

ICS 65.020

B 20

团体标准

T/AFFI XXX-2022

鲜葡萄及葡萄干中黑曲霉的测定

20XX-XX-XX 发布

20XX-XX-XX 实施

阿拉尔果业行业联合会 发布

目 录

前言	1
1 范围	2
2 规范性引用文件	2
3 术语和定义	2
4 原理	2
5 培养基与试剂	2
6 标准菌株	3
7 仪器和设备	3
8 检测程序	3
9 生化实验	4
10 菌落计数	4
11 结果与报告	5
11.2 报告	5

前 言

本文件按照 GB/4789.15《食品微生物学检验 霉菌和酵母计数》的规定起草。

本文件由新疆兵团第一师阿拉尔市果业行业联合协会提出。

本文件由新疆兵团第一师阿拉尔市果业行业联合协会归口。

本文件起草单位：新疆维吾尔自治区产品质量监督检验研究院、新疆维吾尔自治区标准化研究院、新疆天科博创科技有限公司、新疆兵团第一师阿拉尔市果业行业联合协会、新疆艾旗斯德检测科技有限公司

本文件主要起草人：孙蕾、范田丽、祁来芳、文红梅、丁煜玮、付晓静、周皓、廖毅凡、何军、陈晨

本文件实施应用中的疑问，请咨询新疆维吾尔自治区产品质量监督检验研究院（乌鲁木齐市河北东路 188 号）。

新疆维吾尔自治区产品质量监督检验研究院：联系电话：0991-3191180；邮编：830011

本文件为首次发布。

鲜葡萄及葡萄干中黑曲霉的测定

1 范围

本标准适用于葡萄中黑曲霉的测定。

本标准规定了葡萄中黑曲霉的检验方法。

本文件适用于新疆地区鲜葡萄、葡萄干中黑曲霉的检测。

2 规范性引用文件

本文件中引用的文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是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/T6682 分析实验室用规定的一级水。

