

バイオフィーム研究技術の新展開

New Perspective in Technologies to Study Biofilms

八幡 穰¹, 戸田 憲輔², 瀬戸山恵里香¹, 福田 淳二²,
鈴木 博章², 稲葉 知大¹, 内山 裕夫¹, 野村 暢彦^{1*}

YAWATA YUTAKA, TODA KENSUKE, SETOYAMA ERIKA, FUKUDA JUNJI, SUZUKI HIROAKI, INABA TOMOHIRO,
UCHIYAMA HIROO and NOMURA NOBUHIKO

¹ 筑波大学大学院生命環境科学研究科 〒305-8572 つくば市天王台 1-1-1

² 筑波大学大学院数理物質科学研究科 〒305-8571 つくば市天王台 1-1-1

* E-mail: nomunobu@sakura.cc.tsukuba.ac.jp

* TEL/FAX: 029-853-6627

¹ Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, Tennoudai 1-1-1,
Tsukuba, Ibaraki 305-8572, Japan

² Graduate School of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba, Tennoudai 1-1-1,
Tsukuba, Ibaraki 305-8571, Japan

キーワード: バイオフィーム, マイクロデバイス, MEMS

Key words: biofilms, microdevice, MEMS

(原稿受付 2010年2月23日/原稿受理 2010年4月7日)

1. はじめに

バイオフィームとは、一般的な定義においては物質表面に付着した微生物集団と微生物が生産するEPS (Extracellular polymeric substance) からなる3次元構造体を指す。バイオフィームは、排水処理、発酵工業、微生物燃料電池など、工業のプロセスとも関係が深い。バイオフィームを形成した微生物細胞は、浮遊状態の細胞とは異なる挙動を示す。バイオフィーム状態の *Pseudomonas aeruginosa* が浮遊状態と比較して3オーダー高い濃度のトブラマイシンに耐えうることが示されているほか¹⁾, 免疫系に対して高い耐性を示す事も知られている²⁾。また, *Escherichia coli* の遺伝子発現プロファイル研究においては, 実に38%の遺伝子が浮遊状態とは異なる発現を示すという報告もある³⁾。これらの知見は, バイオフィーム中の微生物は浮遊状態の微生物とは根本的に性質を異にすることを示唆している。従ってバイオフィーム中の微生物を制御するためには, バイオフィーム状態の微生物そのものを研究する必要がある。本総説では, バイオフィーム研究技術の現在を概観するとともに, 現在我々のグループが取り組んでいる新規バイオフィーム研究技術について紹介してゆく。

バイオフィームの生育環境は土壌・海洋環境から人体まで多様であり⁴⁾, そのため研究技術も生態学的手法から分子生物学的手法まで幅広い。 *Methods in Enzymology* の3分冊においてフィールドワークにおける採取技術から *in vitro* 培養解析技術まで幅広いバイオフィーム研究

手法が網羅されているほか⁴⁻⁶⁾, その全体像については優れた総説⁷⁾があるので参照されたい。

in vitro 培養解析技術に話題を絞れば, マイクロタイターアッセイ法は, おそらく最も汎用されているバイオフィーム研究技術の一つである。マイクロタイタープレートにバイオフィームを形成させ, 様々な因子がバイオフィーム形成に与える影響をスクリーニングするマイクロタイターアッセイ法は (図1), バイオフィーム形成関連因子の探索に広く用いられている。McEldowney と Flecher らは, 1986年の各種化学物質のバイオフィーム形成への影響を研究において, この手法を初めて用いている⁸⁾。その後, O'Toole と Koltor らはこれを *Pseudomonas fluorescence* のバイオフィーム特異的遺伝子を探索するのに適用し⁹⁾, 以後バイオフィーム形成異常変異株などのスクリーニングを行う最も普通の方法の一つとなっている。図1Bに *P. aeruginosa* PAO1 変異株と野生株のバイオフィーム形成の差を示す。このように, ある因子がバイオフィームの形成に正負いずれの影響を与えるかを容易に知る事ができる。そのプロトコルが実践しやすく, 多条件を同時に比較しやすい利点を持つことから, バイオフィーム形成に対する各種因子の影響を研究する目的には大変有用な手法である。

一方で, マイクロタイターアッセイは回分培養であることから, バイオフィームの構造的特徴の変遷を経時的に追跡するには適さない。そこで, 共焦点レーザー顕微鏡観察法と連続培養法を組み合わせ, バイオフィームの三次元構造を経時的に観察する方法が開発されてきた。

バイオフィルムの観察は、電子顕微鏡を用いたものが1970年代から1980年代にかけて盛んに行われ、現在でも高解像度が必要な場合に用いられている¹⁰⁻¹²。しかしながら近年、共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いた観察がより一般的となりつつある¹³。共焦点レーザー蛍光顕微鏡では、試料と共焦点な位置に置かれたピンホール板を備え、特定の焦点面から放たれた蛍光シグナルを検出することができる(図2A)。焦点面を徐々にずらしながら走査することで、蛍光を放つ物質の空間分布を再構築することができる。電子顕微鏡法では試料の脱水処理が必要であるのに対して、共焦点レーザー蛍光顕微鏡では無処理のバイオフィルムの三次元構造を研究することができる。また、形質転換により微生物細胞にGFPなどの蛍光タンパク質を生産させられれば、共焦点レーザー蛍光顕微鏡法で生きたバイオフィルムの三次元構造が観察可能である。バイオフィルムの三次元構造を可視化する手法としては、蛍光タンパク質を用いる方法の他に、蛍光色素染色法と共焦点レーザー蛍光顕微鏡法を組み合わせ

せる方法があり、蛍光色素染色法ではバイオフィルムの様々な構成要素の分布を可視化することができる点で有利である¹⁴⁻¹⁶。しかしながら、蛍光色素による染色はしばしば細胞の生理状態の変化を引き起こすため¹⁷、バイオフィルム三次元構造の経時的な観察には通常用いられない。

