

大连地区输欧水产企业加工用水中微生物的检测分析

齐欣^{1*}, 闫平平², 崔妍¹, 徐文英¹, 曲世超¹, 田卓¹, 王煜¹

(1. 大连出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 大连 116600; 2. 中检(大连)测试技术有限公司, 大连 116600)

摘要: 目的 针对大连地区输欧水产企业加工用水进行微生物监测, 调查其水质是否存在微生物污染风险。**方法** 依据欧盟新水质指令 98/83/EEC 的要求, 在 50 份水样中分别对细菌总数(22 °C 和 37 °C)、大肠埃希氏菌、肠球菌和铜绿假单胞菌进行检测, 对水样中的风险菌进行分离培养及生化鉴定, 并通过大肠埃希氏菌 *ydiJ* 基因和肠球菌 *ddl* 基因合成特异性引物及探针进行分子生物学方法的验证。**结果** 2 种方法针对风险菌检出阳性结果一致。试验结果发现包含细菌总数(22 °C 和 37 °C)、大肠埃希氏菌和肠球菌在内的微生物指标不合格率为 20%, 部分输欧水产企业没有达到欧盟加工用水的要求。**结论** 要充分认清水产企业加工用水在水产品加工环节中的重要地位, 做到对各个加工环节进行微生物风险监控, 以保证输欧水产品的质量安全。

关键词: 输欧水产企业; 加工用水; 微生物检测

Detection and analysis of microorganism in processing water of aquatic enterprises exported to Europe in Dalian area

QI Xin^{1*}, YAN Ping-Ping², CUI Yan¹, XU Wen-Ying¹, QU Shi-Chao¹, TIAN Zhuo¹, WANG Yu¹

(1. Inspection and Quarantine Technical Center of Dalian Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Dalian 116600, China; 2. China Inspection & Certification Group Testing Technology (Dalian) Co., Ltd, Dalian 116600, China)

ABSTRACT: Objective To carry out microbial monitoring of processing water used in aquatic production enterprises in Dalian, and investigate whether there is microbial contamination risk in water quality. **Methods** According to the requirements of the EU New Water Quality Directive 98/83/EEC, the total number of bacteria (22 °C and 37 °C), *Escherichia coli*, *Enterococcus* and *Pseudomonas aeruginosa* were detected in 50 water samples, respectively. The risk bacteria in the sample were isolated, cultured and biochemically identified, and verified by molecular biological methods by synthesizing specific primers and probes of *Escherichia coli ydiJ* gene and *Enterococcus ddl* gene. **Results** The 2 methods were consistent with the positive results for the risk bacteria. The test results showed that the microbiological index unqualified rate including the total number of bacteria (22 °C and 37 °C), *Escherichia coli* and *Enterococcus* was 20%, and some European aquatic products companies did not meet the requirements of EU processing water. **Conclusion** It is necessary to fully understand the important role of processing water in aquatic enterprises in the processing of aquatic products, and to carry out microbiological risk monitoring on various processing links to ensure the quality and safety of aquatic products exported to Europe.

KEY WORDS: aquatic enterprises exported to the European Union; processing water; microbiological testing

*通讯作者: 齐欣, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全与检测。E-mail: 110697186@qq.com

*Corresponding author: QI Xin, Master, Engineer, Inspection and Quarantine Technical Center of Dalian Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Dalian 116600, China. E-mail: 110697186@qq.com

1 引言

大连是我国输欧水产品主要产地之一,随着出口外汇的创收,水产品对大连地区的经济起着举足轻重的作用。在水产企业加工生产过程中,为了能够更好地保障产品质量安全,满足加工行业越来越高的品质要求,必须对各个加工环节加强监督管理,防止某些水产加工企业因忽视加工用水的水质管理及监测而发生意想不到的微生物质量安全事故^[1]。因此,加工用水作为最基础的水产品生产原料之一,其好坏对产品的质量起着至关重要的作用,并且影响着整个产品的质量^[2,3]。

