



培地操作ハンドブック

調製方法、使用方法、保管方法



目次

乾燥粉末培地の使用	3
乾燥粉末培地の受け取りと保管	3
乾燥粉末培地の調製方法	4
1- 溶解の手順	4
2- 滅菌の手順	5
3- サプリメントの準備および添加	6
4- pHの測定および調整	6
培地の分注	7
1- シャーレでの寒天培地の調製	7
2- 寒天スラントチューブでの調製	8
調製した培地の保管方法	8
READY-TO-USE培地の使用	9
READY-TO-MELT培地の調製	9
培地の脱気および再生方法	9
完全培地の調製	10
調製した培地の保管	10
接種方法	11
液体培地への接種	11
寒天培地への接種	11
I – 菌体の検出方法	12
1- シャーレへの表面塗抹	12
2- 寒天スラントへの表面塗抹	12
II- 菌数の確認方法	13
1- シャーレでの混積平板希釈法	13
2- チューブでの混積平板希釈法	13
3- 表面塗布法	14
4- メンブレンフィルター法	14
使用上の注意	15
使用後の培地の除染と破棄方法	15
化学的リスクの予防	16
トラブルシューティング	17
ラベリング	19
CLP規則	19
ラベル情報	20
参考文献	21

乾燥粉末培地の受け取りと保管

培地製品の受け取り：

1. 受け取った培地製品の名称と日付を記帳します。
2. 培地はラベルに記載されている推奨条件に従い、培地を保管します。一般的に、保管温度は2℃から30℃を推奨している商品が多いです。しかし、培地の種類によっては2℃から8℃の冷蔵条件を推奨している商品もございます。乾燥粉末培地の多くは吸湿性を示し、熱や光に対して敏感です。また、カビの汚染による影響を受けやすいです。そのため、保管の際には照明や湿気、オートクレーブやインキュベーターのような熱源を避けてください。

※BIOKAR Diagnostics社の培地はラベルに記載の使用期限までに調製および接種を終えた場合に、適切な培養時間後に使用期限を超えていたとしても、信頼できる結果を得ることができます。

製品の最初の開封時：

1. ラベルに記載されている使用期限を確認します。
2. 製品を開封した日付を記入します。
3. 培地の外観を確認します。もし、粉末の質感や色の変化等の異常を感じた場合は使用を中止してください。
4. 使用後、容器の蓋がしっかりと締められていることを確認し、適切な保管場所にて保管してください。

※元の包装材で最適な条件下で保管した場合、乾燥粉末培地は3年から5年間は保管が可能です。

乾燥粉末培地の調製方法

1- 溶解の手順

1. MSDSに記載されている保護具を使用し、適切な量の培地粉末を容器に量り取ります。
2. ラベルまたはテクニカルデータシートに記載されている内容に従い、乾燥粉末培地の再構成に必要な量の水を徐々に添加します。

※テクニカルデータシートに特段の記載がない限り、約50℃に温めた温水を再構成に使用することで溶解にかかる時間を短縮することができます。
3. スターラーでゆっくりと攪拌して可溶性成分を溶解し、寒天を均一化します。
4. 寒天を含む培地の場合、フラスコやチューブへの分注前に培地を沸騰させて寒天を溶解します。加熱の際、過加熱にならないよう注意が必要です。容器側面に寒天粒子が付着していなければ、寒天は完全に溶解しています。
液体培地の場合、溶解液はオートクレーブ前に加熱をしなくとも溶液は清澄です。一部、セレナイトシスチン培地のような短時間の加熱を必要とする培地は清澄にはなりません。
5. 用途に従い、フラスコやチューブに適量ずつ分注します。寒天は沈殿物を形成しやすいので、分注前はよく懸濁して均一化してください。



2- 滅菌の手順

培地を分注するボトルやチューブは使用する培地に適した時間、温度にて滅菌してください。培地の種類によってはオートクレーブは不要です。各培地の特性についてはテクニカルデータシートやラベルに記載されておりますのでご確認ください。

