

農業環境技術研究所資料

第19号

パソコンを用いた植物病原細菌同定
システム「簡易同定96」の使い方

西 山 幸 司

(環境生物部 微生物管理科)

農林水産省
農業環境技術研究所
(平成8年12月)

農業環境技術研究所資料 第19号

審 査 会

会 長	永 田 徹	(所 長)
審 査 員	原 田 二 郎	(企画調整部長)
〃	西 尾 道 徳	(環境研究官)
〃	山 田 紘 一	(総務部長)
〃	福 原 道 一	(環境管理部長)
〃	蘭 道 生	(環境資源部長)
〃	大 内 昭	(環境生物部長)
〃	真 弓 洋 一	(資材動態部長)

パソコンを用いた植物病原細菌同定システム「簡易同定96」の使い方

西山 幸司

(1996年5月27日受理)

目	次
第1章. はじめに	1
第2章. 調査株データの取り方	2
1. MUCによる検索のためのデータの取り方 ..	2
2. APIによる検索のためのデータの取り方 ..	3
3. プロフィールインデックスの求め方	3
第3章. 検索方法	4
第4章. 検索可能菌種群	6
1. MUCで検索できる菌種群	6
2. APIで検索できる菌種群	7
第5章. セットアップ方法	8
第6章. プログラムの構造	8
1. MUCの陽性率法検索	8
2. MUCのプロフィール法検索	9
3. APIの陽性率法検索	10
4. APIのプロフィール法検索	12
5. 検索可能菌種群表示	13
6. 異常時対策	13
7. 表処理作業の補助説明	13
第7章. 簡易同定78	21
1. 培地の調製および検査方法	21
2. 検索方法	22
付録. 参考文献	22

第1章. はじめに

簡易同定法に関して著者は、1978年にはじめて「植物病原細菌簡易同定法の試案」を公表し、その後も若干の改良を加えてきた。このほかに、コンピュータを利用して行う簡易同定法を新たに開発した。前者の簡易同定法は二分法検索表に基づいており、後者のコンピュータ利用によるものは鑑別表に基づいているので、両者は質的に異なる。そこで、両者を区別する必要から、前者を「簡易同定78」、後者を「簡易同定96」と称することにす。本マニュアルは「簡易同定96」の使い方を述べるものであるが、異なる方法によって得られる結果は、結果の相互検証に役立つと考えられるので、「簡易同定78」についても第7章に補足説明として述べることにした。

簡易同定法の目的は、比較的簡便・迅速に検査できる少数の細菌学的性質を用いて、効率よく同定されるべき菌種を推定することにあるが、ここには二つの問題がある。一つはどのような細菌学的性質をどのよう

な方法で検査するかということであり、他の一つはその検査結果から菌種をどのような方法で検索するかということである。

「簡易同定78」においては、細菌学的性質は通常の同定で採用されている試験方法を用いて2～4日目に結果を判定し、二分法で検索している。この方法は、検索方法が視覚的で理解しやすいという特徴があり、典型的な株は正しく同定されるが、反面では情報量が少ないために変異のある株は同定できなったり、誤った同定結果に導かれることにもなる。しかし、1970年代前半までは、細菌学的性質を調査してもそれを検索にどのように利用して同定結果を導くべきかの方法論が十分確立していなかった時代である。すなわち、多くの場合は宿主に対する病原性から同定結果として導かれる菌種を推定し、その後で、補足的に細菌学的性質を羅列していたに過ぎない。例えば、オキシダーゼ活性陽性の *Erwinia aroideae* (今日の *E. carotovora* subsp. *carotovora*) が存在したり、アルギニンジヒドロラーゼ活性陽性の *Pseudomonas lachrymans* (今日の *P. syringae* pv. *lachrymans*) が存在するとい

う結果が導かれた。前者の例は腐敗性をマークに選抜したために *P. marginalis* の混入を許してしまったものであり、後者の例は病原性試験が不十分なために非病原菌（あるいは後から侵入した二次的病原菌）を真の病原菌と誤認したことに原因があると推察される。これらは細菌学的性質の検査結果を軽視したために生じた事故と言わざるをえない。

二分法検索表に基づく検索は、同種内の典型的でない株を同定する際には、効果的でないことを上に述べた。これを解決する方法として、鑑別表を利用して検索することが考えられる。「簡易同定96」は、陽性率あるいはプロフィールインデックスで表す鑑別表に基づく検索方法を採用している。しかし、鑑別表の基になるデータは存在しないので、農林水産省微生物遺伝バンク所蔵株をはじめ多数の菌株を調査して、自前のデータベースを作成することとした。その際、調査すべき細菌学的性質の項目は、調査の簡便性、検索結果の合理性等を予備試験によって確かめてから決めることとし、結果として、医学細菌同定キットとして市販されている API 20 NE と自らが開発したものを採用することとした。前者は市販品であり保存も容易であるが、やや高価なので、以下に述べる MUC 法で予備的に検査し、5～10株に1回の割合で API 法で検査するのが現実的である。

検索に用いるプログラムと鑑別表のデータを合わせると約460 KB の大きさがある。プログラムはパナファコム製の ACE/Win V2.0 で書いてあり、MS-DOS 6.2/V、MS-Windows V3.1 または Microsoft Windows 95 上で動作する。なお、将来はネットワーク上での利用あるいは他の OS やソフト上でも利用できるようにしたいと考えているが、本使用説明書は単体として ACE/Win で利用する場合を想定したものである。

第2章. 調査株データの取り方

1. MUC による検索のためのデータの取り方

MUC による検索のためのデータの取り方について以下に述べる。調査項目は7種類の炭素源の利用試験と緑色蛍光色素の産生、集落の色調の有無、40℃下での生育、グラム反応である。結果は図-1 に示すデータシートに記入する。

1). 炭素源利用能の試験

炭素源の利用試験は、96穴マイクロプレートの各穴に基礎培地6滴、炭素源2滴、接種菌液1滴の合計9

滴を分注する方法により行う。基礎培地の組成は以下のとおりである。NH₄H₂PO₄ 1.5g, KCl 0.3g, MgSO₄ · 7H₂O 0.3g, 0.5%プロムチモールブルー (BTB) 水溶液 45ml, イーストエキス・ペプトン水 6ml, 寒天 3g, 水 1,000ml, pH 7.0。滅菌は110℃で10分間オートクレーブする。なお、イーストエキス・ペプトン水はイーストエキス 0.5g, ペプトン 1g, 水 100ml である。炭素源溶液は糖質の場合は2.25%, 有機酸の場合は1.35%水溶液とする。供試糖質にはスクロース (SUC), トレハロース (TRE), ラクトース (LAC), ソルビトール (SOR), イノシトール (INO), デルシトール (DUL) を、有機酸には酒石酸ナトリウム (TAA) を用いる。滅菌は110℃で10分間オートクレーブする。

マイクロプレートへの分注は以下の方法により行う。基礎培地を湯煎で溶解後約50℃に冷却し、マイクロプレートの各穴に6滴ずつ分注し、次に7種類の炭素源または対照の滅菌水を列方向に1種類ずつ各2滴分注し、最後に菌液を行方向に1種類ずつ各1滴分注する。分注には口部に綿を詰めて滅菌したパスツールピペットを用いる。なお、マイクロプレートは操作を簡便にするために途中に2～3列の空白を設け、1枚のプレートで8～10種類の細菌を検査する。

マイクロプレートは26℃で培養し、結果の判定は24時間培養ごとに3回行い、プレートの方から光を当て、糖質においては培地の黄変を、有機酸では培地の青変を陽性と判定する。

2). 緑色蛍光色素の生産性

緑色蛍光色素の生産性 (FLU) は、市販のキングB培地 (日本製薬または栄研化学製) を用いて作成した斜面に細菌を移植し、26℃で培養して3日間毎日紫外線下で観察し、黄緑色蛍光色素の観察されたものを陽性とする。

3). 集落の色調の有無

集落の色調の有無 (CCL) は、普通寒天あるいはPSA, PPGA, キングB培地等の培地上に生育した細菌が無色あるいは白色以外の色調すなわち赤色, 黄色, 橙色等の色調を示す場合を陽性とする。

4). 40℃下での生育

40℃下での生育 (TMP) の有無は、ペプトン水またはYPGS培地 (イーストエキス 1g, ペプトン 5g, グルコース 3g, スクロース 3g, NaCl 3g, 水 1,000ml, pH 7.0, 15 x 150mm試験管に5ml分注) に細菌懸濁液から1白金耳を移植し、正確に40℃に調整したウォーターバス内に培地部分が完全に浸漬される

ように静置培養する。結果は3日間毎日透過光線下で観察し、細菌が生育して培地が混濁したものを陽性とする。

5). グラム反応

グラム反応 (TPH) は、劉のグラム鑑別法で判定する。すなわち、3% KOH 水溶液の1滴と普通寒天斜面培養の新鮮な細菌の1白金耳とをスライドガラス上で混和し、混和液が粘ちょうようになって白金耳を持ち上げると糸を引くようになるものをグラム陰性と判定し、混和液がいつまでもさらさらして粘ちょう液にならず白金耳を持ち上げても糸を引くようにならないものをグラム陽性と判定する。

