

# 能力验证样品中霉菌和酵母检测结果的 不确定度评定

郭丽艳\*

(四川省眉山市产品质量监督检验所, 四川省眉山市东坡区泡菜技术研究所, 眉山 620010)

**摘要:** **目的** 评定能力验证样品中霉菌和酵母计数检测结果的不确定度。**方法** 根据能力验证作业指导书和 GB4789.15-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 霉菌和酵母计数》中第一法霉菌和酵母平板计数法对能力验证样品霉菌和酵母进行定量检测, 按照 JJF1059.1-2012《测量不确定度的评定与表示》对检测结果进行不确定度评定。**结果** 在 95%的置信区间下, 霉菌和酵母检测结果的扩展不确定度为 0.0238。**结论** 本研究建立的评定方法可以对能力验证的样品霉菌和酵母定量检测进行不确定度评定, 且适用于检测条件相近的实验室进行相关的不确定度的评定。

**关键词:** 能力验证; 霉菌和酵母; 不确定度评定

## Evaluation of uncertainty of mould and yeast test results in capability verification samples

GUO Li-Yan\*

(Sichuan Meishan Product Quality Supervision and Inspection Institute, Meishan Institute of Pickle Technology, Dongpo district, Meishan 620010, China)

**ABSTRACT: Objective** To evaluate the uncertainty of mould and yeast count test results in proficiency test samples. **Methods** According to the operational instructions of capability verification and GB 4789.15-2016 *National food safety standard-Food microbiology test-Mold and yeast count*, the first method mold and yeast plate count method, the mold and yeast of the capability verification sample were tested quantitatively. The uncertainty of test results was assessed in accordance with JJF 1059.1-2012 *Evaluation and expression of measurement uncertainty*. **Results** The extended uncertainty of mould and yeast test results was 0.0238 at 95% confidence interval. **Conclusion** The evaluation method established in this study can evaluate the uncertainty of the quantitative detection of mould and yeast samples with ability verification, and is suitable for the evaluation of the relevant uncertainty in laboratories with similar testing conditions.

**KEY WORDS:** proficiency testing; moulds and yeasts; uncertainty evaluation

### 1 引言

霉菌和酵母是自然界中广泛存在的, 在其生长代谢过程中, 会产生黄曲霉毒素等真菌毒素及霉菌代谢产生的

其他有毒代谢产物, 其中黄曲霉毒素在各类真菌毒素中被公认为最强致癌物, 可以致癌、致畸、致突变<sup>[1]</sup>。霉菌和酵母是食品中正常菌相的一部分, 同时在某些条件下, 霉菌和酵母的繁殖也会造成食物的腐败变质, 使食品表面失

\*通讯作者: 郭丽艳, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品、纸制品微生物检验。E-mail: CL02250414@126.com

\*Corresponding author: GUO Li-Yan, Master, Engineer, Sichuan Meishan Product Quality Supervision and Inspection Institute, Meishan Institute of Pickle Technology, Dongpo District, Meishan 620010, China. E-mail: CL02250414@126.com

去色、香、味。由于霉菌和酵母能抵抗热、抗冷冻以及抗生素和辐照等储藏及保藏技术, 主要存在于 pH 低、温度低、含糖和含盐高、含抗生素的食品中。因此, 霉菌和酵母也被作为评价食品卫生质量的指示菌, 目前对食品中霉菌和酵母污染现状的文献较少<sup>[2-4]</sup>, 主要集中在饮料和酸奶等食品, 通过对霉菌和酵母计数来判定食品的污染程度, 由于霉菌孢子容易扩散, 操作不当会使计数结果不准确, 这就对检测机构的检测能力有了更高的要求。能力比对是实验室质量控制的有效手段之一, 通过参加能力比对, 综合考察实验室的检测能力, 确保检测数据的准确可靠。同时可以识别实验室存在的问题, 并制定相关的补救措施, 对实验室的质量控制和管理起到补充、纠正和完善的作用<sup>[5]</sup>。为了评价本实验室的霉菌和酵母的定量检测能力, 特参加英国 FAPAS 实验室组织霉菌和酵母的计数能力比对。经查阅相关文献, 霉菌和酵母检测结果的不确定度评定的文献很多<sup>[6-10]</sup>, 但在实验室能力验证中的应用却很少。根据《检测和校准实验室能力的通用要求》<sup>[11]</sup>和《检测和校准实验室能力认可准则》<sup>[12]</sup>中要求对出具的检测结果的实验室进行不确定度分析。

