

Bagoong(fermented fish) から分離した *Aspergillus* 属の同定

村尾 勝^{**}・藤田藤樹夫^{*}・山縣 敬^{*}

Identification of the Species of Genus *Aspergillus* Isolated from
Bagoong (fermented fish).

Masaru MURAO, Tokio FUJITA and Kei YAMAGATA

Synopsis

Bagoong is a traditional fermented fish prepared with salted anchovy (*Engraulis japonica*) consumed by the people living in the northern part of Luzon island, particularly in Baguio city of Mountain province. The raw materials for preparation of a *Bagoong* consist of about 45 Kg of the fresh anchovy with added 20 percentage of sodium chloride in earthen jar about 50 liter capacity, and then allowed to ferment naturally at room temperature (28 to 33°C) for 4 weeks. Samples were collected on the rainy season, July 30 and the dry season, December 2, 1979. The commonly isolated species in *Bagoong* were *Aspergillus ruber*, *A. repens*, *A. tonophilus*, *A. chevalieri* and *A. restrictus*.

I 緒 言

フィリッピン発酵食品中の微生物に関する研究について、Tuba^{1,2,3)} (palm wine), Tapuy⁴⁾ (rice wine), Basi⁵⁾ (sugar cane wine), Puto⁶⁾ (fermented rice cake), Bubod's⁷⁾ (basi starter) などの報告がある。

この研究では、フィリッピン発酵食品の改善と microflora の調査を目的として、1979年7月(雨期)、12月(乾期)の2回、Luzon 島北部 La Union 地方で Bubod's⁷⁾ *Bagoong* (fermented fish) の試料を採取した。

Bagoong は塩漬片口イワシや小魚を 28~33°C 付近約1ヵ月自然発酵させた高食塩濃度の食品である。

その試料中から抗浸透圧性 *Aspergillus glaucus* group, *A. restrictus* group に属する35株をえた。その分離株の特徴からこれらの分離株を *Aspergillus ruber* (R-D-2), *A. repens* (R-F-1), *A. tonophilus* (Y-F-2), *A. chevalieri* (G-B-1), *A. restrictus* (B-3-1) の5種に検索同定した。その結果について報告する。

II 実験材料および方法

(1) 試料の採集

1979年7月30日(雨期)、12月2日(乾期)の2回、Luzon 島、La Union 地区、Nagilian 市内の魚醬工場で仕込まれた500gの *Bagoong* を500ml 容殺菌

^{*} 農芸化学科応用微生物学研究室 (Lab. of Applied Microbiology, Dept. of Agricultural Chemistry, Kinki Univ., Higashiosaka, Osaka, 577 Japan.)

^{**} 近畿大学豊岡女子短期大学家政学部 (Dept. of Domestic science, Kinki University Toyooka Women's Junior College, Todera, Toyooka-shi 668, Japan.)

採集瓶に採取した。Bagoong は Bauang (Luzon 島 Lingayen 湾) 付近で魚獲した新鮮な片ロイワシを、50 l 容素焼壺で塩漬にし、28~33°Cで、約1ヵ月自然発酵させた塩蔵食品である。

(2) 分離培地

Bagoong 中の分離株は耐浸透圧性であるので常用培地では分離困難である。そこで M40Y, Harrold's agar (sucrose 400 g, malt extract 20 g, yeast extract 5 g, agar 20 g, H₂O 1 l) を分離培地として使用した。

(3) 分離方法

本株の分離には常法の平板希釈培養法は不適である。塩漬片ロイワシを M40Y Harrold's agar 含有 plate の中央に直接のせ、28~30°Cで、7日間培養後、出現した colony を平板塗抹法で純化し、生じた単一 clone を釣菌した。

(4) 分離株の同定法

斜面培地上の colony の色相、性状により 5 群に整

理し、その代表株を Raper⁸⁾らの方法で検索同定した。

III 実験結果

(1) 分離株の group の検索

M40Y Harrold's agar 平板中央に Bagoong をのせ、28~30°Cで、7日間培養後、出現した colony を塗抹法で純化し、*Aspergillus* 属35株をえた。えられた分離株を Raper⁸⁾らの方法によりまず形態的特徴から group の検索を試みた。梗子一段、分生子頭は放射状、colony の色相は青緑色から褐色、なかには橙赤色の株もみられた。耐浸透圧性で、閉子嚢器は輝黄色の株を *Aspergillus glaucus* group とした、有性増殖がみられず、閉子嚢器形成を欠き、梗子一段、分生子頭は円柱状に近く分生子は長い楕円形 colony の色相が暗緑色の株を *A. restrictus* group とした。Bagoong からの分離株はすべてこの 2 group に属した。そこで Group の検索をつぎのようにまとめた。

Key to group based on morphology.

Sterigmata strictly uniseriate.

Conidial heads radiate, variable in size, in bluish green or olive green shades (brown in one species); osmophilic; bright yellow cleistothecia abundant in most species. *A. glaucus* group

Sterigmata strictly uniseriate.

Conidial heads loosely to definitely columnar, often long, thin and twisted, in green shades; conidia cylindrical when young; osmophilic; cleistothecia lacking. *A. restrictus* group

(2) *Aspergillus glaucus* group の著明な特徴

梗子一段、分生子頭は放射状から、なかには円柱状に近いものもある。分生子は楕円、亜球形、球形、その表面は一般に粗面である。閉子嚢器は輝黄色球

形、子嚢胞子はレンズ形で赤道線、筋、外側に分水線やトサカ状の突起をもったりあるいは欠くものもあり、多様性である。耐浸透圧性で高張濃度の培地に発育可能である。Group の特徴をつぎにまとめた。

Outstanding characters on *Aspergillus glaucus* group.

