

〔報文〕 霧島神宮の塗装部位から分離された糸状菌の諸性質

佐藤 嘉則・森井 順之・木川 りか・太田 英一*・中別府 良啓*²・
中山 俊介・川野邊 渉

1. はじめに

膠など有機物が用いられる伝統的な塗装方法では、一般的に糸状菌などの従属栄養生物による生物劣化を受けやすい。糸状菌による生物劣化は、著しく美観が損なわれるばかりでなく、塗装の物理的な劣化にも関与すると考えられる。例えば、膠を用いた塗装では、糸状菌が接着材として機能している膠のタンパク質を分解することで塗装面から顔料が剥離したり、代謝産物によって顔料が変色したり、溶解したりすることも想定される。また、膠を用いた塗装で施工後すぐに大規模な糸状菌被害が起こることがある。この理由としては、様々な環境因子や材料の違いなどが大きく影響するため、一概には述べることができないが、①施工後すぐには膠などに含まれる水分量が大きく、水分活性の高い糸状菌でも増殖が可能なこと、②新しい膠は膠を構成する有機物の中でも多種の糸状菌が利用可能な易分解性有機物に富んでいること、などが推察される。

平成22年に霧島神宮の渡廊下、登廊下、拝殿の壁面に胡粉塗や黄土塗といった伝統的な塗装が施されたが、場所によって施工後数か月で糸状菌と思われる微生物が広範囲に渡り増殖するといった被害が起こった。本研究は、その原因となった微生物を特定して、微生物が塗装部位に与える影響を考察するために、微生物の分離と分類学および生理学的な解析を行ったものである。なお、霧島神宮の渡廊下、登廊下、拝殿の塗装部位周辺の温湿度環境と本研究で得られた分離菌株を用いた現地での曝露試験については、森井らの報告¹⁾を参照されたい。

2. 試料および実験方法

2-1. 試料の採取

霧島神宮は鹿児島県霧島市にあり、本殿、幣殿、拝殿、登廊下、勅使殿などは国の重要文化財に指定されている。試料採取地点は、霧島神宮の本殿に向かう渡廊下、登廊下の内壁と拝殿外部の西壁に選定した。試料は、平成23年4月26日に渡廊下および登廊下で糸状菌の生育が認められる胡粉試料と拝殿の西壁で同じく糸状菌の生育が認められる黄土試料を、滅菌メスを用いて少量採取した。採取した試料は滅菌したポリスチレン製コニカルチャーブ{Becton Dickinson and Company (BD), MD, USA}にて持ち帰り、分析に供するまで低温(約4℃)、暗所で保存した。

2-2. 糸状菌の分離

糸状菌の分離は、一般的な糸状菌の分離培地としてポテトデキストロース寒天(PDA)培地(Difco™ Potato Dextrose Agar, BD)、低栄養要求性の糸状菌の分離培地として、通常使用される濃度の半量に調製したコーンミール寒天(1/2CMA)培地[BBL™ Corn Meal Agar (8.5

*公益財団法人文化財建造物保存技術協会 *²霧島神宮

g L⁻¹; BD), Bacto™ Agar (7.5g L⁻¹; BD)], 好稠性 (≡好乾性) の糸状菌の分離培地としてジクロラングリセロール (DG-18) 寒天培地 [glucose (10g L⁻¹) Bacto™ Pepton (5g L⁻¹; BD), KH₂PO₄ (1g L⁻¹), MgSO₄ · 7H₂O (0.5g L⁻¹), glycerol (220g L⁻¹), 2,6-Dichloro-4-nitroaniline (0.002g L⁻¹), Bacto™ Agar (15g L⁻¹; BD)] の3種類を用いて直接接種法にて行った。すなわち、滅菌した葉さじで少量の試料 (新鮮重で約0.05g) を採取して各培地面に接種して、23°Cで数日間培養しながら、伸長してきた菌糸を無作為に実体顕微鏡下で滅菌メスを用いて新しい培地へ移植することで分離菌株とした。分離菌株の維持は、1/2CMA 培地に麦芽抽出物と酵母抽出物を加えた1/2CMMYA 培地 [BBL™ Corn Meal Agar (8.5g L⁻¹; BD), Bacto™ Malt Extract (10g L⁻¹; BD), Bacto™ Yeast Extract (2g L⁻¹; BD), Bacto™ Agar (7.5g L⁻¹; BD)] を用いた。

2-3. 分離菌株の分類学的性質

分離菌株の分類学的性質は、遺伝子 (DNA) 解析に基づき行った。具体的には、分離した糸状菌菌体から ISOPLANT DNA extraction kit (ニッポンジーン, 東京) を用いて DNA を抽出した。抽出した DNA は、2% (w/v) のアガロース (ノベルサイエンス, 東京) で電気泳動を行い、核酸染色剤 (GelRed Nucleic Acid Stain; Biotium, CA, USA) で DNA を染色した後に、UV 照射下で確認した。次に、抽出した DNA を鋳型として、ITS 領域 (Internal Transcribed Spacer region; 内部転写スペーサー領域) を標的とした PCR 増幅を行った。PCR 増幅は、ITS1プライマー (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') と ITS4プライマー (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') を使用して、95°Cで4分間保持した後、94°Cで35秒間、52°Cで55秒間、72°Cで2分間を35サイクル後に、72°Cで10分間の反応条件で行った。塩基配列の決定および系統解析は、Sato らの論文^{2),3)}の方法に従って行ったので、ここでは省略する。

