

饮用水

微生物检验技术

MICROBIOLOGICAL EXAMINATION TECHNIQUES OF
DRINKING WATER

张明露 张 灿 吴艳艳 / 编著



中国环境出版社

饮用水微生物检验技术

张明露 张 灿 吴艳艳 / 编著

中国环境出版社·北京

图书在版编目 (C I P) 数据

饮用水微生物检验技术/张明露等编著. —北京: 中国环境出版社, 2015.8

ISBN 978-7-5111-2495-1

I. ①饮… II. ①张… III. ①饮用水—水质监测—微生物检定
IV. ①R123.1

中国版本图书馆CIP数据核字 (2015) 第182953号

出 版 人 王新程
责任编辑 陈雪云
责任校对 尹 芳
封面设计 彭 杉

出版发行 中国环境出版社
(100062 北京市东城区广渠门内大街16号)
网 址: <http://www.cesp.com.cn>
电子邮箱: bjgl@cesp.com.cn
联系电话: 010-67112765 (编辑管理部)
010-67112735 (第一分社)
发行热线: 010-67125803 010-67113405 (传真)

印 刷 北京中献拓方科技发展有限公司
经 销 各地新华书店
版 次 2015年8月第1版
印 次 2015年8月第1次印刷
开 本 787×1092 1/16
印 张 9.75
字 数 225千字
定 价 35.00元

【版权所有。未经许可, 请勿翻印、转载, 违者必究。】
如有缺页、破损、倒装等印装质量, 请寄回本社更换。

前 言

饮用水是人类生存的基本需求，随着人民生活水平的不断提高，人们对饮用水质量的要求也越来越高，饮用水安全问题越来越受到重视。特别是近年来世界各国相继发生的重大饮用水安全事件，给饮用水安全敲响了警钟。因此，建立灵敏度更高、特异性更强、更简便快捷的饮用水安全检测技术和方法，完善饮用水安全微生物检测技术和体系迫在眉睫。

近几年世界各国的许多机构和学者都致力于快速检测技术和方法的研究，并且已改进和开发了一些快速的检测技术和方法，饮用水微生物的研究也已取得很多进展，大大加深了人们对饮用水微生物的认识。从传统的依赖培养的平板计数法到群落水平的生理生化方法，再到基于 PCR 技术的现代分子生物学方法，微生物检测技术已由培养水平逐步向分子水平迈进。本书不但全面介绍了饮用水微生物常规检验方法，更注重介绍国际上新兴的快速检测方法和新技术。

本书在编写过程中参考了国内外大量研究资料，全书共 7 章，第 1 章绪论，第 2 章介绍微生物检验基础操作技术，第 3 章介绍样品的采集及常规微生物指标检测，第 4 章介绍现代微生物检验技术，第 5 章介绍活的非可培养状态细菌（VBNC）的检测，第 6 章介绍饮用水中抗生素残留及其检测以及第 7 章介绍细菌内毒素及其检测。

本书的主要编著人员有：张明露（第 1 章、第 4 章、第 5 章、第 6 章），张灿（第 2 章、第 3 章、第 7 章），吴艳艳（第 3 章）。全书由张明露统稿。此外，在本书的编写过程中，周贺，潘丁等参与了部分资料收集、图表设计等工作，在此一并表示感谢。

限于编者的能力和水平，书中难免有不足之处。敬请广大读者、专家和同行批评指正。

编 者

2015 年于北京工商大学

目 录

第 1 章 绪论.....	1
1.1 饮用水中微生物污染状况	2
1.2 饮用水微生物标准	4
1.3 我国饮用水微生物标准存在的问题	7
1.4 饮用水微生物污染的控制	8
第 2 章 微生物检验基础操作技术	10
2.1 微生物检验常用仪器	10
2.2 细菌形态结构的检验	19
2.3 微生物的消毒灭菌	24
2.4 微生物的分离和纯培养	31
第 3 章 样品的采集及常规微生物指标检测	38
3.1 水样的采集与处理	38
3.2 水样的运输、标记和保存	39
3.3 饮用水中常规微生物指标的检测	41
第 4 章 现代微生物检验技术.....	57
4.1 微生物快速检测方法	57
4.2 现代免疫技术	66
4.3 分子生物学技术	74
4.4 生物芯片技术	92
4.5 生物传感器检测技术	93
第 5 章 活的非可培养状态细菌 (VBNC) 的检测	97
5.1 VBNC 细菌简介	97
5.2 VBNC 细菌的检测方法	100

