

# 無菌操作と培地の作り方 マニュアル

## ○目次

1. 培養液の組成……………2～4

2. オートクレープの使用方法 ……5～9

滅菌終了後の取り扱い……………9

3. 簡易型の滅菌方法(圧力鍋) ……10・11

4. 無菌操作……………12～15

5. 簡易型無菌操作……………16

## ○実験器具と薬品

### 実験器具

- マイクロピペット
- ガラスシャーレ
- pH測定器
- 電子天秤
- 消毒液(エタノール)
- 薬さじ
- メスフラスコ(1000cm<sup>3</sup>容量)
- オートクレーブ
- アルミホイル
- 手袋(軍手)
- スターラー
- メスシリンダー
- ビーカー

### 培養液の組成

- バクトペプトン (和光純薬工業株式会社)
- イーストエクストラクト (和光純薬工業株式会社)
- アガー(寒天)
- 塩化ナトリウム
- 無菌水

## ○培養液の調整

### 1. 調整のための薬品

<30枚分>

- ・バクトペプトン ( )g
- ・イーストエクストラク ( )g
- ・塩化ナトリウム ( )g
- ・無菌の水 ( )ml

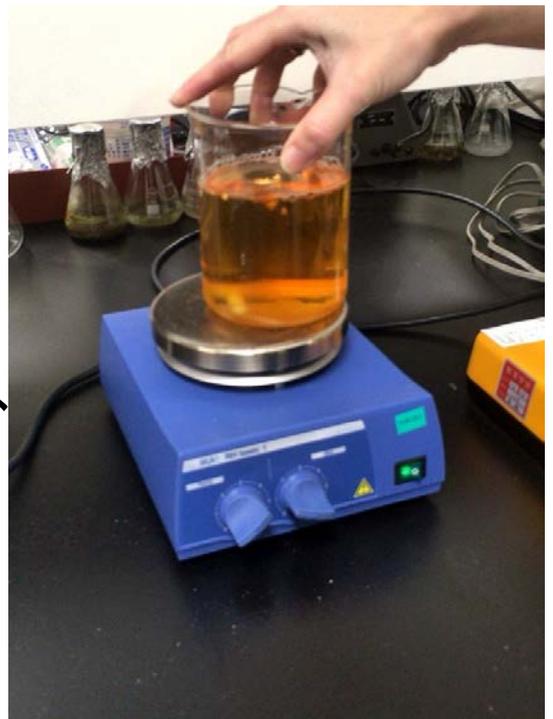
をメスシリンダーで測り、  
ビーカーに入れて薬品を溶かす。

<組成の基準>

水の量X mlに対して、バクトペプトン0.01倍、イーストエクストラクト0.005倍、アガー(寒天)0.015倍、NaCl 0.01倍、7.5pH

※一度取り出した試薬や溶液はもとの場所に戻さない。

→スターラーに乗せて薬品を溶かす。



## 2. 作った溶液をpH7.5に調整する

pHメーターを用いてpH7.5に調整する。

～pHメーターの使い方～

①水から電極を取り出して無菌の水で洗う。

※このとき電極が乾かないように素早く行う。

※電極は割れやすいため底に当てないように注意する。

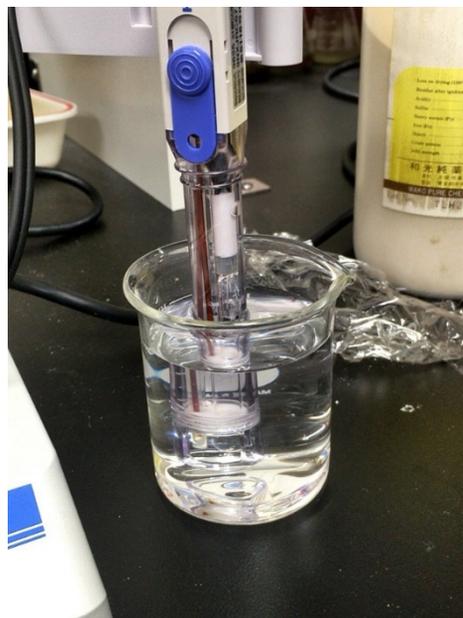
②pH標準液につけてそのときの温度のpHを測定する。

③pHを小さい値から大きい値にするために水酸化ナトリウム(2.5mol)をマイクロピペットでゆっくり落として調整する。

※マイクロピペットは横にしてはいけない。

※マイクロピペットに直接触らない。

→終わったらアガー(寒天)( )gを溶液に入れる。

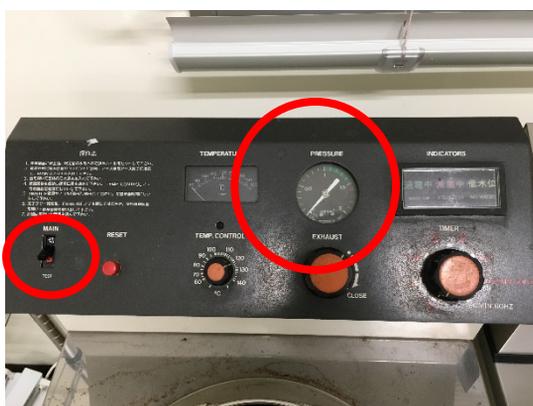


# オートクレーブの使用方法



○オートクレーブとは  
高圧滅菌器, 耐圧釜, 加圧釜ともいう。  
内部を高圧に維持できる蒸気釜で, 蒸  
気の温度が $100^{\circ}\text{C}$ 以上になるため, 高  
圧の蒸気で滅菌を行う機械。

**STEP 1 電源がONになっていないこと・圧力メーター  
が0になっていることを確認する。**



左の赤丸の部分が電源、右  
の赤丸が圧力メーターです

**STEP 2 排水のタンクの水がHIGH～LOWになっているか確認する。**



赤丸の部分が排水のタンク。  
