

Posudek oponenta na disertační práci RNDr. Jaroslava Čeply
„Morfogeneze bakteriálních kolonií“

Práce autora disertace RNDr. Jaroslava Čeply se zabývá tématem, které je v současné mikrobiologii málo zpracovávané - zkoumáním vývoje bakteriálních kolonií s neobvyklou a podle mého s velmi paradoxní morfologií. Zabývá se možností jejího ovlivňování, pokusem o vysvětlení sil, které k této morfologii vedou, komunikací mezi koloniemi, interakčními signály mezi koloniemi, mezidruhovými interakcemi mezi koloniemi a souvislostí mezi produkcí amoniaku jako nástroje mezibuněčné komunikace a rezistencí k antibiotikům. Práce je založena na třech článcích – dvou publikovaných (BMC Microbiology a Analyst) a třetím připraveném k publikaci.

Oponent se nejprve musí vyjádřit k publikovaným pracím. Většinou prohlásí (a je to i můj případ), že práce posuzovali kvalifikovaní oponenti v impaktovaném časopise s dobrým IF, takže k článkům, jejich koncepci, výsledkům a diskuzi není co dodat. Oponentovi tedy nezbývá než oponovat úvodní text práce samotné a podívat se, jak si doktorand poradil s digestem publikovaných i nepublikovaných výsledků, který by, pokud to jde, měl budit dojem celku.

Jaroslav Čepl měl to štěstí, že pracoval v podstatě monotématicky – pokoušel se vysvětlit morfologické vlastnosti kolonie *Serratia marcescens*, mezidruhové interakce s koloniemi jiných organismů, použitelnost analytického sledování plyných metabolických produktů pro výzkum mezidruhových interakcí a dále možnými důsledky metabolismu *Serratia* pro antibiotika přítomná v blízkosti kolonií. Jeho práce jsou společně s pracemi jeho kolegů a předchůdců vyvrcholením snahy vidět vizuálně atraktivní kolonie *Serratia* jako organismy a zkoumat je jako celky a výsledky morfogeneze. Tato snaha sahá daleko do minulosti a byla možná někdy vnímána jako jakási libůstka vycházející z atraktivních a podivně se v čase chovajících bakteriálních kolonií *Serratia*. Musím velmi ocenit, že se autorovi a jeho kolegům podařilo vědecký svět přesvědčit, že má takový přístup v mikrobiologii místo a že lze nesmírně jednoduchými prostředky zjistit podstatná data.

Je otázka, jakou úlohu by měl přesně plnit úvod k publikovaným pracím. Jaroslav Čepl se snažil o stručný přehled zásadních pokusů, vysvětlení jejich výsledků a o jejich diskuzi. Musím napsat, že se mu to podařilo s určitými výhradami a že je v úvodu hodně poměrně zkratkovitých a trochu dogmatických tvrzení, že jde občas o digest v horším smyslu. Nedá se nic dělat, ale úvody v původních publikovaných pracích, tamní popisy experimentů i diskuze jsou přece jen pojednány na podstatně větší ploše nebo jsou formulované daleko přesvědčivěji než v úvodu dizertační práce. Nakonec, čtenář se vždycky může podívat do výchozího článku a posoudit, nakolik Úvod něco opomenul, co zjednodušil až příliš. Nebudu jako doklad svého tvrzení dávat více příkladů s cílem poučit autora, protože jsem názoru, že další Úvod k dizertaci už doktorand psát nebude a že se při psaní vlastních článků naučil, co bylo zapotřebí.

Jako malý příklad bych dal část popisu, kterým autor shrnuje a vysvětluje, co je kritické pro vývoj tzv. mezikruží v kolonii *S.marcescens* morfotypu F.:

Str. 24: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.

Komentář: čtenář tady musí dlouho přemýšlet, jak si tyto značně neurčité výroky vyložit ve světle toho, co už přečetl.

Model morfogeneze na obr. 2.16 by si take zasloužil podrobnější vysvětlení.

Vcelku ale úvod samozřejmě dává představu o tom, co všechno autor udělal, je vybaven velmi pěknou dokumentací a ukazuje, že je téma dobře a z mnoha stran zpracované a dává v mnoha případech odpovědi na otázky, které vyvolává morfogeneze kmene F a ostatní

témata. Naprosto mě přesvědčil, že autor předvádí spoustu reprodukovatelných výsledků a že umí postavit zajímavé experimenty.

Před otázkami pro autora ještě pár poznámek k tématu práce, do kterého jsem pronikal, přiznám se, velmi obtížně. Pokud se v současnosti mikrobiologové zabývají fyziologií a komunikací usedle žijících bakterií, tak se soustředí především na biofilmy, případně na souvislost quorum sensingu a biofilmu a většinou je nezajímají vztahy buněk v plně narostlé kolonii organismů na Petriho misce. Pro mikrobiálního fyziologa zvyklého na kulturu rostoucí v suspenzi je tu dost důvodů, proč kolonii jako objekt výzkumu ignorovat. U starší a plně vyvinuté kolonie se vždy nabízí výhrada, že jde o arteficiálně zbytnělou mikrokolonii, která se zmitá ve vlastních problémech, kterými jsou

- 1) příliš pomalá difuze živin, která nestačí zásobit rychle rostoucí biomasu
- 2) v konkrétním případě morfotypu F přechod mezi glukózou jako zdrojem C a aminokyselinami jako zdrojem C po vyčerpání glukózy (moje domněnka)
- 3) metabolické rozrušení aerobní svrchní ale živinami hůře zásobené vrstvy kolonie a spodní anaerobní vrstvy s jiným metabolismem, která je ale ale lépe zásobená
- 4) Růst do stran a do výšky mechanickými tlaky rostoucích buněk, možná s pohybem pomocí bičíků po agaru
- 5) Nestejné fáze růstu v různých oblastech, růstovou fází ovlivněná tvorbu sekundárních metabolitů.