第 6 章 饮用水中抗生素残留及其检测	108
6.1 抗生素的污染现状	108
6.2 抗生素污染水环境的途径和危害	109
6.3 水体中抗生素的检测	114
第 7 章 细菌内毒素及其检测	121
7.1 细菌内毒素的特性	121
7.2 饮用水的内毒素污染状况	122
7.3 饮用水内毒素污染的暴露途径及风险分析	124
7.4 饮用水中内毒素检测方法	126
7.5 结论	134
附 录	135
附录 I 30 种抗生素的基本性质	135
附录 II 抗生素微生物检定法标准曲线法的计算及统计学检验	140
附录 III 培养基及其制备方法	142
参考文献	145

第1章 绪论

水是人类生活不可缺少的重要物质，也是人体的重要组成部分，饮水安全与人类健康息息相关。据世界卫生组织（WHO）的不完全统计，全球有 88% 的疾病应该归咎于不安全的用水和相关的卫生设施的缺乏。水作为维持生命和新陈代谢必不可少的物质与人体健康的关系可见一斑。WHO 于 1992 年 9 月在日内瓦召开的修改《饮用水水质标准》（以下简称《准则》）会议中，明确了修订的主导思想是：控制微生物的污染是极端重要的，并指出与饮用水有关的卫生问题大多来自微生物，包括细菌、病毒和原生动物等。微生物污染的潜在后果使对其控制总是最重要的，绝不允许让步。应该注意的是，在水处理中使用化学消毒剂通常引起化学副产物的形成，其中部分具有潜在危险性。与消毒不彻底相比，这些副产物所引起的健康风险是非常低的，因此不应该为控制副产物而牺牲消毒效果。因为微生物污染能在同一时间内造成大片人群发病或死亡。

20 世纪以来，饮用水生物污染问题日益严重，几次大的疾病暴发流行，特别是 2003 年 SARS 在全球的暴发，使公众对影响健康的病原微生物更加关注。人类对饮用水中污染物对健康危害的认识，最早也是从病原微生物开始的。人类对饮用水采取了过滤消毒等多种手段，来减少病原微生物的威胁，使很多国家介水传染病的发病率大幅降低。尽管人类在控制饮用水传播致病性生物方面已经取得很大的成就，但生物导致的饮用水污染事件在发达国家和发展中国家都时有暴发。例如 1993 年在美国威斯康星州密尔沃基市暴发了由隐孢子虫引起的水传染病，共 40.3 万人得病，4 000 余人住院治疗，112 人死亡；1994 年美国拉斯维加斯市暴发隐孢子虫病，20 名艾滋病患者死亡；2000 年，加拿大安大略省沃尔克顿镇山洪暴发造成病菌感染饮用水，引起了加拿大历史上最严重的大肠杆菌传染，造成 5 000 多人染病，7 人死亡。近年来我国也暴发过多次饮用水生物污染事件，例如 1987 年在南京市区首次发现了隐孢子虫病例，随后在徐州、安徽、内蒙古、福建、山东和湖南等省市均报道发现了病例；2009 年，赤峰市发生饮用水受沙门氏菌污染事件，受感染人群高达 4 322 人，影响范围之大，在我国尚属首次；2005 年，某师范学校由于污水管道破裂污染水源，暴发了由沙门氏菌和福氏痢疾杆菌引发的细菌性痢疾，导致 238 名学生出现腹痛、腹泻的症状；2011 年 4 月，黑龙江省依兰县由于地下供水管线受到污染，导致大肠杆菌超标，引起 2 600 余户居民陆续出现腹泻、腹痛症状；2011 年的另一次较大规模饮用水污染事件发生在河南省潢川县，报道 294 例腹泻病例，本次事件是由于饮用水受到污染造成的，受测水源中大肠杆菌严重超标。在饮用水中不断发现新的对人类造成重大危害的病原微生物，如大肠杆菌 O157：H7、军团菌、隐孢子虫和柯萨奇病毒等，常规饮用水处理技术难

以有效地去除。由于环境污染日益加剧，还会产生一些新的病原微生物，危害人类健康。水污染事件的频发使饮用水安全已成为全球性的重大战略性问题，受到世界各国的普遍关注。

1.1 饮用水中微生物污染状况

天然水体中已鉴定存在多种可能的病原微生物，包括细菌、病毒和原虫等，其主要来源是人畜排泄物，水是这些致病菌的重要传播途径。通过接触受损害皮肤、吸入、饮用、呼出或与眼、鼻、耳、口等黏膜直接接触危害人体健康，如导致霍乱、伤寒、痢疾等疾病。这些病原微生物一旦进入自来水厂便可附着于水处理设备的生物膜上或在配水管线、储水塔中再生长。为了使水质符合细菌学标准，自来水厂主要采用通氯气、加二氧化氯消毒液等消毒方法，灭活或去除所有致病菌，使其达到可接受的水平，保障饮水卫生安全。

