

团 体 标 准

T / CBIA 011—2024

包装饮用水中铜绿假单胞菌的 快速检测方法

Rapid determination of *Pseudomonas aeruginosa* in packaged drinking water

2024-04-01 发布

2024-04-01 实施

中国饮料工业协会 发布

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由中国饮料工业协会提出。

本文件由中国饮料工业协会团体标准技术工作委员会归口。

本文件起草单位：中国饮料工业协会、华润怡宝饮料(中国)有限公司、农夫山泉股份有限公司、上海康识食品科技有限公司、四川蓝剑饮品集团有限公司、椰树集团有限公司、青岛崂山矿泉水有限公司。

本文件主要起草人：程毅、张志刚、罗慧琳、沈中锋、周炯、邹宗凤、郑燕华、魏华磊、杨永兰。

本文件为首次发布。

本文件知识产权归属中国饮料工业协会，本文件仅供中国饮料工业协会会员企业自愿使用。未经中国饮料工业协会同意，不得印刷、销售。任何单位和个人使用本文件开展认证、检测等活动应经中国饮料工业协会书面批准授权。

引 言

本文件的发布机构提请注意,声明符合本文件时,可能涉及 ZL 2019 1 0582662.7 相关的专利的使用。

本文件的发布机构对于该专利的真实性、有效性和范围无任何立场。

该专利持有人已向本文件的发布机构承诺,他愿意同任何申请人在合理且无歧视的条款和条件下,就专利授权许可进行谈判。该专利持有人的声明已在本文件的发布机构备案。相关信息可以通过以下联系方式获得:

专利持有人姓名:华润怡宝饮料(中国)有限公司

地址:广东省深圳市南山区第五工业区朗山路怡宝食品饮料园

请注意除上述专利外,本文件的某些内容仍可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

包装饮用水中铜绿假单胞菌的快速检测方法

1 范围

本文件规定了包装饮用水中铜绿假单胞菌的快速定性检测方法。

本文件适用于包装饮用水中铜绿假单胞菌的检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB 4789.1 食品安全国家标准 食品微生物学检验 总则

GB 8538 食品安全国家标准 饮用天然矿泉水检验方法

3 原理

铜绿假单胞菌是专性需氧微生物,CN 液体培养基组合振荡培养的方式可以为铜绿假单胞菌提供充分的营养条件和氧气环境,通过测量培养液浊度可以客观、便捷地识别微生物的生长状态。萘啶酮酸等抗生素具有一定选择性,可抑制除铜绿假单胞菌以外的革兰氏阴性菌生长。对培养液划线分离纯化菌落后,通过生化或分子生物学等技术对可疑菌进行鉴定。

4 定义

下列术语和定义适用于本文件。

4.1

阴性对照浊度值 negative control sample NTU

在实验条件和操作方法与样品保持一致的情况下,250 mL 无菌水经滤膜过滤,然后将滤膜置于 50 mL CN 液体培养基中,在温度 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、转速 150 r/min 培养条件下培养 24 h 后测得的培养液的浊度值。

4.2

CN 本底浊度值 CN background NTU

因萘啶酮酸不易溶于水,含有萘啶酮酸的 CN 液体培养基呈现微浑浊状态。在培养过程中,具有孔状结构的滤膜会改变 CN 液体培养基的浊度。萘啶酮酸和滤膜等背景浊度值会对检测结果带来干扰,因此将除微生物繁殖影响外的其他因素导致的浊度值定义为 CN 本底浊度值,其数值为过往累积试验的阴性对照浊度值的平均数。

5 实验室要求

应符合 GB 4789.1 中 2 实验室基本要求等规定。

6 设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外,其他设备和材料要求如下。

- 6.1 过滤设备。
- 6.2 无菌滤器。
- 6.3 无菌平头无齿镊子。
- 6.4 无菌亲水性微孔滤膜:直径 47 mm,孔径 0.45 μm 。
- 6.5 无菌锥形瓶及配套透气瓶塞:容积 100 mL。
- 6.6 恒温振荡培养箱:温度 $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$,转速 150 r/min。
- 6.7 浊度计及配套比色管:测量范围 0~200 NTU。

7 培养基和试剂

- 7.1 CN 液体培养基:见 A.1。
- 7.2 无菌水:经 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 灭菌 15 min 的纯水。
- 7.3 CN 琼脂培养基:见 A.2。

