

猪肉菌落总数检验中不确定度的评定

蔡大川*, 黄启红*, 邴喆, 熊娟, 张志军, 伍玲燕, 黄璇莹, 陈敏儿, 简艳婷
(中国广州分析测试中心广东省化学危害应急检测技术重点实验室, 广州 510070)

摘要: **目的** 建立猪肉中菌落总数检测结果的不确定度评定方法。**方法** 依据 JJF 1059.1-2012《测量不确定度评定与表示》和 GB4789.2-2010《食品微生物学检验菌落总数测定》以及相关统计学方法, 对样品不确定度进行评定。**结果** 依据所采用的方法, 对同一样品测定 10 次菌落总数的扩展不确定度为 0.090, $k=2$ 。**结论** 本研究可以对单个样品的菌落总数检测结果的不确定度作出较好的估计, 可适用于日常工作中菌落计数的不确定度评定。

关键词: 猪肉; 菌落总数; 不确定度

Uncertainty evaluation of aerobic plate count in pork

CAI Da-Chuan*, HUANG Qi-Hong*, BIN-Zhe, XIONG Juan, ZHANG Zhi-Jun, WU Ling-Yan,
HUANG Xuan-Ying, CHEN Min-Er, JIAN Yan-Ting

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Emergency Test for Dangerous Chemicals, China National Analytical Center, Guangzhou 510070, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method of uncertainty evaluation for the detection of aerobic plate count in pork. **Methods** Based on JJF 1059.1-2012 *Evaluation and Expression of Uncertainty in Measurement*, GB 4789.2-2010 *Microbiological Examination of Food Hygiene-Detection of Aerobic Bacterial Count*, and related statistical methods, uncertainty of the samples was evaluated. **Results** According to the methods, the extended uncertainty was 0.090 with $k=2$ based on 10 times of determination of the same pork sample under the same condition. **Conclusion** Evaluation method used in this study can estimate the uncertainty of test results of a single sample, which is suitable to evaluate the uncertainty of colony count in the daily work.

KEY WORDS: pork; aerobic bacterial count; uncertainty

1 引言

随着生活水平和经济水平的发展提高, 人们对食品营养、食品安全的要求越来越高。食品菌落总数是用来判

定食品被细菌污染的程度, 可用于对食品卫生进行评价。在生产、流通、存储食品等过程中都必须检验其中的菌落总数。在日常检验工作中极少涉及谈论微生物检验中的误差。由于微生物在样品中分布不均匀, 菌落总数的检测误

基金项目: 广东省省级科技计划项目(粤科规财字[2014]208号, 2013B091604003, 2014B070705001)

Fund: Supported by Guangdong Provincial Science and Technology Projects (Guangdong Branch Planning and Finance Word [2014]NO.208, 2013B091604003, 2014B070705001)

*通讯作者: 蔡大川, 高级工程师, 主要研究方向为食品检测技术和管理工作。E-mail: cai-dachuan@21cn.com.

黄启红, 助理研究员, 主要研究方向微生物分析和研究。E-mail: 39341441@qq.com.

*Corresponding author: CAI Da-Chuan, Senior Engineer, Guangdong Provincial Key Laboratory of Emergency Test for Dangerous Chemicals, China National Analytical Center, Guangzhou 510070, China. E-mail: cai-dachuan@21cn.com

HUANG Qi-Hong, Research Assistant, Guangdong Provincial Key Laboratory of Emergency Test for Dangerous Chemicals, China National Analytical Center, Guangzhou 510070, China. E-mail: 39341441@qq.com

差问题更为突出, 实验室应具有评定测量不确定度的程序并应用在日常检测中^[1]。国家统一使用的 ISO/IEC 17025: 2005《检测和校准实验室能力认可准则》^[2]对测量不确定度的评定有了明确要求, 指出在必要时对测量结果的不确定度进行评定。《实验室资质认定评审准则》对测量不确定度也作了如下要求: 不确定度与检测或校准结果的有效性或应用有关, 或不确定度影响到对结果符合性的判定时, 报告还需要包括不确定的信息。测量不确定度的评定是实验室内外质量管理的重要组成部分, 在微生物实验室内部质量控制中也极其重要^[3]。检测工作的测量结果都存在不确定度而且不可避免^[4]。目前国际上通用的衡量测量结果可靠的统一尺度主要是测量不确定度, 测量不确定度的正确评定在客观分析测量结果中具有重要意义^[5]。