Je tu směs metabolismů, růstových fází, signalizace, stresů.

Na druhé straně je možné výslednou morfologii tohoto složitého „těla“ přijmout jako fakt, případně východisko pro zkoumání, což udělal autor a jeho kolegové. Je k tomu určitě zapotřebí odvahy, protože náhledy J.A. Shapiro zatím v mikrobiologické komunitě nezdolaly.

Musím se přiznat, že mi morfotyp F jako model pro výzkum připadá příliš složitý. Obsahuje totiž paradox, který se velmi těžko vysvětluje – jde o to, že střed kolonie a okraj vypadají stejně. Pokud totiž přemýšlím jako bakteriální fyziolog a vycházím z problémů uvedených nahoře, připadá mi, že je F morfotyp výsledkem velmi složité nestabilní (ale reprodukovatelné) situace. Ale autoři prací tento problém přesto úspěšně uchopili.

K autorovi bych měl několik otázek – je to zlomek z toho, co člověka u tohoto tématu napadne a týká se vlastně hlavně morfotypu F:

- 1) Pokud bakterie využívá aminokyseliny jako zdroje uhlíku, je nutným produktem jejich deaminace amoniak. Předpokládáte, že produkce amoniaku je důsledkem vyčerpání glukózy v médiu a přechodu k aminokyselinám jako zdroji C ?
- 2) Předpokládáte, že acidifikace je důsledkem fermentace glukózy v mezikruží v důsledku vyčerpání kyslíku? Jaké mohou být důvody toho, že se prodigiosin netvoří v mezikruží, ale na okraji a ve středu ano? Jaké by mohly být předpoklady jeho tvorby? pH? Stáří? Quorum sensing? Pokuste se prosím vysvětlit tento paradox, který mě nejvíc zajímá.
- 3) Dívali jste se na buňky lemu a středu s ohledem na přítomnost pouzdra? Je výška středu a lemu způsobena vyšší vrstvou buněk nebo pouzdrům (o kterém jenom spekuluji, vycházím z různého charakteru kolonie v mezikruží, středu a okraji). Mohlo by pouzdro například zabránit acidifikaci z okolí a napomoci tak tvorbě prodigiosinu? V práci píšete o tom, že je ve středu a v lemu „hustota kolonie lokálně zvýšena“ (str. 27)
- 4) V kapitole “4.1. Změna morfotypu *S. marcescens*” pro mě trochu nepochopitelně trápíte v tekutém médiu morfotyp F tak dlouho, až sice roste na minerálním médiu, ale netvoří na komplexním médiu morfotyp F. Bylo možné v průběhu této selekce izolovat morfotyp F, který roste na minerálním médiu? Tvoří prototrofní kmeny

Serratia marcescens na minerálním médiu prodigiosin? Znamenalo by to, že by buňky tvořily amoniak jako signální molekulu a ne jako metabolický odpad.

- 5) Byla kultivace pro “plynné fingerprinty” anaerobní? Vháněl se vzduch pod hladinu nebo nad hladinu? V článku to řečeno není.

Neodpustím si ještě poznámku, která se týká tématu jako takového: Práce i články vycházejí z morfologického a „organizmálního“ pohledu na věc, který dává představy pro mě občas nečekané. Například v závěrech článku Pátkové a kol. (BMC Microbiology, 2010) se píše: „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”.

Komentář: Text dává představu, že se kolonie chová jako organizmus, dává něčemu přednost. Pro mě je to trochu nepřirozené – “kanál” volného místa mezi koloniemi nepovažuji za náklonnost kolonie k volnému místu kolem sebe, ale třeba za důsledek vyčerpání živin na spojnici mezi koloniemi – což je určitě možný a třeba jediný důvod v některých případech. Poměrně často se v úvodu a člancích mluví o tom, že kolonie vytváří určitou strukturu, aby se s něčím vyrovnala. Autoři zároveň mluví o tom, že morfogenetické změny kolonie vznikají náhodnou kombinací různých faktorů při růstu a nejsou evolučním přizpůsobením struktury, kterou obdivujeme na miskách (ale v přírodě se nevyskytuje). Formulovat závěry mezi těmito extrémami není jednoduché. Některé představy o organizmálním charakteru kolonie mi, pokud nejsou doprovázeny vysvětlením na fyziologické úrovni, prostě nějak “nesedí”. Na druhé straně uznávám, že jde v těchto formulacích především o produktivní provokaci.

Disertační práce Jaroslava Čepla je nepochybně práce objevná, výsledky jsou cenné, autor určitě prokázal svou kvalifikaci pro vědecký život a další vědeckou kariéru. Proto navrhuji jeho práci k přijetí jako dizertační práci.

V Praze dne 4.11.2013

Doc. RNDr. Ivo Konopásek, CSc.