1. 一般的に、ボトルやチューブに分注した培地は $121^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、15分間の条件でオートクレーブにより滅菌します。滅菌サイクルは1000 mL以上の容量にも適している条件である必要があります。

※オートクレーブにより滅菌した培地は、過加熱による培地成分の劣化をを防ぐために速やかに冷却してください。また、オートクレーブから培地を取り出す際には、重篤な火傷の危険を避けるために、耐熱グローブや保護メガネを着用してください。

2. 取り出した培地は耐熱性の台の上に置き、室温で2分程度、静置します。
3. 44°C から 47°C のウォーターバスにて培地を冷まします。

※冷却時はサーマルショックによる容器の破裂や破損の危険がございます。ご注意ください。



※外部から培地へのコンタミネーションを防ぐために、オートクレーブ滅菌後の培地は必ず無菌条件下で操作してください。

3- サプリメントの準備および添加

培地によっては選択サプリメントや濃縮サプリメントの添加が必要です。サプリメントは凍結乾燥品、ready-to-useの液体品あるいはタブレット品で提供しております。

1. 凍結乾燥のサプリメント製品の場合、まず最初に適量の滅菌水または希釈剤を無菌環境下で添加し、再構成します。
※ 凍結乾燥品のウサギ血漿のような一部のサプリメントでは、44℃に加熱した滅菌水を再構成に使用します。
2. 容器を数回転倒させながら混合し、サプリメントを完全に溶解させます。その際、サプリメント溶液が泡立たないようにします。
3. 44℃から47℃に保持している培地にサプリメントを添加します。
4. 容器を数回上下に回転させて均一なるように混合します。



4- pHの測定および調整

オートクレーブ滅菌後25℃に冷却し、必要であればサプリメント添加した後の、接種の準備ができた完全な状態で培地のpH調整を行ってください。pHの振れを防ぐために、培地調製手順書に従い、慎重に調整してください。

1. pHメーターを使用し、25℃の培地のpHを測定します。
2. 必要であれば40.0 g/L (1 mol/L)水酸化ナトリウム水溶液、または36.5 g/L (1 mol/L)の塩酸溶液を使用してpHを調整します。

培地の分注

調製した培地はチューブ、シャーレ等の適切な容器に分注してください。容器に分注し、冷却した後の液体培地はそのまま使用または保存できます。寒天培地の場合は分注後に固化させて使用してください。

1- シャーレでの寒天培地の調製

1. 溶解した寒天培地をシャーレに注ぎます。90 mm径のシャーレの場合は3 mm、55 mm径のシャーレの場合は5 mmの厚さが目安です（シャーレ1枚あたり、18-20 mLの寒天培地を使用します）。シャーレに分注した培地を48時間以上、保存またはインキュベーションする場合、あるいは40℃以上の温度でインキュベーションする場合は培地の量を増やします。

※蓋の中で結露した水滴が培地に落ちてこないように、分注する際の培地の温度は44℃から47℃に維持してください。

2. 蓋をした寒天培地を冷たく平坦な台、または層流下に置き、培地を冷まして固化させます。



2- 寒天スラントチューブでの調製

1. 培地をチューブへ分注し、オートクレーブ滅菌します。
2. 斜面部分ができるようにチューブを傾けます。また、穿刺培養を行う場合は底に約3cmのペレットができるように傾けます。
3. 傾けたまま常温で寒天培地を冷まし、固化させます。



調製した培地の保管方法

研究室で調製された培地の有効期限は、シャーレの場合は通常2週間から4週間、チューブの場合は3カ月から6カ月です（各培地についての情報はテクニカルデータシートに記載されております）。

