

微生物实验教学中氧化酶试验准确性和稳定性的探讨

权云帆¹, 修皓¹, 孙庆惠¹, 曾颖斐¹, 符婷婷¹, 崔秀吉^{2*}

(1. 海南医学院 热带医学院, 海口, 571199;

2. 海南医学院 基础医学与生命科学学院, 海口, 571199)

摘要: 为提高实验教学操作中氧化酶试验的准确性和稳定性, 减少和避免学生操作中出现假阳性或假阴性的情况。采用多种培养基和多种氧化酶试纸(试剂)尝试, 以期寻找一种稳定可靠的适用于学生实验的氧化酶试验方法。实验结果表明, 取自普通营养琼脂斜面培养基上的铜绿假单胞菌氧化酶试验假阴性结果较多; 取自普通营养琼脂平板或血琼脂平板培养基上的铜绿假单胞菌氧化酶试验均为阳性。氧化酶试验, 以血琼脂平板培养基培养物效果最佳, 采用氧化酶试纸或盐酸二甲基对苯二胺化学释放剂试纸均可, 以灭菌竹签或玻璃棒取菌或直接用试纸蘸取菌落, 30s 内观察结果。

关键词: 氧化酶试验; 铜绿假单胞菌; 血琼脂平板培养基

Evaluation of the Accuracy and Stability of Oxidase test in Microbiology Experimental Teaching Course

QYAN Yunfan, XIU Hao, SUN Qinghui, ZENG Yingfei, FU Tingting, Cui Xiujie*

(1. School of Tropical Medicine, Hainan Medical University, Haikou, 571199, China;

(2. School of Basic Medical Sciences and Life Sciences, Hainan Medical University, Haikou, 571199, China)

Abstract False-positive and false-negative to the Oxidase test frequently occur during microbiology experimental teaching. The aim of the study is to increase the accuracy and stability of the Oxidase test. Various bacterial culture medium and Oxidase test kit were evaluated to find a proper protocol of Oxidase test. As a result, *Pseudomonas aeruginosa* cultured in slant agar medium frequently showed false positivity in the Oxidase test, whereas *Pseudomonas aeruginosa* cultured in regular agar plate or blood agar plate didn't show any false positive. Taken together, blood agar is the best medium for bacterial culture for the Oxidase test. The Oxidase test paper disk or N,N-Dimethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride test paper showed similar result in the Oxidase test and the result can be appeared in 30 sec when smears bacterium with sterilized toothpick, glass stick or directly pick up the bacterium with paper disk.

Keywords Oxidase test; *Pseudomonas aeruginosa*; blood agar plate

细胞色素氧化酶简称氧化酶，是细胞色素呼吸酶系统的终末呼吸酶。具有氧化酶的细菌首先氧化细胞色素 C，然后氧化型的细胞色素 C 再使对苯二胺氧化生成有颜色的醌类化合物。使用盐酸四甲基对苯二胺时，产物呈蓝色；使用盐酸二甲基对苯二胺时，产物呈紫红色。氧化酶试验主要用于肠杆菌科与非发酵菌（代表为铜绿假单胞菌）的鉴定，肠杆菌科多为阴性，弧菌科、非发酵菌多为阳性。此外，奈瑟菌属及莫拉菌属也呈阳性。氧化酶试验是临床细菌学鉴定中的关键试验之一^[1-3]，也是化妆品和包装饮用水中铜绿假单胞菌检测常用的生化试验之一^[4-6]。

在微生物学实验教学中多次会应用到氧化酶试验，但学生在实际实验操作过程中有时候会因为培养基的问题或试剂原因或学生操作不规范等多种因素出现假阳性或假阴性的情况。为提高学生氧化酶试验的准确性和稳定性，本文采用多种培养基和多种氧化酶试纸（试剂）尝试，以期寻找一种稳定可靠的适用于学生实验的氧化酶试验方法。

