

加权平均法表述菌落总数测定的数学模型与 测量不确定度的评定

易大为^{1*}, 高敬红², 邹宇¹

(1. 辽宁省药品检验检测院, 沈阳 110023; 2. 沈阳志鹰药业有限公司, 沈阳 110015)

摘要: **目的** 建立食品菌落总数测定的通用数学模型和测量不确定度的评定方法。**方法** 按照加权平均的算法对菌落总数计算公式进行推导, 建立了菌落总数计数方法的通用数学模型。以某橙汁饮料菌落总数的测定过程为例, 从三个方面分析并量化了各不确定度的分量, 分别为: 不同稀释度平板上菌落数的分布(以同一稀释度上两个平板计数结果的相对相差表示), 样品移取和稀释过程(以各量具的容量允差及稀释过程对稀释倍数贡献的相对不确定度表示), 数字修约(以修约间隔引入的粗大误差表示)。按照均方根法则, 将各计数平板的测量不确定度进行加和, 即为总测量不确定度。**结果** 本例中该橙汁饮料菌落总数的扩展不确定度 $U=0.2 \times 10^4$ CFU/mL, $k=2$ 。**结论** 建立了简便准确的食物菌落数测量不确定度的评定方法。

关键词: 不确定度; 菌落总数; 加权平均

Establishment of mathematical model and evaluation of measurement uncertainty for Aerobic Plate Count by weighted average

YI Da-Wei^{1*}, Gao Jing-Hong², Zou Yu¹

(1. Liaoning Institute for Drug Control, Shenyang 110023, China; 2. Shenyang Zhiying Pharmaceutical Co., Ltd, Shenyang 110015, China)

ABSTRACT: Objective To establish the general mathematical model and the procedure of measurement uncertainty for the determination of the Aerobic Plate Count (APC) on food. **Methods** According to the weighted average method, the formula of the APC was derived, and a general mathematical model was established. To take the measurement process of an orange juice drink APC as an example, three uncertainty components were evaluated and expressed, including the distribution of colony forming units (CFUs) on selected plates at different dilutions (equal to the relative difference of CFUs at the same dilution plates), the sampling and diluting process (equal to the relative uncertainty of dilution factor from capacity allowable errors and dilution process cumulative errors), rounding off numerical values (equal to gross error of rounding interval). According to the root-mean-square principle, measurement uncertainty components of each plate were added to calculate the total measurement uncertainty. **Results** Expanded uncertainty for the APC is 0.2×10^4 CFU/mL, $k=2$. **Conclusion** A simple and accurate method for evaluating measurement uncertainty for the APC of food is established.

KEY WORDS: uncertainty; aerobic plate count; weighted average

*通讯作者: 易大为, 副主任药师, 主要研究方向为微生物检验。E-mail: detin@163.com

*Corresponding author: YI Da-Wei, Associate Chief Pharmacist, Liaoning Institute for Drug Control, No. 46 on Guihe Street in Tiexi District, Shenyang 110023, China. E-mail: detin@163.com

1 引言

GB 4789.2-2010《食品微生物学检验 菌落总数测定》规定^[1],当连续两个稀释度的平板菌落数在适宜计数的范围内时,需要采用两个稀释级的测定结果,按公式(1)计算菌落总数。

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0.1 \times n_2)} \times d \quad (1)$$

N —样品中菌落数; C —平板(含适宜范围菌落数的平板)菌落数之和; 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)。

GB 4789.2-2010 未对该公式的数学意义进行明确的解释^[2],一些文献也只报道了一个稀释度的计数方法测量不确定度的评定方法^[3-7]。一个完整的测量过程,引起测量不确定度的因素有很多,包括被测量的定义不完整,被测量的定义值实现不理想,被测量的样本不能完全代表定义的被测量,对环境条件的影响认识不足或环境条件的不完善测量,人员对仪器的信号输出读数偏差,测量仪器的分辨率或鉴别域的限制,测量标准和标准物质的给定值或标定值的不准确,测量方法、测量系统和测量程序的不完善,数据处理时所引起的常数和其他参数不准确,修正系统误差的不完善以及各种随机因素的影响等等。评估不确定度的正确做法是首先密切注意所有可能来源,然后从中找到主要来源,再集中精力分析主要的不确定度分量。每个测量领域都有自身的特殊性,在实际应用中只要运用专业知识和经验,是不难做到