2-4. 分離菌株の生理学的性質

分離菌株の生理学的性質として三千本膠の利用性とタンパク質分解能の有無について検討した。三千本膠の利用性試験は、栄養源を三千本膠のみとした単純三千本膠培地 [三千本膠 (20g L⁻¹), Bacto™ Agar (15g L⁻¹; BD)] の平板培地を作成して、分離菌株を接種後、23°Cで5日間静置培養して、増殖の有無を判定した。なお、増殖は1/2CMMYA 平板培地での菌集落面積より大きい対象を++, 同等の対象を+, より小さい対象を-と判定した。タンパク質分解能の試験は、ゼラチン液化試験および膠液化試験によって判定した。ゼラチン液化試験は、微生物のタンパク質分解能の試験として標準的に用いられる方法であるため、膠の分解試験の比較として試験項目に加えた。具体的な方法は、グルコース・ペプトン・ゼラチン培地 [glucose (20g L⁻¹), Bacto™ Pepton (5g L⁻¹; BD), Gelatin (200g L⁻¹; 和光純薬工業株式会社, 大阪)] をオートクレーブ滅菌後に滅菌試験管 (φ15×150mm) に5ml分注して、凝固させた後 (高層培地)、分離菌株を接種して23°Cで30日間静置培養した。ゼラチン液化の判定は、培養後の試験管を4°Cに約1時間置き、固化した対象を陰性、固化しなかった対象を陽性とした⁴⁾。また、別の判定方法として、Stone 反応による判定も行った⁵⁾。これは、グルコース・ペプトン・ゼラチン平板培地を作成して、分離菌株を接種して23°Cで5日間静置培養して、培養後の菌集落に硫酸アンモニウム飽和水溶液を滴下して10分間置き菌集落の周辺部分が透明に変化したものを陽性とした。ゼラチン液化試験と同様の方法を用いて、分離菌株の膠液化能の有無を検討した。膠液化試験は、牛皮和膠を主成分とした培地 [glucose (20g L⁻¹), Bacto™ Pepton (5g L⁻¹; BD), 牛皮和膠 (200g L⁻¹; 寺脇産業株式会社)] (以下、膠培地と記載する) を調製し

て、オートクレーブ滅菌後に滅菌試験管 ($\phi 15 \times 150 \text{mm}$) に 5 ml 分注して、凝固させた後、分離菌株を接種して 23°C で 30 日間静置培養した。膠液化能の判定は、培養後の試験管を 4°C に約 1 時間置き、対象の液化を確認したうえで判定した。

3. 結果と考察

3-1. 試料採取地点の状況と試料の実体顕微鏡観察

試料採取地点である霧島神宮の渡廊下胡粉塗装部位と、拝殿西壁の黄土塗装部位の写真を図 1, 2 に載せた。渡廊下の胡粉塗では、広範囲に渡り深緑色や灰色をした糸状菌が認められた (図 1-A)。目視での観察では、灰色の糸状菌の分布が他の糸状菌より優占して認められた。一方、拝殿西壁の黄土塗では、白色の糸状菌の分布が広範囲で認められた (図 2-A)。渡廊下および登廊下で糸状菌の生育が認められた胡粉塗装部位を 4 箇所、拝殿の西壁で同じく糸状菌の生育が認められた黄土塗装部位を 2 箇所の合計 6 箇所を選定して、試料を採取した (以下、それぞれ胡粉試料, 黄土試料と記載する)。採取した両試料の表面部分を実体顕微鏡にて観察した (図 1-B, C, 図 2-B, C)。胡粉試料では、灰色の菌糸の分布が認められ、目視観察の結果と一致した。黄土試料では目視観察の結果を支持する白色の菌糸が観察されたが、形態の異なる数種の白色菌糸が混在していた。

