J S M *Mycotoxins*

www.jstage.jst.go.jp/browse/myco

Isolation of *Aspergillus flavus* strains from field soil by the improved DV-AM method

Marin Kishimoto, Tomohiro Furukawa, Toshihiko Karasawa,
Yasujiro Morimitsu, Masayo Kushiro

JSM Mycotoxins, **71**(1):9-12 (2021)

<http://doi.org/10.2520/myco.71-1-6>

JSM Mycotoxins is issued twice a year, one volume a year, by the Japanese Society of Mycotoxicology and the purpose of the journal is to publish results and technical information regarding mycotoxins. *JSM Mycotoxins* publishes Reviews, original results (Research Papers, Technical Notes, Notes, and Letters), Proceedings of special lectures, symposia, and workshops of the meeting of Japanese Society of Mycotoxicology

改良DV-AM法を用いた圃場からの*Aspergillus flavus*の単離

岸本 真凜^{1,2}, 古川 智宏¹, 唐澤 敏彦³, 森光 康次郎², 久城 真代¹

¹国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 (NARO) 食品研究部門 (〒305-8642 茨城県つくば市観音台2-1-12)

²お茶の水女子大学大学院人間文化創成科学研究科 (〒112-8610 東京都文京区大塚2-1-1)

³国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 (NARO) 中央農業研究センター (〒305-8666 茨城県つくば市観音台2-1-18)

キーワード

アフラトキシン; 検出法; 産生菌

連絡先

久城 真代, 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 (NARO) 食品研究部門, 〒305-8642 茨城県つくば市観音台2-1-12
電子メール: kushirom@affrc.go.jp

(2021年2月22日受付,
2021年3月1日改訂,
2021年3月1日受理)

要旨

本研究では、つくばの実験圃場中の菌を、改良ジクロロボス-アンモニア (DV-AM) 法を用いてスクリーニングし、手法の適用性を検証することを目的とする。DV-AM法は、目視の赤 (陽性) 白 (陰性) 判定によるアフラトキシン (AF) 産生菌コロニーの検出法であり、培地組成の改良により高感度の検出が可能となっている。7月 (立毛の植物体がある時期) に実験圃場土壌を採取し、本法によるスクリーニングを行った結果、20地点から採取した土壌のうち3点から計4株の陽性株が分離された。この4株についてTLCおよびHPLCを用いてAF産生性を分析したところ、4株すべてでAF産生が確認できた。そのうちの2株について、カルモジュリン遺伝子領域の配列解析および顕微鏡観察を行ったところ、どちらも*Aspergillus flavus*として同定されたが、培地上に形成されたコロニーの形態学的特徴が違ったほかAF産生能にも差があり、異なる系統であると考えられた。以上より、改良DV-AM法はAF産生型の*A. flavus*の分離への適用性が確認され、また、同一圃場において系統の異なる*A. flavus*が存在していることが示された。

アフラトキシン (AF) は、主に*Aspergillus flavus*と*Aspergillus parasiticus*が産生する真菌の二次代謝物である。急性毒性とともに慢性毒性としても強力な発がん性を有するため、農作物をはじめとした食品のAF汚染が世界的に問題となっている。従来、農作物のAF汚染は、熱帯・亜熱帯地域の圃場土壌中に常在するAF産生菌由来とされていた。しかし近年の地球規模の気候変動に伴い、AF産生菌分布地域が拡大していることが予測され、実際に関東地方においても種々の培地によりAF産生型の*A. flavus*が分離されている¹⁾。そのため、既存の手法より簡便で高感度なAF産生菌の検出法が必要となってきている。

これまで行われてきたAF産生菌の可視検出法には、AFPA法²⁾やアンモニア法³⁾があるが、本研究では後者をより高感度にしたジクロロボスアンモニア法 (DV-AM法)^{4),5),6)}を用いてAF産生菌の識別を行った。DV-AM法は、培地にAF生合成酵素阻害剤

の一種ジクロロボス (DV) を添加してAF産生菌を培養することで、菌体内にAF生合成中間体である versiconal hemiacetal acetate (VHA) と versiconol acetate (VOAc) を蓄積させる。VHAやVOAcは分子内にアントラキノン構造を有し、pHによって色調が鋭敏に変化するため、アンモニア (AM) 蒸気に曝すことでコロニーは鮮やかな赤紫色に変化する。これまでDV-AM法では選択培地としてGY培地 (グルコース2%, 酵母エキス0.5%, 寒天2%) が用いられてきたが、本研究ではYES培地 (酵母エキス2%, スクロース10%, デオキシコール酸ナトリウム0.1%, クロラムフェニコール0.01%, 寒天2%) を用いた改良DV-AM法を行った。YES培地は高濃度の糖と抗生物質としてクロラムフェニコールを含有するため、AF産生菌がより選択されやすくなっている。本研究の目的は、つくばの実験圃場中の菌を、改良DV-AM法を用いてスクリーニングし、手法の適用性を検証することである。

