

ICS 59.140.30
分类号: Y46
备案号: 32266-2011

QB

中华人民共和国轻工行业标准

QB/T 4199—2011

皮革 防霉性能测试方法

Leather—Test method for antimould

2011-06-15 发布

2011-10-01 实施

中华人民共和国工业和信息化部 发布

前 言

本标准由中国轻工业联合会提出。

本标准由全国皮革工业标准化技术委员会（SAC/TC 252）归口。

本标准起草单位：国家皮革质量监督检验中心（浙江）、浙江盛汇化工有限公司。

本标准主要起草人：黄新霞、姜德云、王海明、马贺伟。

皮革 防霉性能测试方法

1 范围

本标准规定了皮革的防霉性能测试方法。

本标准适用于各种半成品革、皮革。

2 规范性引用文件

下列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 4789.15 食品卫生微生物学检验 霉菌和酵母计数

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法（GB/T 6682—2008，ISO 3696:1987，MOD）

QB/T 2707 皮革 物理和机械试验 试样的准备和调节（QB/T 2707—2005，ISO 2419:2002，MOD）

3 原理

将霉菌接种于待测样品上，在规定条件下培养一定时间后，观察样品表面霉菌生长情况，然后判断样品的防霉性能。

4 设备和材料

- 4.1 恒温培养箱，可控温度（25±1）℃。
- 4.2 冰箱，可控温度 0℃～5℃。
- 4.3 生物安全柜，二级。
- 4.4 光学显微镜，放大倍数 5 倍～50 倍。
- 4.5 压力蒸汽灭菌器，5L。
- 4.6 离心机，2000r/min，能控制温度至-5℃。
- 4.7 振荡器，振荡频率 50r/min～150r/min。
- 4.8 电子天平，精度 0.01g。
- 4.9 培养皿，三分格，直径 100mm。
- 4.10 模刀，圆形，内直径 25mm。
- 4.11 医用胶带。

5 样品的制备

5.1 对照样品

按附录A进行制备，阴性对照样品、阳性对照样品各两个。测试前将对照样品从冰箱中取出，解冻至室温。

——阴性对照样品，编号 A；

——阳性对照样品，编号 B。

5.2 测试样品

测试样品，编号C。用模刀（4.10）切取三个样品，其中两个为测试样品，另一个为备用样品，按 QB/T 2707进行空气调节。

6 培养基和试剂

除非另有说明，在分析中仅使用确认为分析纯的试剂和符合GB/T 6682规定的三级水。

6.1 格林氏溶液

按表1规定进行配制。

表1 格林氏溶液的组分

组 分	用 量
水（新煮沸后冷却至室温）	1000mL
NaCl	6.5g~7.5g
KCl	0.09g~0.14g
CaCl ₂	0.11g~0.12g
NaHCO ₃	0.20g~0.22g

6.2 培养基的配制

6.2.1 孟加拉红培养基

按表2规定进行配制，加热溶解后，用0.1mol/L NaOH溶液调节pH至7.0~7.2，分装后置于压力蒸汽灭菌器（4.5）内，121℃灭菌15min。

表2 孟加拉红培养基组分

组 分	用 量
水（新煮沸后冷却至室温）	900mL
1/3000孟加拉红溶液	100mL
蛋白胨	5.0g
葡萄糖	10.0g
琼脂	20.0g
氯霉素	0.1g
KH ₂ PO ₄	1.0g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5g

6.2.2 斜面培养基

取蛋白胨10.0g，牛肉膏3.0g，氯化钠5.0g，琼脂20.0g，加入1000mL蒸馏水，加热溶解并搅拌，煮沸1min，加入到直径15mm的试管中（不超过体积的1/5），置于压力蒸汽灭菌器内，121℃灭菌15min，冷却至60℃时，摆斜面。

6.3 润湿剂

选择 N-甲基乙磺酸、吐温 80、二辛磺化丁二酸钠三种试剂中的任意一种，制成含 0.05%润湿剂的水溶液，调节 pH 至 6.0~6.5，置于压力蒸汽灭菌器内，115℃灭菌 30min。

7 检测用菌种的准备

7.1 检测用菌种

检测用菌种见表3，防霉性能测试应在具有生物安全防护的霉菌实验室进行。

表 3 检测用的菌种

序号	菌种 ^a 名称	菌种 编号
1	黄曲霉 (<i>Aspergillus flavus</i>)	ATCC 10836
2	黑曲霉 (<i>Aspergillus niger</i>)	ATCC 6275
3	大毛霉 (<i>Mucor mucedo</i>)	ATCC 48559
4	产黄青霉 (<i>Penicillium chrysogenum</i>)	ATCC 9179
5	桔灰青霉 (<i>Penicillium aurantiogriseum</i>)	ATCC 16025
6	变幻青霉 (<i>Penicillium variable</i>)	ATCC 32333
7	马氏拟青霉 (<i>Paccilomyces marquandii</i>)	ATCC 10525
8	绿色木霉 (<i>Trichoderma viride</i>)	IFO 31137
^a 根据产品的使用要求, 可选用其他菌种作为检测菌种, 但选用的菌种应具有相应的标准菌种合格证明。		

7.2 菌种培养和保藏

准备8个斜面培养基(6.2.2), 将8类菌种分别单独接种, 放入恒温培养箱(4.1), 在温度(25±1)℃下培养7d~14d后, 于2℃~10℃下储藏(不应超过三个月), 作为保藏菌。

