

包装饮用水中铜绿假单胞菌定性检测方法构建

曾海燕^{1,2}, 邓颖庄², 李婉华², 陈艺彩², 王丽^{1*}

(1. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642) (2. 广州陆桥检测技术有限公司, 广东广州 511400)

摘要: 该研究构建包装饮用水中铜绿假单胞菌定性检测方法并开展应用效果评价。通过低菌浓度接种, 选取合适培养条件及增菌基础肉汤, 通过单因素试验优化增菌液配方, 通过多重比较优化选择分离培养基配方。以 GB 8538-2022 方法为对照, 选取市售包装饮用水加入不同类别、菌量标准菌后, 使用臭氧发生器分别通气 0、30、60、90 min 后, 再进行膜过滤富集增菌-选择划线分离-MALDI-TOF MS 仪鉴定的定性测试, 比较两者的灵敏度、选择性、特异性, 并选取不同类别样品进行应用效果测试。该研究构建的定性检测方法第一步增菌选取 TSB 添加甘露醇 4 g/L 配方, 42 °C 培养 6~8 h; 第二步选择分离选取 CN 添加丙酮酸钠 0.20 g/L 配方, 42 °C 培养 24~48 h, 利用 MALDI-TOF MS 仪对可疑菌可实现准确、快速、高通量鉴定。该法对铜绿假单胞菌的最低识别限为 3 CFU/250 mL, 可识别 1 000~10 000 CFU/250 mL 干扰菌, 对不同样品的检测识别效果较现行国标差异显著 ($\chi^2=25.45$, $P<0.05$), 相对现有方法, 具有灵敏度高、特异性强、简便安全、高效等技术优势。

关键词: 包装饮用水; 铜绿假单胞菌; 培养基优化; MALDI-TOF MS

文章编号: 1673-9078(2023)10-315-323

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.10.1247

Development of a Qualitative Detection Method for *Pseudomonas aeruginosa* in Bottled Water

ZENG Haiyan^{1,2}, DENG Yingzhuang², LI Wanhua², CHEN Yicai², WANG Li^{1*}

(1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

(2. Guangzhou Land Bridge Detection Technology Co. Ltd., Guangzhou 511400, China)

Abstract: A qualitative detection method for *Pseudomonas aeruginosa* in bottled water developed and its performance was evaluated. Appropriate cultivation conditions and meat-based enrichment broth were selected according to the inoculation results at low bacterial concentrations. Moreover, a single-factor test was performed to optimize the enrichment medium formula for inoculation at low bacterial concentrations. Thereafter, a multiple comparison test was conducted to optimize the solid medium for selection and separation. Commercially available bottled water was used and spiked with different concentrations of reference strains, followed by ozone addition for 0, 30, 60 and 90 min. The pre-treated water was then tested using the proposed qualitative detection method. More specifically, 4 g/L mannitol was added to tryptic soy broth (TSB). The bacteria were cultivated in liquid media at 42 °C for 6~8 h. Next, sodium 0.20 g/L pyruvate was added to CN agar and cultured at 42 °C for 24~48 h. Finally, MALDI-TOF MS was adopted to ensure accurate, rapid, and high-throughput detection of potentially pathogenic bacteria, including *P. aeruginosa*. The results were compared to those obtained via the GB 8538-2022 method in terms of sensitivity, selectivity, and specificity. Different types of samples were also selected to evaluate the wide range of applications that can be assessed using the proposed method. The results demonstrated that the proposed method can identify *P. aeruginosa* at concentrations as low as 3 CFU/250 mL. Moreover, it identified interfering bacteria at a concentration range of 1 000~10 000 CFU/250 mL. The detection and identification performances for different samples were statistically significant ($\chi^2=25.45$, $P<0.05$). Thus, the method established in this study

引文格式:

熊雪梅,李可文,陈苗苗,等.乳双歧杆菌 V9 对头孢曲松钠作用小鼠肠道菌群的变化[J].现代食品科技,2023,39(10):315-323

XIONG Xuemei, LI Kewen, CHEN Miaomiao, et al. Effect of *Bifidobacterium lactis* V9 on changes in intestinal microflora of ceftriaxone sodium-treated mice [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(10): 315-323

收稿日期: 2022-09-29

基金项目: 广东省自然科学基金项目 (2020A1515011561)

作者简介: 曾海燕 (1983-), 女, 硕士研究生, 工程师, 研究方向: 食品微生物检测, E-mail: 1229642500@qq.com

通讯作者: 王丽 (1980-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品质量与安全, E-mail: wangli_scau@scau.edu.cn

exhibits high sensitivity and specificity, ease of use, and high efficiency compared to existing methods.

Key words: bottled water; *Pseudomonas aeruginosa*; medium optimization; MALDI-TOF MS

铜绿假单胞菌是一种广泛存在于水体的革兰氏阴性条件致病菌,有抗性强、营养要求低等特点^[1,2]。饮用水被该菌污染易引发婴幼儿、免疫缺陷或低下人群急性肠炎^[3,4]及皮肤或内脏等炎症^[5,6]。随着城镇化与人民生活水平的提高,包装饮用水成为我国食品行业发展最快产业之一,2019年人均消费量达31.2 L,位列全球第五^[7]。目前我国要求生产、流通的包装饮用水产品执行GB 19298-2014限量标准^[8],微生物指标要求大肠菌群和铜绿假单胞菌不得检出,与国外要求一致^[9,10]。

然而,近几年国内各地检测机构对包装饮用水生产、流通环节进行专项抽样检查,却发现铜绿假单胞菌阳性率居高不下^[11]。以产能占比20%的广东省数据为例,在2015~2017年的省专项监测中发现铜绿假单胞菌为高风险项目,其不合格率在10%左右^[12],检出范围为2~560 CFU/250 mL^[13],检出率体现为桶装饮用水高于瓶装饮用水,矿泉水高于纯净水,生产环节高于流通环节,且大部分分离株存在耐药性^[14]。其根本原因是产品在生产、销售流通的各环节受到了污染^[15,16];再者产品存在初始低菌量污染,出厂时检验合格,但随后放置较长时间铜绿假单胞菌菌数有所增长^[17]导致市场流通环节抽检不合格的漏检情况。

