

**2019 年度**  
**生物学科 生物学実験法 II**  
**微生物取扱の基礎**

**2018/9/27、 10/4**

**担当教員 川田健文**

**(047-472-5156、 tkawata@bio.sci.toho-u.ac.jp)**

**(オフィス：理学部1号館 1414A)**

**(実験室：理学部1号館 1413、 1415)**

## 本実習では微生物の取扱の基礎を学習する

第1週目は、実習で扱う微生物についての簡単な講義と実習の手順の詳しい説明を行う（場所は実験台実習室、席順無しなのでなるべく実験台上のモニターが見やすい位置にイスを持って移動すること）。また、こちらから一部の人を班長と副班長に指名するので、それらの人には残ってもらって2週目で使う培地の作成と器具の設置を行ってもらう。

なお、今回の実習の説明に先立ち今年の生物科学実験法 II の全体責任者の教員から今学期の実習全体に関して諸注意その他の説明がある。それに引き続いて川田の担当する実習を開始する。忘れなければ1週目の講義で用いるスライドは分子発生生物学研究室のホームページ（文字化けする場合は別のブラウザをトライ）に掲載予定であるので、2週目の実習の前にアクセスしてもう一度復習しておこう。2週目は全体で16班に分かれて実習をする（グループと班分けは後日掲示する）。本実習では滅菌操作、無菌操作について体験し、その応用として微生物の増殖を観察する。

実験は病原性のないパン酵母（出芽酵母）と遺伝子工学に多用されている大腸菌株を用いて行い、万が一汚染しても被害がないようにする。なお、酵母は班ごとに違う栄養要求性株を用いる。

Web; <http://www.lab.toho-u.ac.jp/sci/bio/moldev/a/jikkenhou1.htm>

以下は微生物学実習でも紹介する主な注意事項で、前もって記載するので必ず読んでおく。

### 1) 総論

#### 実験を行う際の心構え

実験には病原性のない出芽酵母（食用として用いられているパン酵母と同じもの）と病原性のほとんどない遺伝子組換え研究用の大腸菌株を用いて万が一汚染しても良いようにするが、あくまでも通常の微生物実験のための訓練と考え、**病原性のある菌を扱っているものとして実験を行う。**

#### 安全について

病原性のあるものと仮定して実験を行うので以下のことを徹底する。滅菌操作の際に**火傷をしないように十分注意する。**

- (1) 無菌状態の器具と、そうでない器具を常に区別し把握しておく。
- (2) 実験が終了したら、使用した全ての菌は必ずオートクレーブ滅菌をして

から捨てる。オートクレーブ滅菌ができない器具類に菌が少量付着しているときは、まず消毒液で殺菌した後に洗浄する。

(3) 誤って実験台、手指、床、器具、服などを菌で汚染したときは、教員やTAの指示を受ける。汚染が疑われるときも直ちに殺菌消毒する。

(4) 実習室内では白衣を着用し、飲食は禁止する。

(5) 実験台には、実験器具とテキスト、ノート類以外の物は置かない。

(6) 実習室を離れるときは、ガスバーナー、ガスコンロの火を必ず消す。

## 廃棄物

(1) 実験終了後、培養した寒天培地（プラスチックシャーレ）は専用の袋に入れ、袋を開けた状態でオートクレーブ滅菌する。寒天が固まる前に、熱いので注意して下に穴を開け、寒天を回収する。寒天は指定した袋に入れて生ゴミとして捨てる。残ったプラスチックシャーレは、燃えない実験ゴミとして捨てる。オートクレーブ後に溶けた寒天を流しに捨てると、冷えて固まり排水管が詰まる。培養した液体培地はオートクレーブ滅菌を行い、流しに捨てる。**(今回、寒天処理の作業はやりません)**

**(2)** 試薬、生きた微生物、その他の有害物を含まない場合に限り、一般のゴミとして捨てることができる。次のように分別する：**紙、木、プラスチック、ビニール、コンビニ袋などは燃えるゴミ**に捨てる。金属や**アルミホイル、ゴムなどは燃えないゴミ**に捨てる。ガラスは**燃えないゴミ**であるが、特別な容器に入れる。特に手を触れると危険な状態のものは指示を受けること。空き缶、ペットボトルは別々に資源ゴミとして回収する。**(今回はすべてのゴミを各班に配布する1つの袋に入れる)**

## 2) 主な機器、施設の使用法

### a) 計量器

メスピペット（微生物用のものは先端目盛りになっており、中間目盛りは用いない。今回は滅菌済みの使い捨てのものを用いる）、メスシリンダー

### b) 実験器具

洗浄ビン、安全ピペッター、三角フラスコ、ビーカー、試験管、試験管立て、シャーレ（滅菌済みの使い捨てのもの）、ガスバーナー、秤量皿、アルミホイル、キムワイプ、プラスチックセル、白金耳

