

宁夏桶装水中铜绿假单胞菌的污染情况、 耐药性及同源性分析

冯秀娟^{*}, 董川, 苏洋, 高俊峰

(宁夏回族自治区食品检测研究院, 宁夏银川 750004)

摘要: 为综合评价宁夏桶装水生产企业铜绿假单胞菌污染情况、耐药性及系统进化关系, 确定污染来源, 提升产品质量, 该研究对企业各生产环节的水样进行铜绿假单胞菌检测, 并采用全自动微生物鉴定系统 (VITEK-2)、基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱仪 (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-time of Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF MS)、16S rRNA 测序法对分离菌株进行鉴定。铜绿假单胞菌的耐药性实验应用微生物全自动鉴定及药敏系统检测, 采用 16S rRNA 基因序列测序构建系统发育树, MALDI-TOF MS 进行同源性分析。结果表明, VITEK-2、MALDI-TOF MS、16S rRNA 鉴定结果与常规方法分离的 24 株阳性菌株鉴定结果 100% 相符。耐药性结果表明, 24 株铜绿假单胞菌中 2 株为耐药菌株, 分别是 5-B-1, 7-C-5, 耐药率为 8.3%, 说明水源性菌株的耐药水平总体偏低。质谱结果表明来自同一地区的阳性菌株亲缘关系较近; 16S rRNA 系统发育表明铜绿假单胞菌分离株与地域不存在明显的相关性, 但同一来源的铜绿假单胞菌属于同一簇, 其来源主要为水源。该研究为桶装水中铜绿假单胞菌的污染溯源积累了数据, 为进一步研究菌种污染溯源提供理论依据。

关键词: 铜绿假单胞菌; 耐药分析; 基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱; 16S rRNA; 同源性分析

文章编号: 1673-9078(2024)06-295-302

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.6.0698

Analysis of Contamination, Drug Resistance, and Homology of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Barreled Water in Ningxia

FENG Xiujuan^{*}, DONG Chuan, SU Yang, GAO Junfeng

(Ningxia Hui Autonomous Region Food Testing Institute, Yinchuan 750004, China)

Abstract: The study objectives were to comprehensively evaluate the pollution situation, drug resistance, and phylogenetic relationship of *Pseudomonas aeruginosa* strains in Ningxia barreled water production enterprises; identify the pollution source; and improve the product quality. Detection of *P. aeruginosa* was conducted in water samples from each production link of the enterprise. The isolates in the water samples were identified using a VITEK-2 microbial identification system, matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), and 16S rRNA gene sequencing. The antimicrobial resistance of *P. aeruginosa* was assessed using a compact VITEK 2 system, a phylogenetic tree was constructed using 16S rRNA gene sequencing data, and homology was analyzed using MALDI-TOF MS. The

引文格式:

冯秀娟, 董川, 苏洋, 等. 宁夏桶装水中铜绿假单胞菌的污染情况、耐药性及同源性分析[J]. 现代食品科技, 2024, 40(6):295-302.

FENG Xiujuan, DONG Chuan, SU Yang, et al. Analysis of contamination, drug resistance, and homology of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from barreled water in Ningxia [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(6): 295-302.

收稿日期: 2023-06-09

基金项目: 宁夏自然科学基金项目 (2022AAC03720)

作者简介: 冯秀娟 (1986), 女, 硕士, 工程师, 研究方向: 食品微生物检测, E-mail: fxj1639@163.com

identification results of the VITEK-2 system, MALDI-TOF MS, and 16S rRNA gene sequencing were 100% consistent with the identification results of the 24 positive strains isolated using conventional methods. Two of the 24 *P. aeruginosa* strains, 5-B-1 and 7-C-5, were drug-resistant, and the drug resistance rate was 8.3%, indicating that the drug resistance level of water-borne strains was low. The mass spectrometry results showed that the positive strains from the same area were closely related. The phylogeny analysis showed that the isolates of *P. aeruginosa* were not related to the geographical region, but the strains of *P. aeruginosa* from the same source were in the same cluster, and the main source of *P. aeruginosa* was water. This study provides accumulated data for the contamination traceability of *P. aeruginosa* in barreled water and the theoretical basis for further research on contamination traceability of bacterial species.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*; drug resistance analysis; matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry; 16S rRNA; homology analysis

