milimetrů od okrajů kolonie, později naopak alkalizaci prostředí na pH 8,6 a to v rozsahu celé Petriho misky. Střídání těchto tří fází (neutrální, acidické a alkalické) časově koreluje se změnami růstu struktur kolonie (střed, mezikruží, lem). Acidifikace media je způsobena pravděpodobně produkty metabolismu glukosy. Faktor, který ovlivňuje přechod od struktury mezikruží do struktury lemu a zároveň přechod z acidické do alkalické fáze jsme identifikovali jako amoniak. Zastavení růstu je pravděpodobně způsobeno lokálním vyčerpáním živin z media.

(ii) Dále jsme pozorování kolonií *S. marcescens* rozšířili o „gnotobiologické“ interakce se *S. rubidaea* a *E. coli*. Jiné bakteriální klony přinášejí nové typy interakcí. Dochází k obrůstání kolonií *S. marcescens* koloniemi *S. rubidaea*, k repulzi růstu *E. coli* koloniemi *S. marcescens* nebo k pohlcení kolonie *S. rubidaea* kolonií *E. coli*. Tyto vztahy jsme popsali jako heterarchii typu kámen, nůžky, papír. Zkoumali jsme, jak budou tyto konkurenční vztahy vypadat při různých nastaveních: v sousedství na pevném mediu, při smíšeném růstu v suspenzním mediu nebo při formování chimérické kolonie. Při sledování populační dynamiky ve smíšeném růstu dvou klonů jsme rozpracovali pokus o vytvoření metody pro neinvazivní detekci poměrů jednotlivých klonů ve smíšeném růstu podle plyných fingerprintů.

(iii) Amoniak byl popsán jako faktor vyvolávající fyziologické změny bakterií vedoucí k indukci resistance k antibiotikům ampicilinu a tetracyklinu. Testovali jsme tuto skutečnost na našich modelových bakteriích. Ukázalo se, že amoniak produkovaný nárůstem bakterií *S. rubidaea* i *S. marcescens*, nebo uvolněný z roztoku čpavku zvyšuje počet vyrostlých kolonií na antibiotiku v sousedním segmentu dělené Petriho misky. Zjistili jsme ale, že takovou resistenci vyvolá zvýšení pH obecně a to rozkladem testovaných antibiotik; nabízíme tak alternativní vysvětlení tohoto v literatuře popsáného fenoménu.

Abstract

The topic of this thesis has been built on previous work of our group, especially Rieger et al. 2008 and Čepl et al. 2010. We examined and described the regularity of morphogenesis of *S. marcescens*, morphotype F colonies (from "the fountain", because of a shape it resembles). Typical colony consists of elevated red navel, low non-pigmented ring and again elevated red rim. Structured profile of the colony together with changes in pigmentation of structures during development without need of artificial dyeing, provides considerable advantage in observation of the morphogenesis.

Aims of this thesis were (i) to find other factors that affect the morphogenesis, (ii) to characterize interactions of *S. marcescens* colonies with other bacterial strains (*S. rubidaea* and *E. coli*) and finally (iii) to study the phenomenon of induced resistance to the antibiotics described in (Heal and Parsons, 2002; Lu 2004; Bernier et al. 2011) in our model organisms.

(i) Mutual interactions of colonies on the plate indicates that morphogenesis is affected by autocrine signals, which diffuse into the medium and the atmosphere and affect the development of surrounding colonies. We have detected changes of pH of the medium during the development of colonies in their vicinity. At first, we detected acidification of neighborhood (pH 7.2 → pH 6) to a distance of several millimeters from the edge of the colony. Later, we saw alkalization of environment (pH 8.6) of the entire dish. Time course of these three phases (neutral, acidic and alkaline) correlated with changes in the morphogenesis of colonies (navel, interstitial ring and rim). Acidification of the medium is probably caused by products of glucose metabolism. Factor that influences the interstitial ring – rim transition together with acidic – alkaline transition was identified as ammonia. Limited growth is probably caused by local depletion of nutrients from the medium.

(ii) We extended our observations of colony morphogenesis by "gnotobiological" interactions of *S. marcescens* with *S. rubidaea* and *E. coli*. Other bacterial clones bring new types of interactions: wrapping of *S. marcescens* colonies by colonies of *S. rubidaea*, the repulsion of growth of *E. coli* by factor produced by *S. marcescens* colonies or overgrowth of *S. rubidaea* colonies by *E. coli* colonies. We described these relationships as heterarchy like game rock, paper, scissors. We investigated how these competitive interactions would appear at different settings: neighborhood of colonies on the solid medium, mixed growth in suspensions or formation of chimeric colonies. To monitor population dynamics in mixed growth of two clones, we attempted to develop a method for non-invasive detection of ratios of individual clones in mixed growth by gaseous fingerprints.

(iii) Ammonia has been described as a factor inducing physiological changes leading to induction of resistance to antibiotic ampicillin and tetracycline in bacteria. We tested this phenomenon in our model bacteria. Ammonia produced by growth of bacteria *S. rubidaea* and *S. marcescens* or released from the ammonia solution increases the number of colonies grown on medium with antibiotics in a neighboring compartment of segmented Petri dish. We found, however, that such resistance is caused by an increase of pH in general followed by the degradation of antibiotic molecule.

Table of Contents

| | |
|--|----|
| Abstrakt..... | 4 |
| Abstract..... | 5 |
| 1. Úvod..... | 8 |
| 1.1. Bakterie unikají naší přímé zkušenosti..... | 8 |
| 1.2. Mnohobuněčnost bakterií | 9 |
| 1.3. Ontogeneze | 10 |
| 2. Morfogeneze kolonie <i>Serratia marcescens</i> – literární úvod | 12 |
| 2.1. Organismus | 12 |
| 2.2. Variace tvaru vlivem okolního nárůstu | 13 |
| 2.3. Způsoby inokulace a tvar kolonie..... | 14 |
| 2.3.1. Inokulační množství | 14 |
| 2.3.2. Splynutí na úrovni mezikruží - soukoloníí | 14 |
| 2.3.3. Rozšiřování inokulačního terčíku | 15 |
| 2.3.4. Variace tvaru inokulačního terčíku | 16 |
| 2.4. Ovlivnění morfogeneze na dálku | 17 |
| 2.5. Důležitost neobsazeného media kolem kolonie | 20 |
| 2.6. Role živin ve vývoji kolonie | 21 |
| 2.7. Plynné signály ovlivňující morfogenezi kolonie | 22 |
| 2.8. Závěry: Shrnutí morfogeneze..... | 24 |
| 2.9. Model | 24 |
| 3. Změny pH prostředí během vývoje kolonie | 26 |
| 3.1. Amoniak jako faktor ovlivňující morfogenezi | 26 |
| 3.2. Sledování změn pH v čase kolem koloníí | 26 |
| 3.3. Role glukosy při acidické fázi F koloníí | 29 |
| 3.4. Dynamika alkalizace | 29 |
| 3.5. Závěry..... | 30 |
| 4. Variabilita bakterií..... | 32 |
| 4.1. Změna morfotypu <i>S. marcescens</i> | 32 |
| 5. Interakce bakteriálních druhů..... | 34 |
| 5.1. Interakce <i>S. marcescens</i> morfotypu F a morfotypu M..... | 34 |
| 5.2. Interakce <i>S. marcescens</i> a <i>S. rubidaea</i> | 35 |
| 5.3. Interakce <i>S. marcescens</i> a <i>E. coli</i> | 35 |
| 5.4. Interakce <i>S. rubidaea</i> a <i>E. coli</i> | 36 |
| 5.5. Chimérická inokulace | 36 |
| 5.5.1. Chiméra F/R | 36 |

| | |
|--|----|
| 5.5.2. Chiméra F/Ec..... | 37 |
| 5.5.3. Chiméra R/Ec..... | 37 |
| 5.5.4. Chiméra F/R/Ec | 37 |
| 5.5.5. Chiméra R/W..... | 38 |
| 5.6. Interakce chimér s koloniemi..... | 39 |
| 5.7. Závěry..... | 40 |
| 5.8. Směsi v suspenzi..... | 41 |
| 5.9. Plynný fingerprint..... | 42 |
| 6. Antibiotika | 44 |
| 6.1. Indukovaná resistance | 44 |
| 6.2. Změna morfogeneze kolonie v závislosti na nízkých dávkách antibiotik..... | 45 |
| 6.3. Pozorování indukované resistance | 46 |
| 6.4. Dynamika alkalizace vs. indukovaná resistance..... | 48 |
| 6.5. Alkalizace agaru bez použití čpavku..... | 49 |
| 6.6. Oddělení zvýšení pH ampicilinu a výsevu bakterií | 50 |
| 6.7. Závěry..... | 51 |
| 7. Závěr..... | 53 |
| 8. Přehled použité literatury | 55 |
| 9. Přílohy | 59 |

1. Úvod

Mikroorganismy byly až do vynálezu mikroskopu neznámé, a proto bylo opravdovým zjevením, když se čas od času objevovaly například červené skvrny na potravinách nebo hostích. Tuto zkušenost sdíleli mnozí: Pythagoras, který viděl srážení krvavé substance na pokrmech, vojsko Alexandra Makedonského, jež si krvavé skvrny na chlebu vykládalo jako dobré znamení před dobýváním Tyru, nebo kněz Petr Pražský, kterého krvavé krůpěje na hostích přesvědčili o pravosti učení o transsubstanciaci, což bylo zvěčněno na Rafaelově obrazu (obr. 1.1). Za původce podobného zázraku byla v roce 1823 určena bakterie *Serratia marcescens*, nebo dříve také *Bacillus prodigiosus* – kouzelná tyčinka (Sehdev and Donnenberg 1999). A právě její kolonie zde budou prezentovány a bude popsána jejich schopnost tvořit makroskopické kolonie.



Obrázek 1.1: **Rafaelův obraz „Mass of Bolsena“**. podle <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/f9/Massatbolsena.jpg>

1.1. Bakterie unikají naší přímé zkušenosti

Velký systematik Carl von Linné zařadil v 18. století všechny mikroskopické organismy do třídy „chaos“. A aby bylo jasné, že se jimi dále zabývat nehodlá, přidal konstatování že Tvůrce nechtěl, abychom mikroskopické organismy poznávali, proto je udělal tak malé (podle Kaprálek 1999).

Do jisté míry Linného námitka stále platí - mikroskopické organismy můžeme poznávat jen skrze jejich hromadné projevy, epifenomény – průvodní jevy jejich skrytého života. Vnímáme jen jejich zásahy do našeho makroskopického světa (např. fermentace, nemoci). Vyzbrojeni přístroji poznáváme – ve smyslu detekce chemických látek, přečtení úseků DNA, nahlížení obrázků z mikroskopu atd. - bakteriální projevy do detailů, ale přímé zkušenosti se nám opět téměř nedostává. Nemáme přístup k bakteriím v originále, dostáváme pouze zprostředkovaná data.

Podobně ale nemáme bezprostřední zkušenost s jednotlivými buňkami v těle myši, můžeme však mít bezprostřední zkušenost s myší samotnou. Takovou ojedinělou příležitostí z bakteriálního světa nabízí makroskopická kolonie. Začali jsme o bakteriálních koloniích přemýšlet jako o mnohobuněčných *tělech* s vlastní ontogenezí (Neubauer 2002; Rieger et al. 2008). A převážně z tohoto pohledu je nazíráno na kolonie v průběhu celé práce, tedy ne jako na epifenomén hromadění se jednotlivých bakterií, ale jako na mnohobuněčné, nebo lépe řečeno proto-mnohobuněčné bakteriální tělo srv. (Shapiro 1995; Shapiro and Dworkin 1997; Ben-Jacob et al. 1998; Ben-Jacob 2003).

1.2. Mnohobuněčnost bakterií

Jevy jako bakteriální komunikace, sebevztáženost bakteriální populace, diferenciací bakterií, přítomnost faktorů ovlivňujících vývoj biofilmů i jiné aspekty mnohobuněčnosti jsou u bakterií ve stále se zvětšujícím objemu prací popisovány stále častěji:

Příkladem komunikace i sebevztáženosti bakteriálních společenství může být fenomén quorum-sensing, díky němuž bakteriální společenství koordinuje svůj růst (Fuqua et al. 1994; Miller and Bassler 2001; Diggle et al. 2007). Další schopnosti koordinace se ukazují např. na růstu větvících se kolonií, kde jednotlivé větve rostoucí na agaru vysílají repulsivní signály tak, aby nedocházelo k prolínání větví (Ben-Jacob et al. 1998).

Klonálně rostoucí populace bakterií ukázaly schopnost diferenciací buněk v rámci společenství, ať už dědičnou, nebo dočasnou. Tato vlastnost bakterií dlouho unikala pozornosti, protože dříve se zkoumaly převážně jevy vyplývající z výkonů mnoha jedinců. Dnes se ale začínají objevovat techniky, díky nimž je možné studium jednotlivých bakterií. Ukazuje se, že jednotlivé bakterie se mohou výrazně lišit od celopopulačního průměru. Příkladem jsou bakterie *E. coli*, do kterých byly vloženy dva plasmidy, kde se pod identickým promotorem nacházel jeden gen kódující zelený fluorescenční protein a podruhé gen kódující červený fluorescenční protein. Celá populace se jevila podle očekávání jako žlutě fluoreskující, kdežto při bližším pohledu se kromě skupiny žlutě svítících bakterií našla i skupina červeně svítících a skupina zeleně svítících bakterií (Elowitz et al. 2002).

Podobně bakterie *Bacillus subtilis* dokážou v suspenzi stochasticky diferencovat tak, že nakonec budou v celé populaci přesné poměry bakterií zastávajících různé role (López and Kolter 2010). Bakterie jednoho druhu dokážou diverzifikovat i ve svých ekologických nárocích a mnohem lépe tak využít prostředí, ve kterém se nacházejí, nebo rozložit riziko možné extinkce předpřipraveností na různé škodlivé faktory – viz níže; pojišťovací efekt (Boles et al. 2004; Vos and Velicer 2006). Rizika mohou bakterie překonávat i schopností vstoupit do málo nebo vůbec nerostoucího, ale za to resistantního/persistentního stavu. Chronické infekce *Staphylococcus aureus* se běžně skládají ze dvou populací – jedné virulentní a druhé resistantní, tzv. small colony variants, která omezí svůj

metabolismus a stane se tak odolnou vůči antibiotikům. Obě populace mají schopnost přechodu jedna v druhou (Melter and Radojevič 2010). *Bacillus subtilis* má schopnost tvořit odolné spory (Schultz et al. 2009). *E. coli* může dočasně spustit toxin-antitoxin systém, díky kterému se na čas přestane dělit, a tím se může vyhnout působení škodlivých vlivů (Kim et al. 2013).

Pokud podstoupení některé z diferenciací ve svém důsledku vede k „dobrovolnému odstoupení“ z „germinální linie“ nebo alespoň omezí šanci stát se její součástí, dá se potom hovořit o rysu mnohobuněčnosti. Bakteriální kolonie zjevně není projekt k podpoře několika málo privilegovaných. I přesto existují některé případy u bakterií nebo v kolonii žijících eukaryot, které se obětují ve prospěch ostatních (Shimkets 1990; Mehdiabadi et al. 2006). Protože se ale jednotlivé bakterie v kolonii mají potenciál dále množit pokud dostanou vhodnou příležitost, často se na populace bakterií aplikují sociobiologické poznatky (West et al. 2002; West et al. 2006).

U některých kmenů bakterií můžeme pozorovat rozštěpení populace do variant, které se promítnou v morfogenezi kolonií. V kapitole 4. Variabilita bakterií referujeme o několika takových případech. Tyto jednotlivé morfotypy diverzifikované populace ukazují i na změněné strategie ve tvorbě biofilmu - zde je vidět korelace mezi stavbou biofilmů a morfogenezí kolonií.

1.3. Ontogeneze

I když jsou bakterie schopné morfogeneze kolonie, v přírodě nacházíme kolonie pouze ojediněle. V přírodě jsou bakterie zapojeny a již se rodí do sítě funkčních symbiotických vztahů s jinými organismy. Jen pokud se jim dostane možnosti vyvázat se z těchto vztahů, např. dostat se na bohaté, ale ještě neosídlené prostředí (například pokrm, nebo miska s agarovým médiem), mají možnost podstoupit ontogenezi.

Taková izolace je patrně nutnou podmínkou ontogeneze obecně: Rostliny i živočichové zajišťují, aby se jejich zárodky začaly vyvíjet ve sterilním prostředí. Dokonce i houby, jinak značně zapojené do ekologických vztahů, před tím, než vytvoří plodnici, vytvoří kokon, ve kterém je zárodek plodnice izolovaný od vztahů s okolím. Zapojení se takto vzniklého těla do sítě biosféry následuje až v dalším kroku, kdy je ontogeneze už dostatečně nastartovaná. Nástin takové teorie ontogeneze viz. (Pátková et al. 2012, str. 1-2).

Vidíme tedy, že samotná makroskopická kolonie se, na rozdíl od biofilmů většinou složených z více druhů (Watnick and Kolter 2000; Ram et al. 2005), v přírodě objevuje jen zřídka. Proto nepředpokládáme, že by ontogeneze námi pozorovaných kolonií byla zajišťována procesy, které by byly pro tento účel vyhrazeny/adaptovány tj. selekčním tlakem vybroušené a udržované. Můžeme zde hovořit o preadaptaci nebo o gouldovském spandrelu (Gould and Lewontin 1979): Bakterie mají

potenciál vytvořit kolonii, ač faktory ovlivňující tento vývoj jsou patrně původně určené částečně podobným (stavba biofilmu), nebo ke zcela jiným účelům. Kdyby byl na morfogenezi kolonie vyvíjen silný selekční tlak, ty faktory, které se na ní podílejí byť jen „mimoděk“, by byly vystaveny selekci i podle této nové roviny. Klasický příklad takového fenoménu jsou pendentivy (spandrely) v chrámu sv. Marka v Benátkách: na jedné straně jsou nutným výsledkem nasazení kopule na čtvercovou podstavu, ale v tomto konkrétním případě se jejich další rolí stalo nesení mozaik čtyř evangelistů (Gould and Lewontin 1979).

Na základě axiomu, že bakteriální kolonie je výsledkem ontogeneze, byl vyvinut jednoduchý matematický model, který je pokusem o popis interakcí v rámci vznikajícího bakteriálního těla – viz oddíl 2.9. a Čepel et al. 2010.

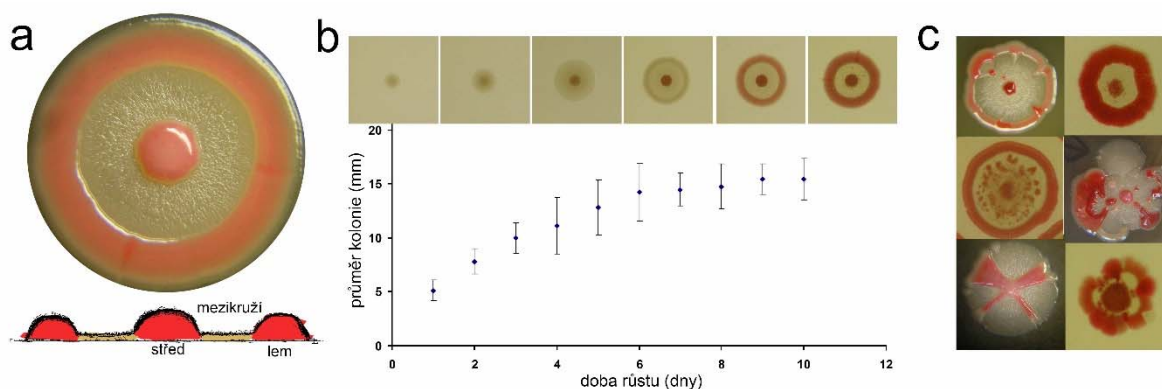
2. Morfogeneze kolonie *Serratia marcescens* – literární úvod

V této kapitole popíšeme zkušenost s morfogenezí kolonií *Serratia marcescens*, které se dostalo naší skupině v rámci předcházejících prací; převážně v publikacích Rieger et al. 2008 a Čepl et al. 2010. Přiblíženy jsou i některé výsledky, které se v publikacích neobjevily, ale tematicky sem zapadají (viz diplomová práce Čepl 2010).

