

アンコール遺跡石造文化財の微生物劣化
Microbial deterioration of stone monuments in Angkor site

2014.3

東京農工大学大学院
連合農学研究科
環境資源共生科学専攻

久住 朝子

目次

第1章 序論.....	4
1-1 本研究の背景と目的	4
1-1-1 微生物が引き起こす石材劣化.....	4
1-1-2 アンコール遺跡の石材劣化の現状.....	5
1-1-3 アンコール遺跡の劣化抑制に向けての課題.....	9
1-2 研究目的.....	9
1-3 本論文の構成.....	10
第2章 石材の剥離劣化部に生育するイオウ酸化細菌.....	11
2-1 研究の背景と目的.....	11
2-2 実験方法.....	12
2-2-1 剥離劣化した石材試料から分離された SOB.....	12
2-2-2 分離された SOB の形態および生理的性質.....	13
2-2-3 分離された SOB の DNA の抽出ならびに系統解析.....	13
2-2-4 THI503 株のイオウ酸化による増殖確認.....	16
2-2-5 THI503 株の培養に伴うチオ硫酸、および硫酸の測定.....	16
2-2-6 THI503 株の COS 分解.....	17
2-3 結果および考察.....	18
2-3-1 分離されたイオウ酸化細菌の性質と系統解析.....	18
2-3-2 THI503 株のイオウ酸化能.....	23
2-3-3 WS5 培地での THI503 株の生育確認.....	27
2-3-4 THI503 株の COS 分解能.....	29
2-4 結論.....	31
第3章 アンコール遺跡の砂岩壁面に付着したバイオフィルムの細菌叢解析.....	32
3-1 研究の背景と目的.....	32

3-2	実験方法.....	37
3-2-1	試料の採取.....	37
3-2-2	DNA 抽出と PCR 増幅.....	42
3-2-3	DGGE 解析.....	43
3-2-4	DGGE ゲル上のバンドのシーケンス解析.....	43
3-3	結果および考察.....	43
3-3-1	バイオフィルム中の細菌叢と空気中の細菌叢の比較.....	43
3-3-2	バイオフィルムの色調ごとの細菌叢の比較.....	50
3-3-3	バイオフィルムの層ごとの細菌叢解析.....	62
3-4	結論.....	64
第 4 章	バイオフィルム中の硝酸イオン測定.....	65
4-1	研究の背景と目的.....	65
4-2	実験方法.....	66
4-2-1	試料の採取.....	66
4-2-2	硝酸イオン濃度と pH 測定.....	67
4-2-3	各種陽イオン、および陰イオン測定.....	67
4-3	結果および考察.....	68
4-3-1	バイオフィルムの pH と硝酸イオン濃度.....	68
4-3-2	バイオフィルム中の陰イオン、陽イオン分析.....	70
4-4	結論.....	72
第 5 章	結論.....	73
5-1	総括.....	73
5-2	将来課題と展望.....	73
引用文献.....		74
謝辞		

学 位 論 文 要 旨

アンコール遺跡石造文化財の微生物劣化

Microbial deterioration of stone monuments in Angkor site

環境資源共生科学専攻 環境保全学大講座

久住 朝子

文化財である歴史的な石造建築物において，表面に微生物が生育することによる石材の劣化が深刻な問題となっている。アンコール遺跡は 9 世紀から 13 世紀にかけて建造された石造遺跡群であり，石材の劣化が顕著であることからその保存と修復が急務となっている。本論文では，石材劣化のうち剥離劣化と着色劣化に着目し，その劣化に関与する微生物を明らかにし，遺跡の保護に役立つ情報を得ることを目的とした。

先行研究により，剥離劣化の要因として，硫酸を生成するイオウ酸化微生物が要因の一つとして指摘されており，剥離劣化石材試料からイオウ酸化細菌と真菌が分離された。真菌については系統やイオウ酸化能が調べられていたものの，細菌については未着手であった。また，バイオフィームについては，その一部について微生物叢が調べられているものの，様々な色調のバイオフィームの微生物叢の比較は行われていない。

以上のことから，本論文では，アンコール遺跡の剥離劣化，および着色劣化に関与する微生物の解明を目的とし，剥離劣化への寄与が疑われるイオウ酸化細菌の特徴の解明（第二章）と，バイオフィームの細菌叢解析（第三章），およびバイオフィームの陽イオン，陰イオン測定（第四章）を行った。

第二章では，剥離劣化石材試料から分離された細菌 5 株の特徴を調べた。分離菌 5 株は，無機イオウに依存する独立栄養的な性質と，糖の資化による従属栄養的な性質を有していた。これら 5 株はすべて *Mycobacterium* 属に属する細菌に最も相同性が高かった。これらことから，分離菌 5 株は既知のイオウ酸化細菌の系統とは異なり，*Actinobacteria* 門に属することが明らかになった。

分離菌 5 株のうち、代表として選抜した THI503 株を、単体イオウを添加した無機塩培地で培養した結果、硫酸およびチオ硫酸の生成と、菌数の増加が確認された。以上の結果より、5 株の分離菌は砂岩壁面において、利用しやすい有機物がある場合にはそれを炭素源に用い、有機物がない場合には無機イオウを酸化して ATP を生成する、というように環境に合わせて代謝を切り替えている可能性が考えられた。このように代謝をスイッチできる特徴は、栄養が少ない砂岩上での生育に有利となる可能性がある。

第三章では、アンコール遺跡バイオンの砂岩壁面から採取したバイオフィルムの細菌叢の解析を行った。バイオフィルムの細菌叢は、周辺空気中の細菌叢と比較して多様性が高く、既知の細菌とは相同性が低い新規の細菌種から構成されていた。また、バイオフィルムの色調は、壁面の状況により特徴があった。すなわち、赤色、緑色、暗緑色のバイオフィルムは屋根で覆われた部分の砂岩壁面で観察されることが多かった。一方、紫色のバイオフィルムは、屋根が崩落して日射や降雨が直接降り注ぐ壁面で観察されることが多く、黒色のバイオフィルムは、屋根で覆われた部分と崩落した部分の両方で観察された。

バイオフィルムの色調ごとの細菌叢解析の結果、赤色のバイオフィルムには *Rubrobacter* 属に近縁な細菌が優先しており、黒色、紫色、黒色、暗緑色のバイオフィルムには、*Cyanobacteria* 門に最も近縁な細菌が優占していた。

これら 5 色のバイオフィルムのうち、バイオフィルムが厚く、その下の石材の劣化が顕著であった暗緑色のバイオフィルムについて、バイオフィルムの層ごとに細菌叢を解析した。その結果、バイオフィルムの表層には *Cyanobacteria* 門、石材に近い部分には *Chloroflexi* 門がそれぞれ分布していた。また、表層から石材付近にかけては *Deinococcus-Thermus* 門と *Rubrobacter* 属に最も近縁な細菌が分布していた。

第四章では、バイオフィルムの各種陽イオン、陰イオンを測定した。暗緑色のバイオフィルムを含む、屋根で覆われている砂岩壁面から採取されたバイオフィルムでは、屋根が崩落している砂岩壁面のバイオフィルムに比べて高濃度の硝酸イオン、ナトリウムイオン、マグネシウムイオン、カルシウムイオンが蓄積されていた。このことから、暗緑色のバイオフィルムにおいて高濃度の硝酸が蓄積し、砂岩中の陽イオン種が溶脱している可能性が示された。

本研究では、剥離劣化の原因微生物の一つとして分離されたイオウ酸化細菌が、還元型イオウを酸化して ATP を生成する独立栄養的な代謝と従属栄養的な代謝の両方を有することを明らかにした。また、着色劣化に関与する細菌は色調によって異なり、特に赤色着色劣化と *Rubrobacter* 属の細菌との関与を明らかにした。砂岩の劣化が顕著な暗緑色のバイオフィルムでは、高濃度の硝酸イオンと金属イオンの蓄積が確認されたことから、高濃度の硝酸により砂岩中の金属イオンが溶脱されることで、石材の劣化が促進される可能性が示された。

第 1 章 序論

1-1 本研究の背景と目的

1-1-1 微生物が引き起こす石材劣化

生物学的劣化 (biodeterioration) は「生物の生命活動によってひきおこされる、物質の望ましくない変化」(Hueck, 1965) と定義されている。そのうち、特に微生物が引き起こす劣化 (microbial deterioration) は、産業、医療分野に加え、文化財保存の分野でも問題となっている。

文化財である歴史的な石造建築物や遺跡は、大きく分けると 3 つの要因によって劣化が進行している。一つは応力集中や風化作用などによる物理学的な劣化、もう一つは塩類集積などの化学的な劣化、そしてもう一つが生物の生育による生物学的な劣化である。生物学的な劣化のうち、微生物の生育に起因する石材の劣化は多くの遺跡で深刻な問題となっている。微生物と石材劣化の関係については特に欧州を中心に数多く報告されており (Warscheid and Braams, 2000; Scheerer et al., 2009)、微生物の生育が石材の物理学的劣化を促進することも示唆されている (Papida et al., 2000)。

微生物の生育による石材の劣化の事例として、微生物が生成する無機酸や有機酸により石材が腐食されること (Sand and Bock, 1991)、微生物が微細な空隙から石材の内部に入り込んで生育し、石材の破壊を促進すること (McNamara et al., 2006) などが報告されている。

加えて、石材表面に形成されるバイオフィームも石材の劣化を促進する働きがある。バイオフィームとは微生物が凝集した菌膜であり、微生物が生成する細胞外多糖 (EPS: Extracellular polysaccharide) が凝集をより強固にし、外界の環境変化から内部の微生物を保護する役割を果たしている。石材表面にバイオフィームが形成されると、石材表面に微生物の色素由来の着色劣化が生じ、外観が損なわれるだけでなく、バイオフィーム内は栄養豊富な状態が保持されるため微生物の生育が促進され、微生物により生成される無機酸、有機酸による石材の腐食が促進される。また、バイオフィームの細胞外多糖によって石材の炭酸カルシウムの溶出が促進されることが報告されている (Perry et al., 2004)。

1-1-2 アンコール遺跡における石材劣化の現状

アンコール・ワットに象徴されるアンコール遺跡 (Fig. 1-1) は 9 世紀から 13 世紀にかけてクメール民族によって建造された石造遺跡群である。アンコール・ワットやアンコール・トムなど 26 遺跡が、1992 年に世界文化遺産として登録されたが、劣化が著しいことから、同時に「危機に瀕する遺産」としても登録された。その後の修復活動により「危機に瀕する遺産」リストからは除外されたものの、現在も世界各国のチームが保存・修復活動を行なっている。日本の修復チームの一つである日本国政府アンコール遺跡救済チーム (JASA) は、1994 年に発足された JSA を前身とし、アンコール遺跡の保存・修復を目的として調査研究活動を行なっている。その活動は、建築学、地盤地質環境学、都市計画学、修復設計・修復技術、考古学、岩石学、保存科学、美術史学など多岐にわたっている。本研究ではそのうちの保存科学のグループに属し、微生物学の観点から遺跡の劣化の調査研究活動を実施した。

内田 (2007) の報告によると、アンコール遺跡の建造には、主として砂岩とラテライトが使用されている。砂岩は基壇表面、祠堂、回廊等の建造物の重要な部分に、ラテライトは基壇内側、参道等に使用されている。アンコール遺跡に共通して使用されている砂岩は、灰色～黄褐色砂岩であり、その主要構成粒子は石英、斜長石、カリ長石、黒雲母、白雲母、岩石片である。

アンコール遺跡の微生物学的な調査として、これまでに石材壁面の藻類や地衣類が調べられており、僅かな水分があれば生育可能な気生藻類が着生していることが報告されている (新井, 1994; 新井&山岸, 1996; 山岸, 1997)。また、アンコール遺跡の剥離劣化石材から 10 年に渉りイオウ酸化微生物が計数されており (Li et al., 2008)、剥離劣化とイオウ酸化微生物の関連が示唆されている。この剥離劣化石材試料から、イオウ酸化真菌 *Fusarium solani* THIF01 株が分離され、そのイオウ酸化能について明らかになっている (Li et al., 2010)。一方、イオウ酸化細菌については分離されているものの、系統的な情報やイオウ酸化能については調べられていなかった。

バイオフィルムの微生物叢は、バイオンのバイオフィルムの微生物叢についてはクローン解析や系統解析によりその一部が明らかになっている (Lan et al., 2010; Gaylarde et al., 2012)。しかし、様々な色調のバイオフィルムが存在しているにも関わらず、色調ごとの微生物叢の特徴は十分に示されていなかった。また、厚みのあるバイオフィルム内で微生物がどのように分布しているのかも不明であった。バイオン内回廊は壁面が屋根で覆われている部分と、屋根の一部が崩落し壁面が日射や降雨にさらされている部分とがある (Fig. 1-2)。著者らの観察により、屋根の有無に

より、壁面のバイオフィルムの色調に違いがあることが観察された。しかし、これまでに内回廊の屋根の有無によるバイオフィルムの微生物叢について示す報告例はなかった。

これまでのバイオフィルムの微生物叢解析の結果、バイヨンの壁面に付着するバイオフィルムにシアノバクテリアが生育することが示されている (Lan et al., 2010; Gaylarde et al., 2012)。シアノバクテリアの一部の細菌は窒素固定を行うことが知られている。仮にバイオフィルム中で窒素固定による空気中の窒素のとりこみが行われていれば、硝酸にまで酸化され、石材に影響を与えている可能性が考えられた。

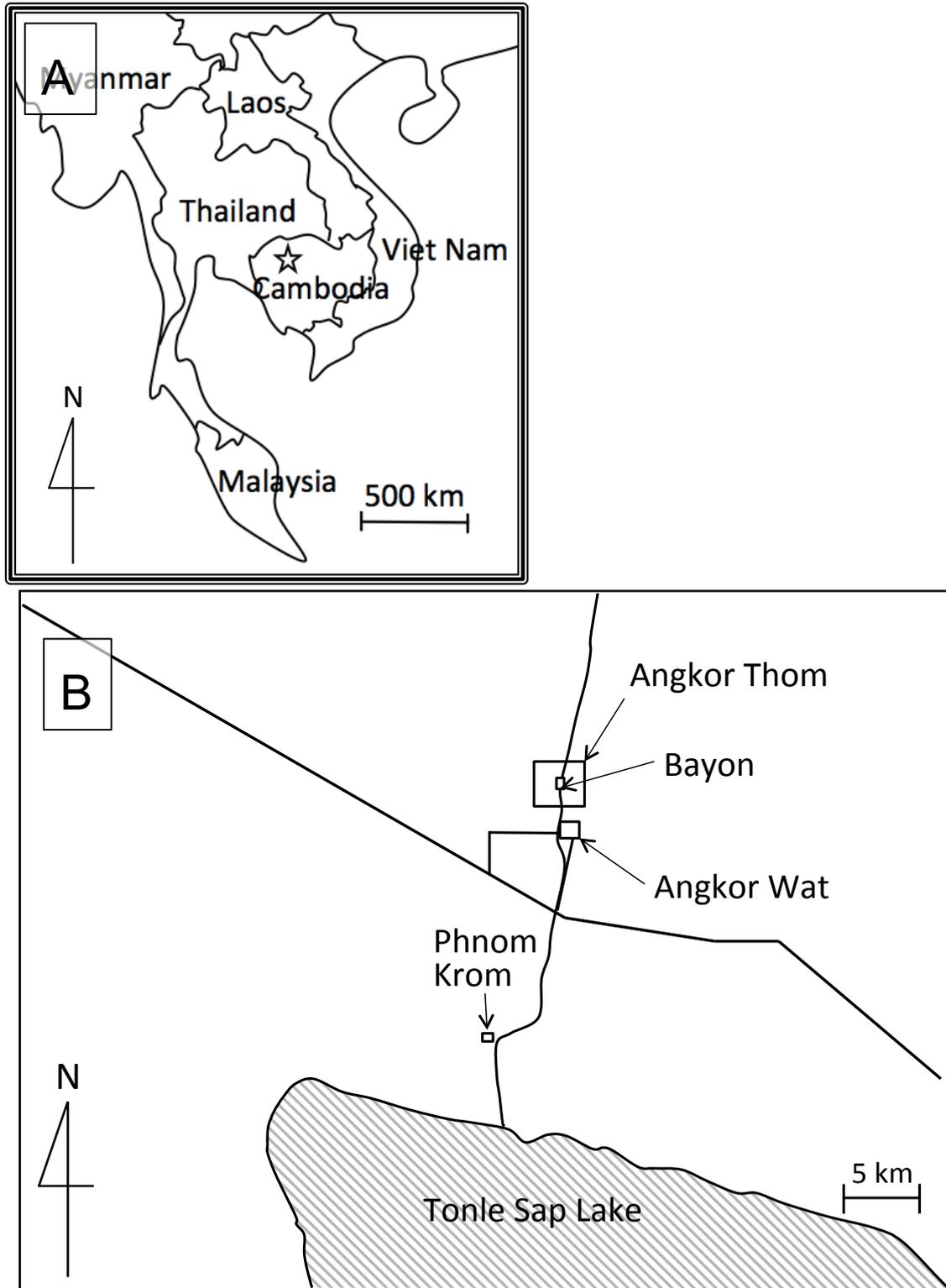


Fig. 1-1. Location of Bayon, Angkor Wat, and Phnom Krom in Cambodia.

A. Location of Angkor site. Asterisk shows Angkor sites. Bar indicates 500 km,

B. Location of Angkor site; Bayon, Angkor Wat and Phnom Krom. Bar indicates 5 km,



Fig. 1-2. Photo of inner gallery at Bayon in Angkor Thom, Cambodia. The roof still stands at some area, but the roof was partly or completely missing at some area.

1-1-3 アンコール遺跡の劣化抑制に向けての課題

アンコール遺跡の劣化を抑制するために、石材劣化に関与する微生物の特定と劣化のメカニズムの解明、およびその生育抑制が重要である。

アンコール遺跡で見られる石材の剥離劣化については、前述したようにイオウ酸化微生物の関与が示唆されている。それら微生物のうち、イオウ酸化真菌はすでに性質や系統が明らかになっている一方、イオウ酸化細菌については未着手であった。そのため、イオウ酸化微生物全体の菌叢の把握は行えていなかった。イオウ酸化細菌についても性質や系統を明らかにすることで、アンコール遺跡の剥離劣化に寄与する可能性のあるイオウ酸化微生物の菌種の特定につながり、剥離劣化に寄与する微生物の知見を得ることができる。

一方、バイオフィルムの付着による石材の劣化については、特定のバイオフィルムの微生物叢については調べられているもの、様々な色調のバイオフィルムの微生物叢を網羅的に把握することは行えていなかった。バイオフィルムの色調によって微生物叢の特徴が明らかになれば、バイオフィルムを構成する微生物種を現場で簡便に判断できる可能性がある。さらに、色調によって、石材への影響が大きいバイオフィルムと、それほど影響が大きいバイオフィルムが分別されれば、広大な表面積のバイオンにおいて、優先順位をつけて保存や修復に着手できる可能性があると考えた。

1-2 研究目的

以上の課題をうけて、本研究では次の2点を研究目的とした。

- ・ 剥離劣化石材から分離されたイオウ酸化細菌の特徴の解明

16Sr RNA 解析により細菌種を特定し、単体イオウを添加した無機塩培地での培養に伴う酸生成を調べることで、アンコール遺跡の剥離劣化石材部に生育するイオウ酸化細菌の特徴を明らかにする。

- ・ バイオフィルムの細菌叢の網羅的な解明

細菌叢の解析には、DGGE法（Denaturing gradient gel electrophoresis）を用い、空気中の細菌叢との比較、バイオフィルムの色調ごとの細菌叢の比較、バイオフィルムの層ごとの細菌叢の比較により、バイオフィルムの細菌叢を網羅的に把握する。

1-3 本論文の構成

本論文の構成を以下に記す。

第2章では、剥離劣化石材から分離されたイオウ酸化細菌について、系統解析を行い、代表とした THI503 株のイオウ酸化能について詳細に調べた。

第3章では、バイヨンの内回廊に付着したバイオフィルムの細菌叢の特徴を調べるために、遺跡内空気中の細菌叢とバイオフィルムの細菌叢の比較、バイオフィルムの色調ごとの細菌叢の比較、バイオフィルムの層ごとの細菌叢の比較を行なった。

第4章では、バイヨン壁面に付着したバイオフィルム中の硝酸イオン濃度、および各種陰イオン、陽イオン濃度を測定し、硝酸がバイオフィルムに与える影響について考察した。

第5章では、全体の総論的総括を行なった。

第2章 石材の剥離劣化部に生育するイオウ酸化細菌

本章の要旨

本章では、アンコール遺跡における石材の剥離劣化に関与する可能性のあるイオウ酸化細菌の特徴について論じる。

アンコール遺跡の剥離劣化箇所の石材試料からイオウ酸化細菌の選択培地を用いて分離されたイオウ酸化細菌5株は、無機イオウに依存する独立栄養的な性質と、糖の資化による従属栄養的な性質を有していた。分離菌5株はすべて *Mycobacterium* 属に属する細菌に最も相同性が高く、既知のイオウ酸化細菌の系統とは全く異なり、従属栄養性として知られるグループに属することが明らかになった。分離菌5株のうち TH1503 株についてさらに詳細に調べた結果、イオウ酸化細菌の選択培地中で硫酸およびチオ硫酸を生成していたことからイオウ酸化を行なっていることが確認できた。以上より、分離菌は利用しやすい有機物がある場合にはそれを炭素源に用い、有機物がない場合には無機イオウを用いて ATP を生成する能力があった。このように環境に合わせて代謝を切り替えられる性質は、栄養が少ない石材表面上での生育に有利となる可能性が考えられる。

2-1 研究の背景と目的

イオウ酸化細菌 (Sulfur-oxidizing bacteria : 以下 SOB) は硫酸を生成することから、剥離劣化 (exfoliate weathering) を引き起こす微生物の一つとして考えられてきた。1960年代には、SOB である *Thiobacillus* 属の細菌がアンコール遺跡やフランスの遺跡において石材劣化部から発見されている (Pochon and Jaton, 1967, 1968)。しかし、それ以降は SOB と石材劣化の関係についての報告は少ない。特に北欧の歴史的な石造建築物では石材劣化と SOB の関連を示唆する報告はない (Sand and Bock, 1991)。

アンコール遺跡においてはこれまでに 2001 年雨季、および 2002 年乾季に、劣化石材部でのイオウ酸化微生物の活性が調査されている。健全な石材ではイオウ酸化活性が検出されないのに対し、剥離劣化石材ではイオウ酸化活性が強いこと、さらに乾季ではイオウ酸化活性が低下することが明らかとなった (片山ら, 2002)。また、1998 年から 2007 年にわたり、各年の雨季ごとに劣化石材部のイオウ酸化微生物が MPN 法 (Most Probable Number method, 最確数法) で計数されており、 10^1 – 10^5 MPN (g sample)⁻¹ のイオウ酸化微生物の存在が確認されている (Li et al., 2008)。イオウ酸化を担うのは通常、*Thiobacillus thioparus* などに代表され

SOB である。しかし、アンコール遺跡の剥離劣化石材からは SOB だけでなくイオウ酸化活性をもつ真菌 *Fusarium solani* THIF01 株が分離された。この真菌は単体イオウを添加した無機塩培地で培養したときにチオ硫酸および硫酸の生成することが確認されている。また、大気濃度レベル (500pptv) の硫化カルボニル (carbonyl sulfide: 分子式 COS) を分解することから、無機態のイオウに加えて大気中のイオウ成分である COS 分解する能力があることが明らかになっている。

一方、アンコール遺跡の剥離劣化石材から SOB5 株も分離されていたが、分離菌の性質や系統などの特徴については不明であった。

そこで、本章では、アンコール遺跡の剥離劣化した石材から分離された SOB の特徴を調べるために、それらのイオウ酸化能や系統学的位置を調べた。具体的には、剥離劣化した石材から分離された SOB5 株の近縁種および生理学的な性質を調べた。さらにイオウ酸化に関する詳細な情報を得るために、5 株の代表菌株として THI503 株を選択し、イオウの酸化による生成産物や生育の確認を行った。加えて、*Fusarium solani* THIF01 株で確認されている COS 分解能についても調査した。