この有効期限は、標準的な研究室の環境を想定して設定されております。

培地成分の変化を防ぐため、調製した培地は照明から遠ざけ、乾燥しないように保管してください。また、必要であれば2-8℃で冷蔵保存してください。

READY-TO-MELT培地の調製

1. ボトルまたはチューブのキャップを緩め、圧力交換される状態にします。
2. 培地を50℃のウォーターバスに入れ、95℃まで加温しながら溶かします。過加熱による劣化を防ぐために、溶解されたことが確認でき次第、速やかにウォーターバスから取り出します。

※ 作業時には耐熱グローブと保護メガネを着用してください。
重篤な火傷の危険があります。

3. 耐熱性の台の上に置き、室温で2分間程度冷却します。
4. 溶解した培地を44℃から47℃のウォーターバスにて冷却します。

※ サーマルショックによる容器の破裂や破損の危険があります。ご注意ください。



95℃



44-47℃

培地の脱気および再生方法

培地の種類（特に嫌気性細菌用の培地）によっては、使用前に正確な空気濃度または酸素濃度の供給を推奨しております。また、品質を維持するため、オートクレープ済の培地の再生は最小限の時間で行うことを推奨しております。

沸騰させた湯あるいは蒸気で培地を15分間加熱します。
加熱の際、キャップは軽く緩めます。加熱完了後、培地の蓋を締め直し、
使用温度まで速やかに冷却してください。

※前章に記載されている手順に従ってください。

完全培地の調製

液体培地または再溶解寒天培地を使用する場合：

1. 必要であればサプリメントを培地に添加し、ゆっくりと混合します。
2. 完全培地のpHを確認します。
3. 手順書に従い培地を分注します。
 - － 寒天培地はシャーレまたはチューブに分注してください
 - － 液体培地は混合できるチューブ、ボトルまたはバッグに分注してください

これらの各ステップのより詳細な手順は、ページ6（「乾燥粉末培地の調製-サプリメントの準備および添加」、「pHの確認と調整」）とページ7（「培地の分注」）をご参照ください。

調製した培地の保管

1. READY-TO-USE製品の保管条件や有効期限については、ラベルまたはテクニカルデータシートに記載の内容に従ってください。

※BIOKAR Diagnostics社の培地はラベルに記載の使用期限までに調製および接種を終えた場合に、適切な培養時間後に使用期限を超えていたとしても、信頼できる結果を得ることができます。

2. 実験室で培地を調製した際の使用期限は、シャーレであれば2週間から4週間、チューブであれば3か月から6か月です。（各培地の使用期限はテクニカルデータシートをご参照ください）。また、使用期限は標準的な実験室の環境に従って設定されています。

※成分の変化を防ぐために、調製した培地は照明から遠ざけ、乾燥しないようにし封をし、必要であれば2-8℃で冷蔵保存してください。

使用前に：

1. 使用する培地は常温に戻しておいてください
2. 使用した製品（培地の名称、サンプル、希釈倍率など）を表記してください

液体培地への接種

液体培地は増菌試験や無菌試験に使用します。

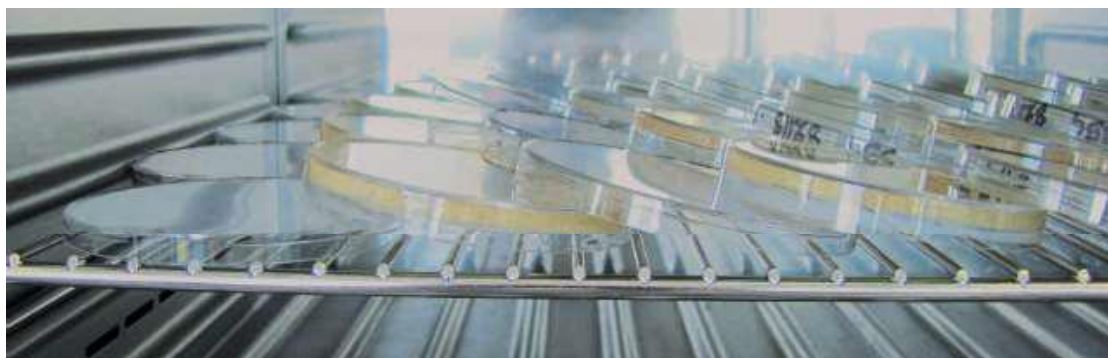
1. 十分量の液体培地にサンプルを適量接種します
※ダーラム発酵管を使用する場合、上下に回転させて空気泡を除いてください
2. 容器の蓋を軽く緩め、適切な条件下でインキュベートします
3. 微生物の生育の有無を確認します