水是生命之源,老百姓生活离不开水,为更好的享受生活,越来越多的家庭、学校、企事业单位选择桶装饮用水。目前,饮用桶装水已相当普遍。随之而来的是桶装水相关的质量安全问题报道层出不穷^[1-3]。全国各地包装饮用水的抽检调查结果显示,最突出的不合格检验指标为铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)^[4-7],国内外研究表明^[8-10]包装饮用水中铜绿假单胞菌的检出率较高。铜绿假单胞菌是一种常见的条件致病菌^[11],天然耐药性极强^[12,13],对免疫力低下或丧失免疫力的患者来说具有较高的致病风险^[14,15]。铜绿假单胞菌常见于动物的肠道及人的体表等部位,也分布在空气、水源、土壤等自然环境中^[16-18]。目前,我国对医源性铜绿假单胞菌耐药性的研究比较广泛^[19-21],而对于水源性铜绿假单胞菌的耐药性研究比较少。消费者饮用受污染的瓶装水,尤其是免疫功能低下的患者饮用污染了铜绿假单胞菌的桶装水,可能导致铜绿假单胞菌感染^[22-23]。对铜绿假单胞菌进行耐药性及同源性分析,对污染源的识别和污染检测分析途径的追踪有重要意义^[24]。MALDI TOF MS^[25-27]具有速度快、高通量、低成本的优势,可快速鉴定出微生物类别,也可进行微生物同源性分析。16S rRNA^[28,29]基因序列测序后的同源性分析是细菌分类和鉴定的重要手段,在细菌分类和同源性研究中被广泛应用。

本文采集桶装水生产企业各环节的样品检测铜绿假单胞菌,采用法国梅里埃公司的革兰氏阴性菌药敏卡片检测了阳性分离菌株对14种抗生素的耐药性。利用基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)、16S rRNA基因序列测定方法对检出的铜绿假单胞菌进行同源性分析,旨在初步建立宁夏地区水源性铜绿假单胞菌菌株数据库及其药敏数据库,以期为桶装饮用水生产企业防控铜绿假单

胞菌污染提供理论依据,为市场监管部门有效监管提供参考依据,以保障广大消费群众的饮水安全。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

材料:实验中所用样品产自宁夏五个地市包括银川、吴忠、固原、中卫、石嘴山(覆盖宁夏全区)桶装饮用水生产企业的各个环节。

采样袋;假单胞菌琼脂基础培养基 CN、King's B 培养基、乙酰胺液体培养基、绿脓菌素测定用培养基、营养琼脂、氧化酶试剂、纳氏试剂,北京陆桥技术股份有限公司;VITEK-2 GN13 革兰氏阴性菌药敏鉴定卡及 GN 鉴定卡,法国生物梅里埃公司;细菌基因组 DNA 提取试剂盒;引物,上海生工生物工程技术有限公司合成;质谱样本预处理试剂 α -氰基-4-羟基肉桂酸(α -Cyano-4-Hydroxycinnamic Acid, HCCA),安图生物工程有限公司。

1.2 仪器设备

VITEK-2 Compact 全自动微生物鉴定仪,法国生物梅里埃公司;基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱(MALDI-TOF MS),安图生物工程有限公司;PCR 仪;凝胶成像系统;恒温培养箱(36 ± 1) $^{\circ}\text{C}$;立式自动压力蒸汽灭菌器(GR850DF),致微仪器有限公司;微生物膜过滤系统和配套滤膜;均质器;高速台式冷冻离心机($\geq 7\ 000$ r/min),加热模块(100 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 等。

1.3 试验方法

1.3.1 铜绿假单胞菌的分离纯化与鉴定

样品采集:选择企业不同生产环节采样,水源

水、成品罐、罐装口等部位有水龙头,用酒精棉球对水龙头嘴消毒后,打开水龙头放水 1 min,然后用 500 mL 的无菌采样袋进行采样;盛水的容器桶随机抽取,用 250 mL 0.85% 的无菌生理盐水涮洗容器,将洗液作为检测样品。共采集 14 家企业 138 份样品。水样按照 GB 8538-2016《食品安全国家标准 饮用天然矿泉水检验方法》中 57 的要求进行实验,将 250 mL 水样用孔径为 0.45 μm 的滤膜过滤,将过滤后的滤膜贴在已制备好的 CN 琼脂平板上,平板倒置于 (36 \pm 1) $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 24~48 h,观察结果。(1) 所有显蓝色或绿色(绿脓色素)的菌落,经绿农菌素确证试验,判定为铜绿假单胞菌。(2) 将需验证的产荧光不产绿脓菌素及红褐色不产荧光的可疑菌落进行纯化,分别采用微生物传统方法、VITEK-2、MALDI-TOF MS、16S rRNA 测序法进一步确认。

