

## 研究ノート

## 大腸菌標準野生株 (ECOR strains) におけるバイオフィーム形成能の分析

柴田 有加<sup>\*1</sup> 松本 晃子<sup>\*\*2</sup> 世古口 歩華<sup>\*1</sup> 前田 純夫<sup>\*\*\*3</sup>

原稿受付平成 25 年 10 月 1 日；原稿受理平成 26 年 1 月 7 日

## Analysis of Biofilm Formation Ability in ECOR Strains

Yuka Shibata<sup>\*1</sup>, Akiko Matsumoto<sup>\*\*2</sup>, Ayuka Sekoguchi<sup>\*1</sup>, Sumio Maeda<sup>\*\*\*3</sup>

## Summary

Biofilms are communities of microorganisms adhering to solid surfaces. The microbial cells growing in biofilms are physiologically distinct from planktonic cells of the same organism. Although *Escherichia coli* (*E. coli*) have been often used for studying biofilm, past studies predominantly used laboratory *E. coli* strains, most of which belong to one serotype, K-12. In order to analyze biofilm formation characteristics in natural *E. coli* strains, we used *E. coli* collection of reference (ECOR) strains which were a standard collection of 72 wild-type *E. coli* strains established from 2600 natural isolates. We have classified the 72 ECOR strains into five groups, four groups by their features on biofilm formation such as the rate of biofilm-formation and preference for hydrophilic or hydrophobic surface, and one group for those cannot be classified into the four groups. Since the 72 ECOR strains showed a broader range of biofilm forming characteristics than the laboratory strains, it is suggested that the natural *E. coli* strains growing in biofilms are physiologically diverse.

(Received October 1, 2013 ; Accepted in revised form January 7, 2014)

## 緒言

バイオフィームとは、固体表面（界面）に付着して増殖した微生物の集合体である<sup>1,2)</sup>。バイオフィームは、自然界では水層や空気層に接する固体表面に広く形成され、人工環境では水回りのぬめりなどとして、また人体関連では歯垢やコンタクトレンズの汚れなどとして存在している。バイオフィームはマイルドな除菌処理では完全な除去が困難であることから、医療や食品製造などの場で衛生上の要注意点ともなっている。

バイオフィームを形成した微生物細胞は、同一種の細胞でも、液体培養条件下での細胞とは生理状態が大きく変化することが、近年明らかとなってきた。また、バイオフィームは生細胞のみでなく死細胞や細胞外高分子物質をも含めた複雑な構造体を形成しており、そうした複雑なバイオフィーム内での微小局所環境の違いに応じて多様な生理状態の細胞が出現することなど、バイオフィーム内特有の現象が明らかになり、興味深い研究対象として注目を集めている。

バイオフィームの研究には、各種の細菌が用いられているが、遺伝学的解明が最も進んだ細菌として、大腸菌 (*Escherichia coli*) も多く用いられている<sup>1,2)</sup>。しかし、研究に一般的に用いられている「実験室株」と呼ばれる大腸菌株のほとんどは、K-12 株という単一血清型由来のものであるため、実際の環境中に存在する野生の大腸菌の遺伝的多様性を十分反映しているとは言い難い。また、実験室株は、遺伝子組換え実験などに用いやすいため、数多くの遺伝的変異が人工的に導入されており、

<sup>\*1</sup> 奈良女子大学大学院人間文化研究科<sup>\*1</sup> Graduate School of Humanities and Sciences, Nara Women's University.<sup>\*\*2</sup> 奈良女子大学生生活環境学部<sup>\*\*2</sup> Faculty of Human Life and Environment, Nara Women's University<sup>\*\*\*3</sup> 奈良女子大学大学院生活環境科学系食物栄養学領域<sup>\*\*\*3</sup> Food Science and Nutrition, Human Life and Environmental Sciences, Nara Women's University