寒天培地への接種

寒天培地に表面塗布する前に、シャーレを乾燥させます。

シャーレの蓋を外し寒天培地の表面を下向きにして、培地表面の水滴が消えるまで、25-50℃に設定したオープンまたはクリーンベンチに置きます。

※寒天培地を完全に乾燥させないように注意してください。

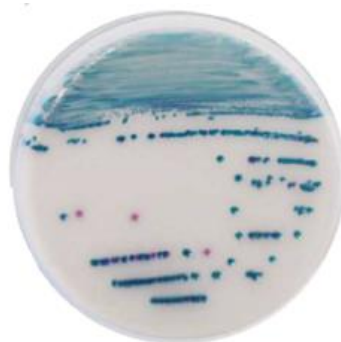


I 菌体の検出方法

1- シャーレへの表面塗抹

シングルコロニーアイソレーションは複数の微生物が混在した培養液から純粋培養液を得るために、コロニーを単離するための技術です。

1. 無菌条件下で、約10 μ Lの懸濁液を滴下し、各線培養法に従って、ループを用いて培地の表面に塗り広げます。
2. シャーレに蓋をし、適切な条件下でシャーレをインキュベートします。
3. コロニーが単離されていることを確認します。



2- 寒天スラントへの表面塗抹

チューブ内の寒天培地への塗布はコロニーの典型的な様相を観察するために使用されます。また、ペレットのある寒天スラントチューブは嫌気状態での特徴の観察にも使用されます。

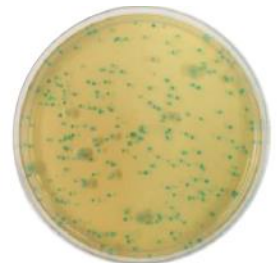
1. 単離したコロニー、微生物培養液、ストックサンプル等より、ループを使用してサンプルを約10 μ L取ります。
2. 寒天にダメージを与えないように、ジグザグに上昇させながら接種します。ペレットのある寒天培地の場合、表面塗布の前に中央に穿刺して接種します。
3. プロトコルに従った条件下でインキュベートします。
4. 単離したコロニーを確認します。

II 菌数の確認方法

1- シャーレでの混釈平板法

混釈平板法は、サンプル中の微生物を数え上げるために使用される方法です。本法ではより小さいコロニーを成長させ形成させることができます。混釈平板法は通常シャーレで実施します。

1. 無菌下で1mLのサンプルまたは希釈液を空のシャーレの底に滴下します。
2. 44℃から47℃に温めた寒天培地を15-20mL注ぎます。
3. シャーレをぐるぐると回してサンプルと培地を混合させます。
4. シャーレに蓋をし、冷たく平坦な台の上に置き、培地を固化させます。
5. 必要であれば、培地をさらに5mL加えて重層にし、培地を固化させます。
6. 指定された条件でインキュベートします。
7. コロニー数を数え、サンプル液中の微生物の数を確認します。



2- チューブでの混釈平板法

混釈平板法はチューブ内の寒天培地に対しても同様に適用可能です。

1. 培地を溶解後、44℃から47℃に冷却し、1mL（または使用する手順書に記載の容量）のサンプルまたはその希釈液を添加します。
2. サンプルと培地を転倒させながら混合します。
3. 培地を固化させます。
4. 適切な条件でインキュベートします。
5. コロニーの数を数え、サンプル液中の微生物の数を確認します。