2.1. Organismus

Modelovým organismem naší skupiny je *Serratia marcescens*, morfortyp F. Ten byl pojmenován podle vzhledu kolonie, který díky vystouplému středu, propadlému mezikruží a vystouplému okraji připomíná fontánu (obr. 2.1).

Jasně strukturovaný profil kolonie společně se změnami barevnosti struktur bez nutnosti umělé vizualizace poskytuje výhodu v pozorování diferenciacce bakterií v rámci kolonie, na rozdíl od umělé vizualizace srv. (Shapiro 1995). Tato diferenciacce a celá morfogeneze F kolonie se stala předmětem zájmu naší skupiny. V této části předvedeme pozorované jevy, které vedly ke konstrukci modelu publikovaného v (Čepl et al. 2010).



Obrázek 2.1: **Kolonie morfortypu F *Serratie marcescens***. a) standardní dospělá (7 dní stará) kolonie se schématem průřezu; b) časový vývoj morfogeneze kolonie F s grafem průměrů kolonií; c) variace tvaru F kolonií; srv. (Čepl et al. 2010, obr. 1)

V rámci standardní F kolonie lze rozlišit 3 struktury (obr. 2.1):

1) Střed, který narůstá do průměru asi 2 mm a roste během prvního a druhého dne. Ze začátku je bledý, ale kolem pátého dne růstu začíná červenat, má konvexní charakter.

2) Mezikruží navazuje na střed, vzniká od druhého dne růstu a na rozdíl od středu není pigmentované, ale má hrubý, matný povrch a dorůstá do výrazně menší výšky od agaru a do průměru asi 10 mm.

3) Lem narůstá po okraji kolonie v návaznosti na mezikruží, začíná vznikat okolo pátého dne růstu kolonie a v mnohém připomíná strukturu středu. Začíná červenat kolem sedmého dne růstu. Tou dobou také končí rozrůstání kolonie, které se zastaví na průměru cca 14,5 mm.

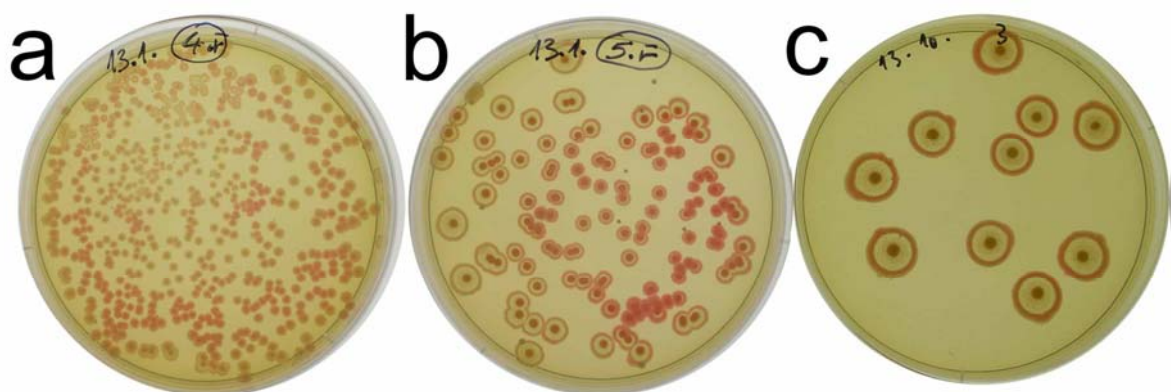
Tato morfogeneze, v ideální formě představena v obr. 2.1a, může nabývat větších či menších nepravidelností. Kolonie může obsahovat výhřezky, chyby ve struktuře mezikruží nebo nepravidelný tvar lemu, atd. – viz obr. 2.1c.

Výše popsaná morfogeneze kolonie F je citlivá ke kultivačním podmínkám. Standardní kultivační podmínky jsou živný agar s přidavkem glukosy (= ŽAG) a teplota 27°C. Pokud některou z těchto podmínek změním, vývoj kolonie bude probíhat alternativním způsobem.

Jednotlivé změny jsou blíže popsány v (Pátková et al. 2012, str. 3-5).

2.2. Variace tvaru vlivem okolního nárůstu

Změny morfogeneze F kolonií byly pozorovány i v závislosti na hustotě kolonií na misce (obr. 2.2). Výše uvedená standardní morfogeneze probíhá, pokud je na Petriho misce s průměrem 9 cm přítomno jen několik kolonií. Obecně potom platí, že čím je kolonií na misce více, tím jsou menší a rychleji se vyvíjejí – tj. rychlejší přechod od mezikruží k lemu, rychlejší tvorba pigmentu a zastavení růstu. Při vysokých hustotách kolonií se typická stavba ztrácí úplně a při nejhustších výsevech se bakteriální těla slijí v jednolitý tenký povlak přes celou miskou bez možnosti rozlišení jednotlivých center.



Obrázek 2.2: **Vzhled kolonií v závislosti na hustotě kultivace.** a) hustý výsev, stovky kolonií na miskou (dokumentace 4. den růstu); b) středně hustý výsev, desítky kolonií na miskou (dokumentace 4. den růstu); c) řídký výsev, několik kolonií (dokumentace 7. den růstu); srv. (Čepl et al. 2010, obr. 1)

Byla stanovena hypotéza, která stála v základu tvorby matematického modelu, že vývoj kolonií řídí difuzibilní morfogeny a že tyto morfogeny stojí i za vzájemným ovlivňováním sousedních kolonií ve smyslu lokálního zvýšení koncentrace těchto morfogenů a tak urychlení vývoje. Charakter těchto morfogenů byl odhalován skrze různá nastavení inokulace kolonií.

2.3. Způsoby inokulace a tvar kolonie

2.3.1. Inokulační množství

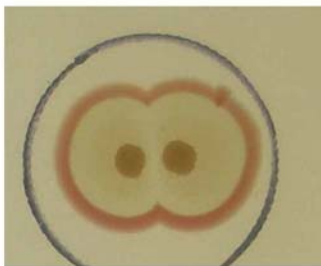
Pokud jsou bakterie inokulovány pomocí výsevu, kolonie vyrostou z jednotlivých bakteriálních buněk. Stejný vzhled a vlastnosti kolonií ale dosahují i kolonie inokulované pomocí nanesení většího počtu bakterií do jednoho místa - srv. tzv. giant colonies (Palková and Janderová 1997), nebo toothpick inoculation (Shapiro and Higgins 1989). F kolonie se standardní morfogenezí může vyrůst prakticky nezávisle na tom, kolik bakterií kolonii zakládalo. Například když byla kličkou sebrána biomasa z celé jedné kolonie a byla nanesena na čerstvý agar do inokulačního terčíku průměru cca 4 mm, vyrostla F kolonie se všemi typickými rysy (obr. 2.3).



Obrázek 2.3: **F kolonie inokulována přenesením biomasy z celé kolonie.** dokumentace 7. den růstu

2.3.2. Splynutí na úrovni mezikruží - soukolonií

F kolonie mají tu vlastnost, že pokud během svého růstu dvě nebo více kolonií dorostou až do přímého kontaktu, splynou a dále se chovají jako jediné tělo. V případě, že do těsného kontaktu dorostou dvě kolonie v době, kdy již mají vytvořený střed a narůstá struktura mezikruží, spojí se a lem se vytvoří společně okolo obou kolonií (obr. 2.4), srv. Rieger et al. 2008, str. 79.

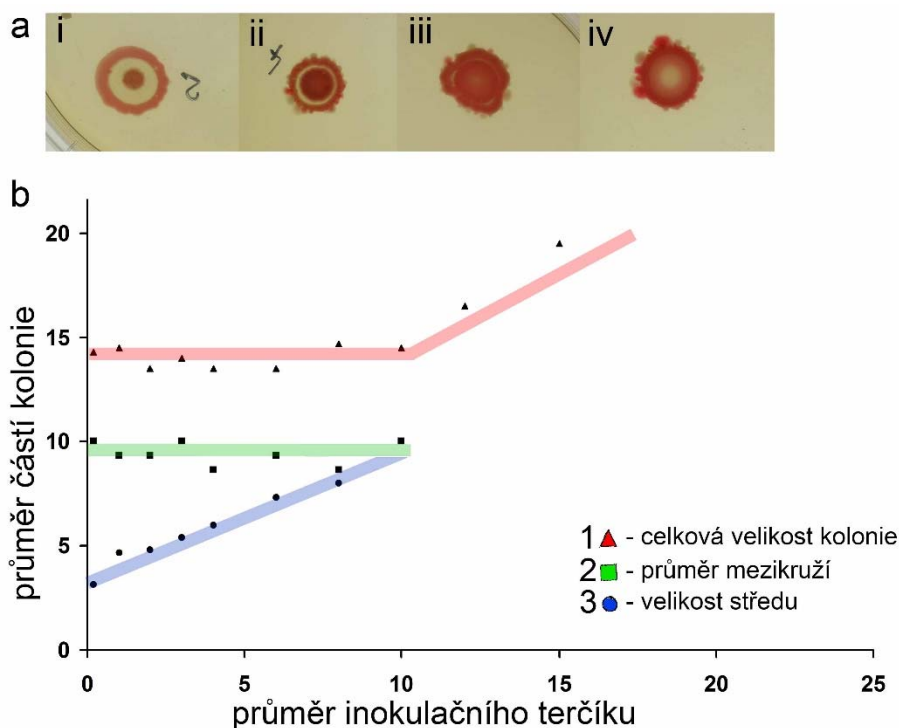


Obrázek 2.4: **Splynutí kolonií na úrovni mezikruží – soukoloní.** dokumentace 6. den růstu

2.3.3. Rozšiřování inokulačního terčíku

Zdá se, že na počtu zakládajících bakterií morfogeneze téměř nezávisí (srv. obr. 2.3). Je naopak závislá na velikosti inokulačního terčíku, do kterého bylo původní inokulum rozprostřeno. V prostoru inokulačního terčíku začíná kolonie svůj růst vždy jako struktura středu.

Pokud je inokulováno do terčíku, který v průměru nepřesáhne 2 mm, lze pozorovat typický vývoj F kolonie. Když se bude inokulační terčík rozšiřovat, dojde i k rozšiřování struktury středu, ale celková velikost kolonie zůstane nezměněna - střed se bude zvětšovat na úkor struktury mezikruží (obr. 2.5). Takto lze inokulační terčík rozšiřovat až do hranice průměru 10 mm, což je typická hranice přechodu mezikruží-lem. Pokud se inokulační terčík rozšíří za tuto hranici, kolonie ztratí typický charakter a střed a lem se slíjí.



Obrázek 2.5: **Závislost velikosti jednotlivých struktur F kolonie na průměru inokulačního terčíku.** a) průměr inokulačního terčíku (i) 2mm; (ii) 4mm; (iii) 8mm; (iv) 12mm; b) graf průměrů typických částí kolonie v závislosti na průměru inokulačního terčíku, řada 1: průměr kolonií; řada 2: průměr mezikruží; řada 3: průměr středů; srv. (Čepl et al. 2010, obr. 7)

2.3.4. Variace tvaru inokulačního terčíku

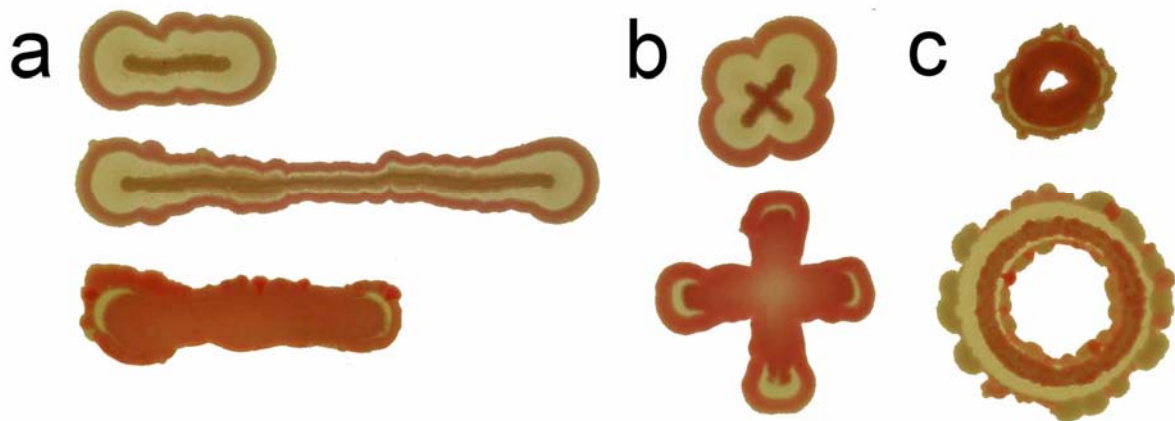
Další série „teratologických“ pozorování popisuje morfogenezi útvarů vzešlých z různé geometrické variace inokulačního prostoru. Odhaluje se zde, podle jakých pravidel se bude měnit typická struktura F morfotypu se středem, mezikružím a lemem.

Linky (obr. 2.6a): Když je inokulovaný materiál roztírán do tenké čáry, na místě inokulační linky vyrostla opět struktura středu, na níž standardně navazuje mezikruží završené lemem (tzv. F-like struktura). Důsledkem takového „růstu vedle sebe“ je i menší šířka nárůstu uprostřed dlouhé F-like struktury – analogicky k menším koloniím, nacházejícím se ve středně hustém výsevu (srv. obr. 2.2a), v takovém případě klesá kritická hodnota průměru pro tvorbu mezikruží. Pokud je inokulační linka širší, než je kritická hodnota tvorby mezikruží, vznikne útvar bez typické F struktury (srv. rozšiřování inokulačních terčíků); pro takový útvar jsme zavedli termín makula (lat. *macula* = skvrna). Občas na konci takové protáhlé makuly pozorujeme drobný růst struktury mezikruží – srv. asymetrický růst na okraji hustého výsevu (srv. obr. 2.2).

Kříže (obr. 2.6b): Podobné výsledky jako inokulace do čáry ukazuje inokulace do kříže. Přítomnost ramen ještě více zvýší lokální hustotu nárůstu a sníží se tak kritická hodnota pro tvorbu mezikruží.

U křížů s širšími inokulačními rameny pozorujeme růst mezikruží a následně lemu jen na koncích ramen. U menších křížů pozorujeme růst mezikruží a spojitého lemu po celém obvodu srv. oddíl 2.3.2. soukoloní).

Prstence (obr. 2.6c): Výsledný vzhled útvaru inokulovaného do prstence je závislý na průměru prstence. Pokud je průměr menší než 4 mm, prstenec se zacelí a vzniklý útvar je prakticky standardní F kolonie s rozšířeným inokulačním terčíkem. Pokud je naopak průměr větší než 15 mm, objeví se mezikruží po obou stranách a máme podobný případ F-like struktury jako u čárové inokulace. V rozmezí průměru prstence 5 - 15 mm má útvar mezikruží a lem jen na vnější straně. Vnitřní strana zůstane hladká. Lze o tom uvažovat jako o rozšířeném inokulačním terčíku s nezacelenou mezerou.



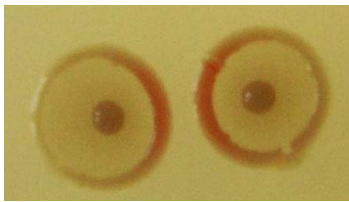
Obrázek 2.6: **Útvary vzniklé deformací inokulačního terčíku.** a) inokulace do čáry; b) inokulace do kříže; c) inokulace do kruhu; dokumentace vše 7. den růstu; srv. (Čepl et al. 2010, obr. 3)

Z výše uvedeného vyplývá, že standardní kolonie nebo F-like struktura s mezikružím a lemem vzniká pouze tehdy, pokud průměr inokulačního terčíku nebo šířka linek nepřesáhne kritickou hodnotu pro tvorbu mezikruží. U kolonií v řídkém výsevu je tato hodnota 10 mm, u kolonií v hustších výsevech tato hodnota klesá proporcionálně k mohutnosti nárůstu v okolí, v případě inokulací do linek, křížů a prstenců se do této mohutnosti počítají i části takto deformovaného těla.

2.4. Ovlivnění morfogeneze na dálku

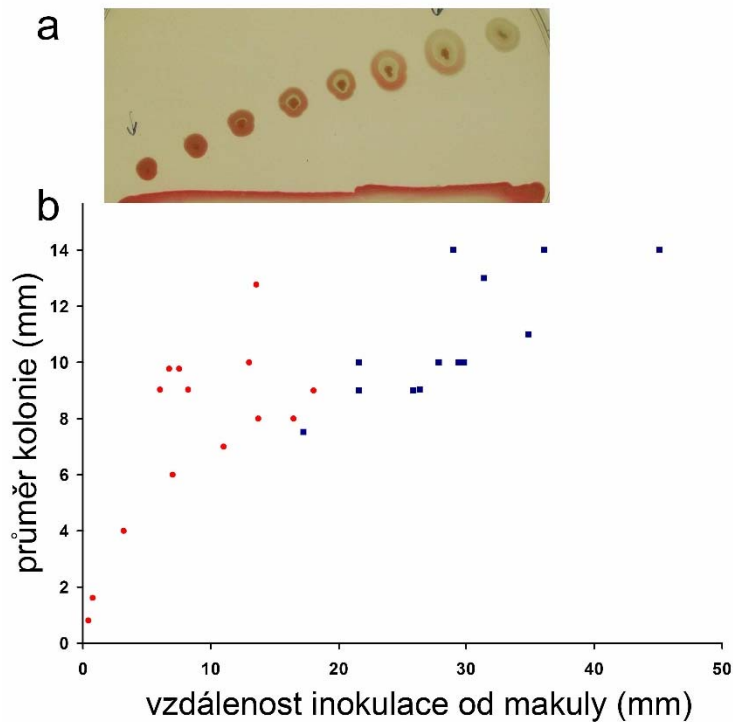
V minulých kapitolách bylo již vzájemné ovlivňování ukázáno, buď v rámci jednoho útvaru např. ovlivňování ramen křížů a vnitřního obvodu prstence, nebo v případě hustých výsevů, kde se zmenší

celková velikost kolonie v závislosti na síle vlivu okolního nárůstu a kolonie se také bude vyvíjet rychleji, tzn. dojde k časnějšímu nástupu lemu na úkor mezikruží a rychlejší pigmentaci (srv obr. 2.2). Nejjednodušší příklad je ovlivňování se dvou kolonií navzájem. Pokud jsou dvě kolonie inokulovány vedle sebe a dostatečně daleko, aby nesplynuly v soukolonii (srv. obr. 2.4), a zároveň dost blízko, aby byl vliv pozorovatelný (což je rozmezí zhruba 5-20 mm), lze vidět jejich asymetrický vývoj. Směrem k sobě se kolonie budou vyvíjet rychleji: pozorujeme rychlejší nástup lemu, časnější produkci pigmentu i rychlejší zastavení růstu (obr 2.7, srv. menší kolonie a rychlejší vývoj u hustého nárůstu obr. 2.2a).