本研究对本实验室参加能力验证的样品霉菌和酵母计数的结果进行不确定度评定, 建立能力验证中霉菌和酵母定量检测测量不确定度评定的方法, 以期对检测条件相近的实验室提供一定的参考。

## 2 材料与方法

### 2.1 材料与仪器

孟加拉红培养基(北京陆桥技术责任有限公司); 能力验证样品(英国 FAPAS 公司)。

BPMJ-250F 霉菌培养箱(上海一恒科学仪器有限公司); LDZK-75L-II 立式压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械有限公司)。

### 2.2 实验方法

#### 2.2.1 检测依据

FAPAS 食品微生物样品准备作业指导书<sup>[13]</sup>; GB 4789.15-2016《食品安全国家标准食品微生物学检验霉菌和酵母计数》<sup>[14]</sup>。

#### 2.2.2 检测过程

无菌开启西林瓶, 立即加入适量的生理盐水进行溶解, 待溶解后, 吸出转移至无菌瓶中, 反复用余下的生理盐水清洗西林瓶内壁, 共 90 mL 的清洗液(生理盐水)全部回收至上述无菌瓶中, 此溶液即是 1:10 (g/mL)的样品匀液(即  $10^{-1}$ )。将上述 1:10 的样品匀液用 1 mL 的无菌吸头吸取 1 mL, 注入盛有 9 mL 生理盐水的无菌试管后, 旋涡混合, 制成 1:100, (V:V, 即  $10^{-2}$ )的样品匀液。同法操作, 制备 10 倍递增系列稀释样品匀液至  $10^{-4}$ 。每递增稀释 1 次, 换

用 1 次 1 mL 无菌吸头。在进行 10 倍递增稀释的同时, 吸取各稀释度样品匀液 1 mL 于无菌平皿内, 每个稀释度做 2 个平行。同时分别取 1 mL 样品稀释液加入 2 个无菌平皿作空白对照; 及时将 20~25 mL 冷却至 46 °C 的孟加拉红琼脂(可放置于 46 °C±1 °C 恒温水浴箱中保温)倾注平皿, 并转动平皿使其混合均匀, 置水平台面待琼脂完全凝固后, 正置平板, 置 28 °C±1 °C 培养箱中培养, 观察并记录培养至第 5 d 的结果, 记录稀释倍数和相应的霉菌和酵母菌数量, 计算结果并报告。在同一相对恒定的实验条件下, 对此能力比对样品重复测 20 次, 然后对检测结果进行不确定度评定。

## 3 检测结果和不确定度分析

### 3.1 按霉菌和酵母菌计数报告规则

选取菌落数在 10~150 CFU 之间的稀释度进行报告, 检测结果和计算见表 1。

表 1 霉菌和酵母总数检测结果及计算  
Table 1 Determination results of moulds and yeasts

编号	检测结果 $x/(CFU/g)$	检测结果取对数 (lgx)	残差平方 $(lgx - \overline{lgx})^2$
1	8400	3.9243	0.0001926
2	7900	3.8976	0.0001631
3	9200	3.9638	0.0028503
4	8600	3.9345	0.0005807
5	7250	3.8603	0.0025062
6	7550	3.8779	0.0010532
7	8100	3.9085	0.0000037
8	7000	3.8451	0.0042643
9	6700	3.8261	0.0071107
10	7850	3.8949	0.0002412
11	8000	3.9031	0.0000534
12	8350	3.9217	0.0001274
13	9650	3.9845	0.0054949
14	9050	3.9566	0.0021389
15	8400	3.9243	0.0001926
16	7900	3.8976	0.0001631
17	8800	3.9445	0.0011616
18	8500	3.9294	0.0003617
19	7350	3.8663	0.0019459
20	8850	3.9469	0.0013354
	$\overline{lgx}$	3.9104	$\Sigma=0.0319412$

### 3.2 建立数学模型

霉菌和酵母菌总数的计算公式:

$$X = \frac{\sum c}{2d}$$

X: 样品中霉菌和酵母菌总数, CFU/g;

C: 平板霉菌和酵母菌的菌落数之和;

d: 稀释因子;

### 3.3 不确定度来源及分析

本试验测定的不确定度来源主要有: 重复性检测引起的不确定度  $u_{Arel}$ (重复); 样液制备引起的不确定度  $u_{Brel}$ (制备); 递增稀释引起的不确定度  $u_{Brel}$ (稀释); 加样体积引起的不确定度  $u_{Brel}$ (加样)。