2-2 実験方法

2-2-1 剥離劣化した石材試料から分離された SOB

SOB として、2003 年 8 月 (雨季) にアンコール遺跡のアンコール・ワット、バイヨン、プノム・クロムの 3 寺院の、剥離劣化した石材試料から分離されたイオウ酸化細菌 THI501, THI502, THI503, THI504, THI505 の計 5 株を用いた。これらの細菌は、好酸性 SOB である *Acidithiobacillus thiooxidans* の培養に広く使われてきた Waksman 培地 (Waksman, 1922) を基礎培地とし、その pH を pH3.0 から pH 5.0 に改変した WS5 培地 ($3.0 \text{ g L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$, $0.2 \text{ g L}^{-1} (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $0.5 \text{ g L}^{-1} \text{ MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0.01 \text{ g L}^{-1} \text{ FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0.25 \text{ g L}^{-1} \text{ CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 単体イオウ 10 g L^{-1} , pH 5.0) を用いて分離されたものである。

WS5 培地の作製方法を以下に示す。イオン交換水に $3.0 \text{ g L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$, $0.2 \text{ g L}^{-1} (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $0.5 \text{ g L}^{-1} \text{ MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0.01 \text{ g L}^{-1} \text{ FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0.25 \text{ g L}^{-1} \text{ CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH 5.0 となるように調整し、オートクレーブ滅菌 (121°C , 15 分) したのち、単体イオウを間歇滅菌したものを 10 g L^{-1} となるように別途添加した。単体イオウの間歇滅菌は、ねじ口試験管に単体イオウを分注し、

そのねじ試験管を湯浴で1時間煮沸滅菌する操作を連続して3日間行なった。

2-2-2 分離された SOB の形態および生理的性質

分離菌の細胞形態は、グラム染色後の顕微鏡観察により確認した。細胞の抗酸性の有無は抗酸性染色（駒形，1975）後の顕微鏡観察により確認した。分離菌のカタラーゼ活性は、3%過酸化水素水の液滴に菌体をつけ、気泡が確認されたときに陽性と判断した。オキシダーゼ活性はオキシダーゼ試験紙（Eiken Chemical）を用いて判断した。分離菌の従属栄養的生育の有無は、PYG 寒天培地（2.0 g L⁻¹ Polypepton, 1.0 g L⁻¹ Yeast Extract, 0.5 g L⁻¹ Glucose, 15 g L⁻¹ Agar, pH 7.2）で30℃、暗所で3日間培養することで確認した。

分離菌の菌密度は、4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)染色後の蛍光顕微鏡（BZ-8000, KEYENCE）観察により確認した。このときの分離菌の培養は、WS5 培地 13.5 mL を入れた 50 mL 容プラスチックチューブ（352070 Falcon, BD Biosciences）に分離菌の前培養液 1.5 mL を接種し、30℃、120 rpm で9日間振とう培養した。

2-2-3 分離した SOB の DNA の抽出ならびに系統解析

1) 菌体の回収: 分離菌を PYG 培地 (2.0 g L⁻¹ Polypepton, 1.0 g L⁻¹ Yeast Extract, 0.5 g L⁻¹ Glucose, pH 7.2) 10 mL を入れた試験管で暗所、30℃、120 rpm で24h 振とう培養した。次にこの培養液を、PYG 培地 100 mL を入れた 500 mL 容坂口フラスコで暗所、30℃、120 rpm で3日間振とう培養した。培養後の菌液を遠心分離 (8,000×g, 20 分, 4℃) 後、上清を除去して菌体を回収した。

2) 有機溶媒による菌体破碎: 菌体に、菌体湿重量で10倍量の saline-EDTA を添加し攪拌後、遠心分離 (8,000×g, 20 分, 4℃) を行い、上清を除去して集菌した。得られた菌体に、菌体湿重量で5倍量の冷アセトンを添加し、攪拌後、氷中に5分間静置した。静置後、遠心分離 (8,000×g, 15 分, 4℃) して上清を除去し、さらに菌体湿重量の5倍量の saline-EDTA を添加して懸濁し、遠心分離 (8,000×g, 15 分, 4℃) して上澄を除去した。この菌体を湿重量の2倍量の saline-EDTA で懸濁し、-20℃で保存した。

3) DNA 抽出: 斎藤，三浦の方法 (Saito and Miura, 1963) を用いた。得られた DNA 抽出液の濃度は、NanoDrop 吸光光度計 (ND-1000, NanoDrop Technologies) によって測定した。

4) PCR : 16S rRNA 遺伝子領域を増幅するために, HotStarTaq Plus DNA polymerase (HotStarTaq Plus, QIAGEN)を用いて, 下記のプライマーセットを用いてキットのプロトコール通りに PCR 試薬を調整した。また, 下記のサーマルサイクル条件を設定したサーマルサイクラー (TP600, TaKaRa PCR thermal cycler dice, TaKaRa) で PCR を行ない, PCR 産物を得た。

<プライマーセット>

- 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')
- 1525R (5'-AAAGGAGGTGATCCAGCC-3'; Lane, 1991)

<サーマルサイクル条件>

(98°C, 5 sec)→(98°C, 5 sec; 50.7°C, 15 sec; 72°C, 15 sec)×30 cycle→(72°C, 10 sec)

5) PCR 産物の確認と精製:得られた PCR 産物は2%アガロースゲルを用いた電気泳動により, 目的とする約 1500 bp の塩基長の増幅産物を確認した。PCR 産物の精製には GFX PCR DNA and gel band purification kit (GE healthcare)を用い, キットのプロトコール通りに行なった。

6) 系統解析 : 精製した PCR 産物を鋳型 DNA として, DNA シーケンスキット (BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction, Applied Biosystems) でさらに部分領域における PCR を行った。これは, 16S rRNA 遺伝子の全塩基配列が約 1500 bp であるのに対してシーケンスの塩基配列解読能力が約 800 bp であり, 一度のシーケンスで全塩基長の解読が行えないためである。サーマルサイクラー (Thermal Cycler Dice™, TaKaRa) で PCR を行ない, シーケンス用の反応液を得た。使用したプライマー, PCR 反応溶液の組成, サーマルサイクル条件を下記に示した。

<プライマー>

- 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')
- 907R (5'-CCCCGTCAATTCCTTTGAGTTT-3'; Lane, 1991)
- 785F (5'-GGATTAGATACCCTGGTAG-3'; Amann et al. 1995)
- 1525R (5'-AAAGGAGGTGATCCAGCC-3'; Lane, 1991)

<反応溶液の組成>

2.5 μ M primer	1.3 μ L
Ready Reaction Premix	0.5 μ L
BigDye Dillution Buffer (5 \times)	1.75 μ L
cleaned PCR template	1.0 μ L
MilliQ water	5.45 μ L
<hr/>	
Total	10.0 μ L

<サーマルサイクル条件>

- (96 $^{\circ}$ C, 1 min) \rightarrow (96 $^{\circ}$ C, 10 sec; 50 $^{\circ}$ C, 5 sec; 60 $^{\circ}$ C, 4 min) \times 25 cycle

反応液は DNA シーケンスキットのプロトコール通りに調整し, シーケンサーABI 3130x genetic analyzer (Applied Biosystems)に供試してシーケンスデータを得た。シーケンスデータは, GENETYX-MAC/ATSQ program version 4.2.1 (GENETYX Corporation)で編集して1本のシーケンス配列とし, BLAST version 2.2.24 (Altschul et al., 1990)を用いて GenBank のデータベースと比較して最も相同性の高い菌種を調べた。複数のシーケンス配列のアラインメントと系統樹の作製には, MEGA version 4 (Tamura et al., 2007)を使用し, 配列間の進化的距離は, Kimura の distance 法 (Kimura, 1980) を用いて評価した。

分離菌の 16S rRNA 遺伝子塩基配列データは, DNA Data Bank of Japan (DDBJ, <http://www.ddbj.nig.ac.jp/>)に登録され, 各菌株に対して以下のアクセッションナンバーで公表されている。

<16S rRNA 遺伝子の塩基配列のアクセッションナンバー>

- AB605019: THI501 株
- AB605020: THI502 株
- AB605021: THI503 株
- AB605022: THI504 株
- AB605023: THI505 株

2-2-4 THI503 株のイオウ酸化による増殖確認

THI503 株のイオウ酸化による生育を、ATP 濃度の測定により評価した。

1) 培養: 前培養した THI503 株の菌液 1.5 mL を WS5 培地 13.5 mL を分注した 50mL 容プラスチックチューブ (BD Biosciences, Falcon 352070) に接種し、30°C, 暗所, 振とう培養した。対象区として、無菌区 (前培養した菌液を接種しない区) と、無イオウ区 (WS5-S 培地の単体イオウを非添加, 前培養した菌液を接種した区) をそれぞれ設けた。培養は 7 日間, 実験は 3 連で行なった。

2) 測定: 培養液は適宜サンプリングし、以下の測定に供試した。培養液の pH は pH メータ (Twin pH Type B-212, Horiba) で測定した。培養液の ATP 濃度は、bioluminescence method (Stanley and Williams, 1969)にて測定した。培養液の ATP は Rakotonirainy et al (2003)の報告に従って抽出し、ATP とルシフェリン、ルシフェラーゼの反応は ATP assay mix (FLAAM, Sigma-Aldrich)を用い、反応により生じた光量を LUMI-COUNTER 700 (Microtec) で測定した。測定された光量は、標品の ATP disodium salt hydrate (FLAAS, Sigma-Aldrich)を用いて作成した標準曲線をもとに ATP 量に換算した。

2-2-5 THI503 株の培養に伴うチオ硫酸、および硫酸の測定

THI503 株のイオウ酸化経路について詳しく調べるために、培地中の硫酸とチオ硫酸濃度を経時的に測定した。しかし、WS5 培地は培地成分に硫酸塩化合物を含むため、培養中に生成される微量の硫酸を評価できない。そこで、WS5 培地に含まれる硫酸塩の化合物をすべて等モル濃度の塩化物に変更した、WS5-S 培地を用いて実験を行なった。

1) 培養: 前培養した THI503 株の菌液 5.0 mL を、WS5-S 培地 ($3.0 \text{ g L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$; $0.16 \text{ g L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$; $0.41 \text{ g L}^{-1} \text{ MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; $0.07 \text{ g L}^{-1} \text{ FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; $0.25 \text{ g L}^{-1} \text{ CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 単体イオウ 10 g L^{-1} , pH 5.0) 45.0 mL を分注した 225 mL 容コニカルポリプロピレン製チューブ (BD Biosciences, Falcon 352075) に接種し、30°C, 暗所, 振とう培養を行なった。対象区として、無菌区 (前培養した菌液を接種しない区) と、無イオウ区 (WS5-S 培地の単体イオウを非添加, 前培養した菌液を接種した区) を設けた。培養は 7 日間行い、実験は 3 連で行なった。

2) 測定: 培養液は適宜サンプリングし、0.22 μm フィルター滅菌後、以下の測定に供試した。培養液の pH は pH メータ (Twin pH Type B-212, Horiba) で測定した。チオ硫酸イオンおよび

硫酸イオン濃度の測定は、イオンクロマトグラフィー (Model 861 Advanced Compact IC, Metrohm) を用い、下記の条件で測定した。得られた濃度から、培養時間中に培地中に蓄積されたチオ硫酸イオンおよび硫酸イオンの物質量を算出した。

<イオンクロマトグラフィーの測定条件>

- ・ カラム：陰イオンカラム I-524A (Shodex)
- ・ 移動相：2.5 mM フタル酸溶液 (pH4.0)
- ・ 流速：1.2 mL min⁻¹
- ・ 圧力：5.5 MPa
- ・ 温度：40°C

2-2-6 THI503 株の COS 分解

1) 培養：THI503 株は、2-2-3 と同様の方法で培養した。培養後の菌体を洗浄するために、培養液を遠心分離 (5,000×g, 15 分, 4°C) し、上清を除去した後、オートクレーブ滅菌 (121°C, 15 分) 済みの 25 mM リン酸バッファー (pH 7.0) を添加して懸濁し、遠心 (5,000×g, 15 分, 4°C) 後上清を除去する作業を 3 回繰り返した。洗浄後の菌体に 25 mM リン酸バッファー (pH 7.0) を添加して懸濁し、実験に供する菌液を作成した。

2) COS 分解：菌液 10 mL はオートクレーブ滅菌 (121°C, 15 分) 済みの試験管 (180 mm×18 mm) に無菌的に分注し、同様にオートクレーブ滅菌したブチル W キャップで密封した。この試験管の気相に、COS 濃度が 25 ppmv になるように COS 標準ガス (10.5% COS, Balance gas: N₂, 日酸 Tanaka) 11.5 μL をシリンジで添加した。COS 標準ガス添加後 10 分間静置して気相が均一化したとみなし、このときの時間を 0 time とした。以降経時的に、試験管内の気相の気体をガスタイトマイクロシリンジで 50 μL 採取し、FPD (flame photometric detector) - ガスクロマトグラフ (GC-14B, Shimadzu) にインジェクションして COS 濃度を測定した。ガスクロマトグラフの測定条件は、カラムには Porapak QS (50-80 mesh, Waters Associates, MA) を用い、Katayama et al. (1992) と同様の方法で測定した。菌体量の評価のために、菌液中の全有機炭素を湿式酸化-赤外線ガス分析計で瀬戸 (1978) と同様の方法で測定した。

2-3 結果および考察

2-3-1 分離されたイオウ酸化細菌の性質と系統解析

アンコール遺跡の剥離劣化石材から分離されたイオウ酸化細菌は、THI501 株, THI502 株, THI503 株, THI504 株, THI505 株の計 5 株である。これらの菌株が分離された剥離劣化石材試料の採取場所の詳細は Table 2-1 に示した。さらに詳細には, Li et al. (2008) および李 (2009) に記載のとおりである。

分離菌は、イオウ酸化細菌の選択培地の pH を改変した WS5 培地および WS5 寒天培地を用いて分離されたが、WS5 寒天培地で 30℃, 暗所, 7 日間培養したときの分離菌のコロニーの直径は、0.1 mm 程度と小さかった。一方、分離菌を従属栄養細菌用の培地である PYG 寒天培地で 30℃, 暗所, 3 日間培養したときのコロニーの直径は 1 mm 程度であった。

分離菌のコロニー形状を以下に記す。WS5 寒天培地で培養した場合、5 菌株ともにそのコロニーは直径 0.1mm 程度、色は透明、円形、全縁、凸状であった。PYG 寒天培地で培養した場合、5 菌株ともにそのコロニーは直径 0.1 mm 程度、円形、全縁、凸状で滑らかな表面を有していた。また、コロニーの色は菌株によって異なり、THI501, THI504, THI505 株は薄い黄色、THI502, THI503 株はクリーム色であった (Fig. 2-1)。

5 株の分離菌は単体イオウを添加した無機塩培地、およびグルコースを含む PYG 培地のいずれにおいても培養可能であったことから、通性無機化学栄養性の性質を有することが示唆された。

Table 2-1. Details of the sampling site of the deteriorated stone samples and isolates

Sample	Detail of the sampling site			Isolate
	Temple	Sampling site	Details	
AW1	Angkor Wat	Northwest pillar in the Northern library	The near ground section of the pillar in west side	THI501
AW2	Angkor Wat	Southwest pillar in the Northern library	The near ground section of the pillar in west side	THI502
BYc	Bayon	The tower of No. 30 in the Inner gallery	Northwest corner of the southwest room of the tower	THI503
PK2	Pnom Krom	The northern one of the three shrine temples	North side wall of the temple	THI504
PK3	Pnom Krom	The southern one of the two small temples	The base of the south pillar of the entrance	THI505

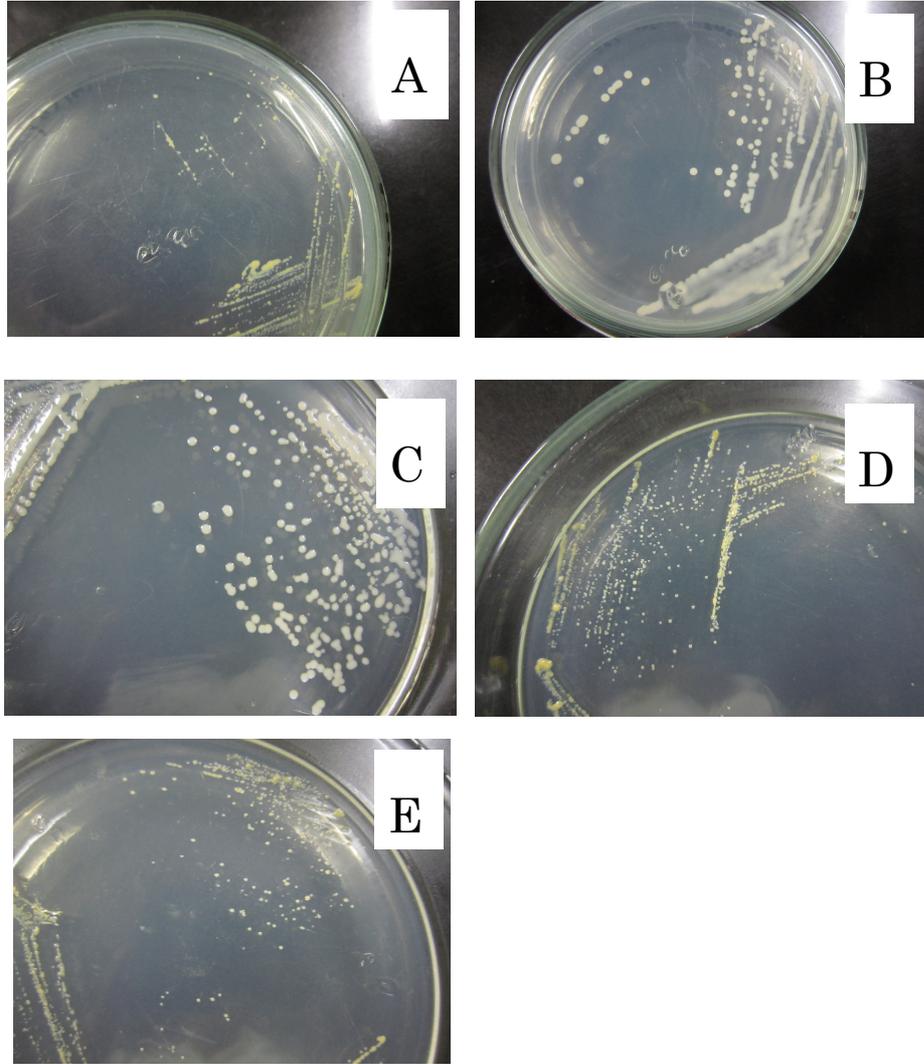


Fig. 2-1. Isolates strain THI501 (A), THI502 (B), THI503 (C), THI504 (D), and THI505 (E) at 5 days of incubation on PYG medium.

分離菌 5 株はいずれもカタラーゼ陽性，オキシダーゼ陰性，グラム染色陽性，抗酸性染色陽性であった。グラム染色後の顕微鏡観察により確認した細胞の形態は Table 2-3 に示した。

16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づく系統解析の結果， TH1502 株と TH1503 株は *Mycobacterium cosmeticum* (AY449728; Cooksey et al., 2004) に 100%近縁であり， TH1501 株， TH1504 株， TH1505 株は *Mycobacterium pallens* (DQ370008; Hennessee et al., 2009)に 99%近縁であった (Table 2-3)。*Mycobacterium* 属は結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* に代表される細菌グループであり，細胞壁にミコール酸が多量に含まれているため加温により細胞が染色され，一旦染まった色素が脱色剤で脱色されにくい脱色抵抗性を示す特徴がある。抗酸性染色において分離菌 5 株はいずれも陽性であり脱色抵抗性を示したため，細胞壁の特徴からもこれらの分離菌が *Mycobacterium* 属細菌であることが裏付けられた。

5 株の分離菌と *Mycobacterium* 属に属する細菌との系統学的位置を Fig. 2-2 の系統樹に示した。分離菌は，*Mycobacterium* 属のうち成長の早いグループ (Rapidly growers) に位置しており，結核菌群である *M. tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanus*, *Mycobacterium microti* が属する成長の遅いグループとは系統的に異なっていた。成長の早いグループに属する細菌は，従属栄養性細菌用の寒天培地で培養したときに 7 日間以内にコロニー形成が見られる特徴がある。分離菌 5 株は PYG 培地で培養後 3 日目にコロニー形成が見られたことから，成長の早いグループに属することが確認された。

Mycobacterium 属に属する細菌は一般的に，ヒトや動物の皮膚や，土壌などの環境等から分離される細菌である。一部の細菌では，水素を用いて独立栄養的に生育すること (Lukins and Foster, 1963; Park and Decicco, 1974) や，一酸化炭素 (CO) を単一の炭素源として生育すること (Park et al., 2003) が報告されている。しかし，イオウを用いて独立栄養的に生育する *Mycobacterim* 属細菌は本報告が初めての報告であった。

Table 2-3. Cell morphology and phylogenetic affiliation by 16S rRNA gene sequences of five sulfur-oxidizing isolates

Isolate	Cell morphology		Phylogenetic affiliation	
	Size, length \times width (μ m)	Shape	Related species	Similarity (%)
THI501	1.1 \times 0.8	Short rod	<i>Mycobacterium pallens</i> strain czh-8 (DQ370008)	99 (1415/1416)
THI502	1.2 \times 0.5	Rod	<i>Mycobacterium cosmeticum</i> strain LTA-388 (AY449728)	100 (1369/1369)
THI503	0.8 \times 0.4	Rod	<i>Mycobacterium cosmeticum</i> strain LTA-388 (AY449728)	100 (1438/1438)
THI504	0.7 \times 0.5	Short rod	<i>Mycobacterium pallens</i> strain czh-8 (DQ370008)	99 (1343/1350)
THI505	0.8 \times 0.6	Short rod	<i>Mycobacterium pallens</i> strain czh-8 (DQ370008)	99 (1415/1416)

All strains were Gram positive, acid-fast positive, catalase positive, and oxidase negative.

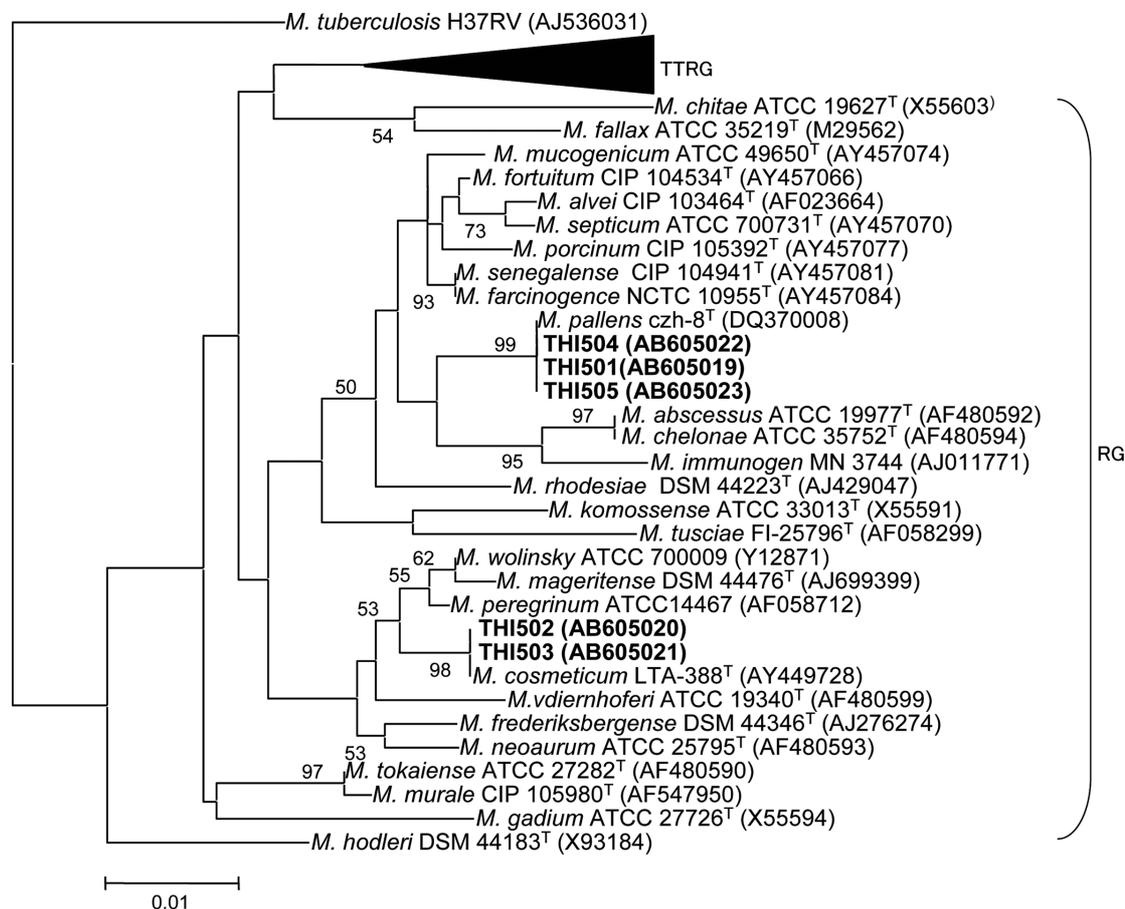


Fig. 2-2. Phylogenetic relationship among the five sulfur-oxidizing isolates and other rapid growing *Mycobacterium* species based on a comparison of their 16S rRNA gene sequences. A slow-growing species, *M. tuberculosis*, was included as the outgroup. GenBank accession numbers are shown in parentheses. Numbers at the branch nodes are bootstrap values per 1000 trials; only values greater than 50% are shown. The scale bar corresponds to 1% estimated sequence divergence. TTRG, thermotolerant rapid growers; RG, rapid growers.

