

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

Teoretická a evoluční biologie



RNDr. Tomáš Rieger

Morfogeneze a vzájemné ovlivňování bakteriálních kolonií

Disertační práce

**Vedoucí práce: Doc. RNDr. Anton Markoš, CSc.
Praha 2017**

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.

Tomáš Rieger

Červen 2017

Poděkování

Rád bych poděkoval doc. RNDr. Anton Markošovi, CSc. za jeho inspirativní a trpělivé vedení, RNDr. Anně Blahůškové za vytrvalou pomoc a neutuchající zájem. Děkuji také všem kolegům a kolegyním z Katedry filosofie a dějin přírodních věd za vytváření podnětného a otevřeného prostředí. Děkuji rodičům, a především mé ženě Petře za nekonečnou podporu, jež se mi po celou dobu dostávalo a bez které by tato práce nikdy nevznikla.

Abstract

This thesis follows previous works of our group (Rieger T. *et al.*, 2008, Cepl J. *et al.*, 2010 and Patkova I. *et al.*, 2012), where we focused on the morphology of the bacterial colonies *Serratia marcescens* and its variety caused by changing of the inoculation conditions on nutrient agar. When bacterial colonies *S. marcescens* are grown on nutrient agar enriched with glucose isolated enough from other colonies in its living space, it can form coloured structured colonies, which we named morphotype „fountain“ (**F**). This morphotype becomes ideal for following studies of mutual influencing of the bacterial colonies, because of its ability of pigmentation change or structure loss caused by altering surrounding inoculation conditions.

We noticed in normal sowed agar plates, that bacterial colonies, which grows in the close distance with other colonies develop their pigmentation sooner, than colonies, that grows more isolated. We studied how is this influencing happening and what are the necessary conditions for it. We proved, that different species of bacterial macrocolonies (*S. marcescens* – morphotype (M), *S. rubidea* and *E. coli*) emits into the nutrient agar informative signal, which makes the recipient colonies *S. marcescens* reacts on this signal with the same manner (X structure). It looks, that this is kind of universal reaction on some compounds emitted by different species of Enterobacteria.

Growth of the **F** morphotype on minimal agar is conditional on its induction by growing heterospecific or conspecific macrocolony nearby. In the work on signal molecule identification we found out, that growing macrocolony of *S. rubidea* (**R**) emits to distant agar (up to few centimetres) protein, which we identified as hypothetical protein (35KDa) of *Serratia marcescens* „WP_025304701.1“ with 100 % identity. Nevertheless filtration of the functional minimal media obtained from growing fluid culture of **R** morphotype through the membrane with cut-off 3500Da proved, that this protein has not the capability to induce growth of **F** colony on minimal agar plate.

Medium obtained from the growing fluid culture of the **R** morphotype, when is deprived from the bacterial cells, induce growth of **F** colony when is added on the minimal agar plate. In the next part of this thesis we tried to identify signal molecule that is contained in the minimal medium obtained from the fluid culture of **R** morphotype by modern biology analytic methods. We detected that possible signal molecule can be short thermostable peptide of approximate mass 3284 Da.

We believe, that this thesis can act as a solid base for further study, that can lead, with optimization of purging methods, to identification of the signal molecules emitted and received by different species of Enterobacteria and thus contribute to our knowledge of intra – and inter-species communication of microorganisms.

Abstrakt

Tato disertace navazuje svým zaměřením na další práce naší skupiny (Rieger T. *et al.*, 2008, dále Cepel J. *et al.*, 2010 a Patkova I. *et al.*, 2012), kde jsme se věnovali studiu morfogeneze bakteriálních kolonií *Serratia marcescens* za různých inokulačních podmínek na nutričně bohatých agarrech. Bakterie *S. marcescens* dokáží, pokud rostou v dostatečné izolaci na misce s živným agarem obohaceném o glukózu, vytvářet barevné strukturované kolonie, jež jsme nazvali „fontánka“ (**F**). Díky schopnosti reagovat na proměny okolních podmínek změnou struktury či barevnosti, se tento fenotyp stal ideálním organismem pro další studia vzájemného ovlivňování bakteriálních kolonií.

Všimli jsme si, že při standardním výsevu se bakteriální kolonie rostoucí v těsné blízkosti vybarvují dříve než kolonie rostoucí na misce izolovaně. Zjišťovali jsme, za jakých podmínek a jakým způsobem se toto ovlivňování děje. Prokázali jsme, že různé druhy bakteriálních makrokolonií (*S. marcescens*-fenotyp **M**, *S. rubidea* a *E. coli*) vysílají skrze živný agar informační agens, po jehož přijetí na ní dokáží recipientní fontánkové kolonie *S. marcescens* reagovat vždy stejným způsobem (**X** struktura). Jde tedy patrně o jakousi univerzální reakci na látku vysílanou různými druhy Enterobakterií.

Růst kolonií fenotypu **F** na definovaném agaru je podmíněn jeho indukci konspicivní i heterospicivní rostoucí makrokolonií. Při snaze identifikovat hledanou signální molekulu jsme zjistili, že rostoucí makrokolonie *S. rubidea* (**R**) vypouští do vzdáleného agaru (až několik centimetrů) protein, který jsme identifikovali jako hypotetický protein (35 KDa) *Serratia marcescens* “WP_025304701.1” se 100 % shodou. Nicméně filtrace funkčního kondiciovaného média membránou s propustností 3500Da prokázala, že tento protein není signální molekula, jež indukuje růst **F** kolonie na definovaném médiu.

Pro indukci růstu kolonií fenotypu **F**, stačí do definovaného agaru zasáknout médium kondiciované rostoucí makrokolonií **R**. V další části práce jsme se snažili identifikovat signální agens obsažené v kondiciovaném minimálním médiu využitím analytických metod moderní biologie. Podařilo se nám zjistit, že hledanou molekulou je patrně krátký termostabilní peptid o přibližné velikosti 3284 Da.

Věříme, že předkládaná disertační práce může poskytnout kvalitní základ pro další studii, jež by za předpokladu optimalizace postupu pročištění signální molekuly, mohla vést k přesné identifikaci signálního agens vysílaného a přijímaného různými druhy Enterobakterií a mohla by tak přispět k lepšímu porozumění intra – i inter – druhové komunikace těchto mikroorganismů.

Obsah

| | |
|---|----|
| 1. Teoretická část..... | 1 |
| 1.1. Komunikace..... | 1 |
| 1.2. Komunikace v živé přírodě..... | 1 |
| 1.3. Mechanismy komunikace v živé přírodě | 3 |
| 1.3.1. Komunikace v živočišné říši..... | 3 |
| 1.3.2. Komunikace v rostlinné říši | 4 |
| 1.3.3. Komunikace u hub | 5 |
| 1.3.4. Komunikace u mikroorganismů..... | 5 |
| 1.3.4.1. Kvasinky..... | 5 |
| 1.3.4.2. Bakterie | 6 |
| 1.4. Typy a mechanismy bakteriální komunikace | 7 |
| 1.4.1. Fyzický kontakt | 7 |
| 1.4.2. Metabolická komunikace | 9 |
| 1.4.3. Komunikace pomocí signálních molekul..... | 10 |
| 1.4.4. Horizontální genový transfer | 13 |
| 1.4.5. Signalizace pomocí fyzikálních signálů..... | 14 |
| 1.5. Techniky mapování signálních molekul a jejich úskalí | 18 |
| 1.6. Taxonomický a strukturní popis bakterie <i>Serratia marcescens</i> | 19 |
| 2. Cíle práce | 21 |
| 3. Definice, materiály a metody | 23 |
| 3.1. Definice pojmů..... | 23 |
| 3.1.1. Typy uspořádání buněčných těl na Petriho misce..... | 23 |
| 3.1.2. Typy kondiciovaných kultur | 25 |
| 3.2. Materiál a metody..... | 26 |
| 3.2.1. Média a živné půdy..... | 26 |
| 3.2.2. Bakteriální kmeny..... | 26 |
| 3.2.3. Metody..... | 28 |
| 3.2.3.1. Pěstování bakteriálních kolonií..... | 28 |
| 3.2.3.2 SDS-PAGE elektroforéza..... | 29 |
| 3.2.3.3. MALDI-TOF | 30 |
| 3.2.3.4. Proteinový fingerprint..... | 32 |
| 3.2.3.5. Gelová chromatografie | 32 |

| | |
|--|----|
| 3.2.3.6. Chromatografie (reverzní fáze)..... | 33 |
| 3.2.3.7. NMR spektroskopie..... | 34 |
| 3.2.3.8. Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer (FT-ICR)..... | 34 |
| 4. Experimentální část..... | 36 |
| 4.1. Formování a morfogeneze “buněčných těl” <i>S. marcescens</i> | 36 |
| 4.1.1. Kolonie typu F neroste na MMA..... | 39 |
| 4.2. Ovlivňování růstu F kolonií na MMA | 41 |
| 4.3. Hledání informačního agens ovlivňujícího růst F kolonií na MMA..... | 44 |
| 4.3.1. Biochemické hledání informačního agens se zaměřením na proteiny..... | 44 |
| 4.3.2. Biochemické hledání informačního agens se zaměřením na menší molekuly..... | 50 |
| 4.3.3. Stanovení váhy hledané signální molekuly metodou hmotnostní spektrometrie | 55 |
| 5. Diskuze | 61 |
| 6. Seznam literatury..... | 66 |
| 7. Přílohy | 72 |

Seznam zkratek:

| | |
|---------------------|--|
| acyl-ACP | acyl carrier protein |
| AE | akustická emise |
| AHK | α -hydroxyketon |
| AHL | acylated homoserine lactones |
| AI-1 | autoinduktor 1 |
| AI-2 | autoinduktor 2 |
| AI-3 | autoinduktor 3 |
| AIP | autoindukující peptidy |
| AV ČR | Akademie Věd České Republiky |
| CCA | 4 - hydroxy-g-kyanoskořicová kyselina |
| D2O | deuteriumoxid |
| Da | dalton |
| ddH ₂ O | dvakrát destilovaná voda |
| DNA | deoxyribonukleová kyselina |
| DP | diplomová práce |
| DSF | difúzní signální faktor |
| DTT | dithiotreitol |
| <i>E.coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| <i>E.coli 15TAU</i> | mutant <i>E. coli</i> vyžadující pro růst thymin, uracil a arginin |
| F | fenotyp “fontánka” <i>Serratia marcescens</i> |
| FA | kyselina mravenčí |
| FT | Fourierovy transformace |
| H ⁺ | vodíkový kationt |
| HAC | kyselina octová |
| HGT | horizontální genetický transfer |
| HSL | homoserinlaktónový kruh |
| ICR | iontová cyklotronová rezonance |
| IP | autoindukující peptidy |
| KDa | kiloDalton |
| LUX-I | rodina I genů pro luminescenci |
| Lux-R | rodina R genů pro luminescenci |
| M | klon M odvozený od <i>Serratia marcescens</i> |

| | |
|---------------------|---|
| MALDI TOF | M atrix A ssisted L aser D esorption/ I onization) v kombinaci s detektorem doby letu (TOF , T ime- O f- F light) |
| MeOH | methanol |
| MM | minimální médium |
| MMA | minimální agar |
| MS | hmotnostní spektroskopie |
| Na ⁺ | sodíkový kationt |
| nm | nanometr |
| NMR | Nukleární Magnetická Rezonance |
| OD | optická densita |
| OMV | vnější membránový vesikl (Outer membrane vesicle) |
| PAGE | polyakrylamidový gel |
| PCR | polycyklic reaction |
| PFRQ | frekvence nejvyšších píků |
| pH | vodíkový exponent |
| P.m. | Petriho miska |
| PQS | <i>Pseudomonas</i> quinolonový signál |
| PVDF | polyvinylidenfluorid |
| QS | quorum sensing |
| R | “wild type” <i>Serratia rubidea</i> |
| RCP | reversed phase chromatografie |
| RNA | ribonukleová kyselina |
| SB pufr | lyzační pufr |
| SDS | dodecylsírán sodný |
| <i>S.marcescens</i> | <i>Serratia marcescens</i> |
| struktura X | bílý povlak vnější části kolonie F přivrácené k rostoucí makule (R, M či <i>E.coli</i>) na ŽA + G |
| SZÚ | Státní Zdravotní Ústav |
| TCA | kyselina trichloroctová |
| TRIS | trisaminomethan |
| V | volt |
| ŽA | živný agar |
| ŽA + G | živný agar s glukózou |

1. Teoretická část

1.1. Komunikace

Chceme-li porozumět nějakému slovu, je nutné se podívat na jeho původ. Slovo komunikace pochází z latinského *communicare*, jenž znamená „společně něco sdílet, činit něco společným“

Komunikace v sobě nezahrnuje pouze výměnu informací mezi účastníky, ale i podílení se na celkovém dopadu zprávy a kontextu, jenž může celý význam tohoto procesu pozměnit. V tomto slova smyslu tedy můžeme komunikaci chápat spíše jako synonymum interakce, procesu vzájemného ovlivňování a působení (Vybiral Z., 2005).

1.2. Komunikace v živé přírodě

Všechny organismy žijí v neustále se měnícím prostředí. Schopnost přizpůsobení se těmto změnám je zásadní pro úspěch každého jedince, a v dlouhodobém uvažování i každého druhu. Vzhledem k tomu, že mezi organismy a jejich prostředím dochází k neustálému toku látek, energií a informací, je umění dorozumívání mezi jednotlivými organismy nezbytné pro jejich přežití. Neustále se měnící vlivy prostředí tak vytvářejí tlak na jednotlivé organismy i společenstva a nutí je vytvářet nové strategie pro přežití. Tyto nové strategie nezdědka zahrnují i nové komunikační možnosti vyvíjejících se organismů.

Pokud chceme v laboratoři zkoumat vliv komunikace s prostředím na výsledný fenotyp daného organismu, je potřeba mít neustále na paměti celou šíři možných informačních vstupů. Proto je potřeba s pečlivostí volit pokusné uspořádání tak, abychom měli celý systém v konstantních podmínkách a vždy měnili pouze jediný požadovaný parametr. Potom můžeme s úspěchem popisovat vliv tohoto konkrétního parametru na výsledný fenotyp buněčného těla.

Pokud pátráme v literatuře po definici pojmu “komunikace v živé přírodě”, nalezneme mnohé interpretace, které se zaměřují na poskytování či přenos informace:

“Komunikace je poskytování informace od odesílatele k příjemci” (Bradbury J. a Vehrencamp S., 1998).

“Při komunikaci jde o přenos informace z jednoho zvířete na druhé. Informace je zakódována jedním zvířetem do signálu. Když je signál obdržén druhým zvířetem, tato informace je opět dekódována” (Green S. a Marler P., 1979).

“Při komunikaci jde o přesun informace prostřednictvím signálu, jež je vyslán pomocí kanálu, který je mezi vysílajícím a přijímajícím” (Hailman J., 1977).

Jedním z vrcholů komunikačního systému je vývoj řeči a písma u člověka, lingvisté definují komunikaci takto:

“Jeden organismus (zdroj) má informaci, jíž sděluje jinému organismu. Tento zdrojový organismus prezentuje chování, které zakóduje tuto danou informaci. Přijímající organismus (přijímač) zpozoruje chování, identifikuje jej ve smyslu kódování, pochopí jeho smysl a jako výsledek tohoto spojení nadále využívá získanou informaci pro své účely” (Anderson S. a Patrick A., 2006). Tento typ komunikace se nazývá kódový model komunikace.

Marc Hauser (Hauser M., 1996) pak ve své práci píše, že kvalita komunikace je závislá na přirozených omezeních. Pro komunikaci organismů může být toto omezení komunikace spatřováno na mnoha úrovních, od neurobiologických omezení přes fyziologické až po psychologické. Tato omezení jsou velice důležitá, protože určují relativní úspěšnost organismů reagovat na relevantní stimuly vysílané okolím. Hauser dále rozlišuje mezi aktivně vysílaným signálem (přímá komunikace ve smyslu adresné komunikace) a pasivně “vystavujícím se” (vytváření elektrických vln biofilmem) podnětem (Cue). Podnět představuje, stejně jako signál, také zdroj informace, ale liší se od signálu ve dvou kvalitách: 1/ podnět je neustále ve stavu ZAPNUTO. Signál naopak může měnit stavy na ZAPNUTO/ VYPNUTO. Tudíž je to právě signál, který je produkován jako socioekologicky relevantní odezva na změny prostředí v čase; 2/ podnět často koresponduje s individuálním, nebo druhovým fenotypem a jeho exprese nepřináší organismu žádný náklad (cost) navíc.

Je zjevné, že potřeba komunikace a interakce s ostatními organismy i vnějším prostředím hrála v průběhu evoluce významnou roli a že umožnila rozvoj biodiverzity a rozmanitosti života. Komunikace je evoluční výhodou ve světě, který není komunikačně perfektní. Kdyby neexistovaly ve světě překážky v komunikaci, všechny organismy by komunikovaly se stejným úspěchem, a tudíž by tato komunikace žádnou evoluční výhodu nepřinášela, ale v našem nedokonalém světě je míra a kvalita komunikace mezi jednotlivými organismy i mezi organismy a prostředím pro evoluční úspěšnost daného organismu zásadní.

1.3. Mechanismy komunikace v živé přírodě

Komunikace mezi organismy v živé přírodě probíhá na mnoha úrovních. Může probíhat na vzdálenosti velké (plynné signály mezi stromy) až ohromné (velrybí písně) či na vzdálenosti malé (řeč), až mikroskopické (buněčný kontakt). Komunikace využívá různé typy signálů od optických (barvy květů, vzorce včelích tanců), zvukových (písně ptáků, mořských savců), přes hmatové (fyzický kontakt při páření) až po biochemické (signální molekuly u bakterií, vůně u rostlin).

1.3.1. Komunikace v živočišné říši

V živočišné říši je pestrost palety různých variant komunikací závislá na různých typech orgánů, jež komunikační signál mohou přijmout. Přijatý signál se poté interpretuje, což vyžaduje určitý stupeň vyvinutosti kognitivních funkcí (nervová soustava). Živočichové dokážou přijímat signály různých fyzikálních typů.

Jsou to například chemoreceptory, čichové či chuťové, schopné zachytit látky rozpustné ve vodě či přenášené vzduchem; zrakové receptory, které přijímají optické signály a termoreceptory analyzující rozdíly v teplotě okolního prostředí. Krom toho jsou někteří živočichové uzpůsobeni k vnímání ionizujícího záření, tzv. elektrorecepční schopnost (útočné chování sršňů, vos a včel před bouřkou). Jiní živočichové dokáží vnímat magnetické pole země (holubi, hmyz). Signály akustické, dotykové (taktilní), či vibrační dokáží vnímat tzv. mechanoreceptory.

Každý živočišný druh má svůj charakteristický soubor signálů, který je schopen přijímat. Tento unikátní repertoár se evolučně vyvinul právě pro každý živočišný druh jedinečně v závislosti na tom, které signály jsou důležité pro přežití tohoto konkrétního živočišného druhu v dané lokalitě. Jednotlivé druhy se přitom liší v míře citlivosti na stejné podněty z okolního světa. Selektivita příjmu signálů je závislá jak na senzoričké výbavě, tak i na aktuálním motivačním stavu daného živočicha (čerpáno z <http://pfyziol.fup.upol.cz/castwiki/?p=2633>).

1.3.2. Komunikace v rostlinné říši

Rostliny si vyvinuly několik možností komunikace s okolním prostředím. Například je známá schopnost rostlin aktivně přilákat hmyz k opylování díky prezentaci pestrých barevných vzorů okvětních lístků (někdy i s použitím mimiker pro ošálení případného opylovače), nebo produkcí vůní lákavých pro opylovače.

Je také známo, že rostliny dokážou vypouštět směsi plyných organických látek do ovzduší jako odpověď na napadení herbivorním hmyzem. Tyto látky mohou působit jako vodítko (atraktant) pro přirozené nepřátele tohoto herbivorního hmyzu a tímto způsobem si rostlina může přivolat pomoc (Hare J.D., 2011). Rostliny dále vypouštějí mnoho variant organických i anorganických látek do podzemí. Podzemní sítě mykorhizních hub, jež propojují kořeny většiny rostlin v blízkém sousedství, tvoří přímé spojení mezi jednotlivými rostlinami a umožňuje rychlé předávání biochemických zpráv mezi sousedními rostlinami (van der Heijden M.G.A. a Horton T.R., 2009). Pokud je například rostlina napadena škůdcem, či patogenem, produkuje signální látky (pro různé typy napadení produkuje různé látky), které vyšle díky mykorhizní síti okolním rostlinám a ty tak varuje o konkrétní aktuální hrozbě. (Song Y.Y. *et al.*, 2010, Babikova Z. *et al.*, 2013). Krom toho mohou touto mykorhizní sítí vzrostlé stromy posílat živiny ke svým malým příbuzným. Ty pak mohou lépe přežít ve stínu svého rodiče, i když ze začátku života nemají dostatek světla na dostatečnou fotosyntézu. (Fortey R., 2016). Pomocí této sítě lze také poslat toxické allelochemikálie, což jsou látky limitující růst okolních rostlin (Bartho E.K. *et al.*, 2011). U Douglasových jedlí byl při odlistění pozorován přenos stresových signálů pomocí mykorhizní sítě (Song Y.Y. *et al.*, 2015).

Jak je patrné, rostliny si vyvinuly pestrou paletu variant komunikace mezidruhové i vnitrodruhové. Vzájemná komunikace je pro rostliny nutná pro správnost

a rychlost reakcí na okolní nepříjemné změny (nálety hmyzu, otrava půdy). Zároveň je pro rostliny výhodné si pomáhat v rámci rodiny (předáváním živin a obraných enzymů) i nepříbuzenského soužití na dané lokalitě.

1.3.3. Komunikace u hub

Vláknité houby často formují coenocytické mycelium, kterým se může cytoplasma a její organely distribuovat v rámci jejich rozvětvené myceliární sítě. Buňky této myceliární sítě mají septa, ve kterých může být jediný větší pór (uniperforate form), nebo více menších pórů (multiperforate form) (Lutzoni F. *et al.*, 2004). Zdá se, že podobně jako u zvířat či rostlin jsou mezibuněčné spojení důležité pro diferenciaci a správný vývoj plodnic hub (Beckett A., 1980)

1.3.4. Komunikace u mikroorganismů

Stejně jako vyšší organismy, využívají i mikroorganismy vnitro- i mezidruhovou komunikaci. U komplexních ekosystémů (plaky, biofilmy, půda) dochází k simultánní výměně signálů mezi členy vlastního druhu i mezi jedinci jiných druhů nebo s eukaryoty. Signálem v tomto kontextu je malá molekula generovaná jedním organismem, jež je rozpoznávána organismem jiným, následkem čehož dochází k buněčné odpovědi. Obvyklou odpovědí je pak změna genové exprese recipienta.

1.3.4.1. Kvasinky

U kvasinek je popsán tzv. ping-pong mechanismus, který může za autoindukci amoniaku u kvasinkových kolonií. Amoniak byl identifikován jako signální molekula, která je šířena vzduchem u různých nepříbuzných kvasinek a je důležitá pro vývin kolonie a její přežití (Palkova Z. *et al.*, 1997; Palkova Z. a Vachova L., 2003). Kvasinkové kolonie periodicky mění pH ve svém okolí z kyselého na zásadité a naopak. Kolonie rostou v kyselé fázi, kdy také produkují amoniak, a jejich růst je přechodně inhibován v zásadité fázi. Amoniak indukuje v koloniích různých kvasinek další produkci amoniaku nezbývá na jejich vlastní fázi vývinu. Proto všechny kolonie v daném okolí shodně zahájí produkci amoniaku poté, co amoniak začne vylučovat nejstarší

kolonie. Tato jednoduchá signální molekula může mít univerzální funkci jako signál alarmu při stresu, jako je nedostatek živin nebo vysoká úroveň toxických látek v okolí. Amoniak pak indukuje svou vlastní produkci v okolních koloniích a následkem toho se celá populace kolonií přepne na režim působení adaptivních mechanismů. Navíc je pozorována přechodná inhibice růstu ve směru gradientu amoniaku, což znamená, že kolonie se orientuje na neokupovaná místa, kde nehrozí tak vysoká kompetice o potravu (Palková Z. a Forstova J., 2000).

1.3.4.2. Bakterie

Bakterie byly v minulosti považovány za primitivní jednobuněčné mikroorganismy, které žijí samostatně nebo nahromaděny v jednoduše strukturované kolonie, které se skládají z identických pasivních partikulí. Při pozorování kolonií začíná být dnes evidentní, že na ně můžeme hledět jako na mnohobuněčné komunity (každá s počtem cca. 10^9 – 10^{12} bakterií), které mají pokročilé možnosti, jak přežít v prostředí, včetně rozdělení úkolů, regulace genové exprese, buněčné diferenciaci a dokonce i vlastní regulace speciálních úkolových skupin (bakterie se speciálními genetickými možnostmi) (Ben- Jacob E., 2004).

Pro tento účel si bakterie vyvinuly a využívají širokou paletu biochemických komunikačních prostředků, jako jsou jednoduché molekuly, například AHL (Bassler B.L., a Losick R., 2006), vněmembránové vesikly OMV (Schwechheimer C., a Kuehn M.J., 2015), peptidové signální molekuly a bakteriociny (Dirix G. *et al.*, 2004) a dokonce celé soubory těchto činitelů (plazmidy, viry) (Miller R.V., 1998). Takto je zajištěna horizontální výměna informací v kolonii ale i s jinými organismy (v placích, biofilmech).

Ben-Jacob navrhl, aby se celé spektrum bakteriální komunikace dělilo do dvou skupin: na signály vyvolávající reakci a signály informativní (sémantické a smysluplné).

1- Vyvolávající reakci rozumíme, že buňka po přijetí speciálního signálu spustí specifickou, předem determinovanou odezvu. Například přítomnost laktózy v prostředí indukuje skrze specifické vnitrobuněčné dráhy expresi souboru genů, které kódují změny nutné pro metabolismus laktózy.

2- Informativními (sémantickými) rozumíme případ, kdy činitel prostředí spouští buněčnou odpověď, která není předem definována a nemá specifickou dráhu (není přesně determinována). Smysluplná informace, kterou signál představuje spustí v buňce

individuální proces interpretace té konkrétní informace, v závislosti na daném stavu buňky a na uložení předchozích smysluplných informací v buňce. Poskytuje to buňce svobodu ke zvolení odpovědi na obdrženou zprávu, včetně vlastní přestavby a vyslání samé zprávy dalším buňkám, jež pak přestavbu provedou také (Ben-Jacob E., 2003).

1.4. Typy a mechanismy bakteriální komunikace

Mezibuněčná komunikace v koloniích je založena jak na difúzi specifických signálů, tak na přímém kontaktu mezi buňkami. Členy svého vlastního druhu, či jiných druhů, vnímají pomocí procesu quorum sensing, který umožňuje detekovat hustotu bakteriální populace.

Inter- a intra- druhová komunikace mezi jednotlivými jedinci může vést k vytvoření vysoce organizované struktury, jež je definovaná jako orientovaný shluk mikroorganismů, jež jsou napojeny k sobě navzájem, či k povrchu a jež je obklopena extracelulární polymérickou substancí, která je produkována těmito mikroorganismy. Takto utvořená vysoce komplexní interagující kolonie se nazývá biofilm. Tvorba biofilmu pak poskytuje nejen vhodné prostředí pro růst, ale vytváří i prostředí, které je odolné vůči antibakteriálním substancím (Mahajan A. *et al.*, 2013). Tvorba biofilmu je vysoce organizovaný proces, zahrnující sekvenční tvorbu vznikajícího povlaku, kolonizaci primárních kolonizátorů a poté sekundárních kolonizátorů. Bez možnosti komunikace by tyto uspořádané změny byly náhodné (Mahajan A. *et al.*, 2013).

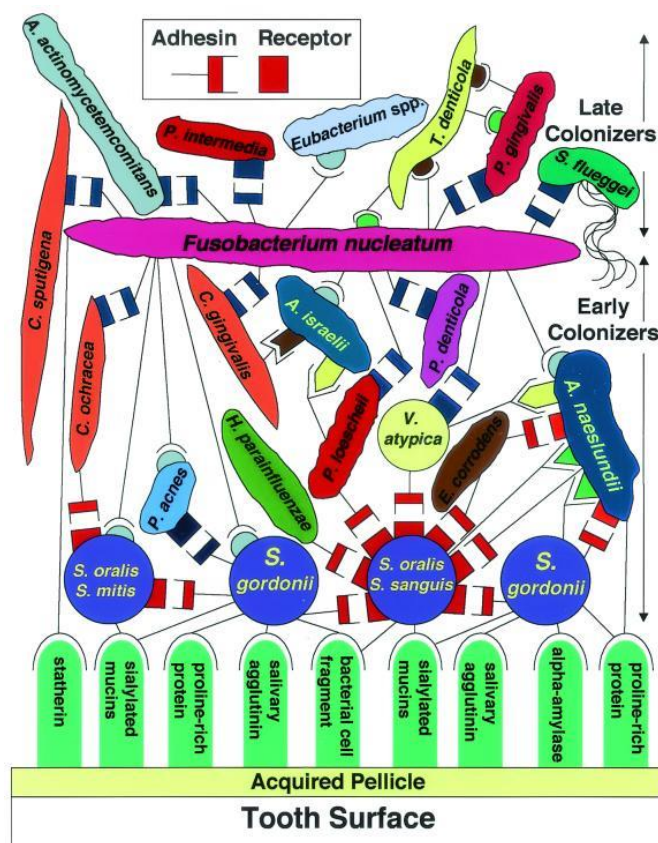
Jedním z nejlépe prostudovaných biofilmů je zubní plak. Jde o příklad vysoce sofistikovaného komunikačního systému sestávajícího se z více než 500 různých bakteriálních druhů, při jehož tvorbě se uplatňují různé podoby komunikace mezi mikroorganismy jako je fyzický kontakt, metabolická komunikace, komunikace pomocí malých signálních molekul či genetická výměna. Speciálním typem biofilmu je bakteriální kolonie (viz diskuze).

1.4.1. Fyzický kontakt

Fyzický kontakt hraje zásadní roli při formování a maturaci biofilmů. Umožňuje osídlení nového povrchu a poskytuje receptory pro primární kolonizátory. Ty pak

poskytují specifická vazebná místa pro kolonizátory sekundární. Při formování zubního plaku (biofilm) jsou popsány různé fáze jako je adheze, formování mikrokolonií, zrání (maturace) a příležitostně rozšíření se do okolního prostoru. Procesu adheze a formování mikrokolonií se účastní mechanismy bakteriálního kontaktu mikrobiální koagregace a koheze. Během koagregace dochází ke vzájemnému specifickému rozpoznávání “hráčů” a vzájemnému přilnutí obou partnerů. Koagregace byla poprvé popsána u bakterií zubního plaku (Gibbson R.J. a Nygaard M., 1970) a byla pozorována u různých bakteriálních kmenů izolovaných z různých prostředí včetně pitné vody (Rickard A.H. *et al.*, 2000). Koagregace je často zprostředkována interakcí adhesinu (např. lektin) na jedné buňce, který interaguje s komplementárním karbohydrátovým receptorem na druhé buňce. Tyto vazebné agregáty se nacházejí na bakteriálních bičících a pilech (Pratt L.A. a Kolter R., 1998). Koagregace může být zablokována přidáním jednoduchých cukrů (laktóza a další beta-galaktosidové deriváty), ale je popsáno mnoho typů koagregace, na něž jednoduché cukry inhibiční projevy nemají. Schopnost bakterií koagregovat se objevuje v suspenzích, nebo pokud je jeden bakteriální druh navázán na nějaký povrch, další druhy pak koagregují k němu. Schopnost koagregace mají dokonce i mrtvé buňky, tato vlastnost je tak vázaná na existenci vhodných povrchových molekul a ne na životnosti dané buňky.

Koheze je proces, kdy přilnutí (adheze) jednoho typu bakterie k povrchu podporuje následnou adhezi dalších bakteriálních druhů. Toto lze spatřit při primární kolonizaci nového prostoru (zubu). Tito primární kolonizátoři, kteří se přichytí k zubu, umožní dalším bakteriálním druhům, aby díky koagregaci přisedli na povrch jejich vlastních těl a tím modifikují samotný povrch zubu, čímž podporují další přilnutí sekundárních kolonizátorů (Datta A. *et al.*, 2017). Zajímavostí je, že primární kolonizátoři (většinou streptokoky) většinou nejsou schopni koagregovat se sekundárními kolonizátory. Toto vzájemné propojení časných a pozdních kolonizátorů má většinou na svědomí bakterie *Fusobacterium nucleatum*, která vytváří můstek mezi těmito dvěma skupinami ústních bakterií (Obr. 1). Časní i pozdní kolonizátoři koagregují se svými skupinami navzájem a zároveň i s touto *F. nucleatum*.



Obr. 1: Schéma zubního plaku. Model ústní bakteriální kolonizace ukazuje rozpoznání receptorů slinných pelikul časně kolonizujícími baktériemi a koagregaci mezi primárními kolonizátory, fusobakterií a sekundárními kolonizátory na povrchu zubu. V tomto modelu kolonizace jsou přítomny bakteriální kmeny *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Actinomyces israelii*, *Actinomyces naeslundii*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Capnocytophaga ochracea*, *Capnocytophaga sputigena*, *Eikenella corrodens*, *Eubacterium spp.*, *Fusobacterium nucleatum*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella denticola*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella loescheii*, *Propionibacterium acnes*, *Selenomonas flueggei*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguis*, *Treponema spp.*, a *Veillonella atypica*. (převzato od Kolenbrander P.E. et al., 2002)

1.4.2. Metabolická komunikace

Schopnost bakterií rychle analyzovat informace získané z prostředí a adaptovat se na ně hraje zásadní roli ve strukturování bakteriálních komunit (často i mezidruhových), v usměrňování konkrétních aktivit jednotlivých bakterií, ale i v ovlivňování různorodých interakcí mezi bakterií a okolním prostředím.

Metabolická komunikace na úrovni vněmembránových proteinů a příslušných receptorů zajišťuje základ pro koagregaci. Bakterie vnímá změny v lokálním mikroenvironmentálním prostředí, které jsou způsobeny sousedními buňkami a získávají

tak informace o okolní mikrobiální populaci. V reakci na tyto nové informace se dokáže bakterie adaptovat změnou genové exprese.

Příkladem vlivu lokálního mikroenvironmentálního prostředí na chování bakterie je chemotaxe, jež je jedním z nejlépe prostudovaných biologických gradientových senzorických systémů. Jde o proces, při kterém pohyblivá bakterie využívá svou schopnost vnímat okolní podmínky a jejich změny v konkrétním místě. Díky rozdílným gradientům různorodých fyzikálně chemických látek v těsném okolí bakterie, dokáže tato bakterie vyhodnotit, kterým směrem se aktivním pohybem vydá (pozitivní/negativní chemotaxe). Senzitivita tohoto systému, jehož základní síť je v rámci prokaryot v zásadě univerzální, je velmi vysoká. Koncentrace rozpoznávaných ligandů klesá až k 3 ligandům na buňku (3 nM). Tento systém jak pak kromě vnímání metabolického prostředí, přítomnosti živin či toxinů využíván v odpovědi na další environmentální faktory jako jsou pH, osmotický tlak či přítomnost jiných buněk – quorum sensing (Sourjik V. a Wingreen N.S., 2012; Micali G. a Endres R.G., 2016).

1.4.3. Komunikace pomocí signálních molekul

Signalizace pomocí chemických agens zahrnuje produkci malých signálních molekul, které, stejně jako v případě metabolické komunikace, způsobují u recipienta změnu genové exprese. Tento druh komunikace se výrazně uplatňuje při quorum sensing.

Quorum sensing (QS)

Quorum sensing je spíše typem blízké (cell to cell) buněčné komunikace, i když v rámci suspenzí může tato komunikace fungovat i na větší vzdálenosti. Jsou popsány i systémy komunikace pomocí QS v rámci celého biofilmu, ale zdá se, že původ tohoto komunikačního systému byl v potřebě komunikace v rámci dané lokality (blízké sousedství). Tento typ komunikace, jež je široce rozšířená mezi bakteriálními patogeny umožňující koordinaci exprese v rámci dosažení společných cílů, jako je bioluminiscence, syntéza antibiotik, produkce virulentních determinantů, formace biofilmů či swarming (Rice S.A. *et al.*, 2005), vede ke společné odpovědi celé bakteriální populace. Quorum sensing je založen na principu autoindukce (Suga H. a Smith K.M., 2003), kdy dochází k zapojení enzymů, které katalyzují syntézu signálu a receptoru, jenž signál váže. Tyto enzymy dále pozměňují genovou expresi některých

genů, včetně těch, které kódují enzymy produkující signál, čímž vytváří pozitivní zpětnou vazbu (Castillo-Juárez I. *et al.*, 2015). Systém tak dovoluje zvýšit počet signálních složek efektivněji, než jak by toho bylo možno dosáhnout jednoduchým zvyšováním signálních složek bez možnosti autoindukce. Díky tomu může populace změnit svoje chování dříve, než dojde ke kritickému zvýšení denzity. Expres quorum sensing kontrolovaného fenotypu je však energeticky velmi náročná a získaná výhoda je tak relevantní pouze u populací, jež dosahují vysoké hustoty (Diggle S.P. *et al.*, 2007; Pai A. *et al.*, 2012). Spolu s aktivním působením imunitního systému, je Quorum sensing hlavním faktorem, jenž determinuje hustotu bakteriální infekce. Bakteriální patogeny, kterým k infekci postačuje jejich nízké množství, postrádají QS systém. Tyto patogeny však účinně inaktivují imunitní odpověď zabíjením fagocytů. Naproti tomu patogeny, jejichž působení je závislé na vysokých hustotách, jsou na QS odkázány (Gama J.A. *et al.*, 2012).

Typy signálních molekul používaných pro quorum sensing

Důležitou roli v mezibuněčné komunikaci hrají signální molekuly, tedy molekuly, které se účastní přenosu informace při zprostředkování odpovědi buňky na změnu prostředí. U mikroorganismů jsou takovými molekulami autoinduktory a mikrobiální feromony.

Aktivita autoinduktorů je závislá na hustotě populace a má určitou hraniční mez. U Gram-negativních bakterií jsou autoinduktory převážně AHL molekuly, zatímco u Gram-pozitivních bakterií jsou jimi procesované oligopeptidy (Yajima A., 2011).

Aktivita mikrobiálních hormonů je závislá na dávce a nemá hraniční omezení. Mezi doposud identifikované mikrobiální hormony pak patří terpenoidy, steroidy, butenolidy, cerebrosidy a nukleové kyseliny (Yajima A., 2011).

Acylované homoserinlaktony (AHL, acylated homoserine lactons; AI-1)

AHL jsou amfifilní molekuly, které volně difundují přes bakteriální plazmatickou membránu (Fuqua W.C. a Greenberg E.P., 1998), a jež jsou běžně používané Gram-negativními baktériemi jako quorum-sensing autoinduktory. Tyto molekuly jsou složeny z invariantního homoserinlaktónového (HSL) kruhu, k němuž je navázán acylový řetězec skládající se z 4-18 uhlíkových atomů. Kromě délky navázaného

acylového řetězce se AHL molekuly dále liší v míře saturace navázaného řetězce a také oxidačním statusem na pozici 3. Obecně jsou AHL molekuly syntetizovány členy Lux-I rodiny AHL syntetáz za použití S-adenosylmethioninu jako substrátu a acylovaného proteinu (acyl-ACP, acyl carrier protein) (Parsek M.R. *et al.*, 1999). Syntetizované AHL molekuly poté volně difundují skrze buněčný povrch a akumulují se v blízkém okolí. V některých případech však dochází i k aktivnímu transportu AHL (Pearson J.P. *et al.*, 1999; Chan Y.Y. *et al.*, 2007). Jakmile je překročena kritická koncentrace signálních molekul, dochází k vazbě AHL k Lux-R typu receptorového proteinu v cytoplazmě buněk. Členové Lux-R rodiny receptorů jsou transkripční regulátory, jejichž DNA-vazebná aktivita je závislá na interakci s ligandem, po níž dochází k modulaci cílové genové exprese v odpovědi na akumulaci AHL (Zhu J. a Winans S.C., 2001). Každý bakteriální druh nese kognátní syntetáza/receptorový pár, který produkuje a odpovídá na specifické AHL molekuly. Některé druhy, jako *Pseudomonas aeruginosa*, však využívají vícero syntetázovo/receptorových párů, které generují a odpovídají na rozličné AHL molekuly (Jimenez P.N. *et al.*, 2012).

Autoindukční peptidy (AIP, autoinducing peptides)

AIP jsou Gram-pozitivními bakteriemi využívané geneticky kódované a ribozomálně generované 5-17 aminokyselin dlouhé peptidy, jež mohou nést neobvyklé modifikace v jejich sekvenci (Mayville P. *et al.*, 1999). Na rozdíl od AHL, jsou tyto peptidy aktivně sekretovány do extracelulárního prostředí procesem, který usnadňuje transportéry na buněčném povrchu (Ansaldi M. *et al.*, 2002). K detekci těchto molekul dochází na buněčném povrchu i intracelulárně. Mnoho známých autoindukčních peptidů je detekováno membránově vázanou senzorkou kinázou, která přepíná svoji kinázovo/fosfatázovou aktivitu v odpovědi na interakci s peptidem. Jakmile dojde k dosažení kritické hranice signálních molekul, váží se AIP k extracelulární doméně specifického kinázového receptoru. Tato interakce aktivuje kinázovou aktivitu receptoru, který pak fosforyluje sám sebe a kognátní cytoplazmatický odpovědný regulátor, což ve svém důsledku vede k aktivaci, nebo represi quorum sensing cílových genů (Solomon J.M. *et al.*, 1996).

Autoinduktor-2 (AI-2, autoinducer-2)

AI-2 je považován za univerzální signální molekulu užívanou pro mezidruhovou a vnitrodruhovou komunikaci u mnoha Gram-pozitivních i Gram-negativních bakterií (Bassler B.L. a Losick R., 2006). Tento autoinduktor je generován z prekursoru S-adenosylhomocysteinu sekvenční enzymatickou aktivitou příslušných enzymů. Vzniká tak molekula, jenž volně difunduje přes bakteriální membránu, kde dochází k její akumulaci. Rozdílné bakteriální druhy pak rozpoznávají různé modifikované formy AI-2 a k detekci dochází extra – i inter-celulárně v závislosti na druhu bakterie (Yajima A., 2011; LaSarre B. a Federle M.J., 2013).

Další signální molekuly účastnící se quorum sensing

Krom výše zmíněných tří hlavních skupin autoinduktorů, existuje celá řada dalších signálních molekul participujících na quorum sensing. Jedná například o DSF (diffusible signal factor), PQS (*Pseudomonas* quinolone signal), AI-3 (autoinducer-3) či AHK (α -hydroxyketon) (LaSarre B a Federle M.J., 2013, Liu Y.C. *et al.*, 2015). Značnou roli hrají dále mikrobiální hormony, kdy ale vzhledem k absenci mnohobuněčné sítě, je pro danou skupinu signálních molekul výstižnější termín hormonům podobné (hormon-like) látky či feromóny.

1.4.4. Horizontální genový transfer

Horizontální transfer genetické (HGT) informace je považován za hlavní příčinu molekulární evoluce mnoha bakteriálních genomů. Zároveň mají bakterie díky těmto možnostem skvělý nástroj, jak bojovat proti antibiotikům v minimálním čase a to předáváním si resistance horizontálně. Hustá bakteriální populace v biofilmech zvyšuje možnost genového transferu mezi druhy. Důkazem pro horizontální genový transfer je přítomnost konjugativních transpozómů a inzertovaných sekvencí u mnoha bakteriálních druhů.

