

大肠菌群 MPN 计数法不确定度评估

姚丽芳, 朱洪坤*, 李蔚, 赵颐晴

(上海出入境检验检疫局工业品与原材料检测技术中心, 上海 200331)

摘要: 目的 为减少大肠菌群检测中的实验误差, 提高检验精确度, 对大肠菌群 MPN 计数法不确定度进行评估。方法 使用大肠杆菌标准菌株, 分析大肠菌群检测结果的不确定度来源, 对测定过程中引入的不确定度分量进行评定。采用合成的方法计算检验结果的不确定度。结果 合成不确定度为 0.06398, 扩展不确定度为 0.1446(以计数)。大肠杆菌含量范围结果为 1212~2358 MPN/mL。结论 本研究发现重复性对不确定度影响最大, 应在分析过程中注意控制。

关键词: 大肠菌群; 不确定度评估; MPN 法

Uncertainty evaluation of coliform bacteria MPN counting method

YAO Li-Fang, ZHU Hong-Hun*, LI Wei, ZHAO Yi-Qing

(Technical Center for Industrial Product and Raw Material Inspection and Testing of Shanghai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shanghai 200331, China)

ABSTRACT: Objective To evaluate the uncertainty of coliform bacteria MPN counting method for reduce experiment error and improve test precision. **Methods** The standard strains of *Escherichia coli* was used, and the uncertainty sources of coliform bacteria were analyzed, then the uncertainty components introduced in the experiment were evaluated. Synthetic method was used to calculate the uncertainty. **Results** The combined uncertainty was 0.06398, and the expanded uncertainty was $u(\log)=0.1446$. Coliform content was 1212~2358 MPN/mL. **Conclusion** The results showed that the repeatability was the greatest influence on the uncertainty, and it should be controlled in the test.

KEY WORDS: coliform; uncertainty evaluation; MPN

1 引言

测量不确定度是表征合理地赋予被测量之值的分散性, 是与测量结果相联系的参数^[1], 在化学分析中应用较多, 但在微生物检验中应用并不多^[2]。大肠菌群作为粪便污染指标, 是评价食品卫生状况的重要指标之一^[3]。CNAS-CL 07:2011《测量不确定度评估和报告通用要求》^[4]中规定检测实验室应有能力对

每一项有数值要求的测量结果进行测量不确定度评估, 且 GB/T 27025-2008《检测和校准实验室能力的通用要求》^[5]中明确规定: 当不确定度与检测结果的有效性或应用有关, 或客户的指令中有要求, 或当不确定影响到对规范限度的符合性时, 检测报告中还需提供不确定度的信息。本研究按 GB 4789.3-2010《食品微生物学检验大肠菌群计数》^[6]第一法进行大肠菌群检测, 评估检测结果不确定度, 旨在为大肠菌

基金项目: 上海出入境检验检疫局科技计划项目(HK025-2014)

Fund: Supported by Science and Technology Plan Project of Shanghai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau (HK025-2014)

*通讯作者: 朱洪坤, 高级工程师, 主要研究领域为食品接触材料卫生检测。E-mail: zhuhk@shciq.gov.cn

*Corresponding author: ZHU Hong-Kun, Senior Engineer, Shanghai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau Inspection Center of Industrial Products and Raw Materials, Shanghai 200331, China. E-mail: zhuhk@shciq.gov.cn

群不确定度评估提供参考。

2 材料与方法

2.1 材料与仪器

大肠杆菌标准菌株(ATCC 10536, 批号 680-42, 美国菌种保藏中心); 月桂基硫酸盐胰蛋白胨(Lauryl sulfate tryptose, LST)肉汤(北京陆桥技术有限责任公司, 批号: 140903); 煌绿乳糖胆盐(Brilliant green lactose bile, BGLB)肉汤(北京陆桥技术有限责任公司, 批号: 150416)。

ESCOCLASS II 生物安全柜(新加坡 ESCO 公司); Thermo Forma 3111 二氧化碳培养箱(美国 ThermoFisher 公司)。

2.2 方法

2.2.1 标准菌株接种

大肠杆菌标准菌株包装内含有单颗冻干菌粒、溶解液及接种棉棒。开始试验时, 捏碎包装头部的安瓿瓶, 使得安瓿瓶里的溶解液与底部冻干菌粒接触, 捏碎颗粒, 垂直震荡使得液体与颗粒混合。用接种棉棒蘸取菌悬液, 以挤压和旋转的方式涂布于营养琼脂培养基三分之一区域, 用无菌接种针划线促使菌落形成, 35 °C, 培养 24 h。

