

山东省检验检测协会团体标准编制说明

(征求意见稿)

一、工作简况

(一) 任务来源

根据山东省检验检测协会《山东质量检验协会关于下达2023年第二批团体标准制修订计划的通知》的通知要求，本部分经山东省检验检测协会审查，由山东省产品质量检验研究院组织制定。

(二) 起草单位、起草人员

1. 起草单位

山东省产品质量检验研究院、青岛海关技术中心

2. 起草人员

李娜、张宇鑫、王智、温展、李小丫、孔啸鸣、任莉、周莉莉、王一村、侯广月

(三) 起草过程

1. 成立标准起草工作组（2023年6月）

为了推动标准制定，山东省产品质量检验研究院成立了《PC饮用水桶中粪链球菌的快速定性检测 实时荧光PCR方法》团体标准起草工作组，开始标准研究准备工作。

2. 标准调研（2023年6月-2023年10月）

标准起草工作组通过文献查阅、企业调研、专家咨询等方式完成标准需求调研，依据《山东省检验检测协会团体标

准管理办法》，形成工作组讨论稿。

3.标准立项（2023 年 10 月-2023 年 11 月）

山东质量检验协会团体标准技术专业委员会组织专家对本团体标准进行立项论证。专家组通过听取项目汇报、审查相关申报材料，形成一致意见，同意该标准作为协会团体标准立项。

2023 年 11 月 8 日，山东省检验检测协会印发了《山东质量检验协会关于下达 2023 年第二批团体标准制修订计划的通知》，标准正式获得立项。

4.形成并完善标准草案（2024 年 1 月-2025 年 12 月）

2024 年 1 月至 4 月，对比验证，确认了能够获取具有代表性样品的取样方案。

2024 年 5 月至 2025 年 5 月，设计引物探针，对扩增反应体系、引物特异性、实验重复性及真实样品模拟进行了实验验证。

2025 年 6 月至 9 月，汇总研究成果，组织撰写标准文本草案、编制说明草案。

2025 年 10 月，组织外部实验室进行标准验证工作，参加验证的外部实验室有：国家水产品质量检验检测中心、青岛海关技术中心。

工作组召开多次组内讨论会，组织专业人员对标准文本和编制说明草案进行系统梳理和逐句审议，并提出修改意见。工作组根据修改意见逐条研讨，经多次修改后形成标准

征求意见稿。

二、标准制定目的和意义

桶装饮用水作为居民重要的饮用水来源，其卫生质量与公众健康密切相关。在国家及各省级食品安全监督抽检工作中，桶装饮用水微生物指标不合格率持续处于较高水平，其主要原因在于回收桶的清洗与消毒工艺不达标。

粪链球菌为常见条件致病菌，广泛存在于人和动物粪便中，该菌对生活饮用水的污染可导致胃肠道感染、腹泻等多种食源性疾病，是评价水体受粪便污染程度的重要指示微生物。粪链球菌的传统鉴定方法主要包括生化鉴定法与常规聚合酶链反应（PCR）技术。生化鉴定法需经分离纯化培养、革兰氏染色及生化反应等流程，检测周期长且消耗大量人力与试剂成本；常规 PCR 虽可实现目标菌株的快速检测，但后续需通过凝胶电泳对扩增产物进行分离判定，操作步骤繁琐，且易造成实验室交叉污染。

实时荧光 PCR 技术融合了常规 PCR 扩增与实时荧光信号检测的双重优势，可在 PCR 反应过程中实时监测扩增产物的积累情况，无需后续凝胶电泳分析，具有高灵敏度、高特异性及高准确度等特点，能够实现目标细菌的快速检测，本标准旨在建立适用于 PC 饮用水桶中粪链球菌的实时荧光 PCR 快速定性检测方法，简化检测流程，突破了传统检测方法周期长、效率低的技术瓶颈，显著提升了检测结果的准

确性、稳定性与特异性。

三、标准编制原则、主要技术内容说明

（一）标准编制原则

标准的内容按照 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》、GB/T 20000.1-2014《标准化工作指南 第1部分:标准化和相关活动的通用术语》和 GB/T 20001《标准编写规则》等进行,确保标准严谨、规范。

（二）主要技术内容确定的依据和过程

1. 确认取样方法

工作组通过查阅文献、标准等技术资料,分析可靠性和代表性后最终确定两种取样方法进行模拟实验,最终确定便捷、精准的取样方法。

（1）表面涂抹取样法

使用无菌棉签或无菌采样布,从几个不同部位用灭菌工具取样,尽可能完整地擦拭涂抹PC桶内表面、桶口、桶盖内侧。将采集到的样品收集到一定量的无菌水中,加入选择性培养基中培养,收集培养后的菌液进行DNA提取。

（2）过滤取样法

根据水桶规格取适量灭菌水注入PC饮用水桶内部,将水桶倾斜充分旋转摇动、润洗,使无菌水与水桶内壁充分接触形成均质样液,将样液收集至无菌容器瓶内,将全部样液

通过孔径0.45 μm 的滤膜过滤。将滤膜置于KF链球菌琼脂培养基 $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 $48\pm 2\text{ h}$ 后，用灭菌的1 mL 0.9%的生理盐水洗脱滤膜上的菌落，并将菌液收集于灭菌的2 mL离心管中。重复洗脱一次，将两次洗脱液合并后进行下一步检测。

分别用两种取样方式多次进行实验发现，采用表面涂抹取样法的检测结果均显著小于过滤取样法（表1）。推测使用表面涂抹取样法在取样过程中由于PC桶特殊结构，不易伸入桶内部，且PC桶内壁常见弧形、转角、接缝、划痕、凹陷，采用无菌棉签和无菌采样布时采样区域有限，存在采样盲区，造成样品不具有充分的代表性。此外，无菌棉签、无纺布本身有纤维孔隙，微生物被吸附后，在后续洗脱到无菌水中时洗脱不完全，大量菌体仍留在拭子上。无菌水转移到培养基时由于沉降管底、管壁吸附、震荡不足等原因，导致最终进入培养基的只是部分可洗脱菌，不是全部采集菌。

相比之下，过滤取样法在采样过程中更简便、易操作、成本低。用灭菌水整桶润洗、旋转摇动，能接触到棉签擦不到的螺纹、缝隙、划痕、凹陷，基本无采样盲区，所采集的样品更具充分代表性。

