《凝结魏茨曼氏菌计数方法》行业标准（征求意见稿）
编制说明

一、工作简况

1、任务来源

2020 年 12 月 1 日，本任务被工业和信息化部列入 2020 年第三批行业标准制修订计划（工信厅科函〔2020〕263 号文），标准立项计划号为 2020-1785T-QB，由全国食品工业标准化技术委员会工业发酵分技术委员会（TC64/SC5）归口，由中国食品发酵工业研究院有限公司牵头制定。

2、主要起草过程

（1）起草阶段

标准任务下达后，中国食品发酵工业研究院有限公司于 2021 年 2 月开始向行业征集起草单位并组建标准起草工作组，同步征求标准制定建议、企业标准文件及样品等制标所需资料。牵头单位广泛查阅国内外先进标准及文献资料，整理相关技术方法及评价指标，初步形成标准制定技术流程图。

2021 年 4 月 16 日，中国食品发酵工业研究院有限公司在上海组织召开了标准制定工作启动会暨第一次工作组会议，由牵头单位及 18 家国内外研究机构成员代表共 34 人，通过线下及线上形式参与标准制定内容和计划讨论。

2021 年 5 月-7 月，牵头单位代表标准起草工作组面向全行业广泛征集凝结魏茨曼氏菌菌粉样品。

2021 年 7 月-12 月，牵头单位组织 10 家标准起草工作组成员单位参加标准方法验证实验室比对工作。根据检验方法验证技术要点，牵头单位整理验证所需试剂及菌粉样品，并邮寄分发至各比对实验室。第一轮方法比对期间，牵头单位共召开 3 次比对实验室内部会议，根据各实验室反馈数据，逐步开展凝结魏茨曼氏菌菌粉总数计数方法研究工作，并完善标准方法技术路线图。

2022 年 1 月 12 日，牵头单位在安徽组织召开了第二次工作组会议，汇报了第一轮实验室验证数据及标准方法草案，并组织起草单位成员讨论下一步方法验证计划，包括添加凝结魏茨曼氏菌的食品样品前处理方式和 pH 调节验证工作。

征求意见稿编制说明

2022 年 2 月-3 月，牵头单位代表标准起草工作组面向全行业广泛征集添加凝结魏茨曼氏菌菌粉的终端食品样品。

2022 年 3 月-7 月，根据征集的终端产品类别，牵头单位组织开展第二轮标准方法实验室比对验证工作，共有 12 家实验室参与，主要涉及样品前处理方式和 pH 调节技术内容。

2022 年 8 月 25 日，卫健委发布《关于<可用于食品的菌种名单>和<可用于婴幼儿食品的菌种名单>更新的公告》（2022 第 4 号），将凝结芽孢杆菌（*Bacillus coagulans*）更名为凝结魏茨曼氏菌（*Weizmannia coagulans*），故本标准名称按照规定要求修改为《凝结魏茨曼氏菌计数方法》。

2022 年 8 月 31 日，牵头单位在河南组织召开了第三次工作组会议，汇报了行业标准《凝结魏茨曼氏菌计数方法》制定工作期间的实验室比对验证内容，结合各起草单位的意见和建议，经过讨论后形成行业标准征求意见稿。

2022 年 9 月，起草工作组将标准文本及编制说明的征求意见稿以电子邮件的形式送发有关单位和专家，同时在研究院的网站上刊登，广泛征求意见。

3、主要起草单位及起草人所作的工作

起草单位：略。

工作组成员：略。

工作内容：中国食品发酵工业研究院有限公司负责起草，收集、整理国内外相关标准和技术资料，制定工作计划，组织开展方法研究、实验室比对及样品测定，撰写标准起草和编制说明等，以及组织、协调、审核等工作。其他起草单位协助搜索提供资料，参与研究方案确定，参与方法比对及样品检测，对本标准各版本涵盖的全部内容提出编写和修改意见。

二、标准编制原则和主要内容

1、标准编制原则

本标准的制定符合产业发展的原则，本着先进性，科学性，合理性和可操作性的原则，以及标准的目标性，统一性，协调性，适用性，一致性和规范性原则来进行本标准的制定工作。本标准按照 GB/T 1.1-2020 等给出的规则起草。本标