Conidial heads radiate to somewhat columnar, typically in some shade of green but light brown in one species.

Conidiophores smooth walled, colorless or pigmented in brown shades terminating in domelike vesicles.

Sterigmata in a single series, rather coarse.

Conidia elliptical to subglobose or globose, characteristically roughened but smooth in one variety.

Cleistothecia generally present; yellow, globose to subglobose, thin walled; red or yellow

encrusted hyphae conspicuous.

Asci eight-spored, without definite arrangement; usually, but not always, ripening in 2 to 4 weeks.

Ascospores lenticular, smooth or rough walled, generally showing an equatorial line or furrow with or without flanking ridges or crests.

Osmophilic, growing optimally on substrates containing high concentrations of sugar or salt.

(3) *Aspergillus restrictus* groupの著明な特徴

有性増殖はみられず、閉子嚢器を欠く。分生子頭は円状またはそれに近い。分生子柄は短く、頂囊も小さい。梗子一段。耐浸透圧性で常用 Czapek's agar

上の発育は非常に劣る。20~40% sucrose 添加培地で発育は回復する。Group の特徴をつぎのようにまとめました。

Outstanding characters on *Aspergillus restrictus* group.

Conidial heads definitely columnar or loosely columnar, in green shades.

Conidiophores short, smooth or nearly so, usually hyaline but occasionally greenish in terminal areas.

Vesicles vary from convex enlargements of conidiophore apices to subglobose.

Sterigmata uniseriate.

Conidia elliptical, ovate, barrel shaped or globose, echinulate Cleistothecia not produced.

Osmophilic; most species growing weakly or restrictedly on Czapek's agar; growth and sporulation usually much improved on media containing 20 to 40 per cent sucrose.

(4) *Aspergillus glaucus* groupに属する分離株の種の検索

1) Strain no. : R-F-1, R-F-7, R-F-8, R-F-13 etc.

M₄₀Y agar 上の colony 色相は橘赤色 (Plate 1-B) である。Czapek's agar 培地では colony の発育が比較的悪い。室温下で3週間後その直径は約1.5~2.2 cm。20% sucrose 添加 Czapek's agar では plate を満たす。分生子頭は大きく放射状から不均一な円筒状 (Plate 4-A, Plate 4-B) である。梗子一段。頂囊は亜球形 (Plate 4-C)。分生子の表面に粗面の突起をもつ (Plate 4-D)。黄色の閉子嚢器はネット状の菌糸上に形成し、その直径220 μm、比較的大きく、表面に菌糸の発育がみられる (Plate 4-E, Plate 4-F)。子嚢胞子は凸レンズ状、表面は平滑、ほとんど赤道線を欠く (Fig. 1-A, Plate 4-H)。本系統は *Aspergillus repens* De Bary と同定した。

本菌種は Thom⁹⁾らの同定した *A. repens* (Cda.) De Bary, Benjamin¹⁰⁾の同定した *Eurotium repens* De Bary と一致する。また本菌種は Bagoong 中に比較的多くみられ、NaCl 20~22%, sucrose 40% 添加培地では発育良好である。

2) strain no. : Y-F-2, Y-F-3, Y-F-6, Y-F-18 etc.

M₄₀Y agar 上の colony 色相は黄褐色 (Plate 1-C)。赤味を帯びない。Czapek's agar 上の colony は室温2週間後、直径1.0~2.0 cm となる。閉子嚢器は輝黄色、球形~亜球形、直径90~160 μm (Plate 5-E)。子嚢胞子は凸レンズ状、表面は平滑、赤道分水線を欠く (Fig. 1-A, Plate 5-F)。頂囊は亜球形、直径20~40 μm (Plate 5-C)。梗子一段である。M₄₀Y agar 上では発育迅速、良好。室温下で2週間後には plate を充滿する。耐浸透圧性。Bagoong 中の常在種である。本菌株を *Aspergillus tonophilus* Ohtsuki に同定した。また本菌種はガラスの表面に発育した *Eurotium tonophilus* Otsuki^{11,12)}とも一致する。

3) Strain no. : R-D-2, R-D-3, R-D-7, R-D-11 etc.

Czapek's agar 上の発育はきわめて悪く、常用培地では分離困難である。M₄₀Y agar 上の colony 色相は黄橙色~橙赤色 (Plate 1-A)。分生子頭は不鮮明な放射状 (Plate 3-A, Plate 3-B)。頂囊は球形 (Plate 3-C, Plate 3-D)。分生子は卵形~亜球形で表面はほぼ平滑である (Plate 3-E)。閉子嚢器は亜球形、直径80~120 μm。黄色~橙赤色 (Plate 3-F)。非常に豊富に形成される。子嚢胞子はレンズ状、表面平

滑、赤道分水線をもち、巾の広い筋を形成する (Fig. 1-B, Plate 3-H). なかにはその表面が粗面のももみられた (Plate 3-I). 本菌株は常用培地で発育極めて不良, M₄₀ Y agar で回復し、代表的な osmotolerant の特徴を保有している。

本菌株を *Aspergillus ruber* (Konig, Spiekermann and Bremer) Thom and Church⁹⁾ に同定した。

4) strain no.: G-B-1, G-B-2, G-B-6, G-B-9 etc.