### 3.4 不确定度分量的评定

#### 3.4.1 样液的制备引起的不确定度 $u_B$ (制备)

该不确定度来源于用 100 mL 量筒量取 90 mL 稀释液加入到 10 g 面粉中。根据 JJG 196-2006《常用玻璃量器检定规程》<sup>[15]</sup>, 100 mL 量筒的允许误差为  $\pm 1.0$  mL, 属于 B 类评定, 按均匀分布<sup>[16]</sup>, 标准不确定度为:

$$u_B(\text{制备}) = 1.0 / \sqrt{3} = 0.57737,$$

相对标准不确定度为:

$$u_{Brel}(\text{制备}) = u_B(\text{制备}) / 90 = 0.006415.$$

#### 3.4.2 递增稀释引起的不确定度 $u_B$ (稀释)

该不确定度来源于用 1 mL 无菌吸头吸取不同稀释级溶液 1 mL 至 9 mL 灭菌生理盐水的稀释过程。所使用的量器分别是 1 mL 无菌吸头(移液器)和 10 mL 的分度吸管, 根据 JJG 646-2006《移液器检定规程》<sup>[17]</sup>的规定, 1 mL 移液器的容量允许误差为  $\pm 0.01$  mL。根据 JJG 196-2006《常用玻璃量器检定规程》, 10 mL 分度吸管的允许误差为  $\pm 0.05$  mL, 属于 B 类评定, 按均匀分布, 本实验取第 2 个稀释度( $10^{-2}$ )的平板进行霉菌和酵母菌检测结果的报告。即稀释过程进行了 2 次, 所以稀释倍数的标准不确定度为:

$$u_B(\text{稀释}) = \sqrt{2 \times \left( \left( \frac{0.01}{\sqrt{3}} \right)^2 + \left( \frac{0.05}{\sqrt{3}} \right)^2 \right)} = 0.041634,$$

相对标准不确定度为  $u_{Brel}(\text{稀释}) = 1 / (9+1) \times u_B(\text{稀释}) = 0.0041634$ 。

#### 3.4.3 加样体积引起的不确定度 $u_B$ (加样)

本次检测结果以稀释因子为  $10^{-2}$  的平板上的霉菌和酵母菌总数进行计数和报告, 每次检测各平板上接种的稀释液的体积均为 1 mL, 做 2 个平行, 1 mL 无菌吸头(移液器)使用 2 次, 属于 B 类评定, 按均匀分布, 加样体积引起的不确定度为:

$$u_B(\text{加样}) = \sqrt{\left( \frac{0.01}{\sqrt{3}} \right)^2 + \left( \frac{0.01}{\sqrt{3}} \right)^2} = 0.008165,$$

相对标准不确定度为:

$$u_{Brel}(\text{加样}) = \sqrt{\left( \frac{0.01}{1 \times \sqrt{3}} \right)^2 + \left( \frac{0.01}{1 \times \sqrt{3}} \right)^2} = 0.008165.$$

#### 3.4.4 重复性检测引起的不确定度 $u_A$ (重复)

重复性检测引起的不确定度, 主要是检测过程中各种因素作用下随机性所得各次霉菌和酵母数值不同引起的。从表 1 可以看出, 检测结果数值的发散性较大, 所以采用统计学方法, 以霉菌和酵母数值的对数值求不确定度。按 A 类评定, 根据贝塞尔公式计算检测结果对数值的样本标准偏差:

$$s(\lg x_k) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\lg x_i - \overline{\lg x})^2}{n-1}} = 0.040997;$$

$$\text{标准不确定度: } u_A(\text{重复}) = \frac{s(\lg x_k)}{\sqrt{n}} = 0.009167;$$

$$\text{相对标准不确定度: } u_{Arel}(\text{重复}) = \frac{u_A(\text{重复})}{\lg x} = 0.002344.$$

#### 3.4.5 合成相对标准不确定度及扩展不确定度

合成相对标准不确定度为:

$$u_{Crel} = \sqrt{u_{Brel}(\text{定容})^2 + u_{Brel}(\text{稀释})^2 + u_{Brel}(\text{加样})^2 + u_{Brel}(\text{重复})^2} = 0.01143;$$

实验结果一般用扩展不确定度来表示,  $U = k u_{Crel}$ , 取置信水平为 95%, 自由度=20, 查  $t$  分布表得  $t_{95}(20) = 2.086$ 。

