

令和5年度 修士論文

龍河洞内部の照明によって  
形成される微生物群集

The impact of artificial lighting on microbial communities in Ryugado cave

高知工科大学 環境理工学群

生命科学コース

1265080 濱田 敵那

指導教員 堀澤栄教授

## 目次

1. 概要
2. 緒言
3. 実験方法
  - 3-1. クローニング法による微生物種の判定
    - 3-1-1. 試料
    - 3-1-2. DNA の抽出
    - 3-1-3. PCR による DNA 増幅
    - 3-1-4. in fusion クローニング法による塩基配列の決定
    - 3-1-5. 微生物種の判定
  - 3-2. 微生物の単離
    - 3-2-1. 希釈平板法による分離
    - 3-2-2. PCR による DNA 増幅
    - 3-2-3. 微生物の塩基配列の決定
  - 3-3. メタゲノム解析による微生物群集の検討
    - 3-3-1. 試料
    - 3-3-2. DNA の抽出
    - 3-3-3. PCR による DNA 増幅
  - 3-4. UV 殺菌試験
4. 結果
  - 4-1. クローニング法による微生物種の判定結果
  - 4-2. 微生物の単離結果
  - 4-3. メタゲノム解析結果
    - 4-3-1. 群集解析結果(バクテリア門)
    - 4-3-2. 群集解析結果(真菌属)
  - 4-4. UV 照射結果
5. 考察
6. 結論
7. 謝辞
8. 文献

## 1. 概要

龍河洞は、高知県香美市にある国指定の天然記念物で石灰岩層の中に形成された鍾乳洞である。昭和 27 年に観光客用に蛍光灯の照明が導入された。照明が当たるところにコケなどが発生し、壁面の着色が問題となった。それらを解決しようと平成 25 年に照明を LED に切り替えることにより光量を減少させる処置がとられ、それまで使用していた蛍光灯よりも光照射の角度が狭くなったため、光が当たっている場所では面積あたりの光量が増加した。これにより更にコケなどの繁殖を促進してしまったと考えられた。洞窟壁面を保存するために着色生物の防除策を講じることとなり、光の波長を限定する試みが行われた。この実験で照明のフィルターの色や光の強さを調節することで、コケなどの発生を軽減できることが確認された。一方で、洞窟内壁に着色や劣化をもたらす原因はまだ明らかでは本研究では、龍河洞の観光通路付近に発生する微生物群集を調査し、それらの除去および発生防止策につなげることとした。

### 〈試料・方法〉

龍河洞内の観光コース約 1km のうち、照明によって変色した壁面や床の 13 箇所において、滅菌された綿棒でこすりとって採取した。綿棒 DNA を抽出し、バクテリア、真菌類、植物類を検出するバーコードを用いて、微生物・植物の多様性を解析した。また綿棒の付着物を培養し、培地上に出現したコロニーを単離した。他にもバクテリア、真菌類を検出するバーコードを用いて微生物群集構造を解析した。

### 〈結果と考察〉

龍河洞内では、さまざまなコケ類、カビ類、藻類が検出された。その中でも青色の照明が当たっている場所付近では粘液細菌や光合成生物の仲間であるグラム陽性菌類、青紫色色素を生産する微生物が検出された。このような色素を持った生物が龍河洞の壁面着色の原因であると考えられる。これらの着色生物は、洞窟に出入りする水や人間によって持ち込まれたと推測される。よって、これらの防除または発生防止策のためには単離した微生物を用いて、光に対する増殖特性を検討する必要がある。

## 2. 緒言

龍河洞は高知県香美市にあり、中生代初期、二億二千万年ほど前の石灰岩層の中に形成された鍾乳洞である。総延長は2150mに及び、国指定の天然記念物である。日本の三大鍾乳洞の一つにされている。調査研究が開始された当時、龍河洞に対する地域住民の関心意識は高かったため、龍河洞が発見されて直ぐに保勝会が設立された。龍河洞を観光施設とするため、地域住民が中心となって環境設備がすすめられた。昭和27年に全国で初めての試みとして観光用通路約1kmに蛍光灯の照明が導入された。昭和48年には、高知県が誇る観光地となった。

しかし、観光化されて来訪者が増加すると、蛍光灯の照射部にコケなどの繁殖がみられ、内壁の変色という問題が生じた。その対処策として、平成25年12月に従来の蛍光灯からLEDに切り替わった。それは、蛍光灯に比べて発熱が小さく、コケなどの繁殖が抑制されると考えられたからである。しかし、一か所に集中的に当たる光量が増加したため、コケなどの繁殖がさらに顕著になった。そこで龍河洞保存会よりコケ類の発生を抑制する技術について高知工科大学へ相談があった。そして、発生したコケに対して光の波長を調整するなどとした試みが行なわれた[1]。これにより、コケについては発生が軽減された。しかし、その他の付着物に対しては、原因生物が不明だったため、光の波長を調節するだけでは解決することが難しいと考えた。このような経緯で、光の波長を調整する方法の他に壁面を損傷しない方法の開発が求められた。そこで本研究では、変色した龍河洞内壁部分を綿棒で拭き取って回収し、回収できたコケ類または微生物類の種を調査することとした。そして、微生物類の多様性を特定して内壁を変色させた微生物類を検討し、防除または発生防止策を考えることとした。