このタンクの中の水の量がHIGH～LOWの間になっているか確認しましょう。  
確認できたら蓋を開けましょう。



もし水がLOWより下回っている、もしくは水がHIGHを超えている場合は排水タンクをオートクレーブから取り出し、水の量を調節してください。  
下の丸がHIGH～LOWの範囲を示しており、上の丸のタンクの口から水を追加する。

**STEP 3 オートクレーブ内の水位が適切かどうかを確認する。**



オートクレーブ内の水位が底と同じくらい、もしくは少し上ぐらいの水位にしましょう。足りない場合は水をたしてください。

**STEP 4 オートクレーブの中に滅菌したい器具・溶液を入れ、蓋を正しい位置まで完全に押し込んでいるか確認し蓋を閉める。**



溶液を入れる場合は、容器の内部とオートクレーブの内部の圧力が変わらないように、密封せずに入れましょう。包むのはアルミホイルぐらいで完全密封しないようにしましょう。そしてしっかり蓋を閉めましょう。

## STEP 5 排気弁をCLOSEにする。



排気弁をCLOSEにしましょう。

### ○最終チェック

STEP 1 電源がONになっていない・圧力メーターが0になっている。	
STEP 2 排水のタンクの水がHIGH～LOWになっているか確認する。	
STEP 3 オートクレーブ内の水位が適切かどうかを確認する。	
STEP 4 オートクレーブの中に滅菌したい器具・溶液を入れ、蓋を正しい位置まで完全に押し込んでいるか確認し蓋を閉める。	
STEP 5 排気弁をCLOSEにする。	

最終チェックの欄に全部○がいたら電源をONにし、TIMEのダイヤルを20分まで動かす。(白の目盛りの)

## ○滅菌終了後



まず、圧力メーターが0になっているかを確認し、CLOSEからEXHAUSTにダイヤルをまわす。



次に、温度が80°Cぐらいになっているか確認し、蓋を開ける。この時蓋も熱くなっている可能性があるため軍手をはめて蓋を開ける。

## ○注意事項

※オートクレーブ終了後に滅菌状態の実験器具や溶液を取り出す際、火傷する可能性があるため軍手などをはめてからとりだす。

※滅菌したいものの隅々まで飽和蒸気が行き届かないと有効な滅菌ができない場合がある。

※溶液や培地の量が多いと、必要な温度に達するのに長くかかるため、液量は多すぎないほうがよい。

# 簡易型滅菌操作

オートクレーブは安いものでも20万近くし、簡単に購入するのは難しいので、今回は圧力鍋を用いて簡易的な高圧力状態を作り、滅菌するという方法を紹介します。

使用する器具

- ・圧力鍋(Luminousplus: 内面フッ素樹脂加工)
- ・カセットこんろ
- ・ガス
- ・メスフラスコ(鍋に入る大きさ)
- ・手袋(軍手)



1. 圧力鍋の底に蒸留水を浸す。

※空炊きは絶対にしない。

2. メスフラスコを鍋に入れる。

※アルミで口元を覆う。密閉はしない。



3. 蓋の赤い調節ダイヤルをⅡまで回す。(赤い○のところまでひねる。)