Popsáno bylo 5 druhů horizontálního genového transferu (HGT):

1/ konjugace - polární transfer genetického materiálu skrze přímý kontakt buněk (cell-to-cell) (Heinemann J.A., 1999; Cabezón E. *et al.*, 2015). Proces konjugace byl popsán i mezidruhově mezi bakterií a kvasinkou (Heinemann J.A. a Sprague G.F., 1991).

2/ transformace - příjem a udržení DNA z prostředí (Dubnau D., 1999; Chen I. a Dubnau D., 2004).

3/ transdukce - genetický transfer pomocí bakteriofága (Mahajan A. *et al.*, 2013) či přenos skrze zprostředkovatele přenosu genů - gene transfer agents (McDaniel L.D. *et al.*, 2010; Lang *et al.*, 2012).

4/ přenos DNA pomocí nanotrubiček (nanotubes)(Dubey G.P. a Ben-Yehuda S., 2011).

5/ přenos DNA membránovými vezikuly. Přenos genetické informace pomocí vnějších membránových váčků (OMV - outer membrane vesicle) je popsán především u Gram-negativních bakterií. Tyto malé partikule o velikosti přibližně 20-250nm (Kulp A. a Kuehn M.J., 2010) obsahují většinu komponentů vnější plazmatické membrány. Tvorba OMV, která probíhá ve všech růstových fázích bakteriální kultury (Manning A.J. a Kuehn M.J., 2011), je spojena se ztrátou podstatného množství materiálu vnější membrány a znamená tak pro bakteriální buňku značný energetický výdaj. Opodstatnění tohoto procesu přinesl intenzivní výzkum v poslední době, jenž odhalil důležitou roli OMV v bakteriální fyziologii i patogenezi. Bylo prokázáno, že se vesikly účastní sekrece a doručení biomolekul (např. toxinů), horizontálního tranferu, intra – i intercelulární komunikace, podílí se při odpovědi na stresové podněty, formaci biofilmů, imunomodulaci a u patogenů přilnutí k hostitelské buňce (Roier S. *et al.*, 2016).

1.4.5. Signalizace pomocí fyzikálních signálů

V literatuře jsou popsány další typy signalizace mikroorganismů, kde jako nositel signálu neslouží biochemická molekula, nýbrž přenášený signál je povahy fyzikální.

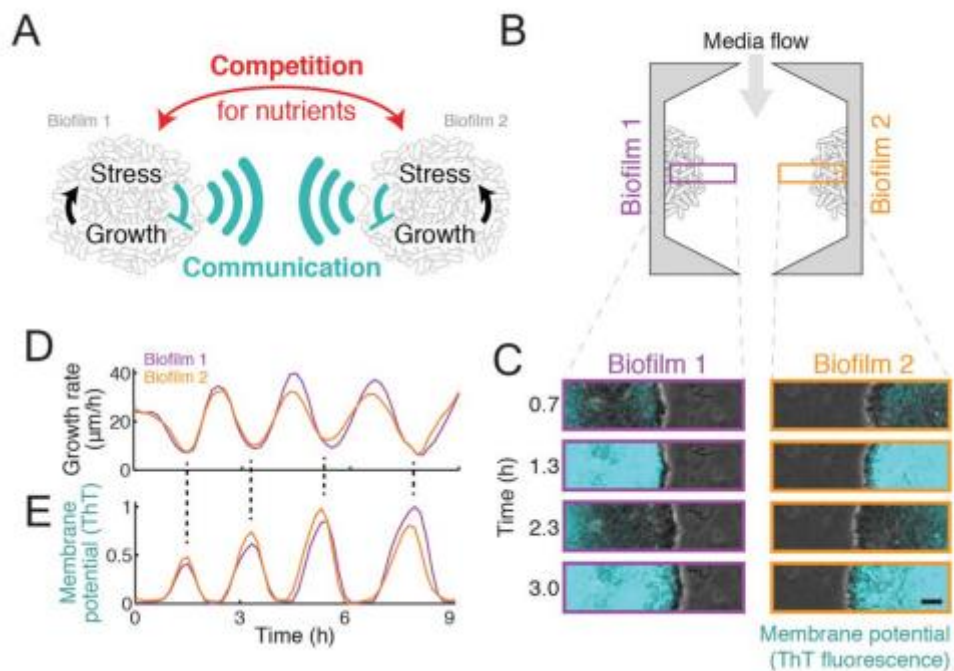
Signalizace pomocí elektrického pole

V nedávné době byla popsána komunikace mezi bakteriemi s dlouhým dosahem, která je zprostředkována elektrickým signálem. V biofilmech bakterie *Bacillus subtilis* vedou iontové kanály, jež vedou elektrické vzruchy v rámci celého biofilmu. Signály jsou vysílány skrze prostorově šířené vlny draslíku. Vypuštění draslíku do extracelulárního prostoru jednou buňkou kanálu vede ke krátkodobé depolarizaci membrány sousední buňky. Tato depolarizace je však ihned následována hyperpolarizací této sousední buňky, a to díky pozitivní zpětné reakci, během níž jsou z

této sousední buňky opět aktivně vypuštěny draslíkové ionty do vnějšího prostoru k další buňce. Takto se pomocí iontových kanálů šíří elektrický signál biofilmem (Prindle A. *et al.*, 2015). Bylo zjištěno, že tento aktivní přenos elektrického signálu v biofilmu pěstovaném v tekuté kultuře (microfluidic chamber) má například souvislost s reakcí biofilmu na nedostatek glutamátu v buňkách uprostřed biofilmu ve srovnání s jeho dostatkem na jeho vnější hranici. Jako reakce na tento koncentrační rozdíl glutamátu v rámci biofilmu byla pozorována oscilace v růstu hraničních buněk biofilmu, která byla synchronizována s oscilací elektrického signálu, jež je generován pomocí iontových kanálů (Liu J. *et al.*, 2015).

Dále bylo popsáno, že pokud jsou dva oddělené biofilmy bakterií rodu *Bacillus subtilis*, jež rostou v omezeném prostoru a vzájemné těsné blízkosti (přibližně 2 mm od sebe), pokusně vystaveny kompetici o glutamát, dokáží vzájemně spolupracovat. Tyto dvě populace vzájemně sladily (posunuly fázi oscilace růstu / elektrického signálu) svoji oscilaci růstu i elektrickou signalizaci (viz obr. 2) v rámci obou biofilmů (Liu J. *et al.*, 2017) tak, aby zřejmě minimalizovaly negativní dopad kompetice o stejnou živinu (glutamát) na růst obou biofilmů.

Biofilm bakterií rodu *Bacillus subtilis* rostoucí v tekutém médiu dokáže po dosažení určité velikosti do okolního prostředí uvolňovat draslíkové ionty ve vlnách, které na membránách okolních mikroorganismů vyvolávají změnu membránového potenciálu, a tím převádí chemický signál na signál elektrický. Tento signál tak působí jako atraktant na vzdálené bakterie stejného, ale i jiných druhů (*Pseudomonas aeruginosa*). Pohyblivé bakterie v dosahu tohoto signálu přizpůsobí směr svého pohybu a zamíří přímo k signalizujícímu biofilmu. Jak je patrné, jde o mezidruhový způsob “svolávání se” (Humphries J. *et al.*, 2017).



Obr. 2: Vzdálené biofilmy synchronizují svůj růst; A - Individuální biofilmy podléhají metabolickým oscilacím, které periodicky pozastavují růst biofilmu. Metabolické oscilace jsou koordinovány elektrickou komunikací, jejíž dosah může přesahovat hranice vlastního biofilmu. Navíc se dva biofilmy mohou propojovat díky kompetici o živiny (červené šipky); B - Schématické znázornění růstu dvou biofilmů v průtokové mikrokomůrce se stabilním průtokem živného média. Fialové a oranžové obdélníky jsou zvětšeny na obrázku C; C - Fotografie ukazující okraje biofilmů v čase. Tyrkysová barva indikuje fluorescenci Thioflavinu T (ThT), fluorescenční barvivo, díky němuž lze pozorovat změny v membránovém potenciálu v biofilmu. Měřítko je 50 µm; D - Oscilace v rychlosti růstu měřené rychlostí růstu kraje biofilmu viz obr. C; E - Oscilace v membránovém potenciálu měřené průměrnou fluorescencí ThT v okrajových částech biofilmu, viz obr. C. (převzato od Liu J., *et al.*, 2017).

U bakterie *Geobacter sulfurreducens* bylo prokázáno, že pilus, jež si tato bakterie formuje dokáže přenášet elektrický náboj na extracelulární elektronové akceptory jako jsou kovy FE(III) a Mn (IV) a tak dokáže elektrickou energii konzervovat. Bakterie *Geobacter sulfurreducens* dokáže pomocí těchto pilů tvořit jakési síť (nanowires) skrze pórovité materiály a tím se propojovat s dalšími bakteriemi, se kterými jinak nemá přímý fyzický kontakt, do větších komunit (Reguera G. *et al.*, 2007).

Signalizace za využití zvukových vln

Již dříve byl pak popsán vliv uhlíkových sloučenin, jako je grafit nebo aktivované živočišné uhlí, na růst některých bakterií během běžně netolerovaných stresových podmínek a to na vzdálenosti až několika centimetrů. Bakterie rodu *Bacillus*

carboniphilus vystavené stresu odpovídají na vzdálený účinek uhlíkových látek zvýšením růstu. Je předpoklad že grafit dokáže měnit externí elektromagnetickou energii na zvukové vlny (Matsushashi M. *et al.*, 1997). Při dalším studiu tohoto efektu bylo zjištěno, že bakterie *Bacillus carboniphilus*, vyseté na miskou s agarem, na kterém standardně nerostou, dokáží růst svých kolonií nastartovat, pokud je na ně z reproduktoru pouštěn zvuk s frekvencí 10, 30, a 40 kHz. Při dalším studiu této reaktivity bakterií na zvuk bylo zjištěno, že z hustě narostlé kolonie *Bacillus subtilis* vychází zvuk, který lze detekovat pomocí výkonného předzesilovače. Zvuk byl měřen ve frekvencích mezi 1 - 50 kHz. U hustě narostlé kolonie byly zaznamenány 3 maxima (peaky) a to na frekvencích 8 - 10 kHz, 18 - 22 kHz a 27 - 43 kHz. Díky podobnosti naměřených hodnot frekvencí vypouštěných kolonií *Bacillus subtilis* a naměřených hodnot frekvencí, na něž reagují kolonie *Bacillus carboniphilus*, autor uvažuje, že tento systém komunikace funguje jako univerzální signál regulující růst bakteriálních společenství (Matsushashi M. *et al.*, 1998).

U 3 různých mutantů bakterie *E. coli* byla také popsána emise zvukových vln (AE - acoustic emission). Mezi různými mutanty se kvalita AE různě lišila, a to jak v intenzitě největšího píku - higher peak frequencies (PFRQ), tak i v různých frekvencích, kde byl PFRQ zachycen (Cox T. J., 2014). Zdá se, že každý mutant má svojí vlastní unikátní pattern AE, což by šlo teoreticky využít pro identifikaci bakteriálních klonů.

Signalizace pomocí světla

Mnoho organismů (od bakterií po ryby) vyvinulo proces známý jako bioluminiscence, jež využívá exergonní chemické reakce k produkci viditelného světla. Je také známo, že některé druhy nesvitivých mikroorganismů včetně bakterií, kvasinek a prvoků emitují záření známé pod pojmem biofotony, Biofoton je ultraslabý typ radiace zahrnující viditelné, blízko infra-červené či blízko ultrafialové světlo. Reaktivita na tento signální systém byla prokázána nejen u buněk vyšších organismů (krysí mozkové buňky, křeččí ledvinové buňky, krysí jaterní buňky), ale také u mikroorganismů. Pokud byly kolonie *E. coli* pěstovány ve skleněném válci s různými variantami (průhledná, neprůhledná) oddělení rostoucích populací, byli mezi populacemi popsány vzájemné interakce (synchronicita růstu) pouze pokud mezi koloniemi byl průhledná přepážka. Světelná emise byla naměřena mezi 450-800nm (Trushin MV, 2003).

Elektromagnetické záření tedy může sloužit jako médium pro přenos informace mezi mikroorganismy.

Fyzikální signály mají oproti chemickým několik výhod. Prostupují prostředím rychleji, nejsou tolik limitovány difúzí a dokáží překonávat volný prostor mezi bakteriálními komunitami, a tak poskytují dobrý mechanismus pro rychlý přenos informace. Zároveň jsou tyto signály, díky svým výhodám, ideální pro mezibuněčnou komunikaci i na větší vzdálenosti v řádu centimetrů, narozdíl od biochemických signálních molekul, které mají většinou dosah v řádu milimetrů a méně (Reguera G., 2011)

1.5. Techniky mapování signálních molekul a jejich úskalí

Z výše uvedených informací je více než patrné, že bakterie využívají pro vnitro – i mezidruhovou komunikaci rozličné fyzikální, chemické i biologické procesy. Studium signálních drah, tak naráží na mnoha úskalí, které mohou být překážkou i při využití nejmodernějších technik, které v současné době mikrobiologie či molekulární biologie nabízí. Signální molekuly mohou být akceptorem signálu rozpoznávány i při velmi nízkých koncentracích, jež mohou být pod detekčním limitem metodik používaných při jejich odhalení.

Vzhledem k tomu, že technické zázemí naší laboratoře nebylo pro studium odhalení signální molekuly ovlivňující růst bakterie *Serratia marcescens* dostačující, navázali jsme spolupráci s odborníkem z Mikrobiologického ústavu AV ČR. Náš externě spolupracující kolega je součástí týmu, jež se specializuje na chromatografii, purifikaci proteinů, hmotnostní spektrometrii proteinů a jejich následnou identifikaci (Mrazek *et al*, 2012).

1.6. Taxonomický a strukturní popis bakterie *Serratia marcescens*

Rod *Serratia*, člen rodiny Enterobacteriaceae, sestává ze skupiny bakterií, které jsou si blízké fenotypově i sekvencí DNA. Typický zástupce tohoto rodu je *Serratia marcescens*.

Některé druhy Serratii produkují červený pigment prodigiosin (Williams R.P. a Qadri S,M,H., 1980). Jelikož bakterie rodu *Serratia* dobře rostou na potravinách obsahujících škrob, objevuje se jejich nárůst v podobě malých červených kulovitých skvrnek, či souvislého červeného porostu na pečivu, či polentě.

Ekologie

S. marcescens je nejčastěji izolovaným zástupcem rodu *Serratia* z říční vody a hospitalizovaných pacientů, jenž jsou při styku s touto bakterií imunokompromitováni, přičemž se nejčastěji nakazí konzumací kontaminovaných potravin. Menší množství tohoto druhu pak byla v porovnání s ostatními členy rodu *Serratia* izolována z rostlin, malých savců či ze zvířecích teritorií. Bakteriím *S. marcescens* rostoucím ve vodě, či v půdě, může dávat značnou ekologickou výhodu fakt, že jsou schopné produkovat prodigiosin, jenž je toxický pro prvoky. Díky své schopnosti mineralizovat organické železo a rozpouštět zlato či měď může pak v půdě hrát *S.marcescens* významnou roli v biologickém cyklu kovů (Grimont F. a Grimont P.A.D., 2006).

Významné sloučeniny produkované Serratii

Pigmenty (prodigiosin)- nedifuzní červený pigment vzniklý jako sekundární metabolit vzniklý enzymatickou kondenzací 2-metyl-3-amylpyrrolu a 4-metoxy-2,2'-bipyrrole-5-carboxy-aldehydu, jež vede k produkci 2-methyl-3-amyl-6-methoxyprodigiosinu. Syntéza pigmentu vyžaduje přítomnost vzduchu, avšak konkrétní biosyntetická dráha vstupních komponent není doposud přesně známa. Některé kmeny Serratii pak dále produkují růžový či žlutý difuzní pigment.

Biosurfaktanty (Serrawetin)- dva pigmentované a některé nepigmentované druhy *S.marcescens* produkují biosurfaktanty, jenž mohou působit jako zvlhčující činidlo. Toto činidlo je produkováno ve velkém množství při 30°C (avšak ne při 37°C) během stacionární fáze růstu.

Mastné kyseliny – *Serratia* produkuje hlavně 3-hydroxy-tetradecanové, *n*-hexadecanové, hexadecanové a octadecanové kyseliny, jež tvoří 50-80% komponent mastných kyselin.

Enzymy - *S.marcescens* produkuje 5 proteinů, jež mají chitinolytickou aktivitu. Tato aktivita je potenciálně využitelná k úpravě chitin-obsahujícího odpadu produkovaného při zpracování plodů moře, při výrobě činidel proti rostlinným patogenním houbám, produkci adheziv, při regeneraci vody od těžkých kovů atd. Další využití některých *Serratii* se objevuje v biotechnologiích (Grimont F. a Grimont P.A.D., 2006).

Růstové podmínky

Pigmentované druhy *Serratii* vykazují růžové, nebo červené zbarvení kolonií na živném agaru. Použití nízko-fosfátového agaru bez glukózy je nejlepším způsobem pro demonstraci pigmentace. Na živném agaru s glukózou však tvoří morfologicky složitější kolonie (Rieger T. *et al.*, 2008). Nepigmentované druhy *Serratii* vytváří na živném agaru neprůhledné bělavé mukoidní kolonie, popřípadě transparentní hladké kolonie. *Serratie* jsou tolerantní ke koncentraci solí a jsou schopny růst při relativně nízkých minimálních teplotách. Nejlepší zisky při kultivaci jsou získávány, pokud je kultura *Serratii* inkubována při 30°C. Při 37°C dochází často k neobjevení pigmentace (mimo *S. marcescens*). Divoké kmeny rodu *Serratia* obvykle nevyžadují přidání růstových faktorů do minimálního média. Dostatečným pro jejich růst je tedy minimální medium obohacené o zdroj uhlíku.

Během růstu produkují bakterie rodu *Serratia* extracelulární gelatinázy, lecitinázy a DNAázy, jež jsou tak základním charakteristickým prvkem tohoto rodu a může tak sloužit k jeho identifikaci. Většina zástupců rodu *Serratia* je navíc rezistentní k některým komponentům jako colistimethate, cephalothin či thaliové soli, jež pak mohou být použity jako selektivní marker tohoto rodu.

2. Cíle práce

Tato práce navazuje na předchozí práce naší skupiny, v nichž jsme studovali morfogenezi, variabilitu a vzájemnou komunikaci bakteriálních kolonií již řadu let. Nejdříve jsme zkoumali a popisovali morfogenezi kolonií zdrojového kmene *Serratia marcescens* CNCTS 5965. Tento kmen tvoří po vysetí na standardní živné půdě (ŽA) červené nestrukturované kolonie. Po vysetí na půdu obohacenou o glukózu (ŽA + G) narostlo více barevných a tvarových variant kolonií. Kromě bílých nestrukturovaných i lehce strukturovaných (lehce červený vnější val) jsme pozorovali i kolonie se zvednutým červeným valem a vystouplým červeným středem, které jsme nazvali Fontánka (fenotyp F; Obr. 3). Tento fenotyp byl po několikerém vysetí na ŽA + G nadále stabilní a pro naše účely optimální z důvodu komplexní morfogeneze (Rieger T. *et al.*, 2008).



Obr. 3 - Kolonie fenotypu F; dole - profil kolonie

Zajímalo nás, jakým způsobem dokáží podmínky prostředí, kterým je kolonie během svého vývoje vystavená ovlivnit časný vývoj kolonie a výsledný vzhled kolonie zralé (fenotyp F). K tomuto zjištění jsme testovali vliv kvality živné půdy – konkrétně její typ, zdroj cukru, hustotu, vlhkost. Na výsledný vzhled kolonie (F) má však výrazný vliv také životní prostor, ve kterém daná kolonie roste. Pokusili jsme se tedy definovat, jaký dopad má na vývoj a výsledný vzhled kolonie pozice ve výsevu v rámci Petriho misky (zda je na okraji či v prostoru) a jakou roli hraje hustota výsevu, obzvláště pak případný kontakt více stejných či různých druhů kolonií (Rieger T. *et al.*, 2008).

V dalších pracích jsme popisovali, jak jsme z původních zdrojů postupně vyizolovali další stabilně udržitelný morfotyp (**M**) bakterie *S. marcescens* (Patkova I. *et al.*, 2012). Zkoumali jsme, jak se různé klony i druhy vzájemně ovlivňují, pokud rostou v blízké vzdálenosti, nebo jsou dokonce natečkované ve směsi, a v neposlední řadě jsme se zaměřili, jak spolu jednotlivé kolonie či makrokolonie interagují a komunikují. (Cepl J. *et al.*, 2010).

Cílem této práce ze začátku bylo podrobněji popsat efekt ovlivňování blízko rostoucích kolonií. Posléze jsme se chtěli zaměřit na fyzikální či biochemickou podstatu tohoto ovlivňování. Během studia tohoto ovlivňování byl popsán efekt podpory růstu vytečkované **F** kolonie na **MMA** (fenotyp **F** za standardních podmínek na **MMA** neroste) za přítomnosti rostoucí makrokolonie (fenotypy **M**, fenotyp **R**, *E. coli*) na **MMA**.

Po tomto pozorování bylo dalším cílem této práce:

- 1: Identifikace mechanismu (vzduch, agar) přenosu informační agens
- 2: Nalezení konkrétní signální molekuly

Navazujeme na publikované práce (Rieger T. *et al.*, 2008; Patkova I. *et al.*, 2012).

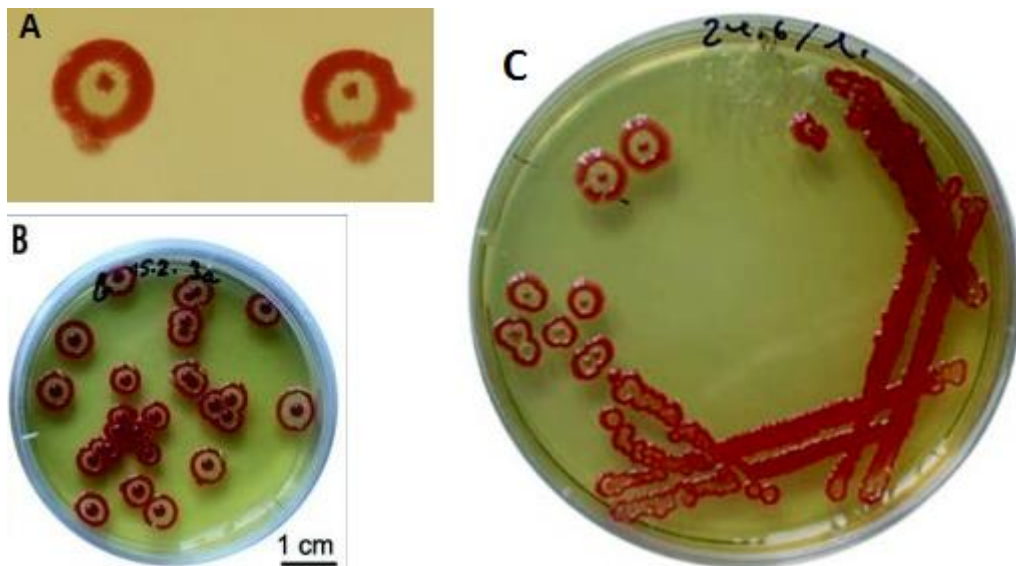
Publikované práce rozšiřujeme o studii týkající se ovlivňování růstu kolonie typu **F** na **MMA**.

3. Definice, materiály a metody

3.1. Definice pojmů

3.1.1. Typy uspořádání buněčných těl na Petriho misce

Kolonie – mnohobuněčný útvar vzniklý po inokulaci bakteriální suspenze výsevem na Petriho misku s živnou půdou, kdy narostou uniformní kolonie vzniklé z jednotlivých bakteriálních buněk. Při dostatečném ředění je předpoklad, že vzrostlé kolonie mají původ v jediné buňce, ale definitivní jistotu toho, že tyto kolonie nevznikají z více buněk najednou, mít nemůžeme. Často se při experimentech používají tzv. „makrokolonie“ („giant colonies“ - Palkova Z., *et al.*, 1997; „toothpick inoculation“ - Shapiro J. A. a Higgins N.A., 1989) mající stejný vzhled i vlastnosti jako kolonie ze standardního výsevu. I my jsme zjistili, že na výsledné morfologii není patrné, zda kolonie vznikla při inokulaci z jediné buňky (“ideální” výsev - obr. 3B), či z více buněk (vyčárkování - obr. 3C, vytečkování - obr. 3A).



Obr. 3 - Morfologie kolonie F fenotypu na ŽA + G při různých typech inokulace; A - vytečkováná kolonie; B - vyšeté kolonie; C - vyčárkovaná kolonie.

Definice fenotypů a zdrojových organismů studovaných kolonií.

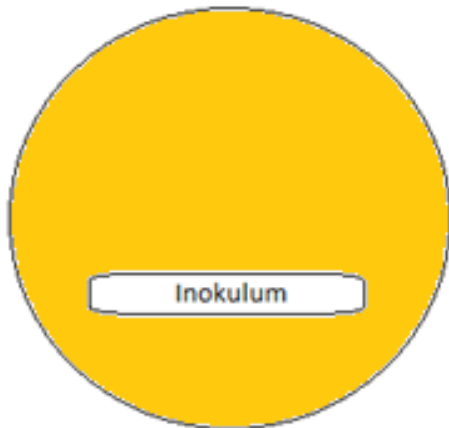
F - “fontánka” - kolonie *Serratia marcescens* s červeným vystouplým středem, nízkým nepigmentovaným mezikružím a červeným vystouplým lemem na okraji

R - lesklé radiálně symetrické červené kolonie - “wild type” *Serratia rubidea*

M - bílá nestruturovaná kolonie *Serratia marcescens* s lehce načervenalým středem

Makrokolonie – makrokolonií rozumíme jakýkoliv buněčný nárůst (linky, husté suspenze), který není vytvořen z jednotlivé buňky (výsevem).

Linka – Inokulum bakteriální suspenze (cca 30 μ l), které je rozprostřeno pomocí sterilní plastové tyčinky na Petriho misku do lineárního tvaru cca 5 cm dlouhého, tvořícího tak makrokolonii. Toto lineární uspořádání nazýváme také **Makula**. Pro naše účely jsme rozprostírali linku dle uspořádání, jenž je znázorněné na Obr. 4.



Obr. 4 - schéma inokulace makuly na Petriho misku

Všechny bakteriální makroútvary (kolonie, makula) rostoucí na živné půdě nazýváme dle potřeby také „buněčná těla“.

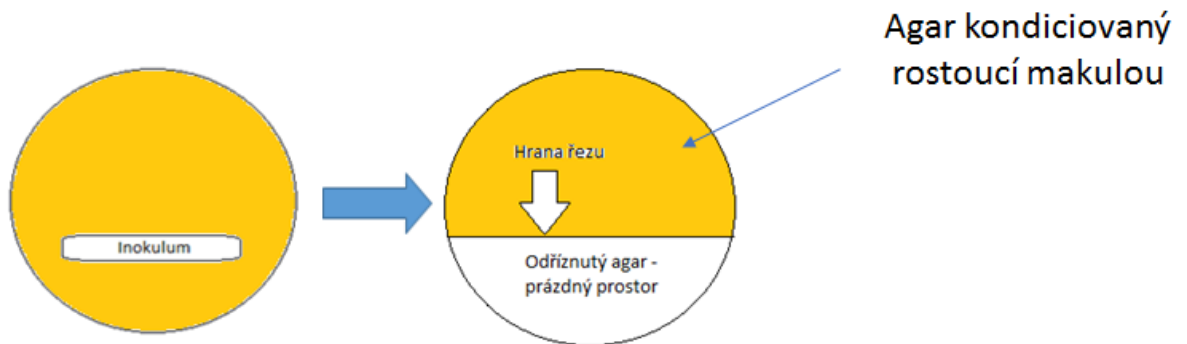
3.1.2. Typy kondiciovaných kultur

Kondiciované médium:

Bakteriální suspenze narostlá v třepané kultuře v tekutém minimálním médiu (**MM**) do stacionární fáze (inkubace při 27°C, po dobu alespoň 72 hod) byla stočena v centrifuze při 10 000 g po dobu jedné minuty. Následovala filtrace supernatantu přes bakteriální filtr (Acrodisk). Získané médium je tak obohacené o všechny přidané látky, jež produkuje rostoucí populace bakterií, ale je zbavené všech živých i mrtvých buněk.

Kondiciovaný agar:

Na Petriho misce se živnou půdou (**MMA, ŽA + G**) byla inokulována linka bakteriální suspenze (30 µl suspenze s obsahem cca 10⁸ bakteriálních buněk) a inkubována při 27 °C po dobu minimálně 72hod. Poté byla sterilním skalpelem odříznuta spodní část agaru i s nárůstem bakterií (Obr. 5). Zbylý prázdný agar je kondiciovaný látkami vypouštěnými rostoucí suspenzí bakterií nanesených do lineárního uspořádání.



Obr. 5: Schéma procesu kondiciace agaru; Spodní část agaru byla odříznuta po 72 hodinách růstu inokulované makuly.

3.2. Materiál a metody

3.2.1. Média a živné půdy

ŽA + G – viz NAG (Patkova I., *et al*, 2012)

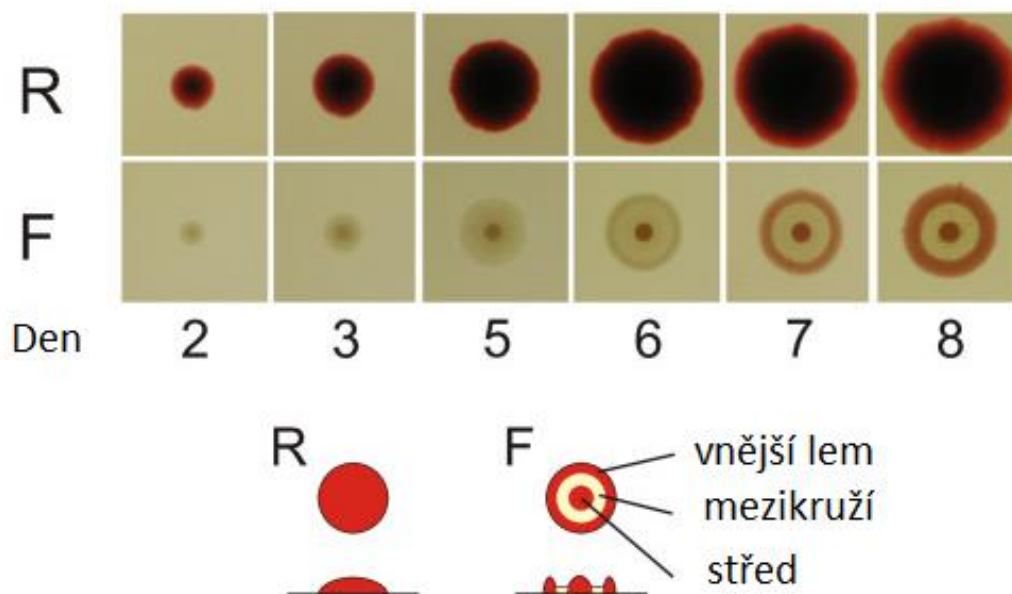
Minimální médium **MM** - viz Minimal medium (Patkova I., *et al*, 2012)

Minimální agar **MMA** - viz Minimal agar (Patkova I., *et al*, 2012)

3.2.2. Bakteriální kmeny

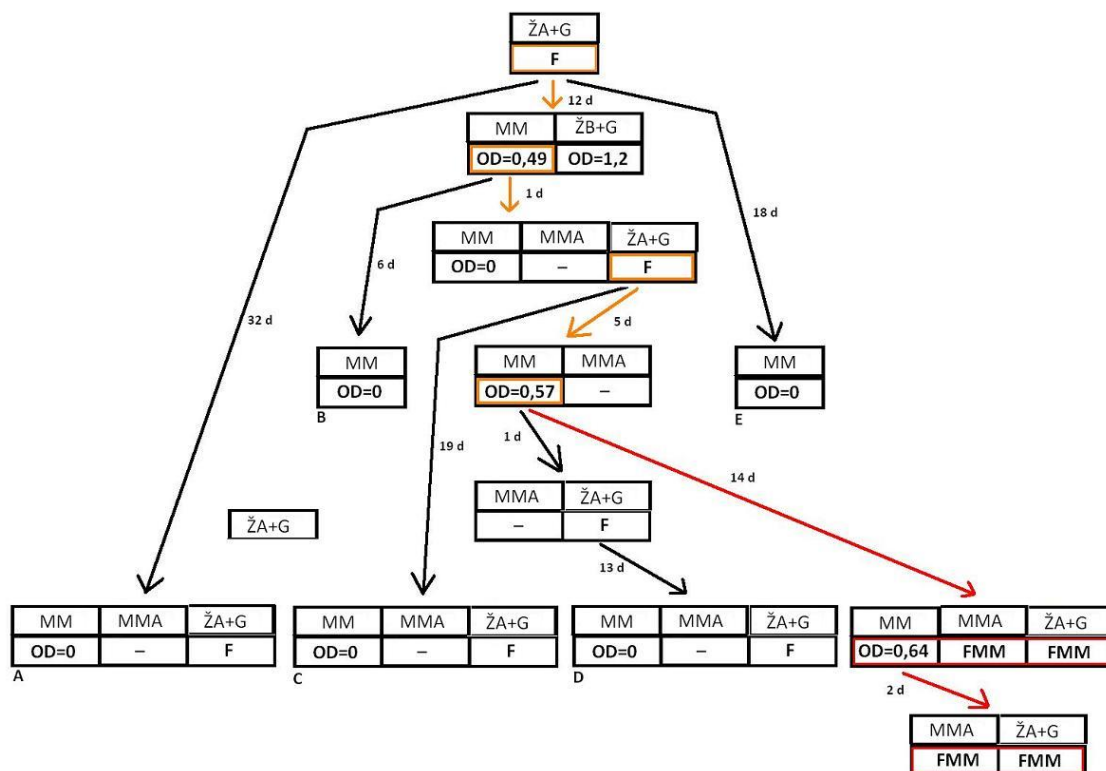
Kmen *Serratia rubidaea* byl získán ze sbírek Katedry Genetiky a Mikrobiologie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Karlovy. Kolonie *S. rubidaea* po vysetí na Petriho misku s **ŽA + G** ve vzájemné minimální vzdálenosti 20 mm vyrostou do hladkých, lesklých radiálně symetrických červených kolonií (fenotyp **R**, viz obr. 6 nahoře). Ve výsevu se často objevují i stabilní bílé klony.

Kmen *S. marcescens* CNCTS 5965 byl získán ze Státního Zdravotního Ústavu (SZÚ). Z původního zdroje *S. marcescens* CNCTS 5965 byl po vysetí na živnou půdu **ŽA + G** vyizolován fenotyp **F** (Fontánka viz. Obr. 6), který je na půdě **ŽA + G** dále udržitelný.



Obr.: 6: Vzhled kolonie R (*Serratia rubidaea*) a F (*Serratia marcescens*) fenotypu na živné půdě ŽA + G; R – vyizolovaný z původního zdroje *S. rubidaea* tvoří červené, hladké, lesklé, nestrukturované kolonie.; F – vyizolovaný „fontánkovitý“ fenotyp z původního zdroje *S. marcescens*, kolonie fenotypu F je tvořena červeným vystouplým středem, nízkým nepigmentovaným mezikružím a na okraji je opět vystouplý červený lem, jehož vytvořením kolonie ukončuje svůj (převzato od Cepl J. *et al.*, 2010).

Fenotyp **M** byl odvozen z fenotypu **F**. Bakterie fenotypu **F** (*S. marcescens*) v **MM** médiu standardně nerostou, pouze přežívají. Po několika cyklech pěstování fenotypu **F** v **MM** v třepané kultivaci a následném výsevu na definovanou půdu **MMA** byla ve výsevu zpozorována bílá nestrukturovaná kolonie s lehce červeným středem, jež jsme vyizolovali a pojmenovali fenotyp **M**. (časové schéma zisku **M** klonu na Obr. 7). Tento fenotyp byl nadále udržitelný nejen na ŽA + G, ale rostl i na **MMA** (na rozdíl od „mateřského“ fenotypu **F**, viz níže). 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 (Cepl J., 2013).



Obr. 7: Časové schéma izolace M klonu z původního F klonu *Serratia marcescens*; Šipky označují kultivaci v třepaném MM; Barevné šipky ukazují postup získání M klonu; čísla u šipek označují počet dnů kultivace v daném médiu; F označuje kolonie morfotypu fontánka (F); FMM označuje kolonie morfotypu M. (převzato od Cepl J., 2013).

Kmen *E. coli* 281 byl získán ze sbírek Katedry Genetiky a Mikrobiologie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Karlovy.

3.2.3. Metody

3.2.3.1. Pěstování bakteriálních kolonií

Metodika zahrnující měření OD, výsev kolonií, inkubaci a dokumentaci byla popsána v příloženém článku (Rieger T., et al, 2008).

Pro zbavení kondiciovaného média bakterií bylo kondiciované médium přefiltrováno přes filtr Acrodisc (Sigma - Aldrich).

Pro odfiltrování molekul větších než 3500 Da z kondiciovaného média bylo kondiciované médium přefiltrováno přes filtr Slide - A - lyzer mini dialysis unit (Thermo scientific).

3.2.3.2 SDS-PAGE elektroforéza

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS) je biochemická metoda využívaná k separaci proteinů na základě jejich elektroforetické pohyblivosti. Tato pohyblivost závisí na mnoha faktorech jako je náboj, molekulová váha, stupeň rozbalení (denaturace) proteinu, posttranslační modifikace proteinu, okolní teplota či viskozita. Některé z těchto faktorů nelze měnit (molekulová váha), ale jiné se dají vhodnými experimentálními podmínkami měnit (tvar, náboj, okolní teplota, atd.)

SDS je anionaktivní detergent, který nese poměrně vysoký náboj, a proto ve vazbě na bílkovinu vyrovnává nábojové rozdíly bílkovin a ty se pohybují v gelu jen podle velikosti. Všechny bílkoviny totiž váží SDS v konstantním poměru, asi 1,4g SDS na 1g bílkoviny, a tím charakteristicky mění svou konformaci. Výsledné komplexy SDS-bílkovina pak mají stejnou hodnotu povrchového náboje a jejich konformace se do té míry unifikuje, že relativní molekulová hmotnost bílkoviny odpovídá velikosti jejího komplexu s SDS. Experimentálně byla prokázána přímá úměrnost elektroforetické pohyblivosti komplexů SDS-bílkovina v polyakrylamidovém gelu a logaritmu relativní molekulové hmotnosti. Takto stanovené hodnoty rel. mol. hmotnosti se obecně uznávají pro účely charakterizace bílkovinného preparátu (čerpáno z <http://biochemie.sweb.cz/x/metody/elektroforeza.htm>).

Příprava vzorků pro SDS PAGE.

Pro analýzu pomocí SDS – PAGE elektroforézy byl z misek 4 dnů růstu ve 27 °C sterilně vyříznut kousek agarů. Agar byl přenesen do 50 ml zkumavky, kde k němu bylo přidáno 15 ml ddH₂O a 4 dny jsme tento agar třepali při 30 °C. Poté byl vzorek přefiltrován přes 0,22 μm filtr. Následně bylo ke vzorkům přidáno 10 ml 30 % TCA a 1 ml 10 % Tritonu X-100. Vzorek byl inkubován ve 4°C po dobu 6 hodin. Dále byl vzorek odstředěn při 9000 g při 4°C po dobu 60 minut. Supernatant byl odstraněn a peleta resuspendována v 10 ml acetonu. Pak byl vzorek inkubován při 4°C po dobu 48 hodin a opět odstředěn při 9000 g při 4°C po dobu 60 minut. Supernatant byl odstraněn a vzorek byl lyofilizován na přístroji SpeedVac po dobu 3 hodin při 30 °C. Peleta byla poté rozpuštěna ve 200 μl pufru SB + 100 mM DTT (dithiotreitol).

SB pufr: 50 mM Tris, 12 % glycerol, 4 % SDS, 0,1 % bromfenolová modř, 2% beta-merkptoethanol, pH = 6,8.

Vzorky byly naneseny do 15 % separačního polyakrylamidového gelu, který byl převrstven zaostřovacím gelem. Elektroforéza probíhala s počátečním napětím 200 V, 65 mA po dobu 60 minut. K vizualizaci separovaných proteinů byla použita Commasie Blue brilliant R250 po dobu 20 minut při laboratorní teplotě. Jako odbarvovacího roztoku jsme použili směs H₂O: MeOH: Hac v poměru 55:45:10 ve kterém byl gel inkubován při laboratorní teplotě a stálého míchání do úplného odbarvení.

3.2.3.3. MALDI-TOF

Hmotnostní spektrometrie je založena na rozdělení nabitých částic ve zkoumaném vzorku podle jejich molekulových hmotností v elektrickém/magnetickém poli. K ionizaci vzorku se používá laser. Během analyzování vzorku je nutné zajistit efektivní a kontrolovatelný přenos energie na vzorek tak, aby se zároveň zamezilo jeho tepelnému rozkladu.

Molekula rezonančně absorbuje při vlnové délce laseru, to znamená, že energie fotonů laseru je rovna energii potřebné k vybuzení dané molekuly a tím i k její ionizaci. Samotný přenos energie na vzorek se děje ve velmi krátkém čase, řádově v jednotkách až desítkách nanosekund.

Jsou-li molekuly vzorku ionizovány laserem přímo, většinou se štěpí nežádoucím způsobem. Proto se začala používat matrice – látka, jejímž prostřednictvím se ionizační energie laseru přenáší na molekuly vzorku a tím brání jejich štěpení. Ionizace laserem přes matrici umožňuje měřit molekulové hmotnosti více látek v tomtéž vzorku. V měření ani tak nepřekáží běžné pozadí biologických a biochemických vzorků jako například pufrační roztoky.

K stanovení vyšších molekulových hmotností se používá ionizace laserem za přítomnosti matrice (MALDI, matrix assisted laser desorption/ionization) v kombinaci s detektorem doby letu (TOF, time-of-flight). Detektor umožňuje změřit dobu průletu a z ní lze vypočítat rychlost částice.

Směs matrice a vzorku v pevném stavu a na vhodném nosiči, například na nerezové destičce, je zasažena nanosekundovým pulzem laseru. Matrice energii pulzu absorbuje a její rozklad ionizuje molekuly vzorku. Touto ionizací se rozumí adice kationtu (H⁺, Na⁺) či aniontu na molekulu vzorku, disociace H⁺ z molekuly vzorku, vznik radikálu odštěpením elektronu, popřípadě cílené rozkouskování (vysokou energií laseru) molekuly vzorku a opět spojení kousků. Ionty analyzované látky jsou urychleny silným

elektrickým polem (25–30 kV) a přes uzemněnou mřížku vstupují do vakua v trubici detektoru letu, kde se pohybují rychlostí danou jejich hmotností a nábojem. Zde se měří doba letu částice, z níž se pak vypočte poměr molekulové hmotnosti a náboje částice. Hmotnostní spektroskopie MALDI byla původně vyvinuta pro kvalitativní analýzu peptidů a bílkovin, avšak nyní se využívá i pro analýzy nukleových kyselin nebo nízkomolekulárních organických i anorganických látek. Výhodou je vysoká citlivost a rychlost měření. Při analýze se vzorek nerozpadá, což umožňuje měření složitějších směsí, zanedbatelný je i vliv pozadí. Metodu MALDI lze kombinovat jako hmotnostní detektor se separačními metodami, například gelovou elektroforézou či kapalinovou chromatografií.