随着检验量的激增,现行GB 8538-2016检验标准^[18]效率低、检验周期长,试验关键培养基及试剂质量控制方法缺失导致最终结果不准确,如关键分离步骤所用CN琼脂不同市售产品受原料质量参差影响导致色素表达不准确,易出现结果误判^[19],鉴定试验结果也常出现假阴性与假阳性的情况,对可疑菌鉴定效果不佳^[20-22],验证所用试剂对环境 and 人员健康不友好,检验结果出现菌落过多时无法识别^[23],漏检、假阴性或假阳性等问题^[24]等问题也日益凸显。2022年底实施的GB 8538-2022新检验标准^[25],在细化了生化试验操作的基础上继续沿用了该检验方法体系,可使生化鉴定试验结果更明确,但低菌量铜绿假单胞菌污染产品存在漏检风险,高菌量铜绿假单胞菌污染产品无法分离和识别,这两个突出问题仍难以解决。

目前,通过MALDI-TOF仪测得待测微生物独特蛋白质指纹图谱,并将其与数据库中微生物标准指纹图谱进行匹配检索,从而完成鉴定的技术手段^[26]在微生物鉴定或作溯源分析有越来越广泛的应用。已有学者研究证明MALDI-TOF MS对铜绿假单胞菌有良好的识别、鉴定效果,与传统生化鉴定结果一致^[26,27]。

本研究建立了包装饮用水中铜绿假单胞菌的定性检测方法,在优化培养基营养和选择性的基础上,利用MALDI-TOF MS仪进行高通量鉴定,并开展方法应用效果评价,为解决现行检验中的上述两个突出问题提供检验优化思路参考。

1 材料与方法

1.1 原料

甘露醇、硫酸钾、氯化镁、十六烷基三甲基溴化铵、丙酮酸钠、甘油、无水乙醇、甲酸(分析纯),上海阿拉丁生化科技股份有限公司;三氟乙酸、乙腈(色谱级),上海阿拉丁生化科技股份有限公司;硫酸镁(分析纯),上海展云化工有限公司;氢氧化钠(分析纯),广州化学试剂厂; α -氰基-4-羟基肉桂酸(分析纯),西格玛奥德里奇上海贸易有限公司;萘啶酮酸、琼脂、明胶胨(生化试剂),北京陆桥技术股份有限公司。

营养肉汤(Nutrient Broth, NB)、胰蛋白胨大豆肉汤(Tryptic Soy Broth, TSB)、胰蛋白胨大豆琼脂(Tryptone Soya Agar, TSA)、假单胞菌CN琼脂培养基(*Pseudomonas* CN Medium, CN)、绿脓菌素测定培养基、乙酰胺液体培养基、钠氏试剂、氧化酶试剂、金氏B培养基,北京陆桥技术股份有限公司。

菌种:铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) (ATCC10145、ATCC15442、ATCC19429)、大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*) (ATCC25922)、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*) (CICC21620)均购自中国工业微生物菌种保藏管理中心。

1.2 仪器与设备

GR85DA 灭菌锅,致微厦门仪器有限公司;902-ULTS 超低温菌种保藏冰箱,赛默飞世尔科技中国有限公司;AC2-6S111 级生物安全柜,赛默飞世尔科技中国有限公司;INCUCU222 培养箱,艾力特生命科学上海有限公司;S39Buyst 便携式荧光检测灯,北京陆桥技术股份有限公司;MS3 basic 涡旋震荡仪,艾卡广州仪器设备有限公司;HTY-303A 微生物膜过滤器支架、HTY-30B 隔膜泵,浙江泰林生物技术股份有限公司;MicroTyper MSMALDI-TOF MS,重庆中元汇吉生物技术有限公司;5425 离心机,Eppendorf 中国有限公司;CQ-8025 臭氧消毒机,天长市畅青机电贸易有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 测试菌浓度调节与菌数测定

将标准储备菌株从-80℃冰箱取出,接种至10 mL/管 TSB 中,36℃培养 18~24 h,作为工作菌株,十倍梯度稀释至所需浓度,吸取适量添加至测试体系。

根据预估测试体系中的菌液浓度进行菌数测定:当菌液浓度过高时需进行十倍梯度稀释,当菌液浓度在 300~3 000 CFU/mL 时,吸取 0.1 mL 涂布于 TSA 平板;当菌液浓度在 1~300 CFU/mL 时,吸取 1 mL 倾注 TSA;当菌液浓度低于 1 CFU/mL 时,取 50 mL 或 100 mL 或 250 mL 样液,通过 0.45 μm 无菌滤膜,将滤膜正面置于 TSA 平板上培养。倒置 36℃培养 24~48 h 后计算菌落数,测三个平行,取均值,计算出测试体系中的加菌量或菌液浓度。

1.3.2 增菌培养条件选择及配方优化

选择三种不同常用增菌肉汤 TSB、NB、TSB 添加抑制剂(十六烷三甲基溴化铵 0.1 g/L),选取三种不同产色素类型铜绿假单胞菌 ATCC10145、ATCC15442、ATCC19429 分别进行接种,接种量为 0~10 CFU/mL,分别置于 36、42℃两种温度下培养至最长 24 h,每间隔 2 h 测定一次菌浓度,绘制生长曲线,选取合适的增菌时长和培养温度。

对所选取的增菌基础肉汤进行单因素实验以优化配方,选择以下三种促生长因子按不同水平添加至增菌基础肉汤中:(1)丙酮酸钠 0.20、0.3 g/L,可增强细菌复苏;(2)甘露醇 2、4 g/L,为发酵碳源;(3)硫酸镁 2 g/L,可促进产生绿脓素;以增菌基础肉汤作为对照,并增加最优复合配方进行复测,分别接种铜绿假单胞菌 ATCC10145、大肠埃希氏菌 ATCC25922,接种量为 0~10 CFU/mL,确定合适的增菌培养基配方。

