

細菌コロニーのフラクタル成長*

東京都立衛生研究所 微生物部 藤 川 浩
中央大学 物理 松 下 貢

(1990 年 5 月 受付)

1. 序 論

自然界におけるパターンに、人々は長い間大きな関心を持ってきた。近年では、非平衡下での凝集や結晶成長などに見られるランダムなパターン形成に、研究者の関心が特に集まっている。それらの現象を統一的に理解しようとする試みが、この約 10 年の間にさかんになされてきた。そのなかでも、拡散に支配された凝集 Diffusion-limited aggregation (DLA) モデルは、特に注目に値する (Witten and Sander (1981))。DLA モデルとは、次のようにブラウン運動粒子を扱うものである。まず、ラプラス場において原点をきめ、そこから無限に遠方からブラウン粒子を一個放出し、その粒子が原点の最近接点に接すればそこに付着させて、新たな粒子を再び遠方から放出する。もしブラウン粒子が原点からあまりに遠方に離れていった場合は、それを捨てて新たな粒子を放出する。その結果、コンピューターシミュレーションによれば、DLA モデルによって成長させたパターンは開いたランダムな樹枝状構造をとる。このパターンは特徴的な長さを持たない自己相似形であるため、フラクタルの範疇にはいる (Mandelbrot (1982))。

自然界において実際に DLA モデルに従って成長すると考えられる実験例が、物理化学的分野においていくつか発見されている (Meakin (1988), Matsushita (1989))。電析による亜鉛金属葉はその代表的な例である (Matsushita et al. (1984))。生物においてもしばしば非常に興味深い形態が見られる。そのいくつかの形態、例えばヒトの脳表面 (Majumdar and Prasad (1988))、樹木の枝分れ (West et al. (1986))、ニワトリ胚の血管分布 (Tsonis, A.A. and Tsonis, P.A. (1987))、細菌コロニー (Matsuyama et al. (1989)) などに見られる形態はフラクタルであることが報告されている。しかし、それらはいずれも各パターンの単なる“静的”な解析であり、各成長メカニズムを理解するための動的なものではない。

一般に生命分野において、そのパターンの成長規則を見出すことは非常に困難なように考えられる。だが最近私達は、ある種の細菌が寒天表面上で、一つの単純な物理的成長規則、すなわち DLA プロセスに従って成長するとみられることを見出した (Fujikawa and Matsushita (1989))。要約すれば、*Bacillus subtilis* (枯草菌) と同定された細菌を、栄養源としてペプトンだけを低濃度に含んだ寒天平板の表面に接種すると、平板上で開いた樹枝状構造のコロニーに成長する。このコロニーパターンは約 1.73 の次元を持つフラクタルである。この値は 2 次元 DLA の値とよく一致している。また、このコロニーは寒天平板の栄養濃度と表面湿潤度によって、そのコロニー形態が著しく変化する。今回私達は本菌の DLA 規則に従った成長の場の本質、各種の条件下における二つの隣接するコロニー間の反発、さらに本菌の局所的成長メカニ

* 本稿は、統計数理研究所 共同研究 (1-共会-51) における発表に基づくものである。

ズムについて検討したので、これらを含めて以下報告する。

2. 細菌コロニーの DLA 型成長

ある食品から分離され、その性状から *B. subtilis* と同定された細菌を実験に用いた。栄養源としてペプトン (Difco Laboratories, Detroit, U.S.A.) だけを低濃度に (1 g/l) 含んだ普通寒天 (Bacto-agar, Difco, 15 g/l) の平板表面に本菌を接種し、湿潤箱にいれ、35℃ で培養した。2-3 日後にはほぼ円形で網目状のコロニー (直径約 10 mm) に成長した。その後コロニー周辺部からランダムな樹枝状突起が生じ、平板表面上を拡がっていった。3 週間後にはコロニー形態は Fig. 1(a) に示すようにランダムな樹枝状構造をとった。このパターンは DLA クラスター (Meakin (1988)) および亜鉛金属葉など DLA 成長実験 (Matsushita (1989)) におけるパターンとよく類似している。コロニーパターンをコンピューターによるイメージスキャナーを用い、ボックスカウンティング法によって解析すると、Fig. 1(b) に表すように 2 桁以上にわたって非常によい直線回帰性を示した (相関係数 $r=0.9999$)。この結果からこのパターンはフラクタルであり、直線の傾きからその次元 D は $D=1.706$ であることが明らかとなった。いくつかのコロニーについてフラクタル次元を平均すると (試料数 $n=14$)、 $D=1.73\pm0.02$ と計算された。このコロニーは寒天平板の表面上にのみ 2 次元的に成長した。これは本菌が酸素存在下でなければ増殖できないためである。