2-3-2 THI503 株のイオウ酸化能

以降の実験には *Mycobacterium* sp. strain THI503 株（以下 THI503 株）を分離菌の代表菌株として選択した。THI503 株を選択した理由は二つある。一つは、THI502 株と THI503 株が観光資源としてより重要度の高い遺跡であるアンコール・ワットおよびバイヨンから分離されているためである。もう一つは、THI503 株が分離されたバイヨンの剥離劣化石材試料 BYc はイオウ酸化微生物が高密度 ($10^4 \sim 10^5$ MPN (g sample)⁻¹) で継続的に計数されているため (Li et al., 2008) 石材の剥離劣化への寄与が高いと考えたためである。

WS5 培地で 9 日間培養した THI503 株を DAPI 染色後に蛍光顕微鏡で観察した結果、無菌区 (Fig. 2-3B) では影のようにみえる単体イオウの粒子の表面に、青色の蛍光で示された THI503 株の菌体が付着していた (Fig. 2-3A)。培養液を経時的に DAPI 染色して蛍光顕微鏡観察すると、培養開始時には THI503 株の菌体はほとんど観察されないが、培養 6 日目、9 日目と培養日数が増加するごとに単体イオウの粒子に付着している菌体の数が増加した。また、培養初期は直径 $10 \mu\text{m}$ ほどの単体イオウの粒子表面に菌体が付着していたが、培養日数が増加すると、直径 $30 \sim 40 \mu\text{m}$ のより大きい単体イオウの粒子にも菌体が付着していた。THI503 株の細胞のほとんどは単体イオウに付着しており、培養液中に遊離した細胞の数は少なかった。

このときの培養 7 日後の菌液の様子は、無菌区では培養開始時と同様に単体イオウが疎水性を保ち、液体培地の液面に単体イオウが浮遊しているのに対し (Fig. 2-3E)、THI503 株の培養液は浮遊する単体イオウの粒子が減少しており (Fig. 2-3C)、攪拌すると容易に懸濁し (Fig. 2-2D)、疎水性が失われていた。このような単体イオウ粒子の疎水性の消失は、THI503 株が単体イオウの粒子表面に付着して生育した (Fig.2-3A) ためと考えられる。

このように、細胞が疎水性の単体イオウ表面に付着して生育し、その疎水性を失わせる現象は、イオウ酸化細菌である *Thiobacillus thiooxidans* (現 *Acidithiobacillus thiooxidans*; Schaeffer et al., 1963) や、*Thiobacillus ferrooxidans* (現 *Acidithiobacillus ferrooxidans*; McGoran et al., 1969) でも確認されており、単体イオウの可溶化を促進し、細菌の単体イオウの取り込みを促進していると考えられている (Knickerbocker et al., 2000)。THI503 株は *A. thiooxidans* と同様に、単体イオウ粒子表面に付着して生育することでより効率的にイオウを取り込み、エネルギー源として利用していると考えられる。

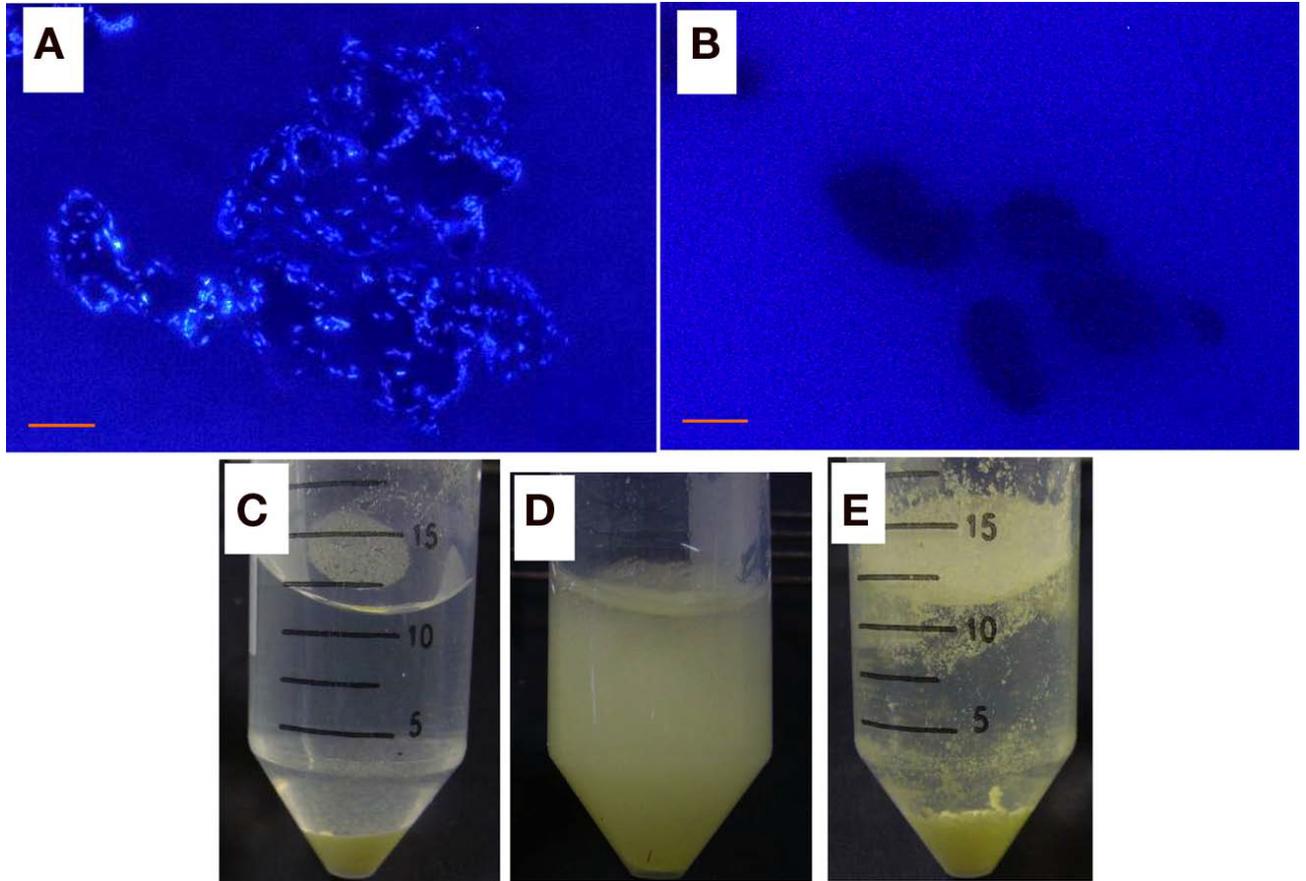


Fig. 2-3. Growth of strain THI503 with S^0 (A, B). Fluorescence microphotographs of WS5 liquid medium culture with S^0 after 9 days of incubation. (A) With strain THI503 or (B) without strain THI503. Bar indicates 10 μm . (C, D, E) S^0 in WS5 media after 7 day of incubation. (C, D) with or (E) without strain THI503. Cultures were allowed to stand for 5 min (C), followed by brief shaking (D). In the absence of strain THI503, some S^0 remained to float on the surface of WS5 medium (E).

単体イオウを添加した無機塩培地で THI503 株を培養したときの酸化型イオウ種の変化を調べるために、THI503 株を WS5-S 培地で 22 日間培養し、培地 pH、培地中のチオ硫酸イオンおよび硫酸イオン濃度を経時的に測定した結果を Fig. 2-4 に示した。培養 22 日間で、無菌区では培地 pH が初期の pH4.8 から pH4.4 に低下し、チオ硫酸イオンおよび硫酸イオン濃度は検出限界値以下であった。一方、THI503 接種区では培地 pH が初期の pH4.7 から pH3.6 に低下し、培地中のチオ硫酸イオン濃度は $22.3 \pm 5.7 \text{ mmol L}^{-1}$ 、硫酸イオン濃度は $2.3 \pm 2.5 \text{ mmol L}^{-1}$ に達した。すなわち、50 mL の培養液中にチオ硫酸イオン $1.1 \pm 0.3 \text{ mol}$ および硫酸 $0.1 \pm 0.1 \text{ mol}$ が培地中に蓄積された。

アンコール遺跡の剥離劣化石材から分離されたイオウ酸化真菌 THIF01 株を WS5-S 培地で 60 日間培養した結果 (Li et al., 2010) と比較すると、THI503 株は単体イオウを酸化して THIF01 株の約 10 倍量の硫酸イオンを生成した。

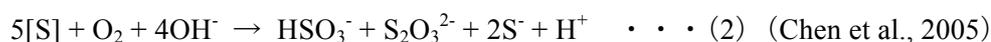
次に、THI503 株の単体イオウ酸化経路について考察する。一般的なイオウ酸化細菌であるグラム陰性菌の *A. ferrooxidans* や *A. thiooxidans* では、硫黄ジオキシゲナーゼ (Sulfur dioxygenase: SDO) によって単体イオウが酸化され、式 (1) の反応により亜硫酸 (SO_3^{2-}) が生成される。亜硫酸は sulfite:acceptor oxidoreductase (SAR) により硫酸に酸化される。亜硫酸の一部は化学的に単体イオウと反応し、チオ硫酸が生成される。



THI503 株のイオウ代謝の結果、硫酸よりもチオ硫酸が過剰に生成されたことから、亜硫酸を経由して硫酸が生成されて一部チオ硫酸が生成される SDO の代謝経路では THI503 株のイオウ代謝経路を説明するのは困難である。

グラム陽性菌によるイオウ化合物の酸化についてはあまり知られていないが、*Sulfobacillus thermosulfidooxidans* は SDO とその関連遺伝子の活性を持つことが報告されている (Egorova et al., 2004; Rohwerder and Sand, 2007)。

また、古細菌では、sulfur oxygenase reductase (SOR) により式 (2) の反応によって単体イオウからチオ硫酸と亜硫酸を生成する代謝経路が知られている。亜硫酸は化学的に単体イオウと反応することによりチオ硫酸に、または SAR による酸化により硫酸に酸化される。



SOR をコードする *Sor* 遺伝子は、古細菌だけでなく細菌 *Acidithiobacillus* sp. strain SM-1 に

存在することが確認されている (Chen et al., 2007; Kletzin, 2008)。THI503 株の代謝経路の特定には酵素遺伝子の有無を調べる必要があるものの、SOR の代謝経路は硫酸よりもチオ硫酸が過剰に生成された THI503 株のイオウ代謝をうまく説明できる。

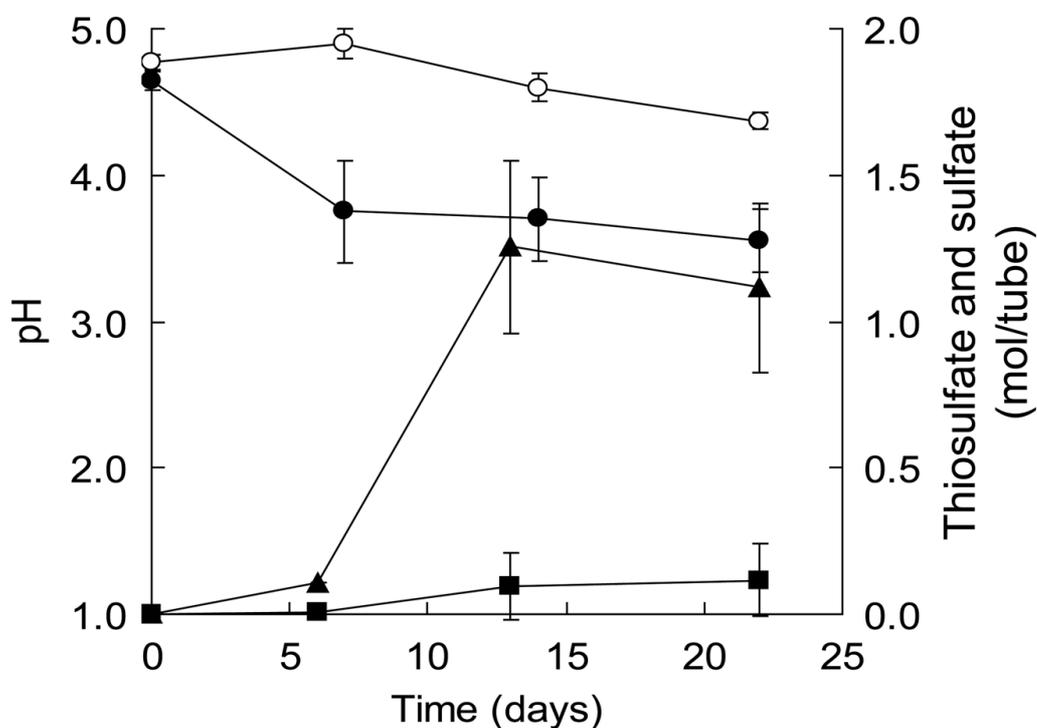


Fig. 2-4. Changes in the medium pH and thiosulfate and sulfate ions during incubation of strain THI503 in WS5-S medium with S⁰ as the sole energy source. Cells were incubated in a 225-mL conical tube containing 50 mL culture. Error bars indicate SD.

Symbols: circles, pH; triangles, thiosulfate; square, sulfate; filled symbols, with THI503 and with S⁰; open symbols, without THI503 and with S⁰.

2-3-3 WS5 培地での THI503 株の生育確認

THI503 株の WS5 培地での生育を確認するために、ATP を測定した。ATP を生育の指標として用いた理由は、DAPI 染色後の蛍光顕微鏡観察では、単体イオウの粒子が厚みを持っているために菌数の確認が困難であり、接着が強固なためソニケーションによる単体イオウ粒子からの菌の剥離も行えなかったためである。

WS5 培地で、THI503 株を接種した区 (THI503 株区)、無菌区、および WS5 培地中の単体イオウを除去した区 (イオウ無添加区) で培養を行った。ただし、イオウ無添加区は、前培養からのもちこみの単体イオウを含むため、終濃度で THI503 株区の 1/10 の単体イオウを含んでいる。

Fig. 2-5 に示す通り、培地 pH は無菌区では培養期間中 pH 5.0~4.9 を維持したのに対し、THI503 株区では初期 pH 4.9 から、培養 12 日目に pH 4.4、培養 20 日目には pH4.2 に低下した。イオウ無添加区では初期 pH 4.9 から、培養 12 日目に pH 4.5、培養 20 日目には pH4.3 に低下した。

培地 50mL 中の ATP 量は、培養 12 日目に THI503 株区で 313 pmol、イオウ無添加区で 144 pmol に達し、その後減少した (Fig. 2-5)。無菌区の ATP は培養期間を通して検出限界値以下であった。イオウ無添加区でも THI503 株区と同様に培地 pH が低下し ATP が増加した理由として、前培養液に含まれた持ち込みの単体イオウ (約 1 gL^{-1}) を利用して、THI503 株が生育し ATP を生成したためと考えられる。

測定された ATP 量から培地中の菌数を以下のように換算した。*Mycobacterium bovis* において、1 CFU (colony-forming unit) あたりの ATP 量が 1.014 fg と報告されている (Cooksey et al., 2004)。この値を用いると、THI503 株区の菌密度は、 $3.0 \times 10^5 \text{ CFU mL}^{-1}$ 、イオウ無添加区の菌密度は $1.4 \times 10^5 \text{ CFU mL}^{-1}$ 、と計算された。

以上の結果より、単体イオウを添加した無機塩培地 WS5 培地中で、THI503 株が生育し、それに伴い培地 pH が低下することが確認できた。

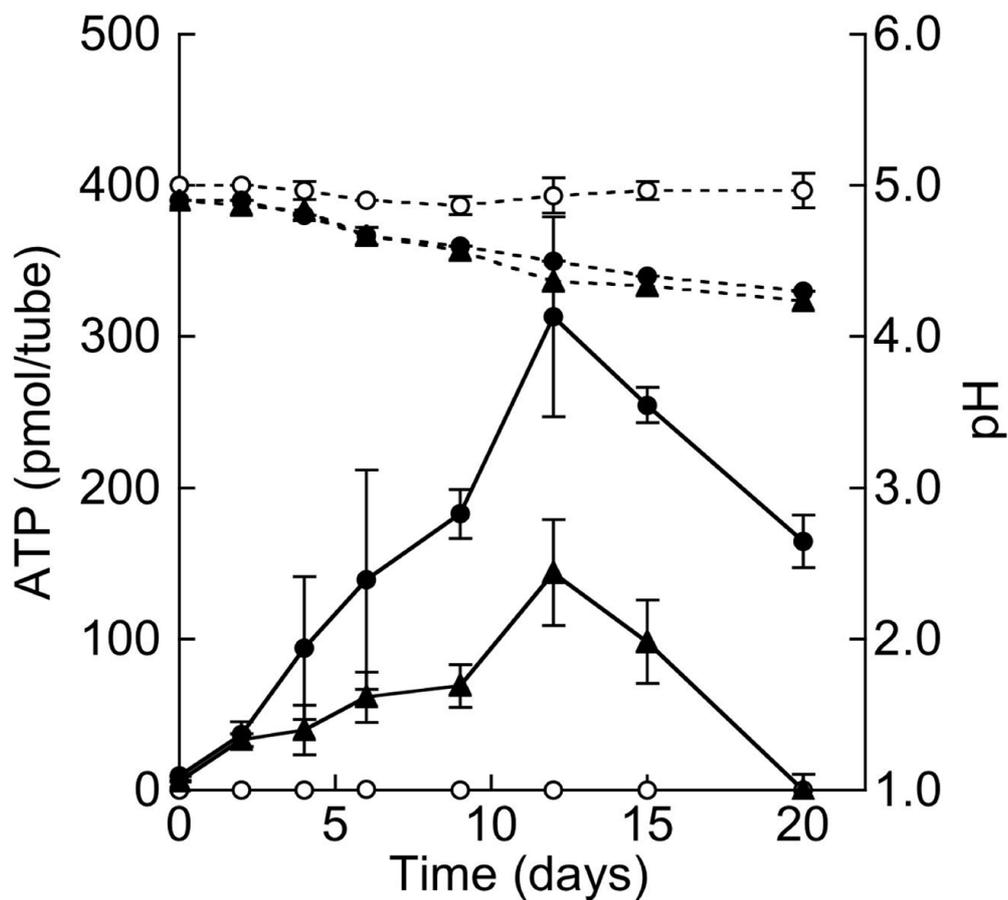


Fig. 2-5. Change in amount of ATP in WS5 medium incubated with strain THI503 with or without S⁰ as the sole energy source. Error bars indicate SD. Symbols: solid line, ATP, dashed line, medium pH, filled circles, with THI503 with 10 g S⁰ L⁻¹; triangles, with THI503 without S⁰ (final concentration of S⁰ was 1 g L⁻¹ due to the carry-over from pre-culture); empty circles, without THI503 with 10 g S⁰ L⁻¹.

2-3-4 THI503 株の COS 分解能

THI503 株のイオウ化合物の代謝能の情報として、大気中に存在するイオウ化合物の一つである COS の利用性を調べた。アンコール遺跡の劣化石材試料から分離された真菌 *Fusarium* sp. THIF01 株は 30 ppmv, および 500 pptv の COS を分解することが示され、大気中の COS の利用によっても硫酸を生成する可能性が示唆されている (李, 2009)。また, COS 分解能を持つ細菌として森林土壌から分離された細菌株のうち 4 株が *Mycobacterium* 属細菌であった (Kato et al. 2008) ことから、THI503 株も COS 分解能を有する可能性が考えられたため、実験を行った。

Fig. 2-6 に示す通り、THI503 株の菌体懸濁液上層に添加した COS は培養 6.5 時間で 25 ppmv (40 nmol) から 1 ppmv (2 nmol) に減少した。コントロールとして設けた無菌区において 24 ppmv (39 nmol) から 18 ppmv (30 nmol) に減少した COS を水への溶解分とみなすと、THI503 株の正味の COS 分解量は 29 nmol であった。

次に、1 菌体あたりの COS 分解量を算出した。菌体懸濁液中の全炭素量は、1.62 mg C と測定された。細菌 1 細胞あたりの炭素量として、*Pseudomonas putida* で報告されている $1.1 \times 10^{-13} \sim 3.1 \times 10^{-13}$ g C (Bratbak, 1985) の値を用いると、10 mL の菌体懸濁液中の THI503 株の菌数は $4.8 \times 10^9 \sim 1.4 \times 10^{10}$ cells と概算された。以上より、THI503 株 COS 分解速度は $3.3 \times 10^{-10} \sim 9.2 \times 10^{-10}$ nmol COS cell⁻¹ h⁻¹ と算出された。一方、大気濃度レベルの COS 500 pptv を THI503 株の培養懸濁液の気相に添加したところ、COS の有意な減少は確認されなかった (data not shown)。

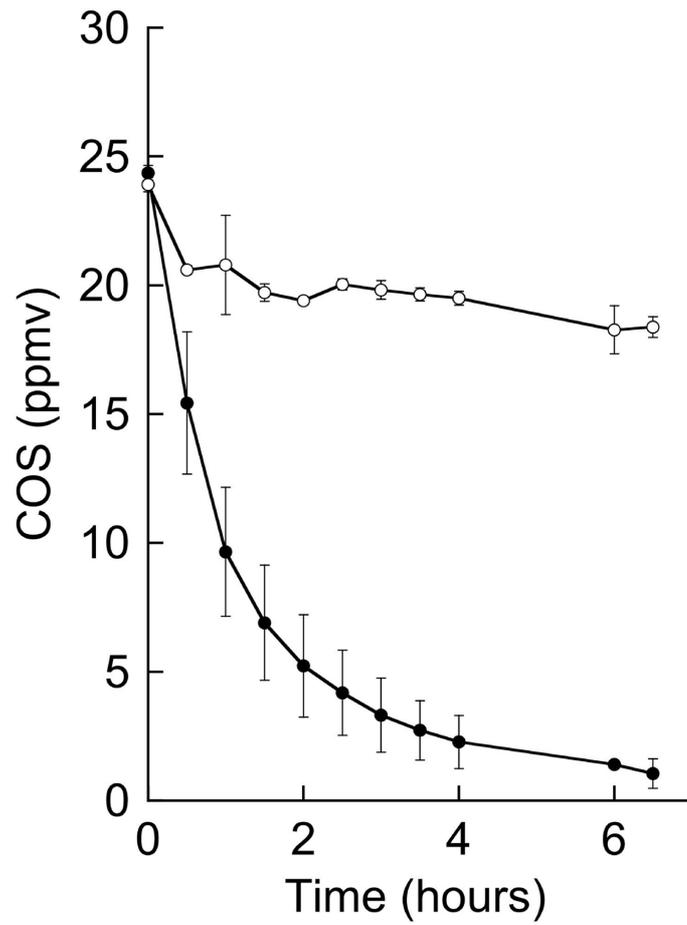


Fig. 2-6. Degradation of 25 ppmv of COS by strain THI503. Cells were suspended in phosphate buffer. Error bars indicate SD, n = 3. Symbols: Filled circles, with THI503; open circles, without THI503.