综上，我们发现过滤取样法所采集样品更具代表性，在相同取样量的情况下过滤取样法得到的微生物读数大于表面涂抹取样。因此，最终确定的取样方法为过滤取样法。

表 1 取样方法确定实验结果

取样方法	水桶最大容量/L	平行实验 1 粪链球菌计数/CFU	平行实验 2 粪链球菌计数/CFU	平行实验 3 粪链球菌计数/CFU
表面涂抹取样法	10	17	19	21
过滤取样法	10	32	33	37
表面涂抹取样法	15	16	20	18
过滤取样法	15	37	41	42
表面涂抹取样法	20	22	25	20
过滤取样法	20	46	52	52

2. 引物探针确定及特异性验证

(1) 引物探针设计

通过 NCBI 获取了粪链球菌基因序列，查阅文献资料，筛选出粪链球菌 23S rDNA 基因片段中具有较高保守性和特异性的核酸片段作为靶基因。将保守序列在 GenBank 数据库进行 BLAST 分析，验证其与其他菌株序列的同源性水平，确认片段具有良好特异性。随后应用 Primer Express 和 Primer Premier 5.0 软件进行引物和探针设计，经实际扩增验证，最终确定检测用引物（表 2）。

表 2 检测用引物和探针

名称	序列（5'—3'）	目的基因
----	-----------	------

检测用正向引物 检测用反向引物 检测用探针	5'-TTAAGTCCCGCAACGAGC-3' 5'-TTGTAGCACGTGTGTAGCCC-3' 5'-VIC-TTGACGTCATCCCCACCTTCCTCC-TAMRA-3'	细菌 16S rRNA 基 因
检测用正向引物 检测用反向引物 检测用探针	5'-AGAAATTCCAAACGAACTTG-3' 5'-CAGTGCTCTACCTCCATCATT-3' 5'-FAM-TGGTTCTCTCCGAAATAGCTTTAGGGCTA-TAMRA-3'	粪链球菌 23S rDNA 基因

(2) 特异性验证

将表 3 中所有标准菌株活化后制备成浓度约为 10^3 CFU/mL 的菌液，取包含粪链球菌在内所列 14 种标准菌种的菌液各 20uL 混合后作为目标菌液，将其余 13 种标准菌株菌液各 20uL 混合后作为对照菌液，分别提取目标菌液和对照菌液的基因组 DNA 作为模板进行扩增检测，判断引物探针的特异性。

表 3 标准菌株信息

序号	菌株名称	拉丁名	菌株编号
1	粪链球菌	<i>Enterococcus faecalis</i>	CICC 10396
2	乙型副伤寒沙门氏菌	<i>Salmonella paratyphi</i> β	CICC 10437
3	副溶血性弧菌	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	CICC 21617
4	福氏志贺氏菌	<i>Shigella flexneri</i>	CICC 21534
5	单核增生李斯特氏菌	<i>Listeria monocytogenes</i>	CICC 21633
6	大肠埃希氏菌 O157	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	CICC 10907
7	金黄色葡萄球菌	<i>Staphylococcus aureus</i>	CICC 21600
8	蜡样芽孢杆菌	<i>Bacillus cereus</i>	CICC 21261
9	大肠埃希氏菌	<i>Escherichia coli</i>	CICC 10389
10	枯草芽孢杆菌	<i>Bacillus subtilis</i>	CICC 10275
11	阪崎克罗诺杆菌	<i>Cronobacter sakazakii</i>	CICC 21544

序号	菌株名称	拉丁名	菌株编号
12	嗜热链球菌	<i>Streptococcus thermophilus</i>	CICC 6063
13	长双歧杆菌	<i>Bifidobacterium longum</i>	CICC 6068
14	荧光假单胞菌	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	CICC 21620

按照标准中所列的反应体系与条件进行实时荧光 PCR 反应，目标菌液和对照菌液扩增结果如图 1 所示，目标菌液中内参照基因与粪链球菌 23SrDNA 基因出现明显的扩增曲线，表明检出粪链球菌。对照菌液扩增中，内参照基因出现明显的扩增曲线，目的基因无明显扩增，表示未检出粪链球菌。实验结果表明，本研究建立的实时荧光 PCR 方法对粪链球菌有较好的特异性，与其他测试菌无交叉反应。

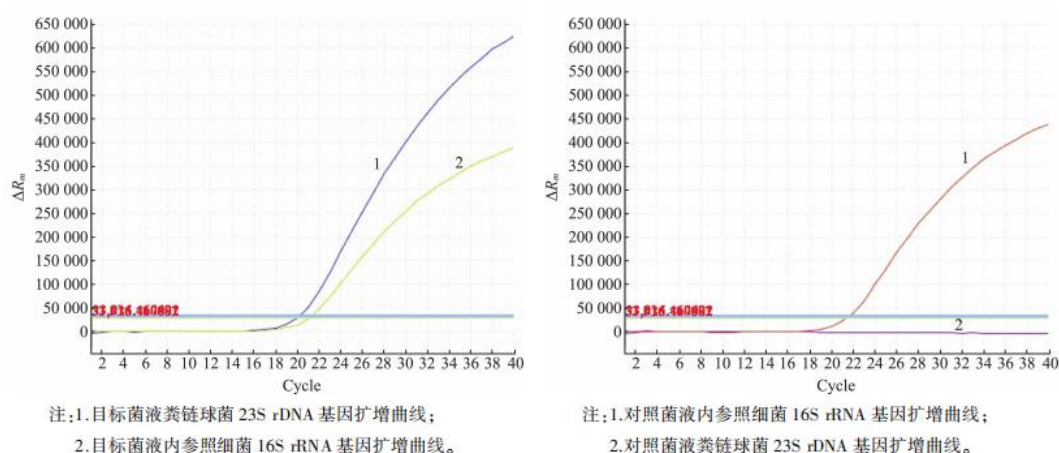


图 1 目标菌液与对照菌液扩增图

3. 重复性实验

将粪链球菌标准菌株纯化培养后，配制含粪链球菌 10^6 CFU/mL、 10^4 CFU/mL 两个不同菌浓度的菌悬液，每个浓度各测定 10 次，采用两个批号的试剂进行实验，计算变异系