培養中コロニー内部にある樹枝は、コロニー外部にあるものとは対照的にほとんど成長しな

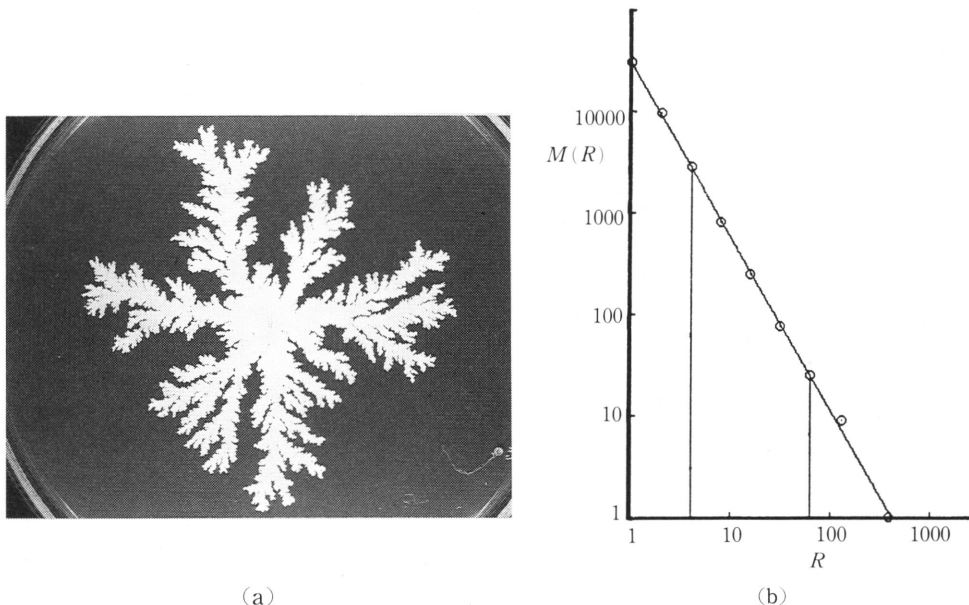


Fig. 1. (a) A typical example of a bacterial DLA colony pattern on an agar plate. The bacteria was inoculated on the surface of the agar plate containing 1 g/l of peptone and then incubated at 35℃ in a humidified box. The colony was photographed 20 days after inoculation. Its diameter is 55 mm. (b) The estimation of the fractal dimension of the colony pattern. The pattern shown in (a) was analyzed to obtain a fractal dimension using the box counting method. The abscissa R is the box size and the ordinate is the number of boxes with the size R supporting the pattern. The part of the regression line between two vertical lines was used to determine the fractal dimension.

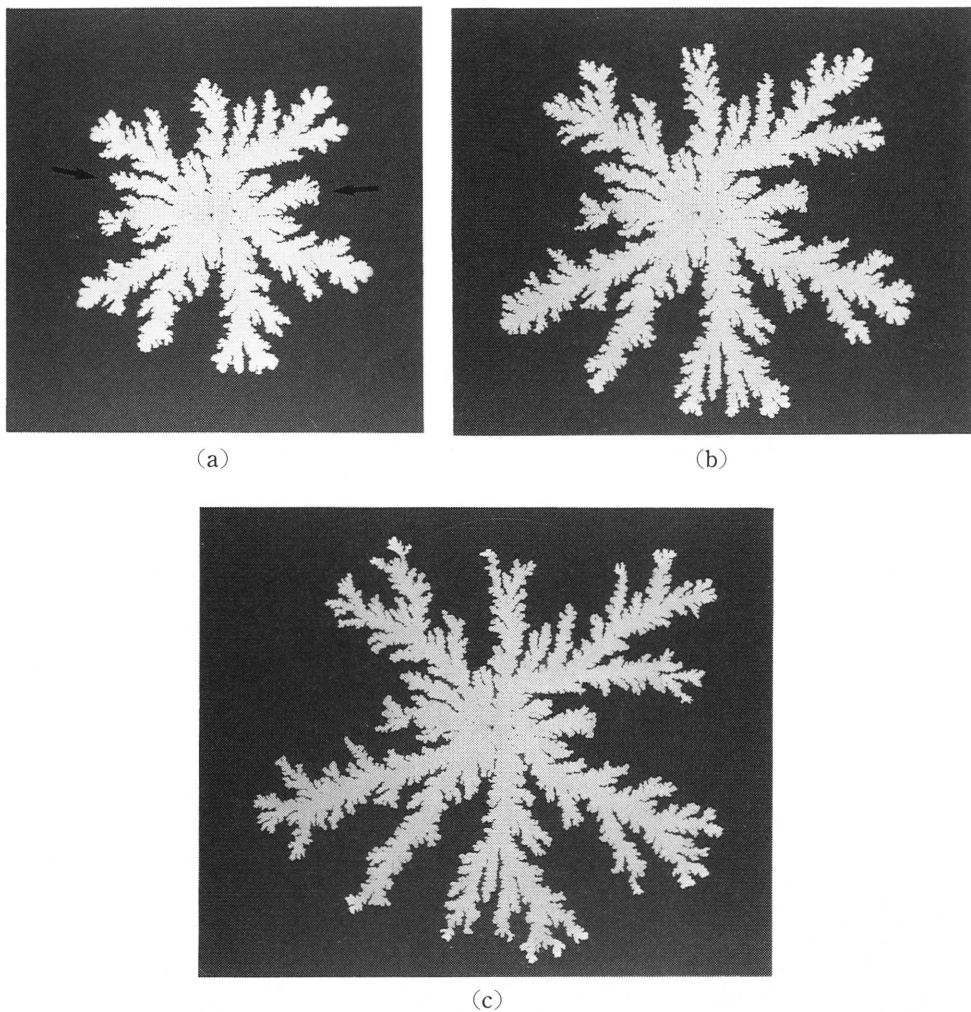


Fig. 2. A screening effect of bacterial inner branches by main ones during incubation. The strain was spotted on an agar plate with the peptone concentration of 1 g/l. Figures were photographed (a) 8, (b) 13 and (c) 19 days after inoculation. Arrows show branches which stopped growing afterwards.