1.3.3 选择分离用固体培养基优化效果多重比较

选择两种成分按不同水平添加至 CN 中:(1)丙酮酸钠 0.20、0.3 g/L,可增强细菌复苏;(2)十六烷基三甲基溴化铵 0.025、0.05、0.075 g/L,可改变细胞通透性,使之自溶或蛋白质变性以抑菌;(3)丙酮酸钠 0.20 g/L、十六烷基三甲基溴化铵 0.075 g/L 复合配方。按照 GB 4789.28-2013^[28]方法,对 CN 及上述配方的固体培养基进行性能测试,分别接种铜绿假单胞菌 ATCC10145、ATCC15442、ATCC19429,干扰菌荧光假单胞菌 CICC21620 和大肠埃希氏菌 ATCC25922,在适宜温度下培养,测定生长率(P_R)及特异性,通过综合比较生长率(P_R)、菌落特征与大小,确定适合的选择分离用固体培养基配方。

$$P_R = \frac{N_S}{N_0} \quad (1)$$

式中:

P_R ——生长率;

N_S ——待测培养基平板上得到的菌落数平均值;

N_0 ——参比培养基平板上得到的菌落数平均值。

1.3.4 MALDI-TOF MS 鉴定细菌

菌液制备:挑取适量纯化菌落至 300 μL 无菌水中混匀,加入 900 μL 无水乙醇,混匀后 9 700 g 离心 2 min,弃上清,室温放置 2 min 待乙醇挥发干;加入 80 μL $\rho=70\%$ 甲酸溶液,混匀,室温放置 2 min;加入 80 μL 乙腈,混匀后 9 700 g 离心 2 min,上清即为待测菌液。

点样测定:取 1 μL 待测菌液至靶板靶点中心,晾干,再滴加 1 μL 基质溶液,晾干。使用大肠埃希菌 ATCC 25922 作为质控菌校准设备。开启 MALDI-TOF MS,把靶板放入测试舱中,确认真空度和参数设置正常后,质控点校准后点击自动采集图谱、比对、生成结果。

1.3.5 包装饮用水中铜绿假单胞菌定性检测方法构建及评价

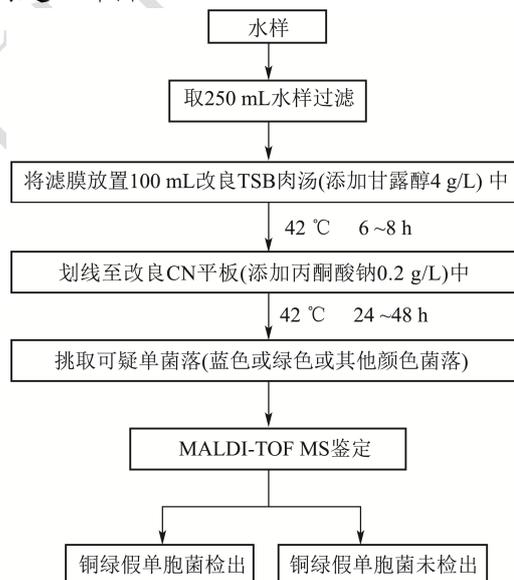


图1 包装饮用水中铜绿假单胞菌定性检测程序

Fig.1 Procedure for qualitative detection of *Pseudomonas aeruginosa* in packaged drinking water

构建包装饮用水中铜绿假单胞菌定性检测方法见图 1。为模拟实际生产情况,选择市售包装饮用天然水分别加入不同类别、不同菌量标准菌,水样加菌后先使用臭氧发生器(臭氧产量 2 000 mg/h)分别通气 0、30、60、90 min,再按图 1 检测程序分别测试该方法的灵敏度、选择性、特异性,加菌方案如下:(1)灵敏度:在水样中加入等体积混匀的三种铜绿假单胞菌(ATCC10145、ATCC15442、ATCC19429),使每

250 mL 水样中的菌含量分别在 2~5、6~20、21~100 CFU 范围内；(2) 选择性：在水样中加入等体积混匀的荧光假单胞菌 CICC21620、大肠埃希氏菌 ATCC25922，使每 250 mL 水样中的菌含量分别在 100~1 000、1 000~10 000 CFU 范围内；(3) 特异性：在水样中加入等体积混匀的五种菌，制成 2 个水样。第一个水样每 250 mL 中加入三种铜绿假单胞菌合计菌含量在 10~100 CFU 范围内、加入荧光假单胞菌 CICC21620 和大肠埃希氏菌 ATCC25922 合计菌含量在 100~1 000 CFU 范围内；第二个水样每 250 mL 中加入三种铜绿假单胞菌合计菌含量在 10~100 CFU 范围内、加入荧光假单胞菌 CICC21620 和大肠埃希氏菌 ATCC25922 合计菌含量在 1 000~10 000 CFU 范围内。同时水样按 GB 8538-2022 作为对照方法进行同步检测，分别进行三次有效的平行检测，进行方法效果比较。另外选取三种不同类型的包装饮用水、其他散装水样品各 30 份，按图 1 程序进行检测，并同时按 GB 8538-2022 国标检测作为比较，展开该方法的实际应用评价。

1.3.6 数据处理分析

本文涉及有效的三平行检测数据是利用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析处理的，当 $P < 0.05$ 时，不同数据组之间被认为具有统计学的显著差异。分析图形均通过 Origin 2019 软件绘制。

