

# **msViP cool** を利用した液体培養概略と実施例

## ヴィトロプランツ

2017年6月27日

2022年10月17日（改訂）

- ・ このPDFの著作権は**ヴィトロプランツ**に属しています。
- ・ 配布自由、ただし、無断改変を禁じます。

# 液体培養システム概略



袋が薄いと膨らんだり、内圧で破れるので不良

ペットボトルなど固定容器は口の細工が難しいので不良（後述）



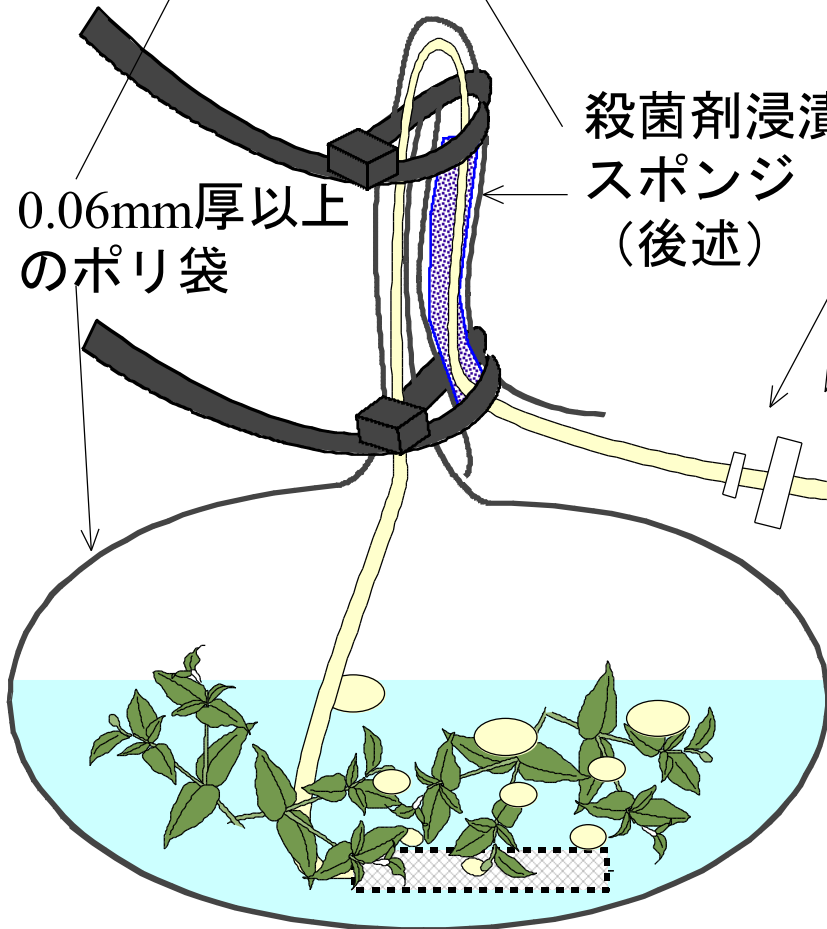
滅菌シリンジフィルタ（2重以上。後述）

殺菌剤浸漬スポンジ（後述）

0.06mm厚以上のポリ袋

経路の通気パイプに適切な布など詰め、最前段のホコリ避けフィルタとする。

エアポンプ



# 用意する物

ウイトロプランツ製品以外 (例 全て電子WEBモールなどでそろいます)

物品名  
説明

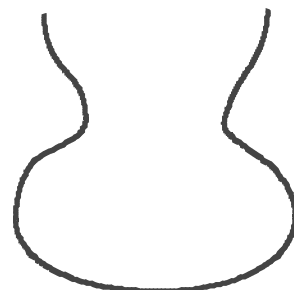
実物例写真

イラスト

## 培養装置

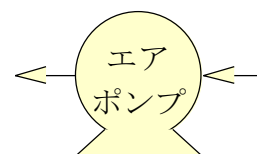
### 軟質ポリエチレン袋

0.06mm厚以上。内気圧と水圧がかかるため、0.08mm以上が望ましい。  
培養液容量の数倍容量のもの。2Lなら規格14サイズ、4Lなら20サイズ、10Lならいわゆる45L袋程度が目安。迷えば大きめ・厚めがよい。