故:  $U = 2.086 \times 0.01143 = 0.0238$ 。由于  $\lg x$  与  $x$  之间呈非线性关系, 不能直接求扩展不确定度  $U$  的反对数。因此应首先确定  $\lg x$  的取值范围:  $\overline{\lg x} = 3.9104 \pm 0.0238$ , 即  $3.8866 \leq \overline{\lg x} \leq 3.9342$ 。再取反对数后, 得检测结果  $x$  的分布区间为:  $7702 \leq x \leq 8594$ 。

#### 3.4.6 结果报告

由于检测结果的发散性较大, 故本实验室能力验证样品的霉菌和酵母总数的估计值为 7700~8600 CFU/g, 包含因子  $k=2.086$ 。

## 4 结论与讨论

本实验室参加的能力验证是英国 FAPAS 分析实验室能力验证组织实施的, 计划编号为 M228e15, 名称为 Enumeration of Yeasts and Moulds[SUM](equivalent to 10 g of flour), 参加本次能力验证的实验室共 68 家, 其中 62 家结果满意, 本实验室收到的能力验证结果通知的  $Z$  值为 0.1, 结果为满意<sup>[18]</sup>。

本次实验对样品制备、递增稀释、加样体积和重复检测引起的不确定度进行评估, 从不确定度计算的结果来看, 4 种因素对测量结果均有影响。但加样体积引入的不确定度贡献最大。因此, 在以后检测过程中要从多方面加强质量控制, 最大限度减小不确定度引入的分量值,

确保检测结果的准确性。

对于微生物不确定度评定, 很多文献都提到了微生物发散性问题。刘培海等<sup>[19]</sup>认为这是因为微生物在样品中分布不均匀, 造成结果间有差异。夏宏丽<sup>[20]</sup>使用标准物质作为测试样品, 可保证样品的均匀性和稳定性, 认为发散性较大是由于平板的菌落计数。王海华<sup>[21]</sup>认为不同的微生物在一起培养过程中有互生、拮抗等相互作用。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, 赵玲等对同一个样品重复测定 20 次, 结果分散性较大。本研究认为微生物除了有在样品中分布不均匀的共性外, 不同的微生物还具有自身的特性, 应根据不同微生物的特性来分析检测方法中对影响检测结果的关键环节。一些无法用公式计算出来的因素也不可忽略不计, 可能对检测结果的不确定度有着重要贡献。如霉菌和酵母检测过程就存在其特殊性, 霉菌和酵母的限定值一般较低, 结果稍有偏差就可能超出限定值。同时, 在食品类样品霉菌和酵母的检出率和检出值都较低, 对于霉菌和酵母菌计数的不确定度带来了一定难度, 所以本研究以能力比对样品为测试样品, 可以解决这个问题。霉菌在培养过程中存在因反复观察而上下翻转平板而导致霉菌孢子扩散, 形成次生小菌落, 影响计数结果。在 CNAS-CL01-A001《检测和校准实验室能力认可准则在微生物领域的应用说明》中对实验室提出要有防止孢子扩散的措施, 这是影响检测结果的一个重要因素, 所以, 在新的标准 GB4789.15-2016 中, 将培养方式改为正置培养。另外, 在均质时, 不能用旋转刀片式均质器, 可能会切断霉菌菌丝<sup>[22]</sup>, 导致检测结果偏高; 同时, 耐药细菌的存在同样会使检测结果偏高。所以, 在霉菌和酵母检测过程中, 孢子扩散、均质方式和耐药细菌的存在同样是影响检测结果测量不确定度的重要因素。

