

菌落总数测定结果不确定度的评定

韦云, 杨丹婷, 苏妙贞, 周露*

(广东省食品检验所, 广州 510435)

摘要: **目的** 对质控样中菌落总数测定结果进行不确定度评定。**方法** 菌落总数测定依据 GB 4789.2-2016《食品安全国家标准食品微生物学检验 菌落总数测定》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** 扩展不确定度为 0.08, 结果对数值取值区间为(3.85±0.08), 取反对数取值区间则为(5900, 8500)。**结论** 本方法可有效评定菌落总数的不确定度。

关键词: 菌落总数; 不确定度; 评定

Evaluation of uncertainty in the results of aerobic plate count

WEI Yun, YANG Dan-Ting, SU Miao-Zhen, ZHOU Lu*

(Guangdong Institute of Food Inspection, Guangzhou 510435, China)

ABSTRACT: Objective To evaluate the uncertainty of the total number of colonies in the quality control sample. **Methods** The aerobic plate count was determined and judged according to GB 4789.2-2016 “National Food Safety Standard for Microbiological Inspection of Food”. The uncertainty components introduced in the determination process were evaluated according to JJF 1059.1-2012 “Evaluation and Representation of Uncertainty in Measurement”. Then, the uncertainty of aerobic plate count was calculated and evaluated by a synthetic method. **Results** The extended uncertainty was 0.08, and the value range of the corresponding value was (3.85±0.08), and the value range of the opposite value was (5900, 8500). **Conclusion** This method is effective to evaluate the uncertainty of aerobic plate count.

KEY WORDS: aerobic plate count; uncertainty; evaluation

1 引言

CNAS-CL07:2011《测量不确定度的要求》^[1]中明确规定: 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不确定度评估, 对于不同的检测项目和检测对象, 可以采用不同的评估方法。在实际工作中, 结果的不确定度有多种来源, 如: 基体效应和干扰、取样过程、容器容量的不确定度、测量方法和程序中的估计和假定等^[2], 往往会给结

果分析带有一定的误差, 很难保证结果的准确性, 因此有效地对检测结果进行不确定度评定显得尤为重要。我国最新国家标准方法 GB 4789.2-2016《食品安全国家标准食品微生物学检验 菌落总数测定》^[3]规定菌落总数是指食品检样经过处理, 在一定条件下(如培养基、培养温度和培养时间等)培养后, 所得 1 g(或 1 mL)检样中形成的微生物菌落总数。食品中菌落总数测定是用来判定食品被细菌污染的程度的标志及卫生质量, 它反映食品在生产过程中是否符合卫生

基金项目: 广东省食品药品监督管理局科技创新项目(2018ZDZ07)

Fund: Supported by the Science and Technology Innovation Project of Guangdong Food and Drug Administration (2018ZDZ07)

*通讯作者: 周露, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品生物安全。E-mail: zhoululu1982@sohu.com

*Corresponding author: ZHOU Lu, Ph.D, Senior Engineer, Guangdong Institute of Food Inspection, Guangzhou 510435, China. E-mail: zhoululu1982@sohu.com

要求, 可为被检样品卫生学评价提供依据。菌落总数的多少在一定程度上标志着食品卫生质量的优劣。因此, 准确地测定食品中菌落总数具有十分重要的意义。

目前国内现有的食品微生物实验室均采用 GB 4789.2-2016《食品安全国家标准食品微生物学检验菌落总数测定》^[3]来进行菌落总数的测定。在日常检测过程中, 检测结果的准确性受到多种干扰因素的影响, 因此提高检测结果的准确性及其必要^[4]。分析检测结果的不确定度是一项提升检测结果可信度的有效方法^[5]。但目前由于微生物计量的特殊性, 不确定度评定大多是在理化实验室开展^[6], 在微生物实验室实际应用并不多。因此, 本研究采用平板计数法测定质控样中的菌落总数, 建立菌落总数测定结果不确定度评定的基本方法, 分析检测过程中影响结果的主要因素, 提升检测结果的可信度, 以期为今后食品中菌落总数测定的准确性提供有力的保障。

