

# 矿泉水中臭氧杀灭霉菌效果研究

张菊梅 吴清平 郭伟鹏

(广东省微生物研究所, 广东省菌种保藏选育重点实验室, 广州, 510070)

**摘 要** 采用从生产现场及矿泉水瓶和盖分离出的卵形孢霉(*Oospora* sp.)、刀孢霉(*Clasterosporium* sp.)、青霉(*Penicillium* sp.)、结实串孢霉(*Hormiscium* sp.)、峡筒串孢霉(*Prophytroma* sp.)和南方常见污染霉菌中的黑曲霉(*Aspergillus niger*)MIG3.27、米曲霉(*Aspergillus oryzae*)MIG3.29、桔青霉(*Penicillium citrinum*)MIG3.100、绳状青霉(*Penicillium funiculosum*)MIG3.104、拟康氏木霉(*Trichoderma pseudokoningi*)MIG3.142等标准菌株作为试验菌株,分别用PET瓶灌装臭氧质量浓度为0.1、0.3和0.6 mg/L的矿泉水后,在矿泉水瓶和瓶盖中分别添加0~30个霉菌孢子,当矿泉水中臭氧质量浓度达到0.3 mg/L以上时,对霉菌孢子有较好的杀灭效果,平均存活阳性率<10%。在1年保质期内,霉菌存活阳性率在不同存放时间差异不大。

**关键词** 矿泉水 臭氧 霉菌

臭氧( $O_3$ )是强氧化剂,因其无残留且易分解,目前广泛应用于矿泉水、纯净水等不能添加任何防腐剂的瓶装饮用水中,消毒灭菌。虽然臭氧水溶液具有很强的氧化杀菌能力,但各种微生物耐受臭氧的程度差别很大,细菌芽孢和霉菌孢子都有很强的耐臭氧能力,而生产厂家外购的PET瓶和瓶盖经常检出霉菌,直接对产品质量造成危害。本文就矿泉水生产中如何选择合适的臭氧浓度及控制包装材料的微生物限量指标,以霉菌孢子为指示,考察臭氧对霉菌的杀灭效果。

## 1 材料与方法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 包装物

瓶盖、500 mL PET瓶。

#### 1.1.2 测试菌株

从生产现场分离5株霉菌,经鉴定为<sup>[1]</sup>:卵形孢霉(*Oospora* sp.)、刀孢霉(*Clasterosporium* sp.)、青霉(*Penicillium* sp.)、结实串孢霉(*Hormiscium* sp.)、峡筒串孢霉(*Prophytroma* sp.)。广东省微生物研究所提供的试验用霉菌5株:黑曲霉(*Aspergillus niger*)MIG3.27、米

曲霉(*Aspergillus oryzae*)MIG3.29、桔青霉(*Penicillium citrinum*)MIG3.100、绳状青霉(*Penicillium funiculosum*)MIG3.104、拟康氏木霉(*Trichoderma pseudokoningi*)MIG3.142。

#### 1.1.3 培养基

虎红琼脂培养基、察氏琼脂培养基(分离培养霉菌用)、抗臭氧霉菌液态培养基(当天取样用)、霉菌液态培养基。

## 1.2 试验方法

#### 1.2.1 制备霉菌孢子混悬液

用无菌生理盐水将新鲜培养的测试菌株的孢子洗下,计数,等量混合,制成孢子混悬液,备用。

#### 1.2.2 调节灌装臭氧质量浓度

在试验现场所要调节的目的臭氧质量浓度为0.1、0.3、0.6 mg/L,为确保所调目的臭氧质量浓度的准确和缩短到达时间,采用从低浓度调节至高浓度的做法。采用广东环凯微生物科技公司生产的臭氧浓度DPD快速测定试剂盒。

#### 1.2.3 利用臭氧进行杀菌试验

(1)在无菌PET瓶中灌装含臭氧的矿泉水,加入一系列不同数量的霉菌孢子,了解不同放置时间其霉菌检出率。具体操作为:用灭菌生理盐水将霉菌孢子混悬液稀释至约

10 个/mL( 实际数以平板计数为准 ), 在无茵 PET 瓶中 , 灌装含臭氧的矿泉水后 , 分别加入霉菌孢子混悬液 0、0.2、0.4、1.0、3.0mL , 各加 80 瓶 , 旋盖。

( 2 ) 瓶盖加霉菌 , 考察不同放置时间霉菌检出率。具体操作为 : 用灭菌生理盐水将霉菌孢子混悬液稀释至约 10 个/mL 和 50 个/mL 在瓶盖上分别滴加 10 个/mL 的孢子混悬液 0、0.2、0.4mL , 使孢子数达 0、2、4 个/盖 , 各加 80 个 ; 在瓶盖上滴加 50 个/mL 的孢子混悬液 0.2、0.6mL , 使孢子数达 10、30 个/盖 , 各加 80 个。边加菌液边旋入刚灌好的含臭氧矿泉水瓶中<sup>[ 2 ]</sup>。