3- 表面塗布

表面塗布は微生物のカウントに用いられる手法です。

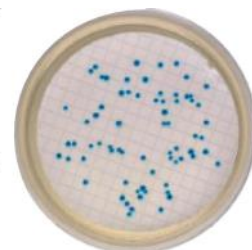
1. 無菌条件下で、0.1mLのサンプルまたはその希釈液をシャーレ中の寒天培地の表面に滴下します。
2. スプレッターまたはループを使用し、サンプル液が完全に培地に吸収されるまで塗り広げます。
3. シャーレを指定の条件でインキュベートします。
4. コロニー数を数え、サンプル液中の微生物の数を確認します。



4- メンブレンフィルター法

メンブレンフィルター法は水や飲料のような大量の液体サンプルの検査に用いられる手法です。

1. 無菌条件でサンプルを濾過します。膜には目的の微生物が残存する孔径のものを使用します（一般的な保持基準は約0.45 μm 径です）。
2. 殺菌された鉗子を使用して膜を培地の表面に置き、膜と培地の間に気泡がないことを確認します。膜は必ず微生物が付着している面（四角が描かれている面）を上にして置いてください。嫌気性微生物の場合は微生物の付着面を下にして膜を空のシャーレに置き、液体培地を注いでください。
3. コロニーを数え、懸濁液中の微生物の数を確認します。



使用後の培地の除染と破棄方法

一度使用した培養液は、多数の潜在的に危険な微生物に汚染されている可能性があります。そのため、微生物の混入した培地は徹底して安全な方法で廃棄しなければなりません。

ガラス機器を洗浄あるいは廃棄物の除去前に、培地は適切な熱処理により滅菌しなければなりません。シャーレ、チューブ、ボトル内の培地は、融点の高いプラスチックバッグに入れ、121℃以上の温度で1時間のオートクレーブ処理、または焼却により滅菌してください。

廃棄方法は各国の法律に従い廃棄してください。



化学的リスクの予防

多くの製品は粉末の使用に関する危険を除き、特定の化学的リスクはありません。呼吸器系を刺激する微細粒子の吸入を避けるために、微細粒子の製品の使用にあたっては適切な保護マスクの着用を推奨しております。

ただし、毒性物質を含む製品もございます。それらの製品を使用する際には特別な注意を払ってご使用ください。

使用前にmaterial safety data sheets (MSDS)を読み、記載されている対策をご確認ください。

あらゆるケースにおいて、適切な保護具を着用は必須です。



※ 化学的リスク管理のためのベストプラクティス

- すべての製品の在庫を把握する
- 各製品のMSDSの読み、分析する
- 各化学製品間の不適合性を特定する
- 保管場所にリスク内容を表示する
- 実験室が良く換気されている状態にする
- 作業場には少量のみを保管する
- 作業中は適した保護具を着用する
- 個人の懸念事項を共有し、訓練する

トラブルシューティング：粉末培地の調製、保管、使用における主要な異常

異常	チェックポイント
粉末培地の塊の形成	<ul style="list-style-type: none"> ・ 保管場所の湿度が高すぎないか ・ 容器を長時間開けたままにしているか ・ 容器の蓋はしっかり締めているか ・ 有効期限を超過していないか
pHが正しくない	<ul style="list-style-type: none"> ・ 正しい保管条件下で保管しているか ・ 有効期限を超過していないか ・ 計量に間違いはないか ・ 再構成は正しく行っているか ・ ガラス機器（フラスコや試験管）の洗浄およびリンスを適切に行っているか ・ 培地の過加熱や、繰り返し溶解していないか ・ オートクレーブ滅菌の条件は適切に設定されているか
濁りが生じている	<ul style="list-style-type: none"> ・ 有効期限を超過していないか ・ 計量に間違いはないか ・ ガラス機器（フラスコや試験管）の洗浄およびリンスは適切に行っているか ・ 脱塩水を使用しているか ・ pHは正しく調整されているか ・ 混合時に十分に均一化をしたか ・ 培地調製中やオートクレーブ滅菌中に培地が過加熱されていないか ・ 培地調製中や保管中に水分の蒸発はなかったか
色が変わっている	<ul style="list-style-type: none"> ・ 粉末培地の分解が起きていないか ・ 有効期限を超過していないか ・ 計量に間違いはないか ・ pHは正しく調整されているか ・ 混合時に十分に寒天を均一化をしたか ・ 培地調製中やオートクレーブ滅菌中に培地が過加熱されていないか ・ 培地調製中や保管中に水分の蒸発はなかったか
異常なゲル強度	<ul style="list-style-type: none"> ・ 粉末培地の分解が起きていないか ・ 有効期限を超過していないか ・ 計量に間違いはないか ・ pHは正しく調整されているか ・ 混合時に十分に寒天を均一化をしたか ・ 培地の過加熱や、繰り返し溶解していないか（特に酸性の培地を使用している場合） ・ オートクレーブ滅菌の条件は適切に設定されているか