通常认为经过处理的自来水应不含致病性微生物，不存在安全隐患，然而实际上，经过一定程序处理和药剂消毒的饮用水仍可能含有病原微生物。在净水厂内或是配水管线、储水塔中也有可能因为水中存在的微量营养物质而滋生一定数量的致病性微生物，使自来水受到二次污染，从而致病性微生物存在的概率也大大提高。除了处理程序及配水系统的问题外，不适当的饮用水微生物指标及监测方法也是造成致病性微生物存在于自来水中的原因。虽然我国居民一直有饮用煮沸水的习惯，一般认为煮沸的水不存在微生物污染的风险，但实际上高温加热煮沸也不能完全杀死微生物。

引起疾病的微生物种类繁多，包括细菌、病毒和原虫等，各病原微生物类群如下：

(1) 细菌类：包括痢疾杆菌、霍乱弧菌、伤寒杆菌、副伤寒杆菌、致病性大肠杆菌、土核巴斯得细菌、结核杆菌、布鲁氏菌、钩端螺旋体、军团杆菌、空肠细菌、小肠结肠类氏菌等。

(2) 病毒类：包括肝炎病毒、骨髓灰质炎病毒、轮状病毒、埃柯卡病毒（呼肠孤病毒）、柯萨奇病毒、肠病毒、胃肠炎病毒、诺瓦克病毒、腺病毒等。

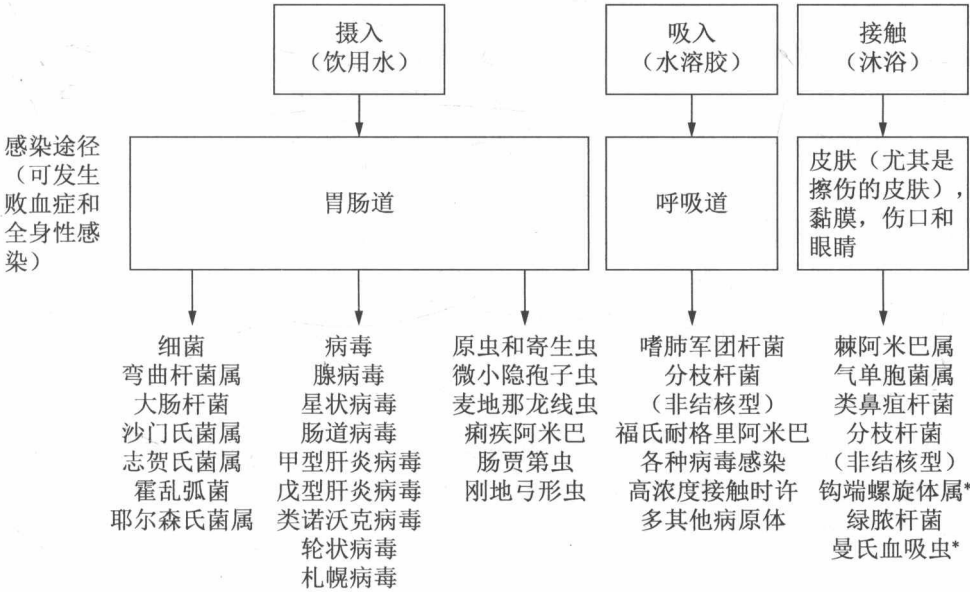
(3) 原虫和蠕虫类：包括溶组织阿米巴虫（又名痢疾内变形虫）、贾第鞭毛虫、隐孢子虫、血吸虫、绦虫、麦地那龙丝虫等。

对人体健康影响最大的病原微生物及其健康危害见表 1-1。主要病原微生物的传播途径如图 1-2 所示。

表 1-1 饮用水中常见致病微生物及其对人体的危害

病原体分类	名称	健康危害
细菌 Bacteria	志贺氏菌 (<i>Shigella</i> spp.)	痢疾、腹泻、呕吐、发热、关节炎、结肠炎、痢疾、
	沙门氏菌 (<i>Salmonella</i> spp.)	心内膜炎、心包炎、脑膜炎、胃肠功能紊乱、腹泻、
	埃希氏杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)	呕吐
	霍乱弧菌 (<i>vibrio cholera</i>)	腹泻、呕吐、死亡
	军团菌 (<i>Legionella</i> spp.)	军团病、肺炎、发烧、死亡
	耶尔森氏鼠疫杆菌 (<i>Yersinia</i>)	痢疾、腹泻、呕吐、关节炎