### 3.実験方法

#### 3-1.クローニング法による微生物種の判定

##### 3-1-1.試料

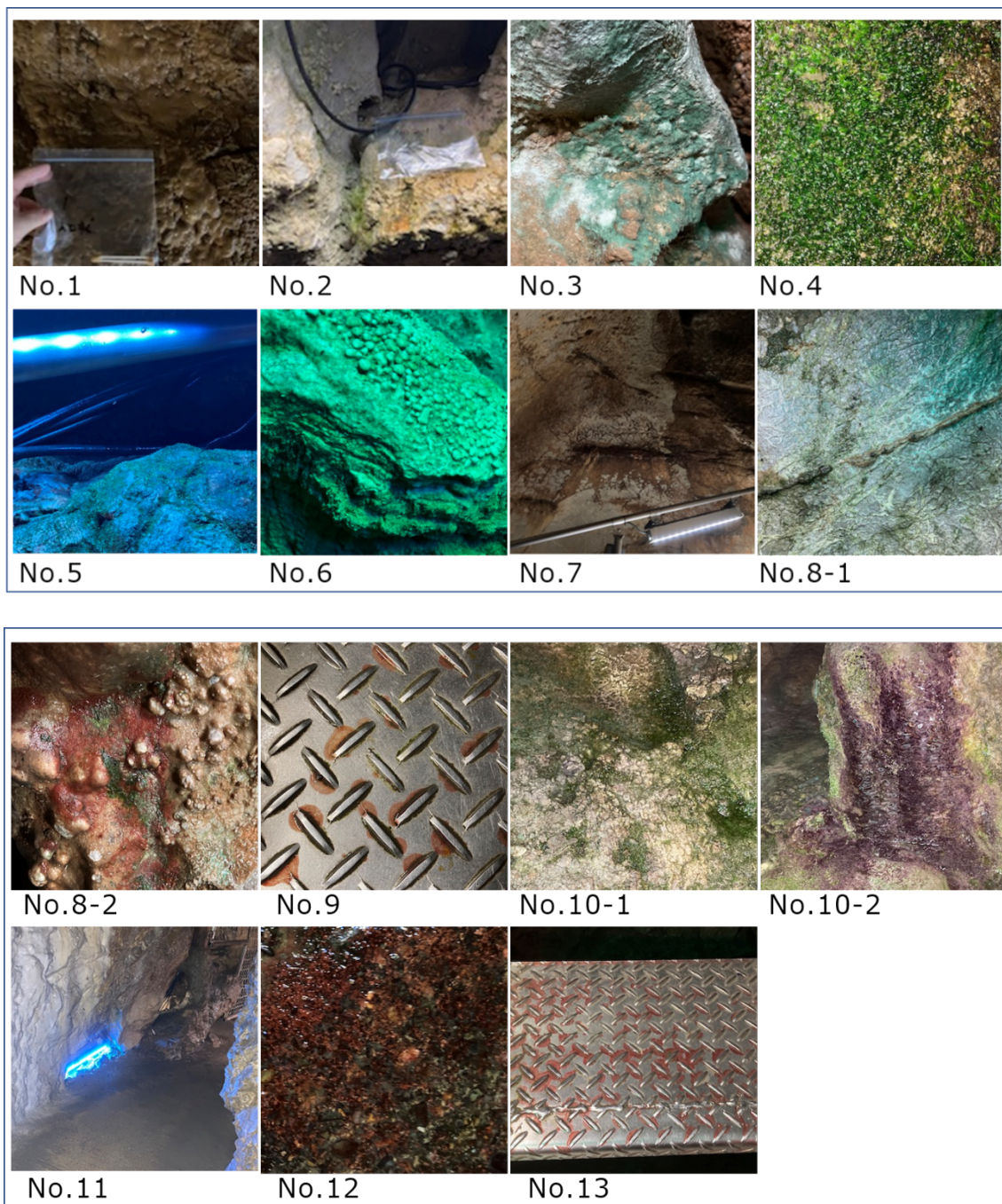


図1. クローニング法による微生物種の判定に用いた試料(No.1 - No.13)



### 3-1-2. DNA の抽出

上記で壁面や床を拭き取った綿棒の先端をピンセットで適量を採取して、1.5mlPP チューブに入れた。コケなどの場合は、葉を適量入れた。NucleoSpin Tissue XS (TakaraBio, 滋賀)を用いて DNA を抽出した。試料の入ったチューブに Lysis Buffer T1 80 $\mu$ L (綿棒などの固形物が多い場合は 160 $\mu$ L)、proteinase K 8 $\mu$ L を加えて、56°Cで 1 時間、加温処理した。その後、Lysis Buffer B3 80  $\mu$ L (綿棒などの固形物が多い場合は 160  $\mu$  l)、70°Cで 5 分間加熱処理した。ここに、エタノール 99%を 80 $\mu$ L 注いで、5 分遠心(15,000 rpm, 20°C)した。遠心後、上清を回収し、カラムをつけたチューブに移した。1 分間遠心(15,000rpm, 20°C)を行い、wash buffer B5 を 50 $\mu$ l 用いた沈殿の洗浄工程を 2 回繰り返した。2 分遠心(1500rpm,20°C)を行い、カラムを新たなチューブに移し、その上から TE を 20 $\mu$ l 入れて 1 分遠心(15,000 rpm, 20°C)を行い、DNA を再溶解した。

### 3-1-3. PCR による DNA 増幅

上記で抽出した DNA が PCR に適した量と質であるかどうか確認する目的で、ユニバーサルプライマーを用い、抽出 DNA をテンプレートとして、Tks Gflex DNA Polymerase(タカラバイオ、滋賀)を用いて PCR を行った。検出が困難だったときは、MightAmp DNA Polymerase(タカラバイオ、滋賀)を PCR キットとして用いて行った。さらに 1 度の PCR では増幅が見られなかったため、1stPCR 産物を鋳型として 2ndPCR を行った。また、一部の試料においては、2ndPCR でうまく増幅配列が得られないものもあり、その場合は Ex-taq(タカラバイオ、滋賀県)を用いて 2 ndPCR を行った。微生物の検出のバーコード配列として、細菌を対象とした 16s rDNA の部分的な領域[2]、植物の葉緑体を対象とした rbcLa 領域[3]、真菌類を対象とした rDNA の internal transcribed spacer(ITS)領域[4]を増幅させる目的の配列とした。16s rDNA 領域の 1stPCR では、27F と 1492R のプライマーペア、2ndPCR では、inf 341F と inf 907R のプライマーペアを用いた。rbcLa 領域の 1stPCR では、rbcLa 52F と rbcLa 893R のプライマーペア、2ndPCR では、inf rbcLa\_F と inf rbcLa\_R のプライマーペアを用いた。ITS 領域の 1stPCR では NS7 と NL4 のプライマーペア、2ndPCR では inf ITS1 と inf ITS4 のプライマーペアを用いた。プライマーの配列リストを表 1 に示す。

表1 プライマーリスト

名前	目的遺伝子	配列 (5'→3')
27F	原核生物 16s rDNA	AgAgTTTgATCMTggCTCAg
341F	原核生物 16s rDNA	CCTACgggAggCAgCAg
907R	原核生物 16s rDNA	CCgTCAATTCCTTTgAgTTT
1492R	原核生物 16s rDNA	TACggYTACCTTgTTAcgACTT
NS7	真核生物 18s rDNA	gAggCAATAACAggTCTgTgATgC
NL4	真核生物 28s rDNA	ggTCCgTgTTTCAAACgACgg
Inf-ITS1	真核生物 ITS 領域	ATCCTCTAgAGTCgACCTACgggAGgCAgCAg
Inf-ITS4	真核生物 ITS 領域	TTgCATgCCTgCAggCCgTCAATTCATTTgAgTTT
rbcLa_F	RuBisCO	ATgTCACCACAAACAgAgACTAAAgC
rbcLa_R	RuBisCO	gTAAAATCAAGTCCACCRCg
F52	RuBisCO	gTTggATTCAAAGCTggTgTTA
rbcL 893R	RuBisCO	TgCATKgCACgRTgIATRTg

#### 3-1-4. in fusion クローニング法による塩基配列の決定

上記で得られた PCR 産物を Nucleospin Gel and PCR clean-up(タカラバイオ)を用いて、DNA 精製を行った。その後、精製した DNA を In-Fusion® HD Cloning Kit (タカラバイオ, 滋賀)を用いてプラスミドに挿入し、大腸菌 E.coli (JM109 株)に導入した。大腸菌の形質転換体を作成し、液体培養によって増殖した菌体より、Plasmid Miniprep System (promega, WI) を用いて、目的の配列を含むプラスミドを抽出した。

#### 3-1-5. 微生物種の判定

得られた塩基配列をもとに、生物情報データベースに登録されている塩基配列情報を BLAST(-NCBI)検索して相同性の高いもの(90%以上)の登録情報より生物種の同定を試みた。