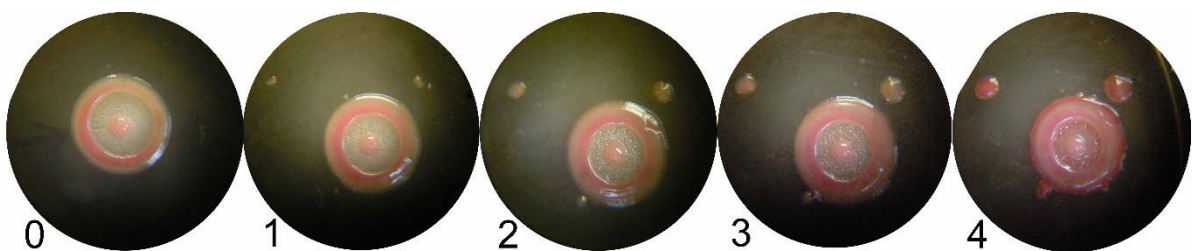
Obrázek 2.7: **Zrychlený vývoj F kolonií na přilehlých stranách.** dokumentace 4. den vývoje; srv. (Pátková et al. 2012, obr. 8)

Pokud se místo kolonie použije k ovlivnění makula (tzn. hustší lokální osídlení), je ovlivnění sousedních kolonií intenzivnější. Do vzdálenosti kolonie zhruba 10 mm od okraje makuly se nevyvine struktura mezikruží a dochází k úplné ztrátě struktury. Vzhled takto ovlivněných kolonií je srovnatelný se vzhledem F kolonií v hustém výsevu (srv. obr. 2.2a). Při zvětšování vzdálenosti kolonie od makuly lze postupně pozorovat zvětšování průměru kolonií a růst mezikruží, nejprve asymetricky směrem od makuly, potom po celém obvodu (srv. asymetrický růst na okraji výsevu). Do vzdálenosti cca 40 mm od makuly je však jejich velikost stále ještě menší a vývoj rychlejší (obr. 2.8).



Obrázek 2.8: **Rychlejší vývoj kolonií v blízkostí makuly.** a) kolonie v blízkostí makuly (dokumentace 4. den růstu); b) graf závislosti velikosti kolonií na vzdálenosti od makuly, červené tečky – kolonie bez mezikruží nebo s mezikružím pouze směrem od makuly, modré tečky – standardní F kolonie; srv. (Čepl et al. 2010, obr. 4)

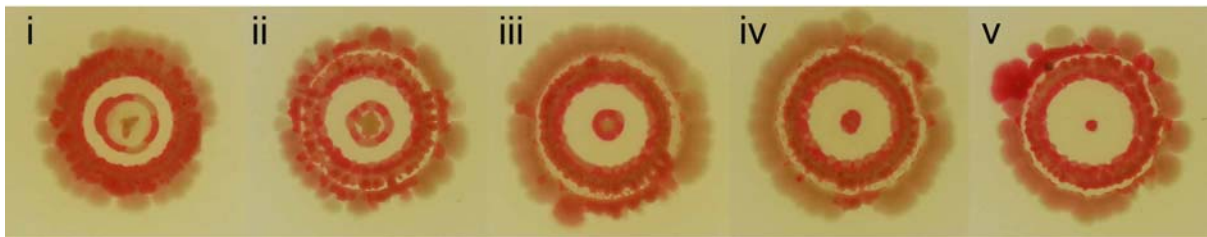
Ovlivnitelnost morfogeneze se mění i se stářím *ovlivňujícího* nárůstu. K týden staré kolonii byly do vzdálenosti 2 mm , 5 mm a 10 mm inokulovány tři kolonie. Nově inokulované kolonie téměř nerostou a připomínají malé červené kolonie z těsné blízkosti makuly nebo z hustého nárůstu (obr. 2.9).



Obrázek 2.9: **Vývoj kolonií v blízkostí vyrostlé kolonie.** inokulováno k 7 dní staré kolonii; čísla ukazují dny vývoje přidaných kolonií

Pro odstranění směrových vlivů (např. gradientu morfogenů), které lze pozorovat u asymetrického růstu kolonií nad makulou, byli použity k ovlivnění vývoje kolonie různě staré prstence inokulované okolo ní. Opět je zde vidět stejný jev: čím je prstenec oproti kolonii starší, tím výraznější je jeho vliv

(obr. 2.10). Naopak, pokud je prstenec inokulován okolo dva dny staré kolonie, přijde vlivem této kolonie o strukturu mezikruží (obr. 2.10i).

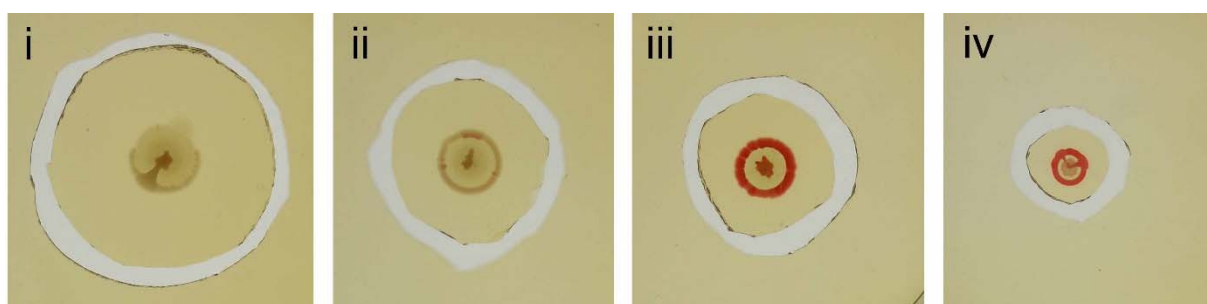


Obrázek 2.10: **Vliv různě staré kruhové inokulace na kolonii.** Prstenec inokulován k dva (i), nebo jeden (ii) den staré kolonii; prstenec i kolonie inokulovány současně (iii); kolonie inokulována doprostřed den (iv), nebo dva dny (v) starého prstence; dokumentace 5. den vývoje kolonií; srv. (Čepl et al. 2010, obr. 3)

2.5. Důležitost neobsazeného media kolem kolonie

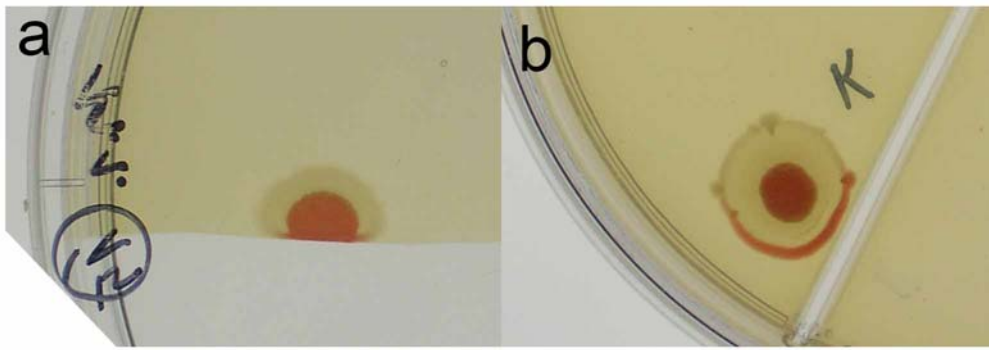
Pokud je prostor na kterém roste kolonie zmenšován, předpokládané signály difundující do okolí se budou hromadit v tomto omezeném prostoru, a tak můžou být pozorovány změny v utváření takto „uvězněné“ kolonie. Kolonie „ovlivňuje“ sebe sama.

Do agarů na standardní misce byly vyřezány prstence tak, aby kolonie rostla pouze na omezené ploše. V porovnání s kontrolou rostoucí na standardní misce (průměr 9 cm) lze pozorovat se zmenšující se velikostí nabídnutého prostoru urychlený vývoj kolonie, tzn. rychlejší nástup lemu a rychlejší vybarvování a zároveň menší konečnou velikost (obr. 2.11).



Obrázek 2.11: **Vliv zmenšující se plochy agarů na vývoj kolonie F.** průměr poskytnutého agarů 4 cm (i); 3 cm (ii); 2 cm (iii); 1 cm (iv); dokumentováno 5. den růstu

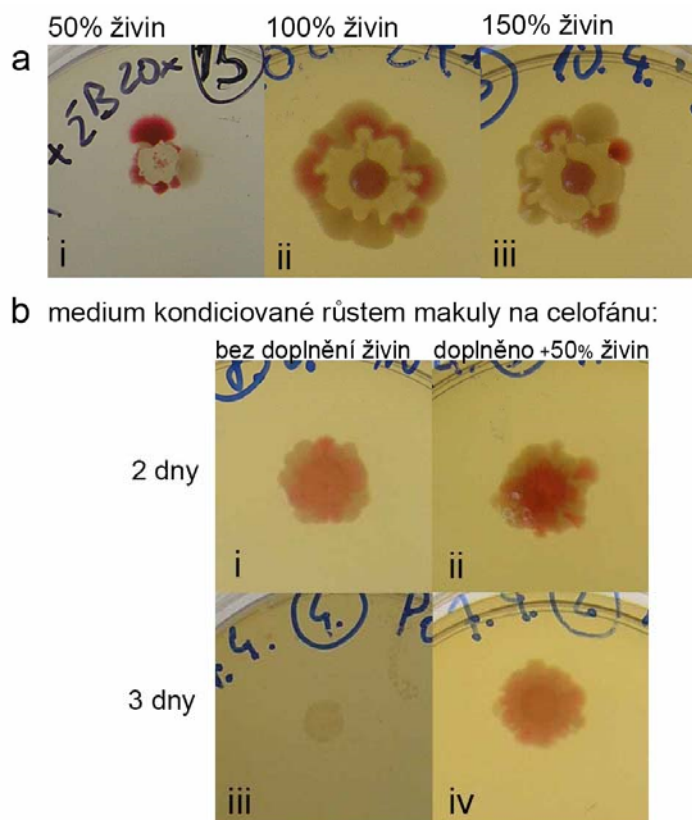
Kolonie sousedící s přepážkou nebo uříznutým agarům vykazují asymetrický růst směrem od překážky a rychlejší vývoj: rychlejší nástup lemu směrem k přepážce. Předpokládané signály, které v těchto místech nemohou stejnoměrně difundovat do prostoru, tedy vývoj kolonie (obr. 2.12) také ovlivní.



Obrázek 2.12: **Vliv pozice kolonie na misce na její vývoj.** a) kolonie na okraji odříznutého agaru; b) kolonie u přepážky dělené misky

2.6. Role živin ve vývoji kolonie

Pro zhodnocení role živin ve vývoji kolonie byla makula pěstována dva resp. tři dny na celofánové membráně přiložené na povrch živného agaru. Potom byla membrána i s makulou odstraněna. Takto kondicionovaný a o živiny ochuzený agar byl doplněn přidáním 50 % živin původního živného agaru. Kontrolou představuje čistý agar doplněný na 50 % živin standardního živného agaru pomocí živného bujónu (viz. DP autora; str. 72-74). Kontrolní kolonie vysazené na takovýto agar vykazují asi o polovinu menší vzrůst než u kolonií na standardním živném agaru, ale s dobře rozlišitelnými strukturami mezikruží i lemu (obr. 2.13ai). Na agaru, který byl vystaven nárůstu po dva dny a nebyl doplněn živinami, vyrostla malá červená kolonie, po doplnění živin narostly nestrukturované kolonie (obr. 2.13bi-ii). Na agaru, který byl vystaven nárůstu po tři dny a nebyl doplněn živinami, nevyrostlo téměř nic, po doplnění živin narostly opět nestrukturované kolonie (obr. 2.13c iii-iv).

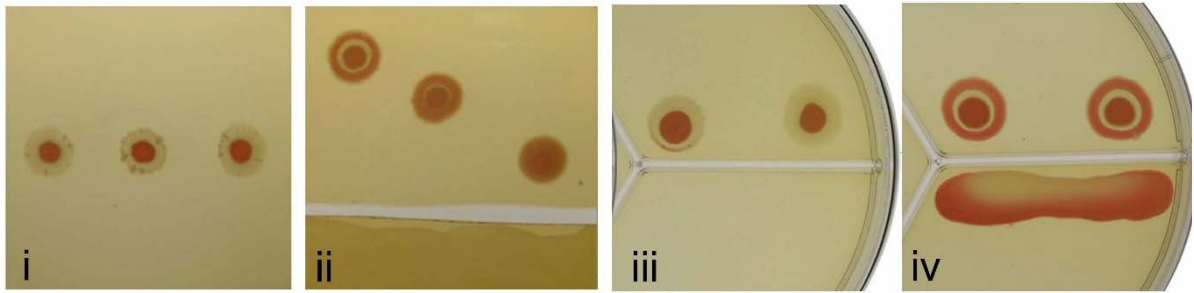


Obrázek 2.13: **Růst F kolonií na kondicionovaném a živinami doplněném mediu.** a) různě bohatá media: (i) 50 % živin standardního živného agaru; (ii) standardní živný agar; (iii) standardní živný agar + dalších 50 % živin; b) vyčerpávání živin makulou na celofánu dva dny bez doplnění živin (i) a s doplněním 50 % živin (ii) a tři dny bez doplnění živin (iii) a s doplněním 50 % živin (iv); dokumentace 7. den růstu kolonií

Ukazuje se, že živiny mají vliv na velikost vzniklé kolonie, tzn. na konečné zastavení růstu, ale faktor zodpovědný za ztrátu struktury mezikruží má jiný charakter, protože ani po doplnění živin se na kondicionovaném agaru mezikruží neobjeví. Naopak na 50 % obsahu živin pozorujeme standardní, pouze miniaturizovaný vývoj kolonie.

2.7. Plynné signály ovlivňující morfogenezi kolonie

Bylo testováno, zda bude pozorovatelný vliv plynných látek produkovaných nárůstem na morfogenezi kolonie. Nejprve byla mezi makulou a koloniemi vyříznuta napříč agarem rýha (Rieger et al. 2008, str. 82-83). Pokus ukázal, že plynný signál způsobuje ovlivnění ve formě ztráty struktury a rychlejšího vývoje. Není zde vidět výrazné zmenšení velikosti kolonií pravděpodobně kvůli nemožnosti vzájemného ovlivnění konzumací živin (obr. 2.14i-ii, srv. obr. 2.8). Podobný pokus byl proveden i na dělené misce s obdobnými výsledky (obr. 2.14iii-iv).

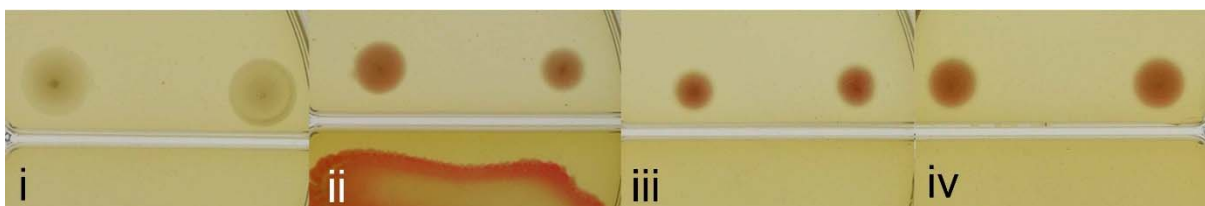


Obrázek 2.14: **Vliv makuly na kolonie plynou fází.** (i) kontrola; (ii) kolonie v blízkosti makuly separované rigolem; (iii) kontrola u přepážky; (iv) kolonie v blízkosti makuly separované přepážkou; dokumentace 5. den růstu; srv. (Čepl et al. 2010, obr. 4)

Pro zvýšení míry ovlivnění kolonie plyným signálem rostla makula na jedné části dělené misky tři dny, a až poté jsme do sousedního kompartmentu inokulovali kolonie (srv. vliv staršího nárůstu). Takové kolonie potom vůbec nevytvořily typickou F strukturu (obr. 2.15ii). Opět se nevyvinula struktura mezikruží jako v případě hustého nárůstu nebo rozšiřování inokulace. Lze předpokládat že agar byl kondiciován plynými produkty makuly rostoucí v sousedním kompartmentu.

Pokud byla makula pěstována na membráně a po třech dnech společně s membránou odstraněna a do sousedního kompartmentu inokulovány kolonie, byl pozorován podobný výsledek (obr. 2.15iii).

Když byl zopakován stejný postup, ale do vedlejšího kompartmentu dělené misky nalit čerstvý agar a na něj inokulovány kolonie, bylo pozorovatelné ovlivnění v podobné síle jako v případě obou předchozích případů (obr 2.15iv).



Obrázek 2.15: **Vliv plyného signálu na vývoj kolonií a jeho přetrvávání v kondiciovaném agaru.** (i) kontrola; (ii) kolonie inokulovány vedle 3 dny staré makuly; (iii) kolonie inokulovány vedle agaru, na kterém po 3 dny rostla makula; (iv) kolonie inokulovány na agar nalitý vedle agaru, kde 3 dny rostla makula; dokumentace v čase 5 dní od inokulace kolonií; srv. (Čepl et al. 2010, obr. 5)

Ke ztrátě struktury došlo vždy - ať už v přítomnosti tři dny staré makuly, nebo na živném agaru tři dny kondiciovaném vzdušnou fází makuly, či na čerstvém agaru v přítomnosti tři dny makulou kondiciovaného agaru. V tomto případě může být zcela vyloučena signalizace pomocí světla, zvuku (Matsuhashi et al. 1998; Matsuhashi et al. 1999) nebo signálu v podobě pulzů chemických látek.

Ukazuje se, že během tří dní růstu makuly se signál akumuluje v kondiciovaném mediu (srv. oddíl 2.6.), z něhož se může dále uvolňovat a působit tak na nárůst v sousedním odděleném kompartmentu.

2.8. Závěry: Shrnutí morfogeneze

V průběhu morfogeneze F kolonie byly zaznamenány tři kritické body:

Rozrůstání středu a přechod na strukturu mezikruží

Středová část se vyvíjí během prvního a druhého dne vývoje kolonie do průměru 2 mm, nebo po celé ploše inokulačního prostoru. Poté následuje růst struktury mezikruží, ale pouze v případě, že kolonie nebo rostoucí útvar nepřekročí kritickou hodnotu pro růst mezikruží a její okolí neobsahuje nadkritické množství jiného nárůstu nebo signálu od jinud. Faktor, který určuje přechod střed-mezikruží, se této fázi výzkumu nepodařilo identifikovat.

Rozrůstání mezikruží a přechod na strukturu lemu

Mezikruží standardně roste mezi druhým až pátým dnem do průměru kolonie 10 mm, a potom vlivem faktoru, který je růstem klonu F produkován, přechází do struktury lemu. Při zvýšení jeho koncentrace jiným nárůstem, a to i za přepážkou nebo jeho lokální akumulací (např. okraj agar, zmenšený agar), dochází k překonání kritické koncentrace, a tak k zastavení vývoje mezikruží a začátku růstu lemu.

Rozrůstání lemu a zastavení růstu kolonie

Lem roste standardně mezi pátým a sedmým dnem do průměru kolonie cca 14,5 mm. Pokud je inokulační terčik větší než kritická hodnota průměru kolonie pro tvorbu mezikruží, struktury středu a lemu splynou, a průměr takového útvaru bude mít velikost inokulačního terčiku plus přírůstek cca 2 mm na každé straně. Velikost kolonie je menší v prostředí chudém na živiny, v hustém nárůstu, v omezeném prostoru, okolí vyvinuté kolonie nebo v blízkosti makuly.