1.3.2 耐药性分析

采用法国梅里埃公司的革兰氏阴性菌药敏卡片对分离得到的 24 株铜绿假单胞菌进行耐药性分析。选择美国国家临床实验室标准化委员会标准中规定的 14 种抗生素分别为:阿米卡星(Amikacin, AMK)、庆大霉素(Gentamicin, GEN)、头孢吡肟(Cefepime, FEP)、头孢他啶(Cef-tazidime, CAZ)、头孢哌酮(Cefoperazone, CPZ)、头孢唑林(Cefazolin, CEF)、头孢替坦(Cefotetan, CFO)、哌拉西林/他唑巴坦(Tazobactam, TZP)、亚胺培南(Imipenem, IMP)、磺胺甲基异恶唑(Sulfamethoxazole, SMZ)、环丙沙星(Ciprofloxacin, CIP)、左氧氟沙星(Levofloxacin, LVX)、四环素(Tetracycline, TE)和米诺环素(Minocycline, MIN),以铜绿假单胞菌 ATCC 27853、ATCC10145 作为质控菌株。

1.3.3 同源性分析

1.3.3.1 MALDI TOF 分析

将分离的 24 株铜绿假单胞菌分别接种于营养琼脂平板,放置于 (36 \pm 1) $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 24 h。用无菌接种环挑取单个菌落,将其均匀的涂布于 MALDI TOF MS 的样品靶板上,加入 1 μL 裂解液,室温条件下自然晾干,然后,在其表面滴加 1 μL HCCA 基质溶液,待自然晾干后利用 MALDI-TOF MS 进行检测,仪器检测器测得样品分子的分子量后生成特异性的铜绿假单胞菌蛋白质组指纹图谱,并与仪器内的微生物数据库图谱进行比对,从而得

到分离菌鉴定结果。通过软件分析鉴定结果,将所有鉴定为铜绿假单胞菌的蛋白图谱导入图谱数据库进行聚类分析,最终形成聚类分析图谱,进行同源性分析。

1.3.3.2 16S rRNA 基因序列分析

采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取 24 株铜绿假单胞菌及标准菌株的 DNA,采用通用引物 27F/1492R (27F :5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3', 1492R : 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') 扩增 16S rRNA 基因片段,PCR 结束后,配制 1% 琼脂糖凝胶添加 gelred 预染色液,通过电泳检测扩增产物,将 PCR 产物(目标扩增片段为 1 425 bp)送上海生物工程有限公司测序,将测序后的序列在 NCBI 上 BLAST 进行序列比对,采用软件 Clustal X 1.83 及 MEGA 7.0 构建系统进化树。

1.3.4 数据分析

阳性菌检出结果数据分析:检出阳性菌株的数量占到采样总数的百分比,即为阳性率。耐药性结果分析:某一抗生素耐药性的样品数量与总样品数(耐药与敏感)的比值,即为耐药率;敏感性的样品数量与总样品数(耐药与敏感)的比值,即为敏感率。

2 结果与分析

2.1 铜绿假单胞菌的检测

根据表 1 结果可知,采集的 138 份样品中共检出铜绿假单胞菌 24 份,阳性率为 17.4%,各生产环节铜绿的检出率分别是水源水 15.4%,冲洗容器水 12.5%,清洗后容器 30.9%,灌装口水 11.1%。分析数据可知,清洗后容器铜绿的检出率最高,14 家企业 7 家检出铜绿,高达 50%。由此可知容器清洗环节较易出现问题,在生产中要重点关注该环节。水源水和灌装口水环节虽然也检出,但存在偶然性,与企业的规模以及卫生状况有关联。冲洗容器用水环节因受限于企业生产工艺,采集的水样不多,但检出铜绿,表明该环节存在一定风险。

将表 1 中检出的铜绿假单胞菌分离纯化,分别进行编号,其编号的具体信息见表 2。分离纯化后得到的 24 份分离株,1 株为深绿色(12-C-3),其余菌落均为浅绿色,24 株菌均产荧光,未检出红褐色与非蓝色产荧光菌。

