ICS 67.040
CCS X60

QB

中 华 人 民 共 和 国 轻 工 行 业 标 准

QB/T XXXX—XXXX

凝结魏茨曼氏菌计数方法

Counting method of *Weizmannia coagulans*

（报批稿）

XXXX - XX - XX 发布　　XXXX - XX - XX 实施

中华人民共和国工业和信息化部　发布

工业和信息化部标准报批公示

工业和信息化部标准报批公示
工业和信息化部标准报批公示
工业和信息化部标准报批公示
工业和信息化部标准报批公示
工业和信息化部标准报批公示
工业和信息化部标准报批公示

前　　言

本文件按照GB/T 1.1-2020《标准化工作导则　第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由中国轻工业联合会提出。

本文件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（SAC/TC64/SC5）归口。

本文件起草单位：凯爱瑞配料贸易（上海）有限公司、善恩康生物科技（苏州）有限公司、微康益生菌（苏州）股份有限公司、中国检验检疫科学研究院综合检测中心、润盈生物工程（上海）有限公司、江苏新申奥生物科技有限公司、萨宾莎（南京）生物科技有限公司、三菱化学株式会社、汤臣倍健股份有限公司、仙乐健康科技股份有限公司、青岛根源生物技术集团有限公司、内蒙古伊利实业集团股份有限公司、黑龙江飞鹤乳业有限公司、上海江崎格力高食品有限公司、北京昕大洋科技发展有限公司、中国食品发酵工业研究院有限公司、中国生物发酵产业协会。

本文件主要起草人：李斌、王欣悦、郁雪平、方曙光、薛晓晶、卢涛、宋锦安、马凯、艾努瑞格·潘迪、赵迪、黄玲、周钡华、张宗国、巴根纳、张亮、张莉、赵丽芳、王杰红、喻扬、夏九学、朱萧燕、韩迪、张常亮、希瓦库玛·阿默干、陈叶兰、许伟沂、冯海霞、曲珍玉、刘英涛、贾娜、余艳、刘明、王洁、刘峡丽、马新、陈珂可、周伟、吴家碧、黄盼、徐红、陈楠楠。

本文件为首次发布。

工业和信息化部标准报批公示

凝结魏茨曼氏菌计数方法

1 范围

本文件描述了凝结魏茨曼氏菌的计数方法，包括设备和材料、培养基和试剂、计数程序、试样制备、操作步骤、结果与报告。

本文件适用于食品用菌种制剂及食品中凝结魏茨曼氏菌的计数。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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 603 化学试剂 试验方法中所用制剂及制品的制备

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

凝结魏茨曼氏菌 *Weizmannia coagulans*

凝结芽孢杆菌 *Bacillus coagulans*

菌落圆形，表面光滑，白色而有光泽，属于芽孢杆菌科、魏茨曼氏菌属，革兰氏阳性兼性厌氧杆菌，芽孢中生到次端生，孢子椭圆或柱状，孢囊膨大或不明显膨大，产L(+)-乳酸的细菌。

[来源: QB/T XXXX-2023,3.1]

4 设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外，其他设备和材料如下:

4.1 天平：感量0.01 g。

4.2 pH计：精确度0.1。

4.3 拍击式均质器及无菌均质袋。

4.4 涡旋混合器。

4.5 恒温水浴锅：（80±1） ℃。

4.6 恒温培养箱：（40±2） ℃。

4.7 容量瓶：100 mL、1 000 mL。

4.8 烧杯：1 000 mL。

4.9 量筒：250 mL、1 000 mL。

4.10 无菌锥形瓶：250 mL、500 mL。

4.11 无菌试管：18 mm×180 mm，15 mm×150 mm。

4.12 微量移液器及无菌吸头：1 000 μL。
4.13 无菌培养皿：直径90 mm。

5 培养基和试剂

本方法中所用的水，在未注明其他要求时，应符合GB/T 6682中水的规格。所用试剂，在未注明其他规格时，均指分析纯（AR），在没有注明其他要求时，均按GB/T 603的规定制备。

5.1 生理盐水（9.0 g/L）

称取9.0 g氯化钠，蒸馏水充分溶解后，定容至1 000 mL，分装后121 ℃高压灭菌15 min~20 min。用于试样制备溶解样品时应按比例添加0.5%吐温-80。

5.2 蛋白胨水溶液（1.0 g/L）

称取1.0 g胰蛋白胨，5.0 g吐温-80，蒸馏水充分溶解后，定容至1 000 mL，分装后121 ℃高压灭菌15 min~20 min。用于试样制备溶解样品时应按比例添加0.5%吐温-80。

5.3 氢氧化钠溶液（2 mol/L）

称取8.0 g氢氧化钠，蒸馏水充分溶解后，定容至100 mL，分装后121 ℃高压灭菌15 min~20 min。

5.4 乳酸溶液（2 mol/L）

称取21.2 g质量分数为85%的L-乳酸，蒸馏水充分溶解后，定容至100 mL，分装后121 ℃高压灭菌15 min~20 min。

5.5 凝结魏茨曼氏菌计数（*Weizmannia coagulans* count，WCC）培养基

葡萄糖5.0 g、蛋白胨10.0 g、酵母粉5.0 g、牛肉膏5.0 g、氯化钠0.25 g、无水氯化钙0.15 g、一水合硫酸锰0.1 g、L-半胱氨酸盐酸盐0.5 g、琼脂粉15.0 g，加入1 000 mL蒸馏水，用氢氧化钠溶液（5.3）或乳酸溶液（5.4）调节pH至5.0~5.5，加热溶解，分装至锥形瓶中，121 ℃高压灭菌15 min~20 min。