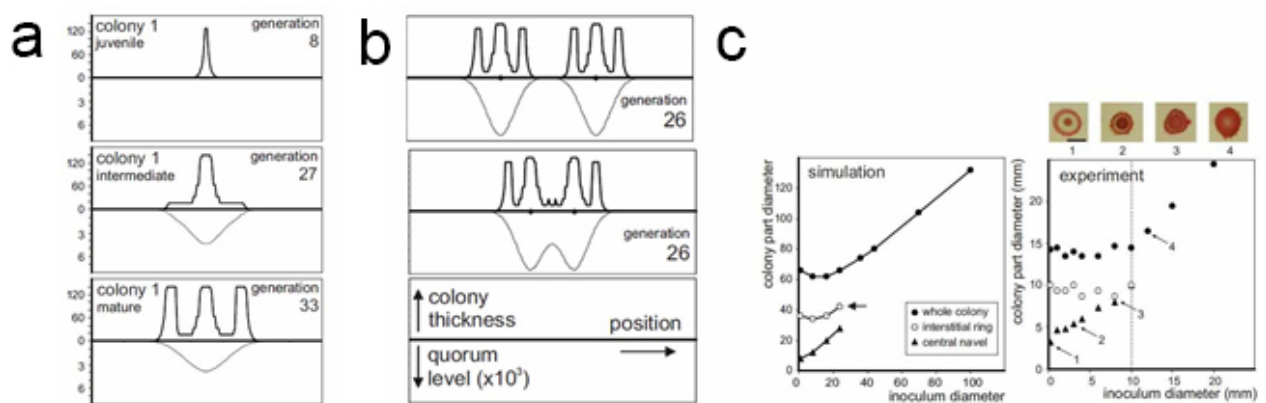
2.9. Model

Modelování růstu kolonie slouží k vytvoření scénáře, který by mohl ukazovat alespoň na některé procesy vedoucí k vývoji složité struktury bakteriálního těla. V této kapitole bude představen model simulující vývoj profilu F kolonie v čase, jenž byl publikovaný v Čepl et al. 2010, str. 7-12:

Model předpokládá dva druhy signálů, jeden difuzibilní vzduchem i agarem označený jako odor a druhý difuzibilní pouze agarem, označený jako quorum. Bakterie nabývají čtyř různých stavů, lišících

se odpovědí na signály a jejich produkci. Jedná se o jednorozměrný celulární automat, řada buněk prezentuje průřez vyvíjející se kolonie a každá buňka je charakterizovaná 1) tloušťkou nárůstu, 2) stavem bakterií, 3) stářím bakterií s kontinuálně vyjádřenou koncentrací difuzibilního quorum signálu a hladinou odorů – viz. (Čepl et al. 2010, obr. 6).

Počítačové simulace založené na tomto modelu ukazují podobné tvary, které jsou pozorovatelné i na miskách. Příkladem jsou dvě blízké kolonie, které mají asymetrický vzrůst nebo vytvoří soukolonii. Podobně lze simulovat inokulace do rozšiřujících se inokulačních terčů, kde výsledkem jsou podobné tvary jako na misce (obr. 2.16).



Obrázek 2.16: **Výsledek simulací matematického modelu.** a) vývoj jediné kolonie; b) interakce dvou kolonií; c) rozšiřování „inokulačního terčů“; převzato z (Čepl et al. 2010, obr. 6 a 7)

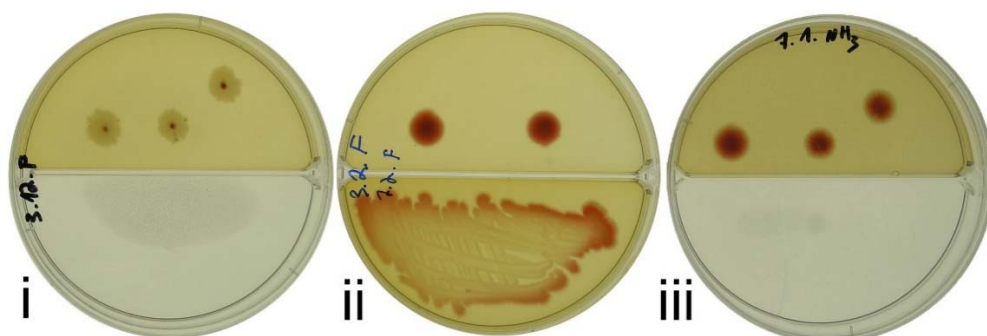
3. Změny pH prostředí během vývoje kolonie

Tato kapitola již představuje vlastní výsledky práce přímo navazující na práci minulou. Představíme zde identifikaci faktoru ovlivňujícího přechod růstu struktury mezikruží a struktury lemu a pozorovanou korelaci vývoje typických částí kolonie se změnami hodnot pH v agaru okolo kolonie během růstu.

3.1. Amoniak jako faktor ovlivňující morfogenezi

Amoniak byl dříve identifikován jako signální molekula ovlivňující vývoj kvasinkových kolonií (Palková and Janderová 1997). Byl také identifikován jako signální látka u bakterií *Bacillus licheniformis* (Nijland and Burgess 2010), kde spouští tvorbu biofilmu a produkci pigmentu. Dokonce byl identifikován i jako induktor resistance na některá antibiotika u *E. coli* (Bernier et al. 2011) – tato problematika je podrobně zpracována v poslední kapitole.

Pokusili jsme se působit na kolonie roztokem čpavku přes přepážku. Při koncentraci 0,1 % roztoku čpavku jsme pozorovali míru ovlivnění morfogeneze F kolonií podobnou jako při ovlivnění 3 dny starou makulou za přepážkou – tj. kolonie normální velikosti, ale bez typické F struktury (obr. 3.1).



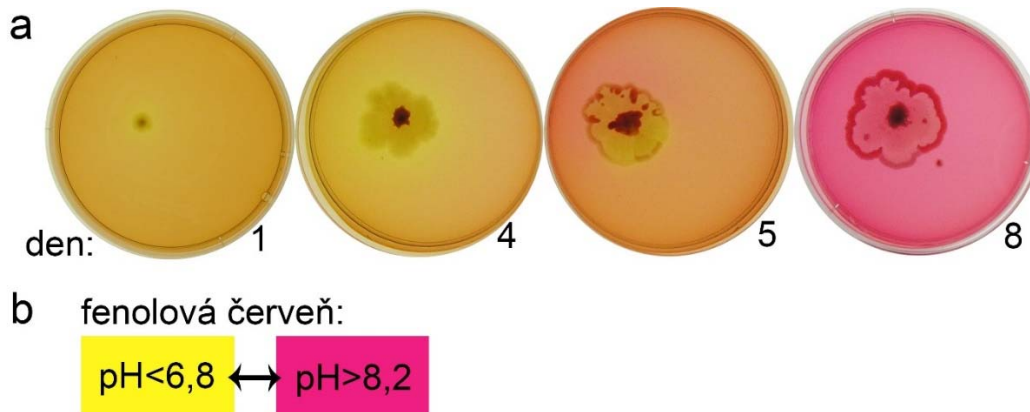
Obrázek 3.1: Srovnání vlivu makuly a roztoku čpavku za přepážkou. (i) kontrolní kolonie v sousedství vody; (ii) kolonie v sousedství 3 dny staré makuly; (iii) kolonie v sousedství roztoku čpavku; dokumentace 5. den růstu

Plynná analýza metodou SIFT-MS potom odhalila v plynné fázi nad tři dny starou makulou koncentraci čpavku v hodnotě 27185 ppb (parts per billion), což je zhruba 150x více, než bylo změřeno nad kontrolním živným médiem.

3.2. Sledování změn pH v čase kolem kolonií

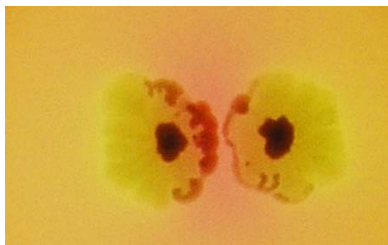
Změny pH jsme sledovali pomocí pH indikátoru (fenolová červeň) a zároveň měřením pH v agaru. Jak jsme předpokládali, amoniak, faktor ovlivňující přechod mezikruží – lem, alkalizuje prostředí (Palková

and Janderová 1997). Navíc jsme zjistili, že během prvních dvou dní se v bezprostřední blízkosti kolonie (i přes pufrací kapacitu živného agaru) snižuje pH z původní hodnoty 7,2 zhruba na hodnotu 6. Acidické prostředí vydrží zhruba do pátého dne, potom pH začne (pravděpodobně vlivem čpavku, srv. obr. 3.9iii-iv) stoupat až na hodnotu 8,6 a prostředí už zůstane nadále alkalické (obr. 3.2).



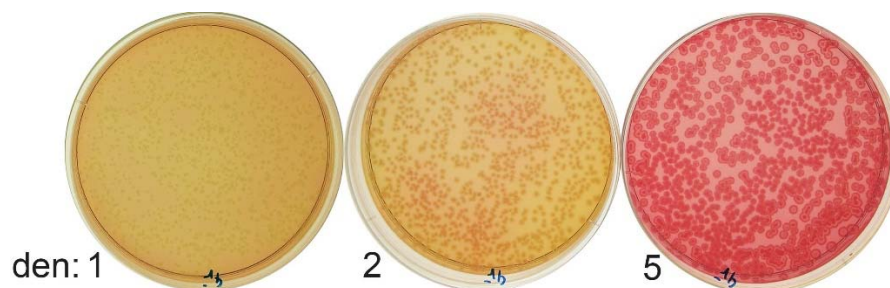
Obrázek 3.2: Změny pH okolního media při vývoji F kolonie. a) vývojová řada kolonie s vizualizovaným pH okolního agaru; b) přechodová škála indikátoru fenolové červeně

Alkalizace probíhá dříve v místech, kde je hustota kolonií lokálně zvýšena, což potvrzuje naše očekávání, že koncentrace signálu se lokálně zvyšuje. Příkladem je setkání dvou kolonií. Při vizualizaci pH v okolí takto sousedících kolonií pozorujeme zásaditou oblast na spojnici, kdežto na odlehlých stranách je hodnota pH v prostředí stále okolo 6 (obr. 3.3).



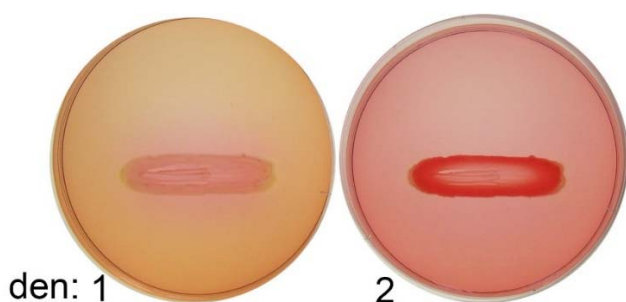
Obrázek 3.3: Včasnější alkalizace při setkání kolonií. Dokumentace 4. den růstu

Podobně při hustých výsevech pozorujeme nástup alkalické fáze již během druhého dne (obr. 3.4).



Obrázek 3.4: Změny pH okolního media při hustém výsevu F kolonií

Makula alkalizuje svoje prostředí již od prvního dne růstu (obr. 3.5).



Obrázek 3.5: Změny pH okolního media při vývoji F makuly.

Jak se alkalický signál z makuly šíří, ovlivňuje i pH v okolí vyvíjejících se kolonií v její blízkosti. Nejbližší kolonie se tak vyvíjejí v prostředí alkalickém, zatímco kolonie vzdálenější si po nějaký čas udrží ve svém okolí acidické prostředí (obr. 3.6).



Obrázek 3.6: Vliv alkalického signálu makuly F na vyvíjející se kolonie v sousedství.

Dále jsme sledovali změny pH agarů sousedícího za přepážkou s makulou nebo čpavkem. Roztok čpavku i makuly po třech dnech zvýší pH sousedního agaru na hodnotu cca 8,6. U kolonií následně inokulovaných na alkalizovaný agar nepozorujeme nástup acidické fáze během jejich vývoje (obr. 3.7).

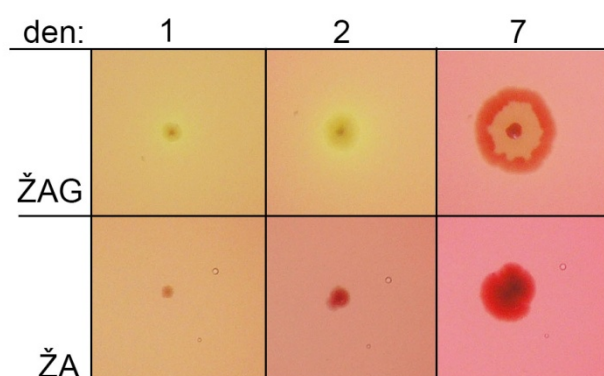


Obrázek 3.7: Vývoj F kolonií v alkalizovaném prostředí po třech dnech růstu makuly za přepážkou

3.3. Role glukosy při acidické fázi F kolonií

Výše uvedenou morfogenezi F kolonie se strukturou středu, mezikruží a lemu sledujeme pouze na živném agaru s glukosou (=ŽAG). Pokud glukosu nepřidáme, vzniká konvexní červená kolonie bez struktury mezikruží (Pátková et al. 2012).

Když jsme pomocí indikátoru vizualizovali změny pH v prostředí živného agaru bez glukosy, acidickou fází jsme nepozorovali a již od prvního dne nastoupila alkalická fáze (obr. 3.8).



Obrázek 3.8: **Rozdíl růstu a změny pH okolního media u vyvíjející se F kolonie na mediu s glukosou, nebo bez glukosy.** a) vývoj F kolonie na ŽAG; b) vývoj F kolonie na ŽA

Poukazujeme v souladu s literaturou na zřejmou souvislost mezi acidickou fází a přítomností glukosy v mediu a acidickou fází a růstem nepigmentovaného mezikruží.

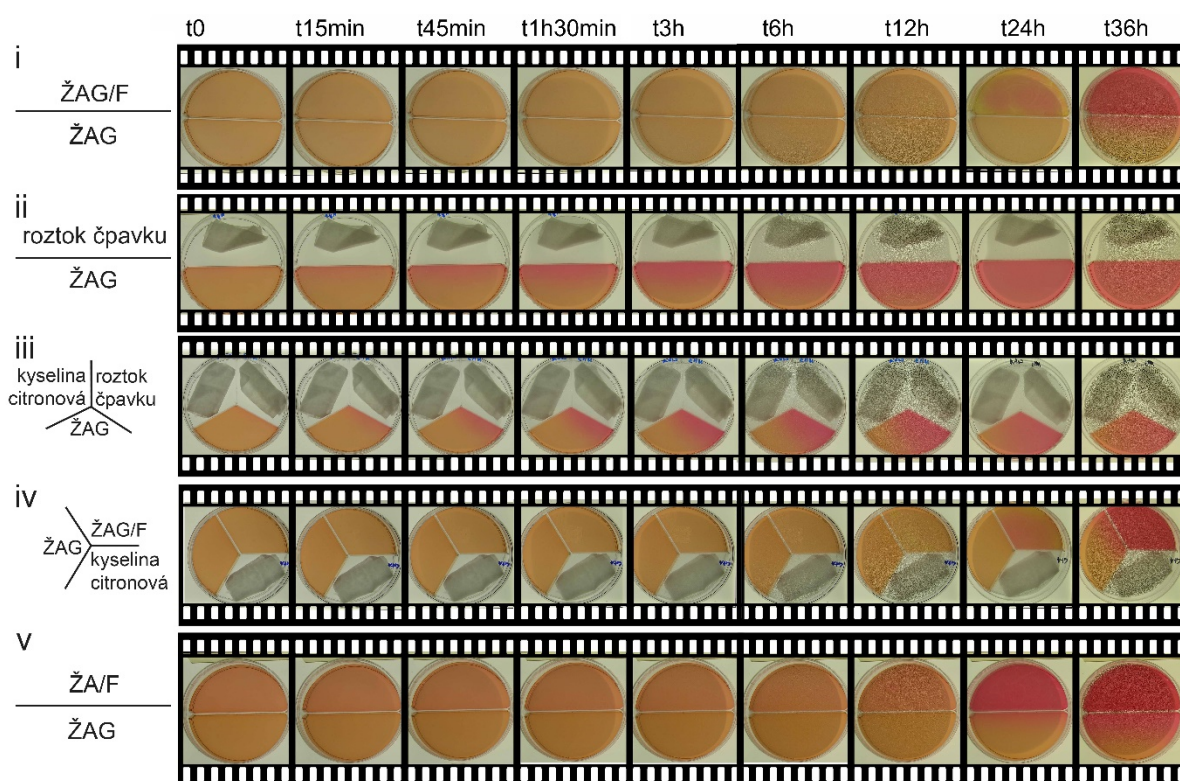
Bylo ukázáno (Solé et al. 2010), že když se k bakteriím *Serratia marcescens* přidá glukosa, začnou ji přednostně metabolizovat, a to vede k acidifikaci prostředí (posun asi o 1,5 jednotky), převážně díky produkci kyseliny octové, pyrohroznové a citronové, které bakterie vylučují do prostředí. Takto snížené pH vede k snížení produkce prodigiosinu. Snížení pH i jinými faktory vedlo ke stejným výsledkům. Naopak zvýšení pH na hodnotu 7,5, i přes přítomnost glukosy, vedlo ke zvýšení produkce prodigiosinu (Solé et al. 1994; Sole et al. 1997). Shodně s tím (Nijland and Burgess 2010) referují o indukci tvorby prodigiosinu působením čpavku, což souhlasí s námi pozorovaným růstem pigmentované struktury lemu na úkor nepigmentované struktury mezikruží.

3.4. Dynamika alkalizace

Sledovali jsem dynamiku alkalizace živného agaru v sousedství makul nebo roztoku čpavku za přepážkou pomocí časosběrné kamery. Nejrychleji byl ŽAG s pH indikátorem alkalizován roztokem čpavku v sousedním kompartmentu (3.9ii), poté makulou rostoucí na živném agaru bez glukosy

(3.9v), a nejpomaleji makulou na živném agaru s glukosou (3.9i). Toto odpovídá našim předchozím pozorováním.

Když jsme vizualizovali dynamiku změny pH v systému trojitě Petriho misky, kde v jednom kompartmentu byla kyselina citronová, která absorbuje amoniak z atmosféry, v druhém živný agar s makulou nebo roztokem čpavku, a ve třetím živný agar s pH indikátorem, pozorovali jsme, že v přítomnosti kyseliny citronové dochází k nehomogenní alkalizaci sousedního kompartmentu, což by odpovídalo vychytání čpavkového signálu v blízkosti absorbentu – kyseliny citronové (obr. 3.9iii-iv).



Obrázek 3.9: **Dynamika alkalizace ŽAGu emitorem čpavku za přepážkou.** Použité emitory: (i) makula F na ŽAG; (ii) roztok čpavku; (iii); roztok čpavku v přítomnosti kyseliny citronové; (iv) makula F na ŽAG v přítomnosti kyseliny citronové; (v) makula F na ŽA; viz video-soubory přiložené k této práci na CD

3.5. Závěry

Z předběžných výsledků lze stanovit, že struktura středu roste v prvním a částečně v druhém dni při neutrálním pH agaru jako výchozí růst. Struktura mezikruží se objeví během druhého dne, když vývoj kolonie vstoupí do kyselé fáze pravděpodobně způsobené metabolismem glukosy. Kyselá fáze je potom vystřídána fází alkalickou způsobenou produkcí čpavku, pravděpodobně zapříčiněnou metabolismem aminokyselin v živném agaru - čpavek produkovaný bakteriemi *E. coli* pochází

z metabolismu aspartátu (Bernier et al. 2011). V alkalické fázi potom strukturu mezikruží vystřídá struktura lemu.

Při roztírání inokulačního terčíku kolonií nad kritickou hodnotu pro růst mezikruží jsme pozorovali splynutí středové části a lemu. Předpokládáme, že se jedná o výchozí růst při neutrální a alkalickém pH - srv. růst na mediu bez glukózy nebo na mediu s glukosou již alkalizovaném, kde u vyvíjející se kolonie nepozorujeme acidickou fázi. Na druhou stranu, struktura mezikruží je typická pro acidickou fázi růstu.

4. Variabilita bakterií

Tématem této kapitoly je dědičná variabilita morfogeneze kolonií u *S. marcescens*.

Tvar kolonií morfotypu F je závislý na kultivačních podmínkách, ve kterém se vyvíjí (Pátková et al. 2012, obr. 3). V případě minimálního agaru však netvoří žádný viditelný nárůst, v tekutém minimálním mediu nenaroste (Pátková et al. 2012, str. 6-7). Pokoušeli jsme se získat/vyšlechtit variantu z morfotypu F, která by tvořila na minimálním agaru kolonie.

V literatuře nacházíme příklady bakteriálních kmenů tvořící varianty lišící se ve vlastnostech spojených s tvorbou kolonií. Zde uvedeme několik příkladů takových změn.