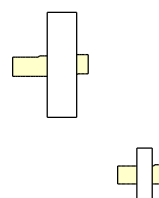
### エアポンプ

魚飼育水槽用エアポンプや汲み取りばっ気用エアポンプでよい。  
目安は吐出量1Lあたり1~2培養容器。実際の吐出容量は、下記の滅菌シリンジフィルタの大きさに調節するほうが現実的(後述)。



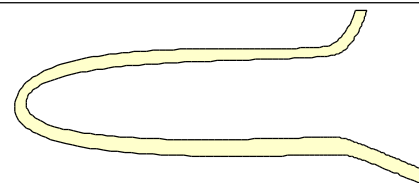
### 滅菌シリンジフィルタ

0.20、0.22 $\mu$ の**撥水性のもの**。フッ素系が望ましい。セルロース、セルロースアセテート系は微生物に破壊されるため不可。培地量数L以下なら13mm径で充分、吐出量を稼ぐときは直径を大きくする。2重以上で使用し、最外側フィルタは適宜、交換・洗浄すること(洗浄法は後述)。



### エアチューブ

魚飼育水槽用エアチューブでよい。



### ルアーフィッティング

エアチューブとシリンジフィルタの接続用(オス)。シリンジフィルタ洗浄用(メス)。必須ではないがあると便利。



イラストなし

### エアストーン

耐薬品性が要求されるため、焼結・セラミックストーンであること。煮沸消毒・洗浄可能なものが再利用しやすい(入手はやや困難)。ある程度重い方がよい。



# 用意する物

ウイトロプランツ製品以外(例 全て電子WEBモールなどでそろいます)

物品名  
説明

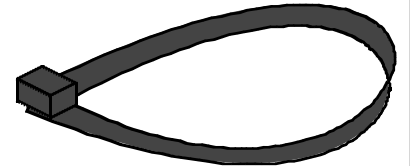
実物例写真

イラスト

## 培養装置 (続き)

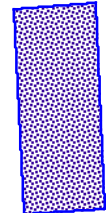
### ロックタイ

締め方の調節が必要なため、再利用可のもの。長めのほうが使いやすい。



### スポンジ

排気部の微生物ブロック用。  
耐薬品性が要求されるため、メラミン製やシリコン製がよい。ウレタン製は培養途中や滅菌時に崩壊するため不可。



## スポンジ浸漬用農薬 (イラストなし)

液体培養では通常は培地への通気が必要です。そのため容器を密封することができません。その排気開口部からの微生物侵入を防ぐために滅菌したスポンジで塞ぎます。塞いだけではスポンジで微生物が繁殖して侵入します(後述)。微生物の繁殖侵入を防ぐため、スポンジには持続性が高く殺菌スペクトラムが広く強力な薬剤を含浸します。

以下は、酸性条件で分解速度の遅い3種の薬剤(銅イオン、カスガマイシン、TPN)と、スポンジを最初に滅菌する塩素剤の組み合わせ例です。塩素は強力ですが速やかに失効し、カスガマイシンとTPN分解後も銅イオンが菌の繁殖を阻止します。