かった (Fig. 2). この現象は DLA モデルにおける遮蔽効果と共通している (Meakin (1988), Witten and Sander (1981)). DLA モデルでは, ブラウン粒子は主要な枝による遮蔽効果のためにクラスター深部まで到達する確率がほとんどないため, 深部にある樹枝はほとんど成長できない.

本菌を寒天平板上で直線状に接種すると, その直線の両側にランダムな樹枝が成長した (Fig. 3). この形態は金属森 (Matsushita et al. (1985)), すなわち拡散律速の析出パターン (Meakin (1983, 1988)) を想起させる.

以上のいくつかの実験結果から, このコロニーは寒天平板上で DLA プロセスに従って成長することが明らかとなった. *B. subtilis* に属する他の菌株でも同様な DLA 型コロニーが観察された. ただし, このバクテリアのコロニーは DLA シミュレーションよりもいくぶん樹枝が

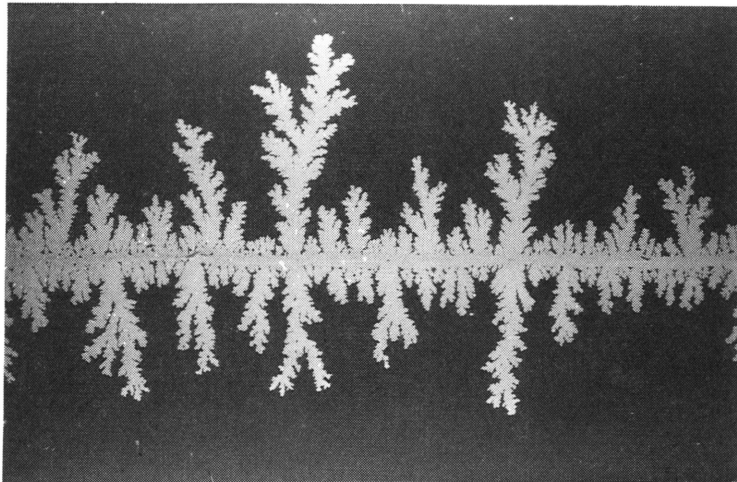


Fig. 3. An example of a "metal-forest" morphology of the bacterial colony. The organism was inoculated linearly on the surface of an agar plate with 1 g/l of peptone and incubated at 35°C. The colony was photographed 20 days after inoculation. The height of the highest "tree" is about 30 mm.

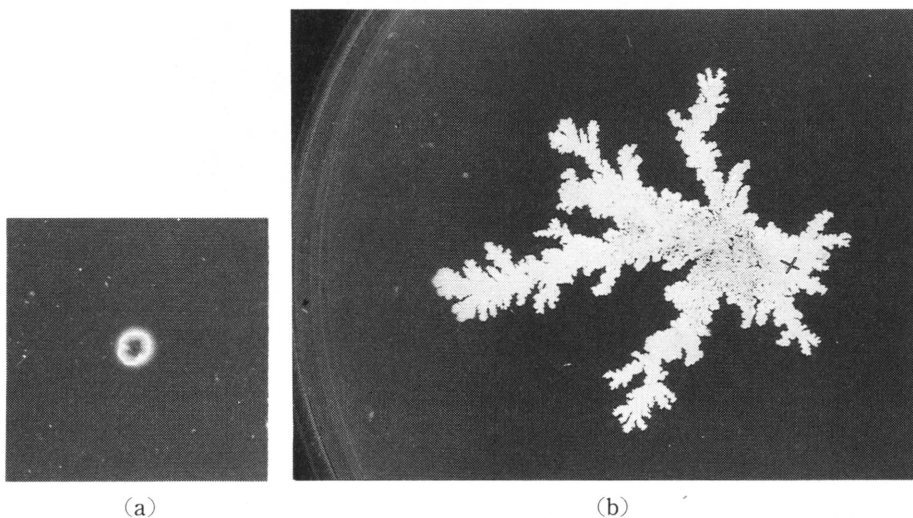


Fig. 4. (a) Bacterial colony growth on an agar plate without peptone. The organism was spotted on the plate and incubated at 35°C. The colony was photographed 18 days after inoculation. (b) Bacterial branch development towards a place with higher peptone concentration on an agar plate. The unidirectional gradient of peptone concentration (0-2 g/l, center to left of the plate) was made in the plate. The bacteria was spotted at a place where the initial peptone concentration was zero (marked ×). The colony was photographed 13 days after inoculation.