Czapek's agar 上の colony は発育が制限され、室温下 2 週間後その直径は 2.0~2.5 cm である。M₄₀ Y

agar 上の colony 色相は暗黄緑色 (Plate 1-D), 分生子頭は放射状 (Plate 6-A, Plate 6-B), 梗子一段、頂囊垂球形 (Plate 6-C) である。閉子囊器はクリの実状、黄色~橙色 (Plate 6-D) である。子囊胞子はレンズ状、表面平滑、赤道分水線は薄く波状、トサカ状突起 (Fig. 1-C, Plate 6-F) をもつ。

本菌株を *Aspergillus chevalieri* (Mangin) Thom and Church に同定した。また本菌株は *Eurtium chevalieri* Mangi とよく一致する。Bagoong から分離した耐浸透圧性の *Aspergillus glaucus* group の種をつぎにまとめた。

Key to the species of isolates belong to *Aspergillus glaucus* group.

Strain no.: R-F-1, R-F-7, R-F-8, R-F-13 etc.

Cleistothecia present

Ascospores with convex surfaces smooth or nearly so

Conidial heads large, radiate to loosely columnar, borne above the surface layer of cleistothecia and enveloping hyphae *A. repens* De BARY

Strain no.: Y-F-2, Y-F-5, Y-F-6, Y-F-18 etc.

Cleistothecia present

Ascospores with convex surfaces smooth or nearly so

Equatorial ridges lacking but with furrow definite, appearing as a narrow shallow depression; colonies yellow, not developing red pigmentation *A. tonophilus* OHTSUKI

Strain no.: R-D-2, R-D-3, R-D-7, R-D-11 etc.

Cleistothecia present

Ascospores with convex surfaces smooth or nearly so

Equatorial ridges low and rounded furrow broad and shallow; colonies developing a strong red or orange-red pigmentation... *A. ruber* (Konig, Spickermann & Bermer) Thom & Church

Strain no.: G-B-1, G-B-2, G-B-6, G-B-9 etc.

Cleistothecia present

Ascospores with convex surfaces smooth or nearly so

Equatorial ridges thin and flexuous, crestlike (ascospore resembling a pulley) *A. chevalieri* (MANGIN) THOM & CHURCH

5) *Aspergillus restrictus* group に属する分離株の種の検索

本 group に属する分離株はすべてつぎの種に同定した。

Strain no.: B-3-1, B-3-7, B-3-8, B-3-15 etc.

Czapek's agar 上の発育は極めて悪く、室温下 2 週間後その直径は 0.5~1.5 cm である。M₄₀ Y agar 上の colony 色相は暗青緑色、*Penillium* 様 (Plate

2) である。分生病頭は円柱状 (Plate 7-A, Plate 7-B), 頂囊は小さくフラスコ形、梗子一段、長く 10 μ m, (Plate 7-C) である。本菌株は *Penillium fusco-flavum* Abe, *Aspergillus Penicilloides*⁹⁾ に酷似する。綿製品に出現した *Aspergillus restrictus* Smith¹⁵⁾ とよく一致し、本種に同定した。

Aspergillus restrictus group に属する種の検索をつぎにまとめた。

Key to the species of each isolates belong to *Aspergillus restrictus* group.

Strain no. : B-3-1, B-3-7, B-3-8, B-3-15 etc.

Heads columnar; vesicles small, flask shaped, domelike or only gradual enlargements of the conidiophore apices, fertile on the upper surface only.

Colonies less than 1.5 cm at 3 weeks on Czapek's agar.

Rapidly growing on M₄₀ Y agar, dark blue green; columns long, often twisted, adherent in fluid mounts. *A. restrictus* SMITH

IV 考 察

この研究は当初東南アジア地区農業関係の大学院研究センター SEARCH (Southeast Asian Regional Center for graduate study and research in Agriculture) のプロジェクトの一端として、フィリッピンでの発酵食品改善を目的とした microflora 調査中に Bagoong の試料を採取して行ったものである。

試料は高張濃度のため微生物集団個体数 (microbial population) の測定や分離は常用培地で困難なため、直接試料を M₄₀ Y agar 上におき、出現した colony を純化、釣菌した。分離株はすべて耐浸透圧性で、常用培地中の発育は非常に悪く、Czapek's agar 室温 (24~26°C) 下 3 週間後の colony の直径は *Aspergillus restrictus* 0.5~1.5 cm, *A. ruber* 1.5 cm, *A. tonophilus* 1.0~2.0 cm, *A. repens* 1.5~2.2 cm, *A. chevalieri* 2.0~2.5 cm であった。*Aspergillus glaucus* group の菌種は Bary¹⁶⁾ を初めとし Thom^{9,13)} ら、Benjamin¹⁰⁾、Ohtsuki¹²⁾、Mangin¹⁴⁾ らの多くの研究者が Synonym として *Eurotium* 属と命名している。またこれらの group は食塩、糖類の高張濃度食品のほか Ohtsuki^{11,12,17)}、Ohtsuki¹⁸⁾ らは glass mold としてガラスの表面から分離報告している。いづれにしてもこれらの菌種は特定な環境下で分離される。有性増殖のみない *Aspergillus restrictus* は頂囊未発達、小形、梗子一段、分生子頭の構造が *Penicillium* 様である。著者⁷⁾ らはさきに Bagoong から本菌種類似の *A. penicilloides* を分離した。今回その菌種の分離が不能であった。両菌種の相違は *A. restrictus* の分生子頭は低倍率で円柱状、*A. penicilloides* は鮮明な放射状^{9,13,15)} であるので、両者は区別されている。*A. restrictus* はまた綿製品^{15,19)} にも出現し、M₄₀ Y agar, Czapek's agar plate 上の colony の形態は *Penicillium* 属様である。

