

研究ノート

枯草菌株間におけるバイオフィーム形成能の比較

榊原 祥清[§]

食品総合研究所

Comparison of biofilm formation abilities in *Bacillus subtilis* strainsYoshikiyo Sakakibara[§]

National Food Research Institute, 2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642

Abstract

Biofilm formation abilities (BFA) of 78 *Bacillus subtilis* strains were evaluated by using a crystal violet staining method. Ten strains showed more than 20-fold higher BFA than that of a low-BFA control strain, 168trpC2. Six strains showed almost the same BFA as the control. In addition, biofilm formation of the high-BFA strain was confirmed with a scanning electron microscopy. The biofilm was observed by using a hexamethyldisilazane drying treatment without cell structure disruption.

細菌による食品汚染を防ぐことは、安全な食品を消費者に提供する上で非常に重要な課題である。これまでの細菌研究では、培養という操作により浮遊状態の細胞を対象とすることが殆どであった。しかし、近年、微生物生態に関する研究が進むにつれて、自然界においては、細菌は浮遊状態よりも、むしろ固体表面に接着し「バイオフィーム」と呼ばれる高次構造体を形成して存在していることがわかってきた^{1, 2)}。バイオフィームは微生物群集の周囲に多糖類を主成分とする強固な外殻が形成されたものであり、バイオフィームが一旦形成されると微生物の除去が困難になるため、食品汚染の観点からも関心を集めている。

バイオフィーム形成に関する様々な研究は、これまで主に大腸菌 (*Escherichia coli*) の他、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) 等、病原性微生物を中心に進められてきた。これらの菌では、分子生物学的手法等を用いてバイオフィームの形成メカニズムを解明する試みが行われている³⁾。その結果、バイオフィーム形成に

関与する因子は、菌種によって異なっており、また、同一の菌種であっても菌株によってバイオフィーム形成能が様々であることがわかってきている。したがって、同一の菌種間でバイオフィーム形成能の異なる菌株を比較することは、その菌種のバイオフィーム形成機構を明らかにする有効な手段になるものと考えられる。

本研究では、グラム陽性菌のモデル微生物であり、食品産業にも利用されている枯草菌 (*Bacillus subtilis*) におけるバイオフィーム形成機構を明らかにするために、その第一段階としてバイオフィーム形成能の異なる枯草菌株を取得することを目的として、様々な枯草菌株のバイオフィーム形成能を解析した。

実験方法

バイオフィーム形成能の解析

枯草菌 (*B. subtilis*) 78株 (表1) は、食品総合研究所微生物バンクより入手した。バイオフィームの形成

2006年12月22日受付, 2007年1月29日受理

[§] 連絡先 (Corresponding author)

表1 バイオフィーム形成の比較に用いた枯草菌株

No.	菌株名	No.	菌株名	No.	菌株名
1	HER1395 BS	27	IP005	53	NFRI8320
2	HER1346 BS	28	IP004	54	NFRI8369
3	HSY20	29	Q6:1.4	55	NFRI8372
4	HER1243 BS	30	OF-1	56	NFRI8291
5	Q1:1.3	31	OP-5	57	NFRI8292
6	SIM46	32	SIM215	58	NFRI8293
7	HER1313	33	IP028	59	NFRI8294
8	HER1149 BS	34	IP002	60	NFRI8299
9	ATCC6653	35	MSQ3338	61	NFRI8300
10	Az657	36	IP003	62	NFRI8301
11	HER1046 BS	37	MAS10-15547	63	NFRI8310
12	W23Sn+	38	SIM131	64	NFRI8311
13	IP050	39	SIM65	65	NFRI8321
14	HER1417 BS	40	IP033	66	NFRI8298
15	SIM47	41	IP032	67	NFRI8358
16	IP626	42	HER1174 BS	68	NFRI8313
17	SIM163	43	HER1148 BS	69	NFRI8312
18	IP053	44	CM-1	70	NFRI8323
19	IP008	45	RM-2	71	NFRI8347
20	SIM64a	46	GSy347	72	NFRI8306
21	IP048	47	SIM281	73	NFRI8308
22	MSQ15202	48	IP035	74	NFRI8325
23	IP099	49	NAFM5	75	NFRI8357
24	IP044	50	NFRI8290	76	NFRI8334
25	IRO3024	51	NFRI8322	77	NFRI8336
26	Comrois	52	NFRI8316	78	168trpC2