太かった。これは細菌細胞の表面張力、有限の栄養濃度、あるいは寒天平板の有限の厚さなどによると考えられる。DLA クラスターはブラウン粒子が低濃度の極限で、しかも表面張力がない条件下で成長している。

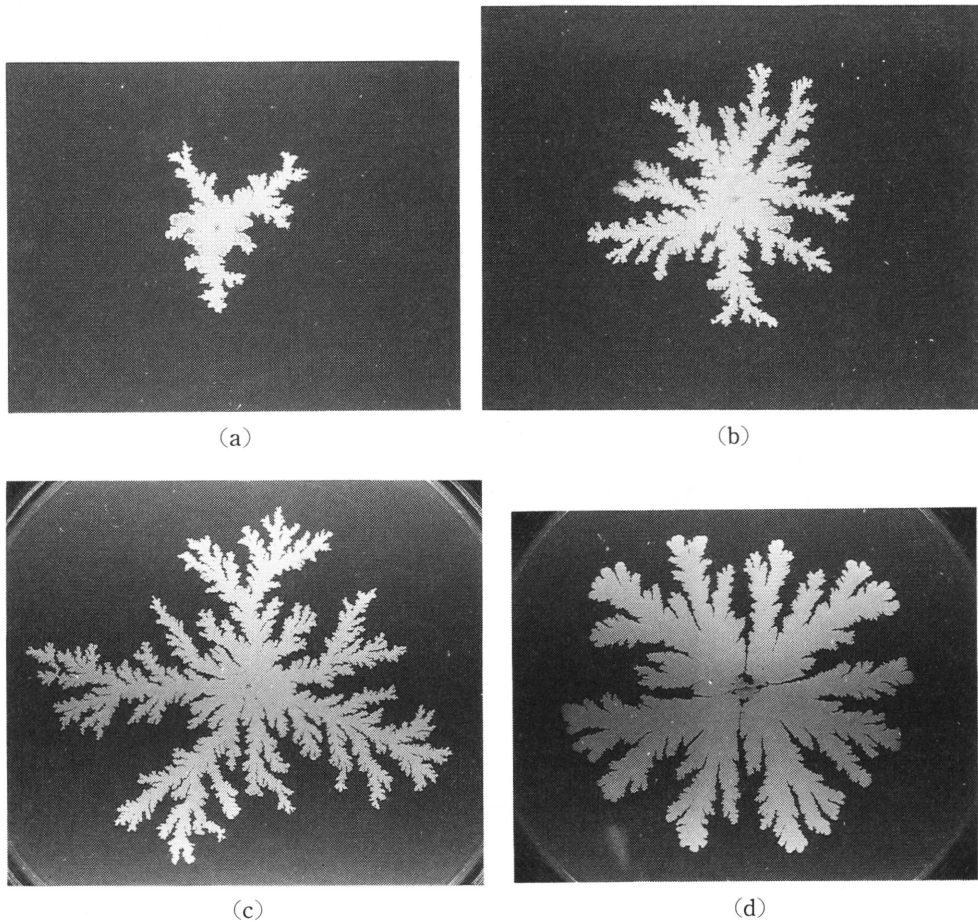


Fig. 5. Bacterial colony patterns grown on agar plates with various peptone concentrations. The concentrations were (a) 0.25, (b) 0.5, (c) 1, (d) 2, (e) 4, (f) 16 and (g) 64 g/l. The colonies were photographed (a) 18, (b) 18, (c) 18, (d) 8, (e) 8, (f) 6 and (g) 3 days after inoculation. Their diameters are (a) 18, (b) 31, (c) 55, (d) 51, (e) 58, (f) 50 and (g) 62 mm.

3. 細菌コロニーの DLA 型成長における場

ある粒子が DLA 型成長をするためには、その場がラプラス方程式をみたす場、すなわち拡散場でなければならない。この細菌コロニーが DLA 型成長をする拡散場は一体何であろうか。それには二つの可能性が考えられる。その一つは、寒天内を拡散している栄養（ペプトン）が、偶然コロニーと寒天との界面に付着した場合、細菌がその栄養を取り込み、分裂・増殖を行うのではないかというものである。他の一つは、細菌自身の産生する（有害な）代謝産物がコロニーから排出され、それが拡散していくことによってコロニー形成が促進されるのではないか、という可能性である（Meakin (1986)）。そこでどちらがコロニーの DLA 型成長の場として関与しているかを解明するため、次のような実験を行った。

