

緑膿菌コロニーにおける同心円状パターンの環境条件依存性
Dependence of Concentric-ring Colony Formation on Environmental Conditions
for Bacterial Species *Pseudomonas aeruginosa*

物理学専攻 有馬 美奈
Dept. Physics Mina Arima

1. 研究目的

寒天培地にバクテリアを接種すると、寒天濃度と栄養濃度に依存しいくつかの特徴的なパターンを形成する(図 1.1)。その中に、同心円状にリングを形成する同心円状パターンがある。*Bacillus subtilis* などでは同心円状パターンの研究が多くなされている。これらの菌の同心円状パターンは migration(進行)と consolidation(停止)のサイクルで形成される。時間周期(migration と consolidation を足した時間)は一定で、空間周期(リング幅)は寒天濃度に依存する。また、栄養濃度が十分に高い領域で形成され、時間周期と空間周期は栄養濃度に依存しない。

一方、本研究で扱う緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*) の同心円状パターンは、栄養濃度に対して比較的低い領域で観察される。また、その範囲が狭いことから、栄養濃度に対して非常に敏感であることがわかる。また、先行研究では、成長途中のコロニーの高さプロファイルを測定することで、コロニーの成長先端より少し内側のピーク位置(成長先端部)が菌密度と進行速度をともに振動させながら成長していることが確認された。しかし、パターンの特徴やその形成過程はほとんど明らかになっていない。

そこで、本研究では寒天濃度と栄養濃度の 2 つの環境条件を変えて高さプロファイルを測定することにより、同心円状パターンの環境条件依存性を調べる。具体的には以下の実験を行う。

- 同時に接種した 2 つのコロニーの反発実験の栄養濃度依存性
- 同心円状パターンの高さプロファイル測定(24 時間)
- 環境条件(寒天濃度と栄養濃度)を変化させた時の高さプロファイル測定

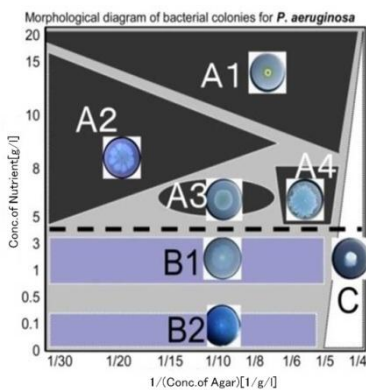


図 1.1 : 緑膿菌のモルフォロジーダイアグラム

A 領域と B 領域の境目の点線で、急激な菌密度の変化が確認されている。

2. 実験結果

2. 1 反発実験(栄養濃度依存性)

栄養濃度場のコロニーの成長に対する影響を調べるため、少し離れた位置に同時に菌液を接種して培養し、成長する 2 つのコロニーが反発するかどうかを確認する実験を行った(図 2.1)。

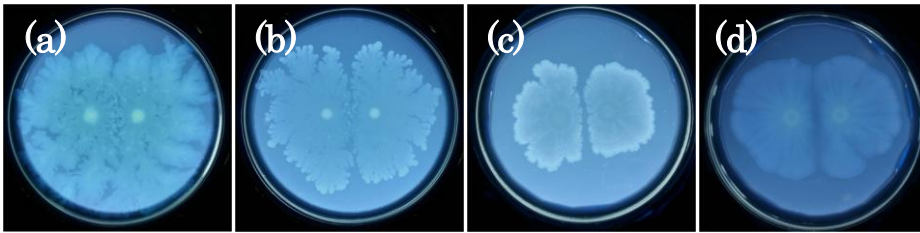


図 2.1 : $C_a = 10$ [g/l]での反発実験 (a) $C_n = 10$ [g/l] (b) $C_n = 8$ [g/l] (c) $C_n = 6$ [g/l] (d) $C_n = 4$ [g/l]