### c) 機器

天秤、分光光度計、オートクレーブ、乾熱滅菌機（今回は用いない）

### d) 試薬

酵母用培地（粉末：寒天も含まれる）

### 3) 酵母についての基礎知識

酵母は真核生物でそのほとんどはカビの仲間の子囊菌に属する。ほとんどが通性嫌気性で、液体培養では振盪培養でも静置培養でも生育出来る。ただし、アルコール酵母のような酵母（例えばパン酵母）では静置培養のように通気性が悪いとアルコール発酵によってエネルギーを獲得する。従って、菌を大量に得たい場合や、生産物を大量に回収したいときなどは振盪培養が適している。培養温度は 30°C前後が至適で、培地の pH は弱酸性（pH 4.0 ~ 6.0）で良く育つ。今回の実習で使用する株のように食用に用いられるものも多い。

### 4) レポートの書き方

テキストの最後にある用紙に従い、実験 1 と実験 3 については 1 週目の実習時間中に記入し提出する。実験 2 は実習の翌週（3 週目）に提出する。ただし、3 週目は他の先生の実習があるので、そちらを優先し、それが終わってから観察すること。**どちらか 1 つでもレポートの提出の無いものは不合格(60 点未満)**となる。また、**出来のよくないレポートには再提出を求める。再提出がない場合には担当分は不合格 (60 点未満) とする。**従って、**やむを得ぬ事情で欠席した場合は必ず速やかに欠席届を提出すること。**例外は認めない。インフルエンザなどやむを得ない事由と判断できるものに対しては予備日に追加の実習（補講）を行う。

なお、3 年次の微生物学実習には人数制限がある。履修希望者が超過した場合には今回のレポートの出来も参考にする。

## 実験 1

### 滅菌と無菌操作、培地の作製

微生物を研究の対象として取り扱うときには、雑菌（他の微生物）が混入することなく目的の微生物だけを純粋に培養する技術が欠かせない。雑菌の混入を防ぐため、器具や培地は滅菌してから使用し、菌の接種、培養など全ての操作は無菌的に行う。実験が終わったら、培養した菌（病原性、非病原性を問わず）や使用した器具は全て滅菌または殺菌（消毒）し、人への感染や環境汚染を防止する。

他の生物と異なり微生物は増殖しないと肉眼で確認できないが、増殖してから汚染に気がついて遅い。そこで、確立した方法で操作するとともに、存在しているはずの場所を常に把握しておくことが重要である。

1) 培地の作成（オートクレーブの取扱いを学ぶ）

**実際の操作と注意事項は口答で説明するので絶対に聞き逃さないように。操作を誤ると火傷をする可能性があり、大変危険。**

各班で作成する培地（各班プレート 1 種類に人数分の枚数準備する）

(1) 合成寒天培地（栄養要求性培地、dropout medium）を作る

作る合成培地は次の 5 種類

1. YPD 培地（合成培地ではない）
2. ロイシンが含まれない培地
3. ウラシルが含まれない培地
4. トリプトファンが含まれない培地
5. ロイシンとトリプトファンが含まれない培地

市販の混合済み粉末のもの（注意：寒天も既に含まれている）を用いて所定の量（1 は 3.5 g、2-4 は 2.5 g）を測って 100 ml の三角フラスコに入れ、純水を 50 ml 加えて、オートクレーブ中の吹きこぼれ防止のために湯せんで寒天をある程度とかす。粉末の中に含まれている小さい気泡を追い出して少し透明

になる程度で良い。粉末を計る時に混み合うので1つの班あたり1人ずつはかるなど班間でやり繰りに融通を利かせる。

湯せんが終わったら、すべての班の分をまとめてオートクレーブをかけ滅菌を開始する。オートクレーブ終了後、滅菌済みプラスチックシャーレに滅菌済みの溶けた寒天培地を注ぐ。寒天培地は班ごとに1人1種類の培地を担当し、滅菌後に一班あたり5種類の培地を作製する。1種類の培地あたり人数分の枚数を作製できるようにする。オートクレーブには時間がかかるので全ての班の準備がそろってからオートクレーブをかける。また、滅菌中にオートクレーブの説明を行う。

ガラスピペットなどのガラス器具や金属の滅菌には乾熱滅菌器を用いるのが一般的である。今回は用いないが、「乾熱滅菌器」とは何かについて、レポートの課題として出しているため、自分で文献を調べて3週目のレポートと一緒に提出する。

今回の実習で用いるピペットは、**滅菌済みのプラスチックピペット**である。使用後は、オートクレーブ滅菌をしてから廃棄しなければいけないので、各班に配布された白い袋（オートクレーブバック）の中に入れ、絶対に通常のゴミ箱には捨てないこと。もし、途中で数が不足した場合や何かのトラブルがあった場合には指示に従うこと。