### 3-2. 微生物の単離

#### 3-2-1. 希釈平板法による分離

5ml の滅菌チューブに miliQ 水 2ml を入れた。そこに拭き取って採取した綿棒の先端を適量入れた。この微生物懸濁液を原液として、10 倍および 100 倍まで希釈懸濁液を調製した。それぞれ所定の量を 1/10 LB 寒天培地 (Trypton 0.1%; Yeast Extract 0.05%; NaCl 0.1%; Agar 1.5%) に塗布して室温で培養した。1/10 濃度の LB 寒天培地を用いたのは、龍河洞内は常時水流によって栄養濃度が低いと考えたことから、龍河洞内の環境に近い状況にした。そして、培地内に発生したコロニーは、さまざまな生物が混在しているため、明らかに単独

のコロニーを取り出して継代培養を繰り返し、純粋培養を得たところで DNA 配列に基づいて種を特定した。

### 3-2-2. PCR による DNA 増幅

上記で得られた単離コロニーを用いて、Tks Gflex DNA Polymerase(タカラバイオ)を用いたダイレクト PCR を行った。16s rDNA 領域を増幅目的配列とし、27F と 1492R のプライマーペアを用いて、目的遺伝子の増幅を行った。プライマーの配列を表 1 に示す。

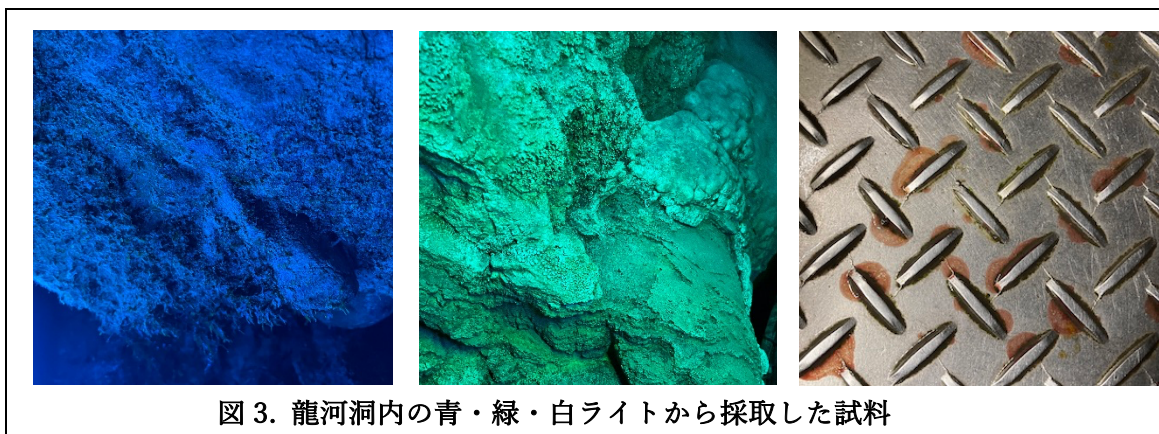
### 3-2-3. 微生物の塩基配列の決定

上記で目的遺伝子が確認できたら、Nucleospin Gel and PCR clean-up(タカラバイオ)を用いて、DNA 精製を行った。一部の試料においては、目的遺伝子が確認できなかったため、液体培養を行い、目的遺伝子の増幅を試みた。LB 培養液 (Trypton 4g; Yeast Extract 2g; NaCl 4g)を 2 ml チューブに分注し、上記希釈平板法により、培地内に発生したコロニーで明らかに単独のコロニーを取り出して 37°Cで培養を行った。のちに前述の DNA 抽出と同様に NucleoSpin Tissue XS (Takarabio, 滋賀)を用いて目的遺伝子の抽出を行い、上記の PCR による DNA 増幅を行った。

### 3-3. メタゲノム解析による微生物群集の検討

#### 3-3-1. 試料

龍河洞内には青、白、緑などさまざまライトがあった。ライトの色によって発生する微生物群集構造は異なるのではないかと考えた。そのため、図3のように左側から青、緑、白ライトからそれぞれ一か所ずつ、綿棒で壁面や床面を拭き取った。コケが生えていた場所は、壁面を傷つけないようにピンセットで付着物を採取した。採取日は、2022年6月であった。図4の6か所は、ライトの色には着目せずに採取した。採取日は、2023年6月であった。図3と図4の解析を行い、微生物群集構造に違いを検討することとした。



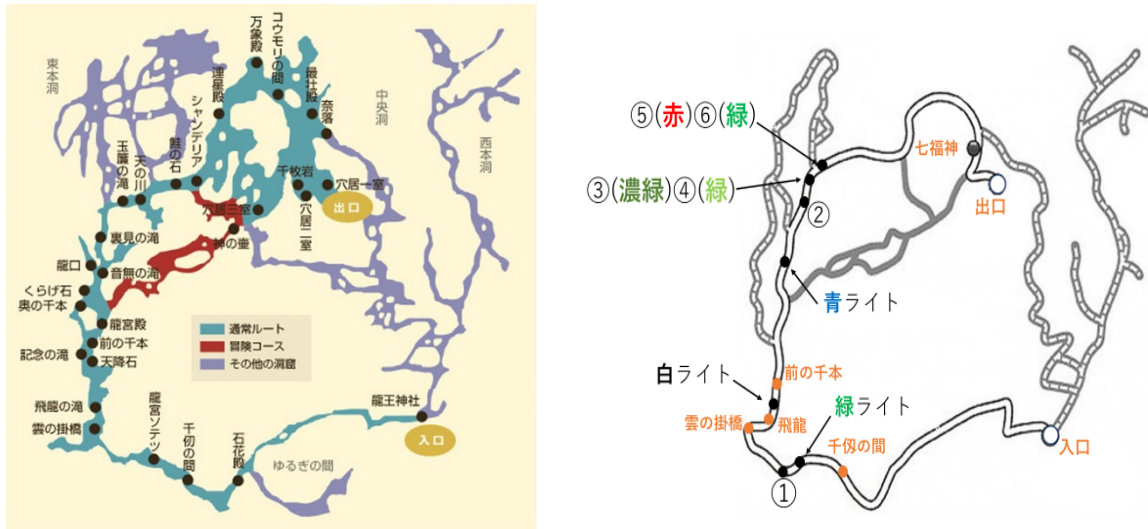


図5 龍河洞の観光ルート（左）および試料採取

### 3-3-2. DNA の抽出

上記で床や壁面を綿棒で拭き取り、綿棒先端を適量プラスチックチューブに入れた。コケの場合、葉をそのままプラスチックチューブに入れた。NucleoSpin Tissue XS (Takara Bio, 滋賀)を DNA 抽出キットとして使用した。綿棒先端の入ったチューブに Lysis Buffer T1 80  $\mu$ L、proteinase K 8  $\mu$ L を用いて必要な DNA を取り出しやすいようにした。次に 56°C で 1 時間。加温処理を行った。その後、Lysis Buffer B3 80  $\mu$ L を入れて、70°C で 5 分加熱処理を行った。更に、エタノール 99% 80  $\mu$ L を加えて 5 分遠心(1500 rpm, 20°C)した。遠心後、上清を取り出し、カラムをつけたチューブに入れた。1 分遠心(1500 rpm, 20°C)を行い、wash Buffer B5 50  $\mu$ L を用いて沈殿の洗浄工程を 2 回繰り返した。2 分遠心(1500 rpm, 20°C)を行い、カラムだけを新たなチューブに移した。その上から TE 20  $\mu$ L を入れて 1 分遠心(1500 rpm, 20°C)を行い、DNA を再溶解した。

