

RIMD 性状検査法 2026/5/21 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**
3. 硝酸塩還元試験 **Nitrate Reduction Test**
4. 運動性試験 **Motility Test**
5. オキシダーゼ試験 **Oxiidase Test *NEW***

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

【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/pmru/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 °C 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 °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。

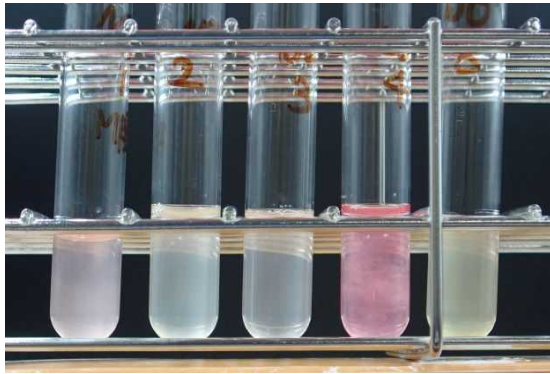
赤変 ⇒ 硝酸塩還元能陰性

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。

【图 1 硝酸盐還元試験反応】



⇒ 試薬添加後約 10 分
($\text{NO}_3 \Rightarrow \text{NO}_2$)

+ - - + -



⇒ 亜鉛未添加後

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られ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。

5. オキシダーゼ試験

NEW

【原理】

オキシダーゼ試験はチトクローム C オキシダーゼ活性を検出する。本酵素は電子伝達系構成酵素の最後に位置して電子と水素イオンを酸素に結合して水を生成する。電子伝達系は細菌細胞膜に存在するが酸素を利用しない嫌気性菌はオキシダーゼ陰性である。

試験原理はチトクローム基質の代わりに TMPD (Tetra-methyl-p-phenylenediamine : Kovacs 法) を用い、TMPD がチトクローム C オキシダーゼによって酸化 (脱水素) されて紫色になるのを判定する。

【試薬および器材】

- ・テトラメチル-パラ-フェニレンジアミン 2 塩酸塩 (TMPD)
- ・滅菌精製水
- ・濾紙あるいは濾紙ディスク、滅菌シャーレ、つまようじあるいはプラスチックニードル、マイクロチューブ

【試薬作製法】

- 1) TMPD 0.1 g を 10 mL の滅菌精製水に溶解後、約 15 分静置する。
- 2) マイクロチューブに適量 (約 200 μ l) 分注して密栓、凍結保存する。

【試験方法】

- 1) 滅菌シャーレに濾紙片を置き室温に戻したオキシダーゼ試薬を滴下して湿らせる。
- 2) つまようじ等でコロニーを採取してオキシダーゼ濾紙に塗りつける。
⇒オキシダーゼペーパーを小さくちぎって (金属挟みで切ってはならない) コロニーにかぶせても良い。
⇒綿棒にコロニーを付着させ、その綿棒にオキシダーゼ試薬を染みこませても良い。
- 3) 30 秒以内に発色を観察する。

【判定】 図 2 参照

陽性：深い青紫色に発色

陰性：発色無し

【精度管理】

陽性対照：*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

陰性対照：*Escherichia coli* ATCC 25922

反応が安定な陽性菌株と陰性菌株であれば上記菌株にこだわる必要は無い。

【注意点】

- ・オキシダーゼ試験は好気性または通性嫌気性グラム陰性菌に適用する。
- ・判定時間を厳守。反応後 30 秒を経過すると陰性菌も徐々に青紫色に変わる。
- ・ニクロム線など金属製器具でコロニーを採取してはならない。
- ・糖や色素を含む培地 (マッコンキー寒天培地など) の発育コロニーを試験に用いてはならない。
- ・調製試薬は酸化しやすいので、紫色に変色したら作り直すこと。

【図2 オキシダーゼ試験】



右 *Vibrio parahaemolyticus* RIMD 2211093 (陽性)
左 *Escherichia coli* ATCC 25922 (陰性)

【参考】

本テストは市販のオキシダーゼテストペーパーが利用できる。

・市販商品例 「チトクローム・オキシダーゼ試験用ろ紙」 島津ダイアグノスティクス株式会社

参考文献

- 1) 坂崎利一ら：新 細菌培地学講座<第二版>-下- 近代出版 東京 1988
- 2) Leber.AL. et. al. 2023 Clinical Microbiology Procedures Handbook. Fifth rdition. ASM Press

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

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

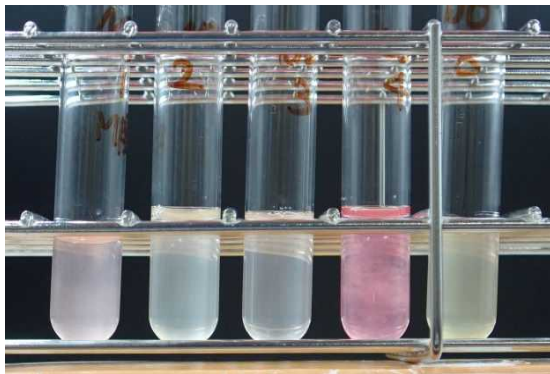
【 Limitation 】

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/pmru/pdf_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. 2017Y

5. Oxidase Test *NEW*

The oxidase test detects cytochrome C oxidase enzyme activity. This enzyme is the final position in electron transport system and its role is to catalyze electron and hydrogen ion combine with oxygen to produce water. The electron transport system is located in the bacterial cell membrane, but anaerobic bacteria that do not utilize oxygen are oxidase negative.

The reaction principle uses TMPD (Tetra-methyl-p-phenylenediamine: Kovacs method) instead of a cytochrome substrate. When TMPD is oxidized (dehydrogenated) by cytochrome C oxidase then forms a deep purple compound.

【 Reagents and Supplies 】

Kovacs reagent ;

- 0.1g N,N,N,N-tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride (TMPD) / 10 mL Sterile purified water.
- After dissolving in sterile purified water, let it stand for about 15 minutes.
- Dispense an approximately 200 μl into a microcentrifuge tube, seal tightly and store frozen.

Supplies ;

- Microtubes, Dried filter paper disk or strip, Toothpick or plastic wire and petri dish.

【 Procedure 】

- 1) Place a piece of filter paper in a sterile petri dish and moisten with Kovacs oxidase reagent that has been returned to room temperature.
- 2) Pick an isolated colony using a toothpick or similar tool and smear them put onto oxidase filter paper.
 - You can also tear the oxidase paper into small pieces (do not cut it with metal tongs) and place them over the colony.
 - Alternatively, you can attach the colonies to a cotton swab and then soak the swab in the oxidase reagent.
- 3) Observe the color change within 30 seconds.

【 Results 】 See Figure 2.

- Positive : Develops a deep blue to purple color.
- Negative : No color change.

【 Quality control 】

- Positive control : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
 - Negative control : *Escherichia coli* ATCC 25922
- ⇒ If stable positive and negative bacterial strains are available, other reference strains may be used.

【 Limitation 】

- The oxidase test is applicable to aerobic or facultative anaerobic Gram negative bacteria.
- Follow the recommended testing time. After 30 seconds, oxidase negative bacteria will gradually turn blue to purple.
- Do not pick a colony using metal instruments such as nichrome wire.
- Colonies grown on agar plate containing sugars or dyes (such as MacConkey agar) should not be used this test.
⇒ False negatives occur in culture media containing glucose.
- The Kovacs reagent is unstable, so if it turns purple, make a new reagent.

【 Fig.2 Oxidase test 】



Right : *Vibrio parahaemolyticus* RIMD 2211093 (positive)
Left : *Escherichia coli* ATCC 25922 (negative)