Dědičné změny morfotypu u *Paenibacillus dendritiformis* byly pozorovány v závislosti na podmínkách růstu, konkrétně na hustotě agaru (Ben-Jacob et al. 1998).

O bakteriích *Staphylococcus aureus* je známo, že při chronické infekci pacientů s cystickou fibrózou v plicích diversifikují na tzv. small colony variant, která je méně virulentní, ale resistantní proti antibiotikům. Rozdíl mezi oběma typy byl popsán jako jediná mutace v genu pro syntázu thymidylátu (Melter and Radojevič 2010).

Bakterie *Pseudomonas aeruginosa* opakovaně dávaly vznik různým variantám kolonií. Diferenciace se projevovala v různých vlastnostech, např. v povrchové motilitě, zbarvení, produkci exopolysacharidů, v požadavcích na živiny, resistenci na antibiotika, nebo v uvolňování bakterií z biofilmu (Boles et al. 2004). Pozorované alternativní fenotypy byly dále dědičné. Popsali diverzifikace tohoto druhu jako tzv. pojišťovací efekt (insurance effect) – vyčlenění části populace jako pojistku přežití pro případ, že nastanou nepříznivé podmínky.

Podobně bylo pozorováno rozrůznění i u *Serratia marcescens* (Koh et al. 2007). S různou frekvencí opakovaně vznikalo šest různých variant kolonií. Tyto nové morfologické varianty se od původního kmene lišily např. v přilnavosti k povrchům, schopnosti swarmingu, formování biofilmu, a v jiných vlastnostech, které jsou důležité pro vývoj biofilmů. Byla stanovena hypotéza, že geny důležité pro morfologii biofilmu nebo kolonií obsahují mutabilní hot-spoty (Vos and Velicer 2006).

U našeho klonu *S. marcescens* byla již dříve popsána diferenciace vzhledu kolonií v barvě, profilu, povrchu, konsistenci, schopnosti tvořit halo, nebo dokonce ve frekvenci další diferenciace (Neubauer 2002).

4.1. Změna morfotypu *S. marcescens*

Morfotyp F jsme inokulovali do roztoku minimálního media, kde se v jednom z mnoha případů po 24h F klon rozrostl. Tyto bakterie jsme vyseli na živný agar, kde jsme posléze pozorovali nárůst klasických F kolonií. Materiál z těchto kolonií jsme znovu inokulovali do minimálního media a opět

jsem získali po 24h nárůst bakteriální kultury. Odebrali jsme vzorek a vyseli na živný agar, ale opět jsme získali pouze klasické F kolonie. Když jsme vzorek z minimálního media znovu odebrali po 16 dnech a vyseli na živný agar, již jsme nepozorovali typické F kolonie, ale bílé konvexní kolonie, které jsme získali i po vysetí na minimální agar. Nově získanou variantu jsme označili jako morfotyp M.

Tato varianta byla nadále stabilní. Postrádá ale vlastnosti typické pro F. Na živném agaru jsou kolonie M menší, zcela postrádají typickou morfogenezi F kolonií, neprodukují červené barvivo prodigiosin, a na rozdíl od morfotypu F rostou na minimálním mediu (Pátková et al. 2012, obr. 1).

Nově vzniklý morfotyp M jsme porovnali s původním morfotypem F metodou MALDI-TOF a pomocí PCR fingerprintů. Oba morfotypy F i M se ve výsledcích obou metod shodovaly.

5. Interakce bakteriálních druhů

Bakterie jsou v přírodě zapojené do bohaté sítě interakcí mezi sebou i s eukaryotickými organismy. V minulých kapitolách jsme popisovali stav, kdy je morfortyp F z těchto interakcí vyvázaný ("germ-free organism"), abychom podhalili faktory zodpovědné za jeho morfogenezi. V této kapitole se naopak zaměříme na to, jak se do morfogeneze F kolonií promítnou interakce s jinými kmeny bakterií.

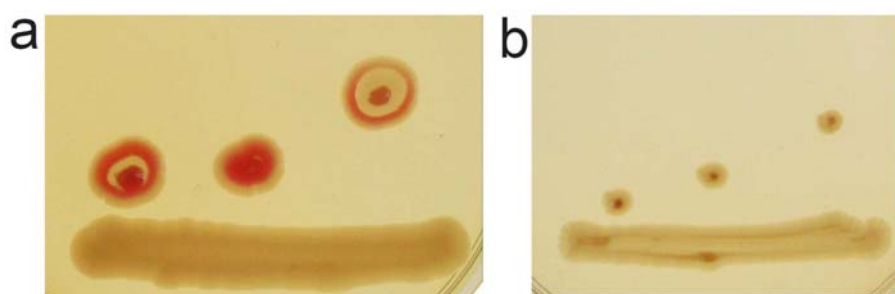
Jako první příklad uvedeme interakce morfortypu F s morfortypem M, z morfortypu F odvozeného. V této kapitole dále rozšíříme katalog interakcí kolonií F o interakce s *S. rubidaea* (příště označovanou jako klon R) a *Escherichii coli* (Ec). Výsledky byly prezentovány v publikacích Pátková et al. 2012 - viz příloha 1 a Sovova et al. 2013 – viz příloha 2.

5.1. Interakce *S. marcescens* morfortypu F a morfortypu M

Morfortyp M má nové vlastnosti, díky kterým může přispět novou kvalitou do následných interakcí s morfortypem F.

Kolonie F jsme inokulovali do blízkosti makuly M. Přítomností M klonu byla znovu ovlivněna i rychlost vývoje jednotlivých struktur F kolonie a může dojít k úplné ztrátě mezikruží podobně jako v případě působení makuly F. Také jsme pozorovali reakci F kolonie ve formě vytvoření bílého lemu nejprve směrem k makule M, potom po celém jejím obvodu (obr. 5.1a). Jak ukážeme dále, toto je typická reakce kolonií F na cizí nárůst v jeho blízkosti.

Když inokulujeme kolonie morfortypu F a M do blízkostí na minimálním mediu, přítomnost nárůstu morfortypu M pomůže kolonii F, aby se na tomto mediu rozrostla (obr. 5.1b). Jak se ukázalo, i jiné testované klony dokážou pomoci *S. marcescens* klonu F, aby se na minimálním agaru rozrostl (připravovaná publikace Rieger et al.).

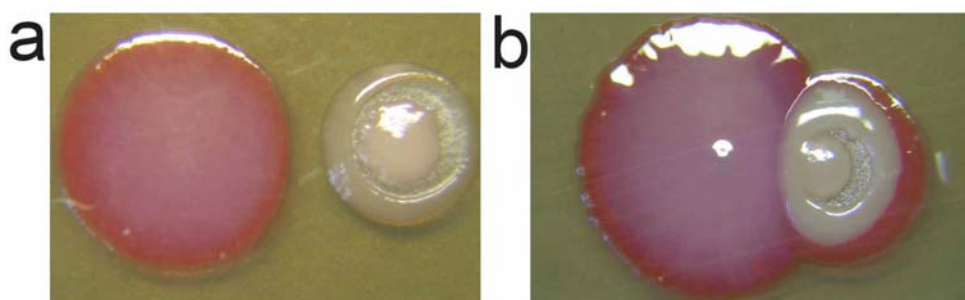


Obrázek 5.1: **Vliv makuly morfortypu M na kolonie morfortypu F.** a) interakce na ŽAG – povšimněte si tvorby bílé struktury u F kolonie; b) interakce na MMA; dokumentováno 5. den růstu; srv. (Pátková et al. 2012, obr. 4)

5.2. Interakce *S. marcescens* a *S. rubidaea*

Následují interakce se vzdálenějším příbuzným, koloniemi *Serratia rubidaea*. Kolonie *S. rubidaea* má podobně jako kolonie *S. marcescens* ukončený růst okolo 7. dne, konečná velikost je však více než 20 mm.

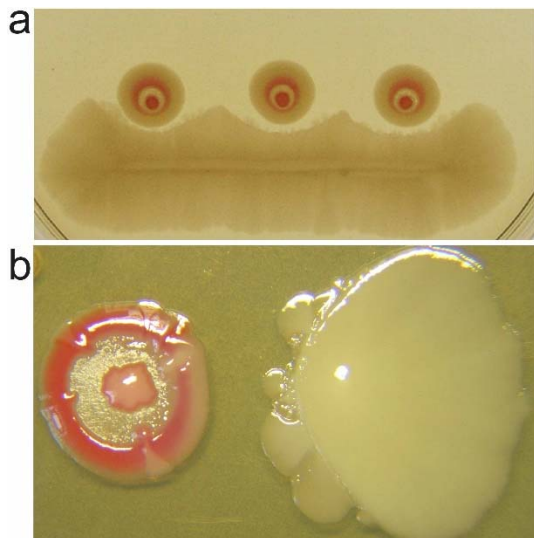
Při inokulacích do větší vzdálenosti pozorujeme opět typickou reakci F kolonií na cizí nárůst – tvorbu bílého lemu (obr 5.2a). Pokud navíc inokulujeme do těsné blízkosti kolonie F a R, kolonie *S. rubidaea* kolonii *S. marcescens* obrůstá nejdříve tenkou linkou – což *S. marcescens* znemožní další rozrůstání. Tato tenká linka se potom mohutně rozroste (obr 5.2b).



Obrázek 5.2: **Interakce kolonií F a R.** a) vliv na vzdálenost středů kolonií 15 mm; b) vliv na vzdálenost středů 5 mm – povšimněte si obrostení F kolonie R partnerem; dokumentace 3. den růstu; srv. (Pátková et al. 2012, obr. 6)

5.3. Interakce *S. marcescens* a *E. coli*

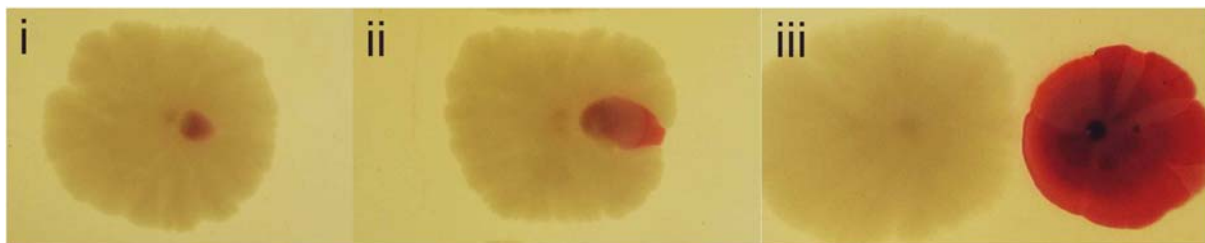
Dále jsme pozorovali interakce s *Escherichia coli*. I kolonie *E. coli* mají na živném agaru ukončený růst okolo 7. dne a dosahují velikosti asi 25 mm. Při inokulacích do větší vzdálenosti znovu pozorujeme u *S. marcescens* tvorbu bílého lemu, kdežto u *E. coli* pozorujeme výraznou inhibici růstu směrem k *S. marcescens*. Tato repulze se prohloubí, pokud budeme kolonie inokulovat do větší blízkosti nebo budeme *Ec* inokulovat ke starší kolonii F (obr. 5.3b). Toto je pravděpodobně způsobeno působením tzv. marcescinu (Fuller and Horton 1950) – tj. faktoru podobného colicinům. Podobnou repulzi *E. coli* pozorujeme i v reakci na kolonie morfotypu M (neukázáno).



Obrázek 5.3: **Interakce kolonií F a Ec.** a) kolonie F v přítomnosti makuly Ec (dokumentace 5. den vývoje); b) kolonie F, ke které po dvou dnech růstu byla inokulována kolonie Ec do vzdálenosti středů 15 mm (dokumentace 5. den vývoje kolonie Ec); z (Pátková et al. 2012, obr. 3 a 7)

5.4. Interakce *S. rubidaea* a *E. coli*

Také jsme pozorovali vzájemné interakce R a Ec. Při blízkém sousedství dojde k pohlcení kolonie R kolonií Ec. Čím je jejich vzdálenost menší, tím výraznější je pohlcení (obr. 5.4).



Obrázek 5.4: **Interakce kolonií R a Ec.** Vzdálenost středů 2 mm (i); 5 mm (ii); 15 mm (iii); dokumentace 5. den růstu; srv. (Pátková et al. 2012, obr. 8)

5.5. Chimérická inokulace

Další způsob, jak pozorovat vývoj kolonie pod vlivem heterospecifického partnera, bylo smíchat suspenzní kultury v poměru 1:1, inokulovat 1 μ l suspenzní směsi na živný agar a sledovat, jak se projeví pozorované vztahy v takto těsném sousedství.

5.5.1. Chiméra F/R

Chiméra směsi F a R narostla vždy tak, že v místě inokulačního terčíku jsme našli kombinaci obou druhů, kdežto v následném nárůstu do šířky byly pouze bakterie R.



Obrázek 5.6: **Chimérická kolonie F/R.** z (Pátková et al. 2012, obr. 11)

5.5.2. Chiméra F/Ec

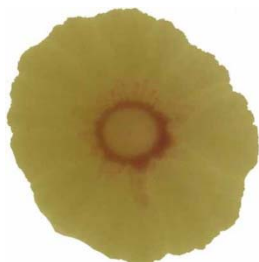
Chimérická směs F a Ec narostla do dvou možných variant. V první variantě zřejmě došlo k potlačení růstu Ec růstem F podobným způsobem, jako docházelo k vyvolání repulze kolonií. Výsledná kolonie byla prakticky nerozeznatelná od standardní F kolonie. V druhém případě převládla Ec, která obsadila okraj chiméry - někdy zcela, jindy pouze částečně. Vždy ale byla v místě inokulačního terčíku nalezena pouze F, Ec byla pod hranicí detekce.



Obrázek 5.7: **Dvě varianty chimérické kolonie F/Ec.** z (Pátková et al. 2012, obr. 11)

5.5.3. Chiméra R/Ec

Chimérická směs R a Ec ukázala znovu podobný trend jako interakce v těsné blízkosti – rozrůstání bylo ve finále tvořeno pouze buňkami Ec a v místě inokulačního terčíku jsme našli směs obou.



Obrázek 5.8: **Chimérická kolonie R/Ec.** z (Pátková et al. 2012, obr. 11)

5.5.4. Chiméra F/R/Ec

V ternární chimérické směsi F/R/Ec pozorujeme kombinaci všech předchozích jevů, a to včetně dvou variant interakce F s Ec. V první variantě F potlačí Ec, a tak má R volnou cestu k obrůstání jako

v případě R/F. V místě inokulačního terčíku byla detekována směs F a R. Občas ale došlo k obsazení okolí Ec podobně jako u nestabilního fenotypu chiméry F/Ec. Zde jsme znovu na místě inokulačního terčíku našli pouze kombinaci R a F, Ec byla pod hranicí detekce.



Obrázek 5.9: **Dvě varianty chimérické kolonie F/R/Ec.** z (Pátková et al. 2012, obr. 11)

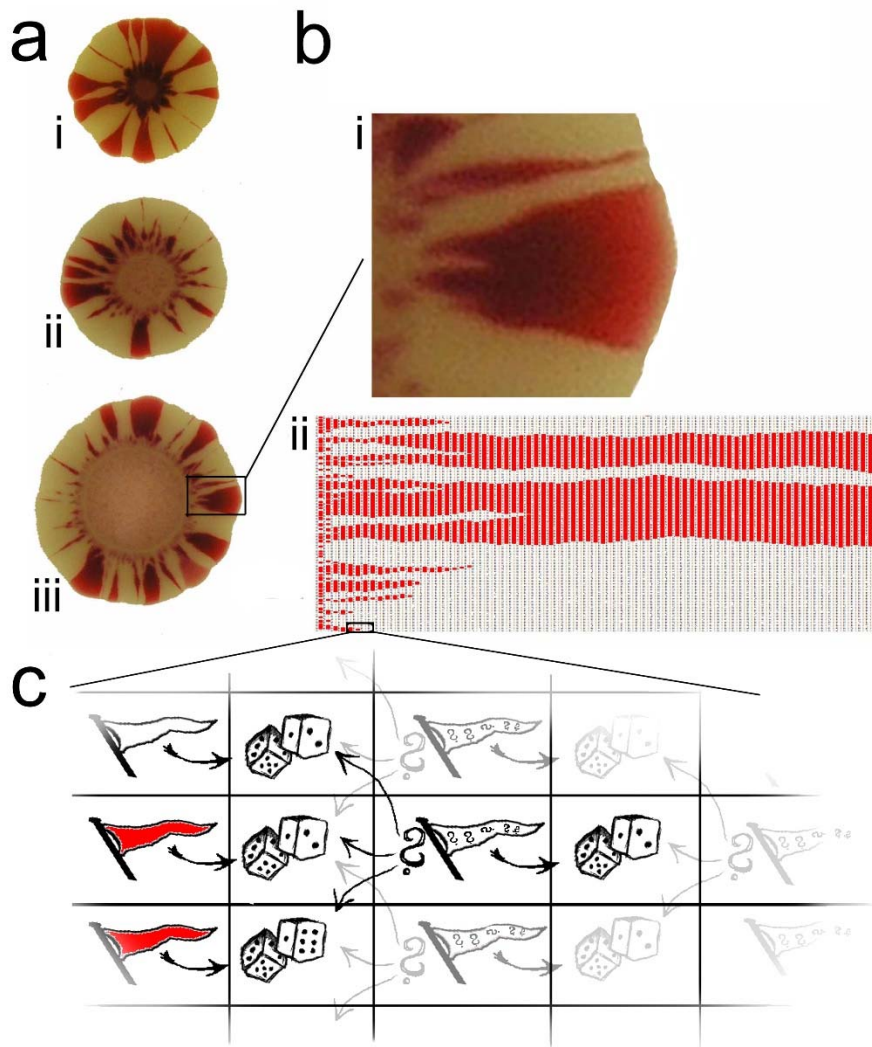
Zdá se, že o vzhledu chimér rozhoduje rychlost postupu do volného prostoru – kdo zabere vnější prostor, má možnost dalšího rozrůstání. Podobně jako v případě těsných interakcí, kde kolonie R tenkou linkou obkroužila F kolonií. Proto občas v případě F a Ec můžeme pravděpodobně vidět situaci, kdy Ec v časných fázích vývoje, kdy ještě není potlačena nárůstem F, obsadí okraj chiméry. Tak znemožní další rozrůstání F do volného prostoru a hladina repulzivního faktoru nepotlačí další rozrůstání Ec.

5.5.5. Chiméra R/W

Ilustrativní je výsledek chimérického růstu směsi klonů prakticky stejné potence. K dispozici máme červený (R) a jeho nepigmentovanou variantu bílý (W) klon *S. rubidaea* s přibližně stejnými vlastnostmi - viz (Pátková et al. 2012 str. 11; obr. 10).

Při inokulaci chimérických R/W kolonií jsme rozšiřovali inokulační terčík. V jeho prostoru vyrůstá oblast červených a bílých mikrokolonií a do okolního prostoru se rozrůstají paprsky jednoho a druhého morfortypu. Paprsky vyrůstají v překvapivě malém počtu ve srovnání s počtem bakterií, které by měly na obvodu inokulačního terčíku v náhodném rozložení být (obr. 5.10a).

Tento jev se dá zjednodušeně matematicky simulovat i v prostředí programu MS Excel. Obrázek 5.10bii představuje výsledek takové simulace. Barva buněk reprezentuje dva různé klony. Úvodní buňka je na 50 % červená a na 50 % bílá. Každá další buňka v řádku je kopií jedné ze tří nejbližších předchozích buněk; té které bylo přiřazené nejvyšší náhodné číslo (obr. 5.10c). I přes značnou počáteční variabilitu rozložení obou variant se po nemnoha krocích vytvoří jen několik kompaktních proudů. Podobný systém byl popsán jako modelový případ evolučního driftu (Hallatschek et al. 2007).