3-2. 糸状菌の分離

糸状菌は、3 種類の培地を用いて直接接種法により分離した。胡粉試料では、PDA 培地から 24 株、1/2CMA 培地から 31 株、DG-18 培地から 7 株の計 62 株、黄土試料では、PDA 培地から 36 株、1/2CMA 培地から 33 株、DG-18 培地から 2 株の計 71 株分離した (表 1)。分離菌株は 1/2 CMMYA 培地での菌集落形態の特徴に基づいて分類して、各グループに属する分離菌株数が多い順番からグループ A-K までの 11 グループに分けた (表 1)。ここでは、分離菌株の出現頻度が高いグループ A からグループ C について考察する。最も多くの分離菌株が分類されたグループ A はすべて黄土試料からの分離株であり、黄土試料からの分離株総数に対して約 50% を占めた。グループ A に属する菌群は、黄土試料に特異的であり、出現頻度も高いことから黄土試料における微生物劣化の原因糸状菌として重要であると考えられた。次に多くの分離菌株が分類されたグループ B は、胡粉試料と黄土試料の両試料から高い頻度で分離され、胡粉試料と黄土試料のそれぞれの分離株総数に対して約 18% と約 27% であった。この菌群は、胡粉試料と黄土試料の共通原材料である膠に対して、高い増殖特性を示す菌群であることや、試料採取地点に普遍的に分布する菌群であることなどが推察される。第 3 番目に多くの分離菌株が分類されたグループ C は、すべて胡粉試料からの分離株であり、胡粉試料からの分離株全体の約 34% を占めた。胡粉試料だけではグループ C が最も出現頻度が高いことと、菌糸の色が灰色であり、目視および実体顕微鏡で直接胡粉試料を観察したときに認められた灰色の菌糸と類似することから、胡粉試料における微生物劣化の原因糸状菌としてはグループ C の菌群が重要であると考えられた。また、グループ C の菌群は好乾性の糸状菌が増殖可能な DG-18 培地からも分離されたことから、耐乾性を有している可能性が高い。

3-3. 分離菌株の分類学的性質

形態学的な特徴から 11 グループに分類された分離株から、それぞれ数株を無作為に選抜して代表分離菌株として、それらの ITS 領域遺伝子の配列を決定した。グループ A, B, C の 3 つのグループは、分離菌株数の出現頻度から優占菌群である可能性が高く、霧島神宮における胡

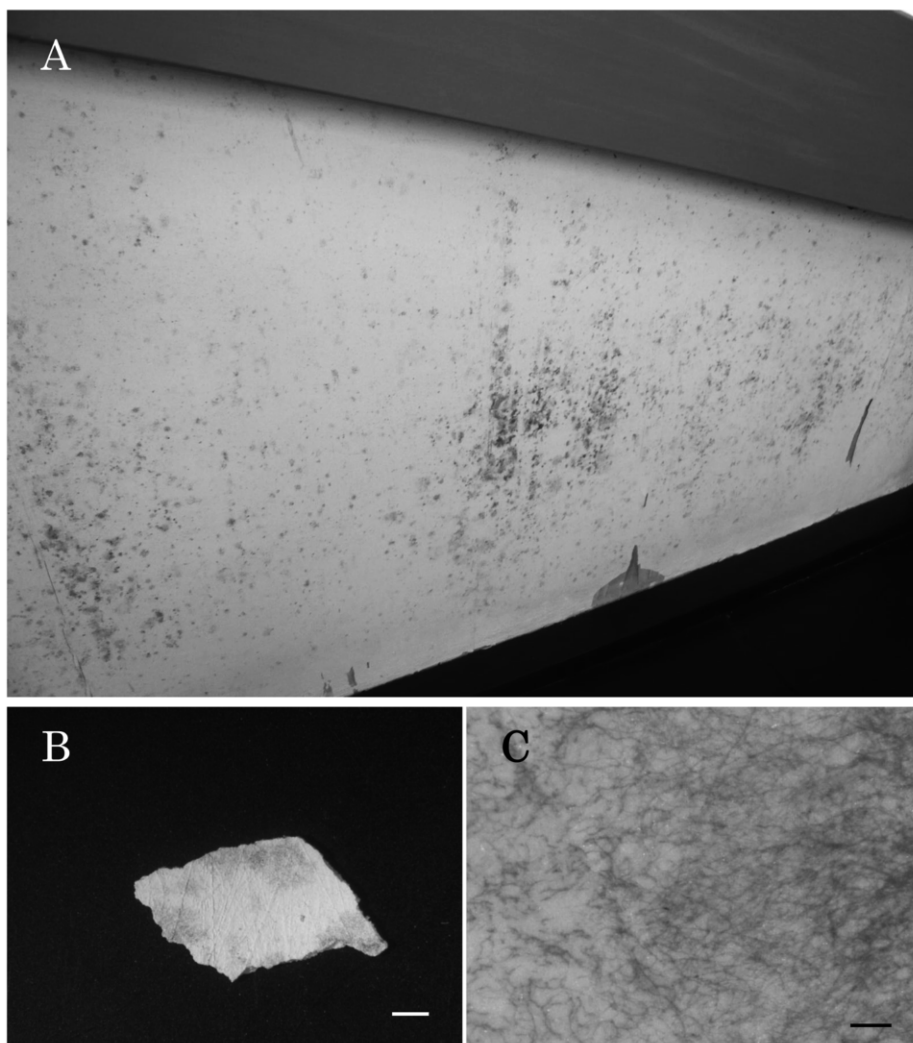


図1 霧島神宮の渡廊下胡粉塗装部位 (A) と採取した胡粉試料 (B) と汚染部位の実体顕微鏡写真 (C)。スケールバーはBとCで、それぞれ1mmと0.1mmを示す。