1 材料与方法

1.1 材料

氧化酶试纸购自青岛高科技工业园海博生物技术有限公司，盐酸二甲基对苯二胺化学释放剂试纸购自杭州滨河微生物试剂有限公司，氧化酶试剂（随机体外诊断试剂板配套试剂）购自珠海迪尔生物工程有限公司，血琼脂平板培养基购自江门市凯林贸易有限公司，普通营养琼脂平板培养基购自江门市凯林贸易有限公司，普通营养琼脂斜面培养基购自杭州滨河微生物试剂有限公司。

血琼脂平板培养基主要成分：每 1000mL 含酪蛋白胰酶消化物 10g、心胰酶消化物 3g、玉米淀粉 1g、琼脂粉 14g、肉胃酶消化物 5g、酵母浸出粉 5g、氯化钠 5g 加蒸馏水至 1000mL，高压灭菌后，冷却至 50℃，再加入无菌羊血 70mL。

普通营养琼脂斜面/平板培养基主要成分：每 1000mL 含蛋白胨 10g、牛肉膏 3g、氯化钠 5g、琼脂粉 12g 加蒸馏水至 1000mL 配制而成。

铜绿假单胞菌 ATCC27853 和大肠埃希菌 ATCC25922 均为质控菌，购自广东省科学院微生物研究所。

1.2 方法

1.2.1 细菌培养

铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 广泛分布于自然界、土壤、水、空气、正常人的皮肤、呼吸道和肠道等均有存在。为条件致病菌，是医院感染的主要病原菌之一。铜绿假单胞菌对营养要求不高，在普通琼脂培养基上生长良好，37℃ 经培养 18~24h 可以形成圆形、扁平、大小不一、表面光滑、湿润、边缘不整齐、有金属光泽的菌落，琼脂被染成绿色或黄绿色。该菌氧化酶试验阳性。

大肠埃希菌 (*Escherichia coli*) 是人和动物肠道中的正常栖居菌，营养要求不高，在普通琼脂培养基上，37℃经培养 18~24h 可以形成灰白色、圆形、凸起、表面光滑、湿润、边缘整齐的菌落。该菌氧化酶试验阴性。

1.2.2 氧化酶试验

1) 将铜绿假单胞菌分别接种于普通营养琼脂斜面培养基、普通营养琼脂平板培养基和血琼脂平板培养基，每种培养基分别各接种 3 只，置于 37℃生化培养箱中培养 18~24h。

2) 每只培养基上的铜绿假单胞菌分别采用氧化酶试纸、盐酸二甲基对苯二胺化学释放剂试纸和氧化酶试剂 3 种方法进行氧化酶试验，每种方法再做两组平行对照。

分别按试剂说明书操作进行氧化酶试验，方法 1：将氧化酶试纸置于干净的载玻片上，用无菌蒸馏水浸湿氧化酶试纸，用灭菌竹签蘸取菌苔，涂在纸上，在 30s 内变为蓝色或蓝紫色为强阳性，2min 内不变色为阴性；方法 2：取盐酸二甲基对苯二胺化学释放剂试纸置于干净的载玻片上，用灭菌竹签蘸取菌苔涂于纸上或直接用试纸蘸取菌落，30s 内观察结果，释放为紫红色，不释放为无色或淡黄色；方法 3：将滤纸剪成约 1cm×1cm 大小，进行高压蒸汽灭菌处理、烘干，用灭菌竹签蘸取菌苔，涂在滤纸上（或直接用滤纸条蘸取菌落少许），滴加氧化酶试剂 1 滴于滤纸条的菌苔上，若立即出现紫红色的为阳性，不变色为阴性。