天然に存在する大腸菌とは生理的性質が大きく異なったものとなっている。

そこで、今回我々は、本来の野生の大腸菌の生理的性質を反映したバイオフィーム形成の解析を行うため、大腸菌の標準野生株コレクション ECOR (*Escherichia coli* collection of reference) を用いることを試みた。

ECOR とは、1984 年に米国の Ochman らが確立した大腸菌の標準野生株 72 株のライブラリである。ECOR は、世界各地の多様な由来から単離した天然の大腸菌二千数百株を母集団とし、11 種の酵素の isozyme 分析に基づいて、72 株の代表が選択された<sup>3)</sup>。その後の各種の研究結果から、ECOR は、実際に大腸菌の種内の系統学的ばらつきを満遍なく網羅した代表的コレクションと見なせることが証明されている<sup>4)</sup>。ECOR は、大腸菌の種内多様性を調べるための実験材料として、広く用いられているが<sup>5-7)</sup>、ECOR 各株のバイオフィーム形成能に関する解析は未だ行われていない。

そこで本研究では、天然の大腸菌群のバイオフィーム形成における多様性を理解するための第一段階として、マイクロプレートを用いた多検体実験系によって、ECOR 全 72 株のバイオフィーム形成能の違いを網羅的に把握し、その比較分析を行うことを目指した。

## 実験材料と方法

### [1] 実験材料

大腸菌は、ECOR (No. 1-72 の全 72 株) と実験室株 5 株 (DH5、DH5 *a*、HB101、MC4100、MG1655) を用いた。ECOR 株は、ミシガン州立大学の Thomas Wittam 博士より分与頂いた。実験室株 5 株は、国立遺伝研究所から分譲を受けた。

大腸菌は、多数の菌株のバイオフィーム形成能を同時に簡便に見るために、96 ウェルマイクロプレートで培養した。今回用いたマイクロプレートは、バイオフィーム形成の均一性を確保するため、角がない丸底ウェルのものを使用した。また、実験室外環境での固体表面の典型的な性質としてありうる親水性・疎水性という 2 条件をそれぞれ代表するため、ウェル表面を親水性処理したプレート [TPP 社 (Tissue Culture Test Plate 96 wells、ポリスチレン製)、以下「親水性プレート」と記述]、および親水性表面処理のないプレート [Thermo Scientific 社 (96-well Standard Microplate、ポリプロピレン製)、以下「疎水性プレート」と記述] の 2 種類のプレートを用いた。大腸菌培養のための LB 培地 (Luria Bertani Broth) と、ウェル洗浄用の PBS (Phosphate

Buffered Saline) は、SIGMA で購入した。

### [2] 大腸菌の培養

ECOR72 株および実験室株 5 株を、疎水性プレート各ウェル中 LB 培地 100 $\mu$ l にそれぞれ植菌し、37 $^{\circ}$ C で 16 時間、静置で前培養を行った。前培養後の各菌株を、親水性プレートおよび疎水性プレート各ウェル中 LB 培地 200 $\mu$ l にそれぞれ植菌し、37 $^{\circ}$ C で 60 時間、静置で本培養を行った。なお大腸菌は通性嫌気性の細菌であるが、マイクロプレートのように液量が少ない場合は静置培養でも十分な生育が可能である。したがって本研究で採用したマイクロプレート静置培養系は、バイオフィーム形成実験系<sup>8,9)</sup>や多検体のプラスミド調製の実験系<sup>10,11)</sup>としても多くの使用例がある。

### [3] 総菌量の測定

本培養後のマイクロプレートを遠心分離 (700  $\times$  g、15min) し、沈殿した菌体細胞 (浮遊細胞と接着細胞の全てを含む) を PBS 100 $\mu$ l で懸濁した。この懸濁液を別の吸光度測定用 96 ウェルマイクロプレートに移し、マルチプレートリーダー (Thermo Electron 社) を用いて吸光値 (OD<sub>600</sub>) を測定した。ブランクとして PBS のみ入れた場合の吸光値を測定し、本サンプルの吸光値からブランク値を引き、各菌株の「総菌量」を表す数値として用いた。