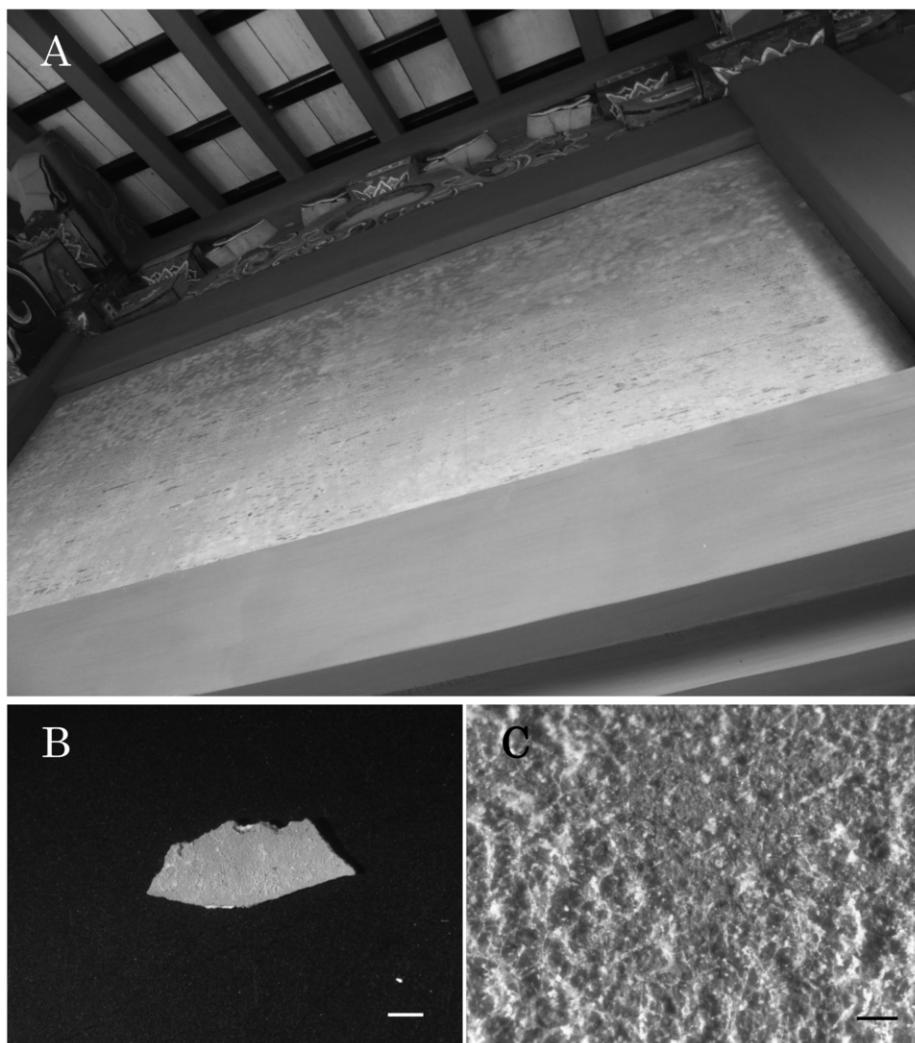


図2 霧島神宮の拝殿西壁黄土塗装部位 (A) と採取した黄土試料 (B) と汚染部位の実体顕微鏡写真 (C)。スケールバーはBとCで、それぞれ1 mm と0.1mm を示す。

表1 霧島神宮の胡粉および黄土試料から分離した糸状菌の菌株数と菌集落形態による分類

グループ名	菌集落の形態	分離菌株数						合計
		胡粉試料			黄土試料			
		PDA 培地	1/2CMA 培地	DG-18 培地	PDA 培地	1/2CMA 培地	DG-18 培地	
A	白-淡橙色, 綿状	0	0	0	9	27	0	36
B	淡橙色, ヒロード状, 放射状の溝	8	5	0	14	5	0	32
C	白-灰色, 綿状	3	17	1	0	0	0	21
D	白-淡橙色, 綿状, 粘性分生子塊 産生	5	4	0	0	0	0	9
E	濃緑色, 綿状	2	0	0	4	0	0	6
F	白色, 粉状, 放射状の溝	0	0	0	3	1	0	4
G	淡緑色, ヒロード状	0	0	2	0	0	2	4
H	黄緑色, ヒロード状, 黄色素産生	1	0	2	0	0	0	3
I	白-淡灰色, 綿状, 茶色素産生	0	3	0	0	0	0	3
J	白色, 綿状, 粘性分生子塊産生	0	0	1	2	0	0	3
K	濃緑-黄緑色, ヒロード状, 放射 状の溝, 黄色素産生	0	0	0	2	0	0	2
その他	—	5	2	1	2	0	0	9