1.2.4 检测臭氧杀菌效果

灌装完毕即抽样检查作为对照 , 1 d、15 d、30 d、60 d、半年及 1 年 , 每个处理分别抽样

10 瓶 , 用霉菌液态大样法( 样品摇匀 , 倒去 400 mL , 瓶中剩 100 mL , 加入 3 料霉菌液体培养基 50 mL , 30℃ 培养 48 ~ 72 h ) 取样检查瓶中霉菌的存活情况。当天取样用抗臭氧霉菌液体培养基 , 其余用普通霉菌液体培养基 , 并结合肉眼观察瓶中有无絮状飘浮物 , 详细记录结果<sup>[ 3 ]</sup>。

2 实验结果

2.1 矿泉水瓶加菌试验

2.1.1 检验结果

样品在规定的存放时间( 0 ~ 1 年 ) 内进行抽样检查 , 如检出霉菌 , 表明霉菌存活阳性 , 每个处理每次抽样 10 瓶的检验结果以阳性率表示 , 不同 O<sub>3</sub> 浓度、不同添加菌量、不同时间的检验结果见表 1。

表 1 瓶加菌实验中 O<sub>3</sub> 质量浓度、添加菌量、取样时间对霉菌存活阳性率的影响

臭氧质量浓度 /mg·L <sup>-1</sup>	取样时间 /d	阳性率/%					平均值 X <sub>j</sub>
		添加霉菌孢子数/个·( 500 mL ) <sup>-1</sup>					
		0	2	5	12	36	
0.1	0	20	50	70	90	60	58
0.3		0	0	0	0	20	4
0.6		0	0	0	0	0	0
0.1	1	20	30	90	100	50	58
0.3		0	0	0	0	0	0
0.6		20	0	0	0	0	4
0.1	15	0	20	70	90	80	52
0.3		0	0	0	0	0	0
0.6		0	0	10	10	10	6
0.1	30	10	30	40	90	60	46
0.3		0	0	0	10	0	2
0.6		0	0	10	0	0	2
0.1	60	10	60	70	90	50	56
0.3		0	20	10	0	10	8
0.6		0	0	20	0	0	4
0.1	182	0	0	40	100	60	40
0.3		0	0	0	0	10	2
0.6		0	10	10	0	0	4
0.1	365	20	30	70	90	30	48
0.3		0	0	0	0	10	2
0.6		0	10	20	0	0	6
平均值 X <sub>i</sub>		11.43	30.00	64.29	92.86	55.71	
		0	2.86	1.43	1.43	7.14	
		2.86	2.86	10.00	1.43	1.43	

2.1.2 不同臭氧质量浓度对霉菌在矿泉水中存活情况的影响分析

根据表 1 结果 , 利用双因子( 添加菌量

A , 放置时间 B ) 在 O<sub>3</sub> 质量浓度分别为 0.1、0.3、0.6 mg/L 的条件下进行因素分析 , 确定 A、B 决定性影响因素 , 因素分析结果为<sup>[ 4 ]</sup>:

$F_{A1} \gg F_{\alpha}$ ,  $F_{A2}$ 、 $F_{A3} < F_{\alpha}$  ;  
 $F_{B1}$ 、 $F_{B2}$ 、 $F_{B3} < F_{\alpha}$ ( 设定  $\alpha$  为 0.05 水平 )  
从计算结果可知 ,在本实验条件下 ,当  $O_3$  为 0.3、0.6 mg/L 时 ,不同添加菌量与存放时间对霉菌在矿泉水中的存活阳性率差异不大 ;当  $O_3$  为 0.1 mg/L 时 ,添加菌量对霉菌在矿泉水中的存活阳性率有显著的影响。

根据不同  $O_3$  浓度、不同添加菌量及存放时间作趋势比较图( 见图 1、图 2 )。从图 1、图 2 可以看出 ,当矿泉水中  $O_3$  为 0.1 mg/L 时 ,在不同的添加菌量及不同的存放时间 ,霉菌保持了较高的阳性存活率 ;当  $O_3$  达到 0.3、0.6 mg/L 时 ,对霉菌的杀灭效果较好 ,霉菌的阳性存活率较低 ,同时 随添加菌量的增加和存放时间的延长 ,霉菌的阳性存活率差异不大。

