

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

Teoretická a evoluční biologie

Autoreferát disertační práce



**Morfogeneze bakteriálních kolonií
Morphogenesis of bacterial colonies**

RNDr. Jaroslav Čepl

Školitel: Doc. RNDr. Anton Markoš, CSc.

Praha 2013

Abstrakt

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

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

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

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

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

Abstract

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

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

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

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

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

Úvod

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

Do jisté míry Linného námitka stále platí - mikroskopické organismy můžeme poznávat jen skrze jejich hromadné projevy, epifenomény – průvodní jevy jejich skrytého života. Vnímáme jen jejich zásahy do našeho makroskopického světa (např. fermentace, nemoci). Vyzbrojení přístroji poznáváme – ve smyslu detekce chemických látek, přečtení úseků DNA, nahlížení obrázků z mikroskopu atd. - bakteriální projevy do detailů, ale přímé zkušenosti se nám opět nedostává. Nemáme přístup k bakteriím v originále, dostáváme pouze zprostředkovaná data. Podobně ale nemáme bezprostřední zkušenost s jednotlivými buňkami v těle myši, můžeme však mít bezprostřední zkušenost s myší samotnou. Takovou ojedinělou příležitost z bakteriálního světa nabízí makroskopická kolonie. Začali jsme o bakteriálních koloniích přemýšlet jako o mnohobuněčných *tělech* s vlastní ontogenezí (Neubauer, 2002; Rieger et al., 2008). A převážně z tohoto pohledu je nazíráno na kolonie v průběhu celé práce, tedy ne jako na epifenomén hromadění se jednotlivých bakterií, ale jako na mnohobuněčné, nebo lépe řečeno proto-mnohobuněčné bakteriální tělo srv. (Ben-Jacob, Cohen, & Gutnick, 1998; Ben-Jacob, 2003; James A Shapiro, 1995; James Alan Shapiro & Dworkin, 1997).

Serratia marcescens

Modelovým organismem naší skupiny je *Serratia marcescens*, morfotyp F. Ten byl pojmenován podle vzhledu kolonie, který díky vystouplému středu, propadlému mezikruží a znovu vystouplému okraji připomíná fontánu.

Jasně strukturovaný profil kolonie společně se změnami barevnosti struktur bez nutnosti umělé vizualizace poskytuje výhodu v pozorování diferenciaci bakterií v rámci kolonie, na rozdíl od umělé vizualizace srv. (Shapiro, 1995). Tato diferenciaci a celá morfogeneze F kolonie se stala předmětem zájmu naší skupiny (Čepl et al., 2010; Rieger et al., 2008).

Takto by se daly shrnout výsledky z předchozího zkoumání:

V průběhu morfogeneze F kolonie byly zaznamenány tři kritické body:

Rozrůstání středu a přechod na strukturu mezikruží

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

Rozrůstání mezikruží a přechod na strukturu lemu

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

Rozrůstání lemu a zastavení růstu kolonie

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

Materiál a metodika

Pro sledování morfogeneze kolonií jsme používali převážně klasické mikrobiologické techniky; plynnou analýzu jsme dělali pomocí metody SIFT-MS; dokumentace fotoaparátem Olympus C-5050ZOOM na prosvětlovacím panelu (Fomei, LP-400) nebo pod binokulární lupou; pro časosběrná videa jsme používali program QuickPHOTO. Pro ověření příbuznosti klonů bylo použito metody porovnání PCR fingerprintů.

Cíle práce

Prvním cílem bylo rozvinout téma morfogeneze kolonií *S. marcescens* morfotypu F a pokusit se identifikovat plynný morfogen zodpovědný za přechod struktury mezikruží do struktury lemu a dále charakterizovat případné další faktory, které ovlivňují morfogenezi kolonie.

Kromě faktorů ovlivňujících morfogenezi produkovaných *S. marcescens* samotnou jsme studovali i vliv faktorů pocházejících od jiných organismů. Jiné bakteriální kmeny mohou přispět novou kvalitou do následných interakcí. Naším dalším cílem bylo charakterizovat takové mezidruhové interakce a sledovat jejich vliv na morfogenezi F kolonie.

Čpavek, který byl v průběhu práce určen jako jeden z faktorů ovlivňujících morfogenezi kolonie, byl popsán jako faktor indukující resistenci na antibiotika. Naším dalším cílem bylo studium a další charakterizace fenoménu indukované resistance k antibiotikům popsané v (Bernier et al., 2011; Heal & Parsons, 2002; Lu, 2004) u našich modelových organismů.

Výsledky

Rozvinutí morfogeneze

Podarilo se nám určit faktor, který ovlivňuje předchod mezikruží-lem jako amoniak. Při koncentraci 0,1% roztoku čpavku jsme pozorovali míru ovlivnění morfogeneze F kolonií podobnou jako již dříve pozorované ovlivnění 3 dny starou makulou za přepážkou – tj. kolonie normální velikosti, ale bez typické F struktury.

