

饲用微生物添加剂地衣芽孢杆菌活菌计数 不确定度评定方法的建立

李欣南*

(辽宁省检验检测认证中心, 沈阳 110016)

摘要: **目的** 探讨检测实验室饲用微生物添加剂地衣芽孢杆菌活菌计数的不确定度评价方法。**方法** 实验依据 JJF 1059.1-2012《测量不确定度评定与表示》、RB/T 151-2016《食品微生物定量检测的测量不确定度评估指南》和 NY/T 1461-2007《饲料微生物添加剂 地衣芽孢杆菌》，对地衣芽孢杆菌活菌计数的不确定度分量进行分析。**结果** 本研究建立了地衣芽孢杆菌活菌计数不确定度评定方法，当包含因子 $k=2$ 时，扩展不确定度 $U=4.05\%$ ，样品的误差允许范围在 $0.95 \times 10^{10} \sim 1.15 \times 10^{10}$ CFU/g 之间。**结论** 建立的地衣芽孢杆菌活菌计数不确定度评定方法简单、易行，符合实际检测要求。

关键词: 不确定度；地衣芽孢杆菌；活菌计数

Establishment of method for the uncertainty evaluation in viable count of *Bacillus licheniformis* as feed microorganism additive

LI Xin-Nan*

(Liaoning Inspection, Examination & Certification Centre, Shenyang 110016, China)

ABSTRACT: Objective To explore the method of uncertainty evaluation for viable count of *Bacillus Licheniformis* as feed microorganism additive. **Methods** The uncertainty components were analyzed according to JJF 1059.1-2012 *Evaluation and representation of measurement uncertainty*, RB/T 151-2016 *Guidelines for the estimation of measurement uncertainty of food microbiological quantitative detection* and NY/T 1461-2007 *Bacillus licheniformis as feed microbial additives*. **Results** This method could evaluate the uncertainty of viable count of *Bacillus licheniformis*. When the factor $k=2$, the expanded uncertainty U was 4.05%. The allowable error range of the sample were between 0.95×10^{10} - 1.15×10^{10} CFU/g. **Conclusion** This method for evaluating the uncertainty of viable count of *Bacillus licheniformis* is simple and feasible, which meets the actual detection requirements.

KEY WORDS: uncertainty; *Bacillus licheniformis*; count of viable bacteria

1 引言

测量不确定度是与测量结果相关联的参数，用以表征合理地赋予被测量值的分散性^[1]。测量不确定度表明了

测量结果的可信赖程度，是测量结果质量的指标。不确定度越小，所述结果与被测量的真值愈接近，质量越高，反之不确定度越小。在报告测量的结果时给出相应的不确定度，一方面便于使用它的人评定其可靠性，另一方面也增

*通讯作者: 李欣南, 博士, 主要研究方向为主要研究方向为微生物检测技术研究、动物源细菌耐药性监测技术研究、养殖投入品与食品质量安全检测技术研究。E-mail: lixinnanli@163.com

*Corresponding author: LI Xin-Nan, Ph.D, Liaoning Inspection, Examination & Certification Centre, Shenyang 110016, China. E-mail: lixinnanli@163.com.

强了测量结果之间的可比性。微生物检验属于非严格性、非度量学和非统计学一类,有 4 种主要类型:常规定量测试、最大或然数(most probable number, MPN)法、定性测试和专家测试等,目前获得的各种不确定度的评定方法仅适用于微生物的常规定量测试^[2]。

近年有关微生物检验不确定度评价报道多集中在药品和食品中微生物的检验领域^[3-10],而对饲料中微生物检验的不确定度评价极少。美国 FDA(1989)认为,安全的微生物菌株共 42 种,根据我国农业部公布的结果,允许饲用的芽孢杆菌菌种有枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、纳豆芽孢杆菌(*Bacillus natto*)、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、地衣芽孢杆菌等 12 种。地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)是芽孢杆菌中较具应用潜力的菌种之一,其在动物养殖生产中的应用日益增多,因而该类产品的质量监测检验日益增加。本研究针对饲料添加剂-地衣芽孢杆菌样品,依据 JJF 1059.1-2012《测量不确定度评定与表示》、RB/T 151-2016《食品微生物定量检测的测量不确定度评估指南》和 NY/T 1461-2007《饲料微生物添加剂地衣芽孢杆菌》,分析不确定度的来源,由于饲料微生物添加剂稳定性较好、浓度较高,其活菌计数的不确定度评价参照了食品微生物定量检测的不确定度评价方法进行。通过不确定度评价可以评估测量结果的准确性,确定影响测量结果的主要因素,以期饲用微生物添加剂定量检验提供参考。