ペプトンを含まない寒天平板上に本菌を接種し培養しても、ほとんどコロニーの成長は見ら

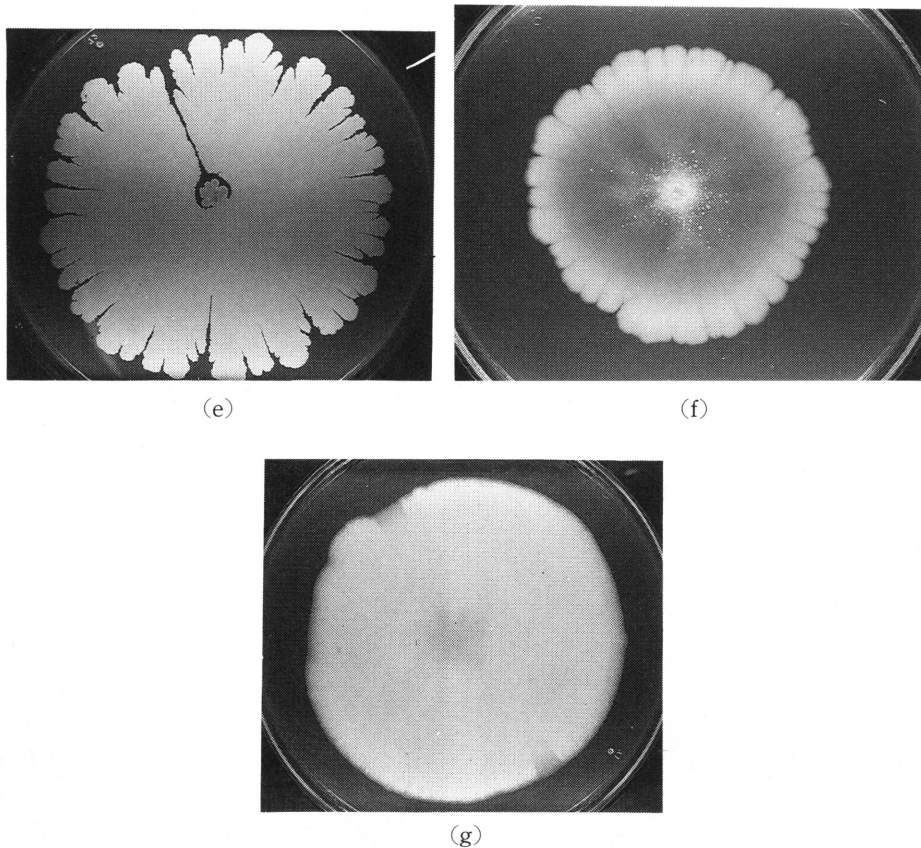


Fig. 5. (continued)

れなかった (Fig. 4(a)). 18 日間培養してもわずか直径 2 mm ほどの大きさであった. この結果は栄養拡散の存在しない場ではコロニーが成長しないことを示している. また一方向にペプトンの濃度勾配 (0-2 g/l) を持つ寒天平板上で, 初期濃度が 0 g/l の点に細菌を接種すると, コロニー樹枝は著しく高ペプトン濃度の方向へ伸長していった.

これらの実験結果から, コロニーの DLA 型成長は寒天中の栄養の拡散場 (濃度場) において起こることが明らかとなった. しかし, 細菌の代謝産物の寒天内への拡散が DLA 型コロニー形成に何らかの影響を与えている可能性も否定できない.

4. コロニー形態の相変化

Bacillus 属, 特に *B. subtilis* のコロニー形態は周囲の環境因子によって大きく変化することがよく知られている (Claus and Berkeley (1986)). 本菌のコロニー形態も寒天平板内の栄養濃度および平板表面の湿潤度によって大きく変わった. すなわち低ペプトン濃度 (≤ 1 g/l) で平板が乾いている場合, コロニーは上述したように DLA 型成長をした (Fig. 5(a), (b), (c)). ペプトン濃度を上げるとコロニー樹枝はしだいに太くなり, 全体の形状も円形に近づき (Fig. 5(d), (e)), それらの樹枝は融合して菊花状になった (Fig. 5(f)). さらに高濃度下ではほぼ円形のコロニーに成長した (Fig. 5(g)). この成長パターンは Eden モデル (Peters et al. (1979) お

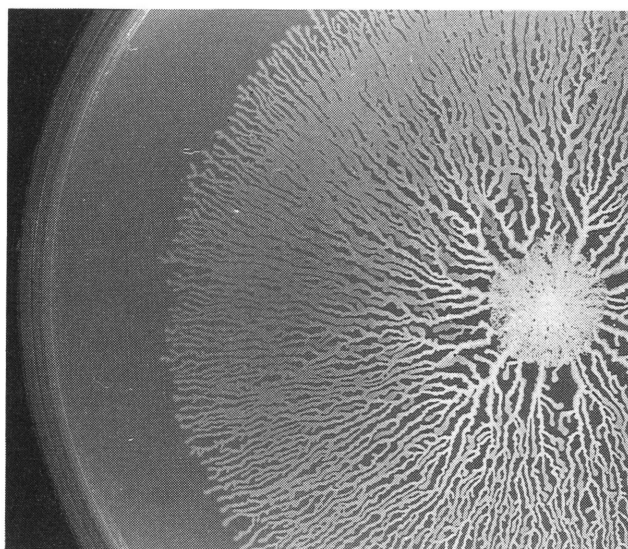


Fig. 6. An example of a dense branching colony morphology. The organism was inoculated on an agar plate containing 1 g/l of peptone, whose surface had a certain moisture. The colony was photographed one day after inoculation. Its diameter is about 65 mm.

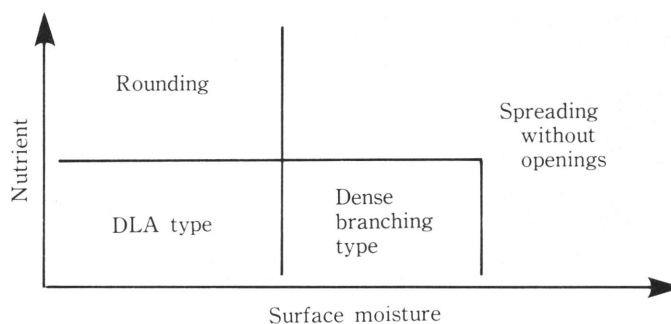
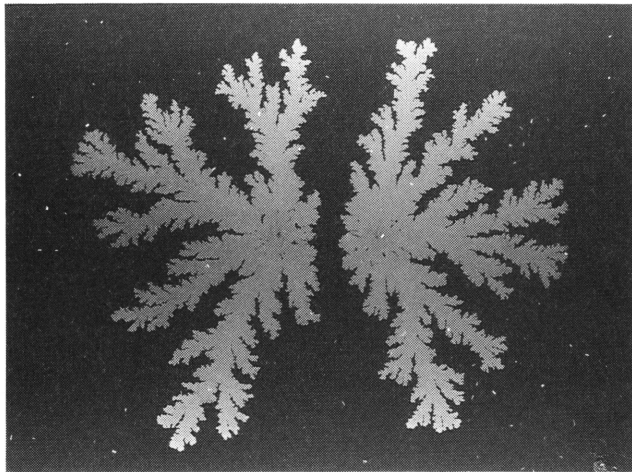