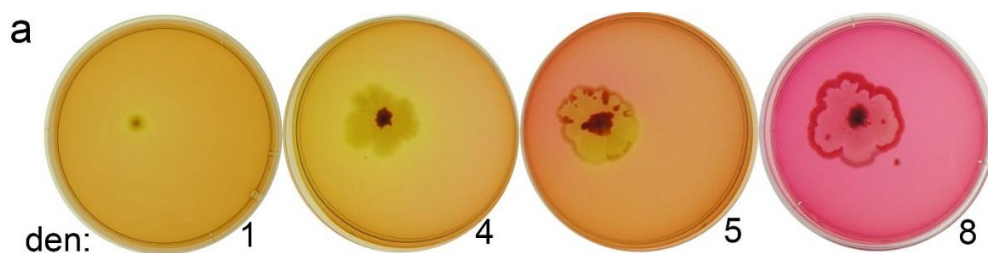
Dokázali jsme, že bakteriální nárůst sám amoniak produkuje: plynná analýza metodou SIFT-MS odhalila v plynné fázi nad tři dny starou makulou koncentraci čpavku v hodnotě 27185 ppb (parts per billion), což je zhruba 150x více, než bylo změřeno nad kontrolním živným mediem.

Dále jsme sledovali jsme změny pH v okolí kolonií pomocí pH indikátoru (fenolčerveň) a zároveň měřením pH v agaru. Jak jsme předpokládali, amoniak alkalizuje prostředí. Navíc jsme zjistili, že během prvních dvou dní se v bezprostřední blízkosti kolonie (i přes pufrací kapacitu živného agaru) snižuje hodnota pH z původních 7,2 zhruba na hodnotu 6. Acidické prostředí vydrží zhruba do pátého dne, potom pH začne stoupat až na hodnotu 8,6 a prostředí už zůstane nadále alkalické.

Při zkoumání charakteru změn pH v okolí kolonie jsme zjistili, že alkalizace probíhá dříve v místech, kde je hustota kolonií lokálně zvýšena, což potvrzuje naše očekávání, že koncentrace signálu se lokálně zvyšuje. Příkladem je setkání dvou kolonií. Při vizualizaci pH v okolí takto sousedících kolonií pozorujeme zásaditou oblast na spojnici, kdežto na odlehlých stranách je hodnota pH v prostředí stále okolo 6.

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

Změny pH korelují se změnami struktur kolonie tak, jak se objevují v morfogenezi. Z předběžných výsledků lze stanovit, že struktura středu roste v prvním a částečně v druhém dni při neutrálním pH agarů. Struktura mezikruží se objeví během druhého dne, když vývoj kolonie vstoupí do kyselé fáze pravděpodobně způsobené metabolismem glukosy. Kyselá fáze je potom vystřídána fází alkalickou způsobenou produkcí čpavku, který byl již dříve určen jako faktor, který zprostředkovává přechod mezikruží v lem.



Ukázka vizualizace změn pH v okolí rostoucích kolonií:

nahore: Vývojová řada kolonie *S. marcescens* na agaru s pH indikátorem;

dole: interakce dvou F kolonií 4. den vývoje

„Gnotobiologické“ zkoumání *S. marcescens*, *S. rubidaea* a *E. coli*

Sledovali jsem rozmanité typy vzájemných interakcí mezi různými bakteriálními kmeny.

Nejprve jsme studovali vývoj kolonií různých kmenů ve vzájemném sousedství.

Kolonie *S. marcescens* vždy reaguje na cizí nárůst vytvořením širokého bílého lemu - nejprve směrem k cizímu nárůstu, potom po celém jejím obvodu.

Interakce *S. marcescens* se *S. rubidaea*:

Při přímém kontaktu kolonie *S. rubidaea* kolonii *S. marcescens* obrůstá kolem dokola tenkou linkou – což *S. marcescens* znemožní další rozrůstání. Tato tenká linka se potom mohutně rozroste.

Interakce *S. marcescens* s *E. coli*:

U *E. coli* pozorujeme výraznou inhibici růstu směrem k *S. marcescens*. Tato repulze se prohloubí, pokud budeme kolonie inokulovat do větší blízkosti nebo budeme *E. coli* inokulovat ke starší kolonii *S. marcescens*. Toto je pravděpodobně způsobeno působením tzv. marcescinu (Fuller & Horton, 1950) – tj. faktoru podobného colicinům.

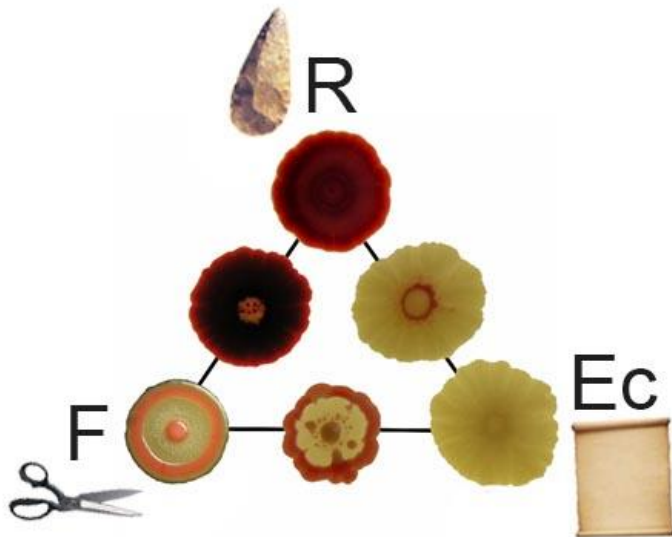
Interakce *S. rubidaea* a *E. coli*:

Při blízkém sousedství dojde k pohlcení kolonie *S. rubidaea* kolonií *E. coli*. Čím je jejich vzdálenost menší, tím výraznější je pohlcení.