2.2.2 样品制备

培养 24 h 后, 挑取典型菌落, 溶解于 10 mL 无菌生理盐水, 振摇试管, 并用无菌吸管反复吹打, 混合均匀, 制成 1:10 样品均液。

2.2.3 样品稀释

用 1 mL 移液管吸取 1:10 样品均液 1 mL, 沿管壁缓缓注入 9 mL 无菌生理盐水的试管中, 移液管尖端不能触及稀释液面, 振摇试管, 并用 1 mL 吸管反复吹打, 使其混合均匀, 制成 1:100 的样品均液。按上述操作, 依次制成 10 倍递增系列稀释样品均液。每次稀释换用移液管和吸管。

2.2.4 初发酵试验

每个稀释度接种 3 管 LST 肉汤, 每管接种 1 mL, 36 °C 培养 24 h, 观察倒管内是否有气泡产生。24 h 产气者进行复发酵试验, 如未产气则继续培养至 48 h, 产气者进行复发酵试验。未产气者为大肠菌群阴性。

2.2.5 复发酵试验

用接种环从产气的 LST 肉汤管中分别取培养物 1 环, 移种于 BGLB 肉汤管中, 36 °C 培养 48h, 观察产气情况。产气者, 计为大肠菌群阳性管。

2.2.6 结果判断

根据确证的大肠菌群 LST 阳性管数, 查 MPN 检索表, 报告每 mL 样品中大肠菌群的 MPN 值。

3 结果与讨论

3.1 不确定度的来源分析

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; 另一些分量是基于经验或其他信息的假定的概率分布获得, 为 B 类不确定度评定^[7]。经初步分析影响大肠菌群 MPN 计数法结果不确定度的主要因素为取样体积的不确定度、稀释倍数的不确定度和测量重复性引入的不确定度, 其中取样体积的不确定度、稀释倍数的不确定度为 B 类不确定度, 测量重复性不确定度为 A 类不确定度。

3.2 不确定度分量计算

3.2.1 取样体积的相对标准不确定度

分别用移液管吸取 1 mL 接种于 LST 肉汤管, JJG196-2006^[8]常用玻璃量器规定, 20 °C 时 1 mL(A 级)的容量允差为 ±0.015, 其产生的标准不确定度为:

$$u(\text{取样})=0.015/\sqrt{3}=0.00866$$

相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(\text{取样})=0.00866/1=0.00866$$

3.2.2 稀释过程中引入的不确定度

样品 10 倍系列梯度稀释采用了 1 mL 和 10 mL 移液管进行。1 mL 移液管的容量允差前面已提到, 20 °C 时 10 mL(A 级)的容量允差, 根据 JJG196-2006 常用玻璃量器规定为 ±0.05, 取矩形分布, 则它们的标准不确定度分别为:

$$u(1\text{mL})=0.015/\sqrt{3}=0.00866$$

$$u(10\text{mL})=0.05/\sqrt{3}=0.02887$$

它们的相对标准不确定度分别为:

$$u_{\text{rel}}(1\text{mL})=u(1\text{mL})/1=0.00866$$

$$u_{\text{rel}}(10\text{mL})=u(10\text{mL})/10=0.002887$$

$$u_{\text{rel}}(\text{稀释})=\sqrt{u_{\text{rel}}(1\text{mL})^2+u_{\text{rel}}(10\text{mL})^2} \\ =\sqrt{(0.00866)^2+(0.002887)^2}=0.009128$$

3.2.3 重复测量引起的不确定度

大肠菌群的生长繁殖是以几何级数递增的, 所得数据的发散性较大, 因此在评定大肠菌群不确定度时, 应用贝塞尔公式计算其对数的平均值和标准偏差^[9]。重复测量 10 次, 取其对数平均值作为测量结果。10 次重复测量结果列入表 1 中。