### [4] バイオフィーム形成菌量 (接着菌量) の測定

本培養後のマイクロプレート各ウェル内部表面に接着した菌体がはがれないように注意して、ウェル内の LB 培地 (浮遊細胞のみを含む) を吸引除去し、残った接着細胞を PBS 100 $\mu$ l で懸濁した。この懸濁液を、上記 [3] と同様の方法で吸光値測定とブランク値補正を行い、得られた値を各菌株の「バイオフィーム形成菌量 (固体表面への接着菌量)」を表す数値として用いた。

### [5] バイオフィーム形成率の算定

各株のバイオフィーム形成率は、[バイオフィーム形成率 (%) = バイオフィーム形成菌量 / 総菌量  $\times$  100] の計算から求めた。また各株 3 連の値から平均値と標準偏差を算定した。有意差検定は *t* 検定で行った。

### [6] R 値の設定と算定

本論文では、各菌株やグループ間での、親水性プレートでのバイオフィーム形成率と疎水性プレートでの形成率の比較分析を簡便に行うための指標として「R 値」と

いう値を独自に設定した。R 値は、計算式 [R 値 = 親水性プレートでのバイオフィーム形成率 / 疎水性プレートでのバイオフィーム形成率] によって求めたもので、親水性プレートでのバイオフィーム形成能と疎水性プレートでのバイオフィーム形成能の違いを数値的に表す指標となる。R 値が 1 より高い場合は、疎水性プレートよりも親水性プレートでのバイオフィーム形成率が高いことを示し、1 より低い場合は、逆に疎水性プレートでのバイオフィーム形成率が高いことを示す。

結果および考察

[1] バイオフィーム形成実験の結果と分析

大腸菌野生株のバイオフィーム形成能を調べるため、ECOR 全 72 株および比較として実験室株 5 株を用いて、親水性と疎水性の 2 種類のマイクロプレート上での培養を行った。培養後、各株のバイオフィーム形成菌量と総菌量を測定し、バイオフィーム形成率を求めた。以下の文章および図中では、バイオフィーム形成率の値は (平均値 ± 標準偏差) で示した。また親水性表面と疎水性表

面に対するバイオフィーム形成率の違いを表す数値として、実験材料と方法の [6] に記述した R 値という指標を設定し、比較を行った。

なお本培養条件下での ECOR 各株の増殖は、全てのサンプルで肉眼で明確に認識できる程度の十分な増殖が認められた。また本実験の 60 時間という培養期間中に濁度の極端な減少 (急激な細胞死の発生を意味する) が観察されることもなかった。また各株の総菌量は、親水性プレートと疎水性プレートでの比較で平均 1.0 倍というほぼ同等の増殖度を示し、最も差があった株でも約 1.5 倍程度の差に留まった。したがって親水性プレートと疎水性プレートでの増殖度の極端な違いにより、R 値が無意味なものになっている株は無いと判断された。

図 1 では、ECOR 全 72 株のバイオフィーム形成率の結果を、実験室株 5 株の結果を含めて、形成率が高い順に並べて示した。以下はその結果の分析である。

まず、ECOR 全株中でのバイオフィーム形成率の最大差は、親水性プレート (図 1 (a)) では約 5 倍 (最高 ECOR35 : 41 ± 4 %、最低 ECOR7 : 8 ± 0 % ,  $P < 0.005$ )、疎水性プレート (図 1 (b)) では約 12 倍 (最高