Sledovali jsme vývoj směsi různých bakteriálních druhů – tzv. chimerické kolonie vzniklé inokulací v poměru 1:1.

V chimerických koloniích předpokládáme rovnoměrné rozložení bakterií obou typů po obvodu inokulační kapky, ale ve výsledku je okraj zcela zabrán jedním z partnerů. V tomto uspořádání se odráží již popsané vzájemné interakce, takže pozorujeme převahu *S. rubidaea* nad *S. marcescens*, kde *S. rubidaea* uplatní svou vlastnost obrůst, a převahu *E. coli* nad *S. rubidaea*, kde je vidět částečná snaha *S. rubidaea* o rozrůstání do prostoru, ale záhy je uvězněna proudy *E. coli*; v případě chiméry *S. marcescens* a *E. coli* jsme pozorovali obě varianty. Zda dojde k situaci, že se *E. coli* rozroste, předpokládáme, že záleží na prvních momentech po inokulaci, kde dojde k závodu zda se *E. coli* rozroste do prostoru a zamezí tak *S. marcescens* možnost dalšího rozrůstání, nebo jestli *S. marcescens* stihne dostatečně rychle vyprodukovat repulzní faktor a zabránit tak *E. coli* v růstu. Směs všech tří klonů potom ukazuje kombinaci všech předchozích interakcí. Pozorovali jsme dva možné výsledky: převahu *S. rubidaea*, nebo *E. coli*, kde předpokládáme, že znovu záleží na závodu *S. marcescens* a *E. coli* – vítěz se potom utká se *S. rubidaea*. Tyto vztahy jsme sumarizovali do systému analogického s hrou kámen-nůžky-papír.

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



Interakce *S. marcescens* (F), *S. rubidaea* (R) a *E. coli* (Ec) sumarizované do heterarchie připomínající hru kámen-nůžky-papír

Indukovaná resistance k ampicilinu

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

V případě výsevu *S. marcescens* jsme použili koncentraci ampicilinu v mediu 300 µg/ml. Na kontrolním ŽAG s ampicilinem i na ŽAG s ampicilinem vystavenému působení makuly F jsme růst kolonií nepozorovali. Avšak na ŽAG s ampicilinem vystavenému působení 0,1 % roztoku čpavku jsme pozorovali 33 % nárůst oproti kontrole.

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

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

Ve všech předchozích případech působení makul, nebo roztoku čpavku způsobilo alkalizaci prostředí v sousedním ŽAG s ampicilinem na hodnotu pH mezi 8,3 a 8,6 dále jsme vynechali čpavkový signál a vyvolali indukovanou resistenci pouze alkalickým prostředím.

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

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

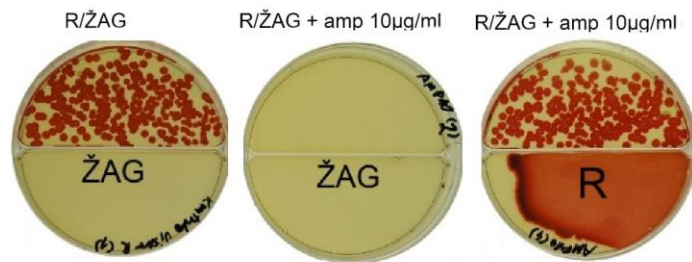
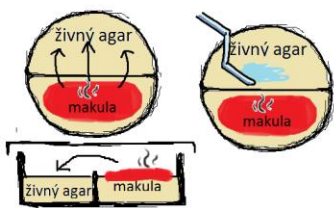
Ampicilin jsme před přidáním do ŽAG inkubovali v alkalickém prostředí co nejpodobnějším, jako je prostředí na miskách. Do zkumavky jsme aplikovali ŽBG, ampicilin a agens (amoniak nebo TRIS), kterým jsme zvyšovali pH na hodnotu cca 8,5 (což odpovídá hodnotě pH na ŽAG vystavenému třídennímu působení makul nebo roztoku čpavku) a ponechali 24h ve 27°C. Poté jsme tento roztok přidali do ŽAG tak, aby konečná teoretická koncentrace ampicilinu (tj. kdyby nedošlo k jeho rozkladu) odpovídala 300 µg/ml. Přidání roztoku neovlivnilo pH ŽAG a to zůstalo na hodnotě 7,2. Po vysetí *S. marcescens* na toto medium narostlo 47 % (při zvyšování pH čpavkem), resp. 100 % (při zvyšování pH TRISEm) kontroly na mediu bez ampicilinu.