病原体分类	名称	健康危害
原生动物 Protozoa	兰伯氏贾第虫 (<i>Giardia lamblia</i>)	长期慢性痢疾、腹泻痢疾、发烧、内变形虫病、阿米巴痢疾
	隐孢子虫 (<i>Cryptosporidium</i>)	
	痢疾内变形虫 (<i>Entamoeba</i>)	
病毒 Viruses	PV 肠道病毒	胃肠功能紊乱、急性胃肠炎、心肌炎、脑膜炎
	埃可病毒	脑炎及瘫痪性疾病、流行性皮疹、呼吸道感染
	柯萨奇病毒 (Enterovirus)	气管炎和肺炎、流行性眼结膜炎、侵犯腮腺
	新型肠道病毒	损害肝脏、胰腺等器官
	甲肝病毒	肝功能障碍、肝炎
	腺病毒 (Adenovirus)	呼吸道疾病、眼部感染
	轮状病毒 (Rotavirus)	胃肠功能紊乱、腹泻、呕吐、肠胃炎
	诺沃克因子 (Norwalk)	肠型流感的致病因子、胃肠功能紊乱
	呼肠孤病毒 (Reovirus)	痢疾、腹泻、呕吐、发烧
	星状病毒 (Astrovirus), 冠状病毒 (Coronavirus)	胃肠功能紊乱、痢疾、腹泻、呼吸道感染、气管炎和肺炎
寄生虫 Helminthes	蛔虫 (Roundworm)	蛔虫病
	钩虫 (Hookworm)	钩虫病
	蛲虫 (Threadworm)	蛲虫病
	鞭虫 (Whipworm)	鞭虫病
	绦虫 (Tapeworm)	绦虫病



注：* 主要是接触高污染和地表水源。

图 1-2 水源性疾病病原体的传播途径和举例

1.2 饮用水微生物标准

1.2.1 饮用水微生物标准概况

目前,全世界具有国际权威性、代表性的饮用水水质标准有三个:世界卫生组织(WHO)的《饮用水水质准则》、欧盟(EC)的《饮用水水质指令》和美国环保局(USEPA)的《国家饮用水水质标准》。WHO的《饮用水水质准则》是由世界各国的专家综合国际上相关的调查报告及研究编制而成。它们代表了当今世界饮用水标准的最高水平,其他国家或地区的饮用水标准大都以这三种标准为基础或重要参考,来制定本国国家标准。

我国饮用水的相关标准主要有《生活饮用水卫生标准》(GB 5749—2006)、《瓶(桶)装饮用纯净水卫生标准》(GB 17324—2003)和《饮用天然矿泉水》(GB 8537—2008)等。各标准中要求的微生物指标具体如下:

《瓶(桶)装饮用纯净水卫生标准》(GB 17324—2003)中菌落总数 ≤ 20 CFU/mL,大肠菌群 ≤ 3 MPN/100 mL,霉菌和酵母菌(CFU/mL)不得检出,致病菌(沙门氏菌、志贺氏菌、金黄色葡萄球菌)不得检出。

《饮用天然矿泉水》(GB 8537—1995)要求菌落总数水源水 < 5 CFU/mL,灌装产品 < 50 CFU/mL;大肠菌群为0个/100 mL。《饮用天然矿泉水》(GB 8537—2008)删除了菌落总数指标,大肠菌群为0 MPN/100 mL,并新增了3个致病菌,要求粪链球菌和铜绿假单胞菌为0 CFU/250 mL、产气荚膜梭菌为0 CFU/50 mL。

《生活饮用水卫生标准》(GB 5749—2006)是在1985年版《生活饮用水卫生标准》的基础上修订的,于2006年由国家标准委和卫生部颁布,规定自2007年7月1日起全面实施。这是21年来首次对1985年发布的标准进行修订。规定指标由原标准的35项增至106项,还对原标准的8项指标进行了修订,指标限量也与发达国家的饮用水标准具有可比性。该标准把原来的4项检测项目调整为8项检测项目,分别为:菌落总数、总大肠菌群、余氯、浑浊度、耐热大肠菌群、肉眼可见物、色度、臭和味。后四项为新增检测分析项目。其中微生物指标由2项增至6项,增加了大肠埃希氏菌、耐热大肠菌群、贾第鞭毛虫和隐孢子虫。新国标中水质微生物指标及限值见表1-2。表1-3为国外一些组织和国家的饮用水卫生微生物学限量标准,并将其与国内饮用水卫生标准进行比较分析。

1.2.2 其他国家和地区的标准

其他国家和地区饮用水水质标准大都以美国、欧盟、WHO的标准为参考,制定本国国家标准。如捷克采用WHO的饮用水标准;法国、英国则均以EC指令为指导;而澳大利亚、加拿大、日本同时参考美国、欧盟、WHO的标准。捷克1989年制定的《饮用水水质标准》很大程度是以WHO(1984年第一版)《饮用水水质准则》为参考,但有的指标比WHO要求更加严格。捷克标准中微生物指标[如粪型链球菌(*Streptococcus faecalis*)等]及生物指标有9项,且指标分最大限定值、限定值、指标值和推荐值4种,以适应将来水质要求提高的需求。