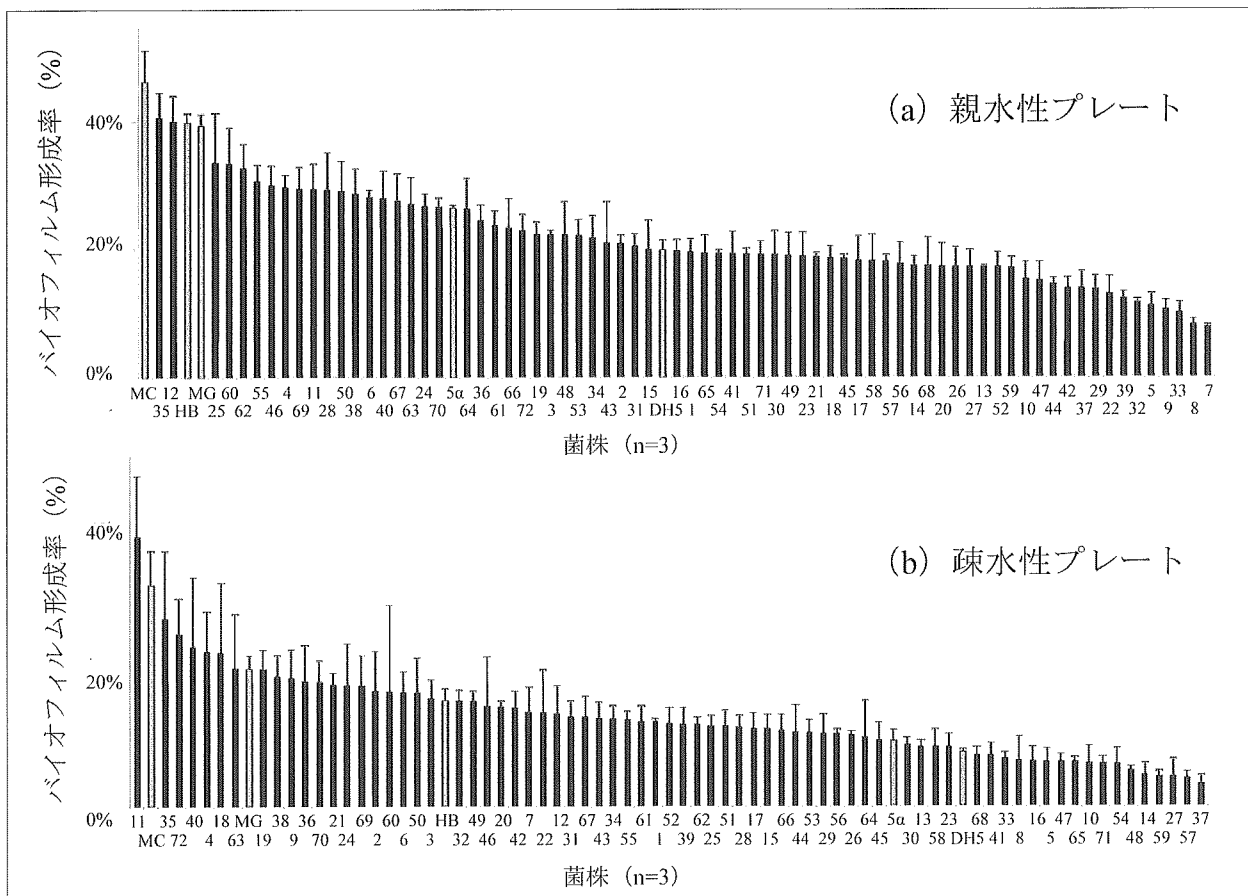


図 1- (a), (b) ECOR72 株および実験室株 5 株のバイオフィーム形成率  
各菌株のバイオフィーム形成率は平均値 ± 標準偏差 (n=3) で示した。ECOR 株 (菌株 No. で記載) は黒色のバー、実験室株は白抜きの斜線入りバーで示した。