2 结果与讨论

2.1 增菌培养条件选择及配方优化

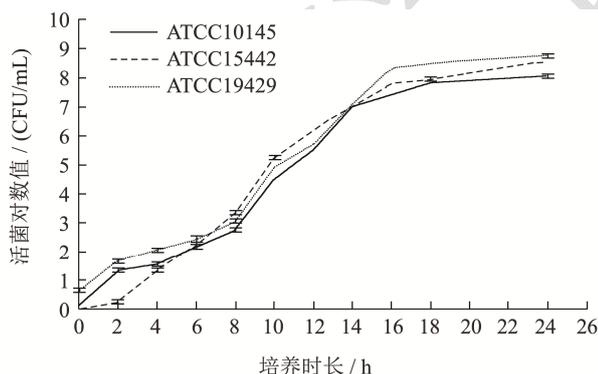


图 2 三种铜绿假单胞菌低浓度接种 TSB 培养时的生长曲线

Fig.2 Growth curve of three kinds of *Pseudomonas aeruginosa* at low concentrations inoculated to TSB

观察铜绿假单胞菌接种 0~10 CFU/mL 至 TSB 培养后的生长情况 (见图 2) 可知，经 6 h 培养后三种铜绿假单胞菌均能增殖至 10^2 CFU/mL 以上，此时传统培养法固体培养基均能培养识别，因此，铜绿假单胞菌检测第一步增菌选择 6~8 h。经测定培养后菌数可知，TSB 添加抑制剂肉汤均无菌生长，TSB 增菌效果

优于 NB (见图 3)，增菌效果 42 °C 均优于 36 °C (见图 4)。因此，为避免漏检增菌阶段增菌肉汤不考虑添加抑菌剂，而应以营养优化方向为主，增菌选择 TSB 为基础肉汤，培养温度为 42 °C。

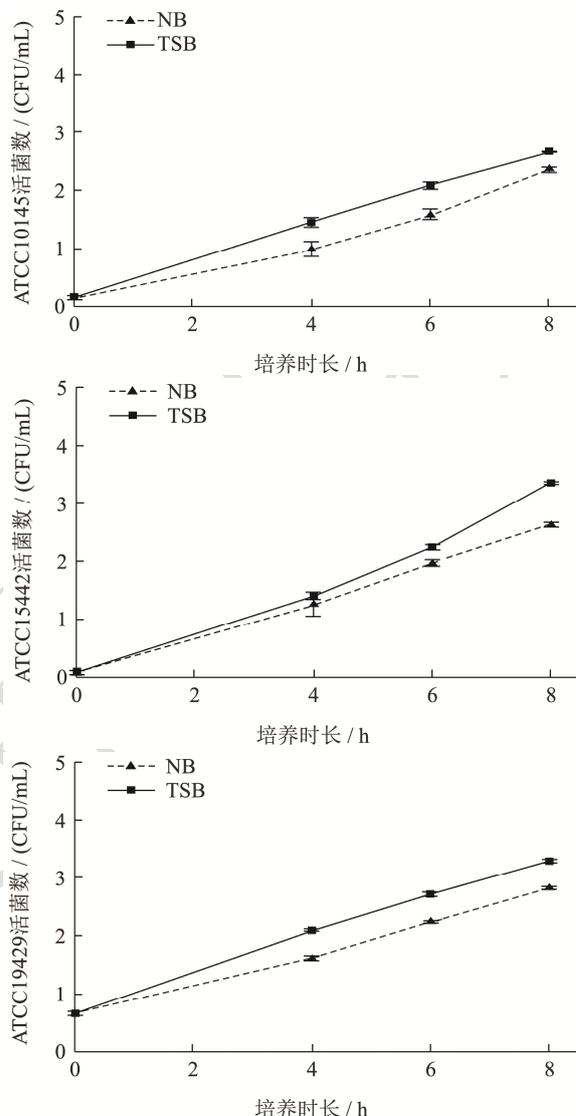


图 3 三种铜绿假单胞菌低浓度接种不同肉汤的生长情况比较

Fig.3 Comparison of the growth rate of three kinds of *Pseudomonas aeruginosa* inoculated with different broths at low concentrations

TSB 分别添加不同生长因子的不同水平及复合配方，分别接种 0~10 CFU/mL 的目标菌铜绿假单胞菌 ATCC10145、干扰菌大肠埃希氏菌 ATCC25922，置 42 °C 培养 6~8 h 后测定菌数，并作多重比较分析。由图 5 可知，复配配方 P5、P6 的增菌效果较 TSB 明显，且 P5 效果优于 P6，但均弱于 TSB 单独添加甘露醇 2 g/L、4 g/L 的增菌效果。由于优化增菌肉汤的营养对大肠埃希氏杆菌的增菌效果同样明显，因此选择对铜绿假单胞菌增菌效果最明显的 TSB 添加甘露醇 4 g/L 的配方作为增菌肉汤培养基的配方。