CNAS-CL07《测量不确定度的要求》^[6]8.2 条款中提出, 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。尤其当不确定度与检测结果的有效性或应用或客户要求或其他相应条件有关时, 检测报告中必须提供测量结果的不确定度。食品检测中限用药和禁用药也有要求检出限应尽可能低^[7]。所以, 临界点的检测结果是否可用很大程度上取决于其测量不确定度的大小, 测量不确定度在微生物检验中具有重要意义。

本研究对猪肉中菌落总数的日常检测结果进行不确定度的评定, 以期科学公正评定测试的结果提供依据。检测过程中会出现各种随机情况影响检测结果, 因此样品重复性检测次数越多, 所获得的检测重复性引入的标准偏差可靠性越高^[8]。由于微生物检测的特点, 同一样品重复检测的结果往往相差较大, 即分散性较大; 与操作过程中的其他因素相比较, 检测结果的分散性对结果不确定贡献较大, 因此根据相关要求, 菌落总数测定结果的不确定度采用检测结果的分散性进行评定^[9,10], 其他不确定度可以忽略不计。本研究按照《测量不确定度评定与表示》^[4]分析检测结果不确定度的来源并建立数学模型, 对猪肉中菌落总数检验结果的不确定结果进行评定。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

样品购自广州先烈中路肉菜市场。

平板计数琼脂为广东环凯微生物科技有限公司生产, 按照说明配制。

2.2 样品的制备

无菌条件下, 无菌操作称取 25 g 样品, 放入含有 225 mL 灭菌的生理盐水中, 均质后经充分振匀后制成 1: 10 均匀的样品稀释液, 再用 1 mL 灭菌吸管吸取 1: 10 的样品稀释液 1 mL, 沿管壁缓缓注入含有 9 mL 灭菌生理盐水的试管内, 振荡试管使之混合均匀, 制成 1: 100 的稀释液; 以

此类推, 按上述操作顺序做 10 倍递增稀释液, 如此每递增稀释 1 次, 即换用 1 支灭菌吸管。

分别吸取 1: 10, 1: 100, 1: 1000, 1: 10000 共 4 个稀释度的稀释液各 1 mL 于无菌培养皿中, 每个稀释度做 2 个平板即双平行, 同时分别取 1 mL 生理盐水做空白对照; 将冷却到约 46 °C 的平板计数琼脂培养基约 15 mL 注入培养皿, 并转动平皿使之混合均匀; 待琼脂凝固后, 翻转平板, 置 (36±1) °C 培养箱内培养(48±2) h。

用肉眼或菌落计数器计数, 求出相同稀释度的各平板平均菌落总数。按菌落计数原则选择平板菌落总数在 30~300 之间的稀释度, 乘以稀释倍数报告菌落总数。

2.3 检测方法

按照 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》^[11]进行检测, 利用平板计数琼脂 (plate count agar, PCA) 培养基对猪肉样品进行菌落总数重复性测定。

2.4 不确定度模型

菌落总数的计算公式参考以下数学模型:

$Y=KX/V$, Y : 样品菌落总数, CFU/g; 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 结果与分析

3.1 不确定度评定

测定结果根据不同稀释度, 依照 GB 4789.2-2010 中的规定, 计算结果, 得出菌落数 X_i 。对 10 次测定结果取对数 $\lg x_i$ (i : 为第 i 次测定); 计算 10 次测定结果的对数 $\lg x_i$ 的平均值 $\overline{\lg x}$; 计算 10 次测定的残差 $\lg x_i - \overline{\lg x}$; 根据置信概率 $P=95\%$ 和自由度 $\nu=9$, 由 t 分布得到包含因子 $k=2$, 并计算不确定度。对猪肉样品微生物菌落总数 10 次重复测定的结果见表 1。

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可以得出以下数据。

实验标准偏差:

$$S(\lg x) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\lg x_i - \overline{\lg x})^2}{n-1}} = 0.0640$$

在日常检测中, GB 4789.2-2010 菌落总数检测中规定每个稀释度做 2 个平皿(双平行)后于(36±1) °C 培养(48±2) h 后进行计算菌落总数, 因此, 在日常检测中的 $n=2$ 。

标准不确定度:

$$U_A(Y) = \frac{s(\lg x)}{\sqrt{2}} = 0.0453$$

表 1 菌落总数检测结果及计算
Table 1 Results and calculation of total plate count

序号	测定结果 X_i	检测结果取对数 $\lg x_i$	对数平均值 $\overline{\lg x}$	残差 $\lg x_i - \overline{\lg x}$	残差平方 $(\lg x_i - \overline{\lg x})^2$
1	250000	5.3979		0.0423	0.0018
2	280000	5.4472		0.0916	0.0084
3	260000	5.4150		0.0594	0.0035
4	210000	5.3222		-0.0334	0.0011
5	200000	5.3010		-0.0546	0.0030
6	230000	5.3617	5.3556	0.0061	0.0000
7	180000	5.2553		-0.1003	0.0101
8	260000	5.4150		0.0594	0.0035
9	230000	5.3617		0.0061	0.0000
10	190000	5.2788		-0.0768	0.0059

