

HK半流動確認培地

用途

嫌気性菌の性状確認による Level 1 の鑑別

- ES加HK半流動培地 (ES-HK) → Esculin加水分解能、硫化水素産生能の確認
- Bile加HK半流動培地 (Bile-HK) → 20%胆汁耐性試験
- CV加HK半流動培地 (CV-HK) → 0.001%crystal violet 耐性試験

組成 (1,000mL 当たり)

肉ペプトン 10.0g、カゼインペプトン 10.0g、酵母エキス 5.0g、ソイペプトン 4.0g、
 ブドウ糖 1.0g、亜硫酸ナトリウム 0.1g、アルギニン 1.0g、ビタミンK1 0.001g、
 ヘミン 0.01g、ビルビン酸ナトリウム 1.0g、ギ酸ナトリウム 0.15g、フマル酸ナトリウム 0.15g、
 リン酸一水素カリウム 0.4g、リン酸二水素カリウム 0.8g、塩化ナトリウム 2.5g、
 チオグリコール酸ナトリウム 0.3g、溶性デンプン 5.0g、塩酸システイン 0.3g、寒天 1.5g



エスクリン 1.0 g
 クエン酸鉄アンモニウム 0.5g



ES加HK半流動培地



胆汁末 20.0g



Bile加HK半流動培地



クリスタルバイオレット 0.01g



CV加HK半流動培地

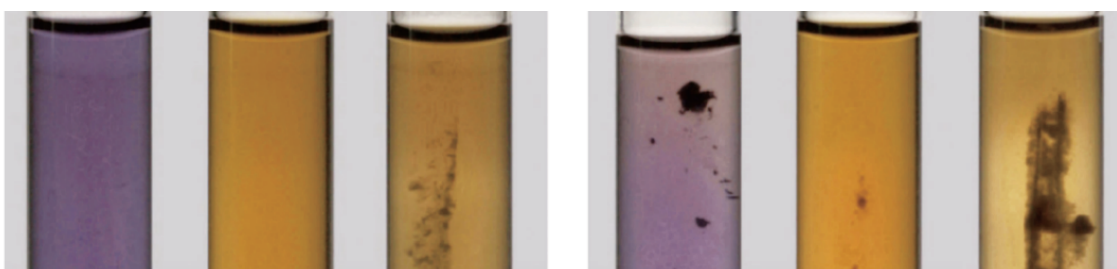
使用方法

● 被験菌株

耐気性の有無、純培養を確認した新鮮な培養菌株を用いること。

● 接種方法

- ① 被験菌株はMcFarland#0.5の菌液として接種するが、菌液をつくりだめすることなく、一株毎に調整し、直ちに②、③の手順で接種する。
- ② 菌液からパスツール・ピペットなどで0.1mLを採取する。この時、菌液中に気泡が見られる場合、予め、接種する培地上で気泡を押し出しておく。(少量の菌液が培地上に落下しても支障はない。)なお、菌液を調整することなく、集落から直接に白金耳、白金線などで接種すると、本来CV:S、あるいはBile:Sである株が不整発育し、判定を誤るので、これをしてはならない。(注)
- ③ 一本のピペットで、3本の培地への接種を行う場合、ES-HK、Bile-HK、CV-HKの順に培地底部から培地上端まで均一に接種する。このとき、ピペット中に残液、あるいは該当培地成分が残っている場合、接種した培地上に残液を滴下、排出しておく。(次の培地へのcarry-overを避けるためであり、少量の残液が培地上に落下しても支障はない。)
- ④ 接種後は密栓することなく、ふ卵器に収容、培養を開始する。



CV-HK Bile-HK ES-HK

① : 菌液を pasteur pipet で接種

CV-HK Bile-HK ES-HK

② : 平板集落から白金耳で接種



接種時の動画

注 : 図左は*Prevotella intermedia* の所定濃度の菌液を接種した所見、右は同株の平板培養から白金耳で直接接種した所見で、CV-HK、Bile-HK共に不整発育が起きている。平板培養からの白金耳などでの直接接種を実施してはならない。

