

## 環境条件の違いによる微生物の増殖過程とパターン形成

榎原周平<sup>†</sup> 三輪佳奈美<sup>†</sup> 中桐齊之<sup>†</sup>兵庫県立大学 環境人間学部 環境人間学科<sup>†</sup>

## 1. はじめに

## 1.1 微生物とパターン形成について

大腸菌や枯草菌などの細菌は多細胞生物とは異なり、個々の細胞が情報のやりとりをすることなく、独自に生育しているかのように見える。しかし、実際はバラバラではなくコロニー（集落）を形成しており、このコロニーの大きさや形態が環境条件により変化することが知られている。

これまでに松下らは、土壌などに広く分布している枯草菌 (*Bacillus subtilis*) を用いて、寒天濃度と栄養濃度（ペプトン）の2つのファクターを変化させたときのコロニー形成に及ぼす影響について検討している [1]。寒天は細菌が生育する足場となり、濃度が低ければ柔らかく能動的に移動しやすい。一方、ペプトンの濃度が高ければ生育が促進される。従って、寒天濃度が高く、ペプトン濃度が低い条件下では枯草菌にとって生育条件として非常に悪い。このような環境下では、菌は、高度に枝分かかれして増殖し、このコロニー形成パターンが DLA (diffusion limited aggregation; 拡散に支配された凝集) モデルに非常に近似していることが分かっている。

## 1.2 ビオチンについて

ビオチンとは水溶性ビタミンの1つで、酵母の増殖促進因子の一つとして卵黄から発見された。動物ではビオチンはカルボキシラーゼの補酵素として炭酸固定反応や炭酸転移反応に関与し、糖新生、脂肪酸合成、分枝鎖アミノ酸の代謝に必須の微量栄養素である。ビオチンが欠乏すると皮膚炎や脱毛を呈することが報告されている。

ビオチンなどの水溶性ビタミンを定量する方法には理化学的方法や動物の成長を指標とする方法がある。しかし簡便で安価な方法として、微生物学定量法（バイオアッセイ法）が広く用いられている [2]。この方法は、ある微生物が生育するためには特定のビタミンを必要とするという性質を利用して、その生育度からビタミン量を測定する方法である。大腸菌、乳酸菌、枯草菌、酵母などが用いられている。この方法では微生物を液体培養して定量されることが多いが、固形培養中のコロニーの広がりや計測する場合もある。

枯草菌の一種である *Bacillus subtilis natto* は一般に納豆菌と呼ばれ、生育にビオチンを要求することが知られている。このため、ビオチン濃度により菌の増殖過程やパターン形成に及ぼす影響について興味を持った。

## 2. 環境条件の違いによるコロニー形成について

本実験では、*Bacillus subtilis* (NBRC 3134)、を用いた。Polypepton 10 g/L、Yeast extract 2 g/L、MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 1g/L、Agar 15g/Lを含む斜面培地で培養したものを保存菌株とした。実験前日に Agar を含まない培養液で一晩培養したものを、試験菌液とした。

平板寒天培地は以下のように調製した。NaCl 5g/L、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5g/L、種々の濃度のペプトン及び寒天を混合し、pH7.1 に調製した。オートクレーブ滅菌 (121°C、15分) 後、9 cm の平板プラスチックシャーレに流し入れた。冷却後、試験菌液を 1μL 植菌した。本実験では、ペプトン濃度が高いほどコロニーが大きくなったが、寒天濃度によるコロニーのパターン形成に影響は見られなかった (Fig. 1)。

Effect of environmental conditions on bacterial growth and pattern formation.

<sup>†</sup> Shuhei Ebara, Kanami Miwa, Nariyuki Nakagiri  
School of Human Science & Environment  
University of Hyogo

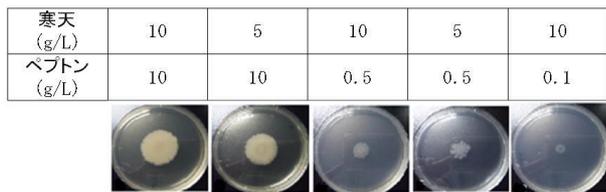


Fig. 1, *Bacillus subtilis* の生育に及ぼす寒天、ペプトン濃度の影響

### 3. ビオチン濃度の違いがコロニー形成に及ぼす影響について

本実験では、*Bacillus subtilis* (NBRC 3134)及び納豆菌 *Bacillus subtilis natto* (JCM 20036) を用いた。平板寒天培地は以下のように調製した。NaCl 5g/L、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5g/L を溶解し、さらにペプトン (0.01~10 g/L)、ビオチン (10<sup>-7</sup>~10<sup>-1</sup> mg/L) を添加した。寒天は 10 g/Lとし、pH7.1に調製した。オートクレーブ滅菌 (121°C、15分) 後、5 cm 平板プラスチックシャーレに流し入れた。