8 检验程序

铜绿假单胞菌检验程序见图 1。

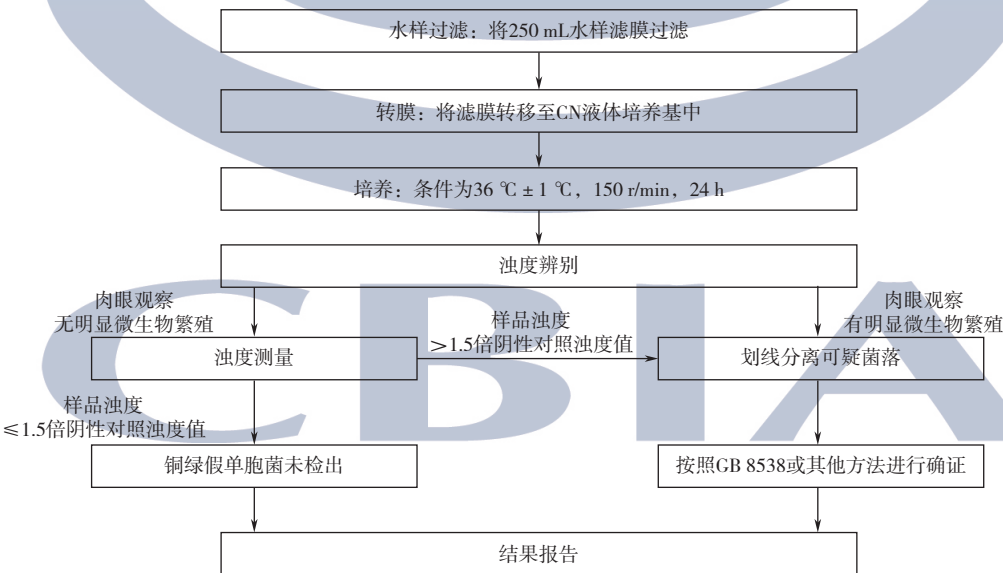


图 1 检验程序

9 操作步骤及报告

9.1 样品消毒处理

用 75% 酒精等消毒剂对样品包装容器充分擦拭消毒后传入洁净室,去除大包装饮用水样品的帽标

等塑料包装,再次用 75%酒精等消毒剂对包装容器口盖处、外壁等充分擦拭消毒。

9.2 初筛培养

9.2.1 灭菌并组装过滤系统

在 100 级洁净工作台内进行无菌操作。将膜过滤系统过滤头灭菌并降温后,用无菌平头无齿镊子夹取无菌滤膜的边缘部分,将滤膜网格面向上,贴放在已灭菌的过滤头滤床面上,将无菌滤杯固定到已贴好滤膜的过滤头上。

9.2.2 水样采集

对于瓶装包装水,在 100 级的洁净工作台内,宜对瓶口螺纹处灼烧消毒后,直接倒取 250 mL 水样至无菌滤杯内。对于大包装饮用水,宜在 100 级洁净环境中或使用 100 级洁净保证的无菌采样器,抽取 250 mL 水样并转移到无菌滤杯内。如采样过程无法在 100 级洁净环境中进行,则需加强采样过程环境控制及监控,避免样品受到环境污染,保证样品有效性。

9.2.3 水样过滤

在 100 级洁净工作台内进行无菌操作。打开滤泵过滤水样,待杯内水样过滤完毕后,小心卸下过滤杯,用无菌平头无齿镊子夹取滤床上已过滤好的滤膜边缘,转移滤膜至装有 50 mL CN 液体培养基的锥形瓶中,滤膜应完全与培养液接触,不应粘贴在瓶内壁上。

9.2.4 阴性对照试验

每批次检测需做一个阴性对照,作为后续浊度判定的阴性参比样。按照 9.2.3 的方法,过滤 250 mL 无菌水并将该滤膜转移至另一瓶 50 mL CN 液体培养基中,作为阴性对照。

9.2.5 培养

将所有接种后的锥形瓶放置于温度 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的恒温振荡培养箱内,在转速 150 r/min 条件下,培养 24 h。

9.2.6 初筛判定

9.2.6.1 浊度观察方法

从培养箱中取出锥形瓶,将待观察的锥形瓶对向明亮光源处,轻缓摇晃锥形瓶使培养液混匀,肉眼观察培养液的浊度。

9.2.6.2 阴性对照浊度观察

按 9.2.6.1 观察阴性对照,如阴性对照明显表现为微生物繁殖的浊度,说明阴性对照受到污染,该次检测无效,需排查原因。如阴性对照未明显表现为微生物繁殖的浊度,仅呈现 CN 本底微浑浊状态,则测量阴性对照浊度并判定。

9.2.6.3 检测样品浊度观察

按 9.2.6.1 逐一将检测样品和阴性对照对比,观察两者的浊度。如检测样品的浊度大于阴性对照,且明显表现为有微生物繁殖的浊度,该样品可直接判定为铜绿假单胞菌初筛可疑样;反之,如检测样品与阴性对照的浊度无明显差别,则测量样品浊度并判定。