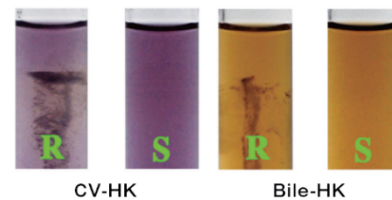
観察・判定

- ・ 判定に先立ち、ES-HKでの発育を確認する。(ES-HKはBile-HK、CV-HKとは異なり、選択的鑑別因子を含有しない。) 日常、分離頻度の高い *Bacteroides* spp., *Fusobacterium* spp., *Prevotella* spp., *Eggerthella lenta* などは2日培養で判定可能であるが、一部に発育の遅い株もあるため、1日目、2日目に中途観察し、3日目に判定することが推奨される。
- ・ ES-HKに十分な発育が見られない場合は、さらに培養時間を延長する。

● CV

発育を判定する。

Rの場合、脱色程度は菌種、培養時間によって異なる。



CV-HK

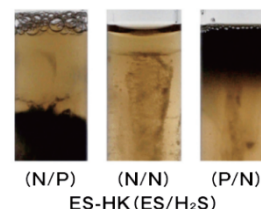
Bile-HK

● Bile

発育を判定する。

● ES

発育を判定する。



(N/P)

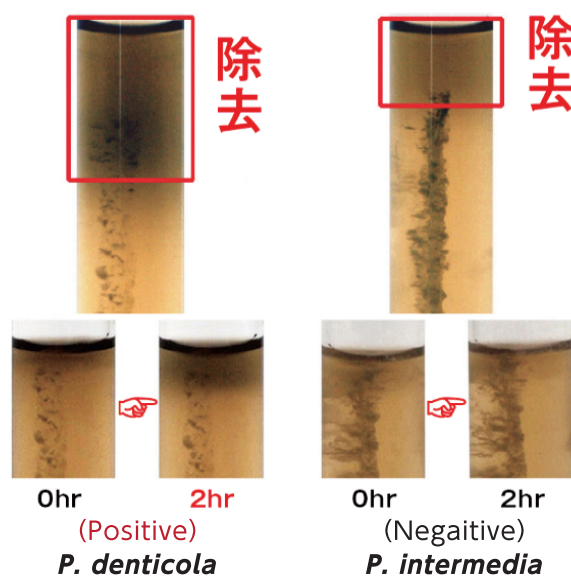
(N/N)

(P/N)

ES-HK (ES/H₂S)

注意

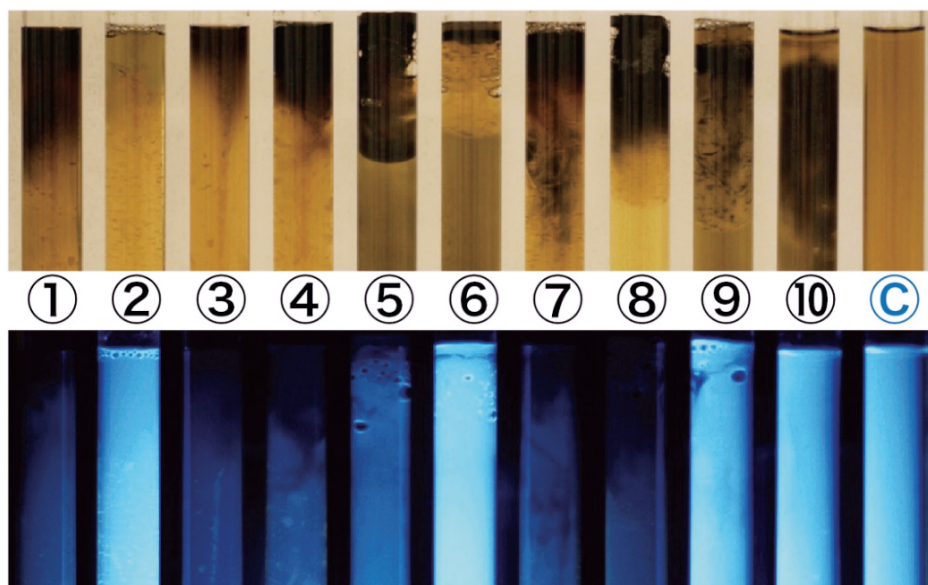
- 一般にES加水分解で生成するエスクリンと鉄の反応による黒色化は培地上端が著しいが、発育の遅い一部の *Prevotella* spp. やグラム陽性桿菌で、ES positive であっても培地上端ではなく、やや下部が薄く黒変し、判定に難渋する場合がある。
これらの株の多くはES加水分解酵素が誘導性である（発育に比してES加水分解が遅滞するとともに発育が遅い）ため、酸素の侵入による培地上部の非発育部位が長いことからこの現象が起こる。そのため、上部の非発育部位を除去後、追加培養を行い、上部の黒色化がみられれば ES positive とする。(注)
- *Prevotella* spp.、*Solobacterium moorei* などは2~3時間程度の追加培養により、ES positive と判定可能である。なお、このような株は後述の *Clostridium* spp. と異なり、ESの残留が多いため、365nm UV 照射による判定は困難である。