酸性銅・  
カスガマイシン剤



TPN剤



有効塩素剤



ウイトロプランツ製品付属の  
『次亜塩素酸カルシウム粒』

# 用意する物

## 培養容器内容物

物品名

説明

イラスト

### ヴィトロプランツ製品以外

#### 液体培地

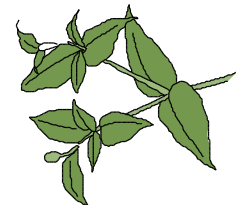
水道水程度以上の清浄な原水で作成。未滅菌。pH・成分など調整



#### 植える植物（無菌）

容器内無菌植物が望ましい。

初代の場合は別途滅菌



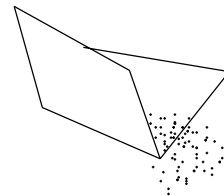
#### 水

水道水程度以上の清浄な水。培地とは別途。農業用水などは不可

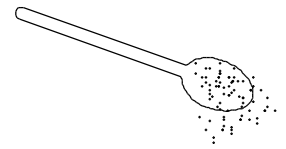
### ヴィトロプランツ製品

**msViP cool** (もしくはeViP培地coolシリーズ)  
**siViP**シリーズ

**msViP cool**

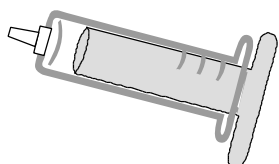


**siViP G**

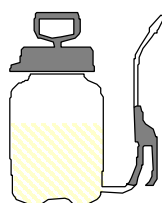


### 適宜必要に応じて

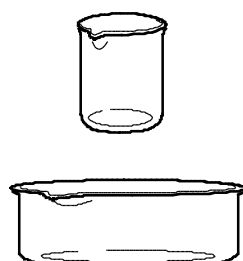
シリンジ



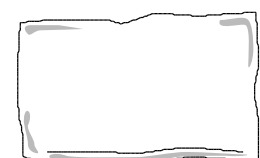
噴霧器



調整用容器



アルミ蒸着  
シート



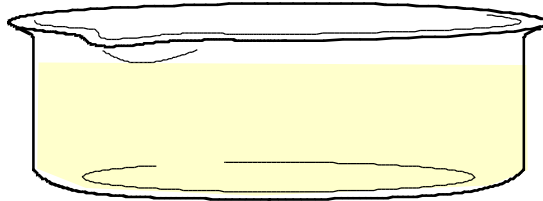
# 準備

準備のできた物は順次、直射日光の当たらないところに保持。  
ハウス内などでは使うまでアルミ蒸着シートなどを掛けておく。

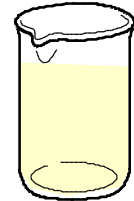
- I 水道水1Lあたり次亜塩素酸カルシウム粒10粒（秤量する場合は0.7g）を溶解して塩素液を作成し、一部を噴霧器に（I-①）、一部を2つの容器に入れる（I-②、I-③）。



I-①



I-② (数リットル)



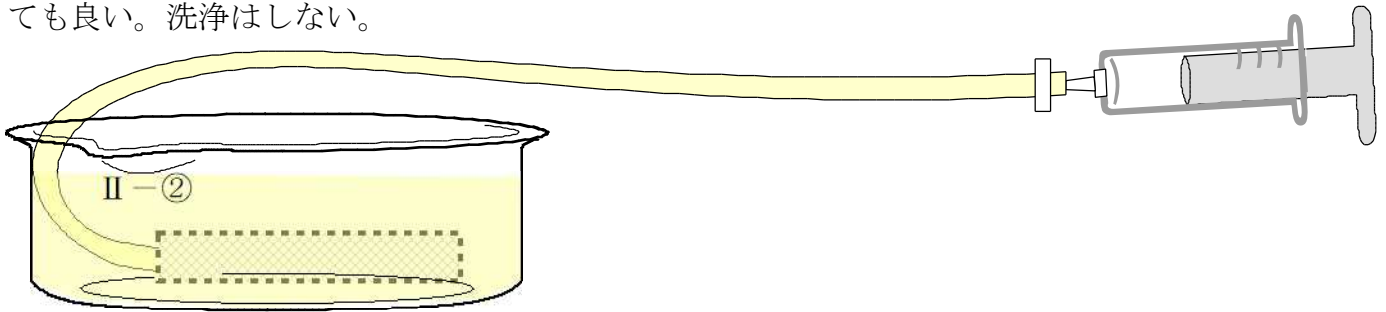
I-③

エアストーンとエアチューブとシリンジフィルタ×1を組み立てる。（培養液量の1/100以上量）

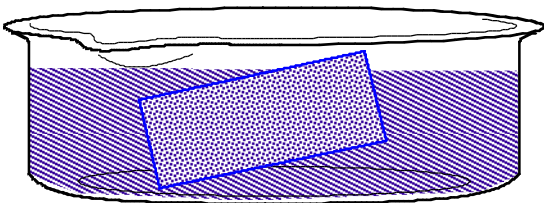
この時、I-②の液に浸漬してから組み立てる。



組み立て後、シリンジ等で引いて、エアチューブおよびフィルタのストーン側内部までI-②の液を入れ、フィルタ内部まで滅菌する。時間は一瞬でよいが、使用するまで置いておいても良い。洗浄はしない。