フローセル法は、このような共焦点レーザー顕微鏡によるバイオフィルム構造の経時的観察を行うために広く用いられている一種の連続培養法である^{7,18}。フローセルとは、一般的にはカバーガラスで蓋をされた流路である。培地が流路を通過し、カバーガラス上にバイオフィルムが形成されるので、これを共焦点レーザー顕微鏡で観察する事が出来る(図3)。培地はポンプによって培地ボトルから供給され、フローセルを通過して廃液ボトルに捨てられる。フローセル法においては、微生物細胞に蛍光遺伝子発現レポーターを組み込む事で遺伝子発現の時空間的局在を追跡する事ができる。また、それぞれ異なる蛍光タンパク質を発現させる事で複合微生物系内の優占化や微生物種同士の位置関係などを追跡する研究等も行われている¹⁹。フローセル法は、マイクロタイターアッセイ法のように多条件を比較する研究には適さないが、バイオフィルムの三次元構造について経時的な研究を行う際には優れた手法である。この利点を生かしてバイオフィルムの形成過程の経時観察が盛んに行われ、バイオフィルムの形成が、①微生物の固体表面への付着とマイクロコロニーの形成、②マイクロコロニーの成長と成熟化、③バイオフィルムの崩壊と再生、の各段階からなることが解明された²⁰。このような背景から、バイオフィルムの生態を理解するためには、時間軸に沿った変化、すなわち経時的プロセスの解明が必要であるという認識が広まりつつある。

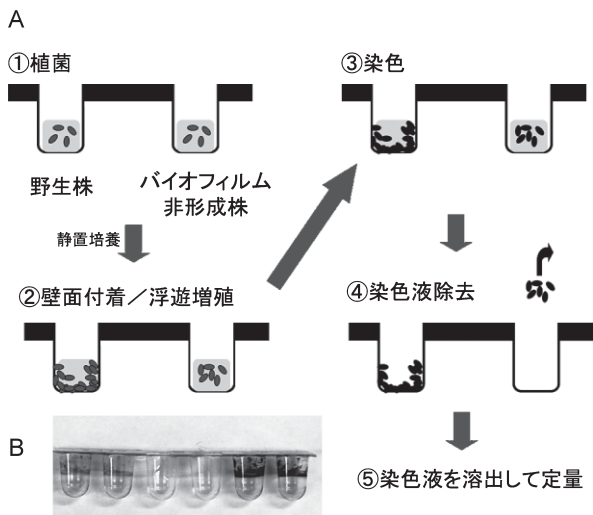


図1. (A) マイクロタイターアッセイの手順。バイオフィルムを形成しなかった細胞は染色液とともに除去される。(B) 染色後の96穴マイクロタイタープレートの写真。バイオフィルムが形成されたウェルは紫色に染色される。野生株(左)よりバイオフィルム過剰形成株(右)では染色の程度が著しく強い。好気環境における試験では、しばしば気液界面にリング状のバイオフィルムが形成される。

2. バイオフィルム研究技術の進展

前章で述べたように、共焦点レーザー蛍光顕微鏡観察やフローセル法といった技術の活用により、バイオフィルムが時間と共にダイナミックに変化して行く構造体であることが明らかにされてきた。しかしながらこのような時間的プロセスの解析は、形質転換系が確立された微生物について、穏和な環境条件下で行われたものが大部分である。では、実環境バイオフィルムはどのような時間的プロセスを演じ、厳しい環境はそのプロセスにどのような影響を与えるのだろうか？あるいはまた、そのようなバイオフィルムの時空間的变化は、微生物の生存戦略においてどのような役割を果たしているのだろうか？

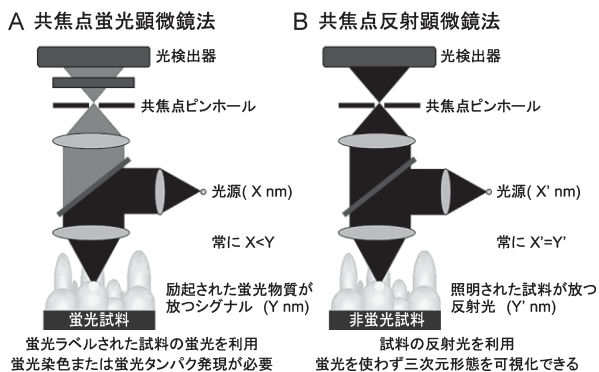


図2. 共焦点レーザー蛍光顕微鏡法(左)と共焦点反射顕微鏡法(右)の原理の比較。

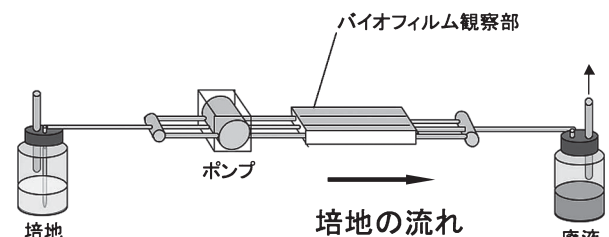


図3. 一般的なフローセル法用のセットアップ。フローセル直前に気泡除去用のトラップを設置する場合もある。

これらの疑問に取り組むために、我々のグループでは、非破壊 (intact) と同時解析 (simultaneous analysis) をキーワードとしたバイオフィーム研究技術の改良、開発を進めてきた。

3. intact なバイオフィームの可視化技術としての共焦点反射顕微鏡法

共焦点レーザー蛍光顕微鏡法を用いたバイオフィームのリアルタイム観察は前述のように極めて有用な手法であるが、その適用範囲に原理的な限界がある。第一に、蛍光タンパク質を発現させるためには対象となる微生物の形質転換系が確立している必要がある (ただし強く安定した自家蛍光を持つ微生物は除く)。第二にはバイオフィームの生育環境が蛍光タンパク質の正常に機能する環境であることが必要である²¹⁾。また、形質転換系が確立している微生物であっても、タンパク生産が正常に行われる生理状態でなければ可視化できない場合が多い。このため、極限環境におけるバイオフィームや、形質転換系の確立していない微生物種 (微生物全体の大多数と考えられる) のバイオフィーム、あるいは殺菌処理下や VBNC 状態などタンパク生産が不活性な状態のバイオフィームについては、その三次元構造の経時的変化に関する知見が非常に限られているのが現状である。一方で近年、バイオフィームを構成する種や生育環境の多様性²²⁻²⁴⁾、また殺菌処理に対する抵抗性²⁵⁻²⁶⁾ などが明らかとなっていることから、多様な微生物種や生育環境、細胞の生理状態におけるバイオフィームを可視化することには大きな社会的ニーズが潜在していると考えられる。