在输欧水产企业加工用水的检测中,微生物污染是造成水质不合格的主要因素^[4]。欧共体理事会发布的新水质指令(98/83/EEC)^[5]中要求所有输往欧盟市场的水产加工企业,每年必需对加工用水进行水质验证,并定期向欧盟食品安全管理组织提供水质检测报告,否则欧盟市场不允许对其出口水产品^[6]。指令中规定,用于瓶装或桶装饮用水中微生物检测包括 4 项指标,其中细菌总数(22 °C)限量值为 100 CFU/mL、细菌总数(37 °C)限量值为 20 CFU/mL,大肠埃希氏菌、肠球菌、铜绿假单胞菌均为不得检出。

本研究针对大连地区输欧水产企业加工用水进行了微生物监测,通过监测结果使水产企业了解自身加工用水是否受到了微生物污染,如被微生物污染如何采取有效措施降低风险源,防止水产企业由于加工用水微生物污染而导致产品质量问题被停止输欧,同时也为加工企业避免了经济上的损失。

2 材料和方法

2.1 材料

2.1.1 样品来源

收集 2019 年 4 月大连地区输欧水产企业加工用水水样共计 50 份。按照欧盟指令微生物采样要求先用酒精灯烧水龙头端口,水流流出 5 min 后再进行采集,每份样品取水量总计约 1 L,样瓶必须在(5±3) °C 下运输和储存,保证样瓶在 3 h 之内完成送检和检测工作。

2.1.2 试剂及培养基

大肠埃希氏菌(CICC 10389)、粪肠球菌(CICC 21606)、屎肠球菌(CICC 10840)(中国工业微生物菌种保藏管理中心)。

酵母提取物琼脂(yeast extract agar)、slanetz 和 bartley 培养基(slanetz and bartley medium)、假单胞菌培养基(*Pseudomonas* agar base)、假单胞菌 C-N 选择性添加剂(*Pseudomonas* C-N selective supplement)(英国 OXOID 公司);CCA 显色培养基(chromogenic coliform agar,法国科马嘉公司);肠球菌琼脂(*Enterococcus* agar)、营养肉汤(nutrient broth, NB,北京陆桥公司);细菌基因组 DNA 提取试剂盒

(北京天根生物公司);实时荧光 qPCR 预混液(美国 ABI 公司);特异性引物探针(上海生工生物工程股份有限公司);VITEK2 革兰氏阴性细菌鉴定卡、VITEK2 革兰氏阳性细菌鉴定卡(法国生物梅里埃公司)。

2.1.3 设备

CL-40M 高压灭菌锅(日本 ALP 公司);Milliflex plus 微生物过滤检测仪(美国赛多利斯公司);BD115 E3.1 生化培养箱(德国 BINDER 公司);NU-425-400E 生物安全柜(美国 NUAIRE 公司);VITEK 2 Compact 全自动细菌鉴定系统(法国生物梅里埃公司);7500 实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)。

2.2 方法

2.2.1 细菌总数检测

参照 ISO 6222-1999 标准^[7],样品需要分别进行 37 °C 和 22 °C 细菌总数的检测,针对不同温度检测需以无菌操作吸取 1 mL 充分混匀的水样,加入灭菌培养皿中,选择适宜的稀释度,每个稀释度 2 个平行,同时做空白实验,倾注 15~20 mL 45 °C 的酵母提取物琼脂转动混匀,细菌总数(37 °C)培养 44 h,细菌总数(22 °C)培养 68 h。

2.2.2 大肠埃希氏菌、肠球菌和铜绿假单胞菌检测

参照 ISO 9308-1:2014 标准^[8]、ISO 7899-2:2000 标准^[9]和 ISO 16266-2008 标准^[10],将 250 mL 水样进行过滤处理,水样中的细菌截留在 0.45 μm 的过滤膜上。大肠埃希氏菌在 CCA 显色培养基上 36 °C 培养 24 h;肠球菌在 slantz and bartley 平板上 36 °C 培养 44 h;铜绿假单胞菌在添加假单胞菌 C-N 选择性添加剂的假单胞菌培养基平板上 36 °C 培养 44 h。

经培养后,50 份水样中 1 份水样疑似存在大肠埃希氏菌,4 份水样疑似存在肠球菌,需要通过确证试验进行证实。

2.2.3 生化鉴定

大肠埃希氏菌:挑取滤膜上典型菌落进行镜检及生化鉴定,生化鉴定参照 VITEK 2 革兰氏阴性细菌鉴定卡说明进行具体操作。

肠球菌:将有典型菌落的滤膜以无菌操作转移至 44 °C 的肠球菌琼脂平板上,44 °C 培养 2 h 后观察培养基变化。挑取单菌落进行镜检及生化鉴定,生化鉴定参照 VITEK 2 革兰氏阳性细菌鉴定卡说明进行具体操作。

