SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1514—2005

进出口粮谷中桔青霉、黄绿青霉、岛青霉检验方法

Inspection of *P. citrinum*, *P. citreo-viride* and *P. islandicum* in foodstuff for import and export

2005-02-17 发布　　2005-07-01 实施

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局　发布

前　言

本标准的附录A是规范性附录，附录B和附录C是资料性附录。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国天津出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：王素琴、何霖、陈子红、赵宏、孙俐。

本标准系首次发布的出入境检验检疫行业标准。

进出口粮谷中桔青霉、黄绿青霉、岛青霉检验方法

1 范围

本标准规定了进出口粮谷中桔青霉、黄绿青霉、岛青霉检验的抽样、制样和测定方法。

本标准适用于进出口粮谷中桔青霉、黄绿青霉、岛青霉的检验。

2 抽样和制样

2.1 检验批

以不超过2 500件为一检验批。

同一检验批的商品具有相同的特征，如包装、标记、产地、规格和等级等。

2.2 抽样数量

抽样数量见表1。

表1

批量/件	最低抽样数/件
1～25	1
26～100	5
101～250	10
251～500	15
501～1 000	17
1 001～2 500	20

2.3 抽样方法

按2.2规定的抽样数随机抽取，逐件开启。

2.4 试样制备

将1 kg的样品平铺在白磁盘或玻璃板上其厚度不超过1 cm，用棋盘式取样方法，分十点取大米200粒～500粒，放置在带盖的小称量皿中。

3 测定方法

3.1 方法提要

试样经乙醇溶液及氯化汞溶液处理，然后接种在察氏培养基平板上，于28℃±1℃培养一周。将可疑菌落转接到察氏培养基平板上，于28℃±1℃培养观察，对照标准菌株形态结构进行鉴定。对可疑菌落，进一步转接培养，用产毒培养来确定是否产毒。

3.2 试剂和材料

除另有规定外，试剂均为分析纯，水为蒸馏水。

3.2.1 无水乙醇。

3.2.2 75%乙醇溶液：乙醇＋水(3＋1)。

3.2.3 0.1%氯化汞溶液：准确称取1 g氯化汞，溶于1 000 mL水中。

3.2.4 察氏培养基：见附录第A.1章。

3.2.5 产毒培养液：见附录第 A.2 章。

3.2.6 产毒检定培养基：见附录第 A.3 章。

3.2.7 列希尔浮载剂：见附录第 A.4 章。

3.2.8 培养基 V：见附录第 A.5 章。

3.2.9 培养基 Ⅵ：见附录第 A.6 章。

3.2.10 标准菌株：桔青霉(*Penicillium citrinum* AS 3.690)；黄绿青霉(*Penicillium citreo-viride* AS 3.226)；岛青霉(*Penicillium islandicum* AS 3.4025)；巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium* AS 1.1741)。

3.3 仪器和设备

3.3.1 游标卡尺：测量范围 0 mm～200 mm，精度 0.02 mm 或使用抑菌圈测量仪测量。

3.3.2 牛津杯：高 10 mm±0.1 mm，内径 6.8 mm±0.1 mm，外径 8.0 mm±0.1 mm(浙江海宁医疗器械厂生产或相当者)。

3.3.3 恒温培养箱：28℃±1℃，30℃±1℃，搁板必须保持水平。

3.3.4 高压灭菌器。

3.3.5 培养皿：内径 90 mm，底部平整光滑的玻璃皿或塑料皿，并应配有陶瓦盖；内径 90 mm 的玻璃皿。

3.3.6 载玻片和盖玻片。

3.3.7 试管(直径 17 mm，长 170 mm)。

3.3.8 离心机及带刻度离心管。

3.3.9 其他：玻璃板、吸管、毛细管、U 型玻璃棒等。

3.4 测定步骤

3.4.1 试样处理

加 100 mL 乙醇溶液，浸泡试样 5 min，弃去乙醇溶液；再加入氯化汞(3.2.3)溶液 100 mL 静置 1 min，弃去氯化汞溶液，最后在无菌条件下用无菌水反复清洗 3 次～5 次，每次 100 mL，将水倒掉空净。