征求意见稿编制说明

准为制定标准，通过综合分析国内外凝结魏茨曼氏菌相关计数方法标准，查阅大量科学研究文献资料，并结合产品原料工艺、指标特性及市场发展需求等制定适合国内市场需求的计数方法标准。凝结魏茨曼氏菌相关国内外计数方法标准法规及文献资料对比见附表 1。

2、标准主要内容

（1）标准名称

凝结魏茨曼氏菌计数方法。

国家卫健委 2022 年发布第 4 号公告，将凝结芽孢杆菌（*Bacillus coagulans*）更名为凝结魏茨曼氏菌（*Weizmannia coagulans*）。

（2）范围

2016 年卫健委（原卫计委）将凝结魏茨曼氏菌列入《可用于食品的菌种名单》，可以作为食品原料应用，本标准规定了凝结魏茨曼氏菌的计数方法。本标准适用于食品用菌种制剂及食品中凝结魏茨曼氏菌的计数。

（3）规范性引用文件

根据引用标准版本整理标准号和名称。

（4）术语和定义

根据《伯杰细菌鉴定手册》、《常见细菌系统鉴定手册》、《乳酸细菌分类鉴定及实验方法》、《食品微生物检验手册》等书籍和文献资料，对凝结魏茨曼氏菌（*Weizmannia coagulans*）进行定义，凝结魏茨曼氏菌为菌落圆形，表面光滑，白色而有光泽，属于芽孢杆菌科、魏茨曼氏属[1]，革兰氏阳性兼性厌氧杆菌，孢子椭圆或柱状，孢囊膨大或不明显膨大，产 L(+)-乳酸的细菌。

（5）培养基和试剂

通过第一轮实验室方法比对工作，确定梯度稀释溶液为 0.9%生理盐水或 0.1%蛋白胨水溶液，用于样品溶解时为了更容易使凝结魏茨曼氏菌分散，需要额外添加 0.5%的吐温-80 起到分散剂作用。本标准方法中，涉及的 pH 调节试剂是

[1] Gupta RS, Patel S, Saini N, Chen S. Robust demarcation of 17 distinct Bacillus species clades, proposed as novel Bacillaceae genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: description of Robertmurraya kyonggiensis sp. nov. and proposal for an emended genus Bacillus limiting it only to the members of the Subtilis and Cereus clades of species. Int J Syst Evol Microbiol. 2020 Nov;70(11):5753-5798. doi: 10.1099/ijsem.0.004475. Epub 2020 Oct 27. Erratum in: Int J Syst Evol Microbiol. 2020 Dec;70(12):6531-6533. PMID: 33112222.

征求意见稿编制说明

参考美国食品化学法典第十二版（FCC12）版本中 *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086 检验方法标准所用试剂，并从实际应用方面考虑，将氢氧化钠及乳酸溶液浓度降低为 2mol/L，更加有利于 pH 调节。琼脂培养基是经过第一轮实验室标准方法比对，筛选出的最适合应用于凝结魏茨曼氏菌计数的培养基配方。

（7）检验程序

参考 GB 4789.35-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳酸菌检验》，并根据本标准检验方法技术内容制定相应检验程序流程图。

（8）试样制备

标准适用范围包括凝结魏茨曼氏菌原料菌粉和添加凝结魏茨曼氏菌粉的终端食品，终端食品根据样品特性分为菌种制剂、可直接溶解食品类（表面喷涂的加工坚果与籽类、即食谷物、饮料、乳及乳制品等）、需加热溶解食品类（可可制品、巧克力和巧克力制品及糖果等）和需粉碎食品类（焙烤食品等）。

菌种制剂：参考美国食品化学法典第十二版（FCC12）中方法对于菌种制剂取样量为 1.0 g 加入到 199mL 的蛋白胨水溶液中；同时面向行业进行考察，由于其原料菌粉生产工艺特性，样品能够保持很好的均一性，并考虑到菌种制剂价格昂贵，过高的样品检验取样量容易为生产及应用企业造成经济损失，所以本标准针对菌种制剂采用“1 g 样品+99 ml 稀释液”进行制备样品匀液。

