硝酸塩還元試験

【試薬】

1. 硝酸塩培地（2 ～ 8 ℃保存）
   - Bact ペプトン　20g
   - 硝酸カリウム　2g　⇒ 100mL 作製して分注。
   - 純水　1,000ml

   小試験管に 2 ～ 4mL 分注して 121 ℃、15min.滅菌。
2. 試薬 A（スルファニル酸）
   - スルファニル酸0.8g
   - 純水　70mL
   - 氷酢酸　30mL

   ⇒スルファニル酸に水 70mL を加えて加温溶解。冷却後、酢酸を加える。

   ⇒ 2 ～ 8 ℃保存、有効期限　約 3 ヶ月
3. 試薬 B（アルファ・ナフチルアミン）
   - 氷酢酸　30mL
   - 純水　70mL
   - NN ジメチル-α-ナフチルアミン　0.5g

   ⇒水に酢酸を加え、次いでαナフチルアミンを加える。

   ⇒ 2 ～ 8 ℃保存、有効期限　約 3 ヶ月

   （注）NN ジメチル-α-ナフチルアミンは発がん物質
4. 亜鉛末

【方法】

1. 硝酸塩培地に 1 コロニー程度を加えよく混和する。
2. 37 ℃、2 時間反応。
3. 0.5mL 程度を小試験管に移す。
4. 試薬 A を 2 ～ 3 滴加えて混和。
5. 試薬 B を 2 ～ 3 滴加えて混和。
6. 1 ～ 2 分以内に赤変

   ⇒硝酸塩還元能陽性、亜硝酸塩還元能陰性
7. 色調無変化無しの場合は亜鉛末をほんの少し（爪楊枝の先ほど）加える。

   赤変　⇒　硝酸塩還元能陰性

   無変化（約 10 分間色調を観察）　⇒硝酸塩還元能陽性、亜硝酸塩還元能陽性。

【注意点】

1. 発色後は退色しやすいので手早く判定すること。

Nitrate reduction test

a. Reagents

（1） Nitrate substrate broth： store at 2 to 8 ℃.

peptone	20 g
（or heart infusion broth for fastidious organisms	25 g）
potassium nitrate	2 g
distilled water	1,000 ml

Dispense 2 ml in 13 by 100 mm screw-cap tubes.

Autoclave at 121 ℃ for 15 min.

（2） 0.8% sulfanilic acid（reagent A）

sulfanilic acid	0.8 g
distilled water	70 ml
glacial acetic acid	30 ml

Mix sulfanilic acid with water ; heat to dissolve.

Cool, and then add acetic acid.

Store at 2 to 8 ℃.

Shelf life is 3 months, approximately.

（3） 0.5% N,N-dimethyl-cr-naphthyl-amine（reagent B）

glacial acetic acid	30 ml
distilled watgr	70 ml
MN-dimethyl- α -naphthylamine	0.5 g

Combine acetic acid and water then add α -naphthylamine.

Store at 2 to 8 ℃.

Shelf life is 3 months approximately.

（4） Zinc metal dust

b. Procedure

（1） Inoculate the tube of nitrate broth from an isolated colony, a pure subculture, or 1 or 2 drops of an overnight broth culture of the organism.

（2） Incubation

a. Nonfermenting Gram-negative rods, 25 to 30 ℃.

b. Other organisms, 35 ℃

c. Two to five days of incubation.

d. Incubate Campylobacter at 35"C in a microaerobic atmosphere for 72h.

（3） Remove approximately 0.5 ml of broth into a nonsterile 13- by 100-mm tube.

（4） Add 2 or 3 drops of reagent A. Mix well by tapping or shaking tube.

（5） Then, add 2 or 3 drops of reagent B. Mix again.

（6）Look for a red color within 1 to 2 min.

（7）If no red color is observed, add a small amount of zinc dust to the nitrate tube.

（8） Examine for red color within l0 min.

c. Results

Positive results ;

Red color after the addition of reagents: nitrate reduction positive, nitrite reduction negative.

No red color after the addition of reagents plus no red color after the addition of zinc to nitrate broth: nitrate reduction positive, nitrite reduc-tion positive

Negative results ;

In nitrate broth no color development after adding reagents and red color development after adding zinc（zinc catalyzns the change from nitrate to nifite）: nitrate reduction negative

d. Limitation

Interpretation of color reactions should be made immediately, as color reactions with a positive test may fade rapidly.

（Reference）

CMPH 4th edi. 2016. ASM