

市販生ゴミ処理剤から分離した *Aspergillus* 属カビの 形態学的、生理学的性状

高橋 治男, 篠塚 孝夫¹⁾, 一戸 正勝²⁾

Morphological and physiological characters of *Aspergillus*, sp. isolated from
a commercial kitchen-waste degradative agents

Haruo TAKAHASHI, Takao SHINOZUKA, Masakatsu ICHINOE

Summary

A numerous colonies of *Aspergillus* sp. were found in a commercial degradative agent for kitchen-waste. The isolates were all tentatively indendefied as *Aspergillus flavus* from some morphological characteristics. Scanning electron micrography clearly showed that conidial walls of the isolates were relatively smooth and compatible with that of *A. flavus* NRRL 1957. But, they were different from those of *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 which were distinctly rough-walled. Therefore, the isolates of *Aspergillus* sp. were all definitely determined as *A. flavus*. The isolates never produced aflatoxin as well as cyclopiazonic acid, an indole mycotoxin. Active growth of the isolates from the degradative agent was observed in temperature range of 15 to 42 °C, but scarecely found at 45°C, which were nearly consistent with those of the reference strains including *A. flavus* and *A. parasiticus*.

I. はじめに

近年, 都市部におけるゴミの排出量は著しく増大し, その対策として家庭などで生じる野菜屑をコンポスト中で微生物を用いて分解処理する方法が注目を集めている。その際に, ゴミに付着していた微生物だけでなく生ゴミに対して分解活性の高い微生物を分解促進材として加えることが多い。野菜屑などの生ゴミは植物組織を多く含むため, その微生物としては植物細胞壁の分解活性が高いことや, また, その処理過程で蓄熱をとまうため耐熱性や好熱性が要求されている。しかしながら, それらの微生物はそこで多量に繁殖することから, それらの性質の他に, ヒトに対する非病原性など, 安全性も要求される。

著者らは, 市販生ゴミ処理材から, 病原性カビや毒素産生カビが含まれる *Aspergillus* 属のカビが認められたことから, このカビを分離同定し, さらにはカビ毒産生性についても検討を加えたので報告する。

II. 材料及び方法

1. 菌分離

生ゴミ処理剤 1 g を滅菌水に懸濁後, その上澄液, 0.5 ml をクロラムフェニコール添加ポテトデキストロース寒天平板培地に塗布し, 28°C で 3~5 日間培養を行った。増殖してきた緑色の *Aspergillus* 属の集落を, single conidium germination technique¹⁾によりさらに純粋分離を行なった後, PDA 斜面に保

存培養した。

2. *Aspergillus* 属分離株の同定

1) 集落及び形態観察

Aspergillus 属分離株は, それらの保存培養からツアツペク・ドックス寒天 (CzDA) 平板と麦芽エキス寒天 (MEA) 平板に接種し, 25°C で 7 日間培養を行った。それらの形態学的特徴を Klich²⁾らの基準にしたがって同定を行った。

2) 走査型電顕による分生子の観察

分離株などの供試株を保存培養から CzD 平板に接種し, 25°C で 10 日間培養を行った。両面接着カーボンテープを走査型電顕 (SEM) 観察用台座に貼り着けた後, テープ表面にそれらの集落を軽く触れさせ分生子を付着させた。次に, それらを 2% オスミウム酸溶液を小瓶を含むガラスチャンパー入れ, 4°C で 20 時間ガス固定を行った後, 金蒸着し, SEM (JSM-6100) で観察した。

3. 生理学的特徴

1) アフラトキシンおよびシクロピアゾン酸の産生性

A. flavus が産生することが知られている 2 種の主要カビ毒, アフラトキシンとシクロピアゾン酸について, その産生性を調べた。

アフラトキシン; 玄米を 3 時間水道水に浸漬した後, 水切りしたその約 5 g を 50 ml 容の三角フラスコにとり, 121°C で 15 分オートクレーブで滅菌した。また, 必要に応じて滅菌水を 1~2 ml 加え加湿した。それらに, 供試株の保存培養から菌を接種し 28°C で 7 日間培養を行った。培養終了後, クロロホルムを加えアフラトキシンを抽出し, その抽出液を濃縮乾固し, 200 μ l のベンゼン: アセトニトリル混液 (95: 5, V/V) を加え抽出物を溶解させた。その 1 部をシリカゲル薄層プレート (Merck, Precoated Kieselgel 60, No.5721) にスポットし, クロロホルム: アセトン混液 (9: 1/V) で展開した。展開後, アフラトキシンを紫外線 (365nm) 照射下で検出を行った。