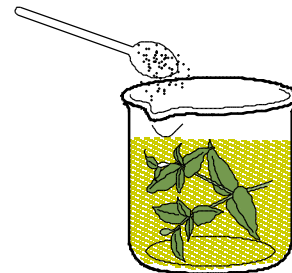


- II 水道水に銅剤・TPN剤の散布指示濃度（大抵の場合は0.5~2g/L）、次亜塩素酸カルシウム粒 5~20粒/Lを溶解し、スポンジを浸漬。

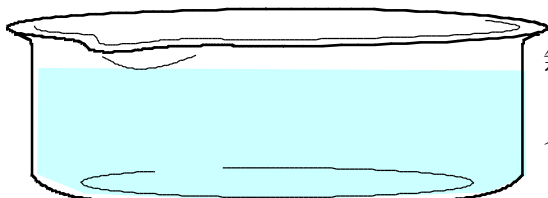


- III 水道水100mLあたり **siViP G** 0.5~2g溶解し、植物を浸漬。

**siViP G**



- IV 水道水で必要量の培養液を作成。



無機塩+砂糖+ホルモン程度のシンプルな物を御使用下さい。

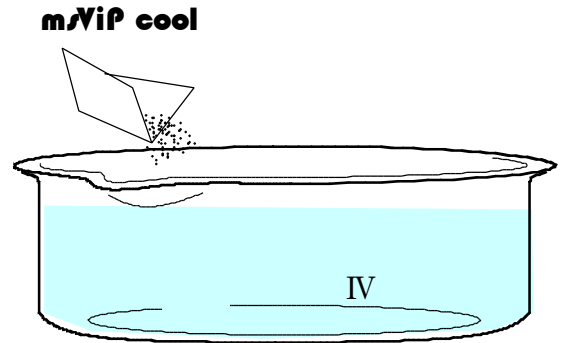
アミノ酸やビタミン類の添加は充分テストしておりません。

イーストエキスやココナッツウォーター等は使用しないで下さい。

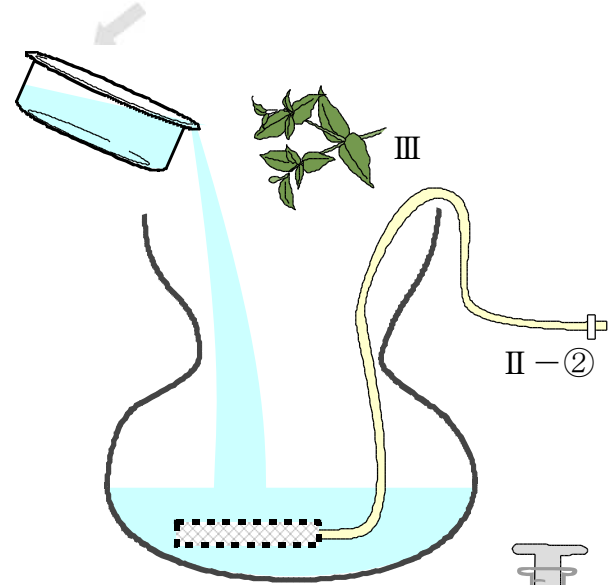
# 液体培養操作

IVの培養液 1 Lあたり

0.5gのmsViP coolを投入してよく攪拌する



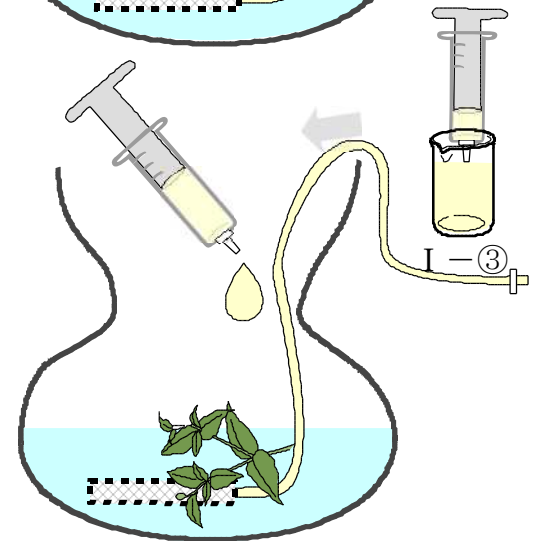
ポリエチレン袋に、上記の培養液、IIIの植物、I-②で滅菌したエアストーン・エアチューブ・シリンジフィルタのセットを入れる。