6). 接種用細菌懸濁液の作り方

普通寒天、PPGAまたはPSAの斜面培地に1~2日間26℃で培養した細菌を径15mm長さ150mmの試験管に作成した5mlの滅菌水に懸濁する。濃度はカロリメーターを用いて測定し、滅菌水の透過度を100%として $T_{610}=55\sim75\%$ に調整する。これは、吸光度で表すと $A_{610}=0.13\sim0.26$ 、平均的細菌における菌数で表すと約 10^8 cfu/mlである。

2. APIによる検索のためのデータの取り方

APIによる検索のためのデータの取り方について以下に述べる。APIに用いるデータは、アピ20NEキット(製造元: BIO MERIEUX S. A., フランス, 輸入元: 日本ビオメリユーバイテック株式会社, 東京)を用いて調査する。その調査項目は8種類の生化学的性状テスト, 12項目の利用試験およびオキシダーゼ活性である。結果は図-2に示すデータシートに記入する。

1). アピ20NEキットの試験方法

アピ20NEキットは合計21項目の細菌学的性状が1枚のストライプの上で調査できるようになっている。8種類の生化学的性状テストは硝酸塩の還元(NIT), インドールの産生(TRP), 発酵性試験(FER), アルギニンジヒドロラーゼ活性(ADH), ウレアーゼ活性(URE), β -グルコシダーゼ活性(ESC), ゼラチンの液化(GEL), β -ガラクトシダーゼ活性(PNG)である。12項目の利用試験はグルコース(GLU), L-アラビノース(ARA), D-マンノース(MNE), D-マンニトール(MAN), N-アセチル-D-グルコサミン(NAG), マルトース(MAL), グルコン酸カリウム(GNT), *n*-カプリン酸(CAP), アジピン酸(ADI), *dl*-リンゴ酸(MLT), クエン酸ナトリウム(CIT), 酢酸フェニル(PAC)である。オキシダーゼ活性の有無は炭水化物

の利用試験の終了後にテトラメチル-P-フェニレンジアミン試薬を添加して判定する。

菌液の分注はアピ20NEキットの処方に従って行い、26℃に培養して、1, 2, 3日目の反応を測定する。なお、試薬を添加して調査するNITとTRPは2日目に行い、オキシダーゼ活性は3日間培養後のグルコース利用試験等のカップ部分を用いて検査する。

2). 接種用細菌懸濁液の作り方

MUCの場合と同様の方法で作成する。

3. プロフィールインデックスの求め方

MUCでは11項目の試験を、APIでは21項目の試験をする。これらの性質が陽性であったか、陰性であったかを簡単に表現する方法として、試験項目を3項目ずつ区切り、オクタコードの文字列に変換して表す。

MUCでは検査項目を図-3に示す順に配列し、3の倍数プラス1の位置が陽性の場合には1点、3の倍数プラス2の位置が陽性の場合には2点、3の倍数の位置が陽性の場合には4点を与え、3項目ずつ区切って加算する。結果として、0000~7773までの数字列が得られる。

APIでは検査項目を図-4に示す順に配列し、3の倍数プラス1の位置が陽性の場合には1点、3の倍数プラス2の位置が陽性の場合には2点、3の倍数の位置が陽性の場合には4点を与え、3項目ずつ区切って加算する。結果として、000000~777777までの数字列が得られる。

第3章. 検索方法

MUCまたはAPIで求めた2日目または3日目の細菌学的性質をプロフィールインデックスで入力し、同定候補として、陽性率において近似する菌種、または合致するプロフィールインデックスを持つ菌種を得る。プログラムの基本構造は図-5に示すとおりである。まず、初期画面が表示されるので、希望する作業を選択する(画面をマウスでクリックまたはファンクションキーを押す)。それ以後は画面に表示される質問や指示に従って操作する。

1). 初期画面

第1メニュー画面

見出し：《簡易同定・検索専用》

- | | |
|---------------------|---|
| F 1 : MUC 陽性率法検索 | ----- MUC 陽性率法で検索する。
メニュー画面11へ移る。 |
| F 2 : MUC プロフィール法検索 | ----- MUC プロフィールインデックス法で検索する。
メニュー画面12へ移る。 |
| F 3 : API 陽性率法検索 | ----- API 陽性率法で検索する。
メニュー画面13へ移る。 |
| F 4 : API プロフィール法検索 | ----- API プロフィールインデックス法で検索する。
メニュー画面14へ移る。 |
| F 6 : 検索可能菌種群表示 | ----- MUC または API で検索できる菌種群を表示する。
実行プログラム P 3 へ移る。 |
| F 9 : 異常時対策 | ----- 何らかの事情で異常終了した場合の事後処理として、次回立ち上げたとき最初に実行する。
(不要な中間表を削除するプログラムが入っている)
実行プログラム P 4 へ移る。 |
| F 10 : 終了 | ----- 本作業を終了する。 |

2). MUC 陽性率法による検索

第11メニュー画面

見出し：《検索方法の選択》

- | | |
|------------------------|--|
| F 1 : MUC 陽性率法検索開始 | ----- MUC 陽性率法による検索を開始する。
実行プログラム P 21 へ移る。
(実行後はこの画面へ返って来る) |
| F 7 : MUC プロフィール法検索に変更 | ----- MUC プロフィールインデックス法による検索に変更する。
メニュー画面12へ移る。 |
| F 8 : API 陽性率法検索に変更 | ----- API 陽性率法による検索に変更する。
メニュー画面13へ移る。 |
| F 9 : API プロフィール法検索に変更 | ----- API プロフィールインデックス法による検索に変更する。
メニュー画面14へ移る。 |
| F 10 : 戻り | ----- 第1メニュー画面へ戻る。 |

3). MUC プロフィールインデックス法による検索

第12メニュー画面

見出し：《検索方法の選択》

- F 2 : MUC プロフィール法検索開始 ----- MUC プロフィールインデックス法による検索を開始する。
実行プログラムP 22へ移る。
(実行後はこの画面へ返ってくる)
- F 6 : MUC 陽性率法検索に変更 ----- MUC 陽性率法による検索に変更する。
メニュー画面11へ移る。
- F 8 : API 陽性率法検索に変更 ----- API 陽性率法による検索に変更する。
メニュー画面13へ移る。
- F 9 : API プロフィール法検索に変更 ----- API プロフィールインデックス法による検索に変更する。
メニュー画面14へ移る。
- F 10 : 戻り ----- 第1メニュー画面へ戻る。

4). API 陽性率法による検索

第13メニュー画面

見出し：《検索方法の選択》

- F 3 : API 陽性率法検索開始 ----- API 陽性率法による検索を開始する。
実行プログラムP 23へ移る。
(実行後はこの画面へ返ってくる)
- F 6 : MUC 陽性率法検索に変更 ----- MUC 陽性率法による検索に変更する。
メニュー画面11へ移る。
- F 7 : MUC プロフィール法検索に変更 ----- MUC プロフィールインデックス法による検索に変更する。
メニュー画面12へ移る。
- F 9 : API プロフィール法検索に変更 ----- API プロフィールインデックス法による検索に変更する。
メニュー画面14へ移る。
- F 10 : 戻り ----- 第1メニュー画面へ戻る。

5). API プロフィールインデックス法による検索

第14メニュー画面

見出し：《検索方法の選択》

- F 4 : API プロフィール法検索開始 ----- API プロフィールインデックス法による検索を開始する。
実行プログラムP 24へ移る。
(実行後はこの画面へ返ってくる)
- F 6 : MUC 陽性率法検索に変更 ----- MUC 陽性率法による検索に変更する。
メニュー画面11へ移る。
- F 7 : MUC プロフィール法検索に変更 ----- MUC プロフィールインデックス法による検索に変更する。
メニュー画面12へ移る。
- F 8 : API 陽性率法検索に変更 ----- API 陽性率法による検索に変更する。
メニュー画面13へ移る。
- F 10 : 戻り ----- 第1メニュー画面へ戻る。

6). 実行プログラム P 21～P 24

ここでは画面表示に対して取るべき作業について述べ、プログラムの内容は第 6 章で述べる。

図-6 あるいは図-7 に示す画面から以下の 6 項目のデータを入力する。

(1) 試験番号：4 バイト以内の文字。

(2) 菌株番号：15 バイト以内の文字。

(3) 検査年月日：例 (96.01.01) のように 8 バイトで入力する。

なお、前回入力と同じ場合は、キーボードから “.” 記号を入力する。

(4) 検査担当者：4 バイト以内の文字。

なお、前回入力と同じ場合は、キーボードから “^” 記号を入力する。

(5) 培養期間：1 バイト文字の 2 または 3 を入力する。

なお、前回入力と同じ場合は、キーボードから “.” 記号を入力する。また、空白を入力すると 2 が入力されたものとみなす。

(6) プロフィールインデックスを 1 バイト文字で入力する。MUC の場合は 4 文字 (0000～7773 の間)、API の場合は 7 文字 (0000000～7777777 の間) を入力する。なお、各々の検査項目の陽性または陰性の結果は、プロフィールインデックスから変換して自動的に表示し、入力される。