的^[8]。本文以加权平均的算法推导了菌落总数的计算公式,揭示了该计数方法的数学意义,建立了菌落总数测定的通用数学模型;同时以某橙汁饮料菌落总数的测量不确定度评定为例,探讨了菌落总数计数法的主要误差来源,较准确地评定了菌落总数的测量不确定度。

2 材料与方法

2.1 菌落总数测定简述

对某橙汁饮料(鲜榨橙汁,购于某超市鲜榨果蔬店)按 GB 4789.2-2010 标准方法进行检测,试验流程见图 1,各稀释级的计数结果见表 1。

按公式(1)计算为:

$$N = \frac{265 + 274 + 32 + 36}{(2 + (0.1 \times 2)) \times 10^{-2}} = \frac{607}{0.022} = 27591, \text{ 该数}$$

据数字修约后,表示为 2.8×10^4 CFU/mL。

2.2 数学模型的建立

菌落总数测定公式(1)成立的理论依据:①在计数方法能够分辨并计数的前提下,平板上菌落数越多越具有代表性,越接近菌落总数真实值;②同等取样条件下,取样量越大越具有代表性,不同的取样量需要赋予不同的权重^[9,10]。

加权平均是指在计算若干个数量的平均数时,为了考虑到每个数量在总量中所具有的重要性不同,可分别给予不同的权数,按不同权数计算所得的各数量的平均数^[11]。本例是将供试品溶液以 10 倍为一个数量级依次稀释,并且低稀释级的菌落数量和取

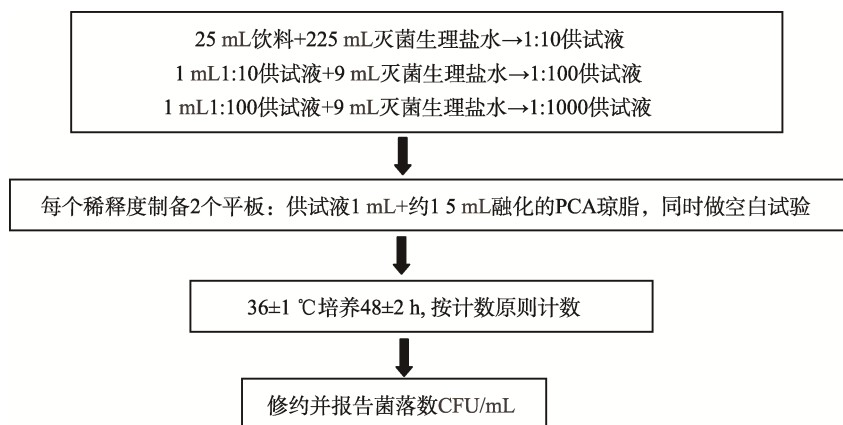


图 1 菌落总数检测流程

Fig. 1 The testing process of aerobic plate count

表 1 橙汁饮料各稀释级菌落数的测定值
Table 1 The colony forming units of each dilution level for orange juice

稀释度	1:10	1:100	1:1000
平板 1 菌落数(CFU)	多不可计	265	32
平板 2 菌落数(CFU)	多不可计	274	36

样量均多于高稀释级,可以成 10 倍的赋予低稀释级菌落计数结果的权数,所以赋予 1:100 稀释级各平板的权数为 10,而赋予 1:1000 稀释级各平板的权数为 1。本例中各稀释级分别有两个平板参与计算,则 1:100 稀释级各平板的权重值为 $\frac{10}{22}$; 1:1000 稀释级各平板的权重值为 $\frac{1}{22}$,按加权平均法对将公式(1)重新表述,即公式(2)。

$$N = \frac{10}{22} \times C_1 \times 10^2 + \frac{10}{22} \times C_2 \times 10^2 + \frac{10}{22} \times C_3 \times 10^3 + \frac{10}{22} \times C_4 \times 10^3 \quad (2)$$

$$N = N_1 + N_2 + N_3 + N_4$$

$$N = 12045.45 + 12454.55 + 1454.55 + 1636.36$$

$$= 27591 \text{ CFU} / \text{mL}$$

2.3 识别和分析不确定度来源

按公式(2)的表述,菌落总数的测量不确定度可以分解成每一个菌落计数平板引入的测量不确定度,再考虑修约引入的因素,则共有 5 个分量参与评价,见公式(3)。

$$u_N^2 = u_{N1}^2 + u_{N2}^2 + u_{N3}^2 + u_{N4}^2 + u_{\text{修约}}^2 \quad (3)$$