(čerpáno z <http://casopis.vesmir.cz/clanek/hmotnostni-spektrometrie-maldi-tof>).

Příprava vzorků pro hmotnostní spektrometrii

Příprava zahrnovala vyříznutí bandů z SDS-PAGE skalpelem a jejich rozkrájení na přibližně stejně velké kostičky (cca 1 mm³), jež byly přeneseny do čistých zkumavek. Gely byly dále odbarvovány sonikací ve směsi ethylmorfolinového pufru s přídavkem 300 μM cystaminu a acetonitrilu (AcN) v poměru 1:1 (o celkovém objemu cca 30 μl). Směs byla několikrát vyměněna, dokud nebyly gely zcela bezbarvé a nakonec byla směs odstraněna. Následně byly gely vysušeny pětiminutovou sonikací ve 30 μl AcN. Roztok AcN byl pak odstraněn a bylo přidáno 30 μl ethylmorfolinového pufru, v němž byly gely též 5 minut sonikovány. Tento proces byl zopakován 3x, poté byly gely vysušeny na vakuové odparce. Ke štěpení proteinu byl použit trypsin. K vysušeným gelům bylo přidáno 50 μl 10% AcN v ethylmorfolinovém pufru s 300 μM cystaminem a příslušnou proteázou (trypsin do finální koncentrace 20 ng/μl) Směsy byly inkubovány přes noc při 37 °C.

Extrakce peptidů z gelu:

Proteázy byly po této inkubaci inaktivovány 1% kyselinou mravenčí (FA). Následně byla směs ze zkumavek odebrána do nových zkumavek, kam byly přidávány další extrakty: 30 μl AcN a 30 μl 0,5% FA, v nichž byly gely střídavě 5 minut sonikovány. Extrakce peptidů z gelu byla provedena pomocí sonikace, která probíhala nejprve s AcN a poté s FA, a byla zopakována 3x. Nakonec byly extrahované směsi odpařeny na vakuové odparce.

Peptidy byly rozpuštěny v 0.5 % FA s 2 % CCA která sloužila jako matrice.

3.2.3.4. Proteinový fingerprint

Proteinový fingerprint (Peptide mass fingerprinting (PMF)) je analytická technika pro identifikaci proteinů, ve které je hledaný protein nejprve rozštěpený na menší peptidy, jejichž absolutní hmotnosti mohou být přesně změřeny pomocí hmotnostní spektrometrie jako je MALDI-TOF nebo ESI-TOF. Hmotnosti peptidů jsou porovnány s databází obsahující známé proteinové sekvence daného organismu nebo celý jeho genom. Genom se pomocí počítačových programů (např. www.expasy.org) přeloží do proteinových sekvencí. Poté si další program (např. Mascot) všechny teoretické proteiny “rozstříhá” na menší peptidy a propočítá absolutní hmotu takovýchto úseků peptidů všech teoretických proteinů. Poté se porovnají hmoty nalezených peptidů (pomocí hmotnostní spektrometrie) se všemi teoretickými částmi všech možných proteinů daného organismu. Výsledky jsou statisticky vyhodnoceny s cílem nalézt nejlepší shodu hledaného proteinu s nějakým teoretickým proteinem.

3.2.3.5. Gelová chromatografie

Gel je umístěn ve svislé koloně. Uvnitř gelu jsou póry - jedná se o molekulové síto. Směs látek se nanese na povrch gelu. Kolonou protéká konstantní rychlostí mobilní fáze neboli eluční roztok stejného složení jako má roztok v pórech gelu a látky procházejí kolonou různou rychlostí. Molekuly větší než póry gelu nemohou pronikat do pórů a procházejí přes kolonu stejnou rychlostí jako mobilní fáze. Objeví se v eluátu hned po vytečení intersticiální kapaliny z kolony. Dochází k tzv. stérickému vyloučení (= exkluzi) větších molekul. Malé molekuly pronikají do pórů gelu. Tam mobilní fáze neprotéká a neunáší je. Pokud se difúzí dostanou ven z částice gelu, proud mobilní fáze ji odnese k další částici gelu. Látky se rozdělují podle zmenšujících se rozměrů molekul. Velké molekuly tedy procházejí kolonou rychleji, malé pomaleji. V praxi se však také uplatňují další interakce mezi částicemi, např. adsorpční, polární, apod. Pokud není uvedeno jinak, prováděla se chromatografie při absorbananci 280 nm.

Příprava vzorků pro gelovou chromatografii

Pro chromatografickou analýzu jsme připravili 60 ml minimálního média (MM) kondiciovaného růstem **R** fenotypu po dobu 4 dnů. Toto kondiciované médium jsme odstředili po dobu 15 min při 4000x g. Supernatant jsme filtrací přes bakteriální filtr (Acrodisc) zbavili bakterií, poté byl převeden do odpařovacích baněk, zmražen při -80°C

a vakuově odpařen (SpeedVac). Suchá hmota byla rozpuštěna v cca 5ml 50mM octanu amonného při pH=5,8. Získaný roztok byl zbaven nerozpustných zbytků filtrací přes 0,45 μ m PVDF membránu. Poté bylo 0,5ml přefiltrovaného roztoku nanášeno na kolonu Sephadex G-15 (300mm délka, 10mm průměr, přístroj Biorad). Chromatografie probíhala při konstantním průtoku 0,3ml/min.

Příprava vzorků o velkém objemu

Po 96 hodinách třepání MM inokulovaného fenotypem R při 27°C bylo 500 ml kondiciovaného média odstředěno při 4000x g po dobu 15 min a poté přefiltrováno přes bakteriální filtr (Acrodisc), abychom se zbavili bakterií z kondiciovaného média. Supernatant byl převeden do odpařovacích baněk, zmrazen při -80°C a poté vakuově odpařen. Suchá hmota byla rozpuštěna v cca 5ml 50mM octanu amonného (pH=5,8) a roztok byl zbaven nerozpustných zbytků filtrací přes 0,45 μ m PVDF membránu. Poté bylo 0,5ml přefiltrovaného roztoku nanášeno na kolonu Sephadexu G-15 (300mm délka, 10mm průměr). Chromatografie probíhala při konstantním průtoku 0,3ml/min. V případě potřeby přípravy větších objemů bylo použito 2ml vzorku na koloně (Sephadex G-15) s délkou 600mm a průměrem 26mm s průtokem 2ml/min.

3.2.3.6. Chromatografie (reverzní fáze)

Typ chromatografie, u které je na nepolární hydrofóbní stacionární fázi (např. na oktadecylovaném silikagelu) chování analytů opačné vzhledem k chování na silikagelu. Jako mobilní fáze se používá směs polárních rozpouštědel: voda-metanol, voda-acetonitril, voda-isopropylalkohol. Vodná složka může obsahovat rozpuštěnou látku (sůl, kyselinu).

Příprava vzorků pro chromatografii s reverzní fází

Funkční frakce získané gelovou chromatografií byly smíchány, vakuově vysušeny při pokojové teplotě a znovu rozpuštěny v 1,5 ml 5 % AcN + 0.1% TFA.

Chromatografie - pufr A: 5% AcN + 0,1% TFA

pufr B: 95% AcN + 0,07% TFA

Takto získaný vzorek jsme použili pro chromatografii s reverzní fází (reversed phase chromatography, **RPC**) na koloně C18 v tomto časovém schématu: 20 min A; 40 min → 20 % B; 10 min → 100% B; 10 min B; 10 min A. Nastříknuto bylo 750 μ l vzorku.

3.2.3.7. NMR spektroskopie

Zkratka NMR znamená Nukleární Magnetická Rezonance. Jde o analytickou metodu, která na základě absorpce radiofrekvenčního záření vzorkem umístěným v silném magnetickém poli poskytuje informace o struktuře zkoumané látky. Tato metoda je v chemii velmi důležitá a slouží jak ke studiu nízkomolekulárních látek, tak i k objasňování struktury velkých molekul z oblasti biologie a biochemie, např. bílkovin, DNA, RNA, atd.

Jak je patrné z názvu, NMR spektroskopie se zabývá chováním atomového jádra v magnetickém poli. Atomové jádro se v nejjednodušším přiblížení skládá ze dvou částic – kladně nabitého protonu a elektricky neutrálního neutronu. Každá z těchto částic má důležitou vlastnost, která se nazývá spin. Zjednodušeně můžeme říct, že jde o směr rotačního pohybu částice. Hodnota spinu elementární částice (protonu nebo neutronu) může být $+1/2$ nebo $-1/2$. Součet spinů všech částic v jádře se nazývá jaderný spin. Tato charakteristika nám říká, jestli bude dané jádro vhodné pro NMR spektroskopii nebo ne. Pro vlastní měření jsou nejvýhodnější jádra se spinem $1/2$, např. ^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^{31}P (čerpáno z <http://nmrlab.chemi.muni.cz/img/NMR.pdf>).

Příprava vzorků pro NMR

Při přípravě vzorku na NMR byl vzorek rozpuštěn v 0.4ml D₂O. Měřena byla spektra ^1H s potlačením reziduálního signálu vody pomocí "excitation sculpting". Použitý počet akumulací byl 64. Vzorky byly analyzovány pomocí přístroje Spektrometr 600MHz Bruker AVANCE III, jež byl vybavený kryosondou.

3.2.3.8. Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer (FT-ICR)

Při analýze vzorku pomocí hmotnostní spektrometrie s iontovou cyklotronovou rezonancí se excitují ionty pomocí krátkého vystavení vzorku střídavému proudu. Ten způsobí simultánní excitaci všech iontů v cele. Ion se v silném magnetickém poli začne pohybovat s cykloidální trajektorií a frekvencí ωc . Simultánně se detekuje frekvence všech iontů (každá m/z má charakteristickou frekvenci a pomocí FT (Fourierovy transformace) se převádí na hmotnostní spektrum.

Hmotnostní spektrometrie FT-ICR byla provedena na přístroji 9.4 T Apex-Qe mass spectrometer - Bruker Daltonics při nástřiku $2\mu\text{l}/\text{min}$. Před měřením přesné molekulové hmotnosti nativního proteinu pomocí ESI-FT-ICR MS byl vzorek zbaven

solí na koloně MacroTrap C4 s reverzní fází. Frakce byla testována oproti blanku (čisté MM).

Příprava vzorků pro FT-ICR

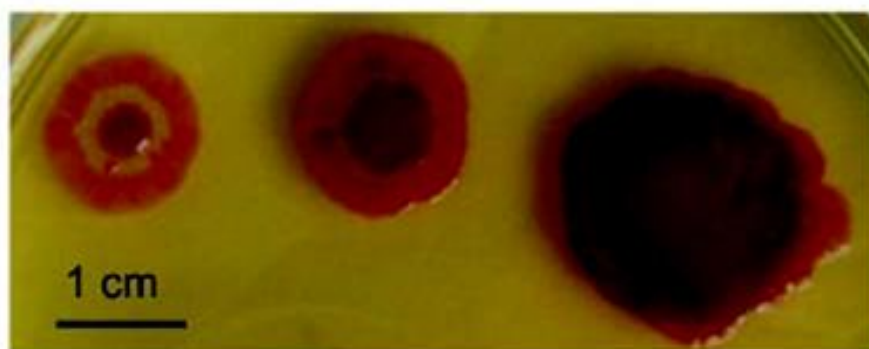
| Krok | Roztok | Objem roztoku |
|------------------------------|------------------|-------------------------|
| 1. Okyselení vzorku | 0,5% FA | doplněno na 200 μ l |
| 2. Promytí kolony | 80% AcN, 0,5% FA | 150 μ l |
| 3. Ekvilibrace kolony | 0,5 % FA | 100 μ l |
| 4. Nanesení a promytí vzorku | 0,5% FA | 500 μ l |
| 6. Eluce proteinu | 80% AcN, 0,5% FA | 200 μ l |

Tab. 1 : Postup přípravy vzorku na FT-ICR.

4. Experimentální část

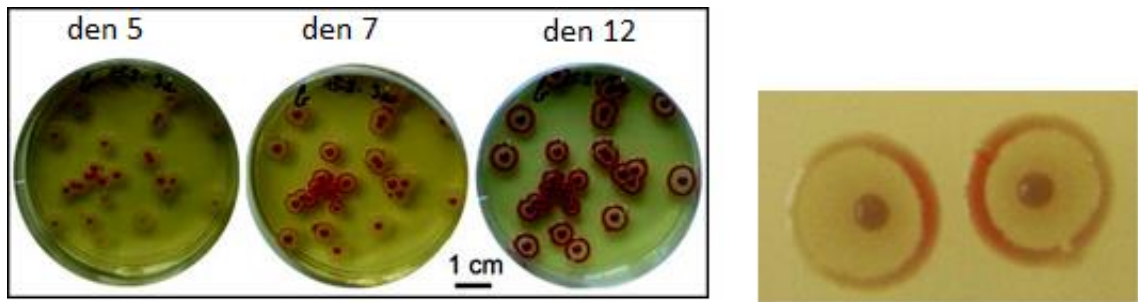
4.1. Formování a morfogeneze “buněčných těl” *S. marcescens*

Téma a obsah disertační práce navazuje na práci, kterou jsme započali již v roce 2004 a jež se zabývala morfogenezí bakteriálních kolonií *S. marcescens*, kdy jsme u těchto bakterií fenotypu **F** mimo jiné prokázali (Rieger T. *et al.*, 2007) závislost výsledného vzhledu bakteriálního nárůstu inokulovaného jinak než výsevem (vytečkováním, vyčárkováním) na rozměrech prostoru, do kterého jsou bakteriální suspenze inokulovány (Obr. 8).



Obr. 8: Závislost prostoru rozetření bakteriální suspenze na výsledný vzhled; Tři bakteriální suspenze o stejné hustotě bakterií (kolem 10^6) byly rozprostřeny do různě velkých inokulačních terčů (2, 7 a 20 mm); Foceno 9 dnů po inokulaci; U prvních 2 vzrostlých mnohobuněčných těl zleva je patrné, že nárůsty se podobají (s rozdílným úspěchem) fenotypovému rozložení kolonie **F**, zatímco nárůst napravo se již kolonii typu **F** nepodobá viz. Makula či Linka (Rieger T., *et al.*, 2008).

Krom toho jsme při klasických výsevech zaznamenali rychlejší dozrávání **F** kolonií (vybarvují se rychleji), které vyrůstají v blízkém sousedství, než u kolonií osamocených (Obr. 9).



Obr. 9: Urychlení vybarvování F kolonií vyšetých na Petriho misku ve vzájemné blízkosti; Nalevo - časový průběh zrání kolonií na misce; napravo - detail urychleného zrání F kolonií (Patkova I. *et al.*, 2012)

Z našeho předchozího zkoumání (Rieger T. *et al.*, 2008) jsme dále věděli, že urychlení vybarvování kolonií je patrné i u „buněčných těl“, která rostou blízko neživé překážky v jejich životním prostoru (přepážka, vyříznutý agar). Na tento typ urychlení vybarvování jsme se dále nesoustředili. Zajímalo nás více ovlivňování rychlosti vybarvování díky blízko rostoucím živým „buněčným tělům“.

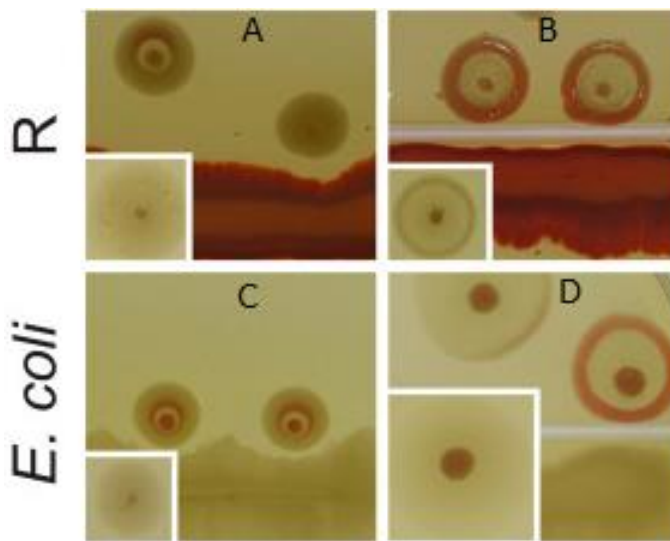
Pro další prozkoumání tohoto jevu urychleného vybarvování jsme provedli sérii pokusů, kde jsme se na toto vzájemné ovlivňování „buněčných těl“ rostoucí v blízké vzdálenosti detailněji zaměřili. Nejdříve jsme zvolili následující uspořádání pokusů: na Petriho misku s živnou půdou **ŽA + G** jsme nanесли lineární makrokolonii bakteriální suspenze a nad ní jsme vytečkovali kolonie v různé vzdálenosti od lineární makuly (viz. Obr. 10). V prvních sériích pokusů jsme pracovali s variantou nanesené **F** makuly a nad ní jsme vytečkovali **F** kolonie.



Obr. 10: F kolonie nad F Makulou; Snímky byly pořízeny 3. 4. a 7. den po inokulaci bakterií - osa X; (převzato od Cepl J. *et al.*, 2010)

V těchto pokusech jsme opět pozorovali urychlené vybarvování kolonií, jež byly makule nejbliže. Efekt urychlení vybarvení kolonií při růstu blízko k dalšímu „buněčnému tělu“ je podobný rychlejšímu vybarvování kolonií rostoucích blízko u sebe. Vzájemná komunikace bakteriálních těl urychluje vybarvování bližších sousedů,

zároveň však tyto makrokolonie ztrácejí strukturu (Obr. 10 - kolonie úplně napravo). V dalších pokusech jsme zjišťovali, jak budou **F** kolonie reagovat na jiné druhy bakterií rozprostřených do makuly. Nanesli jsme do makuly bakterie *S. rubidea* fenotypu **R** a také bakterie *E.coli*. (Obr. 11). Zároveň jsme stejné uspořádání nanесли na dělenou Petriho misku, kde mezi jednotlivými částmi misky spolu agary nijak nekomunikují. Jediná možná komunikace tak může probíhat vzduchem. Na jednu oddělenou část jsme na tomto typu misek nanесли makulu (**R**, či *E. coli*) a za přepážku jsme vytečkovali kolonie **F**.



Obr. 11: Ovlivňování F kolonií blízkým nárůstem makuly; A – F kolonie nad **R** makulou v nedělené misce; B – F kolonie nad **R** Makulou v dělené misce; C – F kolonie nad Makulou *E.coli* v nedělené misce; D – F kolonie nad *E. coli* makulou v dělené misce; foceno 5. den, (převzato od Cepl J. *et al.*, 2010).

Potvrdili jsme, že i blízký okraj životního prostoru ovlivňuje rychlost zbarvování blízkých „buněčných těl“ (Obr. 11 B, D) – viz naše předchozí práce (Rieger T. *et al.*, 2008).

Pokud jsme na nedělenou misku pod kolonie **F** nanесли makulu **R**, či *E. coli*, pozorovali jsme vznik bílého okruží u **F** kolonií (obr. 11 A, C), který jsme u kolonií **F** do té doby neviděli. Toto bílé okruží jsme nazvali **X** struktura (Čepl J., *et al.* 2010).

Bylo patrné, že rostoucí makula (**R**, či *E. coli*) musí být s kolonií ve společném prostoru, aby tato **X** struktura vznikala. Zajímalo nás, pomocí jakých molekul k tomuto ovlivňování dochází. Do této doby jsme však pracovali na nedefinovaném médiu (**ŽA** + **G**). Abychom mohli lépe tyto informační molekuly identifikovat, museli jsme přejít na médium definované (**MMA**).

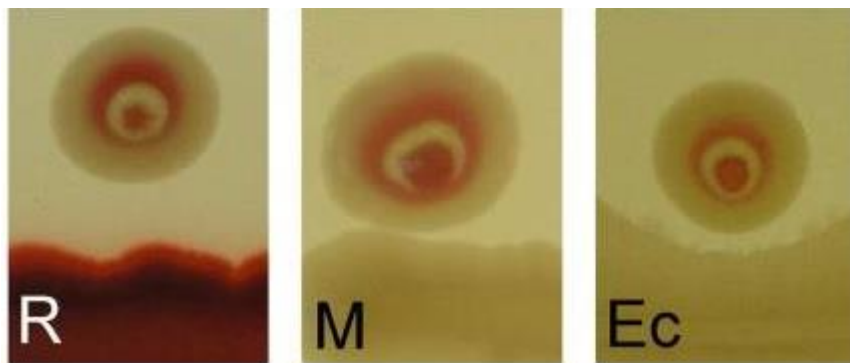
4.1.1. Kolonie typu F neroste na MMA.

Při opakování předchozího pokusu na **MMA** jsme zjistili, že kolonie *Serratia marcescens* typu **F** nanesené na **MMA** vysetím, roztěrem či vytečkováním nerostou. Bakterie sice na médiu přežívají, po inokulaci nerostoucích bakterií zpět (i po 14 dnech) na **ŽA + G** vyrostou klasický fenotyp **F**, ale na minimálním agaru nevytvoří žádný viditelný nárůst (Pátková I. *et al.*, 2012). Zkusili jsme tedy na **MMA** nanést jiné varianty uspořádání buněčných těl a pozorovali jsme, že pokud se na **MMA** inokuluje lineární roztěr fenotypu **R**, tak nad ní vytečkované kolonie typu **F** vyrostou (Obr. 12-2). Kolonie sice nevytvoří útvar připomínající klasický **F** morfotyp, ale růst je evidentní. Stejně pozitivní ovlivnění růstu kibiucu **F** na **MMA** jsme pozorovali i pokud jsme místo fenotypu **R** použili jako „induktor“ růstu makulu *E. Coli* (Obr. 12-1), či makulu **M** (Obr. 12-4). Těmto „induktorům“ způsobujícím růst **F** kolonií na **MMA** říkáme také „helpeři“.

U **R**, **M** i *E. coli* makuly je zajímavé propojení jejich funkce podpory růstu **F** kolonie na **MMA** s indukcí tvorby **X** struktury (Pátková I., *et al.*, 2012) u **F** kolonií na **ŽA + G**. (Obr. 13). Zdá se, že tvorba **X** struktury může být univerzální odpověď fenotypu **F** rostoucího na **ŽA + G** při setkání se z cizí makrokolonií.



Obr. 12: Vytečkované F kolonií nad různé makuly na MMA. 1 - F kolonie vytečkované nad rostoucí makulu *E. coli*; 2 - F kolonie vytečkované nad rostoucí makulu R; 3 - F kolonie (nerostoucí) vytečkované nad (nerostoucí) makulu F; 4 - F kolonie vytečkované nad rostoucí makulu M.



Obr. 13: Tvorba X struktury na F koloniích vytečkovaných nad makuly (R, M a *E. coli*) v době jejich inokulace na Petriho misce s ŽA + G. Foceno po 6 dnech růstu.

4.2. Ovlivňování růstu F kolonií na MMA

Na základě výše uvedených informací je tedy více než jasné, že růst F kolonií na MMA je podmíněn přítomností látky/látek, jež do média produkují bakteriální kmeny stejného či jiného bakteriálního druhu. Tento fenomén, podporující myšlenku přítomnosti signálu, který je nezbytný pro indukci růstu F kolonií, nás velmi zaujal. V dalších experimentech jsme se tedy na ovlivňování růstu a formování morfotypů pomocí “helperů” zaměřili podrobněji.

Pokud jsme k nerostoucím koloniím F vytečkovaným na MMA přidali po 7-10 dnech přežívání makulu R, došlo k nastartování růstu kolonie F (kolonie F na MMA do přidání R makuly nenarostla, ale přežívání bylo potvrzeno vyčárkováním na misku se ŽA + G).

Krom toho, pokud je F kibuc, narostlý díky přítomnosti “helperu” na MMA po dobu alespoň 72hod, vyčárkovaný na novou misku MMA bez přítomnosti “helperu”, tak k jeho růstu již znovu nedojde. Tato schopnost rozrostení F kibucu díky “helprovi” na MMA není tedy pro bakterie fenotypu F dědičná.

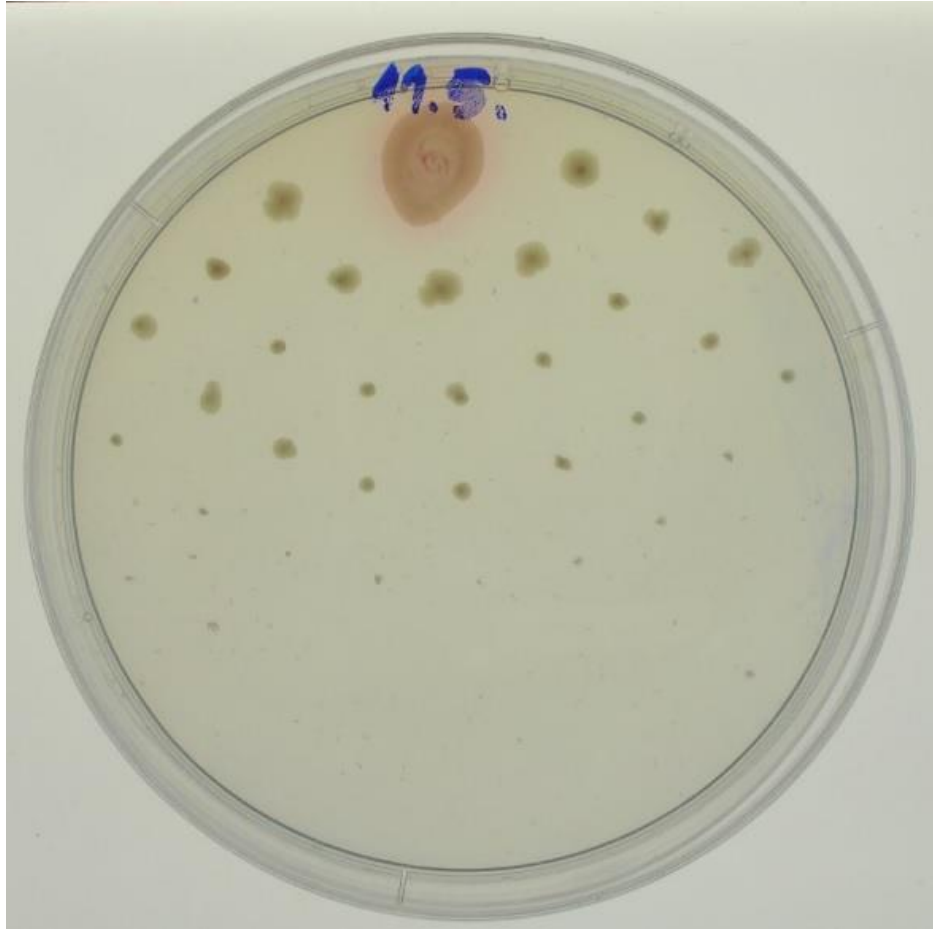
Je patrné, že ani makula F fenotypu (která na MMA pouze přežívá, ale neroste, viz Obr. 12-3) nanesená na MMA neindukuje růst kolonii stejného typu F. Podobný pokus jsme provedli s klonem *E. coli* 15 TAU, což je mutant, který k růstu na minimálním agaru potřebuje přítomnost nukleových bází (thyminu, uracilu) a aminokyseliny argininu v médiu. Když jsme nanесли tuto makulu na MMA a nad ní vytečkovali F kolonie, k indukci růstu F kolonií taktéž nedošlo. Pokud jsme však MMA obohatili o thymin, uracil a arginin a poté na tuto misku inokulovali makulu *E. coli* 15 TAU, došlo po 3 dnech inkubace k patrnému nárůstu nad ní vytečkovaných F kolonií.

Víme tedy, že růst F kolonií na MMA podporuje pouze rostoucí makula.

Zajímalo nás tedy, zda je pro pozorovanou indukci růstu postačující přítomnost helperovské makuly pouze v momentu inokulace, či zda je její přítomnost nezbytná po celou dobu růstu. Provedli jsme tedy experiment, při němž jsme rostoucí makulu R na MMA odřezávali od vytečkovaných F kolonií v různých časech růstu kolonií / po inokulaci (T 2hod, T 19hod, T 50hod a T 73hod). V čase T 2hod nebyl pozorován nárůst F kolonií vůbec. V čase T 19hod byl pozorován slabý náznak růstu F kolonií oproti kontrole. V čase T 50hod už byly na misce pozorovány standardně narostlé F kolonie

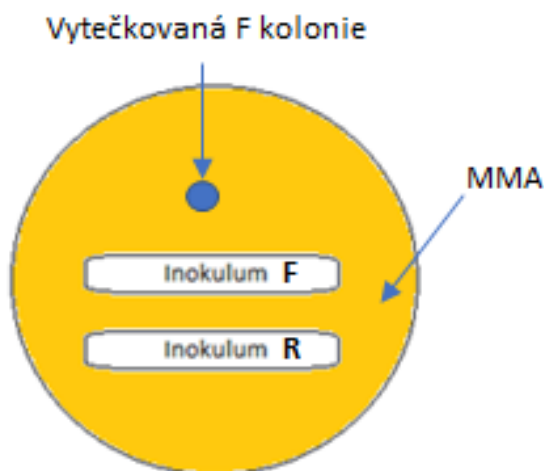
na **MMA**. V čase T 73hod byl nárůst **F** kolonií největší, z čehož usuzujeme, že pro růst **F** kolonií na **MMA** je potřeba kontinuální přítomnost helperovské molekuly. Pokud se molekula z agaru vyředí, kolonie růst zastaví.

Dále jsme chtěli více specifikovat, na jakou vzdálenost je rostoucí makula **R** schopná iniciovat růst **F** kolonií na **MMA**. Ověřili jsme si, že rostoucí makula **R** je schopná helperovat koloniím **F** na **MMA** jen v omezeném prostoru (Obr. 14).



Obr. 14: Helperování rostoucí makulou R na MMA má omezený dosah; Nahoře na misce je inokulovaná makula **R**; Kolem ní jsou v kruzích vytečkované kolonie **F**; foceno 96 hodin po inokulaci.

Pro ověření, zda makula **F** rostoucí díky pomoci helperovské makuly **R**, způsobuje zároveň růst sousední vytečkované **F** kolonie, jsme inokulovali buněčná těla na Petriho misku dle schématu na Obr. 15. Buněčná těla byla inokulována současně. Experimentálně jsme tak ověřili, že **F** makula nanesená do prostoru ovlivňování “vychytá / spotřebuje” helperovské agens, takže sama (po 72 hodinách inkubace) trochu povyroste (oproti kontrole), ale **F** kolonie nad ní růst nezahájí.



Obr. 15: Schéma pokusu vycytávání signální molekuly nerostoucí F makulou.

Dále jsme testovali potencionální helperující schopnost **MMA** média, které bude rostoucí makulou (**R**, **M** či *E. coli*) pouze kondiciováno (viz metody). Zjistili jsme, že **F** kolonie vytečkované (po odříznutí zdrojové makuly) na kondiciovaný minimální agar zahájí po inokulaci růst. Také eluát z kondiciovaného agaru (třepaný 5 dnů při 27 °C) po zasáknutí (v potřebné koncentraci) do čerstvého **MMA** před vytečkováním **F** kolonií, podpořil jejich růst. Stejně tak bylo pokusně ověřeno, že filtrát (přefiltrováno přes Acrodisc) z minimálního média (**MM**) kondiciovaného růstem **R** fenotypu, způsobuje po zasáknutí (v potřebné koncentraci) do čerstvého **MMA** růst následně vytečkovaných **F** kolonií.

Tato indukce růstu může být způsobená informačním signálem produkovaným rostoucí makulou, nebo k ní může docházet následkem vypouštění některé z esenciálních stavebních či nutričních agens rostoucí makulou, které **F** kolonie pro růst na **MMA** nezbytně potřebují.

V dalších experimentech jsme testovali možnost indukce růstu **F** kolonií na **MMA** po přidání základních nutričních komponent. Minimální agar jsme postupně obohacovali o casamino kyseliny (hydrolyzovaný kasein obohacený o cystein a tryptofan), thyamin (vit. B1), aminokyselinu histidin i nukleové báze adenin, guanin, cytosin, thymin a uridin. Na žádném z takto obohacených minimálních agarů růst **F** kolonií pozorován nebyl. Glukóza, která má zásadní efekt na vzhledu **F** kolonie na **ŽA** je v **MMA** již obsažená.

4.3. Hledání informačního agens ovlivňujícího růst F kolonií na MMA

V další fázi našeho výzkumu jsme se tedy snažili zjistit, zda indukce růstu F kolonií v přítomnosti “helperů” probíhá pomocí agens šířícího se agarem, či zda k přenosu informace dochází vzduchem stejně jako v případě synchronizace rostoucích kvasinek amoniakem (Palková Z. *et al.* 1997). Provedli jsme experiment v dělených Petriho miskách s MMA. Makulu R a vytečkované F kolonie dělila přepážka. Při takovémto uspořádání F kolonie růst nezačaly. Tímto pokusem jsme tedy vyloučili šíření indukčního agens vzduchem.

Rozhodli jsme se tedy zaměřit se na to, čím rostoucí makuly obohacují okolní agar biochemicky.

Pro zjištění, zda signální molekula AHL (v našem případě – N-hexanonyl – L – Homoserine lactone) nezpůsobí iniciaci růstu F kolonie na MMA (viz úvod), jsme ji nechali zasáknout do MMA s výslednou koncentrací AHL v agaru 0,5 μM (převzato od Slater *et al.*, 2003). Ani tato signální molekula růst F kolonie nezpůsobila (a to ani při zvýšené koncentraci 1 μM , či 10 μM).

Vzhledem k tomu, že technické zázemí naší laboratoře nebylo pro odhalení signální molekuly ovlivňující růst bakterie F na MMA dostačující, navázali jsme spolupráci s odborníky z Mikrobiologického ústavu AV ČR.

4.3.1. Biochemické hledání informačního agens se zaměřením na proteiny

Je známo, že rostoucí bakteriální kolonie vypouštějí do okolního agaru proteiny, které mohou působit jako informační agens (Be'er A., *et al.*, 2010). Nejdříve jsme se tedy zaměřili na identifikaci proteinů v agaru MMA kondiciovaném rostoucími makulami R a *E. coli* pomocí hmotnostní spektrometrie. Jako první jsme zvolili přístup tzv. proteinového fingerprintu, kde se proteiny separují pomocí polyakrylamidové elektroforézy. Pro elektroforetickou separaci byly připraveny tři Petriho misky s různými variantami uspořádání buněčných těl na MMA.

Miska č. 1 - prázdný **MMA** jako kontrola

Miska č. 2 - **MMA** se samotným nárůstem **R** linky ve spodní části P.m.

Miska č. 3 - miska s nárůstem *E. coli* inokulovaným do linky ve spodní části P.m.

Z každé misky jsme po 4 dnech růstu ve 27 °C sterilně vyřízli kousek agaru (cca 0,5 x 1 cm) nad makulou ve vzdálenosti cca 2 cm od rostoucí makuly **R** či *E. coli*. Agar byl přenesen do 50 ml zkumavky a následně byl připraven k analýze pomocí SDS - PAGE elektroforézy.

Na gelu byly po SDS PAGE patrný 1 výrazný band, a to ve vzorku z misky č.2. Tento band byl poté vyříznut a vzorek byl připraven na hmotnostně spektrometrickou analýzu na přístroji MALDI-TOF.

Porovnáním získaných molekulových fragmentů s databází Mascot byl nalezena následující sekvence (Obr. 16).

```
10      20      30      40      50      60
MCLSCPQSRR NRPIFSYYGY ASMIRSM TAY ARREIKGEWG SAAWELRSVN QRYLETYIRL

      70      80      90      100     110     120
PEQFRSLEPV IRERIRGRLT RGKVECNLRF ELDPSAQSSL ILNEKLAQQL VEAANWVKMQ

      130     140     150     160     170     180
SDEGEINPID VLRWPGVMSA QEQDLDAISV ELMQALDGAĀ DDFIVARESE GAALKTLIEQ

      190     200     210     220     230     240
RLDGVSAEVĀ KVRAQMPNĪ QWQERLVSĀ LEEAQVQLEĀ TRLEQELVLM AQRIDVAEĒĀ

      250     260     270     280     290     300
DRLEAHVKET HNILKKKEAV GRRLDFMMQE FNRESNTLAS KSINADVTAS AIELKVLIEQ

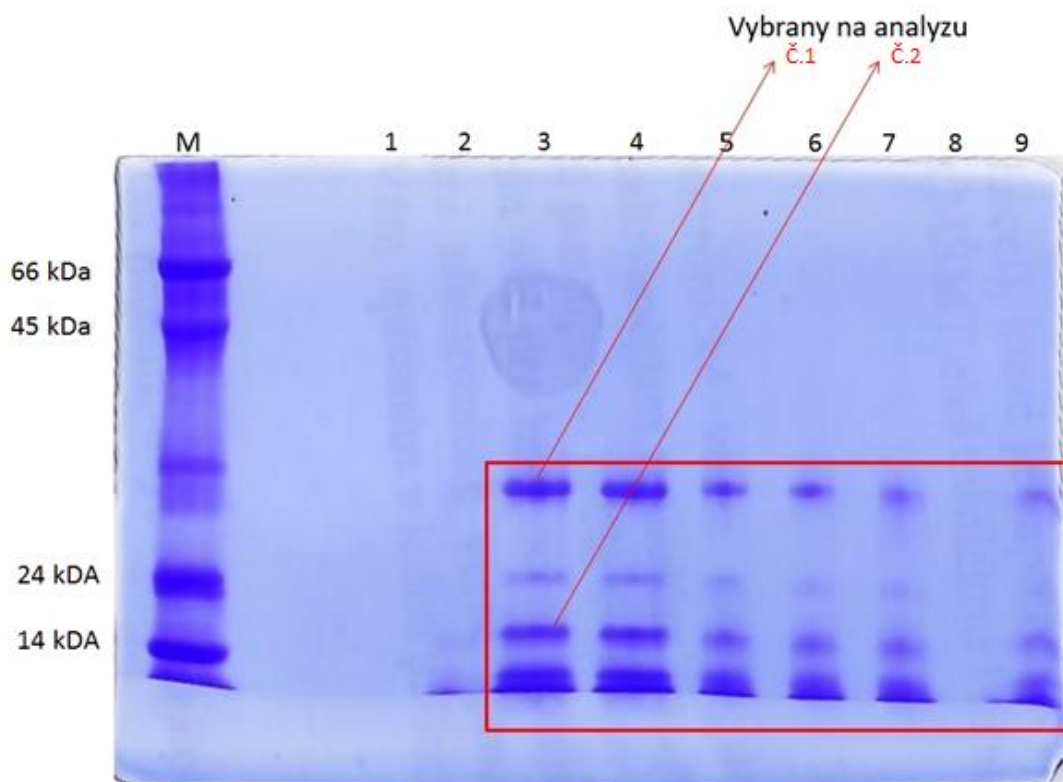
MREQIQNIE
```

Obr. 16: Aminokyselinové sekvence získané pomocí MALDI TOF z misky číslo 2. Počet aminokyselin: 309; Molekulová hmotnost: 35665.7; Teoretické pI: 5.3

Tuto sekvenci jsme zadali do programu BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Program našel jednu 100% shodu s hypotetickým proteinem *Serratia marcescens* “WP_025304701.1” (Obr. 18).

Tento pokus jsme zopakovali opět s různými variantami společných uspořádání na pokusných miskách. Na výsledném gelu jsou patrné jasné bandy.

- Miska č. 1 - prázdný **MMA** jako kontrola (vzorek 1)
- Miska č. 2 - **MMA** se samotnými nevzrostlými **F** koloniemi (vzorek 2)
- Miska č. 3 - miska s nárůstem **R** inokulovaným do linky ve spodní části P.m. (vzorek 3, 4)
- Miska č. 4 - miska s nárůstem **R** inokulovaným do linky ve spodní části P.m. a jednou vytečkovanou **F** kolonií ve vzdálenosti cca 2 cm od nárůstu. (vzorek 5)
- Miska č. 5 - miska s nárůstem **R** inokulovaným do linky ve spodní části P.m. a jednou vytečkovanou **F** kolonií ve vzdálenosti cca 4 cm od nárůstu. (vzorek 6)
- Miska č.6 - miska s nárůstem **R** inokulovaným do linky ve spodní části P.m. a jednou vytečkovanou **F** kolonií ve vzdálenosti cca 5 cm od nárůstu.(vzorek 7)
- Miska č.7 - miska s nárůstem **R** inokulovaným do linky ve spodní části P.m. a jednou vytečkovanou **F** kolonií ve vzdálenosti cca 6 cm od nárůstu.(vzorek 8, 9)



Obr. 17: Rozdělení proteinů získaných z výřezů agarů (vzorek 1-9) získaných z různých variant inokulací F/R buněčných těl pěstovaných na Petriho miskách s MMA pomocí vertikální agarózové SDS PAGE; M - marker; 1 - výřez (všude cca 0,5, cm³) z prázdného agaru MMA; 2 - výřez z misky se samotnými F koloniemi na MMA (ve vzdálenosti cca 1 cm od nevzrostlé kolonie); 3 - výřez z misky se samotnou R linkou na MMA (ve vzdálenosti cca 2 cm od makuly); 4 - výřez z misky se samotnou R linkou na MMA (ve vzdálenosti cca 1 cm od makuly); 5 - výřez z misky s R linkou a F koloniemi inokulovanými ve vzdálenosti 2 cm od sebe na MMA (výřez proveden ve vzdálenosti cca 1 cm od makuly); 6 - výřez z misky s R linkou a F koloniemi inokulovanými ve vzdálenosti 4 cm od sebe na MMA (výřez proveden ve vzdálenosti cca 2,5 cm od makuly); 7 - výřez z misky s R linkou a F koloniemi inokulovanými ve vzdálenosti 5 cm od sebe na MMA (výřez proveden ve vzdálenosti 3,5 cm od makuly); 8 - výřez z misky s R linkou a F koloniemi inokulovanými ve vzdálenosti 6 cm od sebe na MMA (výřez proveden ve vzdálenosti 5,5 cm od makuly); 9 - výřez z misky s R linkou a F koloniemi inokulovanými ve vzdálenosti 6 cm od sebe na MMA (výřez proveden ve vzdálenosti 4,5 cm od makuly); Osa X nahoře : čísla testovaných vzorků; Osa Y nalevo: molekulová váha bandů v markeru; Bandy č. 1 a č.2 byly vybrány na analýzu hmotnostní spektrometrií.

Pro hmotnostně spektrometrickou analýzu na přístroji MALDI TOF jsme vybrali 2 bandy označené červenou čarou. Tyto bandy pocházejí z vyříznutého agaru v blízkosti (cca 2 cm) rostoucí R makuly na MMA. Jak je vidět na Obr. 17, tak i v dalších variantách uspořádání buněčných těl na Petriho miskách s MMA jsou výsledky SDS PAGE elektroforézy podobné. Na všech těchto miskách (č.3 - č.7) s výraznými bandy se nacházela buďto samotná rostoucí makula R, nebo makula R v kombinaci s F koloniemi. U vzorků č. 5, č. 6, č. 7, č. 9 jsou patrné méně výraznější bandy, což může být způsobené různými vzdálenostmi agaru vyjmutého pro analýzu od vzrostlých buněčných těl. U

vzorku č. 8 nejsou patrné žádné výrazné bandy. Může to být způsobeno větší vzdáleností (5,5 cm od makuly **R**) vyřízlého agaru od rostoucí makuly.