ECOR11:38 ± 9%、最低 ECOR37:3 ± 1% ( $P < 0.005$ ) に達した。

有意差は様々な比較で見られた。例えばグループ間の比較では、親水性プレートでの形成率が上位 10 株の ECOR グループ (グループ平均: 33 ± 5%) と下位 10 株の ECOR グループ (グループ平均: 11 ± 3%) の差は  $P < 0.005$  で有意であった。また個別の菌株間の比較でも、例えば、親水性プレートで形成率の値が近い ECOR36 (24 ± 3%) と ECOR57 (18 ± 1%) でも、その差は  $P < 0.05$  で有意であった。

このような有意差は、疎水性プレートでも確認された [例 1: 上位 10 株グループ (23 ± 8%) と下位 10 株グループ (5 ± 2%) の比較、( $P < 0.005$ ); 例 2: 個別株 ECOR32 (15 ± 2%) と ECOR26 (10 ± 1%) の比較、( $P < 0.05$ ) ]。

また、ECOR 全 72 株全体の傾向性として、親水性プレートと疎水性プレートでのバイオフィーム形成率を比較するため、各プレートでの全菌株の平均値をそれぞれ算出したところ、親水性プレートでは 21 ± 8%、疎水性プレートでは 13 ± 7% という結果となった。これらの値から R 値を計算すると、1.7 という数値が得られた。すなわち、親水性プレートの方が疎水性プレートより 1.7 倍バイオフィーム形成率が高い ( $P < 0.005$ ) ことが明らかとなった。この結果から、ECOR 株全体の傾向として、親水性表面の方がバイオフィームを形成しやすいことが示された。

さらに、今回 ECOR 株の比較として用いた実験室株 5 株の結果を見ると、親水性プレートでは、5 株ともバイオフィーム形成率が高いグループに位置しており、特に MC4100、HB101、MG1655 の 3 株は形成率が上位の 10 株内に含まれていた。疎水性プレートでは、MC4100、HB101、MG1655 の 3 株は形成率が高いグループに、DH5 と DH5  $\alpha$  の 2 株は形成率が低いグループに位置していた。またこれら 5 株の個別 R 値は、R 値が大きい順に DH5  $\alpha$  = 2.86、HB101 = 2.64、DH5 = 2.60、MG1655 = 2.01、MC4100 = 1.47 で、5 株の平均 R 値は、2.3 であった。これらの結果から、実験室株のバイオフィーム形成能は、ECOR 各株全体の分布範囲内に概ね収まっているものの、傾向としてやや偏りのあるものが多く、天然の大腸菌の平均的な性質を必ずしも反映していないことが示唆された。

## [2] バイオフィーム形成能に基づく ECOR 株の分類

次いで、ECOR 株の個別菌株に着目し、これらを以下の基準で分類を試みた。基準の第一は、バイオフィ

ーム形成率の高低とした。具体的には、図 1 で親水性・疎水性の両プレートともにバイオフィーム形成率が上位あるいは下位 20% に含まれる株をそれぞれ形成能が高い株あるいは低い株とし、表 1 の (1) および (2) のグループとした。また、第二の基準として、親水性/疎水性表面への形成率の違いを表す R 値を用いた。上記 [1] の結果から、ECOR 株全体の R 値が 1.7 であることがわかったので、この数値を基準とし、各菌株の R 値が 1.7 を 2 倍以上上回る ( $\geq 3.4$ ) か、1/2 以下を下回る ( $\leq 0.85$ ) ものを、それぞれ表 1 の (3) および (4) のグループとした。以下では、これら (1) から (4) のグループに含まれた株に関して、それぞれ結果と考察を記述する。

表 1 バイオフィーム形成能に基づく ECOR 株の分類

グループ	グループに属する ECOR 株
(1) 親水性と疎水性の両プレートでバイオフィーム形成率がともに上位 20% に含まれる株のグループ	35, 11, 4, 38
(2) 親水性と疎水性の両プレートでバイオフィーム形成率がともに下位 20% に含まれる株のグループ	10, 47, 5, 37
(3) R 値が 3.4 以上の株のグループ	57 [4.71], 48 [4.54] 37 [4.53], 27 [4.30] 59 [4.25], 14 [4.08]
(4) R 値が 0.85 以下の株のグループ	18 [0.85], 32 [0.77] 11 [0.77], 7 [0.58] 9 [0.58]