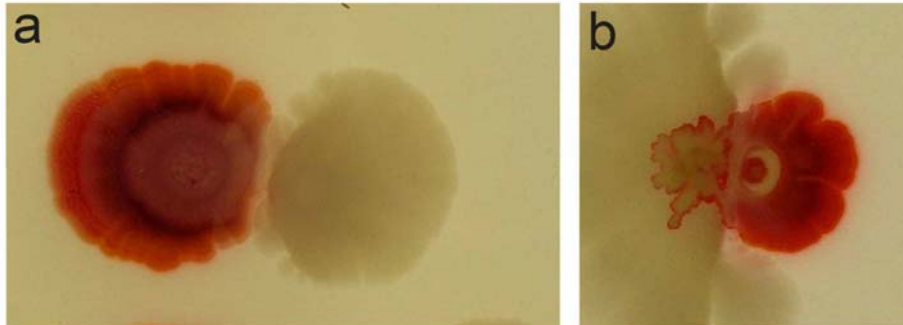


Obrázek 5.10: **Chimérická kolonie R/W.** a) rozšiřující se průměr inokulačního terčíku R/W chimér: 2 mm (i), 5 mm (ii); 14 mm (iii); b) detail paprskovitého růstu R a W klonu do prostoru (i) a ukázka výstupu modelu takového růstu (ii); c) schéma modelu: jedná se o tabulku, kde se v každém řádku pravidelně střídají dva typy políček: políčko, jemuž je přiřazeno náhodné číslo a políčko, které může nabývat dvou stavů (červená/bílá); toto políčko nabude svého stavu tak, že najde nejvyšší číslo mezi třemi nejbližšími předchozími políčky s náhodným číslem a zkopíruje stav políčka, které se nachází před tímto číslem. První sloupec políček nabývá stavu náhodně.

5.6. Interakce chimér s koloniemi

Interakce chimér s jednodruhovou kolonií jsou většinou řízeny klonem, který kontroluje okraj. Avšak objevili jsme určité výjimky. Jedná se o kombinaci chiméry R/F s kolonií Ec a chiméry R/Ec s kolonií F. Chiméra F/R částečně projevuje vlastnosti obou druhů – F zůstává sice uzavřena pouze v místě inokulačního terčíku, ale produkuje dostatečné množství odpuzujícího faktoru tak, aby chiméra F/R odpuzovala Ec (obr. 5.11a).

U chiméry *Ec/R* a kolonie *F* pozorujeme nejprve odpuzení růstu *Ec* u chiméry v místě přilehlém s kolonií *F*. Do takto uvolněného prostoru z chiméry může uniknout nárůst *R*. Jakmile se *R* dostane ke kolonii *F*, začne ji standardním způsobem obrůstat (obr. 5.11b).

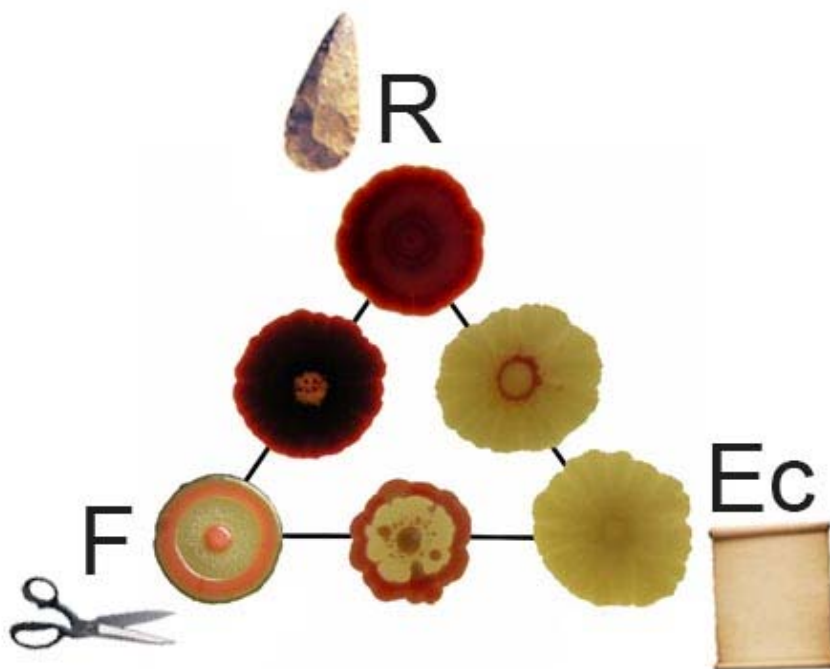


Obrázek 5.11: **Interakce chimérických kolonií *F/R-Ec* a *R/Ec-F*.** a) interakce chiméry *F/R* a kolonie *Ec* na vzdálenost středů 15 mm; b) interakce chiméry *R/Ec* a kolonie *F* na vzdálenost středů 5 mm; dokumentace 7. den růstu; z (Pátková et al. 2012, obr. 11)

5.7. Závěry

Vliv všech zkoumaných klonů na vývoj kolonie *F* ukazuje na podobné trendy jako při vzájemné interakci *F* nárůstu – zmenšený růst v blízkosti jiného nárůstu, urychlení vývoje struktury lemu, pravděpodobně opět vlivem amoniaku. Nově pozorujeme indukci vzniku bílého okraje. Navíc, nárůst *R* má tendenci *F* kolonie obrůstat. Klon *F* má schopnost odpuzovat růst *Ec*. Interakce kolonií *R* a *Ec* vede k pohlčení kolonií *R* kolonií *Ec*. Tyto vztahy se potom projeví i při chimérické inokulaci.

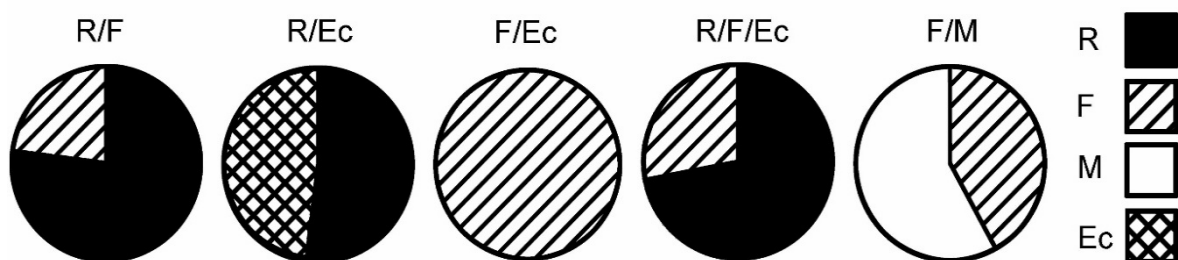
Takto sumarizované interakce nám ukazují heterarchii připomínající hru kámen, nůžky, papír (obr. 5.12). V literatuře se můžeme setkat s podobným systémem u *E. coli*, kde kombinace producent toxinu-resistent-sensitiv dokáže koexistovat bez ultimátního vítěze a udržovat tak po dlouhou dobu diverzitu populace (Kerr et al. 2002).



Obrázek 5.12: Schéma heterarchie kámen-nůžky-papír v našem systému interakcí a chimér.

5.8. Směsi v suspenzi

Sledovali jsme, do jaké míry jsou tyto jevy vázané na nárůst na agaru - tj. na prostorové uspořádání chiméry. Vyzkoušeli jsme, jestli budou podobné vztahy pozorovány i ve směsných suspenzních kulturách. Do živného bujónu s glukosou (=ŽBG) jsme inokulovali směsi klonů 1:1 (obr. 5.13). Po 24h růstu jsme sledovali, jak se poměry v suspenzi změnil.



Obrázek 5.13: Poměry jednotlivých klonů v suspenzní kultuře. podle (Pátková et al. 2012, obr. 11)

Výsledky sice zhruba odpovídají pozorováním na misce, ale nejsou již tak jednoznačné. V tekutých kulturách nelze totiž zamezit partnerovi v růstu včasným zabráním prostoru. Vidíme, že R nezamezí růstu F partnera ve směsi, stejně tak Ec nezamkne R uprostřed chiméry.

5.9. Plynný fingerprint

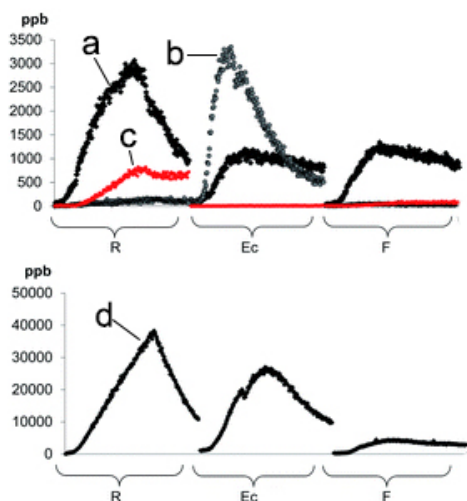
Výsledky popsané v následující kapitole jsou obsažené v publikaci Sovova et al. 2013, viz příloha 2.

V tekuté kultuře můžeme snadno kvantifikovat poměr obou partnerů odběrem, výsevem a počítáním kolonií, počet odběrů je však limitovaný. Také nás zajímalo, zda by šlo podobně určit poměr přítomných partnerů i ve vyvíjejících se chimérách na pevném mediu, případně i v jiných prostředích, kde by se mechanickým odběrem vzorku celý systém narušil. Hledali jsme metodu, která by byla neinvazivní a nezasahovala do vyvíjejícího se těla.

Jako nadějná metoda se ukazuje detekce plynných látek produkovaných bakteriemi. Poměry plynných látek produkovaných jednotlivými druhy bakterií jsou druhově specifické a takové fingerprinty jsou již využívány pro detekci a identifikaci bakteriálních patogenů z dechu pacienta (Allardyce et al. 2006; Shestivska et al. 2012; Sovova et al. 2013). Metoda pro určení množstevních poměrů dvou či více druhů bakterií však ještě vyvinuta není.

Pro detekci plynných látek jsme použili jsme metodu SIFT-MS – jedná se o přímou kvantitativní hmotnostní spektrometrii, založenou na chemické ionizaci během přesně definovaného reakčního času. Výhodou této metody je taková rychlost měření, že můžeme mít prakticky kontinuální profil dynamiky vývoje složení populace.

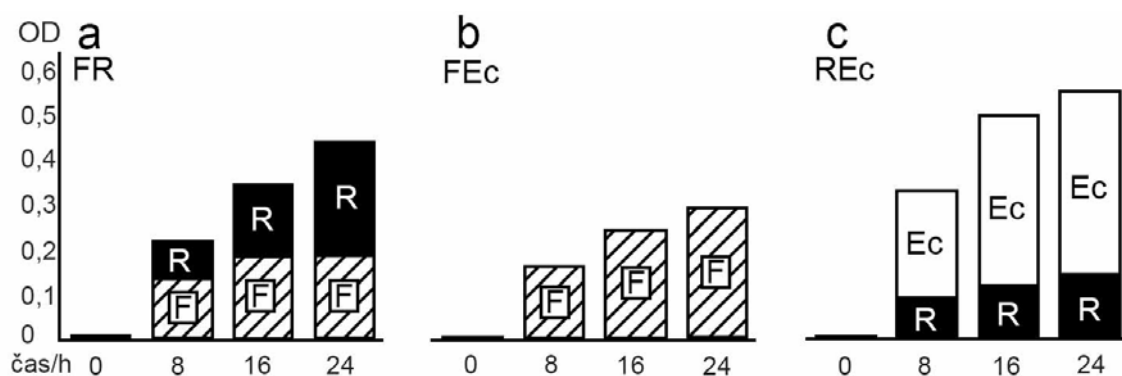
Zajímavé vedlejší zjištění se nám ukázalo na změnách koncentrace několika vybraných sloučenin (acetaldehyd, propanol, 3-hydroxy-2-butanon a etanol) během 24h kultivace (obr 5.15). Časový profil křivek ukazuje zvyšování koncentrace jednotlivých sloučenin ve shodě s rostoucím počtem bakterií. V určitém bodě ale křivka dosáhne maxima a potom se koncentrace snižuje. Podle růstových křivek tento bod zhruba odpovídá přechodu z exponenciální do stacionární fáze. Snižování koncentrace těchto plynných složek může být způsobeno zastavením produkce po přechodu do stacionární fáze a následnou ztrátou v důsledku odběru plynu na měření (rychlostí 20 ml/min bylo celkově odebráno 28 l).



Obrázek 5.15: **Změny koncentrace plynných látek v průběhu kultivace.** a) acetaldehyd; b) propanol; c) acetoin; d) etanol; z (Sovova et al. 2013, obr. 3)

Během 24h růstu suspenzní kultury jednotlivých klonů F, R a Ec jsme měřili koncentrace plynných látek ve vzdušné fázi nad suspenzí. Potom jsme vybrali referenční metabolity a sestavili typické fingerprinty pro jednotlivé klony - viz (Sovova et al. 2013, tabulka 1).

Dále jsme přistoupili k měření plynné fáze nad binárními směsmi těchto klonů (FR, REc, FEc). Zároveň jsme určovali poměr bakterií jednotlivých klonů v suspenzích pomocí výsevu na misku v osmihodinových intervalech.



Obrázek 5.14: **Poměrné zastoupení klonů ve směsích v různých časech.** a) směs FR; b) směs FEc; c) směs REc; viz (Sovova et al. 2013, obr. 2)

Byla navržena první verze matematického modelu k propočítání poměrů jednotlivých klonů ve směsi ze složení plynných látek – viz (Sovova et al. 2013). Tato metoda by v dalším kroku mohla vést také k diagnostice superinfekcí nebo infekcí, kde se nachází několik infekčních variant z dechu pacienta.

6. Antibiotika

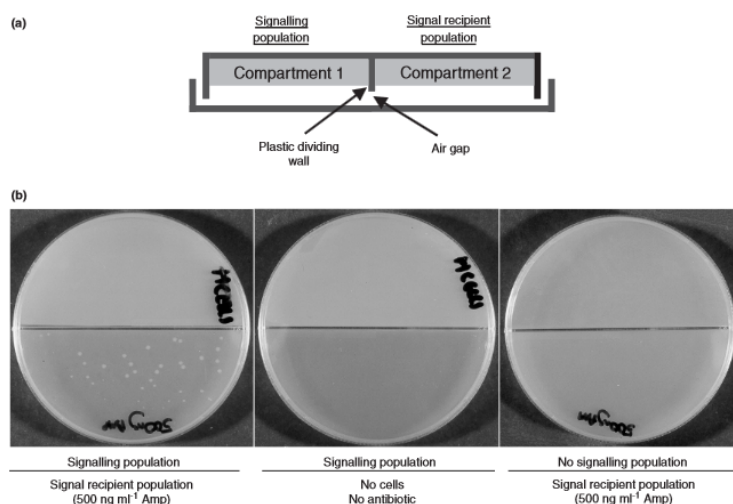
V této kapitole ukážeme vliv ampicilinu na morfogenezi kolonií morfotypu F a rozšíříme zkoumání vlivu amoniaku o fenomén indukce resistance k antibiotikům. Zároveň představíme alternativní vysvětlení jevů popsaných v literatuře. Rukopis vznikající publikace na toto téma viz příloha Čepel et al. – viz příloha 3.

6.1. Indukovaná resistance

Nejprve stručné představení fenoménu indukované resistance tak, jak je popsán v literatuře:

U *E. coli* byla dokumentována schopnost vyvolat resistenci proti ampicilinu u sousední populace pomocí vzduchem šířitelného signálu. Na jedné polovině dělené misky byl hustý výsev *E. coli* a po 24h růstu této signální populace byl na sousední polovinu s médiem s ampicilinem přidán výsev *E. coli* (tentokrát řidší, aby byly pozorovatelné jednotlivé kolonie). Výsev, který měl v sousedství nárůst signální populace narostl, výsev, kterému se signálu nedostalo, nenarostl (obr. 6.1). Nejedná se o dědičnou, ale o indukovanou resistenci – potomstvo odpovídá na ampicilin opět sensitivně (Heal and Parsons 2002).

Autoři předpokládají, že signální látkou je indol. To bylo ale posléze vyvráceno podobnými pokusy s indukovanou resistencí na tetracyklin (Lu 2004), kde byl jako signalizující populace použit nárůst kmene neschopného produkovat indol a přesto tato signální populace indukovala resistenci k tetracyklinu.



Obrázek 6.1: Schéma a výsledek experimentu indukovaní resistance; převzato z (Heal and Parsons 2002)

Identifikaci signálu indukujícího resistenci provedla skupina Bernier et al. 2011. Vytvořili experimentální nastavení, ve kterém nechali působit místo signálního nárůstu kondiciované medium (kondiciováno 24h *E. coli*) na výsev bakterií na mediu s inhibiční koncentrací tetracyklinu. Pozorovali nárůst všech bakterií, které byly vystaveny působení tohoto kondiciovaného media. To se týkalo *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* a *Staphylococcus aureus*.

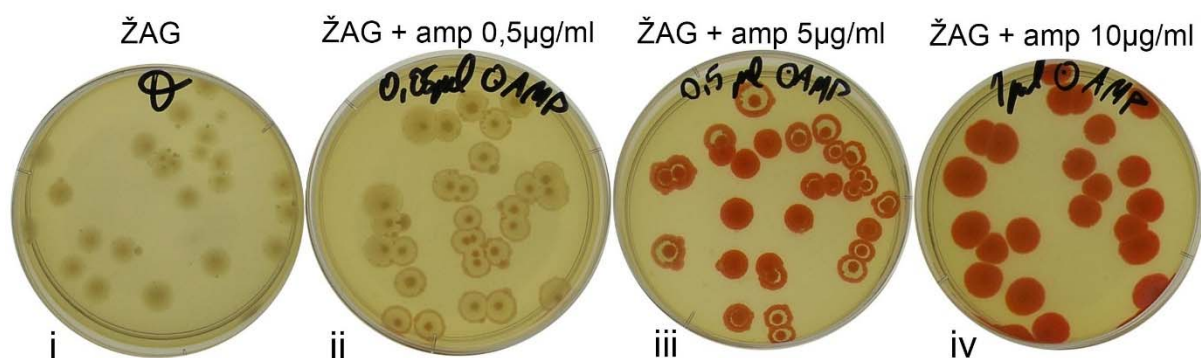
Konkrétní signální látku hledali pomocí použití různých mutant *E. coli*. Zjistili, že kondiciované medium z těch mutant, které nesly defekt v metabolismu aspartátu, nevyvolávalo resistenci u recipientní populace. Bakterie defektní v tomto genu zároveň nebyly schopné produkovat amoniak. Podobné výsledky jako s kondiciovaným mediem potom skutečně dostali i s použitím roztoku čpavku.

Účinek amoniaku na vyvolání resistance je vysvětlován tak, že jeho metabolismus vede ke zvýšení koncentrace vnitrobuněčných polyaminů - putrescinu, sperminu a spermidinu. Polyaminy chrání bakterie před oxidativním stresem např. vázáním se k nukleovým kyselinám (Tkachenko et al. 2001; Tkachenko and Nesterova 2003; Tkachenko 2004; Tkachenko et al. 2006; Tkachenko et al. 2012) nebo snížením propustnosti membrány (Bernier et al. 2011).

6.2. Změna morfogeneze kolonie v závislosti na nízkých dávkách antibiotik

Zjistili jsme, že když zvyšujeme koncentrace ampicilinu v ŽAG, tak dříve než dojde ke snížení počtu kolonií *S. marcescens* z výsevu, dojde k ovlivnění jejich standardní morfogeneze. Již při koncentraci ampicilinu 0,5 µg/ml dochází k urychlení vývoje. Při koncentracích ampicilinu nad 5 µg/ml dochází k rychlejšímu vývoji kolonií a začínají se objevovat hladké červené kolonie bez typické struktury, podobně jako v případě vlivu čpavku (obr. 6.2). Průběh změn pH v těchto podmínkách probíhá standardně s nástupem acidické fáze růstu, po kterém následuje fáze alkalická. Výsledky ukazují na další možnost ovlivnění morfogeneze.