V 摘 要

フィリッピンのルソン (Luzon) 島リガエン (Lingayen) 湾周辺の Bauang 付近で魚獲された片ロイワシ、小魚の発酵食品 (Bagoong) 中の耐浸透圧性 *As-*

pergillus 属菌株を M₄₀ Y agar で塗抹法により分離した。分離35菌株を形態的特徴から Raper⁸⁾ らの方法により *Aspergillus glaucus* group, *Aspergillus restrictus* group に分類した。*A. glaucus* group に属する菌株中、10株は *A. ruber*, 8株は *A. repens*, 8株のうち4株がそれぞれ *A. tonophilus* と *A. chevalieri* に同定した。*A. restrictus* group に属する9菌株のすべては *A. restrictus* であった。これらの菌株は常用培地では分離困難であり、試料を直接 M₄₀ Y agar 上にのせ、出現した colony を塗抹法により純化、単一 clone として実験に供した。

References

1. K. Yamagata, T. Fujita, P.C. Sanchez, R. Takahashi and M. Kozaki: Trans. Mycol. Japan Soc. 21, 469-476 (1980).
2. K. Yamagata, T. Fujita, P.C. Sanchez and R. Takahashi: Mem. Coll. Agr., Kinki Univ., 13, 59-66 (1980).
3. K. Yamagata, P.C. Sanchez and R. Takahashi: Kalikasan-Philippine J. Biol. 7, 327 (1979).
4. W. Tanimura, P.C. Sanchez and M. Kozaki: J. of Agri. Sci. of the Tokyo Univ. of Agriculture 22(1), 118-134 (1977).
5. W. Tanimura, P.C. Sanchez and M. Kozaki: J. of Agri. Sci. of the Tokyo Univ. of Agriculture 22(1), 135-141 (1977).
6. P.C. Sanchez: J. of Philippine Agriculture 58(9 & 10) 376-383 (1975).
7. 山縣・藤田・藤樹夫: 近大医誌 5(3), 137 (1980).
8. K.B. Raper and D.I. Fennell (Ed.): The Genus *Aspergillus*, pp. 129-136 (1965). Williams & Wilkins Company Baltimore.
9. C. Thom and K.B. Raper: A Manual of the *Aspergilli*, pp. 103 (1945). Williams &

- Wilkins Company Baltimore.
10. C.R. Benjamin: *Mycologia* **47**, 674 (1955).
 11. T. Ohtsuki: *Botan. Mag. (Tokyo)* **75**, 221-227 (1962).
 12. T. Ohtsuki: *Botan. Mag. (Tokyo)* **75**, 436-442 (1962).
 13. C. Thom and M.B. Church: *The Aspergilli* pp. 272 (1926). Illus, William & Wilkins, Baltimore.
 14. M.L. Mangin: *Ann. Sci. nat. Botan.*, Ser. **9** & **10**, 303 (1909).
 15. G. Smith: *J. Textile Inst.* **22**, 115 (1931).
 16. A.D. Bary: *Botan. Ztg.* **12**, 425 (1854).
 17. T. Ohtsuki: *Congr. intern. botan.*, Paris 8: Sec. **11**, 220 (1954).
 18. T. Ohtsuki, Y. Suda and M. Sai: *Misc. Repts. Research Inst. Resources Tokyo* **17**, 69 (1950).
 19. G. Smith: *J. Textil Inst.* **19**, 92 (1928).