2 材料与方法

2.1 材料与仪器

磷酸盐缓冲液(批号: 1069771, 广东环凯微生物科技有限公司); 平板计数琼脂(广东环凯微生物科技有限公司, 批号: 1073705); 质控样品(中国计量科学研究院分发)。

LRH-250 型生化培养箱(上海一恒科学仪器有限公司); SX-700 型高压灭菌锅(日本 TOMY 公司); MS3 型漩涡混合器(德国 IKA 公司); SW-CJ-2F 超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 检测依据

GB 4789.2-2016《食品安全国家标准食品微生物学检验 菌落总数测定》^[3]。

2.2.2 检测流程

每个单元的样品净含量为 0.5 g, 加入 4.5 mL 无菌磷酸盐缓冲液或无菌生理盐水充分溶解, 充分混匀, 制成 1:10 的样品匀液。用 1 mL 无菌吸管或移液器吸取 1:10 的样品匀液 1 mL, 沿管壁缓缓注入 9 mL 无菌磷酸盐缓冲液或生理盐水的无菌试管中(注意吸管或吸头尖端不要触及稀释液面), 振荡试管或换用 1 支 1 mL 无菌吸管反复吹打, 使其混合均匀, 制成 1:100 的样品匀液。按照上述操作, 依次制成十倍递增系列稀释样品匀液, 每递增稀释一次换用 1 次 1 mL 无菌吸管或吸头。

选择 3 个适宜的连续稀释度, 每个稀释度接种至少 3 个无菌平皿, 每皿 1 mL(注: 当选择 1:10 样品匀液倾注平板时, 每皿 0.5 mL)。同时取 1 mL 生理盐水加入无菌平皿, 采用相同的试剂, 在相同的条件下作空白对照。将 10~15 mL 冷至(46±0.5) °C 的平板计数琼脂培养基(可放置于(46±1) °C 恒温水浴箱中保温)倾注于每个平皿中, 并小心旋转平皿, 使得培养基与样品匀液充分混匀。待琼脂凝固后, 将平板翻转, (36±1) °C 培养(48±2) h。

3 结果与分析

3.1 建立数学模型和计算结果

选取菌落数在 30~300 CFU 之间的平板计数菌落总数。根据 GB 4789.2-2016^[3], 菌落总数的计算公式为:

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

式中, N 为样品中菌落数; $\sum C$ 为平板(含适宜范围菌落数的平板)菌落数之和; n_1 为第一稀释度(低稀释倍数)平板个数; n_2 为第二稀释度(高稀释倍数)平板个数; d 为稀释因子(第一稀释度)。当只有一个稀释倍数的平板菌落数在计数范围内, $n_2=0$ 。本实验在重复性条件下对 3 个样品进行 3 个重复的测定, 考虑到结果的分散性, 将计算得到的菌落数转换为对数值之后再计算其不确定度。详见表 1。

表 1 3 个样品中菌落总数测定及计算结果

Table 1 Determination of colony count in 3 samples and calculation results

样品	编号	测定结果/(CFU/g)	测定结果对数转换值 [Lg(CFU/g)]	测定结果对数转换值的极差 R[Lg(CFU/g)]
U ₁	重复 1	7600	3.88	0.05
	重复 2	7600	3.88	
	重复 3	6800	3.83	
U ₂	重复 1	6200	3.79	0.06
	重复 2	6900	3.84	
	重复 3	7200	3.86	
U ₃	重复 1	7100	3.85	0.03
	重复 2	7200	3.86	
	重复 3	6700	3.83	

$$\lg \bar{X} = 3.85$$

3.2 不确定度来源

测量不确定度一般由若干分量组成, 其评定可分为 A 类评定和 B 类评定。测量不确定度的 A 类评定是指其中一些分量可根据一系列测量值的统计分布, 并可用标准偏差表征; 测量不确定度的 B 类评定是指另一些分量可根据基于经验或其他信息获得的概率密度函数, 也可用标准偏差表征^[7]。本研究中菌落总数测定结果的不确定度主要有以下几个来源^[7-9]: 样品重复性测定引入的相对标准不确定度评定 $u_{\text{rel}}(\text{method})$; 样品制备过程中稀释液体积引入的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(V)$; 样品加样体积引入的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(V)$; 样品稀释过程中引入的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(d)$ 。