Oba tyto vybrané bandy pocházející z původní misky č. 3 (Obr. 17) byly připraveny pro hmotnostně spektrometrickou analýzu na přístroji MALDI-TOF.

Porovnáním získaných molekulových fragmentů s databází Mascot byla nalezena stejná sekvence jako v předchozím případě (Obr. 16). Jde tedy o druhé potvrzení nalezení stejného proteinu v agaru kondiciovaném rostoucí makulou **R**.

Identifikovaný hypotetický protein "WP_025304701.1" je jeden z mnoha zástupců rodiny "PRK11820 family proteins" (Obr. 18). Tato proteinová rodina je členem proteinové "superfamily cl26779", jež je součástí "DUF1732 Superfamily" a YicC-N superfamily. Tento protein obsahuje DUF1732 domény (domény neznámé funkce) a také YicC_N domény.

YicC_N domény jsou často nalézány na C – konci bakteriálních proteinů. Mnoho z nich je hypotetických včetně rodiny proteinů YicC, jež mají na N – konci pfam03755 doménu.

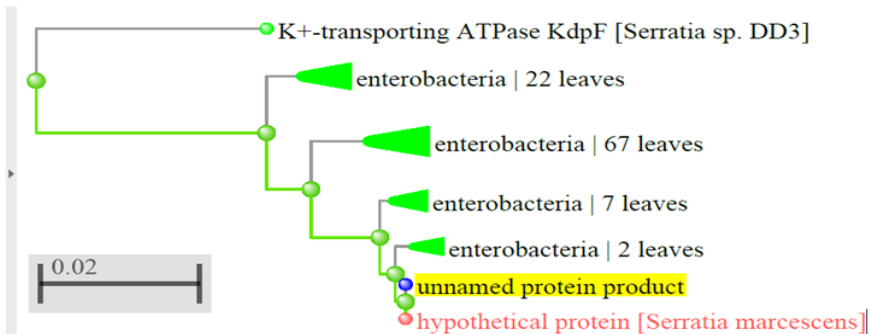
YicC-N proteinové rodiny s N-koncovým regionem reprezentují rodinu bakteriálních proteinů s prozatím špatně charakterizovanou funkcí. Tyto proteiny se vyskytují i u organismů příbuzných *S. marcescens* (Enterobakterie). Bylo prokázáno, že proteiny z této rodiny hrají roli při přežívání ve stacionární fázi vývoje bakteriální populace, ač nejsou pro tuto stacionární fázi esenciální. Inaktivací genu kódujícího tento protein se snížila schopnost růstu bakterií *E.coli* při vyšších teplotách (Poulsen P. a Jensen K.F., 1991). Strukturální modelování naznačuje, že by tato doména mohla vázat nukleové kyseliny.

This record is a non-redundant protein sequence. Please [read more here](#).

hypothetical protein [Serratia marcescens]

NCBI Reference Sequence: WP_025304701.1

[GenPept](#) [Identical Proteins](#) [FASTA](#)



Obr. 18 - Specifikace hypotetického proteinu “WP_025304701.1”; nahoře - specifikace obsažených domén; dole - evoluční kladogram nelezeného hypotetického proteinu (označen červeně)

Při analýze bandu č. 2 (Obr. 17) bylo zjištěno, že jde o stejný protein, jako v případě bandu č.1, pouze jde o jeho degradovanou formu. Tento nalezený protein dokáže zřejmě vytvářet kovalentní dimery, díky čemuž byl na elektroforéze nalezen ve 2 variantách (monomer a homodimer). Proces izolace tohoto proteinu, konkrétně několikadenní třepání při 30 °C, může způsobovat jeho rozpad na podjednotky. Případně se protein může v roztoku vyskytovat ve formě jak monomeru, tak homodimeru.

Multiproteinové komplexy se obecně skládají do aktivní formy až na místě určení. V cytoplazmě se tak vyskytují jako volné monomery, které se následně za pomoci např. chaperonů skládají do nativní konformace.

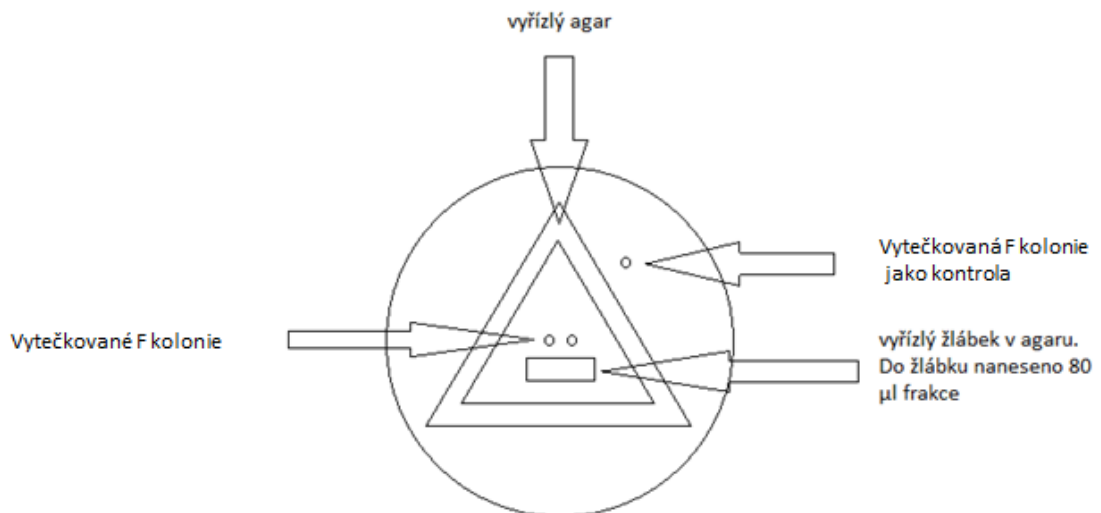
Pro finální potvrzení nebo vyvrácení varianty, že tento nalezený protein má nebo nemá námi hledanou signální funkci jsme v dalším pokusu přefiltrovali **MM** kondiciované růstem (4 dny) **R** fenotypu v třepané kultuře přes filtr s membránou o velikosti do 3500 Da. Takto pořízený filtrát nám po zasáknutí na **MMA** těsně před inokulací **F** kolonií růst indukoval. Tím jsme specifikovali velikost námi hledané signální molekuly, jež musí být menší než 3500 Da. Ověřili jsme tedy, že žádný z nalezených bandů pomocí SDS-PAGE elektroforézy neobsahuje proteiny či signální molekuly, které by způsobovaly námi zkoumaný efekt podpory růstu **F** kolonií na

MMA. Proto jsme nadále pokračovali v analýze kondiciovaného média jinými metodami zaměřenými na identifikaci menších molekul.

Přítomnost proteinu této velikosti v agaru vzdáleném až několik centimetrů od zdrojové bakteriální masy však není nezajímavá. Zamyšlení se nad důvodem/výhodou přítomnosti tohoto proteinu ve vzdáleném agaru, se budu podrobněji věnovat v diskuzi.

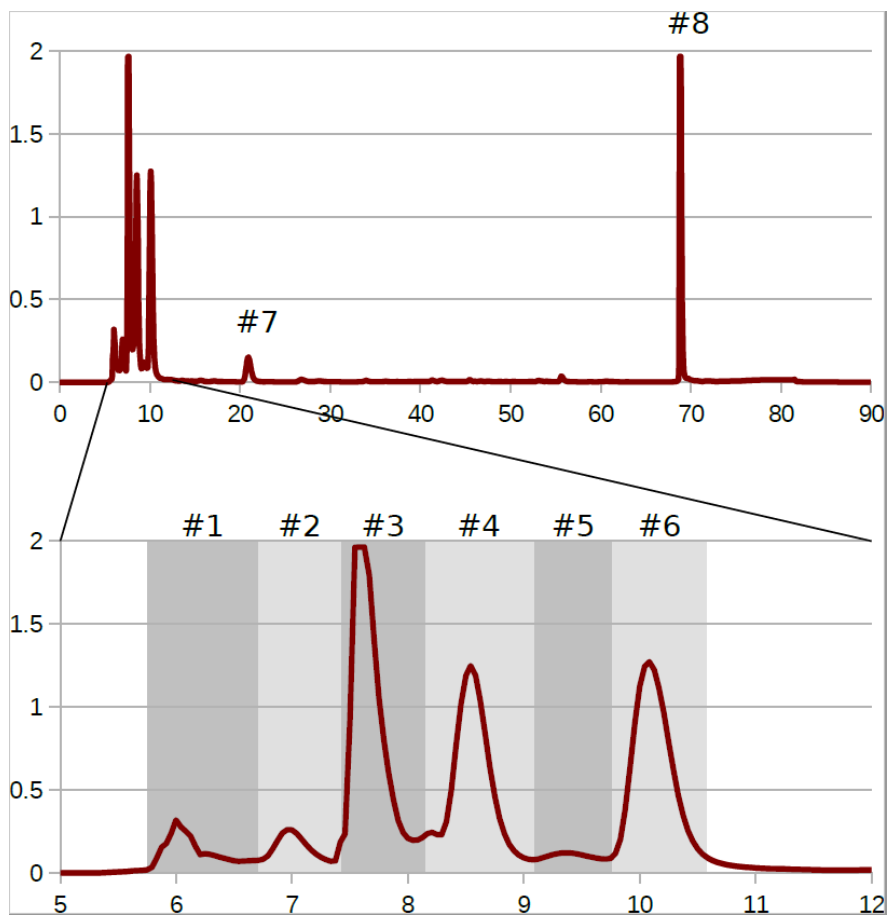
4.3.2. Biochemické hledání informačního agens se zaměřením na menší molekuly

Pro testování přítomnosti menších signálních molekul v kondiciovaném MM mediu jsme nejprve využili gelovou chromatografii. Připravili jsme 60 ml minimálního média (**MM**) kondiciovaného růstem **R** fenotypu po dobu 4 dnů. Funkčnost frakcí (chytány po 2 minutách) vzešlých z této chromatografie (dohromady 30 vzorků) jsme poté experimentálně otestovali specifickou inokulací na Petriho misku (Obr. 19).



Obr. 19: Schéma experimentu pro testování funkčnosti frakcí získaných z chromatografie na MMA.

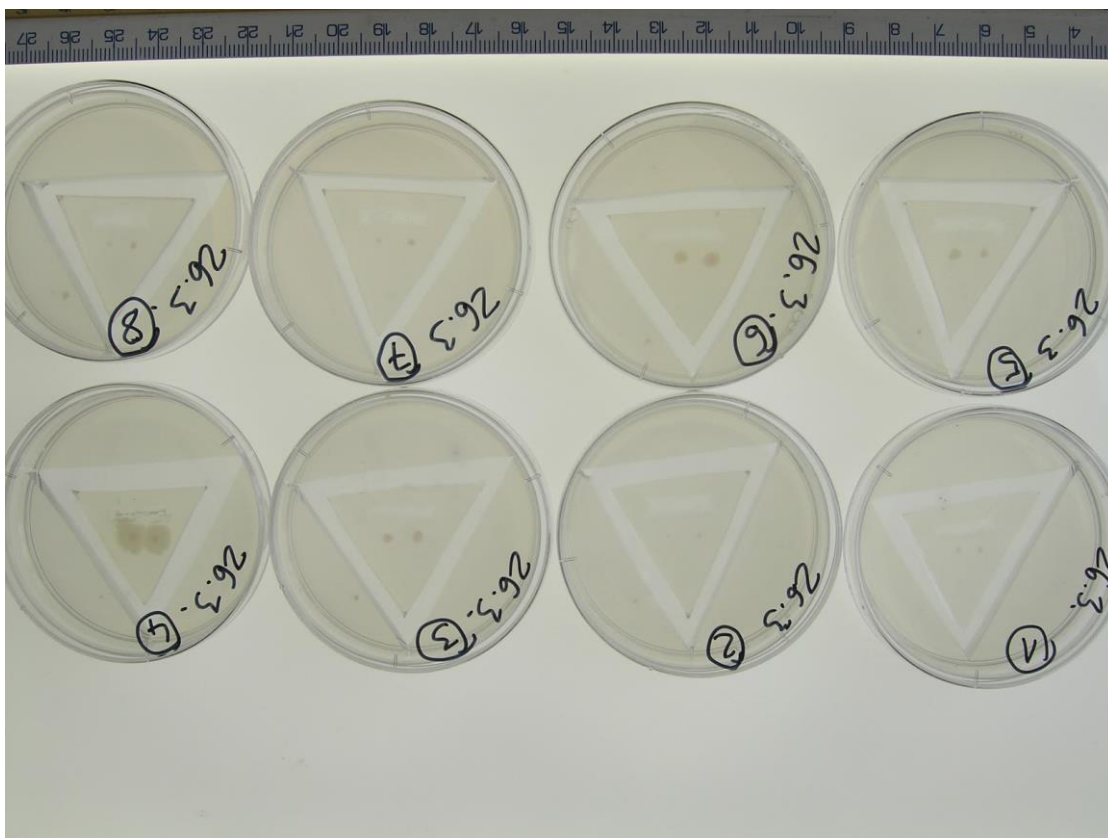
Pro další pročištění jsme použili pouze frakce, které způsobovaly růst **F** kolonií na **MMA**. Tyto funkční frakce jsme pak připravili pro chromatografii s reverzní fází. Z tohoto chodu chromatografie bylo získáno 8 frakcí (Obr. 20 - frakce # 1 - #8).



Obr. 20: Výsledek druhé pročišťující chromatografie s 8 patrnými frakcemi vybranými na další analýzu. Osa x - čas (min); osa y - absorbance.

Funkčnost těchto frakcí jsme experimentálně otestovali specifickou inokulací na Petriho misku (Obr.19).

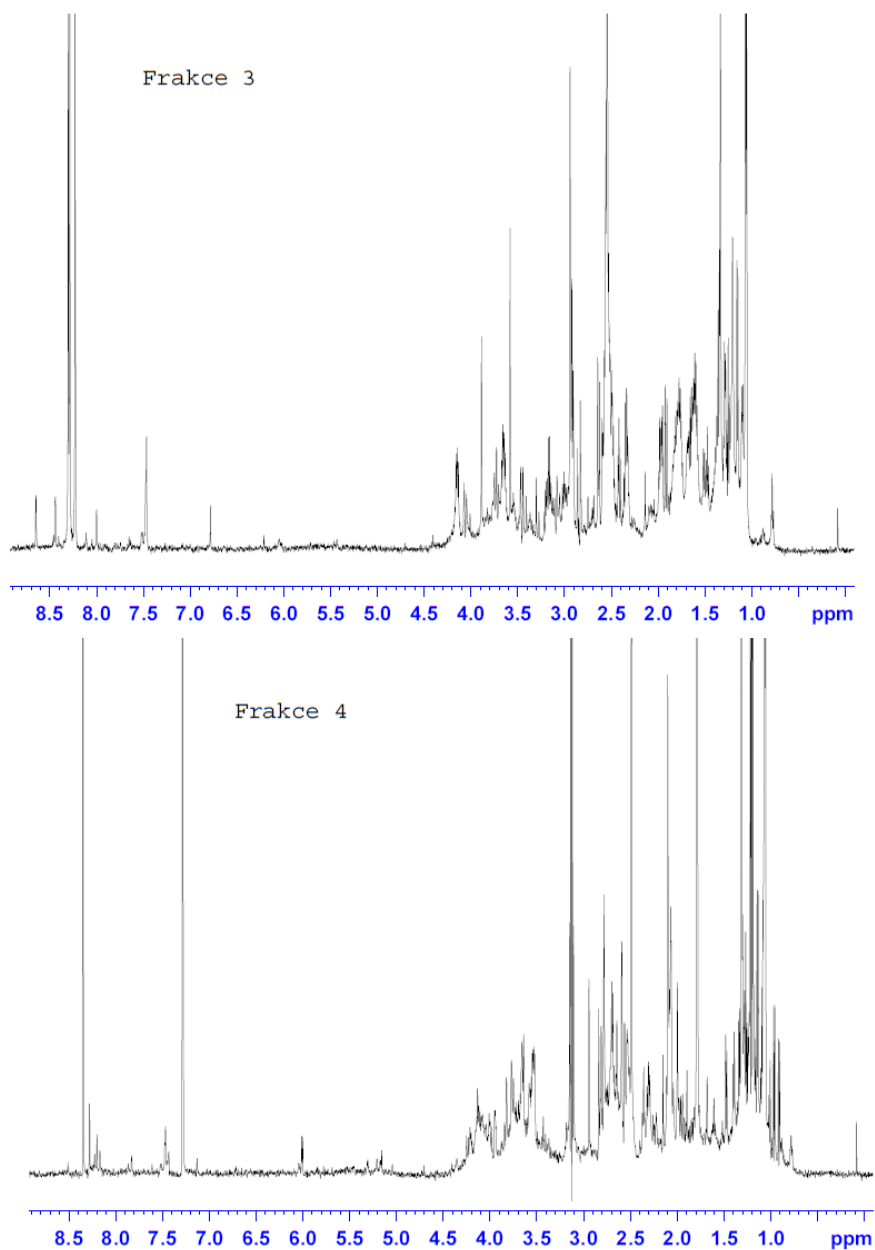
Významná funkčnost byla zaznamenána u frakcí 3, 4, a 6. Slabější nárůst je patrný i na misce s frakcí č. 5. (Obr. 21).



Obr. 21: Ověření funkčnosti frakcí vzešlých z chromatografie s reverzní fází. Čísla frakcí jsou zapsány na miskách (čísla v kroužku); foceno 4 dny po inokulaci.

Vzorky číslo 3. a 4. byly, díky intenzitě svých píků na chromatogramu i pozitivnímu výsledku ověření funkčnosti frakcí, vybrány na další analýzu pomocí NMR. Vzhledem k dobrému nárůstu **F** kolonií na **MMA** v přítomnosti těchto frakcí předpokládáme, že tyto frakce obsahují i námi hledané helperovské agens. Vzorky byly přeneseny do servisního pracoviště NMR na Albertově.

Na Obr. 22 jsou výsledky obou frakcí.



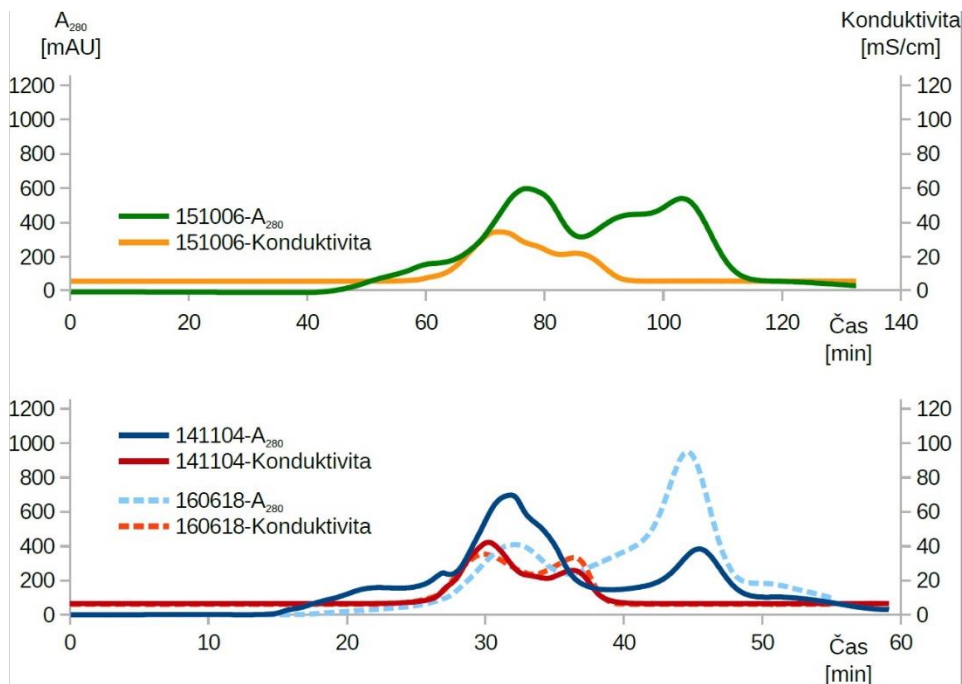
Obr. 22: Výsledná spektra vzorku č. 3 a č. 4. Osa x - chemický posun (ppm -parts per milion); y - intenzita signálů

Dle názoru zkušeného analytika metody NMR, RNDr. Zdeňka Tošnera Ph.D. ze servisního pracoviště NMR, který vzorky vyhodnocoval, by se mohlo jednat o krátký peptid. Nicméně čistota vzorku nebyla optimální a proto nám doporučil vzorek více pročistit a optimálně v něm zkoncentrovat hledanou signální molekulu.

Protože jsme potřebovali získávat námi hledané helperovské agens v co největším množství, zvolili jsme pro přípravu vzorků na gelovou chromatografii trochu pozměněný postup (viz materiál a metody). Připravili jsme tedy velký objem (500 ml)

minimálního média **MM** kondiciovaného růstem bakterií *Serratia marcescens* fenotypu **R**, u nichž víme, že mají schopnost pozitivně ovlivnit růst **F** kolonie na **MMA**.

Výsledný chromatogram vypadal vždy trochu jinak, ale pokaždé měl podobný pattern píků (Obr. 23).



Obr. 23: Překryv 3 různých chromatografií prováděných vždy s velkým objemem filtrátu získaného z média kondiciovaného rostoucím **R** klonem *Serratie marcescens*. Nahoře je chromatografie prováděná na koloně Sephadex G-15 (600 mm délka, 26 mm průměr, průtok 2 ml/min) trvající 2 hodiny; Dole jsou chromatografie prováděné na koloně Sephadex G-15 (300mm délka, 10mm průměr, průtok 0,3 ml/min) trvající 1 hodinu; osa y nalevo - absorbance (mAU), osa y napravo - vodivost (mS/cm), osa x - čas (min).

Frakce z těchto chromatografií byly vždy sbírány po 2 minutách a dále testovány specifickou inokulací na Petriho misku s **MMA** (viz Obr. 19). Nejvíce funkční frakce byly vždy zjištěny kolem 48 minuty (viz chromatografie trvající 1 hodinu - Obr. 23 dole) a 115 minuty (viz chromatografie trvající 2 hodiny; Obr. 23 nahoře).

Kolem 48 minuty (Obr. 23 dole) a 115 minuty (Obr. 23 nahoře) by se měly pomocí této metody odmyvat z nastříknutého vzorku vždy molekuly o podobné hmotnosti.

V některých případech nám v našich experimentech ověřování funkčnosti frakcí vycházela slabší funkčnost i frakcí kolem 32 minuty (Obr. 23 dole) nebo 78 minuty (Obr. 23 nahoře). Toto může být způsobeno tím, že různé proteiny, pokud jsou ve směsi,

mohou před nastříknutím do kolony přirozeně tvořit proteinové agregáty (shluky různých proteinů), které se na koloně vymyjí dříve (rozdíl v čase vymytí), a zároveň mohou obsahovat námi hledanou signální látku.

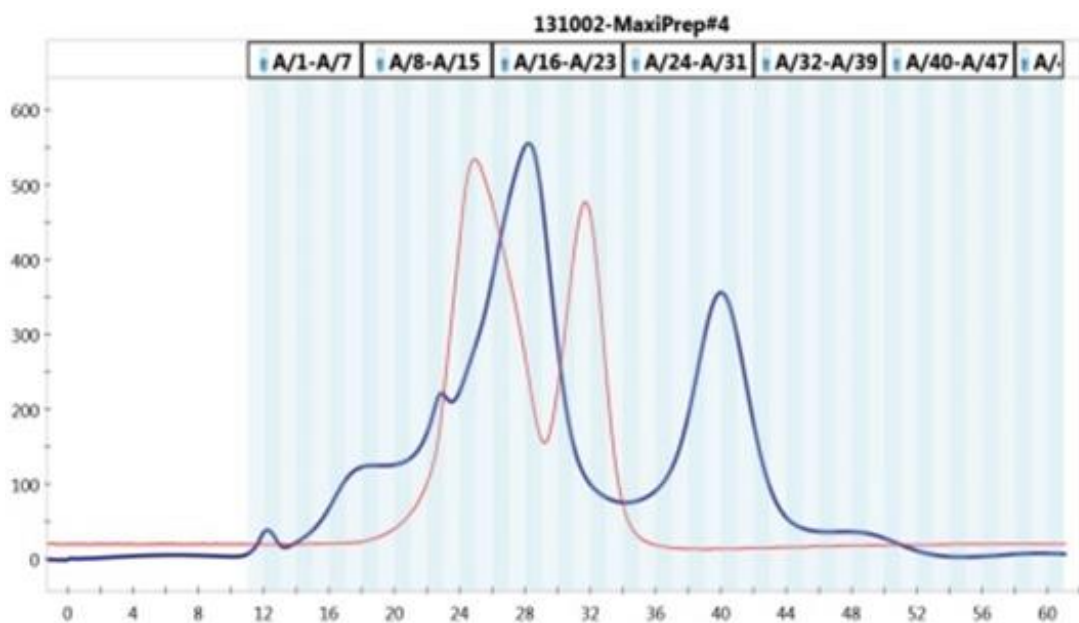
Z výše zmíněných výsledků (NMR a gelová chromatografie) by se tedy dalo uvažovat o tom, že námi hledaná signální molekula je krátký peptid, který by měl mít hmotnost do 3500Da. Možnosti metodiky NMR by nám v ideálním případě měly o povaze, struktuře a složení námi hledané molekuly prozradit více. Nicméně se nám do dnešního dne různými separačními metodami, které máme k dispozici, nepodařilo připravit dostatečně čistý a zároveň koncentrovaný vzorek tak, abychom mohli naplno využít potenciál této moderní metody. Nicméně i tyto informace jsou pro nás velkým přínosem a poskytly nám představu o tom, jaké povahy by mohla být molekula, jež ovlivňuje růst **F** kolonie na **MMA**.

I přes to, že jsme tlačeni termínem vymezeném pro sepsání disertační práce a ukončení mého doktorského studia, jsme odhodláni pokračovat v testování a hledání postupů, které by nám následně dovolily plně využít možnosti, jež nám tyto metody poskytují. Spolupráce s Akademií věd i servisním střediskem NMR bude tak i nadále pokračovat a věříme, že dosáhneme výsledků publikovatelných v některém s významných periodik.

4.3.3. Stanovení váhy hledané signální molekuly metodou hmotnostní spektrometrie

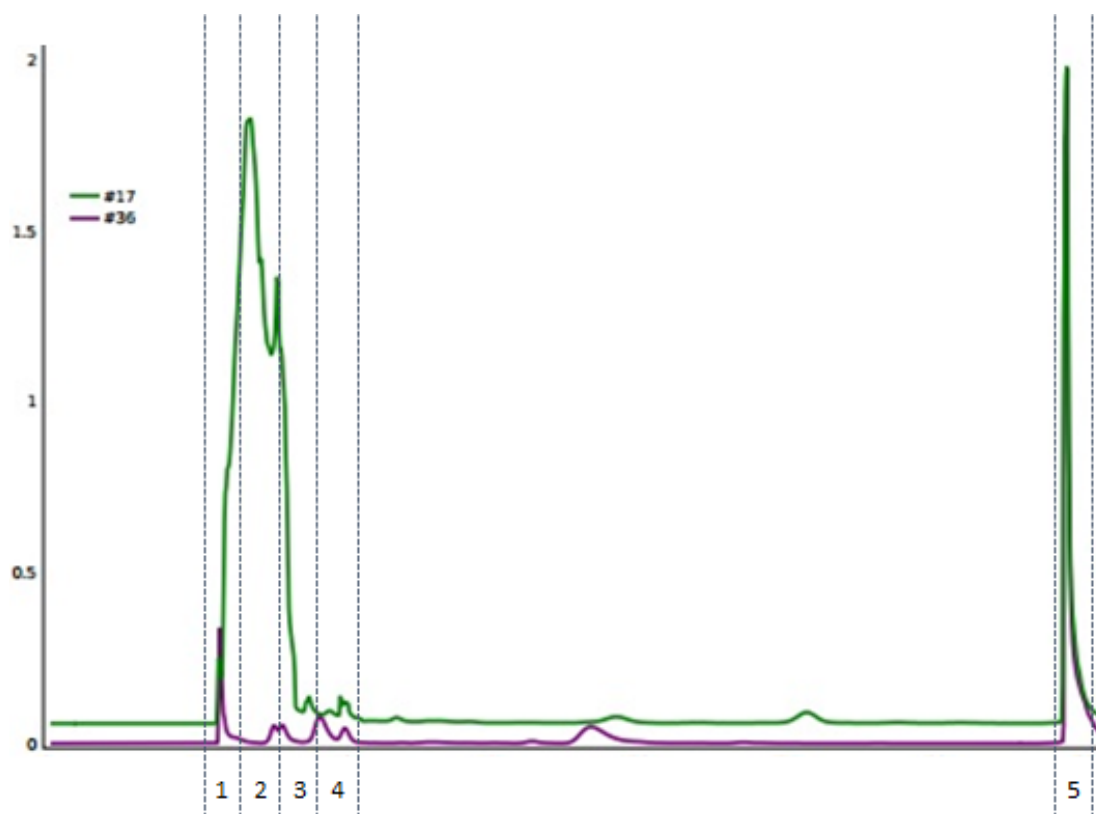
Vzhledem k tomu, že výše uvedené metody nám podaly sice zajímavé, nicméně neúplné informace o potenciální signální molekule, zkusili jsme využít jinou metodu (FT-ICR), jež by nám mohla pomoci specifikovat přesnou hmotnost této molekuly.

Vzorky pro FT-ICR byly připraveny opět gelovou chromatografií. Získané frakce byly pro jejich funkčnost experimentálně otestovány specifickou inokulací na Petriho misku (Obr. 19). Na výsledném chromatogramu (Obr. 24) je patrné na ose X nahoře pořadí získaných frakcí. Experimentálně byla zjištěna slabší funkčnost ve frakci číslo 17 a nejsilnější funkčnost ve frakci č. 36.



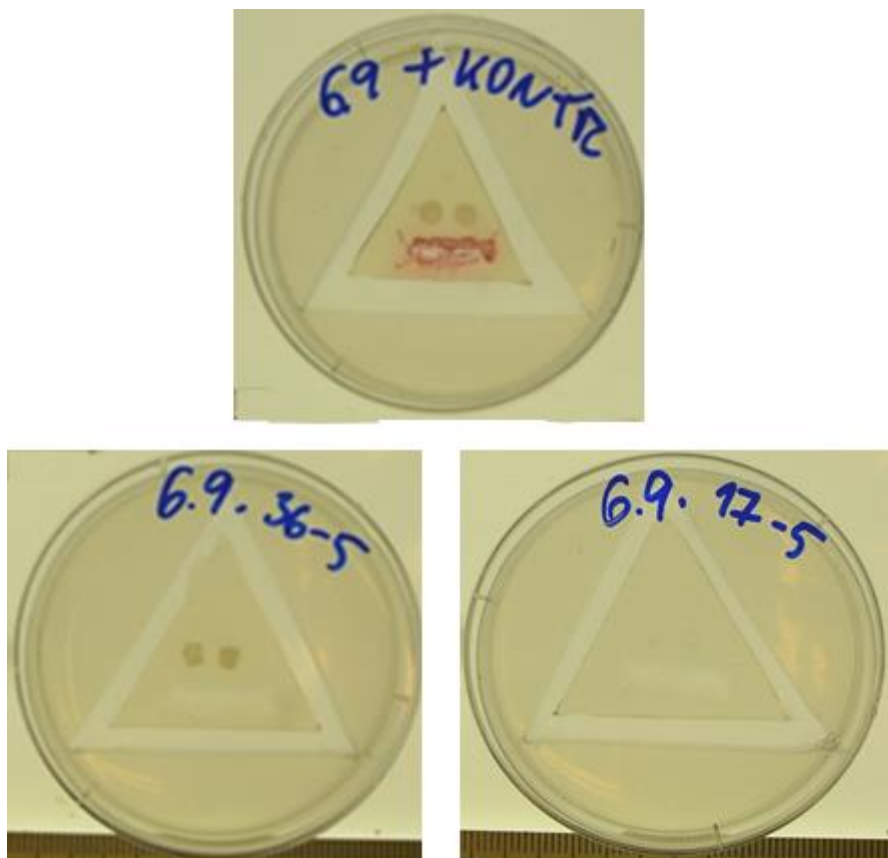
Obr. 24: Záznam gelové chromatografie média kondicionovaného růstem R klonu na koloně Sephadex G-15 napojenou na přístroj Biorad. Osa x dole - čas (min), osa x nahoře - číselné označení sbíraných frakcí, osa y nalevo - absorbance.

Vycházeli jsme z předpokladu, že díky dvojité separaci pomocí gelové chromatografie by mělo dojít k lepšímu pročištění naší hledané látky. Pro získání vzorků s lepší čistotou byly nejlépe fungující frakce (17, 36) znovu separovány gelovou chromatografií ve dvou různých chodech (Obr. 25).



Obr. 25: Překryv 2 vzorků analyzovaných gelovou chromatografií na přístroji Biosys a koloně Sephadex G-15 s nástřikem 0,5ml/min; Osa x - pořadí a rozmezí dále testovaných frakcí, osa y - absorbance; Fialová barva je znovu separovaná frakce č. 36; zelená barva je znovu separovaná frakce č. 17.

Funkčnost získaných frakcí byla experimentálně otestována specifickou inokulací na Petriho misku (Obr.19). Při experimentálním ověřování fungovala nejlépe frakce 36-5 (Obr. 26).



Obr. 26: Testování druhé separace pomocí gelové chromatografie. Nahoře - pozitivní kontrola, kde místo frakce je nanesená suspenze obsahující fenotyp **R** napomáhající růstu kolonií **F** na **MMA**; Dole nalevo - funkční frakce 36-5; Dole napravo - nefunkční frakce 17-5; foceno 4 den po inkulaci.

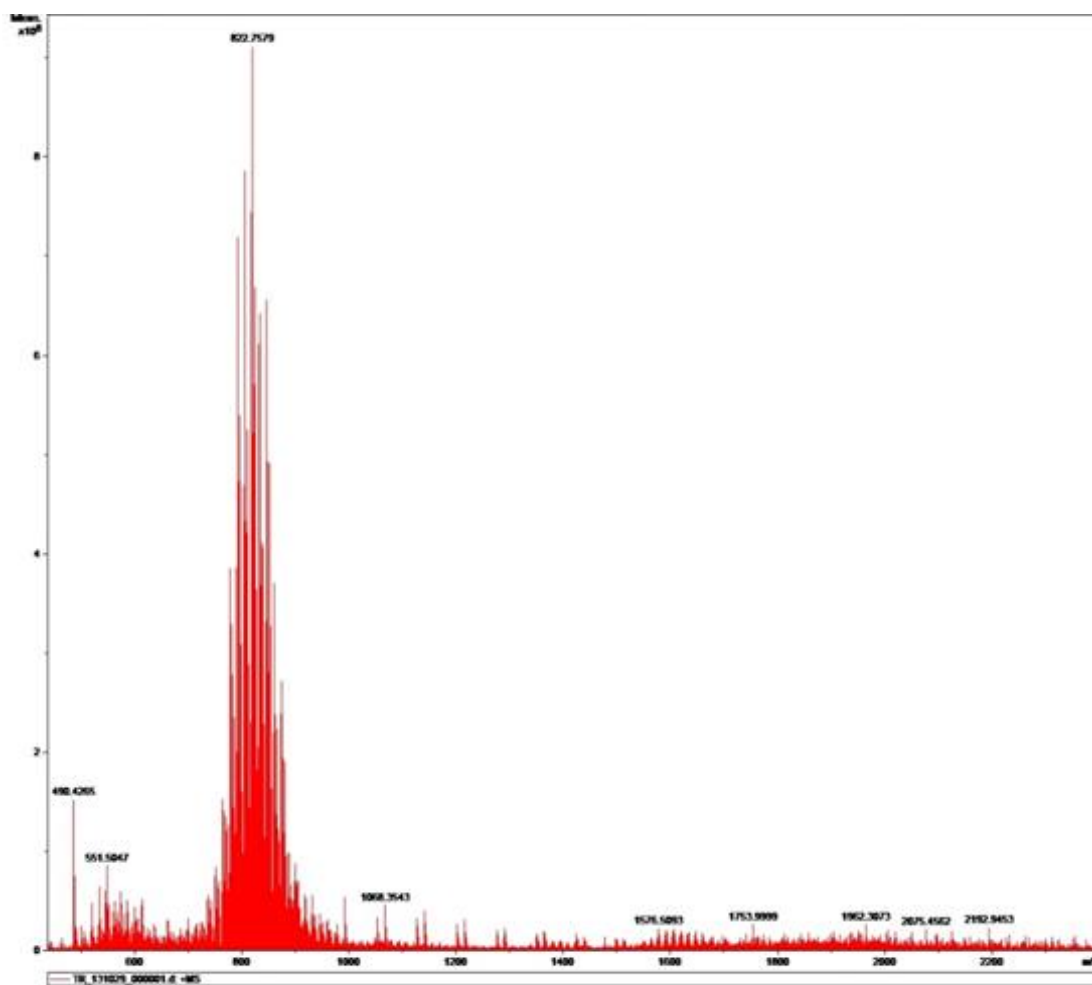
Získaná frakce 36-5 měla nejvýraznější schopnost podpory růstu **F** kibucu na **MMA**, a proto byla vybrána na další analýzu pomocí FT-ICR. Tuto frakci jsme analyzovali hmotnostní spektrometrií.

Postup pro přípravu vzorku pro hmotnostní spektrometrii FT-ICR je uveden v tabulce (Tab. 1) v metodické části.

| | | | | | | | |
|---|-----|---------------------|--------|---|-----|-----------|--------|
| A | Ala | alanin | 71 Da | M | Met | methionin | 131 Da |
| C | Cys | cystein | 103 Da | N | Asn | asparagin | 114 Da |
| D | Asp | kyselina asparagová | 115 Da | P | Pro | prolin | 97 Da |
| E | Glu | kyselina glutamová | 129 Da | Q | Gln | glutamin | 128 Da |
| F | Phe | fenylalanin | 147 Da | R | Arg | arginin | 156 Da |
| G | Gly | glycin | 57 Da | S | Ser | serin | 87 Da |
| H | His | histidin | 137 Da | T | Thr | threonin | 101 Da |
| I | Ile | isoleucin | 113 Da | V | Val | valin | 99 Da |
| K | Lys | lysin | 128 Da | W | Trp | tryptofan | 186 Da |
| L | Leu | leucin | 113 Da | Y | Tyr | tyrosin | 163 Da |

Tab. 2.: Tabulka hmotností jednotlivých aminokyselin v Daltonech.

Z výsledku FT-ICR (obr. 27) je patrný signál převyšující svojí intenzitou okolní šum cca 8násobně. Analýzou signálu se zjistilo, že zdrojová molekula je 4 x nabitá, a proto je tedy výsledná hmota této molekuly přibližně 3284 Da. Vzhledem k tomu, že podle dřívějších výsledků uvažujeme, že námi hledanou signální molekulou je krátký peptid menší než 3500Da, je přítomnost molekulární masy s touto velikostí odpovídající našim předpokladům. Průměrná velikost aminokyselin je 119Da (váha se pohybuje od 57Da u Glycinu až po 186Da u Tryptofanu; Tab. 2). Námi hledaná signální molekula by tedy mohl být peptid mající přibližně 21 aminokyselin.



Obr. 27: Výsledek hmotnostní spektrometrie FT-ICR frakce 36-5; Osa X - m/z (hmota/náboj); Osa Y - intenzita signálu

5. Diskuze

Všechny organismy žijí v neustále se měnícím prostředí. Jejich schopnost adaptace na měnící se podmínky, zahrnující optimalizaci regulace růstu a vývoje, tak určuje šanci na přežití každého druhu. Bakterie žijící v přirozeném prostředí mohou spontánně růst ve velmi těsné blízkosti sousedních bakterií stejného, či jiného druhu a musí se tak vyrovnávat s konstantními změnami dosažitelnosti živin, fyzikálních podmínek, dostupného prostoru či přítomností kompetitorů. Je více než patrné, že pro dlouho trávající přežití bakteriálních druhů, je schopnost vnímat své okolí, reagovat na změny a komunikace s okolními jedinci stejného či jiného druhu nezbytná.

Fakultativně anaerobní Gram-negativní bakterie *Serratia marcescens* je běžným oportunistickým patogenem infikujícím široké spektrum hostitelů, ale žijícím i v uniformních populacích ve vodních tocích (Dudova P., 2008). Pokud rostou bakterie *Serratia marcescens* v uniformní kolonii, dokáží během růstu a vývoje reagovat na podmínky prostředí velmi zásadními změnami fenotypu kolonie, jež jsou dobře rozpoznatelné a identifikovatelné na agarových plotnách již po několika dnech kultivace. Z tohoto důvodu jsou vhodným organismem pro studium ovlivňování růstu a vzhledu následkem změn okolních podmínek, nebo přijímání signálů z okolního prostředí (Koh K.S. *et al.*, 2007; Rice S.A. *et al.*, 2005).

To, že bakteriální kolonie nejsou pouze nahodilým shlukem buněk, ale vysoce sofistikovaným buněčným konsorciem připomínající svými vlastnostmi a schopnostmi mnohobuněčné organismy, je všeobecně známo už od konce 80. let minulého století (Shapiro J. A., 1988). Bakteriální kolonie má možnosti, jak sledovat okolní dění, vyhodnotit aktuální situaci a podle svého “uvážení” rozhodnout, zda pouze přizpůsobí svoji strukturu a činnost okolním vlivům, či spustí kompletní buněčnou přestavbu (sporulace). Dokáže také identifikovat okolní kolonie a reagovat na ně. Díky těmto schopnostem můžeme u bakterií v rámci kolonie uvažovat o sociální inteligenci (Ben Jacob E. *et al.*, 2004).

Komunikační schopnosti bakteriálních “těl” byly za poslední roky hojně zkoumány převážně v rámci jedné kolonie/ biofilmu (Ben – Jacob E. *et al.*, 2004; Bassler B.L. a Losick R., 2006). Jak jsme ukázali (Rieger T. *et al.*, 2008), chimerické kolonie mají schopnost restaurovat originální vzhled i po mechanickém rozrušení, čímž

podporují myšlenku na diferenciaci buněk uvnitř kolonie, přičemž diferenciace buněk v biofilmu byla popsána již dříve (Costerton J.W. *et al.*, 1995). Rozdíl mezi pojmem kolonie a biofilm se tím stírá a o koloniích tak můžeme směle uvažovat, jako o specifickém typu bakteriálního biofilmu složeného z jediného druhu bakterií, ale schopného komplexní odpovědi na změnu okolních podmínek.

Mikroorganismy si pro schopnost komunikace vyvinuly mnoho specifických systémů včetně horizontálního genového přenosu (Cabezón E. *et al.*, 2015), quorum sensing (Bassler B.L. a Losick R., 2006), ale i signálů fyzikální podstaty (chemická – plynný čpavek Palkova Z. a Vachova L., 2003) zvukové signalizace (Cox T. J., 2014) či elektrochemické signalizace pomocí K⁺ a iontových kanálů v biofilmech (Liu J. *et al.*, 2015). Krom toho, pro komunikaci v rámci kolonie, ale i mezi koloniemi navzájem, využívají mikroorganismy širokou škálu bioinformativních (signálních) molekul (Dirix G. *et al.*, 2004; LaSarre B. a Federle M.J., 2013; Liu Y.C. *et al.*, 2015).

