

能力验证菌落总数测定结果不确定度的评定

王海华*, 兰 茜

(广西-东盟食品药品安全检验检测中心, 广西壮族自治区南宁食品药品检验所, 南宁 530001)

摘 要: **目的** 对实验室能力验证样品菌落总数进行不确定度评定。**方法** 能力验证菌落总数依据 GB 4789.2-2010《食品安全国家标准食品微生物学检验 菌落总数测定》以及能力验证计划参试指导书来进行测定和结果判断, 再根据 JJF 1059.1-2012《测量不确定度评定与表示》的规定, 对测定过程中引入的不确定度分量进行评定, 然后采用合成的方法来计算和评定菌落总数的不确定度。**结果** 菌落总数测定结果合成不确定度为 0.05042, 扩展不确定度为 0.1008(以对数计)。**结论** 本研究建立的方法可以对能力验证样品的菌落总数进行不确定度评定, 此方法适合于类似检测条件下菌落总数不确定度的评定。

关键词: 能力验证; 菌落总数; 不确定度评定

Uncertainty evaluation of aerobic plate count by proficiency testing

WANG Hai-Hua*, LAN Qian

(Guangxi - ASEAN Food and Drug Safety Inspection and Testing Center, Nanning Institute for Food and Drug Control, Nanning 530001, China)

ABSTRACT: Objective To evaluate the uncertainty of aerobic plate count by proficiency testing. **Methods** Proficiency testing of aerobic plate count was conducted under the direction of GB 4789.2-2010 *National food safety standard microbiological examination in food: Aerobic plate count* and CFAPA-024 *Reference book for microbiological ability verification plan in food*. Then, the uncertainty components introduced in the experiment were determined according to JJF1059.1-2012 *Evaluation and expression of uncertainty in measurements*. Finally, synthetic method was used to calculate and assess the uncertainty of aerobic plate count.

Results The combined uncertainty of aerobic plate count was 0.05042, the expanded uncertainty was $U(\log)=0.1008$. **Conclusion** The method established in this study can be used in the uncertainty evaluation of aerobic plate count under similar circumstances.

KEY WORDS: proficiency testing; aerobic plate count; uncertainty evaluation

1 引 言

测量不确定度是表征合理地赋予被测量之值分散性, 与测量结果相联系的参数^[1]。一个完整的测量结果, 除了给出最佳的估算值外, 还要对其进行不确

定度的评定。GB/T 27025-2008《检测和校准实验室能力的通用要求》^[2]中明确规定: 当检测方法有要求、或用户有要求、或据已作出满足某规范决定的窄限时, 检测报告应提供测量结果的不确定度。但目前不确定度评定大多在理化实验室中开展, 微生物检验中不

*通讯作者: 王海华, 副主任药师, 主要研究方向为食品药品检验及质量标准。E-mail: 13877185340@139.com

*Corresponding author: WANG Hai-Hua, Associate Chief Pharmacist, Guangxi - ASEAN Food and Drug Safety Inspection and Testing Center, Nanning Institute for Food and Drug Control, No.9 Qinghu Road, Qingxiu District, Nanning 530001, China. E-mail: 13877185340

@139.com.

确定度评定虽然有一些报道,但在实验室工作中实际应用并不多。现对实验室能力验证样品的菌落总数测定结果进行不确定度评定,并确定其置信区间,为类似检测条件下菌落总数不确定度的评定提供参考。

2 材料与方法

2.1 材料与仪器

平板计数琼脂(北京陆桥技术有限责任公司,批号:14120413);能力验证样品(大连中实国食检测技术有限公司);生化培养箱(SPX-150型,扬州惠科电子有限公司,控温范围:0~60℃);立式压力蒸汽灭菌器(LMQ.C/3260J,山东新华医疗器械股份有限公司)。

2.2 方法

2.2.1 检测依据

食品中微生物学能力验证计划参试指导书^[3],GB 4789.2-2010《食品安全国家标准食品微生物学检验 菌落总数测定》^[4]。

2.2.2 检测过程

无菌开启西林瓶,立即加入2~4 mL稀释液(生理盐水)进行溶解,稀释液合计40 mL。待溶解后,吸出放入无菌瓶中,反复用余下的稀释液清洗西林瓶内壁,回收清洗液至上述的无菌瓶中,此溶液即是待测样品原液(即 10^0)。将上述制备的40 mL待测原液用1 mL无菌吸头吸取1 mL,沿管壁缓慢注于盛有9 mL稀释液的无菌试管中,振摇试管使其混合均匀,制成1:10(10^{-1})的样品匀液。同法操作,制备10倍系列稀释样品匀液至 10^{-7} 。每递增稀释一次,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,其中 10^{-3} ~ 10^{-5} 每个稀释度做10个平行平皿,其他每个稀释度做3个平行平皿。及时将15~20 mL冷却至46℃的平板计数琼脂培养基倾注平皿,并转动平皿使其混合均匀。待琼脂凝固后,将平板翻转,于(36±1)℃下培养(48±2)h。结果可用肉眼观察,必要时用放大镜或菌落计数器,记录稀释倍数和相应的菌落数量。