表 1 桶装饮用水企业各环节铜绿假单胞菌检测结果

Table 1 Detection results of *Pseudomonas aeruginosa* in every link of barreled drinking water enterprises

企业编号	水源水		冲洗容器水		清洗后容器		精滤后水		灌装口水		瓶盖	
	样品	阳性	样品	阳性	样品	阳性	样品	阳性	样品	阳性	样品	阳性
1	2	0	/	/	5	2	2	0	2	1	/	0
2	2	0	/	/	5	1	2	0	2	0	/	0
3	2	0	/	/	5	4	2	0	/	/	/	0
4	2	1	/	/	/	/	2	0	/	/	/	0
5	2	0	2	1	/	/	2	0	2	0	/	0
6	2	0	2	0	5	0	2	0	2	0	/	0
7	/	/	/	/	5	2	/	/	/	/	5*	0
8	2	0	2	0	5	0	2	0	2	0	5*	0
9	2	0	/	/	5	1	2	0	2	0	5*	0
10	2	0	2	0	5	0	2	0	2	0	5*	0
11	2	0	/	/	5	0	2	0	2	0	5*	0
12	2	2	/	/	5	5	2	0	2	1	5*	0
13	2	0	/	/	5	2	2	0	/	/	5*	0
14	2	1	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
各环节样品总数	26	4	8	1	55	17	24	0	18	2	7	0
各环节阳性率/%	15.4		12.5		30.9		0		11.1		0	
总阳性率/%	17.4											

注：“/”表示未取样检测，“0”表示未检出，“5*”表示一份样品。

表 2 铜绿假单胞菌阳性菌株来源及编号

Table 2 Sources and number of the *Pseudomonas aeruginosa*

水源水	冲洗容器水	清洗后容器	灌装口水
0	/	1-C-2、1-C-4	1-E-1
0	/	2-C-3	0
0	/	3-C-2、3-C-3、3-C-4、3-C-5	/
4-A-2	/	/	/
0	5-B-1	/	0
0	0	0	0
/	/	7-C-1、7-C-5	/
0	0	0	0
0	/	9-C-5	0
0	0	0	0
0	/	0	0
12-A-1	/	12-C-1、12-C-2、12-C-3、	12-E-2
12-A-2	/	12-C-4、12-C-5	
0	/	13-C-2、13-C-3	/
14-A-1	/	/	/

注：编号前面的数字代表企业，字母代表生产环节，后面数字代表同一来源样品。

2.2 耐药性结果分析

药敏结果见表 3，24 株纯化菌对阿米卡星 (AMK)、庆大霉素 (GEN)、头孢吡肟 (FEP)、头孢他啶 (CAZ)、头孢哌酮 (CPZ)、哌拉西林 / 他唑巴坦 (TZP)、亚胺培南 (IMP) 不耐药，对环丙沙星 (CIP)、左氧氟沙星 (LVX) 耐药率分别为 8.3%，4.2%，其中 12-C-4 对环丙沙星中度敏感，对头孢唑林 (CEF)、磺胺甲基异恶唑 (SMZ)、四环素 (TE)、米诺环素 (MIN) 耐药率达 100%，对头孢替坦 (CFO) 耐药率为 95.8%，其中 5-B-1、7-C-5 为 6 重耐药。结果表明：宁夏地区水源性铜绿假单胞菌对 14 种抗生素中 5 种耐药，耐药率达 35.7%，其中大多菌株的耐药性与标准菌株 ATCC27853、ATCC10145 一致，只有 2 株为耐药株，抗生素耐药水平较低，与其它省区耐药性水平偏低结果一致^[14,19]。其次，水中铜绿假单胞菌与院感的铜绿假单胞菌在耐药性上有较大的区别，院感株的耐药性较高^[30]。