### 3-3-3. PCR による DNA 増幅

上記で抽出した DNA の品質を確認するために、Tks Gflex DNA Polymerase(タカラバイオ, 滋賀)およびユニバーサルプライマーを用いて PCR を行った。微生物の検出および同定のために、細菌を対象とした 16s rDNA の部分的な領域、真菌類を対象とした rDNA の internal transcribed spacer (ITS)領域を増幅させる目的の配列とした。16s rDNA 領域で 27F と 1492R のプライマーペア、ITS 領域で NS7 と NL4 のプライマーペアを用いて DNA 増幅を確認した。目的遺伝子が確認できたら、16s rDNA 領域の V3V4-F と V3V4-R のプライマーペア、ITS 領域の ITS4-MIX と gITS7-MIX のメタゲノム用プライマーペアを用いた。しかし、ほとんどの試料に目的遺伝子が確認できなかったため、16s rDNA 領域 27F と 1492R のプライマーペア、ITS 領域で NS7 と NL4 のプライマーペアを用いた 1stPCR 産物

を鋳型とし、2ndPCR を 16s rDNA 領域の V3V4-F と V3V4-R のプライマーペア、ITS 領域の ITS4-MIX と gITS7-MIX のメタゲノム用プライマーペアを用いた。ライブラリ調製の 2nd PCR 以降および Miseq を用いた配列解析は、生物技研株式会社に委託した。

#### 3-4. UV 殺菌試験

薬剤などは使用せず、内壁を傷つけない方法として、殺菌効果のある UV で照射試験を行った。微生物の単離を行った時と同様に希釈平板法を用いて 10 倍から 1000 倍まで希釈したものを 1/10LB 寒天培地(Trypton 0.1%; Yeast Extract 0.05%; NaCl 0.1%; Agar 1.5%) に添付した。添付する際、UV 照射を行うものを行わないもの、それぞれ 3 つずつ添付した。NK 卓上型クリーンベンチの UV ランプを使用した。UV の波長は、253.7nm、ライトからの距離は、約 60cm であった。照射時間は、まず 10 分から 90 分検討した。UV ライト照射の影響により増殖に変化が認められたのが 90 分だったため、以降の照射実験の時間を 90 分に固定した。そして、UV 照射を行ったものを行わなかったもので実施し、室温で培養した。

#### 4. 結果

##### 4-1. クローニング法による微生物種の判定結果

No.1~No.13(図1)の試料から、それぞれ微生物種の判定結果を細菌類(表2)、植物類(表4)、真菌類(表5)に示す。

細菌類(表2)については、光合成を行う *Synechococcales cyanobacterium*, *Rhodocyclaceae* sp., *Rhodoplanes* sp., *Fissidens nobilis*, *Pseudocrossidium replicatum* などが検出された。他には、色素生産する細菌である *Janthinobacterium lividum* が検出された。植物類(表3)については、*Hyophila propagulifera*, *Seligeria austriaca*, *Tuerckheimia svihlae*, *Pottiopsis caespitos* など光合成を行うさまざまなコケ類や植物が検出された。真菌類(表4)については、*Eucampia* sp. *Halamphora calidilacuna*, *Gomphonema parvulum* などの珪藻が検出された。他には、カビ類である *Cladosporium* sp.が検出された。

これらのことから、龍河洞内の各場所で光合成生物が検出されたことから、照明の光によって光合成生物が発生したと推定された。他にもカビ類である *Cladosporium* sp. *Janthinobacterium lividum* 色素生産する細菌が検出されたことから光合成生物だけが着色の原因でないと推定された。また、クローニング法による微生物種の判定では、生物集団の中で最も多く入っているものが検出できたと考えられた。

表2 微生物種の判定(細菌類)

試料名	種名	和名/特徴	identity
No.1	<i>Sphingomonas</i> sp.	スフィンゴモナス	95%
No.1	<i>Acidobacterium</i> sp.	アキドバクテリウム	98%
No.1	<i>Altererythrobacter</i> sp.	エリスロバクター科の細菌属	99%
No.1	<i>Aridibacter famidurans</i>	非運動性細菌	99%
No.2	<i>Fissidens nobilis</i>	ホウオウゴケ	99%
No.2	<i>Pseudocrossidium replicatum</i>	Pottiaceae 科に属するコケ属	99%
No.3	<i>Bacillus idriensis</i>	バシラス属	99%
No.3	<i>Burkholderiales</i> sp.	バークホルデリア属	96%
No.4	<i>Spirosoma endophyticum</i>	内生菌	91%
No.4	<i>Synechococcales cyanobacterium</i>	シネココックス目	94%
No.4	<i>Hyphomicrobium</i> sp.	ヒフォミクロビウム属	97%
No.4	<i>Hydrobacter penzbergensis</i>	キチノファガ科のグラム陰性菌	99%
No.4	Uncultured cyanobacterium	藍藻	99%
No.4	<i>Sphingomonas</i> sp.	スフィンゴモナス	94%
No.8-1	<i>Paenisporosarcina</i> sp.	好冷性細菌	99%

No.8-1	<i>Pseudomonas</i> sp.	シュードモナス	100%
No.10	<i>Pseudomonas</i> sp.	シュードモナス	100%
No.10	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	アシネトバクター属菌	99%
No.11	<i>Rhodocyclaceae</i> sp.	ロドシクルス属	98%
No.11	<i>Haslea salstonica</i>	細菌類	99%
No.11	beta proteobacterium	ベータプロテオバクテリア綱	95%
No.11	<i>Inquilinus</i> sp.	Azospirillaceae 科の細菌属	99%
No.11	<i>Rhodoplanes</i> sp.	光合成細菌	99%
No.12	<i>Pseudomonas</i> sp.	シュードモナス	99%
No.12	<i>Sphingobacterium</i> sp.	スフィンゴバクテリウム	98%
No.12	<i>Janthinobacterium lividum</i>	青紫色素生産する細菌	99%
No.12	<i>Pseudomonas psychrophila</i>	低温性細菌	100%
No.13	<i>Acidobacteria</i> sp.	アキドバクテリウム門	99%
No.13	<i>Sphingomonas</i> sp.	スフィンゴモナス	99%
No.13	Firmicutes bacterium	ファーミキューテス門	91%
No.13	<i>Nocardioides</i> sp.	ノカルジオイド	99%

表3 微生物種の判定(植物)