3 检测结果和不确定度分析

3.1 按菌落计数报告规则

选取菌落数在30~300 cfu之间的稀释度进行报告。检测结果和计算见表1。

3.2 建立数学模型

$$Y=K \cdot x/V$$

Y---样品菌落总数, cfu·mL⁻¹

K---稀释倍数

x---某稀释度检测平板上的菌落数, cfu

V---某稀释度下取样体积, mL

3.3 不确定度来源及分析

测量不确定度一般由若干分量组成,其中一些分量可根据一系列测量值的统计分布获得,为A类不确定度评定;另一些分量基于经验或其他信息获得的概率密度函数获得,为B类不确定度评定^[1]。本实验测定的不确定度来源主要有以下几个方面:样品重复性测定所引入的不确定度 $u_A(Y)$;样品定容引入的不确定度 $u_B(D)$;稀释倍数所引入的不确定度 $u_B(K)$;取样体积所引入的不确定度 $u_B(V)$ 。

表1 菌落总数检测结果及计算
Table 1 Results of aerobic plate count determination

编号	检测结果(x)	检测结果取对数(lg x)	残差平方 $(\lg x_i - \overline{\lg x})^2$
1	169000	5.2279	0.0004368
2	189000	5.2765	0.0007673
3	165000	5.2175	0.0009797
4	154000	5.1875	0.0037577
5	178000	5.2504	0.0000026
6	209000	5.3201	0.0050837
7	180000	5.2553	0.0000423
8	175000	5.2430	0.0000336
9	166000	5.2201	0.0008237
10	195000	5.2900	0.0016974
		$\overline{\lg x}=5.2488$	$\Sigma=0.013625$

4 不确定度分量的评定

4.1 重复性检测引入的不确定度 $u_A(Y)$

从表1得出,由于重复10次检测的菌落总数结果相差较大,因此对检测结果取对数后,再计算检测结果对数值的样本标准偏差。按A类评定,根据贝塞尔公式,得到检测结果对数值的样本标准偏差:

$$s(\lg x_k) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\lg x_i - \overline{\lg x})^2}{n-1}} = 0.03891$$

$$\text{标准不确定度 } u_A(Y) = \frac{S(\lg x_k)}{\sqrt{n}} = 0.01230$$

$$\text{相对标准不确定度 } u_{Arel}(Y) = \frac{u_A(Y)}{\lg x} = 0.002343$$

4.2 样品定容引入的不确定度 $u_B(D)$

该不确定度来源于用50 mL量筒量取40 mL稀释液将样品溶解定容至40 mL。依据JJG196—2006《常用玻璃量器检定规程》^[5],50 mL量筒容量允差为±0.5 mL,属B类评定,按均匀分布,标准不确定度为 $u_B(D) = 0.5/\sqrt{3} = 0.28868$,相对标准不确定度 $u_{Brel}(D) = u_B(D)/40 = 0.007217$ 。

4.3 稀释倍数引入的不确定度 $u_B(K)$

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,所采用的量器分别是1 mL无菌吸头(移液器)和1~10 mL瓶口分液器,根据国家检定规程JJG 646-2006《移液器检定规程》^[6]的规定,其容量允许误差分别是±0.01和±0.006, B类评定,按均匀分布,它们的标准不确定度分别是 $u(V_1) = 0.01/\sqrt{3} = 0.005774$, $u(V_2) = 0.006/\sqrt{3} = 0.003464$ 。本实验取第3个稀释级(即 10^{-3})来报告结果,即取1 mL至9 mL共操作了3次,所以,稀释倍数产生的标准不确定度为 $u_B(K) = \sqrt{3 \times (0.005774^2 + 0.003464^2)} = 0.01166$ 。相对标准不确定度 $u_{Brel}(K) = 1/(1+9) \times u_B(K) = 0.001166$ 。

4.4 加样体积引入的不确定度 $u_B(V)$

由于每次检测各平板上接种稀释液的体积均为1 mL,使用1 mL无菌吸头(移液器),属B类评定,按均匀分布,加样引入的不确定度为: $u_B(V) = 0.01/\sqrt{3} = 0.005774$,相对标准不确定度是 $u_{Brel}(V)$

$= 0.005774/1 = 0.005774$ 。

4.5 检测结果的合成不确定度 u_C

合成相对标准不确定度为:

$$u_{Crel} = \sqrt{u_{Arel}(Y)^2 + u_{Brel}(D)^2 + u_{Brel}(K)^2 + u_{Brel}(V)^2} = 0.009606$$