巻末に参考資料（微生物学実習で用いているもの）を少し改変したものを添付した。

## 実験2

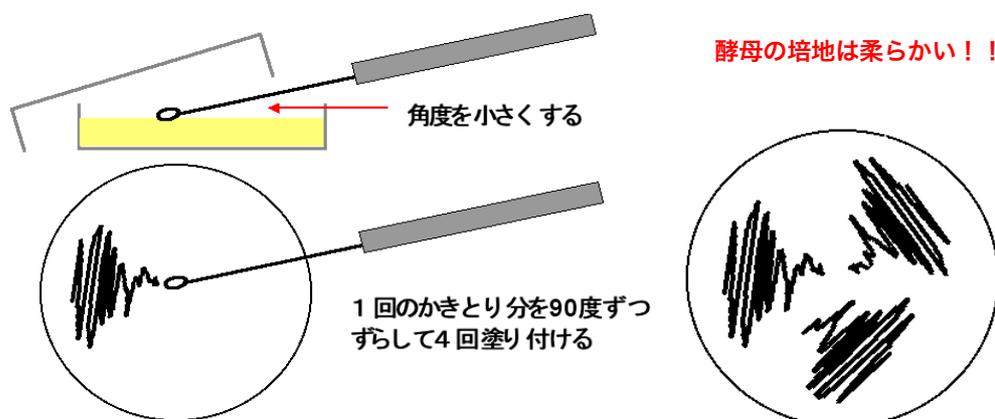
### 酵母の植菌

#### 1) 寒天培地への無菌的な植えつけを習う。

出芽酵母を寒天培地で増殖させると、実際には30℃で保温すると2～3日で増殖してコロニーとして観察できる。実習は金曜日の午後しかないため、今回は**室温で1週間放置する**。1週間後（3週目）にコロニーが確認できたら観察し、レポートを書いて提出する。

菌を液体培地や寒天培地に植え付けることを植菌と言う。やり方は当日口頭

で説明する。また、巻末資料のところに詳しく述べられている。



**注意！** 白金耳は、菌をつける前と後に火炎滅菌する。

## 実験の翌週に！ (10月11日)

### 2) 酵母の栄養酸要求性の同定

第2週で植菌した酵母をその翌週に観察する（その週の実習が終わってから）。どの培地で増殖出来て、どの培地で増殖出来なかったかを記録し、レポート用紙にあるようにスケッチし、アミノ酸や塩基などの栄養素に対する要求性を判断し考察する。

蓋にたまった液体があればそれが何であるか考察する。また、その液体はどのような代謝によって生じたものかも考察する。

## 実験3

### 微生物の増殖曲線

#### 増殖曲線の作成

こちらで試験管に用意しておいた大腸菌の前培養液 (preculture) を1週目に班長が作成した本培養 (mainculture) 用の普通ブイヨン液体培地へ植菌し、吸光度計で増殖をみる。

酵母や細菌の培養を液体培地で観察していると時間の経過とともに菌数が増えるのでだんだんと培地が濁ってくる。この濁りの濃さを相対的な菌数として

機械的に測定する。実際にこの濁り（濁度）を測定することで生育度を測定する方法は一般に行われている。本実習では分光光度計を用いて濁度を測定する。

- (1) 前培養液 (preculture) は各班に1つこちらで用意する。
- (2) まず、液体培地 3 ml を 5 ml の滅菌済の使い捨てピペットでとり、分光光度計で 600 nm の培養前の液体培地のみの見かけの吸光度 ( $A_{600}$ ) を測定する。実験開始時には対照として水を入れたセルでゼロ合わせしてあるので、ゼロ設定は変更しないようにする。見かけの吸光度を培養開始後の各測定値から差し引く（レポートの表を参照）。
- (3) 300 ml の三角フラスコ（蓋としてアルミホイルを被せてある）に入れた普通ブイヨン液体培地 100 ml（滅菌済み）に、前培養液 **1.0 ml**（この液量は前培養液中の菌の増殖具合によって変化させるので当日判断する）を 2 ml の滅菌ピペット（今回の実験ではプラスチック製の滅菌済みものを用いる）で加え、三角フラスコに蓋をしっかりとって 37°C のウォーターバスにセットし、振盪培養 (shaking culture) する。振盪速度は液体培地がよく攪拌されるように調節してあるので、スピードの変更はしない。多少時間がかかるので、実験は他の実験より先に開始する。
- (4) 接種直後（0 時間）から 30 分おきに大腸菌の培養液を(2)と同様にプラスチックセルに入れ、600 nm の見かけの吸光度 ( $A_{600}$ ) を測定する。

測定後の菌液は別に用意した廃液入れ用の 100 ml の三角フラスコに入れ、後でまとめてオートクレーブ滅菌してから捨てる。**セルは毎回廃液を捨ててからオスバン消毒液に 5 分ほど浸して殺菌し、その後、脱イオン水で洗って乾燥させておく。**セル毎に吸光度が違うので**同じセルを使用するほうが測定誤差は少ない。**

