不同类型瓶装水中铜绿假单胞菌的数量变化研究

潘 波, 曾志明*, 沈中锋, 毛 勇, 吴 平
(杭州娃哈哈集团有限公司质量监控部, 杭州 310018)

摘 要: 目的 探究室温储存条件下, 不同类型瓶装饮用水中铜绿假单胞菌的数量变化趋势。**方法** 将计数好的铜绿假单胞菌菌悬液分别加入到纯净水、矿物质水、天然深层湖水、天然矿泉水等不同类型的瓶装饮用水中, 跟踪检测保存不同天数后, 水中的菌浓度变化情况。**结果** 纯净水中铜绿假单胞菌的活菌数量在保存期间一直衰减, 且菌的初始浓度低于 2.5×10^5 CFU/250 mL 时, 在保存 90 d 后未检出活菌。矿物质水、天然深层湖水、天然矿泉水中, 虽然铜绿假单胞菌的初始添加数量不一样, 但均先出现一次明显的增长, 然后再迅速下降, 之后虽偶有小幅回升的情况, 但总体呈衰减趋势; 保存 90 d 后, 数量分别为 50、300、2000 CFU/mL。**结论** 铜绿假单胞菌的数量在纯净水中直接衰减; 在含有矿物元素的饮用水中, 菌的数量呈现先增后减的趋势, 并在 3 个月后依然保持较高的菌浓度, 且活菌数量随着矿物元素的种类及浓度的增加而提升。

关键词: 铜绿假单胞菌; 包装饮用水; 矿物元素; 菌浓度

Study on the quantity variation of *Pseudomonas aeruginosa* in different types of bottled water

PAN Bo, ZENG Zhi-Ming*, SHEN Zhong-Feng, MAO Yong, WU Ping
(*Hangzhou Wahaha Group Co., Ltd., Hangzhou* 310018, *China*)

ABSTRACT: Objective To explore the change trend of *Pseudomonas aeruginosa* in different types of drinking water under room temperature storage. **Methods** The counted *P. aeruginosa* suspension was added to different types of drinking water, such as pure water, mineralized water, natural deep lake water and mineral water, then the change of bacteria concentration in water was detected continuously after different days. **Results** The number of *P. aeruginosa* in purified water declined during storage. When the initial concentration was less than 2.5×10^5 CFU/250 mL, no viable bacteria was detected after 90 days of storage. Although the initial amount of *P. aeruginosa* added in mineralized water, natural deep lake water and mineral water was different, there was a significant increase first and then a rapid falling. Despite there were occasional rebounds, it showed a general trend of attenuation. After 90 days of storage, the number of *P. aeruginosa* was 50, 300 and 2000 CFU/mL, respectively. **Conclusion** The number of *P. aeruginosa* declines directly in pure water. While the number of bacteria firstly increases and then decreases, and still remains a high concentration after 3 months in drinking water containing mineral elements. Furthermore, the number of living bacteria increases with the increase of types and concentrations of mineral elements.

KEY WORDS: *Pseudomonas aeruginosa*; drinking water; mineral elements; bacterial concentration

***通讯作者:** 曾志明, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品检测与质量安全控制。E-mail: zengzhiming@wahaha.com.cn

***Corresponding author:** ZENG Zhi-Ming, Master, Engineer, Hangzhou Wahaha Group Company Limited, Hangzhou 310018, China. E-mail: zengzhiming@wahaha.com.cn

1　引　言

铜绿假单胞菌, 又称绿脓杆菌, 属于革兰氏阴性杆菌, 无芽孢, 有单鞭毛, 在自然界中广泛分布, 空气、水、土壤中均有存在, 是重要的水源和食源性致病菌, 具有多种致病因子, 也是人体皮肤、肠道、呼吸道、黏膜上的常见菌, 易导致人类急性肠道疾病和皮肤炎症[1]。此外, 铜绿假单胞菌在形成生物膜后, 对消毒剂、干燥、紫外线等理化因素及不良环境具有较强的抵抗力[2]。产品污染后会出现异味, 并影响产品的理化指标, 如亚硝酸盐、硝酸盐和氮三者相互转化中直接影响亚硝酸盐的含量, 从而造成经济损失[3]。

