KYOKUTO
PHARMACEUTICAL INDUSTRIAL CO., LTD.

HK 半流動確認培地

用　途

嫌気性菌の性状確認による Level 1 の同定

- ●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

ES 加 HK 半流動培地	
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 K_1	0.001g
ヘミン	0.01g
ピ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
エスクリン	1.0g
クエン酸鉄アンモニウム	0.5g
寒天	1.5g
pH	7.0 ±

Bile 加 HK 半流動培地	
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 K_1	0.001g
ヘミン	0.01g
ピ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
胆汁末	20.0g
寒天	1.5g
pH	7.0 ±

CV 加 HK 半流動培地	
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 K_1	0.001g
ヘミン	0.01g
ピ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
クリスタルバイオレット	0.01g
寒天	1.5g
pH	7.0 ±

図1

図1. 注; CV-HK は製造直後には図左のごとき色調である。CV 自体の性質として還元剤存在下では時間経過に伴い、徐々に図右にみられるような脱色傾向を示すが、鑑別性への影響はない。

極東製薬工業株式会社

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。

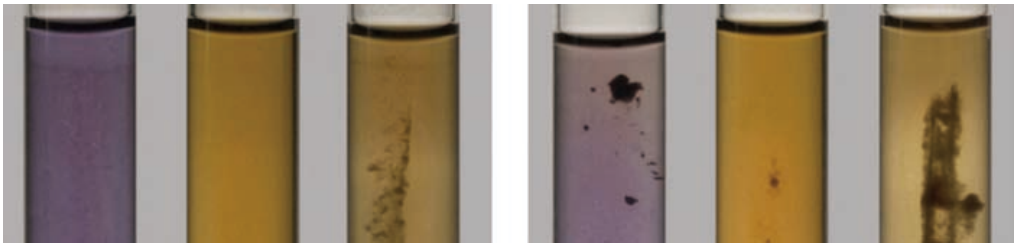
接種時の注意

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、一株毎に調製し、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、菌液を調製することなく、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。(＊;図2.)

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、あるいは当該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、ふ卵器に収納、培養を開始する。



①:菌液を pasteur pippet で接種　②:平板集落から白金耳で接種

図2

図2. 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 ともに不整発育が起こっている。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 に充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。

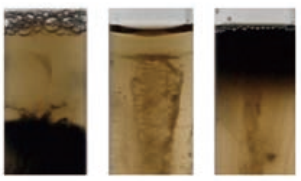
CV

Resistant/Sensitive(R/S) 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。

Bile

Resistant/Sensitive(R/S) を判定する。

CV-HK　Bile-HK



(N/P)　(N/N)　(P/N)
ES-HK(ES/H_2S)

図3. 三種の培地の所見

ES

Positive/Negative(P/N) を判定する。一般に ES 加水分解で生成する esculetin 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ため、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、酸素の浸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、上部の黒色化が見られれば ES positive とする。(図4)

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。

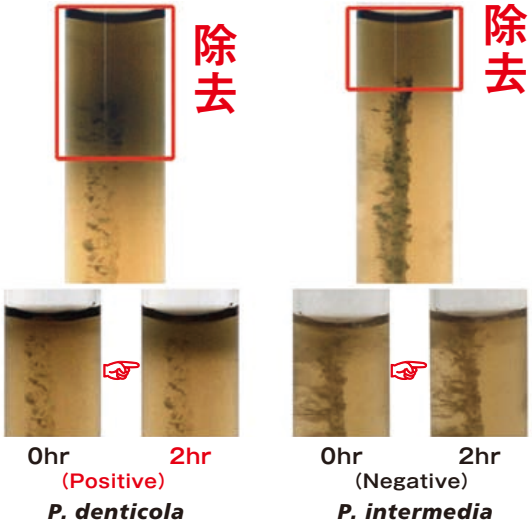


図4. ES-HK 非発育部位除去・追加培養法

H_2S

ES-HK で産生された H_2S 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 H_2S 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、H_2S 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。(図5)

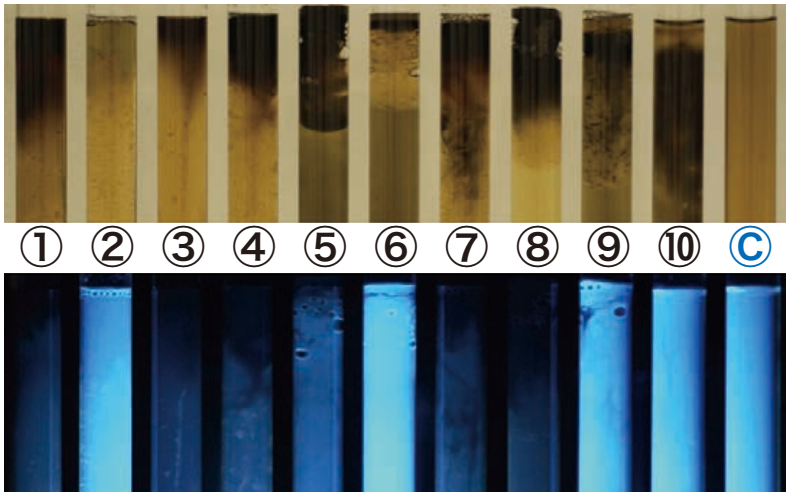


図5. ES-HK 365nm UV 照射法 (上; 通常光照明、下; 365nm UV 照射)

図5注.下記の青字で示した菌株は ES; N である。
(左から)
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 。

HK 半流動確認培地

培地の取扱い

①遮光下で保存。

②転倒・振動などにより培地内部に気泡などがある場合、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こと。

③被験菌株の接種用菌液の調製が済むまでは培地を開栓してはならない。

統一商品コード No.	製品名	包装	培地構成	貯法	有効期限	備考
551-06691-3	HK半流動確認培地	10 検体	白キャップ：ＥＳ 加 HK半流動培地 10 本 黄キャップ：Bile 加 HK半流動培地 10 本 青キャップ：CV 加 HK半流動培地　10 本	室温・遮光	３ヶ月	転倒厳禁

嫌気性菌検査用生培地

統一商品コード No.	製品名	包装	貯法	有効期限	用途
551-06600-5	バイタルメディア ブルセラ HK 寒天培地（ウサギ）	20 枚	4 ～ 8℃	４ヶ月	嫌気性菌分離用
551-06601-2		100 枚			
551-06620-3	バイタルメディア ブルセラ HK 寒天培地（RS）	20 枚		３ヶ月	
551-06621-0		100 枚			
551-06662-3	バイタルメディア PV 加ブルセラ HK 寒天培地（ウサギ）	5 枚		３ヶ月	グラム陰性嫌気性菌分離用
551-06660-9		20 枚			
551-06680-7	バイタルメディア BBE 寒天培地	20 枚		４ヶ月	*Bacteroides fragilis* group　分離用
551-06640-1	バイタルメディア PEA 加ブルセラ HK 寒天培地（ウサギ）	20 枚		４ヶ月	グラム陽性嫌気性菌分離用
551-06690-6	極東 HK 半流動生培地	50 本	遮光・室温	６ヶ月	嫌気性菌増菌用

極東製薬工業株式会社

【お問い合わせ先】
〒 103-0024　東京都中央区日本橋小舟町 7 - 8
TEL：03-5645-5664　　FAX：03-5645-5703
URL：http://www.kyokutoseiyaku.co.jp/

23.04.3000
D