A 領域では、栄養濃度を $C_n = 10$ [g/l]から $C_n = 6$ [g/l]に下げていることにより、最初は衝突していた 2 つのコロニーが反発するようになり、さらにその反発距離が広がっていく様子が確認できる。このことから、コロニー成長界面への栄養の供給が無くなって、コロニーの成長が止まることが考えられる。コロニーがシャーレ全体に広がらない原因は、非平衡栄養濃度場によるものと考察できる。

さらに、B 領域の $C_n = 4$ [g/l]ではコロニー同士が再び衝突する。このことから、A 領域と B 領域では菌の増殖のメカニズムが違うことが考えられる。

2. 2 同心円状パターンの高さプロファイル測定

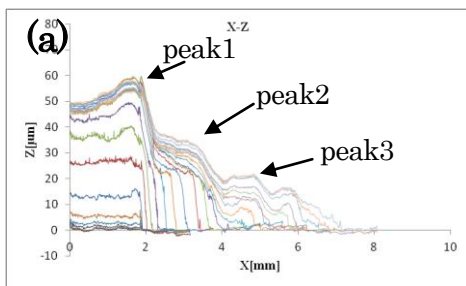


図 2.2 : (a) $C_a = 10$ [g/l] , $C_n = 6$ [g/l]での高さプロファイル

(b)ピーク位置 X[mm]の時間発展

(c)高さ Z[μ m]の時間発展

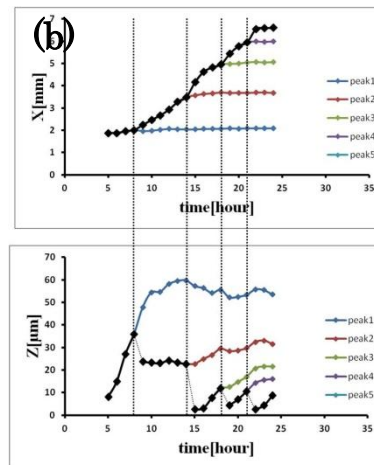


図 2.2(b)を見てみると、成長先端部が菌密度(高さ)と進行速度をとともに振動させながら進行している様子がうかがえる。*B. subtilis*などの同心円状パターンと比較して、はっきりとした migration(進行)と consolidation(停止)を確認することはできなかった。*B. subtilis*などでは、migration(進行)中は菌の運動性が活発で、consolidation(停止)中は増殖性が活発であるというように、運動と増殖の違いがはっきりと分かれている。一方で、図 2.2(a)を見てみると、コロニー界面が進行しながら増殖もしている様子が確認できる。このことが、migration(進行)と consolidation(停止)がはっきりと確認できない理由だと考えられる。

次に、空間周期と時間周期に着目する。緑膿菌コロニーにおける同心円状パターンの空間周期と時間周期はコロニーの成長とともに短くなっていく傾向が見える(図 2.2(a))。これは、成長界面近傍の栄養分が無くなってコロニーの成長が止まってしまうことが原因と考えられる。

2. 3 同心円状パターンの環境条件依存性

寒天濃度もしくは栄養濃度の 2 つの環境条件パラメータを変化させた時の結果を比較し、同心円状パターンの環境条件依存性を調べる。本研究では、 $C_a = 10$ [g/l], $C_n = 5.5, 6$ [g/l]で 3 回ずつ、 $C_a = 15$ [g/l], $C_n = 6$ [g/l]で 2 回ずつ測定を行った。

本研究では、以下の物理量の寒天濃度および栄養濃度依存性について調査した。

- ring1 の空間周期(width)→peak3 が出てきた時の peak2 と peak1 の位置の差を空間周期 width とする。
- 高さ Z_0, Z_1 →peak3 が出てきた時の peak2 の高さを Z_0 、peak3 の高さを Z_1 とする。
- 断面積 S の時間発展→高さプロファイルの結果から、断面積(菌量に關係する)を求める。
- 成長先端部菌集団の運動性 V_{front} と高さ Z_1 の關係→成長先端部の大まかな速さを V_{front} とする。