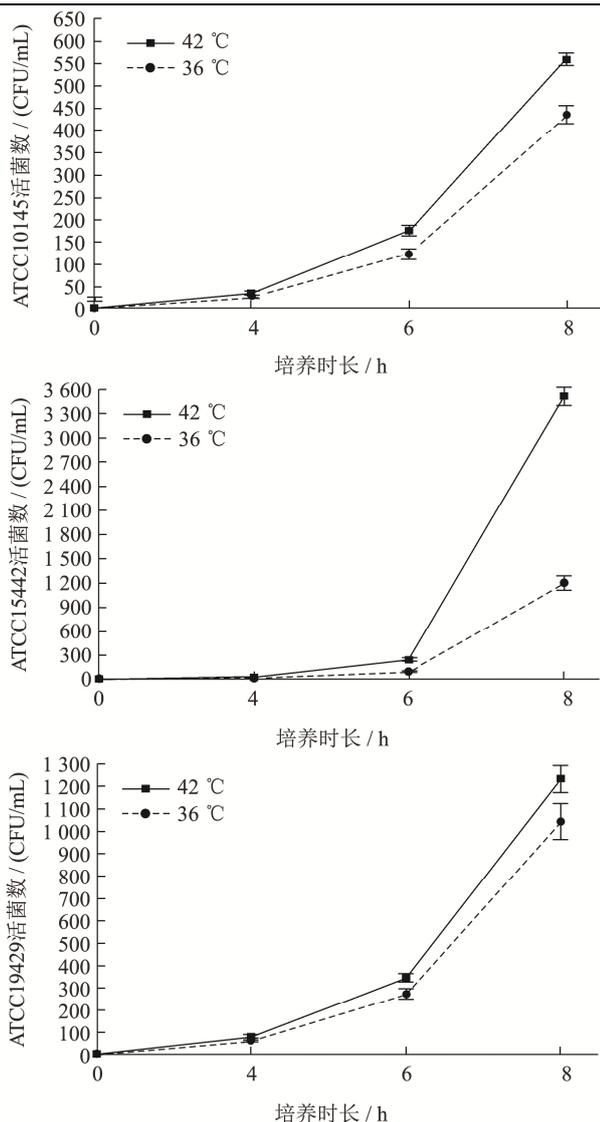


图4 三种铜绿假单胞菌低浓度接种 TSB 不同温度培养的生长情况比较

Fig.4 Comparison of the growth rate of *Pseudomonas aeruginosa* at low concentrations and different temperatures inoculated to TSB

表 1 五菌株在不同配方 CN 琼脂中的生长率比较

Table 1 Comparison of P_R of five bacteria in different formula CN Agar

试验菌株	CN	CN 添加丙酮酸钠		CN 添加十六烷三甲基溴化铵			CNH
		0.20 g/L	0.3 g/L	0.025 g/L	0.05 g/L	0.075 g/L	
铜绿假单胞菌 ATCC10145	0.99±0.04 ^a	0.85±0.03 ^b	0.72±0.04 ^c	0.51±0.03 ^c	0.58±0.03 ^d	0.60±0.05 ^d	0.51±0.02 ^c
铜绿假单胞菌 ATCC15442	1.21±0.09 ^{ab}	1.26±0.10 ^a	1.22±0.04 ^{ab}	1.21±0.04 ^{ab}	1.09±0.02 ^b	1.09±0.02 ^b	0.97±0.03 ^c
铜绿假单胞菌 ATCC19429	1.05±0.04 ^b	1.20±0.02 ^a	1.01±0.04 ^b	1.02±0.03 ^b	0.87±0.02 ^c	0.74±0.05 ^d	1.15±0.04 ^a
荧光假单胞菌 CICC21620	1.21±0.08 ^c	1.25±0.04 ^c	1.82±0.06 ^a	1.85±0.10 ^a	1.95±0.08 ^a	1.91±0.11 ^a	1.49±0.06 ^b
大肠埃希氏菌 ATCC25922	0.09±0.04 ^{ab}	0.04±0.02 ^{cd}	0.01±0.02 ^d	0.07±0.02 ^{bc}	0.14±0.04 ^{ab}	0.16±0.05 ^a	0.11±0.02 ^{ab}

注：(1) 用 Waller-Dunca 方法进行多重比较，每种菌株组内进行多重比较，标不同小写字母表示生长率结果差异显著 ($P < 0.05$)；标相同小写字母表示生长率结果差异不显著 ($P > 0.05$)；(2) TSA 为参比培养基；CNH 指 CN 添加丙酮酸钠 0.20g/L、十六烷三甲基溴化铵 0.075 g/L。

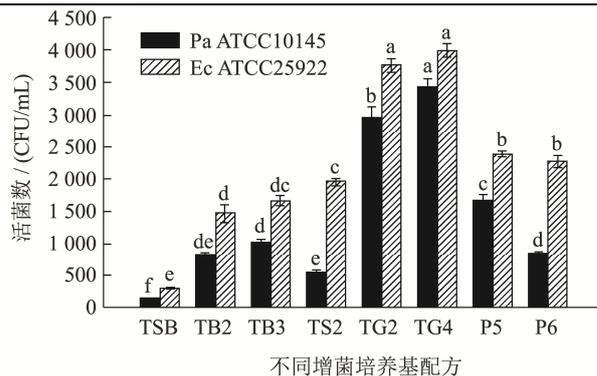


图5 两种菌低浓度接种不同配方肉汤 42 °C 培养时生长情况比较

Fig.5 Comparison of the growth rate of two bacteria at low concentrations inoculated to different formula broths at 42 °C

注：TB3、TB4 分别指 TSB 添加丙酮酸钠 0.3 g/L、0.4 g/L；TS2 指 TSB 添加硫酸镁 2 g/L；TG2、TG4 分别指 TSB 添加甘露醇 2 g/L、4 g/L；P5 指 TSB 添加丙酮酸钠 0.3 g/L、甘露醇 4 g/L、硫酸镁 2 g/L；P6 指 P5 添加抑制剂（十六烷三甲基溴化铵 0.025 g/L）。

2.2 选择分离用固体培养基配方优化

计算四种不同类型特征的五株试验菌在不同配方的 CN 琼脂中的生长率 (P_R)，由表 1 可知：五株菌在不同配比平板上的生长率各菌株组内有显著的差异。其中 CN 添加丙酮酸钠 0.20 g/L 配方可显著提升 ATCC15442 和 ATCC19429 两株铜绿假单胞菌的生长率，且对大肠埃希氏菌抑制显著增强，综合考虑该配方对目标菌的生长率促进效果较好。

观察试验菌在不同配方的 CN 系列平板上的菌落形态及菌落直径大小，由表 2 可知：五株菌在不同配比平板上的菌落形态均典型，其中三株铜绿假单胞菌在 CN 添加丙酮酸钠 0.20 g/L 配方上的菌落均有所变大，荧光假单胞菌和大肠埃希氏菌的菌落大小不变，整体效果较好（见图 6）。

表2 五菌株在不同配方 CN 琼脂中的菌落形态比较

Table 2 Comparison of colony morphology of five bacteria in different formula CN agar