注：ES-HK 非発育部位除去・追加培養法

H₂S

ES-HKで産生されたH₂Sは鉄と化合、黒色の硫化鉄を生成により陽性と判定される。通常は培地の上部に存在するH₂Sは鉄との反応前に大気中に放出されるため培地上端は硫化鉄による黒色化は見られないが、*Clostridium* spp. で著しいGas産生により、ES negativeであっても、H₂Sから生成した硫化鉄が培地上部に押し上げられES加水分解による黒色化との区別が困難となることがある。このような場合には未接種のES-HKを対照に365nm UV を照射し、対照と同程度の青色蛍光を示す場合、ES加水分解はnegativeとする。(注)



- ① *C. difficile*
- ② *C. perfringens*
- ③ *C. ramosum*
- ④ *C. septicum*
- ⑤ *C. sporogenes*
- ⑥ *C. sordellii*
- ⑦ *C. clostridioforme*
- ⑧ *C. paraputrificum*
- ⑨ *C. novyi A*
- ⑩ *C. symbiosum*
- ◎ は対照の未接種 ES-HK

注：ES-HK 365nm UV照射法（上；通常光照明、下；365nm UV照射）
右記の青字で表示した菌株は ESが陰性である。

培地の取扱い

- ① 遮光下で室温保存（1～30℃）
- ② 転倒・振動等により培地内部に気泡等がある場合、開栓せずに沸騰浴で再溶解後、ただちに冷水浴中で再凝固させる。この操作は一度限りとする。
- ③ 被験菌株の接種用菌液の調整がすむまでは培地を開栓してはならない。

製品構成

品番	品名	製品構成	価格（税抜）
TP101	HK半流動確認培地 10試験用	ES、Bile、CV 各10本入	15,000円
TP102	HK半流動確認培地 5試験用	ES、Bile、CV 各5本入	8,000円

使用期限：製造後4か月

関連製品

（関連製品の製造元はスギヤマゲン）

品番	品名	製品構成	価格（税抜）
SG-SPOTIND-5	スポットインドール	5ml/本（2～8℃）	6,600円
SG-3-KOH	3%水酸化カリウム	2ml/本	1,500円
SG-A-GLU	α-グルコシターゼ	2ml/本（2～15℃）	4,500円
GG-300	紫外線照射ボックス	1台	14,800円



紫外線照射ボックス 365 (GG-300)

【販売元】



Prepare For The Next Stage

株式会社スギヤマゲン

〒113-0033 東京都文京区本郷2-34-9

TEL 03-3814-0285 FAX 03-3815-3045

E-mail mail@sugiyama-gen.co.jp

URL <https://sugiyama-gen.co.jp>

【製造元】



極東製薬工業株式会社

〒103-0024 東京都中央区日本橋小舟町7-8

TEL : 03-5645-5662 (学術)