近几年来, 铜绿假单胞菌污染食品的事例频发[4-6], 其对食品安全的危害逐步引起关注。GB 19298-2014《食品安全国家标准 包装饮用水》[7]删除了菌落总数、霉菌酵母菌等微生物项目, 仅保留了大肠菌群, 增加了对铜绿假单胞菌的检验指标, 并要求水样中不得检出[8]。随着包装饮用水生产和消费数量的不断上升, 产品种类和包装方式也逐渐多样化。铜绿假单胞菌污染包装饮用水的研究逐渐增多, 且其在矿泉水的检出率普遍高于纯净水[9,10], 但该菌在各类型饮用水中的数量变化规律的研究较少。本研究将计数好的铜绿假单胞菌菌悬液分别加入到不同类型的瓶装水中, 检测保存期间水中的菌浓度变化情况, 以期发现不同类型瓶装水中铜绿假单胞菌的变化规律及其影响因素。.

2　材料与方法

2.1　仪器与试剂

三联膜过滤器、膜过滤滤杯(德国 Sartorius 公司); 生化培养箱、立式压力蒸汽灭菌器(上海博讯实业有限公司); II 级生物安全柜(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); ZF-20D 暗箱式紫外分析仪(上海宝山顾村电光仪器厂)。

假单胞菌琼脂基础培养基/CN 琼脂(pseudomonas agar base/CN agar)、绿脓菌素测定培养基、乙酰胺肉汤、金氏 B 培养基、氧化酶试纸、钠氏试剂(青岛高科园海博生物技术有限公司); 细菌用 0.45 μm 过滤膜(美国密理博公司); 盐酸、四氯甲烷(杭州双林化工试剂有限公司)。

2.2　瓶装水样品的采购及检测

从市场购买不同类型的瓶装饮用水, 包括纯净水、矿物质水、天然深层湖水、天然矿泉水各 3 瓶, 每一类型饮用水 3 瓶样品批号一致, 各类型饮用水的理化特征指标见表 1。从各瓶中取出 0.5 L 水样分别至无菌具塞的广口瓶中, 依据 GB8538-2016《食品安全国家标准 饮用天然矿泉水检验方法》[11]检测铜绿假单胞菌, 此外依据 GB4789-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验》[12]检测大肠菌群及菌落总数, 检测后剩余水样作为不加菌液的对照组实验。

表 1　各类型饮用水的理化特征指标
Table 1　Physicochemical characteristics of drinking water

类型	规格/L	pH	离子浓度/(mg/L)
纯净水	4.5	6.8±0.3	/
矿物质水	1.5	7.0±0.5	K^+: 1~10、Mg^{2+}: 0.1~1.0
天然深层湖水	4.0	7.3±0.5	Ca^{2+}: ≥4、Mg^{2+}: ≥0.50、K^+: ≥0.35、Na^+: ≥0.80、H_2SiO_3: ≥1.80
天然矿泉水	4.5	7.5±0.5	Ca^{2+}: 2.0~12.8、Mg^{2+}: 1.2~10.3、K^+: 0.8~4.7、Na^+: 1.7~11.1、H_2SiO_3: 45.3~78.6

2.3　菌悬液的制备及计数

将保存于冻干管中的铜绿假单胞菌活化并划线分离, 挑取单菌落用无菌水制备菌悬液。对菌悬液作 10 倍浓度梯度稀释, 取合适稀释度的悬液 100 μL 涂布于 CN 琼脂平板, 进行菌悬液浓度的计数。

2.4　样品的处理及检测

菌悬液的计数结果为 7.8×10^5 CFU/mL, 分别吸取适量的菌悬液加入各组 3 瓶包装饮用水中, 立即混匀并取样检测样品中铜绿假单胞菌的初始浓度(见表 2), 以评估不同浓度的铜绿假单胞菌在各类型瓶装水中的表现情况。