検索結果は、まず画面に表示されるので、印刷を希望する場合は所定のキー (F5) を選ぶと、図-8, 10 (陽性率法による検索の場合)、図-9, 11 (プロフィールインデックス法による検索の場合) に示すような印刷物が得られる。

第 4 章. 検索可能菌種群

MUC, API で現在検索出来る菌種群は以下のとおりである。API では分類階級が種および亜種以上または pathovar 以上の分類群に区分されているが、MUC では API で区分した分類群をさらに区分したものもある。なお、検索可能菌種群はわが国に分布し、ある程度の菌株が調査されているものに限っている。これは、わが国での分布が知られていない菌群が同定候補の一部として表示されると、かえって候補菌種群の絞り込みを困難にすると予想されるからである。本邦での発生が報告されていない菌群あるいは分布は知られていないものの、まだ十分なデータの蓄積がされていない菌種群についても、候補に挙がることを期待する場合は、農業環境技術研究所環境生物部微生物管理科微生物特性・分類研究室にある MUC および API 開発用ソフトの方を利用するように勧める。

1. MUC で検索できる菌種群

Genus *Agrobacterium*

A. tumefaciens bv. 1

A. tumefaciens bv. 2

A. vitis

Genus *Clavibacter*

Cl. michiganensis subsp. *michiganensis*

Genus *Curtobacterium*

C. flaccumfaciens pv. *oortii*

Genus *Erwinia*

E. ananas

E. carotovora subsp. *carotovora*

E. chrysanthemi

E. chrysanthemi pv. *zeae*

E. cyripedii

E. herbicola pv. *milletitiae*

E. rhapontici

Genus *Pseudomonas*

P. andropogonis

P. avenae

P. caryophylli

P. cepacia

P. cichorii

P. corrugata

P. fluorescens

P. gladioli

P. gladioli pv. *gladioli* SUC-

P. glumae

P. marginalis pv. *marginalis* SUC+

P. marginalis pv. *marginalis* SUC-

P. plantarii

P. pseudoalcaligenes subsp. *konjaci*

P. putida
P. solanacearum
P. solanacearum bv. 2
P. solanacearum bv. 3
P. solanacearum bv. 4
P. syringae pv. *syringae*
P. syringae pv. *actinidiae*
P. syringae pv. *aptata*
P. syringae pv. *atropurpurea* FLU+
P. syringae pv. *atropurpurea* FLU-
P. syringae pv. *coronafaciens*
P. syringae pv. *glycinea*
P. syringae pv. *japonica*
P. syringae pv. *lachrymans* FLU+
P. syringae pv. *lachrymans* FLU-
P. syringae pv. *maculicola*
P. syringae pv. *mori*
P. syringae pv. *myricae*
P. syringae pv. *oryzae*
P. syringae pv. *phaseolicola*
P. syringae pv. *pisi* FLU-
P. syringae pv. *tabaci*
P. syringae pv. *tomato*
P. viridiflava

Genus *Xanthomonas*

X. campestris pv. *campestris*
X. campestris pv. *carotae*
X. campestris pv. *citri*
X. campestris pv. *glycines*
X. campestris pv. *mangiferaeindicae*
X. campestris pv. *oryzae*
X. campestris pv. *pruni*
X. campestris pv. *vesicatoria*
X. campestris pv. *vitians*

2. APIで検索できる菌種群

Genus *Agrobacterium*

A. tumefaciens

Genus *Clavibacter*

Cl. michiganensis subsp. *michiganensis*

Genus *Curtobacterium*

C. flaccumfaciens pv. *oortii*

Genus *Erwinia*

E. ananas

E. carotovora subsp. *carotovora*

E. chrysanthemi

E. herbicola pv. *millettiae*

E. rhapontici

Genus *Pseudomonas*

P. andropogoni

P. avenae

P. caryophylli

P. cepacia

P. cichorii

P. corrugata

P. fluorescens

P. gladioli

P. gladioli pv. *gladioli*

P. glumae

P. marginalis pv. *marginalis*

P. plantarii

P. pseudoalcaligenes subsp. *konjaci*

P. putida

P. solanacearum

P. syringae pv. *syringae*

P. syringae pv. *actinidiae*

P. syringae pv. *aptata*

P. syringae pv. *atropurpurea*

P. syringae pv. *glycinea*

P. syringae pv. *japonica*

P. syringae pv. *lachrymans*

P. syringae pv. *maculicola*

P. syringae pv. *mori*

P. syringae pv. *morsprunorum*

P. syringae pv. *oryzae*

P. syringae pv. *phaseolicola*

P. syringae pv. *tabaci*

P. viridiflava

Genus *Xanthomonas*

X. campestris pv. *campestris*

X. campestris pv. *carotae*

X. campestris pv. *citri*

X. campestris pv. *glycines*

X. campestris pv. *mangiferaeindicae*

X. campestris pv. *oryzae*

X. campestris pv. *pruni*

X. campestris pv. *vesicatoria*

X. campestris pv. *vitians*

第5章. セットアップ方法

セットアップは以下の手順で行う。

- 1). ACE/Win のインストール
 - 1-1. ACE/Win が既にインストールされている場合は2)へ進む。
 - 1-2. ハードディスクドライブにACE/Win V2.0以上をインストールする。
インストールの方法は、MS-Windows V3.1およびACE/Winの指示に従う。
- 2). DB名の定義
 1. ACE/Winを起動し、DB定義をクリックする。
 2. DB名：0 (ゼロ)
パス：A:¥
DB形式：リスト形式
および
DB名：AMX (本説明で例として使用。ユーザー希望の文字または数字でよい)
パス：C:¥ACE¥AMX (例として、CドライブにAMXと言う名のディレクトリを作成する)
DB形式：リスト形式
を作成する。
- 3). 「簡易同定96」ソフトの複写
 - 3-1. ドライブAに「簡易同定96」のソフトをセッ

トする。

- 3-2. 本ソフトはDB名0に複写されているので、これをDB名AMXに転写する。
- 3-3. ファイルオープンをクリックし、AT-START/AMXと入力する。
8行目のアポストロフ(')を削除 (DELキーを1回押す) する。
#D8=0を#D8=AMXに変更する。
ファイル保存をクリックし、以上の変更を保存する。
- 3-4. 自分用の自動プログラムに接続し、メニュー画面から操作出来るようにする場合は、以下の操作を行う。なお、この操作を行わないと本ソフトの終了を選択した場合に自動操作は解除される。
ファイルオープンをクリックし、AT-END/AMXと入力する。
3行目にアポストロフ(')を挿入する。
すなわち '@自動終了' となる。
6行目のアポストロフ(')を削除し、AT-HOJYO/10の代わりに自分用の続けたいプログラム名とDB名を書き込む。
ファイル保存をクリックし、以上の変更を保存する。

第6章. プログラムの構造

実行プログラムの主な作業は以下のとおりである。

1. MUCの陽性率法検索

(実行プログラムP21の主な作業)	(作業内容)
001 \$\$表複写 M-GEN 7 D-KEN	M-GEN 7の表を複写してD-KEN表を作る
002 \$\$画面入力 M-IN 2 D-KEN	M-IN 2の画面から入力し、データをD-KEN表に蓄える
003 @条件 #B5="2"	培養期間(#B5)が2日の場合に実行する
004 \$\$表複写 M2D-POS POS 6	M2D-POSデータ表を複写してPOS 6表を作る
005 \$\$更新 \$表処理 POS 6 M-DF 11	POS 6表をM-DF 11の指示に従って更新する M-DF 11の作業はB-1を参照
006 \$\$計算 POSS=(SUC)*(LAC)*(TRE)*(SOR) *(INO)*(DUL)*(TAA)*(CCL)*(FLU)*(TMP) *(TPH) POS 6	(SUC)~(TPH)までの11項目の陽性率の積を算出し、 POS 6表の(POSS)項目に格納する
007 \$\$計算 相対比=POSS/IDCS POS 6	006で求めたPOSS値をM2D-POS表から受け継いだ理論値(IDCS)で除し、結果をPOS 6表の(相対比)項目に格納する
008 \$\$分類 POS 6 POS 7 相対比↓学名↑	POS 6表の項目(相対比)を降順に、相対比が同じ場合は

