

洁净室中沉降菌测量不确定度评定

李诗华, 李建新*, 刘长富, 蔡伟江

(汤臣倍健股份有限公司, 珠海 519040)

摘要: 目的 计算洁净室中沉降菌测量的不确定度。**方法** 建立数学模型, 评估和量化沉降菌测定过程中可能产生影响的各个不确定度分量, 分别计算 A、B 类各不确定度分量值、合成标准不确定度、扩展不确定度。

结果 沉降菌的菌落数为 4 个/皿时, 其合成标准不确定度为 0.861 个/皿, 取包含因子 $k=2$ (置信概率为 95%), 沉降菌的扩展不确定度为 $U=u_c \times k = 0.861 \times 2 \approx 2$ 个/皿; 洁净区沉降菌结果为 (4 ± 2) 个/皿, $k=2$ 。**结论** 对于洁净室沉降菌的不确定度评定, 其中 A 类不确定度这一分量占比最大, B 类不确定度各个分量值均很小, 所以进行沉降菌的不确定度评定时主要是以 A 类不确定度为主, B 类不确定度所带来的影响可以忽略不计。

关键词: 沉降菌; 测量不确定度; 洁净室

Uncertainty evaluation for measurement of settling microbe in clean room

LI Shi-Hua, LI Jian-Xin*, LIU Chang-Fu, CAI Wei-Jiang

(By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China)

ABSTRACT: Objective To evaluate the uncertainty of measurement of settling microbe in clean room.

Methods The mathematical model was established to evaluate and quantify the various uncertainty components that might affect the sedimentation process, and the uncertainty component values of A and B, the synthetic standard uncertainty, and the extended uncertainty were calculated. **Results** When the colony number of settling microbe was 4/plate, the standard uncertainty of synthesis was 0.861/plate. Taking the inclusion factor $k=2$ (95% confidence level), the extended uncertainty of settling microbe was $U=u_c \times k = 0.861 \times 2 \approx 2$ /plate, and the result of settling microbe in the clean area was (4 ± 2) /plate, $k=2$. **Conclusion** For the uncertainty assessment of clean room settling bacteria, the component of class A uncertainty accounts for the largest proportion, and the component of class B uncertainty is small. Therefore, the uncertainty of the settlement bacteria is mainly based on the class A uncertainty, and the impact of the class B uncertainty is negligible.

KEY WORDS: settling microbe; measurement uncertainty; clean room

1 引言

沉降菌(settling microbe)是指通过自然沉降原理收集在空气中的生物粒子置于培养基中生长繁殖到肉眼可见的菌落数^[1]。沉降菌检测^[2-4]通常是把配制好的大豆酪蛋白琼脂培养基倒进 $\varnothing 90 \text{ mm} \times 15 \text{ mm}$ 的玻璃平皿中, 敞开平皿, 静置, 收集在空气中的生物粒子, 其中静态测试时, 培养

皿暴露时间为 30 min 以上, 动态测试时, 培养皿暴露时间为不大于 4 h, 然后在 33 °C 生化培养箱^[5]中培养 5 d, 以培养皿中的沉降菌菌落数来判定洁净环境内的活微生物数, 并以此来评定洁净室的洁净度^[6]。其主要用于医药工业洁净室、无菌室或局部空气净化区域(包括洁净工作台的)沉降菌的测试和环境的验证, 是进行洁净室环境洁净监测的三大途径之一^[7-10]。

*通讯作者: 李建新, 主要研究方向为膳食营养补充剂的质量检测。E-mail: 815455530@qq.com

*Corresponding author: LI Jian-Xin, By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China. E-mail: 815455530@qq.com

测量不确定度是根据所用到的信息表征赋予被测量值分散性的非负参数^[11-15]。目前沉降菌检测测量不确定评定的数据较少,本研究通过进行洁净室中沉降菌检测测量不确定度评定的来源分析与数据计算,以期建立沉降菌的测量不确定度方法评定提供参考以及对检测结果进行评估,为保证测试结果的可靠性和准确性,对沉降菌测试流程的影响进行不确定度评估。

2 材料与方法

2.1 仪器

SPX-250SII型生化培养箱(上海新苗医疗器械制造有限公司); LT1002E 电子天平(常熟市天量仪器有限责任公司); 量筒(500 mL, 天津市天玻玻璃仪器有限公司); WS-1 温湿度计(天津凤洋公司); W11AB KM 压差表(美国MAGNEHELIC公司)。