粉および黄土塗装部の微生物劣化に関して特に重要であると考えられたため、詳細な系統解析を行った。図3-5はグループA-Cに属する代表分離菌株のITS領域遺伝子系統解析に基づく系統樹を示した。グループAは、グループFと同じ *Acremonium* 属に属した(図3)。興味深い点として、先に述べたようにグループAはすべて黄土試料から分離された菌群であったが、グループFも同様にすべて黄土試料からの分離菌株であり、両グループを合わせると黄土試料からの分離株全体の約56%が *Acremonium* 属に含まれた。黄土試料における *Acremonium* 属の増殖特性については今後の検討課題である。より詳細な分類学的性質では、グループAの最も近縁の既知種は *Acremonium alternatum* であり、既知菌株のCBS223.70株との相同性は高く(99%)、系統樹においても同じ分岐に含まれた(図3)。一方、グループFは、*Acremonium brachyphenium* CBS866.73株が最も近縁の既知菌株であったが、相同性は低く(92%)、系統樹においても異なる分岐を示した(図3)。グループBは、胡粉試料と黄土試料の両試料から高い頻度で分離されたグループである。分類学的な性質については、子囊菌門のボタntaxe目に属する *Eucasphaeria capensis* 2712株と最も近縁であった。*Eucasphaeria capensis* はCrousら(2007)によって新属新種が提唱された菌群であり、南アフリカ自生のユーカリ(*Eucalyptus* 属)の生葉や落葉から分離されている⁹⁾。本グループの菌群は *Eucasphaeria capensis* に近縁ではあるが、参照株であるCBS120027株やCBS120028株とは塩基配列の相同性が低く(88-91%)、系統樹においても異なる分岐を示すことから、系統的に新規の菌群である可能性が高いと考えられる(図4)。グループCは胡粉試料の優占分離株であり、子囊菌門のプレオスポラ目に属する *Stagonosporopsis cucurbitacearum* に近縁であった(図5)。*Stagonosporopsis cucurbitacearum* は、*Didymella bryoniae* の不完全世代(アナモルフ)であり、ウリ科植物蔓枯病菌として知られている⁷⁾。

表2には、代表分離菌株名と系統解析から得られた近縁菌株・近縁参照菌株とそのアクセッション番号、分類門、塩基配列の相同性を示した。なお、グループE, G, I, Kは代表菌株についてITS領域遺伝子を標的としたPCR増幅を行ったが、増幅産物を得られなかったため系統解析を行うことができなかった。これらのグループについてはPCRに用いるプライマー