表 1 10 次重复测量检测结果
Table 1 Results of 10 repeat measurements

序号	阳性管数				X_i	$\lg X_i$	$\lg x_i - \overline{\lg x}$	$(\lg x_i - \overline{\lg x})^2$
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}				
1	3	3	2	0	930	2.968	-0.295	0.08702
2	3	3	2	2	2100	3.322	0.059	0.003481
3	3	3	2	1	1500	3.176	-0.087	0.007569
4	3	3	2	2	2100	3.322	0.059	0.003481
5	3	3	2	2	2100	3.322	0.059	0.003481
6	3	3	3	0	2400	3.380	0.117	0.01369
7	3	3	2	2	2100	3.322	0.059	0.003481
8	3	3	2	1	1500	3.176	-0.087	0.007569
9	3	3	2	0	930	2.968	-0.295	0.08702
10	3	3	2	2	2100	3.322	0.059	0.003481

$$\lg X = \overline{\lg X} = 3.228$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\lg X_i - \overline{\lg x})^2}{n-1}} = \sqrt{\frac{0.2203}{10-1}} = 0.1564$$

标准不确定度为: $u(\text{rep}) = s / \sqrt{n} = 0.1564 / \sqrt{10} = 0.04946$

$$\text{相对不确定度为: } u_{\text{rel}}(\text{rep}) = \frac{0.04946}{3.228} = 0.01532$$

3.3 合成标准不确定度

相对合成标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(\lg X) = \sqrt{u_{\text{rel}}(\text{取样})^2 + u_{\text{rel}}(\text{总稀释})^2 + u_{\text{rel}}(\text{rep})^2} \\ = \sqrt{0.00866^2 + 0.009128^2 + 0.01532^2} = 0.01982$$

合成标准不确定度为:

$$u(\overline{\lg X}) = 3.228 \times 0.01982 = 0.06398$$

3.4 扩展不确定度的计算

当 $P=95\%$ 时, 自由度为 $\gamma=10-1=9$, 由 t 分布表可得 $k=2.26$ 。扩展不确定度为: $U = k \times u(\overline{\lg X}) = 2.26 \times 0.06398 = 0.1446$ 。

3.5 结果报告

该样品中大肠菌群含量为 $10^{3.228} = 1690$ MPN/mL。

检测结果的对数均值范围为 3.228 ± 0.1446 , 取反对数后, 样品中大肠菌群含量取值范围为 1212~2358 MPN/mL。

4 结论

影响大肠菌群不确定度的因素很多, 除了上述不确定度之外, 还有样品保存条件、检测环境、培养基质量、培养条件、培养时间、人员计数以及数值修约等方面引起的不确定度, 但它们对合成标准不确定度贡献较少^[10], 本次不确定度评估, 主要对取样体积、稀释倍数和测量重复性引入的不确定度进行分析, 结果显示重复性对不确定度影响最大。经分析重复性不确定度生产的主要原因一方面是试验操作, 另一方面是样品不均匀性造成的, 在分析过程中应注意控制, 应加强实验人员试验操作的培训以及在试验过程中应将样品充分混匀后再取样。

参考文献

- [1] CNAS-GL06:2006 化学分析中不确定度的评估指南[S]. CNAS-GL06:2006 Guidance on evaluating the uncertainty in chemical analysis [S].
- [2] 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.
- [3] 凌云, 王李宝, 沈辉, 等. 食品中大肠菌群平板计数结果不确定度的评定[J]. 食品与机械, 2010, 26(5): 75-77. Ling Y, Wang LB, Shen H, et al. Uncertainty evaluation for plate

- couts of coliforms in foods [J]. Food Mach, 2010, 26(5): 75-77.
- [4] CNAS-CL 07:2011 测量不确定度的要求[S].
CNAS-CL 07:2011 Requirements for measurement uncertainty [S].
- [5] 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].
- [6] GB 4789.3-2010 食品安全国家标准食品微生物学检验大肠菌群计数[S].
GB4789.3-2010 National food safety standard Food microbiological examination:Enumeration of coliforms [S].
- [7] 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].
- [8] JJG 196-2006 常用玻璃量器检定规程[S].
JJG 196-2006 Verification regulations for volumetric glasswares [S].
- [9] CNAS-GL05:2011 测量不确定度要求的实施指南[S].
CNAS-GL05:2011 Guidance on the application of the requirements for measurement uncertainty [S].
- [10] 林吉年. 食品检验中大肠菌群的不确定度评估[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(10): 1984-1985.
Lin JN. Assessment on uncertainty of coliform group determination in food [J]. Chin J Heal Lab Technol, 2008, 18(10): 1984-1985.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



姚丽芳, 高级工程师, 主要研究方向为食品接触材料卫生检测。

E-mail: yaolf@shciq.gov.cn



朱洪坤, 高级工程师, 主要研究方向为食品接触材料卫生检测。

E-mail: zhuhk@shciq.gov.cn