V našich předchozích pracích (Rieger T. *et al.*, 2008) jsme ukázali, jakou roli na výsledný vzhled bakteriálních těl má rozmístění inokulačního terčiku na agarové plotně, okolní prostor obklopující kolonie (Rieger T., 2007), nebo přítomnost jiných buněčných těl v blízkém sousedství. Popsali jsme, že během vývoje bakteriální kolonie můžeme spatřovat jistou ontogenezi srovnatelnou s mnohobuněčnými organismy (Patkova I. *et al.*, 2012). Také jsme popsali, jak dokáží kolonie identifikovat sousedské kolonie a podle jejich původu specificky reagovat na jejich přítomnost (Rieger T. *et al.*, 2008). Po vyloučení možnosti přenosu signálu vzduchem, bylo patrné, že toto aktivní rozpoznávání je způsobeno schopností aktivní komunikace, vysíláním informačních agens a schopností přijímání takových agens z okolního prostoru.

Pro identifikaci informačních agens, pomocí kterých spolu buněčná těla komunikují, jsme využili systém pěstování buněčných těl na definovaném médiu (**MMA**), tak aby byla zaručena specifita látek přítomných v tomto médiu.

Při použití definovaného média jsme zjistili nové vlastnosti studovaných organismů, především neschopnost růstu **F** kolonie na **MMA** a zároveň schopnost indukce růstu **F** kolonií pomocí rostoucích heterospecifických (*E. coli*, **R**) i konspecifických makul (**M**). Tato zjištění nás nasměrovala k následnému studiu tohoto fenoménu.

Po vyloučení nutričně podmíněné iniciace růstu **F** kolonií na **MMA** pomocí široké škály “výživových doplňků” jsme usoudili, že příčina tohoto ovlivňování bude

spíše povahy informační než metabolické. Dále jsme vyloučili variantu šíření signální informace vzduchem. Bylo tedy patrné, že pozorovaná iniciace růstu je s největší pravděpodobností způsobená molekulou difundující agarem.

Ukázalo se, že bakterie fenotypu **F** na **MMA** sice nerostou, ale přežívají na něm v reverzibilním dormantním stavu a rozrostou se až po přidání rostoucí **R** makrokolonie do stejného životního prostoru, což je v souladu se známou schopností bakterií aktivně reagovat na změnu okolních podmínek, viz tvorba heterocyst u sinic rodu *Anabaena* za nepříznivých podmínek (Shapiro J.A., 1998). Vzhledem k tomu, že růst **F** kolonií na **MMA** je podmíněn přítomností rostoucí makrokolonie v blízkém okolí, jsou tyto kolonie na helperující molekule plně závislé. Tato zjištění jsou navíc podpořena faktem, že schopnost růstu na minimálním agaru není přenositelná do dalších generací.

Zajímavé je, že makrokolonií, jež produkuje domnělou helperující molekulu, může být druhově příbuzný “wild type” **R**, bakterie jiného druhu (*E. coli*) a stejně tak i klon **M**, jež má nevýraznou pigmentaci, roste na minimálním agaru, ale je od fenotypu **F** odvozený. Podobná změna strategie životního plánu pomocí helpera byla popsána u *Myxococcus xanthus*, kdy v návaznosti na přítomnost buněk zdrojového klonu “wild type” dochází k přepnutí životní strategie mutantních klonů do sporulačního stavu. Tito mutanti sporulační schopnost bez přítomnosti “wild type” buněk ve stejném životním prostoru nemají (Kaiser D. a Losick R., 1993).

V současné době dokončuje naše pracovní skupina další publikaci, zaměřenou na detailnější rozpracování studia ovlivňování morfogeneze bakteriálních kolonií *S. marcescens* a dalších druhů pomocí změny různých vnějších faktorů (pH, hustota agaru, okolní prostor, hustota a původ okolních organismů) se zvláštním zaměřením na fakt, že stejné typy bakterií (**R**, **M**, *E. coli*) jež vyvolávají tvorbu X struktury u **F** kolonií na **ŽA** + **G** ovlivňují i růst **F** kolonií na **MMA**. Je možné, že tvorba X struktury u kolonií **F** rostoucích na **ŽA** + **G** v blízkosti makul (**R**, **M** a *E. coli*) je výsledkem reakce na stejnou signální molekulu, jež u kolonií **F** na **MMA** indukuje růst.

Schopnost bakterií produkovat do okolního životního prostoru malé informační/signální molekuly je dobře známá. V procesu známém jako quorum sensing je využíváno mnoho variant signálních látek jako jsou molekuly obsahující homoserinový laktonový kruh (HSL), ale také peptidy, či sloučeniny cyklických furanonů, jež mohou volně difundovat mezi Gram-pozitivními i Gram-negativními

bakteriemi (LaSarre B. a Federle M.J., 2013). Jsou popsány peptidy, které se účastní quorum sensing fenoménu u Gram-pozitivních bakterií, jejichž produkce byla ale popsána i u Gram-negativních bakterií. Tyto peptidy mají mnohdy velikost mezi 50 až 150 aminokyselinami (Dirix G. *et al.*, 2004). U Gram-pozitivní bakterie *Bacillus subtilis* byla popsána komunikace pomocí peptidoglykanových fragmentů, které dosahují velikosti cca 1000Da (Shah I.M. *et al.*, 2008).

Známé jsou i případy komunikace mezi dvěma koloniemi. *Paenibacillus dendritiformis* dokáže předávat informaci pomocí relativně velkých molekul (12kDa, 30KDa a 32KDa), které jsou ale stále schopny difundovat skrze agar. *P. dendritiformis* tímto způsobem aktivně reguluje směr růstu kolonií (Be'er A. *et al.*, 2010).

Rostoucí makrokolonie (**R**, **M**, *E. coli*) může vysílat pro okolní dormantní kolonie (v našem případě **F** na **MMA**) signál, který vede ke změně životní strategie, kdy bakteriální kolonie na základě příjmu tohoto signálu začnou růst. Prokázali jsme, že rostoucí makrokolonie **R** produkuje během růstu do okolního agaru protein (35 KDa), který může mít signální funkci. Lze se zamýšlet nad tím, z jakého důvodu bakteriální kolonie uvolňuje do svého okolí nemalou molekulu, pro jejíž syntézu bylo potřeba vynaložit množství energie a prostředků. Vzhledem k tomu, že tuto molekulu produkují rostoucí makrokolonie, je zde předpoklad, že uvolňování hypotetického proteinu “WP_025304701.1” do okolního prostředí má nějaký zatím nezjištěný význam či přínos pro produkující i/nebo akceptující kolonii. Představa altruismu u bakteriálních kolonií je přijatelná v kontextu evolučního zvýhodnění této kolonie přirozeným výběrem (Loš J.M. *et al.*, 2013). Reciprocita schopnosti přijímání a vysílání informací vedoucí k růstu i za podmínek, které nejsou pro danou kolonii příznivé, tak může být selekčním kritériem umožňujícím přežití celé populace. Relativní plýtvání zdroji by tedy mohlo mít biologické opodstatnění v rámci koevoluce mikroorganismů. My jsme popsali systém pomoci růstu příbuzným i nepříbuzným jedincům u bakterií, jež se podobá systému pomoci u vyšších organismů. Stromy dokáží díky propojení podzemní sítě hyf mykorhizních hub vnítr – i mezi-druhově pomoci v růstu malým semenáčkům rostoucím v okolí vzrostlých stromů (van der Heijden M. G. A. a Horton T. R., 2009).

Vzhledem k tomu, že k přenosu signálu ke kolonii *S. marcescens* na **MMA** docházelo i po kondicionování média rostoucí *S. rubidea* a následné filtraci přes membránu s propustností pro molekuly s nižší molekulovou vahou než 3500 Da, a zároveň, že na SDS PAGE u *E. coli* nebyl tento protein nalezen, bylo jasné, že výše nalezený protein není podstatou fenoménu indukce růstu **F** kolonie na **MMA** a že v hledání signální

molekuly budeme muset dále pokračovat. Rozhodli jsme se proto využít technické možnosti moderní biologie.

Bohužel se nám do dnešní doby nepodařilo optimalizovat postup pročištění a zakoncentrování helperovského agens tak, abychom mohli jeho složení pomocí dostupných metod detailně identifikovat. Z prozatímních výsledků je patrné, že helperovské agens, jež indukuje růst dormantních kolonií *S. marcescens* na agaru s definovaným složením, bude krátký peptid (cca 21 aminokyselin), jež je termostabilní (mražení, nebo krátké povaření nemá na jeho funkci vliv) a který pravděpodobně asociuje s ostatními proteiny v kondiciovaném médiu za tvorby proteinových agregátů.

Věříme, že se nám během naší studie podařilo rozšířit znalosti o chování bakteriální kolonie *Serratia marcescens* v závislosti na měnicích se okolních podmínkách. Popsali jsme, jak reaguje bakterie na blízké sousedství a jak je díky němu urychlené její dozrávání (i za cenu ztráty struktury). Také jsme popsali, že blízko rostoucí buněčná těla dokáží vysílat agarem signály, jež jsou navzájem přijímány a je na ně adekvátně reagováno (X struktura). Následně jsme popsali, jak může být “dormantní” bakteriální kolonie **F** inokulována na **MMA** “probuzena” k životu díky blízko rostoucím heterospecifickým (*E. coli*, **R**) i konspecifickým makulám (**M**), či pouze médiem kondiciovaným jejich růstem. Tento indukční efekt byl důkladně studován a bylo poukázáno, že tato indukce bude nejspíše způsobená vyslanou signální molekulou, kterou bude zřejmě krátký termostabilní peptid o váze cca. 3284 Da (přibližně 21 aminokyselin).

6. Seznam literatury

- Anderson S., Patrick A.**, Doctor Dolittle's delusion: Animals and the uniqueness of human language. Yale University Press, 2006.
- Ansaldi M., Marolt D., Stebe T., Mandic-Mulec I., Dubnau D.** Specific activation of the Bacillus quorum-sensing systems by isoprenylated pheromone variants. *Mol Microbiol.* 2002 Jun;44(6):1561-73.
- Babikova Z., Gilbert L., Bruce T.J., Birkett M., Caulfield J.C., Woodcock C., Pickett J.A., Johnson D.** Underground signals carried through common mycelial networks warn neighbouring plants of aphid attack. *Ecol Lett.* 2013 Jul;16(7):835-43.
- Barto E.K., Hilker M., Müller F., Mohny B.K., Weidenhamer J.D., Rillig M.C.** The fungal fast lane: common mycorrhizal networks extend bioactive zones of allelochemicals in soils. *PLoS One.* 2011;6(11): e27195.
- Bassler B.L., Losick R.** Bacterially speaking. *Cell.* 2006 Apr 21;125(2):237-46.
- Beckett A.**, Ultrastructure and behaviour of nuclei and associated structures within the meiotic cells of Euascomycetes, Symposium series-British Mycological Society. 1980.
- Be'er A., Ariel G., Kalisman O., Helman Y., Sirota-Madi A., Zhang H.P., Florin E.L., Payne S.M., Ben-Jacob E., Swinney H.L.**, Lethal protein produced in response to competition between sibling bacterial colonies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Apr 6;107(14):6258-63.
- Ben Jacob E., Becker I., Shapira Y., Levine H.**, Bacterial linguistic communication and social intelligence. *Trends Microbiol.* 2004 Aug;12(8):366-72.
- Ben Jacob E., Shapira Y., Becker I., Raichman N., Volman V., Hulata E., Baruchi I.**, Communication-based regulated freedom of response in bacterial colonies, *Physica A*, 2003, 330, 218-231
- Bradbury J., Vehrencamp S.**, Principles of animal communication. Sinauer Associates, Inc., Publishers Sunderland, Massachusetts (1998).
- Cabezón E., Ripoll-Rozada J., Peña A., de la Cruz F., Arechaga I.** Towards an integrated model of bacterial conjugation., *FEMS Microbiol Rev.* 2015 Jan;39(1):81-95
- Castillo-Juárez I, Maeda T, Mandujano-Tinoco EA, Tomás M, Pérez-Eretza B, García-Contreras SJ, Wood TK, García-Contreras R.** Role of quorum sensing in bacterial infections. *World J Clin Cases.* 2015 Jul 16;3(7):575-98.
- Cepl J, Patkova I, Blahuskova A, Cvrckova F, Markos A.** Patterning of mutually interacting bacterial bodies: close contacts and airborne signals. *BMC Microbiol.* 2010 May 12; 10:139.
- Cepl J.** Morfogeneze bakteriálních kolonií (disertační práce), 2013
- Chan YY, Bian HS, Tan TM, Mattmann ME, Geske GD, Igarashi J, Hatano T, Suga H, Blackwell HE, Chua KL.** Control of quorum sensing by a Burkholderia pseudomallei multidrug efflux pump. *J Bacteriol.* 2007 Jun;189(11):4320-4.
- Chen I, Dubnau D.** DNA uptake during bacterial transformation. *Nat Rev Microbiol.* 2004 Mar;2(3):241-9.

- Costerton J.W., Lewandowski Z., Caldwell D.E., Korber D.R., Lappin-Scott H.M.**, Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol.* 1995; 49:711-45.
- Cox T. J.**, The acoustic emissions produced by *Escherichia Coli* during the growth cycle (diplomová práce), 2014
- Datta A., Stapleton F., Willcox M.D.**, Bacterial Coaggregation Among the Most Commonly Isolated Bacteria From Contact Lens Cases. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2017 Jan 1;58(1):50-58.
- Diggle S.P., Griffin A.S., Campbell G.S., West S.A.**, Cooperation and conflict in quorum-sensing bacterial populations. *Nature.* 2007 Nov 15;450(7168):411-4.
- Dirix G., Monsieurs P., Dombrecht B., Daniels R., Marchal K., Vanderleyden J., Michiels J.**, Peptide signal molecules and bacteriocins in Gram-negative bacteria: a genome-wide in silico screening for peptides containing a double-glycine leader sequence and their cognate transporters. *Peptides.* 2004 Sep;25(9):1425-40.
- Dubey G.P., Ben-Yehuda S.**, Intercellular nanotubes mediate bacterial communication. *Cell.* 2011 Feb 18;144(4):590-600.
- Dubnau D.**, DNA uptake in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 1999; 153, 217–244
- Dudová P.**, Fylogenetická diverzita bakteriálního planktonu různých typů vod, Diplomová práce, 2008
- Fortey R.**, Dendrology: The community of trees., *Nature.* 2016 Sep 15;537(7620):306
- Fuqua C., Greenberg E.P.**, Self perception in bacteria: quorum sensing with acylated homoserine lactones. *Curr Opin Microbiol.* 1998 Apr;1(2):183-9.
- Gama J.A., Abby S.S., Vieira-Silva S., Dionisio F., Rocha E.P.**, Immune subversion and quorum-sensing shape the variation in infectious dose among bacterial pathogens. *PLoS Pathog.* 2012 Feb;8(2): e1002503.
- Gibson R.J., Nygaard M.** Interbacterial co-aggregation of plaque bacteria. *Arch Oral Biol.* 1970; 15: 1397–1400.
- Green S., Marler P.**, The analysis of animal communication. *Social behavior and communication.* Springer US, 1979. 73-158.
- Hailman J.**, Optical signals. Indiana University Press, 1977.
- Hare J.D.**, Ecological role of volatiles produced by plants in response to damage by herbivorous insects. *Annual Review of Entomology* 2011; 56; 161-180
- Hauser M.**, The Evolution of Communication. MIT Press, 1996.
- van der Heijden M. G. A., Horton T. R.** Socialism in soil? The importance of mycorrhizal fungal networks for facilitation in natural ecosystems, *J. Ecol.* 2009 97, 1139–1150
- Heinemann J.A., Sprague G.F. Jr.**, Transmission of plasmid DNA to yeast by conjugation with bacteria. *Methods Enzymol.* 1991; 194:187-95.
- Heinemann J.A.**, Genetic evidence of protein transfer during bacterial conjugation. *Plasmid.* 1999; 41:240–247.

- Humphries J., Xiong L., Liu J., Prindle A., Yuan F., Arjes H., Tsimring L., Süel G.M.**, Species-Independent Attraction to Biofilms through Electrical Signaling, *Cell* Volume 168, Issues 1–2, 12 January 2017, Pages 200–209.e12
- Jimenez P.N., Koch G., Thompson J.A., Xavier K.B., Cool R.H., Quax WJ.** The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2012 Mar;76(1):46-65.
- Kaiser D., Losick R.**, How and why bacteria talk to each other., *Cell.* 1993 Jun 4;73(5):873-85.
- Kim G., LeBlanc M.L., Wafula E.K., dePamphilis C.W., Westwood J.H.**, Plant science. Genomic-scale exchange of mRNA between a parasitic plant and its hosts. *Science.* 2014 Aug 15;345(6198):808-11.
- Koh K.S., Lam K.W., Alhede M., Queck S.Y., Labbate M., Kjelleberg S., Rice S.A.**, Phenotypic diversification and adaptation of *Serratia marcescens* MG1 biofilm-derived morphotypes. *J Bacteriol.* 2007 Jan;189(1):119-30
- Kolenbrander P.E., Andersen R.N., Blehert D.S., Eglund P.G., Foster J.S., Palmer R.J. Jr.** Communication among oral bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2002 Sep;66(3):486-505
- Kulp A., Kuehn M.J.**, Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annu Rev Microbiol.* 2010; 64:163-84.
- Lang A.S., Zhaxybayeva O., Beatty J. T.**, Gene transfer agents: phage-like elements of genetic exchange, *Nat Rev Microbiol.* 2012 Jun 11; 10(7): 472–482.
- LaSarre B., Federle M.J.**, Exploiting quorum sensing to confuse bacterial pathogens. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2013 Mar;77(1):73-111.
- Liu J., Prindle A., Humphries J., Gabalda-Sagarra M., Asally M., Lee D., Ly S., Garcia-Ojalvo J., Süel G.M.**, Metabolic codependence gives rise to collective oscillations within biofilms, *Nature.* 2015 Jul 30; 523(7562): 550–554.
- Liu J., Martinez-Corral R., Prindle A., Lee D., Larkin J., GabaldaSagarra M., Garcia-Ojalvo J., Süel G.M.**, Coupling between distant biofilms and emergence of nutrient time-sharing, *Science* 10.1126/science. aah4204 (2017).
- Liu Y.C., Chan K.G., Chang C.Y.**, Modulation of Host Biology by *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing Signal Molecules: Messengers or Traitors. *Front Microbiol.* 2015 Nov 9; 6:1226.
- Łoś J.M., Łoś M., Węgrzyn A., Węgrzyn G.**, Altruism of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: recent hypothesis versus experimental results. *Front Cell Infect Microbiol.* 2013 Jan 4; 2:166.
- Lutzoni F., Kauff F., Cox C.J., McLaughlin D., Celio G., Dentinger B., Padamsee M., Hibbett D., James T.Y., Baloch E., Grube M., Reeb V., Hofstetter V., Schoch C., Arnold A.E., Miadlikowska J., Spatafora J., Johnson D., Hambleton S., Crockett M., Shoemaker R., Sung G.H., Lücking R., Lumbsch T., O'Donnell K., Binder M., Diederich P., Ertz D., Gueidan C., Hansen K., Harris R.C., Hosaka K., Lim Y.W., Matheny B., Nishida H., Pfister D., Rogers J., Rossman A., Schmitt I., Sipman H., Stone J., Sugiyama J., Yahr R., Vilgalys R.**, Assembling the fungal tree of life: progress, classification, and evolution of subcellular traits., *Am J Bot.* 2004 Oct;91(10):1446-80.
- Mahajan A., Singh B., Kashyap D., Kumar A., Mahajan P.**, Interspecies communication and periodontal disease. *ScientificWorldJournal.* 2013 Dec 10; 2013:765434.

Manning A.J., Kuehn M.J., Contribution of bacterial outer membrane vesicles to innate bacterial defense. *BMC Microbiol.* 2011 Dec 1; 11:258.

Matsuhashi M., Endoh K., Pankrushina A.N., Watanabe H., Yamamura H., Komiyama M., Endo S., Tobi M., Ohshima H., Mano Y., Hyodo M., Kaneko T., Otani S., Growth-promoting effect of carbon material upon bacterial cells propagating through a distance. *J Gen Appl Microbiol.* 1997

Matsuhashi M., Pankrushina A.N., Takeuchi S., Ohshima H., Miyoi H., Endoh K., Murayama K., Watanabe H., Endo S., Tobi M., Mano Y., Hyodo M., Kobayashi T., Kaneko T., Otani S., Yoshimura S., Harata A., Sawada T., Production of sound waves by bacterial cells and the response of bacterial cells to sound. *J Gen Appl Microbiol.* 1998 Feb;44(1):49-55.

Mayville P., Ji G., Beavis R., Yang H., Goger M., Novick R.P., Muir T.W., Structure-activity analysis of synthetic autoinducing thiolactone peptides from *Staphylococcus aureus* responsible for virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Feb 16;96(4):1218-23.

McDaniel L.D., Young E., Delaney J., Ruhnau F., Ritchie K.B., Paul J.H., High frequency of horizontal gene transfer in the oceans. *Science.* 2010 Oct 1;330(6000):50.

Micali G., Endres R.G., Bacterial chemotaxis: information processing, thermodynamics, and behavior. *Curr Opin Microbiol.* 2016 Apr; 30:8-15.

Miller R.V., Bacterial gene swapping in nature., *Sci Am.* 1998 Jan;278(1):66-71.

Mrazek H., Benada O., Man P., Vanek O., Kren V., Bezouska K., Weignerova L., Facile production of *Aspergillus niger* α -N-acetylgalactosaminidase in yeast. *Protein Expr Purif.* 2012 Jan;81(1):106-14.

Pai A., Tanouchi Y., You L., Optimality and robustness in quorum sensing (QS)-mediated regulation of a costly public good enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Nov 27;109(48):19810-5.

Palkova Z., Janderova B., Gabriel J., Zikanova B., Pospisek M., Forstova J., Ammonia mediates communication between yeast colonies. *Nature.* 1997 Dec 4;390(6659):532-6.

Palkova Z., Forstova J., Yeast colonies synchronise their growth and developments, *J Cell Sci.* 2000 Jun;113 (Pt 11):1923-8.

Palkova Z., Vachova L., Amonia signaling in yeast colony formation, *Int Rev Cytol.* 2003; 225:229-72.

Parsek MR., Val DL., Hanzelka BL., Cronan J.E. Jr., Greenberg E.P., Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Apr 13;96(8):4360-5.

Patkova I., Cepl J., Rieger T., Blahuskova A., Neubauer Z., Markos A., Developmental plasticity of bacterial colonies and consortia in germ-free and gnotobiotic settings. *BMC Microbiol.* 2012 Aug 15; 12:178.

Pearson J.P., Van Delden C., Iglewski B.H., Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *J Bacteriol.* 1999 Feb;181(4):1203-10.

Poulsen P., Jensen K.F., Three genes preceding *pyrE* on the *Escherichia coli* chromosome are essential for survival and normal cell morphology in stationary culture and at high temperature. *Res Microbiol.* 1991 Feb-Apr;142(2-3):283-8.

- Pratt L.A., Kolter R.**, Genetic analysis of *Escheria coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol.* 1998; 30: 286–293.
- Prindle A., Liu J., Asally M., Ly S., Garcia-Ojalvo J., Süel G.M.**, Ion channels enable electrical communication in bacterial communities. *Nature.* 2015 Nov 5;527(7576):59-63.
- Reguera G., Pollina R.B., Nicoll J.S., Lovley D.R.**, Possible nonconductive role of *Geobacter sulfurreducens* pilus nanowires in biofilm formation. *J Bacteriol.* 2007 Mar;189(5):2125-7. Epub 2006 Dec 8.
- Reguera G.**, When microbial conversations get physical. *Trends Microbiol.* 2011 Mar;19(3):105-13
- Rice S.A., Koh K.S., Queck S.Y., Labbate M., Lam K.W., Kjelleberg S.**, Biofilm formation and sloughing in *Serratia marcescens* are controlled by quorum sensing and nutrient cues. *J Bacteriol.* 2005 May;187(10):3477-85.
- Rickard A.H., Gilbert P., Handley P.S.**, Coaggregation between aquatic bacteria is mediated by specific growth phase dependent lectin-saccharide interactions. *J Appl Microbiol.* 2000; 66: 431–434.
- Rieger T., Neubauer Z., Blahusková A., Cvrckova F., Markos A.**, Bacterial body plans: Colony ontogeny in *Serratia marcescens*, *Commun Integr Biol.* 2008 Jul-Sep; 1(1): 78–87.
- Rieger T.**, Morfogenez mnehobuněčných těl u bakterie *Serratia marcescens*, Diplomová práce, 2007
- Roier S., Zingl F.G., Cakar F., Schild S.**, Bacterial outer membrane vesicle biogenesis: a new mechanism and its implications. *Microb Cell.* 2016 May 10;3(6):257-259.
- Shah I.M., Laaberki M.H., Popham D.L., Dworkin J.**, A eukaryotic-like Ser/Thr kinase signals bacteria to exit dormancy in response to peptidoglycan fragments., *Cell.* 2008 Oct 31;135(3):486-96.
- Shapiro J.A.**, Bacteria as multicellular organisms. *Sci Am.* 1988; 256:62–69.
- Shapiro J.A., Higgins N.P.**, Differential activity of a transposable element in *Escherichia coli* colonies. *J Bacteriol.* 1989 Nov;171(11):5975-86.
- Schwechheimer C., Kuehn M.J.**, Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. *Nat Rev Microbiol.* 2015 Oct;13(10):605-19.
- Slater H., Crow M., Everson L., Salmond G.P.**, Phosphate availability regulates biosynthesis of two antibiotics, prodigiosin and carbapenem, in *Serratia* via both quorum-sensing-dependent and – independent pathways. *Mol Microbiol.* 2003 Jan;47(2):303-20.
- Solomon J.M., Lazazzera B.A., Grossman A.D.**, Purification and characterization of an extracellular peptide factor that affects two different developmental pathways in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev.* 1996 Aug 15;10(16):2014-24.
- Song Y.Y., Zeng R.S., Xu J.F., Li J., Shen X., Yihdego W.G.**, Interplant communication of tomato plants through underground common mycorrhizal networks. *PLoS One.* 2010 Oct 13;5(10): e13324.
- Song Y.Y., Simard S.W., Carroll A., Mohn W.W., Zeng R.S.**, Defoliation of interior Douglas-fir elicits carbon transfer and stress signalling to ponderosa pine neighbors through ectomycorrhizal networks. *Sci Rep.* 2015 Feb 16; 5:8495.

Sourjik V., Wingreen N.S., Responding to chemical gradients: bacterial chemotaxis. *Curr Opin Cell Biol.* 2012 Apr;24(2):262-8.

Suga H., Smith K.M., Molecular mechanisms of bacterial quorum sensing as a new drug target. *Curr Opin Chem Biol.* 2003 Oct;7(5):586-91.

Trushin M.V., Studies on distant regulation of bacterial growth and light emission. *Microbiology.* 2003 Feb;149(Pt 2):363-8.

Vybiral Z., *Psychologie komunikace.* 2005, 2.vyd. ISBN 978-80-7367-387-1

Williams R.P., Qadri S. M. H., The pigment of *Serratia*. 31-79. *The genus Serratia.* Boca Raton, CRC Press

Yajima A., Synthesis of microbial signaling molecules and their stereochemistry-activity relationships. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2011;75(8):1418-29.

Zhu J., Winans S.C., The quorum-sensing transcriptional regulator TraR requires its cognate signaling ligand for protein folding, protease resistance, and dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Feb 13;98(4):1507-12.

7. Přílohy

Rieger T., Neubauer Z., Blahuskova A., Cvrckova F., & Markos A., (2008). Bacterial body plans: colony ontogeny in *Serratia marcescens*. *Communicative & integrative biology*, 1(1), 78-87.

Patkova I., Cepl J., Rieger T., Blahusková A., Neubauer Z., & Markos A., (2012). Developmental plasticity of bacterial colonies and consortia in germ-free and gnotobiotic settings. *BMC microbiology*, 12(1), 178.

Research Paper

Bacterial body plans

Colony ontogeny in *Serratia marcescens*

Tomáš Rieger,¹ Zdeněk Neubauer,¹ Anna Blahůšková,¹ Fatima Cvrčková² and Anton Markoš^{1,*}

¹Charles University in Prague; Department of Philosophy and History of Science; and ²Department of Plant Physiology; Prague Czech Republic

Abbreviations: CFU, colony-forming unit; F, “fountain” (colored) colony strain; W, white colony strain

Key words: *Serratia marcescens*, colony development, differentiation, self/non-self recognition, ontogeny, morphogenesis, microbial communication, signaling

The bacterium *Serratia marcescens* produces a plethora of multicellular shapes of different colorations on solid substrates, allowing immediate visual detection of varieties. Such a plasticity allows studies on multicellular community scale spanning two extremes, from well-elaborated individual colonies to undifferentiated cell mass.

For a single strain and medium, we obtained a range of different multicellular bodies, depending on the layout of initial plating. Four principal factors affecting the morphogenetic pathways of such bodies can be distinguished: (1) amount, density and distribution pattern of founder cells; (2) the configuration of surrounding free medium; (3) the presence and character of other bacterial bodies sharing the same niche; and (4) self-perception, resulting in delimitation towards other bodies. The last feature results in an ability of well-formed multicellular individuals to maintain their identity upon a close mutual contact, as well as in spontaneous separation of cell masses in experimental chimeras. We propose an “embryo-like” colony model where multicellular bacterial bodies develop along genuine ontogenetic pathways inherent to the given species (clone), while external shaping forces (like nutrient gradients, pH, etc.) exert not formative, but only regulative roles in the process.

Introduction

The morphogenesis of multicellular organisms is usually exemplified by the model case of animal ontogeny, i.e., as an irreversible process resulting in an *individual*. Many multicellular life forms, however, might be bound by much looser morphogenetic constraints, allowing alternative developmental pathways controlled by external or internal cues as, e.g., in plants. Not only a variety of shapes can arise from a zygote or a spore; some ontogenetic strategies allow also vegetative propagation by buds, cuttings, founder cells and similar

body fragments. Some life forms can thus be “parsed” (even to the level of single cells) and give rise to new shapes. We focused on such plasticity in a model prokaryotic organism—the bacterium *Serratia marcescens*, whose natural coloration greatly facilitates in vivo observation of developing multicellular structures.

Bacteria cover an admirable range of multicellular life forms, even within a single species or strain. They may grow as undifferentiated cell masses or suspensions; given, however, opportunities (free space, nutrients, ground texture, neighbors, etc.), they give rise to sophisticated body forms—societies created by billions of cells—often following morphogenetic pathways akin to those observed in genuine individuals.¹⁻⁴ *S. marcescens* is known for its extreme variability of multicellular bodies formed under different settings.⁵⁻⁸ As nutritional conditions are a prominent factor, the variability of bodies tends to be described as an epiphenomenon of nutrient limitation and/or metabolite buildup in the medium.^{9,10} Often the morphogenesis of bacterial bodies is depicted or modeled as if molded by external forces like, e.g., the behavior of iron particles in a magnetic field, or as a crystallization-like process, with bacteria playing role of “molecules”.¹¹⁻¹³ Decisive for a genuine embryonic development are, however, not the nutrients and bulk metabolites but specific signals. The participating cells are interpreting them in a context-dependent, semantic manner, which results in cell populations proceeding along inherent morphogenetic trajectories. Here we show that this indeed appears to be the case also in the development of multicellular bacterial bodies.

Results

Classification of bacterial bodies. Under standardized nutrient conditions and in the presence of glucose, *Serratia marcescens* CNCTS 5965 gives rise to distinctly shaped and colored colonies (see below), while only smooth red colonies were obtained on identical media without glucose. On glucose-containing media, the original bacterial population occasionally segregated clones lacking the red pigment. After several rounds of selection, we derived two stable variants of the strain, colored (F) and white (W), which no longer segregated and which have been used in all the subsequent experiments.

Surprisingly, colonies of both variants exhibited a finite growth, reaching, under optimal settings, a maximum diameter of 15 mm

*Correspondence to: Anton Markoš; Charles University in Prague; Department of Philosophy and History of Science; Viničná 7; Praha 2; 128 44 Czech Republic; Email: markos@natur.cuni.cz

Submitted: 07/03/08; Accepted: 07/05/08

Previously published online as a *Communicative & Integrative Biology* E-publication: <http://www.landesbioscience.com/journals/cib/article/6547>

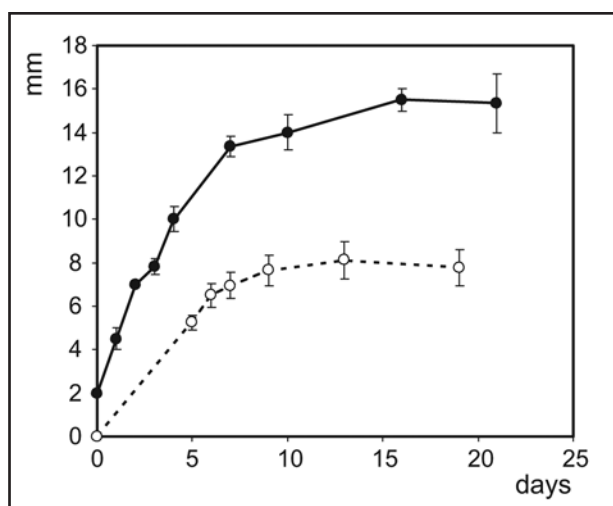


Figure 1. Colonies of the F clone exhibit limited growth. Colonies were started by sowing (open symbols) or dropping (closed symbols; see Methods) at time 0; average diameter from 6 colonies \pm standard deviation is shown for each time point.

(the final size was somewhat smaller under suboptimal conditions, such as dense plating). Colonies and other multicellular bodies (see below) reached their final size, shape and color within 7–10 days upon plating, and survived for at least another three weeks without substantial changes (Fig. 1).

Upon streaking the bacteria on a dish, multicellular bodies ranging from an undifferentiated cell mass to characteristically patterned colonies could be distinguished (Fig. 2). For the sake of further study, we define three well-differentiated body types—colony, confluent colony and macula—that appear on such a continuum, depending on the number, density and distribution of colony-forming units (CFU) in the original plating.

A colony was provisionally defined as a multicellular body grown from a single cell. Its appearance depends on the density of plating:

(i) Bacteria sown at hundreds CFU per dish produce many small colonies (diameter of 1–2 mm), colored or white depending on the strain used (colored colonies shown in Fig. 3A). As we shall discuss below, these can be viewed as incompletely developed, “dormant” colonies.

(ii) At tens CFU per dish, colonies develop to a diameter of about 10 mm, i.e., the maximum mature size at that density of plating. The colored form is characterized by a shape resembling a fountain (F), with an elevated smooth red center and an elevated red rim, separated by a rough white circle (Fig. 3B and C). Colonies in somewhat denser plating are smaller and produce only the red rim, but no elevated center (see Fig. 6A). The colonies of the white (W) strain are shaped somewhat differently (Figs. 2B and 3D).

Bodies indistinguishable from F or W colonies described above, and of the same size, arose also from multicellular inocula, such as up to 10^6 cells planted (dotted or dropped, as described in Methods) to a strictly limited spot. Sometimes, however, multicellular CFU of the F clone produced disheveled forms with many red protuberances (Fig. 3E). Thus, in agreement with others (reviewed in refs. 14 and 15), a colony will be understood here not only as a clonal body grown from a single cell, but also as a morphological entity, independent from the number of founders. (This also brings a methodological

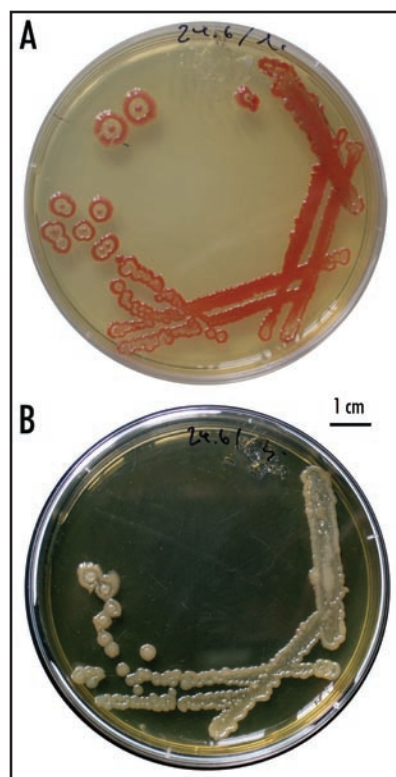


Figure 2. Continuum of multicellular bodies, from an undifferentiated cell mass to characteristically patterned colonies, develops upon streaking the bacteria on solid media. (A) Colored (F) strain; (B) white (W) strain.

advantage, since colonies can be planted to desired coordinates on the dish.) Even more importantly, mature large F and W colonies can be viewed as fully developed specimens of a lineage-specific “body plan”, while small colonies, or other forms described below, may be interpreted as instances of an incompletely accomplished development towards the prototype F or W colony pattern.

Next, we investigated initial and boundary conditions allowing development of colonies or colony-like bodies. In particular, cell density and the size and layout of the planting area (dot, drop or smear), can be understood as two dimensions of a bacterial “morphospace” that may act in mutual discordance (Fig. 4). Two additional characteristic shapes were observed under such “suboptimal” conditions.

Confluent colony (“concol”) develops upon spreading a bacterial suspension (approx. 15–150 cells/cm²) over an area up to a diameter of 15 mm, i.e., similar to, or slightly exceeding, the size of a mature, fully developed colony (Fig. 5A). A concol can also arise if colonies in a sparse sowing meet prior to achieving their fully differentiated state (see Figs. 2A and 3B). Three types of concols can be observed for the F strain; bodies of the W form are analogous, albeit white (see Fig. 2B):

(i) At lower densities (approx. 20 cells/cm²), a small number of colonies is initiated; they soon merge, establishing a center consisting of several red spots (corresponding approximately to the number of founder cells), surrounded by an elevated common red rim reminiscent of an F colony (as in Figs. 2A and 3B; compare also Fig. 6C).

(ii) Densities up to 150 cells/cm² produce concols with a single granular red center surrounded by a white laced zone, which later

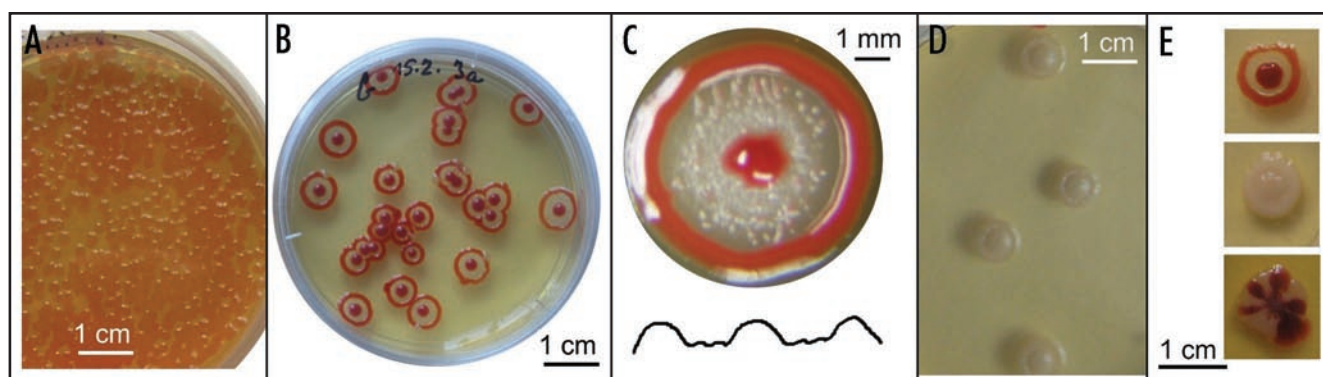


Figure 3. Types of colonies. (A) A dense spread gives rise to small colonies (the F strain, 14 days); (B) a low-density spread (about 30 CFU/dish) leads to the fountain (F) pattern (12 days); (C) a typical F colony at higher magnification with a profile of its cross-section (not to scale; 12 days); (D) a low-density spread of the W strain (6 days); (E) colonies originated by planting dense inocula: top—F colony; middle—W colony; bottom—disheveled morphology obtained sometimes for the F strain (6–9 days).

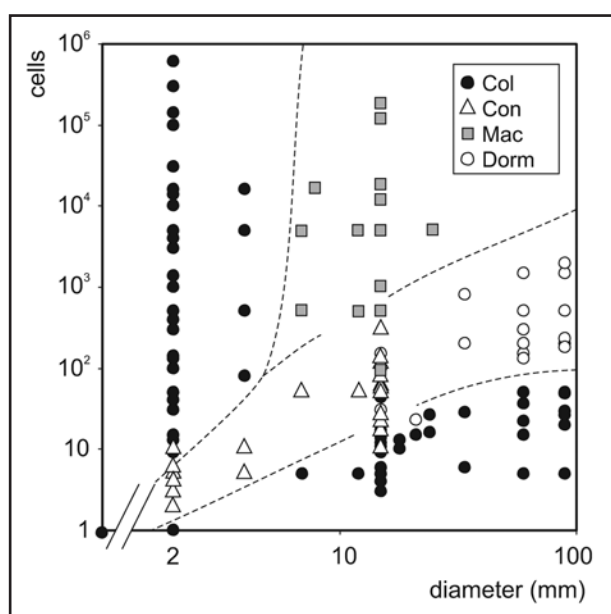


Figure 4. A "phase diagram" of the colony morphospace. Depending on the number of cells plated and the diameter of the [circular] area sown, bacteria develop into well-developed colonies (Col), confluent colonies (Con), maculae (Mac) or small, "dormant", colonies (Dorm).

develops into a red rim, albeit less perfect than that at lower cell densities (Fig. 5A). Best-looking concols developed from a single spot of bacterial suspension per dish.

(iii) If the diameter of the inoculated area exceeds the 15–20 mm limit, cells no longer establish a concol, the only exception being elongated concols developing when one dimension in the spread is limited to about 7 mm (Fig. 2, lower left of each dish). Again, however long such a body might be, it never grows far into the unoccupied area beyond its borders.

Unlike colonies, concols do not develop in the same manner after planting multicellular inocula in a dense spacing instead of sowing a cell suspension; results of such experiments will be described in more detail below.

If the density of spreads is even higher than in concols (>150 CFU/cm²) and, at the same time, the planting area exceeds the

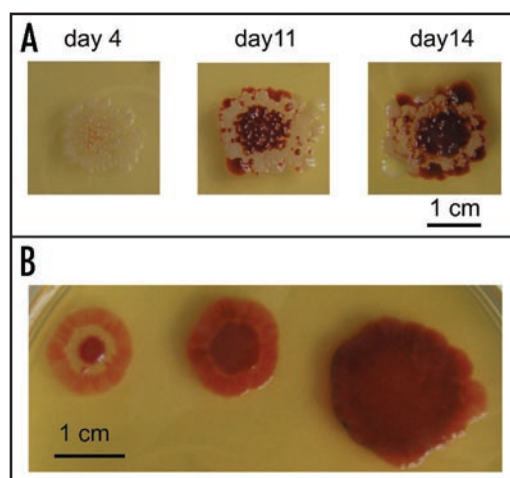


Figure 5. Bodies originating from multicellular inocula. (A) Development of a confluent colony (concol) of the F strain. Three subsequent stages at day 4, 11 and 14 after plating. (B) Spreading of a dense inoculum produces maculae. Development of 3 identical cell suspensions (about 10⁶) spread to an area of a diameter 2, 7 and 20 mm, respectively, at 9 days after plating. Whereas two bodies at the left and middle grew while differentiating and exhibited (to a varying extent) aspects of the F colony phenotype, the body to the right did not grow beyond the original area of spread, and produced a macula.

diameter of 10–15 mm, distinguishable colonies never appear. Instead, the F bacteria develop into a macula—a red carpet without apparent inner structuring but with a well-developed rim as the last remnant of the F-type developmental pathway (Fig. 5B, right). Best results were again obtained with a single body per dish: the development of a macula requires a certain amount of unoccupied medium in its surrounding. Smears as those in Figure 10 represent maculae elongated in one dimension. An analogous phenotype was obtained also for the W form.