蛍光タンパク質の発現、脱水処理および色素染色のいずれも必要としないバイオフィーム三次元構造の可視化法があれば、完全に intact な生きたバイオフィームの三次元構造を、生育環境やバイオフィームを構成する微生物種、あるいはまたその生理状態などを問わずに研究することができると考えられる。そこで我々が着目したのが共焦点反射顕微鏡法 (Confocal Reflection Microscopy: CRM)²⁷⁾ である。CRM とは、共焦点顕微鏡を用いる反射顕微鏡法である (図 2B)。先述した共焦点レーザー蛍光顕微鏡法では、蛍光タンパク質または蛍光色素が放つ蛍光をシグナルとして検出するのに対し、CRM では対象物が照明光を反射した反射光をシグナルとして検出する点が大きく異なる (図 2)。反射光をシグナルとして利用するために、対象となる細胞を形質転換したり、蛍光色素で染色したりすることなく三次元構造を可視化することができる。本法は主に動物生理学の分野で用いられていたが、動物細胞は多くの場合殆ど透明で反射率が極端に低く、骨等の硬組織の表面走査を行う場合以外には、高反射性物質で染色する必要がある²⁷⁻²⁸⁾。そのため、蛍光色素と蛍光顕微鏡法の急速な発達以降、この方法が同分野で用いられることは極端に少なくなっている²⁸⁾。

一方で、液体培地中で微生物細胞が増殖すると、培養液の Optical Density は上昇する (つまり光線透過率が低下する)。このことは微生物細胞が光線を拡散させていること、すなわち微生物細胞がある程度の光線反射率を持つことを示している。この性質を利用して、微生物

細胞で形成されたバイオフィームの三次元構造は、高反射性物質で染色しなくとも、CRM を用いれば可視化できる。CRM がバイオフィームの可視化に用いられた前例はあるものの、その存在と有用性が広く認知されてきたとは言い難い。また、原法では、バイオフィームが物質表面に付着している場合には、バイオフィーム内の細胞を可視化することはできるものの、バイオフィームの深さにより信号強度が著しく変動するために、バイオフィームの全体像を可視化することはできないという問題もあった。

そこで我々は、共焦点反射顕微鏡法に改良を加え、intact なバイオフィーム観察法として広く活用できる事を示してきた。共焦点顕微鏡の各種設定を焦点面ごとに最適化しつつ走査する Continuous optimizing 法を考案し、Continuous optimizing 法を用いる共焦点反射顕微鏡法を COCRM (Continuous-optimizing-CRM) 法と名付けた²⁹⁾。図 4 はバイオフィーム研究の代表的モデル微生物である *P. aeruginosa* バイオフィームをモデルとし、COCRM 法によりバイオフィームが正しく可視化できることを示す。図 4G はハイドロキシアパタイト素材に形成させた *Streptococcus mutans* のバイオフィームの三次元投影画像を示す。*S. mutans* は染色も固定もしていない intact な状態であるが、連鎖球菌が折り重なるようにマット状バイオフィームを形成している様子が可視化されている。また、COCRM 法と FCLSM 法を組み合わせる事により、バイオフィーム内部への蛍光物質の浸透過程を可視化する事も可能であり、我々はこの原理を用いたバイオフィーム内部への物質輸送の解析法として CRFP (the combined reflection and fluorescent confocal microscopy test for dye penetration) 法を開発している (図 5)³⁰⁾。より幅広い範囲の微生物種のバイオフィームやより幅広い環境におけるバイオフィームの構造を研究する上で、COCRM 法は強力なツールになると考えられる。

4. バイオフィームの構造形成と代謝活性の同時分析

植物の葉や根の形状が、代謝に大きな与えていることは広く受け入れられている。ここから、バイオフィームの立体構造もまた、代謝効率に影響を与えており、その生き残りに貢献しているという仮説が導かれる。環境中のバイオフィームはガス状代謝産物を生産することが知られている。一例として、自然環境中の葦に付着したバイオフィームが N_2 や N_2O を生産することが報告されている³¹⁾。さらに、微生物バイオフィームは排水処理やその他の産業プロセスにおいて、嫌氣的脱窒処理により硝酸を N_2 や N_2O に変換する例に見られるように、可溶性物質をガス状物質に変換する処理に用いられている³²⁻³⁴⁾。しかしながら、バイオフィームの構造とガス状代謝産物生産との間に関係があるか否かはほとんど分かっていない。重要なエネルギー代謝反応の最終代謝産物はしばしばガス状分子である。従って、バイオフィームの構造とガス状代謝産物生産の間に関係があることを示すことができれば、バイオフィームの立体構造がエネルギー代謝効率に影響をあたえる機能を有していることが示唆されると考えられる。