2.4 量化各不确定度的分量

2.4.1 平板上菌落数的标准不确定度

平板上的菌落是由 1 mL 样品稀释液中的微生物经过培养而表现出来的。一般用波松分布(Poisson Scatter)来表示在一系列等量均分的粒子悬液中粒子数的变异,即波松分布可表示 1 mL 样品稀释液中微生物的不确定度。当选定的某个稀释度的计数平板上的菌落数值为 C 时,波松分布所引起的相对标准差为 $\frac{1}{\sqrt{C}}$ [12]。但实际上,计数平板上的菌落数的不

确定度除了受波松分布制约之外,还受其它因素如培养基、培养条件、菌落的重叠和菌落的计数误差等的影响 [13,14]。因此,同一稀释度下,两个平板的相对标

准不确定度,以两个平板计数结果的相对相差表示。

$$u_{rel c1} = u_{rel c2} = 2 \times (274 - 265) / (274 + 265) \times 100\% = 3.3\%$$

$$u_{rel c3} = u_{rel c4} = 2 \times (36 - 32) / (36 + 32) \times 100\% = 12\%$$

2.4.2 稀释过程引入的相对标准不确定度

该不确定度包括首步的 10 倍稀释(25 mL 检样 + 225 mL 生理盐水)和后续的 10 倍系列稀释(1 mL 首步或以后各步稀释的样品稀释液 + 9 mL 生理盐水)所产生的不确定度。稀释倍数由下式计算:

$$d_1 = d_2 = 10^2$$

$$= \frac{25 \text{ mL} + 225 \text{ mL}}{25 \text{ mL}} \times \frac{1 \text{ mL} + 9 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} \times 1 \text{ mL}$$

$$d_3 = d_4 = 10^3$$

$$= \frac{25 \text{ mL} + 225 \text{ mL}}{25 \text{ mL}} \times \frac{1 \text{ mL} + 9 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} \times \frac{1 \text{ mL} + 9 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} \times 1 \text{ mL}$$

首步稀释所用的量器分别为 25 mL 的完全流出式分度吸管和 250 mL 的量出式量筒,其容量允差分别为 0.20 mL 和 2.0 mL (均由生产厂商提供),由于玻璃容器的允差属于矩形(均匀)分布 [15],那么它们的标准不确定度 $u_{25\text{mL}}$ 和 $u_{250\text{mL}}$ 分别为:

$$u_{25\text{mL}} = \frac{0.20 \text{ mL}}{\sqrt{3}} = 0.12 \text{ mL}, u_{250\text{mL}} = \frac{2 \text{ mL}}{\sqrt{3}} = 1.15 \text{ mL}。$$

同理,若第二步及其以后各步稀释所用的量器均为 1 mL 和 10 mL 的量出式快速流出分度吸管,其容量允差分别为 0.015 mL 和 0.10 mL (均由生产厂商提供),那么

$$u_{1\text{mL}} = \frac{0.015 \text{ mL}}{\sqrt{3}} = 0.0087 \text{ mL},$$

$$u_{9\text{mL}} = \frac{0.10 \text{ mL}}{\sqrt{3}} = 0.058 \text{ mL}。$$

本次评定假定试验温度恒定,不考虑由于温度波动引起的溶液体积变化的测量不确定度。按照均方根法则 [15],对以上来源的测量不确定进行加和:

$$u_{25\text{mL}+225\text{mL}}^2 = u_{25\text{mL}}^2 + u_{225\text{mL}}^2 = 1.34,$$

$$u_{1\text{mL}+9\text{mL}}^2 = u_{1\text{mL}}^2 + u_{9\text{mL}}^2 = 0.034。$$

$$\frac{u_{d1}^2}{100^2} = \frac{u_{d2}^2}{100^2} = 2 \times \frac{u_{1\text{mL}}^2}{1^2} + \frac{u_{10\text{mL}}^2}{10^2} + \frac{u_{25\text{mL}}^2}{25^2} + \frac{u_{250\text{mL}}^2}{250^2}$$

$$= 2 \times \frac{7.6 \times 10^{-5}}{1^2} + \frac{0.034}{100} + \frac{0.12^2}{25^2} + \frac{1.34}{250^2} = 5.8 \times 10^{-4}$$

$$\frac{u_{d3}^2}{1000^2} = \frac{u_{d4}^2}{1000^2} = 3 \times \frac{u_{1\text{mL}}^2}{1^2} + 2 \times \frac{u_{10\text{mL}}^2}{10^2} + \frac{u_{25\text{mL}}^2}{25^2} + \frac{u_{250\text{mL}}^2}{250^2}$$

$$= 3 \times \frac{7.6 \times 10^{-5}}{1^2} + 2 \times \frac{0.034}{100} + \frac{0.12^2}{25^2} + \frac{1.34}{250^2} = 9.9 \times 10^{-4}$$