2. 3. 1 空間周期 width の環境条件依存性

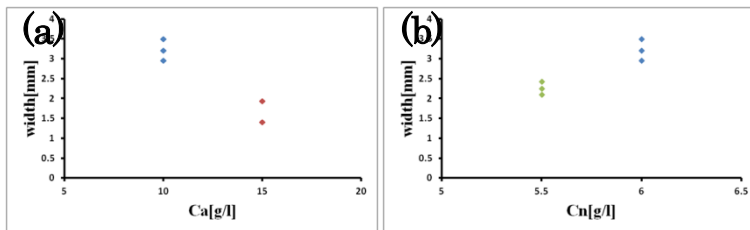


図 2.3 : 空間周期 width の環境条件依存性 (a)寒天濃度依存性($C_n = 6$ [g/l]) (b)栄養濃度依存性($C_a = 10$ [g/l])

空間周期は、寒天濃度と栄養濃度の両方に依存する(図 2.3)。緑膿菌コロニーの成長先端近傍では、菌集団の密度と運動性が、ともに栄養濃度に依存して変化の様子が確認されている。寒天濃度だけではなく栄養濃度も運動性に關係するパラメータであるため、空間周期が栄養濃度にも依存すると考えられる。

2. 3. 2 高さ Z_0, Z_1 (菌密度)の環境条件依存性

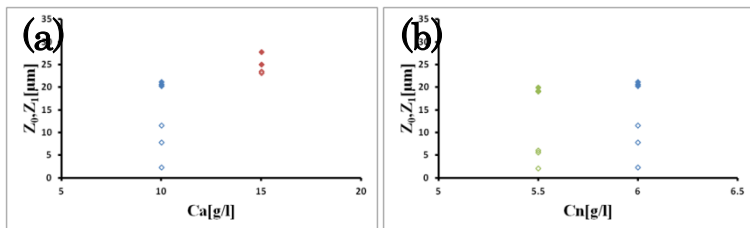


図 2.4 : 高さ Z_0, Z_1 の環境条件依存性 (a)寒天濃度依存性($C_n = 6$ [g/l]) (b)栄養濃度依存性($C_a = 10$ [g/l])

図 2.4 をみてみると、コロニー成長先端部に新たなピーク(peak3)が現れた時のその高さ Z_1 が特徴的であることに気づく。同心円状パターンが形成される条件は栄養濃度に関してとても狭い範囲なので、その範囲内で Z_1 の変化はわずかであった。一方、寒天濃度に関しては広いので Z_1 の変化も大きかった。すなわち、寒天濃度を高くすると、 Z_1 もそれに応じて高くなった。

寒天濃度を高くすると培地は固くなり、コロニーは進行方向に成長しづらくなる。しかし、菌の増殖はさまたげられないのでコロニーの高さは増すと考えられる。

2. 3. 3 断面積 S の環境条件依存性

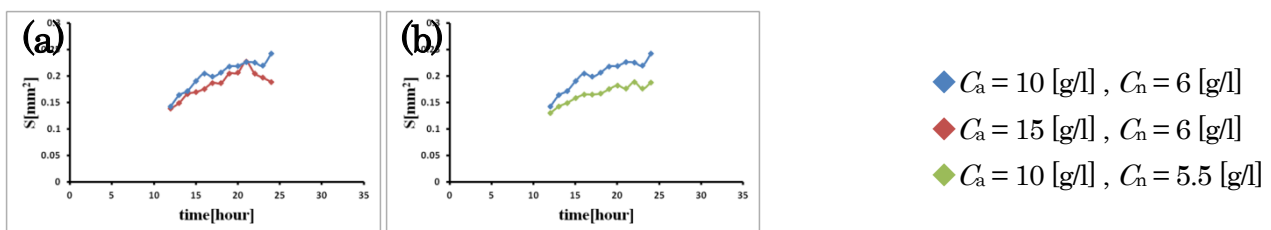


図 2.5 : 断面積 S の環境条件依存性 (a)寒天濃度依存性($C_n = 6$ [g/l]) (b)栄養濃度依存性($C_a = 10$ [g/l])