試料名	種名	和名/特徴	identity
No.3	<i>Hyophila propagulifera</i>	ハマキゴケ	99%
No.3	<i>Seligeria austriaca</i>	サンカクキヌシツポゴケ	98%
No.6	<i>Pottiopsis caespitosa</i>	ポッティア	99%
No.6	<i>Tuerckheimia svihlae</i>	ニセイシバイゴケ	99%
No.8-2	<i>Quercus sessilifolia</i>	ツクバネガシ	100%
No.12	<i>Pseudomonas</i> sp.	シュードモナス	99%

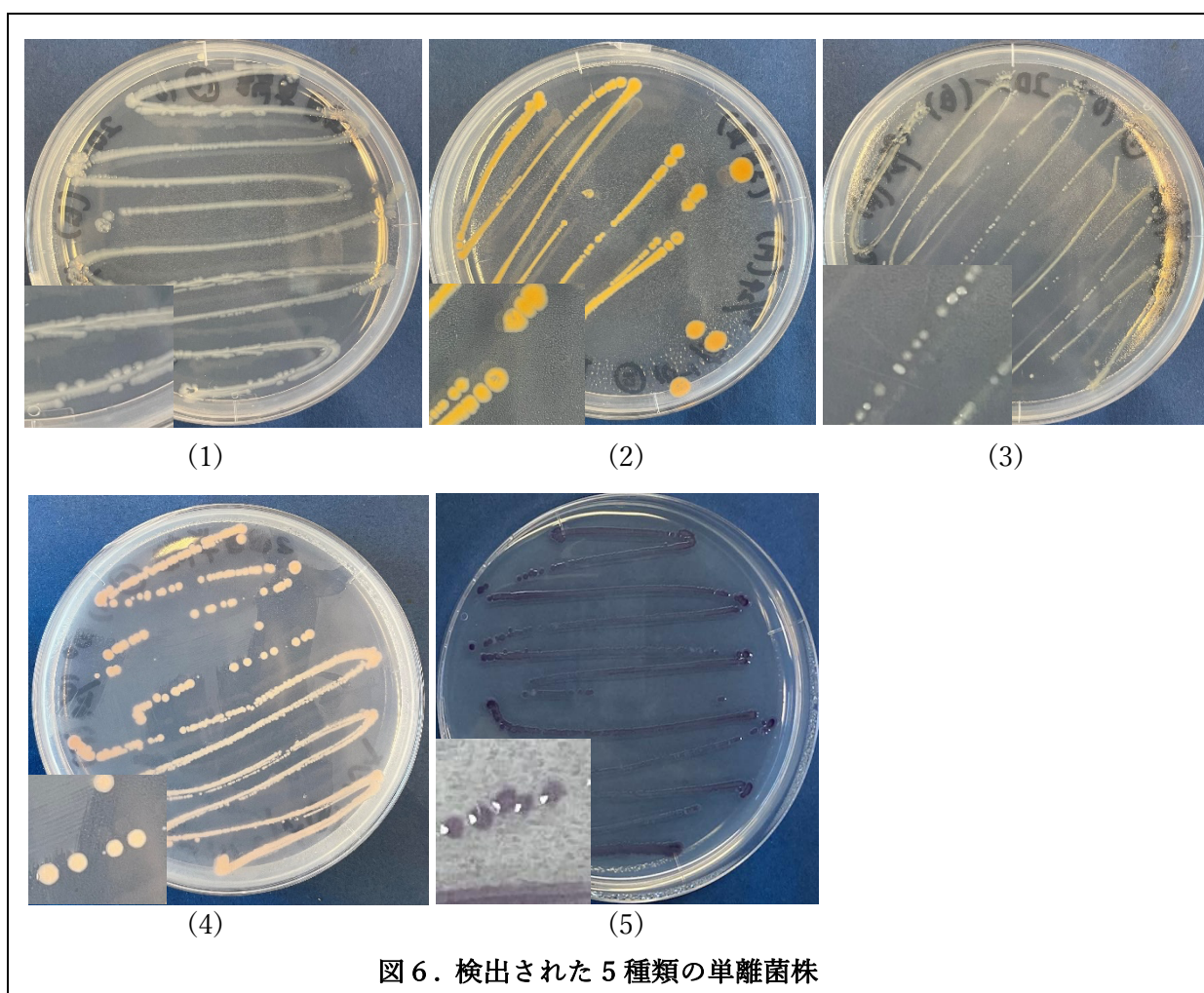
表4 微生物種の判定(真菌類)

試料	種名	和名/特徴	identity
No.3	<i>Gymnopilus penetrans</i>	チャツムタケ属	95%
No.4	<i>Gymnopilus penetrans</i>	チャツムタケ属	98%
No.4	<i>Gymnopilus dilepis</i>	ムラサキチャツムタケ	99%
No.11	<i>Gymnopilus penetrans</i>	チャツムタケ属	95%
No.11	<i>Fleischerobryum longicolle</i>	ナガクビスワゴケ	99%
No.11	<i>Gymnopilus suberis</i>	エビイロチャツムタケ	98%
No.11	<i>Eucampia</i> sp.	珪藻の仲間	98%
No.12	<i>Pseudomonas fragi</i>	シュードモナス	99%
No.12	<i>Gymnopilus</i> sp.	チャツムタケ属	98%
No.12	<i>Halamphora calidilacuna</i>	珪藻の仲間	99%
No.12	<i>Gomphonema parvulum</i>	クサビケイソウ属	98%
No.13	<i>Gymnopilus suberis</i>	エビイロチャツムタケ	98%
No.13	<i>Hypocreales</i> sp.	ボタンタケの仲間	92%
No.13	<i>Cladosporium</i> sp.	クラドスポリウム	99%
No.13	<i>Adineta vaga</i>	ヒルガタワムシの仲間	95%

#### 4-2. 微生物の単離結果

図 4 では、5 種類の単離菌株が検出された。図 6 (1)白色コロニーから *Aeromonas tecta* グラム陰性菌が検出された。(2)黄色コロニーから *Exiguobacterium undae* 桿菌の仲間が検出された。(3)白色コロニーから *Pseudomonas fragi* シュードモナスフラギが検出された。(4)ピンク色コロニーから *Peribacillus muralis* 好気性細菌、(5)紫色コロニーから *Janthinobacterium lividum* 青紫色素生産する細菌が検出された。

また、紫色の付着物から採取した試料から *Janthinobacterium lividum* が検出されたことで一部の紫色の付着物は、青紫色素生産する細菌が原因であることが判明した。しかし、緑色や茶色などの付着物の原因は、特定できなかった。



### 4-3. メタゲノム解析結果

#### 4-3-1. 群集解析結果(バクテリア門)

図3と図4の試料から同定結果を示す。(図7) Alphaproteobacteria の中にリゾビウムが多く存在していた。各場所に共通して検出されたのは Cyanobacteria、植物に共生する種が多く含まれた Rhizobium、好気性の従属栄養生物である Planctomycetes などであった。他の生物から栄養を共有する生物が各場所から検出されたことから光合成生物が影響している可能性が推測された。更に各場所に共通する種が多かったことでライトの色は、群集構造に影響しないことが推測された。