表 3 24株铜绿假单胞菌的耐药结果

Table 3 Drug sensitivity of 24 *Pseudomonas aeruginosa* strains

菌株编号	抗生素种类													
	AMK	GEN	FEP	CAZ	CPZ	CEF	CFO	TZP	IMP	SMZ	CIP	LVX	TE	MIN
1-C-2	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S	S	R	R
1-C-4	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S	S	R	R
1-E-1	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S	S	R	R
2-C-3	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S	S	R	R
3-C-2	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S	S	R	R
3-C-3	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S	S	R	R
3-C-4	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S	S	R	R
3-C-5	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S	S	R	R
4-A-2	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S	S	R	R
5-B-1	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R	S	R	R
7-C-1	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S	S	R	R
7-C-5	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R	R	R	R
9-C-5	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S	S	R	R
12-A-1	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S	S	R	R
12-A-2	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S	S	R	R
12-C-1	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S	S	R	R
12-C-2	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S	S	R	R
12-C-3	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S	S	R	R
12-C-4	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	I	S	R	R
12-C-5	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S	S	R	R
12-E-2	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S	S	R	R
13-C-2	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S	S	R	R
13-C-3	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S	S	R	R
14-A-1	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S	S	R	R
ATCC27853	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S	S	R	R
ATCC10145	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S	S	R	R

注: R 表示耐药, S 表示敏感。

2.3 MALDI TOF结果分析

24株菌经MALDI TOF MS测试,其结果均为铜绿假单胞菌,鉴定结果得分大多都在9.4分以上,该结果与传统方法鉴定结果一致。通过将24株铜绿假单胞菌的蛋白质指纹图谱进行聚类分析。24株铜绿假单胞菌的亲缘关系树如图1所示,亲缘关系树分为两大类:A类与B类,其中A类群又分为两类,一类只包含检出的1-E-1,其与标准菌ATCC27853和ATCC15442为一簇,表明该株菌与两株标准菌在蛋白成分上很相似;另一簇的菌株来自3个市区的水厂,其中来自同一地区的阳性菌株亲缘关系较近(如红、蓝框所示),标准菌株CMCC10104与12-C-5(固原市区水厂回收桶)的阳性株亲缘关系近。B类群中除13-C-3外都是同一市区的阳性株,

13-C-3来自回收桶,由此表明回收桶的重复使用不仅引起铜绿假单胞菌的污染,也增加了铜绿假单胞菌异地传播的风险。

2.4 16S rRNA序列分析

从NCBI数据库中下载3株铜绿假单胞菌标准菌株*P. aeruginosa* ATCC 27853 (genebank AF094719.1)、*P. aeruginosa* ATCC 15442 (genebank AF094718.1)、*P. aeruginosa* CMCC(B)10104 (genebank MK341714.1),将其与24株菌测序后的16s rRNA基因序列在NCBI上经过BLAST比对,比对结果显示:铜绿假单胞菌的同源性在99.4%以上。图2是以荧光假单胞菌*Pseudomonas fluorescens* OP493230.1为外群的16S rRNA基因序列系统发生树,从图中可知24株分离株和3

株标准株分成两大类群，A 类群来自三个区域，7-C-5 来自青铜峡市，9-C-5、12-C-1~12-C-5、12-E-2 来自固原市，2-C-3、3-C-2 来自永宁县，其与 ATCC27853、ATCC15442 属同一类群，除 12-E-2 外其余菌株来自回收桶，表明来源相同的菌株亲缘

关系较近，但菌株的分型与地域没有明显的对应关系。本结果与国内报道的结果一致^[19]。B 类群也分布在不同的市区，但水源水中分离的阳性菌 4-A-2、12-A-1、12-A-2、14-A-1 都在该群，表明来自水源的铜绿假单胞菌具有相同的簇。