シクロピアゾン酸: 培養は大桃³⁾の方法によって行った。す

千葉県衛生研究所

1) 東京消防庁消防科学研究所

2) 東京家政大学

(1998年11月12日受理)

なわち、まず培地としては、マンニトール30g、コハク酸10g、KH₂PO₄ 1g、MgSO₄·7H₂O 0.3g、を水道水に溶かし、アンモニア水でpH5.6に調製した後、300ml容の三角フラスコに100mlずつ分注し加熱殺菌したものを用いた。供試株の保存斜面より分生子を接種し、28℃で30日間培養を行った。次に、培養物に塩酸を加え酸性にした後、100mlの酢酸をエチル加え時々揺り動かしながら菌体と酢酸エチルとを2~3時間よく接触させ、その後ろ紙ろ過を行った。

得られた酢酸エチル層と培養ろ液を分液ロートに移して振とう抽出を2回行い、次に酢酸エチル抽出液から100mlの1/10N水酸化ナトリウムに転溶させ、さらに、再度塩酸酸性にして、再び酢酸エチル100mlで2回抽出を行った。この酢酸エチル層を減圧濃縮して抽出液とし、薄層クロマトグラフィーにより⁹シクロピアゾン酸の検出を行った。シリカゲルプレートは、市販のもの(Merck, precoated Kieselgel 60, No5721)を2%修酸アルコール溶液に浸した後、80℃で1時間乾燥させたものを用いた。抽出液の一部とシクロピアゾン酸標準液(2.5μg/μlクロロホルム溶液)とをプレートにスポットした後、ベンゼン:酢酸:メタノール混液(90:5:7, V/V)で展開した。風乾後、1gのp-dimethylaminobenzaldehydeを75mlのエタノールと25ml塩酸に溶解させたEhrlich 試薬を噴霧してシクロピアゾン酸の検出を行った。

2) 増殖温度域の検討

供試株をPDA斜面で8日間培養した後、CzA平板に接種し、45, 42, 37, 25, 15の各温度(℃)で10日間培養を行った。培養終了後、集落の径を測定した。

III. 結果及び考察

1. 菌分離

ゴミ処理剤の懸濁液を接種したPDA 平板は、緑色の*Aspergillus*属と灰色の*Rhizopus*属の集落で埋めつくされた。*Aspergillus*属については10株を分離し、さらに、それらを前述のように純粋分離を行い、それらを保存株とした。

2. *Aspergillus*属分離株の同定

1) 集落及び形態観察

上記の得られた10株について形態観察を行った。集落の色調は、いずれもCzA平板では全体として緑色、周縁部は黄色、MEA平板ではオリーブ緑色をなした。光学顕微鏡による観察では、フラスコ形の頂囊を有し、フィアライドのみの頂囊とメトレとフィアライドからなる頂囊が混在した。分生子は球形から亜球形をなし、径は4.0~4.5μm、表面はほぼ滑面に見えた。また、集落の黄色が長期間培養でも退色しないこと、また、集落が羊毛状とならないことから、近縁種の1種である麹菌、*Aspergillus oryzae*とは異なることを示した。これらの形態学的特徴から、それらの分離株はいずれも*Aspergillus flavus*と推定された。

Fig. 1-4 Scanning electron micrographs of conidial surface walls of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* isolates.

