

RIMD 性状検査法 2022/12/23 版
Biochemical Procedures for the Identification of Bacteria

目次

カタラーゼ試験

Catalase test

硝酸塩還元試験

Nitrate Reduction Test

大阪大学微生物病研究所附属感染症国際研究センター病原微生物資源室

Pathogenic Microbes Repository Unit, PMRU

Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University

カタラーゼ試験

【試薬】

3% 過酸化水素水
⇒遮光、冷蔵保存。

【消耗品】

清浄なスライドグラス
つまようじ、プラスチック製ニードル、プラスチック製ループ

【方法】

- 1) 寒天平板に発育した新鮮なコロニーを用いる。
⇒ 嫌気性菌は試験前に 30 分ほど大気暴露すること。
- 2) 独立コロニーの中央部を採取してスライドグラスに塗りつける。
⇒ 塗抹部分が明瞭に見えるように塗抹すること。
⇒ 血液寒天培地から採取する場合は血液の混入を避けること。
- 3) 3% 過酸化水素水 1 滴を塗抹部分に滴下して直ちに発泡を確認する。
⇒ 背景を暗くして観察すること。
- 4) 観察後のスライドグラスはメスキュード缶などに入れて滅菌廃棄する。

【判定】

陽性：速やかに強い発泡、あるいは 1 ～ 2 個の発泡が見られる。
陰性：20 秒経過後に発泡無し、あるいは弱い発泡が見られる。

【精度管理】

陽性対照：*Bacillus* spp. are catalase positive.
陰性対照：*Clostridium* spp.

【注意点】

- ・赤血球はカタラーゼ活性を有する。コロニー採取時に血液寒天培地の混入を避けること。
- ・複数コロニーを掻き取って試験してはならない（偽陽性になることがある）。
- ・古い培養コロニーを用いてはならない（偽陰性になることがある）
- ・コロニーと試薬を混ぜることはしない（スライドグラス上で反応を観察すること）。

硝酸塩還元試験

【試薬】

1. 硝酸塩培地 (2 ~ 8 °C 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 °C、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 °C 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-1-ナフチルアミン 0.5g
- ⇒ 水に酢酸を加え、次いで 1-ナフチルアミンを加える。
⇒ 2 ~ 8 °C 保存、有効期限 約 3 ヶ月

4. 亜鉛末

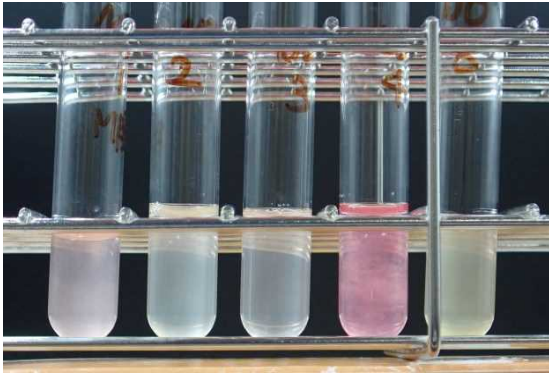
【方法】

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 °C、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。

【参考図】



+ - - + -

Catalase test

【 Reagents 】

Hydrogen peroxide reagent 3%.

Dilute 30% 1:10 in deionized water prior to use.

⇒ 30% reagent is hazardous.

Store at 2 to 8 °C with light shielding.

【 Supplies 】

Glass slide.

Sterile wooden sticks or plastic or platinum loops or wires.

【 Procedure 】

1) Fresh colonies of bacteria growing on agar media, preferably blood agar or Chocolate agar.

For anaerobes, expose colonies to air for 30 min prior to testing.

2) Touch the center of a well isolated colony to a clean glass slide.

⇒ Be sure colony is visible to the naked eye on slide.

⇒ If colony is from blood agar plate, use care not to pick up blood.

3) Place 1 drop of peroxide reagent on slide and observe immediately for effervescence.

⇒ Hold over dark background to well observed bubbles.

4) Discard slide into sharps container.

【 Results 】

Positive results ;

Shows immediate appearance of bubbles or weak reaction has one or two bubbles.

Negative test ;

Shows no bubbles or a few bubbles after 20 sec.

【 Quality control 】

Positive control ;

Bacillus spp. are catalase positive.

Negative control ;

Clostridium spp. are catalase negative.

【 Limitation 】

RBCs contain catalase, do not pick up blood agar with colony.

Selecting colonies with loop will yield false-positive results.

Older cultures may give false-negative results.

Do not mix the reagent and the colony.

Nitrate reduction test

【 Reagents 】

1. Nitrate substrate broth : store at 2 to 8 °C.

[Bacto peptone	20 g
	potassium nitrate	2 g
	distilled water	1,000 ml

Dispense 2 to 4 ml in 13 by 100 mm screw-cap tubes.

Autoclave at 121 °C 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 °C.

Shelf life is 3 months, approximately.

3. 0.5% N,N-dimethyl- α -naphthyl-amine (Reagent B)

[glacial acetic acid	30 ml
	distilled water	70 ml
	MN-dimethyl-1-naphthylamine	0.5 g

Combine acetic acid and water then add α -naphthylamine.

Store at 2 to 8 °C.

Shelf life is 3 months approximately.

4. Zinc metal dust

【 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) Incubate for 2 hours to 5 days.

Nonfermenting Gram-negative rods incubate at 25 to 30 °C.

Other organisms at 35 to 37 °C.

Incubate *Campylobacter* at 35°C in a microaerobic atmosphere for 3 days.

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 10 min.

【 Results 】

Positive results ;

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

No red color after the addition of reagents and no red color after the addition of zinc to nitrate broth: nitrate reduction positive, nitrite reduction positive

Negative results ;

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

【 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

【 Figure 】