3 术语和定义

3.1 鲜葡萄 fresh grapes

选用新鲜、洁净，经过一定加工或保鲜处理的葡萄。

3.2 葡萄干 Raisins

经自然风干或人工加热等方式使葡萄果实脱水而成。

3.3 黑曲霉 *Aspergillus niger*

黑曲霉属于半知菌亚门、丝孢纲、丝孢目、丛梗孢科、曲霉属真菌中的常见种。在高温、高湿环境下易大量生长繁殖，多生于多汁的果实上，引起腐烂变质。

4 原理

被感染葡萄中的黑曲霉可在马铃薯葡萄糖琼脂上于 28℃ 条件下培养 5d，检测霉菌，从中分离黑曲霉，通过生化鉴定确定黑曲霉菌并计数，算出每毫升检验中黑曲霉菌数。

5 培养基与试剂

5.1 培养基

5.1.1 马铃薯葡萄糖琼脂（PDA）。

5.1.2 2%淀粉查氏培养基。

5.2 试剂

5.2.1 无菌生理盐水。

5.2.2 I2-Ki 试剂(花粉活力染色液)。

6 标准菌株

6.1 黑曲霉标准菌株

7 仪器和设备

7.1 培养箱:28℃±1℃。

7.2 拍击式均质器及均质袋。电子天平 :感量 0.1 g。

7.3 无菌锥形瓶:容量 500 mL。

7.4 无菌吸管:1 mL(具 0.01 mL 刻度)、10 mL(具 0.1 mL 刻度)。

7.5 无菌试管:18 mmx180 mm。

7.6 旋涡混合器。

7.7 无菌平皿:直径 90 mm。

7.8 恒温水浴箱:46 ℃±1℃。

7.9 显微镜:10 倍~100 倍。

7.10 微量移液器及枪头:1.0 mL。

7.11 郝氏计测玻片:具有标准计测室的特制玻片。盖玻片。

7.12 测微器:具标准刻度的玻片。

7.13 电子天平: 感量 0.01 g。

7.14 振荡器

8 检测程序

见图 1。

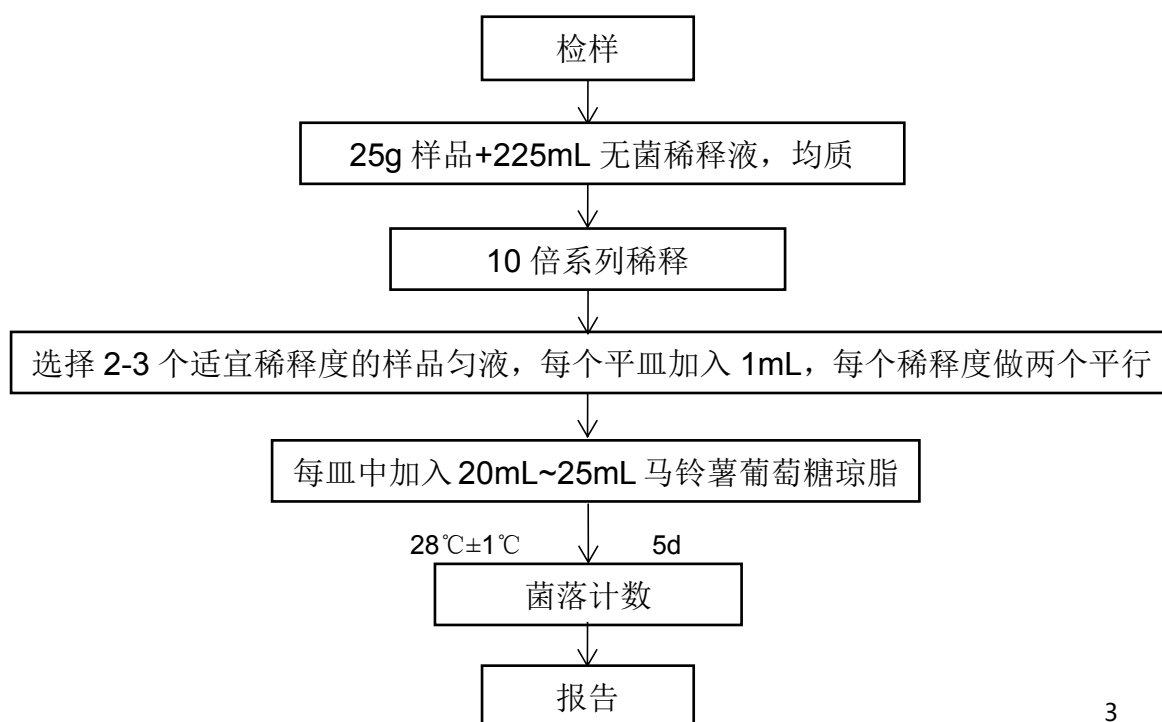


图 1 黑曲霉菌数测定检验程序

8.1 检测步骤:

8.1.1 称取 25g 样品置盛有 225mL 生理盐水的无菌均质袋内,用拍击式均质器拍打 1min~2min,制成 1:10 的样品匀液。

8.1.2 取 1 mL 1:10 样品匀液注入含有 9mL 无菌稀释液的试管中,另换一支 1mL 无菌吸管反复吹吸,或在旋涡混合器上混匀,此液为 1:100 的样品匀液。

8.1.3 按 5.1.3 操作,制备 10 倍递增系列稀释样品匀液。每递增稀释一次,换用 1 支 1 mL 无菌吸管。

8.1.4 根据对样品污染状况的估计,选择 2 个~3 个适宜稀释度的样品匀液,在进行 10 倍递增稀释的同时,每个稀释度分别吸取 1mL 样品匀液于 2 个无菌平皿内。同时分别取 1mL 无菌稀释液加入 2 个无菌平皿作空白对照。

8.1.5 及时将 15mL~20mL 冷却至 46℃的马铃薯葡萄糖琼脂(可放置于 46℃±1℃恒温水箱中保温)倾注平皿,并转动平皿使其混合均匀。置水平台面待培养基完全凝固。

8.2 培养

琼脂凝固后,正置平板,置 28℃+1℃培养箱中培养,观察并记录培养至第 5d 的结果。(注:若污染程度过高,可在第 3d 开始进行观察。)

9 生化实验

自选择性琼脂平板上分别挑取 2 个以上典型或可疑菌落进行鉴定试验。

9.1 黑曲霉菌落形态观察

黑曲霉的菌落蔓延迅速,但生长稍局限,菌丝为白色,之后变成鲜黄色直至黑色厚绒状,背面无色或中央略带黄褐色,顶部形成球形顶囊。其分生孢子头球形,直径 700~800 μm,褐黑色。