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

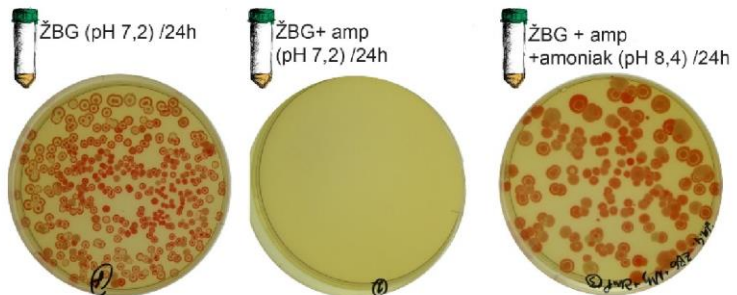
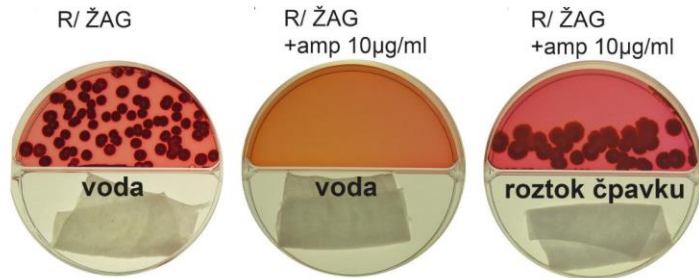
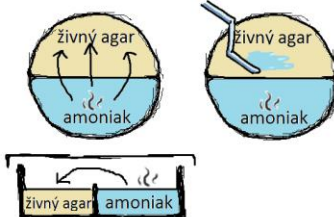
Abychom ověřili, zda ampicilin nerozkládá některá ze složek živného media, stejný postup jsme zopakovali za použití fosfátového pufru a TRISu. I zde došlo k inaktivaci ampicilinu.

Na základě výše uvedených výsledků jsme došli k závěru, že role čpavku při indukované resistenci na antibiotika spočívá v alkalizaci prostředí, ve kterém se ampicilin inaktivuje. Naše výsledky ovšem nevylučují i jinou roli čpavku při zvýšené resistenci, než inaktivaci antibiotika. Udělali jsme podobný pokus za použití amoniaku k ovlivnění bakterií před pobytem v antibiotiku. Naše předběžné výsledky naznačují, že u amoniakem ovlivněných bakterií také dochází ke zvýšení počtu přeživších v prostředí s antibiotiky – dostáváme čtyřnásobně více přeživších než neovlivněné populace.

Nejprve se makula nechá rozrůst (3 dny) a potom se do sousedního kompartmentu s ampicilinem přidá výsev bakterií



Stejná procedura, pouze se místo makuly použije roztok čpavku, výsev bakterií se provede okamžitě po aplikaci čpavku



Srovnání působení plynných látek produkovaných makulou a roztoku čpavku na bakterie rostoucí na mediu s ampicilinem a působení čpavku pouze na ampicilin:

nahore: vliv 3 dny staré makuly na "indukci resistance"

uprostřed: vliv roztoku čpavku na "indukci resistance"

dole: inaktivace ampicilinu roztokem čpavku

Závěry

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

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

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

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

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

Ve vývoji chimérických kolonií, složených ze směsi dvou klonů, se odráží již popsané vzájemné interakce. Tyto vztahy jsme sumarizovali do systému analogického s hrou kámen-nůžky-papír.

Zároveň pracujeme na vytvoření metody pro neinvazivní detekci poměrů jednotlivých klonů podle plynných fingerprintů.

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

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

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

Reference

- Ben-Jacob, E. (2003). Bacterial self-organization: co-enhancement of complexification and adaptability in a dynamic environment. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 361(1807), 1283–1312.
- Ben-Jacob, E., Cohen, I., & Gutnick, D. L. (1998). Cooperative organization of bacterial colonies: from genotype to morphotype. *Annual Reviews in Microbiology*, 52(1), 779–806.
- Bernier, S. P., Létoffé, S., Delepierre, M., & Ghigo, J. (2011). Biogenic ammonia modifies antibiotic resistance at a distance in physically separated bacteria. *Molecular microbiology*, 81(3), 705–716.
- Čepl, J. J., Pátková, I., Blahůšková, A., Cvrčková, F., & Markoš, A. (2010). Patterning of mutually interacting bacterial bodies: close contacts and airborne signals. *BMC microbiology*, 10(1), 139.
- Fuller, A. T., & Horton, J. M. (1950). Marcescin, an antibiotic substance from *Serratia marcescens*. *Journal of General Microbiology*, 4(3), 417–433.
- Heal, R. D., & Parsons, A. T. (2002). Novel intercellular communication system in *Escherichia coli* that confers antibiotic resistance between physically separated populations. *Journal of applied microbiology*, 92(6), 1116–1122.
- Lu, L. (2004). Autoinducer 2-based quorum sensing response of *Escherichia coli* to sub-therapeutic tetracycline exposure. Texas A&M University.