3.4.2 平板制备

于灭菌培养皿中加入 20 mL 熔化的察氏培养基(3.2.4)，保持水平，待其凝固备用。

3.4.3 分离培养

每个样品用 10 个平板，将处理空干后的大米无菌移植于察氏培养基平板上，每个平板中均匀放置 10 粒，置于培养箱中 28℃±1℃培养，3 d 开始观察，直到第 8 d。如果可疑，可观察到 15 d，对照标准菌株，观察大米样品污染菌的菌落形态(参见附录 B)，如无特征菌落出现，可报告阴性结果；如特征近似可疑，应做进一步镜检鉴定。

3.4.4 镜检鉴定

3.4.4.1 转接培养

将可疑菌落挑出，转接到察氏培养基(3.2.4)平板中，每个菌落转接两个平板，于 28℃±1℃培养。3 d 开始肉眼观察菌落形态，并且直接镜检观察，直至 15 d。应认真记录镜检观察情况，有条件的应做菌落照相，备查。

3.4.4.2 小室培养

对产生小而易碎的分生孢子梗的真菌，可用小室培养法对菌丝和子实体着生状态进行观察。用于小室培养(参见附录 C)的平皿上应预先放置一张 90 mm 的滤纸，再放置一只 U 型玻璃棒，在玻璃棒上放一片洁净的载玻片，连同两片盖玻片于 121℃高压灭菌 15 min，备用。以无菌操作将已熔化的约 5 mL察氏培养基(3.2.4)倾注到另一空白灭菌平皿中，使之刚刚铺满平皿，保持平衡，待其凝固，用手术刀无菌将琼脂层切成两块盖玻片大小的方块，分别轻轻放到载玻片上，用接种针挑取可疑的菌落，接种

到这两块培养基四周，然后盖上盖玻片，于滤纸上滴加 3 mL 灭菌水或甘油，于 28℃±1℃培养过夜。

从第 2 天开始观察，轻轻取出载玻片，对照标准菌株的显微形态，在显微镜下直接观察，仔细记录观察到的菌落的显微形态。一定要观察菌种的生长全过程，以便确定所检出的菌种是否为该三种产毒真菌中的一种，必要时还应接种标准菌种，与该可疑菌种同步培养，以便进行对比观察。

3.4.5 产毒鉴定

3.4.5.1 菌液的制备

将巨大芽孢杆菌(3.2.10)安瓿瓶的上部消毒后敲碎，加入少量培养基 V(3.2.8)，使其充分溶解并移至盛有培养基 V(3.2.8)的试管中混匀，置 37℃±1℃培养 24 h。将培养物划线接种到培养基 Ⅵ(3.2.9)斜面上，37℃±1℃培养 24 h，镜检，芽孢数达到 85%以上时可制备芽孢混悬液。

用灭菌生理盐水冲洗菌苔并转入灭菌带刻度离心管中，3 000 r/ min 离心 30 min，弃去上清液，再加同量灭菌生理盐水，摇匀后 65℃水浴 30 min，1 000 r/ min 离心 5 min，取上清液并转入灭菌试管中，既为芽孢悬液，测定并稀释浓度至 10^7/mL，置于 4℃冰箱中保存，可使用一周。

3.4.5.2 产毒培养

用灭菌接种针挑取转接平板上符合形态的培养物，接种于产毒培养液中(3.2.5)，30℃±1℃培养 9 d～14 d，仔细观察接种培养液的颜色，如果培养液的颜色改变，就有产毒的可能，一般从第 9 天开始观察，直到第 14 d。

3.4.5.3 产毒培养液的过滤

取 10 mL 培养后的产毒培养液用滤纸无菌过滤到带磨口的三角瓶中，置于 4℃冰箱待测。

进行过产毒鉴定的培养液不要随意倾倒，应加入一定量的氢氧化钠或次氯酸钠，121℃高压灭菌 30 min。

3.4.5.4 用杯碟法测毒

将产毒检定培养基(3.2.6)熔化并冷却至 50℃±1℃，加入适量的巨大芽孢杆菌悬液(10^7/mL 的巨大芽孢杆菌悬液按 1%加入)，充分混匀，每皿倾注 8 mL，保持水平，待其凝固后备用。在每个平板中均匀放置 4 个灭菌的牛津杯，其中三个用于检测产毒培养液滤液，另一个滴加未接菌的产毒培养液，作为阴性对照，每个样品平行做两套平板，于 30℃±1℃培养 16 h～18 h。

