

# 矿泉水中铜绿假单胞菌的测定能力验证结果分析

韦云, 陈佩虹, 周露\*

(广东省食品检验所, 广州 510435)

**摘要:** **目的** 分析矿泉水中铜绿假单胞菌检测能力验证(ACAS-PT 736(2019))的结果。**方法** 根据能力验证指导书, 并参照 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》对样品进行稀释, 依据 GB 8538-2016《食品安全国家标准 饮用天然矿泉水检验方法》对可疑菌落进行鉴定, 同时对可疑菌落使用 VITEK2 进行辅助鉴定。**结果** 样品 19-P383 检测结果为 7800 CFU/250 mL, 样品 19-Q333 检测结果为 8800 CFU/250 mL。本次能力验证 Z 值分别为 -0.8、-0.1、|Z| 均小于 2, 检测结果满意。**结论** 本实验室具备检测铜绿假单胞菌的能力, VITEK2 对可疑菌落进行辅助鉴定的准确性也得到了验证。

**关键词:** 能力验证; 铜绿假单胞菌; VITEK2; 矿泉水

## Proficiency testing results analysis of determination of *Pseudomonas aeruginosa* in mineral water

WEI Yun, CHEN Pei-Hong, ZHOU Lu\*

(Guangdong Institute of Food Inspection, Guangzhou 510435, China)

**ABSTRACT: Objective** To analyze the results of the proficiency testing (ACAS-PT 736 (2019) of *Pseudomonas aeruginosa* in mineral water. **Methods** Samples were diluted according to the proficiency test guidance and GB 4789.2-2016 *National food safety standard-Food microbiological inspection total colony determination*. Suspicious colonies were identified according to GB 8538-2016 *National food safety standard-Test method for drinking natural mineral water*, and VITEK2 was used for auxiliary identification of suspicious colonies at the same time. **Results** The test result of sample 19-P383 was 7800 CFU/250 mL, and the test result of sample 19-Q333 was 8800 CFU/250 mL. The test results were satisfactory as the Z values of the proficiency test were -0.8, -0.1, and |Z| were less than 2. **Conclusion** This laboratory has the ability to detect *Pseudomonas aeruginosa* in mineral water, and the accuracy of VITEK2's auxiliary identification of suspicious colonies has been verified.

**KEY WORDS:** proficiency testing; *Pseudomonas aeruginosa*; VITEK2; mineral water

## 1 引言

铜绿假单胞菌原称绿脓杆菌。在自然界分布广泛, 是土壤中存在的最常见的细菌之一, 可在各种水、空气、

正常人的皮肤、消化道和呼吸道等存在<sup>[1]</sup>。铜绿假单胞菌是一种常见的条件致病菌, 可在水中及含水量较高的食品中存活, 对于干燥、消毒剂、紫外线等理化因素和不良环境具有较强的抵抗力<sup>[1-3]</sup>。铜绿假单胞菌具有多种致病因子,

基金项目: 国家市场监督管理总局科技计划项目(2019MK057)

Fund: Supported by the Science and Technology Plan Project of National Administration of Market of Supervision (2019MK057)

\*通讯作者: 周露, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品生物安全。E-mail: zhoululu1982@sohu.com

\*Corresponding author: ZHOU Lu, Ph.D, Senior Engineer, Guangdong Institute of Food Inspection, Guangzhou 510435, China. E-mail: zhoululu1982@sohu.com

可导致人类多种急性肠道炎、脑膜炎、败血症和皮肤炎症等疾病<sup>[4-6]</sup>。近年来, 不断有饮用水中铜绿假单胞菌污染的相关报道<sup>[7-9]</sup>。因此, 准确并快速地检测水中是否含有铜绿假单胞菌, 对于保障人民饮用水安全和评价检验检测机构检验能力方面就显得尤为重要。

能力验证是按照预先制订的准则, 通过实验室间对比来判断和监控实验室的技术能力、持续改进质量管理体系的有效手段之一<sup>[10]</sup>, 也是一种实验室外部质量控制有效的方式。在人员能力评价、方法验证、数据或结果准确性评价、满足监管机构和认证机构的要求等方面都具有非常重要的意义。实验室和检测机构可利用此手段实行检测水平的有效监控<sup>[11]</sup>, 评估检测人员的能力, 从而提高实验室的竞争力<sup>[12]</sup>。