加入菌的样品均置于无菌室内保存, 室温 20~30 ℃。在保存第一个月, 前 10 d 内每 2 d 检测 1 次, 后续约每周检测 1 次。在保存的第 2~3 个月, 每隔 15 d 检测一次, 直至保存 90 d 结束。取样时, 用 75%酒精棉球对瓶口烧灼消毒后开启, 迅速倒出适量水样至无菌具塞的广口瓶后, 立即封好瓶盖。根据倒出的水样中铜绿假单胞菌的数量变化情况, 可采用 100 μL 涂布法或依次采取 50、100、250 mL 抽滤法检测样品水中的活菌浓度; 每个样品每次同时做 2 次平行检测, 计算均值并分析结果。

3　结果与分析

3.1　各瓶装水样品及对照实验的检测结果

对实验过程中用到的各瓶装水样品依据相关国家标准检测铜绿假单胞菌、大肠菌群、菌落总数, 结果均未检出, 表明各实验样品中初始状态均不含有活菌。在整个实验过程中, 各组的对照实验均未有菌检出。

3.2　纯净水中铜绿假单胞菌的数量变化

纯净水中铜绿假单胞菌的检测, 在浓度高时取 100 μL 样品涂布在 CN 平板表面, 当浓度逐渐下降时, 依次取 50、100、250 mL 抽滤检测, 最终结果都以 250 mL 计算, 结果见表 3。在 90 d 的跟踪检测中, 纯净水的铜绿假单胞菌初始数量虽存在明显差异, 但均以较快的速度开始下降,

尤其在最初的 10 d 时间; 当菌的初始浓度低于 2.5×10^5 CFU/250 mL 时, 最终未检出活菌。在没有营养物质的情况下, 铜绿假单胞菌在纯水中随着储存时间的延长出现快速衰亡, 活菌数量越来越少; 若储存时间足够长, 会一直衰减至不能检出。

表 2 各类型饮用水的菌液接入量及样品的菌浓度
Table 2 Volume of added bacterial suspension and bacterial concentration in drinking water

类型	样品量/L	编号	菌液接入量/mL	样品的菌浓度/(CFU/mL)
纯净水	4.0	1	10	2000
		2	5	1000
		3	0.2	38
矿物质水	1.0	4	2.5	2000
		5	1.5	1200
		6	0.5	380
天然深层湖水	3.5	7	10	2000
		8	5	1200
		9	0.2	78
天然矿泉水	4.0	10	30	5400
		11	15	2800
		12	0.2	40

表 3 纯净水中铜绿假单胞菌的数量变化
Table 3 Quantity changes of *P. aeruginosa* in purified water

放置天数/d	数量变化/(CFU/250 mL)		
	样品 1	样品 2	样品 3
0	500000	250000	9500
2	130000	25000	2500
4	17500	10000	500
8	12500	2500	320
10	5000	1850	260
15	6500	1150	95
22	1800	725	20
30	1200	600	10
45	680	450	7
60	500	400	3
75	360	150	0
90	130	0	0

3.3 矿物质水中铜绿假单胞菌的数量变化

矿物质水中含有 KCl、$MgSO_4$, 铜绿假单胞菌在矿物质水中的前 10 d 先出现增殖, 分别由 2000、1200、380 CFU/mL 增殖到 5300、2330、1490 CFU/mL。10 d 后, 数量先开始出现显著下降, 后续下降趋势变缓; 在第 75~90 d 的时间内, 数量保持相对稳定。在保存 90 d 后, 虽然各瓶矿物质水中铜绿假单胞菌的初始浓度存在较大差异, 但最终浓度均在 50 CFU/mL 左右, 数量基本保持一致(见图 1)。