2-4 結論

本章では、イオウ酸化微生物が 10 年に渉り 10^3 - 10^4 cells g^{-1} 計数されていたアンコール遺跡の剥離劣化部位において、どのようなイオウ酸化細菌が生息しているのかを明らかにするために、剥離劣化部位から採取された石材試料から分離されたイオウ酸化細菌の系統学的位置とイオウ代謝に関する性質を調べた。

その結果、アンコール遺跡の剥離劣化部位の石材試料から分離された細菌 5 菌株は、*Mycobacterium* 属の生育の早いグループに属する細菌であった。*Mycobacterium* 属に属する細菌はこれまでイオウ酸化による独立栄養的な性質が知られていなかったため、5 菌株のうち代表として THI503 株を選択し、さらに詳細に実験を行った。

無機塩培地に単体イオウを添加した WS5 培地で THI503 株を培養すると、WS5 培地中の単体イオウに THI503 株の細菌が付着して生育し、一般的なイオウ酸化細菌で見られるように、単体イオウの疎水性が消失する様子が観察された。

また、WS5 培地で THI503 株を培養すると、培地 pH が低下し、培養液中の ATP が増加したことから、THI503 株の生育と酸生成が確認された。

WS5 培地に含まれる硫酸イオンを除外した WS5-S 培地において、THI503 株を培養したところ、培養に伴いチオ硫酸と硫酸が生成された。硫酸だけでなくチオ硫酸が生成されていることから、SOR により単体イオウが酸化されている可能性が示唆された。

以上の結果より、アンコール遺跡の剥離劣化部位において *Mycobacterium* 属が生育し、硫酸を生成して石材の劣化に寄与している可能性が示唆された。

次章では、アンコール遺跡で見られる石材劣化のうち、着色劣化に注目し、着色劣化に寄与する細菌について調査を行った結果について論じる。

第3章 アンコール遺跡の砂岩壁面に付着したバイオフィルムの細菌叢解析

本章の要旨

本章では、アンコール遺跡、アンコール・トムの中央に位置するバイヨンにおいて、砂岩壁面に付着するバイオフィルムに注目し、バイオフィルムを構成する細菌叢について調査した結果について論じる。砂岩壁面に付着したバイオフィルムの細菌叢は、バイオフィルム周辺の空気中の細菌叢と比較して多様性が高く新規の細菌種から構成されていた。バイオフィルムの色調ごとに細菌叢を比較した結果、バイオフィルムの色調によりバイオフィルムを構成する細菌種の構成比が異なることが示された。バイオフィルムの層ごとに細菌叢を解析した結果、表層から石材の表面にかけて、細菌叢が遷移していることが示された。

3-1 研究の背景と目的

バイヨンは、アンコール遺跡、アンコール・トムの中央に位置しており、アンコール・ワットと並んでアンコール遺跡を代表する寺院だが、アンコール・ワットよりも保存状態が悪く、劣化が顕著である。バイヨンは、外回廊、内回廊、テラス、中央塔より構成されている。外回廊、内回廊の砂岩壁面表面に彫られた浅浮き彫り（レリーフ）には、乳海攪拌などの宗教的な神話の一場面や、当時の人々の生活の様子が描かれており、文化的にも貴重な資料である。しかし、現在この浅浮き彫り表面にはバイオフィルムが付着し、バイオフィルム由来の着色が生じている。また、一部の壁面では砂岩表面が腐食したように劣化している部分も見られる。第1章に記載したように、石材表面にバイオフィルムが付着すると、石材の劣化が促進される。レリーフを保存するために、バイオフィルムを構成する細菌叢を明らかにし、その生育を抑制するための知見を得ることが重要である。

先行研究により、バイヨンの砂岩壁面に付着するバイオフィルムについて、クローン解析法により新鮮な（fresh）バイオフィルムと古いバイオフィルムの微生物叢が報告された（Lan et al., 2010）。また、黒茶色、または茶色のバイオフィルムに生育するシアノバクテリアについて顕微鏡観察と系統学的解析により菌種が明らかになっている（Gaylarde et al., 2012）。しかし、バイオフィルムを構成する細菌叢の網羅的な解析は行われていない。

空気中の微生物（airborne microorganisms）は、文化遺産の生物劣化にしばしば重要な影響を与えている。特に、洞窟内の生物劣化においてその影響が指摘されている（Wang et al., 2012）

ほか、モスクワの大聖堂 (Petushkova and Kandyba, 1999) や、ローマのカタコンベ (Saarela et al., 2004) においても、石材表面に付着したバイオフィルムを構成する微生物の「運び屋」として空気中の微生物が重要な役割を果たすことが報告されている。しかし、アンコール遺跡のバイオンでは、これまで遺跡内のバイオフィルムと遺跡内空気中の微生物叢の関連を調べた報告はなく、空気中の微生物とバイオフィルムの関連は不明である。

バイオン内回廊では、様々な色調のバイオフィルムが存在している。バイオフィルムの色調によって、分布や劣化状況が異なる様子が観察されたことから、バイオフィルムの色調によって微生物叢が異なり、石材劣化への影響度が異なる可能性があると考えた。バイオフィルムの色調ごとに細菌叢を明らかにすることで、バイオフィルムの色調からバイオフィルムを構成する細菌種を推測できれば、石材劣化への影響度や深刻度を判断する指針になりうる可能性がある。

また、欧州の事例では、オーストリアの教会内の 14 世紀に描かれたフレスコ画や、ドイツの教会内の 18 世紀に書かれたフレスコ画上の赤色 (rosy-pigmented) のバイオフィルムと、*Rubrobacter* 属に近縁な細菌との相関が示されており (Schabereiter-Gurtner et al., 2001)、スペインとポルトガルの劣化石材から *Rubrobacter* 属に近縁な細菌が分離されている (Laiz et al., 2009)。また、Imperi et al. (2007) の報告により、*Rubrobacter* 属の細菌が生成する色素が、壁画の深刻な赤色着色劣化の原因となっていることが示された。バイオンでも、赤色のバイオフィルムによる着色劣化が観察されているが *Rubrobacter* 属に属する細菌との関連は明らかになっていない。

メキシコのマヤ遺跡では、石灰岩の石材の表面 (Epilithic) と内部 (Endolithic) で細菌叢が異なることが示されている (McNamara et al., 2006)。バイオフィルムにおいて、石材のより近くに生育する微生物は、バイオフィルムの表層に生育する微生物に比べて劣化への影響がより大きいと考えられる。しかし、これまでバイオンのバイオフィルムにおいて、バイオフィルムの表層と内部とで細菌叢を比較した例はない。

以上の背景より、本章ではバイオフィルムの色調ごとの構成細菌種およびバイオフィルムの表層と内部の構成細菌種を調べることで、石材劣化に寄与する可能性のある細菌種を明らかにすることを目的とした。この目的のために、まずはバイオフィルムの細菌叢の特徴を示すために遺跡内空気中の細菌叢との比較を行った。次に、バイオフィルムの色調ごとに細菌

叢を比較した。さらに、劣化が顕著な石材表面に付着したバイオフィルムについて、バイオフィルムの表層と内部とで細菌叢を比較した。



A



B



C

Fig. 3-1. Features of Bayon temple at Angkor Thom in Cambodia. A, Appearance of the Bayon temple. B, Tetrahedral stone face on the tower, which cluster around the central tower at Bayon. C, Bas-relief engraved on the sandstone walls of the inner gallery at Bayon.

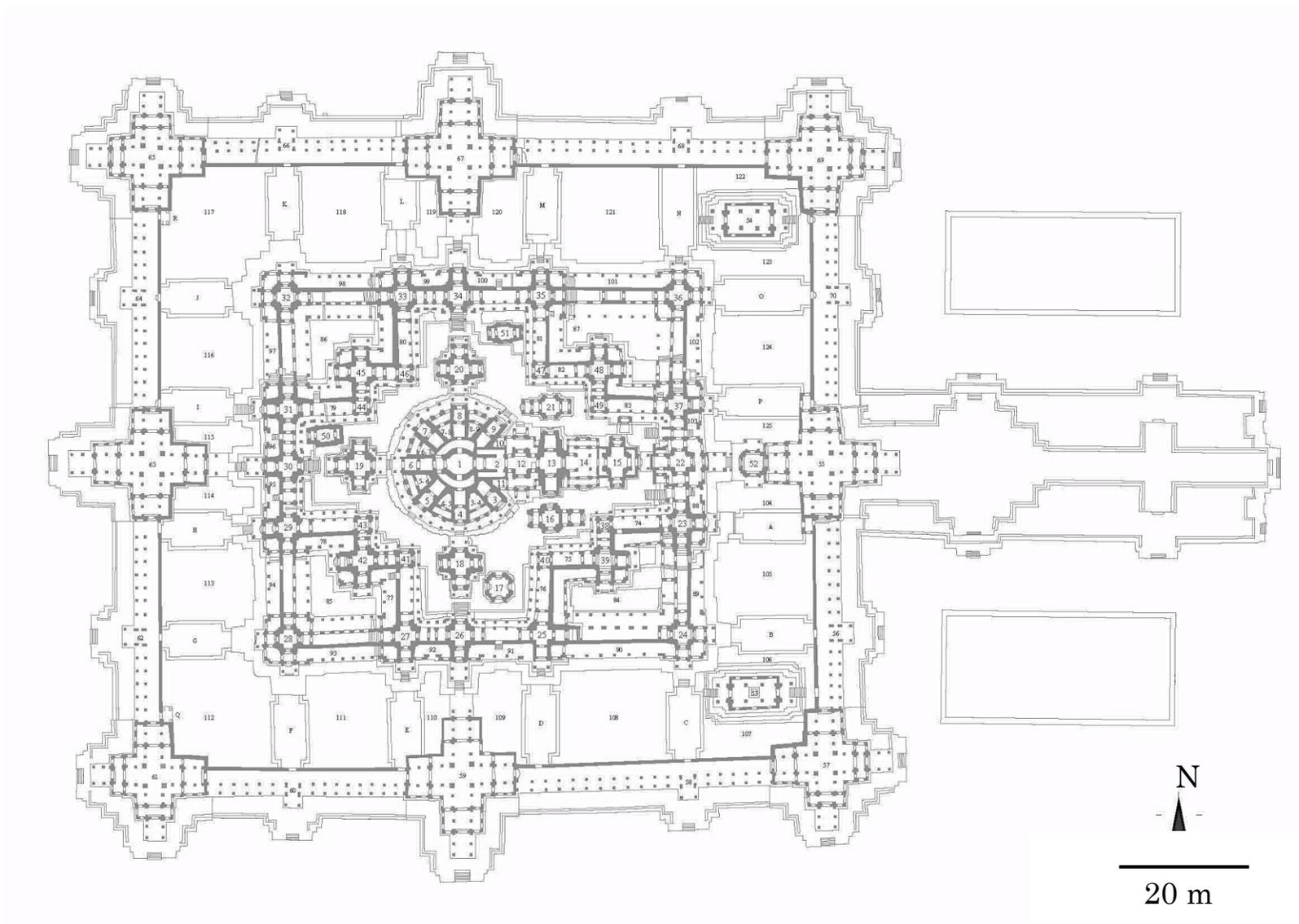


Fig. 3-2. Map of the Bayon. Bayon was composed of the outer gallery, the inner gallery, the upper terrace, and the central tower.

3-2 実験方法

3-2-1 試料の採取

試料を採取した地域の年平均気温は 25°C (Iwasaki et al., 1995), 気候は雨季 (5 月～10 月) と乾季 (11 月～4 月) があり, 年間降水量は 1,300 ～1,500 mm (Iwasaki, 2003)である。バイヨン内回廊の月平均気温は年間を通して 25～30°Cであり, 相対湿度は乾季に 60～80%, 雨季に 80～90%であった (Sawada et al., 2009)。

本章の実験に供した試料はすべて, カンボジア, アンコール遺跡, アンコール・トム内, バイヨンで採取した。

1) 空気中微生物試料: 遺跡内空気中の微生物試料 BA1, BA2, BA3, BA4 は, 内回廊南面東側で 2009 年 9 月に採取された。試料の採取場所は Fig. 3-3 に示した。

試料の採取方法を以下に示す。まず, オートクレーブ滅菌 (121°C, 15 分) したポリカーボネイトメンブレンフィルター (孔径 0.20 μm , 直径 47 mm, Advantec) を, 70% (v/v) エタノールで滅菌したオープンフェイス型フィルターホルダーに装着した。このフィルターホルダーを, 床上 2.5 m, 壁から 20 cm 離れた場所に壁側を向けて設置し (Fig. 3-4A & B), DMQ-V デジタルマスフローコントローラー (model MQV0050, 山武) およびダイアフラム型ドライ真空ポンプ (model DA-30S, アルバック機工) に接続した。マスフローコントローラーで吸引速度を一定に保ちながらポンプで吸気を行なうことで, 空気中の微生物をポリカーボネイトメンブレンフィルター上に補集した。1 枚のフィルターを 5 L min^{-1} , 48 時間吸気し, 1.4 $\times 10^4$ L の空気中に含まれる微生物が補集された試料を得た。補集後のフィルターは 70% (v/v) エタノールで滅菌したフィルターケースに収めた。資料の保管は, 2 日ごとに 1 試料を回収し, 8 日間かけて 4 試料 BA1, BA2, BA3, BA4 を得た。

2) バイオフィルム試料: バイオフィルム試料として, (1) 空気中微生物との比較, (2) バイオフィルムの色ごと, および (3) 層ごとの構成微生物の比較のために, 3 種類の試料を採取した。

(1) 空気中微生物との比較のために, バイオフィルム試料計 8 試料は, 内回廊南面東側, 床上 2.5 m, 空気中微生物試料を採取した付近の砂岩壁面に付着したバイオフィルムより, 2009

年 9 月（雨季）に採取された。この場所は、屋根が残っているため降雨が砂岩壁面に直接降り注がないものの、雨が降ると石材の割れ目から雨水が染み込み、砂岩壁面に濡れが生じていた。試料の採取場所は Fig. 3-3 に示した。

バイオフィルム試料は、 γ 線滅菌済みの粘着シート（Yamaguchi et al., 2003）を用いて、粘着面（2.4×3.0 cm）を壁面に押し付け、剥がしとることにより採取した。この方法により、壁面への影響を最小限に抑え、非破壊的にバイオフィルムを採取できた。バイオフィルムの色は、茶色（BF1, BF2, BF9）、黒茶色（BF8）、黒色（BF3）、暗緑色（BF4, BF6）、緑色（BF7）であった。試料は採取後すぐに保冷剤をいれた保冷箱中にいれ、現地ラボでは-20°Cで数日保存し、帰国後は-80°Cで保存した。以降に記載するすべてのバイオフィルム試料も、粘着シートを用いて同様に採取、保管した。

(2) バイオフィルムの色ごとにバイオフィルムを構成する微生物を比較するために、バイオフィルム試料計 21 試料は、内回廊東西南北各面の浅浮き彫りが施された砂岩壁面に付着したバイオフィルムから、2008 年 9 月、または 2009 年 9 月に採取された。バイオフィルムの色は、カラーチャート（RAL Classic, German Institute for Quality Assurance and Certification）と比較することで定義し、サーモン・ピンク[salmon pink (以下 P 色), RAL 3022], クロム・グリーン[chrome green (以下 G 色), RAL 6020], シグナル・バイオレット[signal violet (以下 V 色), RAL 4008], ブラック・グレー[black-gray (以下 B 色), RAL 7021], ブルーグリーン[blue-green (以下 BG 色), RAL 6004]の計 5 色とした。P13, P20, P21, P39, P53, G01, G27, G31, V11, V15, V35, V37, V53, B06, B23, B24, B36, B53, BG1, BG4, BG5 の計 21 試料の採取場所は、Table 3-1 および Fig. 3-3 に示した。

(3) バイオフィルムの層ごとにバイオフィルムを構成する微生物を比較するために、試料は内回廊南面 26 塔東側小部屋の東に面した砂岩壁面で 2008 年 9 月に採取された。試料 BG4 を採取したバイオフィルムの同一箇所、粘着シートを貼って剥がしとる作業を 23 回繰り返し、バイオフィルムの表層から奥にかけての 1 連のバイオフィルム試料を採取した。採取場所は Fig. 3-3, Table 3-1 に示した試料 BG4 と同一である。この箇所のバイオフィルムは、他の箇所と比較してバイオフィルムに厚みがあり、石材の劣化が著しい。

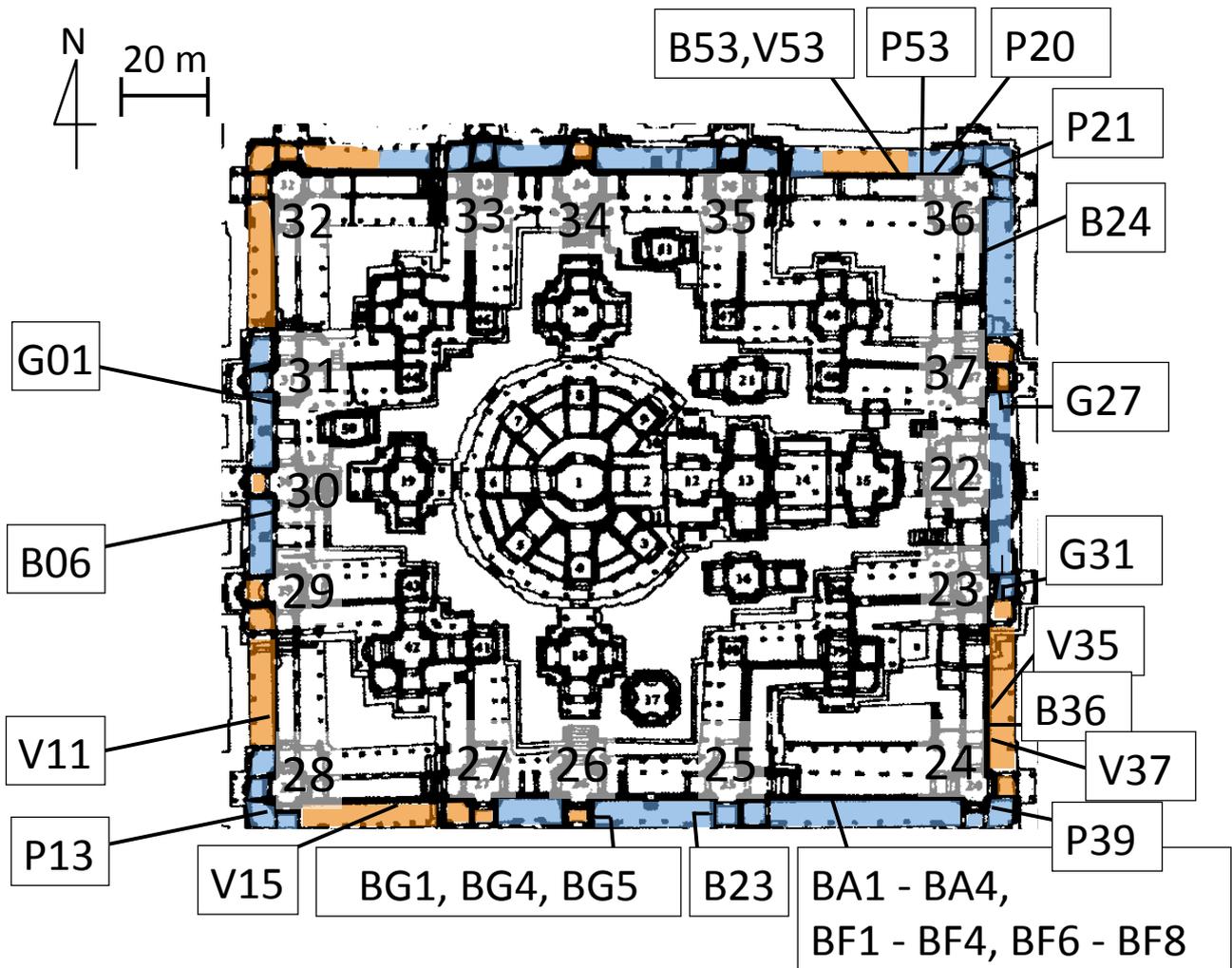


Fig. 3-3. Map of the inner gallery of Bayon, Angkor Thom, showing locations where biofilm and airborne microorganism samples were collected. Sample names are prefixed by the abbreviation of each biofilm color; sample identifications and biofilm characteristics are given in Table 3-1. The number next to the tower is the tower number. Blue area shows the area where the roof remained. Orange area shows the area where the roof was partly or completely missing.

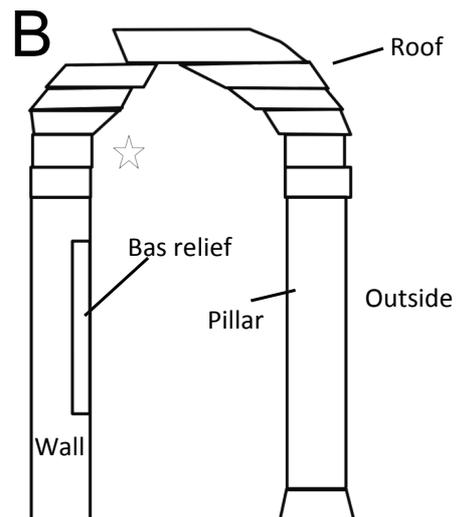
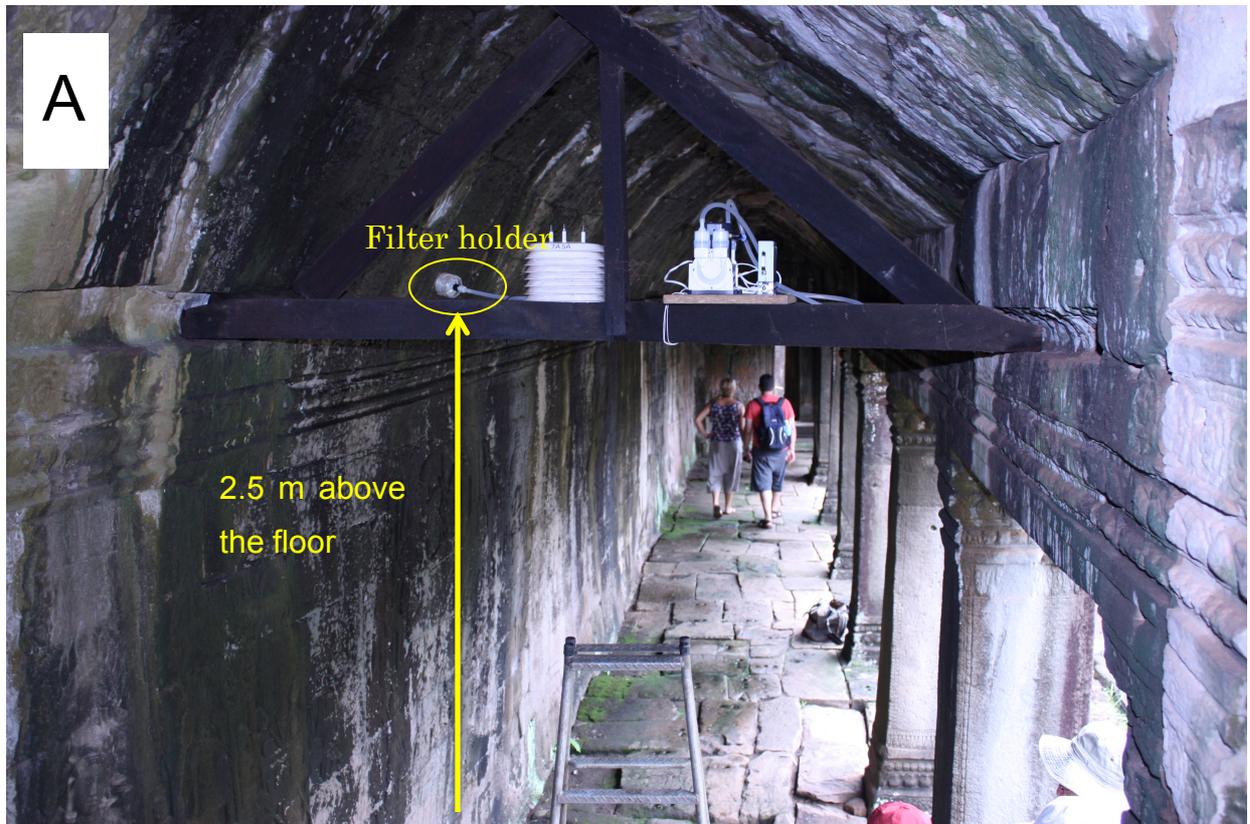


Fig. 3-4. Sampling site of the airborne bacterial samples at inner gallery in Bayon. A. Photo of the sampling site. The filter holder was attached 2.5 m above the floor facing to the wall. B. Side view of the inner gallery. An asterisk shows the area from which airborne bacterial samples were collected.