数。结果见表 4，批内 Ct 值的变异系数均小于 2%，可见该实时荧光 PCR 方法具有良好的可重复性，满足实验统计学要求。

表 4 重复性实验结果

序号	Ct 值			
	第一批		第二批	
	10 ⁶ CFU/mL	10 ⁴ CFU/mL	10 ⁶ CFU/mL	10 ⁴ CFU/mL
1	19.14	23.46	18.89	23.24
2	19.23	23.31	19.21	23.38
3	18.93	23.35	18.99	23.28
4	19.10	23.34	19.25	23.31
5	19.22	23.45	19.15	23.29
6	19.18	23.23	19.34	23.41
7	19.21	23.45	19.10	23.36
8	19.11	23.27	19.23	23.25
9	18.87	23.53	19.16	23.28
10	19.32	23.42	19.21	23.23
批内变异系数	0.73%	0.41%	0.74%	0.27%

4. 真实样品模拟实验

选取日常检测工作中 10 份样品，分别采用本标准方法和国标方法 GB8538-2022《食品安全国家标准饮用天然矿泉水检验方法》模拟检测后对比实验结果。模拟实验结果（表 5）表明使用本方法与国标方法检测的结果相符合，说明使用本文建立的实时荧光 PCR 方法检测 PC 饮用水桶中粪链球

菌的准确度较高，有较好的实际应用可行性。

表 5 真实样品模拟实验结果

序号	内参照荧光	粪链球菌荧光	本标准方法检测结果	GB 8538-2022 方法检测结果
1	+	+	检出	检出
2	+	+	检出	检出
3	+	+	检出	检出
4	+	+	检出	检出
5	+	-	未检出	未检出
6	+	+	检出	检出
7	+	+	检出	检出
8	+	-	未检出	未检出
9	+	+	检出	检出
10	+	+	检出	检出

（三）标准验证

为验证方法的准确性，我们邀请了国内两家检测机构（国家水产品质量质量检验检测中心、青岛海关技术中心）对于阳性和阴性的人工添加样品运用本标准进行了检测（见附件），验证结果表明本标准方法可靠，在粪链球菌检测中具有良好的特异性和适用性，能够准确区分粪链球菌与其他非目标细菌，具备实际应用的可行性。

四、预期的经济、社会和生态效益

本标准的制定与实施，将为 PC 饮用水桶粪链球菌检测提供科学、高效的技术依据，填补行业针对性快速检测方法

空白，兼具显著经济、社会与生态效益。经济效益方面，实时荧光 PCR 方法大幅缩短检测周期，简化操作流程，减少检测机构人力、试剂与设备投入，过滤取样法提升取样效率、降低重复操作损耗，同时助力饮用水企业快速筛查桶体污染问题，减少成品不合格、召回等损失，优化品控流程并降低管控成本，还能推动实时荧光 PCR 技术在饮用水检测领域的应用，带动相关试剂、设备市场化发展。社会效益方面，该方法高特异性、高灵敏度的检测优势，可从源头把控 PC 饮用水桶卫生质量，降低粪链球菌污染引发的食源性疾病风险，保障公众饮水健康；统一的检测技术准则将规范行业市场秩序，解决检测方法不统一、结果可比性差的问题，同时提升监管部门监督抽检与应急溯源效率，倒逼企业提升工艺与品控水平，筑牢饮用水安全保障体系。生态效益方面，方法无需凝胶电泳分析，减少核酸染料等危险废弃物排放，过滤取样法降低一次性耗材使用量，且快速检测减少设备能耗，助力企业优化清洗消毒工艺，减少水资源与消毒试剂浪费，同时从源头避免不合格桶体导致的水体二次污染，践行绿色低碳发展理念，推动行业检测与生产环节的节能降耗。

五、与现行相关法律、行政法规和其他标准的关系

本标准与我国有关法律、法规、规章及相关标准无冲突。是对国家相关标准的有效补充。

六、采用国际标准的程度及水平的简要说明

本文件未完全等同、修改或非等效采用一个特定的国际标准。

七、重大分歧意见的处理经过和依据

本标准在起草过程中未出现重大意见分歧。

八、其他需要说明的内容(标准如涉及专利情况请说明)

无。

附件：实验验证报告

山东省产品质量检验研究院

2025 年 12 月 16 日

验证试验报告

项目名称	PC 饮用水桶中粪链球菌的快速定性检测 实时荧光 PCR 方法
主持单位	山东省产品质量检验研究院
主要设备	微生物过滤系统、恒温培养箱、荧光定量 PCR 仪、核酸蛋白分析仪
工作参数	<p>1、1号样品为18 L PC水桶中添加大肠埃希氏菌标准菌株CMCC(B)43201，2号样品为同规格水桶中添加粪链球菌标准菌株CMCC(B)32482。各取750 mL 无菌水分别对1号和2号样品进行充分润洗，收集所得洗脱液作为待测样液；经滤膜过滤系统完成菌落富集后，将滤膜贴于KF链球菌琼脂培养基平板进行培养，并收集菌体。随后提取菌体DNA，完成浓度测定，并进行实时荧光定量PCR检测。</p> <p>2、引物和探针、DNA提取试剂盒、商品化2×荧光定量PCR预混液购自湖南艾科瑞生物工程有限公司。</p> <p>3、实时荧光PCR反应体系为：2×荧光定量PCR预混液 12.5 μL，引物（10 μM）各0.8 μL，探针 P（5 μM）0.4 μL，样品DNA（10 ng/μL-100 ng/μL）1 μL，ddH₂O补至25 μL。</p>



	4、实时荧光PCR反应参数为：95℃预变性2 min；95℃变性 5 s，60℃退火45 s，40个循环。
--	---

一、DNA 提取结果

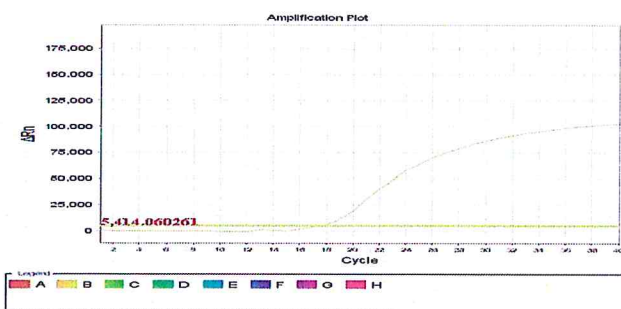
	样品	1 号样品	2 号样品	阳性对照	阴性对照
DNA 质量测定	浓度 (ng/μL)	78.5	80.1	83.1	76.5
	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	1.85	1.81	1.87	1.82

