

国际
标准

ISO
16266-2

第一版

2018-7

水质-铜绿假单胞菌的检测
第二部分：
最大可能数方法

目录

前言	3
简介	4
1. 范围	5
2. 引用标准	5
3. 术语和定义	6
4. 原则	6
5. 设备和玻璃器皿	6
6. 培养基、稀释水和消泡剂	7
7. 采样	7
8. 操作	7
9. 结果	9
10. 质量控制	9
11. 检测报告	9

前言

ISO（国际标准化组织）是一个全球性的国际标准机构（ISO 成员机构）。制定国际国标的工作通常是通过 ISO 技术委员会进行。任何一个对技术委员会家里的主题感兴趣的成员均有权利委派代表参加该委员会。国际组织、政府和非政府，与 ISO 存在联络的单位或组织，也可以参加工作。ISO 与国际电工委员会（IEC）在所有电工技术标准化事务有密切合作。

本文档的建立和维护符合ISO/IEC的指示，第一部分。本文的起草制定也符合ISO/IEC指示，第二部分（见www.iso.org/directives）。

请注意，文中的某些内容可能涉及专利。ISO不对任何专利的真实性负责。在文件制定过程中任何确定的专利将在引言或者ISO收到的专利声明清单上（www.iso.org/patents）发布。

文中所使用的任何商标都是为了方便用户而提供的信息。

有关标准的自愿性质的解释，ISO特定术语的含义和与合格评定相关的表达，以及ISO遵守的世界贸易组织（WTO）在技术性贸易壁垒（TBT）中的原则，见www.iso.org/iso/foreword.html。

本文是由技术委员会ISO/TC 147, 水质、微生物方法小组4 SC准备。

关于本文的任何反馈或者问题，请直接与所在地的国家标准组织联系。完整列表，请访问www.iso.org/members.html。

简介

铜绿假单胞菌是一种在低营养浓度情况下就可以在水中生长的易感染人的病原体。任何250mL的天然矿泉水或者泉水中，都不能检出铜绿假单胞菌（例如Council Directive 2009/54/EC）。其他250mL的瓶装水样品中，也规定不能检测铜绿假单胞菌（例如Council Directive 98/83/EC）。其他类型的水样，如泳池水和温泉水、医疗用水和饮用水，有时也会检测铜绿假单胞菌。通常这些水样的检测量为100mL。

本文中所描述的方法适用于各种类型的水。包括医院用水，饮用水，非碳酸化瓶装水，地下水，游泳池水和温泉池水。

水质—铜绿假单胞菌的检测

第二部分

最大可能数方法

警告 — 使用此方法的实验人员必须熟悉正确的实验室操作。这一国际标准并不会罗列所有的安全问题，文件提到的也是使用中可能会遇到的问题，实验人员有责任建立合适的安全和健康条例来保证实验操作符合当地国家的规章制度。

重要 — 选择合适且经过考核的操作人员进行这一部分的实验操作非常重要。

1. 范围

该文件规定了检测水中铜绿假单胞菌的方法。该方法是基于统计学原理的最大可能数方法，最后通过查阅 MPN 表获取最终的结果。

该方法适用于各种类型的水。包括医院用水，饮用水，非碳酸化瓶装水，地下水，游泳池水和温泉池水。

但是该方法目前不适用于碳酸瓶装水，调味瓶装水，冷却塔水或者海水，这些类型的水样尚未得到验证。故实验室可以使用本文中提供的方法对这些类型的水样进行适当的验证实验。

该方法基于一种细菌酶检测技术，即铜绿假单胞菌分解代谢 Pseudalert 试剂产生一定的信号表明其存在。绿脓假单胞菌利用 Pseudalert 试剂中丰富的氨基酸、维生素和其他营养物质迅速地生长和增殖。生长活跃的铜绿假单胞菌可以产生一种能够水解试剂底物的一种酶，同时产生在紫外灯下可观测的蓝色荧光。

Pseudalert 可以在 24 小时内检测铜绿假单胞菌，无需后续的验证实验。

2. 引用标准

下列文件中的部分或全部被本文档引用，这些标准的应用是不可或缺的，对于引用有日期的标准，只限于引用的版本。若引用的文件没有日期，则自动引用最新版的文件（包括任何修改）。

ISO 8199, *Water quality — General guide to the enumeration of micro-organisms by culture*

ISO 11133, *Microbiology of food, animal feeding stuffs, food production, environment and water — Preparation, production, storage and performance testing of culture media*

