

# 平板计数法测定传统发酵樱菜中乳酸菌检验结果不确定度的评定

刘笑笑, 李胜男, 樊慧梅, 魏春雁\*

(吉林省农业科学院农业质量标准与检测技术研究所/农业农村部农产品质量安全风险评估实验室(长春), 长春 130033)

**摘要:**依据 SN/T 4091-2015《食品微生物学测量不确定度评估指南》和 JJF 1059.1-2012《测量不确定度评定与表示》, 分析影响样品中乳酸菌平板计数检验结果的不确定度来源, 计算合成不确定度和扩展不确定度。结果表明, 不确定度来源的主要因素所占分量由大到小排序为: 重复性检测>样品稀释>加样>样品制备>环境温度。检验结果的扩展不确定度为  $6.2 \times 10^7$  CFU/g, 取值区间为  $6.0 \times 10^8 \sim 7.3 \times 10^8$  CFU/g, 包含因子  $k=2$ 。此方法适用于类似条件下乳酸菌计数不确定度的评定。

**关键词:**发酵樱菜; 乳酸菌; 平板计数法; 不确定度

中图分类号: R155.5

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2021)03-0126-04

## Uncertainty Evaluation of Lactobacillus in Traditional Fermented *Lepidium Sativum*

LIU Xiaoxiao, LI Shengnan, FAN Huimei, WEI Chunyan\*

(Institute of Agricultural Quality Standards and Testing Technology, Jilin Academy of Agricultural Sciences / Risk Assessment Lab of Agri-products Quality and Safety (Changchun), Agriculture Ministry of P.R.C., Changchun 130033, China)

**Abstract:** According to SN/T 4091-2015 "Guidelines for the Evaluation of Uncertainty in Food Microbiology Measurement" and JJF 1059.1-2012 "Evaluation and Expression of Determination Uncertainty", the sources of uncertainty affecting the determination results of lactobacillus tablets in the traditional fermented primrose were analyzed, and the uncertainty of synthesis and expansion were calculated. The results show that during the inspection process, the components of the various factors of the uncertain source are ranked from large to small: repeatability test > sample dilution > sample addition > sample preparation > environment. The extended uncertainty of the lactic acid bacteria test results is  $6.2 \times 10^7$  CFU/g, and the lactic acid bacteria plate count test results range from  $6.0 \times 10^8$  to  $7.3 \times 10^8$  CFU/g, including the factor  $k = 2$ . This method is suitable for evaluating the uncertainty of lactic acid bacteria count under similar conditions.

**Key words:** Fermented *Lepidium sativum*; Lactobacillus; Tablet counting method; Uncertainty evaluation

乳酸菌是一种益生菌, 在维持人体微生态平衡作用与机体健康过程中起到尤为关键的作用<sup>[1]</sup>。食用含活性乳酸菌的制品可预防心脑血管疾病<sup>[2-4]</sup>。

不确定度评定是一种统计手段, 是表示被测量值的分散性与测量结果相关性的参数<sup>[5-6]</sup>。目

前不确定度评定在标准物质研究、化学计量等行业中应用广泛, 但用于微生物检验中不多<sup>[7]</sup>。为了提升食品中乳酸菌检验结果的可信度、可比性以及可接受性, 本文依据 SN/T 4091-2015《食品微生物学测量不确定度评估指南》和 JJF 1059.1-2012《测量不确定度评定与表示》, 将测量不确定度的评定引入平板计数法测定传统发酵樱菜中乳酸菌检验工作中。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 试验材料

收稿日期: 2019-03-15

基金项目: 吉林省农业科技创新工程项目(CXGC2018ZY004、CXGC2017ZY038、CXGC2017TD011)

作者简介: 刘笑笑(1984-), 女, 助理研究员, 硕士, 主要从事农产品质量安全研究。

通讯作者: 魏春雁, 女, 博士, 研究员, E-mail: wchy@yeah.net

櫻菜,购自吉林省延边朝鲜族自治州延吉市农贸市场。

## 1.2 仪器与试剂

仪器:高压灭菌器,西班牙 SELECTA;无菌操作台,苏州安泰空气技术有限公司;恒温培养箱,太仓市科教器材厂;密封培养罐和厌氧产气袋,日本三菱;电子天平( $\pm 0.01$  g),瑞士梅特勒-托利多公司。