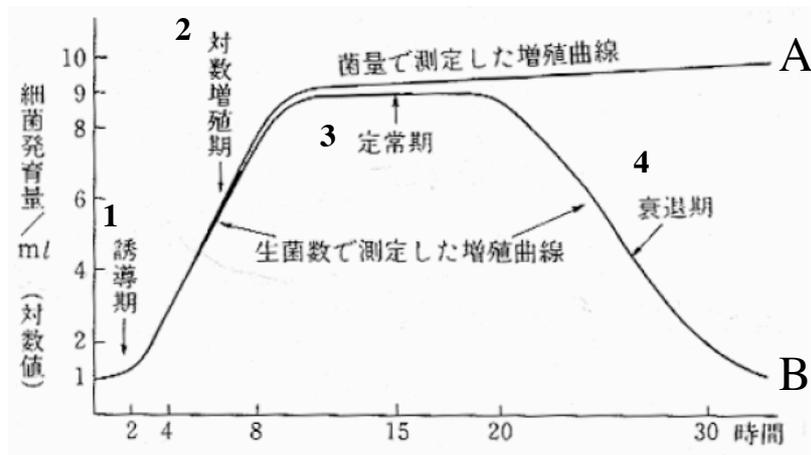
**注意！ 毎回、手はオスバン液につける。実験台や分光光度計が菌で汚染されたときもオスバン液で殺菌消毒する。**

- (5) 補正後の  $A_{600}$  の値を片対数の方眼紙（添付してある）にプロットして生育曲線を描く。グラフの書き方は当日説明する。

<参考> 細菌や酵母の生育曲線には、誘導期 (lag phase)、対数期 (logarithmic phase)、定常期 (stationary phase)、死滅期 (death phase) が見られる（下図）。

出芽酵母は出芽により増殖し倍加する。細菌や分裂酵母は二分裂で増殖し倍

加する。数式により増殖の様子を推測することが出来るが、今回の実習では**片対数グラフ**を描いて、その傾きから**世代時間 (=倍加時間)**を求める。



A : 総菌数 B : 生菌数  
1 : 誘導期 2 : 対数期 3 : 定常期 4 : 死滅期

## 参考資料

滅菌と無菌操作、培地の作製

### 1. 使用する菌株

出芽酵母の一種 *Saccharomyces cerevisiae*

大腸菌 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ 株

株によって遺伝型が異なるので各種のアミノ酸や塩基に対する要求性が異なる。

### 2. 消毒法

本実習では、市販のオスバン (10% (w/v) 塩化ベンザルコニウム、逆性石鹼の一種) の原液を水道水で 100 倍に希釈して消毒液とし、汚染箇所の殺菌消毒に使用する。

オスバンなどの逆性石鹼は不快な臭気がなく、副作用も少なく、消毒力が強いなど利点が多いが、普通石鹼と逆の荷電をもっているので混用すると効果が消失する。一般細菌、真菌に有効で、芽胞、結核菌には効果がない。有機物が

混ざると効果が減弱するので排泄物の消毒には不適切で、手指、調理器具などの消毒に用いられる（「生物化学実験のてびき ⑤ バイオハザード防止法」、化学同人）。

消毒液は条件によって殺菌力が低下するので、オートクレーブ滅菌や火炎滅菌が可能な場合は、それらの方法を優先的に使う（例えば、培養した培地はオートクレーブ滅菌する）。

（１）少量の菌が付着したスライドグラス、カバーグラス、分光測定用セルなどは、オスバン液（100 倍希釈液、以下同じ）にしばらく入れて殺菌し、その後で洗う。

（２）菌液が付着した（使用した）メスピペットは、まず綿栓を針金の切り口に引っ掛けて外してオスバン液（ビーカーに用意）につける。次にピペットを、先端を下向きにしてオスバン液を入れたピペット洗浄筒へ入れる。ピペット全体（内部も）がオスバン液に触れていることを確認すること。

（３）培養中のシャーレ、三角フラスコなどは注意深く扱う。培養物を落としてこぼしてしまったときは、直ちに指導者に連絡して指示を受ける。5% 石炭酸水を噴霧器で注ぎ、30 分以上放置してから片付ける。石炭酸水は刺激性があり、手指の消毒には使わない。

オスバン液、エタノール（80% 程度）、ルゴール液をかけて殺菌する方法もある。少量の菌が実験台、器具類、床、服などに付着したときも指導者に連絡し、オスバン液で殺菌する。

（４）オスバン液を入れた容器（たらい）を各班で用意し、実験操作の前後に手指を消毒する。オスバン液は毎日つくりかえる。普通石鹼と併用しない。

### 3. 滅菌 (sterilization)

病原菌、非病原菌を問わず、全ての微生物を完全に死滅除去することを滅菌という。本実習では、乾熱滅菌、高圧蒸気滅菌（オートクレーブ滅菌）、火炎滅菌（焼却）を使い分ける。

#### （１）乾熱滅菌 (dry heat sterilization)

使用するガラス器具などは、あらかじめ乾熱滅菌する。

メスピペットは、吸い口に綿栓をして、先端を奥にして金属製滅菌缶に入れる。綿栓には青梅綿（脱脂してない）を使い、吸水性のある脱脂綿は不適當である。綿栓は使用後取り除きやすいように、吸い口から 1 cm 位まで、ゆるめ