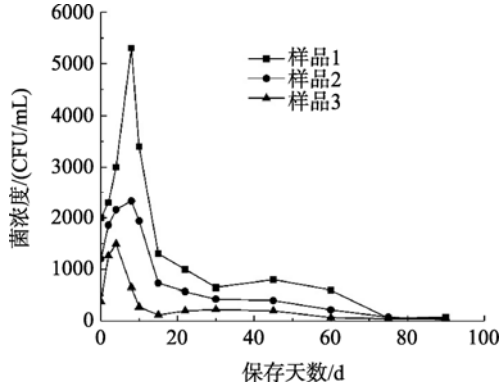

图 1 矿物质水中铜绿假单胞菌的数量变化
Fig.1 Quantity changes of *P. aeruginosa* in mineralized water

3.4 天然深层湖水中铜绿假单胞菌的数量变化

天然深层湖水比矿物质水含有更多种类的矿物元素, 铜绿假单胞菌在天然湖水中的前期先出现一次明显的增殖, 并且菌初始浓度越低, 增殖越明显, 分别由 2000、1200、78 CFU/mL 最高增殖到 6100、12000、15000 CFU/mL (见图 2)。这可能是因为新增殖的菌相比于原始菌, 更适应天然湖水的低营养环境, 所以菌的初始浓度越低, 数量增加的反而更快、更高。在第一次增殖达到顶峰后, 数量开始出现下降, 但紧随着又开始一次幅度较小的上升, 最终一直呈现平缓下降的趋势。在保存 90 d 后, 最终浓度均在 300 CFU/mL 左右, 稍高于矿物质水中的数量。

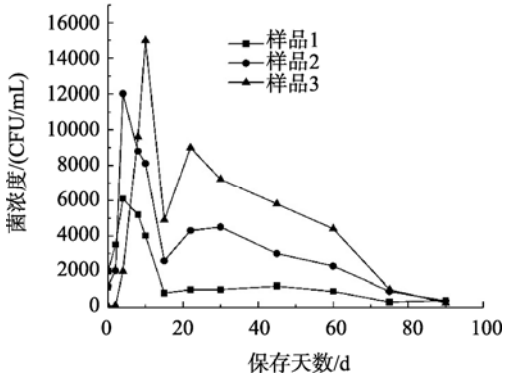

图 2 天然深层湖水中铜绿假单胞菌的数量变化
Fig.2 Quantity changes of *P. aeruginosa* in natural deep lake water

3.5　天然矿泉水中铜绿假单胞菌的数量变化

天然矿泉水中含有的矿物元素与天然深层湖水的矿物元素基本相同, 但浓度要高于深层湖水。铜绿假单胞菌在矿泉水中的前 4 d 出现快速增殖, 数量急剧上升, 分别由 5400、2800、40 CFU/mL 上升至 54000、66000、58000 CFU/mL; 然后在第 6 d 开始快速下降, 之后虽偶有小幅回升, 但总体呈现下降趋势(见图 3)。虽然铜绿假单胞菌在矿泉水中的初始浓度存在较大差异, 但其在矿泉水中的数量上升及下降趋势保持一致。在保存 90 d 后, 最终浓度均在 2000 CFU/mL 左右, 明显高于天然深层湖水中菌的最终数量。