(1)、(2) のグループではバイオフィーム形成率の高い順に、(3)、(4) のグループでは R 値の高い順に、それぞれ ECOR 株の番号を記し、各菌株の R 値を [ ] に記した。

(1) 親水性・疎水性の両プレートでバイオフィーム形成率がともに上位 20% に含まれる株のグループ

このグループに当てはまるのは、ECOR35、11、4、38 の 4 株であった。このグループは、固体表面の性質に関わらずバイオフィーム形成能が高いグループとして注目される。特に ECOR35 は、両方のプレートでともに上位 10% に含まれる、ECOR 株の中で最もバイオフィーム形成能が高い株であり、大腸菌のバイオフィーム形成の促進機構を解析するための良いモデル系となると考えられる。

(2) 親水性・疎水性の両プレートでバイオフィーム形成率がともに下位 20% に含まれる株のグループ

このグループに当てはまるのは、ECOR10、47、5、37 の 4 株であった。このうち両方のプレートで下位 10% に含まれる株はなかった。このグループは、固体表面の性質に関わらずバイオフィーム形成能が非常に低く、(1) のグループとは真逆の特徴を有する点が注目される。したがって、大腸菌のバイオフィーム形成の抑制機構を解

析するための良いモデル系となると考えられる。

### (3) R 値が 3.4 以上の株のグループ

このグループに当てはまるのは、ECOR57、48、37、27、59、14 の 6 株であった。このグループに属する株は、R 値が平均の 2 倍以上あるため、親水性プレートへの選別性が平均よりも高い株であると解釈できる。したがって、特に大腸菌の親水性表面への付着機構のモデル系として適していると考えられる。ただし、このグループ中で、ECOR37 は (2) のグループにも属していたため、そうした利用には適さない。

### (4) R 値が 0.85 以下の株のグループ

このグループに当てはまるのは、ECOR18、32、11、7、9 の 5 株であった (ECOR11 は、(1) のグループにも属す)。このグループは、R 値が平均の 1/2 以下であり、かつ R 値が 1 未満であるため、疎水性プレートへの相対的選別性が平均よりも高い株であると解釈できる。すなわち、これらの株は、ECOR 株の全体的な傾向とは反対に、親水性プレートよりも疎水性プレートの方がバイオフィーム形成能が高いという特徴を示す興味深いグループである。これらの株の中で、特に ECOR9 は、親水性プレートでは下位から 4 番目であるのに対し、疎水性プレートでは逆に上位から 10 番目という際だって特異な性質を示すことから、特に大腸菌の疎水性表面への付着機構のモデル系として適していると考えられる。

### (5) 上記以外のグループと実験室株

この他、4 つのどのグループにも当てはまらなかった株は 55 株であった。なお、この中で ECOR43、ECOR34、ECOR31 などは、バイオフィーム形成率および R 値の両面で、ECOR 株全体のちょうど中間値付近を示す株であり、ECOR 株すなわち野生の大腸菌群の中で平均的な性質を有する代表株として、今後の研究に有用であると考えられた。

実験室株 5 株は、MC4100 と MG1655 が (1) のグループに該当したが、残りの 3 株はどのグループにも属さなかった。

## [3] 総合考察

本研究では、全 ECOR 株のバイオフィーム形成を網羅的に解析し、野生の大腸菌株群が示すバイオフィーム形成能の多様性とその範囲の一端を明らかにすることができた。また今後のバイオフィーム研究のモデル菌株として有用なグループ別の代表株や、実験室株には見られない特異な性質を示す株などを見出すことができた。このような ECOR 全株を用いたバイオフィーム形成実験は初めての試みであり、実際の天然環境中で大腸菌が関