VITEK2 即全自动微生物鉴定系统, 是一类依据菌种的生理生化特性, 并结合比色、比浊动态分析技术的自动化鉴定系统<sup>[13]</sup>。使用该系统时, 只需将单个菌落配制到适宜的菌悬液浓度, 结合菌落形态及革兰氏染色结果, 即可接种到相应的鉴定卡进行上机分析。因鉴定卡具有 64 孔, 可同时进行多种生化反应, 平均 6~8 h 便可出结果, 故 VITEK2 具有操作简便、耗时少的优点。

本实验室通过参加中国检验检疫科学研究院组织的矿泉水中铜绿假单胞菌的检测能力验证, 分析实验结果, 对本实验室铜绿假单胞菌的持续检测能力进行有效的监控, 确保实验室出具的检验报告具有高度的可靠性, 并以此验证 VITEK2 辅助鉴定的准确性和时效性, 以期为准确鉴定铜绿假单胞菌提供可靠的技术支撑。

## 2 材料与方 法

### 2.1 样品来源

样品 19-P383 和 19-Q333(中国检验检疫科学研究院测试评价中心提供); 铜绿假单胞菌(ATCC 27853)和荧光假单胞菌(ATCC 13525)(美国菌种保藏中心)。

### 2.2 试剂耗材

假单胞菌 CN 选择性培养基、营养琼脂(北京陆桥技术股份有限公司)、氧化酶试纸、乙酰胺肉汤、钠氏试剂、GN 卡(革兰氏阴性细菌鉴定卡)(法国梅里埃公司); 实验用水均为无菌水。

### 2.3 仪器设备

SW-CJ-1CU 洁净工作台(苏州真田洁净设备有限公司); EZ-FITM 三联过滤装置(支架)、MS 3 digital 涡旋混合器(德国 IKA 公司); DHP-9052 电热恒温培养箱(上海一恒科学仪器有限公司); ZF-8 暗箱式四用紫外分析仪(上海嘉鹏公司); AxioScope A1 荧光倒置显微镜(德国卡尔蔡司公司); VITEK2 Compact 微生物分析系统(法国梅里埃公司)。

## 2.4 实验方法

### 2.4.1 样品处理

依据 ACAS-PT736(2019)矿泉水中铜绿假单胞菌的检测能力验证参试指导书<sup>[14]</sup>处理样品, 在 100 级环境中打开西林瓶, 加入 10 mL 无菌水进行水化, 待溶解后, 吸出放入已灭菌 1000 mL 三角瓶中, 再反复用余下的无菌水清洗西林瓶内壁, 回收清洗液放入上述无菌瓶中, 直至三角瓶中菌液为 520 mL 为止。三角瓶中的 520 mL 菌液即为待测样品原液。

### 2.4.2 样品稀释

参照 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》<sup>[15]</sup>对样品进行相应的稀释: 吸取 50 mL 待测液+450 mL 无菌水, 混匀即为 1:10 待测液; 吸取 50 mL 1:10 待测液+450 mL 无菌水, 混匀即为 1:100 待测液; 吸取 50 mL 1:100 待测液+450 mL 无菌水, 混匀即为 1:1000 待测液(以上 3 种稀释液分别平行制备 2 份)。

### 2.4.3 样品过滤

按照 GB 8538-2016《食品安全国家标准 饮用天然矿泉水检验方法》<sup>[16]</sup>进行样品过滤。首先用无菌镊子夹取无菌滤膜边缘部分, 将粗糙面向上, 贴在已灭菌的滤床上, 固定好 250 mL 无菌滤杯, 分别取 250 mL 待测液(原液, 1 份)、1:10 待测液(2 份)、1:100 待测液(2 份)以及 1:1000 待测液(2 份)通过孔径 0.45  $\mu\text{m}$  的滤膜过滤, 然后将过滤后的滤膜贴在已制备好的 CN 琼脂平皿, 平铺并避免在琼脂和滤膜之间夹留着气泡, 同时做阴性和阳性对照。将贴好滤膜的 CN 琼脂平皿倒置放入到 36  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中培养 24~48 h, 并防止干燥。