可直接溶解食品类（表面喷涂的加工坚果与籽类、即食谷物、饮料、乳及乳制品等）：此类产品中添加的凝结魏茨曼氏菌菌粉均是直接加入到食品中或喷涂在食品表面，采用直接取样并溶解的方式能够有效将凝结魏茨曼氏菌从食品中进行提取，故本标准针对此类样品采用“25g 样品+225mL 稀释液”进行制备。

需加热溶解食品类（可可制品、巧克力和巧克力制品及糖果等）：根据 GB 4789.1-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 总则》中对于样品取样需要满足具有代表性原则，同时参考 GB 4789.34-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 双歧杆菌检验》、GB 4789.35-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳酸菌检验》等微生物检验标准中对于取样量均采用“25g 样品+225mL 稀释液”，同时由于样品受热易溶解的特性，故本标准针对此类样品采用“25g 样品+55℃的 225mL 稀释液”进行制备样品匀液。

需粉碎食品类（焙烤食品等）：由于凝结魏茨曼氏菌在样品中分布不均匀，

征求意见稿编制说明

需要对最小独立包装样品进行粉碎处理并混匀后，再称取具有代表性的 25g 样品加入 225mL 的稀释液进行制备样品匀液。针对部分样品由于基质较为复杂，无法直接完全粉碎，也可选择先将样品与加稀释液进行混合后，再对样品进行粉碎并混合均匀后按比例称取样品。

（9）操作步骤

样品均质：参考行业征集的多项企业标准，对于样品的前处理方式主要分为拍击式均质器拍打和添加玻璃珠摇床震荡两类，实验室比对工作组通过对这两种形式进行验证后，结果表明无显著差异，故本标准确定样品前处理方式选用设备普及率高、操作更简单的拍击式均质器进行样品制备。根据终端产品基质及原料菌粉性质不同，对于部分溶解均质后 pH＜7.0 的酸性样品，将样品匀液 pH 调整为 8.5 能够显著提高凝结魏茨曼氏菌总数检出，故本标准对于 pH 调节步骤不做强制要求，企业和检验机构可根据样品实际情况自行选择。

梯度稀释：参考 GB 4789.34-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 双歧杆菌检验》、GB 4789.35-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳酸菌检验》等微生物检验标准中对于样品梯度稀释的方式，本标准另明确规定了对于梯度稀释步骤需要采用涡旋振荡器进行混匀，混匀方式为“从试管内液体旋转至底部开始计时，振荡 10 s~15 s”。

水浴热激：参考美国食品化学法典第十二版（FCC12）及国内相关企业标准，对于样品溶解后需要采用高温水浴方式处理样品匀液，能够有效激活芽孢状态的凝结魏茨曼氏菌进行萌发，并灭活非芽孢状态的营养体成分。热激共有“80℃水浴 10min”和“75℃水浴 30min”两种方式。第一轮实验室比对工作组对其进行了验证，同时也对梯度稀释和水浴热激的先后顺序进行了验证，实验结果表明“80℃水浴 10min”的检验结果高于“75℃水浴 30min”，同时先进行梯度稀释后的试管便于进行水浴加热，能够保持受热均匀，故本标准采用“80℃水浴 10min”处理样品匀液。

平板培养：第一轮实验室比对工作在 40℃±2℃条件下，通过平板倾注法，针对培养时间为 48h 或 72h 进行了验证，计数结果结果表明二者无显著差异，凝结魏茨曼氏菌在培养 48h 后能够有效生长，故本标准采用 40℃±2℃培养 48h 进行检验。

征求意见稿编制说明

（10）结果与报告

由于微生物活菌总数检验的特殊性，参考 GB 4789.34-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 双歧杆菌检验》、GB 4789.35-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳酸菌检验》等微生物检验标准，对于适宜稀释度的平板上菌落数在 30-300CFU 为有效平板，并对其计数规则进行规定。凝结魏茨曼氏菌计数结果报告以科学计数法（保留两位有效数字）形式表示，报告单位为 CFU/g 或 CFU/mL。

（三）解决主要问题

本标准制定的计划目的是研究凝结魏茨曼氏菌的菌种制剂和终端食品中的凝结魏茨曼氏菌的计数问题，提升标准科学性和实用性，完善微生物检验方法标准体系，促进产品应用推广，解决产品质量规范等问题。