实验测得菌落总数对数平均值为 $\overline{\lg x} = 5.2488$,则检测结果的合成不确定度为:

$$u_C = u_{Crel} \times \overline{\lg x} = 0.05042$$

4.6 检测结果的扩展不确定度 U

取置信概率为95%,包含因子 $k=2$,扩展不确定度 $U = k u_C = 2 \times 0.05042 = 0.1008$ 。

4.7 结果报告

本实验菌落总数的结果表示为 (5.2488 ± 0.1008) , $k=2$,取反对数得取值区间为 $140605 \sim 223666$ cfu·mL⁻¹。最终本实验室能力验证样品的菌落总数应报告为: $(1.4 \sim 2.2) \times 10^5$ cfu·mL⁻¹,包含因子 $k=2$,或菌落总数估计值在 $140000 \sim 220000$ cfu·mL⁻¹之间。

5 讨论

(1) 本次能力验证检测中,为了防止样品中可能含有在琼脂培养基表面弥漫生长的菌落(防止菌落蔓延),同时做了增加覆盖一层琼脂培养基的方法与PCA直接倾注法进行对比,即在凝固后的琼脂表面覆盖一薄层琼脂培养基(约4 mL),凝固后翻转平板,再按条件进行培养。结果两种方法的菌落总数差异不大。本实验室在本次共有17家实验室参加的能力验证中结果是令人满意的。

(2) 对于菌落总数不确定度评定,很多文献都提到了菌落总数发散性问题。刘培海等^[7]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^[8]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。本人认为微生物检测有其特殊性,与化学物质检测不同,主要表现在同一份样品平行操作其检测结果发散性很大。尤其当菌落数量达到几个数量级时,会有很大的差异(见表1)。原因主要是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,从而致使形成的菌落数远远低于实际的活菌数。另外培养基的质量、样品

的制备、操作时间的长短、培养温度、培养时间、菌落计数等等有诸多的因素影响。因此,在分析不确定度来源时,一些分量(如定容、吸液、稀释的影响)相对容易识别,但有些分量(如培养基的质量、不同微生物的相互作用)既不能直接测量也不能以统计学的方式进行评价。因此,实验室应考虑其造成的偏离,偏离的程度可借助于能力验证的结果进行评估^[9]。

(3) 由于菌落总数检测结果的发散性较大,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太合理^[10-12],可对检测结果取对数值后,求检测结果的对数样本标准偏差,再计算出不确定度则较为方便。

参考文献

- [1] JJF1059.1-2012 测量不确定度的评定与表示[S].
JJF1059.1-2012 Evaluation and expression of uncertainty in measurements [S].
- [2] 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].
- [3] CFAPA-024 食品中微生物学能力验证计划参试指导书[S].
CFAPA-024 Reference book for microbiological ability verification plan in food [S].
- [4] GB 4789.2-2010 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数[S].
GB 4789.2-2010 National food safety standard-Microbiological examination in food-Aerobic plate count[S].
- [5] JJG 196-2006 常用玻璃量器检定规程 [S].
JJG 196-2006 Verification regulations for volumetric glasswares [S].
- [6] JJG 646-2006 移液器检定规程[S].
JJG 646-2006 Verification regulations for locomotive pipettes [S].
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 岁源, 吴晓军, 曹俊, 等. 食品检验中菌落总数的不确定度评定[J]. 江苏卫生保健, 2013, 15(6): 6-8.
Sui Y, Wu XJ, Cao J, et al. Evaluation of the uncertainty of aerobic plate count in food inspection[J]. Jiangsu Health Care, 2013, 15(6): 6-8.
- [10] 杨兰花, 卢力. 化妆品微生物检验菌落总数不确定度评定[J]. 香料香精化妆品, 2010, (1): 31-32, 37.
Yang LH, Lu L. Assessment on uncertainty of aerobic bacterial count in cosmetics[J]. Flavour Fragrance & Cosmetics, 2010, 1: 31-32, 37.
- [11] 王晓红, 姜娴. 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, Jian X. Uncertainty evaluation of the aerobic plate count in food [J]. Chin J Health Lab Technol, 2011, 21(11): 2799-2800.
- [12] 周婕, 姚羚羚, 廖惠青. 农村饮用水菌落总数测量不确定度的评定[J]. 医学动物防制, 2014, 30(7): 814-816.
Zhou J, Yao LL, Liao HQ. Evaluation of uncertainty of total bacterial colonies in rural drinking water [J]. J Med Pest Control, 2014, 30(7): 814-816.

(责任编辑: 卢 忆)

作者简介



王海华, 副主任中药师, 主要研究方向为食品、药品、化妆品检测。
E-mail: 13877185340@139.com