表 1-2 新国标中水质微生物指标及限值

指标	限值
总大肠菌群（MPN/100mL 或 CFU/100mL）	不得检出
耐热大肠菌群（MPN/100mL 或 CFU/100mL）	不得检出
大肠埃希氏菌（MPN/100mL 或 CFU/100mL）	不得检出
菌落总数（CFU/mL）	100
贾第鞭毛虫（个 /10L）	< 1
隐孢子虫（个 /10L）	< 1
肠球菌（CFU/100mL）	0
产气荚膜梭状芽孢杆菌（CFU/100mL）	0

注：MPN 表示最可能数；CFU 表示菌落形成单位。当水样检出总大肠菌群时，应进一步检验大肠埃希氏菌或耐热大肠菌群；水样未检出总大肠菌群，不必检验大肠埃希氏菌或耐热大肠菌群；贾第鞭毛虫和隐孢子虫为非常规指标；肠球菌和产气荚膜梭状芽孢杆菌为参考指标。

表 1-3 我国与国外三部饮用水标准中的微生物指标比较

标准名称	年度	项目数	指标
中国《生活饮用水卫生标准》	2006	6 项	总大肠菌群（total plate count）
			耐热大肠菌群（thermotolerant coliform bacteria）
			大肠埃希氏菌（Escherichia coli）
			菌落总数（total plate count）
			隐孢子虫（Cryptosporidium）
			贾第鞭毛虫（Giardia lamblia）
美国《国家饮用水水质标准》	2006	8 项	异养菌总数（Heterotrophic Plate Count）
			分枝杆菌（Mycobacteria）
			军团菌（Legionella）
			总大肠杆菌（Total coliform）
			隐孢子虫（Cryptosporidium）
			贾第鞭毛虫（Giardia lamblia）
			病毒（Virus）
			浊度（Turbidity）
欧盟《饮用水水质指令》	1998	7 项	大肠埃希氏菌（Escherichia coli）
			肠道球菌（Enterococcus）
			假单胞菌（Pseudomonas）
			总大肠菌群（total plate count）
			产气荚膜菌（Clostridium perfringens）
			22℃ 异养菌（22℃ Heterotrophic bacteria）
			37℃ 异养菌（37℃ Heterotrophic bacteria）

标准名称	年度	项目数	指标
WHO《饮用水水质准则》	2006	细菌 12 项	类鼻疽伯克霍尔德氏菌 (<i>Burkholderia pseudomallei</i>)
			空肠弯曲杆菌 (<i>Campylobacter jejuni</i>)
			致病性埃希氏大肠杆菌 (<i>Escherichiacoli-Pathogenic</i>)
			肠出血性大肠杆菌 (<i>E.coli-Enterohaemorrhagic</i>)
			军团菌属 (<i>Legionella spp.</i>)
			非结核型分枝杆菌 (<i>Non-tuberculous mycobacteria</i>)
			绿脓杆菌 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)
			伤寒杆菌 (<i>Salmonella typhi</i>)
			其他沙门氏菌 (<i>Other salmonellae</i>)
			志贺氏菌属 (<i>Shigella spp.</i>)
			霍乱弧菌 (<i>Vibrio cholerae</i>)
			小肠结肠炎型耶尔森氏菌 (<i>Yersinia enterocolitis</i>)
		病毒 6 项	腺病毒 (<i>Adenovirus</i>)
			肠道病毒 (<i>Enterovirus</i>)
			甲型肝炎病毒 (<i>Hepatitis A</i>)
			戊型肝炎病毒 (<i>Hepatitis E</i>)
			类诺沃克病毒和札幌病毒 (<i>Norovirus and Sapovirus</i>)
			轮状病毒 (<i>Rotavirus</i>)
		原虫 7 项	棘阿米巴属 (<i>Acanthamoeba spp.</i>)
			微小隐孢子虫 (<i>Cryptosporidium parvum</i>)
			环孢子虫 (<i>Cyclospora cayetanensis</i>)
			痢疾阿米巴 (<i>Entamoeba histolytica</i>)
			肠贾第鞭毛虫 (<i>Giardia intestinalis</i>)
			福氏耐格里阿米巴 (<i>Naegleria fowleri</i>)
			刚地弓形虫 (<i>Toxoplasma gondii</i>)
		寄生虫 2 项	麦地那龙线虫 (<i>Dracunculus medinensis</i>)
			血吸虫属 (<i>Schistosoma spp.</i>)