三、标准中涉及专利的情况

本标准不涉及专利问题。

四、预期达到的社会效益、对产业发展的作用等情况

本标准符合国内外产品的要求，在市场经济中占有十分重要的地位。该标准的实施，将规范凝结魏茨曼氏菌行业生产，为国内外销售及开展对外技术、经济交流提供了法规依据。

五、与国际、国外对比情况

本标准根据国内产品的实际应用情况，主要依据凝结魏茨曼氏菌的新资源食品公告（卫计委 2016 第 6 号），以及美国食品化学法典第十二版（FCC12）中标准检验方法，同时参考了国内多项国家、行业、团体、企业标准。标准属于国际先进水平。

六、在标准体系中的位置，与现行相关法律、法规、规章及标准，特别是强制性标准的协调性

本标准与现行法律、法规、规章和政策以及有关基础和强制性标准不矛盾。在食品工业标准体系中属于“07 发酵制品、07 其他新型发酵制品、03 菌种制剂”。

征求意见稿编制说明

七、重大分歧意见的处理经过和依据

本标准未产生重大分歧意见。

八、标准性质的建议

建议本标准的性质为推荐性行业标准。

九、贯彻标准的要求和措施建议

无。

十、废止现行相关标准的建议

无。

十一、其他应予说明的事项

无。

征求意见稿编制说明

附表 1 凝结魏茨曼氏菌相关国内外标准计数方法关键指标对比

	技术要求								
	稀释液类型	**取样量**	**稀释液用量**	**水浴热激条件**	**水浴热激顺序**	**前处理方式**	**pH 调节**	**培养条件**	**培养时间**
本标准	0.9%生理盐水或 0.1%蛋白胨水溶液，加 0.5%吐温 80	菌种制剂：1g 其他食品：25g	菌种制剂：99mL 其他食品：225mL	80℃，10min	先稀释后热激	均质器拍打	pH＜0.7，可选择调节至 8.5±0.2	需氧 40±2℃	48h
美国 FCC	0.1%蛋白胨水溶液	少量：1g 大量：2-50g	少量：199mL 大量：总体积为 200 或 300mL	75℃，30min	先热激后稀释	/	pH＜0.7 或 pH＞8.5，均调节至 8.5±0.2	需氧 40±2℃	48h
GB 4789.35	0.85%生理盐水	25g	225mL	/	/	均质器拍打	/	36±1℃	72±2h
GB/T 26428	0.85%生理盐水	25g	225mL	80℃，10min	先稀释后热激	均质器	/	需氧 37±1℃	48±2h
T/CSWSL 022	0.85%生理盐水	25g	225mL	80℃，10min	先热激后稀释	振荡器	/	需氧 50±1℃	24±1h
DB21/T 3278	0.85%生理盐水	25g	225mL	80℃，10min	先热激后稀释	振荡器	/	需氧 50±1℃	24±1h
T/YNBX 024	0.9%生理盐水+0.5%吐温 80	1g	100mL	/	/	摇床震荡	/	需氧 40±1℃	48±2h
企标 1	0.85%生理盐水	5g	45mL	/	/	摇床震荡	/	需氧 40℃	48-72h
企标 2	生理盐水+0.5%吐温 80	25g	225mL	80℃，10min	先热激后稀释	振荡器	/	需氧 42±1℃	48h
企标 3	0.9%生理盐水	1g	200mL	74-76℃，30min	先稀释后热激	均质杯	/	需氧 36-38℃	69-75h
企标 4	0.9%生理盐水+磷酸盐缓冲	1g	250mL 或 500mL	75℃，30min	先稀释后	超声	/	需氧	72h

征求意见稿编制说明

	技术要求								
	稀释液类型	取样量	稀释液用量	水浴热激条件	水浴热激顺序	前处理方式	pH 调节	培养条件	培养时间
	液				热激			37±1℃	
企标 5	0.85%生理盐水	5g	45mL	/	/	均质	/	需氧 40℃	48-72h
企标 6	0.9%生理盐水+0.5%吐温 80	1-3g	99mL	80℃，10min	先稀释后热激	摇床震荡	/	需氧 40℃	48h
企标 7	0.85%生理盐水	1g	100mL	/	/	摇床震荡	/	厌氧 37℃	44-48h

征求意见稿编制说明