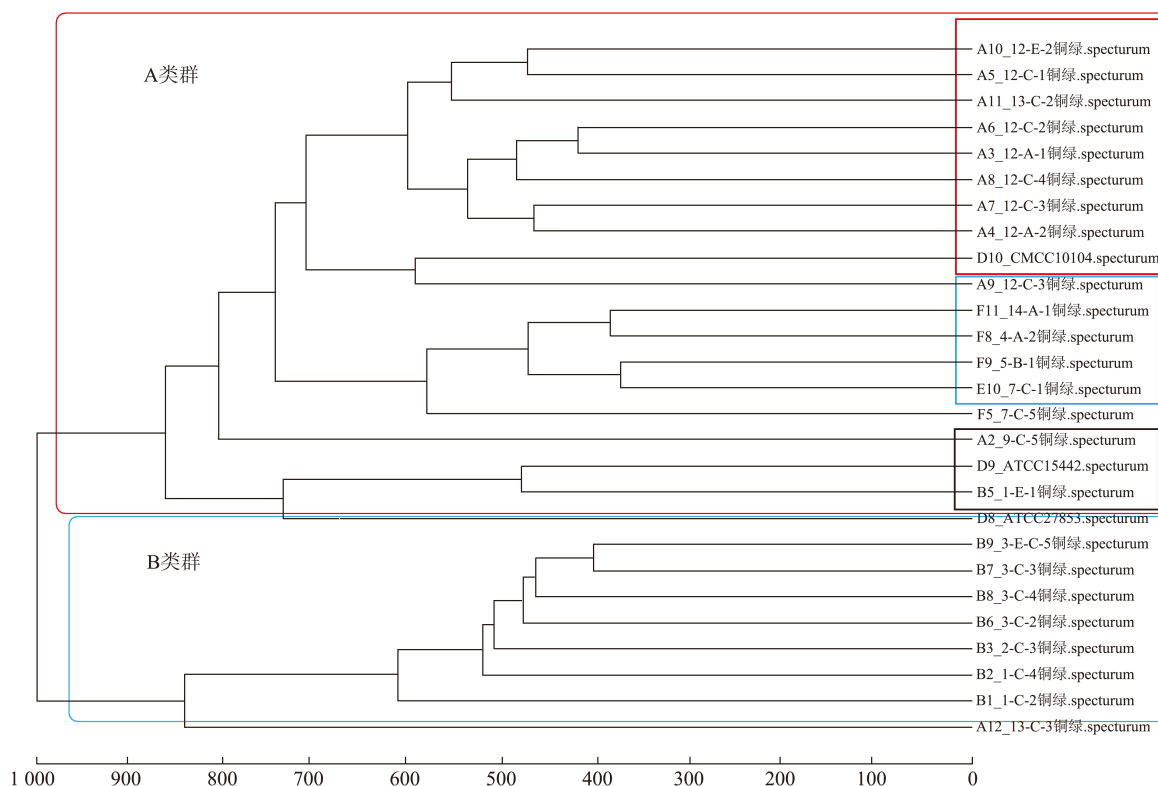


图 1 菌株 MALDI TOF MS 同源性结果

Fig.1 The result of MALDI TOF MS homologyg

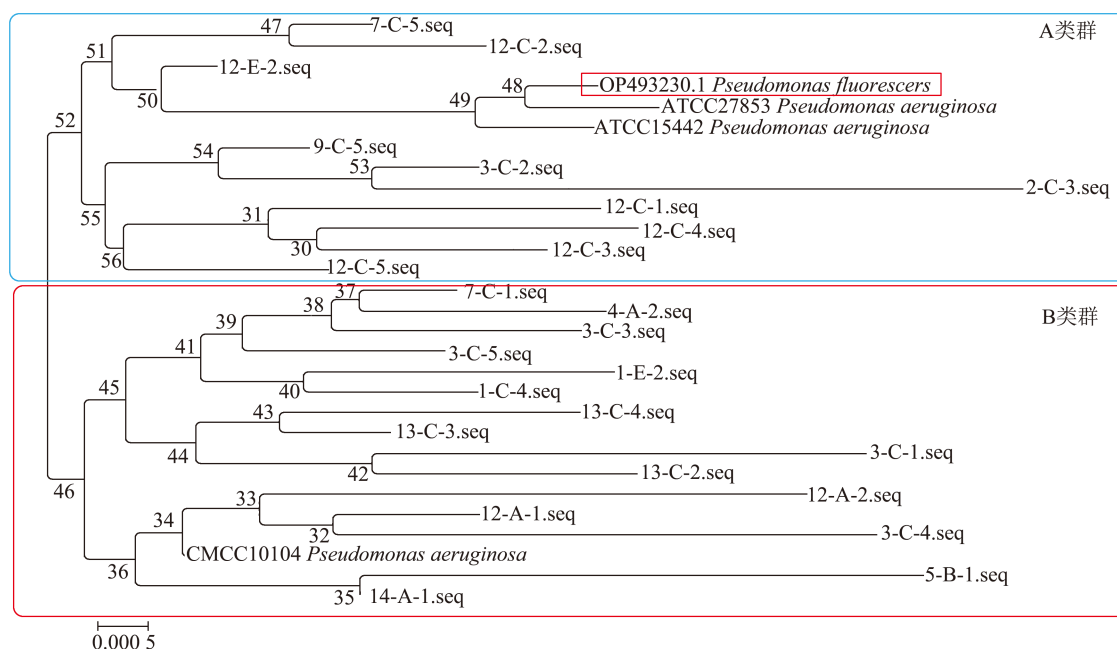


图 2 菌株 16s rRNA 基因测序系统发育树

Fig.2 The phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequencing

3 结论

本研究主要通过对企业水源水、各环节水样中所存在的铜绿假单胞菌进行检测,其中回收桶清洗环节铜绿的检出率最高。究其原因:企业为节省成本,会对水桶进行回收再利用,回收的桶在用前要清洗消毒。部分企业没有配备清洗水桶的专用设备,致使桶消毒不彻底,微生物残留造成交叉污染。配备了清洗水桶专用设备的企业,因设置的清洗程序以及所用的消毒剂的浓度达不到清洗要求,清洗桶用的水没有严格把控,造成污染源。水源水和灌装口环节也有检出,这与企业的规模以及卫生状况相关,也因部分企业的灌装车间的洁净度并未达到万级的要求,环境潮湿、常有积水,铜绿假单胞菌在潮湿环境下容易滋生;生产设备的维护保养不及时、贮水罐和管道无冲洗消毒设施。耐药性分析结果表明宁夏地区水源性铜绿假单胞菌抗生素耐药水平总体偏低,本次分离出2株6重耐药株,这与国内同行报道从水源中分离出多重耐药菌株结果一致。尽管水源性铜绿假单胞菌耐药性远低于临床分离株,但仍要加强关注并监测桶装饮用水中铜绿假单胞菌的耐药情况,以保障广大消费群体的饮水安全。

