

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 & 检测

杨俊业*, 黄玲玲

(广东产品质量监督检验研究院, 佛山 528300)

摘要: 目的 对广东地区 2018 年市售的包装饮用水及天然矿泉水铜绿假单胞菌污染情况进行分析及检测。**方法** 采用国标《GB 8538-2016 食品安全国家标准饮用天然矿泉水检验方法》对实验室 2018 年抽检的包装饮用水及天然矿泉水进行铜绿假单胞菌项目检测及分析。**结果** 275 份包装饮用水及天然矿泉水中 23 份样品检出铜绿假单胞菌, 总阳性率为 8.36%; 包装饮用水、天然矿泉水的阳性率分别为 9.87%、1.92%; 包装饮用水中桶装水的阳性率为 100%, 共检出 76 株阳性菌株, 菌株形态主要为蓝绿色。**结论** 包装饮用水中铜绿假单胞菌污染状况比天然矿泉水严重, 且集中在桶装包装饮用水中。建议桶装饮用水生产企业采取控制措施, 相关监督部门应加强监督管理。

关键词: 包装饮用水; 饮用天然矿泉水; 铜绿假单胞菌; 污染状况

Analysis and detection of *Pseudomonas aeruginosa* contamination in 275 packaged drinking water and natural mineral water in Guangdong in 2018

YANG Jun-Ye*, HUANG Ling-Ling

(Guangdong Testing Institute of Product Quality Supervision, Foshan 528300, China)

ABSTRACT: Objective To analyze and detect the *Pseudomonas aeruginosa* contamination in packaged drinking water and natural mineral water in Guangdong in 2018. **Methods** The national standard GB 8538-2016 *National standard for food safety testing methods for drinking natural mineral water* was used to test and analyze the *Pseudomonas aeruginosa* in the drinking water and natural mineral water sampled by the laboratory in 2018. **Results** *Pseudomonas aeruginosa* was detected in 23 samples of natural mineral water among 275 samples of packaged drinking water, with a total positive rate of 8.36%. The positive rates of packaged drinking water and natural mineral water were 9.87% and 1.92%, respectively. The positive rate of bottled water in packaged drinking water was 100%, and 76 positive strains were detected in total. The shape of the strains was mainly blue-green. **Conclusion** *Pseudomonas aeruginosa* contamination in packaged drinking water is more serious than natural mineral water and concentrated in bottled packaged drinking water. The barreled drinking water production enterprises should take control measures and relevant supervision departments should strengthen supervision and management.

KEY WORDS: packaging drinking water; drinking natural mineral water; *Pseudomonas aeruginosa*; pollution status

*通讯作者: 杨俊业, 初级工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。E-mail: 345805309@qq.com

*Corresponding author: YANG Jun-Ye, Engineer, Guangdong Testing Institute of Product Quality Supervision, Foshan 528300, China. E-mail: 345805309@qq.com

1 引言

水是生命之本,人类的生存和一切活动都离不开水,但是由于环境日渐恶化、人民生活水平提高及健康意识的增强,人们渴望更洁净的水、更方便的携带方式,于是各种类型的包装饮用水开始出现在人们面前。近年来,市售包装饮用水及天然矿泉水质量问题的检测指标主要集中在微生物、污染物、常规理化等^[1],微生物以铜绿假单胞菌为主要不合格项目^[2-6]。铜绿假单胞菌作为一种重要的水源和食源性致病菌,分布广泛,对不良环境抵抗力强^[7],主要引起抵抗力低下患者的机会感染,对多种抗菌药物有天然耐药性,并可通过各种机制产生多药耐药,给临床治疗带来很大困难^[8]。因此世界卫生组织(world health organization, WHO)编制的《饮用水水质指南》^[9](guidelines for drinking-water quality)第四版中把铜绿假单胞菌作为瓶装水的污染危害指示菌,国家标准 GB 19298-2014《食品安全国家标准包装饮用水》^[10]、GB 8537-2008《饮用天然矿泉水》^[11]也包含了铜绿假单胞菌项目,并且限量为不得检出。

为了解广东地区 2018 年包装饮用水及天然矿泉水中铜绿假单胞菌污染状况,对这一年来实验室抽检的包装饮用水及天然矿泉水样本进行检测分析,并对检测过程产生的问题进行探讨和改进,为其水质安全提供科学依据。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

2.1.1 样品来源

275 份包装饮用水及天然矿泉水为实验室 2018 年抽检样本,样本主要来自广州、中山、佛山等广东地区,其中包装饮用水 223 份(饮用纯净水 95 份、其他饮用水 128 份)、饮用天然矿泉水 52 份。