3) 为避免试验误差，保证试验的重复性，将此铜绿假单胞菌再接种第 2 代和第 3 代，分别重复上述试验。

4) 阴性对照为大肠埃希菌，试验方法同铜绿假单胞菌。

2 结果

2.1 普通营养琼脂斜面培养基氧化酶试验结果

取自普通营养琼脂斜面培养基上的铜绿假单胞菌氧化酶试验假阴性结果较多，不论是氧化酶试纸（图 1a）还是盐酸二甲基对苯二胺化学释放剂试纸（图 1b），30s 内仅出现很浅很淡的颜色变化或 1~2min 甚至需要更长的时间才出现较浅的颜色变化；涂在滤纸上的菌苔滴加氧化酶试剂后立即出现颜色变化（图 1c），放置一段时间后（30s 内）颜色逐渐明显，但仍为浅紫色。阴性对照大肠埃希菌氧化酶试验均为无色，没有颜色变化。部分试验结果如图 1 所示。

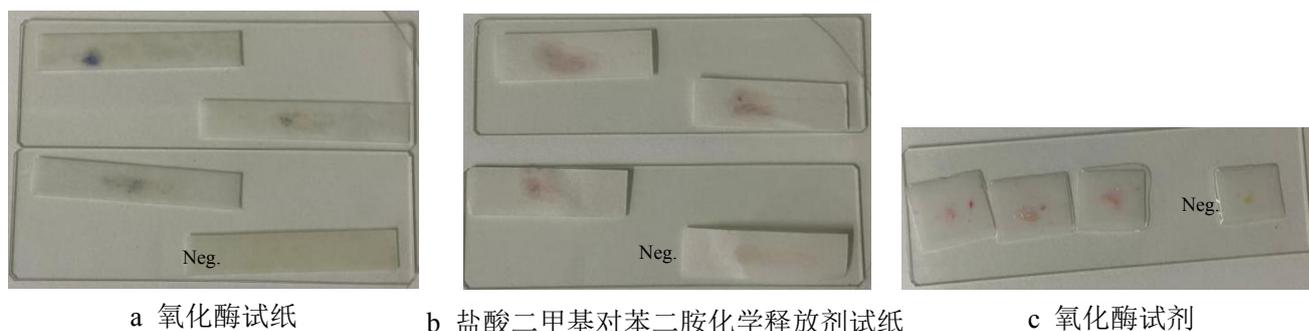


图 1 接种于普通营养琼脂斜面培养基的铜绿假单胞菌氧化酶试验结果
注：Neg. 表示阴性对照

2.2 普通营养琼脂平板培养基氧化酶试验结果

取自普通营养琼脂平板培养基的铜绿假单胞菌氧化酶试验均为阳性，氧化酶试纸（图 2a）在 30s 内出现蓝色；盐酸二甲基对苯二胺化学释放剂试纸（图 2b）在 30s 内释放为紫红色；涂在滤纸上的菌苔滴加氧化酶试剂后立即出现紫红色（图 2c）。阴性对照大肠埃希菌氧化酶试验均为无色，没有颜色变化。部分试验结果如图 2 所示。