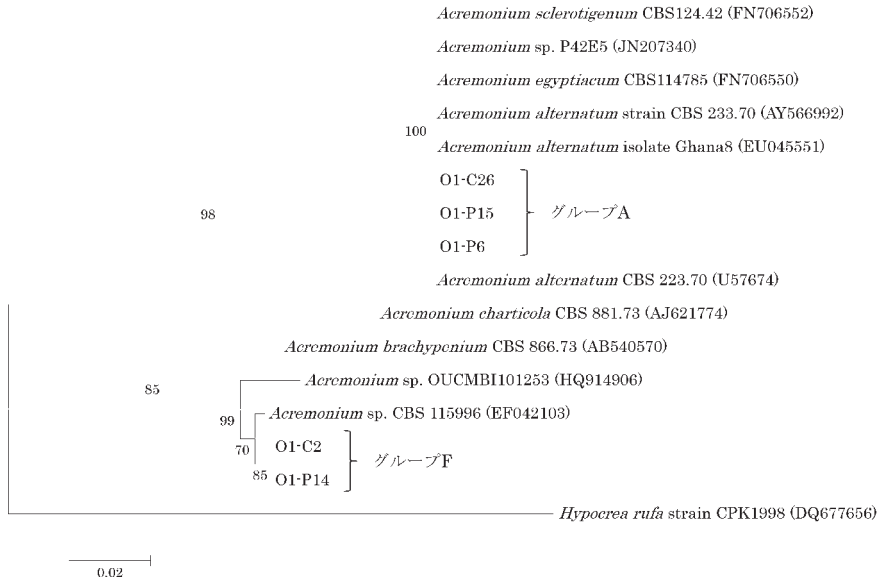


図3 グループAおよびFの代表分離菌株と *Acremonium* 属菌の ITS 領域遺伝子に基づく系統樹。

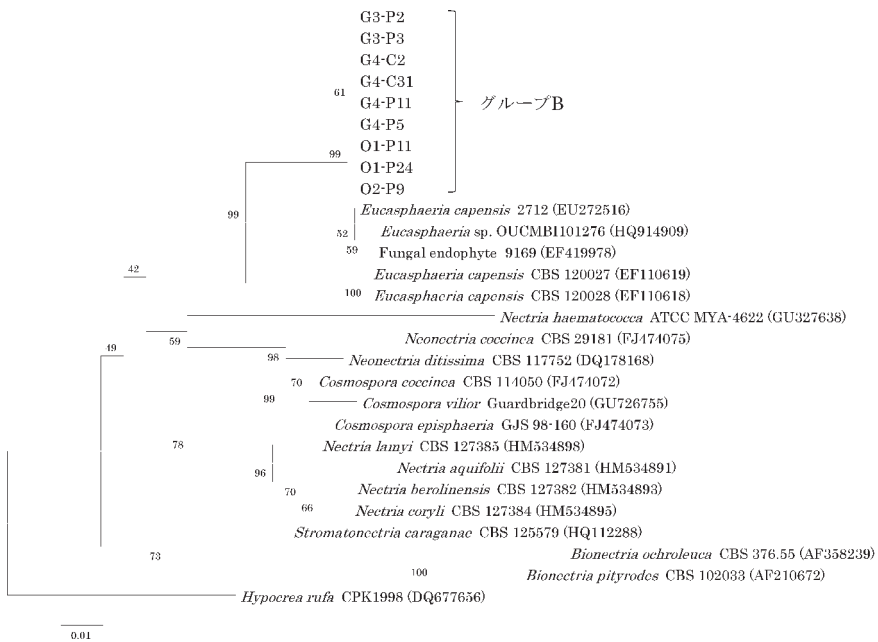


図4 グループBの代表分離菌株とボタntaxケ目に属する近縁属菌との ITS 領域遺伝子に基づく系統樹。

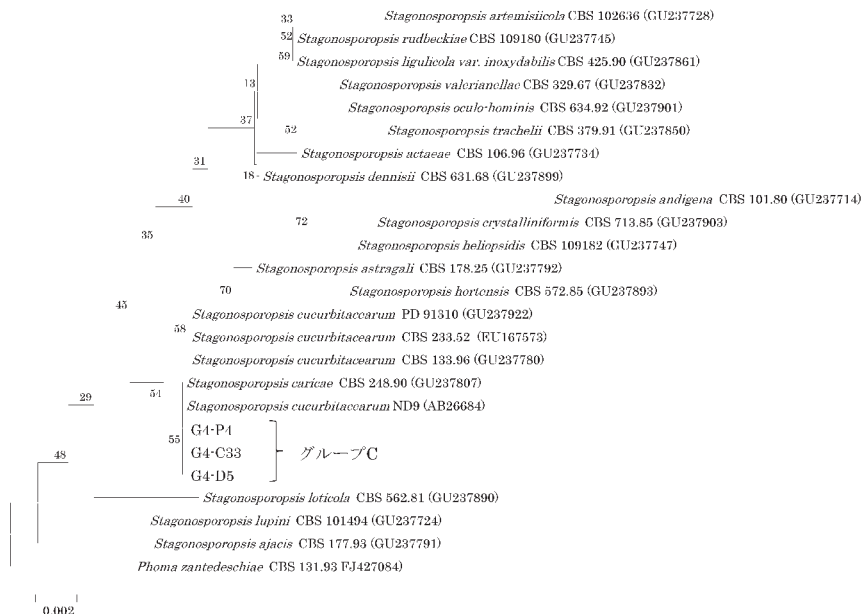


図5 グループCの代表分離菌株と *Stagonosporopsis* 属菌との ITS 領域遺伝子に基づく系統樹。

表2 霧島神宮の胡粉および黄土試料から分離した糸状菌の分類学的性質

グループ名	代表菌株名	近縁菌株・アクセッション番号／近縁参照菌株	相同性 (%)	分類門／目
A	O1-C26, O1-P6, O1-P15	<i>Acremonium</i> sp. P42E5・JN207340／	99-100	子囊菌門／
		<i>Acremonium alternatum</i> CBS223.70・U57674	99	ボタタケ目
B	G3-P2, O1-P24, O2-P9, G4-C2, G4-C31, G3-P3, O1-P11, G4-P11, G4-P5	<i>Eucasphaeria capensis</i> 2712・EU272516／	97-99	子囊菌門／
		<i>Eucasphaeria capensis</i> CBS120027・EF110619	88-91	ボタタケ目
C	G4-C33, G4-P4, G4-D5	<i>Stagonosporopsis cucurbitacearum</i> ND9・AB266846／	98	子囊菌門／
		<i>Stagonosporopsis cucurbitacearum</i> CBS233.52・EU167573	97-98	プレオスボラ目
D	G4-C34, G4-P31, G4-C9	<i>Myrothecium masonii</i> ATCC24426.2・AY254153	97	子囊菌門／ ボタタケ目
F	O1-C2, O1-P14	<i>Acremonium</i> sp. CBS115996・EF042103／	97-98	子囊菌門／
		<i>Acremonium brachyphenium</i> CBS866.73・AB540570	92-	ボタタケ目
H	G3-P1, G3-D1, G3-D2	<i>Penicillium citreonigrum</i> strain 35・EU497942／	99-100	子囊菌門／
		<i>Penicillium toxocarum</i> NRRL35655・EF198663	99-100	ユーロチウム目
J	O1-P1, O1-P27	<i>Pestalotiopsis</i> sp. BRIP25619・AF409991／	98-99	子囊菌門／
		<i>Pestalotiopsis theae</i> MAF752011・AB482210	98-99	クロサイワイタケ目

表3 霧島神宮の胡粉および黄土試料から分離した菌株の生理学的性質

グループ名	代表菌株名	単純三千本膠培 地での増殖	タンパク質分解能		
			ゼラチン液化能		膠液化能
			高層培地での液 化判定	平板培地での Stone 反応判定	
A	O1-C26	+	-	-	+
	O1-P6	+	-	-	+
B	G4-P11	+	+	+	+
	G4-P5	+	+	+	+
C	G4-C33	++	-	-	-
	G4-P4	++	-	-	-
D	G4-C34	+	+	+	+
	G4-P31	+	+	+	+
E	G4-P7	+	+	+	+
	O2-P8	+	+	+	+
F	O1-C2	+	-	-	+
	O1-P14	+	-	-	+
G	G4-D1	+	+	+	+
	O1-D2	+	+	+	+
H	G3-P1	-	-	-	-
	G3-D1	-	-	-	-
I	G4-C18	+	+	+	+
	G4-C27	+	+	+	+
J	O1-P1	++	+	+	+
	O1-P27	++	+	+	+
K	G4-D4	+	+	+	+
	O1-P4	+	+	+	+