二、荧光定量 PCR 结果

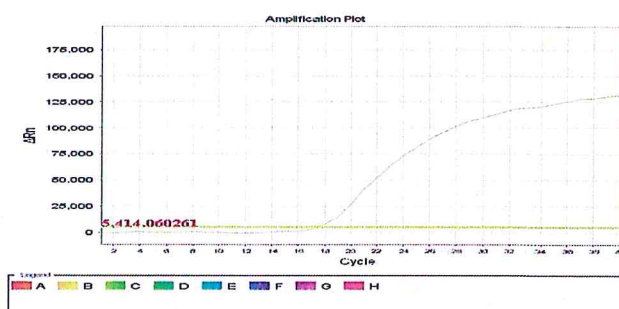
实时荧光 PCR 检测	检验样品	内参照基因扩增				基因扩增			
		平行 1		平行 2		平行 1		平行 2	
		荧光	Ct 值	荧光	Ct 值	荧光	Ct 值	荧光	Ct 值
	1 号样品 DNA	+	17.6	+	17.5	-	ND	-	ND
	2 号样品 DNA	+	20.0	+	19.8	+	28.9	+	29.2
	阳性对照	+	17.3	+	16.6	+	19.4	+	19.7
	阴性对照	+	18.7	+	19.0	-	ND	-	ND
	空白对照	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND

内参照基因荧光实时 PCR 检测曲线图

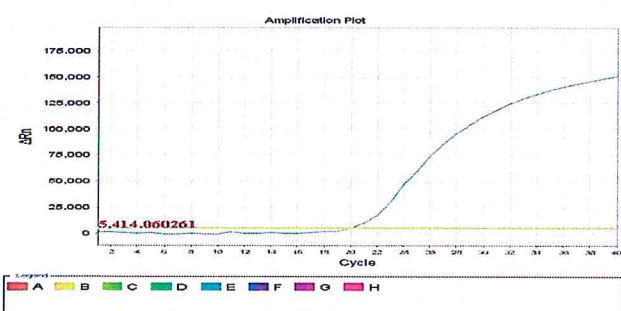
1 号样品 DNA 平行 1:



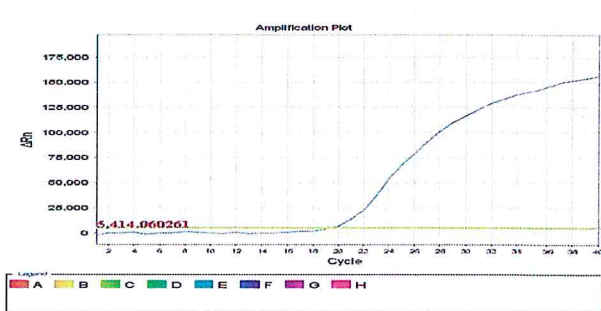
1 号样品 DNA 平行 2:



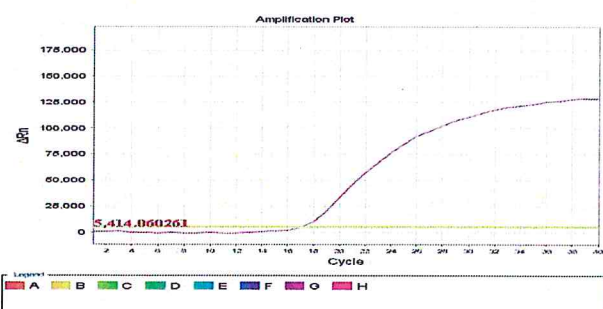
2 号样品 DNA 平行 1:



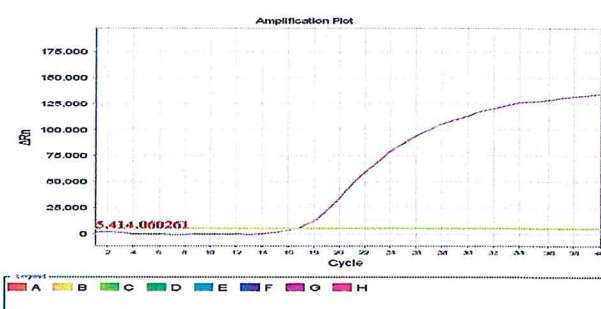
2 号样品 DNA 平行 2:



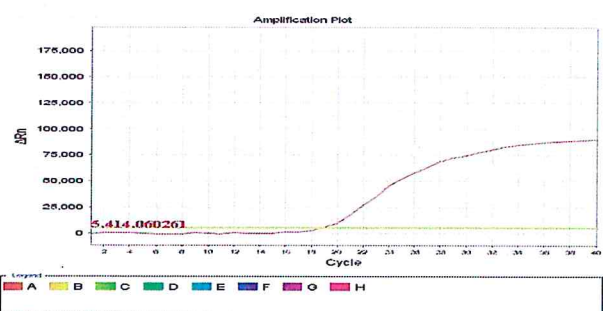
阳性对照平行 1



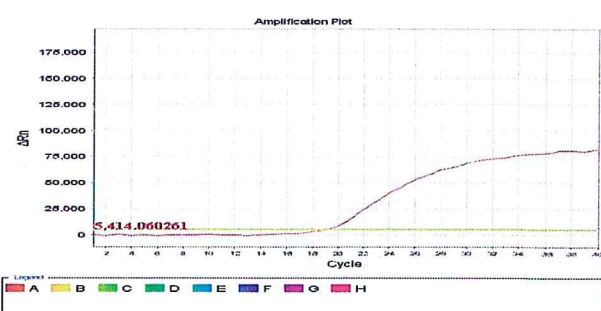
阳性对照平行 2



阴性对照平行 1:

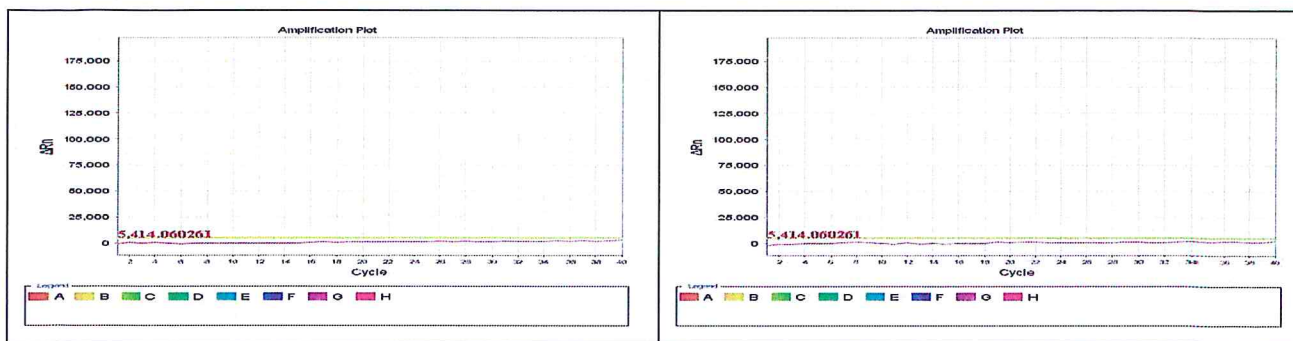


阴性对照平行 2:



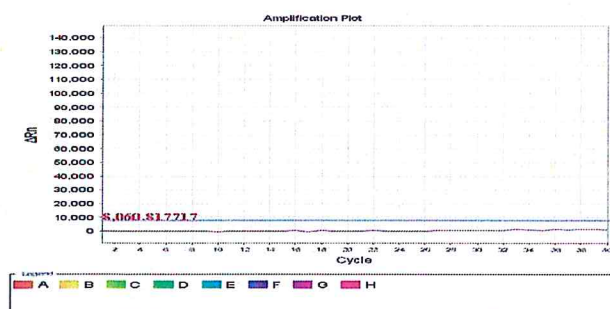
空白对照平行 1:

空白对照平行 2:

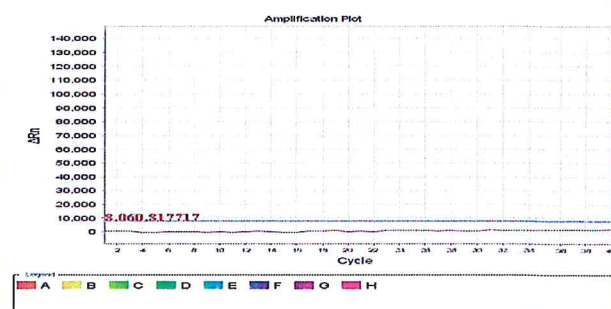


粪链球菌基因扩增荧光实时 PCR 检测曲线图

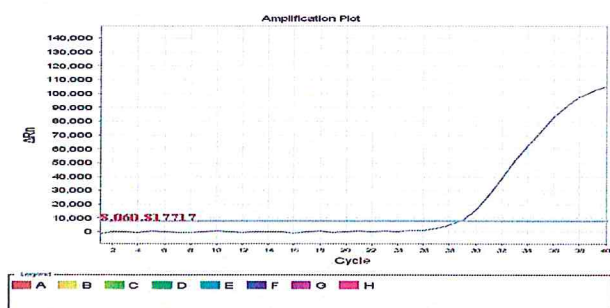
1 号样品 DNA 平行 1



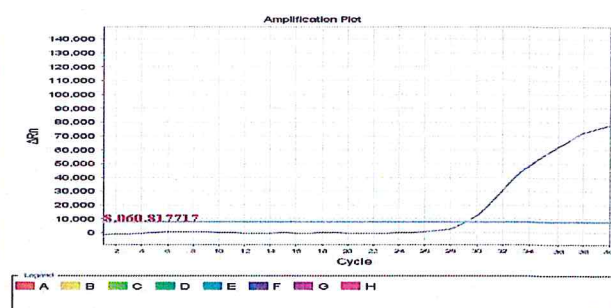
1 号样品 DNA 平行 2



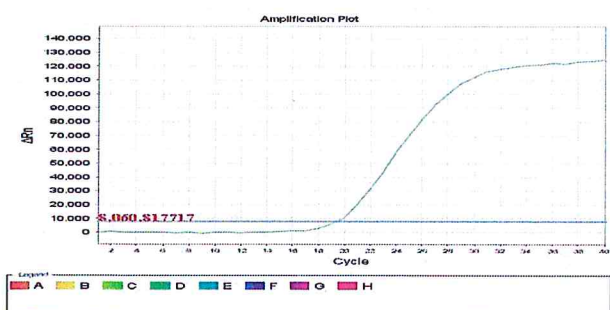
2 号样品 DNA 平行 1



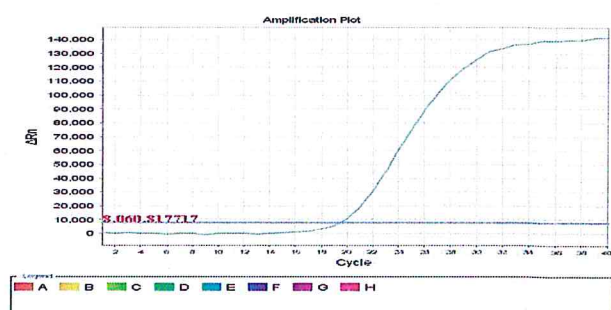
2 号样品 DNA 平行 2



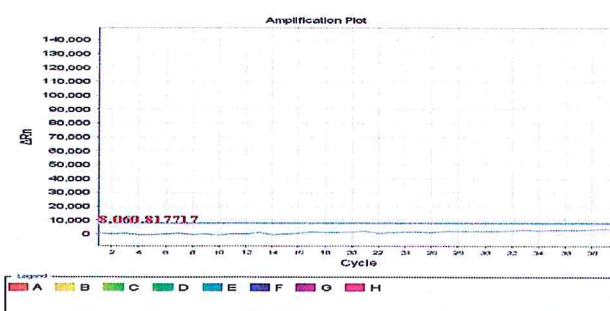
阳性对照平行 1



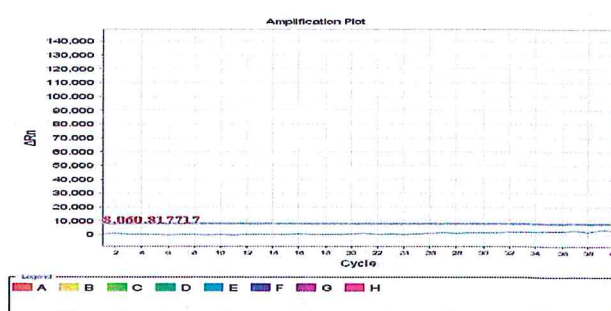
阳性对照平行 2

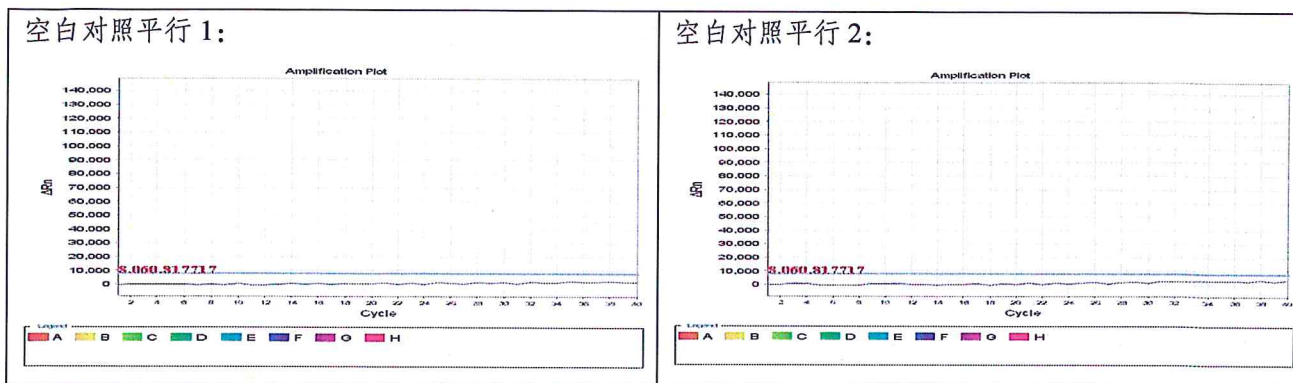


阴性对照平行 1:



阴性对照平行 2:





三、验证结论

依据山东省产品质量检验研究院团体标准规定的方法开展检测，经增菌培养、DNA 提取及实时荧光 PCR 检测后，结果显示：1 号样品未检出粪链球菌，2 号样品检出粪链球菌。

该结果验证了该标准提供的方法与引物探针等在粪链球菌检测中具有良好的特异性与适用性，能够有效区分目标菌与非目标菌，表明该方法作为一种便捷、高效的定性检测手段，具备实际应用的可行性。

验证人:

李乾坤

审核人:

姚琳

验证单位 (盖章):



验证时间: 2025.10.22



验证试验报告

项目名称	PC 饮用水桶中粪链球菌的快速定性检测 实时荧光 PCR 方法
主持单位	山东省产品质量检验研究院
主要设备	实时荧光定量 PCR 仪、紫外分光光度计、微生物过 滤检测系统、生化培养箱