※Ⅰは圧力が少し弱め、蒸気のマークが圧力を抜くことができる。今回は圧力高い状態で行う。



4. コンロに乗せ、強火で蓋の栓から蒸気がでるまで加熱する。

5. 蒸気が出たら火を弱火にし、15分加熱する。

6. 15分加熱し終わったら、温度が下がるまで15分ほど待ち、器具の温度が下がったら取り出す。

※軍手を使うと安全



→ このあとはガスバーナーの簡易型無菌操作を行う

## ○培養地の作り方

### 1. クリーンベンチを無菌操作できる状態にする。

※クリーンベンチとは細胞や微生物を取り扱う際に、埃や雑菌の混入(コンタミネーション)を防ぎ、無菌状態で作業するための装置。安全キャビネットが、装置内部の菌や微生物が空気中に漏れることを防ぐ装置であるのに対して、クリーンベンチは外部の雑菌が装置内に入ることを防ぐ。



※無菌操作できる状態にするためには

- ①手を石鹼で洗い、エタノールで消毒する。
- ②70%エタノールを含ませた清潔なキムタオルでクリーンベンチ内をすみずみまでふく。
- ③ガラスを閉めて、ファンを消し、UVランプをつけて2時間以上放置すると無菌状態になる。



(○がUVランプのスイッチ)

## 2. クリーンベンチ内に器具を持ち込む

①持ち込む際にはまず十分に手を洗淨し、エタノールで消毒をする。

②器具類もすべてエタノールで消毒する。

※前面のガラスを20cmあげたら危険ゾーン30cmと考えておく。

## 3. 培養液をシャーレに移す

①無菌のガラスシャーレを用意する。

②ガラスシャーレに溶液を注ぐ。

※溶液は冷めると固まり始めるので溶液が冷めないうちに注ぐ。

※ガラスシャーレの半分ぐらいまで溶液を注ぐ。

③固まるとガラスシャーレを逆にする。

→1日おいてコンタミしてないか確認する。



## 4. 培養地に菌を撒く

- ・マイクロピペット
- ・アルコールランプ
- ・エタノール(器具の消毒用)
- ・パラフィルム
- ・スプレッター(菌を培養地に撒くための器具)を用意する。