Počet kolonií *S. marcescens* z výsevu začne oproti kontrole klesat až při koncentraci ampicilinu mezi 100 a 200 µg/ml; při koncentraci ampicilinu 200 µg/ml klesne počet kolonií na cca 50 % kontroly. Úplnou inhibici nárůstu pozorujeme při koncentraci ampicilinu 300 µg/ml. U *S. rubidaea* i *E. coli* byla koncentrace ampicilinu 10 µg/ml pro úplnou inhibici růstu dostatečná.



Obrázek 6.2: **Vývoj F kolonií v přítomnosti ampicilinu.** Koncentrace ampicilinu v mediu: 0 µg/ml (i); 0,5 µg/ml (ii); 5 µg/ml (iii); 10 µg/ml (iv); dokumentace 4. den růstu; viz příloha 3

6.3. Pozorování indukované resistance

Testovali jsme, zda bude pozorován fenomén indukované resistance i v našem systému se *S. marcescens*, *S. rubidaea* a *E. coli*. Pro získání indukované resistance jsme použili dělenou misku, kde v jednom kompartmentu byl ŽAG bez antibiotika, na který byla inokulována makula F, R nebo 0,1 % roztok čpavku a v druhém kompartmentu byl ŽAG s ampicilinem. Makuly a roztok čpavku působily tři dny svou plynnou fází na ŽAG s ampicilinem, kontrolou byla miska s ŽAG a ampicilinem ve stejných podmínkách, ale bez ovlivnění. Po třech dnech jsme na živný agar s ampicilinem a na kontrolní misku vyseli suspenzi F, R nebo Ec.

V případě výsevu *S. marcescens* jsme použili koncentraci ampicilinu v mediu 300 µg/ml.

Na kontrolním ŽAG s ampicilinem i na ŽAG s ampicilinem vystavenému působení makuly F jsme růst kolonií nepozorovali. Avšak na ŽAG s ampicilinem vystavenému působení 0,1 % roztoku čpavku jsme pozorovali 33 % nárůst oproti kontrole bez ampicilinu (obr. 6.3a).

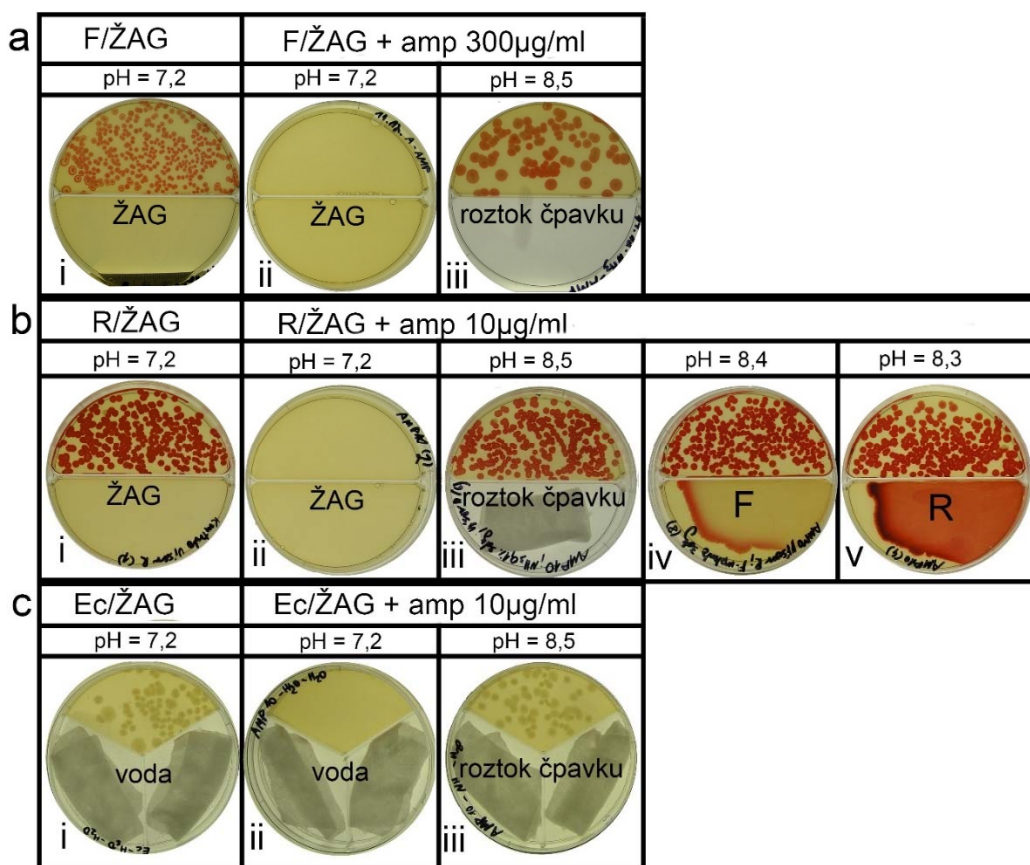
V následujícím experimentu jsme snížili koncentraci ampicilinu v ŽAG na 200 µg/ml. Zde narůstá 46 % F kolonií oproti kontrole. Když jsme takový ŽAG s ampicilinem vystavili třídnímu působení makuly F vyrostlo 66 % kolonií oproti kontrole bez ampicilinu a v případě vystavení 3 dennímu vlivu roztoku čpavku vyrostlo 100 % oproti kontrole (neukázáno).

V případě obdobného pokusu se *S. rubidaea* jsme použili koncentraci ampicilinu 10 µg/ml. Při vysetí na ŽAG s ampicilinem pod třídním vlivem makul R, F, nebo roztoku čpavku vyrostlo vždy 100 % kolonií oproti kontrole bez ampicilinu (obr. 6.3b).

Při použití koncentrace ampicilinu 100 µg/ml v ŽAG narostla *S. rubidaea* pouze tam, kde byl jako induktor resistance použit třídní vliv roztoku čpavku, nárůst kolonií byl tomto případě také 100 % kontroly bez ampicilinu (neukázáno).

Při výsevech *E. coli* jsme použili koncentraci ampicilinu 10 µg/ml. Nárůst jsme pozorovali pouze na ŽAG s ampicilinem, který byl vystaven třídnímu působení roztoku čpavku (100 % oproti kontrole bez ampicilinu), makuly Ec, F ani R zvýšenému přežití nepomohly (obr. 6.3c).

Ve všech případech, po vystavení třídního působení makul nebo 0,1 % čpavku, stoupla hodnota pH u sousedního ŽAG s ampicilinem z původní 7,2 na hodnotu 8,3-8,5.



Obrázek 6.3: Vliv makul a čpavku na indukovanou resistenci u *S. marcescens* a *S. rubidaea*.

hodnoty pH ukazují stav v momentě výsevu bakterií

a) *Serratia marcescens*

(i) kontrola bez ampicilinu; (ii) živný agar s 300 µg/ml ampicilinem; (iii) živný agar s 300 µg/ml ampicilinem v sousedství roztoku čpavku

b) *Serratia rubidaea*

(i) kontrola bez ampicilinu; (ii) živný agar s 10 µg/ml ampicilinem; (iii) živný agar s 10 µg/ml ampicilinem v sousedství roztoku čpavku; (iv) živný agar s 10 µg/ml ampicilinem v sousedství makuly *S. marcescens*; (v) živný agar s 10 µg/ml ampicilinem v sousedství makuly *S. rubidaea*

c) *Escherichia coli*

(i) kontrola bez ampicilinu; ; (ii) živný agar s 10 µg/ml ampicilinem; (iii) živný agar s 10 µg/ml ampicilinem v sousedství roztoku čpavku

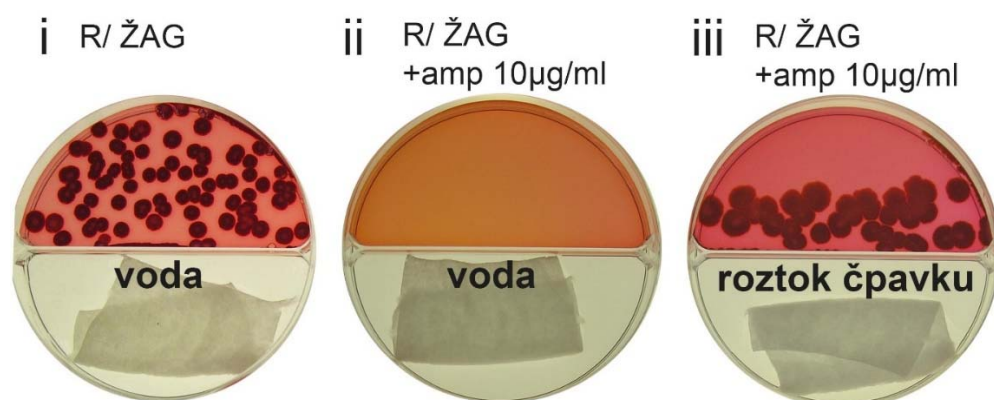
Makuly i roztok čpavku vyvolávaly plynným působením u recipientních populací resistenci k antibiotiku. Na rozdíl od příkladů z literatury, kde stačilo makulám na rozrostení a produkci dostatečného množství signálu 24h, jsme však dostávali u recipientních kolonií odpověď až v přítomnosti tři dny staré makuly. Když jsme použili dva dny starou makulu, pozorovali jsme určitou míru indukované resistance, ale jeden den stará makula resistenci nezvyšovala.

Vysvětlení se může nacházet v suplementaci media glukosou. Jak bylo ukázáno u dynamiky alkalizace sousedního media (obr. 3.9 - dynamika alkalizace), makula rostoucí na ŽAG má oproti makule rostoucí na ŽA značnou prodlevu v alkalizaci sousedního kompartmentu. V experimentech (Heal and Parsons 2002; Lu 2004) bylo použito medium bez glukosy, (Bernier et al. 2011) také ukazují, že 24h kondicionované medium s glukosou nevyvolává indukovanou resistenci. V případě signální makuly na ŽA jsme také pozorovali částečnou alkalizaci sousedního kompartmentu již během 24h. Rychlost alkalizace je zjevně i důvod proč působení roztoku čpavku v porovnání s působením makul vyvolává u nárůstu na sousedním ŽAG s ampicilinem nejvyšší resistenci.

6.4. Dynamika alkalizace vs. indukovaná resistance

Když jsme na ŽAG s 10 µg/ml ampicilinu inokulovali *S. rubidaea* současně s aplikací 0,1 % roztoku čpavku do sousedního kompartmentu, dostali jsme částečný nárůst kolonií v zóně směrem k roztoku čpavku.

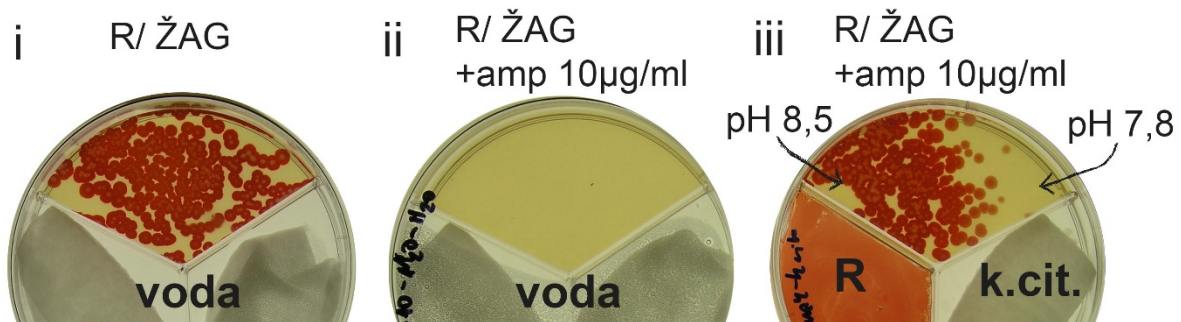
Celkem vyrostlo 58 % kolonií proti kontrole bez ampicilinu, ale všechny tento růst byl lokalizován v oblasti přilehlé k roztoku čpavku. Hustota tohoto nárůstu je ale v porovnání se stejnou oblastí na kontrole osídlena ze 100 %. Podle dynamiky alkalizace (obr. 3.9) se ukazuje, že toto území je alkalizováno během první hodiny.



Obrázek 6.4: Vliv současné aplikace čpavku a inokulace na indukovanou resistenci na ampicilin.

(i) kontrola bez ampicilinu; (ii) ŽAG s 10 µg/ml ampicilinu v sousedství vody; (iii) ŽAG s 10 µg/ml ampicilinu v sousedství čpavku; dokumentace 7. den růstu

Vliv makuly *S. rubidaea* na indukci resistance kolonií *S. rubidaea* se nám podařilo zvrátit působením roztoku kyseliny citronové. Kyselina citronová dokáže pohlcovat čpavek (obr. 3.9) a držet tak ŽAG s 10 µg/ml ampicilinu alespoň částečně neutrální i po třech dnech vlivu makuly. V tomto nastavení blokovala kyselina citronová čpavkový signál a kolonie v zóně přilehlé ke kompartmentu s kyselinou citronovou nenarostly. Také pH v této zóně je nižší (pH = 7,8) než v zóně přilehlé k makule (pH = 8,5).

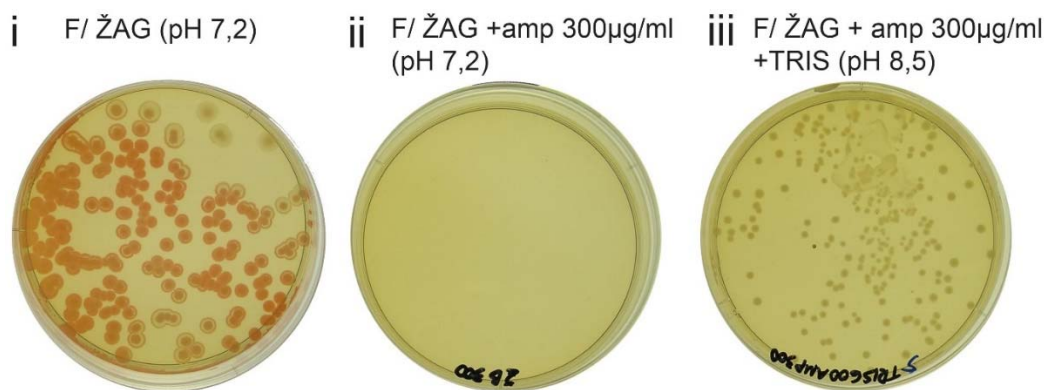


Obrázek 6.5: **Vliv kyseliny citronové na schopnost makuly R vyvolávat indukovanou resistenci k ampicilinu.** (i) kontrola bez ampicilinu; (ii) ŽAG s 10 µg/ml ampicilinu v sousedství vody; (iii) ŽAG s 10 µg/ml ampicilinu v sousedství makuly *S. rubidaea* a kyseliny citronové; dokumentace 3. den růstu

6.5. Alkalizace agaru bez použití čpavku

V minulých pokusech jsme viděli souvislost čpavkového signálu, alkalizace prostředí a indukované resistance. Zkusili jsme vynechat čpavkový signál a vyvolat indukovanou resistenci pouze alkalickým prostředím.

Do ŽAG s 300 µg/ml ampicilinem jsme aplikovali roztok TRISu tak, aby se pH zvýšilo na hodnotu 8,5. Na takové medium jsme vyseli *S. marcescens*. Kolonie zde narostly z 69 % oproti kontrole bez ampicilinu (obr. 6.6). Z toho vyplývá zásadní poznání, že není nutný vliv čpavku přímo, ale stačí pouze vliv zvýšeného pH.



Obrázek 6.6: **Indukce resistance zvýšením pH.** (i) kontrola bez ampicilinu; (ii) ŽAG s 300 µg/ml ampicilinem; (iii) ŽAG s 300µg/ml ampicilinem se zvýšeným pH pomocí TRISu; dokumentace 4. den růstu

6.6. Oddělení zvýšení pH ampicilinu a výsevu bakterií

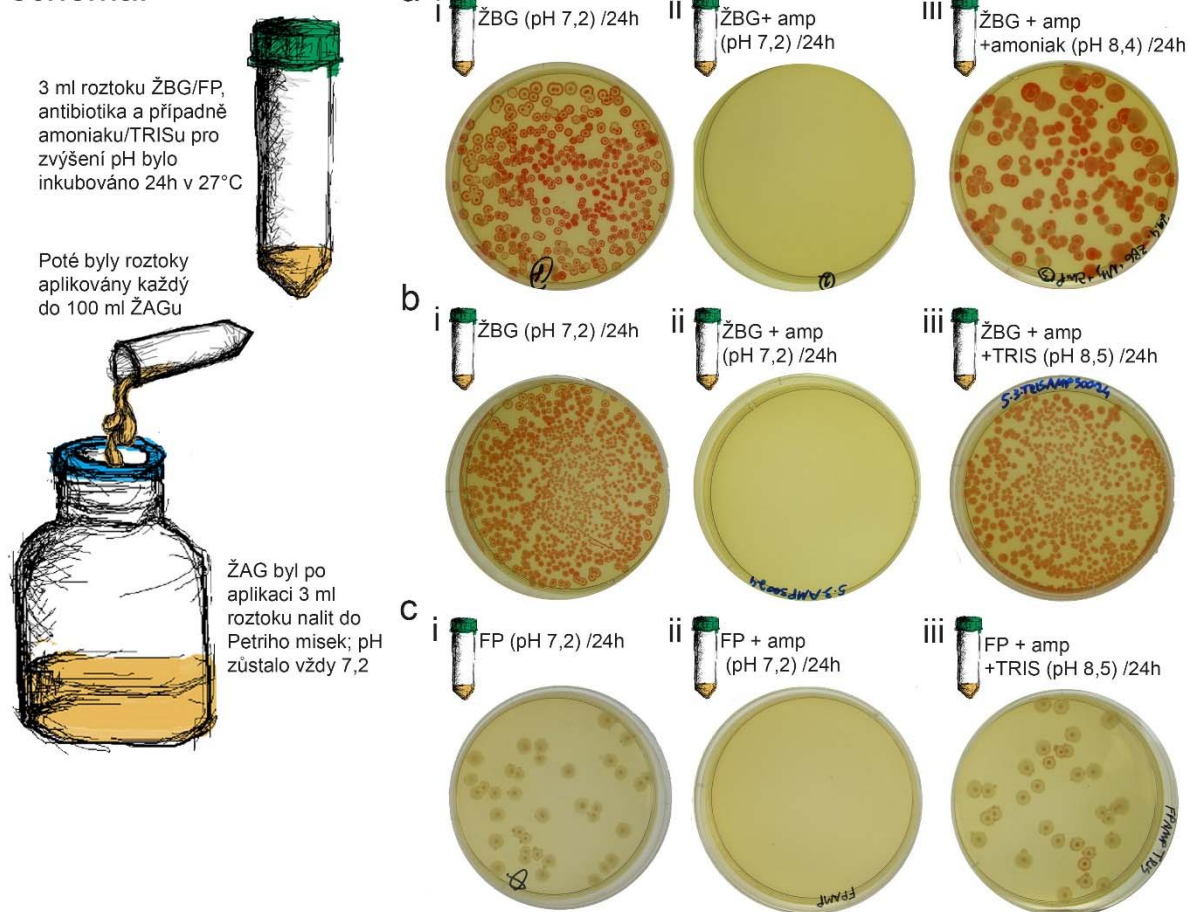
Vliv zvýšeného pH se může projevit ve fyziologii bakterií ve smyslu spuštění SOS reakcí a tím i zvýšené rezistence proti antibiotikům (Miller et al. 2004). Abychom otestovali tuto hypotézu, oddělili jsme proces alkalizace media s ampicilinem a růst bakterií.