納豆菌においては、*Bacillus subtilis* (NBRC 3134)と比べて同一培養条件下において高度に枝分かれして増殖していた。これは菌株によって運動性あるいは増殖能に違いがあるためと考えられた(Fig. 2、3)。

ビオチン濃度によるパターン形成に違いは見られなかった。これはペプトンにビオチンが含まれており、違いが確認できなかった可能性が考えられた。そこで、カゼインの酸加水分解物

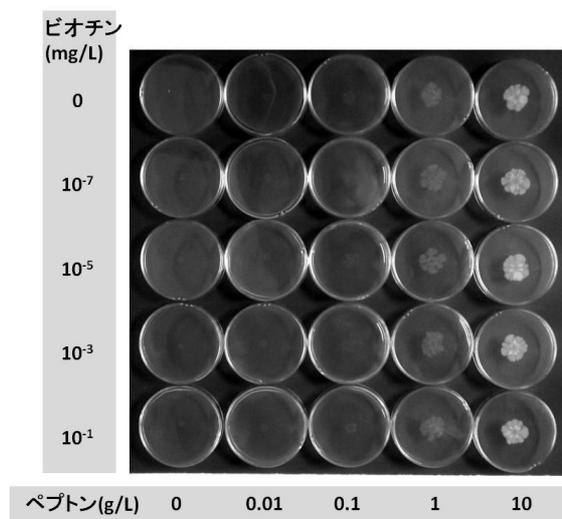


Fig. 2, *Bacillus subtilis* の生育に及ぼすペプトン、ビオチン濃度の影響

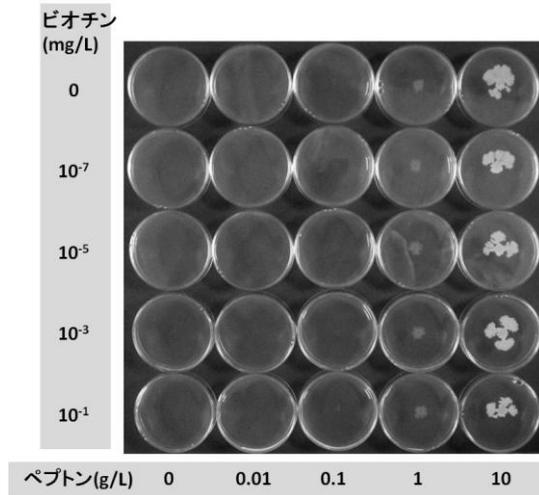


Fig. 3, 納豆菌の生育に及ぼすペプトン、ビオチン濃度の影響

(ビタミン不含)をタンパク質源として用いることとした。この合成培地にビオチンを 10<sup>-7</sup>~10<sup>-1</sup> mg/L 添加してパターン形成に及ぼす影響について検討しているところである。

### 4. 数理モデルとの比較

実験で得られたデータをもとに格子モデルによりモデルを構築した。2次元の格子を2層用意し、寒天層の上に納豆菌層を配置した。寒天層では、ビオチンがランダムに運動することとし、納豆菌層では、納豆菌が下層にある寒天層上のビオチンを摂取して、一定の増殖率  $r$  で増殖することとした。その結果、ビオチンの量に依存して、パターンが変化することを確認出来、高度に枝分かれして増殖の様子などを再現できることが分かったが、詳細な形を再現するには至っていない。講演では、このモデルを発展させた格子モデルの結果についても報告する。

### 謝辞

本研究の一部は兵庫県立大学環境人間学部・教育研究プロジェクトの助成金により行われた。

### 参考文献

- [1] Matsushita M, Hiramatsu F, Kobayashi N, Ozawa T, Yamazaki Y, Matsuyama T. "Colony formation in bacteria: experiments and modeling". *Biofilms* 1, 305-317 (2004)
- [2] 榎原周平, 渡邊敏明. "ビタミンの微生物学的定量法と HPLC 法". *ビタミン* 85(7), 335-337 (2011)