は、以下のように行った。

3 mlのLB培地に枯草菌を接種し、37℃で一晩培養を行った（前培養）。3 mlのバイオフィーム形成培地（150mM 硫酸アンモニウム、100mM リン酸カルシウム、34mM クエン酸ナトリウム、1mM 硫酸マグネシウムを含むLB培地）を培養管（φ17mm×H100mm）に入れ、前培養液を1%（v/v）となるように加えた。この培養管内にスライドガラス（W25mm×H75mm×D1mm）を縦に半分に切断したものを立てかけ、37℃で48時間静置培養を行った。培養後、蒸留水で浮遊細胞を洗浄除去したスライドガラスを0.1%（w/v）クリスタルバイオレット溶液に15分間浸漬し、スライドガラスに接着した菌体の染色を行った。スライドガラス上の余分な色素を蒸留水で洗浄除去した後、6 mlのエタノール溶液に15分間浸漬した。エタノール溶液に溶出したクリスタルバイオレットの濃度は、溶液の吸光度（595nm）を

測定することにより求めた。また、培養液の菌濃度は、濁度（OD₆₀₀）を測定することにより求めた。以上の実験を3回反復し、得られた平均値を用いて各菌株のバイオフィーム形成能を評価した。

走査電子顕微鏡による観察

上述の方法と同様に行い、カバーガラス上にバイオフィームを形成させた後、以下の方法で前処理を行った。2.5%（w/v）グルタルアルデヒド／0.1 M リン酸緩衝液（pH7.3）に4℃で一晩浸漬した後、0.1 M リン酸緩衝液（pH7.3）で3回洗浄を行った。次に、50%、70%、90%、100%（v/v）のエタノール溶液に、各10分間ずつ浸漬して（100%エタノール処理は3回）脱水処理を行った。ヘキサメチルジシラザン（HMDS）に30秒ずつ2回浸漬した後、10分間室温で風乾した⁵⁾。前処理を行った試料に、イオンスパッタリング装置（日本