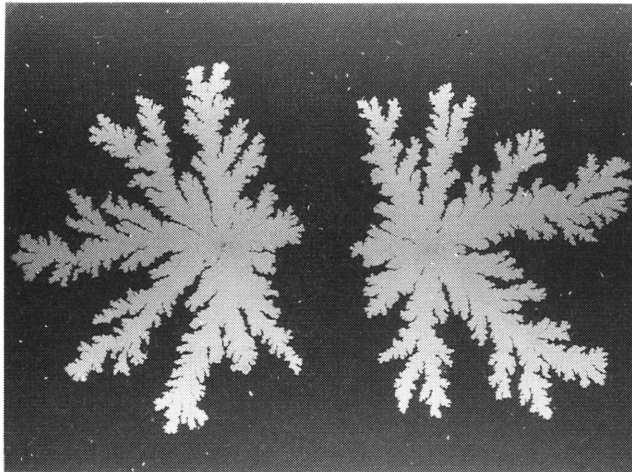
Fig. 7. A schematic phase diagram of the colony patterns in terms of surface moisture and nutrient of agar plates.

よびその参考文献, Meakin (1988)) を想起させる. Eden モデルとはクラスター周辺部の成長確率をすべて等しく, しかもランダムに与えたもので, このクラスターはコンパクトな形態に成長する.

栄養濃度が低く (1 g/l), 平板表面がある湿潤度を持つ場合, 培養 1 日後には接種点からほぼ平面を覆う放射円状の樹枝構造のコロニーが観察された (Fig. 6). この形態は Dense branching morphology (DBM) (Sawada et al. (1986), Grier et al. (1986), Ben-Jacob et al. (1986)) を想起させる. DBM とは, 直線的な樹枝による放射円状の形態である. その成長メカニズムは現在まだ解明されていない. さらに栄養濃度あるいは表面湿潤度が高い場合には, 培養 1 日後コロニーは平板全体をすきまなく薄い膜状に拡がった. 以上の結果をまとめると, 平板の栄養濃度と表面湿潤度の二つの因子によるコロニー形態の変化は, Fig. 7 に示すような相図に表された.



(a)



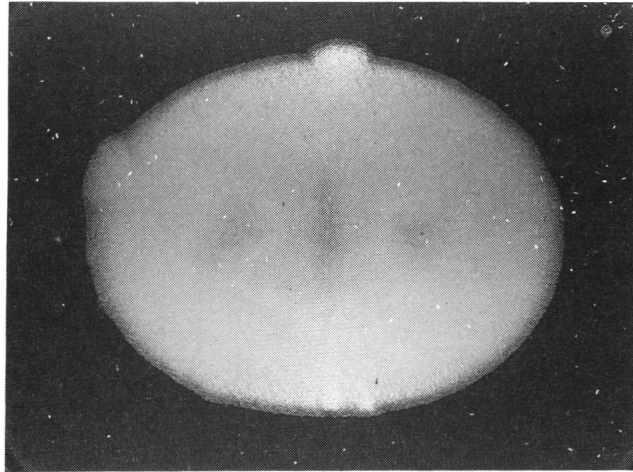
(b)

Fig. 8. Repulsion between two neighboring colonies. The organism was spotted simultaneously at two points at a distance of (a) 1, (b) 2, (c) 2 and (d) 4 cm on the plate surface. The peptone concentrations of the plates were (a) 1, (b) 1, (c) 40 and (d) 1 g/l. The colonies were photographed (a) 12, (b) 12, (c) 3 and (d) 1 day after inoculation. The surface of the agar plate (d) has certain moisture.

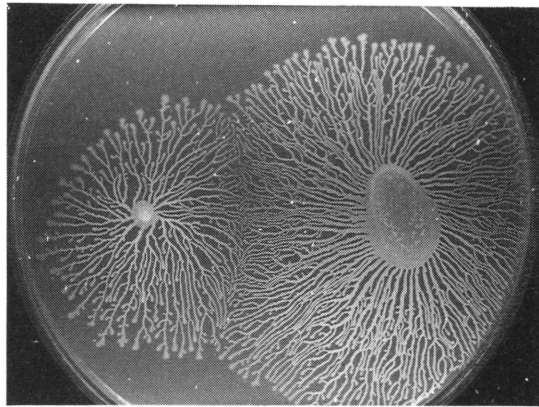
5. 隣接する2コロニー間の反発

拡散場における DLA 型成長では隣接するクラスターは結合せず、お互いに反発して成長する (Meakin (1986)). では本菌の場合、成長中の2コロニー間に反発は起こるであろうか.