Table 3-1. Colors and sampling locations of biofilms used for phylogenetic analysis in this study

Sample	Color of biofilm*	Sampling location**	Roof [†]
P13	Salmon pink (P)	Southwest area of tower 28	+
P20		North-facing wall between towers 35 and 36	+
P21		Northeast area of tower 36	+
P39		Southeast area of tower 24	+
P53		North-facing wall in the northwest area of tower 36	+
G01	Chrome green (G)	West-facing wall between towers 30 and 31	+
G27		South-facing wall in the southeast area of tower 37	+
G31		North-facing wall in the northeast area of tower 23	+
V11	Signal violet (V)	West-facing wall between towers 28 and 29	-
V15		South-facing wall between towers 27 and 28	-
V35		East-facing wall between towers 23 and 24	-
V37		East-facing wall between towers 23 and 24	-
V53		North-facing wall between towers 35 and 36	-
B06	Black gray (B)	West-facing wall between towers 29 and 30	-
B23		West-facing wall in the southwest area of tower 25	+
B24		East-facing wall between towers 36 and 37	+
B36		East-facing wall between towers 23 and 24	-
B53		North-facing wall between towers 35 and 36	-
BG1	Blue green (BG)		+
BG4		East-facing wall in the southeast area of tower 26	+
BG5			+

Samples P53, V53, B53, BG1, BG4, and BG5 were collected in September 2008. The other samples were collected in September 2009.

* Letters in parentheses are abbreviations of colors.

**All biofilms were obtained from the inner gallery of the Bayon. Towers are numbered as described in Fig. 3-3.

3-2-2 DNA 抽出と PCR 増幅

試料からの DNA 抽出のために、FastDNA spin kit for soil (MP Biomedicals) を用いた。試料を採取した粘着シートは、粘着面だけを切り取り、粘着面が内側を向くようにチューブに入れ、その後の作業はキットのプロトコール通りに実施した。

DGGE 解析のための PCR には、下記のプライマーセット、PCR の反応溶液組成、サーマルサイクル条件を使用した。サーマルサイクラー (TP600, TaKaRa PCR thermal cycler dice, TaKaRa) で PCR 増幅を行ない、PCR 産物を得た。得られた PCR 産物が目的とする約 500 bp の塩基長の増幅産物かどうかは、1.5%アガロースゲル電気泳動により確認した。

<プライマーセット>

- GC8F [GC-clamp (cgccccgcgcgccccgcgcccgtcccgcgccccgccccg) を 5'末端に付与した 8F (5'-agagttgatcmtggctcag-3'; Yuki et al., 2000)]
- 520R (5'-accgcggtgctggc-3'; Lane, 1991)

<PCR 反応溶液組成>

5×Phusion HF Buffer (Finnzymes)	10.0 μL
10 mM dNTPs (200 μM each)	1.0 μL
primer GC8F (0.5 μM)	1.0 μL
primer 520R (0.5 μM)	1.0 μL
0.1% bovine serum albumin	5.0 μL
dimethyl sulfoxide	1.0 μL
Phusion DNA polymerase (Finnzymes)	0.5 μL
Template DNA	1.0 μL
Milli-Q water	29.5 μL
<hr/>	
Total	50.0 μL

<サーマルサイクル条件>

(98°C, 30 sec)→(98°C, 5 sec; 50.7°C, 15 sec; 72°C, 60 sec)×30 cycle→(72°C, 10 min)

3-2-3 DGGE 解析

DGGE は、D Code universal mutation detection system (Bio-Rad Laboratories) を使用し、Muyzer et al. (1993) の示した方法で実施した。前述の方法で準備した PCR の増幅産物 150 ng を、変性剤の濃度勾配が 30%~70% denaturant (100% 変性剤は 7 M 尿素と 40% ホルムアミドを含む)となるように作成した 10% (w/v) ポリアクリルアミドゲルにアプライした。スタンダードマーカーとして、DGGE marker I (Nippon Gene, Toyama, Japan) を使用した。このポリアクリルアミドゲルを 60°C, 75 V, 14 時間電気泳動後、SYBR Green I nucleic acid gel stain (Eugene) 染色液に浸して暗所で 30 分間ゆるやかに振とうした。染色されたゲルをプリントグラフ (DT-20MP, Atto)にて UV 照射下で撮影した。

ポリアクリルアミドゲル上のバンドの相対位置とピーク強度は、CS Analyzer 3 (Atto)を用いて測定した。得られたバンドパターンから、バンドごとにシーケンス解析を行い、近縁種を調べることで、バイオフィルムを構成する細菌種を調べた。このとき、全バンドのピーク強度の 5%以上のピーク強度を示すバンドのみを対象とした。5%以下のピーク強度のバンドは、ピークが確認できたものの、ほとんど PCR 増幅が行えず、シーケンス解析が行えなかった。

3-2-4 DGGE ゲル上のバンドのシーケンス解析

1) DNA 抽出 : DGGE ゲル上のバンドは、Gel Cutting Tip (Axygen)で切り出しを行い、オートクレーブ滅菌 (121°C, 15 分) 済みの TE buffer (10 mM Tris-HCl, 0.5 M EDTA; pH 8.0) 50 µL を入れた 1.5 mL マイクロチューブに入れ、凍結融解により TE buffer 中に DNA を遊離した。懸濁した。DGGE ゲルはバンドの切り出し前後に UV 照射下で撮影し、ターゲットとしたバンドが切りだされたかどうかを確認した。

2) PCR 増幅と精製 : この TE buffer を Template DNA として、3-2-2 に示した方法で PCR 増幅を行なった。ただし、フォワード・プライマーを GC8F から 8F に変更した。目的とする増幅産物であることを、3-2-2 に記載の方法で確認した。PCR 産物の精製のために illustra GFX PCR DNA and gel band purification kit (GE healthcare)を使用した。

3) シーケンス : 2-2-3 6)に記載の方法でシーケンスを行なった。ただし、プライマーは 8F, 520R を使用した。

4) 系統解析 : 試料由来の塩基配列は、National Center for Biotechnology Information (NCBI;

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) が提供する BLASTN 2.2.26 (Zhang et al., 2000) を用いて既知のデータベース上の塩基配列と比較した。試料由来の塩基配列とその近縁種の塩基配列は MEGA 5 (Tamura et al., 2011) を使用してアラインメントし, neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) により系統樹を作成した。キメラ配列の有無は, Greengenes (DeSantis et al., 2006, <http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-index.cgi>) の提供する BLASTN (Altschul et al., 1997)を用いて, キメラチェック済みのデータベースと比較することで確認した。

試料由来の 16S rRNA 遺伝子部分領域の塩基配列データは, DNA Data Bank of Japan (DDBJ, <http://www.ddbj.nig.ac.jp/>)に登録し, Table 3-2, Table 3-3 に示すアクセッションナンバーで公表されている。

3-3 結果および考察

3-3-1 バイオフィーム中の細菌叢と空気中の細菌叢の比較

バイオン内回廊壁面に付着したバイオフィーム表面の細菌叢と、そのバイオフィーム付近の空気中の細菌叢を DGGE 法により比較した。DGGE ゲル上のバンドパターンを Fig. 3-5 に示した。DGGE ゲル上のバンドは、変性剤の濃度勾配によって DNA の塩基配列の違いにより分離される。よって、理論上は 1 本のバンドが 1 種類の細菌種を意味し、同一種は、横方向に同じ位置にバンドが形成される。1 レーンあたりのバンド数が多いほど、試料中の細菌種の多様性が高いことを示す。

空気中の細菌を補集した試料 BA1~BA4 は、共通する 2 本のメインバンドを有し、試料 BA1, BA3, BA4 はこの 2 本のメインバンドのみから細菌叢が構成されていた (Fig. 3-5A)。このことから、空気中の細菌種は 8 日間を通して類似しており、2 種類の細菌種が優占していることが示唆された。一方、バイオフィームから採取された試料 BF1~4, BF6~8 は、空気中の細菌叢と比較して 1 試料あたりのバンド数が多く、試料に共通する複数のバンドと、試料に特有のバンドから構成されていた。このことから、バイオフィーム中の細菌叢は空気中の細菌叢と比較して多様性に富むことが示唆された。

DGGE ゲル上のバンド (Fig. 3-5A) は、Fig. 3-5B に示すバンド名をつけ、シーケンス解析を行なった。空気中の細菌叢からバンド A1, A2, A3, A4, A5, A8, A11 の 6 本、バイオフィームの細菌叢からバンド F3, F4, F5, F10, F12, F15, F17, F18 の 8 本、計 14 本のシーケンスデータが得られた。これらのバンド由来の塩基配列の近縁種と相同性を Table 3-2 に、系統樹を Fig. 3-6 に示した。

バイオフィームの細菌叢の複数の優占種のうち、解析できた細菌種は、*Rubellimicrobium* 属 (バンド F17) と、*Rubroacter* 属 (バンド F5, F12, F18) に属する細菌種に最も近縁だった (Table 3-2)。これらのバンド由来の塩基配列と近縁種の塩基配列との相同性は 92~94%と低いため、優占種は新規の細菌である可能性が示唆された。また、バンド F10 は、*Cyanobacteria* 門の *Planktothricoides raciborskii* NIES-207 に 91%の相同性で最も近縁だった。*Cyanobacteria* 門は、ラン藻類ともよばれ、緑色の色素を有し光合成をおこなう細菌のグループである。バンド F10 は、暗緑色のバイオフィーム試料 BF6 由来であることから、この細菌のもつ色素がバイオフィームの暗緑色の色の一部を構成している可能性がある。

バイオフィルム由来のバンドはすべて *Actinobacteria* 門, *Proteobacteria* 門, および *Cyanobacteria* 門の細菌グループに含まれていた (Fig. 3-6)。既知の細菌との相同性は、一部のバンドを除き総じて 91~94%と低いことから (Table 3-2), バイオフィルムを構成する細菌種の大部分は、これまでに分離されていない新規の細菌である可能性が示された。同様の低い相同性は、マヤ遺跡 (McNamara et al., 2006) の他、オーストリア, ドイツ (Schabereiter-Gurtner et al., 2001), スコットランド (Suihko et al., 2007) などの歴史的石造建築物の石材表面に付着したバイオフィルムを構成する細菌叢の DGGE 解析でも示されている。石材表面という特殊な環境に生育する細菌は、これまでの培養法では分離されてこなかった細菌と考えられる。

一方、空気中の細菌叢の優占種は、*Pseudomonas panacis* CG20106 に 100%近縁な細菌 (バンド A1, A3, A11) と, *Phyllobacterium myrsinacearum* STM 948 に 100%近縁な細菌 (バンド A2, A5) だった (Table 3-2)。空気中由来の細菌は、すべて *Actinobacteria* 門, および *Proteobacteria* 門の細菌グループに含まれていた。空気中とバイオフィルム中では細菌種異なっていたことから、空気中の細菌叢がバイオフィルムを構成する細菌の由来である可能性は低いと考えられた。

バイオフィルム試料に含まれるバンド数は、空気中微生物試料に含まれるバンド数よりも有意に多い ($P < 0.05$) ことから、バイオフィルム中の細菌叢は空気中の細菌叢よりも高い多様性を示した。

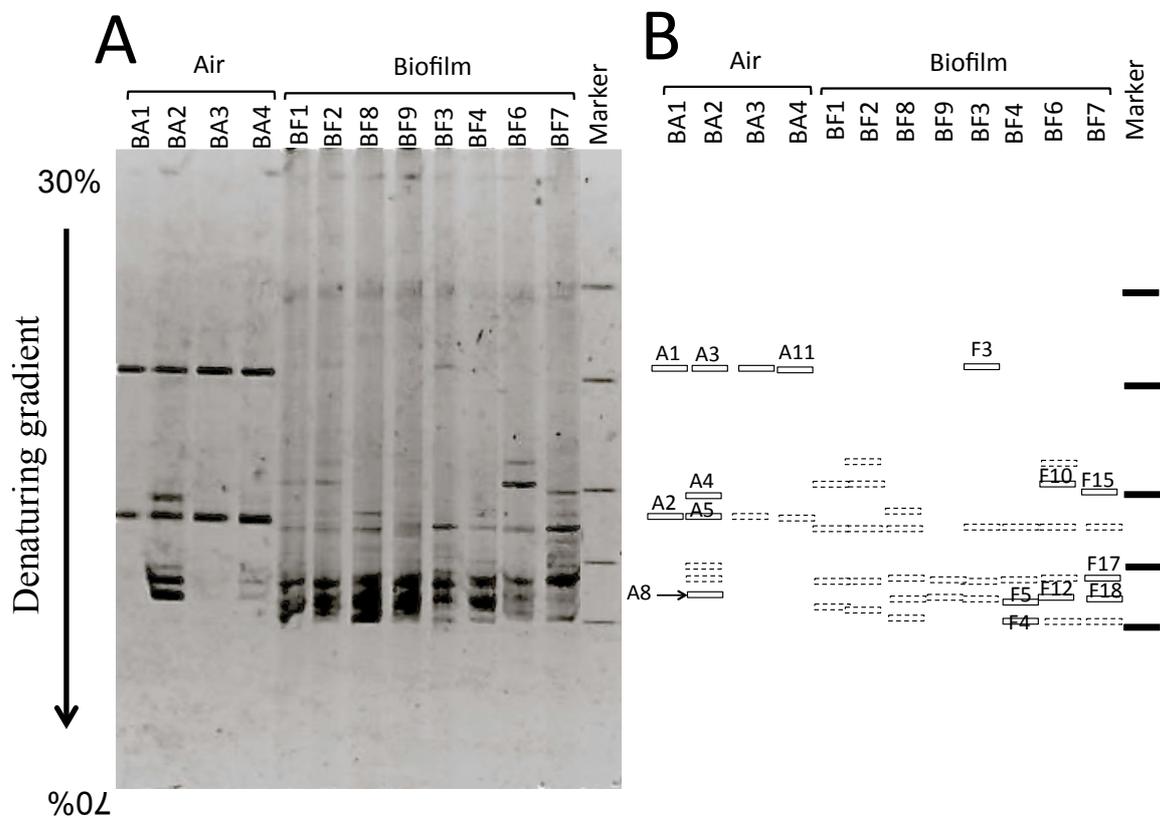


Fig. 3-5. Comparison based on partial 16S rRNA gene sequencing of bacterial communities in air collected in the inner gallery and in biofilms formed on the sandstone wall close to the air-sampling location.

A. Bacterial community fingerprints of air (BA) and biofilm (BF) samples by DGGE analysis. The partial 16S rRNA gene was amplified with primers GC8F and 520R.

B. Schematic diagram of the DGGE band patterns in A. Labeled bands correspond to 16S rRNA gene sequence types described in Table 3-2. *Broken lines* are DGGE bands that were not sequenced.

Table 3-2. Phylogenetic affiliations of 16S rRNA sequences retrieved in the PCR-DGGE analysis of air and biofilm samples. Phylogenetic tree of these sequences was drawn in Fig. 3-6.

Band name sequenced	Accession number	Closest BLAST match (accession number)	Identity (%)
<i>Air</i>			
A1	AB758608	<i>Pseudomonas panacis</i> strain CG20106 (NR_043195)	488/488 (100%)
A2	AB758609	<i>Phyllobacterium myrsinacearum</i> STM 948 (NR_043189)	437/437 (100%)
A3	AB758610	<i>Pseudomonas panacis</i> strain CG20106 (NR_043195)	506/506 (100%)
A4	AB758611	<i>Bosea vestrisii</i> 34635 (NR_028799)	390/392 (99%)
A5	AB758612	<i>Phyllobacterium myrsinacearum</i> STM 948 (NR_043189)	431/431 (100%)
A8	AB758613	<i>Rhodococcus erythropolis</i> N11 (NR_037024)	469/470 (99%)
A11	AB758614	<i>Pseudomonas panacis</i> strain CG20106 (NR_043195)	480/480 (100%)
<i>Biofilm</i>			
F3	AB758615	<i>Pseudomonas moorei</i> RW10 (NR_042542)	339/339 (100%)
F4	AB758616	<i>Rubrobacter radiotolerans</i> P1 (NR_029191)	384/410 (94%)
F5	AB758617	<i>Rubrobacter radiotolerans</i> P1 (NR_029191)	353/374 (94%)
F10	AB758618	<i>Planktothricoides raciborskii</i> NIES-207 (NR_040858)	354/390 (91%)
F12	AB758619	<i>Rubrobacter radiotolerans</i> P1 (NR_029191)	425/451 (94%)
F15	AB758620	<i>Caulobacter</i> sp. FWC21 (NR_041963)	247/254 (97%)
F17	AB758621	<i>Rubellimicrobium</i> sp. MSL 20 (NR_044275)	164/177 (93%)
F18	AB758622	<i>Rubrobacter radiotolerans</i> P1 (NR_029191)	275/299 (92%)

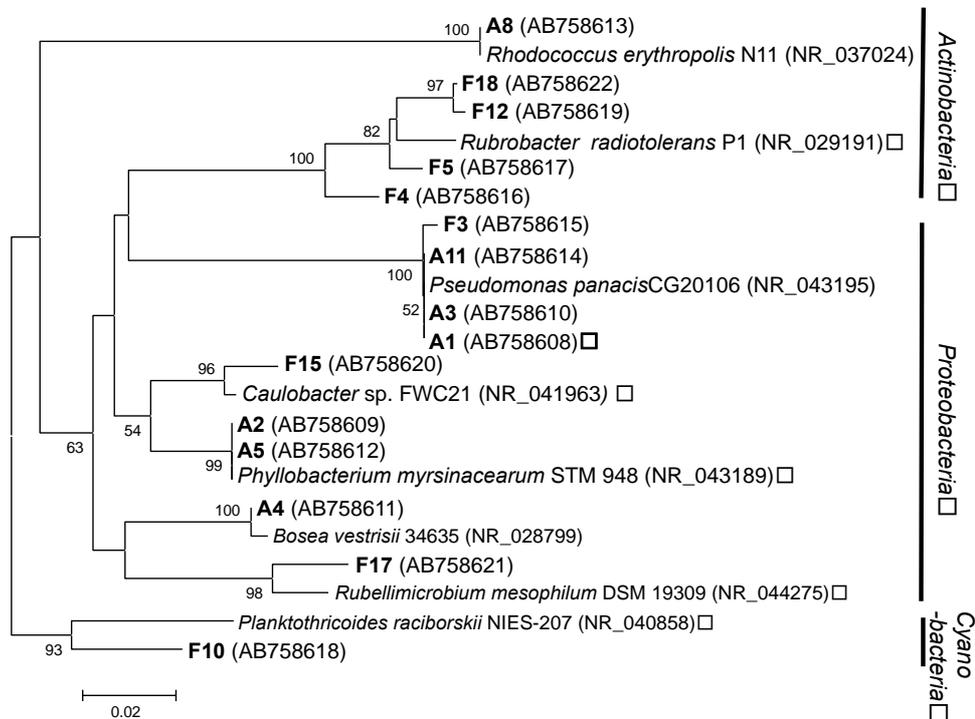


Fig. 3-6. Phylogenetic tree based on partial 16S rRNA gene sequences derived from air and biofilm samples by DGGE analysis. Sequences recovered in this study and corresponding to the band names in Fig. 3-5.B are shown in bold type; “A” indicates bands derived from the air sample and “F” indicates bands derived from the biofilm sample. Numbers in parentheses are GenBank accession numbers. Neighbor-joining tree; bootstrap values based on 1000 replicates are indicated for branches supported by 50% of trees. *Scale bar* represents 0.02 nucleotide changes per position.

