

RIMD 性状検査法 2024/12/13 版

Biochemical Procedures for the Identification of Pathogenic Bacteria

目次

- | | |
|---------------------|--|
| 1. カタラーゼ試験 | Catalase Test |
| 2. 耐熱性（68°C）カタラーゼ試験 | Heat-stable（68°C）Catalase Test <i>NEW</i> |
| 3. 硝酸塩還元試験 | Nitrate Reduction Test |
| 4. 運動性試験 | Motility 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

1. カタラーゼ試験

【原理】

糖の好氣的分解過程の最終産物として過酸化水素を形成する。過酸化水素が蓄積すると菌に有害である。カタラーゼは過酸化水素を分解して酸素ガスを産生する。カタラーゼ試験は発生するガスを肉眼で判定する。好気性菌の多くはカタラーゼ陽性であるが、カタラーゼ陰性の菌種もあることから鑑別性状として利用される。

【試薬】

3% 過酸化水素水（30%過酸化水素水を精製水で 10 倍希釈）

⇒遮光、密栓して冷蔵保存。

【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やプラスチック製ループも使用可能）

【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釣菌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。
⇒ 血液寒天培地から釣菌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。
⇒ あらかじめ過酸化水素水をスライドグラスに滴下し、菌を接種しても良い（動画）。
⇒ 黒色背景で観察すると判定しやすい。
- 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。

参考動画 https://www.biken.osaka-u.ac.jp/pmru/pdf_data/catalase3.mp4

【精度管理】

陽性対照：*Staphylococcus* spp.

陰性対照：*Clostridium* spp.

【注意点】

- ・赤血球はカタラーゼ活性を有する。コロニー釣菌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ない（静かに見守ること）。

2. 耐熱性（68℃）カタラーゼ試験 **NEW**

【原理】

新鮮菌液を 68℃ に加温した後にカタラーゼ活性の有無を調べる。主に抗酸菌の鑑別性状として用いられる。結核菌群と非結核性抗酸菌群の簡易鑑別法のひとつ。

【試薬】

30% 過酸化水素水 + 10% Tween 80 等量混合液
1/15M リン酸緩衝液

【消耗品】

スクリーキャップ試験管（非滅菌、密栓できる試験管）
恒温槽（68℃、温浴あるいはアルミブロック）
ピペット（約 0.5mL 計量）

【方法】

- 1) 平板培地（小川培地、7H11 培地など）に発育した新鮮コロニーを用いる。
- 2) スクリュー試験管に 1/15M リン酸緩衝液 0.5mL を分注する。
- 3) コロニーを掻き取って濃厚菌液を作成する。
- 4) 68℃、20 分加温する。
- 5) 室温に戻す。
- 6) 30% 過酸化水素水 + 10% Tween 80 等量混合液を約 0.5mL 加える。
- 7) 発泡の有無を観察。
- 8) 観察後の試験管等は滅菌廃棄する。

【判定】

陽性：5 分以内に明瞭な発泡あるいは液面上の小さな発泡が観られる。

陰性：20 分経過後に発泡無し。

参考動画：https://www.biken.osaka-u.ac.jp/pmr/pdf_data/catalase2.mp4

【精度管理】

陽性対照：*Mycobacterium gordonae*

陰性対照：*Mycobacterium tuberculosis*

【注意点】

- ・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）。
- ・スクリー試験管を攪拌しない（偽陽性になることがある）。

3. 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
- ・ 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-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 ℃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 ℃、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。

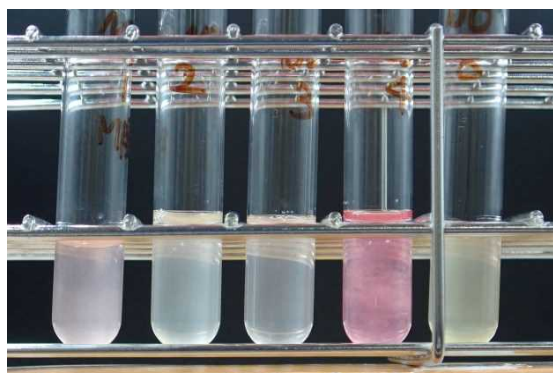
赤変 ⇒ 硝酸塩還元能陰性

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】



⇒ 試薬添加後約 10 分

+ - - + -



⇒ 亜鉛末添加後

4. 運動性試験（直接法）

【原理】

細菌の運動性を培地あるいは生食中の固有運動を顕微鏡を用いて直接観察する。本法によって運動性を認めた場合は運動性陽性と決定できる。

【試薬】

滅菌生食あるいは糖を含まない液体培地。

例）ハートインフュージョンブイオン、ニュートリエントブイオン、ペプトン水

【消耗品】

清浄なスライドグラス、カバーグラス

つまようじ（プラスチック製ニードルやプラスチック製ループも使用可能）

【方法】

- 1) スライドグラスに発育ブイオンを 1 滴落とす。
- 2) あるいは滅菌ブイオンを 1 滴落として、爪楊枝でコロニーを懸濁する。
- 3) カバーグラスをかけて 400 倍の乾燥系レンズで検鏡する。
⇒ 通常の光学顕微鏡では絞りを絞ってコントラストを高めて観察する。
⇒ 可能であれば位相差装置の利用が望ましい。
- 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：運動性がある場合は菌相互の相対位置が刻々と変わる。