### 2.4.4 生化鉴定

按照 GB 8538-2016《食品安全国家标准 饮用天然矿泉水检验方法》<sup>[15]</sup>对可疑菌落进行鉴定, 同时借助 VITEK2 对可疑菌落进行进一步的确证。

### 2.4.5 统计学方法

对实验结果数据采用平均值进行统计分析。

## 3 结果与分析

### 3.1 结果观察与计数

样品 19-Q333 和 19-P383 在 CN 琼脂平板上的生长情况及菌落计数见表 1。样品在 1:100 及 1:1000 的稀释度平皿上形成了可计数的分散单一菌落形态, 而其他的稀释比例则菌落数目较多无法计数。

### 3.2 可疑菌落的确证性试验

分别挑取 5 个产荧光非蓝/绿色菌落, 划线接种至营养琼脂培养基, 于(36 $\pm$ 1) $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h。检查再次纯化的菌落, 将纯培养物接种到装有乙酰胺液体培养基的试管中, 在(36 $\pm$ 1) $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h。然后向每支试管培养物添加 2 滴纳氏

试剂, 检查各试管的产氨情况, 如表现出从深黄色到砖红色的颜色变化则为阳性结果, 其余为阴性结果。同时 VITEK2 进行鉴定。鉴定结果详见表 2 和表 3。

由表 2 和表 3 可得, 19-Q333 和 19-P383 上的产荧光非

蓝/绿色菌落经常规生化验证实验和 VITEK2 鉴定为铜绿假单胞菌。结合 CN 平板上可疑菌落的计数结果(详见表 1), 样品 19-P383 报送结果为 7800 CFU/250 mL, 样品 19-Q333 报送结果为 8800 CFU/250 mL。

表 1 在 CN 琼脂上的可疑菌落计数结果  
Table 1 Suspicious colony count results in CN agar

样品号	稀释比例	培养时间/h	蓝色/绿色菌落/(CFU/250 mL)		产荧光(非蓝绿色)/(CFU/250 mL)		红褐色/(CFU/250 mL)	
			平板 1	平板 2	平板 1	平板 2	平板 1	平板 2
19-Q333	原液	24	0	/	多不可计	/	0	/
		48	0	/	多不可计	/	0	/
	1:10	24	0	0	多不可计	多不可计	0	0
		48	0	0	多不可计	多不可计	0	0
	1:100	24	0	0	82	94	0	0
		48	0	0	82	94	0	0
	1:1000	24	0	0	6	6	0	0
		48	0	0	6	6	0	0
19-P383	原液	24	0	/	多不可计	/	0	/
		48	0	/	多不可计	/	0	/
	1:10	24	0	0	多不可计	多不可计	0	0
		48	0	0	多不可计	多不可计	0	0
	1:100	24	5	5	70	76	0	0
		48	5	5	70	76	0	0
	1:1000	24	0	0	5	5	0	0
		48	0	0	5	5	0	0

注: “/”表示没有平板计数结果。

表 2 可疑菌落常规生化结果  
Table 2 Suspect colony routine biochemical results

可疑菌落形态	乙酰胺肉汤
19-Q333 产荧光(非蓝/绿) $1^{\#}\sim 5^{\#}$	+
19-P383 产荧光(非蓝/绿) $1^{\#}\sim 5^{\#}$	+

注: +表示阳性结果。

表 3 VITEK2 鉴定结果  
Table 3 Appraisal result by VITEK2

VITEK2	生化谱	鉴定率/%	置信区间	结果
19-Q333 产荧光(非蓝/绿) $1^{\#}$	0003451303500240	98	Excellent identification	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
19-P383 产荧光(非蓝/绿) $1^{\#}$	0003451303500252	99	Excellent identification	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

注: *Pseudomonas aeruginosa* 为铜绿假单胞菌。

由表 4 可知 VITEK2 鉴定出铜绿假单胞菌, 所需时间最短; 由 GB 8538-2016《食品安全国家标准 饮用天然矿泉水检验方法》<sup>[15]</sup>可知常规生化鉴定的时间最长(金氏 B 培养基产荧光实验阴性需要 120 h)。