わるバイオフィーム形成の実態を明らかにしていくための第一段階として、良好な結果が得られたと考えられる。また実験室株との比較では、ECOR 株では実験室株 5 株には見られない性質の広がりが見られたことから、天然の大腸菌の有する多様なバイオフィーム形成能を理解していく上で ECOR 株を用いることの優位性が示された。

今回の結果をより詳細に見ると、1) ECOR 各株のバイオフィーム形成能には、最大 5 倍から 12 倍もの個体差があること、2) ECOR 株の全体的傾向としては、疎水性表面より親水性表面でのバイオフィーム形成能が高い傾向があったこと、3) ただし個別株としてはその傾向から大きく外れるものもあること、などの事実を明らかにすることができた。これら結果の内、2) の結果に関しては、これまでに大腸菌の実験室株を用いて、様々な固体素材 (本研究でも用いたプラスチック類や、金属類、ガラスなど) の表面上でのバイオフィーム形成能を調べた研究は存在するが<sup>12)</sup>、必ずしも親水性と疎水性に焦点を当てたものではなかったため、それらの結果との直接の比較は難しい。また、グラム陽性菌を含めた他細菌での研究では、疎水性表面の方が親水性表面よりも形成能が高いという報告も存在するが<sup>13)</sup>、本研究の結果が、大腸菌に固有の傾向なのか、あるいは培養条件によって大腸菌と他細菌が同様の挙動を示すのか、に関しては今後より詳細な解析が必要である。

また、ECOR 株は系統学的分類 (A に 25 株、B1 に 16 株、B2 に 15 株、D に 12 株、ungrouped に 4 株) がなされているが、これらの系統学的分類と今回の見出した 4 つのグループ分けとを比較した所、一見して明らかなほどの単純な関係性は見出せなかった。したがって、亜株レベルでの遺伝的差異や共通性はバイオフィーム形成能とは直接的な関係はなく、おそらく個別株レベルでのアクセサリー DNA やバイオフィーム関連遺伝子の特異的変異などの、非系統学的差異がバイオフィーム形成能の違いを生んでいるものと推察された。

今後に向けた課題としては、今回の実験は ECOR 全株を用いた初めてのバイオフィーム形成実験であり、一度に扱えるサンプル数の制約もあったため、大腸菌の培養に関して環境中でありうる多様な条件検討ができなかった点が挙げられる。そこで今後の方向性としては、バイオフィーム形成の経時変化やより長期の培養、様々な温度条件、貧栄養条件下でのバイオフィーム形成、プラスチック素材以外の材質でのバイオフィーム形成、などのさらなる条件検討を行っていく必要があると考えられる。また、未だ未解明の部分の多いバイオフィーム形成とその制御に関わる生理的分子機構に関しても、今回

見出した特徴ある ECOR 株のいくつかを用いて、菌体外マトリックス成分の組成や量、線毛や鞭毛などの細胞表層構造体、またバイオフィーム形成に関与する遺伝子群の同定などの観点から、新たな解析を進めていきたいと考えている。

### 要 約

バイオフィームとは、固体表面に付着して増殖した微生物の集合体である。バイオフィーム中の微生物は、同じものであっても単一細胞とは生理学的に異なる性質を示すことが分かっている。バイオフィームの研究として大腸菌がよく用いられているが、そのほとんどは K-12 に属する実験室株である。そこで本研究では、環境中の大腸菌のバイオフィーム形成を分析するために、大腸菌野生株の標準コレクションである ECOR を用いた。この ECOR 株とは、大腸菌野生株二千六百を母集団とし、代表として 72 株が選ばれたものである。バイオフィーム形成に関する特徴（バイオフィーム形成能および親水性 / 疎水性表面への選好性）に基づき、ECOR 株を 5 つ（4 つとその他）のグループに分類した。この分類において、72 の ECOR 株は実験室株より広いレンジの性質を示したことから、バイオフィーム形成における天然の大腸菌株の生理的多様性が示唆された。