ペプトン濃度 1 g/l の寒天平板上で、ある距離 d だけ離れた二つの点に本菌を接種した. 培養中、相手のコロニーに面しているコロニー樹枝は外界に面した樹枝とは対照的に成長がほとんど停止した. その結果二つのコロニーはお互いに融合せず、反発した形態となった (Fig. 8



(c)



(d)

Fig. 8. (continued)

(a)). 距離 d が大きくなるとこの傾向は弱まった(Fig. 8(b)). これらの結果は、このタイプの成長が栄養の拡散場の影響を受けていることを示している。この現象は同時に、このタイプのコロニー形成が DLA プロセスに従って成長することを明らかにしている。高栄養濃度下では二つの隣接したコロニーは培養中反発せず、融合した(Fig. 8(c)). この結果から、このタイプのコロニー成長はそれほど強く栄養の濃度場の影響を受けないと考えられ、Eden モデルと類似している。コロニー形成において、高栄養濃度になるほど DLA プロセスに Eden 的要素が加わる可能性がある。

DBM 型成長においては、二つの隣接するコロニーは培養中反発した(Fig. 8(d)). これは、このタイプの成長は栄養濃度場の影響を受けていることを示している。また、DBM において樹枝間の距離はどこでもほぼ一定であるため、その距離がこの成長形態での栄養の拡散長に相当するのではないかと考えられる。これは、同図に示されているように、各コロニーの成長が培養中 2 次元の境界条件、すなわち寒天平板の外形に影響を受けないことによって支持される。平板表面の湿潤度あるいは栄養濃度がさらに高い場合、二つのコロニーは平板上を速く拡がり、

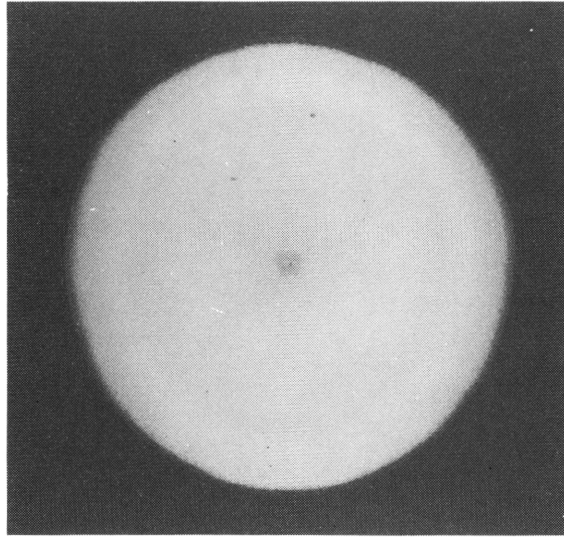


Fig. 9. A round colony morphology on an agar plate covered with glycerol. The strain was inoculated in an agar plate with 1 g/l of peptone, whose surface was covered with a thin layer of glycerol. The colony was photographed 3 days after inoculation. Its diameter is 30 mm.

お互いに融合した。その両者間の境界線は観察できなかった。

以上のように各コロニー形態、すなわちその成長メカニズムによって、2コロニー間に拡散場の影響を受けて反発が起こるもの（DLA および DBM 型）とそうでないものがあった。

6. 局所的成長メカニズム

今回の *B. subtilis* を用いた研究結果から、どのような種類のバクテリアも基本的には栄養の低濃度下においては拡散律速のプロセスに従って成長するのではないかと推測できる。また同時に細菌のコロニー成長はその表面張力、細胞分裂の方向性などその細菌自体が持つ固有な局所的成長規則によっても決定されると考えられる。この局所的成長規則が各細菌のコロニー形態を特徴づけていると推察される。コンピューターシミュレーションにおいては、局所的成長規則が DLA パターンに変化を与えることが知られている (Meakin (1988))。現在まで私達はいくつかの種類の細菌について本菌と同じ条件でコロニー形態を調べてきた。しかし本菌以外の種類で DLA 型成長をするものはまだ発見されていない。その理由の一つに、本菌が他の細菌に比べてコロニーの疎水性が非常に強いことが考えられる。すなわち寒天平板上でコロニーと水を接触させたとき、本菌は他の細菌よりもかなり撥水性が強い。以上のことから本菌の局所的成長規則を解明する目的で次のような実験を試みた。

ペプトン濃度 1 g/l の寒天表面に薄く層状にグリセロールを塗布し、その上に本菌を接種するとコロニー形態はほぼ完全な円形になった (Fig. 9)。このような形態になる原因は不明であるが、ある物理的要因、例えばコロニー最外部でのグリセロールの表面張力がコロニーを円形にするのではないかと考えられる。

また本菌をペプトン濃度 1 g/l の寒天平板上に接種し、低温 (例: 25℃) で培養した場合、あるいは寒天濃度の高い平板上で (例: 30 g/l) 培養した場合、コロニーは DLA パターンよりも

密度の高い樹枝状構造に成長した。これらの現象は寒天中のペプトンの拡散速度と細菌の成長速度との相対的比率に関係していると考えられる。

今後、各バクテリアに特徴的な局所的成長規則を解明することは、コロニーの形態形成を研究する上でますます興味深く、かつ重要になるであろう。また細菌のコロニー形成におけるDLA, Eden モデル, DBM 間の相互作用および交差についての研究も同様に重要であると考えられる。