- Miller, C., Thomsen, L. E., Gaggero, C., Mosseri, R., Ingmer, H., & Cohen, S. N. (2004). SOS response induction by β -lactams and bacterial defense against antibiotic lethality. *Science*, 305(5690), 1629–1631.
- Neubauer, Z. (2002). *Biomoc*. Malvern.
- Nijland, R., & Burgess, J. G. (2010). Bacterial olfaction. *Biotechnology journal*, 5(9), 974–977.
- Rieger, T., Neubauer, Z., Blahuskova, A., Cvrčková, F., & Markos, A. (2008). Bacterial body plans: colony ontogeny in *Serratia marcescens*. *Communicative & integrative biology*, 1(1), 78–87.
- Shapiro, James A. (1995). The significances of bacterial colony patterns. *Bioessays*, 17(7), 597–607.
- Shapiro, James Alan, & Dworkin, M. (1997). *Bacteria as multicellular organisms*. Oxford University Press New York.
- Sole, M., Francia, A., Rius, N., & Loren, J. G. (1997). The role of pH in the “glucose effect” on prodigiosin production by non-proliferating cells of *Serratia marcescens*. *Letters in applied microbiology*, 25(2), 81–84.
- Solé, M., Rius, N., Francia, A., & Loren, J. G. (1994). The effect of pH on prodigiosin production by non-proliferating cells of *Serratia marcescens*. *Letters in applied microbiology*, 19(5), 341–344.
- Solé, M., Rius, N., & Lorén, J. G. (2010). Rapid extracellular acidification induced by glucose metabolism in non-proliferating cells of *Serratia marcescens*. *International Microbiology*, 3(1), 39–43.

Introduction

Great systematist, Carl von Linné, ranked all microscopic organisms, without further specification, in the class "chaos". And to make clear that he did not intend to deal with them any further, he added a statement: "God did not want us to learn about microscopic organisms, so he made them so small."

To some extent, Linné's objection is still valid - microscopic organisms can be seen only by their collective manifestations - epiphenomena - concomitants of their hidden life. We can see only their impact on our macroscopic world (e.g. fermentation, disease), but not them. Armed with a scientific devices we can see - in terms of detection of chemicals, reading sequences of DNA, viewing images from the microscope, etc. - bacterial symptoms in detail, but again, we almost lack direct experience with them - we do not have access to the bacteria in the original, we only get the mediated data.

Similarly, we do not have direct experience with individual cells in the body of the mouse, but we can have direct experience with the mouse itself. Macroscopic colonies offer such unique opportunity from bacterial world. We started to think about bacterial colonies as multicellular bodies with their own ontogenesis (Rieger et al., 2008; Neubauer, 2002). We see bacterial colonies throughout the work primarily from this point of view, not as an epiphenomenon or the random accumulation of bacteria, but as multicellular, or better proto-multicellular bacterial body (Ben-Jacob, et al., 1998; Ben-Jacob, 2003; James A Shapiro, 1995; James Alan Shapiro & Dworkin, 1997).

Serratia marcescens

Our model organism is *Serratia marcescens*, morphotype F. It was named by the appearance of it's colonies, which, thanks to elevated navel, lower interstitial ring and again elevated rim reminds fountain.

Clearly structured profile of colonies together with changes of coloration of structures, without need of artificial visualization, provides the advantage for observing differentiation in the colonies (Shapiro 1995). The differentiation and morphogenesis of the F colonies becomes the subject of interest to our group (Čepl et al., 2010; Rieger et al., 2008).

During morphogenesis of F colonies, we recorded three critical points:

Growth of the central navel and the transition to interstitial ring structure

The central navel is developed during the first and second day of colony development to diameter of 2 mm, or on the entire surface area of the inoculation. Growth of the interstitial ring structure follows, but only if the colony does not exceed a critical diameter for the growth of the interstitial ring and its surroundings does not exceeds critical amount of signals from other colonies. The factor that determines the transition central navel- interstitial ring, was not identified this phase of the research.

Growth of the interstitial ring and the transition to the rim structure

Interstitial ring normally grows between the second and the fifth day to the diameter of colony 10 mm, and then due to a factor that is produced by the growth of clone F, transfers into the rim structure. Increasing the concentration of the factor by another growth, even behind a partition, or by the local accumulation (e.g. edge of agar) to the value that overcomes the critical concentration, leads to the stop of the interstitial ring structure development and start of growth of the rim structure.

Growth of the rim and the stop of the growth of colonies

Rim normally grows between the fifth and seventh day till colony diameter about 14.5 mm. If the inoculum disc is greater than the a critical diameter for the growth of the interstitial ring, central navel and rim structure merge together. The diameter of such body will have a size of inoculation plus increment about 2 mm on each side. Colony size is smaller in an environment poor in nutrients, in heavy growth, in the limited space, near developed colony or near the macula.

Material and Methods

To study morphogenesis of colonies, we used mainly classical microbiological techniques; documentation was done by Olympus C-5050ZOOM with the transilluminator (Fomei, LP-400) or under a binocular magnifier; for time-lapse videos we used QuickPHOTO software. To verify the kinship of clones we compared PCR fingerprints; gas analysis was done using the SIFT-MS method.

Aims

The first goal was to develop a theme of morphogenesis of *S. marcescens* colonies, morphotype F, and try to identify gas morphogen responsible for the transition from the interstitial ring structure to the rim structure and further characterize any other factors that might be involved in the morphogenesis of colony.

In addition to the factors influencing the morphogenesis of *S. marcescens* alone we were interested also if we'll see effect of the factors derived from other organisms. Other bacterial strains may contribute with new quality in subsequent interactions. Our next goal was to characterize such interspecific interactions and monitor their effect on the morphogenesis of F colony.