MALDI TOF MS 具有速度快、高通量、低成本的优势,可快速鉴定出微生物类别,也可进行微生物同源性分析。采用常规手段分离的24株分离株经飞行时间质谱鉴定均100%符合生化鉴定结果。MALDI TOF MS 通过蛋白质指纹图谱进行聚类分析的结果表明,铜绿假单胞菌的分型与地域有明显的对应关系,同一地区分离的铜绿假单胞菌亲缘关系较近,出现地域偏差较大的菌株(如9-C-5)来自回收桶,再次验证重复利用回收桶污染风险较大,可能会引起跨地域的交叉污染。16S rRNA 系统发育分析结果表明其与各标准菌株同源性达99.4%,来源相同的菌株亲缘关系较近,但菌株的分型与地域没有明显的对应关系,这与该法在近亲缘关系的菌株分型上有局限性有关,在一定程度上暴露了该方法在需要进行近亲缘关系菌株分析上存在不足。综上,本研究对检出铜绿假单胞菌的污染环节进行了梳理并分析了污染的原因,收集了宁夏地区水源性铜绿假单胞菌,建立了菌株资源库及药敏数据库。采用铜绿假单胞菌的快速检测方法定期监控水源,确保水源水不受污染;进一步了解水源性铜绿假单胞菌的特性,在回收桶的清洗消毒环节、灌装

及贮存环节优化消毒流程达到消除铜绿假单胞菌的目的,为实现桶装水中铜绿假单胞菌的防控提供技术支持。MALDI TOF MS 与16S rRNA 的同源性分析可以为桶装水中铜绿假单胞菌的污染溯源积累数据。MALDI TOF MS 在蛋白水平上的同源性分析与16S rRNA 在分子水平上的同源性分析结果存在差异,具体原因仍需在后期研究中加大菌株的分析数量进一步确证;同时将分子分型、多重耐药菌株毒力因子分析作为今后的研究重点。