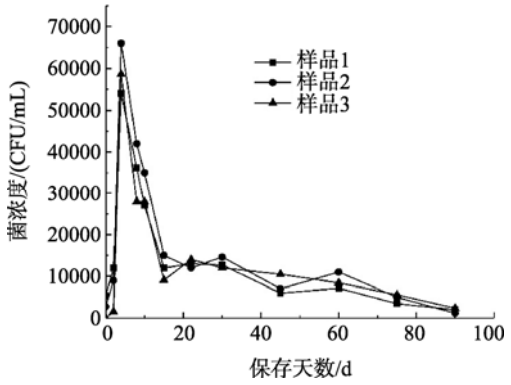

图 3　天然矿泉水中铜绿假单胞菌的数量变化

Fig.3　Quantity changes of *P. aeruginosa* in natural mineral water

4　讨　论

综合比较本实验中铜绿假单胞菌在纯净水、矿物质水、天然深层湖水和矿泉水保存过程的数量变化情况: 除纯净水中铜绿假单胞菌的数量一直降低外, 矿物质水、天然深层湖水、天然矿泉水中铜绿假单胞菌的数量均呈现先增殖后衰减的情况。瓶装饮用纯净水, 由于经过活性炭过滤、二级反渗透、离子交换等方法处理, 水中的矿物质、有机成分等均被除去, 所以水中几乎不含任何营养物质[13]。而天然深层湖水及矿泉水的生产工艺与纯净水有所差异, 仅经过精滤和超滤处理, 溶解物不能被完全处理掉, 许多矿泉水中含 0.1~0.2 mg/L 的溶解有机碳。根据有机碳代谢水平, 假设所有可利用有机碳均为细菌所利用, 理论上可推算出矿泉水中的细菌含量在 1×10^7 CFU/mL[14]。但事实上, 将未经任何处理的水源处的矿泉水装瓶后, 其细菌数量由 1 CFU/mL 左右在 3~7 d 内只增至 10^4~10^5 CFU/mL。这可能是因为矿泉水中的有机碳只有小部分可作为碳源和能源被微生物利用[15], 而有机碳是决定细菌生长和活动的最重要养分, 因此限制了瓶装水中微生物的增殖。马群飞[1]研究表明, 铜绿假单胞菌具备兼性化能自养代谢的能力, 对有机营养要求低, 在瓶装矿泉水中可生长达到 10^4 CFU/mL, 并在接下来的四周内, 细菌数量缓慢下降或长期保持不变。本研究发现铜绿假单胞菌在矿泉水中保存 6 d 后, 菌浓度达到最高值为 6.6×10^4 CFU/mL, 随后出现下降或保持稳定, 与上述文献报道一致。

钾、钙、镁等是细菌生长所必需的微量营养元素, 它们作为细菌的组成成分, 起到调节渗透压、维持酶活性等作用, 对细菌的机体生长、繁殖和各种生理活动都至关重要[16]。郭素菊等[17]发现铜绿假单胞菌在含不同浓度的 Mg^{2+} 培养基中的生长情况与不含 Mg^{2+} 培养基中的生长存在明显差异, $MgSO_4$ 对促进铜绿假单胞菌的生长尤为重要。本研究表明在矿物质水、天然深层湖水、天然矿泉水 3 种类型饮用水中, 尽管铜绿假单胞菌的初始浓度存在差异, 但在保存 90 d 后, 菌的最终浓度在 3 种饮用水中逐步上升, 推测由矿物元素的种类和浓度在这 3 种水系中依次丰富和提高所致。而在同一类型的饮用水中, 虽然铜绿假单胞菌的初始浓度有变化, 但保存 90 d 后, 菌的最终浓度却未存在明显差异, 这表明同一类型水中菌的最终浓度主要取决于矿物质等微量元素, 和菌的初始浓度关系不大。

5　结　论

铜绿假单胞菌在不同类型的包装饮用水中有不同的增殖和衰减趋势, 在纯净水中因缺乏矿物质及有机物质等营养元素, 菌的数量直接呈现衰减。在含有矿物元素的矿物质水、天然深层湖水、天然矿泉水中, 菌的数量先出现一次明显增殖, 然后迅速下降, 之后虽偶有小幅回升, 但总体呈衰减趋势; 在保存 3 个月后仍有活菌存在, 且活菌数量随矿物元素的种类及浓度的增加而提升。

参考文献

[1] 马群飞. 瓶装饮用水铜绿假单胞菌污染研究进展[J]. 微生物学免疫学进展, 2003, 31(2): 95–98.
Ma QF. Research progress on contamination of bottled drinking water by *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Prog Microbiol Immunol, 2003, 31(2): 95–98.

[2] 邓军. 包装饮用水中铜绿假单胞菌的检测方法[J]. 现代食品, 2016, (1): 104–105.
Deng J. Detection method of *Pseudomonas aeruginosa* in packaged drinking water [J]. Mod Food, 2016, (1): 104–105.