试剂:肠膜明串珠菌菌株 CCTCC M2018129,中国典型培养物保藏中心;MRS 固体培养基,青岛拓普生物工程有限公司。

## 1.3 试验方法

将櫻菜在阴凉处进行晾晒,用8%的盐水进行初腌,再按朝鲜族传统腌制方法(辣椒粉、姜粉、蒜粉、盐、苹果梨)进行拌料、装瓶,加入5%肠膜明串珠菌菌株 CCTCC M2018129 菌悬液,4℃条件下进行发酵,第10天取样,依据 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》<sup>[8]</sup>测定其乳酸菌含量。

## 1.4 不确定度的主要来源

检验结果不确定度的主要来源见图1。

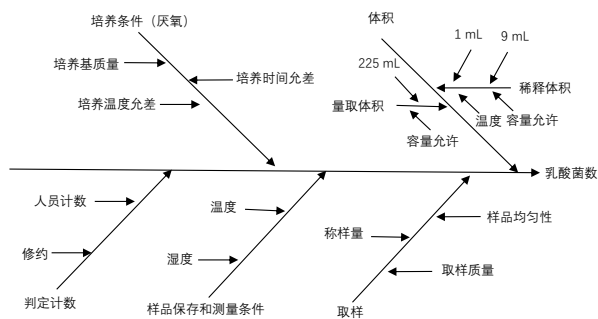


图1 乳酸菌检验结果不确定度来源

# 2 各不确定度分量的评定

## 2.1 样品制备引入的不确定度评定

样品制备过程中主要由两个因素引起不确定度。一是用电子天平称取25.0 g样品引入的不确定度;二是用量筒量取225 mL生理盐水引入的不确定度。根据电子天平检定证书的最大允许误差为 $\pm 0.1$  g,按矩形分布计算;根据《常用玻璃量器检定规程》<sup>[9]</sup>250 mL量筒允许误差为 $\pm 2$  mL,按三角形分布计算。电子天平和量筒引入的相对标准不确定度 $U_{rel}(m_{\text{样}})$ 和 $U_{rel}(v_{\text{样}})$ 分别为:

$$U_{rel}(m_{\text{样}}) = \frac{0.1 \text{ g}}{\sqrt{3} m_{\text{样}}} = \frac{0.1 \text{ g}}{\sqrt{3} \times 25.0 \text{ g}} = 0.002 31$$

$$U_{rel}(v_{\text{样}}) = \frac{2 \text{ mL}}{\sqrt{6} v_{\text{样}}} = \frac{2 \text{ mL}}{\sqrt{6} \times 225 \text{ mL}} = 0.003 63$$

样品制备过程产生的相对标准不确定度 $U_{rel}$ (样品制备)为:

$$U_{rel}(\text{样品制备}) = \sqrt{U_{rel}^2(m_{\text{样}}) + U_{rel}^2(v_{\text{样}})} \\ = \sqrt{0.002 31^2 + 0.003 63^2} = 0.004 30$$

## 2.2 样品稀释引入的不确定度评定

样品稀释过程不确定度来源主要是1 mL移液器和10 mL刻度吸管。JJG 646-2006移液器检定规程<sup>[10]</sup>规定1000  $\mu\text{L}$ 移液器吸取1 mL时允许误差为 $\pm 1.0\%$ ,JJG 196-2006<sup>[9]</sup>规定,10 mL刻度吸管允许误差为 $\pm 0.05$  mL。按矩形分布计算不确定度。因此,1 mL移液器和10 mL刻度吸管引入的相对不确定度 $U_{rel}$ (1 mL移液器)和 $U_{rel}$ (10 mL刻度吸管)分别为:

$$U_{rel}(1 \text{ mL移液器}) = \frac{1.0 \text{ mL}}{\sqrt{3} v} = \frac{1.0 \text{ mL}}{\sqrt{3} \times 1 \text{ mL}} = 0.005 77$$

$$U_{rel}(10 \text{ mL刻度吸管}) = \frac{0.05 \text{ mL}}{\sqrt{3} v} = \frac{0.05 \text{ mL}}{\sqrt{3} \times 9 \text{ mL}} = 0.003 21$$