2 材料与方法

2.1 实验材料

营养琼脂(批号: 180503, 北京三药科技开发公司); 饲用微生物添加剂 地衣芽孢杆菌样品(含量为 1×10^{10} CFU/g, 辽宁省兽药饲料畜产品质量安全检测中心)。

2.2 仪器与设备

LRM-70F 生化培养箱(精度 $36 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 上海捷呈实验仪器有限公司); GR60DA 高压蒸汽灭菌锅(致微(厦门)仪器有限公司); VITEK 2 COMPACT 30 细菌鉴定仪(法国梅里埃公司); Nu-425-400S 生物安全柜(美国纽埃尔公司); MaxQ Shakers SHKE5000-1CE 振荡器(美国 Thermo Scientific 公司)。

2.3 实验方法

以无菌操作称取 25 g 样品,加入 225 mL 0.85%灭菌生理盐水,均质 1~2 min,制成 1:10(m:V)的初始悬浮液。按 10 倍稀释法制成不同浓度稀释液,选择 3 个适宜浓度,从

稀释液中分别吸取 1 mL 置于无菌培养皿中,每一稀释度做 3 次重复。将实现熔化并冷却至 $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 的营养琼脂培养基,向每个培养皿中倾倒约 12 mL,摇匀,待凝固后,倒置培养 24 h,进行菌落计数,选择菌落数落在 30~300 CFU/皿范围内的稀释度来计算和报告检测结果、平板上应无大块菌苔。由实验室同一人员,重复测定 15 次。实验结果的计算根据 NY/T 1461-2007 建立活菌计数的公式如下:

$$X(\text{CFU/g}) = A \times C \times \frac{V_1}{V} \times \frac{1}{V_2}$$

X 为地衣芽孢杆菌含量, CFU/g; A 为单次测量菌落平均数, CFU; C 为稀释倍数; V 为菌剂称量 g 数, g ; V_1 为母液菌悬液的体积, mL; V_2 为接种量, mL。实验中称样菌剂质量为 25 g, 母液菌悬液的体积为 250 mL, 接种量为 1 mL, 将数值带入得到数学模型公式如下:

$$X(\text{CFU/g}) = 10 \times N \times C$$

3 结果与分析

3.1 不确定度的来源分析

测量不确定度的来源分析是正确开展不确定评估的前提。地衣芽孢杆菌活菌计数的测量不确定度的来源主要有样品的称量与溶解、样品的次级稀释、样品的移取、培养和重复性测定,如图 1 所示,需要逐一进行评估。

3.2 地衣芽孢杆菌活菌计数不确定度分量的量化

3.2.1 样品称量过程中引入的不确定度 U_m

样品称量的不确定度 U_m 来源于天平的示值不确定度 U_{m0} 、重复性不确定度 U_{m1} 及天平偏载误差 U_{m2} 。根据 JJG 1036-2008《电子天平检定规程》,天平检定示值误差为 0.02 g, $U_{m0} = 0.02 / \sqrt{3} = 0.012 \text{ g}$; 由天平重复性引入的不确定度 U_{m1} , 根据天平检定结果,天平称量重复性 0.03 g, $U_{m1} = 0.03 / \sqrt{3} = 0.017 \text{ g}$; 由天平偏载误差引入的不确定度 U_{m2} , 根据天平资料,天平称量偏载误差 0.03 g, $U_{m2} = 0.03 / \sqrt{3} = 0.017 \text{ g}$ 。样品称量的平均重量为 25.00 g。

$$U_m = \sqrt{\frac{0.012^2 + 0.017^2 + 0.017^2}{25.00^2}} = 0.108\%$$

3.2.2 样品溶解过程中引入的不确定度 U_v

该不确定度为首步溶解 25.00 g 样品至 225 mL 生理盐水中,使用了 250 mL 量出式量筒,根据 JJG196-2006《常用玻璃量器检定规程》,250 mL 量筒允许误差为 $\pm 1.0 \text{ mL}$,假设为三角形分布, $U_{v1} = 1.0 / \sqrt{6} = 0.408 \text{ mL}$; 重复称量 10 次,标准偏差为 0.50 mL, $U_{v2} = 0.50 \text{ mL}$; 溶液温度与校正



图 1 地衣芽孢杆菌活菌计数测量不确定度来源分析

Fig.1 Sources of uncertainty in measurement of viable count of *Bacillus licheniformis*

用贝塞尔公式计算单次测量的标准偏差, 地衣芽孢杆菌含量单次测量标准偏差 $S(x)$, $n=15$ 按照贝塞尔法算出。

$$S_{(x)} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (d^2)}$$
$$S_{(x)} = 0.083 ;$$