3-3-2 バイオフィルムの色調ごとの細菌叢の比較

バイオン内回廊の砂岩壁面に付着するバイオフィルムのうち、P色、G色、V色、B色、BG色の計5色のバイオフィルムについて、色調ごとに細菌叢を解析した。試料として、各色調のバイオフィルムからそれぞれ3~5枚の試料を採取し、計21試料を得た (Table 3-1)。5色のバイオフィルムの色調は、Fig. 3-7に示した。

それぞれのバイオフィルムの特徴を以下に示す。まず、P色、G色、BG色のバイオフィルムは、屋根で覆われている砂岩壁面で観察されることが多かった。P色のバイオフィルムは、層が1 mm以下と薄く、表面が乾燥していた。G色のバイオフィルムは層が1 mm以下と薄く、石材に強固に接着しており、粘着シートで剥離しにくい性質があった。BG色のバイオフィルムは、層が約1 mm以上と厚く、バイオフィルムの表面は湿り気があった。粘着シートで容易に剥離され、バイオフィルムの下の石材はもろく剥落しやすい状況であった。一方、V色のバイオフィルム層は、屋根が崩落して日射や降雨が直接降り注ぐ壁面で観察されることが多かった。B色は、屋根で覆われている壁面と、崩落している壁面との両方の壁面で観察された。V色とB色のバイオフィルムはどちらも比較的強固に壁面に付着していたが、V色のバイオフィルムの方が比較的粘着シートで剥離しやすく、B色は剥離しにくい状況であった。

これらの色調の異なるバイオフィルムの細菌叢を、16S rRNA 遺伝子部分領域の塩基配列に基づく DGGE 解析により比較した。DGGE 解析の結果、P色、G色、V色、B色、BG色のバイオフィルムから、それぞれ36、17、24、33、20本のバンドが得られ、そのうち24、6、7、11、18本の計66本のバンドはPCR増幅、およびシーケンス解析を行うことができ、塩基配列データが得られた。この66本のバンドについて、バンド名を「(試料名) - (通し番号)」とつけ、それぞれのバンドの塩基配列の近縁種検索の結果をTable 3-3に示した。バンドの塩基配列とデータベース上の既知の細菌との相同性は、81~95%と低かった。このことから、3-3-1の結果と同様に、新規の細菌種によってバイオフィルムが構成されていることが示唆された。

Table 3-3に示したバンドとその近縁種について、細菌の門レベルのグループごとに系統樹を作成し、細菌叢を比較した。*Cyanobacteria* 門に属する細菌に最も近縁だったグループの系統樹を、Fig. 3-8Aに示した。このグループには、B色、V色、G色、BG色のバイオフィルム

試料由来のバンドが含まれていた。一方、P色のバイオフィルムからは *Cyanobacteria* 門に属する細菌に近縁なバンドは発見されなかった。

Actinobacteria 門に属する細菌に最も近縁だったグループの系統樹を、Fig. 3-8B に示した。このグループには、P色、G色、BG色のバイオフィルム試料由来のバンドが含まれた。特に、*Rubrobacter* 属に属する細菌に近縁なバンド 18本のうち、11本はP色のバイオフィルム試料由来のバンドだった。*Rubrobacter* 属は、*Rubrobacter radiotolerans*, *Rubrobacter xylanophilus*, *Rubrobacter taiwanensis* の3種のみから構成される属である。*R. radiotolerans* は、強い γ 線耐性能を持つことが知られている。また、3-1で述べたように、欧州の異なる地域の石材劣化箇所において、*Rubrobacter* 属に近縁な細菌種がフレスコ画の赤色バイオフィルムや、エフロ（白華）の発生している石灰岩と砂岩の劣化に関係している複数の事例が報告されている (Imperi et al., 2007; Laiz et al., 2009; Schabereiter-Gurtner et al., 2001)。欧州の事例で報告された *Rubrobacter* 属に近縁な細菌種と、本研究で得られたバンドの系統学的位置を比較すると、異なるクラスターを形成していた。以上の結果から、欧州の事例と同様に、*Rubrobacter* 属に近縁な細菌種が、バイオン砂岩壁面の赤色バイオフィルムの形成に関係していることが示唆された。しかし、その系統学的位置は、ヨーロッパの事例とはわずかに異なっていた。

Chloroflexi 門、*Proteobacteria* 門、*Acidobacteria* 門、*Deinococcus-Thermus* 門に最も近縁なグループの系統樹を、Fig. 3-8C に示した。このグループには、P色、B色、BG色のバイオフィルム試料由来のバンドが含まれた。*Chloroflexi* 門、および *Deinococcus-Thermus* 門に属する細菌は、放射線耐性と高温耐性が知られている。これらの性質は、日射が降り注ぐ砂岩壁面での生育に有利である可能性がある。

バイオフィルムの色調ごとの細菌叢の特徴を明らかにするために、DGGE解析で得られたバンドの相同性検索の結果とそのバンドの本数の割合を Fig. 3-9 に示した。バンドが確認されたものの、近縁種が特定されなかったバンドは N.D. と示した。P色のバイオフィルムでは、*Rubrobacter* 属に近縁な細菌の占める割合が 46% を占めていた。B色、V色、G色、BG色のバイオフィルムでは、*Cyanobacteria* 門に最も近縁な細菌が優占していた。G色とB色のバイオフィルムでは、解析できたバンドは全体のバンドの半数以下であったものの、解析できた

バンドの中では *Cyanobacteria* 門に属する細菌の占める割合が多かった。V 色のバイオフィルムでは、解析できたバンドはすべて *Cyanobacteria* 門に属する細菌であった。BG 色のバイオフィルムでは、*Cyanobacteria* 門が最も割合が高く、*Chloroflexi* 門、*Deinococcus-Thermus* 門、*Rubrobacter* 属に属する細菌も一定の割合を占めていた。以上の結果から、色調の異なるバイオフィルムにおいて、色ごとに細菌叢が異なることが示唆された。

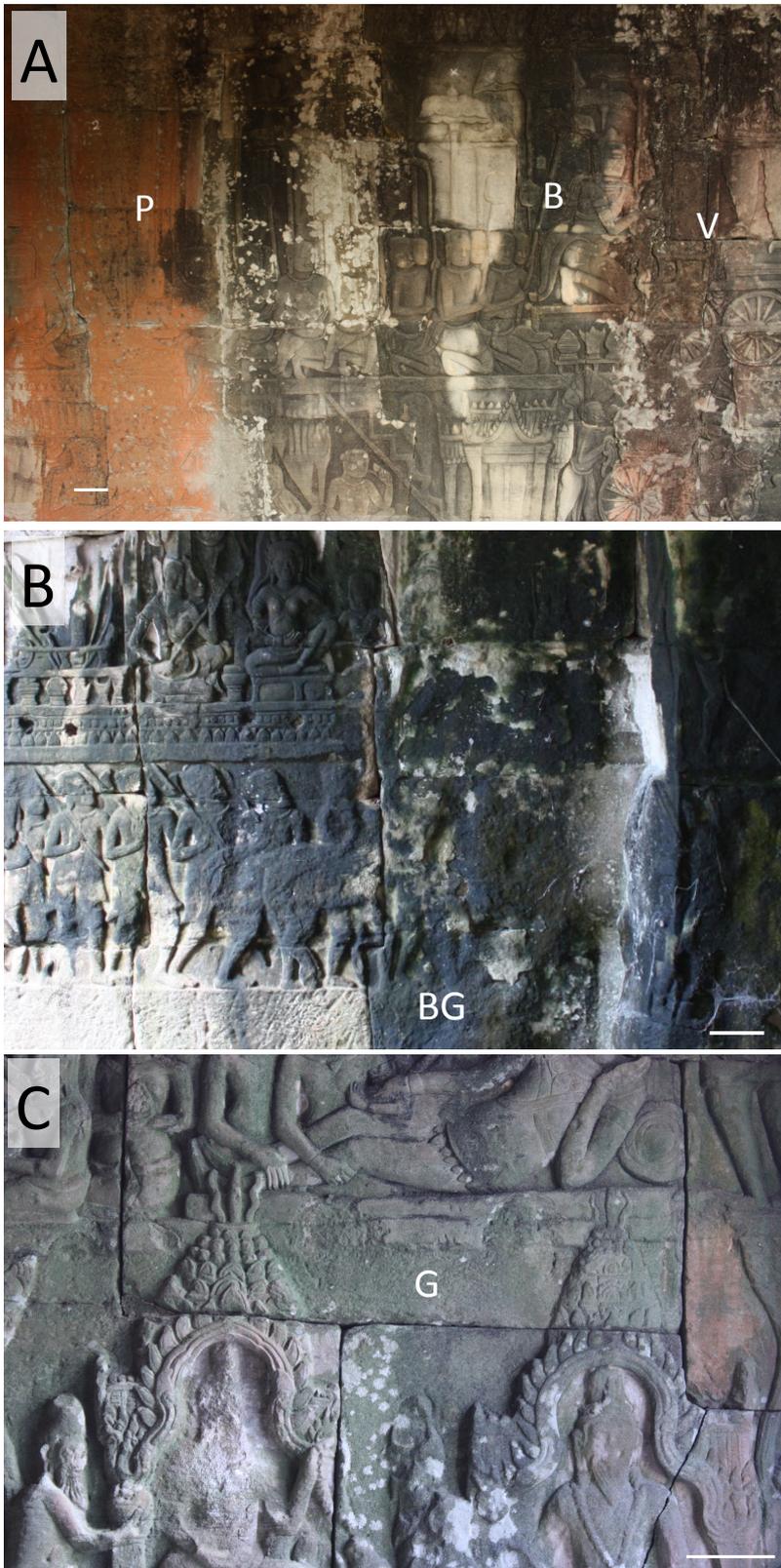


Fig. 3-7. Various pigmented biofilms formed on the sandstone walls of the inner gallery of Bayon. Bar indicates 10 cm.

A. Salmon pink (P), black-gray (B), and signal violet (V) biofilms on the north-facing wall on the north side. Samples P53, B53, and V53 were obtained from the positions indicated “P”, “B”, and “V”, respectively.

B. Blue-green (BG) biofilm on the east-facing wall on the south side. Samples BG1, BG4, and BG5 were obtained from the position indicated “BG”, measuring 30 cm in circumference. Sample BG4 was used for analysis of bacterial stratified structure.

C. Chrome green (G) biofilm on the south-facing wall of the east side. Sample G27 was obtained from the position indicated by “G”.

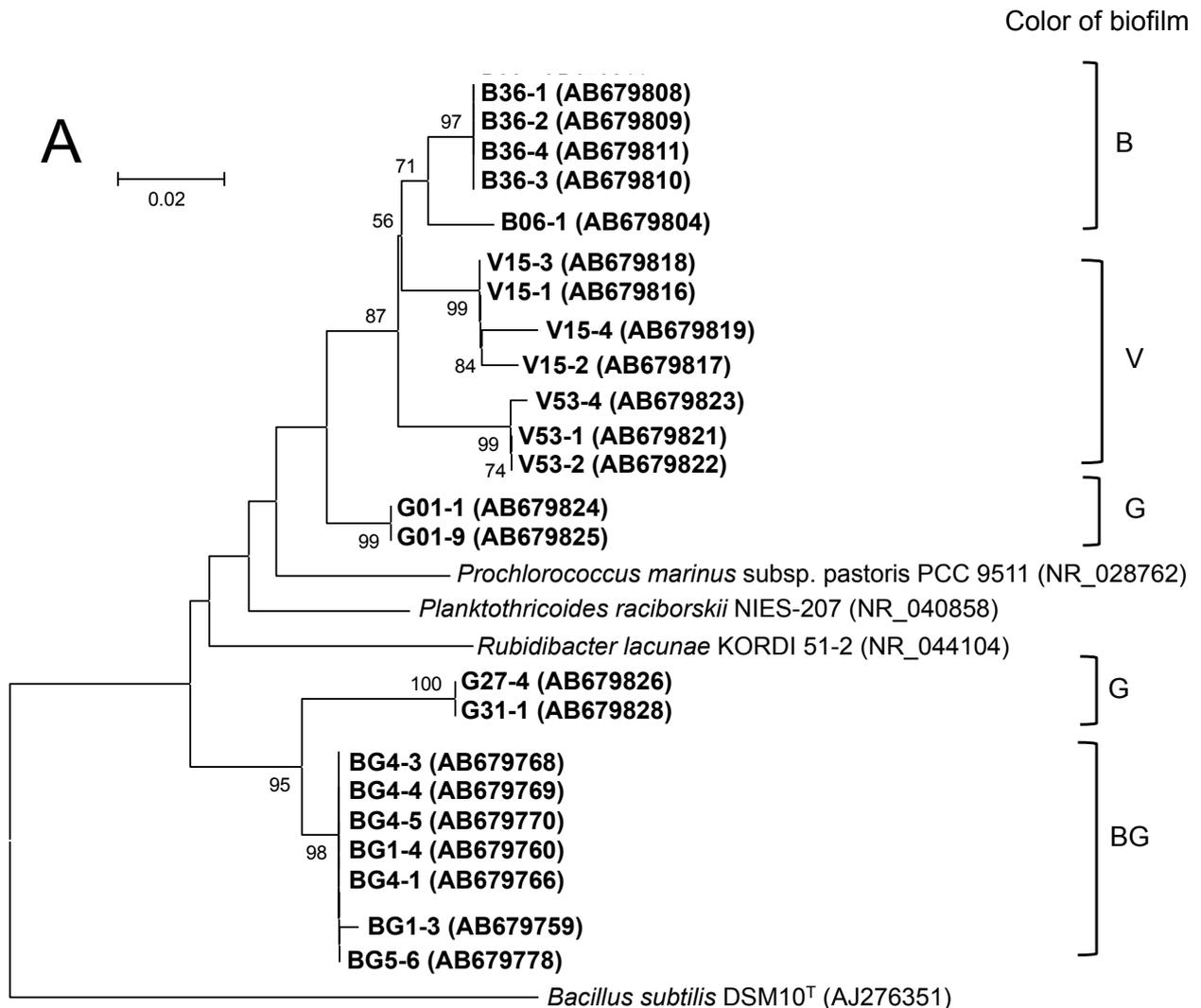


Fig. 3-8. Phylogenetic relationships based on partial 16S rRNA gene sequences recovered from salmon pink (P), chrome green (G), signal violet (V), black–gray (B), and blue–green (BG) biofilms derived from sandstone walls at Bayon by DGGE analysis. Sequences recovered in this study are shown in bold type. Numbers in parentheses are GenBank accession numbers Neighbor-joining tree: bootstrap values based on 1,000 replicates are indicated for branches supported by 50% of trees. Scale bar represents 0.02 nucleotide changes per position.

A. Phylogenetic affiliation of Cyanobacteria clade members. *Bacillus subtilis* DSM10^T was used as an outgroup.

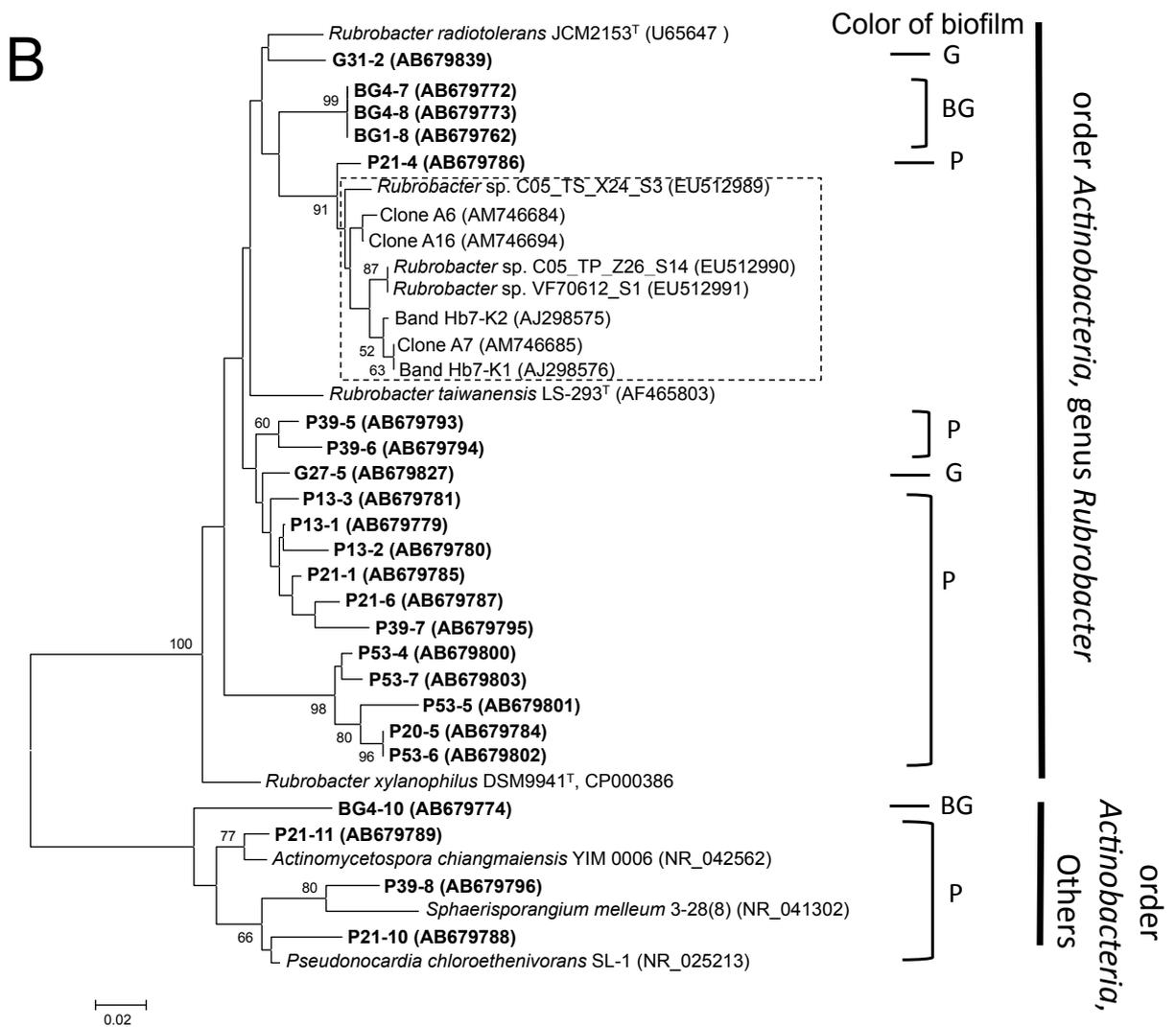


Fig. 3-8.

B. Phylogenetic affiliation of Actinobacteria clade members. *Escherichia coli* ATCC 11775^T was used as an outgroup. Dashed box indicates 16S rRNA sequences derived from rosy discoloration of European historical stone monuments (Imperi et al., 2007; Laiz et al., 2009; Schabereiter-Gurtner et al., 2001).

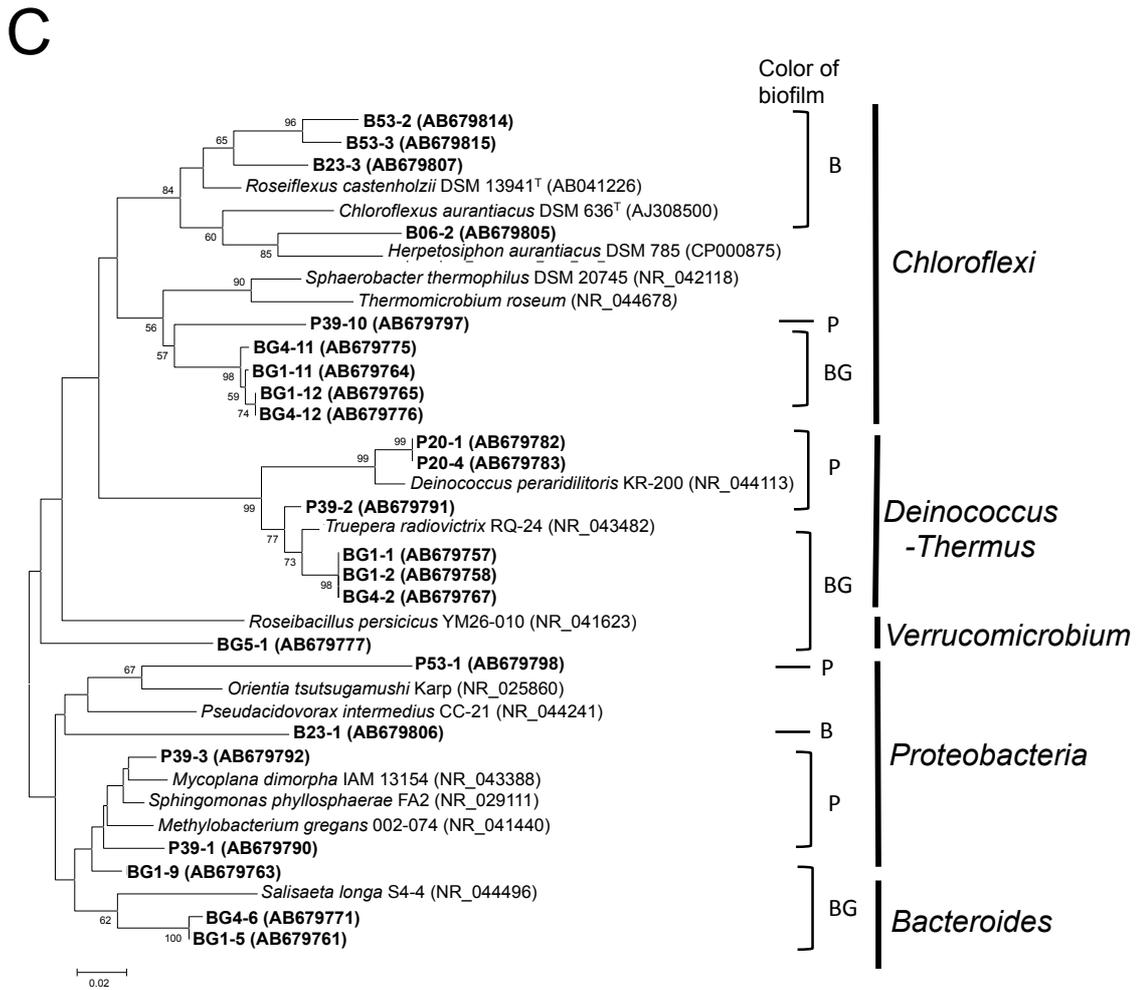


Fig. 3-8.

C. Phylogenetic affiliation of *Chloroflexi*, *Proteobacteria*, and *Deinococcus-Thermus* clade members.

Table 3-3. Phylogenetic affiliation of sequences derived from DGGE analysis of biofilm samples in the Bayon.

Band name sequenced	Accession number	Closest blast match (Accession number)	Identity (%)
<i>Salmon pink biofilm</i>			
P13-1	AB679779	<i>Rubrobacter radiotolerans</i> strain P 1 (NR_029191)	383/409 (94%)
P13-2	AB679780	<i>Rubrobacter radiotolerans</i> strain P 1 (NR_029191)	383/410 (93%)
P13-3	AB679781	<i>Rubrobacter radiotolerans</i> strain P 1 (NR_029191)	390/415 (94%)
P20-1	AB679782	<i>Deinococcus peraridilitoris</i> KR-200 (NR_044113)	331/371 (89%)
P20-4	AB679783	<i>Deinococcus peraridilitoris</i> KR-200 (NR_044113)	363/407 (89%)
P20-5	AB679784	<i>Rubrobacter radiotolerans</i> P 1 (NR_029191)	312/343 (91%)
P21-1	AB679785	<i>Rubrobacter radiotolerans</i> P 1 (NR_029191)	390/420 (93%)
P21-4	AB679786	<i>Rubrobacter radiotolerans</i> P 1 (NR_029191)	371/400 (93%)
P21-6	AB679787	<i>Rubrobacter radiotolerans</i> P 1 (NR_029191)	372/407 (91%)
P21-10	AB679788	<i>Pseudonocardia chloroethenivorans</i> SL-1 (NR_025213)	221/234 (94%)
P21-11	AB679789	<i>Actinomycetospora chiangmaiensis</i> YIM 0006 (NR_042562)	371/405 (92%)
P39-1	AB679790	<i>Sphingomonas phyllosphaerae</i> FA2 (NR_029111)	313/331 (95%)
P39-2	AB679791	<i>Truepera radiovictrix</i> RQ-24 (NR_043482)	313/347 (90%)
P39-3	AB679792	<i>Sphingomonas abaci</i> C42 (NR_042192)	338/359 (94%)
P39-5	AB679793	<i>Rubrobacter radiotolerans</i> P 1 (NR_029191)	397/417 (95%)
P39-6	AB679794	<i>Rubrobacter radiotolerans</i> P 1 (NR_029191)	259/273 (95%)
P39-7	AB679795	<i>Rubrobacter taiwanensis</i> LS-293 (NR_025220)	384/418 (92%)
P39-8	AB679796	<i>Sphaerisporangium melleum</i> 3-28(8) (NR_041302)	186/203 (92%)

Band name sequenced	Accession number	Closest blast match (Accession number)	Identity (%)
(continuation)			
P39-10	AB679797	<i>Thermomicrobium roseum</i> (NR_044678)	321/395 (81%)
P53-1	AB679798	<i>Orientia tsutsugamushi</i> Karp (NR_025860)	173/203 (85%)
P53-4	AB679800	<i>Rubrobacter radiotolerans</i> P 1 (NR_029191)	346/375 (92%)
P53-5	AB679801	<i>Rubrobacter radiotolerans</i> P 1 (NR_029191)	312/346 (90%)
P53-6	AB679802	<i>Rubrobacter radiotolerans</i> P 1 (NR_029191)	353/384 (92%)
P53-7	AB679803	<i>Rubrobacter taiwanensis</i> LS-293 (NR_025220)	279/306 (91%)
<i>Crome green biofilm</i>			
G01-1	AB679824	<i>Planktothricoides raciborskii</i> NIES-207 (NR_040858)	310/335 (93%)
G01-9	AB679825	<i>Planktothricoides raciborskii</i> NIES-207 (NR_040858)	332/363 (91%)
G27-4	AB679826	<i>Rubidibacter lacunae</i> KORDI 51-2 (NR_044104)	319/364 (88%)
G27-5	AB679827	<i>Rubrobacter radiotolerans</i> P 1 (NR_029191)	496/526 (94%)
G31-1	AB679828	<i>Rubidibacter lacunae</i> KORDI 51-2 (NR_044104)	319/364 (88%)
G31-2	AB679829	<i>Rubrobacter radiotolerans</i> P 1 (NR_029191)	216/229 (94%)
<i>Signal violet biofilm</i>			
V15-1	AB679816	<i>Planktothricoides raciborskii</i> NIES-207 (NR_040858)	282/323 (87%)
V15-2	AB679817	<i>Planktothricoides raciborskii</i> NIES-207 (NR_040858)	287/333 (86%)
V15-3	AB679818	<i>Planktothricoides raciborskii</i> NIES-207 (NR_040858)	306/346 (88%)
V15-4	AB679819	<i>Planktothricoides raciborskii</i> NIES-207 (NR_040858)	306/349 (88%)
V53-1	AB679821	<i>Planktothricoides raciborskii</i> NIES-207 (NR_040858)	294/331 (89%)

