



中华人民共和国粮食行业标准

LS/T 6132—2018

粮油检验 储粮真菌的检测 孢子计数法

Inspection of grain and oils—Storage fungal examination—
Enumeration spores of fungi

2018-01-08 发布

2018-03-01 实施

国家粮食局 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由国家粮食局提出。

本标准由全国粮油标准化技术委员会(SAC/TC 270)归口。

本标准起草单位：国家粮食局科学研究院、国家粮食局标准质量中心、湖北省粮油食品质量监测站、河南省粮油饲料产品质量监督检验站、安徽省粮油产品质量监督检测站、山东省粮油检测中心。

本标准主要起草人：唐芳、程树峰、朱之光、曹阳、欧阳毅、张海洋、祁智慧、熊宁、尹成华、季一顺、姜洪、李琦、胡斌、胡纪鹏、尹豪。

粮油检验 储粮真菌的检测

孢子计数法

1 范围

本标准规定了粮食储藏过程中生长真菌的检测方法。

本标准适用于小麦、稻谷、玉米和大豆原粮储存过程中可生长真菌的检测。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的引用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅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/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 29890 粮油储藏技术规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

储粮真菌 storage fungi

粮食储藏过程中,籽粒上生长的真菌,主要是霉菌,其中曲霉和青霉危害严重。储藏初期对粮食造成危害的主要是灰绿曲霉和白曲霉。

3.2

储粮真菌分生孢子 conidiospore of storage fungi

储粮真菌生长繁殖过程中,会产生一种生于细胞外的无性孢子,称之为分生孢子。分生孢子因真菌种类而有差异,是真菌鉴定的依据之一。

3.3

灰绿曲霉 *Aspergillus glaucus* G.

粮食上常见曲霉,是粮食储藏期间初期侵染粮粒的重要霉菌。具有干生性的特点,能在高渗透压的基质上旺盛发育,孢子萌发的最低相对湿度在65%~80%。因其生长对温度的要求不高,能侵害低水分含量(14.5%以下)粮食,可以侵入和杀死种胚,使粮食丧失发芽力和变色,导致粮食变质。

3.4

白曲霉 *Aspergillus candidus*

陈粮中常见曲霉,腐生性强,是导致粮食霉变发热的主要危害霉菌。中温性和干生性,孢子萌发最低相对湿度75%左右,主要侵染水分含量为15.0%左右的谷物,会引起发芽率下降和粮食霉变。

4 原理

储粮真菌会产生一定数量的分生孢子。用水将试样中的孢子洗脱下来,在规定条件下,通过显微镜计数,检测孢子的数量。孢子的数量反映了储粮生霉的状况,是粮食储藏安全的重要指标。

5 试剂和仪器

- 5.1 天平:感量 0.1 g。
- 5.2 生物显微镜:目镜 10×,物镜 10×~60×。
- 5.3 血球计数板:规格为 25 个中方格, V 等于 0.1 mm^3 ,计数板结构参见 A.1。
- 5.4 盖玻片:20 mm×20 mm。
- 5.5 具塞试管:50 mL。
- 5.6 滤布:网孔 300 目,尺寸 10 cm×10 cm。
- 5.7 计数器:计数范围为 0~9 999,转动式回零。
- 5.8 胶头滴管:长度大于 200 mm。
- 5.9 实验用水:符合 GB/T 6682 国家实验室三级水标准,检测前需在显微镜下镜检,确认实验用水显微镜视野无杂物干扰即可使用。

6 扦样

按照 GB/T 29890 的扦样要求,扦取粮食样品需单独存放,每份样品 200 g,于白封袋密封保存。样品在保存和运输的过程中,应采取必要的措施防止样品中原有微生物发生数量变化,保持样品的原有状态。

7 操作步骤

7.1 孢子洗脱

称样前将样品混合均匀,准确称取 10.0 g 原始样品于具塞试管(5.5)中,加入 30 mL 水(5.9),加塞,上下剧烈振荡 1 min,振荡频率为每分钟 120 次~150 次,用 300 目滤布(5.6)过滤,收集滤液于具塞试管中(5.5)备用

7.2 孢子计数

7.2.1 血球计数板准备:加样前,对血球计数板(5.3)计数室进行镜检,若有污物,需清洗吹干后使用。

7.2.2 点样品:在计数板(7.2.1)计数室上加盖一块盖玻片(5.4)。将 7.1 中制备的滤液振荡摇匀,立即用滴管(5.8)吸取少许,从计数室最外侧沿盖玻片下边缘滴入一小滴(不宜过多)(参见 A.3),让滤液一次性虹吸充满计数室,防止产生气泡。充入滤液的量以不超过计数室台面与盖玻片之间的矩形边缘为宜(参见 A.4)。