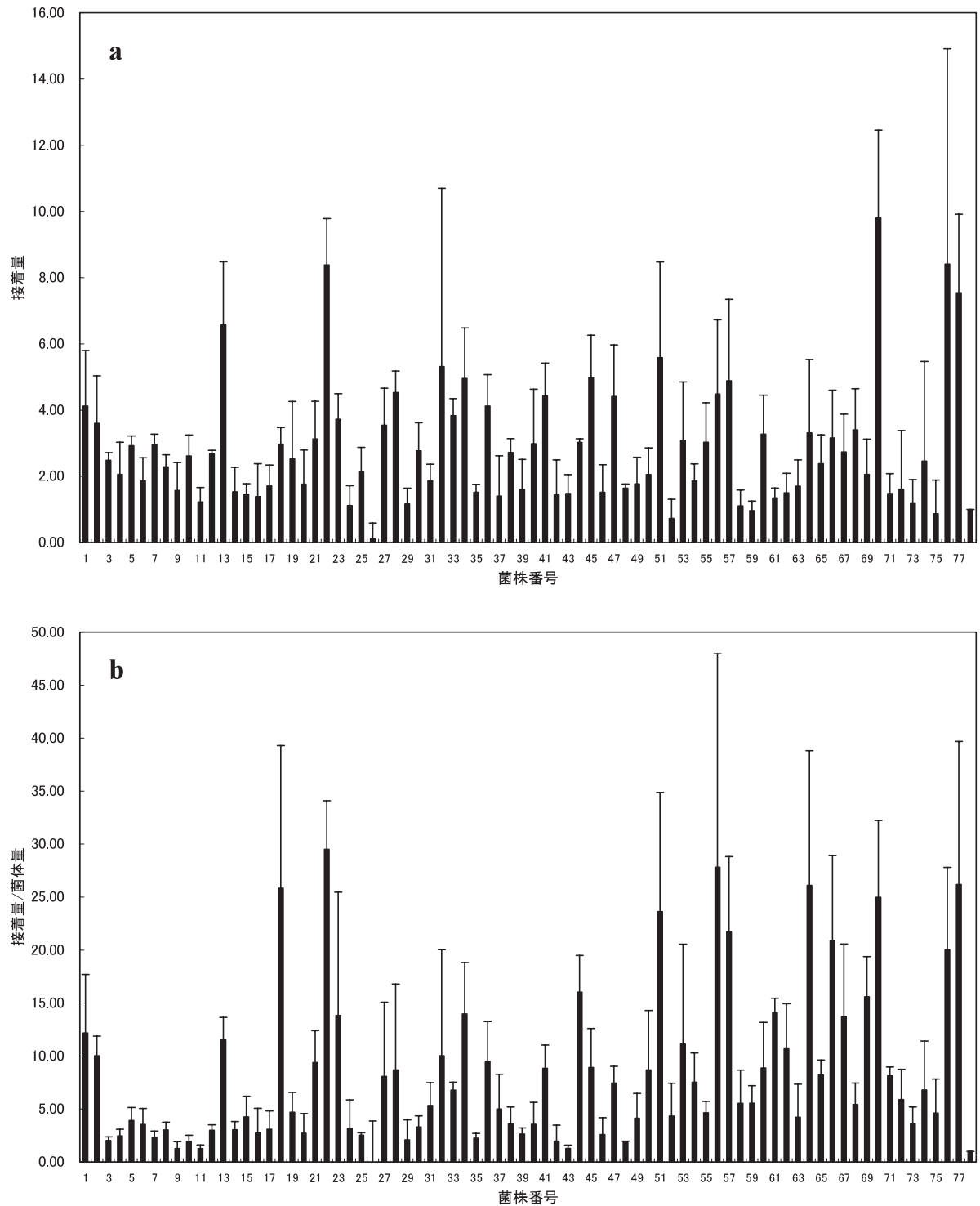


図1 枯草菌株間におけるバイオフィーム形成能の比較

a:色素染色によって求めた菌体接着量, b:培養液中の菌体量あたりの接着量. いずれも168trpC2株(菌株No.78)の値を1として表した.

電子, JFC-1500) を用いて金蒸着を行い, 走査電子顕微鏡 (日本電子, LV-5600) により観察した.

結果および考察

バイオフィーム形成能の解析

78株の枯草菌について, クリスタルバイオレットを

用いた染色法により、バイオフィーム形成能の評価を行った。図1 aは、スライドガラス上の菌体に結合した色素の量を、枯草菌の研究でよく使用される168trpC2株の値に対する相対値で示したものである。46株において、168trpC2株の2倍以上の値を示した。特にMSQ15202 (No.22), NFRI8323 (No.70), NFRI8334 (No.76) 及びNFRI8336 (No.77) の4株は、168trpC2株の7.5~9.8倍の値を示し、168trpC2株よりも接着能の高い株と考えられた。

さらに、浮遊菌数に対する接着菌の割合を見るために、上述の色素量を培養液の濁度で除した値を、168trpC2株の値に対する相対値で示した(図1 b)。その結果、22株が168trpC2株の10倍以上の値を示した。一方、168trpC2株と同等の値(2倍以内)を示したものはわずか7株に過ぎなかった。このことから、168trpC2株では多くの菌体が浮遊状態で存在し、接着の起こりにくい株であることが示された。一般に実験室でよく用いられる菌株は、栄養に富む培地で長期間維持されてきたことにより、増殖効率は高いものの、微生物が本来備えていた環境適応機能を欠失してしまっているものが多いと言われていることと一致する。

上述のMSQ15202, NFRI8323, NFRI8334及びNFRI8336の4株に加え、IP053 (No.18), NFRI8322 (No.51), NFRI8291 (No.56), NFRI8292 (No.57), NFRI8311 (No.64), NFRI8298 (No.66) の6株が、高い菌体量あたりの接着量(168trpC2株の20倍以上)を示し、バイオフィーム形成能の高い菌株であると考えられた。前者の4株は増殖能も接着能も高い菌株であり、後者の6株は増殖能は低いものの接着する菌体の割合が高い菌株であると考えられた。一方、ATCC6653 (No.9), Az657 (No. 10), HER1046BS (No.11), Comrois (No.26), HER1174BS (No.42), HER1148BS (No. 43), IP035 (No. 48) の7株は、168trpC2株と同様に接着が起こりにくく、バイオフィーム形成能の低い菌株であると考えられた。