2.2 矿泉水瓶盖加菌试验

2.2.1 检验结果

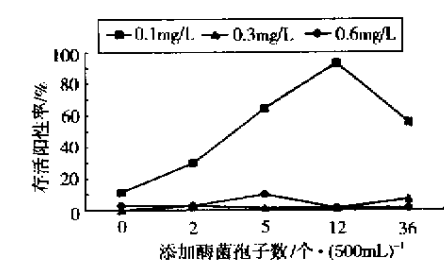


图 1 瓶加菌实验中不同臭氧浓度下添加菌量与霉菌存活阳性率的关系

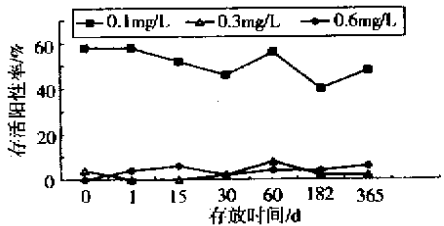


图 2 瓶加菌实验中不同臭氧浓度下样品存放时间与霉菌存活阳性率的关系

检验结果的处理与矿泉水瓶盖加菌试验相同 ,检验结果见表 2。

表 2 瓶盖加菌实验中中  $O_3$  质量浓度、添加菌量、取样时间对霉菌存活阳性率的影响

臭氧质量浓度 /mg·L <sup>-1</sup>	取样时间 /d	阳性率/%					平均值 X <sub>j</sub>
		添加霉菌孢子数/个·( 500mL ) <sup>-1</sup>					
		0	2	5	14	41	
0.1	0	20	10	0	0	10	8
0.3		0	0	0	10	0	2
0.6		0	0	0	0	0	0
0.1	1	20	0	0	0	20	8
0.3		0	10	0	0	0	2
0.6		20	0	0	0	0	4
0.1	15	0	0	10	10	30	10
0.3		0	0	0	0	0	0
0.6		0	0	20	10	0	6
0.1	30	10	0	20	0	20	10
0.3		0	0	10	0	0	2
0.6		0	10	0	0	0	2
0.1	60	10	30	20	10	40	22
0.3		0	10	0	20	10	8
0.6		0	0	10	0	0	2
0.1	182	0	20	0	10	50	16
0.3		0	0	0	0	0	0
0.6		0	0	0	0	10	2
0.1	365	20	20	20	50	20	26
0.3		0	0	10	0	40	10
0.6		0	0	0	0	10	2
平均值 X <sub>i</sub>		11.43	11.43	10.00	11.43	27.14	
		0	2.86	2.86	4.29	7.14	
		2.86	1.43	4.29	1.43	2.86	

### 2.2.2 不同臭氧质量浓度对霉菌在矿泉水中存活情况的影响分析

根据表 2 结果,进行因素分析,判断添加菌量 A、放置时间 B 及  $O_3$  质量浓度对存活率的影响。因素分析结果为:

$F_\alpha > F_{A1} > F_{A2} > F_{A3}$ , 同时  $F_\alpha > F_{B1} > F_{B2} > F_{B3}$  (设定  $\alpha$  为 0.05 水平)。

所以  $O_3$  质量浓度较添加菌 A、放置时间 B 对霉菌存活率的影响大。根据不同  $O_3$  质量浓度、不同添加菌量及存放时间作趋势比较图(见图 3、图 4)。

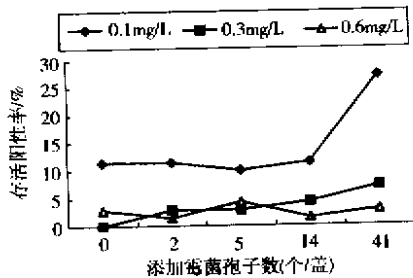


图 3 瓶盖加菌实验中在不同臭氧质量浓度下添加菌量与霉菌存活阳性率的关系

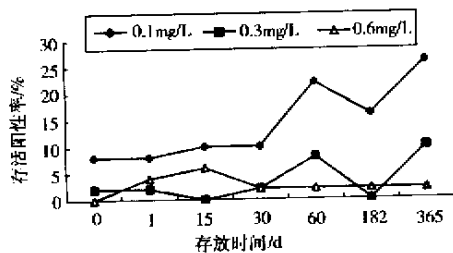


图 4 瓶盖加菌实验中不同臭氧质量浓度下样品存放时间与霉菌存活阳性率的关系

从图 3、图 4 可以看出,瓶盖中添加菌时,  $O_3$  对霉菌的抑杀效果与矿泉水瓶中加菌结果一致。

## 3 讨论

臭氧的氧化能力很强,水中的无机和有机物质均易被臭氧所氧化。在天然矿泉水等饮用水的生产中臭氧的功效主要是灭菌,其杀菌效果与其浓度、水温、pH 等有关,浓度高杀菌效果好。但并非越高越好,在矿化度较高的矿泉水中使用过高浓度的臭氧,易引起产品中期和后期产生沉淀,同时亦不经济。因此,在矿泉水的生产中就涉及到如何选择合适的臭氧质量浓度问题。