菌の増殖性に関するパラメータは栄養濃度である。高さプロファイル断面積の栄養濃度依存性を見てみると、栄養濃度が低い方が増殖率が低いことが確認できる(図 2.5(b))。

一方で、高さプロファイル断面積の寒天濃度依存性を見てみると、寒天濃度が高い方が少し増殖しにくい傾向がみられる(図 2.5(a))。これは、培地が固くコロニーが成長しづらいため菌量が増えにくいと考えられる。

2. 3. 4 成長先端部菌集団の運動性 V_{front} と高さ Z_1 の環境条件依存性

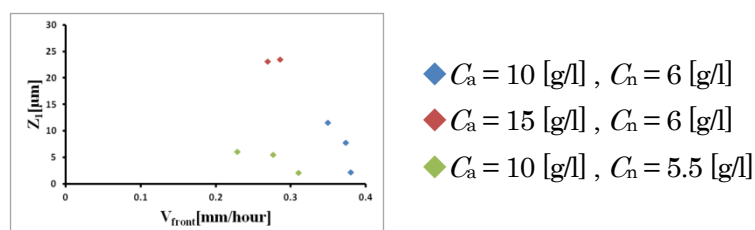


図 2.6 : 成長先端部菌集団の運動性 V_{front} と高さ Z_1 の環境条件依存性

コロニー成長先端部ピーク位置の運動性と高さの寒天濃度依存性を見た場合、寒天濃度を高くすると運動性が低くなる一方で、高さが高くなる。運動性と高さの栄養濃度依存性については、栄養濃度を低くすると運動性が低くなる。両方を変えた場合の $C_a = 15$ [g/l], $C_n = 6$ [g/l] と $C_a = 10$ [g/l], $C_n = 5.5$ [g/l] を比較すると、運動性は大体同じくらいである。 $C_a = 10$ [g/l], $C_n = 6$ [g/l] を基準に考えてみると、寒天濃度は 50% も変化させたのに対し、栄養濃度は 8% しか変化させていない。それにも関わらず運動性が同じくらいであるということは、栄養濃度が運動性に非常に大きい影響を与えているということである。

3. まとめ

緑膿菌では進行と停止のサイクルがはっきり確認できず、コロニーの成長とともに空間周期と時間周期が短くなる傾向がある。そして、空間周期は寒天濃度と栄養濃度の両方に依存する。

一方で *B. subtilis* などの同心円状パターンでは、進行と停止のサイクルがはっきりと確認でき、成長とともに空間周期と時間周期が変化することはない。そして、空間周期と時間周期ともに栄養濃度依存性がない。

これらの違いが出た理由を考察してみる。*B. subtilis* などにおいては寒天濃度と運動性、栄養濃度と増殖性の対応がほぼ独立であるように見えたが、緑膿菌の場合は栄養濃度を変化させることによって菌集団のサイズと運動性がともに変化するという特徴がある。また、寒天濃度を変化させた場合も断面積(菌量)の変化から運動性だけでなく増殖性も多少は影響を受ける。このことから、緑膿菌では栄養濃度と寒天濃度がそれぞれ運動性と増殖性の両方に影響する、一見複雑なパラメータになってしまう。特に、運動性と増殖性の両方に栄養濃度が非常に強く影響することが確認できた。よって、緑膿菌の同心円状パターンは栄養濃度が本質であるということがいえ

参考文献

- [1] 柳川愉恵 : 緑膿菌コロニーの周期的成長パターン (2010 年度修士論文)
- [2] H.Ito, J.Wakita, T.Matsuyama and M.Matsushita : J.Phys.Soc.Jpn,68(1999)1436
- [3] J.Wakita, H.Shimada, H.Ito, T.Matsuyama and M.Matsushita : J.Phys.Soc.Jpn,70(2001)911
- [4] R.Tokita, T.Katoh, Y.Maeda, J.Wakita, M.Sano, T.Matsuyama and M.Matsushita : J.Phys.Soc.Jpn,78(2009)074005