样品稀释过程中产生的相对标准不确定度 $U_{rel}$ (样品稀释)为:

$$U_{rel}(\text{样品稀释}) = \sqrt{\frac{9^2}{(1+9)^2} (U_{rel}^2(1 \text{ mL}) + U_{rel}^2(10 \text{ mL}))} \\ = \sqrt{\frac{9^2}{(1+9)^2} + (0.005 77^2 + 0.003 21^2)} \\ = 0.005 94$$

## 2.3 加样引入的不确定度评定

用100~1 000  $\mu\text{L}$ 移液器向培养基中接种样品稀释液的体积是1 mL,《移液器检定规程》<sup>[10]</sup>规定1 000  $\mu\text{L}$ 移液器吸取1 mL时允许误差为 $\pm 1.0\%$ ,均属于B类评定,按矩形分布计算不确定度。1 mL移液器引入的相对标准不确定度为:

$$U_{rel}(\text{加样}) = U_{rel}(1 \text{ mL移液器}) \\ = \frac{1.0 \text{ mL}}{\sqrt{3} v} = \frac{1.0 \text{ mL}}{\sqrt{3} \times 1 \text{ mL}} = 0.005 77$$

## 2.4 环境引入的不确定度评定

实验过程中环境控制室通过空调设置室温为(20 $\pm$ 5)℃,水的膨胀系数为 $2.1 \times 10^{-4} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$ <sup>[5]</sup>,均属于B类评定,按矩形分布计算。环境引入的相对标准不确定度 $U_{rel}$ (环境温度)为:

$$U_{rel}(\text{环境温度}) = \frac{5 \times 2.1 \times 10^{-4}}{\sqrt{3}} = 0.000 61$$

## 2.5 重复性检测引入的不确定度评定

本实验是同一检验员测定,同一样品重复测定10次,结果见表1。

由表1计算可得 $U_{rel}$ (重复性检测)为:

表 1 乳酸菌计数结果

| 编号  | 检验结果(CFU/g)       | $\lg x_i$ | $\lg x_i - \lg \bar{x}$ | $(\lg x_i - \lg \bar{x})^2$ |
|-----|-------------------|-----------|-------------------------|-----------------------------|
| 1   | $5.9 \times 10^8$ | 8.770 852 | -0.031 827              | 0.001 012 96                |
| 2   | $7.0 \times 10^8$ | 8.845 098 | 0.042 419               | 0.001 799 37                |
| 3   | $9.0 \times 10^8$ | 8.954 243 | 0.151 564               | 0.022 971 50                |
| 4   | $6.0 \times 10^8$ | 8.778 151 | -0.024 528              | 0.000 601 61                |
| 5   | $1.0 \times 10^9$ | 9.000 000 | 0.197 321               | 0.038 935 58                |
| 6   | $5.9 \times 10^8$ | 8.770 852 | -0.031 827              | 0.001 012 96                |
| 7   | $4.3 \times 10^8$ | 8.633 468 | -0.169 211              | 0.028 632 21                |
| 8   | $9.7 \times 10^8$ | 8.986 772 | 0.184 093               | 0.033 890 13                |
| 9   | $5.1 \times 10^8$ | 8.707 570 | -0.095 109              | 0.009 045 69                |
| 10  | $3.8 \times 10^8$ | 8.579 784 | -0.222 895              | 0.049 682 36                |
| 平均值 | $6.7 \times 10^8$ | 8.802 679 | 求和                      | 0.187 584 37                |

$$U_{rel}(\text{重复性检测}) = \sqrt{\frac{0.187\ 584\ 37}{10(10 - 1)}} = 0.045\ 65$$

3 传统发酵樱菜中乳酸菌计数的合成不确定度和扩展不确定度

根据各相对不确定度合成乳酸菌计数的相对不确定度  $U_{rel}(\text{总})$  为:

$$U_{rel}(\text{总}) = \sqrt{U_{rel}^2(\text{样品制备}) + U_{rel}^2(\text{样品稀释}) + U_{rel}^2(\text{加样}) + U_{rel}^2(\text{环境温度}) + U_{rel}^2(\text{重复性检测})} = \sqrt{0.004\ 30^2 + 0.005\ 94^2 + 0.005\ 77^2 + 0.000\ 61^2 + 0.045\ 65^2} = 0.046\ 6$$

