［**成果情報名**］スターチス萎凋細菌病菌の低密度汚染土壌からの高感度検出法

［**要約**］選択培地の改良および２倍希釈懸濁液の遠心上清の塗布により、スターチス萎凋細菌病菌（*Burkholderia caryophylli*）の低密度汚染土壌中から10^2cfu/g乾土を検出できる。

［**キーワード**］スターチス萎凋細菌病菌、*Burkholderia caryophylli*、選択培地
［**担当機関名**］農業試験場・環境部　　［**連絡先**］0736-64-2300
［**部会名**］野菜・花き（野菜作物）　　［**分類**］研究

［**背景・ねらい**］

スターチス萎凋細菌病菌は10^2cfu/g乾土の低密度でも発病する難防除の土壌病害であるため、発生生態の解明には土壌中の病原菌の低密度域までおよぶ分布調査が必要である。しかし、従来用いられてきた青野ら（1979年）の方法では、検出感度は10^3レベルであり、土壌の種類によっては雑菌の生育のため検出感度が低下する。そこで、低密度の土壌においても検出可能な手法を確立する。

［**成果の内容・特徴**］

１．青野ら（1979年）の選択培地に、硫酸ポリミキシンBを500U/ml添加すると、土壌の低希釈液（10倍液）からの検出において雑細菌の生育が抑制され、萎凋細菌の出現コロニー数が10倍以上となり、検出感度が向上する（表１）。

２．糸状菌の多い土壌では、低希釈液からの検出において糸状菌の発生により萎凋細菌コロニーが検出困難となる場合がある。選択培地へのシクロヘキシミド50ppmの添加と2000rpm、３分の遠心分離の組み合わせは、糸状菌の除去・生育抑制効果が高く、萎凋細菌病菌の検出を阻害しない（データ省略）。

３．改良選択培地（表１）を使用し、２倍希釈の土壌懸濁液より、遠心操作の前処理を行うと、10^2cfu/g乾土レベルの萎凋細菌病菌の検出が可能である（表２、図１、図２）。

４．萎凋細菌病菌は、本培地上で28℃、７～８日培養すると、橙黄色のドーム形コロニーを形成し、10日で他細菌との識別が容易となる。

［**成果の活用面・留意点**］

１．本法は、カーネーション、シュッコンカスミソウなどの萎凋細菌病菌検出にも利用できる。

［具体的データ］

表1．青野培地への硫酸ﾎﾟﾘﾐｷｼﾝBの添加がスターチス萎凋細菌病菌（*Burkholderia caryophylli*）のコロニー検出に及ぼす影響

硫酸ﾎﾟﾘﾐｷｼﾝB濃度 (U/ml)	コロニー数／シャーレ[1]		
	発病土壌[2]	無発病土壌[3]	無＋B.c[4]
500	17.5	0.0	129
250	9.5	0.0	85
100	10.3	0.0	94
0	1.0	0.0	11

1)土壌の10倍希釈液を100μl塗布での、3シャーレの平均
2) 前年スターチス萎凋細菌病発病土壌A　3) 前年エンドウ栽培土壌
4) 3)の土壌10倍希釈液に *B.caryophylli*を添加

表2．2倍希釈の土壌懸濁液を用いた低菌密度土壌からの検出

希釈率（倍）	供試土壌	検定土量 (g wet soil)	遠心[1] 分離	ｺﾛﾆｰ数[2] /ｼｬｰﾚ	菌量(cfu /g dry soil)
2	1／10発病土壌[3]	20	あり	3.7	1.8×10^2
10	1／10発病土壌	20	静置	0.0	検出できない
10	発病土壌[4]	20	静置	5.0	1.2×10^3

1)2000rpm、3min　2)改良培地に50μl塗布での、3ｼｬｰﾚの平均値
3)発病土壌Bと無病土を1：9(W/W)混合し、病原菌量を1/10とした。含水比：23%
4)前年度発病土壌B、含水比：23%

表３．培地の処方(1L)

（基本培地）

$(NH_4)_2SO_4$	0.75g
KH_2PO_4	1.0 g
$MgSO_4\cdot7H_2O$	0.5 g
KCl	0.2 g
ﾃﾞｵｷｼｺｰﾚｰﾄ酸	2.0 g
寒天	15.0 g
（糖類及び抗生物質）	
D-ｱﾗﾋﾞﾉｰｽ	2.0 g
硫酸ﾎﾟﾘﾐｷｼﾝB	***50万U***
ｼｸﾛﾍｷｼﾐﾄﾞ	***50mg***

注）基本培地はpH6.9に調整後ｵｰﾄｸﾚｰﾌﾞ110℃15分処理。約50℃に放冷後、糖類及び抗生物質を、ｼｸﾛﾍｷｼﾐﾄﾞはｴﾀﾉｰﾙに溶解、その他は水に溶解後ﾌｨﾙﾀｰ滅菌して添加する。
　青野(1979年)の処方にｲﾀﾘｯｸの薬剤を追加

・病土（20g）
↓　50mlｺﾆｶﾙﾁｭｰﾌﾞ内
・殺菌水（20ml）に懸濁
↓
・振とう、120rpm、15分
↓
・遠心分離、2000rpm、3分
↓
・上清を選択培地に塗布
↓（原液及び10倍希釈）
・培養、28℃、10日

図１．土壌の前処理法を改良した検定法の手順

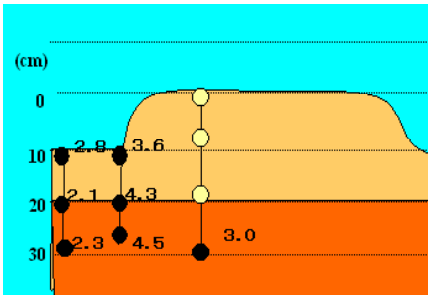

図２．スターチス萎凋細菌病の多発圃場における病原菌の土壌分布測定事例
注）○は検出されず，●及び添え字は菌量Log(cfu/g乾土)が検出されたことを示す。

［その他］

研究課題名：太陽熱利用土壌消毒のパワーアップ技術
予算区分　：県単（戦略研究）　研究期間　：平成17～19年
研究担当者：増田吉彦・白井雄祐・大谷洋子・岡本晃久
発表論文等：スターチス萎凋細菌病菌選択培地の改良と土壌中における菌の分布，関西病虫研報，49：107，（2007）