试验菌株	CN	CN 添加丙酮酸钠		CN 添加十六烷三甲基溴化铵			CNH
		0.20 g/L	0.30 g/L	0.025 g/L	0.05 g/L	0.075 g/L	
铜绿假单胞菌 ATCC10145	绿圆形 0.90 mm	绿圆形 1.50 mm	绿圆形 1.40 mm	绿圆形 0.90 mm	绿圆形 0.90 mm	绿圆形 1.00 mm	绿圆形 1.00 mm
铜绿假单胞菌 ATCC15442	黄圆形 1.50 mm	黄圆形 1.70 mm	黄圆形 1.50 mm				
铜绿假单胞菌 ATCC19429	草绿圆形 1.50 mm	草绿圆形 2.00 mm	草绿圆形 1.50 mm	草绿圆形 1.70 mm	草绿圆形 1.50 mm	草绿圆形 1.50 mm	草绿圆形 2.00 mm
荧光假单胞菌 CICC21620	黄圆形 1.00 mm						
大肠埃希氏菌 ATCC25922	黄圆形 3.70 mm	黄圆形 3.70 mm	黄圆形 3.70 mm	黄圆形 3.20 mm	黄圆形 3.20 mm	黄圆形 3.20 mm	黄圆形 3.20 mm

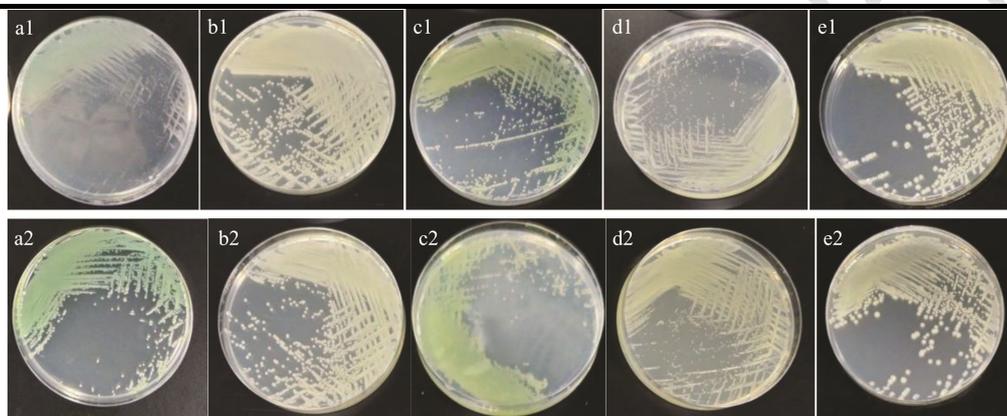


图6 五菌株在不同配方 CN 琼脂中的菌落形态 (24 h)

Fig.6 Colony morphology of five bacteria in different formula CN agar (24 h)

注: (1) a 为铜绿假单胞菌 ATCC10145; b 为铜绿假单胞菌 ATCC15442; c 为铜绿假单胞菌 ATCC19429; d 为荧光假单胞菌 CICC21620; e 为大肠埃希氏菌 ATCC25922; (2) 1 为 CN 琼脂; 2 为 CN 添加丙酮酸钠 0.20 g/L。

综合比较生长率、特异性、选择性结果,选择 CN 添加丙酮酸钠 0.20 g/L 配方作为选择分离用固体培养基配方,对三株铜绿假单胞菌有较好的促生长与识别效果,对大肠埃希氏菌的抑制效果较好,调整培养温度为 42 °C 可完全抑制荧光假单胞菌生长。

2.3 包装饮用水中铜绿假单胞菌的定性检测方法的应用评价

模拟生产水样按图 1 定性检测程序测试其灵敏度、选择性、特异性,与 GB 8538-2022 测试结果比对。对目标菌灵敏度结果见表 3,可知除了添加最低添加菌浓度(T1)经 60 min 臭氧处理的 1 个样品、经 90 min 臭氧处理的 3 个样品在改良 CN 上无菌落生长外,其余样品在改良 CN 平板上均有菌落生长,选取单菌落用 MALDI-TOF 仪进行鉴定,结果良好;而国标法检测,T1 梯度样品在 CN 上均无菌落生长,T2 梯度经 60 min

臭氧处理的 2 个样品,经 90 min 臭氧处理的 3 个样品在 CN 上无菌落生长,其余样品在 CN 上均有菌落生长。可知定性检测程序对目标菌的灵敏度较现行国标略高。

对非目标菌的选择性结果见表 4,可知 T4 梯度不经臭氧处理的 2 个样品,以及 T5 梯度经臭氧处理 0、30、60 min 样品虽在改良 CN 平板上的有菌落生长,但通过后续 MALDI-TOF 仪鉴定可快速排除阳性结果;T4 梯度的其他经过臭氧处理的样品,以及 T5 梯度经 60 min 臭氧处理样品在改良 CN 平板上无菌落生长,即可得到阴性结果。而国标法检测,T4 梯度经臭氧处理 60、90 min 样品在改良 CN 平板上无菌落生长;T4 梯度经臭氧处理 0、30 min 样品,以及 T5 梯度经臭氧处理 30、60、90 min 样品有菌落生长,且需要进一步生化鉴定排除;T5 梯度不经臭氧处理样品在 CN 平板上出现多不可计、不好挑取菌落进行生化鉴定的情况。可知定性检测程序在含菌量高的样品中的选择性识别效果较现行国标更好。

表 3 水样添加不同菌浓度铜绿假单胞菌经不同时长臭氧处理检测结果比较

Table 3 Comparison of detection results of water added with different types and amounts of *Pseudomonas aeruginosa* then treated with ozone for different durations

检验方法	加菌梯度 臭氧处理时长/min	T1				T2				T3			
		0	30	60	90	0	30	60	90	0	30	60	90
定性检测法	改良 TSB 增菌	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	改良 CN 分离	+	+	2/3+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	MALDI-TOF 鉴定	+	+	2/3+	N	+	+	+	+	+	+	+	+
国标法	CN 分离	N	N	N	N	+	+	1/3+	N	+	+	+	+
	生化鉴定	N	N	N	N	+	+	1/3+	N	+	+	+	+

注：(1) T1、T2、T3 梯度初始加菌数分别为 3 CFU/250 mL、15 CFU/250 mL、58 CFU/250 mL；(2) +代表有生长或阳性结果；-代表阴性结果；N 代表无生长或无需测试。