We further focused on three factors affecting morphogenesis of bodies described: availability of unoccupied substrate, the presence of other bodies, and internal processes governing body shaping.

Behavior towards unoccupied medium. A dense suspension, spread evenly over the whole dish, results in a population of small, separated colonies (Fig. 3A and 6A). Spreading on dishes of varying

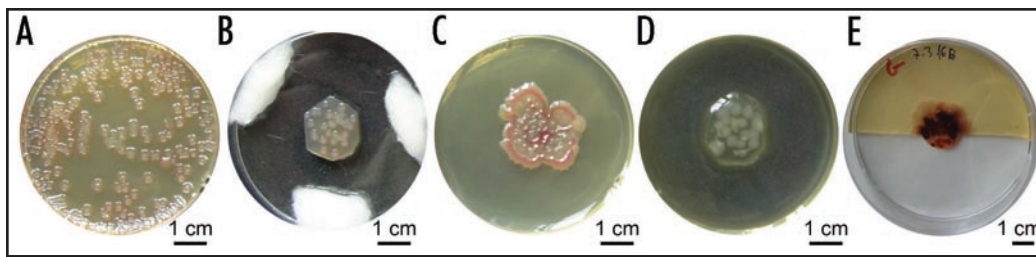


Figure 6. Effects of plating geometry. (A) Growth of dense colonies (about 300 CFU/dish) sown evenly over the whole surface of agar; (B) removal of surrounding agar leads to development of single colonies (wet tampons maintaining humidity can be seen in the dish); (C) a concol grown from a suspension of the same plating density, surrounded by free agar; (D) nutrient broth is not a sufficient substitution for the agar removed; (E) a combination of a concol and colonies developing at the interface of free space and agar. Cultures are at least 20 days old, but the same phenomena are well-developed already after 10–14 days.

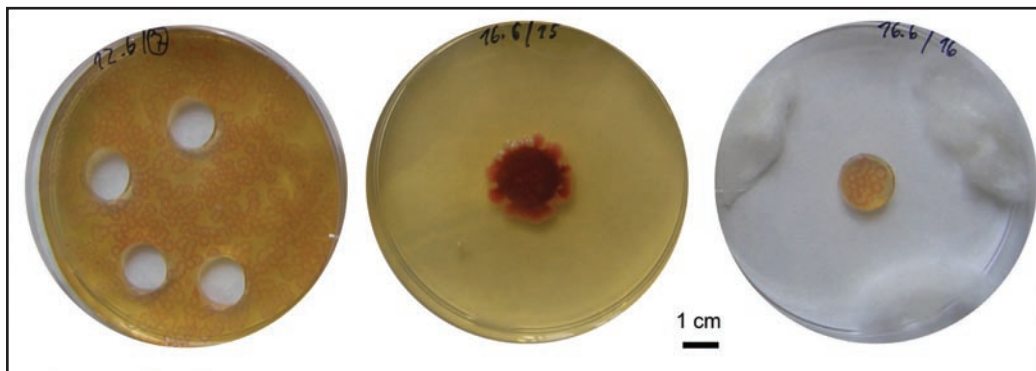


Figure 7. Transfer of colonies. Circular plugs were removed from a field of 4-day colonies (left) and transferred into a hole in a fresh agar dish (middle), or to a damp chamber (right). Fresh agar induced colonies to merge into a macula within 8 days (all dishes photographed at the same time).

diameter (9, 6, 3.4 or 1.5 cm, see Fig. 4) or immediate removal of the surrounding agar field after plating the cells in a 1.5 cm disc in the center of a dish (Fig. 6B) produces the same pattern, provided the whole area is covered by the bacterial spread at a similar density. However, spreading of an inoculum of the same density in a circle of a diameter 1.5 cm in the center of a larger dish results in a concol instead of multiple isolated colonies, indicating that the free agar medium surrounding the inoculum provides some factor that facilitates colony expansion into the unoccupied space (Fig. 6C).

An obvious explanation would be that bacteria on fully occupied plates simply cease growing due to exhaustion of the medium or buildup of metabolites. However, the same pattern of small colonies was obtained upon replacement of the removed solid medium by liquid broth, maintaining constant nutritional conditions across the whole dish (Fig. 6D). In subsequent experiments we found that at least 1.5 cm of unoccupied medium in all directions is required for full concol development (not shown). Hence, the development of the growing concol reflects the availability of free agar in its surroundings, possibly via perceiving some physical parameter or a specific rate-limiting compound provided and/or sequestered by the agar component of the solid media, unless we assume a substantial influence of relatively minor differences in water availability in the broth-supplemented agar block. The later explanation, however, is unlikely, since even at agar concentration down to 0.5% some aspects of the F pattern can develop, albeit less efficiently than on full-strength agar (not shown).

Upon one-sided removal of the free agar in the vicinity of the inoculated central disk (Fig. 6E), the bacterial body responds by developing into an imperfect concol (as in Fig. 6C) in the direction of remaining agar, whereas the cut edge remains flanked by free colonies.

Upon transfer of small (ca 1 cm²) discs cut out from a continuous carpet of mature dormant colonies (hundreds per dish; Fig. 7 left) into an opening of identical diameter in an empty agar dish (from the same batch of dishes, Fig. 7 middle), colonies resumed their development, expanded somewhat beyond the confines of the transferred agar plug and merged into a macula. Similar discs transferred into an empty dish without agar remained unchanged (Fig. 7 right). Such a behavior took place even with older (24 days) cultures. (Note that a comparable number of CFU—approx. 20—sown in the middle of the dish would result in a concol, as in Fig. 6C; however, here we did not transfer freshly sown cells but established colonies).

Thus, bodies seemingly in a final stage of their ontogeny can resume development if challenged by fresh unoccupied medium. However, even in such a case they remain spatially restricted, suggesting the involvement of specific regulatory processes as opposed to simple nutrient limitation.

Close neighborhood effects. To examine the mutual behavior of bodies sharing the same dish, we followed the development at several plating configurations.

First, dishes were sown with a suspension of the F strain at hundreds of CFU per dish, which should produce small colonies, and an inoculum of the same strain sufficient to start a colony or a macula was planted (dropped or dotted) upon this field immediately. Whereas the colonies of the background developed normally, only an undifferentiated blotch lacking structures of a typical macula or colony developed on the planting site, while controls developed normally (Fig. 8A–F). Although inhibition was observed even if the number of cells in the planting exceeded that in the field by several orders of magnitude, it was more profound on a dense field and/or upon planting a diluted suspension. As expected, dropping of inocula corresponding to a colony or macula to fields of 2–4 days old colonies led to even more dramatic impediment of development (not shown).

If such a dense bacterial field was applied only to one half of a dish, and a macula-producing inoculum was planted immediately at the interface of the occupied and free agar, a typical macula with a well-developed rim appeared in the direction of the free agar; its rim, however, disappeared at the border facing neighboring colonies

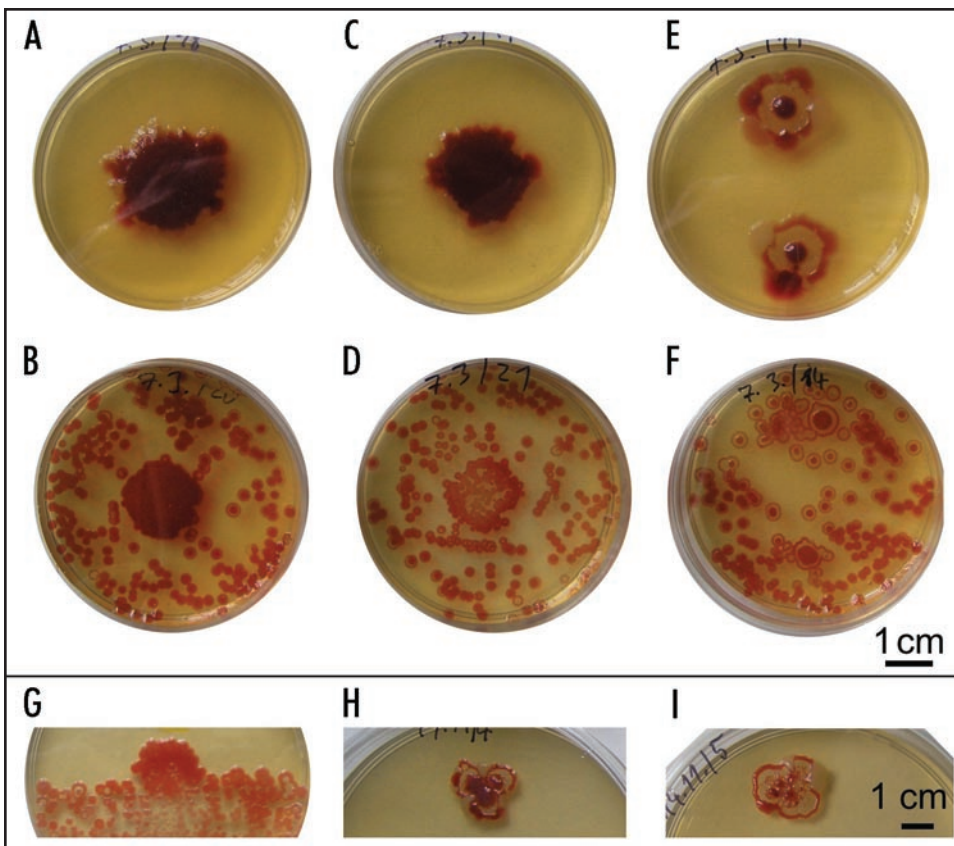


Figure 8. Development of bodies on dense bacterial fields. (A and B) Maculae from about 1500 cells, (C and D) those from about 150 cells, sown on (A and C) free agar and (B and D) a background of about 200 CFU per dish. (E and F) A similar layout with inocula normally giving rise to F colonies (3000 cells above, 300 below, respectively); (A–F) 36 days, but identical results after 14 days. (G) Development of a macula at the interface of small-colony field and free agar (6 days). (H) Three high-density drops (100–150 cells) in close vicinity develop to delimited F phenotypes, without merging into a concol; the same result was obtained with larger inocula up to 10^5 cells, while (I) drops containing only 10–15 cells in the same configuration give rise to a typical concol (H and I, 15 days).

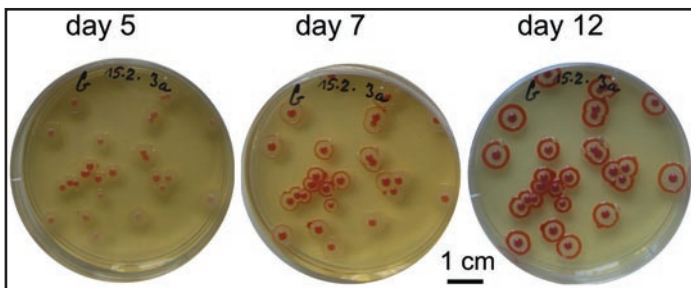


Figure 9. Spread of colony coloring from “reddening centers”. The same dish is shown at three time points.

(Fig. 8G), reminiscent of the situation at the interface of free agar and empty space (Fig. 6E).

Multiple comparably strong inocula of 10^2 – 10^5 cells planted close to each other developed to normal F colonies, neither inhibited nor merged into a concol (Fig. 8H). However, colonies developing from small inocula did produce a concol (Fig. 8I). This indicates the existence of a limit inoculum size deciding the result of a tradeoff between tendencies to merge into a concol, or to develop a full-fledged colony, at a given distance (see also the overlap of

configurations in the morphospace phase diagram at Fig. 4).

Long-distance signaling between bodies. F colonies incidentally growing in close vicinity develop their coloration quicker than their peers growing sparsely; from such a colored center the reddening front spreads into the surroundings (Fig. 9). The effect suggests that colonies can induce final phenotypes in their neighbors.

To get a closer insight, a smear of approx. 10^8 cells was applied to a line on agar, and, at the same time, colonies were planted 1–2 cm from that line. The smear developed into a macula that accelerated the coloring of colonies, as compared to the controls, to a degree proportional to the distance between both bodies (Fig. 10A). A trench cut into the agar did not prevent acceleration of color development, suggesting participation of a signal traveling through the gas phase (Fig. 10B). A macula of W cells also exerted an accelerating effect on F colony coloration (Fig. 10C).

Surprisingly, also an F macula induced weak pink coloration in W colonies, together with disruption of colony structure (Fig. 10D; for structure disruption see also Fig. 11A). Similar disruption of W colony structure was observed also in the vicinity of a W macula (not shown). Thus, an F body can induce the production of pigment in W colonies. The coloring, albeit fainter, appeared also in a configuration with the trench (not shown). Cells from the

pink crescent gave rise to normal W colonies, even after five rounds of co-cultivation with an F macula as described above, indicating a transient, regulatory nature of the observed changes.

Chimeric bodies. Upon collision of growing F and W colonies, the two bodies do not merge into a concol with a common rim but maintain a clear-cut boundary instead. As in the case described above, the W colony develops a pink coloration adjacent to the F neighbor (Fig. 11A). While this phenomenon might be analogous to the above-described collision of large colonies that also do not merge (Fig. 8H), it prompted us to investigate the behavior of bodies originating from mixed suspensions.

When dense suspensions containing a mixture of cells of F and W lineages were dropped in a manner that would produce colonies under monoclonal conditions, colony-sized chimerical bodies (i.e., about 10–12 mm in diameter) lacking the typical F morphology developed, with a red center and white periphery. The proportion of colors roughly corresponded to the ratio of F and W cells in the original suspension (Figs. 11B and 12A middle). Material dotted directly from the red or white part of a chimera, or sown from suspensions prepared from local samples, maintained the characteristics of the place it was taken from, suggesting segregation of both constituting clones into delimited territories, while a suspension

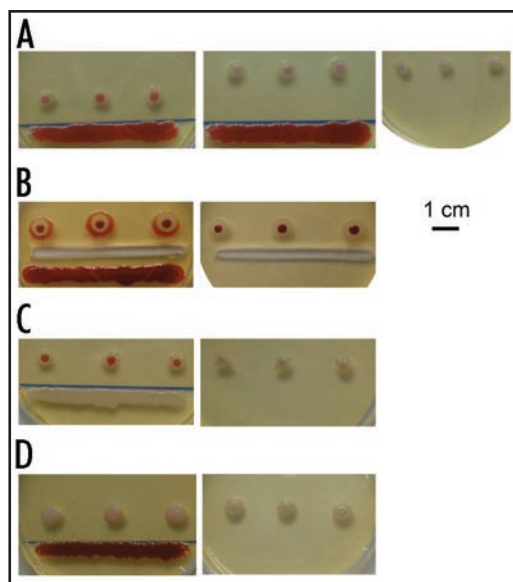


Figure 10. Effect of a neighboring macula on the development of colonies. (A) F colonies planted 1 and 2 cm, respectively, from an F macula; control (colonies only) to the right; (B) macula accelerates color development across a trench in agar; (C) a W macula accelerates ripening of F colonies; (D) W colonies adjacent to an F macula develop a faint coloring. All preparations are approx. 4 days old; snapshots were taken at the time of maximum difference between control and colonies close to a macula. After prolonged incubation all F colonies developed the standard pattern while W colonies did not acquire any additional structures.

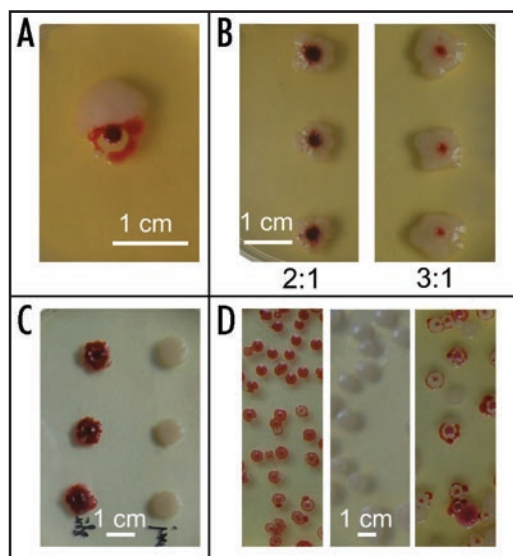


Figure 11. Encounter of colonies and development of WF chimeras. (A) W and F colonies maintain their identity upon encounter. (B) Chimeric bodies grown from mixed suspensions of W and F cells in the indicated proportions; (C) colonies dotted from the red center (left) and white rim (right) of a chimeric body; (D) colonies sown from a suspension prepared from the red center, white rim, and the whole chimera, respectively. All colonies about 10 days old.

from the whole chimera gave rise to a mixture of F and W colonies (Fig. 11C and D).

Chimerism was further confirmed by pattern reconstitution in chimeras disrupted in situ using a sterile glass rod at 1, 2 and 4 days after planting (i.e., prior to development of coloration, which was only

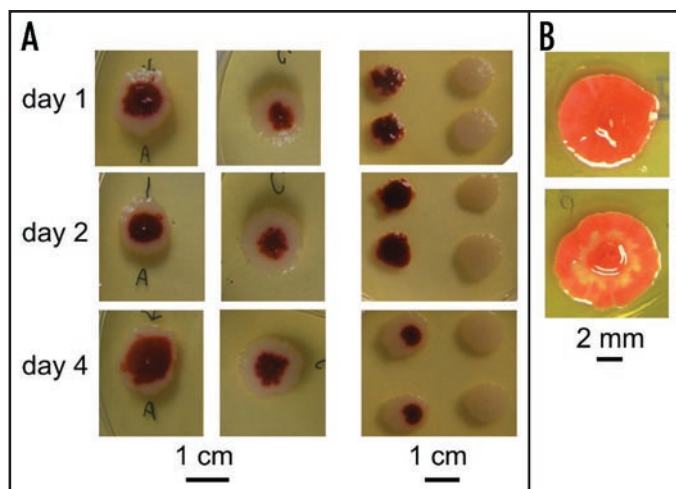


Figure 12. In situ homogenization and regeneration of chimeric and mono-clonal bodies. (A) Left: WF (1:1) chimeras disrupted after 1, 2 and 4 days, respectively, and regenerated; middle: undisturbed controls; right: progeny of the reconstituted bodies (samples taken from white margins and/or red centers). For progeny of corresponding controls, see Figure 11C. (B) A colony that has been disturbed at 3 days photographed 6 days later (top), compared to an undisturbed control (bottom).

starting to appear in the oldest bodies). 2–4 days after such homogenization the body re-established its red center and white margin (Fig. 12A). The younger the chimera at the time of disruption, the more complete was the pattern regeneration; in 4 days-old chimeras, the regeneration capacity is nearly lost (see bottom row of Fig. 12A).

When bacteria from white or red parts of such regenerated bodies were replanted, they produced colonies whose character corresponded to their kin in the region the dot was taken from, indicating that reconstitution involves cell migration rather than phenotype switching in individual cells. Material from red parts of incompletely reconstituted older (4 days) chimeras produced mixed bodies, consistent with imperfect redistribution of both cell types, possibly due to increasing rigidity of older chimeras, which impedes their complete homogenization.

Unlike chimeras, F colonies did not regenerate their original pattern after homogenization at 2 to 3 days, producing only variegated bodies (Fig. 12B). Obviously, cells of the same clonal origin do not perceive their sisters as “strangers”, regardless of their (color) differentiation status, and, thus, they do not migrate to segregate the two colored variants.

Discussion

Prior to the advent of the DNA era, bacterial colonies were mostly viewed as epiphenomena or diagnostic tools revealing “true” performances taking place at cellular level, such as pathogenicity, biochemical processes, mutations or even life cycles (reviewed in ref. 16). For example, Mary I. Bunting in a series of papers on colony plasticity (so called “dissociation”) in *Serratia*⁵⁻⁸ seeks after trends going on *not* in colonies proper, but in suspensions that gave birth to such colonies. (For a review written as an epilogue of the whole period (see ref. 17).

Post-war bacterial genetics brought a somewhat higher status to bacterial bodies, especially after the discovery of true life cycles (e.g.,

Bacillus, *Caulobacter*), often encompassing multicellular stages with multiple cell types (e.g., *Myxobacteria*, *Streptomyces*, *Cyanobacteria*). Finally, multi-species consortia such as mats, plaques, stromatolites, etc., joined the company. A colony is no longer perceived as a heap of cells, which stick together only because they cannot disperse quickly enough. Finally, in the 1980s Shapiro¹⁸⁻²⁰ introduced multicellularity of colonies to common awareness.

The structure of multicellular bacterial bodies might simply reflect environmental differences—often transient—caused by metabolism of growing bacterial masses, such as nutrient limitation or accumulation of various metabolites in the medium, which has been the standard explanation in earlier works.^{21,22} Shapiro,^{14,19,20} on the other hand, takes the radial symmetry as one of the arguments suggesting developmental coordination of processes within the bacterial body (such as synchronous switching of transposons), i.e., *active* participation of cell assemblies in true morphogenetic processes. A plethora of colony shapes can also be acquired by treatment as simple as changing the density of agar support.¹¹ The recent studies of E. Ben Jacob and others go even further, proposing genuine semantical communication between bacteria comprising the colony.²³

Here we suggest viewing the development of multicellular bacterial bodies as a genuine counterpart of animal, plant or fungal ontogeny, i.e., production of multicellular bodies through intricate morphogenetic processes resulting from cell cooperation and communication that channel the development along species- or lineage-specific pathway (a “body plan”). We observed that bacteria can (i) produce multicellular bodies of limited size that adjust their development according to such parameters as layout of the inoculum, availability of unoccupied solid medium, or the presence of other bodies in the vicinity and (ii) distinguish between cells of identical and non-identical clonal origin upon co-cultivation. This suggests involvement of specific signals that are perceived in a context-dependent manner, similar to morphogenetic signals of multicellular eukaryotes.

“Embryology” of colonies. Bacteria in general (and our model *Serratia marcescens* in particular) are known to be inherently phenotypically plastic—minute variation in the environment changes the overall appearance of a multicellular body. Indeed, different colony phenotypes can be obtained in *S. marcescens* upon minor variation of media composition, including, e.g., variation in agar density—reviewed in refs. 24 and 25; and our unpublished data. However, here we focused on factors affecting the development of multicellular bodies under constant nutrient conditions on rich media, such as plating geometry and mutual interaction of bacterial bodies over short or long distance.

To our surprise, we found that our strain exhibits restricted growth, producing colonies whose size usually does not exceed the limit of 10–12 mm in diameter, while most strains described in the literature display unlimited growth of colonies, resulting in very big bodies.^{26,27} Also some other isolates of *S. marcescens* exhibit unlimited growth under the same conditions in our laboratory (not shown), indicating that the observed limitation is not due to exhaustion of the medium. It can be speculated whether such a limited growth does not result from domestication of a sort; domestication effects of laboratory life were described in bacteria¹⁵ as well as in yeast colonies.²⁸ From our point of view, finite growth further justifies the embryological analogy, with fully developed mature colonies as final,

“accomplished” stages of a genuine morphogenetic pathway, consummated and modified according to the parameters of the environment (a “morphospace” where geometry of the plating, chemical composition and its time course represent just some of multiple variables). Alternative developmental outcomes may then be viewed as different stages and/or endpoints of an endeavor towards such a final stage. In particular, three such alternatives deserve closer attention.

The first variant outcome is represented by small colonies that develop at densely populated plates, reaching their final appearance rapidly, which suggests an early quorum-based decision. Such colonies might be compared to “dormant” embryos, as frequently encountered in plants or some animals. Dormancy, however, can be overcome by discontinuing the supply of the quorum signal, e.g., by transfer to a fresh medium. At even higher plating densities, distinct colonies can no longer be established, and an unstructured lawn develops instead (not shown).

The quorum signal is unlikely to be constituted by a simple parameter such as concentration of nutrients in the medium or a signal molecule in the gas phase above it, since colonies apparently perceive *directional* information about the availability of unoccupied substrate, even if they do not attempt to expand onto it to a larger extent (see below). Studies on quorum signaling in *Serratia* revealed a plethora of specific chemical signals regulating the bacterial phenotype, such as, e.g., various acyl homoserine lactones. However, these phenomena were studied on bacteria grown in suspensions, i.e., the traits followed were biochemical.^{29,30} (Similarly, when Engelbert-Kulka et al.^{31,32} speak about the role of programmed cell death in multicellular bacterial bodies, they mean bacterial suspensions).

The decision between the pathway towards fully developed colonies and the “dormant” ones does not depend on the overall number of cells on a dish but on the amount of colony seeds (colony-forming units, CFU) that may be either unicellular or multicellular. Surprisingly, even large multicellular CFU containing millions of cells “respect” the quorum established by multiple unicellular initiating centers that make up only a negligible fraction of total cells present on the dish, thus further supporting the notion of specific signaling.

It is well documented (reviewed in refs. 14 and 33) that fully developed colonies can arise not only clonally from single cells, but also from a dense suspension, planted to a small area by dotting or dropping. Such a behavior reminds of “regulatory embryos” (like, e.g., those of mammals), which can start not only from a zygote but also from greater embryonic-cell masses or even chimaeras of different genetic backgrounds, or of regeneration of an anatomically complete plant from adventitious roots or shoots developing on a callus. However, establishing the colony body plan from such cell masses may be error-prone, as documented by occasional aberrant colonies. It also apparently takes some time before a colony from a multicellular inoculum acquires the ability to process environmental information, e.g., to monitor the presence of close neighbors. Thus, fully developed colonies form even in situations that soon lead to collision of growing bodies originated from closely planted large inocula.

Plating of a dense suspension to an area greater than the maximum colony size leads to another variant developmental outcome—confluent colonies—that may be understood as a tradeoff between several suboptimal options. The development cannot get canalized to dormant small colonies, because of lack of the necessary quorum

(too few CFU) and a vast area of free substrate. For the same reason, the population cannot grow wild towards an unstructured cell mass. At the beginning, the CFU interpret their situation as favorable for establishing fully developed colonies (low CFU density plus free substrate). In the prime of the morphogenetic process, however, their growth becomes intersected with that of their peers, but at this stage it is already too late to withdraw and channel the development toward the—perhaps more appropriate—alternative pathway towards small dormant colonies; moreover, free surrounding space would not allow for such a trajectory anyway. The solution is an attempt to share the formative activities of several nuclei, resulting in a modification of the colony pattern. It is worth noting that the stronger the founders, and the closer they are planted, the better is the symmetry preserved. We interpret these outcomes as cases of teleonomic morphogenesis whereof a single fully developed colony is a fully accomplished end-point.

Finally, planting of a dense suspension to an area exceeding the size of a developed colony results, over a range of cell suspension densities, in a macula—a body whose single hint to the mature pattern may be its elevated rim.

We interpret all the developmental outcomes discussed above as products of mutual cooperation of cells within the body, i.e., not only results of passive patterning due to some external forming forces (gradients of physical parameters and/or nutrients, limitation for space, or phenomena that could be described using metaphors like crystallization).

Effects of inoculum layout. Our observations suggest that colonies adjust their development according to the parameters of surrounding space. A decisive physical or chemical cue may be provided by free, unoccupied agar medium. Moreover, this cue is likely to be specific, since if such information were carried by absolute concentration of nutrients (or by dilution of an inhibitory signal molecule), it would be provided also by liquid broth replacing the agar, or even by agar removal in case of an inhibitor. However, it has to be noted that even simple small molecules including bulk metabolites may play the part of a specific signal if they are “understood” as such (e.g., ethylene as a plant signaling molecule, or ammonia governing the morphogenesis of yeast colonies⁹).

Multicellular communities obviously cannot arise in liquid media, as these do not provide structured environment with gradients of nutrients, information, and—later—support for the resulting bodies. Only a semi-solid support (e.g., agar) allows establishing (often transient) spatial structures that may mold more permanent multicellular bacterial bodies. A single colony on the dish may impose to its surroundings a steep gradient (of any compound), whose slope conveys information on extent of free space available to establish a big and well-structured colony. On the contrary, dense sowings may hinder formation of such steep gradients, resulting in the choice of the pathway towards small, unstructured “dormant” bodies. Such explanations, which may deserve a more formal treatment in terms of Turing-style reaction-diffusion models, may be adopted also for cases of more complex plating layouts such as e.g., sowings to an already occupied background.

Besides self-structuring, the growing bodies also influence the development of their neighbors, at least partly via signals propagated by the gas phase, similar to the case of yeast colonies.⁹ Searches for the “material basis” of structured gradients in the environment identified

multiple candidate factors in yeasts;³⁴ a similar outcome can be predicted also for bacteria, but remains to be proved experimentally.

A natural white variety derived from our pigmented *Serratia* strain allowed a deeper insight into the cell and body communication phenomena. Reddening of white colonies in the vicinity of a red streak suggests that the white clone retained its capacity to synthesize the pigment, but lost the ability to generate a releasing signal, thus developing the color only in the presence of signal(s) coming from outside. This feature is stable, as no signs of genetic assimilation^{35,36} were observed. Like the famous triton axolotl (*Ambystoma*), white colonies remain as if locked at a “larval” stage, never proceeding to the fully developed coloring. (An alternative explanation—transfer of the dye from neighboring red cells—is extremely unlikely since the color-inducing signal is airborne).

Genetic mutations, in particular those caused by transposable elements, or stable regulatory states, can also cause morphological changes in microbial colonies.^{14,15,19,33,37} A population of *E. coli* was found to generate three metabolically distinguishable forms, which persist, in constant proportions, through hundreds of generations, and which specialize for distinct metabolic tasks while “cross-feeding” the rest of the population.³⁸ Older authors also described such “differentiation-like” phenomena, showing that a suspension in its “optimal” phase produces colonies with greatest heterogeneity. Even for bacteria, true ontogeny where the developing body decides for alternative developmental trajectories towards different endpoints has been proposed in older works,^{16,39,40} opening the space for recognition and analysis of phenomena such as developmental plasticity or reaction norm of the strain. Indeed, we are inclined towards such an explanation of our results.

According to M. Barbieri,⁴¹ ontogeny represents a build-up of new information by re-iterating inputs from both genome and environment in an “organic memory”, which is virtually “empty” at the beginning of development. Elaborated embryonic and organogenic processes in multicellular eukaryotes are highly dependent on genetic regulatory networks (reviewed in ref. 42). Since the complexity of such possible networks in bacteria is far lower than that found in eukaryotes, it can be speculated that in bacteria the memory is more emancipated (less “hard-wired” into the genome).

Self/non-self recognition. We used the availability of two stable colored lines of our strain to investigate the behavior of bacterial bodies towards populations of the same species but different clonal origin. To our surprise, mixed suspensions attempted, more or less successfully, to segregate the two constituent clones into separate populations. Regeneration experiments confirmed that segregation is due to cell migration and not phenotypic switching or selective cell death. The ability of bacteria to travel long distance just to be able to reestablish zones of their own kin is an unexpected finding, and resembles a similar incompatibility observed in embryonic cells in cultures (a mixture of, e.g., ectoderm and mesoderm cells segregates in a similar manner). Moreover, it suggests that the ability to recognize “self” (i.e., cells of the same clone) from non-self (cells of related but distinct clonal origins), that has been even suggested as one of the criteria for assessing intelligence of a biological system,⁴³ may be characteristic not only for multicellular animals or plants, but also for bacteria—and, indeed, possibly for all forms of life. The capacity for intraspecific self/non-self recognition may present one of the ancestral and fundamental features of living beings.

We believe that our observations document the existence of surprisingly sophisticated communicative potential within and between bacterial colonies that presents a challenge both for experimental and theoretical biologists. One possible pathway of future investigation obviously leads towards identification of the signaling compounds and molecular mechanisms involved. Theoretical (mathematical) models of colony development also should be able to incorporate or predict the observed colony/space interaction phenomena.

Materials and Methods

Strain and media. The strain *S. marcescens* CNCTS 5965 was obtained from the Czech National Institute of Health, and maintained in nutrient broth No. 2 (Imuna Pharm, ZB No. 2, containing 5 g beef extract, 5 g peptone, 6.25 g nutrient base No. 1, 6.25 nutrient base No. 2, 2.5 g NaCl per litre) with 15% glycerol at -80°C. Upon reviving from the frozen stock, the bacteria were colony-purified twice and their colony phenotype was verified prior to subsequent experiments.

Bacteria were grown under standard conditions comprising 9 cm dishes with a 4% nutrient broth with nutrient agar No. 2 (Imuna Pharm ZA No. 2, i.e., ZB No. 2 with 1.5% agar), complemented with 0.5% glucose unless stated otherwise. For liquid cultures, nutrient broth No. 2 was also used.

Inoculation procedures. All manipulations were performed in a laminar flow box, at room temperature. Cell suspensions for plating were prepared in PBS (22 mM KH₂PO₄, 50 mM Na₂HPO₄, 8.6 mM NaCl, 18.7 mM NH₄Cl; pH 7.4) from agar-grown mature but less than 3 weeks old bacterial bodies. Cell density of suspensions was adjusted according to optical density at 450 nm, calibrated by plating serial dilutions.

Methods of application to the agar surface were as follows:

(1) Sowing (standard procedure, used unless specified otherwise): 100 µl of an adequately diluted bacterial suspension was spread over the whole surface of the 9 cm dish. Proportionally smaller volumes were applied if sowing to a smaller area (e.g., 40 µl to a 6 cm dish).

(2) Dropping: a dense suspension was applied as a small drop (ca 1 µl) within a diameter of about 2 mm.

(3) Dotting: Small amount of material was picked from a bacterial body using a sterile needle and transferred to a fresh surface.

(4) Smear: 30 µl of bacterial suspension (approx. 10⁸ cells) was applied to a line of approx. 5 cm.

In all cases, the suspensions soaked into agar within 2–3 min. Dishes were kept at 27°C for 2 days, and maintained at room temperature (ca 22°C) in closed but not sealed boxes containing a damp sponge to maintain humidity, wrapped in cloth to prevent insect infestation.

Documentation. Cultures were photographed using an Olympus digital camera under ambient light (except Fig. 12B that has been taken under artificial illumination with the aid of an Olympus dissecting microscope); black background was used for visualizing white colonies in some cases. Colony size measurements have been performed on the digital photographs, either manually or with the aid of the ImageJ 1.32i software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

All experiments were done repeatedly; figures shown were selected from an extensive collection of primary photos. Corel Photo Paint was used to assemble the plates but no image enhancement was performed.

Acknowledgements

This work was supported by the projects GACR 408/08/0796 and MSM 0021620845 to Anton Markoš, Anna Blahůšková and Zdeněk Neubauer, and MSM 0021620858 to Fatima Cvrčková. We thank Alexander Nemeč for providing the bacterial strain and Vladimír Vondřejš for critical reading of the manuscript. The authors declare that they have no financial interests in the outcome of this work, nor they are aware of any conflict of interests.

References

- Ben-Jacob E, Levine H. Self-engineering capabilities of bacteria. *J R Soc Interface* 2005; 3:197-214.
- Cohen I, Ron IG, Ben-Jacob E. From branching to nebula patterning during colonial development of the *Paenibacillus alvei* bacteria. *Physica A* 2000; 286:321-36.
- Di Franco C, Beccari E, Santini T, Pisaneschi G, Tecce G. Colony shape as a genetic trait in the pattern-forming *Bacillus mycoides*. *BMC Microbiology* 2002; 2:33.
- Pipe LZ, Grimson MJ. Spatial-temporal modelling of bacterial colony growth on solid media. *Molecular BioSystems* 2008; 4:192-8.
- Bunting MI. A description of some color variants produced by *Serratia marcescens*, strain 274. *J Bacteriol* 1940; 40:57-68.
- Bunting MI. The production of stable populations of color variants of *Serratia marcescens* #274 in rapidly growing cultures. *J Bacteriol* 1940; 40:69-81.
- Bunting MI, Ingraham LJ. The distribution of color variants in ageing broth cultures of *Serratia marcescens* #274. *J Bacteriol* 1942; 43:585-91.
- Bunting MI. Factors affecting the distribution of color variants in ageing broth cultures of *Serratia marcescens* #274. *J Bacteriol* 1942; 43:593-606.
- Palková Z, Devaux F, Řiřicová M, Mináriková L, Le Crom S, Jacq C. Ammonia pulses and metabolic oscillations guide yeast colony development. *Mol Biol Cell* 2002; 13:3901-14.
- Palková Z, Váchová L. Ammonia signaling in yeast colony formation. *Intl Rev Cytology* 2003; 225:229-72.
- Matsushita M. Formation of colony patterns by a bacterial cell population. In: Dworkin J, Shapiro JA, eds. *Bacteria as multicellular organisms*. Oxford, UK: Oxford University Press, 1997; 366-93.
- Li B, Wang J, Wang B, Liu W, Wu Z. Computer simulations of bacterial-colony formation. *Europhys Lett* 1995; 30:239-43.
- Wakano JY, et al. Self-organized pattern formation of a bacteria colony modeled by a reaction diffusion system and nucleation theory. *Phys Rev Lett* 2003; 25:258102-4.
- Shapiro JA. Multicellularity: The rule, not the exception. Lessons from *E. coli* colonies. In: Dworkin M, Shapiro JA, eds. *Bacteria as Multicellular Organisms*. Oxford UP 1997; 14-49.
- Aguilar C, Vlamakis H, Losick R, Kolter R. Thinking about *Bacillus subtilis* as a multicellular organism. *Curr Opin Microbiol* 2007; 10:638-43.
- Hadley P. Further advances in the study of microbial dissociation. *J Infect Dis* 1937; 60:129-92.
- Braun W. Dissociation in *Brucella abortus*: a demonstration of the role of inherent and environmental factors in bacterial variation. *J Bacteriol* 1946; 52:243-9.
- Shapiro JA. Bacteria as multicellular organisms. *Sci Am* 1988; 256:62-9.
- Shapiro JA. Thinking about bacterial populations as multicellular organism. *Ann Rev Microbiol* 1998; 52:81-104.
- Shapiro JA. Bacteria are small but not stupid: cognition, natural genetic engineering and socio-bacteriology. *Stud Hist Phil Biol Biomed Sci* 2007; 38:807-19.
- Ben-Jacob E, Shmueli H, Schochet O, Tenenbaum A. Adaptive self-organization during growth of bacterial colonies. *Physica* 1992; 187:378-424.
- Ben-Jacob E, Schochet O, Tenenbaum A, Cohen I, Czirok A, Vicsek T. Generic modeling of cooperative growth patterns in bacterial colonies. *Nature* 1994; 368:46-9.
- Ben-Jacob E, Becker I, Shapira Y, Levine H. Bacterial linguistic communication and social intelligence. *Trends Microbiol* 2004; 12:366-72.
- Lacasta AM, Cantalapiedra IR, Auguet CE, Penaranda A, Ramirez-Piscina L. Modeling of spatiotemporal patterns in bacterial colonies. *Phys Rev E* 1999; 59:7036-41.
- Giri AV, Anandkumar N, Muthukumar G, Penathur G. A novel medium for the enhanced cell growth and production of prodigiosin from *Serratia marcescens* isolated from soil. *BMC Microbiology* 2004; 4:11.
- Wimpenny JW. The growth and form of bacterial colonies. *J Gen Microbiol* 1979; 114:483-6.
- Wimpenny J. Spatial gradients in microbial ecosystems. In: Guerrero R, Pedros-Alio C, eds. *Trends in Microbial Ecology*. Spanish Soc Microbiol 1993; 135-40.
- Kuthan M, Devaux F, Janderová B, Slaninová I, Jacq C, Palková Z. Domestication of wild *Saccharomyces cerevisiae* is accompanied by changes in gene expression and colony morphology. *Mol Microbiol* 2003; 47:745-54.
- Labbate M, Queck SY, Koh SK, Rice SA, Givskov M, Kjelleberg S. Quorum sensing-controlled biofilm development in *Serratia liquefaciens* MG1. *J Bacteriol* 2004; 186:692-8.
- Van Houdt R, Givskov M, Michiels CV. Quorum sensing in *Serratia*. *FEMS Microbiol Rev* 2007; 31:407-24.

31. Engelberg-Kulka H, Amitai S, Kolodkin-Gal I, Hazan R. Bacterial programmed cell death and multicellular behavior of bacteria. *PLoS Genetics* 2006; 10:1518-26.
32. Kolodkin-Gal I, et al. A linear pentapeptide is a quorum-sensing factor required for *mazEF*-mediated cell death in *Escherichia coli*. *Science* 2007; 318:652-55.
33. Shapiro JA. A role for the Clp protease in activating Mu-mediated DNA rearrangements. *J Bacteriol* 1993; 175:2625-31.
34. Zikánová B, Kuthan M, Řiřicová M, Forstová J, Palková Z. Amino acids control ammonia pulses in yeast colonies. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 294:962-7.
35. Waddington CH. Genetic assimilation. *Adv Genet* 1961; 10:257-90.
36. Waddington CH. The evolution of adaptations. *Endeavour* 1953; 12:134-9.
37. Siguier P, Filé J, Chandler M. Insertion sequences in prokaryotic genomes. *Curr Opin Microbiol* 2006; 9:526-31.
38. Rosenzweig RF, Adams J. Microbial adaptation to a changeable environment: Cell-cell interactions mediate physiological and genetic differentiation. *BioEssays* 1994; 16:715-7.
39. Braun W. Bacterial dissociation. *Bacteriol Rev* 1947; 11:75-14.
40. Mellon RR. The polyphasic potencies of the bacterial cell; general biologic and chemotherapeutic significance. *J Bacteriol* 1942; 46.
41. Barbieri M. *The organic codes. The birth of semantic biology*, Cambridge, UK: Cambridge University Press, 2003.
42. Davidson EH. *Genomic regulatory systems*. Dev Evol AP 2001.
43. Trewavas A. Plant intelligence. *Naturwissenschaften* 2005; 92:401-13.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Developmental plasticity of bacterial colonies and consortia in germ-free and gnotobiotic settings

Irena Pátková, Jaroslav J Čepl, Tomáš Rieger, Anna Blahůšková, Zdeněk Neubauer and Anton Markoš*

Abstract

Background: Bacteria grown on semi-solid media can build two types of multicellular structures, depending on the circumstances. Bodies (colonies) arise when a single clone is grown axenically (germ-free), whereas multispecies chimeric consortia contain monoclonal microcolonies of participants. Growth of an axenic colony, mutual interactions of colonies, and negotiation of the morphospace in consortial ecosystems are results of intricate regulatory and metabolic networks. Multicellular structures developed by *Serratia* sp. are characteristically shaped and colored, forming patterns that reflect their growth conditions (in particular medium composition and the presence of other bacteria).

Results: Building on our previous work, we developed a model system for studying ontogeny of multicellular bacterial structures formed by five *Serratia* sp. morphotypes of two species grown in either "germ-free" or "gnotobiotic" settings (i. e. in the presence of bacteria of other conspecific morphotype, other *Serratia* species, or *E. coli*). Monoclonal bodies show regular and reproducible macroscopic appearance of the colony, as well as microscopic pattern of its growing margin. Standard development can be modified in a characteristic and reproducible manner in close vicinity of other bacterial structures (or in the presence of their products). Encounters of colonies with neighbors of a different morphotype or species reveal relationships of dominance, cooperation, or submission; multiple interactions can be summarized in "rock – paper – scissors" network of interrelationships. Chimerical (mixed) plantings consisting of two morphotypes usually produced a "consortium" whose structure is consistent with the model derived from interaction patterns observed in colonies.