6 计数程序

凝结魏茨曼氏菌按图1所示程序进行计数。

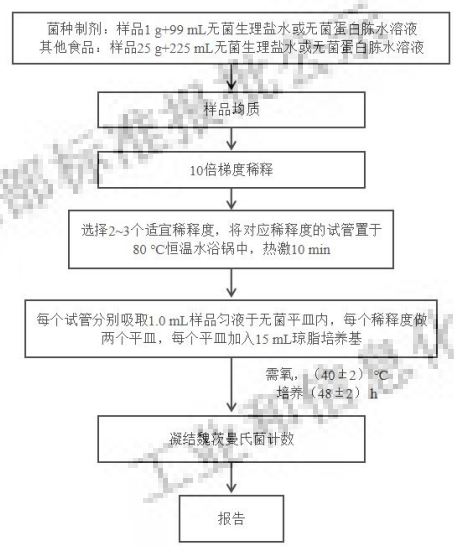

图1 凝结魏茨曼氏菌计数程序

7 试样制备

7.1 菌种制剂

以无菌操作称取1 g样品，置于装有99 mL无菌生理盐水（5.1）或蛋白胨水溶液（5.2）的无菌均质袋中。

7.2 可直接溶解食品（表面喷涂的加工坚果与籽类、即食谷物、饮料、不含颗粒的乳及乳制品等）

以无菌操作称取25 g（mL）样品，置于装有225 mL无菌生理盐水（5.1）或蛋白胨水溶液（5.2）的无菌均质袋中。

7.3 需加热溶解食品（可可制品、巧克力和巧克力制品及糖果等）

以无菌操作称取25 g样品，置于装有温度为55 ℃的225 mL无菌生理盐水（5.1）或蛋白胨水溶液（5.2）的无菌均质袋中。

7.4 需粉碎食品（焙烤食品、含颗粒的乳及乳制品等）

以无菌操作将足够数量的整份独立包装样品粉碎处理并混匀，称取25 g处理后样品，置于装有225 mL无菌生理盐水（5.1）或蛋白胨水溶液（5.2）的无菌均质袋中。部分难粉碎样品可按照称取样品取样量与无菌生理盐水（5.1）或蛋白胨水溶液（5.2）的比例为1:9进行溶解，再粉碎混合均匀后，并转入无菌均质袋中。

8 操作步骤

8.1 样品均质

将无菌均质袋在拍击式均质器中以 10 次/秒均质 5 min~10 min，直至样品分散均匀，制备样品匀液。处理后的样品匀液 pH＜7.0，可用氢氧化钠溶液（5.3）或乳酸溶液（5.4）调节至 8.5±0.1。

8.2 梯度稀释

用 1.0 mL 微量移液器无菌吸头吸取样品匀液 1.0 mL，垂直注于装有 9.0 mL 生理盐水（5.1）或蛋白胨水溶液（5.2）的无菌试管中（注意吸管尖端不要触及稀释液），通过涡旋振荡器混匀（从试管内液体旋转至底部开始计时，振荡 10 s~15 s），制成 10 倍稀释的样品匀液；按上述操作顺序，做 10 倍递增稀释，每递增稀释一次，即换用 1 次 1.0 mL 无菌吸头。

8.3 水浴热激

根据待检样品凝结魏茨曼氏菌总数进行估计，选择 2~3 个连续适宜稀释度，将对应稀释度的试管置于 80 ℃恒温水浴锅中热激 10 min，水浴期间手动振摇试管 2~3 次使试管内样品匀液受热均匀。若样品水分含量较高，则不必进行水浴热激。

8.4 平板培养

每个稀释度试管分别吸取 1.0 mL 样品匀液于无菌平皿内，每个稀释度做两个无菌平皿；同时分别吸取 1.0 mL 空白稀释液加入两个无菌平皿内作空白对照。将约 15 mL 冷却至 50 ℃的 WCC 培养基（5.5）倾注至无菌平皿中，顺时针或逆时针转动无菌平皿至少 20 次使其混合均匀，待琼脂凝固后，将平板翻转，40 ℃±2 ℃需氧培养 48 h±2 h。从样品梯度稀释到平板倾注要求在 30 min 内完成。

9 结果与报告

9.1 结果计算

9.1.1 选取菌落数在 30 CFU~300 CFU、无蔓延菌落生长的平板计算凝结魏茨曼氏菌菌数，每个稀释度的菌落数应采用两个平板的平均数。

9.1.2 若只有一个稀释度平板上的菌落数在适宜计数范围内，计算两个平板菌落数的平均值，再将平均值乘以相应稀释倍数，作为每克样品中的菌数结果。

9.1.3 若有两个连续稀释度的平板上菌落数在适宜计数范围内时，按公式（1）计算：

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0.1n_2)d} \qquad \text{……(1)}$$

式中：

N——样品中凝结魏茨曼氏菌菌数，以芽孢计，单位为（CFU/g 或 CFU/mL）；

$\sum C$——平板（含适宜范围菌落数的平板）菌落数之和，单位为（CFU）；

n_1——第一稀释度（低稀释倍数）平板个数；

n_2——第二稀释度（高稀释倍数）平板个数；

d——稀释因子（第一稀释度）。

示例：若第一稀释度（10^{-5}）经确证后的菌落数为 262 和 215，第二稀释度（10^{-6}）经确证后的菌落数为 43 和 35，则按照上述公式计算结果为：

$$N = \frac{262 + 215 + 43 + 35}{(2 + 0.1 \times 2) \times 10^{-5}} = 2.52 \times 10^{7}$$

9.2 报告

凝结魏茨曼氏菌菌数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。

工业和信息化部标准报批公示