

能力验证乳粉中乳酸菌计数不确定度的评定

杨 燕, 李琼琼, 宋光艳, 戴佳丽, 杨美成*

(上海市食品药品检验所, 上海 201203)

摘要: **目的** 对能力验证乳粉样品中乳酸菌计数进行不确定度评定。**方法** 依据能力验证作业指导书和 GB4789.35-2010《食品安全国家标准食品微生物学检验乳酸菌检验》进行测定, 再根据 JJF 1059.1-2012《测量不确定度评定与表示》对不确定度来源进行分析和评定。**结果** 乳酸菌计数过程中, 分散性对结果不确定贡献较大, 因此测定结果的不确定度采用检测结果的分散性进行评定。6份样品乳酸菌计数结果扩展不确定度分别为 0.02012、0.04337、0.01992、0.03296、0.02182 和 0.031379 ($P=95\%$, $k=2.09$)。**结论** 此方法适用于类似检测条件下乳酸菌计数不确定度的评定。

关键词: 能力验证; 乳酸菌计数; 不确定度

Uncertainty evaluation of lactic acid bacteria count in milk power by proficiency testing

YANG Yan, LI Qiong-Qiong, SONG Guang-Yan, DAI Jia-Li, YANG Mei-Cheng*

(Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China)

ABSTRACT: Objective To evaluate the uncertainty of lactic acid bacteria count in milk power by proficiency testing. **Methods** Proficiency testing of lactic acid bacteria count was conducted under the direction of *Reference book for microbiological ability verification plan in food* and GB 4789.35-2010 *National food safety standard Food microbiological examination: Lactic acid bacteria*. Then, the uncertainty sources introduced in the experiment were determined according to JJF1059.1-2012 *Evaluation and expression of uncertainty in measurements*. **Results** The dispersion was the major contribution of the uncertainty in the detection of total bacterial colony, so the dispersion of results was evaluated for the uncertainty of determination results. The extended uncertainty results of 6 samples were 0.02012, 0.04337, 0.01992, 0.03296, 0.02182 and 0.031379 ($P=95\%$, $k=2.09$), respectively. **Conclusion** The established method can be used in the uncertainty evaluation of lactic acid bacteria count under similar circumstances.

KEY WORDS: proficiency testing; lactic acid bacteria count; uncertainty

1 引言

乳酸菌是一类可发酵糖主要产生大量乳酸的细菌的通称^[1]。按照能力验证的要求, 进行乳酸菌的定量测定。一切定量结果都不可避免具有不确定度, 而检测方法的不确定度大小表征了实验室的测量水平^[2]。测量不确定度,

是根据所用到的信息, 表征赋予被测量值分散性的非负参数^[3]。目前, 不确定度的评定在理化实验中应用较为广泛, 在实际应用中关于微生物检验的不确定度报道并不多, 且多集中在菌落总数方面。

GB/T 27025-2008《检测和校准实验室能力的通用要求》(ISO/IEC17025:2005《检测和校准实验室能力认可准

*通讯作者: 杨美成, 博士, 主任药师, 主要研究方向为实验室质量管理。E-mail: yangmeicheng@vip.sina.com

*Corresponding author: YANG Mei-Cheng, Ph.D, Chief Pharmacist, Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China. E-mail: yangmeicheng@vip.sina.com

则》)^[4, 5]对测量不确定度有了明确要求,指出适当时应应对测量结果进行不确定度评定。CNAS-CL09:2013《检测和校准实验室能力认可准则在微生物检测领域的应用说明》中也指出,在微生物检测领域应对测量不确定度进行合理地评估^[6]。

本研究依据 GB 4789.35-2010《食品安全国家标准食品微生物学检验乳酸菌检验》^[1]和 2015 中国食品药品检定研究院能力验证保健食品益生菌的检测作业指导书对样品进行乳酸菌总数的测定。同时为了保证数据的准确可靠,依据 JJF 1059.1-2012《测量不确定度评定与表示》^[3],根据数据的分散性进行乳酸菌总数不确定度评定,并确定其置信区间,为类似检测条件下乳酸菌总数不确定度的评定提供参考。