Ammonia, which was in the course of work identified as one of the factors affecting the morphogenesis of the colony, was also described as a factor inducing resistance to antibiotics. Our next goal was to study the phenomenon of induced resistance to antibiotics described in (Bernier et al., 2011; Heal & Parsons, 2002; Lu, 2004) in our model organisms.

Results

Morphogenesis

We identified the factor that affects interstitial ring-rim transition as ammonia. At a concentration of 0.1% ammonia solution, we observed degree of influence at F colonies morphogenesis similar to previously observed effect of 3 days old macula separated in other part of segmented Petri dish - i.e. colonies of normal size, but without the typical F structure. We showed that bacterial growth itself produces ammonia: gas analysis method SIFT-MS revealed in the gas phase above three days old macula concentration of ammonia in the

amount of 27 185 ppb (parts per billion), which is about 150 times more than was measured above the control nutrient medium .

We have also observed changes in pH in medium near colonies using pH indicator (phenolred). As expected, ammonia alkalized environment. Furthermore, we found that during the first two days near colonies (despite the buffering capacity of the nutrient agar), pH is lowered from the initial 7.2 to about 6. Acidic environment lasts until about the fifth day, then the pH will rise up to 8.6 and it will remain alkaline. pH changes correlate with changes in colony structures as they appear in the morphogenesis.

When examining the nature of the changes in pH around the colony, we saw that alkalization takes place earlier in areas where the density of the colonies is locally increased, which confirms our expectation that the concentration of signal can be locally accumulated. An example is the encounter of two colonies. When visualizing pH in the vicinity of neighboring colonies, we can observe alkaline region at the junction, while around the remote sides of colonies, the pH of the environment is still around 6.

From preliminary results can be indicated that the structure of central navel grows in the first and partly in the second day at neutral pH as a default growth. The structure of the interstitial ring appears on the second day, when the development of the colony enters the acidic phase, probably due to the metabolism of glucose. The acidic phase is then replaced by alkaline phase caused by the production of ammonia, which was previously identified as a factor that mediates interstitial ring-rim transition.

„Gnotobiological“ examination of *S. marcescens*, *S. rubidaea* and *E. coli*

As expected, we observed various types of interactions:

Colonies F always reacts to foreign growth by creating broad white rim - at first towards a foreign growth, then all around its perimeter.

Interaction of *S. marcescens* and *S. rubidaea*: at first, *S. rubidaea* colonies envelop *S. marcescens* colonies with thin line - which prevents *S. marcescens* from further grow.

Interaction of *S. marcescens* and *E. coli*: We observe significant inhibition of *E. coli* growth toward *S. marcescens*. This repulsion will increase if we inoculate colonies into closer vicinity or inoculate *E.coli* to the older F colony. This is probably due to the effect of the marcescin (Fuller & Horton, 1950) - i.e. factor like colicin.

Interaction of *S. rubidaea* and *E. coli*: In the close vicinity, *E. coli* colony tends to absorb *S. rubidaea* colonies. Lesser the distance is, the greater is the absorption.

In the chimeric colonies, we assume the uniform distribution of both types of bacteria on perimeter droplets after inoculation, but the result is completely confiscated edge by one of the partners. In this annexation are reflected described interactions, as we observe victory of *S. rubidaea* over *S. marcescens*, where *S. rubidaea* applies its feature to wrap its *S. marcescens* partner; a victory of *E. coli* over *S. rubidaea*, where we can see a partial effort of *S. rubidaea* to grow, but it is trapped by currents of *E. coli* growth. In the case of *S. marcescens* and *E. coli* chimera we observed both variants of victory. We suppose that it depends on the first moments after inoculation, when occurs the race if *E. coli* grows in space and thus cuts off *S. marcescens* from sources and from the possibility of further growth, or whether *S. marcescens* manages to produce a repulsion factor fast enough and prevent *E. coli* from growth. A mixture of all three clones then shows a combination of all previous interactions and we observe two possible outcomes: victory of *S. rubidaea*, or *E. coli*, where we assume that again depends on the struggle between *S. marcescens* and *E. coli* - the winner will then compete with *S. rubidaea*. These interactions are summarized in system analogous with the game of rock-paper-scissors.

Induced resistance to ampicillin

We tested whether the observed phenomenon of induced resistance can be seen even in our system with *S. marcescens*, *S. rubidaea* and *E. coli*. To get the induced resistance, we used segmented Petri dish, where in one compartment was nutrient agar with glucose (= NAG) without antibiotics, on which we inoculated either *S. marcescens*, *S. rubidaea* macula, or ammonia solution and in the second compartment was NAG with ampicillin. Macula and ammonia solution were kept for three days and influenced NAG with ampicillin by its gaseous phase. After three days, we sown *S. marcescens*, *S. rubidaea* or *E. coli* on nutrient agar with ampicillin influenced by gaseous phase of maculae or ammonia solution.

In the case of sowing *S. marcescens*, on the control NAG with ampicillin (300 µg/ml) as well as on NAG with ampicillin exposed to effect of *S. marcescens* or *S. rubidaea* macula, we haven't seen any colony growth. However, on NAG with ampicillin exposed to 0.1 % ammonia solution, we observed a 33 % growth compared to the control.