2.2.4 实时荧光定量 PCR 验证试验

DNA 模板的制备:将样品分离纯化后所得的单菌落用营养肉汤进行增菌,收集菌体后参照试剂盒操作说明提取 DNA 模板。

引物及探针的合成:大肠埃希氏菌 *ydiJ* 基因上游引物 5'-ATT TGG CGA AAA TGG CAG TAA C-3',下游引物 5'-CAG CTA TTA CGA TGC GCA AGT G-3',探针 5'-FAM-TGG AAA CCT AAT TTT TCG ACC AGA CGG A-BHQ1-3'^[11];粪肠球菌 *ddl* 基因上游引物 5'-GAA AGA TGT CGC TTT CTA TGATTA

TGA-3', 下游引物 5'-GCG ACT TAA GCC ACT TCC ATC TA-3', 探针 5'-FAM-ATG CAA ATC CCA GCG CAT GTT CC-BHQ-3'^[12]; 尿肠球菌 *dll* 基因上游引物 5'-GAAAGA TGT CGC TTT CTA TGA TTA TGA -3', 下游引物 5'-CCG GCT CAA TCC GCT TCC ACC TA-3', 探针 5'-HEX-ATG CAG ATT CCA GCC GAA GTG CC-BHQ-3'^[13]。

目的基因扩增: 反应体系为 qPCR 预混液 10 μL、10 μmol/L 上下游引物各 0.4 μL 及探针 0.2 μL、DNA 模板 2 μL, 加去离子水至 20 μL。反应条件为 50 °C 2 min; 95 °C 10 min; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 共 40 个循环。反应结束后, 依据扩增曲线 Ct(cycle threshold)值判断结果是否为阳性。

3 结果与分析

3.1 细菌总数检测结果

培养后, 可参照 GB 4789.2-2016^[14]中的计算方法, 分别计算 37 °C 和 22 °C 细菌总数。50 份水样中细菌总数(22 °C)超过规定限量值 6 份, 细菌总数(37 °C)超规定限量值 3 份, 具体超限量数值参见表 1。

3.2 生化鉴定结果

样品的菌落特征及 VITEK 2 生化鉴定结果见表 2。样

品 M-19-02124 的分离菌在 CCA 培养基上为蓝色菌落(如图 1 所示), 镜检为革兰氏阴性无芽胞杆菌; 样品 M-19-02107、M-19-02113、M-19-02138、M-19-02140 的分离菌在 slantetz and bartley 琼脂平板上为紫红色凸起圆形菌落(如图 2 所示), 在肠球菌平板上分离菌使周围培养基变黑(如图 3 所示), 4 个样品镜检均为革兰氏阳性短链状球菌。通过 VITEK 2 全自动细菌鉴定系统鉴定的结果均为阳性。通过菌落特征及生化鉴定结果初步判定大肠埃希氏菌和肠球菌的存在。

表 1 细菌总数超限量数值

样品编号	37 °C 细菌总数值/(CFU/mL)	22 °C 细菌总数值/(CFU/mL)
M-19-02109	450	250
M-19-02116	60	570
M-19-02121	70	207
M-19-02127	/	265
M-19-02140	/	131
M-19-02152	/	450

注: M 表示微生物实验室检测; 19 表示年份; 00001 表示样品流水号。

表 2 样品的菌落特征及生化鉴定结果

Table 2 Colony characteristics and biochemical identification results of the samples

样品编号	CCA 显色平板	琼脂平板	肠球菌平板	VITEK 鉴定结果(可信用)
M-19-02124	蓝色菌落	/	/	大肠埃希氏菌 <i>Escherichia coli</i> (99%)
M-19-02107	/	紫红色凸起圆形菌落	周围培养基呈黑色	尿肠球菌 <i>Enterococcus faecium</i> (97%)
M-19-02113	/	紫红色凸起圆形菌落	周围培养基呈黑色	粪肠球菌 <i>Enterococcus faecalis</i> (96%)
M-19-02138	/	紫红色凸起圆形菌落	周围培养基呈黑色	粪肠球菌 <i>Enterococcus faecalis</i> (98%)
M-19-02140	/	紫红色凸起圆形菌落	周围培养基呈黑色	尿肠球菌 <i>Enterococcus faecium</i> (95%)