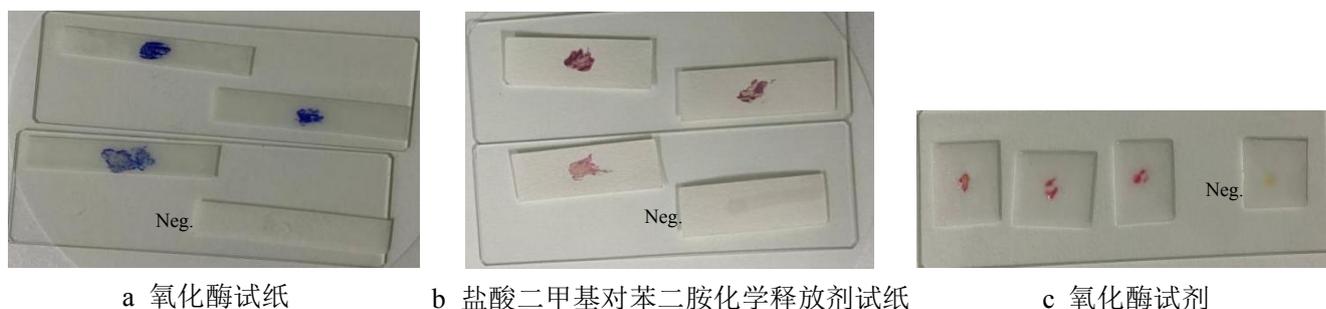


图 2 接种于普通营养琼脂平板培养基的铜绿假单胞菌氧化酶试验结果
注：Neg. 表示阴性对照

2.3 血琼脂平板培养基氧化酶试验结果

取自血琼脂平板培养基的铜绿假单胞菌氧化酶试验均为阳性，氧化酶试纸（图 3a）立即出现蓝色，30s 内颜色加深呈现深蓝色；盐酸二甲基对苯二胺化学释放剂试纸（图 3b）立即出现紫红色，30s 内颜色加深甚至呈现紫黑色；涂在滤纸上的菌苔滴加氧化酶试剂后立即出现紫红色（图 3c），颜色逐渐加深。阴性对照大肠埃希菌氧化酶试验均为无色，没有颜色变化。部分试验结果如图 3 所示。



图 3 接种于血琼脂平板培养基的铜绿假单胞菌氧化酶试验结果
注：Neg. 表示阴性对照

3 讨论

3.1 氧化酶试验的意义

氧化酶试验是《临床微生物学》实验课经典试验之一，在“肠杆菌科”鉴定、“非发酵菌”鉴定实验课程中均有涉及，是检验科临床微生物科室选择微生物鉴定及药敏分析系统测试板的关键性实验，临床上常用于肠杆菌科细菌与假单胞菌的鉴别，前者为阴性，后者为阳性；奈瑟菌属、莫拉菌属细菌也呈阳性反应。氧化酶试验在细菌鉴定方面有广泛的应用价值，徐希岳^[7]等报道氧化酶试验和尿毒酶试验一样对检测幽门螺杆菌快速有效，两者联合应用可提高对幽门螺杆菌感染诊断和鉴别诊断的准确性。文献报道氧化酶试验可作为淋病奈瑟菌的辅助检测方法，应用于快速筛查^[8-9]。除此之外，氧化酶试验在《卫生微生物学》实验课程中也有涉及，是化妆品和包装饮用水中铜绿假单胞菌检测常用的生化试验之一。氧化酶试验是相关专业学生必须掌握的一项实验技术。

3.2 氧化酶试验假阴性结果讨论与分析

由于现在学生数量较多，实验教学辅助人员为便于材料准备，常以普通营养琼脂斜面培养基接种细菌以供学生使用，但本文通过对比多种培养基发现，取自普通营养琼脂斜面培养基上的铜绿假单胞菌氧化酶试验常会出现假阴性，取自普通营养琼脂平板或血琼脂平板培养基的铜绿假单胞菌进行氧化酶试验，其结果准确性和稳定性均优于接种于斜面培养基上的菌，且血琼脂平板培养基培养的铜绿假单胞菌氧化酶试验更为灵敏。

为避免普通营养琼脂斜面培养基本身的质量问题，重复验证试验时采用同一瓶营养琼脂粉新配置斜面培养基和普通平板培养基，接菌再次进行氧化酶试验，其结果与上述差别不大，平板培养基上的菌阳性结果明显，斜面培养基上的菌阳性结果依然是不明显或变色很浅或有假阴性。

为避免不同试纸的影响，重复验证试验时采用同一张试纸，左右两边分别取斜面培养基和普通平板培养基上的菌进行氧化酶试验，其结果依然与上述差别不大。

为避免因取菌量不够导致的假阴性，重复验证试验时将整个试纸放入接种有铜绿假单胞菌的斜面培养基中，试纸依然是显色不明显或颜色很浅或为假阴性不产生颜色变化。

产生这种现象的原因可能与菌的生长状态有关，普通营养琼脂斜面培养基与普通营养琼脂平板培养基成分相同，但在实际操作中发现斜面培养基斜面底部常常会有一定的水份聚集，生长在斜面的菌苔与生长在平板培养基的菌苔相比明显更湿润，在用灭菌竹签或玻璃棒取菌时，菌苔不会聚集成块而是分散在竹签或玻璃棒上，但是平板上的菌在刮取的时候可以聚集成块取出，这样实际的取菌就较多，实验效果就更明显。