2 材料与amp;方法

2.1 仪器与试剂

LABGARD 型生物安全柜(NuAire 公司), CONCEPT 1000I 厌氧工作站(RVSKINN 公司), MRS 培养基(Becton Dickinson 公司), 能力验证样品 6 份: 编号 CODE 1-6(中国食品药品检定研究院: TH0046-0046)。

2.2 实验方法

根据 2015 中国食品药品检定研究院能力验证保健食品益生菌的检测作业指导书和 GB 4789.35-2010^[1]进行检测。

在生物安全柜内将益生菌样品的西林瓶打开,取 5 mL 生理盐水充分溶解混合物,并将溶液转移至 50 mL 离心管中,另取 5 mL 生理盐水溶解洗涤西林瓶中残留样品,并转移至 50mL 离心管中。吸取上述样品处理液 1 mL,沿管壁缓慢注于装有 9 mL 生理盐水的无菌试管中,振摇混合均匀,依次倍比稀释。选取 1:10~1:10⁸ 共 8 个稀释度,每个稀释度吸取 0.1 mL 样品匀液分别置于 MRS 琼脂平板,进行表面涂布。于(36±1) °C 下厌氧培养(48±2) h 后计数平板上的所有菌落数。从样品制备到平板涂布要求在 15 min 内完成,依次分别对 6 份样品进行处理。

3 结果与分析

3.1 结果报告规则

选取菌落数在 30~300 CFU 之间、无蔓延菌落生长的平板计数菌落总数。

3.2 建立数学模型

$$Y = Kxd/V$$

Y ——样品菌落总数, CFU/瓶

K ——换算系数, 10 mL/瓶

x ——某稀释度检测平板上的菌落数, CFU

d ——稀释倍数

V ——某稀释度下取样体积, mL

检测结果和计数见表 1。

表 1 样品 CODE1 中乳酸菌计数结果及计算
Table 1 Results of lactic acid bacteria count in sample CODE 1

编号	检测结果(x_i)	检测结果取对数($\lg x_i$)	残差平方和($(\lg x_i - \overline{\lg x})^2$)
1	2.90×10 ⁹	9.4624	0.003636
2	2.65×10 ⁹	9.4232	0.000447
3	2.73×10 ⁹	9.4362	0.001160
4	2.27×10 ⁹	9.3560	0.002123
5	2.50×10 ⁹	9.3979	0.000017
6	2.68×10 ⁹	9.4281	0.000678
7	2.77×10 ⁹	9.4425	0.001631
8	1.98×10 ⁹	9.2967	0.011116
9	2.67×10 ⁹	9.4265	0.000596
10	2.35×10 ⁹	9.3711	0.000963
11	2.78×10 ⁹	9.4440	0.001759
12	2.70×10 ⁹	9.4314	0.000856
13	2.65×10 ⁹	9.4232	0.000447
14	2.45×10 ⁹	9.3892	0.000167
15	2.62×10 ⁹	9.4183	0.000262
16	2.59×10 ⁹	9.4133	0.000125
17	2.33×10 ⁹	9.3674	0.001207
18	2.38×10 ⁹	9.3766	0.000651
19	2.08×10 ⁹	9.3181	0.007062
20	2.63×10 ⁹	9.4200	0.000319
		$\overline{\lg x} = 9.4021$	$\Sigma = 0.035225$

3.2 测量不确定度的来源^[7,8]

不确定度的来源主要包括: 重复性(测试环境、培养时间、培养温度、修约、样品的均匀性、取样的重复性和人员的计数)、培养条件(培养时间允差、培养湿度的允差)、取样(稀释体积、取样体积)、样品保存条件(保存温度和保存时间)等。由于微生物学检验中乳酸菌数测定的特点是同一样品重复测定结果往往相差较大, 即结果的分散性大, 因此取样用天平或移液管、稀释用的容器等系统效应带来的 B 类不确定度对合成不确定度贡献较小, 而由随机效应带来的测量重复性所导致的不确定度占主要部分。因此仅考虑由平板计数方式引入的测量不确定度, 即采用 A 类评定测量不确定度, 其他来源的不确定度忽略不计。