7.2.3 计数:点样后静置 30 s,使真菌孢子沉降到计数板上,不随液体漂移。将计数板放置于显微镜(5.2)的载物台上夹稳,先在低倍镜下找到计数区后,再转换高倍镜观察并计数。计数方法参见图 A.2 和图 A.5。当 5 个中方格中孢子数量少于 10 个时,需计 25 个中方格的孢子数。

7.2.4 计数完毕,取下盖玻片,用水将血球计数板冲洗干净,切勿用硬物洗刷或抹擦,以免损坏网格刻度。洗净干燥后,放入盒内保存。

7.2.5 初期危害真菌的孢子显微形态:灰绿曲霉分生孢子椭圆形至亚球形,直径一般为 $2\text{ }\mu\text{m}$ ~ $6\text{ }\mu\text{m}$ 表面粗糙有刺;白曲霉分生孢子球形至亚球形,直径一般为 $2.5\text{ }\mu\text{m}$ ~ $3.5\text{ }\mu\text{m}$,表面光滑。分生孢子显微形态图片参见附录 B。

8 结果计算

计 5 个中方格孢子数时按式(1)计算,计 25 个中方格孢子数时按式(2)计算,计算结果保留到小数点后 1 位数字。

$$X_1 = (A \times 5 \times 10^4) \times (30/10) = 150\,000 A \quad \dots\dots\dots(1)$$

$$X_1 = (A \times 10^4) \times (30/10) = 30\,000 A \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中:

X_1 每克粮食样品中孢子总数,单位为个每克(个/g);

A ——5 个(或 25 个)中方格内孢子总数,单位为个(个)。

9 检测报告

9.1 同一样品进行两次平行计数,检测结果以两次计数结果最大值记录。

9.2 根据计算结果出具报告。

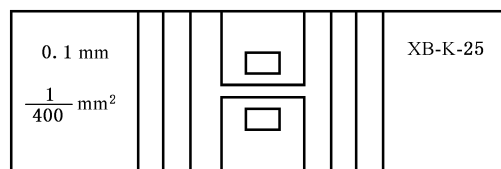
注:可根据孢子计数结果对储粮安全性进行初步判定,判定方法参见附录 C。

附录 A
(资料性附录)

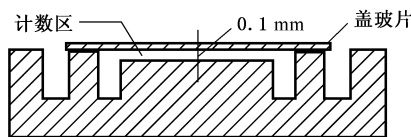
血球计数板结构及计数方法

A.1 血球计数板介绍

血球计数板常用于检测细菌、霉菌、酵母等微生物的数量,是一种常见的生物学工具,由一块特制厚玻片制成。每块计数板由 H 形凹槽分为 2 个同样的计数室。计数室两侧各有一支持柱,将特制的专用盖玻片覆盖其上,形成高 0.10 mm 的计数室[图 A.1b)]。计数室内画有长、宽各 3.0 mm 的方格,分为 9 个大方格,其中只有中间的一个大方格为计数室(图 A.2)。这一大方格的长和宽各为 1 mm,深度为 0.1 mm,其容积为 0.1 mm³。中央大方格用双线分成 25 个中方格,位于正中及四角 5 个中方格是计数区域(图 A.2 粉色区域),用单线划分为 16 个小方格。血球计数板上,刻有一些数字[图 A.1a)],其含义是:XB-K-25 为计数板的型号和规格,表示此计数板分 25 个中格;0.1 mm 为盖上盖玻片后计数室的高;1/400 mm² 表示计数室面积是 1 mm²,分 400 个小格,每小格面积是 1/400 mm²。