法国现行《饮用水水质标准》(95 — 368)，主要参照欧盟《饮用水水质指令》制定，大部分指标值采用最大允许浓度值，有的指标要求高于标准。标准中微生物学指标较全面，分别为耐热大肠菌、粪型链球菌、亚硫酸盐还原梭菌 (*Sulfite-reducing Clostridia*)、沙门氏菌 (*Salmonella*)、致病葡萄球菌 (*Staphylococcus-Pathogenic*)、粪型噬菌体 (*Bacteriophagefaecalis*)、肠道病毒 (*Enterovirus*)，这 7 项指标并不包含在《饮用水水质指令》中。

英国是第一个对饮用水中的隐孢子虫提出量化标准的国家，在 1999 年颁布了该国的《水质规则》，要求水源存在隐孢子虫风险的供水企业，应对出厂水进行隐孢子虫连续监测，同时对饮用水提出了强制性的限值标准，即出厂水中隐孢子虫卵囊要少于 1 个 /10 L。

澳大利亚《饮用水水质标准》(1996) 考虑项目全面，特别是微生物学项目分为细菌、原生动物、毒藻和病毒等 4 类共 26 项。

加拿大现行《饮用水水质标准》于2004年发布,微生物指标包括肠道病毒,要求对其处理率达99.99%;细菌指标仅有大肠埃希氏菌和总大肠菌群2项,均为每100 mL水样不得检出;对隐孢子虫、贾第鞭毛虫的要求仅针对曾暴发过的水源,要求对其虫卵或孢子的处理率达99.9%。

日本现行的《自来水水质标准》中,以粪便污染指标及其量度为基准制定了“大肠杆菌”及“一般细菌”指标。在2000年制定了《水道水中的隐孢子虫等暂定对策指导》,采用测定10 mL水中的卵囊数确定原水受污染程度。最新水质标准于2004年执行,在新水质标准中采用大肠菌培养技术替代大肠菌群指标。

中国台湾省有自己的饮用水水质标准,没有直接采用美国、欧盟、WHO水质标准。1998年的修订版本中,微生物指标中的大肠杆菌标准值很高,为6 CFU/mL (MPN/100 mL)。

1.3 我国饮用水微生物标准存在的问题

1.3.1 采样方案不健全

国际食品微生物规格委员会(ICMSF)规定的采样计划和颁布数值以下列字母及含义构成:

n :一批产品采样个数; c :该批产品中检样菌数超过限量的检样数; m :合格菌数限量; M :附加条件后判定为合格的菌数限量。

CAC饮用水的抽样方案规定在采样个数 n 为5的一批产品中,允许该批产品中检样菌数超过限量的检样数 c 为1。国际食品微生物规格委员会关于饮用水的抽样方案为 $n=5$, $c=0$ 。我国的国家标准关于饮用水的抽样方案为随机抽样6只,比较而言抽样方案不规范、不健全。

1.3.2 检验项目不合理

我国饮用水的检验项目有明显套用传统食品卫生标准的痕迹,没有依据饮用水的微生物生态学分析。从微生物生态学角度来看,饮用水自然水源浅水区分布的主要微生物类群为光合藻类和好氧微生物,如假单胞菌、噬纤维菌、柄细菌、生丝细菌等;深水区分布的微生物类群为紫色和绿色硫细菌及其他兼性厌氧菌等;来自加工环境和加工人员的微生物污染主要为中温型腐生菌和寄生菌。

我国饮用水的检验项目存在的问题:

(1) 菌落总数检验方法培养温度只采用37℃,所培养的对象为体温型微生物,忽略了来自水源和环境中的室温型微生物。

(2) 用致病菌(金黄色葡萄球菌、沙门菌和志贺菌)作为致病微生物指标,没有依据饮用水的微生物生态学分析,缺乏实际意义。

(3) 没有设立与饮用水关系密切的假单胞菌和藻类两项微生物指标。

1.3.3 限量标准不统一

国家颁布饮用水的4个标准菌落总数分别为100 CFU/mL、50 CFU/mL、20 CFU/mL、50 CFU/mL,大肠菌群分别为30 MPN/100mL、0 MPN/100mL、3 MPN/100mL、3 MPN/100 mL,霉菌和酵母菌计数在GB 17324—2003为不得检出,在GB 19298—2003中分别为10 CFU/mL。虽然各项标准分别针对不同的饮用水,但从卫生学角度来说要求应该一致,应设立统一的限量标准。