实验标准偏差 $S(\lg x) = 0.0640$

相对标准不确定度:

$$U_{Arel}(Y) = \frac{U_A(Y)}{\lg x} = 0.0084$$

相对合成标准不确定度:

$$U_{Crel} = \sqrt{U_{Arel}(Y)^2} = 0.0084$$

实验测得菌落总数对数平均值为 $\overline{\lg x}$ 为 5.3556, 则检测结果的合成不确定度为: $U_C = U_{Crel} \times \overline{\lg x} = 0.0450$, 检测结果一般用扩展不确定度 U 来表示, 取置信概率为 95%, 包含因子 $k=2$ (有限次测量), 从而得出扩展不确定度: $U = kU_C = 2 \times 0.0450 = 0.090$ 。

3.2 测量结果报告

本实验菌落总数的结果表示为 $(5.3556 \pm 0.090) \text{CFU/g}$, $k=2$, 取反对数得取值区间为 184332~278997 CFU/g, 最终本实验猪肉样品的菌落总数应报告为: $(1.8 \sim 2.8) \times 10^5$ CFU/g, 包含因子 $k=2$, 或菌落总数估计值在 180000~280000 CFU/g 之间。

4 讨论

本研究依据 GB 4789.2-2010《食品安全国家标准 食品微生物学检验菌落总数的测定》^[11], 利用平板计数琼脂对猪肉中菌落总数进行测定, 对测定结果进行了不确定度分析, 最终给出不确定度。

首先要分析不确定度的主要来源。在测试样品过程中, 重复性(样品的均匀性、人员的计数、培养温度、测试环境、修约、取样的重复性及培养时间)、取样(稀释体积、取样体积)、培养条件(培养时间允差、培养适度的允差)等因素都是不确定度的来源。在微生物检验中, 由于 B 类不确定度对合成不确定度贡献较小, 重复测量带来的不确定度占

主要部分, 所以, 通常采用统计学的方法(A 类)评定测量不确定度, 运用贝赛尔公式计算标准偏差求标准不确定度一般要求 $n \geq 10$, 但实际工作中对每份样品进行 10 次重复检测是不切实际的, 而且在微生物检验中, 样品检验为破坏性取样, 样品检验后不得再进行重复性检测, 否则结果无意义, 因此微生物样品检测 10 次以上结果意义不大。鉴于此, 可以通过对一类样品的检测数据运用合并样品平方差的方法评定不确定度^[12,13], 本次实验是对同一样品进行 10 次重复检测, 得出的测量结果相差太大, 直接计算标准差不合适, 故取对数后进行计算。

其次, 根据各重复测定结果来计算不确定度。平板测试结果不是正态分布属于偏态分布, 这些数据必需转换成对数, 使其接近正态分布, 建立模型便于计算。因此在检验过程时, 必须严格控制好各步骤的实验条件, 在平行样测试时, 必须由同一检验人员进行操作, 最后将测试完成后得到的测试结果, 取对数用于进行菌落总数的不确定度评定。检验人员在检验过程中必须使用校准合格的计量器具, 并且严格按照操作规范进行检验, 尽量减小测量结果的不确定度, 以保证检测结果的准确。

另外, 微生物检测在采样时最好了解微生物在样品基质中的分布情况, 在进行不确定度评定时, 不推荐把此分量计算在内, 除非受委托人要求。原因在于样品基质中微生物分布所造成的不确定度并不属于实验室工作范畴之内, 样品间也存在个体差异, 且所用的检测方法也已考虑到样品的不均匀性, 所以在对取样量已有相应规定^[14]。

在检验测试工作中, 对于检验结果在限量标准附近的样品进行合格评定时, 应根据 CNAS-CL08: 2006《评价和报告测试结果与规定限量的符合性的要求》^[15]附录进行, 在 95%置信概率下, 当检验结果延伸扩展不确定度半宽度

后仍小于(大于)限量标准时。当检验结果低于(高于)限量标准的部分小于测量不确定度,则在95%置信概率上不能做出符合(不符合)限量标准的声明^[16]。

猪肉菌落总数检验不确定度的评定既有利于检验人员分析和了解检验结果与真实值之间的差距,也可供客户对该结果进行评价,更进一步方便地了解检验水平,为保障食品安全奠定理论基础。