[3] 包东东, 牛贵洋. 饮用水中铜绿假单胞菌的污染及控制[J]. 食品安全导刊, 2016, (36): 49.
Bao DD, Niu GY. Pollution and control of *Pseudomonas aeruginosa* in drinking water [J]. China Food Saf Magaz, 2016, (36): 49.

[4] 徐述坚. 桶装饮用水卫生质量状况[J]. 实用预防医学, 2015, (22): 124–126.
Xu SJ. Analysis on the hygienic quality of bottled drinking water [J]. Pract Prev Med, 2015, (22): 124–126.

[5] 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): 45–46.

Shen Y, Yang ZL, Yue F. *Pseudomonas aeruginosa* was detected in food poisoning samples [J]. Zhejiang Prev Med, 2010, (22): 45–46.

[6] 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): 2082.
Yan F, Sui YJ, Sun J, *et al*. Investigation and analysis of food poisoning caused by barreled drinking water pollution among students [J]. Chin J Health Lab Technol, 2011, (21): 2082.

[7] GB 19298-2014 食品安全国家标准 包装饮用水[S].
GB 19298-2014 National food safety standard-Packaging of drinking water [S].

[8] 钟菲菲. 包装饮用水铜绿假单胞菌的污染与预防[J]. 现代食品, 2017, (1): 88–90.
Zhong FF. Contamination and prevention of *Pseudomonas aeruginosa* in packaged drinking water [J]. Mod Food, 2017, (1): 88–90.

[9] 石文松, 胡卓, 罗雨阳, 等. 某市包装饮用水铜绿假单胞菌污染状况分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(4): 757–760.
Shi WS, Hu Z, Luo YY, *et al*. Analysis of the contamination status of *Pseudomonas aeruginosa* in packed drinking water in some city [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(4): 757–760.

[10] 罗绍楠, 戴奕杰, 孙端方. 贵州省包装饮用水中铜绿假单胞菌污染情况分析[J]. 食品安全导刊, 2017, (8): 72–73.
Luo SN, Dai YJ, Sun DF. Survey of *Pseudomonas aeruginosa* contamination in packaged drinking water in Guizhou province [J]. China Food Saf Magaz, 2017, (8): 72–73.

[11] GB 8538-2016 食品安全国家标准 饮用天然矿泉水检验方法[S].
GB 8538-2016 National food safety standard-Test method for drinking natural mineral water [S].

[12] GB 4789-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验[S].
GB 4789-2016 National food safety standard-Food microbiological examination [S].

[13] 马群飞. 瓶装饮用纯净水细菌数量变化规律研究[J]. 食品科学, 2000, (9): 52–54.
Ma QF. The quantitative study of bacteria in bottled purified drinking water [J]. Food Sci, 2000, (9): 52–54.

[14] Nicholas D. Technology of bottled water (3rd Edition) [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2013.

[15] VanderKooij. Growth measurements with *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila* and autochthonous bacteria to determine the biological stability of drinking water [J]. Riv Ital Ig, 1990, 5(6): 375–383.

[16] 文刚. 饮用水处理过程中细菌和生物稳定性变化规律的研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2012.
Wen G. Research on the variation of bacteria and biostability during drinking water treatment processes [D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2012.

[17] 郭素菊, 童和平, 张兴德. 不同离子浓度的硫酸镁对铜绿假单胞菌生长的影响[J]. 陕西医学检验, 1993, (1): 33–34.
Guo SJ, Tong HP, Zhang XD. Effects of magnesium sulfate with different ion concentrations on the growth of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Shanxi J Med Lab Sci, 1993, (1): 33–34.

(责任编辑: 苏笑芳)

作者简介

潘　波, 工程师, 主要研究方向为食品检测与质量安全控制。
E-mail: panb@wahaha.com.cn

曾志明, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品检测与质量安全控制。
E-mail: zengzhiming@wahaha.com.cn