2.2 培养基

大豆酪蛋白琼脂培养基(soy casein agar medium, TSA)(广东环凯微生物科技有限公司)。

2.3 测试方法

选取微生物检测室万级洁净区(3.4 m×3.5 m=11.9 m², 高度 3.0 m), 根据沉降菌的测试规则, 将配制好的大豆酪蛋白琼脂培养基倒进已灭菌的培养皿中, 按照采样点布置图(6个采样点)逐个放置已制备好的培养皿, 然后从里到外逐个打开培养皿盖, 使培养基表面暴露在空气中 4 h 进行静态测试(1人在洁净区中), 培养 5 d 后记录菌落数^[1]。

2.4 建立数学模型

根据 GB/T 16294-2010 医药工业洁净室(区)沉降菌的测试方法^[1]中沉降菌每个测点的结果计算公式及过程, 沉降菌的数学模型模型可表示为:

$$M = \frac{\sum_{i=1}^n A_i}{n} \quad (1)$$

式(1)中:

M : 采样点沉降菌数;

A_i : 为某一采样点沉降菌菌落数($i=1, 2, \dots, n$), 个/皿;

n : 为采样点总数, 个。

2.5 确定不确定度的来源

影响沉降菌测量结果的主要因素有: ①各采样点的分布测量结果引入的不确定度; ②人员间计数差异引入的不确定度; ③测量的环境条件引入的不确定度; ④培养箱的温度误差引入的不确定度; ⑤天平称量误差引入的不确定度; ⑥量具的误差引入的不确定度^[16]。

3 结果与分析

3.1 标准不确定度的 A 类评定

3.1.1 各采样点的分布测量结果引入的标准不确定度 $u(y)$
根据表 1 的测试结果, 进行测量不确定度的 A 类评定。

表 1 不同采样点沉降菌菌落结果
Table 1 Results of settling microbe from different sampling points

采样点	1	2	3	4	5	6	平均值
采样点沉降菌数 (个/皿)	4	6	3	2	2	7	4

各采样点的分布测量结果引入的标准不确定度 $u(y)$:

$$u(y) = \frac{s(A_i)}{\sqrt{n}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (A_i - M)^2}{(n-1) \times n}} = 0.856 \quad (2)$$

式(2)中,

$s(A_i)$: 标准偏差;

A_i : 某一采样点的沉降菌菌落数;

M : 总平均沉降菌菌落数;

n : 采样点数。

3.1.2 人员间计数差异引入的标准不确定度 $u(j)$

记录 10 名微生物检测人员对同一平皿(2 个检测点)进行计数的结果

由表 2 数据可以得出, 对于沉降菌检测项目, 不同微生物检测人员对同一平皿进行计数的结果无差异, 因此人员间计数差异引入的不确定度 $u(j)$ 可忽略不计。

表 2 不同检测人员对同一平皿计数结果
Table 2 Results of counting the same dish by different testers

人员	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
平皿 1 (个/皿)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
平皿 2 (个/皿)	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6

3.1.3 A 类相对标准不确定 $u(A)$

$$u(A) = \frac{u(y)}{M} = \frac{0.856}{4} = 0.214 \quad (3)$$

式(3)中:

M : 总平均沉降菌菌落数;

$u(y)$: 各采样点的分布测量结果引入的标准不确定度。

由式 3 可知, A 类相对标准不确定度为 0.214。

3.2 标准不确定度的 B 类评定

3.2.1 测量环境条件的相对标准不确定度 $u(h)$

环境影响因素主要有温度、相对湿度、压差等, 所以

测量环境条件的相对标准不确定度 $u(h)$ 按公式(4)计算^[17]。

$$u(h) = \sqrt{u(h_1)^2 + u(h_2)^2 + u(h_3)^2} \quad (4)$$

式(4)中:

$u(h_1)$: 温度引入的相对标准不确定度;

$u(h_2)$: 相对湿度引入的相对标准不确定度;

$u(h_3)$: 压差引入的相对标准不确定度。

查温湿度计、压差计的校准报告, 温度的扩展不确定度 $U=0.4\text{ }^\circ\text{C}(k=2)$, 相对湿度的扩展不确定度 $U=2.0\%\text{RH}(k=2)$, 压差的扩展不确定度 $U=1.4\%\text{FS}$ 。洁净室温度为 $22.5\text{ }^\circ\text{C}$ 、湿度为 55.3% 、压差为 28 Pa 。

(1) 温度引入的相对标准不确定度 $u(h_1)$

$$u(h_1) = \frac{U}{k \times 22.5} = \frac{0.4}{2 \times 22.5} = 0.00889 \quad (5)$$