表 4 生化鉴定所需时间

Table 4 Time schedule for biochemical identification

生化项目	时间范围/h
常规生化	20~120
VITEK2	5~8

### 3.3 实验结果

样品 19-P383 检测结果为 7800 CFU/250 mL, 样品 19-Q333 检测结果为 8800 CFU/250 mL, 并取得 Z 值分别为 -0.8、-0.1 的满意结果(|Z|均小于 2)。说明本实验室具备检测铜绿假单胞菌的能力。

## 4 结论与讨论

本实验室通过参加由中国检验检疫科学研究院组织实施的矿泉水中铜绿假单胞菌检测能力验证, 依据能力验证指导书及 GB 8538-2016 对样品进行检测。由于 GB 8538-2016 没有稀释方式, 本次能力验证对饮用水样品参照 GB 4789.2-2016 进行相应的稀释处理, 使滤膜上能形成分散的单一菌落, 便于可疑菌落的观察计数为准确报告饮用水中铜绿假单胞菌的污染情况提供保障。同时对可疑菌落使用 VITEK2 进行辅助鉴定, 最终取得满意的结果, 说明本实验室具有铜绿假单胞菌检测的能力。通过本次能力验证可知, VITEK2 辅助鉴定可疑菌落可准确地鉴定出铜绿假单胞菌, 且 VITEK2 所需的鉴定时间最短(5~8 h), 验证了其准确性和时效性。因此在日常样品检测中, 可以借助 VITEK2 对可疑菌落进行辅助鉴定, 为准确、高效地鉴定铜绿假单胞菌提供可靠的技术支撑。

### 参考文献

- [1] 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.  
Li J. Improvement of detection method for *Pseudomonas aeruginosa* in packaged drinking water [J]. Food Eng, 2019, (4): 5-7.
- [2] 邢文静. 铜绿假单胞菌检测方法[J]. 食品安全导刊, 2019, (9): 114-115.  
Xing WJ. Detection method of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. China Food Saf Magaz, 2019, (9): 114-115.
- [3] 梁盛年. 瓶装水中铜绿假单胞菌的快速检验方法研究[J]. 现代预防医学, 2007, 34(2): 341-343.  
Liang SN. Study on fast detection method for *Pseudomonas aeruginosa* in bottle water [J]. Mod Prev Med, 2007, 34(2): 341-343.
- [4] 张淑红, 吴清平, 徐晓可, 等. 桶装水中铜绿假单胞菌检测方法的比较[J]. 现代食品科技, 2011, 27(11): 1403-1405.  
Zhang SH, Wu QP, Xu XK, et al. Comparison of detection of *Pseudomonas aeruginosa* in bottled water [J]. Mod Food Sci Technol, 2011, 27(11): 1403-1405.
- [5] 刘珊珊, 杨铮, 杜伟, 等. 包装饮用水中铜绿假单胞菌检验不确定度的评定[J]. 饮料工业, 2017, 20(3): 8-11.  
Liu SS, Yang Z, Du W, et al. Uncertainty evaluation of *Pseudomonas Aeruginosa* in packaged water for drinking [J]. Bever Ind, 2017, 20(3): 8-11.
- [6] 杨秋玲, 季婧涵, 黄小方, 等. 矿泉水中铜绿假单胞菌检测能力验证结果评价[J]. 现代食品, 2018, (20): 117-119.  
Yang QL, Ji JH, Huang XF, et al. Evaluation of the detection capability of *Pseudomonas aeruginosa* in mineral water [J]. Mod Food, 2018, (20): 117-119.
- [7] 周臣清, 张娟, 黄宝莹, 等. 广州市售瓶(桶)装水中铜绿假单胞菌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. Study on *Pseudomonas aeruginosa* contamination status and drug resistance in bottles (barrels) in Guangzhou [J]. China Brew, 2017, 36(12): 168-171.
- [8] 刘思超, 徐励琴, 罗泽燕, 等. 223 份桶装天然矿泉水和包装饮用水中铜绿假单胞菌的检测结果分析[J]. 预防医学情报杂志, 2016, 32(10): 1071-1075.  
Liu SC, Xu LQ, Luo ZY, et al. Analysis of detection results of 223 samples of barreled natural mineral water and packaged drinking water [J]. J Prev Med Inform, 2016, 32(10): 1071-1075.
- [9] 曾晓琮, 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.
- [10] CNAS-RL02:2018 能力验证规则[S].  
CNAS-RL02:2018 Capability verification rules [S].
- [11] 雷质文. 食品微生物实验室质量管理手册[M]. 北京: 中国标准出版社, 2006.  
Lei ZW. Handbook of quality management of food microbiology laboratory [M]. Beijing: Standards Press of China, 2006.
- [12] Abdel MM, Planchon V, Polet M, et al. Analysis performance of food microbiology laboratories-critical analysis of 7 years of proficiency testing results [J]. J Appl Microbiol, 2016, 120(2): 346-354.
- [13] 曾绮文, 王青柏, 朱红惠. 三种微生物鉴定技术的分析与应用[J]. 轻工科技, 2019, 35(12): 15-16, 25.  
Zeng QW, Wang QB, Zhu HH. Analysis and application of three microorganism identification techniques [J]. Light Ind Sci Technol, 2019, 35(12): 15-16, 25.
- [14] ACAS-PT736 矿泉水中铜绿假单胞菌的检测能力验证参试指导书[Z]. 2019.  
ACAS-PT736 Reference guidelines for verification of detection capability