を変更するなどさらに検討する必要がある。グループDは、胡粉試料からのみの分離株であり、最も近縁な菌株は *Myrothecium masonii* ATCC24426.2株であった。*Myrothecium* 属は子囊菌門のボタタケ目に属し、地理的な分布が世界中に広域であり、全国に分布する⁸⁾。また、セルロースの分解能を有する菌種が含まれ、有機物含量の多い土壤に広く分布する⁹⁾。グループFは、子囊菌門のボタタケ目に属する *Acremonium* sp. CBS115996株に最も近縁な菌株であった。先述の通り、このグループのすべての菌株は黄土試料からの分離株であった。グループAと同属であるが、詳細な系統解析の結果、種レベルで異なることが示唆された。グループHは、DG-18培地から2株分離されており、耐乾性を有していると推察される。近縁種の *Penicillium citreonigrum* は、動物に対して強い神経性の毒素 Citreoviridin を産生することで知られている¹⁰⁾。グループJは、*Pestalotiopsis* sp. BRIP25619株が最も近縁であり、参照株としては輪紋葉枯病菌である *Pestalotiopsis theae* MAFF752011株が近縁であった。

3-4. 分離菌株の生理学的性質

三千本膠の利用性試験では、グループHを除くすべてのグループの代表菌株で増殖が認められた。これは、分離された環境である胡粉・黄土塗装部に三千本膠が使用されていたことを反映する結果であると考えられる。グループHの菌株は、三千本膠の利用性が認められなかったが、分離菌株の出現頻度の低さから推察すると膠以外の有機物（微生物の死菌体や空気中の塵や埃など）を利用していただけ、胞子の状態で試料に付着していたことなどが考えられる。グループCは、増殖の比較対象とした1/2CMMYA培地より菌集落の面積が大きいという結果になったが、この点については後述する。

ゼラチン液化試験では、高層培地で培養した後に液化を判定する方法と、平板培地で培養した後に硫酸アンモニウム飽和水溶液を滴下して、培地色調の変化で判定する方法の2つを試みた。その結果、本研究での培養条件では、後者の方法がより短期間（5日間）で判定可能であった。両者の結果は一致したが、前者の高層培地での方法は短期培養（5日間）ではゼラチン分解活性の高い対象のみ陽性判定が可能性であった。さて、ゼラチン液化能が認められたグループは、グループB, D, E, G, I, J, Kであった。膠液化試験では、ゼラチン液化能が陽性だったグループに加えてグループAとFにも液化活性が認められた。これは、ゼラチンと膠では、構成する有機物が若干異なることに起因すると推察される。膠液化試験での結果を採用すると、グループC, Hを除くすべてのグループに膠液化能が認められた。膠液化能の陽性のグループは、塗装部分の顔料を支持している膠のタンパク質を分解することで、顔料の剥落などを引き起こす劣化要因微生物と考えられる。特にグループDとGは、高層培地で有意なゼラチン液化能を示したことから、タンパク質分解能が非常に強い菌群であるため、物理的な劣化の原因菌として重要である。興味深い点として、グループCは、ゼラチンおよび膠液化試験で陰性であったにもかかわらず、単純三千本膠培地での増殖が極めて良好であったことである。これらのグループは直接、膠のタンパク質を分解する可能性は低いと考えられるが、塗装表面で増殖することで景観を損ねるため、広義の劣化微生物として重要である。三千本膠に含まれる物質で、これらのグループの増殖に寄与する物質の特定が今後の課題である。

4. まとめ

本稿では、霧島神宮の渡廊下、登廊下および拝殿で施工された伝統的な胡粉・黄土塗装の部位で広範囲に渡り微生物汚染が起こったことを受けて、その原因となった微生物と微生物が塗装部位に与える影響を推察することを目的として調査研究を行った。試料採取時の目視観察と

採取試料の実体顕微鏡観察から、塗装部位の微生物汚染は糸状菌に因るものであり、胡粉試料では灰色菌糸を有する糸状菌、黄土試料では白色菌糸を有する糸状菌の分布が認められた。各試料から直接接種法にて133株の糸状菌を分離し、菌集落の形態から11グループに分類して、分類学・生理学的解析を行なった。分類学的解析の結果、グループA（近縁種：*Acremonium alternatum*）、B（近縁種：*Eucasphaeria capensis*）、C（近縁種：*Stagonosporopsis cucurbitacearum*）の3つのグループは、分離菌株数の出現頻度から優占菌群である可能性が高く、霧島神宮における胡粉および黄土塗装部の微生物劣化に関して特に重要であると考えられた。また、生理学的解析の結果、膠液化試験でグループC、Hを除くすべてのグループに膠液化能が認められた。膠液化能の陽性のグループは、塗装部分の顔料を支持している膠のタンパク質を分解することで、顔料の剥落などといった物理的な劣化の原因菌として重要である。グループCは、膠液化試験が陰性であったが、単純三千本膠培地での増殖が極めて良好であり、微生物汚染の原因菌のひとつとして推定された。今後、分離菌株のより詳細な解析を行い、伝統的な胡粉および黄土塗装における微生物劣化の予防や防除対策の検討を進める予定である。