9.2 淀粉分解实验

淀粉分解实验:用 2%淀粉查氏培养基进行。用接种环刮取纯化的黑曲霉孢子一环于装有 100mL 无菌生理盐水和玻璃珠的锥形瓶中,振荡。取 1mL 孢子悬液注入 2%淀粉查氏培养基平板中涂布,37℃倒置培养 2 天,向培养基中滴入 I2-Ki 试剂(花粉活力染色液),用直尺测量菌落产生的透明圈大小并记录。

9.3 产柠檬酸鉴定

用无菌接种环轻轻刮下典型或可疑菌的菌丝及孢子于无菌水中制成菌悬液,装在有 PDA(马铃薯葡萄糖琼脂)培养基的锥形瓶中摇匀。置于振荡器中,35℃,200r/min 培养 2 天。取 5mL 发酵液于试管中,滴入饱和 CaCO₃ 溶液,有白色沉淀则证明产生柠檬酸,黑曲霉产生柠檬酸。

10 菌落计数

依据 GB4789.15-2016 食品安全国家标准 霉菌和酵母计数,选择有典型的黑曲霉菌菌落的平板,以菌落单位(colony-forming units, CFU)表示。选取菌落在 10CFU~150CFU 的

平板，根据菌落形态计数黑曲霉，蔓延生长覆盖整个平板的可记录为菌落蔓延。

11 结果与报告

11.1 结果

11.1.1 计算同一稀释度的两个平板菌落数的平均值，再将平均值乘以相应稀释倍数。

11.1.2 若有两个稀释度平板上菌落数均在 10CFU~150 CFU 之间，则按照 GB 4789.2 的相应规定进行计算。

11.1.3 若所有平板上菌落数均大于 150CFU，则对稀释度最高的平板进行计数，其他平板可记录为多不可计，结果按平均菌落数乘以最高稀释倍数计算。

11.1.4 若所有平板上菌落数均小于 10CFU，则应按稀释度最低的平均菌落数乘以稀释倍数计算。

11.1.5 若所有稀释度的平板菌落数均不在 10CFU~150CFU 之间，其中一部分小于 10CFU 或大于 150CFU 时，则以最接近 10CFU 或 150CFU 的平均菌落数乘以稀释倍数计算。

11.2 报告

11.2.1 菌落数按“四舍五入”原则修约。菌落数在 10 以内时，采用一位有效数字报告；菌落数在 10~100 之间时，采用两位有效数字报告。

11.2.2 菌落数大于或等于 100 时，前第 3 位数字采用“四舍五入”原则修约后，取前 2 位数字，后面用 0 代替位数来表示结果；也可用 10 的指数形式来表示，此时也按“四舍五入”原则修约，采用两位有效数字。

11.2.3 若空白对照平板上有菌落出现，则此次检测结果无效。

11.2.4 称重取样以 CFU/g 为单位报告。

团体标准《鲜葡萄及葡萄干中黑曲霉的测定》编制说明

标准名称	鲜葡萄及葡萄干中黑曲霉的测定	标准主要起草人	孙蕾、范田丽、祁来芳、文红梅、丁煜玮、付晓静、周皓、廖毅凡、何军、陈晨
工作概况： 本团体标准的制定目的是制定严于食品安全国家标准的企业标准。 主要工作过程：本标准的起根据 GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准的结构和编写》及《中华人民共和国食品安全法》的要求,经过产品质量验证，验证报告符合要求，上报受理后备案。			
标准主要内容的确定依据（如技术指标、参数、公式、性能要求、试验方法等统计数据）均符合 GB/4789.1、GB/4789.15 的规定。			
规范依据：分析实验室用水规格和试验方法：应符合 GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法。			
与有关法律、法规和强制性标准的关系： 符合《中华人民共和国食品安全法》 GB/4789.15《食品微生物学检验 霉菌和酵母计数》			
严于食品安全国家标准或地方标准指标及说明： 本标准适用于新疆本地区新鲜葡萄、葡萄干中黑曲霉的检测，规定了鲜葡萄及葡萄干中黑曲霉菌的检验步骤、菌落形态及生化鉴定方法等。			
备案前的公示（征求意见）及意见采纳情况说明： 此行业标准经过“全国团体标准信息平台管理系统”在 2023 年 月 日— 月 日网上征求意见，未收到任何意见。			