3.3 测量不确定度的评定

从表 1 可知, 重复 20 次检测的数据结果差异较大, 因此对计数结果取对数后, 根据 A 类评定的贝塞尔公式进行不确定度的评定。

以样品 CODE 1 为例, 计算过程如下:

(1) 列出测量结果 $x_i (i=1, 2, \dots, 20)$

(2) 对测量的结果取对数 lgx_i , 得到对数 lgx_i 的平均值

为: $\overline{lgx} = 9.4021$

(3) 对每一样品求残差平方和: $(lgx_i - \overline{lgx})^2 = 0.035225$

(4) 得到检测结果对数值的样本标准偏差: $s(\overline{lgx}) =$

$$\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (lgx_i - \overline{lgx})^2}{n-1}} = 0.04306$$

(5) 标准不确定度: $u_A(\overline{lgx}) = \frac{s(\overline{lgx})}{\sqrt{n}} = 0.009629$

(6) 扩展不确定度: $U = k \times u_A(\overline{lgx})$

如前所述, 全部测量过程只有一项不确定度, 所以直接由平均值的标准不确定度给出测量结果的扩展不确定度。根据置信概率 $P=95\%$ 和自由度 $\nu=19$, 由 t 分布表得到包含因子 $k=2.09$ 。于是得:

$$U = 2.09 \times 0.009629 = 0.02012$$

$$lgx = \overline{lgx} \pm U = 9.4021 \pm 0.02012$$

(7) 结果报告

lgx 与 x 之间的非线性关系, 不能直接求扩展不确定度的反对数。因此首先确定 lgx 的取值范围在 9.38198~9.42222 之间。再取反对数后, 得测量结果 x 分布于 2409794451~2643747658 之间, 最终本实验室能力验证样品的菌落总数应报告为: $(2.4 \sim 2.6) \times 10^9$ CFU/瓶, 包含因子 $k=2.09$ 。

(8) 参照样品 CODE 1 的计算方法, 依次计算其他 5 份样品即 CODE 2~6 的不确定度(见表 2)。

4 讨 论

本次能力验证主要是针对保健品中益生菌的检测能力, 由中国食品药品检定研究院组织实施(编号: NIFDC-PT-046)。本实验室共收到 6 份益生菌待检样品, 按照要求报告了每瓶样品中乳酸菌的数量。结果反馈为满意结果($ZB=0.90, ZW=0.00, |ZB| \leq 2$ 且 $|ZW| \leq 2$ 为满意结果)。

与理化检验不同, 微生物检测受到的影响因素较多, 主要表现在同一份样品平行操作其检测结果发散性较大。尤其是样品中的微生物数量达到较高的数量级时, 结果差异更为显著。从本次检测结果来看, 乳酸菌的数量分布在 10^9 和 10^8 数量级。在实际检验过程中, 从样品稀释到平板涂布要求在 15 min 内完成, 在一定程度上增加了检验的难度。涂布的过程可能产生一定的损失, 人为因素的干扰较大。此外, 一个菌落并不一定是一个细菌所生成, 也可能是由一簇细菌(一个细菌团)所生成, 从而致使形成的菌落数与实际的活菌数有差异^[9]。

鉴于计数结果的发散性极大, 如直接用贝塞尔公式计算合并样本标准差所得到的不确定度不适合每一个样本^[10]。因此, 对检测结果采取取对数的方法进行不确定度评定更为合适。需要注意的是, 并不是所有的菌落总数测定结果进行不确定度评定时都采用取对数的方法进行计算, 当检测结果分散性较小时, 仍可以采用贝塞尔公式进行不确定度计算^[11]。上述检测方法对于类似检测条件下乳酸菌计数不确定度的评定提供了参考。

表 2 样品 CODE 2~6 乳酸菌计数结果
Table 2 Results of lactic acid bacteria count in sample CODE 2-6