参考文献

- [1] ISO/IEC 17025: 2005. 检测和校准实验室能力的通用要求[S].
ISO/IEC 17025: 2005. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories [S].
- [2] ISO/IEC 17025: 2005 检测和校准实验室能力认可准则[S].
ISO/IEC 17025: 2005 Testing and calibration laboratory criteria for recognition [S].
- [3] 王允田, 张永俊. 农村饮用水菌落总数检验中不确定度的评定[J]. 职业卫生与病伤, 2009, 24(6): 365-366.
Wang YT, Zhang YJ. Uncertainty evaluation of aerobic plate count in rural drinking water [J]. J Occup Health Dmage, 2009, 24 (6): 365-366.
- [4] JJF1059.1-2012. 测量不确定度评定与表示[S].
JJF1059.1-2012. Evaluation and expression of uncertainty in measurement [S].
- [5] 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.
Wang SC. Food analysis and quality assurance and laboratory accreditation [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2004.
- [6] CNAS-CL07: 2011 测量不确定度的要求[S].
CNAS-CL07: 2011 Requirements for measurement uncertainty [S].
- [7] GB/T 27404-2008 实验室质量控制规范 食品理化检测[S].
GB/T 27404-2008 Criterion on quality control of laboratories-Chemical testing of food [S].
- [8] 杨秀梅, 刘养仲, 孙德刚, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定兔肉中氟苯尼考含量的不确定度评估[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(2): 612-616
Yang XM, Liu YZ, Sun DG, *et al.* Assessment of the uncertainty in determination of florfenicol in rabbit meat by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2016, 7(2): 612-616.
- [9] 张秀丰, 翟硕莉, 王雪莲, 等. 速冻草莓菌落总数检验中不确定度的评定[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(6): 1831-1834.
Zhang XF, Zhai SL, Wang XL, *et al.* Uncertainty assessment in detection of total bacterial colony in frozen strawberry [J]. J Food Saf Qual, 2016, 7(2): 1831-1834.
- [10] Yang T. 全脂乳粉需氧芽孢总数检验中不确定度的评定[J]. 食品与机械, 2013, 29 (15806): 82-84.
Yang T. Assessment on uncertainty of total aerobic bacterial spores in whole milk powder [J]. Food Mach, 2013, 29(15806): 82-84.
- [11] GB 4789.2-2010. 食品安全国家标准食品微生物学检验菌落总数的测定 [S].
GB 4789.2-2010. National food safety standard-Food microbiological examination: Aerobic plate count [S].
- [12] 徐品, 张宜友, 张默宇, 等. 水质检验中菌落总数测定的不确定度评定[J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 2109: 2224-2225.
Xu P, Zhang YY, Zhang MY, *et al.* Evaluation on uncertainty level in detecting bacterial colony number of drinking water [J]. Chin J Health Labor Tech, 2011, 2109: 2224-2225.
- [13] 杨滴, 刘彦泓, 刘岑杰, 等. 熟肉制品菌落总数检验的不确定度评定[J]. 品牌与标准化, 2010, (4): 19-20.
Yang D, Liu YH, Liu CJ, *et al.* The uncertainty evaluation of total number of colonies in cooked meat products [J]. Brand Stand, 2010, (4): 19-20.
- [14] 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, 12, 15(6): 6-8.
Sui Y, Wu XJ, Cao J, *et al.* The uncertainty evaluation of total number of colonies in food [J]. Jiangsu Health Care, 2013, 15(6): 6-8.
- [15] CNAS-CL08. 评价和报告测试结果与规定限量符合性的要求[S].
CNAS-CL08. Requirements for assessment and reporting of compliance with specification [S].
- [16] 罗惠名, 幸庆武, 张敏洁. 国标法测定即食紫菜菌落总数结果的不确定度评定及应用[J]. 检验检疫学刊, 2010, 20(2): 51-52.
Luo HM, Xing QW, Zhang MJ. Evaluation and application of measurement uncertainty in aerobic bacterial count of instant laver by GB method [J]. J Inspect Quarant, 2010, 20(2): 51-52.

(责任编辑: 姚菲)

作者简介



蔡大川, 学士, 高级工程师, 主要研究方向为食品检测技术和管理工作。
E-mail: cai-dachuan@21cn.com



黄启红, 硕士, 助理研究员, 主要研究方向为微生物分析和研究。
E-mail: 39341441@qq.com