参考文献

- [1] 王文娟,颜瑛,罗玉彬,等.江西省矿泉水和包装饮用水中铜绿假单胞菌污染情况分析[J].中国卫生检验杂志,2017,27(3):124-126.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] 李海丽.2017-2018年茂名地区包装饮用水污染物监测分析[J].食品安全质量检测学报,2019,10(7):1861-1864.
- [5] 袁利杰,耿熠博,秦逸飞,等.2017-2019年河南省包装饮用水抽检结果分析[J].环境卫生学杂志,2020,10(6):579-583.
- [6] 张琼丹,田国梁,崔碧玲,等.2018-2021年东莞市包装饮用水中铜绿假单胞菌污染状况分析[J].中国口岸科学技术,2022,4(11):54-58.
- [7] 张建军,唐轶君,王灿,等.四川省桶装饮用水回收桶中铜绿假单胞菌的污染状况调查[J].食品安全质量检测学报,2019,10(19):6712-6717.
- [8] 魏磊.矿泉水水处理系统微生物安全和危害形成机制研究[D].广州:华南理工大学,2020.
- [9] WEI L, WU Q, ZHANG J, et al. Prevalence and genetic diversity of *Enterococcus faecalis* isolates from mineral water and spring water in China [J]. Front Microbiol, 2017, 8: 1109.
- [10] 侯磊磊,米林锋,陈小凤,等.榆林市包装饮用水中铜绿假单胞菌抽检数据的分析与讨论[J].现代食品,2021(15):154-156.
- [11] HESSE C, SCHULZ F, BULL C T, et al. Genome based evolutionary history of *Pseudomonas* spp [J]. Environ Microbiol, 2018, 20(6): 2142-2159.
- [12] XIAO M I, WANG Y, YANG Q W, et al. Antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* in China: a review of two multicenter surveil lance programmes, and application of revised CLSI susceptibility break points [J]. Int J Antimicrob Agents, 2012, 40(5): 445-449.
- [13] AXENA P. Biofilms: Architecture, resistance, quorum sensing

- and control mechanisms [J]. *Indian J Microbiol*, 2019, 59(1): 3-12.
- [14] 谭慧林,金永生,吴忠红.水中铜绿假单胞菌的能力验证关键点控制[J]. *食品安全导刊*,2020,4:97-98.
- [15] POBIEGA M, MACIAG J, POMORSKA-WESOŁOWSKA M, et al. Urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* among children in southern poland: virulence factors and antibiotic resistance [J]. *J Ped Urol*, 2016, 12(1): 36.
- [16] CRONE S, Lórez M V, KVICH L, et al. The environmental occurrence of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Apmis*, 2019, 128(3): 220-231.
- [17] BOTELHO J, GROSSO F, PEIXE L. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* mechanisms, epidemiology and evolution [J]. *Drug Resistance Updates*, 2019, 44: 26-47.
- [18] AZAM MW, KHAN AU. Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Drug Discovery Today*, 2019, 24(1): 350-359.
- [19] 张娟,綦艳,周臣清,赵玲,等.61株水源性铜绿假单胞菌耐药分析及其16S rRNA系统发育学研究[J]. *食品安全质量检测学报*,2022,13(13):4150-4156.
- [20] 刘艳,王鸣秋,朱必婷,等.包装饮用水中铜绿假单胞菌的耐药分析及同源性研究[J]. *中国酿造*,2019,38(6):132-135.
- [21] 李露,黄延风.铜绿假单胞菌耐药机制研究进展儿科学杂志,2022,28(12):48-51.
- [22] 赵育林,鲍亚玲,于美荣,等.医院铜绿假单胞菌分布及耐药性分析[J]. *中国病原生物学杂志*,2023,18(1):82-85.
- [23] APPANEAL HJ, CAFFREY AR, JIANG L, et al. Antibiotic resistance rates for *Pseudomonas aeruginosa* clinical respiratory and blood stream isolates among the Veterans Affairs Healthcare System from 2009 to 2013 [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2018, 90(4): 311-315.
- [24] 酃娟,董华夏,张珣,等.桶装饮用水中铜绿假单胞菌的污染调查及分型[J]. *食品研究与开发*,2019,40(11): 170-173.
- [25] 田国梁,雷柳冰,李发俊,等.包装饮用水中检出铜绿假单胞菌的同源性分析[J]. *标准学*,2022,5:128-134.
- [26] 白雯静,刘兴国,田妮娜,等.基于基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法的3种中药材中污染菌的快速鉴定[J]. *食品安全质量检测学报*,2021,12(7):2650-2655.
- [27] JANG KS, KIM YH. Rapid and robust MALDI-TOF MS techniques for microbial identification: a brief overview of their diverse applications [J]. *Journal of Microbiology*, 2018, 56(4): 209-216.
- [28] 黄志强,邱景璇,李杰,等.基于16S rRNA基因测序分析微生物群落多样性[J]. *微生物学报*,2021,61(5):1044-1063.
- [29] CARUSO V, SONG XB, ASQUITH M, et al. Performance of microbiome sequence inference methods in environments with varying biomass [J]. *mSystems*, 2019, 4(1): e00163-e00118.
- [30] 邢献国,邢楚茁,刘辉.某院2019-2021年铜绿假单胞菌临床分布及耐药性分析[J]. *临床医学研究与实践*,2023, 8(14):68-71.