(2) 湿度引入的相对标准不确定度 $u(h_2)$

$$u(h_2) = \frac{U}{k \times 55.3} = \frac{2.0}{2 \times 55.3} = 0.0181 \quad (6)$$

(3) 压差引入的相对标准不确定度 $u(h_3)$

$$u(h_3) = \frac{U}{k \times 28} = \frac{1.4 \times 28}{2 \times 28 \times 100} = 0.0070 \quad (7)$$

测量环境条件的相对标准不确定度 $u(h)$

$$u(h) = \sqrt{u(h_1)^2 + u(h_2)^2 + u(h_3)^2} \\ = \sqrt{0.00889^2 + 0.0181^2 + 0.0070^2} = 0.0213 \quad (8)$$

3.2.2 培养箱温度误差引入的相对标准不确定度 $u(T)$

查所使用培养箱的校准报告, 其扩展不确定度为 $U_T=0.2\text{ }^\circ\text{C}$, $k=2$, 培养箱温度的相对标准不确定度 $u(T)$ 为:

$$u(T) = \frac{U_T}{35 \times k} = 0.0029 \quad (9)$$

3.2.3 天平称量误差引入的相对标准不确定度 $u(m)$

培养基配制方法是称量 16 g 大豆酪蛋白琼脂培养基, 加入 400 mL 蒸馏水, 搅拌溶解后灭菌, 查询所使用天平的校准报告, 载荷为 20 g 时, 天平的扩展不确定度 $U=0.03\text{ g}$, $k=2$, 计算天平称量所引入的相对标准不确定度(u_m)为:

$$u(m) = \frac{U}{16 \times k} = \frac{0.03}{16 \times 2} = 0.00094 \quad (10)$$

3.2.4 量具的误差引入的相对标准不确定度 $u(L)$

查量筒的校准报告, 其扩展不确定度 $U=1.0\text{ mL}(k=2)$

$$u(L) = \frac{U}{k \times 400} = \frac{1.0}{2 \times 400} = 0.00125 \quad (11)$$

3.2.5 B类标准不确定度($u(B)$)

$$u(B) = \sqrt{u_h^2 + u_T^2 + u_m^2 + u_L^2} \\ = \sqrt{0.0213^2 + 0.0029^2 + 0.00094^2 + 0.00125^2} = 0.0216 \quad (12)$$

由式 12 可知, B类标准不确定度为 0.0216 。

3.5 合成标准不确定度(u_c)及扩展不确定度(U)

$$u_c = \sqrt{u(A)^2 + u(B)^2} \times 4 = 0.861\text{ 个/皿} \quad (13)$$

取包含因子 $k=2$ (置信概率为 95%), 沉降菌的扩展不

确定度为:

$$U = u_c \times k = 0.861 \times 2 = 2\text{ 个/皿} \quad (14)$$

3.6 不确定度报告

万级洁净室沉降菌结果为 (4 ± 2) 个/皿, $k=2$ 。

4 结 论

从以上分析可以看出, 对于沉降菌的不确定度评定, 其中 A类相对标准不确定度这一分量最大, 为 0.214 ; B类相对标准不确定度这一分量为 0.0216 , 其中测量环境条件的相对标准不确定度为 0.0213 , 培养箱温度误差引入的相对标准不确定度为 0.0029 , 天平引入的相对标准不确定度为 0.00094 , 量具的误差引入的相对标准不确定度为 0.00125 。B类相对标准不确定度分量约为 A类相对标准不确定度分量的 10% , 所以对于沉降菌的不确定度评定, 主要是以 A类不确定度为主, B类不确定度所带来的影响可以忽略不计。