地衣芽孢杆菌活菌计不确定度 U_r 用单次测量标准偏差算出

$$U_r = \frac{S_{(x)}}{\sqrt{n}} \div \log \bar{N} = 0.214\%。$$

3.2.6 地衣芽孢杆菌活菌计数合成不确定度 $U_{\text{合}}$

由上述各不确定度分量合成地衣芽孢杆菌活菌计数相对标准不确定度 $U_{\text{合}}$ 见表 2。

$$U_{\text{合}} = \sqrt{U_m^2 + U_v^2 + U_f^2 + U_p^2 + U_r^2} = 2.028\%$$

表 2 地衣芽孢杆菌活菌计数的不确定度分量表
Table 2 Uncertainty Scale for enumeration of *Bacillus licheniformis*

序号	各不确定度分量		
	来源	符号	相对值 $U/\%$
1	样品称量	U_m	0.108
2	溶解	U_v	0.287
3	稀释	U_f	1.875
4	移取	U_p	0.677
5	重复性测量	U_r	0.214

3.2.7 地衣芽孢杆菌活菌计数扩展不确定度 U

$U = k \times U_{\text{合}}$, 当包含因子 $k=2$ 时, $U=2$, $U = 2 \times 2.028=4.05\%$ 。

3.3 不确定度的报告

样品地衣芽孢杆菌活菌计数结果为 $\log Y = \log \bar{N} \pm U = 10.019 \pm 0.041$, $9.978 \leq Y \leq 10.060$, 取反对数 $0.95 \times 10^{10} \text{ CFU/g} \leq Y \leq 1.15 \times 10^{10} \text{ CFU/g}$ 。从而确定该样品的误差允许范围在 $0.95 \times 10^{10} \sim 1.15 \times 10^{10} \text{ CFU/g}$ 之间。

4 结论与讨论

在实际工作中, 测量结果的不确定度可能有很多来源, 而微生物检测不确定度的来源主要包括 4 个方面: 样品的质量影响(称量)、稀释、样品的稳定性、重复测试, 要抓住主要分量, 避免漏项。经验证明在微生物检测的过程中, 进入检测实验室前的取样是总误差的重要组成部分, 但它并不是测量本身不确定度的组成部分, 在微生物检测测量不确定度的评定中应不予考虑。

饲用微生物添加剂具有微生物检测的特点, 同时由于该类产品含量稳定, 且含量较高, 因此, 在不确定评估过程中

同时参考了食品微生物定量检测不确定度评估方法^[13-15]。本实验中选择的芽孢杆菌样品为浓度均一、稳定的样品, 样品稳定性与均匀性引入的不确定度忽略不计。而测量过程中的称量、稀释、移取操作、重复性测定都是引入不确定度的主要因素, 重复性测定引入的误差可以通过 A 类不确定度评价来计算, 计数结果为非正态分布, 需要进行对数转换来修正。其余因素可以通过 B 类不确定度评价来计算。分析实验结果可知各不确定度分量中稀释对于合成不确定度的贡献最大, 应注意整个稀释过程, 选用检定合格的移液器, 进行液体量取和稀释时, 保证环境温度、实验试剂温度等, 尽量接近移液器检定的温度。其次, 移取、溶解和重复性测量对不确定度的贡献也不能忽视。相比之下, 样品的称量对不确定度的贡献则较小。因此, 在类似饲用微生物添加剂的定量检测中称量所引入的不确定度分量可以忽略。

本文探讨了饲用微生物添加剂定量检验的不确定度评价方法, 当取样量为 25.0 g, $k=2$ (置信度为 95%)时, 实验样品的含量在 $0.95 \times 10^{10} \sim 1.15 \times 10^{10} \text{ CFU/g}$ 之间。建立的地衣芽孢杆菌活菌计数不确定度评定方法简单、易行, 符合实际检测要求。但是, 由于不同饲料微生物添加剂产品添加的辅料不同, 可能存在基质影响, 必须针对不同基质的样品开展不确定度的评价研究。