### 参考文献

- 1) C. BELOIN, A. ROUX and JM. GHIGO, "Escherichia coli Biofilms", in T. Romeo (ed.), *Bacterial Biofilms*, Springer, 2008, pp.249-289.
- 2) 森崎久雄「序説 微生物の住み場所「バイオフィーム」」, 森崎久雄・大島広行・磯部賢治編『バイオフィーム—その生成メカニズムと防止のサイエンス—』株式会社サイエンスフォーラム, 1998, pp.1-2.
- 3) H. OCHMAN and RK. SELANDER, "Standard Reference Strains of *Escherichia coli* from Natural Populations", *Journal of Bacteriology*, Vol.157, No.2, 1984, pp.690-693.
- 4) O. TENAILLON, D. SKURNIK, B. PICARD and E. DENAMUR, "The Population Genetics of Commensal *Escherichia coli*", *Nature Reviews Microbiology*, Vol.8, No.3, 2010, pp.207-217.
- 5) LE. WILLIAMS, J. WIREMAN, VC. HILLIARD and AO. SUMMERS, "Large Plasmids of *Escherichia coli* and *Salmonella* Encode Highly Diverse Arrays of Accessory Genes on Common Replicon Families", *Plasmid*, Vol.69, No.1, 2013, pp.36-48.
- 6) EJ. BATTAGLIOLI, GA. BAISA, AE. WEEKS, RA. SCHROLL, AJ. HRYCKOWIAN, and RA. WELCH, "Isolation of Generalized Transducing Bacteriophages for Uropathogenic Strains of *Escherichia coli*", *Applied and Environmental Microbiology*, Vol.77, No.18, 2011, pp.6630-6635.
- 7) A. HURTADO and F. RODRIGUEZ-VALERA, "Accessory DNA in the Genomes of Representatives of the *Escherichia coli* Reference Collection", *Journal of Bacteriology*, Vol.181, No.8, 1999, pp.2548-2554.
- 8) SS. BRANDA, A. VIK, L. FRIEDMAN and R. KOLTER, "Biofilms: the Matrix Revisited", *Trends in Microbiology*, Vol.13, No.1, 2005, pp. 20-26.
- 9) R. VAN HOUTDT, A. AERTSEN, A. JANSEN, AL. QUINTANA and CW. MICHIELS, "Biofilm Formation and Cell-to-cell Signalling in Gram-negative Bacteria Isolated from a Food Processing Environment", *Journal of Applied Microbiology*, Vol.96, No.1, 2004, pp.177-184.
- 10) T. BABA, T. ARA, M. HASEGAWA, Y. TAKAI, Y. OKUMURA, M. BABA, KA. DATSENKO, M. TOMITA, BL. WANNER and H. MORI, "Construction of *Escherichia coli* K-12 In-frame, Single-gene Knockout Mutants: the Keio Collection", *Molecular Systems Biology*, Vol. 2, 2006, 2006.0008.
- 11) 小笠原道生『バイオ実験の知恵袋 —効率アップとピンチ脱出のワザ 350+—』, 羊土社, 2007, p.108.
- 12) R. FISLAGE, M. BERCEANU, Y. HUMBOLDT, M. WENDT and H. OBERENDER, "Primer Design for a Prokaryotic Differential Display RT-PCR", *Nucleic Acids Research*, Vol.25, No.9, 1997, pp.1830-1835.
- 13) B. BENDINGER, HH. RIJNAARTS, K. ALTENDORF and AJ. ZEHNDER, "Physicochemical Cell Surface and Adhesive Properties of Coryneform Bacteria Related to the Presence and Chain Length of Mycolic Acids", *Applied and Environmental Microbiology*, Vol.59, No.11, 1993, pp. 3973-3977.