謝 辞

本研究にあたり貴重な意見をいただいた松山東平教授（新潟大学 医学部）、およびフラクタル次元解析を助けていただいた寺田淳、村田克之、横山淳（中央大学 物理）の諸氏に深謝致します。

参 考 文 献

- Ben-Jacob, E., Deutcher, G., Garik, P., Goldenfeld, N. and Lareah, Y. (1986). Formation of a dense branching morphology in interfacial growth, *Phys. Rev. Lett.*, **57**, 1903-1906.
- Claus, D. and Berkeley, R.C.W. (1986). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (ed. P.H.A. Sneath), **2**, p. 1108, Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland.
- Fujikawa, H. and Matsushita, M. (1989). Fractal growth of *Bacillus subtilis* on agar plates, *J. Phys. Soc. Japan*, **58**, 3875-3878.
- Grier, D., Ben-Jacob, E., Clarke, R. and Sander, L.M. (1986). Morphology and microstructure in electrochemical deposition of zinc, *Phys. Rev. Lett.*, **56**, 1264-1267.
- Majumdar, S. and Prasad, R.R. (1988). The fractal dimension of cerebral surfaces using magnetic resonance images, *Computers in Physics*, **2**, 69-73.
- Mandelbrot, B.B. (1982). *The Fractal Geometry of Nature*, Freeman, San Francisco, California.
- Matsushita, M. (1989). Experimental observation of aggregations, *The Fractal Approach to Heterogeneous Chemistry* (ed. D. Avnir), 161-179, Wiley, Chichester, U.K.
- Matsushita, M., Sano, M., Hayakawa, Y., Honjo, H. and Sawada, Y. (1984). Fractal structures of zinc metal leaves grown by electrodeposition, *Phys. Rev. Lett.*, **53**, 286-289.
- Matsushita, M., Hayakawa, Y. and Sawada, Y. (1985). Fractal structure and cluster statistics of zinc metal "trees" deposited on a line electrode, *Phys. Rev. A*, **32**, 3814-3816.
- Matsuyama, T., Sogawa, M. and Nakagawa, Y. (1989). Fractal spreading growth of *Serratia marcescens* which produces surface active exolipids, *Federation of European Microbiological Societies, Microbiology Letters*, **61**, 243-246.
- Meakin, P. (1983). Diffusion controlled deposition on fibers and surfaces, *Phys. Rev. A*, **27**, 2616-2623.
- Meakin, P. (1986). A new model for biological pattern formation, *J. Theoret. Biol.*, **118**, 101-113.
- Meakin, P. (1988). The growth of fractal aggregates and their fractal measures, *Phase Transitions and Critical Phenomena* (eds. C. Domb and J.L. Lebowitz), Vol. 12, 335-489, Academic Press, New York.
- Peters, H.P., Stauffer, D., Hölters, H.P. and Loewenich, K. (1979). Radius, perimeter, and density profile for percolation clusters and lattice animals, *Z. Phys. B*, **34**, 399-408.
- Sawada, Y., Dougherty, A. and Gollub, J.P. (1986). Dendritic and fractal patterns in electrolytic metal deposits, *Phys. Rev. Lett.*, **56**, 1260-1263.
- Tsonis, A.A. and Tsonis, P.A. (1987). Fractals: a new look at biological shape and patterning, *Perspectives in Biology and Medicine*, **30**, 355-361.
- West, B.J., Bhargava, V. and Goldberger, A.L. (1986). Beyond the principle of similitude: renormalization in the bronchial tree, *Journal of Applied Physiology*, **60**, 1089-1097.
- Witten, T.A. and Sander, L.M. (1981). Diffusion-limited aggregation, a kinetic critical phenomenon, *Phys. Rev. Lett.*, **47**, 1400-1403.

Fractal Growth of Bacterial Colonies

Hiroshi Fujikawa

(Department of Microbiology, Tokyo Metropolitan Research
Laboratory of Public Health)

Mitsugu Matsushita

(Department of Physics, Chuo University)

A *Bacillus subtilis* strain is inoculated on an agar plate containing a low concentration (1 g/l) of peptone as nutrient and incubated at 35°C. Colonies grow two-dimensionally with random branches, similar to clusters of the diffusion-limited aggregation (DLA) model. Colony pattern is found to be self-similar with the fractal dimension of 1.73, in good agreement with the value of the DLA model. During the growth of a colony the existence of a screening effect is confirmed. These results clearly show that the colony grows through a simple physical mechanism, that is, the DLA process.

What makes a diffusion field for the bacterial DLA type growth? No remarkable growth is observed on an agar plate without any peptone. When the organism is spotted on an agar plate with the unidirectional concentration gradient of peptone (0-2 g/l), colony branches develop predominantly in the direction of higher peptone concentration. These results strongly suggest that the diffusion field of nutrient in an agar plate is essential for the bacterial DLA growth.

The colony morphology varies a great deal with the nutrient concentration and the surface moisture of agar plates, including a DLA type, dense branching morphology, a round type, and fast spreading without any openings.

Repulsion between two neighboring colonies is observed in the DLA and dense branching morphologies only, suggesting that these growths may be strongly influenced by the concentration field of nutrient.

Local growth mechanism characterized by an organism itself is also considered to affect its colony formation. When the agar plate is covered with a thin layer of glycerol, the colony morphology of our strain becomes thoroughly round. This may come from some physical factor such as surface tension of glycerol.