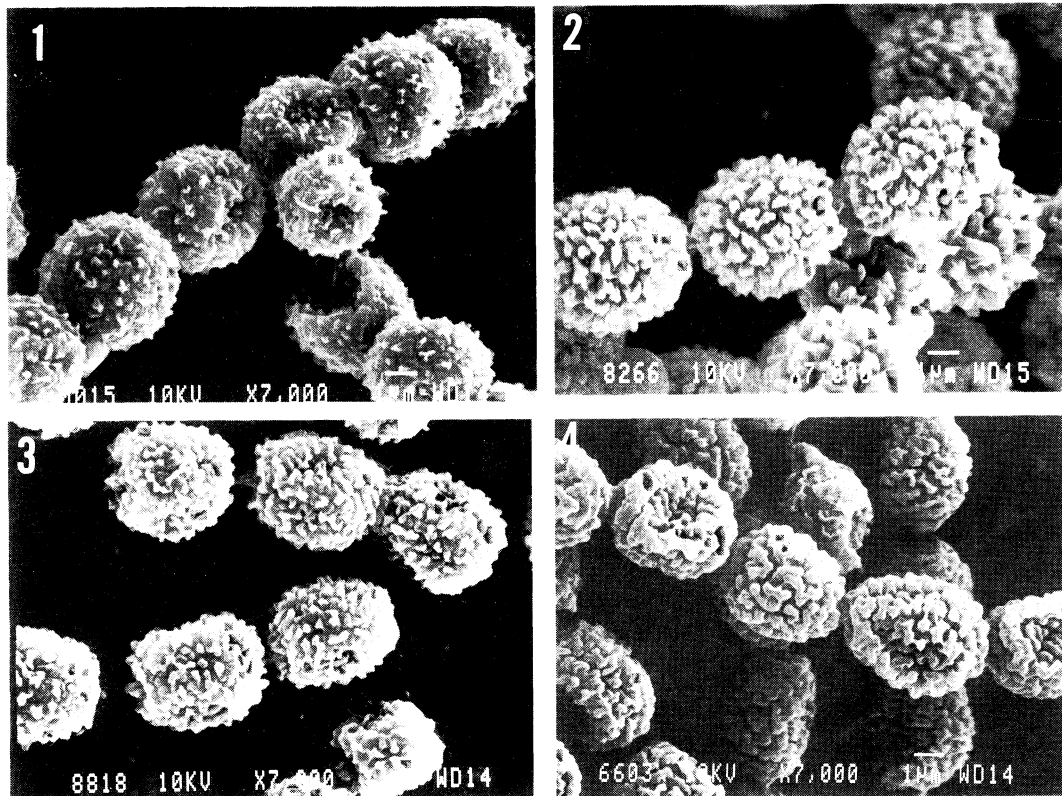


Fig. 1, *A. flavus* WD-1 isolated from a commercial kitchen-waste degradative agents showing smooth-walled surface. Fig. 2, *A. parasiticus* NRRL 2999 showing distinctly rough or echinulate and different from that of *A. flavus* WD-1. Fig. 3, *A. flavus* NRRL 1957, and Fig. 4, *A. flavus* S-33-4 isolated from Southwest Islands in Japan, showing relatively smooth or somewhat verrucose and resemble to that of *A. flavus* WD-1. Scale bars indicate 1 μm.

2) SEM による分生子の観察

*Aspergillus*属は近年、分類の改訂が行われ⁹⁾, *A. flavus* group は、分類学的には、Genus *Aspergillus*, Section Flaviに属することとなった。この Sectionには*A. flavus*の類縁菌、*Aspergillus parasiticus*も包含されている。この両菌種はいずれも急性毒性、発がん性⁹⁾の高いカビ毒、アフラトキシンを産生するなど、生理学的、形態的にも極めて近接することが知られ、Klichら⁷⁾は、この両者を同定するには分生子の表面の観察が有効であると報告している。また、著者らも⁸⁾, *A. flavus*やその近縁菌の同定に分生子表面のSEMによる観察が極めて有用であることを報告した。そこで、それら分離株のSEMによる分生子表面の形態観察を行った。

分離10株はほぼ形態的に類似していたので、そのうち2株を任意に選び、*A. flavus* WD-1 および*A. flavus* WD-2 とし、供試株とした。この他、対照株として、*A. parasiticus* NRRL 2999、*A. flavus* NRRL 1957の他、耐熱性、好熱性株が分離されやすいとされている本邦南西諸島より分離した*A. flavus* S-33-4 株も加えた。