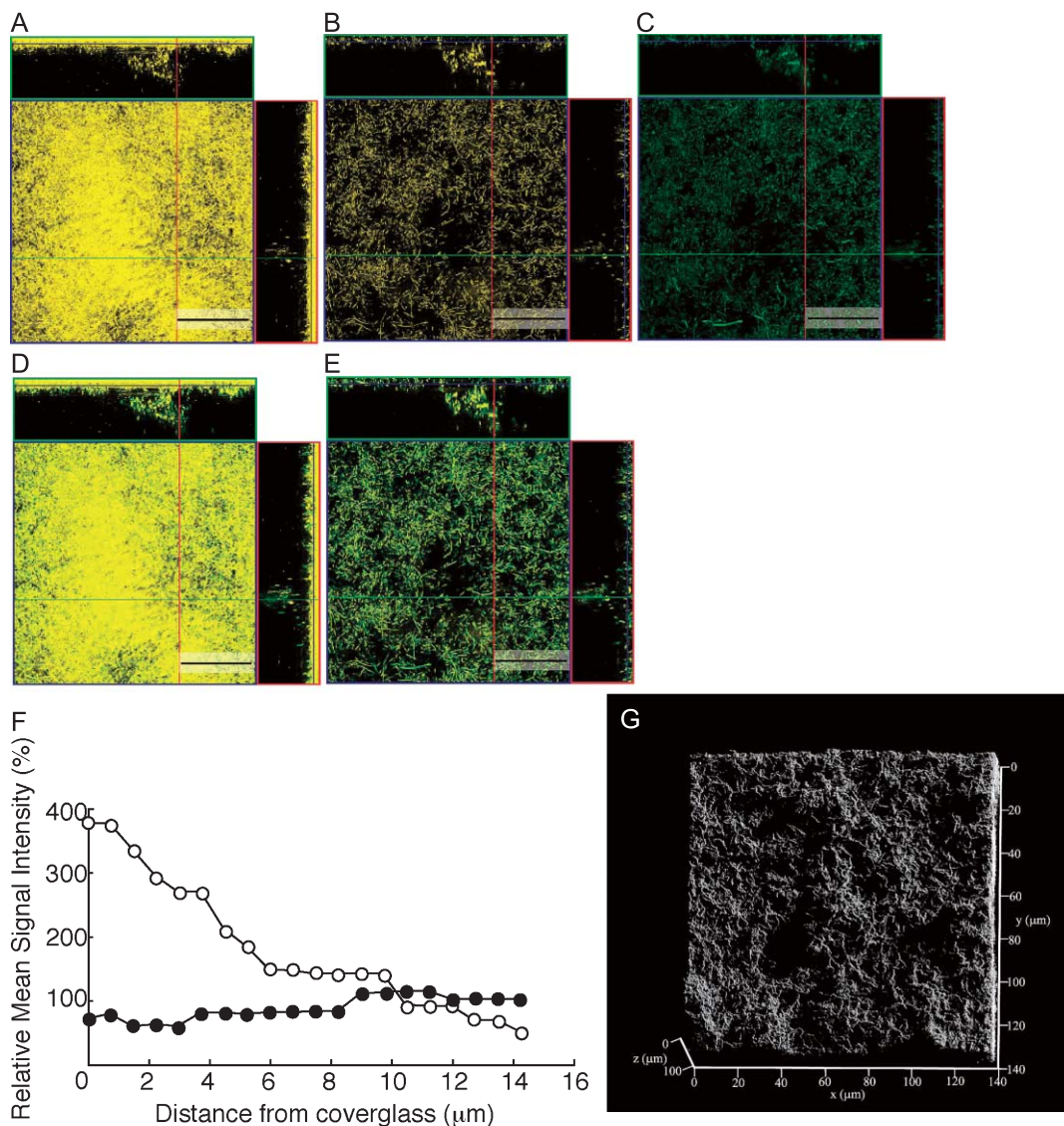


図4. (A) 共焦点反射顕微鏡法, (B) COCRM, および (C) Syto9 蛍光により取得した *P. aeruginosa* PAO1 バイオフィームのオルソメトリック画像。(D) 共焦点反射顕微鏡法 (赤) と Syto9 蛍光 (緑) の重ね合わせ。(E) COCRM (赤) と Syto9 蛍光 (緑) の重ね合わせ。(F) Syto9 蛍光との比で表された共焦点反射顕微鏡法 (Circle) または COCRM (Diamond) により取得された画像の焦点面毎の平均信号強度。画像及びデータは 5 サンプルの中から代表的な例を示した。(G) COCRM により取得したハイドロキシアパタイト素材に形成させた *Streptococcus mutans* バイオフィームの三次元投影画像。

これまで、バイオフィームのガス状代謝産物の解析は、密栓した試験管やフラスコを用いて行われてきた³¹⁾。これらの気密容器はガス状代謝産物の回収が可能であり、回分培養実験には適している。しかしながら、ガス状代謝産物の解析とバイオフィームの観察を同時にかつ非破壊的に行える実験系はこれまでに存在してこなかった。このような手法があれば、バイオフィームの形成や成長、老化とともにガス状代謝産物の生産能がどのように推移するかについて情報が得られると考えられる。前章で述べたように、共焦点レーザー顕微鏡法では生きたバイオフィームを観察できることに加えて、培養を中断することなくフローリアクター中のバイオフィームを観察することができる。従って、もしフローリアクター中で発生するガス状代謝産物を捕集することができれば、バイオフィームの観察とガス状代謝産物の解析が培養を中断することなく行えるであろう。この着想を実

現するために、我々はガス状代謝産物の捕集を可能にする新規な気密性フローリアクターを開発した (図 6)。この新規な培養装置を“Airtight Flow-reactor for nondestructive Gaseous metabolite Analysis and Structure visualization” (AFGAS) と名付け、AFGAS を用いた新規なバイオフィーム解析手法を“AFGAS 法”と名付けた³⁵⁾。

AFGAS 法を用いて *P. aeruginosa* バイオフィームの三次元構造、基質消費、可溶性代謝産物生産、ガス状代謝産物生産について経時的観察を行ったところ、脱窒環境において、我々の実験結果は N_2 と N_2O の蓄積が培養開始 8 時間後と培養開始 16 時間後の間に始まり、培養開始 24 時間後に最大に達することを示した (図 7)。一方で、バイオフィームの構造は、フィラメント形態の菌により構成される特徴的な 3 次元網目構造を示した (図 8)。脱窒環境下におけるバイオフィームの形成過程は、一般的な蛍光タンパク質を用いた共焦点蛍光顕微鏡