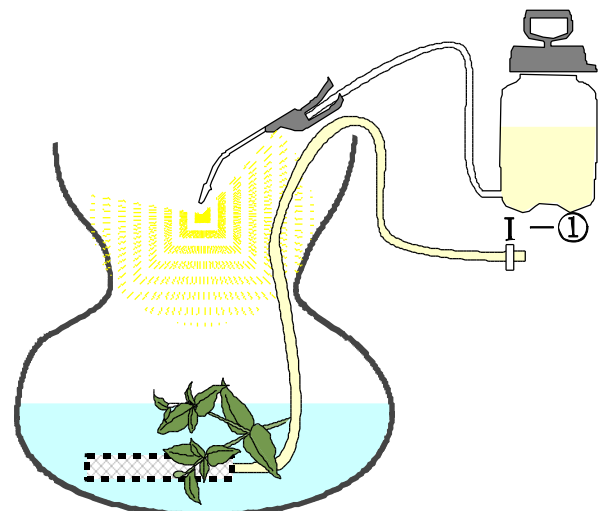
Iの液を培養液1Lあたり10mL入れる。

I液の有効塩素濃度は500mg/L。ストーンやチューブに随伴する液および後述の噴霧液があるため、培地の有効塩素濃度は5mg/Lよりやや上になる。

最終的な培地中塩素濃度は5~10mg/Lの間にする。5mg/L以下では滅菌できず、10mg/L以上では害が大きい。

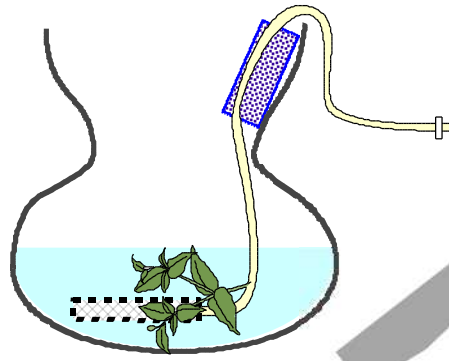


Iの塩素液をポリエチレン袋内面全体に噴霧する。



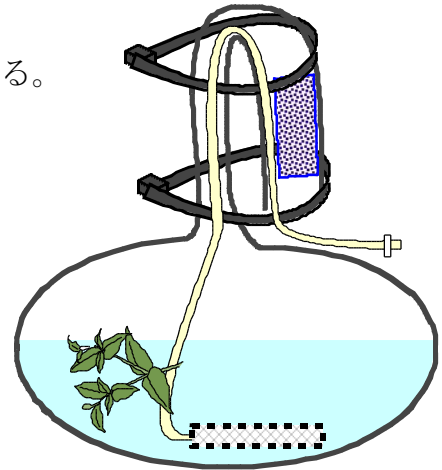
# 液体培養操作(続き)

固く絞った、IIのスポンジを袋上部に入れ、



スポンジより下の部分で折り曲げる。

その後、スポンジの上下をポリエチレン袋の上から結束タイで絞める。



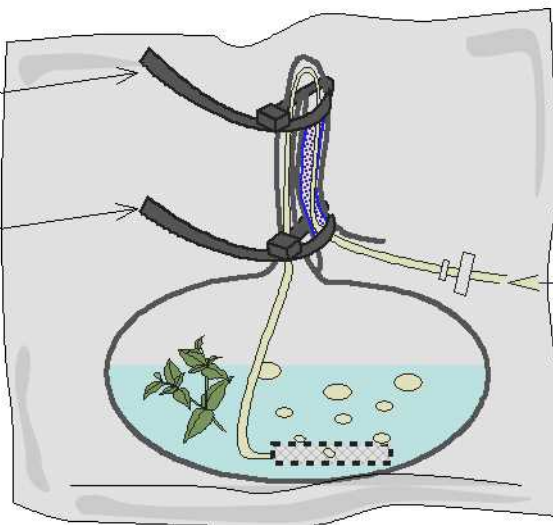
シリンジフィルタを最低2重にし、通気開始。

この時、袋内に通気されることを確かめる。

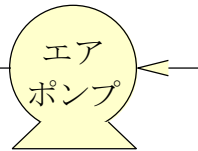
通気しない場合は大抵は結束タイの絞めすぎなのでゆるめる。

弱めに締める

強めに締める



経路の通気パイプに適当な布など詰め、最前段のホコリ避けフィルタとする。



1日以上遮光(できれば暗黒)にし、その後、光を当てて培養する。

暗黒で培養する場合も、1日程度は光に当てること(殺菌終了後に有効塩素の分解を促す)