参考文献

- [1] GB/T 16294-2010 医药工业洁净室(区)沉降菌的测试方法[S]. GB/T 16294-2010 Test method for settling microbe in cleanroom (zone) of the pharmaceutical [S].
- [2] 李天翥, 齐岩. 沉降菌测试暴露时间与培养基失水率和微生物回收率的考察与研究[J]. 生物技术世界, 2016, (1): 243-244. Li TZ, Qi Y. Investigation and study on the exposure time of settling microbe and the rate of medium water loss and microbial recovery [J]. Bio Technol World, 2016, (1): 243-244.
- [3] 林子琳. 洁净室沉降菌检测采样点高度影响考察研究[J]. 海峡医药, 2017, 29(7): 5-7. Lin ZL. Studies on sampling height of method for settling microbe in clean room [J]. Strait Pharmaceut J, 2017, 29(7): 5-7.
- [4] 洪双豪, 杜少平, 郑飞龙. 洁净手术室悬浮粒子与沉降菌检测结果分析[J]. 轻工科技, 2017, (2): 100-101. Hong SH, Du SP, Zheng FL. Analysis of suspended particle and settling microbe detection results in clean operating room [J]. Light Ind Sci Technol, 2017, (2): 100-101.
- [5] 杜宏伟, 姚巍. 温度对培养沉降菌的影响[J]. 科技论坛, 2012, (11): 30. Du HW, Yao W. Effect of temperature on culture of sedimentating bacteria [J]. Sci Technol Forum, 2012, (11): 30.
- [6] 易建钢, 王巍峰. 浅谈洁净区环境的控制[C]. 第三届中国兽药大会-动物药品分会论文集, 2010: 190-191. Yi JG, Wang WF. Discussion on the control of clean area environment [C]. Proceedings of the third China veterinary medicine conference-Animal medicine branch, 2010: 190-191.
- [7] JJF 1059.1-2012 测量不确定度评定与表示[S]. JJF 1059.1-2012 Evaluation and expression of uncertainty in measurement [S].
- [8] 王娟, 许春, 李兵兰, 等. 荆防颗粒微生物需氧菌总数不确定度评定[J]. 中国药师, 2018, 21(2): 363-365. Wang J, Xu C, Li BL, et al. Uncertainty evaluation for total aerobic

- microbial count of Jingfang granule [J]. *China Pharm*, 2018, 21(2): 363–365.
- [9] 林金有. 食品中致病微生物检测结果的不确定度[J]. *食品安全导刊*, 2018, (1): 71–72.
Lin JY. Uncertainty of the results of pathogenic microorganisms in food [J]. *Food Saf Magaz*, 2018, (1): 71–72.
- [10] 张文刚, 姜芹, 孙冰清, 等. 抗生素微生物检定法测定酒石酸泰万菌素预混剂含量的不确定度分析[J]. *上海畜牧兽医通讯*, 2018, (2): 5–7.
Zhang WG, Jiang Q, Sun BQ, *et al.* Determination of tebanectin tartrate by microbial assay uncertainty analysis of premix content [J]. *Shanghai Anim Husb Veter New*, 2018, (2): 5–7.
- [11] 李欣南. 饲用微生物添加剂地衣芽孢杆菌活菌计数不确定度评定方法的建立[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(11): 3414–3418.
Li XN. Establishment of method for the uncertainty evaluation in viable count of *Bacillus licheniformis* feed microorganism additive [J]. *J Food Saf Qual*, 2019, 10(11): 3414–3418.
- [12] 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.
Yang LL, Li HF. Uncertainty evaluation of aerobic plate count in food by blindness examination [J]. *J Food Saf Qual*, 2018, 9(14): 3780–3783.
- [13] 冯秀娟, 邓军, 高俊峰. 发酵乳中乳酸菌计数不确定度的评定[J]. *现代食品*, 2018, (1): 93–97.
Feng XJ, Deng J, Gao JF. Uncertainty evaluation of lactic acid bacteria count in fermented milk [J]. *Mod Food*, 2018, (1): 93–97.
- [14] 岳苑, 马桂娟. 全脂乳粉中菌落总数的测量不确定度评定[J]. *食品与发酵科技*, 2018, 54(3): 124–126.
Yue Y, Ma GJ. Uncertainty measurement of total colony in whole milk powder products [J]. *Food Ferm Sci Technol*, 2018, 54(3): 124–126.
- [15] 车芳萍, 赵梦芸, 陈艳. 食品(糕点)中菌落总数测量不确定度评定[J]. *现代食品*, 2018, (1): 100–102.
Che FP, Zhao MY, Chen Y. Evaluation of uncertainty in measurement of total number of colonies in foods (Pastry) [J]. *Mod Food*, 2018, (1): 100–102.
- [16] 廖波, 吴永智, 肖莉. 洁净室沉降菌监测影响因素分析[J]. *中国卫生产业*, 2017, (3): 45–48.
Liao B, Wu YZ, Xiao L. Analysis of influencing factors of settling microbe monitoring in clean room [J]. *Chin Health Ind*, 2017, (3): 45–48.
- [17] 黄勇. 洁净室中浮游菌测量不确定度的评定[J]. *现代仪器与医疗*, 2014, 20(6): 73–76.
Huang Y. The assessment of the measurements uncertainty of airborne microbe in clean room [J]. *Mod Instrum Med*, 2014, 20(6): 73–76.

(责任编辑: 陈雨薇)

作者简介



李诗华, 主要研究方向为膳食营养补充剂的质量检测。
E-mail: 921865587@qq.com



李建新, 主要研究方向为膳食营养补充剂的质量检测。
E-mail: 815455530@qq.com