

高松塚古墳より分離された主要な微生物の酢酸生成能調査結果

佐野千絵¹・木川りか¹・杉山純多²

1: 東京文化財研究所 2: 東京大学名誉教授、テクノスルガ・ラボ

高松塚古墳から分離されたカビ、酵母、細菌の各分離株について、壁画の劣化と関わる可能性がある代謝物について調査を進めている。今回は、漆喰の溶解や色料の変色を引き起こす可能性がある有機酸である酢酸について、各分離株の生成能を調査した。さらにエタノール、イソプロパノール等を単一の炭素源としたときの酢酸生成量についても検討した。

1. 方法

1) 菌株 以下の試験に用いた菌株のリストを表 1 および表 2 に示す。対照菌株として、近縁既知種の保存株を用いた。

2) 使用培地

<カビ・酵母用>

ツァペック液体培地:硝酸ナトリウム 3g, 燐酸一水素二カリウム 1g, 硫酸マグネシウム七水和物 0.5g, 塩化カリウム 0.5g, 硫酸鉄(II)七水和物 0.01g, スクロース 30g, 蒸留水 1000 mL, pH 6.5

<細菌用>

0.02%酵母エキス添加 BM 液体培地: 燐酸水素二アンモニウム 1g, 塩化カリウム 0.2g, 硫酸マグネシウム七水和物 0.2g, 酵母エキス 0.2g, グルコース 10g, 蒸留水 1000 mL, pH 7.0

さらに、有機酸生成の顕著な株についてエタノール、プロパノール等を単一の炭素源としたときの生成量を調査する場合には、それぞれ炭素源(スクロースあるいはグルコース)を除いたものを基本培地として用い、これらの培地に、最終濃度 1% となるように、エタノール、プロパノール、またはグルコースを添加した。

3) 培養

各菌株について、以下の条件で培養した。

・培地: カビ・酵母は 1%エタノール添加ツァペック液体培地、細菌は 0.02%酵母エキス添加 BM+EtOH (1%エタノール) 液体培地

・培養時間: カビは 6 日または 7 日、酵母、細菌は 3 日または 4 日

・培養温度: 25°C

・培養法: カビは斜面静置、酵母、細菌は振とう培養

培養は各 2 本 (反復)、植種量はカビについては平板培地上のコロニー先端部をコルクボーラーで切り取って、接種源とした。細菌および酵母については懸濁液を作製し、等量添加した。

4) 酢酸生成量と pH の測定

4-1) 酢酸の定量分析

有機酸分析用の各試料は、各培養物を遠心分離後上清を回収し、さらに 0.22 μm のフィルターでろ過後 0.45 μm マイレクスフィルターでろ過して得た。ろ液の回収量はおよそ 2mL で安定していた。

定量分析は島津製作所有機酸分析システムで行い、有機酸のうち漆喰の劣化に影響の大きいと考えられる酢酸の生成量についてまとめた。

使用機器：島津製作所製 有機酸分析システム カラムオープン 45°C、150 μ L

4-2)培養液の pH 測定

培養期間などの違いによる pH の変化を比較検討した。ブランク培地の pH に対する変化量で示した。使用装置：pH メーター(EcoScan pH 5 EUTECH INSTRUMENTS 社製)

2. 結果

2-1) 各分離株の酢酸生成量と pH 変化量

結果を表 1-3 に示す。カビでは *Fusarium* 属分離株およびその近縁対照株で顕著な酢酸生成が認められた。次いで *Acremonium* 属 (*Gliomastix* 節) 分離株で比較的酢酸の生成が多く見られたが、*Penicillium* 属、*Trichoderma* 属などの分離株や保存株では酢酸の生成はほとんど認められなかった。酵母では *Pichia membranifaciens* 分離株で顕著な酢酸生成が認められた。細菌では *Ochrobactrum* 属分離株で酢酸の生成および pH の低下が認められた。

培地の pH は概ね酢酸生成量の多い株で顕著に pH の低下が多く認められる傾向があった。しかし、詳細に見ると pH 低下の程度は必ずしも酢酸生成量のみとは相関しない場合もあった。この理由としては、培地中の窒素源からアルカリ性物質を産生する株では pH の値が中和される場合がある可能性や、酢酸以外の酸の生成によって pH が低下する場合などが推測される。

表 1. カビ分離株による酢酸生成量と培養液の pH 変化量

種名	菌株*	酢酸生成量 m g / L	pH 変化量**
<i>Acremonium</i> (sect. <i>Gliomastix</i>) sp.	T4519-5-1	48	-0.55
<i>Acremonium</i> (sect. <i>Gliomastix</i>) sp. (= <i>A. murorum</i>)	T6713-14-2	14	-0.09
<i>Acremonium</i> (sect. <i>Gliomastix</i>) <i>murorum</i> var. <i>murorum</i>	CBS 148.81	31	-0.09
<i>Acremonium</i> (sect. <i>Gliomastix</i>) sp. (= <i>A. masseei</i>)	T6517-1-1	39	-0.32
<i>Acremonium</i> (sect. <i>Gliomastix</i>) <i>masseei</i>	CBS 794.69	13	0.19
<i>Penicillium</i> sp. 1 (= <i>P. paneum</i>)	T5916-6-1	0	0.31
<i>Penicillium paneum</i>	CBS 101032 ^T	0	0.11
<i>Fusarium</i> sp.	T4716-1	130	-1.63
<i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>mori</i>	NBRC 30964	57	-0.81
<i>Trichoderma</i> sp. 1-b	T4519-9-7	24	-0.35
<i>Trichoderma harzianum</i>	NBRC 30543	13	0.24
<i>Cylindrocarpon</i> sp.	TBT-1	26	-0.60