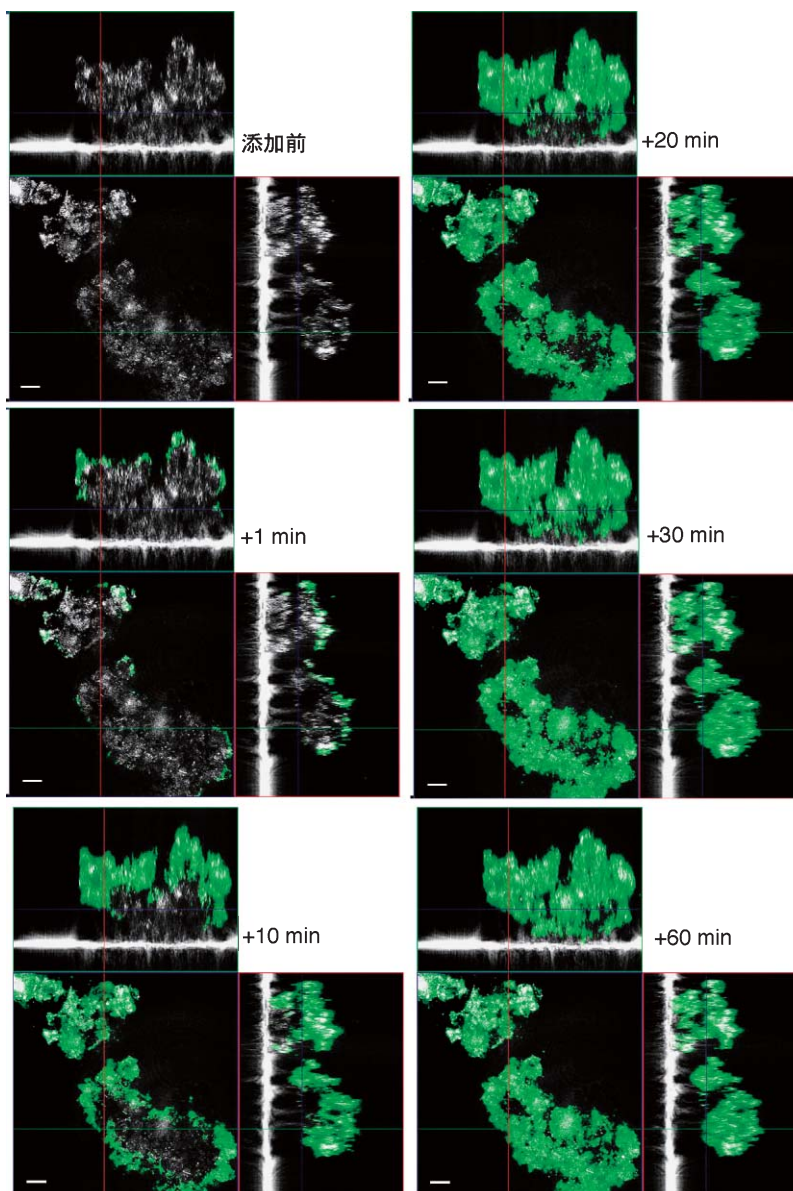


図5. 活性汚泥内部への SYTO9 蛍光色素の浸透過程。CRM により取得した画像（白）と SYTO9 蛍光により取得した画像（緑）の重ね合わせで示す。画像はそれぞれ SYTO9 の添加前と添加後 1, 10, 20, 30 及び 60 分に取得。スケールバーは 20 μm を示す。（Yawata *et al.*, 2010, *Microbes and Environments* より転載）

法では可視化できなかったが、COCRM 法により可視化することができた。興味深いことに、この特徴的な 3 次元網目構造の形成と活発なガス状代謝産物の生産はどちらも同じ培養開始 16 時間から 24 時間の間に起こっており（図 7, 8）、このバイオフィーム構造と代謝産物生産が関連している可能性を示唆している。このように、AFGAS 法を用いて、バイオフィーム構造の変化に伴って代謝産物生産や基質消費がどのように移り変わってゆくかを明らかにすることができる。我々は、AFGAS 法がバイオフィームの構造と代謝産物生産の間にあると推測される相関関係を解き明かし、バイオフィームの生態学に新たな知見をもたらすと考えている。

5. バイオフィーム研究の On-chip 化

これまで述べてきたように、経時的な解析はバイオ

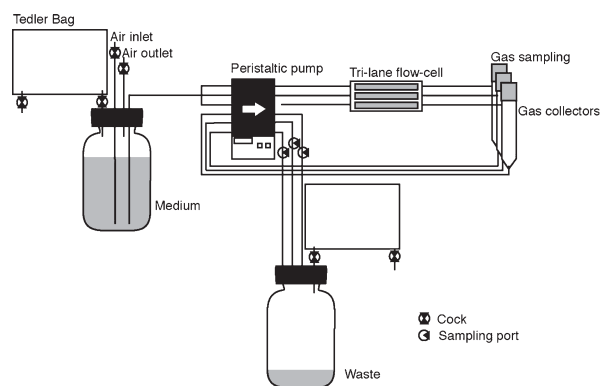


図6. AFGAS の概念図。AFGAS は 3 連実験が可能ないように設計されている。気密バッグが両端に取り付けられ、システム内部を外気から隔離する。3 連フローセルの各レーンは独立に廃液ボトルに接続され、廃液が混合されるのを防ぎ、各レーンからの独立した流下液回収と分析を可能にしている。（Yawata *et al.*, 2008, *Applied and Environmental Microbiology* より改変）

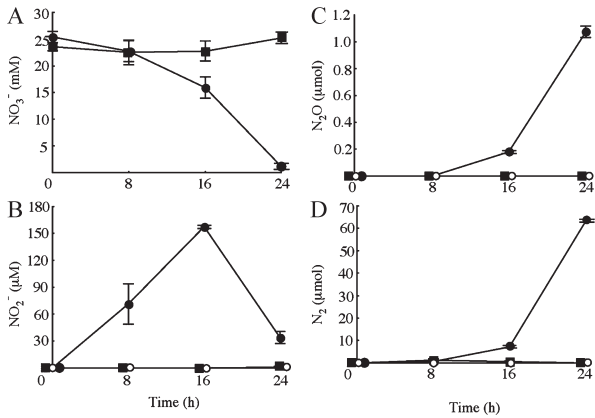


図7. AFGAS法を用いて測定した *P. aeruginosa* バイオフィルムの脱窒活性。PAO1 (Circle) および脱窒関連遺伝子破壊株 (Square) は硝酸添加 (solid) または非添加条件 (open) で培養した。流下液中の (A) NO_3^- または (B) NO_2^- 濃度をそれぞれ示す。ガスコレクター中に蓄積した (C) N_2 または (D) N_2O 量をそれぞれ示す。エラーバーは標準偏差。(Yawata *et al.*, 2008, Applied and Environmental Microbiology より転載)