Conclusions: Our results suggest that development of a bacterial colony can be considered analogous to embryogenesis in animals, plants, or fungi: to proceed, early stages require thorough insulation from the rest of the biosphere. Only later, the newly developing body gets connected to the ecological interactions in the biosphere. Mixed "anlagen" cannot accomplish the first, germ-free phase of development; hence, they will result in the consortium of small colonies. To map early development and subsequent interactions with the rest of the biospheric web, simplified gnotobiotic systems described here may turn to be of general use, complementing similar studies on developing multicellular eukaryots under germ-free or gnotobiotic conditions.

Keywords: Ontogeny of bacteria, Germ-free and gnotobiotic colonies, Interactions of colonies and/or chimeras, *Serratia* sp., Scouting, Rock-paper-scissors

Background

All living beings find themselves embedded in a complicated and fluid network of ecological (symbiotic) interdependencies. Ontogeny, i.e. buildup of a multicellular, species-specific body, may represent an exception: early stages of embryonic development typically require massive shielding against the influences of biospheric web. Thus, animals and plants go to great pains to ensure

sterile conditions for their embryos; even fungi, champions of web-dwelling who spend most of their life without apparent body patterning, produce a special, protected cocoon ("embryo") whenever they decide to produce fruiting bodies – mushrooms typical of their kin. Bacteria, typical dwellers of multi-species consortia, are allowed to build such species-specific bodies only at rare occasions when they can claim suitable germ-free environment (like freshly ruptured fruits, loafs of bread, surface of milk, etc.). Only then we can admire their creativity in building macroscopic, species-specific bodies

* Correspondence: markos@natur.cuni.cz
Department of philosophy and history of Science, Faculty of Science, Charles University in Prague, Viničná 7, Praha 2, Czechia12844

(colonies). Bacterial axenic, i.e. germ-free growth on solid media reveals many paraphernalia of their ontogenetic potential (e.g., [1-5]).

Subsequent coupling of the developing embryo to the biospheric web often requires a thorough coordination. For example, all animals populate their bowels with a microbiome consisting of hundreds of microbial species (e.g., [6]). Some animals even require such cooperation for their proper organogenesis; as in the squid-*Vibrio* interplay in the development of light organ [7], or in mycetome of insects [8]. In plants, mycorrhiza or legume-*Rhizobium* symbioses [9,10] belong among paradigmatic examples. To disentangle such complicated interactions, development under germ-free or gnotobiotic conditions (involving two or at most a small number of interacting species) is often of a great help. Similarly, a “gnotobiotic” state, i.e. controlled development of bacterial colony in the presence of other bacterial bodies, may reveal rules and factors of cross-species interactions that otherwise remain obscured by their usual – consortial – way of life.

Bacterial colonies offer another advantage: Whereas most “typical” multicellular organisms steer their development towards a body capable of reproduction, for most bacteria building a multicellular body is not *the* precondition for maintaining the lineage. If, in spite of the fact, they do not end in topsy-turvy assemblages of cells, structured multicellular bodies must help somehow in marking out and holding their spatial and temporal claims. Hence, whenever freed from the grip of ecological demands in the consortium, they orient their full creative potential towards a single multicellular body.

Putting such bodies into contact with similar bodies – of siblings, of other strains or other species – may reveal some basic rules of bacterial interactions that are valid not only for such gnotobiotic situation on the dish, but also in natural consortia. In a similar way, chimeric “colonies” started by a mixture of different bacterial lineages, may shed light to “colonizing processes” that take place in incomparably more structured, multispecies ecosystems intangible experimentally. Such an approach may be more informative than is the usual study of growing homogenous suspension cultures. In fact, trends towards developing multicellular structured bodies (colonies, films, coatings, flocs, etc..) fail *only* in well-mixed suspension cultures: it seems that the planktonic way of living is rather an extreme, an exception from usual life strategies of most bacteria (e.g. [11]). Yet, most information concerning bacterial communication comes from suspension cultures i.e. unstructured mass (e.g. [12,13] for quorum sensing; [14] for signaling via antibiotics); but see works on intricate networks of quorum regulations in *Serratia* biofilms [15-17]. “Morphogenetic” data on colonies were mostly obtained under stress conditions (as is the presence of antibiotics, phages, etc.), and

the goal of such experiments was primarily diagnostical, not aimed to study developmental processes as such. Many authors therefore consider results obtained from suspensions to be more representative, more “true” than those obtained on bacterial bodies.

In contrast, in this paper we focused on revealing steps towards a simple ecology on the Petri dish: how multicellular bacterial structures (colonies or chimeras) feel the self and the nonself, and how they react to the presence of the others. We draw from earlier works on bacterial colonies [4,5,18,19], but above all from our previous studies on developing *Serratia* colonies [3,20]. Thanks to color and plastic patterning, their development is easy to follow, without a need of artificial molecular or genetic markers. Moreover, our morphotypes show a finite colony growth, i.e. the whole development takes place in a limited area, and the markers of youth, prime, and senescence are readily apparent. Due to relative “simplicity” of their “embryogenesis”, colonies offer insights into strategy of establishing morphogenetic fields, evaluating the quality and amount of space available, and reacting to bodies occurring in the immediate neighborhood – both conspecific (i.e. in axenic cultures) or heterospecific/heterotypic (i.e. under gnotobiotic settings).

We further utilized a gnotobiotic approach in the study of bacterial consortia. We believe that simple chimeric communities, such as those developed in the present work, will provide a pathway towards understanding behavior of the utmost important ecosystems on the Earth – those of the prokaryotes (e.g. [21]).

We designed our study with the assumption that bacterial way of life is primarily multicellular [22]: they form a body that comes to existence through a sequence of elaborated, species-specific morphogenetic processes, in a given environment. (It means that we shall not consider such phenomena as flocculation, even if we admit that even such aggregates may bring a selective advantage in comparison to planktonic way of life; see, e.g., [23,24]). Depending on initial setting, bacteria can develop two kinds of multicellular existence: (1) Axenic, “germ-free” clonal growth from one cell or from a group of cells of the same kin, leading to a colony or a swarm (often with a fruiting body). Such colonies then command a plethora of strategies how to implement their fitness towards neighboring bodies. (2) When the conditions do not allow an axenic start, due either to simple crowding, or to the presence of competing clones and species, the body-building strategy will change towards small colonies in close contact that establish consortia elaborately interconnected with other dwellers of the community (e.g. stromatolites, plaques, or mats; [25,26]). An interesting phenomenon occurs when the edge of such a chimera grows into free substrate: often it will radiate rungs of monoclonal material; this phenomenon

is apparent even if the chimerical body contains close relatives [3,27,28].

Results

“Standard” development of solitary colony morphotypes

For our study, we selected two mutually related stable morphotypes of *Serratia rubidaea* (R and W) and three morphotypes of *S. marcescens* (F, Fw, and M). A common laboratory strain of *E. coli* was included in some gnotobiological experiments.

Figure 1 shows the typical adult appearances of all morphotypes growing as single bodies on NAG substrate (nutrition agar with added 27 mM glucose, 27°C), with the time-course of colony margin development shown at higher resolution (for corresponding macroscopic appearance of developing colonies see Figure 2a). *Serratia rubidaea* colonies (Figure 1a), sown at a mutual distance of minimally 20 mm, grow as smooth, glossy, radially symmetrical red colonies (R) that frequently give rise to a stable colorless variant W (white). Our *S. marcescens* strain gives, on the same medium, a stable, rimmed morphotype F (“fountain”) that also produced a stable white variant, Fw (Figure 1b, see also [20]). Except of color, the behavior of white variants W and Fw were interchangeable with their colored parents, R and F, respectively; that

gave us advantages in further experiments involving colony interactions.

The fifth clone, M, was selected upon long-term cultivation of the F morphotype on liquid minimal medium (MM). On the rich medium NAG (or NA) it produces white optically undifferentiated, rimless colonies (Figure 1b). Finally, the appearance of our strain of *Escherichia coli* is shown in Figure 1c.

As to the microscopic features, the macroscopically smooth R (or W) colonies (*S. rubidaea*) develop terraced-like layers of cells at the margin, as if the growth proceeded in waves of juxtaposed plies. The lowermost, and the quickest layer, however, has no clear-cut edge, and dispatches cohorts of freely moving cells (“scouts”) into the space beyond; the main body of the colony will grow into the area previously “investigated” by the scouts. With the arrest of growth in adult colonies, the scouting decreases and finally ceases (Figure 1a). In contrast, the rimmed F (or Fw) colonies of *S. marcescens* start with a fluffy verge, replaced by an edge of more solid appearance on day 3; terraces do not appear (Figure 1b). Again, from day 3 on, flocks of scouts travel beyond the edge into the free space around, to subside with maturation and cessation of growth. The adult M morphotype of *S. marcescens* (Figure 1b) differs from its parent (F) by a sharp margin, and delayed scouting (after day 5). Finally,

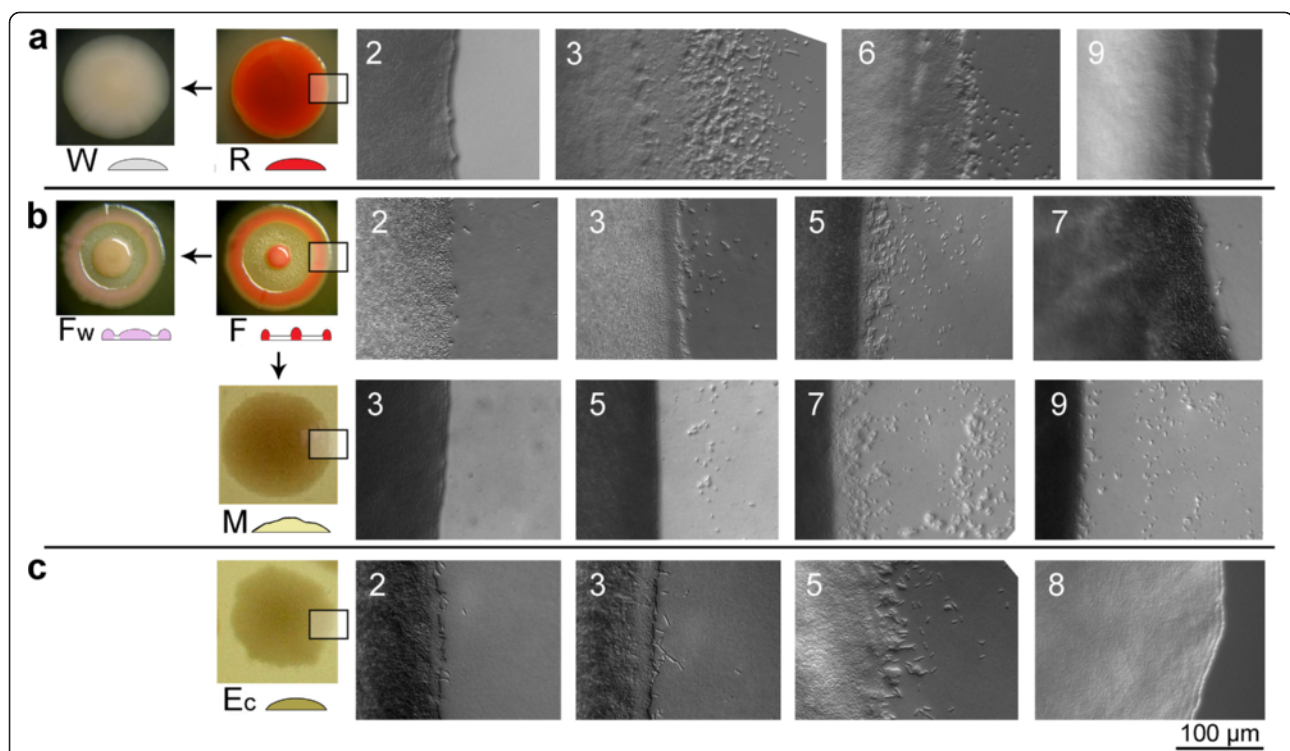


Figure 1 Single colony morphotypes, on NAG medium. **a** *S. rubidaea* R and W forms; **b** *S. marcescens* F, Fw, and M forms; and **c** *E. coli*. Left: colony appearance at maturity (7–9 days), with schemes of colony cross-sections. All *Serratia* colonies show terminate growth: final diameter is about 15 mm in F, Fw, and M, 20 mm in R and W. Right: development of colony margins at days indicated (free agar is at the right).

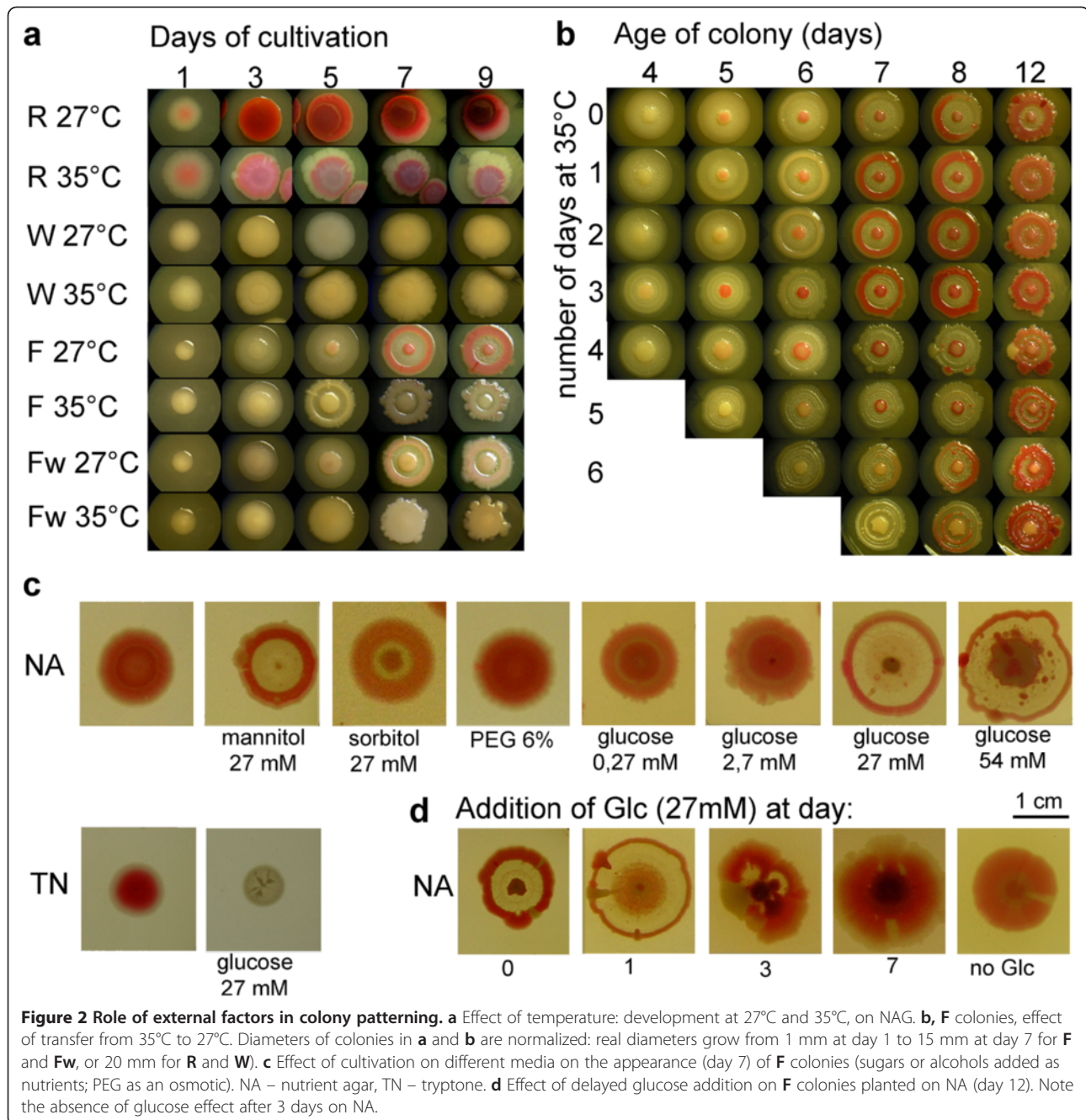


Figure 1c shows development of an *E. coli* colony under identical conditions; colonies of this species also develop terraces on the margin, and send out scouts during vigorous colony growth.

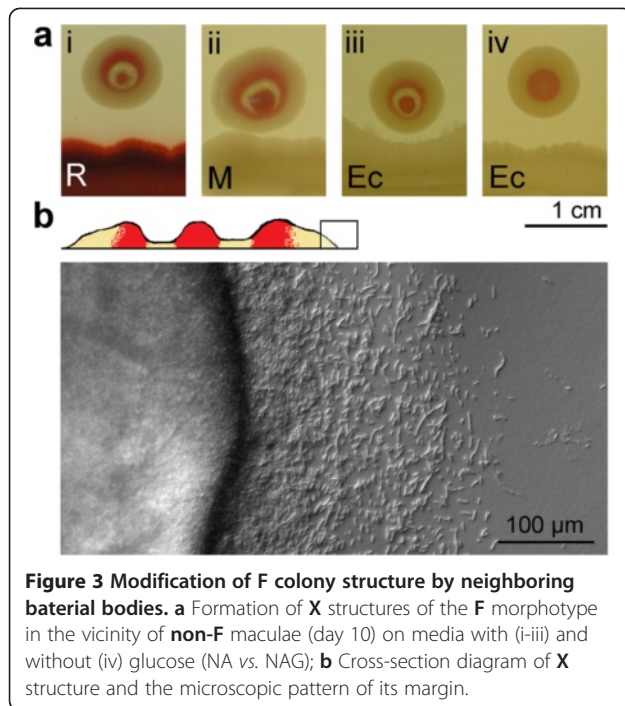
Developmental plasticity induced by varying culture conditions

It is important to stress that given morphotypes develop towards phenotypes described in Figure 1 only under strictly defined culture conditions (the extreme sensitivity of colony structure to cultivation protocols in *Bacillus* see

also [1,29], in *S. cerevisiae* [30]). Different media and/or conditions will lead to different patterning (see below); we have investigated the effects of temperature and manipulations with media composition in more detail. Similarly, the presence of colonies of either *S. rubidaea* or *E. coli* in the vicinity leads to a switch of the **F** morphotype into a new structure (called below **X**, see Figure 3).

Effect of temperature

R, **W**, **F**, and **Fw** morphotypes were planted on NAG at three different temperatures: 27°C (standard development),



6°C, and 35°C. As expected, at low temperature the bacteria did not grow, albeit they survived for long periods and upon transfer to permissive conditions (27°C) resumed standard growth, after some lag (data not shown).

Cultivation at 35°C (Figure 2a) did not affect the final colony size, yet early phases of growth proceeded faster, and the colony patterning frequently deviated from the typical symmetry (especially in F, Fw); moreover, the coloration was lacking (F) or disrupted (R). Hence, higher temperature somewhat interfered with morphogenetic events. As shown in Figure 2b, the effect is, in F morphotype, fully reversible up to about the 3rd day of cultivation at elevated temperature; older colonies transferred to 27°C did not attain the standard colony form in spite of striving towards it, as testified by the onset of coloration. Such a critical time threshold in 3rd day is apparent also in connection with the effect of added glucose (see below, Figure 2d).

Effect of media

The standard appearance of the F phenotype (Figure 1b) was described for colonies grown on nutrient agar NA supplemented with 27 mM glucose (NAG). Replacement of glucose by sorbitol or mannitol at the same concentration allows for a “partial” F pattern. Lower glucose concentrations (0.27 or 2.7 mM) do not support standard patterning; higher concentration (54 mM) deforms the final pattern. Semi-defined medium of comparable composition (TN, or TN with added glucose) supports healthy growth of well-formed colonies, albeit with a patterning different from the phenotype grown on NAG.

Finally, polyethylene glycol (PEG) added to NA in amount mimicking the osmotic load caused by 27 mM glucose did not promote the standard development (Figure 2c).

Effect of glucose addition during development

At various times after planting on NA, F colonies were “circumscribed” with glucose solution, to achieve its concentration, in the agar, in the range of about 27 mM in the immediate vicinity of the colony. As shown in Figure 2d, the older the colony, the more difficult for it to accomplish the standard appearance after glucose addition: after the 3rd day the “struggle towards form” became distorted, and the inner (intermediate) ring did not appear at all (even if under normal condition it grows until 5th day; see [3]).

All these effects of culture conditions are fully reversible in the sense that cell material taken from “atypical” colonies reverts to standard appearance when planted to NAG; thus, we are dealing with true developmental plasticity rather than selection of variants.

Morphotype F: development in the presence of neighbors

As already reported, F colonies are very sensitive towards neighboring bodies on the dish. Closely planted F (or Fw, or F and Fw) colonies grow into a confluent colony with multiple centers and a common rim. An F macula will inhibit normal growth and patterning of F (or Fw) colonies growing in their vicinity, even when planted across a mechanical septum. Finally, heterospecific bodies (colonies or maculae of *S. rubidaea* or *E. coli*) were shown to induce formation of a new quality, a special pattern named X structure, characterized by an additional ring round the standard F colony [3,20].

Here we investigated the formation of X bodies in a closer detail (Figure 3; see also Figure 6a). First, we found that even the M clone (i.e. the rimless derivative of F) can induce the X structure in F. We also found that, in contrast to standard development, there is no critical period of induction: the X structure will appear also on an older, or even adult and non-growing F colony, if a non-F body is planted nearby. The characteristic patterning of the X structure is apparent also at the microscopic level, revealing a margin (devoid of terraces) and scouting pattern somewhat different from typical F (where scouting recedes by the time of maturation; compare Figure 1a and Figure 3b). It is remarkable (in the context of results discussed below), that the margin pattern is identical around the whole perimeter of the X structure (even if the structure macroscopically, as well as microscopically first appears on the site adjacent to the neighbor). Like in the previous cases, the transformation is developmental (i.e. not genetic), as the cell material taken from X will

give, upon planting under standard conditions, rise to a typical **F** (or **Fw**) colony.

The induction of an **X** structure takes place also on NA (i.e. without glucose, Figure 3a, iv): it follows that the **F** morphotype can react by an **X** buildup regardless of its actual phenotype at the time of induction. The effect is exerted also when **F** is planted to the substrate previously conditioned by growth of any **non-F** body (not shown). Hence, the colony is receptive to the “make **X**” order under a great many of initial conditions and the **X**-inducing signal persists in the agar substrate.

Growth on minimal medium

On rich medium such as NAG we observe exigent structures and coloration in both *S. rubidaea* and *S. marcescens*; it was of interest to what extent, if at all, such patterns would develop on the minimal medium agar (MMA). **R** and **W** morphotypes (colonies or maculae), as well as our strain of *E. coli*, grow readily on MMA, yielding, however, only white (occasionally faint pink in case of **R**), concentric colonies that do not allow distinguishing a given morphotype by its appearance (see Figure 11b). Moreover, of great interest is the *absence of scouts* and the *absence of marginal cascades* (Figure 4) in all types or developmental stages of growing bodies interacting with their neighbors (see below). Morphotypes **F** or **Fw** of *S. marcescens* do not grow on MMA, although they survive on it for weeks as an unstructured smear, and upon transfer to NAG commence growth towards standard **F** or **Fw** patterns. Only after prolonged efforts to habituate **F** cells in *liquid* minimal medium (MM), we succeeded to obtain a new stable morphotype, **M**, that gives white colonies on MMA; on NAG it grows towards smooth white colonies with elevated center (Figure 1b). What is important, **F** colonies behave towards the **M** macula as if it were **non-F**

material: **M** induces **X** structure in **F** when grown on NAG (Figure 3a, ii.).

Unexpectedly, however, the **F** morphotype is also able to grow on MMA when a “helper” in the form of a **non-F** body grows nearby (Figure 4): in such a case, it gives rise to small, smooth, white colonies that do not produce scouts or **X** structures.

The adjacent edges of **non-F** macula and **F** colony, whether growing or not, appear sharp, and dispatch no scouts (Figure 4; compare below to Figures 5-8). There is also a difference in colony yield: An inoculum giving 50–100 colonies/cm² on the NAG substrate, will give rise, on MMA, to only 5–10 colonies/cm², and only at a distance of about 2 cm from the helper colony (Figure 4d).

Even old (10–14 days), non-growing, persisting **F** plants can be boosted to grow on MMA when a **non-F** macula (including also **M**) is added to the dish, or even when planted to a macula-conditioned agar (not shown). Cells taken from such boosted **F** colonies will not gain any (even transient) ability to grow independently on MMA; when planed to NAG, however, they give rise to normal **F** pattern.

Thus, the **F** morphotype might be dependent on some essential nutrient or signal present in NAG but not MMA; such a trigger diffusible in agar may be provided by the growing macula (non-growing **F** “macula”, i.e. a mass of non-growing **F** cells applied to the dish, having no effect), and survives in the medium for longer periods. Preliminary results (not shown) suggest that the case may not reside in basic nutrients. First, the *E. coli* 15 TAU strain (auxotrophic for arginine-thymine-uracil) does not grow on MMA even in the presence of helpers, or on a conditioned agar (it also cannot serve as a helper when, as in case of **F** above, a mass of non-growing cells is applied to the vicinity of **F**, on MMA). Second, the **F** morphotype will not resume growth on the MMA even

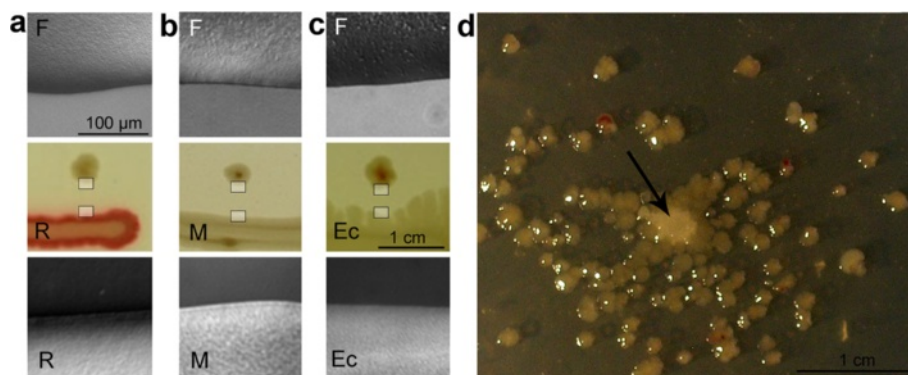


Figure 4 Induction of growth of **F** colonies on minimal medium (MMA) by maculae: **a** **R** macula; **b** **M** macula; **c** *E. coli* macula. (Day 7) Middle row: macroscopic appearance, top and bottom row – magnified details (see inserts the macroscopic structure). Note the smooth, non-interactive edges without scouts. **d** Helper colony of *E. coli* (arrow) in center of dense sowing of **F**. (Day 7). Bars: 1 cm in all macro-, 100 μm in all micro-photographs.

if the substrate is supplemented with casamino acids (caseine hydrolysate with cysteine and tryptophan added).

Mutual influencing of colony habitus

The ability of the F morphotype to develop towards a new pattern in the presence of heterotypic (i.e. non-F), neighbors instigated us to take a deeper look on the mutual interaction of our standard colony types.

Homotypic interactions R:R and F:F

Figure 5 shows the simplest configurations of two colonies of the same morphotype planted to close vicinity. Such colonies may come to a contact and even, in case of F, merge into a confluent colony; when planted further apart, they remain separated, albeit shape deformations occurred frequently (Figure 5a). The common feature of two approaching colonies is the presence of *scouting* bacteria beyond both adjacent (and approaching) colony edges – even in older colonies (10 days), when no such “freelancers” are observable in solitary colonies of comparable age (Figure 5 i-iv; compare to Figure 1a, b). In contrast, the distal side of an interacting colony showed no difference from the solitaires, i.e. no restoration of scouting occurred (not shown). Planting a young R colony to the vicinity of an old one (R, 3 weeks) aroused a new wave of scouting towards the new neighbor, in the old colony (not shown). The phenomenon

is thus distinct from the induction of an X structure, where scouting reappears around the whole perimeter of the colony, accompanied by profound reshaping of the colony phenotype.

Heterospecific interactions: R and Fw

As expected, an R colony planted at a distance not allowing immediate overgrowth of its Fw neighbor (10 mm, Figure 6a) will induce formation of the X structure, which will resist any contact: both colonies persist as separate entities (as in Figure 3), with a typical colony pattern and scouting in the interaction zone.

Figure 6b summarizes situations when young (0–24 h, showing no typical structures) Fw colonies come into close contacts with a plant of R. The Fw colony will always be overgrown by R planted on its outer perimeter. The Fw material, however, maintains its identity in such a conjoint body, and its territory remains free of R cells. Note, in older colony, even an inclination towards the X structure – however it is belated and not able to avoid overgrowth by the neighbor.

Planting R to the inner perimeter of young Fw gives essentially the same picture: the R material breaks free and encircles the Fw if planting had occurred during the first hours of Fw development. After one day, however, the R material cannot “escape” any more, remains confined

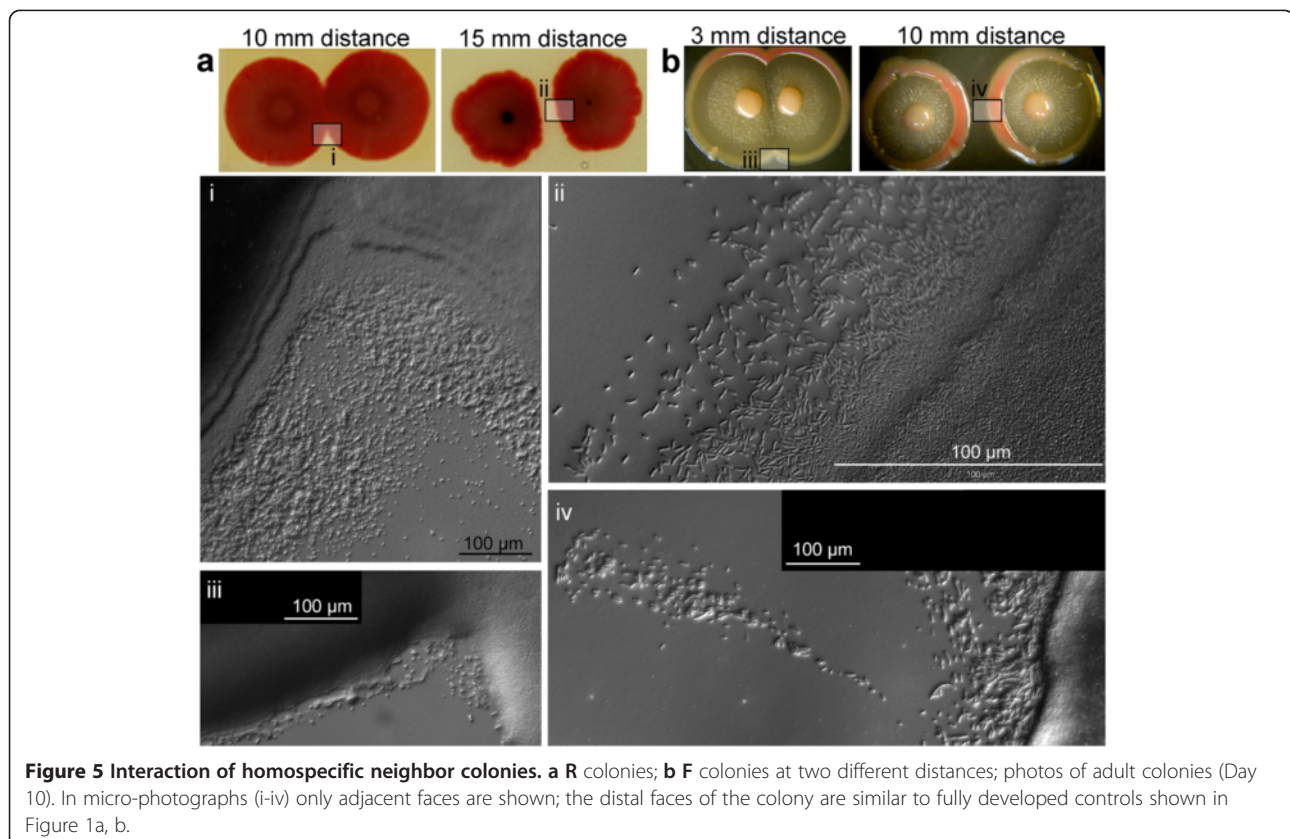


Figure 5 Interaction of homospecific neighbor colonies. **a** R colonies; **b** F colonies at two different distances; photos of adult colonies (Day 10). In micro-photographs (i-iv) only adjacent faces are shown; the distal faces of the colony are similar to fully developed controls shown in Figure 1a, b.

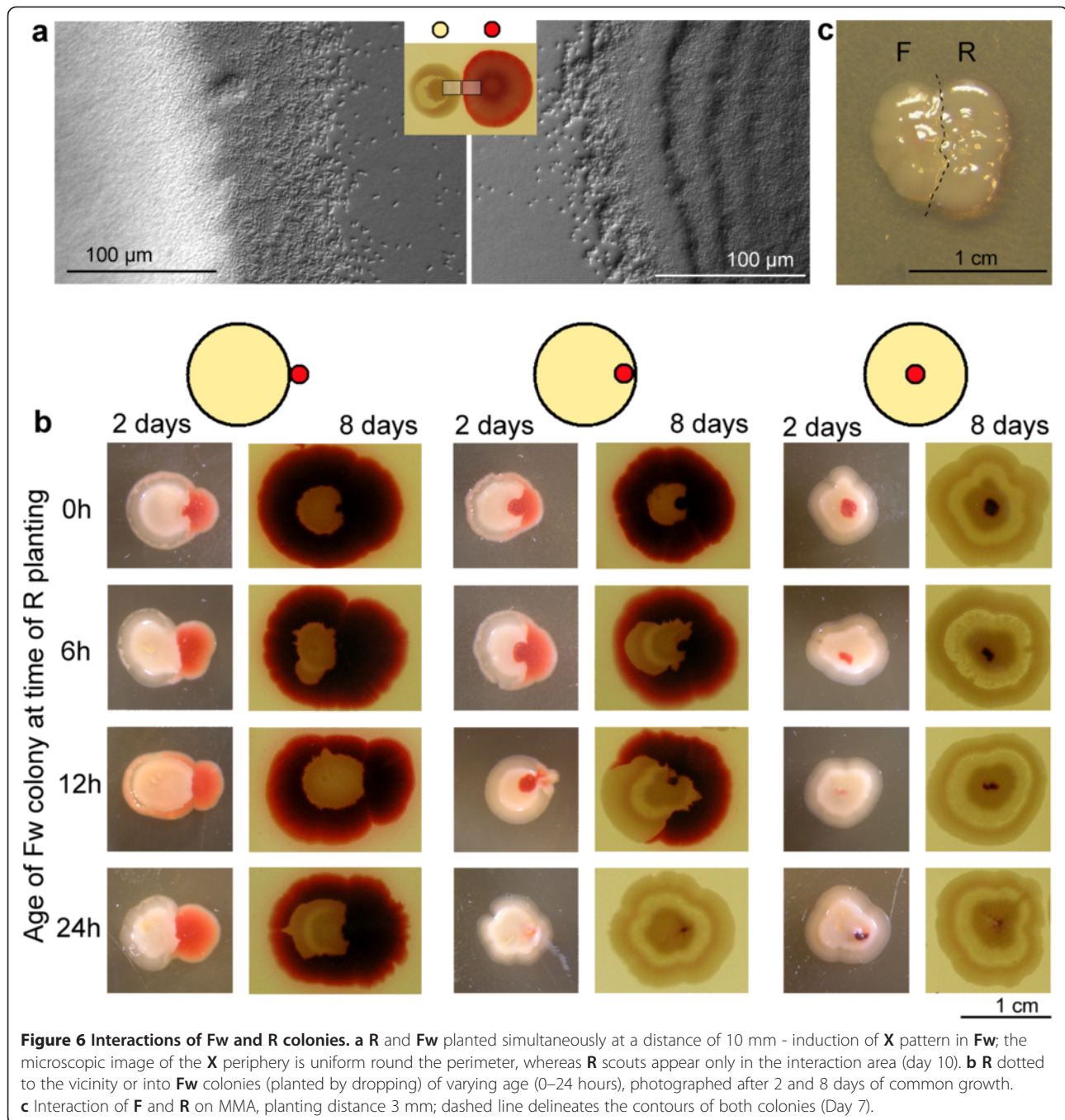


Figure 6 Interactions of Fw and R colonies. **a** R and Fw planted simultaneously at a distance of 10 mm - induction of X pattern in Fw; the microscopic image of the X periphery is uniform round the perimeter, whereas R scouts appear only in the interaction area (day 10). **b** R dotted to the vicinity or into Fw colonies (planted by dropping) of varying age (0–24 hours), photographed after 2 and 8 days of common growth. **c** Interaction of F and R on MMA, planting distance 3 mm; dashed line delineates the contours of both colonies (Day 7).

inside the Fw colony and does not grow (but survives). Finally, when planted into the center of Fw, the R material never resumes growth and remains encaged (but not killed) inside the Fw colony as a tiny island of foreign material.

All interactions on NA resemble to those observed on the rich medium NAG, including colony patterning (not shown). Different, however, is the interaction of both clones (planted 3 mm apart) on MMA: thanks to the helper function of R, both colonies grow to

approximately equal size, and come to a close contact (Figure 6c). The R colony, however, will not encircle the F material (compare to Figure 6b).

Heterospecific interactions: F and E. coli

The interaction of young F colonies with plants of *E. coli* (Figure 7a) is controlled by the F partner: if both partners planted simultaneously, *E. coli* avoids approaching F (see similar trend with the macula, Figure 3a, iii) and grows

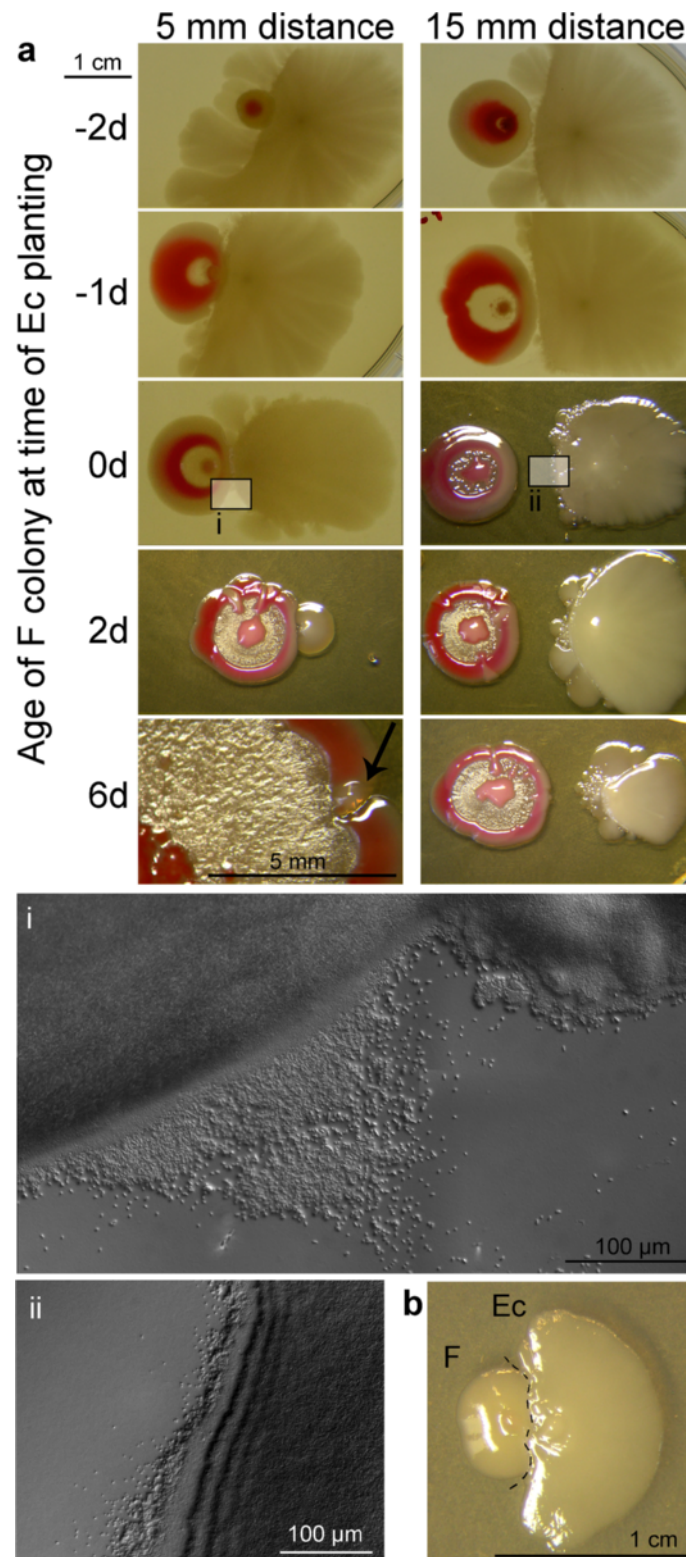


Figure 7 Mutual sensing of F and *E. coli* colonies. **a** At time 0, both partners were planted simultaneously at two different distances. Negative values: F planted to *E. coli* colonies one (–1) or two days old (–2). Positive value: *E. coli* planted to F colonies 2 and 6 days old (note the different magnification at lower left; arrow shows rudiment of *E. coli*). Day 10 after planting *E. coli*. Micro-photographs taken from areas indicated. **b** Interaction on MMA, planting distance 3 mm; dashed line delineates the contours of both colonies. (Day 7).

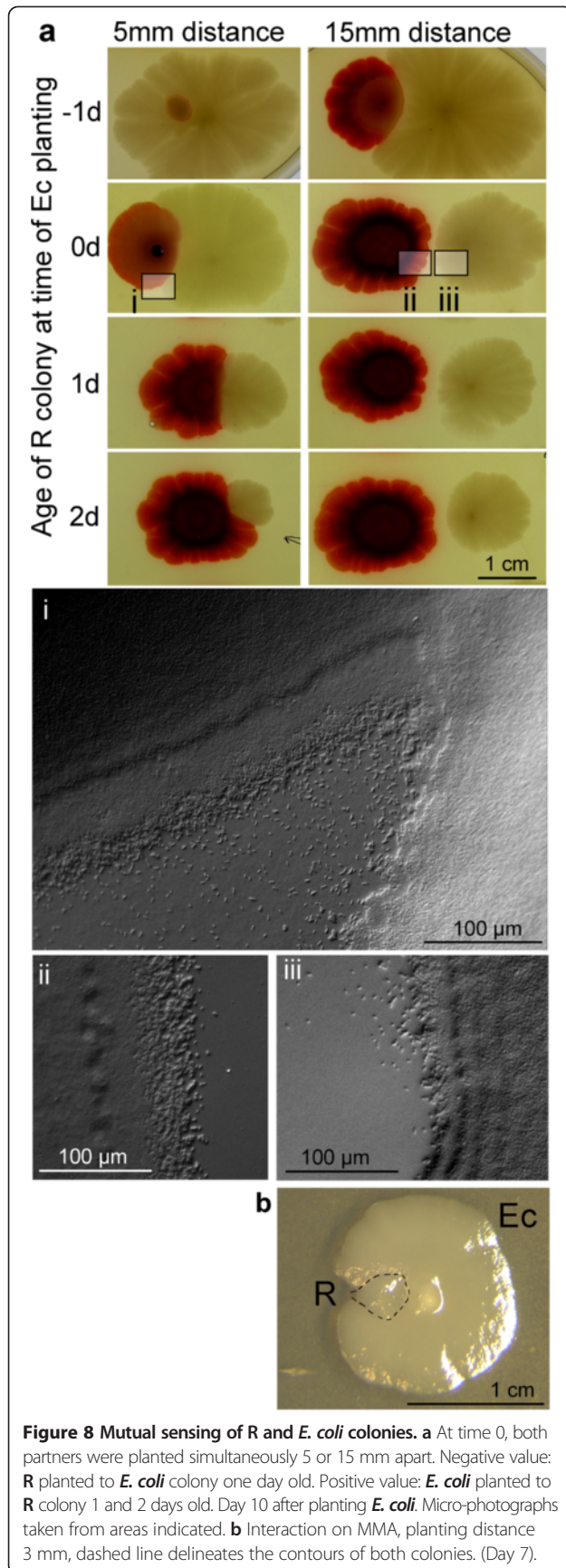


Figure 8 Mutual sensing of R and *E. coli* colonies. **a** At time 0, both partners were planted simultaneously 5 or 15 mm apart. Negative value: R planted to *E. coli* colony one day old. Positive value: *E. coli* planted to R colony 1 and 2 days old. Day 10 after planting *E. coli*. Micro-photographs taken from areas indicated. **b** Interaction on MMA, planting distance 3 mm, dashed line delineates the contours of both colonies. (Day 7).

only at distal side. At the same time, the F colony develops an X structure induced by *E. coli*. If planted to a distance of 15 mm, resulting adult partners maintain their scouts in the gap between them. Planting *E. coli* to older F colonies results in drastic inhibition of the growth of *E. coli*.