2.1.2 培养基与试剂

假单胞菌琼脂基础培养基(CN 琼脂)、金氏 B (King's B)培养基、乙酰胺肉汤、绿脓菌素测定用培养基、营养琼脂、氧化酶试剂、钠氏试剂、乙酰胺培养基(广东环凯微生物科技有限公司);革兰氏阴性菌鉴定卡片(GN 卡)(法国梅里埃生物公司)。

2.1.3 仪器设备

微生物过滤支架、无菌滤膜、无菌滤杯(浙江泰林生物技术股份有限公司);隔水式恒温培养箱(上海一恒科学仪器有限公司);VITEK 2 COMPACT 全自动微生物鉴定系统(法国梅里埃生物公司)。

2.2 检验方法

按国标 GB/T 8538-2016《食品安全国家标准饮用天然矿泉水检验方法》^[12]检测样品中的铜绿假单胞菌。采用滤

膜法,将 250 mL 水样用孔径为 0.45 μm 的滤膜过滤,将滤膜移至 CN 琼脂培养基上,于(36 \pm 1) $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养 48 h,观察滤膜上菌落生长情况,可疑菌落选择和验证步骤见表 1。

表 1 在 CN 琼脂上生长的菌落选择和验证步骤
Table 1 Colony selection and verification steps on CN agar

CN 琼脂上生长的菌落形态	乙酰胺肉汤	氧化酶试验	在金氏 B 培养基上产生荧光	判定为铜绿假单胞菌
蓝色/绿色	NT	NT	NT	是
产荧光(非蓝/绿)	+	NT	NT	是
红褐色	+	+	+	是
其他颜色	NT	NT	NT	否

注: NT 表示不用测试。

3 结果与分析

本院 2018 年所检测的包装饮用水和天然矿泉水样品中存在的铜绿假单胞菌污染状况结果见表 2、表 3 和表 4。

2018 年在 275 份包装饮用水和天然矿泉水中检出 23 份铜绿假单胞菌阳性样品,总检出率为 8.36%,其中包装饮用水的阳性样品 22 份,不合格率为 9.87%,天然矿泉水的阳性样品 1 份,不合格率为 1.92%,因此铜绿假单胞菌的检出主要集中在包装饮用水。

根据国标 GB 19298-2014《食品安全国家标准包装饮用水》,包装饮用水分为饮用纯净水和其他饮用水,2018 年 223 份包装饮用水中共检出 22 份铜绿假单胞菌阳性(见表 3),由表 3 看出 2018 年本院所抽包装饮用水中饮用纯净水和其他饮用水总阳性率为 9.87%,其中饮用纯净水为 11.58%、其他饮用水是 8.59%,桶装水阳性率均为 100%,瓶装水阳性率均为 0%,包装饮用水中铜绿假单胞菌的检出主要集中在桶装饮用水。

表 2 2018 年包装饮用水及天然矿泉水中铜绿假单胞菌检测结果
Table 2 Detection results of *Pseudomonas aeruginosa* in packaged drinking water and natural mineral water in 2018

水样类型	样品量	不合格数量	不合格率/%
包装饮用水	223	22	9.87
天然矿泉水	52	1	1.92
合计	275	23	8.36

表 3 2018 年包装饮用水中铜绿假单胞菌检测结果
Table 3 Detection results of *Pseudomonasaeruginosa* in packaged drinking water in 2018

水样类型	样品量	不合格数量	不合格率 /%	桶装水阳性率 /%	瓶装水阳性率 /%
饮用纯净水	95	11	11.58	100	0
其他饮用水	128	11	8.59	100	0
合计	223	22	9.87	100	0

表 4 包装饮用水中 3 种铜绿假单胞菌典型菌落形态
Table 4 Typical colony morphology of 3 kinds of *Pseudomonasaeruginosa* in packaging drinking water

菌落形态	饮用纯净水		其他饮用水	
	阳性菌株数	所占比例 /%	阳性菌株数	所占比例 /%
蓝绿色	37	94.87	30	81.08
非蓝绿色(产荧光)	2	5.13	6	16.22
红褐色	0	0.00	1	2.70
合计	39	100.00	37	100.00

22 份阳性样中共检出 76 株阳性菌株(表 4), 菌株形态主要为蓝绿色, 其中饮用纯净水中检出 37 株蓝绿色菌株(产绿脓色素), 2 株非蓝绿(产荧光), 其他饮用水检出 30 株蓝绿色菌株, 6 株非蓝绿色(产荧光), 1 株红褐色菌株。