1.4 饮用水微生物污染的控制

在建立水源保护区、加强水处理系统的控制、做好工厂卫生管理与个人卫生,以及提高质量检验方面的微生物检测水平等方面,自来水和瓶(桶)装饮用水生产存在相同性;但瓶(桶)装饮用水和自来水因其水源、生产工艺等不同,生产过程中微生物污染的控制又有不同。

1. 水源控制

饮用水企业特别是矿泉水生产企业要划定饮用水水源保护区,防止水体污染,并定期对水源微生物指标进行监测,对于怀疑有微生物污染的水源,可在出水管和套管中,直接倒入活化的二氧化氯原液,浸泡24h后按允许开采量连续抽水,排净残余药液。

2. 水处理系统控制

对于水处理工艺的设计,必须确保处理后的水质较原水水质更卫生安全,并符合相应卫生要求。而水处理装置应定期维护、更换滤膜或滤料、检查滤膜性能、反复冲洗和清洗。整个水处理系统包括管道,各过滤器等用100mg/L的二氧化氯溶液浸泡2h,再用清水冲洗干净。

3. 工厂卫生管理与个人卫生

用过的工作服、帽等可用250mg/L的二氧化氯浸泡30min后洗净晾干,穿戴前经紫外线灯照射30min;操作人员可用专用消毒剂进行洗手消毒。

4. 质量检验

设立与生产能力相适应的检验室,配备经专业培训并经专业考核合格的检验人员;检验室至少应具备完成产品出厂检验指标的能力;检验室应配备相应的仪器和设备,并定期检定;建立现场品控制度并配备相应的专业人员;改进检测技术,加强水质监测。

5. 瓶(桶)装饮用水微生物污染的控制

对瓶(桶)装饮用水水源井口及设备的消毒。水源井口地面上的藻斑或菌斑,以250mg/L的二氧化氯间隔48h各喷一次至地面潮湿,以后每月施药一次。对于不易移动的如罐装机的罐装口,封盖机的落盖轨等直接接触产品的装置,可用250mg/L的二氧化氯擦洗。但应注意的是,对于聚丙烯纤维制成的滤芯,不能使用氧化型的消毒剂,如过氧乙酸、双氧水、二氧化氯和漂白粉等,可使用非氧化型消毒剂浸泡。

瓶(桶)装饮用水生产过程中臭氧浓度的控制。臭氧浓度过低时不能保证杀菌效果,

若臭氧浓度过高则对设备及瓶(桶)、人员健康及产品品质造成损害或影响,并产生消毒副产物——溴酸盐。因此在实际应用中一般采用喷射投加方式,即全部或部分水流与臭氧通过喷射器混合后进入接触反应罐,工作 20min 后,每小时检测出水口臭氧浓度,应为 $0.3 \sim 0.5\text{mg/L}$ 。

回收空桶的清洗与消毒。要选择合适的清洗剂与消毒剂,保证清洗剂与消毒剂相匹配及正确使用,并对清洗剂与消毒剂浓度进行监控与及时补加与更换。酸性清洗与碱性清洗应交替使用,并需注意强碱与高温对 PC 桶的损伤。

清洗车间与灌装车间空气洁净度的要求。清洗车间与灌装车间空气洁净度应满足《饮用天然矿泉水厂卫生规范》(GB 16330—1996)的要求,清洗车间应为 10 万级洁净厂房,罐装车间应为 1 000 级洁净厂房,或全室 10 000 级,生产线局部 100 级。

防止产品储放与运输过程的污染。保证成品贮藏卫生,成品库定期清扫与消毒;运输工具、车辆随时清洗,定期消毒;保证包装瓶(桶)的密封性,注意瓶(桶)是否有裂缝、穿孔、缺口,盖内密封圈是否有缺口、裂口,瓶(桶)与盖密封性是否良好,封盖机落盖槽或封盖头是否出现偏差造成封盖歪斜。

防止饮水机的二次污染。饮水机是利用空气压力的原理工作的,在取水的同时,等量的空气就进入了饮水机的内部,因此要将饮水机摆放至阴凉通风处,定期对饮水机进行彻底清洗消毒,并保持饮水机周围环境清洁,桶装水尽量在 7d 内饮用完。

6. 自来水微生物污染的控制

自来水消毒过程中消毒剂要求既能杀灭水中的病原微生物,又能保证在饮水管道中的病原微生物不会生长繁殖。防止管网和二次供水的污染,加强水质消毒,定期进行消毒效果的检测,保证出厂水质量,预防供水管网内微生物的再生;保证供水管网设备设施合理;日常管理到位,定期清洗消毒蓄水池和水箱等。对于二次供水水质的处理,可以在出口处安装净水设备或消毒装置,并加强二次供水系统微生物监测。