取置信水平为 95%, 包含因子  $k=2$ , 扩展不确定度  $U_{95rel}$  为:

$$U_{95rel} = k \times U_{rel}(\text{总}) = 2 \times 0.046\ 6 = 0.093\ 2$$

样品中乳酸菌计数检验平均值为  $6.7 \times 10^8$  CFU/g, 其扩展不确定度  $U$  为:

$$U = 6.7 \times 10^8 \times 0.093\ 2 = 6.2 \times 10^7(\text{CFU/g})$$

4 各不确定度分量影响比较

各不确定度分量的比较如图 2 所示。平板计数法测定传统发酵樱菜中乳酸菌含量过程中引入

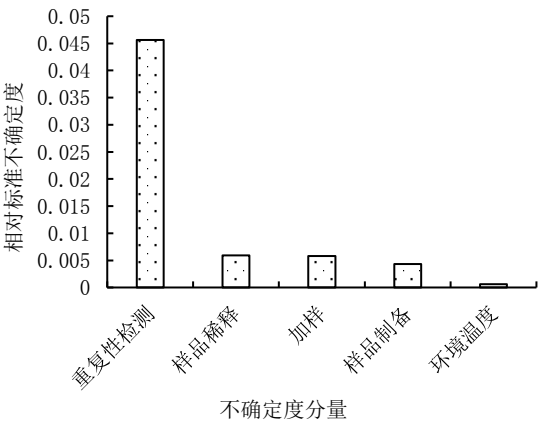


图 2 各不确定度分量影响比较

不确定度的各分量因素所占比例顺序为:重复性检测>样品稀释>加样>样品制备>环境温度。

重复性检验引入的不确定度较高,是导致扩散不确定度高的直接原因。表明在检验的过程中增加测定重复性可提高检测数据的准确性。环境温度引入的不确定度很低,可以忽略不计。

5 结果与讨论

食品检验结果直接关系到国家和企业的利益,检验结果不确定度评定是对测量结果质量的定量表征<sup>[1]</sup>。因此,检验检测中测量不确定度至关重要。影响食品微生物不确定度因素很多,如培养基、试剂、取样、稀释、人员、设备、环境和时间等。本实验中采用同一时间、同一人、同一培养基和试剂,因此忽略了人员、培养基和试剂带来的不确定度。主要考虑了样品制备、样品稀释、加样、环境和重复性检测引入的不确定度,其所占分量由大到小排序为:重复性检测>样品稀释>加样>样品制备>环境温度。

依据 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》,检验结果平均值为  $6.7 \times 10^8$  CFU/g, 检验结果扩展不确定度为  $6.2 \times 10^7$  CFU/g, 取值区间为  $6.0 \times 10^8 \sim 7.3 \times 10^8$  CFU/g, 包含因子  $k=2$ 。通过不确定度评定,可以保证检验结果的可信性。

参考文献:

[ 1 ] Zhao L, Shen J. Whole- body systems approaches for gut microbiota targeted, preventive health car [J].Journal of Biotechnology, 2010, 149(3): 183-190.  
[ 2 ] Liong M T, Shah N P. Effects of a Lactobacillus casei Synbiotic son Serum Lipoprotein, Intestinal Microflora and Organic Acids in Rats [J].Journal Dairy of Science, 2006, 89(5):1390-1399.

- [ 3 ] Jeun J, Kim S, Cho S Y, et al. Hypcholesterolemic effects of Lactobacillus plantarum KCTC3928 by increased bile acid excretion in C57BL/6 mice [J]. Nutrition, 2009, 26(3):321-330.
- [ 4 ] Wand Y, Xu N, Xi A, et al. Effects of Lactobacillus plantarum MA2 Isolated from Tibet Kefir on Lipid Metabolism and Intestinal Microflora of Rats Fed on High-Cholesterol Diet [J]. Applied Microbiology Biotechnology, 2009, 84(2):341-347.
- [ 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.
- [ 6 ] 国家质量技术监督局. JJF1059-1999 测量不确定度评定与表示[S].
- [ 7 ] 张贵刚, 黄博珠. 粪大肠菌群多管发酵法不确定度的评定[J]. 资源节约与环保, 2018(8): 37, 48.
- [ 8 ] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. GB 4789.35-2016 食品微生物学检验乳酸菌检验[S].
- [ 9 ] 全国流量容量计量技术委员会. JJG 196-2006 中华人民共和国国家计量检定规程常用玻璃量器[S].
- [ 10 ] 全国流量容量计量技术委员会. JJG 196-2006 中华人民共和国国家计量检定规程移液器[S].
- [ 11 ] 王叔淳. 食品分析质量保证与实验室认可[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 188-192.
- (责任编辑: 刘洪霞)