4 讨论

(1) 滤膜上菌落的融合现象。主要有两方面的原因, 一是当铜绿假单胞菌污染严重时, 菌落容易融合。二是样品中存在其他杂菌, 当杂菌为优势菌或者数量占优势时, 经培养后, 滤膜上会长满细菌, 不仅掩盖住了铜绿假单胞菌, 且无法判断水样中是否存在铜绿假单胞菌, 更无法对铜绿假单胞菌准确计数^[13]。GB/T 8538-2016^[12]表示在培养至 20~24 h 时观察结果, 防止因培养 40~48 h 导致菌落过分生长而出现菌落融合, 故可在 20~24 h 发现可疑菌落时, 挑取可疑菌落进行下一步确认实验, 同时把 CN 板放回培养箱继续培养观察结果。

另外, 潘孟泉^[13]提出在 42 °C、24 h 铜绿假单胞菌培养生长良好, 把原标准中的(36±1) °C 中培养 24~48 h 调整为 42 °C 培养 24 h, 此方法可以抑制大部分不耐受 42 °C 细菌的繁殖, 缩短培养时间至 24 h 也能有效抑制部分杂菌的生长, 并且对目标菌的生长和辨识没有产生太大的影响, 从而提高铜绿假单胞菌的检出能力, 且能精确计数。

除此之外, 经验证, 在同样的生长环境条件下,

SCDLP 肉汤(soya casein digest lecithin polysorbate broth)与营养肉汤相比, 铜绿假单胞菌在 SCDLP 中的增菌效果更明显^[14], 当发现滤膜上菌落出现融合现象, 且无法分辨是否含有目标菌时, 可把滤膜转移至 SCDLP 中(36±1) °C 增菌培养 24 h 后划线接种 CN 平板, CN 平板(36±1) °C 培养 24 h 后观察是否有可疑菌落, 通过这种选择性增菌和分离的方式, 达到筛选出目标菌的目的, 减少漏检风险, 但是这种方法只能达到定性结果, 无法得到铜绿假单胞菌的准确数量。

(2) 绿色或蓝绿色菌落做绿脓菌素实验, 不一定全是阳性。铜绿假单胞菌产生绿脓菌素需要一定时间, GB/T 8538-2016^[12]表明绿脓菌素实验只需培养(24±2) h, 但经大量实验证明, 有一部分的铜绿假单胞菌按国标方法培养无法做出绿脓菌素阳性, 需要延长培养时间至 48 h, 才能产生绿脓菌素。徐红等^[15]也表示在铜绿假单胞菌生化鉴定的绿脓菌素试验中, 通过延长培养时间, 绿脓菌素色素可以加深, 即 24 h 培养为阴性, 48 h 培养为弱阳性, 72 h 培养为阳性。因此绿色或蓝绿色菌落做绿脓菌素实验, 结果若为阴性, 可以稍微延长培养时间再进行测定。

(3) 某些黄色无荧光的菌落, 按照标准可以判断为非铜绿假单胞菌, 但是纯化后上全自动微生物鉴定系统结果显示为铜绿假单胞菌阳性。郑晶等^[14]和蔡双福等^[16]提出由于自然界中有少数的铜绿假单胞菌不能产生色素, 也可能在特定的食品基质环境中, 细菌的产色素能力降低, 在培养基上不形成黄绿色的典型菌落, 而且铜绿假单胞菌色素的产生因菌株的不同差异明显, 相同菌株色素产生受多种因素影响, 因此不能以菌落颜色来作为唯一的判定标准。

5 结论

包装饮用水中铜绿假单胞菌污染状况比天然矿泉水严重, 且集中在桶装包装饮用水中。在包装饮用水检出的阳性样中, 共检出 76 株阳性菌株, 菌株形态主要为蓝绿色, 建议桶装饮用水生产企业采取控制措施, 相关监管部门加强监督管理。此外, 在实际检测过程中发现国标方法尚存在一些问题或漏洞, 针对这些问题提出修改建议, 为包装饮用水的安全生产提供参考。

参考文献

- [1] 刘青峰. 桶装饮用水主要质量问题及改进措施[J]. 食品安全导刊, 2015, 11(4Z): 70-71.
Liu QF. The main quality problems and improvement [J]. China Food Saf Mag, 2015, 11(4Z): 70-71.
- [2] 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.
Zeng XC, Wang TC, Zhou L, et al. Pollution survey and antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from barreled water in