ISO 19458, *Water quality — Sampling for microbiological analysis*

ISO 16266-2:2018(E)

ISO/IEC Guide 2, *Standardization and related activities — General vocabulary*

3. 术语和定义

以下术语和 ISO/IEC Guide 2 中的定义适用于本标准。

ISO 和 IEC 在以下网站维护标准的术语数据库：

— ISO Online browsing platform: available at <https://www.iso.org/obp>

— IEC Electropedia: available at <http://www.electropedia.org/>

3.1 铜绿假单胞菌

能够在选择性培养基中生长并且能够表达 7-氨基-4-甲基香豆素氨肽酶的细菌。

4. 原则

将一个干燥的 Snap 包装的培养基加入到样品中（100mL 或 250mL），或者是稀释后的样品中。轻轻混匀样品和培养基以保证充分混合，保证培养基完全溶解。然后将样品和培养基倒入 Quanti-Tray（51 孔定量盘）或者 Quanti-Tray/2000（97 孔定量盘）中，两种规格的定量盘分别可以检测出每 100mL 水样中最多 201 个或者 2419 个目标微生物。250mL 样品的检测方法将在 8.2 中描述。将定量盘放在程控定量封口机上进行封口，然后在 $38 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 的温度下培养 24-28 小时。

培养结束后，所有在 365nm 紫外灯下发荧光的孔格为铜绿假单胞菌阳性。

通过 MPN 表，或者小型计算机软件，即可以查出 100mL 或者 250mL 水样中的铜绿假单胞菌的数量。

该方法也适用于定性操作。

5. 设备和玻璃器皿

使用微生物实验室设备，特别是以下的设备和器皿：

5.1 高压蒸汽灭菌器

应按照 ISO 8199 中的说明对设备和玻璃器皿进行灭菌消毒。

5.2 热烘箱，干热灭菌

5.3 培养箱，恒温控制在 $38 \pm 0.5^\circ\text{C}$

5.4 Quanti-Tray 程控定量封口机和橡胶衬垫

5.5 无菌广口容器，容量至少 110mL

ISO 16266-2:2018(E)

5.6 紫外灯, 365nm

5.7 Quanti-Tray (51 孔定量盘) 或 Quanti-Tray/2000 (97 孔定量盘)

6. 培养基、稀释水和消泡剂

6.1 基本的材料

本方法采用的 Pseudalert 培养基是基于固定底物酶底物法技术原理, 一种提前分配在 Snap 包装中即用的粉末状培养基。每个 Snap 包装中包含一个样品检测所需要的培养基 (2.45g,100mL)。对于定量检测 250mL 的样品, 将一份 2.45g 的 Snap 包装培养基加入到每份 8.2 中描述的样品中进行检测。Pseudalert 试剂为棕褐色, 可以自由流动的粉末试剂。试剂中含有氨基酸和维生素, 缓冲剂, 氯化钠, 镁, 硫酸盐等。试剂需要储存在适宜的温度 (2-30℃), 避免阳光直射, 而且需要在包装上标记的保质期内使用。该试剂的保质期为自生产之日起 12 个月。

6.2 稀释水

对于使用 Pseudalert 培养基检测且需要稀释的水样, 应该采用无菌的, 无抑制剂的活氧化剂的水 (去离子或自来水)。使用含有缓冲液成分以及有盐度成分的或者含有蛋白胨成分的稀释水会干扰此检测。

6.3 消泡剂

消泡剂 B 是一种具有 1% 活性, 水溶性分散硅胶。将其加到水样中可以减少混合过程中气泡的产生。

7. 采样

采集和运输样品按照 ISO 19458 进行。

8. 过程

8.1 样品保存和运输

样品的保存和运输需要按照 ISO 19458 进行。检测需要在采样之后的 12 个小时内完成。在特殊情况下, 样品可以在 $5 \pm 3^\circ\text{C}$ 下保存 24 小时。但是这种情况需要在报告中注明。

8.2 操作

ISO 16266-2:2018(E)

8.2.1 100mL 样品的操作

将 Snap 包装的 Pseudalert 试剂加入到 100mL 样品或稀释后的样品中。当培养基完全溶解后，将样品和培养基的混合液倒入到 Quanti-Tray（51 孔定量盘）或 Quanti-Tray/2000（97 孔定量盘）中。然后用程控定量封口机进行封口。