工作参数	<p>1 样品设置：</p> <p>在 18 L PC 水桶中添加粪链球菌标准菌株 CMCC(B)32482，作为1号样品；</p> <p>在 18 L PC 水桶中添加大肠埃希氏菌标准菌株 CMCC(B)43201，作为2号样品。</p> <p>2 样品制备：</p> <p>分别取750 mL无菌水对1号和2号样品水桶充分润洗，收集洗脱液、并将其经滤膜过滤系统富集菌落，将滤膜置于链球菌琼脂培养基平板上培养，刮取菌落。提取菌体DNA，测定其浓度及纯度，并进行实时荧光PCR检测。</p> <p>3 试剂：</p> <p>引物和探针从宝日医生物技术（北京）有限公司定制。DNA提取试剂盒、商品化2×荧光定量PCR预混液购自南京诺唯赞生物科技有限公司。</p> <p>4 反应条件：</p>

	<p>实时荧光PCR反应体系为：2×荧光定量PCR预混液 12.5 μL，引物（10 μM）各0.8 μL，探针P（5 μM）0.4 μL，样品DNA（10 ng/μL ~ 100 ng/μL）1 μL，ddH₂O补至25 μL。反应参数为：95℃预变性2 min；95℃变性 5 s，60℃退火45 s，40个循环。</p>
--	--

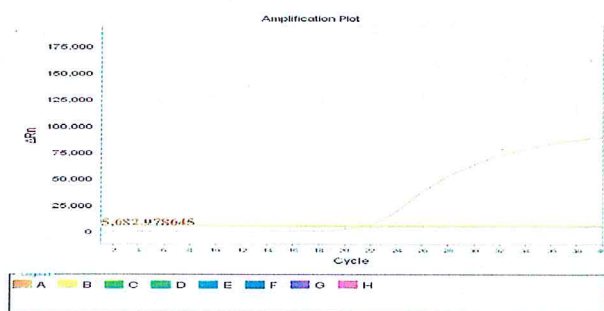
试验结果

DNA 质量 测定			1 号样品		2 号样品		阳性对 照		阴性对 照	
	浓度 (ng/μL)		58.5		69.2		60.5		50.6	
	A ₂₆₀ / A ₂₈₀		1.86		1.93		1.89		1.94	
荧光 实时 PCR 检测	检验 样品	内参照基因扩增				基因扩增				
		平行 1		平行 2		平行 1		平行 2		
		荧 光	Ct 值	荧 光	Ct 值	荧 光	Ct 值	荧 光	Ct 值	
	1 号样 品	+	21.7	+	21.2	+	29.0	+	28.8	
	2 号样 品	+	21.9	+	21.9	-	ND	-	ND	
	阳性 对照	+	18.4	+	18.2	+	20.5	+	20.3	
	阴性 对照	+	18.6	+	18.5	-	ND	-	ND	
	空白 对照	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	

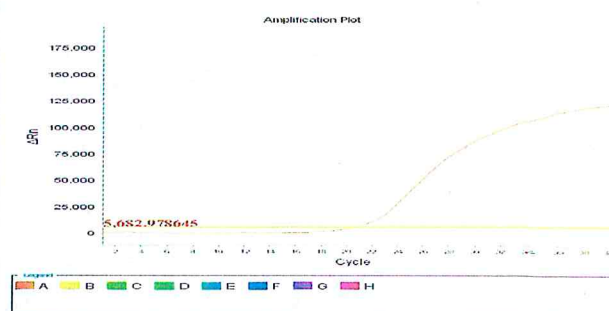
1. 白：34.5 (1)

内参照基因荧光实时 PCR 检测曲线图

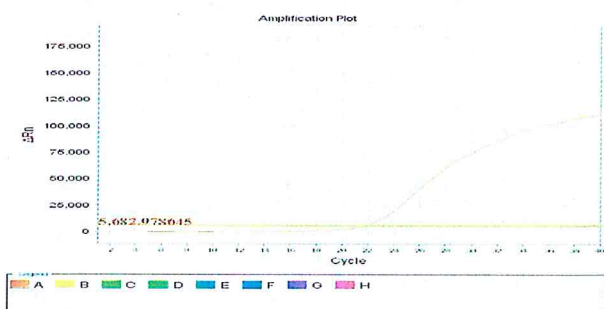
1 号样品 DNA 平行 1:



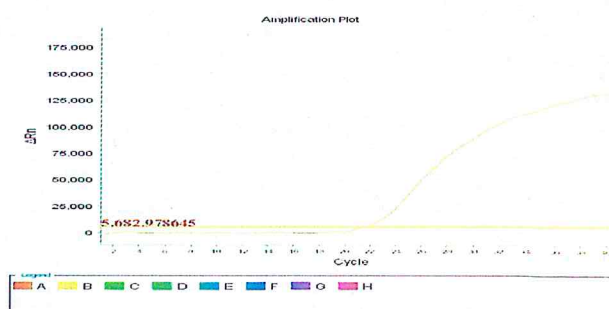
1 号样品 DNA 平行 2:



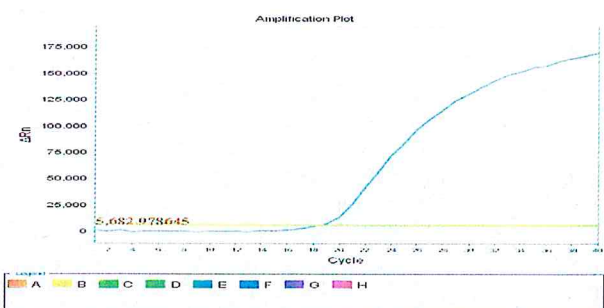
2 号样品 DNA 平行 1:



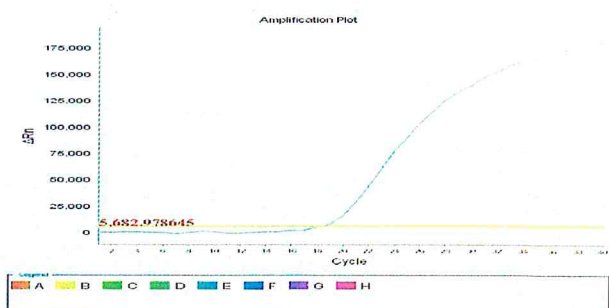
2 号样品 DNA 平行 2:



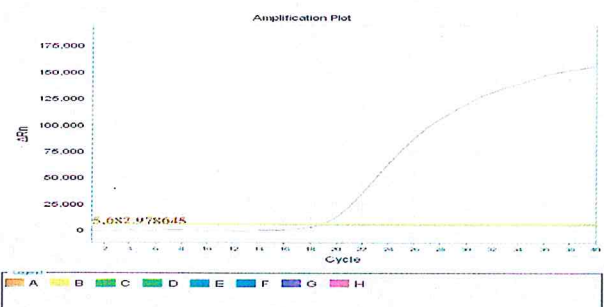
阳性对照平行 1:



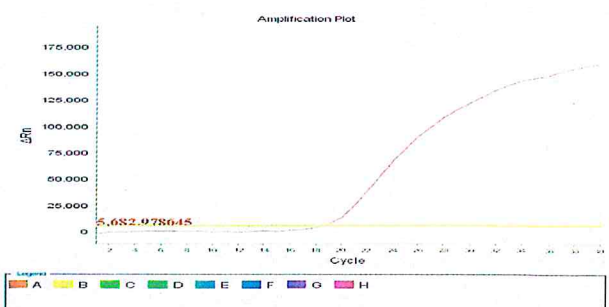
阳性对照平行 2:



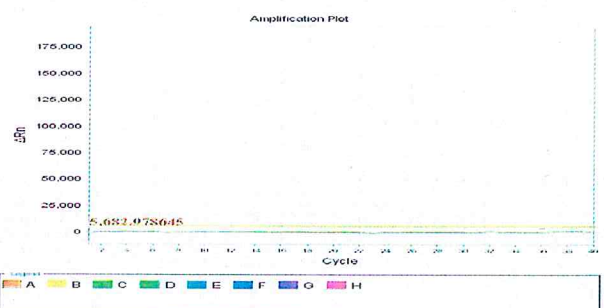
阴性对照平行 1:



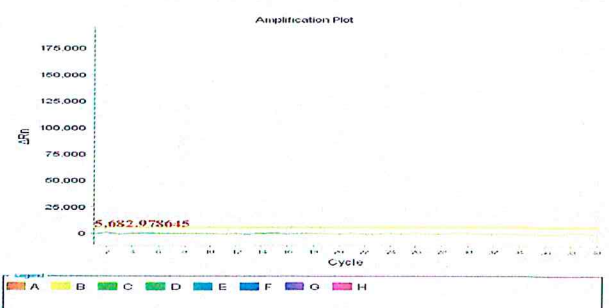
阴性对照平行 2:



空白对照平行 1:

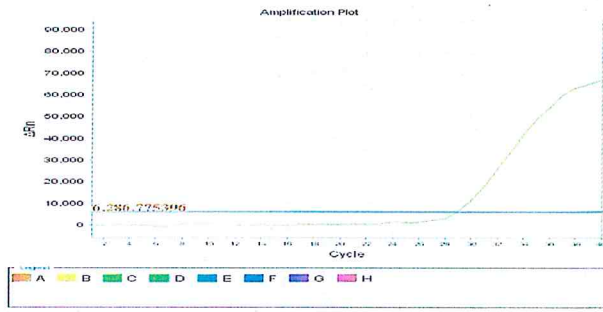


空白对照平行 2:

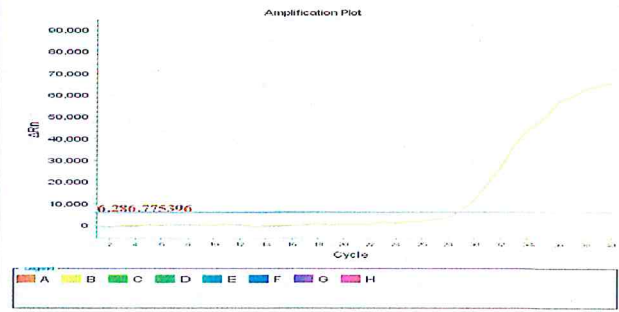


粪链球菌基因扩增荧光实时 PCR 检测曲线图

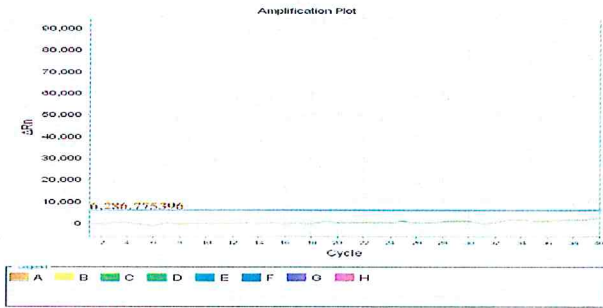
1 号样品 DNA 平行 1:



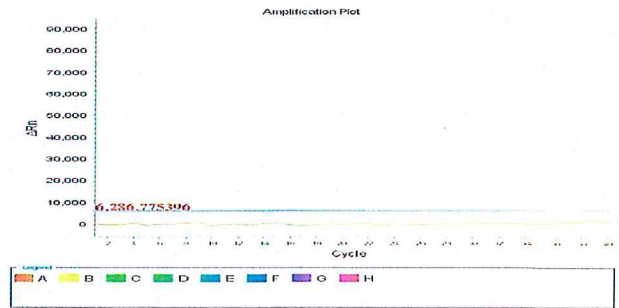
1 号样品 DNA 平行 2:



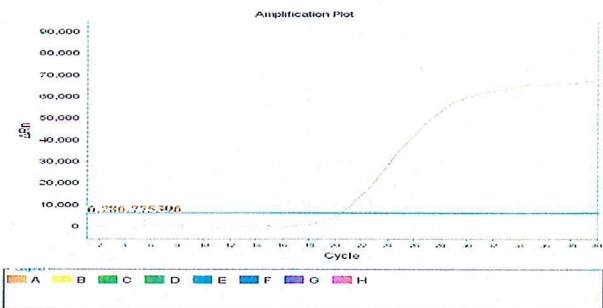
2 号样品 DNA 平行 1:



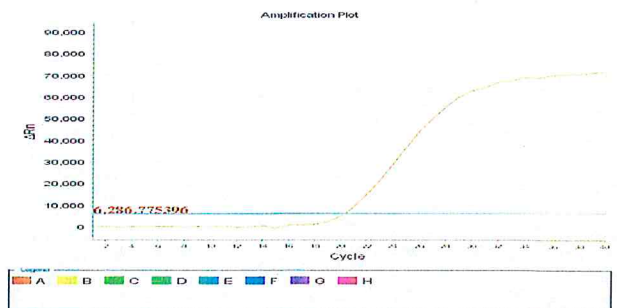
2 号样品 DNA 平行 2:



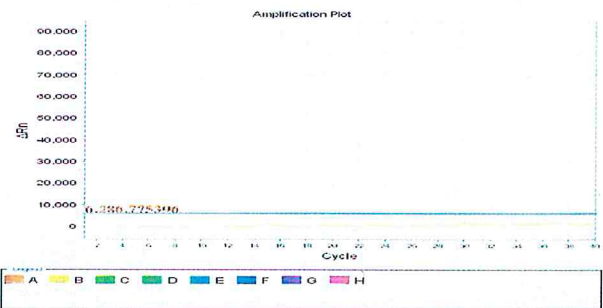
阳性对照平行 1:



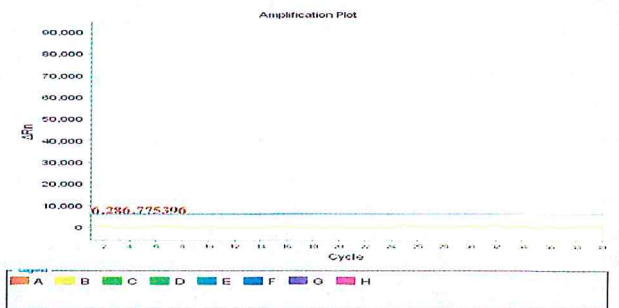
阳性对照平行 2:



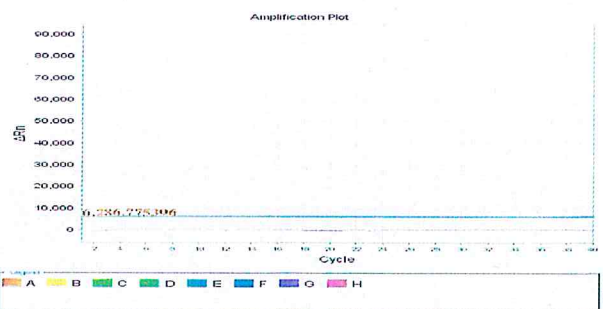
阴性对照平行 1:



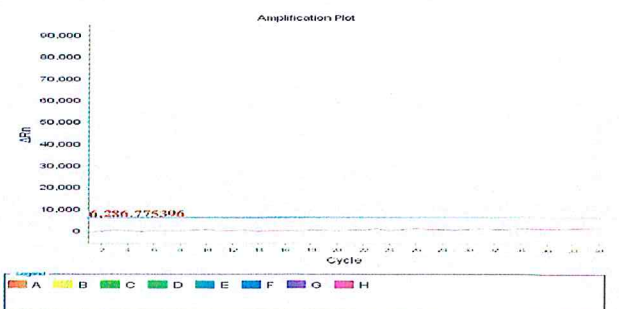
阴性对照平行 2:



空白对照平行 1:



空白对照平行 2:



（此处有红色印章）

结论

本次验证试验，严格遵循了山东省产品质量检验研究院制定的团体标准规定的方法进行检测。具体流程包括增菌培养、DNA 提取及荧光定量 PCR 检测等。

试验结果表明：该方法增菌和 DNA 提取效果良好、获取的 DNA 样品具有较高的浓度和纯度，适宜后续检测；经荧光定量 PCR 检测，1 号样品中检出粪链球菌，2 号样品中未检出粪链球菌，与样品制备时添加阳性菌株的情况相一致。

试验表明，该团体标准所设计的引物探针、以及设计的实验流程与方法，在粪链球菌检测中具有良好的特异性和适用性，能够准确区分粪链球菌与其他非目标细菌等。综上所述，该方法具有精准、高效、操作便捷等优点，作为一套快速的粪链球菌定性检测方法，具备在各大检测机构和相关生产企业中推广应用的可行性。

验证单位（盖章）：



验证时间：2025-10-22