観察結果は、生ゴミ処理剤からの分離株、WD-1, WD-2 の分生子表面がいずれもほぼ滑壁面を示した (Fig. 1) のに対し、対照株*A. parasiticus*の分生子のそれはかなり粗造 (Fig. 2) を示し、明らかにその形態が異なった。これに対して、*A. flavus* NRRL 1957 (Fig. 3) や南西諸島からの分離株*A. flavus* S-33-4 (Fig. 4) の対照株のそれとは比較的類似し、これらの結果より、生ゴミ処理剤からの分離株が*A. flavus*であることが確認された。また、それら分離株のそれはいずれの*A. flavus*対照株のそれよりも比較的滑壁面であった。近縁種の麹菌、*A. oryzae*は比較的滑面の表面構造を有するとされる⁹⁾ことから、それらの分離株はこの点ではむしろ*A. oryzae*に近い形態を示していると言える。

3. 生理学的特徴

1) アフラトキシンおよびシクロピアゾン酸産生性

アフラトキシン；生ゴミ処理剤から分離した*A. flavus* WD-1 およびWD-2 の2株と、アフラトキシン産生陽性対照株として*A. flavus* S-33-2 株の計3株について検討を加えた。その結果、陽性対照株は、Bアフラトキシンを産生したが、WD-1, WD-2 の両分離株ともアフラトキシンを産生しなかった。アフラトキシンなどのカビ毒は二次代謝物であることから産生株と非産生株とが存在する。また、アフラトキシン産生株には地理的分布があり、本邦では主として九州南部から南域¹⁰⁾の亜熱帯から熱帯地域に分布するとされており、著者らが本邦南西諸島から得た

*A. flavus*分離株の約53%がアフラトキシンを産生した¹¹⁾。

シクロピアゾン酸；*A. flavus* WD-1, WD-2 の両分離株と、陽性対照株として、本邦南西諸島のサトウキビ畑土壌より分離した*A. flavus* S-44-2 株の、計3株について検討を加えた。結果は、アフラトキシンの場合と同様で、陽性対照株に産生が認められたものの、WD-1, WD-2 の両分離株では、シクロピアゾン酸の産生は認められなかった。Klichらは⁷⁾*A. flavus*の分離株におけるシクロピアゾン酸産生株の比率は、80株中52株 (約65%) であったと報告している。今回検討した*A. flavus*にアフラトキシン産生性は認められなかったが、*A. flavus*は一般にアフラトキシン産生遺伝子を有するとされているが¹²⁾、その遺伝子の制御機構については、まだ完全には明らかにされていない。著者らは¹³⁾、これまで温室内の栽培土壌から大量の*A. flavus*を分離したことがあり、温室の様な冬季でも比較的高い温度条件の場合、*A. flavus*、ひいてはアフラトキシン産生菌の生息場所となりうる可能性をはらんでいると考えられる。さらに、産生されたアフラトキシンは飛散しやすい分生子にも分布するとされていることから¹⁴⁾、その安全性には十分な検討が加えなければならない。

2) 増殖温度域

生ゴミ処理剤からの分離株*Aspergillus* WD-1, およびWD-2 の2株の他、*A. flavus* S-33-4, *A. flavus* NRRL 1957を対照株として用いた。結果をTableに示した。生ゴミ処理剤からの分離株はいずれも対照株と類似した増殖への温度特性を示し、40℃をこえる比較的高温域で比較的優れた増殖は認められなかった。供試株の中では、南西諸島からの分離株が42℃付近でやや比較的高い増殖速度を示した。以上の結果は、分離株が生ゴミ処理剤の主要微生物として選択された主たる要因が高温域での増殖速度ではなく、他の性質に起因しているものと考えられた。

以上の形態学的、生理学的検討結果は、生ゴミ処理剤から分離された*Aspergillus*属のカビが*A. flavus*ではあったが、アフラトキシンやシクロピアゾン酸のカビ毒を産生せず、安全性の面では一応、問題がないことが明らかとなった。

著者ら¹⁵⁾は、これまで*A. flavus*をはじめ*Aspergillus*, *Penicillium*属やその完全世代が、ペクチンやキシランなどの植物組織構成多糖の分解活性を有することを明らかにした。したがって、*A. flavus*や*Aspergillus*属、あるいは*Penicillium*属のカビも、今後生ゴミの分解処理を担う菌として利用される可能性は高いと言える。しかしながら、*Aspergillus*や*Penicillium*属にはカビ毒産生種やヒトに対する病原菌種が比較的多く含まれていることから、今後とも、その菌種、菌株の選択にあたってはその安全性に十分な注意が必要である。

Table Growth of *Aspergillus* spp. Isolates Associated with Kitchen-waste Degradative Agent and Several Reference Strains at Various Temperatures on Czapek-Dox Agar Plate for 8 days.