为了减少孔格中的气泡，样品可以加入到加有消泡剂 B 的灭菌容器中，或者将消泡剂 B 用滴瓶添加到每个取样瓶中。采用任何一种添加消泡剂的方式都是可以的。

另外，Pseudalert 和水样的混合物可以分配到传统的无菌的 MPN 管中进行检测（如 1 × 50mL 或者 5 × 10mL）。

注意：高矿物质含量（特别是镁和钙）的存在会导致 Pseudalert 试剂变浑浊，但是不会影响实验结果。

8.2.2 250mL 样品的操作

对于 250mL 的样品，将样品分到三个无菌取样瓶中，其中 2 个 100mL 和 1 个 50mL。在 50mL 的样品中，加入 50mL 无抑制剂、无氧化剂的无菌水，配成一个 100mL 的样品。在三个样品中分别加入一个 Pseudalert 试剂当培养基完全溶解后，将样品和培养基的混合液倒入到 Quanti-Tray（51 孔定量盘）或 Quanti-Tray/2000（97 孔定量盘）中。然后用程控定量封口机进行封口。

为了减少孔格中的气泡，样品可以加入到加有消泡剂 B 的灭菌容器中，或者将消泡剂 B 用滴瓶添加到每个取样瓶中。采用任何一种添加消泡剂的方式都是可以的。

注意，请一定标注清楚 50mL 样品和另外两个 100mL 样品的不同。这对于最终的结果计算很重要。

8.3 培养

将封好口的定量盘在 $38\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 培养箱内培养 24h -28h，检测铜绿假单胞菌。

8.4 检测结果

ISO 16266-2:2018(E)

培养 24-28 小时后，用 365nm 的紫外灯照射 Quanti-Tray（51 孔定量盘）或 Quanti-Tray/2000（97 孔定量盘）。确保紫外灯不要直接照射眼睛。应该根据第 10 章的荧光阳性控制方法检查紫外灯的功效。紫外灯泡也应该根据厂家提供的寿命（比如 6000 小时）或者每年进行更换。任何蓝色荧光的孔格，都是铜绿假单胞菌阳性。必要时可以与阴性对照进行比较。如果培养 24 小时后，实验结果无法判断，可以将定量盘延长培养至 28 小时再进行判读。判读结果时，可以将定量盘放在橡胶衬垫中，方便荧光的识别和判读。

9. 最终结果

对于 100mL 样品，通过数出的铜绿假单胞菌阳性孔格数，对照 MPN/100mL 的表格或者利用计算机 MPN 生成软件可以得到最终的结果，见表 B1 和表 B2。

对于 250mL 的样品，计算出 2 个未稀释的样品的阳性孔格数总和作为未稀释样品孔格数。另外将 50mL 稀释样品的阳性孔格数出作为稀释样品的阳性孔格数，然后对照表 B3 的 MPN 表得到最终结果。

10. 质量控制

实验室应该具有明确的质量控制体系条例来确保设备、试剂和检测技术可以满足此检测。阳性控制、阴性控制以及空白对照都应包含在此检测中。

有关生长率和选择性的定义，请参考 ISO 11133。Pseudalert 的性能可以参照 ISO 11133 进行验证（见表 1）。

Table 1 — Performance testing of Pseudalert²⁾

Function	Incubation	Control strain ^a	Reference medium	Method of control	Criteria	Characteristic reactions
Productivity	24 h to 28 h/ (38 ± 0,5) °C	<i>P. aeruginosa</i> WDCM 00024 or WDCM 00025	TSA	Quantitative	PR ≥ 0,5	Blue fluorescence
Selectivity	24 h to 28 h/ (38 ± 0,5) °C	<i>P. fluorescens</i> WDCM 00115	—	Qualitative	Total inhibition	No blue fluorescence

^a Refer to the reference strain catalogue available on http://www.wfcc.info/pdf/WDCM_Reference_Strain_Catalogue.pdf on culture collection strain numbers and contact details.

11. 检测报告

检测报告应至少包括以下信息：

- 采用的检测方法以及引用的方法（例如：ISO 16266-2:2018）；

ISO 16266-2:2018(E)

- b) 全部样品的身份信息；
- c) 第 9 章中得到的检测结果
- d) 如果样品在 $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 保存了 24 小时，在分析以及操作中出现任何可能影响结果的因素，本文中
没有具体说明的可能影响结果的因素。

储存时间也需在报告中注明。