第2章 微生物检验基础操作技术

2.1 微生物检验常用仪器

2.1.1 超净工作台

超净工作台是专为无菌操作设计的一种局部层流装置，能在局部形成高洁度的工作环境。它由工作台、过滤器、风机、静压箱和支撑体等组成，通过过滤空气使工作台操作区达到净化目的。室内空气经预过滤器和高效过滤器除尘后以垂直或水平层流状态通过工作台的操作区，由于空气没有旋涡，所以任何一点灰尘或附着在灰尘上的杂菌都能被排除，使操作区保持无菌状态，通常在进行试验之前，将操作所需物和工具放入工作台内，打开紫外灯照射 30min 灭菌，再结合酒精灯进行操作，可达到较好的无菌操作状态（图 2-1）。

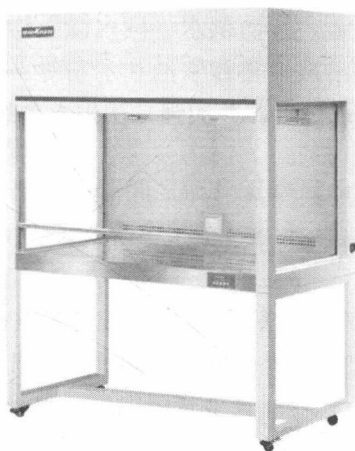


图 2-1 超净工作台

超净工作台主要由 3 个部分组成：高效空气过滤器、风机和箱体。高效空气过滤器是超净工作台的关键组件，其过滤性能的好坏，直接关系到超净工作台的工作质量和寿命。超净工作台原理：在特定的空间内，室内空气经预过滤器初滤，由小型离心风机压入静压箱，再经空气高效过滤器二级过滤，从空气高效过滤器出风面吹出的洁净气流具有一定的、均匀的断面风速，可以排除工作区原来的空气，将尘埃颗粒和生物颗粒带走，

以形成无菌的高洁净的工作环境。

超净工作台按气流流向可分为垂直流超净工作台和水平流超净工作台，垂直流超净工作台由于风机在顶部所以噪声较大，但是风垂直吹，多用在医药工程以保证人的身体健康；水平流超净工作台噪声比较小，风向往外，所以多用于电子行业，对身体健康影响不大。

超净工作台按操作人员数可分为单人工作台和双人工作台，按结构可分为常规型和新型推拉以及自循环型（仅限垂直流）。根据操作结构可分为单边操作及双边操作两种形式，按其用途又可分为普通超净工作台和生物（医药）超净工作台。

使用及注意事项：

（1）超净工作台使用前应首先进行清洁，可在擦拭清洁操作区后，再用浸有清洁剂（75%乙醇或2%新洁尔灭）的纱布擦拭，并用紫外灯照射。

（2）一般情况下，应用紫外灯照射处理20～30min后，再开启日光灯，启动风机。

（3）操作区内不允许放置不必要的物品，尽量保持洁净气流不受到阻碍。

（4）操作结束后，应关闭风机，立即清理操作区台面。用清洁剂及消毒剂擦拭消毒，再用紫外灯照射消毒20～30min后，关闭紫外灯，切断电源。

（5）应根据使用情况，定期清洗或更换高效空气过滤器。

2.1.2 培养箱

培养箱是一种用于微生物、细菌、细胞培养的医学及生物实验设备，由一个类似恒温箱组成，形成一个微生物、细菌、细胞培养的环境。常用的培养箱通常只有升温的功能，因而只适用于室温至60℃各类微生物的培养。目前，随着培养微生物的多样化，出现了许多结构合理、功能齐全的新型培养箱，如恒温培养箱、恒温恒湿培养箱、低温培养箱、微生物多用培养箱和二氧化碳培养箱等。图2-2是恒温培养箱。有些培养箱还可采用计算机控制，可选择多条时间线变换温差，从而克服了环境温度的影响，一年四季均能达到培养要求。

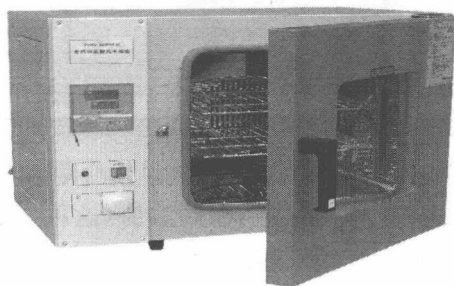


图2-2 恒温培养箱

普通培养箱有隔水式和直热式两种。一般均采用双层箱体和双层门结构，双层箱体之间填充保温材料。内门为钢化玻璃，能清晰观察箱内物品。箱内设计有热风循环通道，确保箱内温度均匀。普通培养箱主要用于需氧和兼性厌氧细菌的培养，也可用于真菌培