7.3 孢子悬液的制备

7.3.1 在培养好的菌种(7.2)中加入10mL含有0.05%湿润剂的水溶液(6.3)。

7.3.2 用灭菌接种针轻轻刮取培养物的表面, 使孢子成游离状态, 轻轻摇动孢子悬液, 使其分散开, 然后将悬液轻轻倒入含有玻璃珠的锥形瓶中。

7.3.3 将装有孢子悬液的锥形瓶放在振荡器(4.7)中, 振荡2h~3h, 使孢子群完全分散开, 然后用纱布过滤以除去菌丝, 得到孢子悬液。

按GB/T 4789.15的规定, 用生理盐水调节混合孢子悬浮液密度, 利用血球计数板计数, 使悬浮液中孢子浓度为(5±0.2)×10⁵cfu。

7.3.4 重复7.3.1~7.3.3, 将8种霉菌分别制成孢子悬液, 然后将8种孢子悬液混合在一起, 充分振荡使其均匀分散, 得到混合霉菌孢子悬液。

混合霉菌孢子悬液应当天使用, 若不在当天使用, 应于0℃~10℃下贮存, 4日内使用。

7.4 霉菌活性控制

7.4.1 无菌培养皿中注入孟加拉红培养基(6.2.1), 厚度3mm~6mm, 凝固后待用(48h内使用)。

7.4.2 剪取直径25mm的圆形无菌滤纸, 铺在已凝固的培养基上, 用装有新制备的混合霉菌孢子悬液(7.3.4)的喷雾器, 将孢子悬液充分均匀地喷在培养基和滤纸上。在温度28℃、相对湿度90%的条件下培养7d, 滤纸上明显有菌生长, 否则应重新制备混合霉菌孢子悬液。

8 样品测试

8.1 取两个三分格培养皿(4.9), 在每个培养皿的三分格外壁分别贴好A、B、C标签, A为阴性对照样品, B为阳性对照样品, C为测试样品, 平行测定。

8.2 将滤纸折叠好, 剪去尖角后放入培养皿中, 用移液管移取少量无菌水使滤纸润湿。

8.3 将两组样品分别放入两个培养皿中对应的分格内, 粒面(使用面)向上。

注: 如果样品表面霉菌生长不明显, 但样品的边缘霉菌生长明显, 则测试样品的另一个面的防霉性能, 并在试验报告中注明。

8.4 从冰箱中取出混合霉菌孢子悬液（7.3.4），温度平衡至室温后，移取约 1mL 的混合霉菌孢子悬液放入 1mL 离心试管中，在温度 10℃~15℃、转速 2000 r/min 条件下，离心处理 20min。

注：混合霉菌孢子悬液的移取量由离心管的体积决定，通常移取 1mL。

8.5 用无菌移液器小心移除上层清液，加入 0.25mL 格林氏溶液（6.1）稀释、混匀霉菌孢子。

8.6 在培养皿中每个样品的中央部位各加入 10μL 的混合霉菌孢子悬液（8.5），然后用医用胶带（4.11）密封培养皿，防止污染。

8.7 将培养皿置于（25±2）℃、饱和湿度的培养箱中，连续培养 28d。

9 等级评价

9.1 检查

每隔 7d 用 50 倍光学显微镜（4.4）检查霉菌生长情况，检查 4 次（检查时间共 28d）。第一次检查时如果发现阴性测试样品 A 上无霉菌生长，则该次测试无效，应重新用孢子接种，然后再培养。

9.2 等级判定

根据对照样品、测试样品的霉菌生长情况进行判定，应符合表 4 规定。

表 4 等级判定

等级	样品测试表面霉菌生长情况			等级说明
	阴性对照样品A	阳性对照样品B	测试样品 C	
1级	霉菌生长明显	无霉菌生长	无霉菌生长	具有防霉性
2级	霉菌生长明显	无霉菌生长	霉菌生长明显，面积≤1/3	防霉性较差
3级 ^a	霉菌生长明显	无霉菌生长	霉菌生长明显，面积>1/3	无防霉性
无效重做	样品A表面无霉菌生长，或样品B表面有霉菌生长，或两个平行样品的等级之差超过1			
^a 检查时，如果测试结果达到 3 级，可随时停止测试。				

10 试验报告

试验报告应包含以下内容：

- a) 本标准编号；
- b) 样品名称、编号、类型、厂家（或商标）；
- c) 试验条件；
- d) 样品的防霉菌等级；
- e) 试验中出现的异常现象；
- f) 实测方法与本标准不同之处；
- g) 试验人员、日期。

附 录 A
（规范性附录）
对照样品的制备

A.1 阴性对照样品的制备

A.1.1 选用生黄牛皮，按照常规制革工艺加工至皮革，加工过程所采用的化工材料均不含杀菌剂及防霉剂成分。

A.1.2 用模刀（4.10）取样，样品经40W紫外灯照射30min后密封，冷冻保存备用（-10℃~-20℃），得到阴性对照样品。

A.2 阳性对照样品的制备

称取A.1中的阴性对照样品，浸泡于5倍量的含苯噻氰（TCMTB）水溶液中（苯噻氰的质量浓度为0.5%），24h后取出，水平放置于生物安全柜（4.3）中，自然晾干。用模刀（4.10）取样，密封，冷冻保存备用（-10℃~-20℃），得到阳性对照样品，阳性对照样品中苯噻氰（TCMTB）的含量在250mg/kg~350mg/kg之间。