参考文献

- 1) 森井順之, 佐藤嘉則, 間瀬創, 木川りか, 太田英一, 中別府良啓, 中山俊介, 川野邊渉: 霧島神宮における塗装劣化要因の解明とその対策の検討, 保存科学, 51, 249-259 (2012)
- 2) Sato, Y., Nishihara, H., Yoshida, M., Watanabe, M., Rondal, J.D. and Ohta, H.: Occurrence of hydrogen-oxidizing *Ralstonia* species as primary microorganisms in the Mt. Pinatubo volcanic mudflow deposit, *Soil Science and Plant Nutrition*, 50, 855-861. (2004)
- 3) Sato, Y., Nishihara, H., Yoshida, M., Watanabe, M., Rondal, J.D., Concepcion, R.N. and Ohta, H.: *Cupriavidus pinatubonensis* sp. nov. and *Cupriavidus laharis* sp. nov., novel hydrogen-oxidizing, facultatively chemolithotrophic bacteria isolated from volcanic mudflow deposits from Mt. Pinatubo in the Philippines, *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, 56, 973-978. (2006)
- 4) 日本放線菌学会編: 『放線菌の分類と同定』日本学会事務センター, pp.37-47. (2001)
- 5) Stone, R.V.: A Cultural Method for Classifying Staphylococci as of the "Food Poisoning" Type, *Proceedings of Society for Experimental Biology and Medicine*, 33, 185-187. (1935)
- 6) Crous, P.W., Mohammed, C., Glen, M., Verkley, G.J.M. and Groenewald, J.Z.: *Eucalyptus* microfungi known from culture. 3. *Eucasphaeria* and *Symptoventuria* genera nova, and new species of *Furcospora*, *Harknessia*, *Heteroconium* and *Phacidiella*, *Fungal Diversity*, 25, 19-36. (2007)
- 7) Aveskamp, M.M., Gruyter, J., Woudenberg, J.H.C., Verkley, G.J.M. and Crous P.W.: Highlights of the *Didymellaceae*: A polyphasic approach to characterise *Phoma* and related pleosporalean genera, *Studies in Mycology*, 65, 1-60. (2010)
- 8) 宇田川俊一, 椿啓介ほか: 『菌類図鑑 下』講談社, pp.1071-1072. (1978)
- 9) Barron, G.L.: *The Genera of Hyphomycetes from Soil*, The Williams & Wilkins, (1968)
- 10) Purchase, I.F.H.: *Mycotoxins*, Elsevier, (1974)

キーワード: 微生物劣化 (microbial deterioration); 糸状菌 (fungi); 霧島神宮 (Kirishima Shrine); 膠 (animal glue); 胡粉 (*Gofun*: oyster shell white); 黄土 (*Odo*: yellow ochre)

Phylogenetic and Physiologic Characteristics of Fungal Strains Isolated from Traditional Coating Materials Used at Kirishima Shrine

Yoshinori SATO, Masayuki MORII, Rika KIGAWA, Hidekazu OHTA*,
Yoshihiro NAKABEPPU*², Shunsuke NAKAYAMA
and Wataru KAWANOBE

Many historic and culturally important objects are at risk of bio-deterioration. Especially, organic materials such as paper, wood and animal glue are often used as traditional materials and are, in general, more easily damaged by microorganisms than inorganic or artificial materials. In case of the microbial deterioration of wall coating materials with animal glue used at Kirishima Shrine, rapid fungal growth was found over a wide area within a few months after coating.

The aim of this study was to isolate the causative fungal strains and examine their phylogenetic and physiologic characteristics, information of which will contribute to countermeasures for fungal growth on the coating material at Kirishima Shrine.

A total of 133 strains isolated from *gofun* (oyster shell white) and *odo* (yellow ochre) by using direct inoculation methods were classified into 11 groups. The phylogenetic and physiologic characteristics of representative strains of each group were analyzed. Representative strains of groups A, B and C were closely related to *Acremonium alternatum*, *Eucasphaeria capensis* and *Stagonosporopsis cucurbitacearum*, respectively. Representative strains of all groups except for groups C, H and J were capable of hydrolyzing animal glue, which seems to be an important enzymatic activity for physical and chemical deterioration of coating materials with animal glue. On the other hand, groups C and J were able to grow more rapidly on simple glue agar medium than on cornmeal agar medium. These results suggest that groups C and J were also important for the indirect bio-deterioration of the coating materials used at Kirishima Shrine.

*The Japanese Association for Conservation of Architectural Monuments

*²Kirishima Shrine