参考文献

[1] 张卫军, 王洪艳. 食品中菌落总数检测结果不确定度的评定[J]. 现代预防医学, 2013, 40(3): 533-535.
Zhang WJ, Wang HY. Uncertainty evaluation on test results of total number of colonies in food [J]. Mod Prev Med, 2013, 40(3): 533-535.
[2] 雷质文. 食品微生物实验室质量管理手册[M]. 北京: 中国标准出版社, 2006.
Lei ZW. Handbook of quality management of food microbiology laboratory [M]. Beijing: China Standards Publishing House, 2006.
[3] 秦文, 王丽媛, 王晶波, 等. 酸奶中乳酸菌计数不确定度的评定[J]. 中国卫生检验杂志, 2018, 28(15): 1844-1846.
Qin W, Wang LY, Wang JB, et al. Uncertainty evaluation of lactic acid bacteria count in yoghurt [J]. Chin J Health Lab, 2018, 28(15): 1844-1846.
[4] 车方萍, 赵梦芸, 陈艳. 食品(糕点)中菌落总数测量不确定度评定[J]. 现代食品, 2018, (14): 100-102.
Che FP, Zhao MY, Chen Y. Evaluation of uncertainty in measurement of total number of colonies in foods (pastry) [J]. Mod Food, 2018, (14): 100-102.
[5] 杨玲玲, 李海芳. 食品菌落总数测定盲样考核结果不确定度的评定[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(14): 3780-3783.
Yang LL, Li HF. Uncertainty evaluation of determination of aerobic plate count in food by blindness examination [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(14): 3780-3783.
[6] 岳苑, 马桂娟. 全脂乳粉中菌落总数的测量不确定度评定[J]. 食品与发酵科技, 2018, 54(3): 124-126.

- Yue Y, Ma GJ. Uncertainty measurement of total colony in whole milk powder products [J]. Food Ferment Technol, 2018, 54(3): 124–126.
- [7] 李玉玲, 宋莉莉. 食品微生物学菌落总数检验中不确定度的评定[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(7): 880–880.
- Li YL, Song LL. Evaluation of uncertainty in the total number of colonies in food microbiology [J]. Chin J Health Lab Technol, 2005, 15(7): 880–880.
- [8] 张虹仙. 能力验证菌落总数测定结果不确定度评定[J]. 中国食品, 2018, (11): 145–147.
- Zhang HX. Evaluation of uncertainty in the measurement of total colony number by capability verification [J]. China Food, 2018, (11): 145–147.
- [9] 冯秀娟, 邓军, 高俊峰. 发酵乳中乳酸菌计数不确定度的评定[J]. 现代食品, 2018, (1): 93–97.
- Feng XJ, Deng J, Gao JF. Evaluation of uncertainty in number of lactic acid bacteria in fermented milk [J]. Mod Food, 2018, (1): 93–97.
- [10] 王娟, 许春, 李兵兰, 等. 荆防颗粒微生物需氧菌总数不确定度评定[J]. 中国药师, 2018, 21(2): 363–365.
- Wang J, Xu C, Li BL, *et al.* Evaluation of uncertainty of total aerobic bacteria in Jingfang granules [J]. China Pharm, 2018, 21(2): 363–365.
- [11] 刘培海, 王玉兰, 郑家利, 等. 进口瓶装饮用水中菌落总数不确定度的评定[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, (7): 89–91.
- Li PH, Wang YL, Zheng JL, *et al.* Evaluation of uncertainty of total colony number in imported bottled drinking water [J]. Chin J Health Lab Technol, 2014, (7): 89–91.
- [12] 张勇, 王闻卿, 张勇琪, 等. 评定食品中菌落总数的不确定度[J]. 临床医药文献电子杂志, 2015, (5): 811–812.
- Zhang Y, Wang WQ, Zhang YQ, *et al.* Uncertainty in assessing the number of colonies in food [J]. J Clin Med Literat (Electr Ed), 2015, (5): 811–812.
- [13] 孟繁磊, 牛红红, 蔡红梅, 等. 分光光度法测定水中亚硝酸盐含量的不确定度评定[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(9): 174–177.
- Meng FL, Niu HH, Cai HM, *et al.* Evaluation of uncertainty in spectrophotometric determination of nitrite content in water [J]. Food Res Dev, 2016, 37(9): 174–177.
- [14] 张莹, 远辉, 丁春瑞. 超高效液相色谱法测定白酒中组甜不确定度评定[J]. 酿酒科技, 2016, (12): 99–101.
- Zhang Y, Yuan H, Ding CR. Evaluation of uncertainty in the determination of Niutan in liquor by ultra high performance liquid chromatography [J]. Liquor-Mak Sci Technol, 2016, (12): 99–101.
- [15] 王忠一, 吴帅. 高效液相色谱法测定碳酸饮料中阿力甜含量的不确定度评定[J]. 中国食品添加剂, 2016, (4): 189–194.
- Wang ZY, Wu S. Evaluation of uncertainty in the determination of Alisma in carbonated beverages by high performance liquid chromatography [J]. China Food Addit, 2016, (4): 189–194.

(责任编辑: 武英华)

作者简介

李欣南, 博士, 主要研究方向为微生物检测技术研究、动物源细菌耐药性监测技术研究、养殖投入品与食品质量安全检测技术研究。
E-mail: lixinnanli@163.com