表 4 水样添加不同菌浓度干扰菌经不同时长臭氧处理检测结果比较

Table 4 Comparison of detection results of water added with different types and amounts of interfering bacteria then treated with ozone for different durations

检验方法	加菌梯度 臭氧处理时长/min	T4				T5			
		0	30	60	90	0	30	60	90
定性检测法	改良 TSB 增菌	+	+	+	N	+	+	+	+
	改良 CN 分离	2/3+	-	-	-	+	+	+	-
	MALDI-TOF 鉴定	-	N	N	N	-	-	-	N
	最终结果	-	-	-	-	-	-	-	-
国标法	CN 分离	+	+	-	-	T	+	+	+
	生化鉴定	Y	Y	N	N	?	Y	Y	Y
	最终结果	-	-	-	-	-	-	-	-

注：(1) T4、T5 梯度初始加菌数分别为 188 CFU/250 mL、4 800 CFU/250 mL；(2) +代表有生长或阳性结果；-代表阴性结果；T 代表菌数多不可计；Y 代表需要测试；N 代表无生长或无需测试；?代表菌数过多或连片难以操作。

表 5 水样添加不同菌浓度混合菌经不同时长臭氧处理检测结果比较

Table 5 Comparison of detection results of water added with different types and amounts of mixed bacteria then treated with ozone for different durations

检验方法	加菌梯度 臭氧处理时长/min	T6				T7			
		0	30	60	90	0	30	60	90
定性检测法	改良 TSB 增菌	+	+	+	+	+	+	+	+
	改良 CN 分离	+	+	+	+	+	+	+	+
	MALDI-TOF 鉴定	+	+	+	+	+	+	+	+
	最终结果	+	+	+	+	+	+	+	+
国标法	CN 分离	+	+	+	+	T	T	+	+
	生化鉴定	Y	Y	Y	Y	?	?	Y	Y
	最终结果	+	+	+	+	?	?	+	+

注：(1) T6、T7 梯度初始加菌数分别为 260 CFU/250 mL、5 200 CFU/250 mL；(2) +代表有生长或阳性结果；-代表阴性结果；T 代表菌数多不可计；Y 代表需要测试；N 代表无生长或无需测试；?代表菌数过多或连片难以操作。

对目标菌、非目标菌混合菌的特异性结果见表 5，可知水样增菌后虽然菌浓度较高，但可通过划线改良 CN 平板分离出单菌落，结合后续使用 MALDI-TOF 仪可实现高通量鉴定，快速得到阳性的检测结果。而国标法检测，当样品中菌浓度过高时，CN 平板上出

现多不可计、不好挑取菌落进行后续生化鉴定试验的情况，即使可以分离出单菌落，也需要进一步生化鉴定试验排除，或出现生化鉴定需要复测的情况，使得测试周期变长。可知定性检测程序的特异性识别效果较现行国标更好。

表6 不同样品两种方法检测识别效果比较

Table 6 Comparison of detection and recognition effect of two methods for different samples

类型	检验数 /份	无菌数 /份	国标方法				定性方法				
			无法测定 /份	无法检测率 /%	阳性检出数 /份	检出率 /%	无法测定 /份	无法检测率 /%	阳性检出数 /份	检出率 /%	
纯净水	23	23	0	0	0	0	0	0	0	0	0
矿泉水	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
山泉水	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
柠檬水	3	0	3	100	0	0	0	0	0	0	0
茶饮料	5	0	1	20	0	0	0	0	0	0	0
水果茶	3	0	3	100	0	0	0	0	0	0	0
奶茶	3	0	3	100	0	0	0	0	0	0	0
地表水	10	0	8	80	1	10	0	0	2	20	20
水机水	6	0	3	50	0	0	0	0	1	17	17
合计	60	30	21	35	1	2	0	0	3	5	5

两种检测方法对不同类型的实际样品的检测结果见表6,可知30份包装饮用水均无菌检出,两种方法结果均可识别,测试时长均为2d,测试结果一致。但对其他散装饮料而言,国标法有70%的样品无法测定或识别,原因主要为受样品杂质干扰出现过滤效果不佳、含菌量高时易出现菌落连片,无法识别的情况;而定性方法可通过增菌、划线分离有效识别单菌,避免了无法测定的情况,两种方法对不同样品检测识别差异显著($\chi^2=25.45$, $P<0.05$)。此外,定性方法检出3个阳性样品,检出率为5%,较国标方法检出1个阳性样品,检出率为2%略高。

3 结论

当前包装饮用水产品在生产、流通环节中铜绿假单胞菌抽检阳性率居高不下,这与产品存在初始低菌量污染随后放置较长时间菌数有所增长现象带来的漏检不无关系。本研究针对此类漏检风险,以及高污染产品采用现行国标方法可能出现无法识别和分离的问题,结合包装饮用水铜绿假单胞菌不得检出的限量要求,转而采取定性检测思路,重点增强增菌液体培养基的营养性和分离固体培养基的选择特性。结果表明,第一步增菌液体培养基采用TSB添加甘露醇4g/L的配方,调整培养条件为42℃培养6~8h,可使接种量为0~10 CFU/mL低浓度的铜绿假单胞菌在较短时间内快速增长至可划线分离识别的 10^2 CFU/mL以上浓度,提高培养温度至42℃用以完全抑制假单胞菌等干扰菌的生长;第二步分离固体培养基采用CN添加丙酮酸钠0.20g/L的优化配方,调整培养条件为42℃培养24~48h,使其对目标菌的促生长效果、识别效