Band name sequenced	Accession number	Closest blast match (Accession number)	Identity (%)
(continuation)			
V53-2	AB679822	<i>Planktothricoides raciborskii</i> NIES-207 (NR_040858)	212/235 (90%)
V53-4	AB679822	<i>Planktothricoides raciborskii</i> NIES-207 (NR_040858)	277/310 (89%)
<i>Black grey biofilm</i>			
B06-1	AB679804	<i>Planktothricoides raciborskii</i> NIES-207 (NR_040858)	311/348 (89%)
B06-2	AB679805	<i>Herpetosiphon geysericola</i> GC-42 (NR_028694)	290/339 (86%)
B23-1	AB679806	<i>Methylobacterium gregans</i> 002-074 (NR_041440)	295/360 (82%)
B23-3	AB679807	<i>Pseudacidovorax intermedius</i> CC-21 (NR_044241)	255/307 (83%)
B36-1	AB679808	<i>Prochlorococcus marinus</i> subsp. <i>pastoris</i> PCC 9511 (NR_028762)	336/382 (88%)
B36-2	AB679809	<i>Prochlorococcus marinus</i> subsp. <i>pastoris</i> PCC 9511 (NR_028762)	354/402 (88%)
B36-3	AB679810	<i>Prochlorococcus marinus</i> subsp. <i>pastoris</i> PCC 9511 (NR_028762)	327/371 (88%)
B36-4	AB679811	<i>Prochlorococcus marinus</i> subsp. <i>pastoris</i> PCC 9511 (NR_028762)	336/382 (88%)
B53-1	AB679813	<i>Rubrobacter radiotolerans</i> P 1 (NR_029191)	416/438 (95%)
B53-2	AB679814	<i>Chloroflexus aurantiacus</i> J-10-fl (NR_043411)	159/182 (87%)
B53-3	AB679815	<i>Verrucomicrobium spinosum</i> DSM 4136 (NR_026266)	178/204 (87%)
<i>Blue green biofilm</i>			
BG1-1	AB679757	<i>Truepera radiovictrix</i> RQ-24 (NR_043482)	223/235 (95%)
BG1-2	AB679758	<i>Truepera radiovictrix</i> RQ-24 (NR_043482)	356/392 (91%)
BG1-3	AB679759	<i>Rubidibacter lacunae</i> KORDI 51-2 (NR_044104)	249/286 (87%)
BG1-4	AB679760	<i>Rubidibacter lacunae</i> KORDI 51-2 (NR_044104)	256/288 (89%)

Band name sequenced	Accession number	Closest blast match (Accession number)	Identity (%)
(continuation)			
BG1-5	AB679761	<i>Salisaeta longa</i> S4-4 (NR_044496)	302/353 (86%)
BG1-8	AB679762	<i>Rubrobacter taiwanensis</i> LS-293 (NR_025220)	380/413 (92%)
BG1-9	AB679763	<i>Mycoplana dimorpha</i> IAM 13154 (NR_043388)	331/363 (91%)
BG1-11	AB679764	<i>Sphaerobacter thermophilus</i> DSM 20745 (NR_042118)	197/217 (91%)
BG1-12	AB679765	<i>Sphaerobacter thermophilus</i> DSM 20745 (NR_042118)	354/432 (82%)
BG4-1	AB679766	<i>Rubidibacter lacunae</i> KORDI 51-2 (NR_044104)	305/345 (88%)
BG4-2	AB679767	<i>Truepera radiovictrix</i> RQ-24 (NR_043482)	250/275 (91%)
BG4-3	AB679768	<i>Rubidibacter lacunae</i> KORDI 51-2 (NR_044104)	290/327 (89%)
BG4-4	AB679769	<i>Rubidibacter lacunae</i> KORDI 51-2 (NR_044104)	308/349 (88%)
BG4-5	AB679770	<i>Rubidibacter lacunae</i> KORDI 51-2 (NR_044104)	305/345 (88%)
BG4-6	AB679771	<i>Salisaeta longa</i> strain S4-4 (NR_044496)	298/352 (85%)
BG4-7	AB679772	<i>Rubrobacter taiwanensis</i> LS-293 (NR_025220)	291/316 (92%)
BG4-8	AB679773	<i>Rubrobacter taiwanensis</i> LS-293 (NR_025220)	337/367 (92%)
BG4-10	AB679774	<i>Streptomyces stramineus</i> NBRC 16131 (NR_041198)	224/236 (95%)
BG4-11	AB679775	<i>Sphaerobacter thermophilus</i> DSM 20745 (NR_042118)	249/274 (91%)
BG4-12	AB679776	<i>Sphaerobacter thermophilus</i> DSM 20745 (NR_042118)	202/222 (91%)
BG5-1	AB679777	<i>Roseibacillus persicicus</i> YM26-010 (NR_041623)	259/310 (84%)
BG5-6	AB679778	<i>Rubidibacter lacunae</i> KORDI 51-2 (NR_044104)	290/327 (89%)

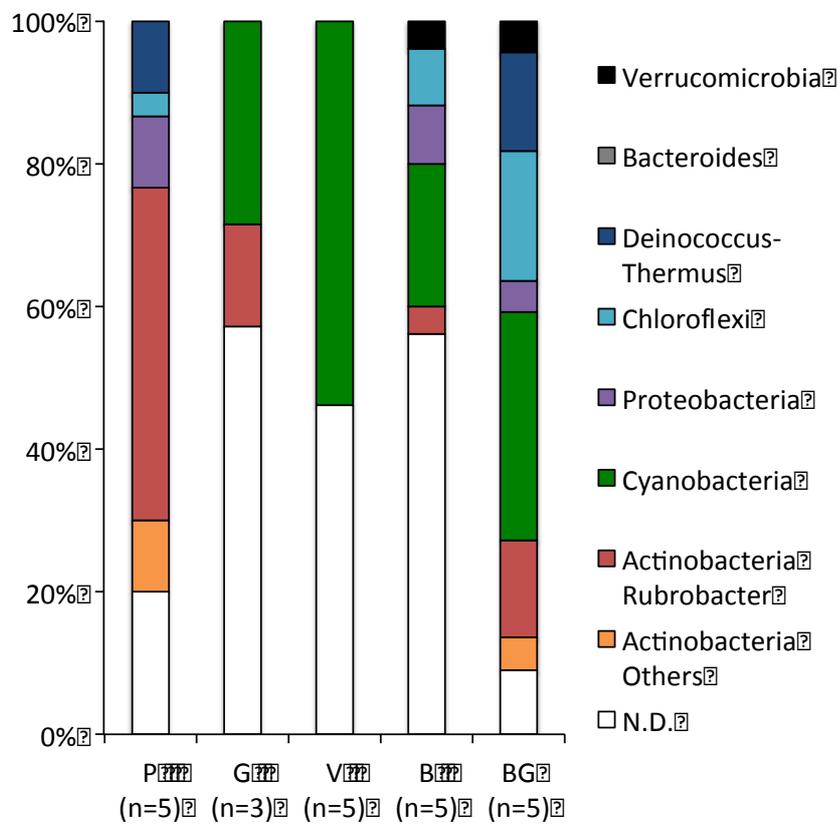


Fig. 3-9. Comparison of bacterial compositions of pigmented biofilms formed on sandstone walls in the Bayon. Sequences obtained from each biofilm sample were classified on the basis of the results of a BLAST search of greengenes. Detailed affiliations are given in Table 3-3. P, salmon pink; B, black gray; V, signal violet; G, chrome green; BG, blue green; N.D. Not determined.

3-3-3 バイオフィルムの層ごとの細菌叢解析

BG 色のバイオフィルムは、他のバイオフィルムに比べてバイオフィルム層が厚かったため、バイオフィルムの層状の細菌叢分布について解析を行った。試料は、BG4 試料を採取した同一箇所で、シートを貼ってバイオフィルムを剥がしとることを繰り返し、23 枚の試料を得た。シートの 1 枚目がバイオフィルム表面の、23 枚目がバイオフィルムの最も石材に近い部分の細菌叢を反映している。この試料を用いて DGGE 解析を行った結果を、Fig. 3 -10 に示した。バンドパターンを見ると、シートの 1 枚目、5 枚目はバンドパターンが類似していた。一方、10、15、23 枚目では、1、5 枚目に比べてバンド数が減少していた。このことから、バイオフィルムの細菌層は、表層の方が多様性が高く、石材に近い部分では多様性が低いことが示唆された。

バイオフィルムの表層には、Cyanobacteria 門に近縁なバンドが複数存在し、これらのバンドはシートの 10 枚目以降ではバンドが消失した。表層から奥にかけて常に存在しているバンドは、*Deinococcus-Thermus* 門（バンド BG4-2）と *Rubrobacter* 属（バンド BG4-8）に属する細菌に最も近縁であった。シートの 10 枚目以降に現れたバンド BG4-12 は、*Chloroflexi* 門に属する細菌に最も近縁であった。

以上のことから、BG 色のバイオフィルムにおいて、バイオフィルムの表層には *Cyanobacteria* 門、石材近い部分には *Chloroflexi* 門、表層から石材付近にかけては *DeinococcusThermus* 門と *Rubrobacter* 属に最も近縁な細菌が分布していることが示唆された。

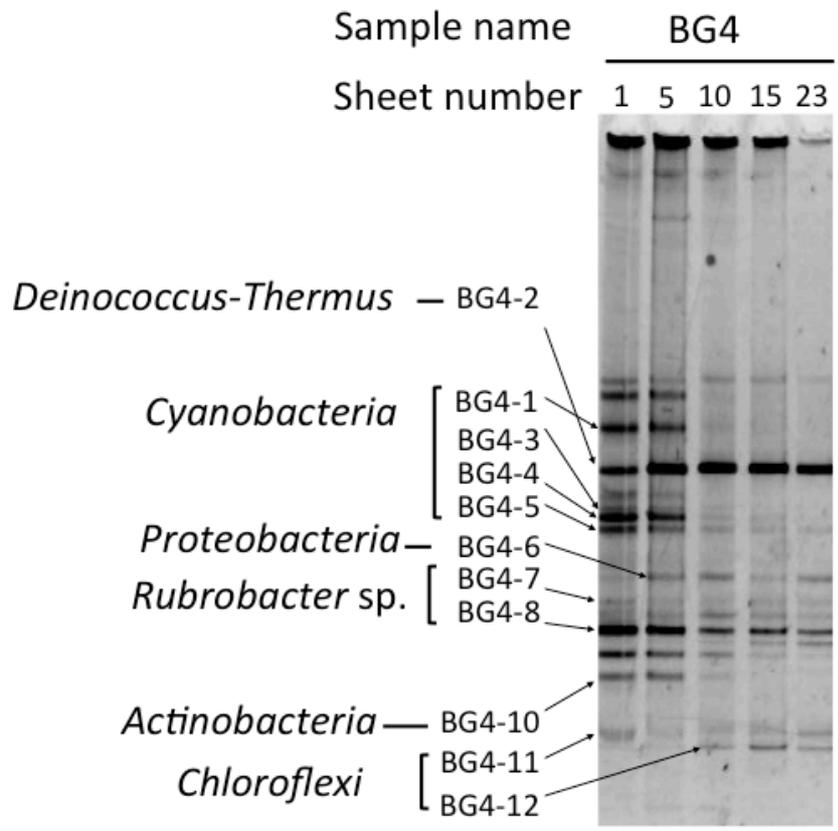


Fig. 3-10. Changes in DGGE patterns of the blue green (BG) biofilm. The sampling location, BG4, was on the south wall of a small room next to tower 26 on the south side of the inner gallery.

To examine in more detail the structure of the biofilm, samples were collected from the surface to the deepest part by using 23 adhesive sheets. Phylogenetic affiliations at the phylum level are shown next to the band names. Detailed affiliations of these bands are given in Table 3-3.

3-4 結論

本章では、DGGE ゲル解析手法を用いてバイオフィルムの細菌叢の解析を行なった。細菌叢の解析手法としては、クローン解析、全ゲノム解析、定量 PCR 解析など様々な解析手法があり、それぞれの長所と短所を理解した上で選択する必要がある。今回の DGGE 解析では、PCR 増幅やシーケンス解析が困難だった一部のバンドでは、シーケンスデータが得ることができず、すべての細菌種の解析には至らなかった。この原因として、バイオフィルムに含まれる夾雑物の影響により PCR の増幅が阻害されたこと、DGGE ゲル状のバンドの分離が不十分だったことなどが考えられる。しかし、DGGE 法は他の手法に比べて低コスト、短時間で細菌叢の解析を行うことができる点で優れた手法である。特に、バイオフィルムの層ごとの解析では、細菌叢の遷移をバンドパターンで捉えることができた。今回の解析ではそれぞれの細菌叢の特徴を大まかに把握することができ、一定の目的が果たされた。ただし、すべての細菌叢を解析するためには、他の手法の検討が必要である。

バイヨンのバイオフィルムの細菌叢は、空気中の細菌叢とは異なり、既知の細菌とは相同性が低い新規の細菌が多く含まれることが示唆された。バイオフィルムの色調は、壁面の状況により特徴があった。P 色、G 色、BG 色のバイオフィルムは、屋根で覆われた部分の砂岩壁面で観察されることが多かった。V 色のバイオフィルムは、屋根が崩落して日射や降雨が直接降り注ぐ壁面で観察されることが多く、B 色のバイオフィルムは、屋根で覆われた部分と、崩落した部分の両方で観察された。

バイオフィルムが厚く、その下の石材の劣化が著しい BG 色のバイオフィルムにおいて、細菌叢を層ごとに解析した。その結果、バイオフィルムの表層には *Cyanobacteria* 門、石材近い部分には *Chloroflexi* 門、表層から石材付近にかけては *Deinococcus-Thermus* 門と *Rubrobacter* 属に最も近縁な細菌が分布していることが示唆された。

第4章 バイオフィルム中の硝酸イオン濃度

本章の要旨

本章では、バイオンの砂岩壁面に付着するバイオフィルム中の硝酸について論じる。3章の結果から、バイオフィルムに硝酸が蓄積する可能性が考えられた。バイオフィルム中の硝酸が石材に与える影響を調べるために、バイオフィルム内の硝酸濃度を測定した。その結果、屋根で覆われている砂岩壁面に付着したバイオフィルムでは、屋根が崩落している砂岩壁面のバイオフィルムに比べて高濃度の硝酸が蓄積されていた。イオンクロマトグラフィーによるバイオフィルムの陰イオン、陽イオンを測定した結果、屋根で覆われている砂岩壁面に付着したバイオフィルムには、ナトリウム、マグネシウム、カルシウムイオンが高濃度で蓄積されていたことから、砂岩の構成成分であるこれらの陽イオン種が溶出している可能性が示された。高濃度の硝酸が蓄積した原因の一つとして、バイオフィルム中の *Cyanobacteria* により空気中の窒素が固定され、硝化細菌によって硝酸に酸化されることが考えられる。

4-1 研究の背景と目的

3章の結果から、B色、V色、G色、BG色のバイオフィルムの細菌叢で、*Cyanobacteria* 門に属する細菌に近縁な細菌が優占していることが示された。*Cyanobacteria* 門に属する細菌は、光合成により二酸化炭素から炭水化物を合成し、他の従属栄養微生物に栄養源を供給する働きがある。加えて、*Cyanobacteria* 門の一部の細菌は、窒素固定を行うことが知られている(Berman-Frank et al., 2003)。窒素固定によって、空気中の窒素から、微生物が利用可能なアンモニアが生成される。さらに、アンモニアは硝化細菌の働きにより硝酸に変換される。バイオフィルムに *Cyanobacteria* 門に属する細菌が存在することから、バイオフィルム内では硝酸が生成されている可能性が考えられた。

そこで、本章では、バイオフィルムの硝酸濃度を測定し、バイオフィルム内の硝酸が石材に与える影響を調べることを目的とした。バイオフィルムの細菌叢との関連を調べるためには3章で供試したバイオフィルム試料の硝酸濃度を測定する必要があったが、3章のバイオフィルム試料は粘着シートを用いて採取したため試料の量が十分でなかった。そこで、バイオン寺院壁面からレリーフに影響を与えない箇所を選び、試料の採取および硝酸イオン濃度の測定を行なった。

4-2 実験方法

4-2-1 試料の採取

バイオフィーム中の硝酸イオンを測定するために、バイヨン内回廊、および外回廊から2011年8月にバイオフィーム試料を採取した。試料採取場所は Fig. 4-1 に、試料を採取したバイオフィームの色調と、壁面の屋根の有無は Table 4-1 に示した。

試料は葉さじと薬包紙を使って、バイヨン内のレリーフに影響を与えない箇所から、少量採取し、マイクロチューブに保管した。試料は採取後すぐに、現地のラボにて pH、および硝酸イオン濃度を 4-2-2 に示す方法で測定した。また、試料を日本に持ち帰った後は実験に供試するまで -20°C に保存し、4-2-3 に示す方法で陽イオン、および陰イオン濃度を測定した。

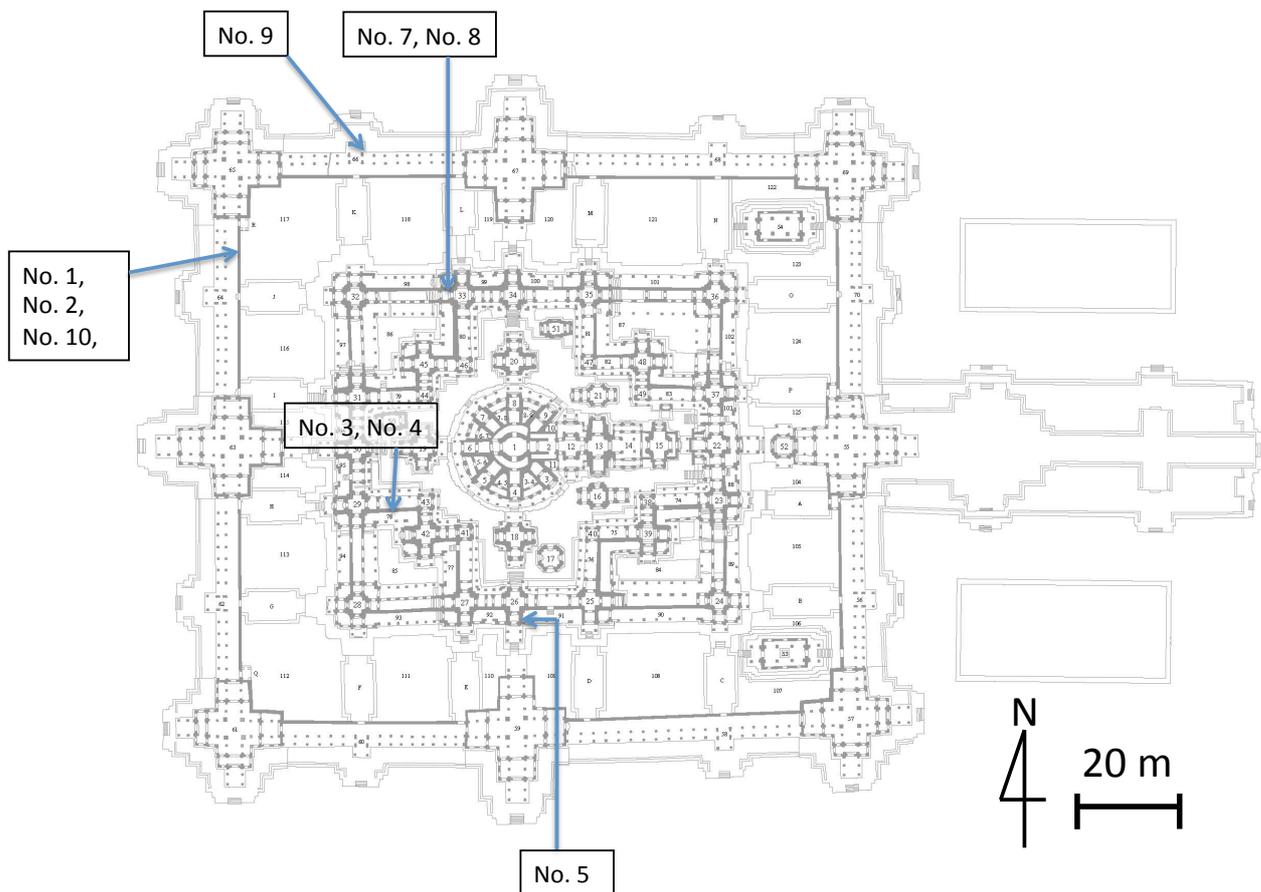


Fig. 4-1. Sampling locations of biofilm samples No.1 to No. 5, and No.7 to No. 10 for nitrate ion concentration measurement in Bayon, Angkor Thom, Cambodia. Color of the biofilm was shown in Table 3-1.

4-2-2 硝酸イオン濃度と pH 測定

試料 0.1 g は Milli-Q 水に懸濁し，遠心分離 (5,000×g, 5 min, 4°C) した。このときの希釈倍率は，pH 測定時には 5 倍，硝酸イオン濃度測定時には 5～100 倍とした。

遠心分離後の上清を，compact pH meter (B-212, Horiba)，および compact NO₃⁻ meter (B-343, Horiba) に供試し，pH および硝酸イオン濃度を測定した。試料間の有意差を調べるために，Student-t 検定を行なった。

4-2-3 各種陽イオン，および陰イオン測定

試料は MilliQ 水で 15～100 倍に希釈し，遠心分離 (5,000×g, 5 min, 4°C) した。上清を 0.22 μm フィルターでろ過後，測定に供試した。陰イオン，および陽イオン濃度の測定は，イオンクロマトグラフィーを用い，下記の条件で測定した。

<陰イオン：イオンクロマトグラフィーの測定条件>

- IC: Model 883 Basic IC plus (Metrohm)
- カラム：陰イオンカラム Metrosep A sup 4-250 (Metrohm)
- 移動相：1.7 mM NaHCO₃/ 1.8 mM Na₂CO₃
- 流速：1.0 mL min⁻¹

<陽イオン：イオンクロマトグラフィーの測定条件>

- IC: Model 861 Advanced Compact IC (Metrohm)
- カラム：陽イオンカラム YS-50 (Shodex)
- 移動相：4 mM HNO₃
- 流速：1.2 mL min⁻¹

4-3 結果および考察

4-3-1 バイオフィルムの pH と硝酸イオン濃度

現地のラボにてバイオフィルムの pH と硝酸イオン濃度を測定した結果を、Table 4-1 に示した。試料間の硝酸イオン濃度を比較すると、試料 No. 5 は $13.07 \text{ mg (kg wet weight sample)}^{-1}$ と最も濃度が高かった。試料 No. 5 は 3 章で示した試料 BG1, BG4, BG5 を採取した付近の、BG 色のバイオフィルムから採取された。

計 9 試料は、屋根で覆われた壁面に付着したバイオフィルムから採取された 5 試料 (No. 3, 4, 5, 7, 8) と、屋根が崩落し、日射や降雨に直接さらされているバイオフィルムから採取された 4 試料 (No. 1, 2, 9, 10) の大きく 2 つのグループに分けられた。屋根で覆われた壁面から採取された試料の硝酸イオン濃度は $32.34 \sim 58.80 \text{ mg (kg wet weight sample)}^{-1}$ であった。一方、屋根が崩落した壁面から採取された試料の硝酸イオン濃度は $0.08 \sim 0.50 \text{ mg (kg wet weight sample)}^{-1}$ であり、屋根で覆われた壁面に比べて有意に低い濃度であった ($P < 0.01$)。バイオフィルムの pH は、 $6.4 \sim 7.5$ の範囲であり、屋根の有無に関わらず、中性を示した。

以上の結果から、屋根で覆われた砂岩壁面に付着したバイオフィルムの方が、屋根が崩落している砂岩壁面のバイオフィルムよりも硝酸イオンが高濃度で蓄積していた。この理由として、屋根が崩落している砂岩壁面では、降雨が直接降り注ぐことで壁面が洗い流されている可能性が考えられる。高濃度の硝酸が蓄積する原因は不明であるが、硝酸が微生物由来であると仮定すると、硝酸生成を担う微生物の働きは屋根で覆われた砂岩壁面の環境で促進され、屋根が崩落して直射日光や降雨が直接降り注ぐ環境で抑制された可能性がある。

Table 4-1. Nitrate ion concentration in the biofilms

Sample	Color of biofilm	Roof [†]	pH [*]	NO ₃ ⁻ [mg (kg wet weight sample) ⁻¹]
No. 5	Blue green (BG)	+	7.0	58.80
No. 3	Yellow green	+	7.5	53.90
No. 4		+	6.5	32.34
No. 7	Brown beige	+	6.6	57.42
No. 8		+	7.0	36.75
No. 1	Purple violet	-	6.4	0.50
No. 2		-	7.2	0.17
No. 10		-	6.3	0.08
No. 9	Brown green	-	6.9	0.12

Samples were collected from the inner or outer gallery in Aug 2011.