Even more profound the effect is in closer plantings (5 mm apart): the *E. coli* plant will be “caught up”, and its growth inhibited proportionally to the age of F (Figure 7a); yet it survives and remains uncontaminated by F material, even in cases of strongest growth inhibition. The dominant role of F is even more profound when F material is planted to older *E. coli* colonies: even in such cases, the F body remains in control of events. Such an inhibition is not bound to the presence of living F cells: the F-conditioned agar has the same effect (not shown). The effect is identical at 35°C, i.e. the inhibition was not due to growth at temperature that may be considered suboptimal to of *E. coli* (not shown).

On the MMA medium (where the F material does not grow when alone), *E. coli* turns into a helper, a necessary precondition for the growth of F (Figure 7b, see also Figure 4a). Yet, the growth of *E. coli* becomes inhibited by the boosted F colony.

Heterospecific interactions: R and *E. coli*

As shown in Figure 10, *E. coli* is dominant only when the R material is planted simultaneously (or to an older) *E. coli* colony, and to a close vicinity (below 5 mm). In all other instances, both bodies are in control of their integrity: (i) they maintain a clear boundary when grown to confluence, and neither is able to overgrow the partner, or (ii) when planted farther apart, they respect the free space between the colonies. In comparison to previous situation (*E. coli* and F), the *E. coli* colony, albeit inhibited, is not repulsed by the *Serratia* partner. Again, mutual contacts induce appearance of the scouting at adjacent faces of both colonies.

Interaction of both morphotypes on MMA leads to a dominant role of *E. coli*: the R material is strongly inhibited (but survives) and becomes engulfed by readily growing material of *E. coli* (Figure 8b).

Interactions involving the M clone

Interactions of M colonies, planted simultaneously to a close vicinity (cca 2 mm) to heterospecific plants are shown in Figure 9. On the rich medium NAG (Figure 9a) no confluent colony appears with the “mother” F morphotype: instead, M was encircled by F (but surviving). On the other hand, M becomes encircled and inhibited by R, as is F, its maternal clone (see Figure 6b). Also in the third setting – M with *E. coli* – the repulsive effect on *E. coli* was similar to that observed in F (see Figure 7). On the MMA

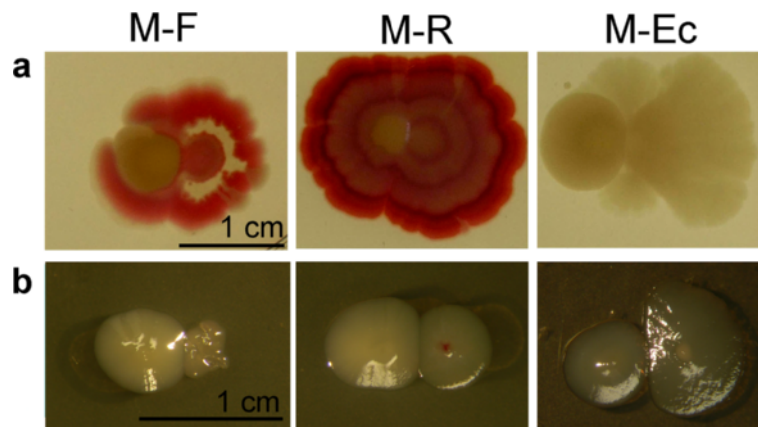


Figure 9 Interactions of M bodies with neighbors. M planted on **a** NAG or **b** MMA simultaneously into a close vicinity (2 mm) of **F**, **R**, or **E. coli**. (Day 6).

(Figure 9b), the **M** exerts the helper effect for **F**, yet the **F** colony remains small and unstructured. Interaction **M-R** reveals partners of equal strength on the minimal medium, whereas **E. coli** is retreating as on NAG.

Binary interactions in liquid media

To investigate to which extent could the above-described phenomena explained by differential growth rate of individual clones, we investigated the growth of the studied morphotypes in liquid media NBG (identical, except for agar, with NAG).

Judged from doubling times Table 1 the **R** and **W** morphotypes should exert highest fitness in all interactions studied. Obviously, this is not a rule, and ecological interactions and mutual influencing enter the game in case of multicellular bodies growing on agar substrates (cf., e.g., the doubling times of **F** and **E. coli** in NBG, and the communication of their colonies in NAG). Inhibition of **E. coli** by **F** (Figure 7), massive overgrowth of **R** by **E. coli** (Figure 8), rapid circumspread of **R** along the margin of **F** (Figure 6), etc., all suggest the existence of interactions that appear at the level of multicellular structures, but cannot be discerned in suspension. Compare also two modes of overwhelming the neighbor: by “brute force”, as in case of **E. coli** towards **R** (Figure 8), or “strangling” (**R** towards **F**, Figure 6). The fact is even more noticeable in chimeras referred to below.

Chimeras

Chimerical assemblages result from planting not a single clone, but a mixture of two or more clones in a single plant (with equal contribution of all partners involved and with constant density of bacteria per unit of surface, Figure 10 and Figure 11). All combinations studied where both partners contributed to the result show a bipartite structure: (1) The area of planting (the navel of future pattern) hosts a consortium, i.e. a mix of small colonies of all

members of the plant (see especially Figure 10). (2) Clonal outgrowths to the free space around the plant. This ruff is usually composed only from cells of a single morphotype, however, in cases when both partners are of equal “strength”, alternating wedges of both clones appear in the ruff (Figure 10a, b). The thickness of the ruff is essentially constant, independent on the diameter of the navel, and corresponding to the radius of single colony of particular cell material.

On NAG (Figure 11a), the only exception from the pattern is chimeras containing **E. coli** in combination with **F** and **M**. In such cases, **E. coli** was eliminated below the level of detection (no colonies out of about 1000 CFU per experiment), and a normal colony will result. Only occasionally **E. coli** manages control of the ruff, see below. Finally, a plant containing a mix of three morphotypes (Figure 11a) – **F:R:E. coli** (1:1:1) – led to two alternative outcomes. In most cases, the ruff consisted of **R** morphotype only, with the mixture of **R** and **F** in the central disk, with **E. coli** below the level of detection. Occasionally, however, as already observed in case of **F/E. coli** chimeras, the **E. coli** cells managed to outgrow to the periphery and control it, leaving a mixture of **R** and **F** in the central disk. In the disk, however, **E. coli** was always under the detection level, even in cases when the colony was started by a mixture **R:F:E. coli** 1:1:10 (not shown). The outcomes depend probably on how the mix escapes from the initial metastable state: (1) either **F** cells are able to keep at bay the **E. coli** population for a while, and both later get overgrown by **R** (compare to Figure 6b, Figure 7a); or (2) **E. coli** managed to acquire the control of periphery and did not let its partners grow out from the center.

On MMA, all chimeras (and colonies) have an almost uniform appearance, with a concave center, and white, broad ruff (Figure 11b); they are white, sometimes slightly pink when containing **R** cells. The exception is

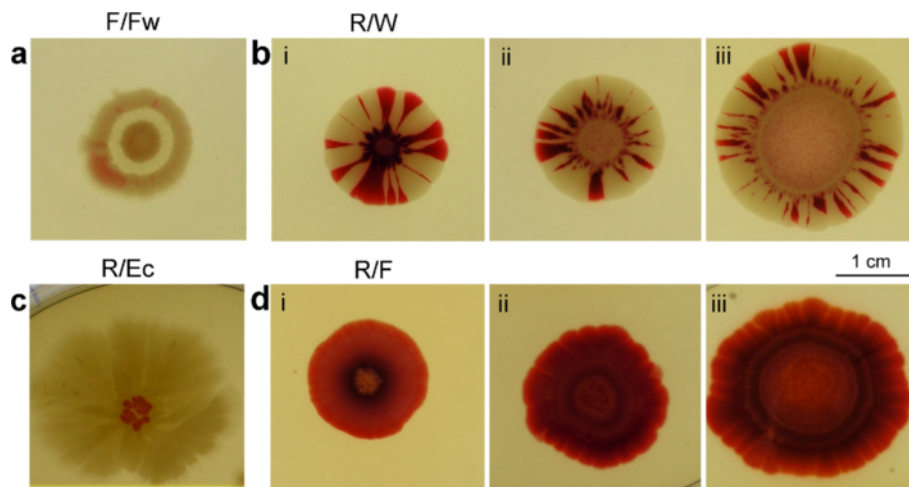


Figure 10 Growth of chimeras. **a** F/Fw **b** R/W **c** R/Ec, and **d** R/Fw chimera. Chimeras are either dropped, (**a-d**, i), or are spread to diameter of 5 (ii) or 14 mm (iii). Note the consortium in the planting area, with clonal outgrowths of both clones in case of R/W, or of the R clone only in case of R/Fw chimera.

the F morphotype that, without helper, does not grow at all; chimeras F/R, F/M and F/E. coli eliminate F material below the detection limit; technically speaking, they build ordinary colonies.

All outcomes of chimerical growth on agar substrates are summarized in Table 2 and in Figure 11.

Mixed suspensions in liquid medium NBG

In order to test the possibility that the behavior of chimeras on the substrate is primarily deducible from the growth rates of partners, chimeric suspensions containing 1:1 inocula of partners, were grown also in the nutrient medium NBG (an equivalent of NAG, except the absence of agar). Figure 11d shows quantitative ratios of some combinations 24 h after inoculation.

Some results are in congruence with observations on chimerical bodies on NAG, i.e. R is dominant over F, and F dominates over E. coli; in this case, however, F dominates absolutely, without rare cases of E. coli overgrowth. Similar is the dominance of M over E. coli (not shown). The proportions of R/F/E. coli in principle also match the situation observed on agar. The mixture R/E. coli, however, with equal representation of both types, differs markedly from chimeras where E. coli always outcompetes R and confines it in the center of body. Mixtures F/M and R/M (not shown) grow at roughly similar rates, i.e. of no sign inhibition of M by F as observed on NAG.

Chimera vs. colony

The interaction of chimerical bodies with single-clone colonies (Figure 11c) planted simultaneously at 5 mm distance depends usually on what material is contained in the chimera's ruff – essentially the interaction follows

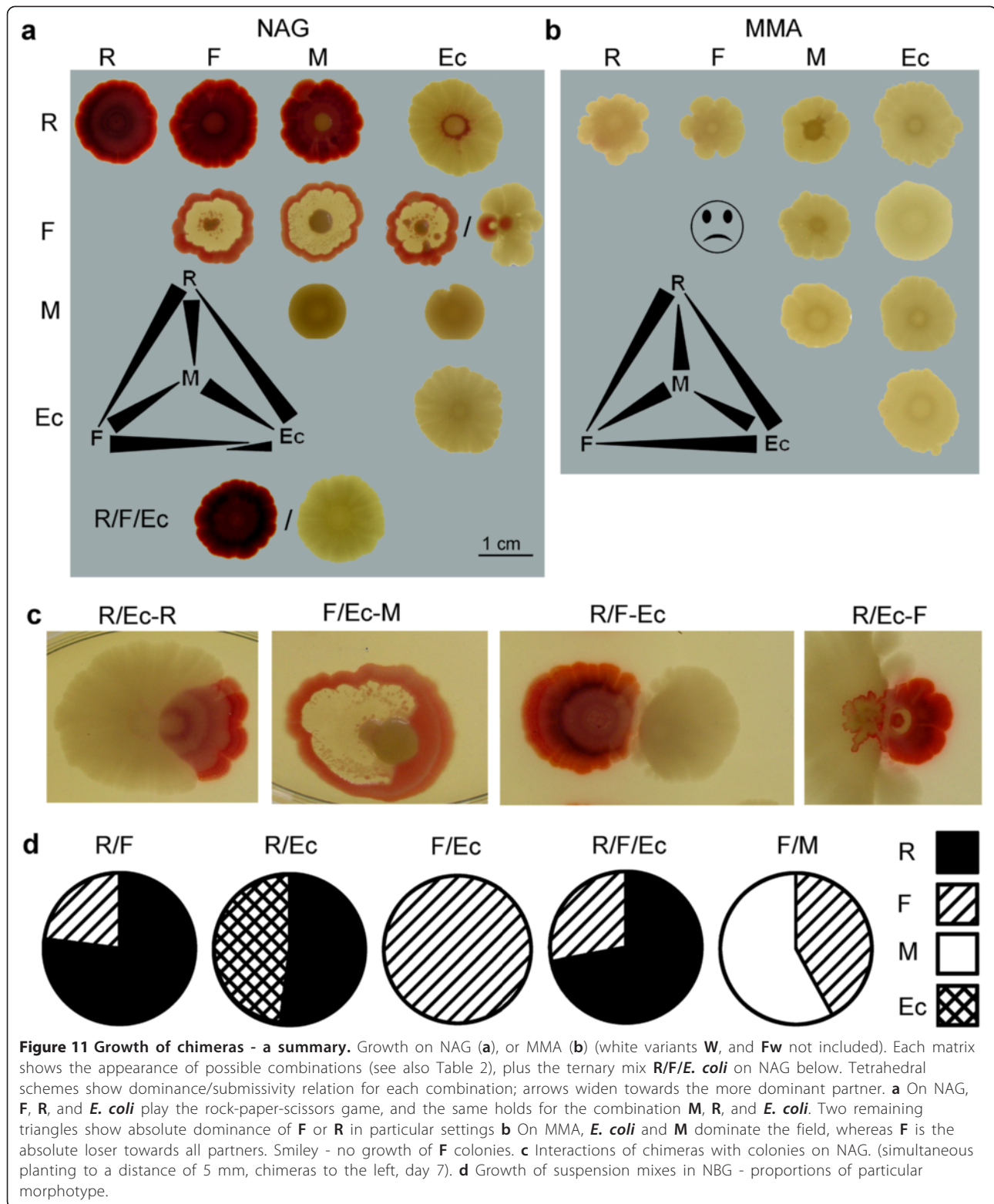
patterns shown in Figures 5–9 (such a typical case is the interaction of R/E. coli with R and F/E. coli with M). Some exceptions, however, deserve attention: In case of R/F chimera interacting with E. coli the result was not the chimera overgrown by E. coli (as in R-E. coli interaction. Figure 8a), but E. coli was effectively repelled, obviously thanks to the F material residing in the center of the chimera. Also interaction of R/E. coli chimera with the F body led, as expected, to an inhibition of E. coli by the F neighbor; this, however, enabled the R material to escape to the periphery and to overgrow the F neighbor.

Summary on chimeras

The outcome of chimerical interactions on both NAG and MMA substrates can be summarized by 4 schemes of interactions (triangular schemes in Figure 11a, b; for simplicity, the white derivatives W and Fw are not included – they behave analogously to their parents, R and F).

Interactions, on NAG, in different settings, reveal a “rock – paper – scissors” relationship for two of four possible ternary settings: R, F, or E. coli and M, R, and E. coli (Figure 11a, scheme). In two remaining ternary combinations, M is always a loser (cf. also Table 2).

The situation is different on MMA, where E. coli always wins the contest in chimeras, whereas F is an absolute loser (Figure 11b, scheme): we are rather confronted with a hierarchy E. coli ≈ M > R > F. The only exception to such a “pecking order” on MMA is not in chimeras but in colony interactions: if M or F (plus helper) get a chance to establish a colony, they take control over the in-growing E. coli in a way similar to that on NAG (Figure 7b).



Discussion

We present here a simple system allowing study of bacterial development in two regimes of growth – germ free (axenic), or gnotobiotic. As mentioned in the Introduction,

we draw inspiration from attempts to reduce extreme complexity of multispecies cohabitations from experiments with germ-free multicellular eukaryotes (mostly animals, or humans with inborn defects of immunity, but also plants)

Table 1 Doubling times in liquid medium NBG (27°C)

| Morphotype | Doubling time |
|----------------|---------------|
| | [min] (F = 1) |
| F | 64 (1.0) |
| Fw | 73 (1.2) |
| M | 58 (1.0) |
| R | 38 (0.6) |
| W | 37 (0.6) |
| <i>E. coli</i> | 55 (0.9) |

or gnotobiotic organisms where such a complexity was reduced to an interaction of two, or small number, of players.

Germ-free development

Formation of multicellular bodies is facultative in bacteria: they easily survive and multiply without multicellularity, thus they can abound with much richer repertoire of creativity, without endangering further propagation of the lineage. Bacterial colonies, then, may provide some cues to the nature of multicellularity. Moreover, growth of a colony is a complex process specific for a given lineage, and specifically modulated by environmental conditions (neighbors, nutrients, spatial settings, an array of signals, etc.). We chose five easily distinguishable morphotypes belonging to two *Serratia* species; the sixth, “outgroup”, morphotype was a domesticated strain of *E. coli*.

It deserves a notice that our morphotypes seem to resist domestication, i.e. gradual loss of structural refinements when grown under laboratory conditions commonly observed in microorganisms [1,31]. What also deserves a comment is the fact that the way of initiating a colony has little, if any, effect on the resulting body building. The same pattern can be grown from a single cell, from big amount (millions) of cells planted to a limited area as a dense homogenous suspension, or even from a chunk of material from the donor colony. Provided the area of planting is small, the cells can coordinate their behavior, “make wise decisions and act upon them” (B. McClintock, The Nobel lecture, 1983). Regulatory embryos of metazoans provide another example of such a potential.

With our array of easily distinguishable morphotypes, we were able to proceed from “germ-free” colonies towards gnotobiotic colony interactions – either with conspecifics, or with heterospecific bodies. We believe that such arrangement may provide a promising tool for future study of microbial communication at the level of structured entities. Similarly, study of chimerical bodies introduced in our works may reveal rules controlling self-structuration of the bacterial body and/or multispecies

Table 2 Composition of central and peripheral areas of chimerical bodies

| Medium: | NAG | | MMA | |
|---------|--------|----------|--------|-------|
| | center | ruff | center | ruff |
| R/M | R + M | R | R + M | R < M |
| R/Ec | R + Ec | Ec | Ec > R | Ec |
| F/M | M + F | F | M | M |
| F/Ec | F | F/Ec > F | Ec | Ec |
| M/Ec | M | M | M | Ec |
| F/R/Ec | R + F | R/Ec | ND | ND |

community. Moreover, our hypothesis of two-phase formation of multicellular body (e.g. axenic and cross-talk stages) can be easily tested on bacterial bodies that are not constrained by the need of producing special reproductive structures (organs).

Gnotobiotic interactions of clonal bodies

Perceiving the neighbors and interacting with them is one of the most natural conditions of all dwellers in the biosphere; often new qualities (shapes and properties) may appear as a consequence of such an encounter (for review, see [32]). Colonies growing on an agar plate provide a simplified model revealing some basic rules of such interactions [33].

In our model, a bacterial plant (be it a single cell or a clump of cells of a given morphotype) needs about 3 days to establish its “self”, to become a genuine multicellular body. During this initial period, its development may be readily deviated by external stimuli (Figure 2), or the presence of other bodies in its vicinity (Figures 3-9). Colonies of the same kin may even merge at this early stage of development (confluent colonies as reported by [20]), reminding early embryos of, e.g., of mammals.

In later stages of their development, colonies maintain their integrity even in inevitable close encounters, preferring a channel of free space between them, sometimes even “guarded” by advanced scouts; conspicuous is, in this respect, the “immune reaction” of rimmed colonies (F, Fw) that develop a specific “X” structure in the vicinity of rimless bodies (see also [3]). Even more accentuated such interactions become when colonies of different age grow to a close contact or are artificially forced to it – with the whole array of reactions such as breaking away from the neighbor, overgrowing it, “strangling” it, changing body pattern, changing the character of scouting, etc. (Figures 6-9). The roles of scouts remain enigmatic for the time being – albeit they may seem obvious candidates for mediators of short-distance interactions), because similar reactions of bodies do take place also on the minimal substrate (MMA) where we did not observe any

scouting. What are they for, if obviously colonies can easily do without them?

Colonies on MMA appear as if underdeveloped: no coloration, no patterning, and no scouts. In this respects, they resemble very young colonies planted on NAG – as if the minimal medium impeded the transition from the juvenile phase into phase of growth and ornamentation (which would require scouts). Growth would, however, continue (as in experiments with higher temperatures, Figure 2), and the result is an “overgrown youngster”. Such a speculation may help to explain behavior on MMA, yet does not help explaining the *very* role of scouts in “full-blooded” development on NAG.

The ability to distinguish between self and non-self may represent one of the preconditions for consortial (or multi-species) way of life. The **X** structure, then, may represent such a reaction of **F** to the presence of foreign clones. Swarms of *Proteus mirabilis* (growing on solid media) display a similar behavior: whereas two swarms belonging to the same line will merge when grow towards each other, swarms of two different lines will maintain a demarcation line dividing both swarms [34]. The phenomenon is readily used in epidemiology, for diagnostics of different strains of *Proteus*. The mutual inhibition is communicated by secretion (and sensing) of a great array of signaling proteins – proticins [35]; similar system was described in *Pseudomonas aeruginosa* [36] Transforming *P. vulgaris* strain by a proticin from *P. mirabilis* leads to abolishment of mutual inhibition [37]. Yet, our observation of incompatibility even between isogenic strains (**R**:**R**, or **F**:**F**, see Figure 8) needs a more parsimonious explanation than rapid mutation of putative pheromone genes. As suggested by [38,39]), if an identical signal is produced by approaching siblings, it may lead to a quick surpassing of the quorum threshold in the furrow between them – this will lead to the inhibition of growth in that direction.

As a rule, we can recognize a “rock – paper – scissors” interplay between colonies belonging to three groups: (1) rimmed morphotypes **F**, **Fw**; (2) rimless morphotypes **R**, **W**; and (3) *E. coli*, as summarized in Figures 5-9. The morphotype **M** has a somewhat intermediary position. Hence, even such a reduced, model “ecosystem”, will establish relations of dominance, cooperation, or subordination according to overall context. For the time being we were able to prove that the induction of **X** structure is the matter of a signal diffusing, and persisting, in the agar substrate (see also [3]).

A similar situation was already described described by Kerr et al. [40]: the authors cultivated three strains of *E. coli*, one producing colicine and being resistant to it, the second not producing but resistant (i.e. growing in the presence of colicine), and the third sensitive (i.e. killed in the presence of colicine). The authors interpret

the results in neoDarwinian frames: The synthesizer will always overgrow the sensitive strain. Because of the cost of colicine synthesis, the resistant wins the contest with the synthesizer. As resistance itself represents extra cost, the sensitive strain will win over the resistant, but is a loser in a contest with the producer (see also [41]).

The harsh behavior of our *S. marcescens* clones (**F**, **Fw**, **M**) against *E. coli* might be explained as a relation producer – sensitive. For example Fuller & Horton [42] described production, by *S. marcescens*, of a factor dubbed marcescin, resembling in its effect to colicins. In such a schema, **F** would be in a role of the producer of the repellent; **R** would be resistant towards it – and therefore overgrowing the **F**, but at the same time sensitive to *E. coli*. We suspect, however, that the situation is more complicated and more factors are in the game.

The phenomenon of cooperation comes to the fore even more with “helpers”: on the minimal medium, the morphotype **F** can grow only in the presence of rimless morphotypes or *E. coli*, as it is dependent on – at present unknown – nutrient or signal secreted to the substrate by the helper. Yet, as soon as helped, **F** can exert its “powers” towards the neighbors: even if **F** colonies can grow only thanks to the *E. coli* plant in the middle, the same plant will later be strongly inhibited by colonies it supports (Figure 7b). Even more illustrative is the interaction of the trio **R**, **F**, and *E. coli*. The **R**/*E. coli* chimera (normally the growth of **R** suppressed) in the vicinity of **F**, the **F** will keep *E. coli* at bay (as in Fig. 9), which enables **R** to grow and, in turn, overgrow and suppress the **F** (Figure 11c). All such interactions may be considered as paradigmatic for much more complicated ecosystems of natural microbial consortia.

Chimeras

The dominance/subordination rules as observed above for colony encounters more or less fit also for chimeric growths; i.e. they are not explainable from the growth rates of particular morphotypes involved, as observed in suspensions (Graph in Figure 11d). Which of the partners will prevail will often depend by rock – paper – scissors rules – as described for single colonies. This is not surprising when we take into account that the chimera represents a model gnotobiotic microbial ecosystem. The dense initial mixed suspension on the area of planting is not able to negotiate the rules how to build the final body: Compare to situation with planting axenic cultures, where even very dense suspension establish a full-fetched colony indistinguishable from that growing from a single colony. An exception is “chimeras” where one of partners is completely eliminated, and the “winner” continues in building an ordinary colony (Table 2, Figure 11). Hence, in cases when all strains present in the mix survive, the planting area represents

not the center of a colony, but a gnotobiotic ecosystem containing a nebula of very small colonies. An organized outgrowth from this navel will build the external circle composed of a single morphotype, or containing alternative wedges, each of a single morphotype. A chimera, thus, does not represent a body, but a consortium of bodies, even in simple gnotobiotic settings; only the clonal outgrowths into the free space may be compared to genuine colonies, albeit “one-dimensional”.

It deserves attention that even closely related sister clones **F-Fw** and **R-W** will not cooperate in building a single colony upon chimeric planting: Especially conspicuous is the “chrysanthemum” appearance of **R/W** chimeras (Figure 10). The finding is not new. Korolev *et al.* [28] working with a different pair of strains, argue that cells that happen to appear on the margin of the plant, will establish cooperating groups of this of that origin. They take over a corresponding part of the circumference and grow out of it as monoclonal, one-dimensional colonies – hence the “petals” of the chrysanthemum. Remarkably – in quoted studies as well as in our results – outgrowing “petals” grow to similar length, independently on the diameter of the planted navel. Again, the rock-paper-scissors rules (Figure 11) will mostly predict the outcome of the growth; the rest of interactions being hierarchical.

The mutual behavior of strains is more or less similar on both substrates tested, rich (NAG) and minimal (MMA); the only expected exception is the submissive role of **F** on MMA whose growth is dependent on the presence of helpers. It is conspicuous that the role of **F** is fully taken by its daughter morphotype **M**. As already mentioned above, the behavior of particular strains in liquid media provides no guide for predicting their behavior on solid substrates: the two kinds of media represent to a great extent alternative, and incompatible, strategies of growth.

Why multicellular bacteria?

If we take axenic bacterial colonies as analogues of clonal body of multicellular eukaryotes, two problems will come out immediately: the *objective* of building such a body, and the *high plasticity* of bacterial ontogenies. As far as we know, colonies of *Serratia* never produce reproductive organs: they can safeguard their propagation without any demanding, and coordinated, activity of colony building. Why, then, do they go into the trouble with elaborate microscopic filigree of terraces and scouts, and even macroscopic patterning and ornamentation? The answer may lie in physiological division of labor [4] and perhaps even “histological” differences across the colony.

Besides plastic responses, bacteria can – reversibly or irreversibly – diversify also *genetically* into different morphotypes, depending on conditions like those mentioned above. In *Paenibacillus* repeated and heritable

switches between different morphotypes are induced by the density of agar [43-45]. Genetic differentiation was also often described in suspension cultures. For example a clone of *Pseudomonas aeruginosa* differentiated quickly and apparently purposelessly into multiple genetic variants [46]. The authors ascribe the phenomenon to an “insurance effect” preparing the lineage to conditions that may set in the future. A similar effect in *Serratia* is believed to play a role in colonization of new niches [47]. Finally, a clonal population may break into different specialized clones evoked by metabolic demands [48,49] or antibiotic pressure [50].

However, since our clones were genetically stable in respect to the observed characteristics, and since all morphogenetic variation was found to be fully reversible, we can exclude such genetic switches, as well participation of phages, plasmids, transposons or similar elements, in our model and ascribe all variations observed (like colony patterning, scouting, or response to neighbors and environmental cues) solely to phenotypic plasticity.

Conclusions

Multicellular bacterial models (colonies) match their eukaryotic counterparts (animals, plants, fungi) in areas of research classically focused only to eukaryotes:

1. Axenic (“germ-free”) and gnotobiotic settings are easy to establish, and interactions within the body, as well as between different bodies (of the same, or different lineages) can be studied to minute details. Such studies can be carried out on developing, fully formed or mixed assemblages of colonies that can be brought into defined spatial and temporal configurations. An additional advantage of the bacterial model is its independence on mature individuals that are able to produce germs (sexually or asexually), i.e. the range of full-formed phenotypes is much greater and can be influenced towards many ends (plasticity).

2. Ontogenesis of a colony (starting either from a single cell or from an assemblage of cells), similarly to the development of multicellular eukaryotic bodies, proceeds in two stages: the first stage must be thoroughly insulated from the rest of the biosphere and relies to intrinsic settings of the developing germ; in the second stage, the germ establishes its bounds with its environment, and plastically reacts to outside cues. In chimeric assemblages where the first phase is wrecked, the mix is unable to establish germ(s) and proceed towards a colony, and develops toward a simple bacterial consortium. Such an “ecosystem” allows detailed study of how different lineages implement their fitness in a given context.

We bring here examples of model settings allowing, in further research, detailed studies of ontogenies and ecologies on the dish.

Methods

Media

PB : phosphate buffer as described in Rieger *et al.* [20].
NA: Nutrient Agar No2 (Imuna Pharm a.s.) supplemented. For growth in suspensions Nutrient broth No2 (**NB**) was used (Imuna Pharm a.s.), of identical composition, but without agar.

NAG: NA enriched with glucose (Sigma; 0.27 mM; 2.7 mM; 27 mM; 54 mM). In some experiments, NA was enriched with manitol (Sigma; 27 mM), sorbitol (Sigma; 27 Mm), or 6% (w/v) polyethylene glycol (Sigma; mw 6000). In all such cases, the osmotic potential was identical: 0.08 MPa.

Analogically, glucose-enriched broth (**NBG**) was used for cultivations in suspension.

TN: 10 g Trypton (Difco), 5 g NaCl (86 mM), 1.5% Agar (Oxoid No 1). Add 1000 ml H₂O.

Minimal medium MM: 21 mM KH₂ PO₄, 48 mM Na₂HPO₄, 8 mM NaCl, 18 mM NH₄Cl, 3.9 mM MgSO₄, 27 mM glucose.

Minimal medium MMA: 1.5% agar in MMA.

Bacteria

The strain *S. rubidea* here labeled **R** was obtained from the collection of the Department of Genetics and Microbiology, Faculty of Sciences, Charles University. The strain *S. marcescens* **CNCTS 5965** was obtained from the Czech National Institute of Health [20].

The identity of strains was confirmed by MALDI - TOF method, using Bruker Daltonik MALDI Biotyper (performed by A. Nemeč, National Health Institute, Prague); the scores assigned to particular strains of *S. rubidaea* (R = 2.241, W = 2.214) and *S. marcescens* (F = 2.151, Fw = 2.212 and M = 2.168) indicate very high probability of correct determination.

It is to be stated that in the previous work, the morphotypes **F** and **Fw** were erroneously determined as belonging to *S. rubidaea* species. In the light of the present, more reliable knowledge, the determination in that paper should be reconsidered – albeit this change has no influence on the results obtained.

The morphotype **M** of *S. marcescens* is a derivative of **F**. It was obtained after many repeated attempts to grow the **F** morphotype in suspensions in the minimal medium **MM**.

E. coli strain 281 was obtained from the collection of the Department of Genetics and Microbiology, Faculty of Sciences, Charles University.

Cultivation

If not specified otherwise, bacteria were grown at NAG at 27°C in sealed boxes with controlled humidity. Stabulates were kept at -80°C [20].

New colonies were initiated as follows: (1) as clones from single cells, by classical *sowing* of bacterial suspension (in phosphate buffer); (2) planted by *dropping* dense suspension (10⁸/ml) on a defined place (diameter about 2 mm); (3) planted by *dotting* from material taken by a sterile needle from an older body; (4) by smearing (to grow maculae): 30 µl of bacterial suspension (approx. 10⁸ cells) was applied to a line of approx. 5 cm.

For conditioned agar see [3].

Documentation

Plates were photographed *in situ* using Olympus C-5050ZOOM digital camera under ambient or penetrating light (Fomei, LP-400 light panel, cold cathode light) or under magnification using a binocular magnifier [3].

Colony margins were observed with fully motorized microscope stand IX81 (Olympus) equipped with objectives LUCPLFLN 20 (NA 0.45) and LUCPLFLN 40 (NA 0.60) and documented with the camera HAMMATSU Orca, with differential interference contrast. Digital images were further elaborated by the software Olympus CELL^R SYSTEM.

Figures shown were selected from an extensive collection of primary photos from several repetitions (5 and more) of each experiment.

Photoshop software was used to assemble the plates as they appear in Figures. No image doctoring was performed except automatic adjustment of brightness and contrast in some cases.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

IP, JC, and TR contributed equally to the designing and performing the experiments and interpreting their results; AB participated in experiments and data interpretation and provided basic technical support; ZN and AM participated in study design and data interpretation and drafted the paper. All authors have read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

Supported by the Grant Agency of Czech Republic 408/08/0796 (JČ, IP, AB, AM, ZN), and by the Czech Ministry of education MSM 0021620845 (AM, AB, ZN). The authors thank Josef Lhotsky for invaluable comments, Alexander Nemeč for strain determination, and Ondřej Šebesta for assistance with microscopy.

Received: 4 March 2012 Accepted: 18 July 2012

Published: 15 August 2012

References

1. Aguilar C, Vlamakis H, Losick R, Kolter R: **Thinking about *Bacillus subtilis* as a multicellular organism.** *Curr Opin Microbiol* 2007, **10**:638–43.
2. Ben-Jacob E, Levine H: **Self-engineering capabilities of bacteria.** *J R Soc Interface* 2005, **3**:197–214.
3. Čepl JJ, Pátková I, Blahůšková A, Cvrčková F, Markos A: **Patterning of mutually interacting bacterial bodies: close contacts and airborne signals.** *BMC Microbiol* 2010, **10**:139.
4. Shapiro JA: **Bacteria are small but not stupid: cognition, natural genetic engineering and socio-bacteriology.** *Stud Hist Phil Biol Biomed Sci* 2007, **38**:807–819.

5. Shapiro JA: Bacteria as multicellular organism. In *Multicellularity: The rule, not the exception. Lessons from E.coli colonies*. Edited by Dworkin M, Shapiro JA. Oxford: University Press; 1997:14–49.
6. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, et al: Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 2011, **473**:174–180.
7. Visick KL, Foster J, Doi J, McFall-Ngai M, Ruby EG: *Vibrio Fischeri lux genes play an important role in colonization and the development of the host light organ*. *J Bacteriol* 2000, **182**:4578–4586.
8. Douglas AE: Mycetocyte symbiosis in insects. *Biol Rev Camb Philos Soc* 1989, **64**:409–34.
9. Hayman DS: Mycorrhizae of nitrogen-fixing legumes. *World J Microbiol Biotech* 1986, **2**:121–145.
10. Long SR: Rhizobium symbiosis: nod factors in perspective. *Plant Cell* 1996, **8**:1885–1898.
11. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R: Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 2000, **54**:49–79.
12. Waters CM, Bassler BL: Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005, **21**:319–46.
13. Williams P: Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world. *Microbiology* 2007, **153**:3923–38.
14. Yim G, Wang HH, Davies J: Antibiotics as signalling molecules. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2007, **362**:1195–2000.
15. Labbate M, Queck SY, Koh KS, Rice SA, Givskov M, Kjelleberg S: Quorum sensing-controlled biofilm development in *Serratia liquefaciens* MG1. *J Bacteriol* 2004, **186**:692–698.
16. Rice SA, Koh KS, Queck SY, Labbate M, Lam KW, Kjelleberg S: Biofilm formation and sloughing in *Serratia marcescens* are controlled by quorum sensing and nutrient cues. *J Bacteriol* 2005, **186**:3477–3485.
17. Van Houdt R, Givskov M, Michiels CV: Quorum sensing in *Serratia*. *FEMS Microbiol Rev* 2007, **31**:407–424.
18. Ben-Jacob E, Shmueli H, Shochet O, Tenenbaum A: Adaptive self-organization during growth of bacterial colonies. *Physica A* 1992, **187**:378–424.
19. Golding I, Cohen I, Kozlovsky Y, Ben-Jacob E: Studies of sector formation in expanding bacterial colonies. *Europhys Lett* 1999, **48**:587–593.
20. Rieger T, Neubauer Z, Blahůšková A, Cvrčková F, Markoš A: Bacterial body plans: colony ontogeny in *Serratia marcescens*. *Communicative Integrative Biology* 2008, **1**:78–87.
21. Markoš A: The ontogeny of Gaia: the role of microorganisms in planetary information network. *J theor Biol* 1995, **176**:175–180.
22. Jefferson K: What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiology Letters* 2004, **236**:163–173.
23. Koschwanez JH, Foster KR, Murray AW: Sucrose utilization in budding yeast as a model for the origin of undifferentiated multicellularity. *PLoS Biol* 2011, **9**:e1001122.
24. Webb JS, Givskov M, Kjelleberg S: Bacterial biofilms. Prokaryotic adventures in multicellularity. *Curr Opin Microbiol* 2003, **6**:578–585.
25. Reid RP, Visscher PT, Decho AW, Stolz JF, Beboutk BM, Dupraz C, Macintyre IG, Paerl HW, Pinckney JL, Prufert-Beboutk L, Steppe TF, DesMarais DJ: The role of microbes in accretion, lamination and early lithification of modern marine stromatolites. *Nature* 2000, **406**:989–992.
26. Stewart PS, Camper AK, Handran SD, Huang C, Warnecke M: Spatial distribution and coexistence of *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *Microb Ecol* 1997, **33**:2–10.
27. Hallatschek O, Nelson DR: Life at the front of expanding population. *Evolution* 2010, **64**:193–206.
28. Korolev KS, Xavier JB, Nelson DR, Foster KR: A quantitative test of population genetics using spatio-genetic patterns in bacterial colonies. *Amer Naturalist* 2011, **178**:538–552.
29. Veening JW, Kuipers OP, Brul S, Hellingwerf KJ, Kort R: Effects of phosphorelay perturbations on architecture, sporulation, and spore resistance in biofilms of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 2006, **188**:3099–3109.
30. Granek JA, Magwene PM: Environmental and genetic determinants of colony morphology in yeast. *PLoS Genet* 2010, **6**:e1000823.
31. Kuthan M, Devaux F, Janderová B, Slaninová I, Jacq C, Pálková Z: Domestication of wild *Saccharomyces cerevisiae* is accompanied by changes in gene expression and colony morphology. *Mol Microbiol* 2003, **47**:745–754.
32. Sachs JL, Skophammer RG, Regus JU: Evolutionary transitions in bacterial symbiosis. *Proc Natl Acad Sci* 2011, **108**:10800–10807.
33. Kresh J, Merritt J, Shi W, Qi F: Competition and coexistence between *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* in the dental biofilm. *J Bacteriol* 2005, **187**:7193–7203.
34. Dienes L: Reproductive Processes in *Proteus* cultures. *Proc Soc Exp Biol Med* 1946, **63**(2):265–70.
35. Senior BV, Larsson P: A highly discriminatory multi-typing scheme for *P. mirabilis* and *P. vulgaris*. *J Med Microbiol* 1983, **16**:193–202.
36. Munson EL, Pfaller MA, Doern GV: Modification of Dienes mutual inhibition test for epidemiological characterization of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates. *J Clin Microbiol* 2002, **40**:4285–4288.
37. Budding AE, Ingham CJ, Bitter W, Vandenbroucke-Grauls CM, Schneeberger PM: The Dienes phenomenon: competition and territoriality in swarming *Proteus mirabilis*. *J Bacteriol* 2009, **191**:3892–900.
38. Be'er A, Ariel G, Kalisman O, Helman Y, Sirota-Madic A, Zhang HP, Florin EL, Payne SM, Ben-Jacob E, Swinney HL: Lethal protein produced in response to competition between sibling bacterial colonies. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010, **107**:6258–6263.
39. Be'er A, Zhang HP, Florin EL, Payne SM, Ben-Jacob E, Swinney HL: Deadly competition between sibling bacterial colonies. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009, **106**:428–433.
40. Kerr B, Riley MA, Feldman MW, Bohannan BJM: Local dispersal promotes biodiversity in a real game of rock-paper-scissors. *Nature* 2002, **418**:171–174.
41. Nahum JR, Harding BN, Kerr B: Evolution of restraint in a structured rock-paper-scissors community. *Proc Natl Acad Sci* 2011, **108**:10831–10838.
42. Fuller AT, Horton JM: Marcescin, an antibiotic substance from *Serratia marcescens*. *J Gen Microbiol* 1950, **4**:417–33.
43. Ben Jacob E, Cohen I, Gutnick DL: Cooperative organization of bacterial colonies: from genotype to morphotype. *Annual Review of Microbiology* 1998, **52**:779–806.
44. Ben Jacob E, Shapira Y, Tauber AI: Seeking the foundations of cognition in bacteria: from Schrödinger's negative entropy to latent information. *Physica A* 2006, **359**:495–524.
45. Ben-Jacob E, Becker I, Shapira Y, Levine H: Bacterial linguistic communication and social intelligence. *Trends Microbiol* 2004, **12**:366–372.
46. Boles BR, Thoende M, Singh PK: Self-generated diversity produces "insurance effects" in biofilm communities. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, **101**:16630–16635.
47. Koh KS, Lam KW, Alhede M, Queck SY, Labbate M, Kjelleberg S, Rice SA: Phenotypic diversification and adaptation of *Serratia marcescens* MG1 biofilm-derived morphotypes. *J Bacteriol* 2007, **189**:119–130.
48. Rosenzweig RF, Adams J: Microbial adaptation to a changeable environment: cell-cell interactions mediate physiological and genetic differentiation. *Bioessays* 1994, **16**:715–717.
49. Rosenzweig RF, Sharp RR, Treves D, Adams J: Microbial environment in a simple unstructured environment: genetic differentiation in *Escherichia coli*. *Genetics* 1994, **137**:903–917.
50. Lee HH, Molla MN, Cantor CR, Collins JJ: Bacterial charity work leads to population-wide resistance. *Nature* 2010, **467**:82–86.

doi:10.1186/1471-2180-12-178

Cite this article as: Pátková et al.: Developmental plasticity of bacterial colonies and consortia in germ-free and gnotobiotic settings. *BMC Microbiology* 2012 **12**:178.