果和对非目标菌的抑制效果均显著优于现行国标的CN琼脂,可有效避免了检验中可能出现的低浓度漏检、高浓度无法识别的问题,提高了检测的灵敏度、选择性。

现行国标受试剂质量和特性、操作经验和缺陷等因素制约,检验结果准确性受到不小的挑战。本研究构建的包装饮用水中铜绿假单胞菌检测采用先过滤、增菌,后划线的定性方法,通过水样的加菌模拟可测得其对铜绿假单胞菌的最低识别限为3 CFU/250 mL;同时能分离和识别1 000~10 000 CFU/250 mL高浓度的大肠埃希氏菌等干扰菌,有效避免高浓度铜绿假单胞菌污染出现的多不可计无法分离鉴定的异常情况;后续使用MALDI-TOF仪对可疑菌可实现准确、快速、高通量鉴定,避免传统生化鉴定中测试数不够或判定不准导致的假阴性,最短能在2d内完成检验。该法具有比现行国标法更好的灵敏度、选择性和特异性,操作简便,节省检测时间,对人员操作经验要求降低等优点,随着MALDI-TOF MS仪器在各省级检验机构的普及,该法可为包装饮用水中铜绿假单胞菌的检验提供一个更安全、高效的一种新的检验策略。

由于研究过程中未能在本地市场流通环节中获得包装饮用水的铜绿假单胞菌阳性样品,使得本研究构建的定性检测方法对包装饮用水样品的效果评价有所欠缺,后续可考虑联系包装饮用水生产厂家在阳性率较高的生产环节乃至水源水进行取样检测,进一步确认和评价新检测方法的适用性。后续还可以通过收集MALDI-TOF MS仪对不同分离菌鉴定的分析图谱,建立数据库,进行图谱聚类分析,开展对包装饮用水铜绿假单胞菌污染的溯源调查。

参考文献

- [1] 闻玉梅.现代医学微生物学[M].上海:上海医科大学出版社,1999.
- [2] 李金玲,李文茹,谢小保,等.铜绿假单胞菌的耐药与异质性耐药研究进展[J].工业微生物,2021,51(5):58-66.
- [3] 闫芳,隋英杰,孙静,等.桶装饮用水污染引起学生食物中毒的调查分析[J].中国卫生检验杂志,2011,21(8):2082,2084.
- [4] 沈瑛,杨正林,岳凤.食物中毒标本中检出铜绿假单胞菌[J].浙江预防医学,2010,22(3):45-46.
- [5] World Health Organization. Guidelines for Drinking Water Quality, 4 thedition [M]. Malta: Gutenberg, 2011.
- [6] 熊正河.瓶(桶)装水要严防铜绿假单胞菌超标[J].中国食品,2016,17:20-21.
- [7] 观研报告网.2020年中国包装饮用水市场调研报告-市场深度分析与投资前景预测[EB/OL].[2020-10-26].http://baogao.chinabaogao.com/yinliao/519135519135.html.
- [8] GB 19298-2014,食品安全国家标准包装饮用水[S].
- [9] 吴清平.食品微生物安全风险数据库在包装饮用水行业的应用[J].饮料工业,2015,18(2):74-77.
- [10] 鲍小丹,罗之纲,周泽业.国内外包装饮用水法规标准综述[J].饮料工业,2019,22(3):62-67.
- [11] 陈万胜,王督,王静怡,等.2016-2019年包装饮用水中铜绿假单胞菌检出情况分析及其对策[J].河南预防医学杂志,2020,31(10):806-808.
- [12] 周露,曾晓琼,丁清龙,等.GB 19298-2014在广东省2015年~2017年桶装饮用水专项监测中的应用研究[J].食品与发酵科技,2019,55(2):125-128.
- [13] 曾国权,刘美玲,曾嘉雯.2016~2017年广州市桶装饮用水中铜绿假单胞菌的污染情况分析[J].食品安全质量检测学报,2018,9(9):2276-2279.
- [14] 曾晓琼,汪廷彩,周露,等.2015年广东省桶装饮用水中铜绿假单胞菌的污染调查和药敏性分析[J].食品安全质量检测学报,2018,9(12):2965-2969.
- [15] 章发盛,张学英,汪洋,等.桶装饮用水生产中铜绿假单胞菌污染的控制研究[J].食品安全导刊,2016,28:73-76.
- [16] 雷兰兰.桶装饮用水中微生物指标的分析与污染控制[J].现代食品,2018,16:84-86.
- [17] 潘波,曾志明,沈中锋,等.不同类型瓶装水中铜绿假单胞菌的数量变化研究[J].食品安全质量检测学报,2019,10(5):1356-1360.
- [18] GB 8538-2016,食品安全国家标准饮用天然矿泉水检验方法[S].
- [19] 万志刚,朱晓旋,杨晓夏,等.不同品牌 CN 琼脂上铜绿假单胞菌色素表达的研究[J].食品安全质量检测学报,2018,9(21):5699-5703.
- [20] 李静.包装饮用水中铜绿假单胞菌检验方法相关问题的探讨[J].食品工程,2019,4:5-7.
- [21] 余明星,郑红艳,汪光.纳氏试剂比色法测定水体中氨氮常见问题与解决办法[J].干旱环境监测,2005,19(2):121-123,126.
- [22] 张帆,李树垚,张子豪,等铜绿假单胞菌检测方法的比较与优化[J].生物技术通报,2018,34(3):67-74.
- [23] 杨俊业,黄玲玲.2018年广东省市售275份包装饮用水及天然矿泉水铜绿假单胞菌污染情况分析及其检测[J].食品安全质量检测学报,2019,10(7):1853-1856.
- [24] 章志超,吴鑫,于帆,等.我国包装饮用水中铜绿假单胞菌检验方法标准问题及其质量控制探讨[J].食品安全质量检测学报,2021,12(10):4257-4262.
- [25] GB 8538-2022,食品安全国家标准饮用天然矿泉水检验方法[S].
- [26] 崔学文,罗慧萍,李增婷,等.基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱在铜绿假单胞菌鉴定中的应用[J].现代预防医学,2016,43(10):1862-1867.
- [27] 谢田刚,王运铎,郑秋月,等.铜绿假单胞菌的 MALDI-TOF-MS 检测方法的建立[J].中国微生态学杂志,2012,24(10):938-940.
- [28] GB 4789.28-2013,食品安全国家标准食品微生物学检验培养基和试剂的质量要求[S].