フィルムの生態を理解する上で有用である。しかしながら、経時的解析はしばしば資材やマンパワーなどの研究リソースを多量に消費するため、多連、多条件での研究には不向きであった。では、もし100 nlサイズの微生物培養解析システムがあり、その内部の微生物をリアルタイムで観察定量できるとすれば、バイオフィーム研究はどう変わるだろうか？例えば容量の小ささは多連多条件の試験を容易にし、貴重なサンプルの消費を抑えて実験の自由度を飛躍的に向上させる。またリアルタイムの観察/定量は、バイオフィームの成長プロセスをモニター可能にする。現在このような解析システムの実現を目指し、COCRM法とマイクロフルーディックデバイス技術を融合させ、微小空間でバイオフィームの定量、観察および代謝分析が可能になる微生物微小培養解析システム「Microbe Micro Total Analysis System (Microbe- μ TAS)法」の開発に取り組んでいる。マイクロフルーディックデバイス (Micro-fluidic-device) とは、シリコン基盤上に微小な液体貯蔵チャンバーや微小センサー、バルブを形成し、それらを微小流路で接続してチップ上で自由に微小液体の移送、混合、貯蔵などを行える化学実験用微小流路系である。MEMS (Micro Electro Mechanical Systems) の一種であり、その特徴から「Laboratory-on-a-Chip」とも呼ばれている。内蔵センサーからの計測情報 (pH, 酸素濃度, アンモニア濃度など) はオンラインでリアルタイムに得られ、経時実験に適している。フォトリソグラフィ製法により低コスト、多連化も容易である。

図9に、現在開発中のアンモニアセンサーを内蔵した微生物培養チップの構造を示す。この微生物培養チップは、COCRM法によるバイオフィーム形成のモニタリングと、イオン選択膜法を用いたマイクロセンサーによるアンモニア消費のモニタリングが同時に可能なように設計されている。マイクロフルーディックデバイスにおけるバイオフィームの培養においては、どのように微生物を観察、定量するかという問題が浮上する。脱水固定し

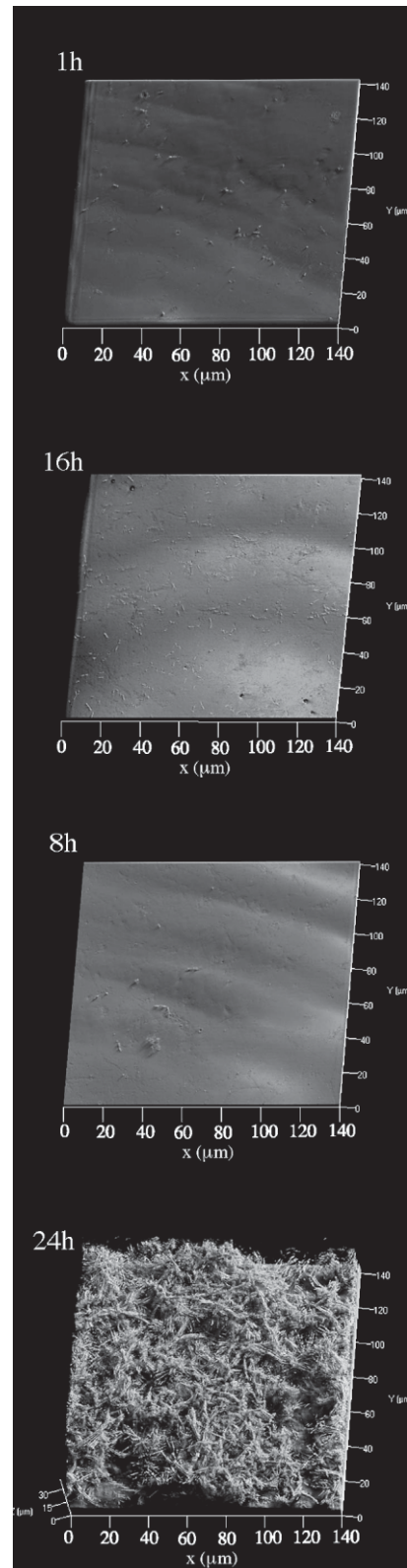


図8. AFGAS法を用いて培養した脱窒環境における *P. aeruginosa* PAO1 バイオフィームの形成過程。COCRM法により画像を取得。パネルはそれぞれ記されている通りに0, 8, 16, 24時間後の画像であり、140 × 140 μm (xy) の範囲を示す。(Yawata *et al.*, 2008, Applied and Environmental Microbiology より転載)

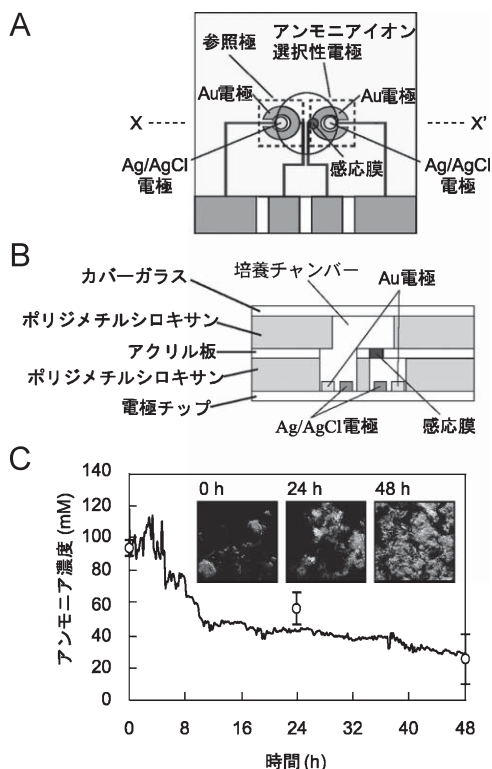


図9. アンモニアセンサーを内蔵した微生物培養チップ。(A) 断面図および (B) 俯瞰図。チップの大きさは 18 mm × 18 mm。(C) 内蔵アンモニアセンサーで測定した硝化汚泥培養時のアンモニウムイオン濃度の経時変化 (実線)。○はグルタミン酸脱水酵素法 (F-kit, Roche Diagnostic, Basel, Switzerland) で測定したアンモニウムイオン濃度。グラフ内のパネルは、COCRM 法により撮影した表示された時間における硝化汚泥の形態。