霉菌污染一直是矿泉水生产比较棘手的问题,各生产厂家由于生产条件与环境条件不同,污染环节及污染的霉菌也不相同。本试验采用从生产现场及矿泉水瓶和盖分离出的 5 株霉菌和南方常见污染霉菌中的 5 株标准菌株作为试验菌株,模拟实际生产中残留少量微生物的情况,观察矿泉水中保持的残留臭氧量对微生物的抑杀情况。根据结果分析可知,在本实验条件下,成品水中保持臭氧浓度为 0.3 mg/L、0.6 mg/L 时对霉菌的杀灭效果较好,在产品保质期 1 年内,霉菌存活情况在不同的放置时间差异不大,其平均存活阳性率  $< 10\%$ 。我们同时进行了在瓶盖添加霉菌的试验,得出的结果是一致的。因此从产品质量控制和经济角度考虑,矿泉水生产选择 0.3 ~ 0.6 mg/L 臭氧为佳。

## 参考文献

- 魏景超著. 真菌鉴定手册. 上海:上海科学技术出版社,1979
- 李正明,吴寒编. 矿泉水和纯净水工业手册. 北京:中国轻工业出版社,2000
- 吴清平,蔡芷荷,张菊梅等. 微生物学通报,2000,27(1):1~4
- 袁荫棠编. 概率论与数理统计. 北京:中国人民大学出版社,1990

## Study on Killing Mold in Mineral Water Using Ozone

Zhang Jumei Wu Qingping Guo Weipeng

(Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou, 510070)

**ABSTRACT** 10 mold strains were selected as test strains, in which, *Oospora* sp., *Clasterosporium* sp., *Penicillium* sp., *Hormiscium* sp. and *Prophythroma* sp. were isolated from mineral water production site, bottles and caps, and other 5 standard mold strains, *Aspergillus niger* MIG3.27, *Aspergillus oryzae* MIG3.29, *Penicillium citrinum* MIG3.100, *Penicillium funiculosum* MIG3.104 and *Trichoderma pseudokoningi* MIG3.142 were the common pollution molds in south China. 0 ~ 30 mold spores were added into the mineral water bottles, caps respectively and different concentrations (i.e. 0.1, 0.3 and 0.6 mg/L) of ozone were test. It had a good effect on killing mold spores when ozone concentration were 0.3 and 0.6mg/L in mineral water, and their average positive percentage of molds were lower than 10 percent. There were no obvious differences of positive percentage of mold – survival in different sampling time within one year shelf time.

**Key words** mineral water, ozone, mold



## 《中华人民共和国食品监督管理实用法规手册》

### 予以 6 折优惠

《中华人民共和国食品监督管理实用法规手册》由国务院法制办工交司、国家质量技术监督局监督司审定,中国食品工业协会编辑,中国工人出版社出版。自 2001 年出版发行以来,销售颇广,现尚有部分存书,予以 6 折优惠销售。

食品监督管理法律、法规和规章是政府有关管理部门和质量监督检验机构、食品卫生监督检验机构等依法行政的根据,是食品生产经营者必须遵循的行业规范,也是食品行业 and 食品市场规范发展的重要保证。该书将有关食品监督管理的重要、现行、有效的法律、法规、规章汇编成册,使其在系统性、全面性和时效性方面能够更好地满足各方面的需要。

该书收录了由全国人大及其常委会、国务院以及国家质量技术监督局、卫生部、国家轻工业局、农业部、外贸部、国家工商局、国内贸易局等政府机构以及地方立法机构和政府部门制定、颁发的与食品行业有关的法律、法规、规章,基本涵盖了食品监督管理方面的现行、有效的法规性文件。在内容和编排上突出了时效性和实用性,资料丰富,使用方便,可作为各级执法机关、检验机构、科研院所和生产、经营企业参考用书。

现尚有部分存书,请速向全国食品与发酵工业信息中心办理邮购。订书单位和个人,可通过邮局汇款(汇款单中请用正楷字填写单位地址、邮编及联系人),中心收到书款后立即发货。

该书原定价 298 元/本(每本另加邮费 12 元)现予以 6 折优惠,售价为 178 元/本(含邮费)

该书 150 万字,装帧精美,近期不会重版,存书数量不多,请速订购。

电话: 010-64645559 646666550 传真 010-64647111

地址: 北京市朝阳区霄云路 32 号 全国食品与发酵工业信息中心

邮编: 100027

联系人: 卢 仡 林红华