9.2.6.4 浊度测量

浊度测量的采样操作应在 100 级洁净工作台内进行。轻缓摇晃锥形瓶使培养液混匀,倒取或吸取一定量的培养液至洁净干燥的比浊管中。

9.2.6.5 阴性对照浊度判定

按 9.2.6.4 测量阴性对照的浊度,如阴性对照浊度 ≤ 2 倍 CN 本底浊度,说明该批次检测试验有效,该阴性对照浊度值将作为本批次检测样品浊度判定的依据。

注:CN 本底浊度值受多因素影响,与 CN 液体培养基的成分及含量、培养基配制及使用条件、培养时间、滤膜材质

有关,故试验中应固化这些变量因素。实验室应固化这些变量因素后,再积累一定数量的阴性对照浊度值,将过往累积试验的阴性对照浊度值作为 CN 本底浊度值。实验室可积累相关数据并验证后,适当调整判定依据的倍数,本文件建议为 2 倍。

9.2.6.6 检测样品浊度判定

按 9.2.6.4 测量检测样品的浊度,并将测量值逐一与阴性对照浊度值相比较,如检测样品的浊度 >1.5 倍阴性对照浊度,则该检测样品判定为铜绿假单胞菌初筛可疑样;反之,如检测样品的浊度 ≤ 1.5 倍阴性对照浊度,则该检测样品判定为铜绿假单胞菌初筛阴性样。

9.2.6.7 初筛报告

对于铜绿假单胞菌初筛可疑样,需按 9.3 进行鉴定操作;对于铜绿假单胞菌初筛阴性样,则报告 250 mL 水样中未检出铜绿假单胞菌。

9.3 铜绿假单胞菌鉴定

9.3.1 平板划线及培养

轻缓摇晃铜绿假单胞菌初筛可疑样的锥形瓶使培养液混匀,用无菌接种环蘸取培养液,于 CN 琼脂平板上划线,以分离纯化单菌落。宜划线 1~3 个平板。将平板倒置于 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱,培养 24 h。在操作时应遵守铜绿假单胞菌接种操作规范并采取相应的防护措施,避免受到微生物污染。

9.3.2 生化确证试验

参照 GB 8538,分别在日光灯及 $360\text{ nm}\pm 20\text{ nm}$ 紫外灯下观察 CN 琼脂平板上生长的可疑菌落的颜色和荧光情况,按照菌落颜色及荧光情况选择做相应的确证试验,每种菌落表现类型选取不少于 3 个可疑菌落(当不足 3 个时,则全部挑取)做确证试验。

9.3.3 其他鉴定法确证试验

挑取不少于 5 个可疑菌落(当不足 5 个时,则全部挑取),通过其他鉴定技术对可疑菌落进行确证,如基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)、16S rDNA 测序等。

9.3.4 确证报告

按照 9.3.2 开展可疑菌落确证的,依据 GB 8538 判定可疑菌落是否为铜绿假单胞菌。

按照 9.3.3 开展可疑菌落确证的,根据各方法的规则判定可疑菌落是否为铜绿假单胞菌。对于阳性样品,应依据 GB 8538 进行最终结果确认。

如任一平板上有菌落确证后被判定为铜绿假单胞菌,则报告 250 mL 水样中检出铜绿假单胞菌;否则,报告 250 mL 水样中未检出铜绿假单胞菌。

附 录 A
(资料性)
培养基和试剂

A.1 CN 液体培养基

A.1.1 成分

明胶蛋白胨	17.6 g
胰蛋白胨	11.6 g
硫酸钾	10.0 g
氯化镁	1.4 g
蒸馏水	1000 mL
CN 补充成分	
十六烷基三甲溴化铵	0.2 g
萘啶酮酸	0.015 g

A.1.2 制法

将明胶蛋白胨、胰蛋白胨、硫酸钾、氯化镁溶解于 1000 mL 蒸馏水中,加热溶解,121 ℃ 高压灭菌 15 min。灭菌后,待培养基冷却至 50 ℃ 以下,加入溶于 2 mL 灭菌蒸馏水的 CN 补充成分,培养基 25 ℃ 的 pH 为 7.1 ± 0.2 。宜现配现用。

A.2 CN 琼脂

A.2.1 成分

明胶蛋白胨	16.0 g
胰蛋白胨	10.0 g
硫酸钾	10.0 g
氯化镁	1.4 g
琼脂	15.0 g~20.0 g
甘油	10 mL
蒸馏水	1000 mL
CN 补充成分	
十六烷基三甲溴化铵	0.2 g
萘啶酮酸	0.015 g

A.2.2 制法

将明胶蛋白胨、胰蛋白胨、硫酸钾、氯化镁、琼脂加热溶解于 1000 mL 蒸馏水中,加入 10 mL 甘油,煮沸至完全溶解,121 ℃ 高压灭菌 15 min。灭菌后,待培养基冷却至 45 ℃~50 ℃ 时,加入溶于 2 mL 灭菌蒸馏水的 CN 补充成分,与尚处于融溶状态的培养基混合,倾注到灭菌平板上,培养基厚度至少高 5 mm,培养基 25 ℃ 的 pH 为 7.1 ± 0.2 。将制备好的平板置于黑暗处,于 2 ℃~8 ℃ 保存,同时防止干燥,在 1 个月内使用。不应使培养基保持融溶状态超过 4 h。