2.4.3 数值修约引入的测量不确定度

由于采用两位有效数字来报告菌落数的检测结果,其修约间隔视具体的检测结果而异。如果检测结果的菌落数 N 小于 100 CFU,其修约间隔为 1 CFU;如果检测结果的菌落数大于 100 CFU,即 $a.b \times 10^x$ CFU (a 为大于或等于 1 的整数, b 为 0 或正整数, x 为等于或大于 2 的整数)时,其修约间隔为 0.1×10^x CFU^[7]。修约间隔所引起的不确定度按正态分布来计算,即分别为 $1/3$ CFU 和 $0.1 \times 10^x / 3$ CFU。本次报告数值为 2.8×10^4 CFU/mL,则其测量不确定为 $U_{\text{修约}} = 333$ CFU/mL。

3 结果

3.1 各计数平板的合成标准不确定度

$$\frac{u_{N1}^2}{N_1^2} = u_{\text{rel } C1}^2 + \frac{u_{d1}^2}{100^2} = 3.3\%^2 + 5.8 \times 10^{-4} = 1.7 \times 10^{-3}$$

$$u_{N1}^2 = N_1^2 \times 1.7 \times 10^{-3} = 246658$$

$$\frac{u_{N2}^2}{N_2^2} = u_{\text{rel } C2}^2 + \frac{u_{d2}^2}{100^2} = 3.3\%^2 + 5.8 \times 10^{-4} = 1.7 \times 10^{-3}$$

$$u_{N2}^2 = N_2^2 \times 1.7 \times 10^{-3} = 263697$$

$$\frac{u_{N3}^2}{N_3^2} = u_{\text{rel } C3}^2 + \frac{u_{d3}^2}{1000^2} = 12\%^2 + 9.9 \times 10^{-4} = 1.5 \times 10^{-2}$$

$$u_{N3}^2 = N_3^2 \times 1.5 \times 10^{-2} = 31736$$

$$\frac{u_{N4}^2}{N_4^2} = u_{\text{rel } C4}^2 + \frac{u_{d4}^2}{1000^2} = 12\%^2 + 9.9 \times 10^{-4} = 1.5 \times 10^{-2}$$

$$u_{N4}^2 = N_4^2 \times 1.5 \times 10^{-2} = 40165$$

$$\therefore u_N^2 = u_{N1}^2 + u_{N2}^2 + u_{N3}^2 + u_{N4}^2 + u_{\text{修约}}^2$$

$$\therefore u_N = \sqrt{246658 + 263697 + 31736 + 40165 + 333^2} = 833 \text{ CFU/mL}$$

3.2 扩展不确定度及报告

通常情况下包含因子 $k=2$ (置信水平约为 95%)^[16], $U_N = 2 \times u_N = 1666 \approx 0.2 \times 10^4$ CFU/mL。本例的菌落总数检测结果报告为: $(2.8 \pm 0.2) \times 10^4$ CFU/mL。

4 讨论

任何计算公式都有其适用范围。公式(1)的适用范围是在以肉眼判读时,有连续两个稀释度落在 30~300 CFU 范围内的情况;若采用更高分辨率的判读设备,如菌落计数成像系统,其辨识能力可能会在

更大的数量级范围内。为更真实地反映高污染样品的菌落总数,可采用更大直径的培养皿或 1 mL 供试液分注多个平板的办法,并参照公式(2)的数学意义,对可辨识的不同稀释度平板上的菌落数采用加权平均法进行计算和报告。

本次评定主要从三个可量化因素着手分析测量过程引入的误差:①平板上生长菌落数量的分布误差以及计数误差引入的测量不确定度;②样品的移取和稀释过程引入的测量不确定度;③数字修约引入的测量不确定度。按照加权平均的算法,将菌落计算公式简化并分解,以每个计数平板为分量建立数学模型,逐一量化各分量的测量不确定度,再加和成总的测量不确定度。同类文献多采用多次试验的标准偏差进行评定,由于受到样品自身属性和污染微生物生存状况及分布等多种因素的限制,其测量不确定度评定结果的通用性和复现性均较差;相比之下,本文菌落总数测量不确定度的评定方法直观、可靠,更具可操作性。