①培養したい菌の濃度を調節する。

②マイクロピペットで菌を培養地に落とす。

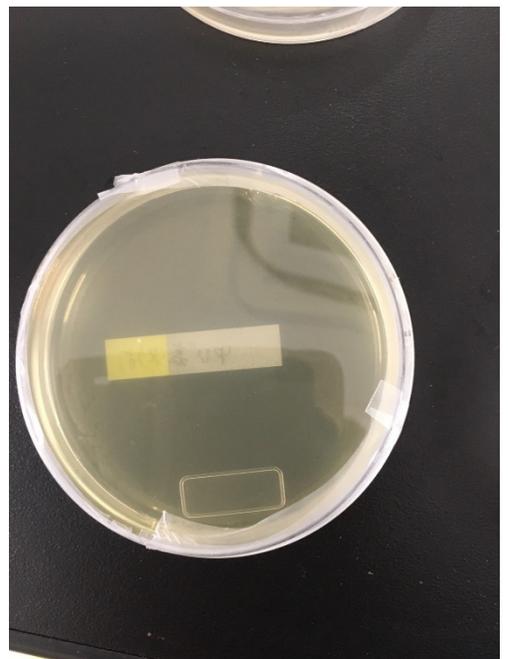
※マイクロピペットを横にしない。

③スプレッターで均等に広げる。

④スプレッターをエタノールで消毒し、ガスバーナーで加熱滅菌を毎回する。

⑤菌を撒いたらシャーレをパラフィルムで密着させ、密封する。

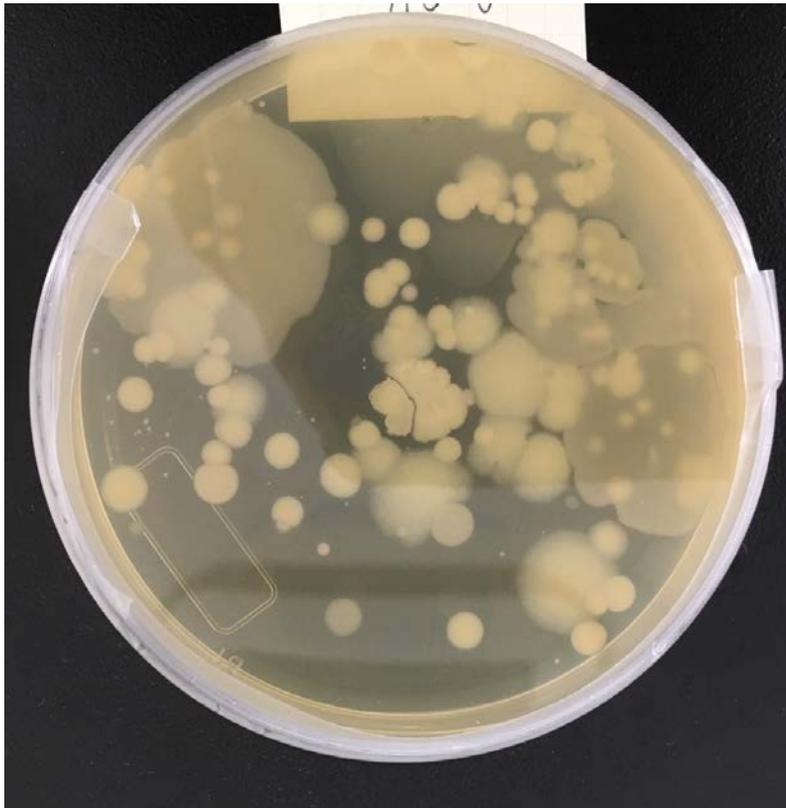
※シャーレをひっくり返して結露によるコンタミを防ぐ。



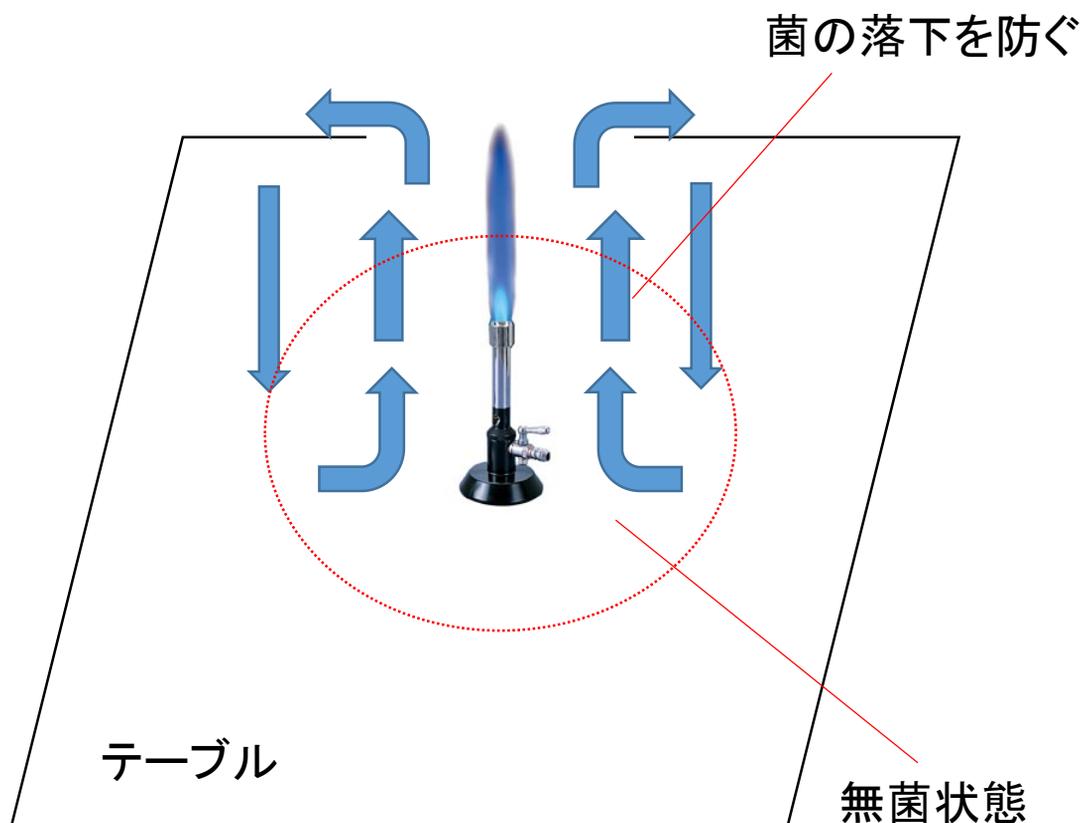
## 5. 培養地を適切な温度で保存する

それぞれの菌の培養に適した温度がある。

コロニーが重なっていないのが理想。



## クリーンベンチがない場合の簡易型無菌操作



### ※ガスバーナーを用いて行う

クリーンベンチ内はドラフトによって空気からの菌の付着を防いでいるが、今回はガスバーナーの火をつけることで付近に上昇気流を発生させ、空気からの菌の付着を防ぐことができる。作業をする場合はテーブルをエタノールで消毒し、きれいにしておく。

### ガスバーナーで行う際

- ・無菌操作の際には火が体に燃え移らないように注意する。
- ・ガスバーナーから近いところで作業を行う。