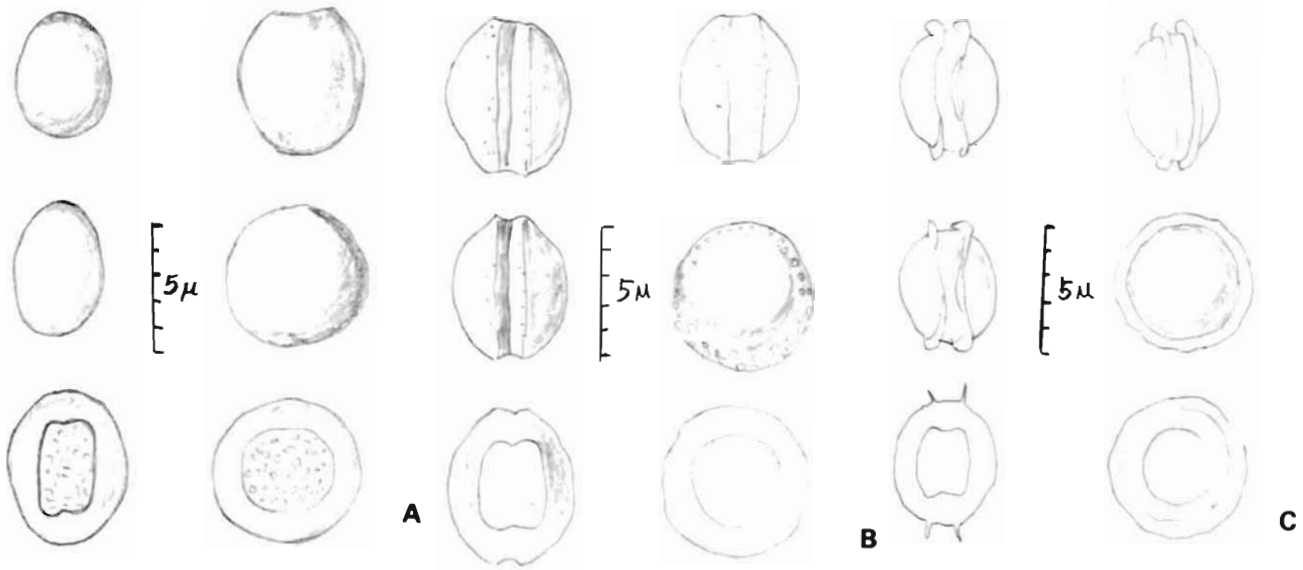
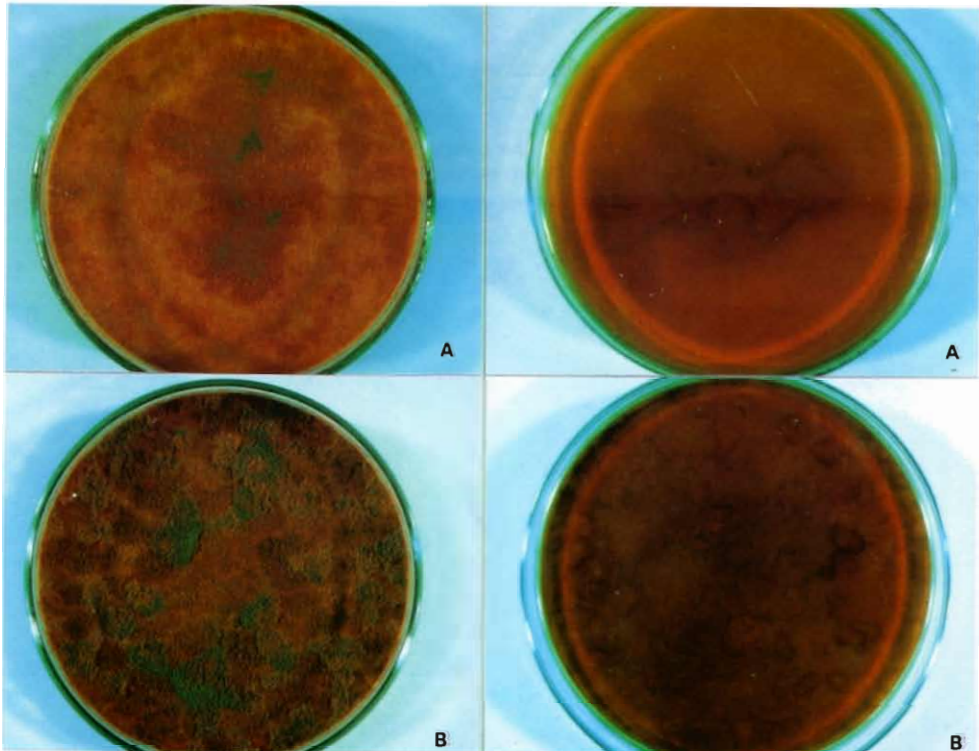
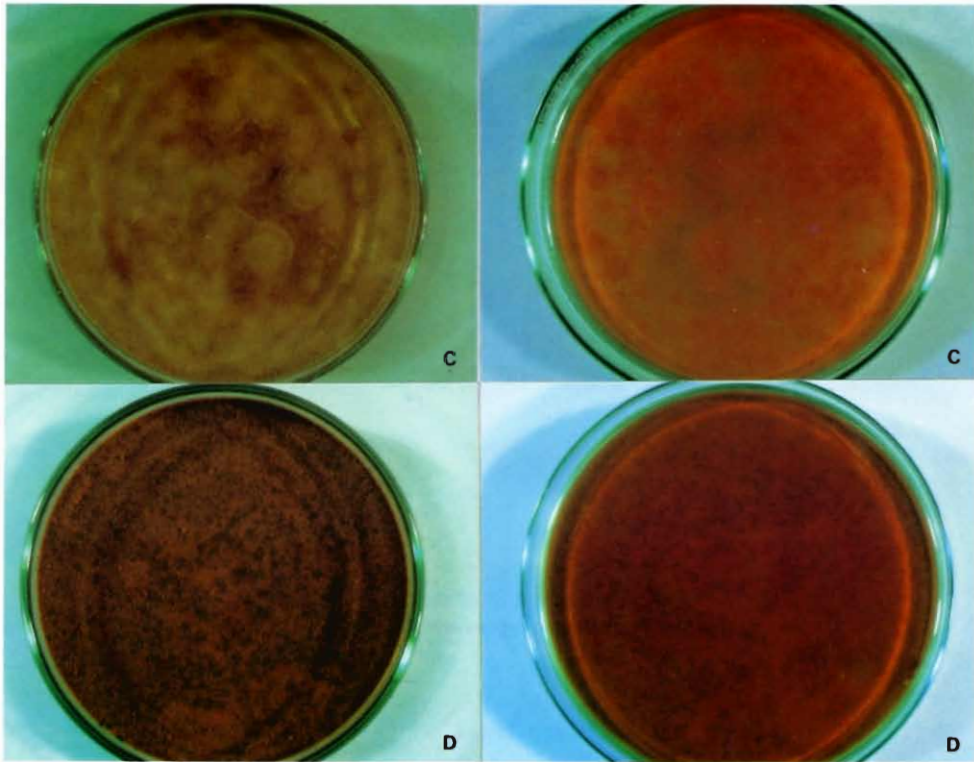


Fig. 1. Ascospores representative of the three species of *Aspergillus glaucus* group. A, *A. repens* and *A. tonophilus*; B, *A. ruber*; C, *A. chevalieri*.