に入れる。

試験管、三角フラスコの口には金属キャップ、綿栓、またはアルミホイルをつける。本実習で使う滅菌済プラスチックシャーレは、この操作は不要である。

乾熱滅菌器の棚に3割位の隙間ができるように入れ、180℃で60分間保ち、閉じたまま放冷する。器具を広げすぎて棚の穴を全て塞いでしまうと熱い空気が上部に移動できず、下部は設定以上に温度が上がって故障することがある。また、途中で扉を開けてはいけない。開けると空気が入り、綿栓が焦げたり、燃え出したりする。

試験管などに綿栓をする方法を練習する。青梅綿を広げ、芯にする綿を丸めて置いて包み、回しながら容器の口に押し込む。綿栓は乾熱滅菌すると固くなり、使いやすくなる。

## (2) 高圧蒸気滅菌 (sterilization by autoclaving)

培地など乾熱滅菌できないものは、オートクレーブ (autoclave) を使用し、高圧水蒸気で滅菌する。新しく調製した培地、不要になった培養物の滅菌に使う。プラスチックは材質により、オートクレーブ滅菌できないものもある。

綿栓部分にはアルミホイルなどをかぶせ、落下する水滴で濡れないようにする (金属キャップのときは不要)。試験管はビーカーなどに入れ、オートクレーブ内で倒れないようにする。

滅菌は高圧水蒸気によるので、器具の内部に高圧水蒸気がよく触れるようにしなければならない。オートクレーブ用バッグは、開いた状態で滅菌する。培地を入れたスクリューキャップ付の瓶 (本実習では使わない) は、密閉しないでキャップを緩めて開けておく。オートクレーブ内の横の穴が入れた物でふさがらないようにする。

水がヒーターを覆っていることを確認し、必要なら水を補給し、排気つまみを閉じる。排気つまみを閉じてても排気口は開いていて、内部が水蒸気で飽和すると自動的に閉じる。滅菌するものを入れて蓋をし、2気圧、121℃で20分間保つ。滅菌する培地の液量が多いときは、温度が上がるのに時間がかかるので、設定時間を長くする (2Lで40分間位)。

終了したら放冷し、圧力計が0 (大気圧) を示したら、排気つまみを回して開き、次に蓋を開く。早めに取り出すときは、排気つまみをほんの少し回して、ゆっくりと圧力を下げる。急いで排気すると、中の液体培地が突沸して吹き出したり、綿栓が外れるので注意する。取り出すときは、火傷をしないように軍手などを使う。

### (3) 火炎滅菌

白金耳などは、火炎滅菌する。6. 接種 を参照。

## 4. 無菌操作

研究ではクリーンベンチや無菌箱を使うが、本実習では使わない。ガスバーナーの火炎のすぐ側では、火炎で滅菌された空気が上昇し、その周辺で下降している。このような火炎無菌の状態を利用し、培地の調製、菌の接種などの無菌操作を行う。手、頭などを火傷しないように注意しながら、できるだけ火炎の近くで、手早く確実に操作する。

## 5. 培地 (culture medium) の調製

### (1) YPD 培地

市販品を記載された量の純水（蒸留、脱イオンなどで不純物を除いた水をさす）に溶かすと、Yeast extract 10 g/L、ペプトン-Y 20 g/L、Dextrose 20 g/L、pH 6.5 となる。オートクレーブ滅菌する。

ガスバーナーの火炎の側で、滅菌した三角フラスコに滅菌した培地を手早く無菌的に入れる。培養容器の口の部分に培地が付着すると雑菌が入りやすい。無菌操作をしないで分注してからオートクレーブ滅菌してもよい。

### (2) YPD 寒天培地

(1) のように YPD 培地を作り、培地 1L あたりに寒天 17 g の粉末寒天を加え湯浴で溶かす。湯浴には金属製たらいとガスコンロを使用する。その後、オートクレーブ滅菌する。実習では既に作製し菌を塗り付けてあるものを使用する。

[平板培地] 滅菌培地 (50°C 位) の入った三角フラスコを傾け、滅菌シャーレに約 12 ml の培地を無菌的に入れ、平らに固める。シャーレの蓋の近くに培地を付けない。蓋を少しずらして短時間放置し、湯気を逃がす。培地表面が濡れていると独立した集落ができないので、**逆さにして**蓋の縁に重ねるように本体をずらして置き、30°C のインキュベーター中で乾かす。

### (3) SDA(寒天)培地

DOB (Dropout Base) は、YNB (Yeast Nitrogen Base) に炭素源を加えた合成

培地で多くの酵母株を生育させる。これにアミノ酸、ウラシルおよびアデニンを加えた培地はSDまたはSC培地と呼ばれ、増殖性の良い酵母株の培地となる。SD培地はDOB培地とCSM (Complete Supplement Mixture)を含む合成培地で、組成は特定のアミノ酸か塩基だけを除いたものになっている。SDA培地はSD培地に寒天を加えたものである。