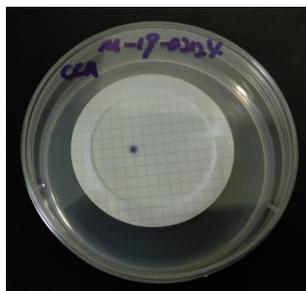


图 1 编号 M-19-02124 样品在 CCA 显色培养基上的菌落特征
Fig.1 Colony morphology of sample M-19-02124 control in chromogenic coliform agar

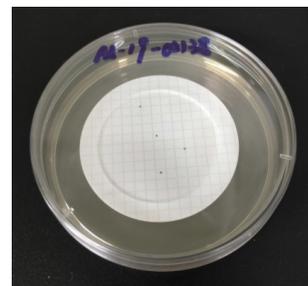


图 2 编号 M-19-02138 样品在 Slantetz and bartley 平板上的菌落特征
Fig.2 Colony morphology of sample M-19-02138 control in slantetz and bartley medium

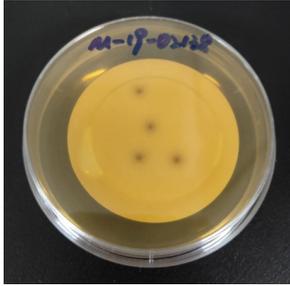
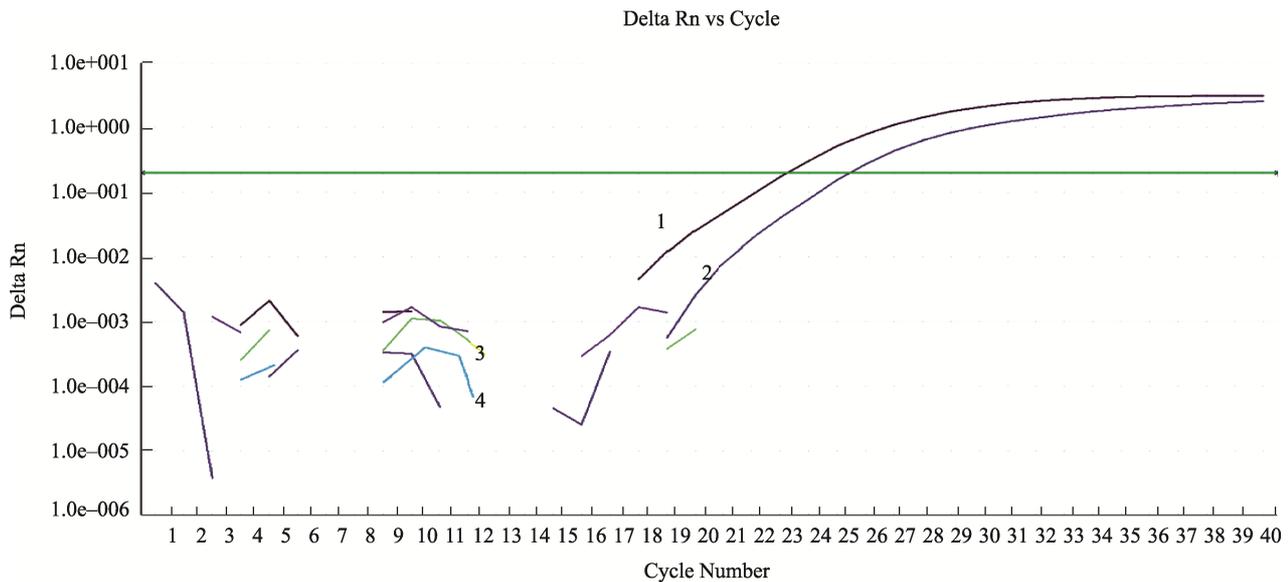


图 3 编号 M-19-02138 样品在肠球菌平板上的菌落特征
Fig.3 Colony morphology of sample M-19-02138 control in *Enterococcus* agar