- Guangdong province in 2015 [J]. *J Food Saf Qual*, 2018, 9(12): 2965–2969.
- [3] 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.
- Zeng GQ, Liu ML, Zeng JW. Contamination situations of *Pseudomonas aeruginosa* in barreled drinking water in Guangzhou from 2016 to 2017 [J]. *J Food Saf Qual*, 2018, 9(9): 2276–2279.
- [4] 何智敏, 黄建萍, 顾俊, 等. 2014年南通市经饮水机后的桶装饮用水抽查结果[J]. *职业与健康*, 2015, 31(22): 49–54.
- He ZM, Huang JP, Gu J, *et al*. Sample results of barreled drinking water after drinking machine in Nantong in 2014 [J]. *Occup Health*, 2015, 31(22): 49–54.
- [5] 王燕梅, 唐震, 乔昕, 等. 江苏省桶装饮用水中铜绿假单胞菌污染情况调查[J]. *中国卫生检验杂志*, 2015, (12): 2019–2020.
- Wang YM, Tang Z, Qiao X, *et al*. Investigation of contamination of *Pseudomonas aeruginosa* in barreled drinking water in Jiangsu [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2015, (12): 2019–2020.
- [6] 周臣清, 张娟, 黄宝莹, 等. 广州市售瓶(桶)装水中铜绿假单胞菌污染现状及其耐药现象研究[J]. *中国酿造*, 2017, 36(12): 168–171.
- Zhou CQ, Zhang J, Huang BY, *et al*. Contamination status of *Pseudomonas aeruginosa* in bottled water and barreled water in Guangzhou and analysis of its antimicrobial resistance [J]. *China Brew*, 2017, 36(12): 168–171.
- [7] 马群飞, 林坚, 陈美兰. 饮用天然矿泉水水源铜绿假单胞菌污染调查[J]. *环境与健康杂志*, 2001, 18(3): 157–59.
- Ma QF, Lin J, Chen ML. Investigation on contamination of *Pseudomonas aeruginosa* in natural mineral water sources for drinking [J]. *J Environ Health*, 2001, 18(3): 157–159.
- [8] 刘德华. 铜绿假单胞菌耐药性及其变迁研究进展[J]. *中华医院感染学杂志*, 2013, 23(19): 4852–4854.
- Liu DH. Research progress on drug resistance and change of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Chin J Nosocomiol*, 2013, 23(19): 4852–4854.
- [9] World Health Organization. Guidelines for drinking-water quality, 4th edition [Z].
- [10] 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 drinking water [S].
- [11] GB 8537-2008 饮用天然矿泉水[S].
GB 8537-2008 Drinking natural mineral water [S].
- [12] GB/T 8538-2016 食品安全国家标准 饮用天然矿泉水检验方法[S].
GB/T 8538-2016 National food safety standards-Drinking natural mineral water [S].
- [13] 潘孟泉. 关于改进饮用天然矿泉水和包装饮用水中铜绿假单胞菌检验方法的研究[J]. *基层医学论坛*, 2018, 22(20): 2830–2831.
- Pan YQ. About improving *Pseudomonas aeruginosa* in drinking natural mineral water and packing drinking water test method research [J]. *Med Forum*, 2018, 22(20): 2830–2831.
- [14] 郑晶, 马骋, 黄晓蓉, 等. 食品中绿脓杆菌检测方法的研究[J]. *食品科学*, 2007, 28(7): 419–424.
- Zheng J, Ma C, Huang XR, *et al*. Study on detection method of *Pseudomonas aeruginosa* in Food [J]. *Food Sci*, 2007, 28(7): 419–424.
- [15] 徐红, 陈丽. 从金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌分离鉴定中分析几个生物学现象[J]. *医学信息*, 2011, 24(8): 3546–3547.
- Xu H, Chen L. Analysis of several biological phenomena in isolation and identification of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Med Inform*, 2011, 24(8): 3546–3547.
- [16] 蔡双福, 周芳梅, 黄楚妮. 水样中绿脓杆菌产色素的初步研究[J]. *现代食品科技*, 2011, 27(6): 640–642.
- Cai SF, Zhou FM, Huang CN. Pigment production by *Pseudomonas aeruginosa* in water [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2011, 27(6): 640–642.

(责任编辑: 苏笑芳)

作者简介

杨俊业, 初级工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。

E-mail: 345805309@qq.com