3.4.5.5 结果报告

培养后，将培养皿倒置弃掉牛津杯，如果无清晰的抑菌圈产生，或抑菌圈的直径小于 12 mm，应将产毒培养液继续培养并每天按上述方法测毒直至 14 d，若结果同前，便可报告产毒阴性结果；如果出现清晰的抑菌圈，且抑菌圈直径大于等于 12 mm，则报告产毒阳性结果。

附 录 A
（规范性附录）
培养基和试剂

A.1 察氏培养基

氯化钾	0.5 g
磷酸氢二钾	1.0 g
硝酸钠	3.0 g
硫酸镁	0.5 g
硫酸亚铁	0.01 g
蔗糖	30 g
琼脂	15 g
水	1 000 mL

除蔗糖外，将其他各成分于水中加热溶解，最后加入蔗糖，用 1 mol/L 氢氧化钠溶液或 10%盐酸调节 pH，使灭菌后 pH 为 6.8±0.1，分装于试管或三角瓶内，于 121℃高压灭菌 15 min。

A.2 产毒培养液

蔗糖	300 g
硝酸钠	2.0 g
磷酸氢二钾	1.0 g
氯化钾	0.5 g
硫酸亚铁	0.01 g
酵母浸膏	2 g
水	1 000 mL

除蔗糖外，将其他各成分于水中加热溶解，最后加入蔗糖，用 1 mol/L 氢氧化钠溶液或 10%盐酸调节 pH，使灭菌后 pH 为 5.8±0.1，分装 500 mL 于 1 000 mL 三角瓶内，于 121℃高压灭菌 15 min。

A.3 产毒检定培养基

胰蛋白胨	6.0 g
牛肉浸膏	1.5 g
酵母浸膏	1.0 g
琼脂	0.5 g
水	1 000 mL

将上述各成分于水中加热溶解，用 1 mol/L 氢氧化钠溶液或 10%盐酸调节 pH，使灭菌后 pH 为 5.8±0.1，分装 500 mL 于 1 000 mL 三角瓶内，于 121℃高压灭菌 15 min。

A.4 列希尔浮载剂

甘油	1.0 g
醋酸钾（2%水溶性）	0.5 g
酒精（无水）	1 000 mL

将上述成分充分混合均匀备用（镜检透明剂用）。

A.5 培养基 V

蛋白胨	10.0 g
牛肉膏	5.0 g
氯化钠	2.5 g
水	1 000 mL

将上述各成分于水中加热溶解，用 1 mol/L 氢氧化钠溶液或 10%盐酸调节 pH，使灭菌后 pH 为 7.0±0.1，分装于试管内(10 mL/管)，于 121℃高压灭菌 15 min。

A.6 培养基 VI

蛋白胨	10.0 g
牛肉膏	5.0 g
氯化钠	2.5 g
琼脂	12.0 g
水	1 000 mL

将上述各成分于水中加热溶解，用 1 mol/L 氢氧化钠溶液或 10%盐酸调节 pH，使灭菌后 pH 为 6.5±0.1，分装于试管内，于 121℃高压灭菌 15 min，制成斜面备用。