* T: 高松塚古墳分離株、CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures 保存株、

NBRC: NITE Biological Resource Center 保存株、TBT: 高松塚古墳分離株 (東文研)、^T (上付 T) : 基準株

** : pH 変化量=培養後の培養液 pH 測定値-ブランク培地の pH 測定値

表 2. 酵母分離株の酢酸生成量と培養液の pH 変化量

種名	菌株*	酢酸生成量 m g / L	pH 変化量**
<i>Candida takamatsuzukensis</i> (新種)	T4922-1-1 ^T	0	0.01
<i>Candida tumulicola</i> (新種)	T6517-9-5 ^T	0	0.04
<i>Pichia guilliermondii</i>	T6517-3-4	8.1	-0.12
<i>Pichia membranifaciens</i>	T4716-3	450	-2.10

*, ** 表 1 脚注参照

表 3. 細菌分離株の酢酸生成量と培養液の pH 変化量

種名	菌株*	酢酸生成量 m g /L	pH 変化量**
<i>Stenotrophomonas</i> sp. (新種)	T5916-2-1b	24	-0.21
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	NBRC 14161 ^T	4.3	-0.10
<i>Ochrobactrum</i> sp. (<i>O. grignonense</i> に近縁)	T6220-2-3b	59	-1.02
<i>Bacillus thuringiensis</i>	T5916-8-1b	24	-0.96
<i>Bacillus thuringiensis</i>	JCM 20386 ^T	13	-1.51
<i>Gluconacetobacter</i> sp. ^K	K5929-2-1b	400	-3.58
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	DSM 5601 ^T	76	-3.91

* JCM: Japan Collection of Microorganisms (RIKEN BioResource Center) 保存株、

DSM: Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen GmbH 保存株、その他略号は表 1 脚注参照

** 表 1 脚注参照、^K(上付き K): キトラ古墳天井西寄り漆喰の穴内黒色物質からの分離株

2-2) エタノール、プロパノール、グルコースをそれぞれ単一炭素源とした時の酢酸生成量と pH

Fusarium 属分離株ではグルコースを単一炭素源としたときに、酢酸の生成が顕著に認められた。一方、酵母ではエタノールを単一炭素源としたときに顕著な酢酸生成が認められた。細菌では、エタノールを単一炭素源としたときに、*Ochrobactrum* 属分離株で酢酸の生成が顕著に認められた。イソプロパノールを単一炭素源としたときは、用いたカビ、酵母、細菌の各分離株は生育も不良であった。

培地の pH は、酸生成の多いもので顕著な低下が認められた。

表 4. 単一炭素源を変えた時の酢酸生成量の相違

種名	菌株*	グルコース炭素源	エタノール炭素源	イソプロパノール炭素源
<i>Fusarium</i> sp.	T4716-1	89	3.3	0.3
<i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>mori</i>	NBRC 30964	49	3.4	0.6
<i>Pichia membranifaciens</i>	T4716-3	24	180	1.6
<i>Ochrobactrum</i> sp.	T6220-2-3b	3.4	52	0
<i>Gluconacetobacter</i> sp. ^K	K5929-2-1b	0	1700	0
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	DSM 5601 ^T	23	320	0.2

表中数値単位 mg/L、* 表 1・表 3 脚注参照、^K(上付き K): 表 3 脚注参照

表 5. 単一炭素源を変えた時の pH の変化量**

種名	菌株*	グルコース炭素源	エタノール炭素源	イソプロパノール炭素源
<i>Fusarium</i> sp.	T4716-1	-1.63	0.34	0.24
<i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>mori</i>	NBRC 30964	-0.94	0.28	0.15
<i>Pichia membranifaciens</i>	T4716-3	-0.34	-1.89	0.04
<i>Ochrobactrum</i> sp.	T6220-2-3b	-1.29	-0.73	0.16
<i>Gluconacetobacter</i> sp. ^K	K5929-2-1b	-3.66	-3.23	0.04
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	DSM 5601 ^T	-3.97	-2.13	0.05

*,** 表 1・表 3 脚注参照、^K(上付き K): 表 3 脚注参照

3. まとめ

高松塚古墳から分離されたカビ、酵母、細菌の各分離株について、特に漆喰の劣化と関わる可能性がある酢酸生成量および pH 低下、さらにエタノール、イソプロパノール等を単一の炭素源としたときの酢酸生成量について比較検討した。カビでは *Fusarium* sp.(T4716-1 株)、酵母では *Pichia membranifaciens*(T4716-3 株)、細菌では *Ochrobactrum* sp.(T6220-2-3b 株)で酢酸生成量の多いものが存在し、pH の低下も引き起こす可能性が示された。単一炭素源を希少量のエタノールに変えると、*Pichia membranifaciens*(T4716-3 株)、*Ochrobactrum* sp.(T6220-2-3b 株)では酢酸生成量が増加し、pH 低下を引き起こす可能性があることがわかった。