In case of a similar experiment with *S. rubidaea*, on NAG with ampicillin (10 µg/ml) under three days of influence of *S. marcescens* or *S. rubidaea* or ammonia solution grew 100 % of colonies compared to control.

In case of a similar experiment with *E. coli*, on NAG with ampicillin (10 µg/ml) under three days of influence of *S. marcescens* or *S. rubidaea*, we haven't seen any colony growth, on

NAG with ampicillin exposed to 0.1 % ammonia solution, we observed a 100 % growth compared to the control.

In all previous cases, maculae or ammonia solution caused alkalization in neighboring agar with ampicillin to pH value from 8.3 to 8.6. We have tried to substitute the ammonia signal with only alkalization of media.

In NAG with 300 µg/ml ampicillin were applied solution of TRIS so that the pH is increased to 8.5. At such medium, we sown *S. marcescens* colonies and get grown to 69 % compared to the control. This shows that impact of ammonia is in the increasing of pH.

We separated the process of alkalizing medium with ampicillin and the bacterial growth.

We made an experiment where we treated ampicillin in alkaline solution as similar to the environment on the plates as possible, before adding to NAG: In the test tube, we applied nutrient broth, ampicillin and an agent (ammonia or TRIS) to increase the pH to about 8.5 (which corresponds to a pH value of to NAG exposed for three days to the effects macula or ammonia) and left for 24 hours in 27°C. Then we added this solution to NAG so the theoretical final concentration of ampicillin (i.e. if not decomposed) corresponded to 300 µg/ml. The addition of this solution did not affect the pH of NAG and it remained 7.2. After sowing of *S. marcescens* on this medium, we saw 47 % (when raising the pH by ammonia), respectively 100 % (when raising the pH by TRIS) of control growth on media without ampicillin.

When we applied to the test tube solution of nutrient broth and an ampicillin only (pH of the solution was 7.2), and left for 24 hours in 27°C and then mixed with NAG (theoretical concentration of ampicillin was 300 µg/ml), *S. marcescens* sown on media will not grow.

Based on the results above, we conclude that the role of ammonia in the phenomenon of induced resistance to antibiotics involves alkalization of the environment in which is the ampicillin inactivated. Support for this hypothesis can be find in the literature.

However, our results do not exclude a different role of ammonia in the resistance rising than destruction antibiotics.

We did experiment using ammonia to affect the bacteria prior to their stay in the ampicillin. Our preliminary results suggest that ammonia also affect bacteria to increase the number of survivors in an environment with ampicillin – we have seen four times more survivors than the unaffected population.

Summary

Unlike conventional multicellular organisms, bacteria lack their own system of isolation from external influences for the purpose of ontogeny. We can provide environment of the Petri dish in which the colony will be isolated from outside relationships. The morphogenesis of the multicellular unit - colonies will appear here.

Building on previous findings, we have identified ammonia as a morphogen causing the transition from growth of interstitial ring to the growth of rim structure.

During the development of the colony, we have also experienced changes of pH of the medium in its vicinity - at first acidification of neighborhood (pH 7.2 -> pH 6) within a distance of several millimeters from the edge of colony, and later alkalization of the environment to the value of pH 8.6, to the extent of the entire Petri dish. Transitions of these three phases (neutral, acidic and alkaline) time-correlated with changes in the growth of the structures of colony (central navel, interstitial ring, outer rim). Acidification of the media is probably caused by products of metabolism of glucose. In the medium without glucose, acidification have not been seen. Factor that causes the transition from acidic to alkaline phase was again identified as ammonia.

It seems that acidification of media is important for the growth of interstitial ring structure, but at the same time, it is not the only condition. It is illustrated by the case of growth on the medium with ampicillin in the range of 10 µg/ml to 200 µg/ml, where the acidic phase of growth of colonies is observed, but the structure of interstitial ring does not appear.

In „gnotobiological“ examinations we observed various types of interactions:

Colonies F always reacts to foreign growth by creating broad white rim - at first towards a foreign growth, then all around its perimeter.

Interaction of *S. marcescens* and *S. rubidaea*: at first, *S. rubidaea* colonies envelop *S. marcescens* colonies with thin line - which prevents *S. marcescens* from further grow.

Interaction of *S. marcescens* and *E. coli*: We observe significant inhibition of *E. coli* growth toward *S. marcescens*. This repulsion will increase if we inoculate colonies into closer vicinity or inoculate *E. coli* to the older F colony. This is probably due to the effect of the marcescin (Fuller & Horton, 1950) - i.e. factor like colicin.

Interaction of *S. rubidaea* and *E. coli*: In the close vicinity, *E. coli* colony tends to absorb *S. rubidaea* colonies. Lesser the distance is, the greater is the absorption.

In case of chimeric colonies are reflected interactions as described above. These interactions are summarized in system analogous with the game of rock-paper-scissors.

We have shown the effect of the ampicillin on the colony morphogenesis of *S. marcescens* morphotype F from levels far lower than those that would reduce the number of colonies in sowing on the dish.

Explanations of induced resistance to ampicillin observed Heal & Parsons and explained by Bernier et al., that involves modifying of the physiology of bacteria towards resistance is not consistent in our system. We have shown that the key role of ammonia in the induced resistance to antibiotics is in alkalization of the environment in which is the ampicillin inactivated.