Isolate and Strain No.	Growth (mm.) at temp. °C				
	45	42	37	25	15
<i>Aspergillus</i> sp. WD-1	2.5*	11.5	71.0	64.5	12.0
<i>Aspergillus</i> sp. WD-2	2.5	10.0	65.0	62.0	10.0
<i>A. flavus</i> S-33-4	2.5	23.5	76.0	72.5	13.0
<i>A. flavus</i> NRRL1957	2.5	12.5	76.5	77.5	9.0

* ; Mean value on two plates tested

引用文献

- 1) K. B. Raper, and D. I. Fennel (1965) : The Genus *Aspergillus*, Williams and Wilkins, Baltimore, U. S. A., pp. 52-
- 2) M. A. KLICH, and J. I. PITT (1988) : A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their telemorphs, Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, North Ryde, Australia.
- 3) 大桃定洋, 杉田正徳, 阿部又三 (1973) : *Aspergillus versicolor*の培養からcyclopiazonic acid, cyclopiazonic acid imineおよびbisecodehydropiazonic acidの分離, 農化, 57-63.
- 4) M. W. TRUCKSESS, P. B. MISLIVEC, K. YOUNG, V. R. BRUCE, and S. W. PAGE (1987) : Cyclopiazonic acid production by cultures of *Aspergillus* and *Penicillium* species isolated from dried beans, corn meal, macaroni, and pecans, J. Assoc. Off. Anal. Chem., 123-126.
- 5) W. GAMS., M. CHRISTENSEN., A. H. ONIONS, J. I. PITT and R. A. SAMSON (1985) : Infragenic taxa of *Aspergillus*, In Advances in *Penicillium* and *Aspergillus* Systematics (Eds. R. A. Samson and J. I. Pitt), pp. 56-62. New York, Plenum Press.
- 6) G. N. WOGAN, P. M. NEWBERNE, (1967) : Dose-response characteristics of aflatoxin B1 carcinogenesis in rat, Cancer Res., 27, 2370-2376.
- 7) M. A. KLICH, and J. I. PITT (1988) : Differentiation of *Aspergillus* from *A. parasiticus* and other closely related species, Trans. Br. mycol. Soc., 91, 99-108.
- 8) H. TAKAHASHI, H. KAMIMURA, I. SAGAWA, M. ICHINOE (1988) : Characterization and typification of aflatoxin-producing fungi isolated from sugarcane field in Japan, Proc. 4th China-Japan International Congress of Mycology, 75.
- 9) 村上英也 (1972) : 麹菌の分類と毒カビの検索, 醸協誌, 30, 193-203.
- 10) 真鍋勝, 鶴田理, 田中健治, 松浦慎治 (1976) : 本邦土壤中のアフラトキシン産生菌群の分布, 日菌報, 17, 436-444.
- 11) H. TAKAHASHI, M. SUZUKI, H. NARITA, Y. KIKUCHI, H. KAMIMURA, M. ICHINOE (1998) : Distribution of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* in sugarcane field of Okinawa, Japan, Proc. 3th China-Japan International Congress of Mycology, 58.
- 12) G. A. PAYNE, G. J. NYSTORM, D. BHATNAGAR, T. E. CLEVE LAND, and C. P. WOLOSHUK (1993) : Cloning of the afl-2 gene involved in aflatoxin biosynthesis from *Aspergillus flavus*, Appl Environ. Microbiol., 59, 156-162.
- 13) 高橋治男, 未発表
- 14) D. T. WICKLOW, and R. J. COLE (1982) : Can. J. Bot., 60, 525.
- 15) 高橋治男, 渋谷直人, 矢崎廣久, 木村修一 (1990) : *Aspergillus*ならびに*Penicillium*属糸状菌の産生する玄米組織の分解酵素について, 農化誌, 27-34.