2020年の7月に、つくばの実験圃場の土壌を採取した。この圃場は2014年の調査でAF産生型の *Aspergillus flavus* が単離された圃場(植生:ソルガム)⁵⁾の隣の圃場である。本研究ではソルガムが生えていた2区画からそれぞれ10点ずつ計20点(スパーテルで各50 g程度を地表から約5 cm下、植物の根を傷つけないよう留意しつつ)採取した。採取した土壌を0.15 gはかりとり、500 μ Lの0.05% Tween 80を加えて土壌懸濁液を作成した。この懸濁液をYES-DV培地⁶⁾に50 μ Lずつまき、25°Cで1週間培養した後、アンモニア (AM) 処理(寒天培地のシャーレを裏返し、蓋に25%AM水200 μ Lを滴下し、AM蒸気に20分間曝露)をして観察した。赤く変色し、かつ巨視的にも *A. flavus* と考えられた4つの真菌コロニーをGY培地に植え継いで25°Cで1週間培養した。その後、AM処理による変色確認により簡易的にAF産生を識別した後、寒天培地ごと菌の一部をくり抜きメタノールで抽出した。

このメタノール抽出液(各1 μ L)をTLC分析に供したところ、分離された4株ともTLC上AFB₁標品と同じRf値に濃いスポットが見られた。TLCの移動相はトルエン系(トルエン:酢酸エチル:酢酸=6:3:0.4)⁷⁾を用い、標品は5 mg/LのAF 4種 (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂) 混合品を0.5 μ L用いた。同様にこのメタノール抽出液をHPLC分析に供したところ、HPLCでは保持時間10.2分付近にピークが見られ、標品のAFB₁と保持時間が一致したためAFB₁を産生していると考えられた。HPLCの分析条件は、分析カラムCapcell pak C18 UG120(内径3.0 mm, 長さ250 mm, 粒子径5 μ m)、流速0.3 mL/min、注入量10 μ L、カラムオープン温度40°C、励起波長365 nm、蛍光波長450 nm、移動相メタノール:水:アセトニトリル(v/v/v)=3:6:1である。4株は巨視的な観察から2株ずつ2グループに分けられたため、各々のグループから1株ずつをJUL1, JUL10とラベリングし、さらに詳しく調査した。AFB₁の産生量はJUL1が85.6 μ g/L (n=3, 標準偏差5.75 μ g/L)、JUL10が213.8 μ g/L (n=3, 標準偏差4.37 μ g/L)であり、JUL1よりJUL10の方が約2.5倍多かった(図1, 図2)。

次に、培養温度によりJUL1とJUL10のコロニー形態およびAF産生性に違いがあるかどうか調べた。GY培地上で、25, 30, 37, 40°Cでそれぞれ1週間培養して観察したところ、25°C, 30°Cにおいて2株の色素産生性と菌核の形成性に差異があった(図3, 図4)。このことから、JUL1とJUL10は同一株ではなく系統の異なる株であると考えられた。また、2株とも、25°Cで培養した場合が最もAF産生量が多く、37, 40°Cではほとんど産生しなかった(データ

図1 TLCによるAF産生性の確認
(標品スポット上から順にAFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂)

図2 JUL1のメタノール抽出物のHPLCクロマトグラム

図3 25°Cで培養後の巨視的観察
(左JUL1 右JUL10)

図4 30°Cで培養後の巨視的観察
(左JUL1 右JUL10)

は示していない). スライドカルチャーによりJUL1とJUL10を培養し、顕微鏡で観察したところ、どちらも*A. flavus*であると推定された。

引き続き、遺伝子配列解析による2株の同定を行うこととした。JUL1とJUL10のゲノムDNAを抽出し、カルモジュリン遺伝子配列の一部を増幅するよう設計したプライマー (*cmd5*: 5'-CCG AGT ACA AGG ARG CCT TC -3', *cmd6*: 5'-CCG ATR GAG GTC ATR ACG TGG- 3')によりPCRを行った。PCR条件は初期熱変性を94°Cで2分間、サイクリングは熱変性を98°Cで10秒間、アニーリング及び伸長反応を68°Cで1分間で35サイクルとした。PCR産物を精製してシーケンサーにより塩基配列を解析し、BLAST検索に供した。その結果、2株の増幅断片はともに*A. flavus*のカルモジュリン遺伝子配列と100%一致したため、*A. flavus*であると同定された。