陰性：ブラウン運動が観察される。菌相互の相対位置は変わらない。

運動性の動画：https://www.biken.osaka-u.ac.jp/pmru/pdf_data/motility2.mp4

【補足】

- ・ *Bacillus* 属および *Klebsiella* 属は本法で判定する（半流動培地法は誤判定になりやすい）。
- ・ *Listeria* 属と *Yersinia* 属は室温（25℃）で判定（多くの場合 37℃ 程度に加温した方が良い）。
- ・ 腸内細菌目細菌などグラム陰性桿菌はブイオンの代わりに生食で判定できる。
- ・ *Enterococcus casseliflavus* と *Enterococcus gallinarum* の運動性は本法で判定。

1. Catalase test

【 Reagents 】

3% Hydrogen peroxide reagent

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.

Refer to attached video ⇒ https://www.biken.osaka-u.ac.jp/pmru/pdf_data/catalase3.mp4

【 Quality control 】

Bacillus spp. are catalase positive.

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.

2. Heat-stable (68°C) catalase test NEW

Most strains of *Mycobacterium tuberculosis* and other members of the MTBC do not produce heat-stable catalase except for certain INH-resistant strain.

【 Reagents 】

30% Hydrogen peroxide

10% Tween 80

0.067 M phosphate buffer (pH 7)

【 Supplies 】

Disposable pipette, Screw-cap tube, Water bath or Aluminum block bath

【 Procedure 】

- 1) Prepare the fresh colonies of bacteria growing on 7H11 agar or Ogawa medium.
- 2) Make a heavy suspension of the organism in 0.5 ml of 0.067 M phosphate buffer in a screw-cap tube.
- 3) Incubate in a 68°C water bath or heating block for 20 minutes.
- 4) Cool to room temperature
- 5) Add 0.5 ml of 50-50 solution of 10% Tween 80 and 30% H₂O₂ and recap tubes loosely.
- 6) Read to well observed bubbles.

【 Results 】

- 1) Positive : formation of bubbles. Small quantity bubbles may be seen, as a positive reaction.
- 2) Negative : no bubbles within 20 minutes.

Refer to attached video ⇒ https://www.biken.osaka-u.ac.jp/pmru/pdf_data/catalase2.mp4

【 Quality control 】

Positive control : *Mycobacterium gordonae*

Negative control : *Mycobacterium tuberculosis*

【 Note 】

Do not shake tubes for the reason that they may read as false positive.

Older cultures may give false-negative results.

3. 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-1-naphthyl-amine (Reagent B)

glacial acetic acid	30 ml
distilled water	70 ml
NN-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 】



+ - - + -

⇒ Reagent addition (after 10 min.).



⇒ After zync powder addition.

4. Motility Test (Microscopic observation method)

Bacterial motility can be observed directly by placing a drop of culture broth medium on a microscope slide, adding a coverslip and viewing it under a microscope. This test is used primarily for detecting the motility of bacteria species.

【 Reagents 】

Saline or any broth can be use which does not contain carbohydrate.

e.g. Heart infusion broth, neutrient broth and peptone water.

【 Supplies 】

Microscope slide and coverslip

Sterile wooden toothpicks or plastic sticks or loops

Microscope

【 Procedure 】

1. Place a small drop of culture broth on the center of a microscope slide and adding a coverslip.
2. Or, place a drop of broth on the center of a microscope slide and suspend isolated fresh growth colony.
3. Observe under high-dry objective (40x).
For a light microscope, decrease the light by closing the diaphragm.
If possible, use a phase-contrast microscope.

【 Results 】

Positive results ; Motile organisms change each other position.

Brownian movement where the organisms remain in the same relative position, should not be mistaken for true motility.

Refer to attached video : https://www.biken.osaka-u.ac.jp/pmr/pmr_data/motility2.mp4

【 Limitation 】

- 1) Microscopic observation method is best method for *Bacillus* spp..
- 2) *Listeria* spp. and *Yersinia enterocolitica* are motile at 25°C but not at 35°C.
- 3) Saline can be used for Gram-negative rods.
- 4) *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus gallinarum* are motile using by this method.

【 Reference 】

- CMPH 4th edi. 2016. ASM
- Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 7 th edi. 2017