て電子顕微鏡観察、培養液を採取して CFU カウントなどの方法では、リアルタイム計測などマイクロフルーディックデバイスの長所がスポイルされ、より簡便迅速な微生物検出の必要にも応えられない。我々は以前の研究において、浮遊細胞のマイクロデバイス内における増殖モニタリングにおいて CRM 法が有用であることを示したが³⁶⁾、COCRM 法を用いればバイオフィームのモニタリングも可能である (図 10)²⁹⁾。図 9C は、微生物培養チップ内に保持した硝化汚泥のアンモニア消費活性を内蔵されたアンモニアセンサーでモニタリングした結果を示す。マイクロセンサーを用いたモニタリングでは測定が自動で行われるため、将来的にはこのようなモニタリングを多条件で行い、活性の推移を容易に比較できるようになると考えられる。

6. おわりに

本稿では、バイオフィームの時間的プロセス解析のための諸技術と、その on-chip 化への取り組みについて紹介してきた。バイオフィームの生態研究においては技術開発と研究領域の拡大が密接に関係している。しかし、300 年以上の歴史を持つ微生物研究の歴史と比べて、バイオフィーム研究が本格化してから未だ 30 年程度しか経っていない (もっとも、Leeuwenhoek ら最初期の微生物

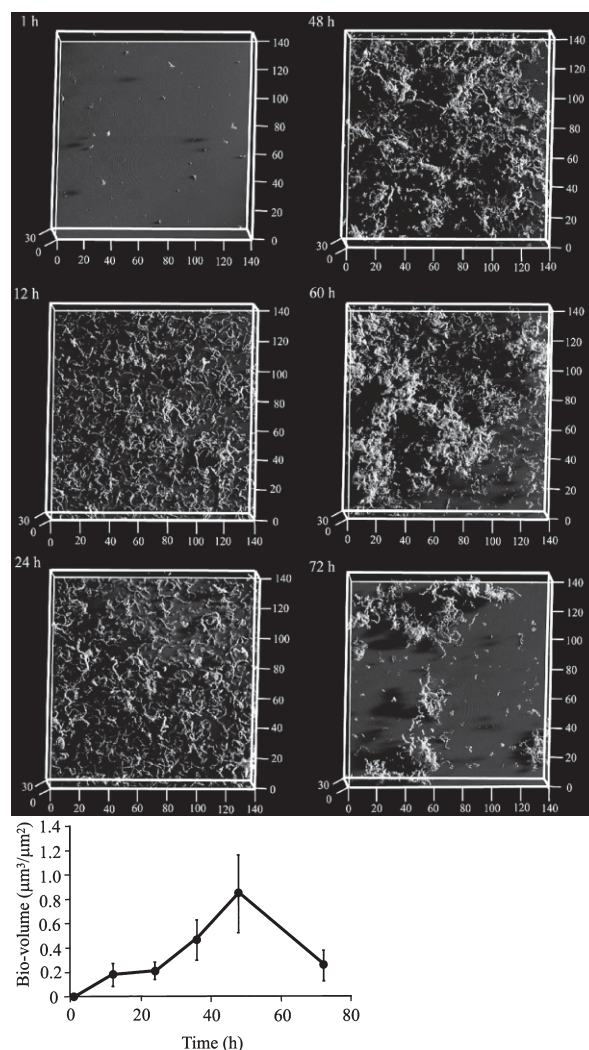


図 10. *S. mutan* バイオフィームの microfluidic device 内における増殖過程。(A) 12 hr 毎に取得した COCRM 画像の三次元投影図。それぞれ 140 × 140 × 30 μm (xyz) の範囲を示す。(B) COCRM により取得した三次元画像より画像処理によって算出したバイオマスの経時変化。(Yawata et al., 2010, Journal of Bioscience and Bioengineering より転載)

物学者たちも付着状態の微生物細胞を観察したという記録はある²⁾。我々は、これからも技術改良/開発を通じて微生物バイオフィームの生態に迫って行きたいと考えている。

文 献

- 1) Nickel, J.C., I. Ruseska, J.B. Wright, and J. W. Costerton. 1985. Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 27: 619–624.
- 2) Donlan, R.M., and J.W. Costerton. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15: 167–193.
- 3) Prigent-Combaret, C., O. Vidal, C. Dorel, and P. Lejeune. 1999. Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 181: 5993–6002.
- 4) Doyle, R.J. 1999. Biofilms. *Methods Enzymol.* 310: 1–720.
- 5) Doyle, R.J. 2001. Microbial growth in biofilms. Part A: devel-