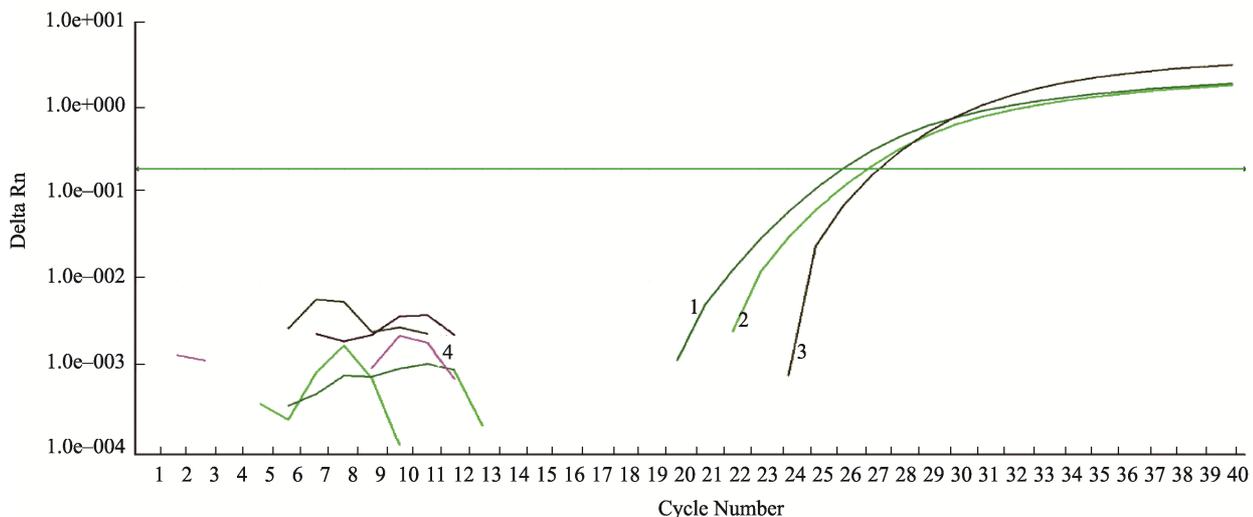
3.3 实时荧光定量 PCR 反应结果

应用实时荧光定量 PCR 仪对初步判定为大肠埃希氏菌和肠球菌的菌株进行验证试验, 结果见图 4~6。如图可见, 阴性对照和空白对照均无扩增曲线, CICC 10389 大肠埃希氏菌、CICC 21606 粪肠球菌和 CICC 10840 屎肠球菌阳性对照均有明显的扩增曲线(Ct 值分别为 23.20、25.97、26.53), 说明本次试验结果有效。编号为 M-19-02124、M-19-02138、M-19-02113、M-19-02107 和 M-19-02140 的样品均出现明显的扩增曲线(Ct 值分别为 25.41、26.86、27.25、27.62、31.95), 结果表明检测结果均为阳性(Ct 值<35)。



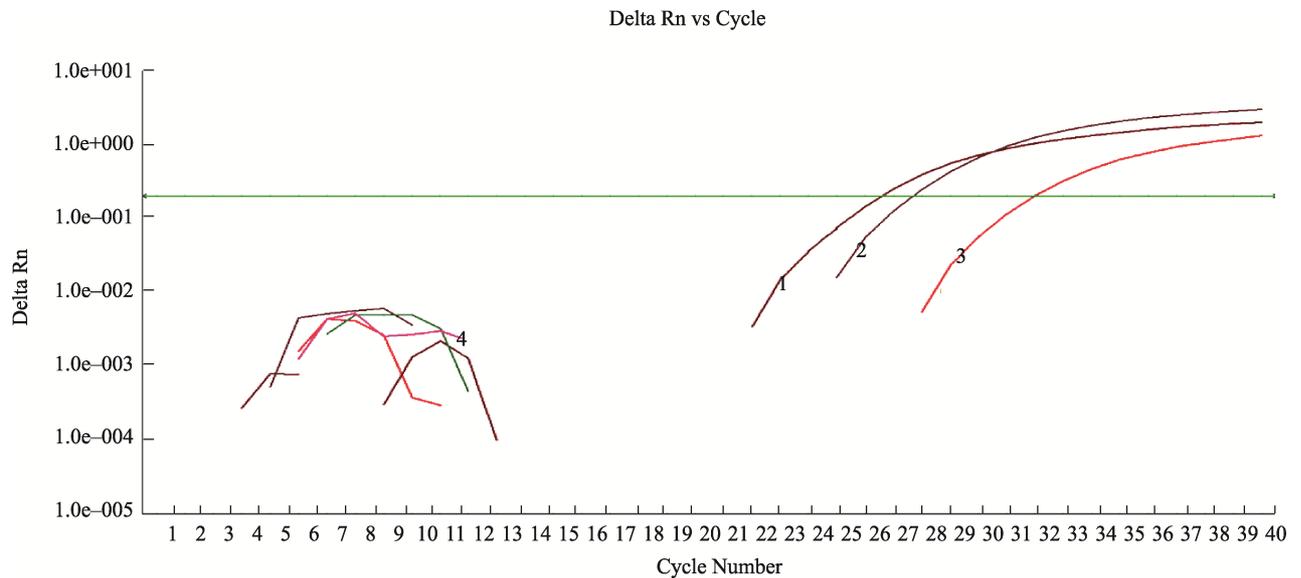
注: 1 为 CICC 10389 大肠埃希氏菌阳性对照; 2 为编号 M-19-02124 的样品中大肠埃希氏菌疑似菌株; 3 为阴性对照; 4 为空白对照。