市販品を記載された量の純水を加えて湯浴で溶かすと、YNB 1.7 g/L、硫酸アンモニウム 5 g/L、Dextrose 20 g/L、CSM (ただし記載のアミノ酸及び塩基を除く) 20 g/L、寒天 17 g/Lとなる。酵母株の栄養要求性を調べるときや栄養要求性遺伝子を利用した形質転換実験に使う。今回の実習では50 ml作る。

#### (4) 普通ブイヨン培地

市販品を記載された量の純水(蒸留、脱イオンなどで不純物を除いた水をさす)に溶かすと、肉エキス 3 g/L、ペプトン 10 g/L、食塩 5 g/L、pH 7.0 となる。オートクレーブ滅菌する。

ガスバーナーの火炎の側で、滅菌した試験管、三角フラスコに滅菌した培地を手早く無菌的に入れる。培養容器の口の部分に培地が付着すると雑菌が入りやすい。無菌操作をしないで分注してからオートクレーブ滅菌してもよい。

## 6. 接種 (inoculation)

ガスバーナーの火炎の側で、手早く無菌的に行う。

**注意！ 培養容器の口の近くに菌や培地を付けないように。**

#### (1) 白金耳の火炎滅菌

白金耳(エーゼ)は、菌を接種する前後に火炎滅菌する。白金耳のニクロム線部分を赤くなるまで焼き、柄の金属の部分も数回火炎に通す。

多量の菌の塊を付けた白金耳を火炎滅菌するときは、菌が飛び散る危険があるので、直接火炎に入れないで次のようにゆっくりと加熱していく。まずニクロム線部分の中央を熱して菌を炭化乾燥付着させ、ついでニクロム線の先を還元炎(内部)に入れて白金耳をほぼ垂直に立て、徐々に酸化炎(外側)に移して灼熱させて完全に火炎滅菌する。

#### (2) メスピペットの使い方(ガラスピペット用なので今回とは異なる)

滅菌したメスピペットは、火炎の側で無菌的に滅菌缶から取り出し、さっと火炎に通して表面を殺菌し、少し待って冷えてから使う。メスピペットの吹き口に付けた綿栓（青梅綿）は、吹き出すときの雑菌汚染を防ぎ、また吸い取りすぎたときに一時的に菌液をはじく働きもする。菌液を扱うときには安全ピペッターを使い、直接口で吸わないこと。使ったメスピペットは、綿栓を外してオスバン液に入れてから、オスバン液を入れた洗浄筒へ先を下向きに入れる。

安全ピペッターに慣れていない人は水で練習すること。内部に菌液が入ってしまったら、指導者の指示を受けること。殺菌するのは面倒で、まず3ヶ所の弁にオスバン液を流し、次に分解して内部にオスバン液を入れて殺菌し、同時に手指も殺菌する。

### （3）斜面培地 (slant) への接種

菌を培養した培地と新しい斜面培地の2本の試験管を左手に持ち、キャップ（または綿栓）をはずして右手指に挟む。試験管の口を火炎にさっと通して殺菌する。火炎滅菌した白金耳が冷えてから菌をつけ、図のように斜面に植える。試験管の口を再び火炎に通し、キャップをつけ、白金耳は再び火炎滅菌する。

斜面培地は菌を保存するために使う。一晚培養した後、培地が乾燥しないように試験管上部を密閉して冷蔵庫に入れ、数ヶ月毎に植え継ぎを行なう。

### （4）平板培地 (plate) への接種

独立した集落（コロニー、colony）をつくらせ、異なる菌を分離することを目的とする。1つの集落は1つの細胞が増殖して生じたものである。

白金耳に少量の菌をつける。図のように平板培地の隅に密に塗り、次に線が交わらないように軽く塗っていく。このとき寒天培地表面に傷をつけない。蓋に付いた水滴が培地に落ちるのを避けるため、逆さにしてインキュベーターに入れて培養する。白金耳へ付ける菌の量は、培養後に塗沫部分に独立した集落が生じる程度とする。

### （5）液体培地への接種

液体培地には、その1%程度の前培養液 (preculture) を接種して培養する。試験管の液体培地へは、メスピペットで0.1 ml程度の培養液を加える。寒天培地のコロニーは、白金耳で接種する。

## 用意する物の目安 (実験 1 ~ 3)

2019 年度

あくまで目安なので、実際には使わないものや足りないものもあります。

**各班で用意** (予め机の上に配布されていますが、ない場合は申し出て下さい)

- ・ガスバーナー、ゴムホース 各 1 → 火炎滅菌、無菌操作に用いる
- ・ライター 1
- ・試験管立て 1
- ・安全ピペッター 2~3 → 必ず滅菌済みメスピペットにつけて使用
- ・白金耳 2~3
- ・ポリエチレン袋 (オートクレーブバック) 1  
→ 使用後の滅菌済みメスピペットなどを入れる