Ampicilin jsme před přidáním do ŽAG vystavili alkalickému prostředí co nejpodobnějšímu prostředí na miskách. Do zkumavky jsme aplikovali ŽBG, ampicilin a agens (amoniak nebo TRIS) kterým jsme zvyšovali pH na hodnotu cca 8,5 (což odpovídá hodnotě pH na ŽAG vystavenému třídenému působení makul nebo roztoku čpavku) a ponechali 24h ve 27°C. Poté jsme tento roztok přidali do ŽAG tak, aby zde konečná teoretická koncentrace ampicilinu (tj. kdyby nedošlo k jeho rozkladu) odpovídala 300 µg/ml (obr. 6.7 schéma). Přídavek tohoto roztoku neovlivnil pH ŽAG a to zůstalo na hodnotě 7,2. Po vysetí *S. marcescens* na toto medium narostlo 47 % (při zvyšování pH čpavkem; obr. 6.7a), resp. 100 % (při zvyšování pH TRISem; obr. 6.7b) kontroly na mediu bez ampicilinu.

Když jsme do zkumavky aplikovali pouze ŽBG a ampicilin (pH tohoto roztoku bylo 7,2), nechali 24h ve 27°C a poté smísili s ŽAG (teoretická koncentrace ampicilinu 300 µg/ml), *S. marcescens* na takovém mediu nevyrostla. Z toho plyne, že v prvním případě došlo k inaktivaci ampicilinu v prostředí se zvýšeným pH simulujícím podmínky v agaru vystavenému působení makul nebo roztoku čpavku, popřípadě agar, jehož pH bylo výšeno TRISem (srv. obr. 6.3 a 6.6).

Aby jsme ověřili, zda ampicilin není rozkládán některou ze složek živného media, stejný postup jsme zopakovali za použití fosfátového pufru a TRISu. I zde došlo k inaktivaci ampicilinu. Dokonce jsme u kolonií vysetých na ŽAG s přídavkem takto inaktivovaného ampicilinu pozorovali stejný průběh morfogeneze kolonií jako na kontrolním ŽAG, z čehož vyplývá, že konečná koncentrace ampicilinu poklesla pod 5 µg/ml (obr. 6.7c srv. s obr. 6.2).

schéma:



Obrázek 6.7: Vliv ampicilinu, vystaveného 24h působení prostředí se zvýšeným pH, na přežití bakterií *S. marcescens*.

- a) ŽBG alkalizovaný čpavkem: (i) kontrola bez ampicilinu; (ii) ŽAG s 300 µg/ml ampicilinem z ŽBG s neutrálním pH; (iii) ŽAG s 300 µg/ml ampicilinem z ŽBG s pH zvýšeným čpavkem
- b) ŽBG alkalizovaný TRISEm: (i) kontrola bez ampicilinu; (ii) ŽAG s 300 µg/ml ampicilinem z živného bujony s neutrálním pH; (iii) ŽAG s 300 µg/ml ampicilinem z ŽBG s pH zvýšeným pomocí TRISu
- c) fosfátový pufr alkalizovaný TRISEm: (i) kontrola bez ampicilinu; (ii) ŽAG s 300 µg/ml ampicilinem z ŽBG s neutrálním pH; (iii) ŽAG s 300µg/ml ampicilinem z fosfátového pufru s pH zvýšeným pomocí TRISu; dokumentace 3. den růstu

6.7. Závěry

Na základě výše uvedených výsledků jsme došli k závěru, že role čpavku při indukované resistenci na antibiotika spočívá v alkalizaci prostředí, ve kterém se ampicilin inaktivuje. Podporu pro tuto hypotézu můžeme najít i v literatuře:

Penicilin je nestabilní v kyselém prostředí, výhodou ampicilinu je aminoskupina, která váže elektrony a snižuje tak nukleofilitu celé molekuly. Ta se díky tomu stává více stabilní v kyselém prostředí (Tsuji

et al. 1978). Na druhou stranu je méně stabilní v prostředí neutrálním a alkalickém (Van Krimpen et al. 1987). Degradční dráha ampicillinu v alkalickém prostředí byla dokumentována v (Robinson-Fuentes et al. 1997). Také tetracyklin není v alkalickém prostředí stabilní (Hlavka, & Boothe, 1985).

Naše výsledky ovšem nevylučují i jinou roli čpavku při zvýšené resistenci, než je degradace antibiotika.

Kim et al. 2013 ukázali vliv plyných molekul vylučovaných *B. subtilis* na expresi zhruba 1/3 všech genů recipientní populace *E. coli*. Mimo jiného našli vliv na spouštění genů persistence skrze toxin/antitoxin–systém. Nejprve nechali na populaci *E. coli* rostoucí na agaru na polovině dělené misky působit těkavé látky z nárůstu *B. subtilis* rostoucího ve druhé polovině dělené misky (*B. subtilis* produkuje mix asi 30 volatilních látek). Takto ovlivněné buňky *E. coli* byly sebrány a po rozředění umístěny do tekutého media obsahující inibiční koncentrace ampicilinu (tj. 100 µg/ml). Po třech hodinách této ampicilinové lázně je vyseli a sledovali poměr přeživších u ovlivňovaných a kontrolních bakterií. Zjistili, že ovlivněné *E. coli* přežili pobyt v prostředí s ampicilinem zhruba 8x lépe než neovlivněné. Jako induktor persistence (tj. spouštěč toxin-antitoxin systému) určili dvě z volatilních látek produkovaných bakteriemi *B. subtilis* 2,3-butandion a kyselinu glyoxylovou. Ve zmiňovaných 30 volatilních látkách produkovaných *B. subtilis* čpavek chybí.

Udělal jsem předběžný pokus za použití amoniaku k ovlivnění bakterií před pobyt v antibiotiku. Naše předběžné výsledky naznačují, že u amoniakem ovlivněných bakterií také dochází ke zvýšení počtů přeživších v prostředí s antibiotiky – dostáváme čtyřnásobně více přeživších než z neovlivněné populace.

7. Závěr

Na rozdíl od běžných mnohobuněčných organismů nemají bakterie vlastní systém izolace od vnějších vlivů pro účely ontogeneze. My můžeme nabídnout prostředí Petriho misky, ve kterém bude kolonie od okolních vztahů izolovaná. Zde se ukáže morfogeneze mnohobuněčného celku – kolonie.

V návaznosti na minulá zjištění jsme identifikovali amoniak jako morfogen způsobující přechod od růstu struktury mezikruží k růstu struktury lemu.

Během vývoje kolonie jsme také pozorovali změny pH media v jejím okolí - nejprve acidifikaci okolí (pH 7,2 -> pH 6) do vzdálenosti několika milimetrů od okrajů kolonie, později naopak alkalizaci prostředí na pH 8,6 a to v rozsahu celé Petriho misky. Střídání těchto tří fází (neutrální, acidické a alkalické) časově koreluje se změnami růstu struktur kolonie (střed, mezikruží, lem). Acidifikace media je způsobena pravděpodobně produkty metabolismu glukosy, v mediu bez glukosy acidifikaci nepozorujeme. Faktor, který ovlivňuje přechod z acidické do alkalické fáze jsme znovu určili jako amoniak.

Zdá se, že acidifikace media je důležitá pro růst struktury mezikruží, zároveň to však není jediná podmínka. Jak ukazuje růst na mediu s ampicilinem v rozmezí 10 µg/ml až 200 µg/ml, kde acidickou fází růstu kolonií pozorujeme, ale struktura mezikruží se neobjeví.

„Gnotobiologické“ zkoumání *S. marcescens*, *S. rubidaea* a *E. coli* ukázalo rozmanité typy vzájemných interakcí: Obrůstání kolonií *S. marcescens* koloniemi *S. rubidaea*; repulze růstu *E. coli* vlivem kolonií *S. marcescens*; pohlcování kolonií *S. rubidaea* koloniemi *E. coli* nebo tvorbu širokého bílého lemu kolem kolonií morfotypu F *S. marcescens* působením nárůstu *E. coli*, *S. rubidaea* a dokonce i jeho dceřiným morfotypem M.

V chimérických koloniích předpokládáme rovnoměrné rozložení bakterií obou typů po obvodu inokulační kapky, ale ve výsledku je okraj zcela zabrán jedním z partnerů. V tomto uspořádání se odráží již popsané vzájemné interakce, takže pozorujeme převládnutí *S. rubidaea* nad *S. marcescens*, kde *S. rubidaea* uplatní svou vlastnost obrůst, a převládnutí *E. coli*, nad *S. rubidaea*, kde je vidět částečná snaha *S. rubidaea* o rozrostení se do prostoru, ale záhy je uvězněna proudy *E. coli*; v případě chiméry *S. marcescens* a *E. coli* jsme pozorovali obě varianty převládnutí. Předpokládáme, že záleží na prvních momentech po inokulaci, zda dojde k situaci, že se *E. coli* rozroste, kde dojde k závodu, zda se *E. coli* rozroste do prostoru a zamezí tak *S. marcescens* od možnosti dalšího rozrůstání, nebo jestli *S. marcescens* stihne dostatečně rychle vyprodukovat repulzní faktor a zabránit tak *E. coli* v růstu. Směs všech tří klonů potom ukazuje kombinaci všech předchozích

interakcí. Pozorovali jsme dva možné výsledky: převládnutí *S. rubidaea* nebo *E. coli*, kde předpokládáme, že znovu záleží na závodu *S. marcescens* a *E. coli* – vítěz se potom utká se *S. rubidaea*. Tyto vztahy jsme sumarizovali do systému analogického s hrou kámen-nůžky-papír.

Zároveň pracujeme na vytvoření metody pro neinvazivní detekci poměrů jednotlivých klonů podle plyných fingerprintů. Byla navržena první verze matematického modelu k propočítání poměrů jednotlivých klonů ve směsi ze složení plyných látek. Tato metoda by v dalším kroku mohla vést také k diagnostice superinfekcí nebo infekcí, kde se nachází několik infekčních variant, z dechu pacienta.

Ukázali jsme vliv ampicilinu na morfogenezi kolonií *S. marcescens* morfotypu F již od úrovně řádově nižší, než která snižovala počet kolonií ve výsevu oproti kontrole.

Vysvětlení indukce resistance na ampicilin pozorované Heal & Parsonsem, které podali Bernier et al., že se jedná o změnu fyziologie bakterií směrem k resistenci, se v našem systému nepotvrdilo – resp. ukázali jsme, že role čpavku při indukované resistenci na antibiotika spočívá spíše v alkalizaci prostředí, ve kterém se ampicilin inaktivuje. Zároveň jsme ukázali, že signální populace, kterou Heal & Parsons použili, byla schopná již během 24h alespoň částečně alkalizovat sousední kompartment.

Přímo tím ale nevylučujeme roli čpavku ve změně fyziologie bakterií vedoucí ke zvýšené odolnosti proti antibiotikům. Naopak, naše předběžné výsledky ukazují, že bakterie vystavené působení amoniaku těsně před pobytem v prostředí s ampicilinem přežívaly se čtyřnásobnou úspěšností proti neovlivněné kontrole.

8. Přehled použité literatury

- Allardyce RA, Langford VS, Hill AL, Murdoch DR (2006) Detection of volatile metabolites produced by bacterial growth in blood culture media by selected ion flow tube mass spectrometry (SIFT-MS). *Journal of microbiological methods* 65:361–365.
- Ben-Jacob E (2003) Bacterial self-organization: co-enhancement of complexification and adaptability in a dynamic environment. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 361:1283–1312.
- Ben-Jacob E, Cohen I, Gutnick DL (1998) Cooperative organization of bacterial colonies: from genotype to morphotype. *Annual Reviews in Microbiology* 52:779–806.
- Bernier SP, Létoffé S, Delepierre M, Ghigo J (2011) Biogenic ammonia modifies antibiotic resistance at a distance in physically separated bacteria. *Molecular microbiology* 81:705–716.
- Blackwood RK, Hlavka JJ, Boothe JH (1985) *The tetracyclines*. Springer-Verlag
- Boles BR, Thoendel M, Singh PK (2004) Self-generated diversity produces “insurance effects” in biofilm communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 :16630–16635.
- Čepl J (2010) Signalizace při vývoji bakteriálních kolonií.
- Čepl JJ, Pátková I, Blahůšková A, et al. (2010) Patterning of mutually interacting bacterial bodies: close contacts and airborne signals. *BMC microbiology* 10:139.
- Diggle SP, Griffin AS, Campbell GS, West SA (2007) Cooperation and conflict in quorum-sensing bacterial populations. *Nature* 450:411–414.
- Elowitz MB, Levine AJ, Siggia ED, Swain PS (2002) Stochastic gene expression in a single cell. *Science* 297:1183–1186.
- Fuller AT, Horton JM (1950) Marcescin, an antibiotic substance from *Serratia marcescens*. *Journal of General Microbiology* 4:417–433.
- Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP (1994) Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of bacteriology* 176:269.
- Gould SJ, Lewontin RC (1979) The spandrels of San Marco and the Panglossian paradigm: a critique of the adaptationist programme. *Proceedings of the Royal Society of London Series B Biological Sciences* 205:581–598.
- Hallatschek O, Hersen P, Ramanathan S, Nelson DR (2007) Genetic drift at expanding frontiers promotes gene segregation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104:19926–19930.
- Heal RD, Parsons AT (2002) Novel intercellular communication system in *Escherichia coli* that confers antibiotic resistance between physically separated populations. *Journal of applied microbiology* 92:1116–1122.

- Kaprálék F (1999) *Základy bakteriologie*, Karolinum
- Kerr B, Riley MA, Feldman MW, Bohannan BJM (2002) Local dispersal promotes biodiversity in a real-life game of rock–paper–scissors. *Nature* 418:171–174.
- Kim K, Lee S, Ryu C-M (2013) Interspecific bacterial sensing through airborne signals modulates locomotion and drug resistance. *Nature communications* 4:1809.
- Koh KS, Lam KW, Alhede M, et al. Phenotypic Diversification and Adaptation of *Serratia marcescens* MG1 Biofilm-Derived Morphotypes. *Journal of Bacteriology* 189 :119–130.
- Van Krimpen PC, Van Bennekom WP, Bult A (1987) Penicillins and cephalosporins. *Pharmaceutisch Weekblad* 9:1–23.
- López D, Kolter R (2010) Extracellular signals that define distinct and coexisting cell fates in *Bacillus subtilis*. *FEMS microbiology reviews* 34:134–149.
- Lu L (2004) Autoinducer 2-based quorum sensing response of *Escherichia coli* to sub-therapeutic tetracycline exposure.
- Matsushashi M, Otani S, Kaneko T (1999) Process for culturing microorganisms or cells using sound waves.
- Matsushashi M, Pankrushina AN, Takeuchi S, et al. (1998) Production of sound waves by bacterial cells and the response of bacterial cells to sound. *The Journal of General and Applied Microbiology* 44:49–55.
- Mehdiabadi NJ, Jack CN, Farnham TT, et al. (2006) Social evolution: kin preference in a social microbe. *Nature* 442:881–882.
- Melter O, Radojevič B (2010) Small colony variants of *Staphylococcus aureus*—review. *Folia microbiologica* 55:548–558.
- Miller C, Thomsen LE, Gaggero C, et al. (2004) SOS response induction by β -lactams and bacterial defense against antibiotic lethality. *Science* 305:1629–1631.
- Miller MB, Bassler BL (2001) Quorum sensing in bacteria. *Annual Reviews in Microbiology* 55:165–199.
- Neubauer Z (2002) *Biomoc*. Malvern
- Nijland R, Burgess JG (2010) Bacterial olfaction. *Biotechnology journal* 5:974–977.
- Palková Z, Blanka Janderová J (1997) Ammonia mediates communication between yeast colonies. *Nature* 390:532–536.
- Pátková I, Čepel JJ, Rieger T, et al. (2012) Developmental plasticity of bacterial colonies and consortia in germ-free and gnotobiotic settings. *BMC microbiology* 12:178.
- Ram RJ, VerBerkmoes NC, Thelen MP, et al. (2005) Community proteomics of a natural microbial biofilm. *Science* 308:1915–1920.

- Rieger T, Neubauer Z, Blahuskova A, et al. (2008) Bacterial body plans: colony ontogeny in *Serratia marcescens*. *Communicative & integrative biology* 1:78–87.
- ROBINSON-FUENTES VA, Jefferies TM, Branch SK (1997) Degradation pathways of ampicillin in alkaline solutions. *Journal of pharmacy and pharmacology* 49:843–851.
- Schultz D, Wolynes PG, Jacob E Ben, Onuchic JN (2009) Deciding fate in adverse times: sporulation and competence in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106:21027–21034.
- Sehdev PS, Donnenberg MS (1999) Answer to Arcanum (See Page 770). *Clinical Infectious Diseases* 29:925.
- Shapiro JA (1995) The significances of bacterial colony patterns. *Bioessays* 17:597–607.
- Shapiro JA, Dworkin M (1997) *Bacteria as multicellular organisms*. Oxford University Press New York
- Shapiro JA, Higgins NP (1989) Differential activity of a transposable element in *Escherichia coli* colonies. *Journal of bacteriology* 171:5975–5986.
- Shestivska V, Španěl P, Dryahina K, et al. (2012) Variability in the concentrations of volatile metabolites emitted by genotypically different strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of applied microbiology* 113:701–713.
- Shimkets LJ (1990) Social and developmental biology of the myxobacteria. *Microbiological reviews* 54:473.
- Sole M, Francia A, Rius N, Loren JG (1997) The role of pH in the “glucose effect” on prodigiosin production by non-proliferating cells of *Serratia marcescens*. *Letters in applied microbiology* 25:81–84.
- Solé M, Rius N, Francia A, Loren JG (1994) The effect of pH on prodigiosin production by non-proliferating cells of *Serratia marcescens*. *Letters in applied microbiology* 19:341–344.
- Solé M, Rius N, Lorén JG (2010) Rapid extracellular acidification induced by glucose metabolism in non-proliferating cells of *Serratia marcescens*. *International Microbiology* 3:39–43.
- Sovova K, Cepl J, Markos A, Spanel P (2013) Real time monitoring of population dynamics in concurrent bacterial growth using SIFT-MS quantification of volatile metabolites. *Analyst* -. doi: 10.1039/C3AN00472D
- Tkachenko A, Nesterova L, Pshenichnov M (2001) The role of the natural polyamine putrescine in defense against oxidative stress in *Escherichia coli*. *Archives of microbiology* 176:155–157.
- Tkachenko AG (2004) Mechanisms of protective functions of *Escherichia coli* polyamines against toxic effect of paraquat, which causes superoxide stress. *Biochemistry (Moscow)* 69:188–194.
- Tkachenko AG, Akhova A V, Shumkov MS, Nesterova LY (2012) Polyamines reduce oxidative stress in *Escherichia coli* cells exposed to bactericidal antibiotics. *Research in microbiology* 163:83–91.

- Tkachenko AG, Nesterova LY (2003) Polyamines as modulators of gene expression under oxidative stress in *Escherichia coli*. *Biochemistry (Moscow)* 68:850–856.
- Tkachenko AG, Pozhidaeva ON, Shumkov MS (2006) Role of polyamines in formation of multiple antibiotic resistance of *Escherichia coli* under stress conditions. *Biochemistry (Moscow)* 71:1042–1049.
- Tsuji A, Nakashima E, Hamano S, Yamana T (1978) Physicochemical properties of amphoteric β -lactam antibiotics I: Stability, solubility, and dissolution behavior of amino penicillins as a function of pH. *Journal of pharmaceutical sciences* 67:1059–1066.
- Vos M, Velicer GJ (2006) Genetic population structure of the soil bacterium *Myxococcus xanthus* at the centimeter scale. *Applied and environmental microbiology* 72:3615–3625.
- Watnick P, Kolter R (2000) Biofilm, city of microbes. *Journal of Bacteriology* 182:2675–2679.
- West SA, Griffin AS, Gardner A, Diggle SP (2006) Social evolution theory for microorganisms. *Nature Reviews Microbiology* 4:597–607.
- West SA, Pen I, Griffin AS (2002) Cooperation and competition between relatives. *Science* 296:72–75.