最後に、2株のエルゴステロールを定量した。AF産生量を分析する際に作成したメタノール抽出液を用い、水酸化カリウムによる鹸化にてエルゴステロールを遊離させて抽出し、ヘキサンによる液液分配にて精製後、HPLCにて分析定量した。抽出・精製法は既報の通り⁸⁾であるが、定量法のみ改変した：カラム ナカライテスクCOSMOSIL C18-MS-II (内径4.6 mm, 長さ150 mm, 粒子径5 µm), 流速1.0 mL/min, 注入量10 µL, カラム温度40°C, 測定波長290 nm, 移動相100%メタノール, その結果, エルゴステロール量はJUL1が23.3 mg/L (n=3, 標準偏差7.42 mg/L), JUL10が26.1 mg/L (n=3, 標準偏差3.99 mg/L)であった。JUL1とJUL10のAF産生量/エルゴステロール量を算出し、Welchの*t*検定を行ったところ、有意水準0.05で差が認められ、JUL1とJUL10では菌体量あたりのAF産生量が異なることが示された。

本研究を総括すると、改良DV-AM法を用いてつくばの圃場からAF産生型の*A. flavus*複数株が単離できたことより、改良DV-AM法の実際の圃場での適用性が実証された。

謝 辞

本研究は、農林水産省の「安全な農畜水産物安定供給のための包括的レギュラトリーサイエンス研究推進委託事業(国産農産物中のかび毒及びかび毒類縁体の動態解明並びに汚染の防止及び低減に関する研究)」(JPJ008617.18072043)により実施しました。

DV-AM法に関するご助言をいただきました福井工業大学・矢部希見子先生、かびの同定に関するご助言をいただきました麻布大学・杉浦義紹先生に感謝いたします。

文 献

- 1) Takahashi, T. Distribution of aflatoxin-producing fungi in soil. *Mycotoxicol.* 1992, **35**, 13-17
- 2) Pitt J.I.: Hocking A.D.: Glenn D.R. An improved medium for the detection of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *J. Appl. Bacteriol.* 1983, **54**, 109-114,
- 3) Saito, M.: Machida, S.A. rapid identification method for aflatoxin producing strains of *A. flavus* and *A. parasiticus* by ammonia vapor. *Mycoscience.* 1999, **40**, 205-221.
- 4) Yabe, K. *et al.* Development of the dichlorvos-ammonia (DV-AM) method for the visual detection of aflatoxigenic fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2015, **99**, 10681-10694.
- 5) Kushiro, M. *et al.*, Application of newly-developed dichlorvos-ammonia (DV-AM) method to direct isolation of aflatoxigenic fungi from field soils. *Mycoscience*, 2017, **58**, 85-94.
- 6) Yabe, K. *et al.* Improvement of the culture medium for the dichlorvos-ammonia (DV-AM) method to selectively detect aflatoxigenic fungi in soil. *Toxins*, 2018, **10**, 519.
- 7) Kushiro, M.: Hatabayashi, H.: Nakagawa, H.: Yabe, K. Improvement of mobile phase in thin-layer chromatography for aflatoxins and analysis of the effect of dichlorvos in aflatoxigenic fungi. *JSM Mycotoxins*, 2017, **67**, 5-6.
- 8) Thammarawong, M.: Distinct distribution of deoxynivalenol, nivalenol, and ergosterol in *Fusarium*-infected Japanese soft red winter wheat milling fractions. *Mycopathologia*, 2011, **172**, 323-330.

Isolation of *Aspergillus flavus* strains from field soil by the improved DV-AM method

Marin Kishimoto^{1,2}, Tomohiro Furukawa¹, Toshihiko Karasawa³, Yasujiro Morimitsu², Masayo Kushiro¹

¹Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization (NARO), 2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642, Japan

²Graduate School of Humanities and Sciences, Ochanomizu University, 2-1-1 Otsuka, Bunkyo-ku, Tokyo 112-8610, Japan

³Central Region Agricultural Research Center, National Agriculture and Food Research Organization (NARO), 2-1-18 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8666, Japan

In this study, to evaluate the newly improved technique of the dichlorvos - ammonia (DV-AM) method, AF-producing fungi in an experimental field of Tsukuba were screened. The DV-AM method is the detection technique of the AF-producing fungi by judging from color of the reverse colony: the red (positive) or white (negative), and recently higher sensitivity is achieved by improvement of the nutrient medium composition. Soil samples were collected from 20 spots in an experimental field in July and screened for AF-producing fungi by the improved DV-AM method. As a result, four of positive isolates were isolated from three spot samples from 20 spots. TLC and HPLC assay revealed AF production of all four isolates. The sequence analysis of the calmodulin gene domain and microscopic observation were performed in two of four isolates, which revealed that both strains were *Aspergillus flavus*. While both were identified as *A. flavus*, the morphological and physiological characteristics such as production of sclerotia and AF production were different. Thus, the improved DV-AM method was evaluated to detect AF-producing fungi from field soil, and it was also shown that different types of *A. flavus* strains existed in the same field.

Keywords: aflatoxin; detection method; producing fungi