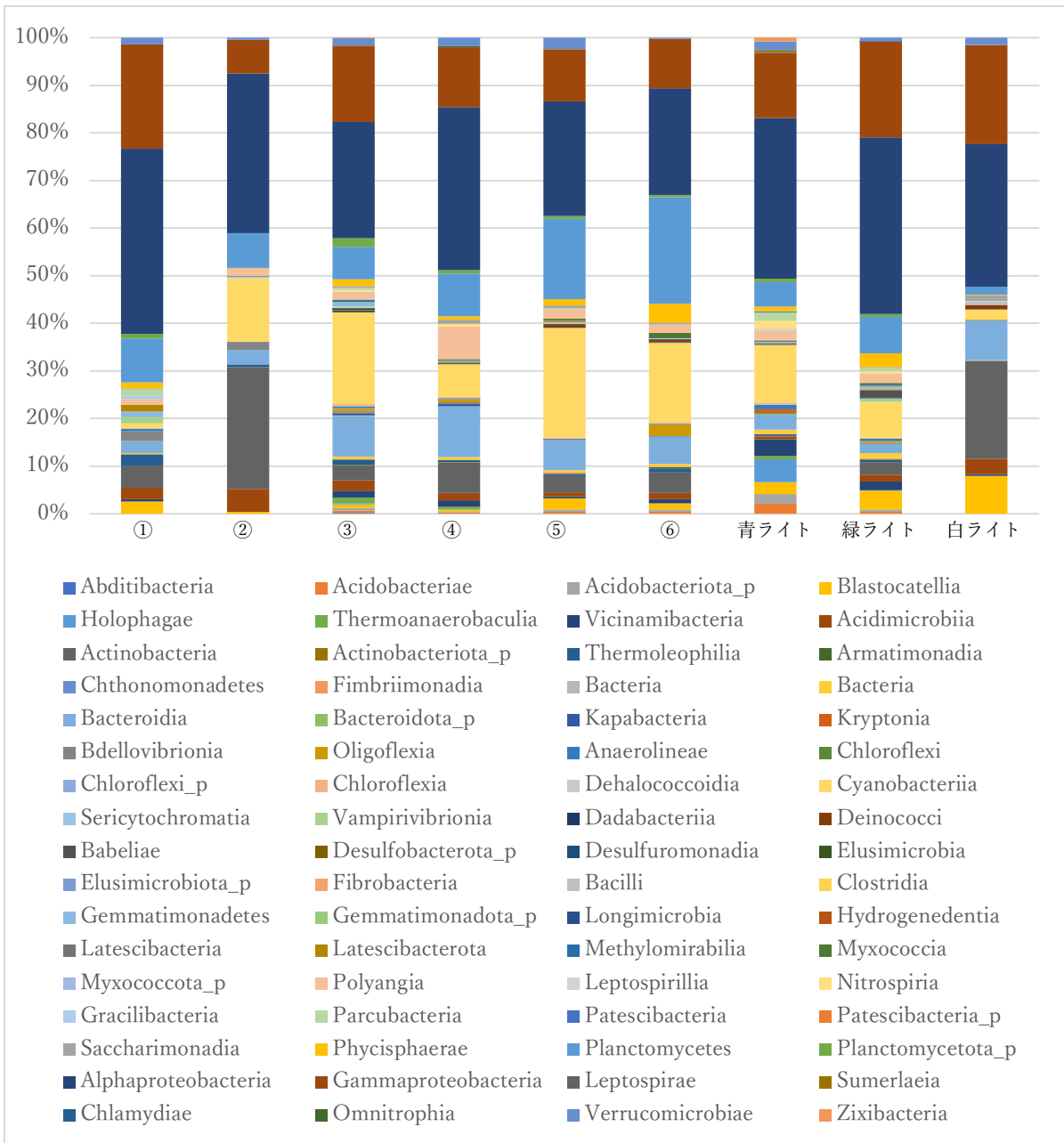


図7. 図3と図4の群集構造(バクテリア門レベル)

#### 4-3-2. 群集解析結果(真菌属)

真菌属では Fungi(界レベル)と不明なものが多かった。他には Cladosporium や Penicillium、Cyphellophora などのカビ類が検出された (図 8)。各場所に共通する種はなかったが、さまざまなカビ類が検出されたことで壁面着色の原因として一部カビが影響することが推測された。