009 \$\$表削除 POS 6	学名の abc 順に並べ替え、結果を POS 7 表に格納する 不要になった中間表を削除する
010 @条件終了	003で設定した条件の及ぶ範囲
011 @条件 #B5="3"	培養期間(#B5)が3日の場合に実行する
012 \$\$表複写 M3D-POS POS 6	M3D-POS データ表を複写して POS 6 表を作る
013 \$\$更新 \$表処理 POS 6 M-DF 11	POS 6 表を M-DF 11の指示に従って更新する M-DF 11の作業は B-1 を参照
014 \$\$計算 POSS=(SUC)*(LAC)*(TRE)*(SOR) *(INO)*(DUL)*(TAA)*(CCL)*(FLU)*(TMP) *(TPH) POS 6	(SUC)~(TPH)までの11項目の陽性率の積を算出し、 POS 6 表の(POSS)項目に格納する
015 \$\$計算 相対比=POSS/IDCS POS 6	014で求めた POSS 値を M3D-POS表から受け継いだ理 論値(IDCS)で除し、結果を POS 6 表の(相対比)項目に 格納する
016 \$\$分類 POS 6 POS 7 相対比↓学名↑	POS 6 表の項目(相対比)を降順に、相対比が同じ場合は 学名の abc 順に並べ替え、結果を POS 7 表に格納する
017 \$\$表削除 POS 6	不要になった中間表を削除する
018 @条件終了	011で設定した条件の及ぶ範囲
019 \$\$計算 POS 7 #M11=SUM(相対比)	POS 7 表の項目(相対比)を集計し、メモ座標11(#M11) に格納する
020 \$\$更新 \$表処理 POS 7 M-DF 13	POS 7 表を M-DF 13の指示に従って更新する。M-DF 13 の作業は B-2 を参照
021 \$\$帳票印刷 POS 7 M-P 3 \$画面表示	POS 7 表を M-P 3 に指定する形式で画面に表示する
022 @FK定義 F5=印刷開始 F8=次作業	ファンクションキーのうち、F5とF8のみが動作する ように定義する
023 @条件 #FK=F5	F5のファンクションキーが選択された場合に実行する
024 \$\$帳票印刷 POS 7 M-P 3 \$印刷	POS 7 表を M-P 3 に指定する形式で印刷する
025 \$\$表削除 POS 7	不要になった中間表を削除する
026 @条件終了	023で設定した条件の及ぶ範囲
027 @条件 #FK=F8	F8のファンクションキーが選択された場合に実行する
028 \$\$表削除 POS 7	不要になった中間表を削除する
029 @条件終了	027で設定した条件の及ぶ範囲
030 \$\$自動 \$実行 AT-P 11	上位階層(AT-P 11)へ返る

2. MUCのプロフィール法検索

(実行プログラム P22の主な作業)

(作業内容)

001 \$\$表複写 M-GEN 7 D-KEN	M-GEN 7 の表を複写して D-KEN 表を作る
002 \$\$画面入力 M-IN 2 D-KEN	M-IN 2 の画面から入力し、データを D-KEN 表に蓄える
003 @条件 #B5="2"	培養期間(#B5)が2日の場合に実行する
004 \$\$検索 M2D-PRF PRF 1	002で入力したプロフィールインデックスに一致するイン デックスを持つデータを M2D-PRF データ表から検索 し、PRF 1 表に格納する
005 @条件 #M256=0	004で一致するデータがなかったときに実行する
006 @メッセージ“該当する菌種はない”	画面のメッセージ行に、検索条件に一致するデータがな かったことを知らせる

007 \$\$自動 \$実行 AT-P 12	上位階層(AT-P 12)へ返る
008 @条件終了	005で設定した条件の及ぶ範囲
009 \$\$分類 PRF 1 PRF 2 割合↓学名↑	PRF 1 表の項目(割合)の値が大きい順に並べ替える。割合が同じ場合は学名の abc 順に並べる。結果を PRF 2 表に格納する
010 @条件終了	003で設定した条件の及ぶ範囲
011 @条件 #B 5 = " 3 "	培養期間(#B 5)が3日の場合に実行する
012 \$\$検索 M 3 D-PRF PRF 1	002で入力したプロフィールインデックスに一致するインデックスを持つデータを M 3 D-PRF データ表から検索し、PRF 1 表に格納する
013 @条件 #M 256 = 0	012で一致するデータがなかったときに実行する
014 @メッセージ "該当する菌種はない"	画面のメッセージ行に、検索条件に一致するデータがなかったことを知らせる
015 \$\$自動 \$実行 AT-P 12	上位階層(AT-P 12)へ返る
016 @条件終了	013で設定した条件の及ぶ範囲
017 \$\$分類 PRF 1 PRF 2 割合↓学名↑	PRF 1 表の項目(割合)の値が大きい順に並べ替える。割合が同じ場合は学名の abc 順に並べる。結果を PRF 2 表に格納する
018 @条件終了	011で設定した条件の及ぶ範囲
019 \$\$表削除 PRF 1	不要になった中間表を削除する
020 \$\$帳票印刷 PRF 2 M-P 4 \$画面表示	PRF 2 表を M-P 4 に指定する形式で画面に表示する
021 @FK 定義 F 5 =印刷開始 F 8 =次作業	ファンクションキーのうち、F 5 と F 8 のみが動作するように定義する
022 @条件 #FK=F 5	F 5 のファンクションキーが選択された場合に実行する
023 \$\$帳票印刷 PRF 2 M-P 4 \$印刷	PRF 2 表を M-P 4 に指定する形式で印刷する
024 \$\$表削除 PRF 2	不要になった中間表を削除する
025 @条件終了	022で設定した条件の及ぶ範囲
026 @条件 #FK=F 8	F 8 のファンクションキーが選択された場合に実行する
027 \$\$表削除 PRF 2	不要になった中間表を削除する
028 @条件終了	026で設定した条件の及ぶ範囲
029 \$\$自動 \$実行 AT-P 12	上位階層(AT-P 12)へ返る

3. APIの陽性率法検索

(実行プログラム P 23の主な作業)

(作業内容)

001 \$\$表複写 A-GEN 7 D-KEN	A-GEN 7 の表を複写して D-KEN 表を作る
002 \$\$画面入力 A-IN 2 D-KEN	A-IN 2 の画面から入力し、データを D-KEN 表に蓄える
003 @条件 #B 5 = " 2 "	培養期間(#B 5)が2日の場合に実行する
004 \$\$表複写 A 2 D-POS POS 6	A 2 D-POS データ表を複写して POS 6 表を作る
005 \$\$更新 \$表処理 POS 6 A-DF 11	POS 6 表を A-DF 11 の指示に従って更新する
	A-DF 11 の作業は B-1 を参照
006 \$\$ 計 算 POSS=(NIT) *(TRP) *(FER) *(ADH) *(URE) *(ESC) *(GEL) *(PNG) *(GLU) *(ARA) *(MNE) *(MAN) *(NAG) *(MAL) *(GNT) *(CAP) *(ADI) *(MLT) *(CIT) *(PAC) *(OXI) POS 6	(NIT) ~ (OXI) までの 21 項目の陽性率の積を算出し、POS 6 表の (POSS) 項目に格納する

007	\$\$計算 相対比=POSS/IDCS POS 6	006で求めた POSS 値を A 2 D-POS 表から受け継いだ理論値 (IDCS) で除し、結果を POS 6 表の (相対比) 項目に格納する
008	\$\$分類 POS 6 POS 7 相対比↓学名↑	POS 6 表の項目 (相対比) を降順に、相対比が同じ場合は学名の abc 順に並べ替え、結果を POS 7 表に格納する
009	\$\$表削除 POS 6	不要になった中間表を削除する
010	@条件終了	003で設定した条件の及ぶ範囲
011	@条件 #B 5 =" 3 "	培養期間 (#B 5) が 3 日の場合に実行する
012	\$\$表複写 A 3 D-POS POS 6	A 3 D-POS データ表を複写して POS 6 表を作る
013	\$\$更新 \$表処理 POS 6 A-DF 11	POS 6 表を A-DF 11 の指示に従って更新する A-DF 11 の作業は B- 1 を参照
014	\$\$ 計 算 POSS=(NIT) *(TRP) *(FER) *(ADH) *(URE) *(ESC) *(GEL) *(PNG) *(GLU) *(ARA) *(MNE) *(MAN) *(NAG) *(MAL) *(GNT) *(CAP) *(ADI) *(MLT) *(CIT) *(PAC) *(OXI) POS 6	(NIT) ~ (OXI) までの 21 項目の陽性率の積を算出し、POS 6 表の (POSS) 項目に格納する
015	\$\$計算 相対比=POSS/IDCS POS 6	014で求めた POSS 値を A 3 D-POS 表から受け継いだ理論値 (IDCS) で除し、結果を POS 6 表の (相対比) 項目に格納する
016	\$\$分類 POS 6 POS 7 相対比↓学名↑	POS 6 表の項目 (相対比) を降順に、相対比が同じ場合は学名の abc 順に並べ替え、結果を POS 7 表に格納する
017	\$\$表削除 POS 6	不要になった中間表を削除する
018	@条件終了	011で設定した条件の及ぶ範囲
019	\$\$計算 POS 7 #M 11=SUM(相対比)	POS 7 表の項目 (相対比) を集計し、メモ座標 11 (#M 11) に格納する
020	\$\$更新 \$表処理 POS 7 A-DF 13	POS 7 表を A-DF 13 の指示に従って更新する。A-DF 13 の作業は B- 2 を参照
021	\$\$帳票印刷 POS 7 A-P 3 \$画面表示	POS 7 表を A-P 3 に指定する形式で画面に表示する
022	@FK 定義 F 5 =印刷開始 F 8 =次作業	ファンクションキーのうち、F 5 と F 8 のみが動作するように定義する
023	@条件 #FK=F 5	F 5 のファンクションキーが選択された場合に実行する
024	\$\$帳票印刷 POS 7 A-P 3 \$印刷	POS 7 表を A-P 3 に指定する形式で印刷する
025	\$\$表削除 POS 7	不要になった中間表を削除する
026	@条件終了	023で設定した条件の及ぶ範囲
027	@条件 #FK=F 8	F 8 のファンクションキーが選択された場合に実行する
028	\$\$表削除 POS 7	不要になった中間表を削除する
029	@条件終了	027で設定した条件の及ぶ範囲
030	\$\$自動 \$実行 AT-P 13	上位階層 (AT-P 13) へ返る