编号	\overline{lgx}	扩展不确定度 U	$\overline{lgx} \pm U$	x 取值区间(CFU/瓶)
CODE 2	9.7091	0.04337	9.7091±0.04337	$(4.6 \sim 5.7) \times 10^9$
CODE 3	9.4771	0.01992	9.4771±0.01992	$(2.9 \sim 3.1) \times 10^9$
CODE 4	8.8493	0.03296	8.8493±0.03296	$(6.6 \sim 7.6) \times 10^8$
CODE 5	8.8126	0.02182	8.8126±0.02182	$(6.2 \sim 6.8) \times 10^8$
CODE 6	8.8111	0.03137	8.8111±0.03137	$(6.0 \sim 7.0) \times 10^8$

参考文献

- [1] GB4789.35-2010 食品安全国家标准,食品微生物学检验乳酸菌检验[S].
GB4789.35-2010 National food safety standard Food microbiological examination: *Lactic acid bacteria* [S].
- [2] 董喆, 李梦怡, 张会亮, 等. 原子吸收法测定泡菜中铅含量的不确定度评定[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(3): 1011-1017.
Dong Z, Li MY, Zhang HL, *et al.* Uncertainty evaluation for determination of lead in pickled vegetables by atomic absorption spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2016, 7(3): 1011-1017.
- [3] JJF 1059.1-2012 中华人民共和国国家计量技术规范测量不确定度评定与表示[S].
JJF 1059.1-2012 Evaluation and expression of uncertainty in measurement [S].
- [4] GB/T 27025-2008 检测和校准实验室能力的通用要求[S].
GB/T 27025-2008 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories [S].
- [5] ISO/IEC 17025-2005 中国实验室国家认可委员会检测和校准实验室能力认可准则[S].
ISO/IEC 17025-2005 Accreditation criteria for the competence of testing and calibration laboratories [S].
- [6] CNAS-CL 09:2013 检测和校准实验室能力认可准则在微生物检测领域的应用说明 [S].
CNAS-CL 09:2013 Guidance on the application of testing and calibration laboratory competence accreditation criteria in the field of microbiological testing [S].
- [7] 周晓红, 孙明华, 徐佩华, 等. 现榨果汁中菌落总数检测结果的不确定度评定[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 9(20): 2324-2326.
Zhou XH, Sun MH, Xu PH, *et al.* Uncertainty assessment in detection of total bacterial colony in fresh squeezed fruit juice [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2010, 9(20): 2324-2326.
- [8] 李静芳, 汤水平, 唐小兰, 等. 奶粉检测中不确定度的评定[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 7(19): 1477-1528.
Li JF, Tang SP, Tang XL, *et al.* Uncertainty assessment in detection of coliforms in lacteal powder [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2009, 7(19): 1477-1528.
- [9] 王海华, 兰茜. 能力验证菌落总数测定结果不确定度的评定[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(6): 2354-2355.
Wang HH, Lan Q. Uncertainty evaluation of aerobic plate count by proficiency testing [J]. *J Food Saf Qual*, 2015, 6(6): 2354-2355.
- [10] 李莎, 谭震. 酸乳乳酸菌数检验中不确定度的评定[J]. 中国卫生检验杂志, 2012, 22(8): 1865.
Li S, Tan Z. Evaluation of uncertainty for *Lactic acid bacteria* determination in yoghurt [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2012, 22(8): 1865.
- [11] 张秀丰, 翟硕莉, 王雪莲, 等. 速冻草莓菌落总数检验中不确定度的评定[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(6): 1833-1836.
Zhang XF, Zhai SL, Wang XL, *et al.* Uncertainty assessment in detection of total bacterial colony in frozen strawberry [J]. *J Food Saf Qual*, 2014, 5(6): 1833-1836.

(责任编辑: 姚 菲)

作者简介



杨 燕, 硕士, 药师, 主要研究方向为微生物学检验。

E-mail: yeats5694@163.com



杨美成, 博士, 主任药师, 主要研究方向为实验室质量管理、药物分析与微生物学检验。

E-mail: yangmeicheng@vip.sina.com