附 录 B
（资料性附录）
菌落形态特征及显微特征

表 B.1

菌落名称	形态特征						代谢
	菌落	埽状体	分生孢子梗	支梗	小梗	分生孢子	产物
桔青霉	在察氏培养基上生长局限或者扩展迅速，直径一般为 3.2 mm～4 mm(25℃培养 10 d～12 d)；大多数为绒状，有的稍带絮状，有放射状的皱纹，周围有宽约 0.2 mm～2.0 mm 的白色细茸毛状边缘；分生孢子区为青绿色、黄绿色，可以交织成不同深浅色彩的环带；老时变成青灰绿色，渗出液有或较少，鲜亮的淡黄色，色素溶出使培养基染成同样的颜色。	典型双轮生和不对称，通常支梗以下没有分枝，稍开放。	从基质上长出，梗壁光滑，带黄色，(60～230) μm×(2.1～3.7) μm。	2～6 轮生的分生孢子梗，并列或多少散开 10～16 或 23×2.1～3.4 μm，或基部肥大而圆端部膨大，宽 3.0 μm～6.2 μm。	3～8 或 10 个平行的密集轮生在支梗上，(7.5～12.5) μm×(1.5～3.0) μm。	圆形或亚球形，直径 1.5～3.3 μm，表面光滑或近乎光滑。分生孢子链成细长的株状；长 60 μm～120 μm 或 300 μm。	*Citrinin*
黄绿青霉	在察氏培养基上生长局限，绒状或类似绒状，有的带絮状，表面有的平滑，有的中部隆起呈突出的皱者和纽扣状，营养菌丝黄色，菌落四周有一条宽 0.2 mm～1.5 mm 淡黄色或白色的边缘；分生孢子区为青绿色、暗青绿色、黄绿色、灰绿色和暗绿色。菌落颜色随着培养时间的延长由淡黄色变为灰绿色，渗出液有的菌系没有、有的少，有的多，为鲜亮的柠檬黄色；呈轻微霉味；菌落反面为鲜明的黄色，有的随着培养期的延长而变暗，四周的培养基呈黄色。	通常为单轮生，主轴偶有延长，从较低的节上生出或 2 分枝。	生于曳生的和分枝的气生菌丝或基质上，表面光滑，(30～90) μm×(1.2～3.0) μm，生于基质上的可达 150 μm，端部膨大，直径 2.3 μm～3.8 μm。		4～12 个密集簇生，大部分(6.8～7.4) μm×(1.2～2.5) μm。	球形至亚球形，直径大部分为 1.2 μm～2.2 μm，大的 3.0 μm，壁光滑或近乎光滑，孢子粘连成串，分生孢子链疏松的并列或呈柱状，大部分长达 30 μm～100 μm。	*Citreoviridin*

表 B.1（续）

菌落名称	形态特征						代谢
	菌落	埽状体	分生孢子梗	支梗	小梗	分生孢子	产物
岛青霉	在察氏培养基上生长较慢，25℃培养 10 d～12 d，直径 20 mm～34 mm；典型絮状；有显著的轮纹及轻微的放射状皱纹。菌落的颜色多变，作橙黄色、橙红色、褐色及暗黄绿色，菌丝及分生孢子结构组成相互交替的轮纹，并构成粗毛毡状的表面，菌落四周有宽约 0.2 mm～0.5 mm 的黄色、橙色或桃橙色的边缘；分生孢子区为暗黄绿色，渐渐变深或变黄橄榄绿色；渗出液少或相当丰富，橙色、橙红色或橙褐色；气味不明显或比较明显；菌落表面为橙褐色或暗红色，色素大量渗出使培养基染、橙色暗红色或黄色。	双轮生对称型，较短，如有分枝，分枝顶端亦具有典型的双轮对称型的结构。	短，从气菌丝或菌丝索上长出，偶尔从基质上长出，(20～120) μm×(2.3～3.0) μm，端部 2.5 μm～3.7 μm，梗壁光滑。	5～8 个不整齐地密集轮生，或多少散开，(7.5～11.2) μm×(2.1～3.1) μm。	尖细披针形，3～6 个并行紧密地簇生，(6.8～10.6) μm×(2.1～2.8) μm。	纺锤形成椭圆形，(3.0～4.4) μm×(2.3～3.7) μm，表面光滑或近乎光滑，分生孢子链纠结状，60 μm～90 μm。	*Luteoskyrin*

附 录 C
（资料性附录）
小室培养图

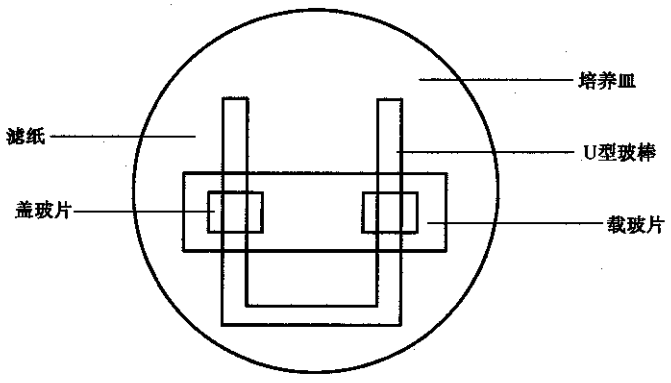


图 C.1

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
进出口粮谷中桔青霉、黄绿青霉、岛青霉检验方法
SN/T 1514—2005
*
中国标准出版社出版发行
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045
网址 www.bzcbs.com
电话:68523946 68517548
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
*
开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 15 千字
2005年5月第一版 2005年5月第一次印刷
*
书号:155066·2-16223 定价 8.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68533533