4. APIのプロフィール法検索

(実行プログラム P 24の主な作業)	(作業内容)
001 \$\$表複写 A-GEN 7 D-KEN	A-GEN 7 の表を複写して D-KEN 表を作る
002 \$\$画面入力 A-IN 2 D-KEN	A-IN 2 の画面から入力し、データを D-KEN 表に蓄える
003 @条件 #B 5 = " 2 "	培養期間 (#B 5) が 2 日の場合に実行する
004 \$\$検索 A 2 D-PRF PRF 1	002 で入力したプロフィールインデックスに一致するインデックスを持つデータを A 2 D-PRF データ表から検索し、PRF 1 表に格納する
005 @条件 #M 256 = 0	004 で一致するデータがなかったときに実行する
006 @メッセージ "該当する菌種はない"	画面のメッセージ行に、検索条件に一致するデータがなかったことを知らせる
007 \$\$自動 \$実行 AT-P 14	上位階層(AT-P 14)へ返る
008 @条件終了	005 で設定した条件の及ぶ範囲
009 \$\$分類 PRF 1 PRF 2 割合↓学名↑	PRF 1 表の項目(割合)の値が大きい順に並べ替える。割合が同じ場合は学名の abc 順に並べる。結果を PRF 2 表に格納する
010 @条件終了	003 で設定した条件の及ぶ範囲
011 @条件 #B 5 = " 3 "	培養期間 (#B 5) が 3 日の場合に実行する
012 \$\$検索 A 3 D-PRF PRF 1	002 で入力したプロフィールインデックスに一致するインデックスを持つデータを A 3 D-PRF データ表から検索し、PRF 1 表に格納する
013 @条件 #M 256 = 0	012 で一致するデータがなかったときに実行する
014 @メッセージ "該当する菌種はない"	画面のメッセージ行に、検索条件に一致するデータがなかったことを知らせる
015 \$\$自動 \$実行 AT-P 14	上位階層(AT-P 14)へ返る
016 @条件終了	013 で設定した条件の及ぶ範囲
017 \$\$分類 PRF 1 PRF 2 割合↓学名↑	PRF 1 表の項目(割合)の値が大きい順に並べ替える。割合が同じ場合は学名の abc 順に並べる。結果を PRF 2 表に格納する
018 @条件終了	011 で設定した条件の及ぶ範囲
019 \$\$表削除 PRF 1	不要になった中間表を削除する
020 \$\$帳票印刷 PRF 2 A-P 4 \$画面表示	PRF 2 表を A-P 4 に指定する形式で画面に表示する
021 @FK 定義 F 5 =印刷開始 F 8 =次作業	ファンクションキーのうち、F 5 と F 8 のみが動作するように定義する
022 @条件 #FK=F 5	F 5 のファンクションキーが選択された場合に実行する
023 \$\$帳票印刷 PRF 2 A-P 4 \$印刷	PRF 2 表を A-P 4 に指定する形式で印刷する
024 \$\$表削除 PRF 2	不要になった中間表を削除する
025 @条件終了	022 で設定した条件の及ぶ範囲
026 @条件 #FK=F 8	F 8 のファンクションキーが選択された場合に実行する
027 \$\$表削除 PRF 2	不要になった中間表を削除する
028 @条件終了	026 で設定した条件の及ぶ範囲
029 \$\$自動 \$実行 AT-P 14	上位階層(AT-P 14)へ返る

5. 検索可能菌種群表示

(実行プログラム P3 の主な作業)	(作業内容)
001 @FK 定義 F2 = API 表示 F3 = MUC 表示 F5 = API 印刷 F6 = MUC 印刷 F8 = 次作業	ファンクションキーのうち, F2, F3, F5, F6, F8 のみが動作するように定義する
002 @条件 #FK=F2	F2 のファンクションキーが選択された場合に実行する
003 \$\$帳票印刷 A2D-POS A-P5 \$画面表示	A2D-POS 表を A-P5 に指定する形式で画面に表示する
004 @条件終了	002 で設定した条件の及ぶ範囲
005 @条件 #FK=F3	F3 のファンクションキーが選択された場合に実行する
006 \$\$帳票印刷 M2D-POS M-P5 \$画面表示	M2D-POS 表を M-P5 に指定する形式で画面に表示する
007 @条件終了	005 で設定した条件の及ぶ範囲
008 @条件 #FK=F5	F5 のファンクションキーが選択された場合に実行する
009 \$\$帳票印刷 A2D-POS A-P5 \$印刷	A2D-POS 表を A-P5 に指定する形式で印刷する
010 @条件終了	008 で設定した条件の及ぶ範囲
011 @条件 #FK=F6	F6 のファンクションキーが選択された場合に実行する
012 \$\$帳票印刷 M2D-POS M-P5 \$印刷	M2D-POS 表を M-P5 に指定する形式で印刷する
013 @条件終了	011 で設定した条件の及ぶ範囲
014 @条件 #FK=F8	F8 のファンクションキーが選択された場合に実行する
015 \$\$自動 \$実行 AT-START	上位階層(AT-START)へ返る
016 @条件終了	014 で設定した条件の及ぶ範囲
017 \$\$自動 \$実行 AT-START	上位階層(AT-START)へ返る

6. 異常時対策

(実行プログラム P4 の主な作業)	(作業内容)
001 @エラー無視	何らかの異常が発生して自動操作が停止した場合に, 作業中に残されているかもしれない中間表を削除する
002 \$\$表削除 POS6 \$\$表削除 POS7 \$\$表削除 PRF1 \$\$表削除 PRF2	エラーが発生しても無視して次の作業を実行する POS6, POS7, PRF1, PRF2 の表を削除する
003 @エラー有効	エラーが生じたときは自動操作を停止する
004 \$\$自動 \$実行 AT-START	上位階層(AT-START)へ返る

7. 表処理作業の補助説明

B-1 M-DF11またはA-DF11の作業

D-KEN 表に入力された検査項目のデータが陽性の場合, POS6 表に格納されている陽性率をそのまま使用し, 同データが陰性の場合, POS6 表に格納されている陽性率を陰性率に置換する。なお, 陽性率20%は陰性率80%のことである。

B-2 M-DF13またはA-DF13の作業

POS7 表の項目(相対比)を#M11で除し, 100倍して(%)表示にする。陽性率の積(項目 POSS に格納されている)が0.1以下のときは「稀」, 0.01以下のときは「極稀」と評価し, 項目(判定)に格納する。また, 項目(該当率)の項にデータを格納する。該当率は学名別にかつプロフィールインデックスを同じくする株の割合を求めた表から検索するものとする。なお, 一致するものがない場合は0.0を格納するものとする。

試験番号： _____ 検査年月日： _____ 補足説明： _____
 菌株番号： _____ 検査担当者： _____

	SUC	TRE	LAC	CTRL	SOR	INO	DUL	TAA	CCL	FLU	TMP	TPH
1 日												
2 日	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	
3 日												
2												
3												

SUC：スクロース利用 SOR：ソルビトール利用 TAA：L-酒石酸利用 TMP：40℃での生育
 TRE：トレハロース利用 INO：イノシトール利用 CCL：集落の色調 TPH：劉法によるグラム鑑別
 LAC：ラクトース利用 DUL：ダルシトール利用 FLU：蛍光色素産生 (3% KOH 耐性)

図-1. MUCデータシート

試験番号： _____ 検査年月日： _____ 補足説明： _____
 菌株番号： _____ 検査担当者： _____

	NIT		TRP	FER	ADH	URE	ESC	GEL	PNG	GLU	ARA	MNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	ADI	MLT	CIT	PAC	OXI
	N O ₂	Zn加																				
1 日	Gas																					
2 日	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	4
3 日	Over																					
2																						
3																						

NIT：硝酸塩還元 ADH：アルギニン水解 GEL：ゼラチン液化 ARA：アラビノース利用 NAG：グルコサミン利用 CAP：カブリン酸利用 CIT：クエン酸利用
 TRP：インドール産生 URE：ウレアーゼ活性 PNG：β-ガラクトシダーゼ MNE：マンノース利用 MAL：マルトース利用 ADI：アジピン酸利用 PAC：フェニル酢酸利用
 FER：O-F試験 ESC：β-グルコシダーゼ GLU：グルコース利用 MAN：マンニトール利用 GNT：グルコン酸利用 MLT：リノゴ酸利用 OXI：オキシダーゼ活性