of *Pseudomonas aeruginosa* in mineral water [Z]. 2019.

[15] 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 microbiology testing-Total number of colonies [S].

[16] GB 8538-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 饮用天然矿泉水检验方法[S].

GB 8538-2016 National food safety standard-Food microbiology testing-Drinking natural mineral water inspection method [S].

(责任编辑: 李磅礴)

## 作者简介



韦云, 助理工程师, 主要研究方向为食品安全。

E-mail: 1615830853@qq.com



周露, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品生物安全。

E-mail: zhoululu1982@sohu.com

## “现代分析仪器在食品检测中的应用”专题征稿函

食品不仅是维持人体生命活动所必需的各种营养物质和能量的最主要来源, 而且以其色、香、味、质地及口感给人们以愉悦的感官享受。随着食品工业和食品科学技术的不断发展, 民众对食品品质和卫生要求也越来越高。因此, 对食品质量的控制与安全保障尤为重要, 而这在很大程度上依赖于先进的分析检测技术。现代仪器分析技术在生命科学、环境科学、材料科学等领域发挥着越来越重要的作用, 在食品科学和食品安全领域同样有着不可替代的重要作用。

鉴于此, 本刊特别策划了“现代分析仪器在食品检测中的应用”专题。本专题将围绕气相色谱、液相色谱、离子色谱、质谱、原子光谱、红外光谱、拉曼光谱、表面等离子共振等现代分析仪器在食品检测与质量安全控制领域的应用, 阐述现代仪器的原理、特点、适用范围、优势与局限性, 展示这些仪器技术在食品安全检测中的应用实例, 或您认为有意义的相关领域展开论述和研究, 综述及研究论文均可。本专题计划在 **2020 年 10 月出版**(学报为中国科技核心, 2019 年知网影响因子 1.201)。

鉴于您在该领域的成就, 学报主编国家食品安全风险评估中心吴永宁研究员及编辑部特别邀请有关食品领域研究人员为本专题撰写稿件, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。综述及研究论文均可, 请在 **2020 年 9 月 20 日**前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并经审稿合格后优先发表。

同时烦请您帮忙在同事之间转发一下, 希望您能够推荐该领域的相关专家并提供电话和 E-mail。再次感谢您的关怀与支持!

投稿方式(注明专题**现代分析仪器在食品检测中的应用**):

网站: [www.chinafoodj.com](http://www.chinafoodj.com)(备注: 投稿请登录食品安全质量检测学报主页-作者登录-注册投稿-投稿选择“专题: **现代分析仪器在食品检测中的应用**)

邮箱投稿: E-mail: [jfoodsqa@126.com](mailto:jfoodsqa@126.com)(备注: **现代分析仪器在食品检测中的应用**专题投稿)

《食品安全质量检测学报》编辑部