图 4 大肠埃希氏菌实时荧光 PCR 反应结果
Fig.4 Real-time PCR results of *Escherichia coli*



注: 1 为 CICC 21606 粪肠球菌阳性对照; 2 为编号 M-19-02138 的样品中粪肠球菌疑似菌株; 3 为编号 M-19-02113 的样品中粪肠球菌疑似菌株; 4 为阴性对照; 5 为空白对照。

图 5 粪肠球菌实时荧光 PCR 反应结果
Fig.5 Real-time PCR results of *Enterococcus faecalis*



注: 1 为 CICC 10840 屎肠球菌阳性对照; 2 为编号 M-19-02107 的样品中屎肠球菌疑似菌株; 3 为编号 M-19-02140 的样品中屎肠球菌疑似菌株; 4 为阴性对照; 5 为空白对照。

图 6 屎肠球菌实时荧光 PCR 反应结果

Fig.6 Real-time PCR results of *Enterococcus faecium*

4 结论与讨论

针对欧共体理事会发布的新水质指令(98/83/EEC)^[5]中规定, 输欧水产企业加工用水的水质必须符合欧盟水质要求。本次试验中涉及的 50 份加工用水样本中, 经过生化鉴定及实时荧光 PCR 定性方法验证, 结果表明两种方法针对风险菌检出阳性结果一致。其中细菌总数不合格样本 5 份, 细菌总数不合格和大肠埃希氏菌阳性结果样本 1 份, 肠球菌阳性结果样本 4 份, 不合格率达 20%。

大肠埃希氏菌和肠球菌易造成人畜共患病的发生, 同时也易造成加工用水、食品和环境的污染, 两者现已成为人和动物非常重要的条件性致病菌, 并且此类致病菌即便短时期处于高浓度状态也可以显著增加水源性疾病的风险^[15,16]。所以, 要充分的认清水在水产品加工环节中的重要地位。通过本次 2019 年春季输欧水产企业加工用水微生物监测情况可看出, 大连地区部分输欧企业加工用水的质量还没有完全达到欧盟加工用水的要求, 带菌率较高。并且随着天气的炎热, 大连地区这种海洋性气候更有利于细菌的生长繁殖, 也更易导致输欧水产品的质量, 给企业带来直接经济损失, 不利于行业发展^[17]。因此, 建议具有水质微生物检测资质的检测机构定期开展水产企业交流会, 对生产过程中水质需要注意的微生物污染点、控制点和检测标准进行讲解, 以便水产企业能更好的监控微生物污染情况。同时, 水产企业自身应充分认识到加工用水微生物检测的重要性, 了解最新欧盟法律法规及标准的动态, 加强交流学习和增加培训机会, 也应对食品加工用水进行

自检自控, 建立加工用水质量控制程序, 确保在加工用水、水产原料、过程产品和最终产品的各个环节均进行微生物风险监控, 如发生微生物污染也能快速有效的找到风险源并进行及时控制。望水产企业能通过以上措施保障加工用水的安全, 只有“水”安全才能保证出口产品的品质和质量, 降低微生物污染风险的同时水产企业经济损失也得到了有效的降低。