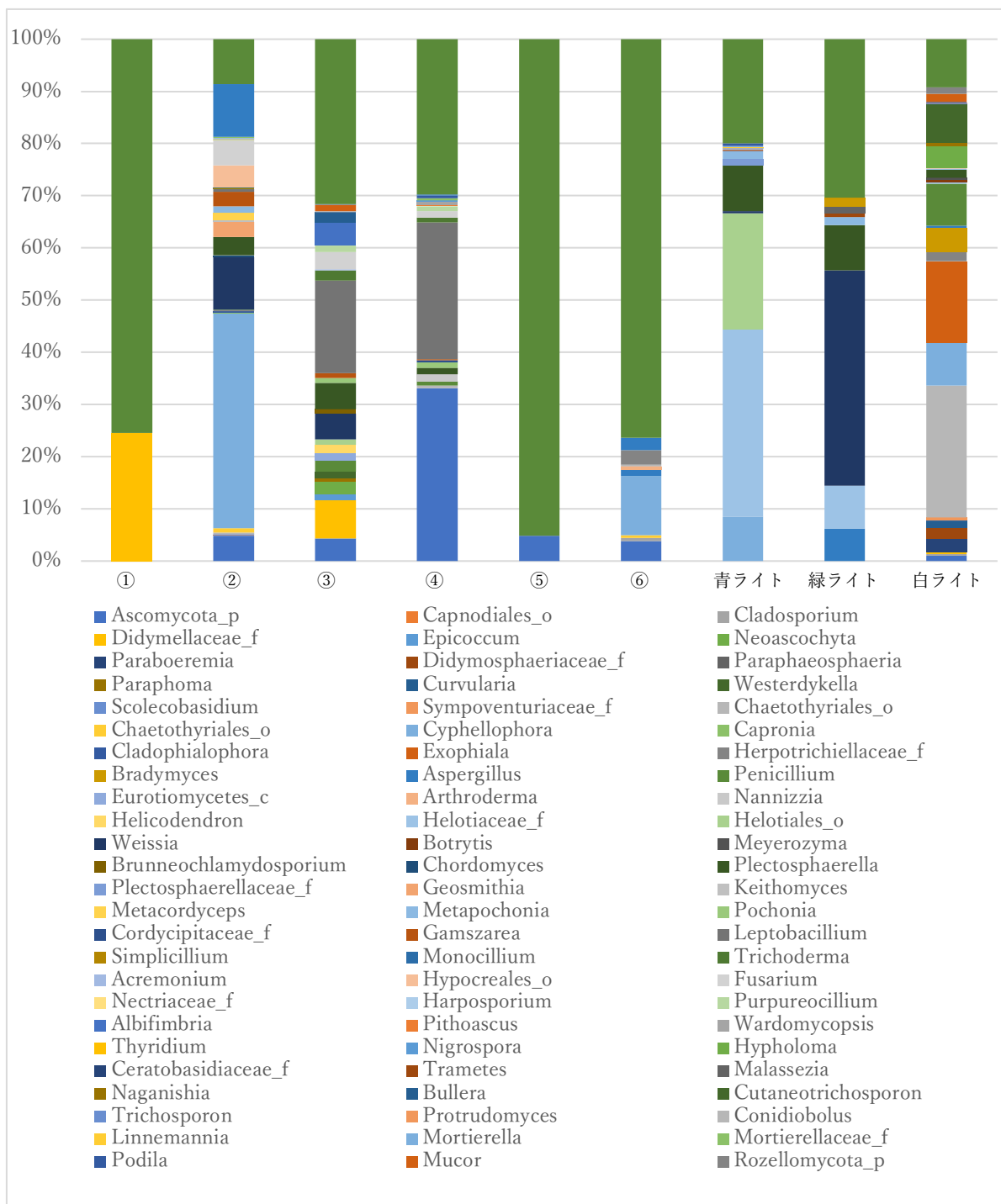


図 8. 図 3 と図 4 の群集構造(真菌, 属レベル)

#### 4-4. UV 照射結果

図9では、*Janthinobacterium lividum* に UV 照射を行った。UV 照射を行わなかった 1/10 寒天培地に不明な黄色のコロニーが混在していた。何度行っても混在していたため、単離が難しいと判断し、そのまま UV 照射を行った。UV 照射後、不明な黄色のコロニーは、約 6.3%減少していた。*Janthinobacterium lividum* は、約 24.5%増殖した。このことから、*Janthinobacterium lividum* は不明な黄色のコロニーと競争関係にあったと考えられた。そのため、UV 照射後、不明な黄色のコロニーが減少したため、*Janthinobacterium lividum* が増殖したと考えられた。図10では、*Peribacillus muralis* に UV 照射を行った。UV 照射を行わなかった培地に *Pseudomonas fragi* が混在していた。UV 照射後、*Peribacillus muralis* はほぼ発生しなかったが、*Pseudomonas fragi* は存在したままだった。図9では、*Exiguobacterium undae* に UV 照射を行った。UV 照射後、変化はあまり見られなかった。

図7, 8, 9 のことから、*Janthinobacterium lividum* , *Pseudomonas fragi* , *Exiguobacterium undae* は耐性が高く、波長 253.7nm の UV は、効果がないことが確認された。また、不明な黄色のコロニー , *Peribacillus muralis* は感受性が高く、効果があることが確認された。