内側(培養液側)フィルタが詰まった場合は、Iの塩素液で、エアチューブ口付近内側および新規シリンジフィルタを濡らしてからはめ込めば交換できる。

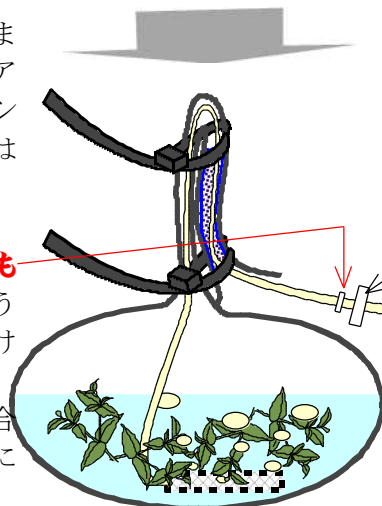
が、**培養終了まで**できるだけ**最も内側のフィルタは交換しない**ように外側フィルタを多めにもうける。

湿度が高いところで培養する場合は外側を2段(合計3段)以上にするのが無難。

外側フィルタは適宜交換・洗浄。

内側(培養液側)フィルタを詰まらせないようにする。

詰まるようであればフィルタ段数を増やす

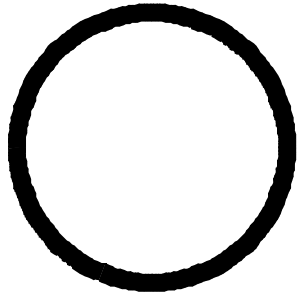


ホコリ避けフィルタ



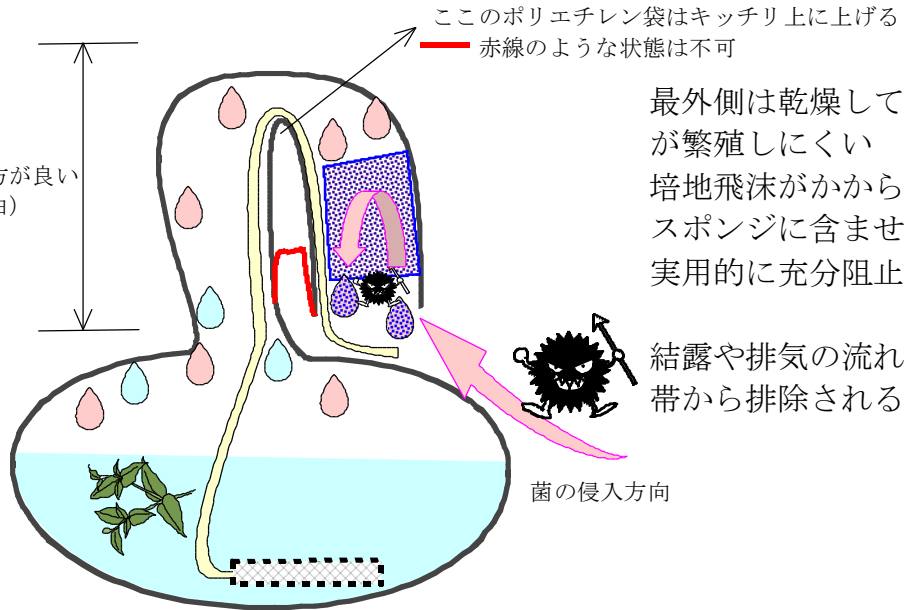
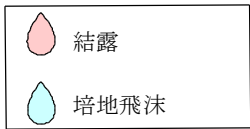


# 排気部分構造説明



U字部分の高さは高い方が良い  
(袋は大きめが良い理由)