参考文献

- [1] 苏莉莉. 水源污染与食品安全[J]. 中国医药指南, 2009, 7(13): 117-118. Su LL. Water pollution and food safety [J]. Guide Chin Med, 2009, 7(13): 117-118.
- [2] 阮国洪. 水环境中微生物的分析进展[J]. 中国人兽共患病杂志, 2003, 19(5): 119-124. Ruan GH. Advanced strategy for microorganisms in aquatic environment [J]. Chin J Zoon, 2003, 19(5): 119-124.
- [3] 刘静, 叶劲, 谢海英. 强化消毒法对水中粪肠球菌灭活效果研究[J]. 供水技术, 2011, 5(5): 12-14. Liu J, Ye J, Xie HY. Inactivation effect of *Enterococcus faecalis* in water by enhanced disinfection method [J]. Water Technol, 2011, 5(5): 12-14.
- [4] 苗锐. 食品加工用水微生物检测的重要性[J]. 科技创新导报, 2018, 31: 148-149. Miao R. Importance of microbiological testing of food processing water [J]. Sci Technol Innov Her, 2018, 31: 148-149.
- [5] EU. Council directive 98-83-EC on the quality of water intended for human consumption [S].
- [6] 唐静, 姜英辉, 赵淑娟, 等. 食品加工用水微生物检测的重要性[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(12): 3906-3910. Tang J, Jiang YH, Zhao SJ, et al. Importance of microbiological testing of

- food processing water [J]. *J Food Saf Qual*, 2014, 5(12): 3906–3910.
- [7] ISO 6222-1999 Water quality -Enumeration of culturable micro-organisms-Colony count by inoculation in a nutrient agar culture medium [S].
- [8] ISO 9308-1: 2014 Water quality-enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria-Part 1: Membrane filtration method for waters with low bacterial background flora [S].
- [9] ISO 7899-2: 2000 Water quality-Detection and enumeration of intestinal enterococci - Part 2: Membrane filtration method [S].
- [10] ISO 16266-2008 Water quality-Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa*-Method by membrane filtration [S].
- [11] 胡朝友. TaqMan 探针荧光 PCR 法定量检测水中大肠埃希氏菌方法建立和应用[D]. 苏州: 苏州大学, 2014.
Hu HY. Development of a real-time qPCR Method (TaqMan probe based) for detection and enumeration of *Escherichia coli* in water [D]. Suzhou: Suzhou University, 2014.
- [12] 任月. 应用实时荧光定量 PCR 方法检测肠球菌的研究[D]. 大连: 大连医科大学, 2007.
Ren Y. The study of detection and quantification of *Enterococci* by real-time quantification PCR [D]. Dalian: Dalian Medical University, 2007.
- [13] 金东, 于波, 叶长芸, 等. 屎肠球菌 TaMan 荧光定量 PCR 检测方法的研究[J]. 中国人兽共患病杂志, 2013, 29(6): 551–555.
Jin D, Yu B, Ye CY, *et al.* TaqMan real-time PCR detection of *Enterococcus faecium* [J]. *Chin J Zoon*, 2013, 29(6): 551–555.
- [14] GB 4789.2-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定[S].
GB 4789.2-2016 National food safety standard-Food microbiological examination-Aerobic plate count [S].
- [15] 刘永安, 李雪瑞, 周建华, 等. 一株羊源致病性屎肠球菌的分离鉴定及耐药性分析[J]. 中国畜牧兽医, 2017, 44(2): 530–537.
Liu YA, Li XR, Zhou JH, *et al.* Isolation, identification and drug resistance analysis of pathogenic *Enterococcus faecium* of sheep [J]. *Chin Anim Husb Vet Med*, 2017, 44(2): 530–537.
- [16] 世界卫生组织饮用水水质标准[S].
World health organization drinking water standards [S].
- [17] 刘耀东, 张立军. 舟山海岛水产品出口加工企业生产用水水质检测[J]. 预防医学论坛, 2000, 6(3): 246.
Liu YD, Zhang LJ. Inspection of production water Quality of island aquatic products export processing enterprise in Zhoushan [J]. *Lit Inf Prev Med*, 2000, 6(3): 246.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



齐欣, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全与检测。
E-mail: 110697186@qq.com