枯草菌のバイオフィーム形成に関しては、Stanleyらによって、浮遊状態の細胞とバイオフィーム形成状態の細胞における遺伝子発現の差異が、DNAマイクロアレイを用いて調べられている⁶⁾。バイオフィーム形成過程において519遺伝子の発現量が変化し、その大部分は運動性やケモタキシス、膜エネルギー、解糖系、TCA回路に関わる遺伝子であることが示されている。今回得られたバイオフィーム形成能の異なる菌株について、繊毛等の運動性に関わる因子の構造や膜タンパク質の組成、代謝系の遺伝子発現等を今後比較検討すること

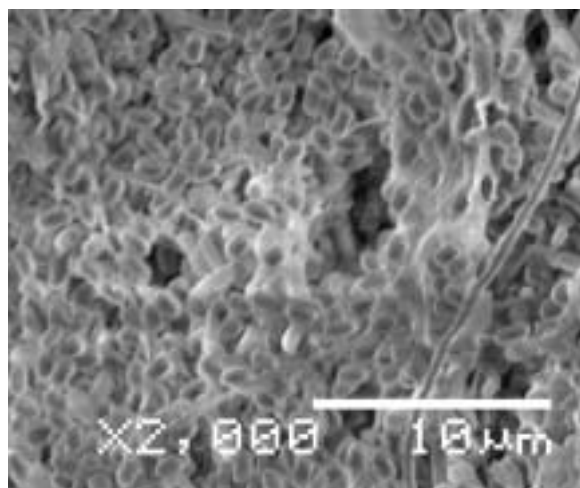


図2 *B. subtilis* MSQ15202株バイオフィームのSEMによる観察

により、枯草菌のバイオフィーム形成に必要な因子がより明らかになるものと期待される。

走査型電子顕微鏡による観察

バイオフィーム形成能が高いと推測されたMSQ15202株について、走査型電子顕微鏡(SEM)観察によって、バイオフィームの形成を確認した。エタノールによる脱水処理後の乾燥方法として、凍結乾燥法とHDMS法⁵⁾を試みた。凍結乾燥法では菌体の凝縮および剥離が起きてしまったが、HDMS法ではガラス表面に菌体が密に接着している様子を観察することができたことから(図2)、枯草菌バイオフィームのSEM観察の前処理にはHDMS法が適していることがわかった。また、得られたSEM像から、枯草菌バイオフィームにおいても、ネズミチフス菌(*Salmonella enterica* serovar Typhimurium)で観察されたバイオフィーム⁷⁾等と同様に、菌体外物質が細胞表層に付着していることが確認された。

要 約

枯草菌78株について、バイオフィームの形成能を解析した。その結果、10株が高いバイオフィーム形成能を示し、6株がコントロールとして用いた168trpC2株と同等の低いバイオフィーム形成能であった。また、ヘキサメチルジシラザン処理により、走査型電子顕微鏡を用いて、バイオフィームの形成を確認した。

文 献

- 1) Watnick, P., Kolter, R., Biofilm, city of microbes, *J. Bacteriol.*, **182**, 2675-2679 (2000).
- 2) 松山東平, バイオフィルムの生物学, 日本微生物生態学会誌, **14**, 163-172 (1999).
- 3) Sauer, K., The genomics and proteomics of biofilm formation, *Genome Biology*, **4**, 219.1-219.4.
- 4) Hamon M.A. and Lazazzera, B.A., The sporulation transcription factor Spo0A is required for biofilm development in *Bacillus subtilis*, *Mol. Microbiol.*, **42**, 1199-1209 (2001).
- 5) Araujo, J.C., Téran, F.C., Oliveira, R.A., Nour, E.A.A., Montenegro, M.A.P., Campos, J.R. and Vazoller, R.F., Comparison of hexamethyldisilazane and critical point drying treatments for SEM analysis of anaerobic biofilms and granular sludge, *J. Electr. Microsc.*, **52**, 429-433 (2003).
- 6) Stanley, N.R., Britton, R.A., Grossman, A.D. and Lazazzera, B.A., Identification of catabolite repression as a physiological regulator of biofilm formation by *Bacillus subtilis* by use of DNA microarrays, *J. Bacteriol.*, **185**, 1951-1957 (2003).
- 7) Anriany, Y.A., Weiner, R.M., Johnson, J.A. and De Rezende, C., *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 displays a rugose phenotype, *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 4048-4056 (2001).