培地飛沫や結露はその  
まま培地へ戻る



最外側は乾燥しているので菌  
が繁殖しにくい  
培地飛沫がかかれば、  
スポンジに含ませた殺菌剤で  
実用的に充分阻止できる。

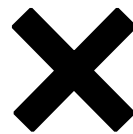
結露や排気の流れと共に阻止  
帯から排除される

菌の侵入方向

4月末～6月半ばに掛けてパッド&ファンでハウス内での実験結果：  
(汚染容器数/全容器数) = 0/24

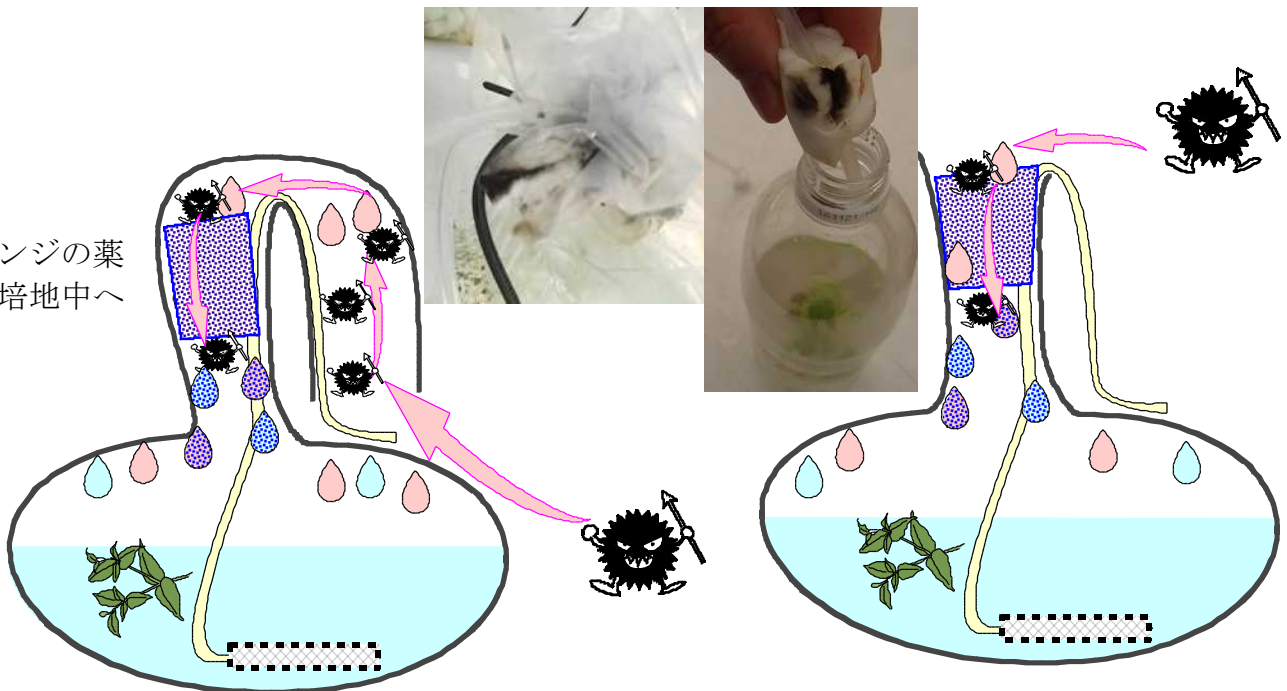


増殖した菌は阻止帯のスポンジに培地飛沫が触れ  
て富栄養化していることもあり、スポンジ中  
で、薬剤に打ち勝って繁殖・通り抜けて侵入。



最外側が乾燥していても、飛沫がスポンジ  
にかかれば、やはり菌は繁殖。  
(同じ容器、同じ栓でも固形培地や無通気では汚  
染しないことを確認済)