## 参考文献

- [1] 蒋红. 饮食与肿瘤[J]. 实用医技杂志, 2007, 14(7): 885-886.  
Jiang H. Diet and cancer [J]. J Pract Med Tech, 2007, 14(7): 885-886.
- [2] 李凤琴, 李玉伟. 酸奶中霉菌和酵母菌污染水平及菌相分布检测研究[J]. 卫生研究, 1998, 27(4): 257-258.  
Li FQ, Li YW. Study on the contamination level and the tolerable limit of mould and yeast in yoghurt [J]. J Hyg Res, 1998, 27(4): 257-258.
- [3] 王翎, 刘奎, 韩承平, 等. 草莓酸奶霉菌酵母污染现状及工艺分析[J]. 食品科学, 1995, 16(7): 8-13.  
Wang L, Liu K, Han CP, et al. The analysis of the dyeing and processing of the mother of the milk *Bacillus* [J]. Food Sci, 1995, 16(7): 8-13.
- [4] 李玉伟, 李东华, 罗雪云. 饮料中霉菌和酵母的污染状况调查[J]. 中国食品卫生杂志, 1998, (5): 19-20.  
Li YW, Li DH, Luo XY. Investigation on the contamination of mould and yeast in beverage [J]. Chin J Food Hyg, 1998, (5): 19-20.
- [5] CNAS-CL 01-A001: 2018 检测和校准实验室能力认可准则在微生物领域的应用说明[S].  
CNAS-CL 01-A001: 2018 Accreditation criteria for testing and calibration laboratory capacity in the field of microbiology [S].
- [6] 许如苏, 马少玲, 陈冠武. 奶制品霉菌和酵母计数检验结果不确定度的评定[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(7): 1247-1248.  
Xu RY, Ma SL, Chen GW. Quantifying uncertainty in enumeration of molds and yeasts in milk and milk products [J]. Chin J Health Lab Technol, 2007, 17(7): 1247-1248.
- [7] 卢安根, 莫建光, 杜寒春. 不确定度评定在饲料卫生学霉菌检验中的应用[J]. 饲料工业, 2007, 28(7): 40-41.  
Lu AG, Mo JG, Du HC. The application of uncertainty assessment in the inspection of the mould of feed hygiene [J]. Feed Ind, 2007, 28(7): 40-41.
- [8] 罗丽疆, 苏伟, 刘佳丽. 进口小麦麸皮霉菌总数不确定度的评定[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(27): 11113, 11161.  
Luo LJ, Su W, Liu JL. Uncertainty evaluation of detection of mold counting in import wheat bran [J]. 2013, 41(27): 11113, 11161.
- [9] 杨丹妮. 食品中霉菌检验不确定度评定[J]. 食品安全导刊, 2017, 3(6): 109.  
Yang DN. The evaluation of the uncertainty of mould inspection in food [J]. China Food Saf Magaz, 2017, 3(6): 109.
- [10] 赵玲, 王邱, 王冰, 等. 饮料中霉菌和酵母计数检验结果的不确定度评估[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(12): 4749-4752.  
Zhao L, Wang Q, Wang B, et al. Uncertainty evaluation of the enumeration of molds and yeasts in beverages [J]. J Food Saf Qual, 2016, 7(12): 4749-4752.
- [11] 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 laboratory capacity for testing and calibration [S].
- [12] CNAS-CL01-2018 检测和校准实验室能力认可准则[S].  
CNAS-CL 01-2018 Accreditation criteria for testing and calibration laboratory capacity [S].
- [13] Fapas 食品微生物样品准备作业指导书[S].  
Fapas-Food microbiology instructions for the preparation of samples [S].
- [14] GB 4789.15-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 霉菌和酵母计数[S].  
GB 4789.15-2016 National food safety standard-Food microbiology test-Enumeration of moulds and yeasts [S].
- [15] JJG 196-2006 常用玻璃量器检定规程[S].  
JJG 196-2006 Verification regulations for common glass gauges [S].
- [16] JJF 1059.1-2012 测量不确定度的评定与表示[S].  
JJF 1059.1-2012 Evaluation and expression of measurement uncertainty [S].
- [17] JJG 646-2006 移液器检定规程[S].  
JJG 646-2006 Verification regulation of locomotive pipette [S].
- [18] Fapas-food microbiology proficiency test report 228 [Z].
- [19] 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, 24(7): 992-994.  
Liu PH, Wang YL, Zheng JL, et al. Uncertainty evaluation of aerobic plate count in imported bottled water [J]. Chin J Health Lab Technol, 2014, 24(7): 992-994.
- [20] 夏宏丽. 使用标准物质评定食品菌落总数的不确定度[J]. 中国卫生检验杂志, 2012, 22(6): 1450-1451.  
Xia HL. Assessing the uncertainty of aerobic plate count in food using standard substances [J]. Chin J Health Lab Technol, 2012, 22(6): 1450-1451.
- [21] 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): 2352-2355.

Wang HH, Lan Q. Uncertainty evaluation of aerobic plate count by proficiency testing [J]. J Food Saf Qual, 2015, 6(6): 2352-2355.

- [22] 马群飞. GB4789. 15-2016《食品安全国家标准食品微生物学检验 霉菌和酵母计数》标准解读[J]. 中国卫生标准管理, 2018, 9(5): 1-3.

Ma QF. Interpretation for GB 4789. 15-2016 National food safety standard-Food microbiological examination-Enumeration of moulds and yeasts [J]. China Health Stand Manag, 2018, 9(5): 1-3.

(责任编辑: 韩晓红)

## 作者简介



郭丽艳, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品、纸制品微生物检验。

E-mail: CL02250414@126.com