参考文献

- [1] GB 4789.2-2010. 食品微生物学检验菌落总数测定[S]. GB 4789.2-2010. Microbiological examination of food: Aerobic plate count [S].
- [2] 王琪. 关于《菌落总数测定》若干问题的建议[J]. 中国质量技术监督, 2012, 9: 66-67.
Wang Q. Some proposal of Aerobic plate count for GB 4789.2-2010 [J]. China Qual Supervision, 2012, 9: 66-67.
- [3] 赵婷. 酱卤肉制品中菌落总数测量结果不确定度评定[J]. 计量与测试技术, 2010, 37(1): 55-56.
Zhao T. Uncertainty of evaluation measurement of Aerobic plate count in cooked meat products [J]. Metrol Meas Tech, 2010, 37(1): 55-56.
- [4] 魏国美. 食品中菌落总数测定不确定度的评定[J]. 质量技术监督研究, 2011, 17(5): 22-26.
WEI GM. Uncertainty evaluation for detection of colony-forming units on food [J]. Qual Tech Supervision Res, 2011, 17(5): 22-26.
- [5] 王晓红, 姜嫄. 食品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, 2011, 21(11): 2799-2800.
Wang XH, Jiang X. Uncertainty evaluation for Aerobic plate count on food [J]. Chin J Health Lab Technol, 2011, 21(11): 2799-2800.
- [6] 许如苏, 罗惠明, 林彩华. 水产品菌落总数检验不确定度的评定[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(3): 549-550.
Xu RS, Luo HM, Lin CH. Uncertainty evaluation for Aerobic

- plate count of aquatic product [J]. Chin J Health Lab Technol, 2007, 17(3): 549–550.
- [7] 胡巖, 丁武, 李素芳. 食品的菌落数检测结果不确定度之评定[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(8): 1494–1497.
- Hu D, Ding W, Li SF. Uncertainty evaluation for Aerobic plate count of food [J]. Chin J Health Lab Technol, 2008, 18(8): 1494–1497.
- [8] 易大为, 刘漫江, 潘强. 旋光度法测定葡萄糖注射液含量测量不确定度的评定[J]. 药物分析杂志, 2010, 30 (1): 157–159.
- Yi DW, Liu MJ, Pan Q. Evaluation of measurement uncertainty for determination of dextrose injection by optical rotation [J]. Chin J Pharm Anal 2010, 30 (1): 157–159.
- [9] International Dairy Federation. Milk and Milk Products: Enumeration of Microorganisms-Colony Count at 3°C. Provisional IDF Standard 100A, 1987, IDF, Brussels, Belgium.
- [10] Niemela, S. Statistical evaluation of Results from Quantitative Microbiological Examinations. Report No. 1, 2nd ed. Nordic Committee in Food Analysis, 1983, Uppsala, Sweden.
- [11] 胡家齐, 武自顺. 中学数学辞典[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1982.
- Hu JQ, Wu ZS. Mathematics Dictionary for the Middle School[M]. Xi'an: Shaanxi Science and Technology Press, 1982.
- [12] 周红雨. 泊松分布应用于菌落总数测定的质量控制[J]. 中国卫生检验杂志, 2000, 10(6): 751–752.
- Zhou HY. The application of Poisson distribution for quality control to Aerobic Plate Count [J]. Chin J Health Lab Technol, 2000, 10(6): 751–752.
- [13] 林彩华, 许如苏. 菌落总数检验结果的影响因素与控制措施的探讨[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2007, 30(4): 241–242.
- Lin CH, Xu RS. The investigation of analysis and control of APC's error [J]. Chin Frontier Health Quarantine, 2007, 30(4): 241–242.
- [14] 李志明. 影响菌落总数测定结果的特殊因素[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(2): 371.
- Li ZM. Factors for the determination results of Aerobic Plate Count [J]. Chin J Health Lab Technol, 2008, 18(2): 371.
- [15] 魏昊, 乔东. 化学分析中不确定度的评估指南[M]. 北京: 中国计量出版社, 2002.
- Wei H, Qiao D. Guidelines to Evaluation of Uncertainty in Chemical Analysis[M]. Beijing: China Metrology Press, 2002.
- [16] 中国合格评定国家认可委员会. 测量不确定度评估和报告通用要求[M]. 北京: 中国计量出版社, 2006.
- CNAS. General Requirements for Evaluating and reporting Measurement Uncertainty [M]. Beijing: China Metrology Press, 2006.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



易大为, 副主任药师, 主要研究方向为微生物检验。
E-mail: detin@163.com