- 贫开发探析[J]. 山地学报, 2006, 24(2): 228-233.
- [ 12 ] 李先琨, 何成新, 唐建生, 等. 广西岩溶山地生态系统特征与恢复重建[J]. 广西科学, 2008, 15(1): 80-86.
- [ 13 ] 杨霖, 杨程, 朱同彬, 等. 岩溶区原始土壤微量元素含量与有效特征[J]. 中国岩溶, 2018, 37(1): 59-66.
- [ 14 ] 杨慧, 李青芳, 涂春艳, 等. 桂林毛村岩溶区典型植物叶片碳、氮、磷化学计量特征[J]. 广西植物, 2015(4): 493-499.
- [ 15 ] 曾四满, 刘满强, 陈小云, 等. 岩溶区和碎屑岩区林地和农田土壤氮矿化过程对比研究[J]. 中国岩溶, 2016, 35(3): 269-273.
- [ 16 ] 李安定, 卢永飞, 韦小丽, 等. 花江喀斯特峡谷地区不同小生境土壤水分的动态研究[J]. 中国岩溶, 2008, 27(1): 56-62.
- [ 17 ] 韩昭庆, 冉有华, 刘俊秀, 等. 1930s-2000年广西地区石漠化分布的变迁[J]. 地理学报, 2016, 71(3): 390-399.
- [ 18 ] 熊康宁. 喀斯特石漠化的遥感: GIS 典型研究[M]. 北京: 地质出版社, 2002: 25-28.
- [ 19 ] 乔胜英. 土壤理化性质实验指导书[M]. 武汉: 中国地质大学出版社有限责任公司, 2012: 135-137.
- [ 20 ] 黄晓娜, 李新举, 刘宁, 等. 煤矿塌陷区不同复垦年限土壤颗粒组成分形特征[J]. 煤炭学报, 2014, 39(6): 1140-1146.
- [ 21 ] 贾恩吉, 何文安, 赵立华, 等. 作物根茬对土壤物理性状的影响[J]. 吉林农业科学, 1996(3): 55-57.
- [ 22 ] 景宜然, 邓湘雯, 邓东华, 等. 湘西南不同石漠化程度土壤理化性质及相关性分析[J]. 水土保持学报, 2016, 30(1): 189-195.
- [ 23 ] 盛茂银, 熊康宁, 崔高仰, 等. 贵州喀斯特石漠化地区植物多样性与土壤理化性质[J]. 生态学报, 2015, 35(2): 434-448.
- [ 24 ] 梁利宝, 许剑敏, 张小红. 菌肥与有机无机肥配施对北方石灰性土壤物理性质的影响[J]. 灌溉排水学报, 2014, 33(6): 105-108.
- [ 25 ] 颜萍, 熊康宁, 王恒松, 等. 喀斯特地区不同等级石漠化对土壤性质的响应[J]. 南方农业学报, 2016, 47(4): 557-563.
- [ 26 ] 王思砚, 苏维词, 范新瑞, 等. 喀斯特石漠化地区土壤含水量变化影响因素分析—以贵州省普定县为例[J]. 水土保持研究, 2010, 17(3): 171-175, 180.
- [ 27 ] 孙云云, 高玉山, 才源, 等. 长春市蔬菜保护地土壤养分特征及评价[J]. 东北农业科学, 2016, 41(1): 54-58.
- [ 28 ] 吕海艳, 李楠. 长期定位施肥对黑土耕层土壤养分状况的影响[J]. 吉林农业科学, 2006, 31(5): 33-36.
- [ 29 ] 王金才, 赵环云, 王晶. 吉林省东部地区土壤钾素分布及施钾效果研究初探[J]. 吉林农业科学, 1997, 22(1): 72-76.
- [ 30 ] 刘效东, 乔玉娜, 周国逸. 土壤有机质对土壤水分保持及其有效性的控制作用[J]. 植物生态学报, 2011, 35(12): 1209-1218.
- [ 31 ] 王巍巍, 魏春雁, 张之鑫, 等. 不同种稻年限盐碱地水田表层土壤酶活性变化及其与土壤养分关系[J]. 东北农业科学, 2016, 41(4): 43-48.
- (责任编辑: 王昱)