図-2. API データシート

項目	SUC	TRE	LAC	SOR	INO	DUL	TAA	CCL	FLU	TMP	TPH
陽性時の配点	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2
例 E.	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
<i>ananas</i>	7			3			2			0	

図-3. MUCにおけるプロファイルインデックスの求め方

項目	NIT	TRP	FER	ADH	URE	ESC	GEL	PNG	GLU	ARA	MNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	ADI	MLT	CIT	PAC	OXI
陽性時の配点	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
例 E.	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
<i>ananas</i>	6		0		6		7		7		4		1		4		1		1		

図-4. APIにおけるプロファイルインデックスの求め方

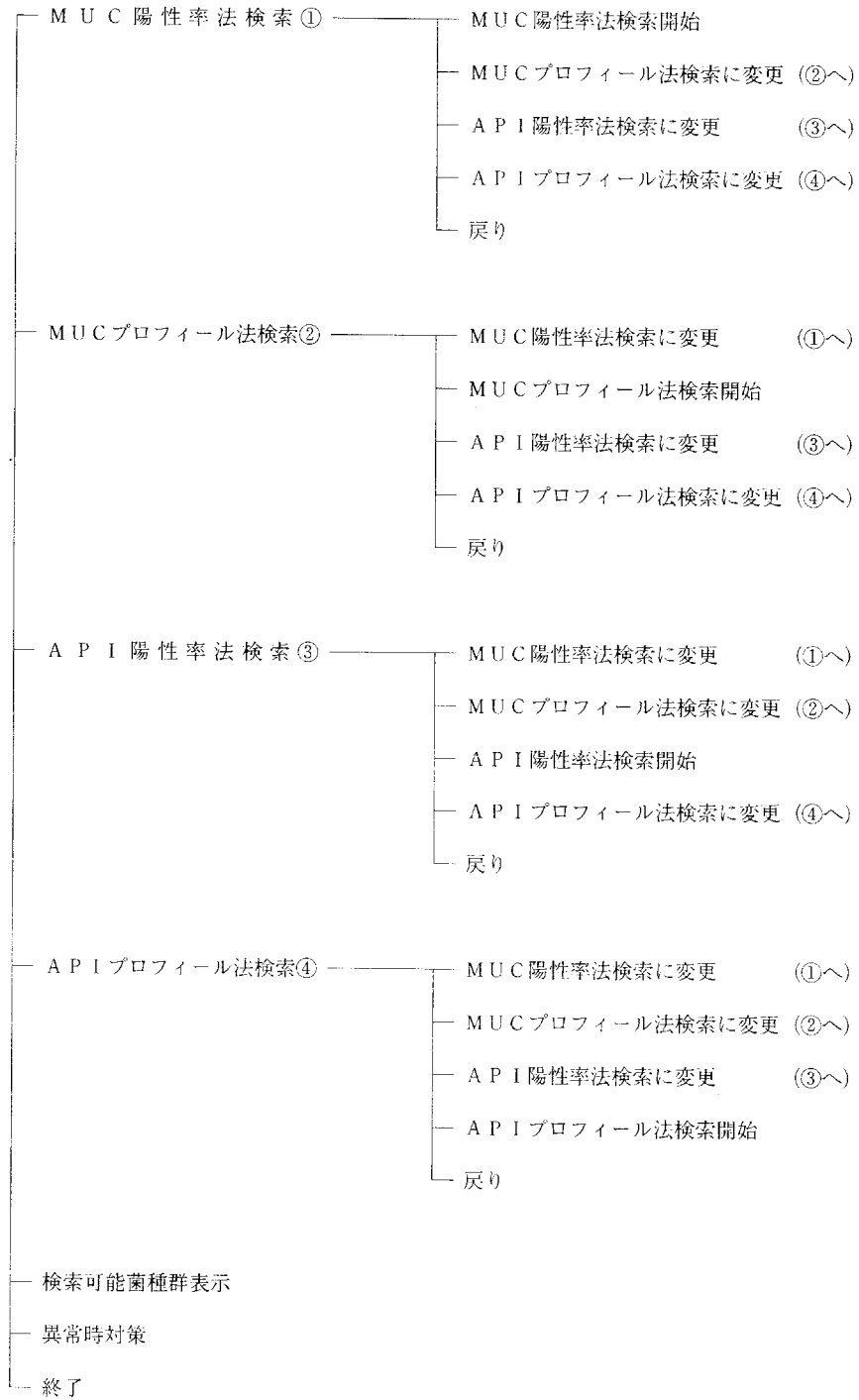


図-5. プログラムの基本構造の概略

MUCデータ 入力画面	試験番号： _____	検査年月日： _____	培養温度26℃
		検査担当者： _____	
	菌株番号： _____	培養期間： ____日	

SUC__ SOR__ TAA__ TMP__ プロフィール _____
TRE__ INO__ CCL__ TPH__ ↑
LAC__ DUL__ FLU__ 0000~7773までの数字

SUC：スクロース利用 SOR：ソルビトール利用 TAA：L-酒石酸利用 TMP：40℃下での生育
TRE：トレハロース利用 INO：イノシトール利用 CCL：集落の色調 TPH：劉法によるグラム鑑別
LAC：ラクトース利用 DUL：ダルシトール利用 FLU：蛍光色素産生 (3% KOH 耐性)

図-6. MUCデータ入力画面

APIデータ 入力画面	試験番号： _____	検査年月日： _____	培養温度26℃
		検査担当者： _____	
	菌株番号： _____	培養期間： ____日	

NIT__ ADH__ GEL__ ARA__ NAG__ CAP__ CIT__ プロフィール _____
TRP__ URE__ PNG__ MNE__ MAL__ ADI__ PAC__ ↑
FER__ ESC__ GLU__ MAN__ GNT__ MLT__ OXI__ 0000000~7777777
までの数字

NIT：硝酸塩還元 GEL：ゼラチン液化 NAG：グルコサミン利用 CIT：クエン酸利用
TRP：インドール産生 PNG：β-ガラクトシダーゼ MAL：マトース利用 PAC：フェニル酢酸利用
FER：O-F試験 GLU：グルコース利用 GNT：グルコン酸利用 OXI：オキシダーゼ活性

ADH：アルギニン水解 ARA：アラビノース利用 CAP：カプリン酸利用
URE：ウレアーゼ活性 MNE：マンノース利用 ADI：アジピン酸利用
ESC：β-グルコシダーゼ MAN：マンニトール利用 MLT：リンゴ酸利用

図-7. APIデータ入力画面

検索条件：

試験番号： _____ 検査年月日： _____ 検査担当者： _____
 菌株番号： _____ 培養期間： 2日 プロフィールインデックス：2701

SUC	TRE	LAC	SOR	INO	DUL	TAA	CCL	FLU	TMP	TPH
-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-

検索結果：

可能性値 (%)	判定	候補菌種	候補菌種内 該当株率 (%)
97.9		<i>Pseudomonas glumae</i>	93.8
0.9	極稀	<i>Pseudomonas gladioli</i> pv. <i>gladioli</i> SUC-	0.0
0.9	極稀	<i>Pseudomonas gladioli</i> pv. <i>undetermined</i>	0.0

図-8. MUC陽性率法に基づく検索結果

2日目に2701のプロフィールインデックスを示す細菌を調査した結果は、以下のことを示している。*P. glumae*に同定される可能性が非常に高い。そして、その候補菌種は、学名を同じくする菌種内の93.8%が2701のプロフィールインデックスを持っていることを表している。また、計算上は*P. gladioli*に同定される可能性も存在するが、その可能性は低く、しかも2701のプロフィールインデックスを持つ株は実在しない。

検索条件：

試験番号： _____ 検査年月日： _____ 検査担当者： _____
 菌株番号： _____ 培養期間： 2日 プロフィールインデックス：2701

SUC	TRE	LAC	SOR	INO	DUL	TAA	CCL	FLU	TMP	TPH
-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-

検索結果：

候補菌種	該当株率 (%)
<i>Pseudomonas glumae</i>	93.8

図-9. MUCプロフィールインデックス法に基づく検索結果

2日目に2701のプロフィールインデックスを示す菌種は、*P. glumae*だけである。また、*P. glumae*の93.8%の株がこのプロフィールインデックスを持っている。

検索条件：

試験番号：_____

検査年月日：_____

検査担当者：_____

菌株番号：_____

培養期間： 2日

プロフィールインデックス：1477551

NIT	TRP	FER	ADR	URE	ESC	GEL	PNG	GLU	ARA	MNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	ADI	MLT	CIT	PAC	OXI
+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-

検索結果：

可能性値 (%)	判定	候補菌種	候補菌種内 該当株率 (%)
48.6		<i>Pseudomonas glumae</i>	39.7
48.6		<i>Pseudomonas plantarii</i>	58.3
2.0	極稀	<i>Pseudomonas gladioli</i> pv. <i>gladioli</i>	0.0
0.7	極稀	<i>Pseudomonas gladioli</i> pv. <i>undetermined</i>	0.0