異常	チェックポイント
調製した培地がコンタミネーションしているように見える	<ul style="list-style-type: none"> ・ 粉末培地の分解が起きていないか ・ 有効期限を超過していないか ・ オートクレーブ滅菌は正しく行っているか ・ オートクレーブ後のチューブやボトルが再度コンタミネーションしていないか ・ シャーレのコンタミネーションはないか
生産性や選択性の低下	<ul style="list-style-type: none"> ・ 粉末培地の分解が起きていないか ・ 有効期限を超過していないか ・ ガラス機器が適切にリンスされており、洗剤や防腐剤、その他の生育阻害剤のような微生物に毒性を持つ物質が付着していないか ・ 再構成の水は適切に脱塩されているか ・ pHは正しく調整されているか ・ 添加剤は正しい量を添加しているか ・ 培地の過加熱や繰り返し溶解していないか ・ オートクレーブ滅菌の条件は適切に設定されているか ・ 分注時の培地の温度は適切か ・ 培地に接種する際のサンプルの量は十分か ・ シャーレは乾燥したものを使用しているか ・ インキュベーションの条件は正しいか

CLP規則（化学物質の分類、ラベル付け、包装）

欧州のCLP規則（2008年12月16日付 欧州議会および理事会規則(EC) no. 1272/2008）は、国際的に統一された表示により危険についての情報を提供することで、人々の健康や環境を保護するために制定された新しい規則です。

危険な物質または混合物であると分類された製品の使用に関するリスクはMSDSやラベルに記載されております。

危険の警告や注意事項は以下を含みます。

- 各危険性のシンボルマーク
- 危険のレベルを示す警告文（“Hazard” または “WARNING”）
- Hコード（危険有害性情報）
- Pコード（注意書き）

シンボルマーク

より詳細な情報を知りたい方は「2008年12月16日付 欧州議会および理事会規則(EC) no. 1272/ 2008」をご参照ください。

物理的な危険



健康上の危険



物理的・健康上の危険












環境への有害性



ラベル情報

シンボル一覧：

 : Product reference
 : Manufacturer
 : Batch code
 : Use-by
 : Temperature limits
 : Keep away from light
 : Keep dry
 : <i>In vitro</i> use
 : See instructions for use

1. NF EN ISO 11133. July 2014. Microbiology of food, animal feed and water – Preparation, production, storage and performance testing of culture media.
2. NF EN ISO 7218/A1. October 2013. Microbiology of food – General requirements and recommendations – Amendment 1.
3. NF EN ISO 6887-1. September 1999. Microbiology of food- Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions.
4. NF T 90-461. July 2001. Water quality -Microbiology – Quality control of culture media. Amended by amendment A1 in June 2005 and amendment A2 in May 2007.
5. Corry JEL, Curtis GDW and Baird RM (eds) 2012, Handbook of Culture Media for Food and Water Microbiology. 3rd edition. Royal Society of Chemistry, UK.