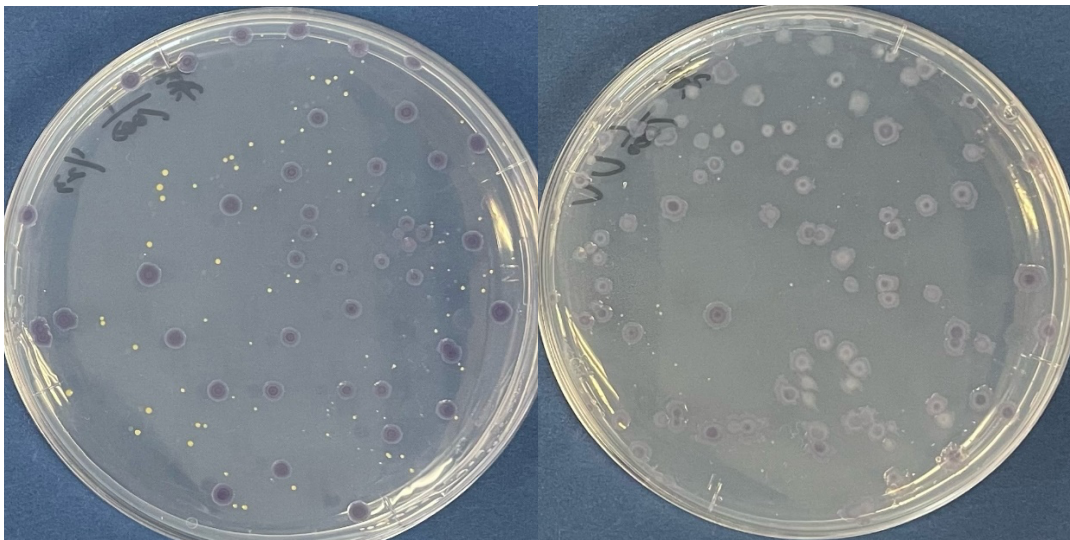


図9. *Janthinobacterium lividum* に対する UV 照射

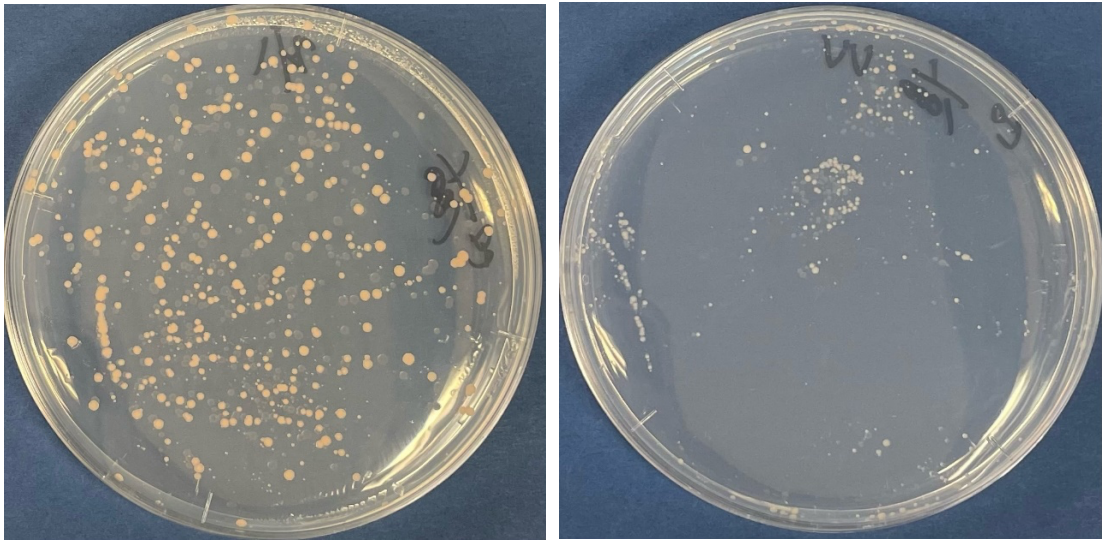


図 8. *Peribacillus muralis* に対する UV 照射

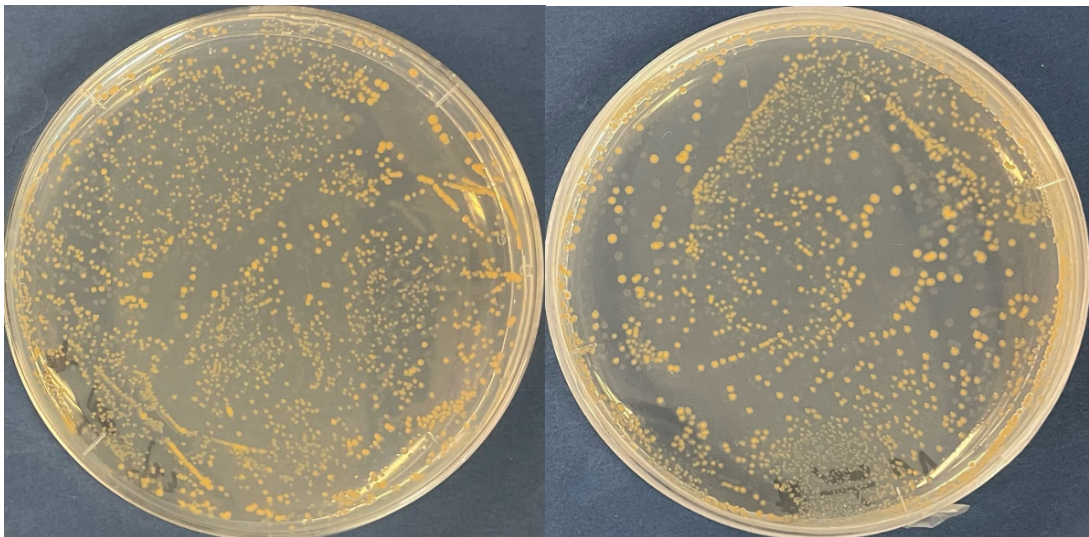


図 10. *Exiguobacterium undae* に対する UV 照射

## 5. 考察

観光に利用される洞窟で、人の出入りによる物質の持ち込み、水や空気の流れによる物質の流入、照明による微生物増殖など洞窟内の環境条件が変化することで、本来の洞窟内に形成された生物群集が影響を受けることは世界的に問題とされている。特に観光用に通路のライトなどによって形成される微生物群集をランペンフロラと呼び、人工的に形成された生物群集として問題となることがある[5-8]。たとえば、壁画などの劣化もこの問題に含まれる。龍河洞の場合も、地下水から流入してくる外界の微生物や、洞窟周辺の生物を観光客が持ち込んだ生物が、観光用の照明を受けて独特の微生物群集を形成してきたと考えられる。したがって、洞窟内壁の着色を防除するためには、洞窟内に形成される生物生態系を理解する必要がある。

微生物種の判定結果から太陽の光が届かない洞窟内で光合成細菌が発見されたことは、照明の光が原因で発生したことが考えられた。また、青色の照明が当たっている場所付近では粘液細菌や光合成生物の仲間であるグラム陽性菌類、青紫色色素を生産する微生物が検出された。このような色素を持った生物が龍河洞の壁面着色の原因の1つであると考えられる。メタゲノム解析から、細菌類では各場所に共通してシアノバクテリア、植物に共生する種を多く含むリゾビウム、好気性の従属栄養生物であるプランクトミケスなどが検出された。これらの機能を持った生物がいたことで光合成生物を軸にさまざまな生物が繁殖し、これらの生物の集団が壁面変色に繋がっていると推測した。真菌類では、クラドスポリウムやペニシリウム、サイプロフォラなどのカビ類が検出された。このことから、壁面着色の原因は一部カビが影響していることが考えられた。そして、UV照射試験では感受性が高く、効果があることが一部分かったが、耐性が高く効果がないものが多かったため UV の波長を変えて発生防止を試みる必要がある。

龍河洞内の着色は、光合成生物と色素を持った生物が壁面変色の原因であると考えられるため、光合成生物には殺菌効果のある UV を検討することで龍河洞内の壁面着色を軽減できると考えた。さらに着色性生物については、洞窟に出入りする水や人間によって持ち込まれたと推定されたため、龍河洞内に出入りする際に靴の裏などの消毒を行うといった対策が考えられる。

## 6. 結論

壁面着色の原因は、色素を持った生物とさまざまな生物の集団が形成された結果である。はじめ、微生物の多様性を調査した中で光合成生物が龍河洞内の各場所から検出されたことから、照明の光によって発生した光合成生物が着色の原因であると考えた。しかし、微生物の単離で青紫色素生産する細菌が検出されたこととメタゲノム解析で各場所に共通して植物に共生する種を多く含むリゾビウム、好気性の従属栄養生物であるプランクトミケスが検出されたこと、クラドスポリウムやペニシリウム、サイフロフォラなどのカビ類が検出されたことで光合成生物だけが原因でないことが確認された。よって、壁面着色の原因は色素を持った生物とさまざまな生物の集団が形成された結果であると推定した。そして、発生防止するには UV の波長を変えて検討する必要がある。また着色性生物は、龍河洞内に出入りする際、靴の消毒を行うことで人が持ち込むことを軽減できると考えられる。

## 7. 謝辞

今回高知の観光地とされる龍河洞の問題を高知工科大学にご相談くださいました龍河洞保存会の皆様、この場をお借りしてお礼申し上げます。とても興味深く、面白い研究が出来ました。

また、本研究のご指導をしていただきました堀澤栄教授、ならびに同研究室の皆様に深く感謝いたします。

## 8. 文献

1. 八田章光, 山本行洋, 堀澤栄, 公文富士夫, 岡村錦一, 永嶋孝之 (2021) 7月, 龍河洞の照明—鍾乳洞におけるコケ繁殖抑制と観光振興の試み—照明学会誌, vol. 105, No.4, pp. 170-175.
2. Lane, D. J. (1991) 16S/23S rRNA Sequencing. In: Stackebrandt, E. and Goodfellow, M., Eds., *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematic*, John Wiley and Sons, New York, 115-175.
3. CBOL Plant Working Group. (2009) DNA barcode for land plant. *PNAS* 106(31), 12794–12797.
4. White TJ, Burns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic, San Diego, pp 315–332.
5. Janez Mulec, Gorazd Kosi (2009) Lampenflora algae and methods of growth control. *J Cave Karst Stud* 71-109.
6. Chiarini V, Duckeck J, De Waele, J (2022) A Global Perspective on Sustainable Show Cave Tourism. *Geoheritage* 14, 82. <https://doi.org/10.1007/s12371-022-00717-5>
7. Kosznik-Kwaśnicka K, Golec P, Jaroszewicz W, Lubomska D, Piechowicz L (2022) Into the Unknown: Microbial Communities in Caves, Their Role, and Potential Use. *Microorganisms* 10(2)-222. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020222>
8. Burgoyne J et al. (2021) Lampenflora in a Show Cave in the Great Basin Is Distinct from Communities on Naturally Lit Rock Surfaces in Nearby Wild Caves. *Microorganisms* 9(6), 1188; <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061188>.
9. 井口亮, 水山克, 頼末武史, 藤田喜久 (2019) 遺伝子解析による琉球列島の海底洞窟性生物群集の多様性と集団形成・維持機構に関する研究の現状と今後の課題, *日本動物分類学会誌* 46:28-33.
10. 龍河洞 60年の歩み (1991) 財団法人龍河洞保存会.
11. 石川重治郎 (1974) 龍河洞, 財団法人龍河洞保存会 p43.