スポンジの薬  
剤も培地中へ  
入る

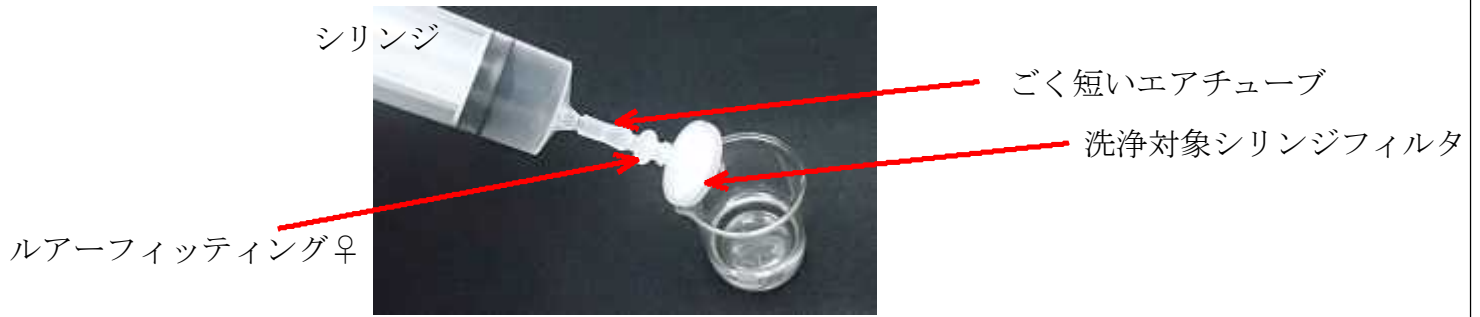


4月末～6月末に掛けてパッド&ファンでハウス内での実験結果：

(汚染容器数/全容器数) = 12/12、

(汚染容器数/全容器数) = 23/23

# シリンジフィルタの洗浄



ゴミやペーパーロック（結露水で詰まる）したら逆方向から有機溶媒で洗浄。100%のエタノール、メタノール、アセトンなど。

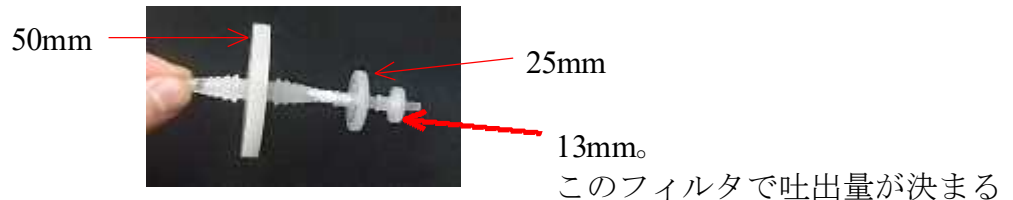
- ・ハウジングやメンブレン素材を犯さない、水と混じる溶媒を使用する。
- ・再使用は中のメンブレンが乾いてから。上記で速いのはアセトン。素材を犯しにくいのはエタノール。
- ・洗浄したシリンジフィルタは最も内側（培地側）に使用してはいけない。外側フィルタに使用。（保証外の逆流をさせているため細かい傷ができている可能性がある）

## ポンプへの繋ぎ方

単純にタコ足やムカデ足で繋ぐとエアの出方にむらができる。

全ての空気出口に、培養容器がなくともシリンジフィルタをつけましょう。フィルタが大きな抵抗になり、通路の抵抗が誤差範囲になるため吐出量が安定します。

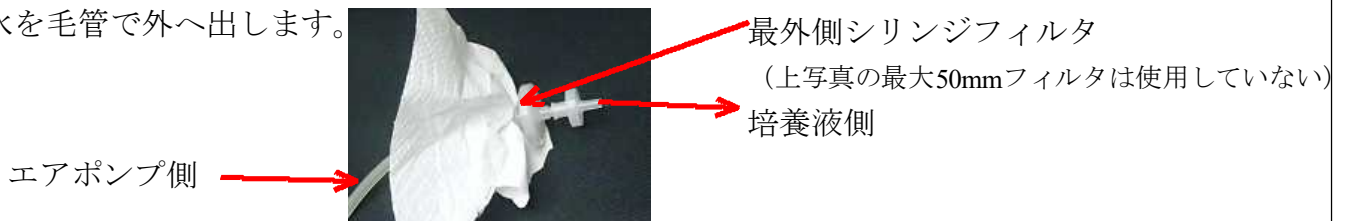
また、シリンジフィルタの抵抗により容器への吐出量が決まりますので、小さな容器には、13mm径、次は25mm径、最大の容器は50mm径などとしていくと、ポンプ出力を変えずに制御できます。吐出量は繋いだ最小径のフィルタで事実上決まります。



また、最外側のフィルタは詰まりやすい＝通過抵抗の変動が激しいですので、内側（培養液側）のフィルタより大きい物を使用すると吐出量が安定します。



湿度が高いなど、結露ペーパーロックが頻発すると思われるときは最外側フィルタの外側フィルタのハウジング内に差し込む形で布を装着するある程度防げます。エアチューブやシリンジフィルタ内に生じた水を毛管で外へ出します。



## **ウイトロプランツ**

住所：〒558-0032 大阪府大阪市住吉区遠里小野6丁目3-8

電話：06-6606-8099

FAX：06-6606-8098

E-mail: [inquiry@vitroplantslab.com](mailto:inquiry@vitroplantslab.com)

<http://www.vitroplantslab.com/>