図-10. A P I 陽性率法に基づく検索結果

2日目に1477551のプロフィールインデックスを示す細菌を調査した結果は、以下のことを示している。*P. glumae*と*P. plantarii*が同レベルの高い可能性値をもっている。そして、それぞれの候補菌種は、学名を同じくする菌種内の39.7%あるいは58.3%の株が1477551のプロフィールインデックスを持っていることを表している。また、計算上は*P. gladioli*に同定される可能性もあるが、その可能性は低く、しかも1477551のプロフィールインデックスを持つ株は実在しない。

検索条件：

試験番号：_____

検査年月日：_____

検査担当者：_____

菌株番号：_____

培養期間： 2日

プロフィールインデックス：1477551

NIT	TRP	FER	ADH	URE	ESC	GEL	PNG	GLU	ARA	MNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	ADI	MLT	CIT	PAC	OXI
+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-

検索結果：

候補菌種	該当株率 (%)
<i>Pseudomonas plantarii</i>	58.3
<i>Pseudomonas glumae</i>	39.7

図-11. A P I プロフィールインデックス法に基づく検索結果

2日目に1477551のプロフィールインデックスを示す菌種は、*P. plantarii*と*P. glumae*だけである。そして、それらは学名を同じくする菌株のうちの、それぞれ58.3%あるいは39.7%の株が示すプロフィールインデックスである。

第7章. 簡易同定78

二分法検索表に基づく簡易同定法は、「植物病原細菌簡易同定法の試案」として1978年にはじめて公表した。このものはその後若干の追加・変更を加えており、今は以下のようになっている。はじめに検索に用いるデータの取り方を述べ、次に検索手順を述べる。

1. 培地の調製および検査方法

検査に用いる主な培地と検査方法は以下のとおりである。検査時期は25～28℃で培養した場合を目安にしたものである。この温度で著しく生育の悪いものは、その細菌の生育適温で培養する。判定は原則として所定の時期における1回だけの検査結果によって行う。ただし、その時に疑陽性を示したものに限り括弧内に示す時期に追加検査を行い、その結果が陽性を示したものは陽性、疑陽性または陰性を示したものは陰性と判定する。なお、経時的に観察できるもので所定の時期以前に明瞭な陽性を示した場合は、その時点で陽性と判定し、以後の観察を打ち切っても差し支えない。

1). 植物病原性

植物病原性の有無は接種試験によって判定する。

2). グラム反応

[培地] 普通寒天培地斜面。

[検査・判定] 移植後20時間、遅くとも48時間以内の新鮮な培養細菌の1～2白金耳と3% KOH水溶液の1滴とをスライドグラス上でよく混和する。混和液が粘ちようになり白金耳を持ち上げると長く糸をひくようになったものをグラム陰性と判定する。混和液が粘ちよう性を帯びず、白金耳を持ち上げても糸を引かないものをグラム陽性と判定する。

3). 緑色蛍光色素の産生

[培地] King B培地 (市販品あり) 斜面。Difco製プロテオーゼペプトンNo3 : 20g, K_2HPO_4 : 1.5g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 1.5g, グリセリン : 10ml, 寒天 : 15g, 水 : 1,000ml, pH : 7.2, 高圧滅菌。

[検査・判定] 2日, (4日)。紫外線下で培地が黄緑色の蛍光を早したものを陽性と判定する。

4). 40℃下での生育

[培地] ブイヨン等十分に栄養価がありかつ透明になる液体培地。寒天培地に生育した新鮮な細菌の1白金耳を滅菌水10mlに懸濁し、その1白金耳を試験培地に移植し、正確に40℃に調整したウオーターバスに浸漬して培養する。

[検査・判定] 3日, (5日)。生育の有無は透過光線下で調べ、培地が混濁したものを陽性と判定する。

5). アルギニンジヒドロラーゼ活性

[培地] ペプトン : 1g, NaCl : 5g, K_2HPO_4 : 0.3g, L-アルギニン塩酸塩 : 10g, 寒天 : 3g, フェノールレッド : 0.01g, 水 : 1,000ml, pH : 7.2。培地を試験管に分注後、さらに乾熱滅菌した流動パラフィンに分注 (深さ1～2cm) し、高圧滅菌。穿刺培養。

[検査・判定] 4日, (6日)。培地が赤色になったものを陽性と判定する。

6). オキシダーゼ活性

[培地] 普通寒天斜面。

[検査・判定] 1%テトラメチルバラフェニレンジアミン2塩酸塩水溶液を滴下して湿らせたろ紙の上に、1～2日間培養した新鮮な細菌を多量に線状に塗布する。細菌を塗布後10秒以内に菌苔が濃紫色に染まったものを陽性と判定する。

7). 集落の色調

[培地] 普通寒天斜面または十分に栄養価のある斜面培地。

[検査・判定] 3日, (5日)。色素を産生し、集落が着色したものを陽性と判定する。色素は黄色が多いが、オレンジ色、ピンク色などもある。

8). 発酵性試験

[培地] ペプトン : 2g, NaCl : 5g, K_2HPO_4 : 0.3g, グルコース : 10g, 寒天 : 3g, ブロムチモールブルー : 0.03g, 水 : 1,000ml, pH : 7.1。培地を試験管に分注後、さらに乾熱滅菌した流動パラフィンに分注 (深さ1～2cm) し、高圧滅菌。穿刺培養。

[検査・判定] 3日, (5日)。培地が黄色になったものを陽性と判定する。

9). 炭素源の利用試験 (スクロース)

[培地] $NH_4H_2PO_4$: 1g, KCl : 0.2g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 0.2g, 炭素源 : 10g, ペプトン : 1g, ブロムチモールブルー : 0.05g, 水 : 1,000ml, 寒天 : 15g, pH : 7.2, 高圧滅菌。斜面に画線する。

[検査・判定] 3日, (5日)。細菌が生育し、培地が黄色になったものを陽性と判定する。

10). 炭素源の利用試験 (乳酸, L-酒石酸塩)

[培地] $NH_4H_2PO_4$: 1g, KCl : 0.2g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 0.2g, 炭素源 : 1.5g, ブロムチモールブルー : 0.05g, 水 : 1,000ml, 寒天 : 15g, pH : 7.2, 高圧滅菌。斜面に画線する。

[検査・判定] 3日, (5日)。細菌が生育し, 培地
が青色になったものを陽性と判定する。

11). 硝酸塩の還元

[培地] 0.1% KNO₃加用普通寒天斜面。

[検査・判定] 2日。検査試薬は30%酢酸水にα-
ナフチルアミンを0.5%加えたもの(A液)と30%酢
酸水にスルファニル酸を0.3%加えたもの(B液)と
を用いる。試薬A, Bを各0.5ml加える。30分以内に
赤変したものは, 硝酸塩の還元は陽性と判定する。30
分後でも変色しないものには微量の亜鉛末を加える。
亜鉛末添加後数分以内に赤変したものは硝酸塩の還元
は陰性, 変色しないものは硝酸塩の還元は陽性と判定
する。

12). 3-ケトラクトースの産生

[培地] 酵母エキス: 1g, ラクトース: 10g, 寒天
: 20g, 水: 1,000ml, pH: 7.2, 高圧滅菌。シャーレ
に分注して平板とし, 画線培養する。

[検査・判定] 3日, (5日)。追加検査は別の培養
を用いる。培養上にベネディクト試薬(市販品あり)
を注ぎ, 室温下に1時間放置する。集落の周囲に黄色
帯が生じたものを陽性と判定する。

13). 粘りょうな生育

[培地] 普通寒天, PSA, PPGAなどの斜面。

[検査・判定] 3日, (5日)。多量のスライムを生
産して生育するものを陽性と判定する。多量のスライ
ムとは, 黄色色素を生産する *Xanthomonas* 属細菌と同
様の生育様相を呈するものを指す。