But this does not directly rule out a role of ammonia in changing the physiology of bacteria towards increased resistance to antibiotics. According to our preliminary results, bacteria exposed to ammonia immediately before stay in an environment with ampicillin survived four more against unaffected controls.

References

- Ben-Jacob, E. (2003). Bacterial self-organization: co-enhancement of complexification and adaptability in a dynamic environment. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 361(1807), 1283–1312.
- Ben-Jacob, E., Cohen, I., & Gutnick, D. L. (1998). Cooperative organization of bacterial colonies: from genotype to morphotype. *Annual Reviews in Microbiology*, 52(1), 779–806.
- Bernier, S. P., Létoffé, S., Delepierre, M., & Ghigo, J. (2011). Biogenic ammonia modifies antibiotic resistance at a distance in physically separated bacteria. *Molecular microbiology*, 81(3), 705–716.
- Čepl, J. J., Pátková, I., Blahůšková, A., Cvrčková, F., & Markoš, A. (2010). Patterning of mutually interacting bacterial bodies: close contacts and airborne signals. *BMC microbiology*, 10(1), 139.
- Fuller, A. T., & Horton, J. M. (1950). Marcescin, an antibiotic substance from *Serratia marcescens*. *Journal of General Microbiology*, 4(3), 417–433.

- Heal, R. D., & Parsons, A. T. (2002). Novel intercellular communication system in *Escherichia coli* that confers antibiotic resistance between physically separated populations. *Journal of applied microbiology*, *92*(6), 1116–1122.
- Kaprálék F (1999). *Základy bakteriologie*, Karolinum
- Lu, L. (2004). Autoinducer 2-based quorum sensing response of *Escherichia coli* to sub-therapeutic tetracycline exposure. Texas A&M University.
- Miller, C., Thomsen, L. E., Gaggero, C., Mosseri, R., Ingmer, H., & Cohen, S. N. (2004). SOS response induction by β -lactams and bacterial defense against antibiotic lethality. *Science*, *305*(5690), 1629–1631.
- Neubauer, Z. (2002). *Biomoc*. Malvern.
- Nijland, R., & Burgess, J. G. (2010). Bacterial olfaction. *Biotechnology journal*, *5*(9), 974–977.
- Rieger, T., Neubauer, Z., Blahuskova, A., Cvrčková, F., & Markos, A. (2008). Bacterial body plans: colony ontogeny in *Serratia marcescens*. *Communicative & integrative biology*, *1*(1), 78–87.
- Shapiro, James A. (1995). The significances of bacterial colony patterns. *Bioessays*, *17*(7), 597–607.
- Shapiro, James Alan, & Dworkin, M. (1997). *Bacteria as multicellular organisms*. Oxford University Press New York.
- Sole, M., Francia, A., Rius, N., & Loren, J. G. (1997). The role of pH in the “glucose effect” on prodigiosin production by non-proliferating cells of *Serratia marcescens*. *Letters in applied microbiology*, *25*(2), 81–84.
- Solé, M., Rius, N., Francia, A., & Loren, J. G. (1994). The effect of pH on prodigiosin production by non-proliferating cells of *Serratia marcescens*. *Letters in applied microbiology*, *19*(5), 341–344.
- Solé, M., Rius, N., & Lorén, J. G. (2010). Rapid extracellular acidification induced by glucose metabolism in non-proliferating cells of *Serratia marcescens*. *International Microbiology*, *3*(1), 39–43.

Jméno a příjmení: Jaroslav Čepl

Narozen: 10.9. 1985

Adresa: Dobroského 2021, 580 01 Havlíčkův Brod

Vzdělání:**2010-**

Doktorský program teoretická a evoluční biologie

Karlova univerzita v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra filosofie a dějin přírodních věd

2008-2010

Magisterský obor Teoretická a evoluční biologie

Karlova univerzita v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra filosofie a dějin přírodních věd

Diplomová práce: Signalizace ve vývoji bakteriálních kolonií

2005-2008

Bakalářský obor Molekulární biologie a biochemie organismů;

Bakalářská práce: Morfogeneze bakteriálních kolonií

Pracovní pozice:**2010-**

Výzkumný asistent; Karlova univerzita v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra filosofie a dějin přírodních věd

Pedagogická činnost:

- Život, informace, jazyk

- Evoluce života a jazyka

Filosofická fakulta, Universita Palackého v Olomouci

Publikace:

Real time monitoring of population dynamics in concurrent bacterial growth using SIFT-MS quantification of volatile metabolites.(2013). Sovová, K., Čepl, J., Markoš, A. & Španěl, P. Analyst (IF 3,96)

Developmental plasticity of bacterial colonies and consortia in germ-free and gnotobiotic settings. Pátková, I., Čepl, J., Rieger, T., Blahůšková, A., Neubauer, Z. & Markoš, A. (2012). BMC microbiology, 12(1), 178. (IF 3,10)

Patterning of mutually interacting bacterial bodies: close contacts and airborne signals. Čepl, J., Pátková, I., Blahůšková, A., Cvrčková, F. & Markoš, A. (2010). BMC microbiology, 10(1), 139. (IF 3,10)