采用试剂法进行氧化酶试验时滴加试剂在滤纸上的量以刚浸湿为宜，一般滴加 1 滴于纸片上即可进行测试。纸片过湿则会影响菌苔与空气的接触，延迟反应，造成假阴性。

氧化酶试验应注意不宜采用在含葡萄糖培养基上生长的菌落，因为葡萄糖发酵可抑制氧化酶的活性，可能导致假阴性结果^[10-11]。

血琼脂平板培养基的营养成分优于普通营养琼脂斜面培养基与普通营养琼脂平板培养基，菌的生长状态更好。

在非选择性和非鉴别性培养基上，如血琼脂平板、普通琼脂平板、MH平板上培养的细菌做氧化酶试验结果一致可靠^[12]。王永新^[13]等人也提出氧化酶试验最好用血琼脂上的培养物。为避免氧化酶试验假阴性结果，故建议采用血琼脂平板培养基接种的铜绿假单胞菌进行氧化酶试验，其效果更灵敏、最佳。

3.3 氧化酶试验假阳性结果讨论与分析

为避免假阳性结果的出现，不能接触含铁物质，切不可用镍铬丝或铁丝制的接种针挑取菌落，因微量的铁即能单独催化苯二胺试剂的氧化作用，导致假阳性结果^[10]，用铁质接种环取大肠埃希菌分别进行的氧化酶试验，图4a为氧化酶试纸、图4b为盐酸二甲基对苯二胺化学释放剂试纸、图4c为氧化酶试剂，均有出现少量较浅的颜色变化，若学生使用接种环未完全冷却则假阳性结果会更明显；图5a、5b、5c为用灭菌竹签取大肠埃希菌分别用氧化酶试纸、盐酸二甲基对苯二胺化学释放剂试纸和氧化酶试剂进行的氧化酶试验，均未出现颜色变化或仅为菌落本身的颜色痕迹。

以一次性塑料接种环或玻璃棒或灭菌竹签代替铁质接种环提供给学生操作使用，可减少氧化酶试验假阳性结果的产生。

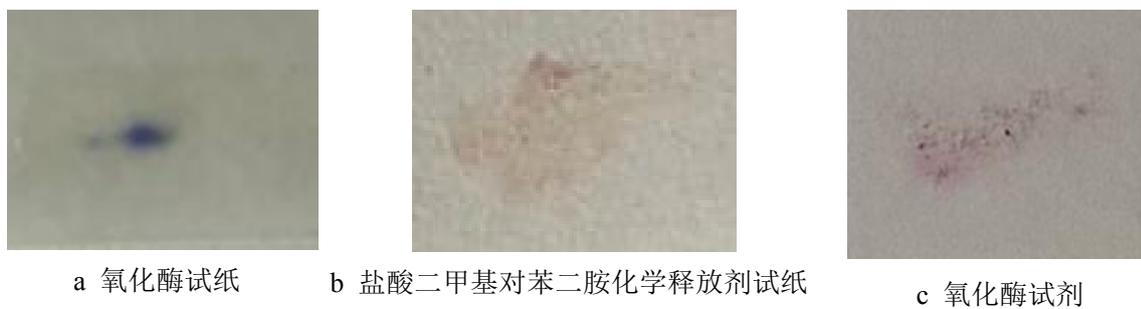


图4 用铁质接种环取大肠埃希菌进行氧化酶试验结果对比



图5 用无菌竹签取大肠埃希菌进行氧化酶试验结果对比

使用带有颜色的菌落，在一些选择性培养基，如 SS 培养基、麦康凯培养基和伊红美蓝培养基等，培养的细菌做氧化酶试验易出现假阳性，这可能与该培养基上的指示剂有关^[11]。