**2 班で 1 つ用意** (共用する)

- ・プラスチック製たらい 1 → オスバン液、手指の殺菌

**全班共通で用意** (1 週目の最後に副班長が用意する)

- ・ガスコンロ 5 → 寒天培地を溶かす
- ・金属製たらい 5 → 寒天培地を溶かす
- ・電子上皿天秤 5 → 試薬、粉末の培地
- ・ポリバケツ、ポリエチレン袋 2 → 滅菌済寒天培地を廃棄
- ・オートクレーブ 2
- ・(インキュベーターは今回用いない)
- ・振盪恒温水槽 4 → 生育曲線の測定実験
- ・恒温機 4 → 温水槽を温める
- ・分光光度計 4 → 生育曲線の測定実験

\*共通でつくる試薬は、別に指示する

この実習で使う器具のほとんどは、他の実習においても使います。なくしたり破損したりしないこと。破損した場合は速やかに届け出ること。



## レポート1 (10月4日提出)

学番 \_\_\_\_\_ 氏名 \_\_\_\_\_

- 1) オートクレーブを使用した滅菌法について質問します。( )の中を埋めて下さい。

オートクレーブ滅菌器は自動化された圧力釜のような機械で、中の圧力は( )気圧になります。このときの内部の温度は( )℃です。このような高温の蒸気が内部に充満することによってあらゆる微生物を完全に死滅させることが可能です。

取り扱うときに注意する点は、中のものが熱いので火傷をしないことです。とくにオートクレーブ本体や、培地そのものからも湯気が出るので注意が必要です。

- 2) オートクレーブを20分に設定してそれが終了しました(ブザーが鳴ります)。ここで、内部のものを取り出すときに正しいやり方は以下のどれですか？また、その理由はなぜですか？

- a) ブザーが鳴ったのですぐに開けてよい。
- b) 気圧のメモリが1気圧まで下がった(100℃になった)ので、すぐに開けた。
- c) 温度表示が100℃以下になってから開けた。
- d) 温度表示が60℃以下になってから開けた。

**[理由]**

- 3) あなたの班ではオートクレーブのスイッチを入れてから終了するまで何分かかりましたか？

4) 分注してから寒天培地が固まるまでに何分くらいかかりましたか？

5) プレートへの植菌はうまくできましたか？うまくいかなかったとしたら、その原因はなぜですか？

6) 下の表を埋めて、縦軸に濁度の対数を取り横軸に培養開始からの時間を取り生長曲線を描きなさい（片対数グラフを一緒にして添付する）。また、グラフより求めた大腸菌の世代時間（見かけの倍加時間）を示しなさい。必ず具体的な数値をあげてどのようにして求めたかを説明すること。また、それをグラフにも記入すること。

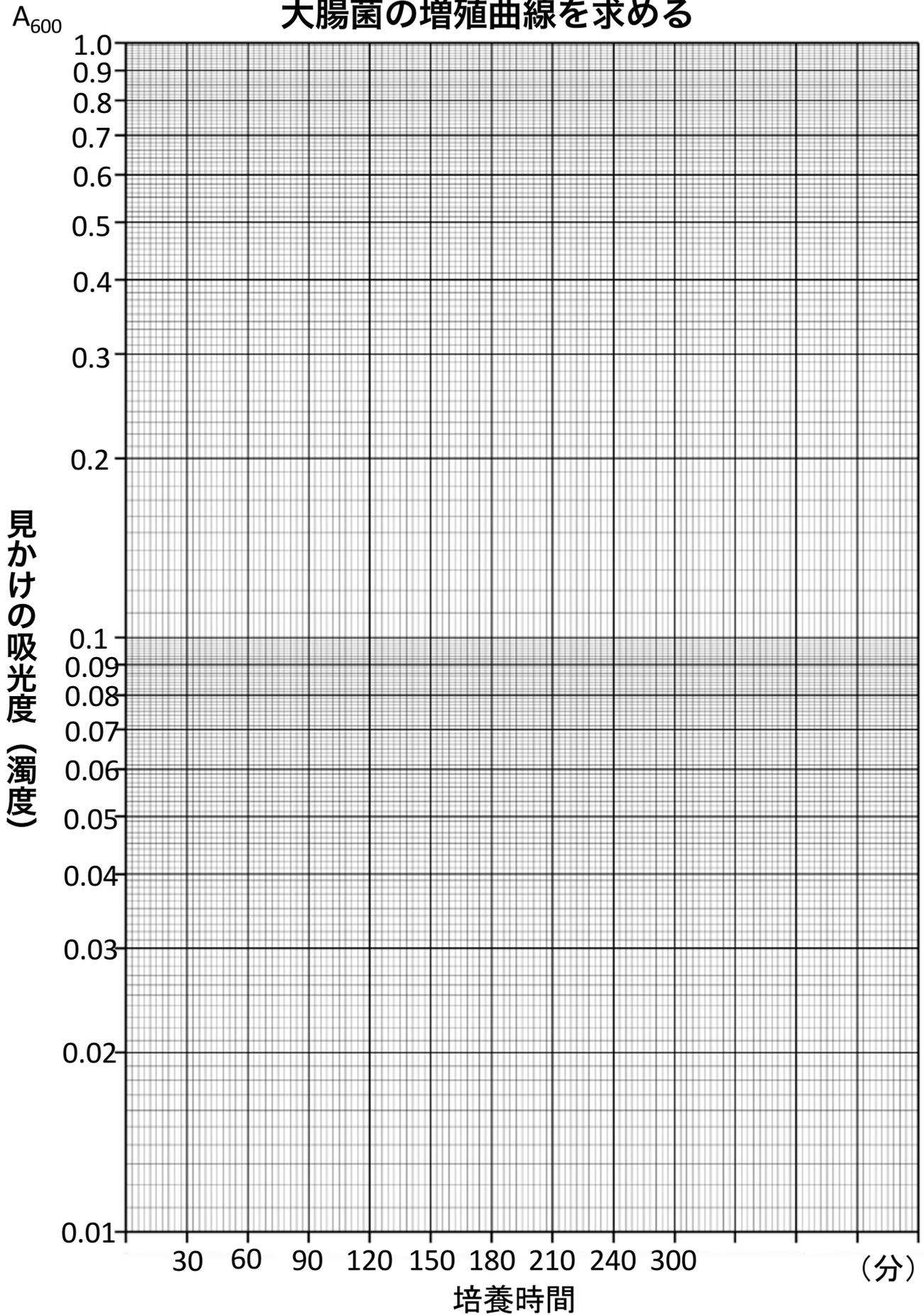
	培養前	30分後	60分後	90分後	120分後	150分後	180分後	210分後
培地のみ濁度 (A)								
濁度の測定値 (B)								
大腸菌のみ濁度 (B-A)								