Plate I





Explanation of Plates

Plate I

Colonies of representative species of the *Aspergillus glaucus* group showing A, *Aspergillus ruber* R-D-2; B, *A. repens* R-F-1; C, *A. tonophilus* Y-F-2; D, *A. chevalieri* G-B-1.

In each species, left colonies represent surface views; and right, the reverse of them.

Plate II

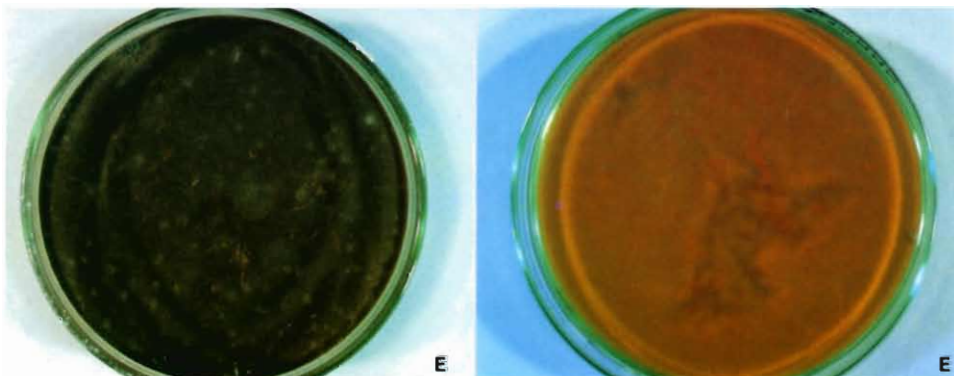


Plate II

Colonies of *Aspergillus restrictus* B-3-1 growing on M₄₀Y agar after 14 days incubation at room temperature. Left, surface and right, the reverse of a colony.

Plate III

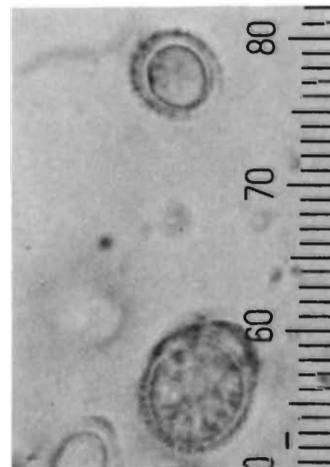
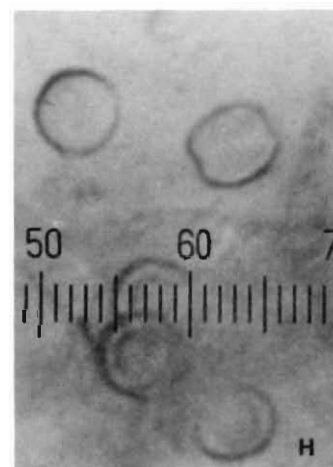
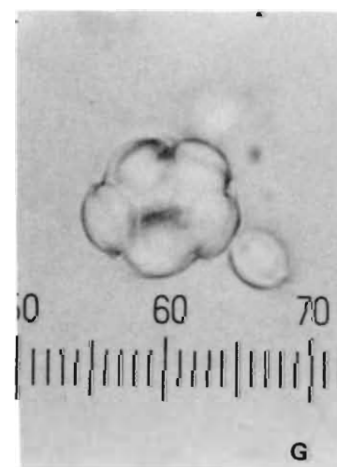
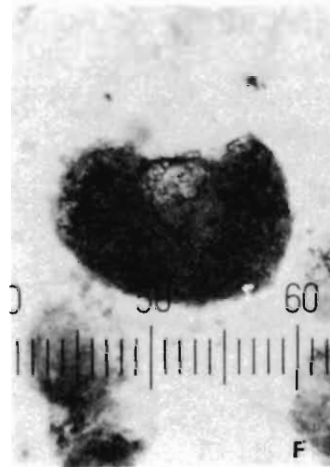
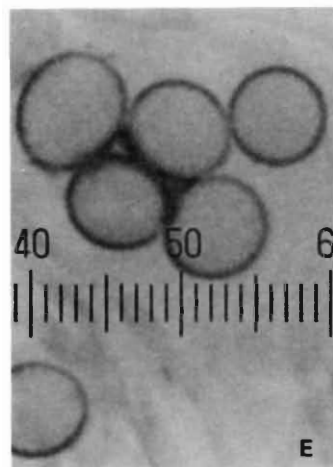
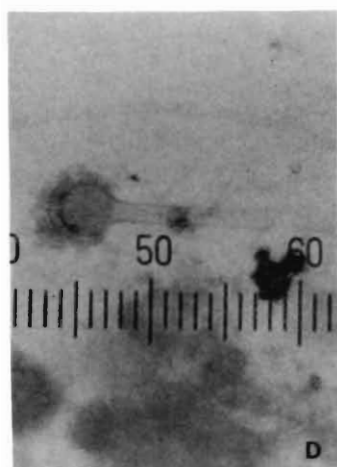
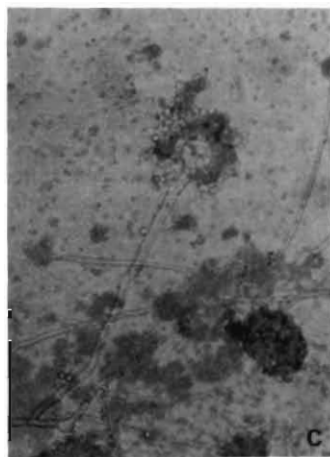
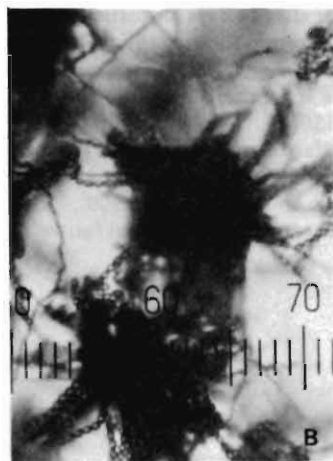