3.4 氧化酶试验试剂的保存

氧化酶试纸（试剂）容易失效，学生实验操作使用后应及时盖上盖子并拧紧，保持干燥和密封，放回于包装盒内，置于 2~8℃ 避光保存，为保存时效更久，也可冷冻保藏^[13-15]。

4 结束语

由于采用平板培养基培养物进行氧化酶试验时氧化酶试纸、盐酸二甲基对苯二胺化学释放剂试纸和氧化酶试剂 3 种方法效果都很明显，考虑到学生在实际操作中的简便性，因采用氧化酶试剂法需要另外制作无菌滤纸片以及学生在滴加试剂对量的把控容易有偏差，故学生实验中，常用试纸法代替试剂法。

综上所述，学生微生物学实验项目中氧化酶试验，以血琼脂平板培养基培养物效果最佳，准确性、稳定性和灵敏性较高，采用氧化酶试纸或盐酸二甲基对苯二胺化学释放剂试纸均可，以灭菌竹签或玻璃棒取菌或直接用试纸蘸取菌落，30s 内观察结果。

参 考 文 献

- [1] 楼永良. 临床微生物学检验技术实验指导[M]. 北京：人民卫生出版社，2015：17.
- [2] 刘运德，楼永良. 临床微生物学检验技术[M]. 北京：人民卫生出版社，2015：27.
- [3] 乔森，张丽丽. 新型氧化酶试验检测试纸棒的临床应用[J]. 世界最新医学信息文摘，2018，18(61): 154-155.
- [4] 高霞，高娟. 化妆品中铜绿假单胞菌检测能力验证结果与分析[J]. 药物生物技术，2021，28(05): 484-486.
- [5] 朱旭. 化妆品中金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌检测能力验证实施研究[J]. 质量安全与检验检测，2020，30(06): 94-95+101.
- [6] 慕妮，何薛纯，樊青青等. 包装饮用水中铜绿假单胞菌检测方法的比较分析[J]. 生物化工，2021，7(06): 151-155.
- [7] 徐希岳，王启之，田怡等. 氧化酶和尿素酶试验对 HP 感染的鉴别诊断[J]. 中国微生态学杂志，2001(02): 39-40.
- [8] 徐杰伟，何艳嫦. 三种方法检测淋病奈瑟菌的结果分析[J]. 国际检验医学杂志，2011，32(12):1301+1303.
- [9] 袁新亮，易坤，李怡芬等. 对一种快速淋病奈瑟菌鉴定方法的探讨[J]. 中国麻风皮肤病杂志，2011，27(06):403-404.

- [10] 姚霞, 齐素瑛. 食品中肠杆菌科生化鉴定的实验研究[J]. 中国人兽共患病杂志, 1997(01): 57-59.
- [11] 欧内玉, 赵加修, 王艳君等. 细菌氧化酶和靛酚氧化酶检测差异性的研究[J]. 现代检验医学杂志, 2003(03): 56.
- [12] 麦克法丁 (MacFaddin, J·F·). 医学细菌生化试验鉴定手册[M]. 林万明译. 北京: 人民卫生出版社, 1985: 191-197.
- [13] 王永新, 梅杰, 钟玉. 氧化酶试剂保存法的实验探讨[J]. 蚌埠医学院学报, 1997(02): 59.
- [14] 许旭初, 洪去病, 洪怡元等. 淋球菌培养基、氧化酶试纸及奈瑟氏菌快速糖试验试剂盒的检定和应用[J]. 中国生物制品学杂志, 1996(01): 29-32.
- [15] 杜忠斌, 卫彩绒. 介绍一种保存氧化酶试剂的方法[J]. 上海医学检验杂志, 2001(01): 32.