倍加時間の求め方の説明（どのようにして求めたか、**グラフに書き込み**それに従ってどのように計算したかの説明を下にきちんと書く）：

倍加時間： \_\_\_\_\_ 分

理由：  $A_{600}$  の値が \_\_\_\_\_ の時、グラフより \_\_\_\_\_ 分と読める。この倍の菌数である  $A_{600}$  の値が \_\_\_\_\_ の時、グラフより \_\_\_\_\_ 分と読める。従って、その差は \_\_\_\_\_ - \_\_\_\_\_ = \_\_\_\_\_ 分となり、これが倍加時間に相当する。

# 大腸菌の増殖曲線を求める

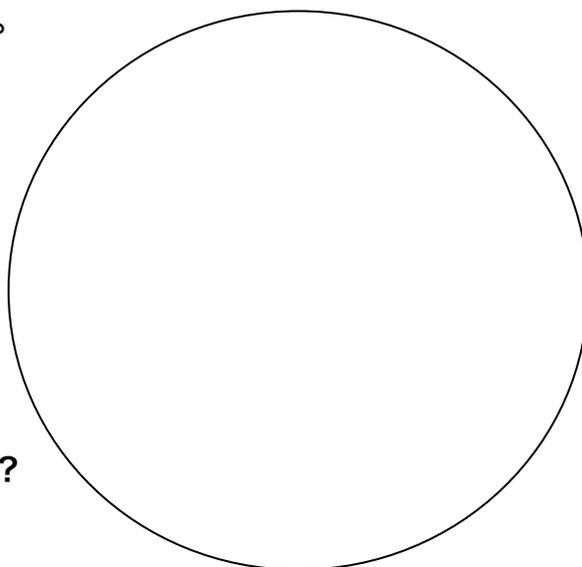




レポート2 (10月11日、19:00までに提出)

学番 \_\_\_\_\_ 氏名 \_\_\_\_\_

1) 酵母をプレートに植菌してから1週間近く経ちました。YPD 寒天培地の様子を示しなさい。



コロニーの色は？

色

2) あなたの班の酵母株はどの培地で増殖できましたか？下の表を埋めて下さい。また、その結果からあなたの班で用いた酵母はどの栄養素を要求する表現型と考えられますか？

	酵母の生育具合
YPD 寒天培地	
ロイシンが含まれない培地	
ウラシルが含まれない培地	
トリプトファンが含まれない培地	
ロイシンとトリプトファンが含まれない培地	

よく生育した場合は○、生育しなかった場合は×、判別が難しいときは△を記入する。

酵母の表現型 = \_\_\_\_\_ を要求する株

3) 酵母の生育しているプレートの臭いを嗅いでみて下さい。どんな臭いがありますか？そのことより何が言えますか？

プレートは\_\_\_\_\_の臭いがした。このことから、酵母は少なくとも\_\_\_\_\_という代謝を行なったと考えられる。また、最初は空気が存在してことも考慮すると蓋に付いていた液体は\_\_\_\_\_ということが考えられる。

4) 乾熱滅菌とは何か調べものをして以下に書きなさい。調べた文献も記入する。ただし、インターネットの丸写しは不可とする。

<参考文献>