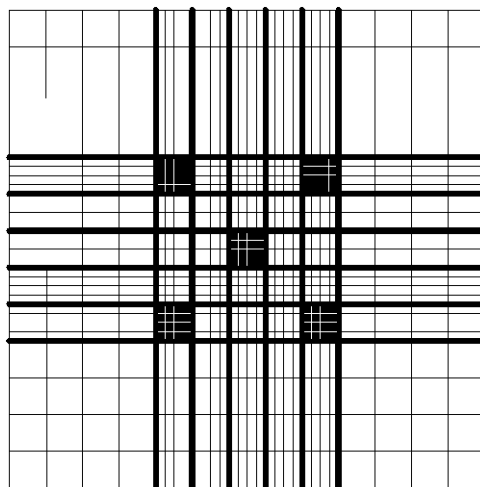


a) 血球计数板的正面



b) 血球计数板的侧面

图 A.1 血球计数板正面、侧面图



注:黑色部分为细胞计数区域。

图 A.2 血球计数板计数区示意图

A.2 点样品的位置及加样量示意

点样时,将滴管末端放于箭头所指位置(图 A.3),滴入一小滴,加样量适量时,血球计数板侧面如图 A.4所示,加样量过量时,血球计数板侧面如图 A.5 所示。

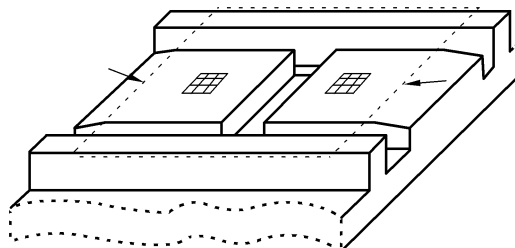


图 A.3 血球计数板计数室最外侧边缘示意图

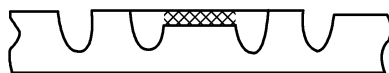


图 A.4 适量加样血球计数板侧面图

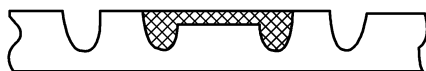


图 A.5 过量加样血球计数板侧面图

A.3 计数方法

计数区由 25 个中方格组成,按对角线方位,计左上、左下、右上、右下以及中央共计 5 个中方格的真菌分生孢子数量。若 5 个中方格计数少于 10 个,应计 25 个中方格的孢子数。如孢子位于大方格或中方格的双线上,计数时按照计上线不计下线的孢子,计左线不计右线的孢子的原则进行计数,以避免重复计数(图 A.6)。

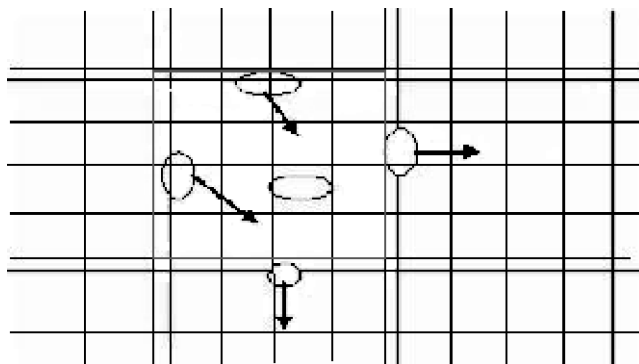
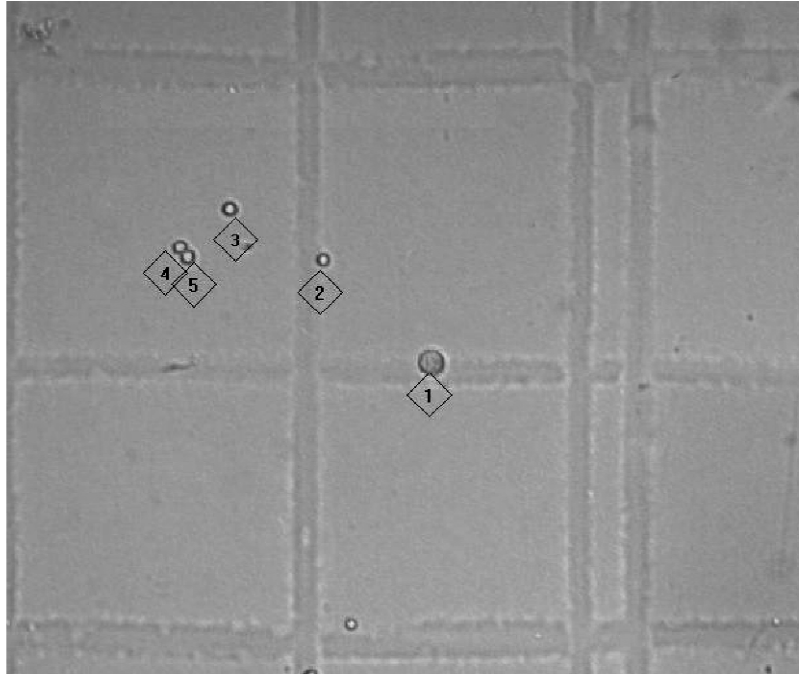


图 A.6 血球计数板计数原则

附录 B
(资料性附录)

储粮早期危害真菌孢子显微形态

孢子显微形态见图 B.1。



说明：

- 1 灰绿曲霉；
- 2、3、4、5——白曲霉。

图 B.1 储粮早期危害真菌孢子显微形态

附 录 C
(资料性附录)
储粮安全性评价参考表

根据储藏真菌分生孢子计数结果,可参考储粮安全性评价级别表(表 C.1),将粮食中真菌危害分为安全、临界、危害和严重危害 4 个等级。

表 C.1 储粮安全性评价级别参考表

级别	危害真菌孢子数/(个/g)	安全性评价	主要生长真菌
I	$<1.0 \times 10^4$	安全	基本没有危害真菌生长
II	$1.0 \times 10^5 \sim 9.9 \times 10^5$	临界 (关键控制区)	以灰绿曲霉为主,后期会出现少量白曲霉等生长
III	$1.0 \times 10^6 \sim 9.9 \times 10^6$	危害	灰绿曲霉生长优势逐渐被白曲霉替代,并会出现少量其他真菌生长
IV	$\geq 1.0 \times 10^7$	严重危害	以白曲霉为主,后期会出现一些黄曲霉、青霉等危害真菌生长