- opmental and molecular biological aspects. *Methods Enzymol.* 336: 1–469.
- 6) Doyle, R.J. 2001. Microbial growth in biofilms. Part B: special environments and physiochemical aspects. *Methods Enzymol.* 337: 1–469.
 - 7) McLean, R.J., C.C.L. Bates, M.B. Barnes, C.L. McGowin, and G.M. Aron. 2004. Methods of studying biofilms, pp. 379–413, In M. Ghannoum, and G.A. O'Toole (ed.), *Microbial biofilms*, ASM Press, Washington, USA.
 - 8) McEldowney, S., and M. Fletcher M. 1986. Variability of the influence of physicochemical factors affecting bacterial adhesion to polystyrene substrata. *Appl. Environ. Microbiol.* 52: 460–465.
 - 9) O'Toole, G.A., and R. Kolter. 1998. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS 365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis. *Mol. Microbiol.* 28: 229–261.
 - 10) Costerton, J.W., and K.J. Cheng, G.G. Geesey, T.I. Ladd, J.C. Nickel, M. Dasgupta, and T. J. Marrie. 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.* 41: 435–464.
 - 11) Lawrence, J.R., D.R. Korber, B.D. Hoyle, J.W. Costerton, and D.E. Caldwell. 1991. Optical sectioning of microbial biofilms. *J. Bacteriol.* 173: 6558–6567.
 - 12) Korber, D.R., J.R. Lawrence, B. Sutton, and D.E. Caldwell. 1989. Effect of laminar flow velocity on the kinetics of surface recolonization by Mot⁺ and Mot⁻ *Pseudomonas fluorescens*. *Microb. Ecol.* 18: 1–19.
 - 13) De Kievit, T.R., M.D. Parkins, R.J. Gillis, R. Srikumar, H. Ceri, K. Poole, B.H. Iglewski, and D.G. Storey. 2001. Multidrug efflux pumps: expression patterns and contribution to antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 45: 1761–1770.
 - 14) O'Toole, G.A., H.B. Kaplan, and R. Kolter. 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* 54: 49–79.
 - 15) Remington, S. 2006. Fluorescent proteins: maturation, photochemistry and photophysics. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 16: 714–721.
 - 16) Lawrence, J., G. Swerhone, G. Leppard, T. Araki, X. Zhang, M. West, and A. Hitchcock. 2003. Scanning transmission X-ray, laser scanning, and transmission electron microscopy mapping of the exopolymeric matrix of microbial biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 5543–5554.
 - 17) Zahller, J., and P. Stewart. 2002. Transmission electron microscopic study of antibiotic action on *Klebsiella pneumoniae* biofilm. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 46: 2679–2683.
 - 18) Korber, D., G. Wolfaardt, V. Brözel, R. MacDonald, and T. Niepel. 1999. Reporter systems for microscopic analysis of microbial biofilms. *Methods Enzymol.* 310: 3–20.
 - 19) Lisle, J., P. Stewart, and G. McFeters. 1999. Fluorescent probes applied to physiological characterization of bacterial biofilms. *Methods Enzymol.* 310: 166–178.
 - 20) Manz, W. 1999. In situ analysis of microbial biofilms by rRNA-targeted oligonucleotide probing. *Methods Enzymol.* 310: 79–91.
 - 21) Palmer, R.J., and C. Sternberg. 1999. Modern microscopy in biofilm research: confocal microscopy and other approaches. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10: 263–268.
 - 22) Kawarai, T., S. Furukawa, H. Ogihara, and M. Yamasaki. 2007. Mixed-species biofilm formation by lactic acid bacteria and rice wine yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 4673–4676.
 - 23) Worlitzsch, D., R. Tarran, M. Ulrich, U. Schwab, A. Cekici, K. Meyer, P. Birrer, G. Bellon, J. Berger, T. Weiss, K. Botzenhart, J. Yankaskas, S. Randell, R. Boucher, and G. Döring. 2002. Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. *J. Clin. Invest.* 109: 317–325.
 - 24) 牧陽之助. 1998. 温泉産バイオマットの生態学, pp. 163–171, 森崎久雄, 大島広行, 磯辺賢治 (編), バイオフィルム. サイエンスフォーラム.
 - 25) Lewis, K. 2001. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 45: 999–1007.
 - 26) Murga, R., T. Forster, E. Brown, J. Pruckler, B. Fields, and R. Donlan. 2001. Role of biofilms in the survival of *Legionella pneumophila* in a model potable-water system. *Microbiology* 147: 3121–3126.
 - 27) Paddock, S. 2002. Confocal reflection microscopy. *BioTechniques* 32: 274–278.
 - 28) Filler, T., and E. Peuker. 2000. Reflection contrast microscopy (RCM): a forgotten technique? *J. Pathol.* 190: 635–638.
 - 29) Yawata, Y., K. Toda, E. Setoyama, J. Fukuda, H. Suzuki, H. Uchiyama, and N. Nomura. (in press). Monitoring biofilm development in a microfluidic device using modified confocal reflection microscopy. *J. Biosci. Bioengi.*
 - 30) Yawata, Y., H. Uchiyama, and N. Nomura. 2010. Visualizing the effects of biofilm structures on the influx of fluorescent material using combined confocal reflection and fluorescent microscopy. *Microbe. Environ.* doi: 10.1264/jisme2.ME09169
 - 31) Yamamoto, M., H. Murai, A. Takeda, S. Okunishi, and H. Morisaki. 2005. Bacterial flora of the biofilm formed on the submerged surface of the reed *Phragmites australis*. *Microbe. Environ.* 20: 14–24.
 - 32) Andrade do Canto, C., J. Rodrigues, S. Ratusznei, M. Zaiat, and E. Foresti. 2008. Feasibility of nitrification/denitrification in a sequencing batch biofilm reactor with liquid circulation applied to post-treatment. *Bioresour. Technol.* 99: 644–654.
 - 33) Rittmann, B.E. 2004. Biofilms in water, pp. 359–378. In M. Ghannoum, and G.A. O'Toole (ed.), *Microbial biofilms*. ASM Press, Washington, USA.
 - 34) Zhu, G., Y. Peng, B. Li, J. Guo, Q. Yang, and S. Wang. 2008. Biological removal of nitrogen from wastewater. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 192: 159–195.
 - 35) Yawata, Y., H. Uchiyama, and N. Nomura. 2008. Development of a novel biofilm continuous culture method for simultaneous assessment of architecture and gaseous metabolite production. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 5429–5435.
 - 36) Yawata, Y., K. Toda, E. Setoyama, J. Fukuda, H. Suzuki, H. Uchiyama, and N. Nomura. 2010. Bacterial Growth Monitoring in a Microfluidic Device by Confocal Reflection Microscopy. *J. Biosci. Bioengi.* doi: 10.1016/j.jbiosc.2010.01.009