Plate III

Aspergillus ruber R-D-2 on M₄₀Y agar after 14 days incubation at room temperature.

A and B, Surface view at low magnification showing the typical, loosely radiate pattern of conidial heads, × 60(A) and × 150(B).

C and D, Detail of head showing the large, nearly globose vesicles bearing uniseriate sterigmata over almost the entire surface, × 150(C) and × 150(D).

E, Conidia showing an absence of surface markings typical of the species, × 1500.

F, Mature cleistothecium crushed to expose ascigerous tissue, × 150.

G, Mature ascus showing characteristic ornamentation, × 1500.

H and I, Mature ascospores showing characteristic equatorial furrow and spinulose walls, × 1500.

Plate IV

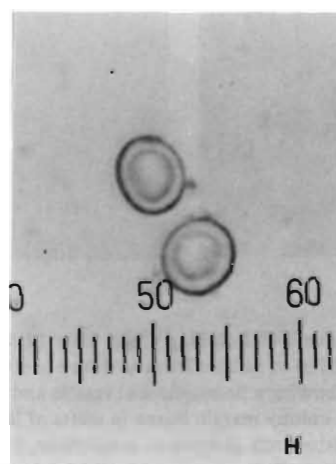
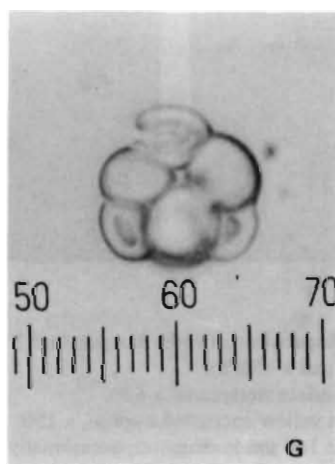
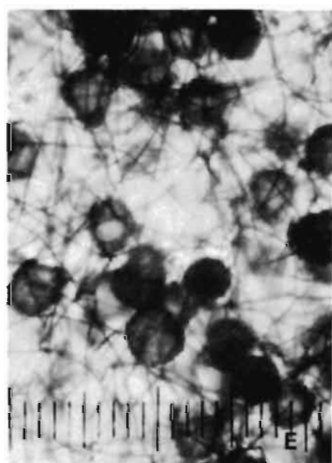
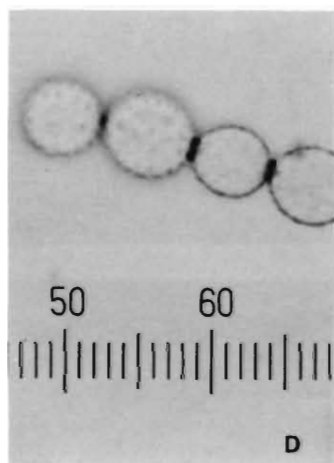
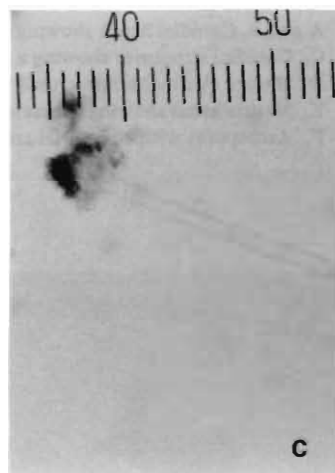
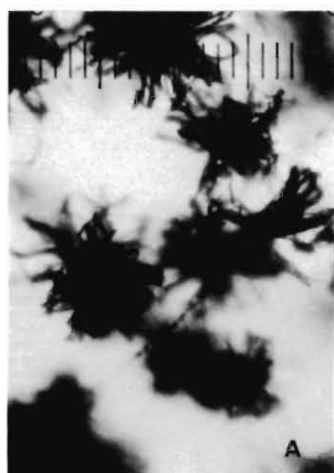