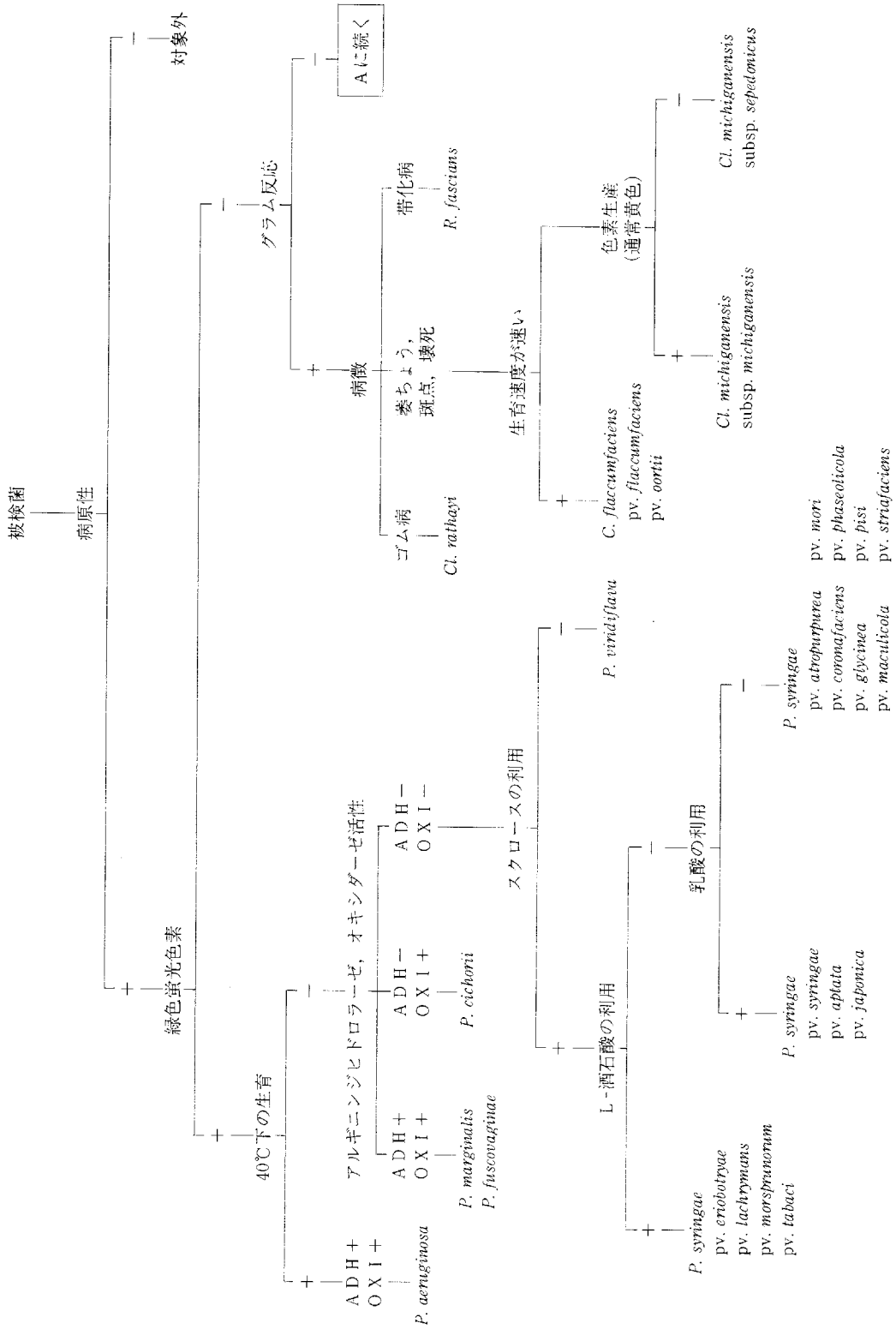
2. 検索方法

概略は図-12に示すとおりである。

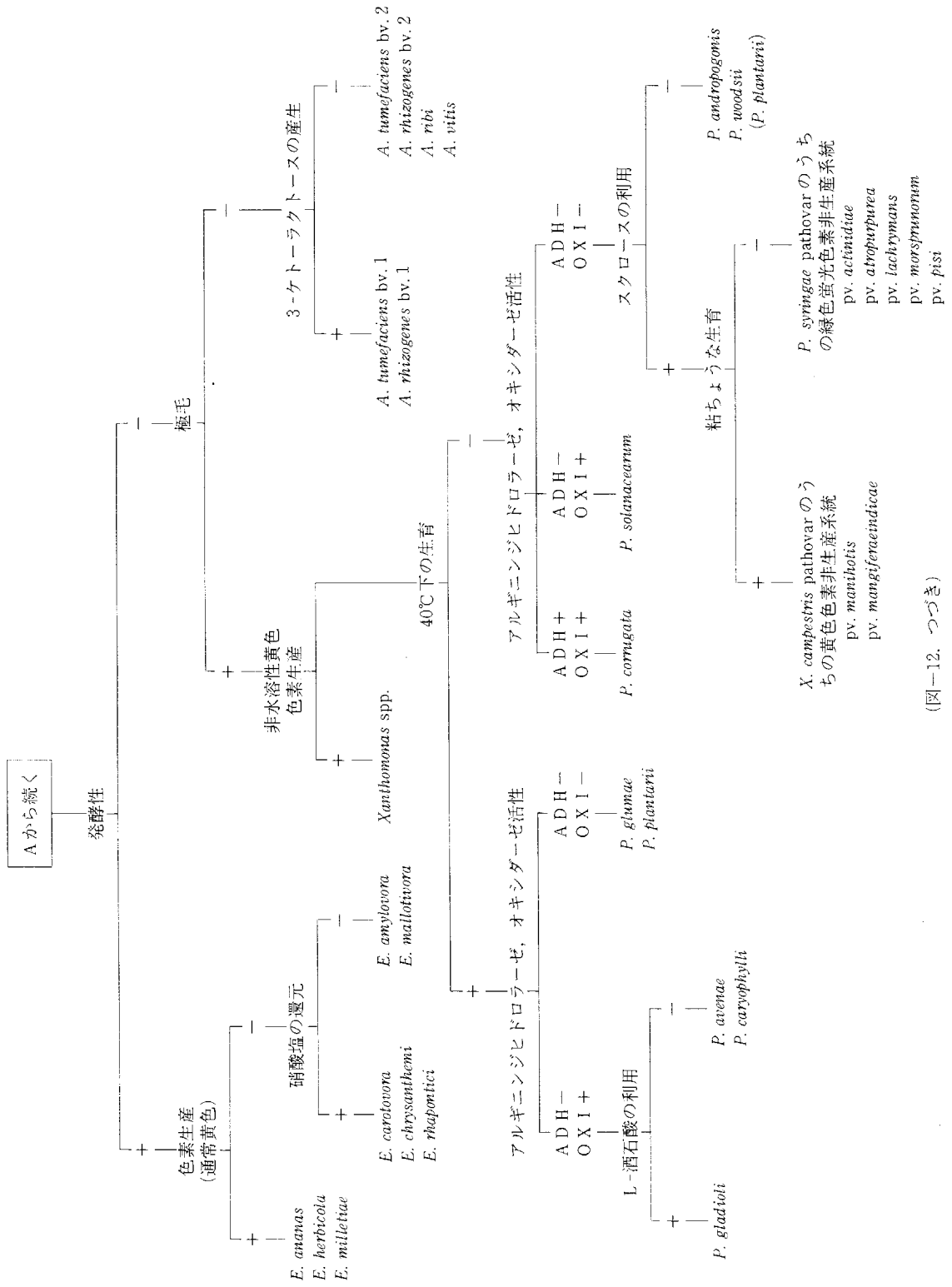
細菌学的性質の検査は何から行ってもよいが, 検索
は上流から下流へと進めるものとする。はじめに植物
病原性を調査し, 病原性の認められたもののみ検索の
対象とする。なお, 図中に記述されている菌種は代表
例であって, 例示菌種以外には存在しないというわけ
ではない。また, 一般に病原性の試験結果は, 多数の
細菌学的性質を調べたのと同等の価値のある情報を提
供するので, 病原性(宿主範囲と病徴)から推定され
る菌種と細菌学的性質から推定される菌種とが異なる
場合には, 慎重な取扱が必要である。

付録. 参考文献

- 1) 西山幸司(1978): 植物病原細菌簡易同定法の試
案. 植物防疫, 32, 283-288.
- 2) 西山幸司(1991): 病原細菌の分離と同定. 田部
井英夫他編, 作物の細菌病, p. 12-56, 日本植物
防疫協会, 東京.
- 3) 西山幸司. アビ20NEキットおよび追加した11項
目の細菌学的性状に基づく植物病原細菌の鑑別表
の作成. 農環研報(投稿中).
- 4) 西山幸司. 鑑別表データを利用した植物病原細菌
の簡易同定法. 農環研報(投稿中).
- 5) 株式会社PFU(1994): Ace/Win V2.0 リファレ
ンスマニュアル. 362pp.



図一12. 「簡易同定78」二分法検索表による植物病原細菌の簡易同定



MISCELLANEOUS PUBLICATION OF THE NATIONAL
INSTITUTE OF AGRO-ENVIRONMENTAL SCIENCES

No. 19

EDITORIAL BOARD

Chairman

Toru NAGATA

Director General

Editors

Jiro HARADA

Director, Department of Research Planning and Coordination

Michinori NISHIO

Environmental Research Coordinator

Koichi YAMADA

Director, Administration Department

Michikazu FUKUHARA

Director, Department of Environmental Management

Michio ARARAGI

Director, Department of Natural Resources

Akira OHUCHI

Director, Department of Environmental Biology

Hirokazu MAYUMI

Director, Department of Farm Chemicals

December, 1996

MISCELLANEOUS PUBLICATION
of the
NATIONAL INSTITUTE OF AGRO-ENVIRONMENTAL SCIENCES
No.19

MANUAL OF "KAN-I DOTEI 96",
RAPID IDENTIFICATION METHOD OF PHYTOPATHOGENIC BACTERIA
USING PERSONAL COMPUTER SYSTEM

Koushi NISHIYAMA
DIVISION OF MICROBIOLOGY
DEPARTMENT OF ENVIRONMENTAL BIOLOGY

THE NATIONAL INSTITUTE OF AGRO-ENVIRONMENTAL SCIENCES
Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305
JAPAN