† +, Roof was present; -, roof was missing.

* Biofilms were diluted 1:4 with Milli-Q water and centrifuged; the supernatants were used for pH measurement in the field.

4-3-2 バイオフィルム中の陰イオン、陽イオン分析

バイオフィルム中の陰イオン種および陽イオン種を調べるために、バイオフィルム試料をイオンクロマトグラフィーに供試した。4-3-1 に示したバイオフィルム 9 試料のうち、試料が十分量採取できた計 6 試料（試料 No. 2～5, No. 9, 10）を実験に供した。

試料の含水率は、屋根で覆われた壁面のバイオフィルムから採取した試料 No. 3, 4, 5 では 25.2～34.4%、屋根が崩落した壁面のバイオフィルムから採取した試料 No. 2, 9, 10 では 5.2～6.5%だった。屋根で覆われた壁面のバイオフィルムは、屋根が崩落した壁面のバイオフィルムの 5 倍の含水率であったことから、屋根で覆われた壁面のバイオフィルムの方が水分を多く保持していることが示された。

陰イオンおよび陽イオンをの測定結果を、Table 4-2 に示した。屋根で覆われた壁面のバイオフィルムから採取した試料 No. 3, 4, 5 では、屋根が崩落した壁面のバイオフィルムから採取した試料 No. 2, 9, 10 と比較して硝酸イオン、塩化物イオン、硫酸イオン、カリウムイオン、マグネシウムイオン、カルシウムイオンが高濃度に蓄積していた。

BG 色のバイオフィルム試料 No. 5 の硝酸イオン濃度は $1366.48 \text{ g(kg dry weight)}^{-1}$ であり、Table 4-1 に示した測定値よりもさらに高濃度の硝酸が検出された。

アンモニウムイオン濃度は、BG 色のバイオフィルム試料 No. 5 では $7.6 \text{ nmol (g dry weight)}^{-1}$ であり、屋根が崩落した壁面のバイオフィルム試料の $1.1\sim 1.9 \text{ nmol (g dry weight)}^{-1}$ に比べて高濃度であった。同様に、ナトリウムイオン、カリウムイオン、マグネシウムイオン、カルシウムイオンについても、屋根で覆われた壁面のバイオフィルムの方が、屋根が崩落した壁面のバイオフィルムよりも高濃度に蓄積されていた。

壁面を構成する砂岩の主成分は、石英 (SiO_2) と長石であり、長石の一般式は $(\text{Na, K, Ca, Ba})(\text{Si, Al})_4\text{O}_8$ で表される。高濃度に蓄積された硝酸によって、長石の構成成分であるナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウムイオンが溶出している可能性がある。これら陽イオン種の溶出によって長石の結晶構造が崩壊するため、高濃度の硝酸の蓄積は石材の劣化が進行する原因の一つであると考えられる。

以上の結果から、屋根で覆われた壁面のバイオフィルムでは砂岩の構成成分であるナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウムイオンが溶出している可能性が示された。その原因の一つとして、高濃度に含まれる硝酸が砂岩の腐食を促進している可能性が示唆された。

Table 4-2. Concentrations of anion and cation in the biofilm samples.

Sample	Color of biofilm	Roof [†]	pH	Anion				Cation					
				[g (kg dry weight) ⁻¹]				[g (kg dry weight) ⁻¹]					
				Cl	NO ₂	NO ₃	SO ₄	Li	Na	NH ₄	K	Mg	Ca
No. 5	Blue green (BG)	+	7.0	85.69	N.D.	1366.48	15.24	N.D.	0.75	0.01	0.38	2.45	5.98
No. 3	Yellow green	+	7.5	121.63	N.D.	5096.77	168.39	N.D.	3.06	N.D.	1.59	6.00	13.54
No. 4		+	6.5	181.54	N.D.	5986.06	N.D.	N.D.	3.95	N.D.	1.36	1.93	14.26
No. 7	Brown beige	+	6.6	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a
No. 8		+	7.0	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a
No. 1	Purple violet	-	6.4	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a
No. 2		-	7.2	N.D.	N.D.	N.D.	0.42	N.D.	N.D.	N.D.	0.02	N.D.	0.04
No. 10		-	6.3	N.D.	N.D.	N.D.	0.05	N.D.	0.01	N.D.	0.03	0.01	0.02
No. 9	Brown green	-	6.9	N.D.	N.D.	N.D.	0.32	N.D.	N.D.	N.D.	0.02	N.D.	0.02

† +, Roof was present; -, roof was missing.

a) Sample No. 7, 8, and 1 weren't determined because of sample amounts.

N.D. = Not detected.

4-4 結論

本章の実験の結果、屋根で覆われた壁面のバイオフィルムにおいて高濃度の硝酸イオンの蓄積と、金属イオン種の蓄積が示された。このことから、高濃度に蓄積された硝酸イオンによって砂岩中の金属イオンが溶出し、砂岩の劣化が促進されている可能性が考えられた。

高濃度の硝酸の蓄積の原因は明らかになっていないが、可能性の一つとして微生物の働きが考えられる。窒素固定細菌により空気中の窒素がアンモニアとして固定され、さらにそのアンモニアが硝化細菌の作用により硝酸にまで酸化されていけば、バイオフィルム中に高濃度の硝酸が蓄積される。試料 No. 5 が採取された BG 色のバイオフィルム試料において、3 章の結果からバイオフィルムの表層に *Cyanobacteria* が分布していることが示されている。*Cyanobacteria* の一部は窒素固定能をもつことが知られていることから、*Cyanobacteria* がバイオフィルム中に N 源を供給する役割を果たしている可能性がある。

Cyanobacteria は、藻類と並び、多くの歴史的な石造建築物において生育が確認されている (Ortega-Calvo et al., 1993)。*Cyanobacteria* の石材表面への着生は、緑～黒色の着色劣化を引き起こすだけでなく、石材表面や石材の微細な空隙の間に入りこんで生育することにより、石材の劣化を引き起こす (Warcheid and Braams, 2000)。また、McNamara et al. (2010) の報告によると、*Cyanobacteria* は強い光を避けて分布することが知られている。カタコンベや洞窟のように光量が制限されている場所では石材表面に *Cyanobacteria* が優占しやすい (Albertano and Urzi, 1999) 一方、南メキシコのマヤ遺跡の外側のように強い光にさらされている場所では、石材表面での *Cyanobacteria* の優占はみられず、緑藻類を含むより多様な微生物叢が報告されている (Videla et al, 2000)。本章では、強い光にさらされている屋根が崩落した部分よりも、屋根で覆われた壁面に高濃度の硝酸蓄積が示された。屋根で覆われた壁面に分布しやすい *Cyanobacteria* がバイオフィルムに N 源を供給することで、硝酸の蓄積の一つの要因となった可能性がある。

第5章 結論

5-1 総括

本研究では、アンコール遺跡の石材劣化を抑制するために、アンコール遺跡の二種類の劣化、剥離劣化とバイオフィルムの付着による劣化に着目し、その劣化に関与する細菌の特徴を調べた。

剥離劣化に関与する可能性のあるイオウ酸化細菌は、分離菌 5 株ともに *Mycobacterium* 属に最も近縁な細菌であった。*Mycobacterium* 属に属する細菌がイオウ酸化能をもつことはこれまでに知られておらず、本報告が初めての報告であった。既知のイオウ酸化細菌とは系統的に異なることから、遺伝子の水平伝播によりイオウ酸化能を獲得した可能性も考えられる。

バイオン内回廊から採取されたバイオフィルムの細菌叢は、既知の細菌とは異なる新規の細菌種により構成されていた。バイオフィルムの色調により、細菌叢に特徴があり、P 色のバイオフィルムは *Rubrobacter* 属に近縁な細菌が、B 色、V 色、G 色、BG 色のバイオフィルムには、*Cyanobacteria* 門に最も近縁な細菌が優占していた。

このうち、バイオフィルムの厚みがあり、その下の石材の劣化が顕著である BG 色のバイオフィルムについて、バイオフィルムの表面と石材に近い部分で細菌叢が遷移していることが示された。また、BG 色のバイオフィルムでは、硫酸イオン、およびナトリウム、マグネシウム、カルシウムイオンが高濃度に蓄積されていた。このことから、石材の構成成分であるこれらの陽イオン種が溶出し、石材劣化が進行している可能性が示された。このことから、BG 色のバイオフィルムは、石材劣化への寄与が大きいバイオフィルムであることが示された。

5-2 将来展望

本研究の結果、剥離劣化への関与が疑われるイオウ酸化細菌が明らかになった。加えて、バイオフィルムの色調ごとにバイオフィルムを構成する細菌の特徴が示された。

今回の報告では細菌叢の一部の解析にとどまっていたが、さらに網羅的に解析することで、バイオフィルムの色調ごとの細菌叢データを拡充する必要がある。

バイオフィルムの色調ごとの細菌叢データをより拡充することで、バイオフィルムの色調からバイオフィルムを構成する微生物が類推できるシステム構築をめざす。このことにより、現場でバイオフィルムの細菌叢が簡便に判断され、石材劣化を促進するバイオフィルムを優先的に排除することが可能になることが期待される。

引用文献

- Albertano, P., and C., Urzi. (1999). Structural interactions among epilithic cyanobacteria and heterotrophic microorganisms in Roman hypogea. *Microb. Ecol.*, 38, 244-252.
- Altschul, S.F., W., Gish, W., Miller, E.W., Myers, and D.J., Lipman. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.
- Altschul, S.F., T.L., Madden, A.A., Schäffer, J., Zhang, Z., Zhang, W., Miller, and D.J. Lipman. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402.
- Amann, R.L., W., Ludnig, K.H., Scheleifer, (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59, 143-169.
- Berman-Frank, I., P., Lundgren, and P., Falkowski. (2003). Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria. *Res. Microbiol.* 154, 157-164.
- Bratbak, G. (1985). Bacterial biovolume and biomass estimations. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 1488-1493.
- Cooksey, R.C., J.H., de Waard, M.A., Yakrus, I., Rivera, M., Chopite, S.R., Toney, G.P., Morlock, and W.R., Butler. (2004). *Mycobacterium cosmeticum* sp. nov., a novel rapidly growing species isolated from a cosmetic infection and from a nail salon. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 2385-2391.
- DeSantis, T.Z., P., Hugenholtz, N., Larsen, M., Rojas, E.L., Brodie, K., Keller, T., Huber, D., Dalevi, P., Hu, and G.L., Andersen. (2006). Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5069-5072.
- Gaylarde, C.C., C.H., Rodríguez, Y.E., Navarro-Noya, and B.O., Ortega-Morales. (2012). Microbial biofilms on the sandstone monuments of the Angkor Wat complex, Cambodia. *Curr. Microbiol.* 64, 85-92.
- Hennessee, C.T., J.-S., Seo, A.M., Alvarez, and Q.X., Li. (2009). Polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading species isolated from Hawaiian soils: *Mycobacterium crocinum* sp. nov., *Mycobacterium pallens* sp. nov., *Mycobacterium rutilum* sp. nov., *Mycobacterium rufum* sp. nov. and *Mycobacterium aromaticivorans* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 378-387.
- Hueck, H.J. (1965). The biodeterioration of materials as part of hylobiology. *Mater. Org.* 1, 5-34.
- Imperi, F., G., Caneva, L., Cancellieri, M.A., Ricci, A., Sodo, and P. Visca. (2007). The bacterial aetiology of rosy discoloration of ancient wall paintings. *Environ. Microbiol.* 9, 2894-2902.
- Iwasaki, Y., E., Tsukuda, and M., Fukuda. (1995). Geotechnology, geology, and environment, pp. 191-309. In T. Nakagawa, Y. Fujiki, Y. Iwasaki, M. Nishimura, E. Uchida, and T. Narita (ed.), Annual Report on the Technical Survey of Angkor Monument 1995. Japan International Cooperation Center, Tokyo, Japan (In Japanese).

- Iwasaki, Y. (2003). Geotechnology, geology, and environment survey (2) Water problems in Angkor, pp. 225–238. In T. Nakagawa, H. Arai, Y. Iwasaki, E. Uchida, S. Sakurada, Y. Akazawa, N. Shimizu, S. Nishimoto, and K. Ota (ed.), Annual Report on the Technical Survey of Angkor Monument 2003. Japan International Cooperation Center, Tokyo, Japan.
- Katayama, Y., Y., Narahara, Y., Inoue, F., Amano, T., Kanagawa, and H., Kuraishi. (1992). A thiocyanate hydrolase of *Thiobacillus thioparus*. A novel enzyme catalyzing the formation of carbonyl sulfide from thiocyanate. *J. Biol. Chem.* 267, 9170–9175.
- Kato, H., M., Saito, Y., Nagahata, and Y., Katayama, (2008). Degradation of ambient carbonyl sulfide by *Mycobacterium* spp. in soil. *Microbiology* 154, 249–255.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16, 111–120.
- Laiz, L., A.Z. Miller, V. Jurado, E. Akatova, S. Sanchez-Moral, J.M. Gonzalez, A. Dionísio, M.F. Macedo, and C. Saiz-Jimenez. (2009). Isolation of five *Rubrobacter* strains from biodeteriorated monuments. *Naturwissenschaften* 96, 71–79.
- Lan, W., H., Li, W.-D., Wang, Y., Katayama, and J.-D., Gu. (2010). Microbial community analysis of fresh and old microbial biofilms on Bayon temple sandstone of Angkor Thom, Cambodia. *Microb. Ecol.* 60, 105–115.
- Lane, D.J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. p. 115–175. In E. Stackebrandt, M. Goodfellow (ed.), Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. Wiley, New York.
- Muyzer, G., E.C., de Waal, and A.G., Uitterkinden. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified gene coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 695–700.
- Ortega-Calve, J.J., X., Ariño, M., Hernandez-Marine, C., Saiz-Jimenez. (1995). Factors affecting the weathering and colonization of monuments by phototrophic microorganisms. *Sci Total Environ*, 167, 329-341.
- Petushkova, J., and P., Kandyba. (1999). Aeromicrobiological studies in the Moscow cathedrals. *Aerobiologia* 15, 193–201.
- Saarela, M., H.-L., Alakomi, M.-L., Suihko, L., Maunuksela, L., Raaska, and T., Mattila-Sandholm. (2004). Heterotrophic microorganisms in air and biofilm samples from Roman catacombs, with special emphasis on actinobacteria and fungi. *Int. Biodeter. Biodegr.* 54, 27–37.
- Saitou, N., and M. Nei. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406–425.
- Sawada, M., T., Matsui, S., Inoue, and T., Ebisawa. (2009). 5.1 Weathering test and environmental survey of

- materials for the conservation and restoration of the bas-relief, pp. 149–154. *In* Japanese Government Team for Safeguarding Angkor (ed.), Annual Technical Report on the Survey of Angkor Monument 2008. Angkor Project Office, Tokyo, Japan.
- Schabereiter-Gurtner, C., G., Piñar, D., Vybiral, W., Lubitz, and S., Rölleke. (2001). *Rubrobacter* -related bacteria associated with rosy discolouration of masonry and lime wall paintings. *Arch. Microbiol.* 176, 347–354.
- Suihko, M.-L., H.-L., Alakomi, A., Gorbushina, I., Fortune, J., Marquardt, and M., Saarela. (2007). Characterization of aerobic bacterial and fungal microbiota on surfaces of historic Scottish monuments. *Syst. Appl. Microbiol.* 30, 494–508.
- Tamura, K., D., Peterson, N., Peterson, G., Stecher, M., Nei, and S., Kumar. (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731–2739.
- Li, X., H., Arai, I., Shimoda, H., Kuraishi, and Y., Katayama. (2008). Enumeration of sulfur-oxidizing microorganisms on deteriorating stone of the Angkor monuments, Cambodia. *Microbes. Environ.* 23, 293–298.
- Li, X. S., T., Sato, Y., Ooiwa, A., Kusumi, J.-D., Gu, and Y., Katayama. (2010). Oxidation of elemental sulfur by *Fusarium solani* strain THIF01 harboring endobacterium *Bradyrhizobium* sp. *Microb. Ecol.* 60, 96–104.
- McGoran, C.J.M., D.W., Duncan, and C.C., Walden. (1969). Growth of *Thiobacillus ferrooxidans* on various substrates. *Can. J. Microbiol.* 15, 135–138.
- McNamara, C.J., T.D., Perry IV, K.A., Bearce, G., Hernandez-Duque, and R., Mitchell. (2006). Epilithic and endolithic bacterial communities in limestone from a Maya archaeological site. *Microb. Ecol.* 51, 51–64.
- McNamara, C.J., N. Konkol, and R. Mitchell. (2010). Chapter 6. Microbial deterioration of cultural heritage materials, pp. 137-151. *In* R. Mitchell, and J.-D. Gu (ed.), Environmental microbiology, second edition. John Wiley & Sons, Inc.
- Pochon, J., C., Jaton. (1967). The role of microbiological agencies in the deterioration of stone. *Chem. Ind.-London*, 9, 1587-1589.
- Pochon, J., C., Jaton. (1968). Biological factors in the alteration of stone, pp. 258-268. *In* A.H., Wolters, and C.C., Elphick (ed.), Biodeterioration of Materials. Elsevier, Amsterdam.
- Rakotonirainy, M.S., C., Héraud, and B., Lavédrine, (2003). Detection of viable fungal spores contaminant on documents and rapid control of the effectiveness of an ethylene oxide disinfection using ATP assay. *Luminescence* 18, 113–121.

- Saito, H., and K.-I., Miura. (1963). Preparation of transforming deoxyribonucleic acid by phenol treatment. *Biochim. Biophys. Acta* 72, 619–629.
- Sand, W., and E., Bock. (1991). Biodeterioration of mineral materials by microorganisms: biogenic sulfuric and nitric acid corrosion of concrete and natural stone. *Geomicrobiol. J.*, 9, 129-232.
- Scheerer, S., O., Ortega-Morales, and C., Gaylarde. (2009). Microbial deterioration of stone monuments—an updated overview. *Adv. Appl. Microbiol.* 66, 97–139.
- Stanley, P.E., and S.G., Williams. (1969). Use of the liquid scintillation spectrometer for determining adenosine triphosphate by the luciferase enzyme. *Anal. Biochem.* 29, 381–392.
- Tamura, K., J., Dudley, M., Nei, and S., Kumar. (2007). MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1596–1599.
- Perry, T.D., O.W., Duckworth, C.J., McNamara, S.T., Martin, and R., Mitchell. (2004). Effects of the biologically produced polymer alginic acid on macroscopic and microscopic calcite dissolution rates. *Environ. Sci. Technol.* 38, 3040–3046.
- Videla, H.A., Guiamet, P.S. and deSaravia, S.G. (2000). Biodeterioration of Mayan archaeological sites in the Yucatan Peninsula, Mexico. *Int. Biodeter. Biodegrad.*, 46, 335-341.
- Wang, W., Y. Ma, X. Ma, F. Wu, X. Ma, L. An, and H. Feng. (2012). Diversity and seasonal dynamics of airborne bacteria in the Mogao Grottoes, Dunhuang, China. *Aerobiologia* 28, 27–38.
- Warscheid, Th., and J., Braams. (2000). Biodeterioration of stone: a review. *Int. Biodeter. Biodegr.* 46, 343-368.
- Yamaguchi, N., A., Ishidoshiro, Y., Yoshida, T., Saika, S., Senda, and M., Nasu. (2003). Development of an adhesive sheet for direct counting of bacteria on solid surfaces. *J. Microbiol. Meth.* 53, 405–410.
- Yuki, N., T., Shimazaki, A., Kushiro, K., Watanabe, K., Uchida, T., Yuyama, and M., Morotomi. (2000). Colonization of the stratified squamous epithelium of the non-secreting area of horse stomach by lactobacilli. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 5030–5034.
- Zhang, Z., S., Schwartz, L., Wagner, and W., Miller. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput. Biol.* 7, 203–214.

新井英夫. (1994). アンコール遺跡における生物劣化とその防除に関する研究 (第1報) 劣化要因の生物学的調査と防除法の検討. 文化財の虫菌害. 28, pp. 3-15.

新井英夫, 山岸高旺. (1996). 保存科学, アンコール遺跡調査報告書 1996, 中川武, 藤木良明, 新井英夫, 岩崎良規, 溝口明則, 内田悦生, 小川英文, 成田剛, 仲鉢貴彦 (編), 財団法人日本

国際協力センター, pp. 391-418.

新井英夫. (1997). アンコール遺跡における生物劣化とその防除に関する研究 (第2報) 防藻・防地衣剤の検討, 文化財の虫菌害. 34, pp. 5-14.

内田悦生. (2007). アンコール遺跡の石材と非破壊調査. 物理探査, 60, pp.223-234.

片山葉子, 小熊健二, 倉石衍 (2002). 9. 保存科学調査 (2). 微生物学的調査. アンコール遺跡調査報告書 2002. 中川武. 日本国アンコール遺跡救済チーム (JSA). pp. 311-317.

駒形和男 (1975). 細菌の分類と同定(1). 好気性細菌. 同定の実験. 「微生物の分類と同定」瀬川武治 編, pp.217-219 財団法人東京大学出版会.

瀬戸昌之 (1978). 湿式酸化-赤外線ガス分析計による全有機炭素の高感度迅速定量法. 日本分析化学会, 27, 660-663.

李賢淑 (2009). アンコール遺跡石造文化財の劣化とそこに生息するイオウ酸化微生物. 東京農工大学連合農学研究科 博士論文.

謝辞

本研究を行うにあたり、東京農工大学大学院 農学研究科 片山葉子教授には、あらゆる面でご指導いただきました。心からの感謝の意を表します。

本論文の審査および完成にあたり、貴重なご意見を頂きました東京農工大学大学院 多羅尾光徳助教授、茨城大学大学院 太田寛行教授、宇都宮大学大学院 夏秋知英教授、東京農工大学大学院 楊宗興教授に心より厚く御礼申し上げます。

研究を進めるにあたり、ご協力、ご助言を頂いた早稲田大学大学院 中川武教授、内田悦生教授、国士舘大学大学院 沢田正昭教授、東京大学大学院 池内克史教授、筑波大学大学院 松井敏也教授、香港大学大学院 Ji-Dong Gu 教授、佐賀大学大学院 染谷孝教授、東京農工大学大学院 木庭啓介准教授、山梨大学大学院 小林拓准教授に深く感謝の意を表します。

カンボジアでの調査において、JASA のチア・ノル氏、吉川舞氏、早稲田大学大学院 千葉真由子氏には大変お世話になりました。

(株)ヤクルト本社中央研究所 左近洋氏には、DGGE 法について技術的な支援およびご協力を頂きました。(株)テクノスルガ・ラボ 富田順子氏には、DGGE 法について技術的なご助言を頂きました。(独)産業技術総合研究所 堀知行氏にはシーケンスデータに関する技術的なご助言を頂きました。大阪大学大学院 那須正夫教授には本論文でサンプリングに使用した粘着シートを提供いただきました。

東京農工大学 山田元章技官には、研究を進めていく上で技術的な課題の解決に尽力いただいただけでなく、本論文をまとめるにあたって様々なご協力・ご助言を頂きました環境微生物学研究室の皆様、心より御礼申し上げます。

最後に、長きに渡る研究生活を理解し、支えてくれた家族に心より感謝致します。