Plate VI

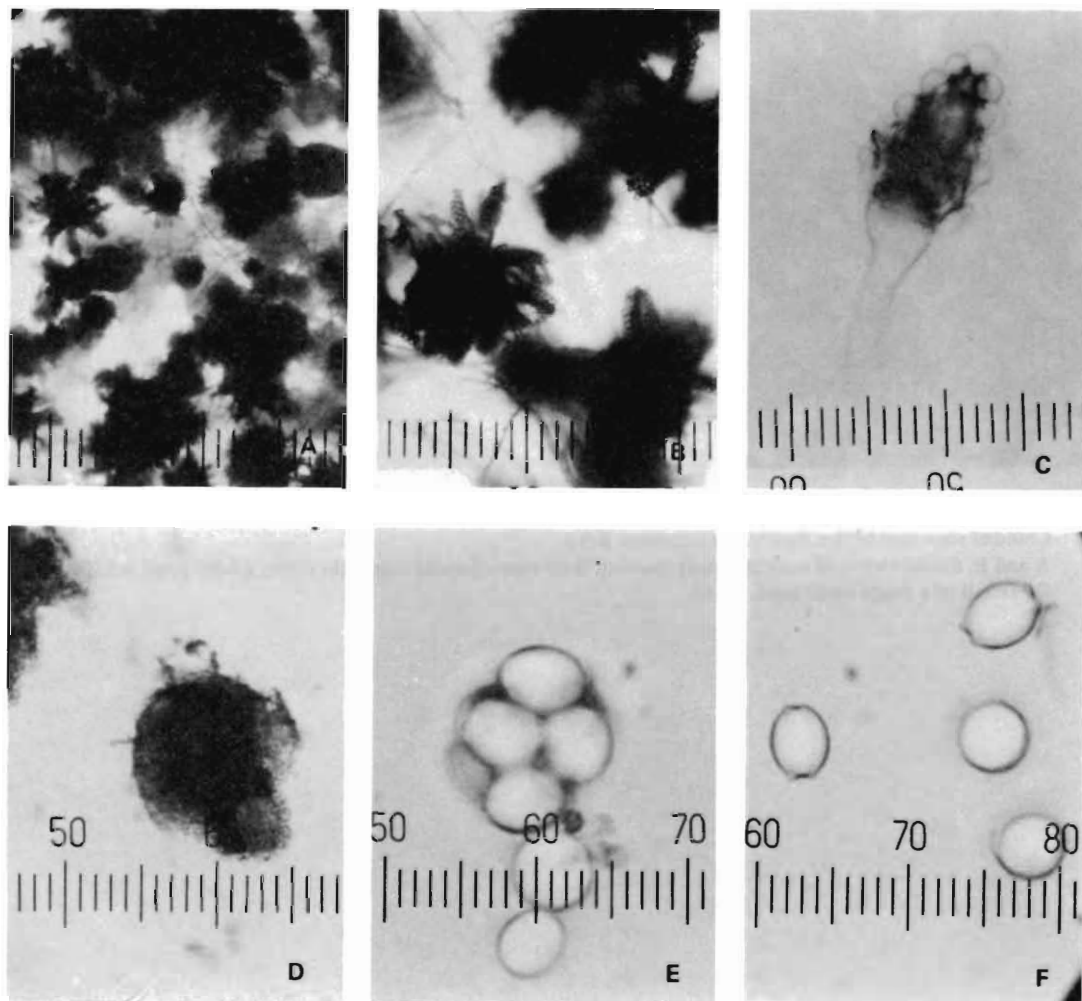


Plate IV

Aspergillus repens R-F-1 on M₄₀Y agar after 14 days incubation at room temperature.

A and B, Conidial heads of typically loose and radiate from as shown $\times 60$ (A) and $\times 150$ (B).

C, Single head forming a hemispherical vesicular apex of the conidiophore, $\times 150$.

D, Characteristic globose spinulose conidia $\times 1500$.

E, Cleistothecia at colony margin borne in wefts of dull olive encrusted hyphae, $\times 60$.

F, Mature cleistothecium crushed to expose ascigerous tissue, $\times 150$.

G, Mature ascus showing characteristic ornamentation, $\times 1500$.

H, Mature ascospores showing the absence of an equatorial furrow, $\times 1500$.

Plate VII

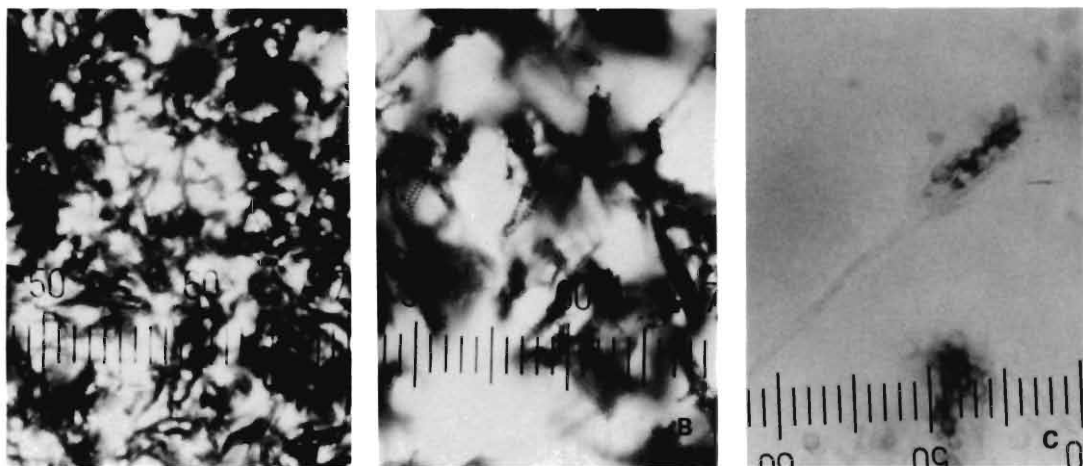


Plate VII

Conidial structure of the *Aspergillus restrictus* B-3-1.

A and B, Surface view of conidial heads showing their characteristic columnar form, $\times 60$ (A) and $\times 150$ (B).

C, Detail of a single small head, $\times 600$.