3.2.1 样品重复性测定引入的相对标准不确定度评定 $u_{\text{rel}}(\text{method})$

本次比对实验过程中, 测定了 3 个平行样品, 根据表 1 的结果采用合并样本标准偏差的方法计算平板计数方法引入的相对标准不确定度。每个样本测量了 3 次, 因此每个样本的标准偏差采用极差法计算。按以下两个公式评定样品重复性测定引入的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(\text{method})$:

$$u_{\text{method}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^m S_i^2}{mn}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^m (R_i/C_n)^2}{mn}} = 0.02$$

$$u_{\text{rel}}(\text{method}) = \frac{u_{\text{method}}}{\lg \bar{X}} = 0.005$$

其中, u_{method} 为方法重复性引入的标准不确定度, s_i 是第 i 组测量的标准偏差; m 是测定的样品数量, $m=3$; n 为个样品重复测量次数, $n=3$; R_i 是第 i 个样品测量结果对数转换值的极差; C_n 是极差系数, $C_3=1.69$; $u_{\text{rel}}(\text{method})$ 为样品重复性测定引入的相对标准不确定度; $\lg \bar{X}$ 为测量结果对数转换值的平均值。

3.2.2 样品制备过程中稀释液体积引入的相对标准不确定度评定 $u_{\text{rel}}(V)$

用 10 mL 的移液枪吸取 4.5 mL 稀释液至比对样品中。由《JJG 646-2006 移液器检定规程》^[10]可知: 10 mL 移液枪(检定点 5 mL)的最大允许误差(maximum permissible errors, MPE)为 ± 0.03 mL, 矩形分布取 $\sqrt{3}$ 。按以下 2 个公式评定样品制备过程中稀释液体积引入的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(V)$:

$$u_V = \frac{\text{MPE}_V}{\sqrt{3}} = 0.02$$

$$u_{\text{rel}}(V) = \frac{u_V}{V} = 0.004$$

其中, u_V 为样品制备过程中稀释液体积引入的标准不确定度; MPE_V 为 10 mL 移液枪(检定点 5 mL)的最大允许误差; $\sqrt{3}$ 为矩形分布的包含因子 k ; $u_{\text{rel}}(V)$ 为样品制备过程中稀释液体积引入的相对标准不确定度; V 为样品制备过程中加入的稀释液体积。

3.2.3 样品加样体积引入的相对标准不确定度评定 $u_{\text{rel}}(V)$

用 1 mL 的移液枪吸取样品至平皿中。由《JJG

646-2006 移液器检定规程》^[10]可知: 1 mL 移液枪的最大允许误差(MPE_V)为 ± 0.01 mL, 矩形分布取 $\sqrt{3}$ 。按以下 2 个公式评定样品加样体积引入的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(V)$:

$$u_V = \frac{\text{MPE}_V}{\sqrt{3}} = 0.006$$

$$u_{\text{rel}}(V) = \frac{u_V}{V} = 0.006$$

其中, u_V 为样品加样体积引入的标准不确定度; MPE_V 为 1 mL 移液枪的最大允许误差; $\sqrt{3}$ 为矩形分布的包含因子 k ; $u_{\text{rel}}(V)$ 为样品加样体积引入的相对标准不确定度; V 为样品加样体积。

3.2.4 样品稀释过程中引入的相对标准不确定度评定 $u_{\text{rel}}(d)$

样品稀释过程采用 1 mL 移液枪和 10 mL 移液枪。按以下公式评定样品稀释过程中引入的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(d)$:

$$u_{\text{rel}}(d) = \sqrt{K \frac{V'^2}{V'^2 + v^2} \left[\left(\frac{u_{V'}}{V'} \right)^2 + \left(\frac{u_V}{V} \right)^2 \right]} = 0.006$$

其中, $u_{\text{rel}}(d)$ 为样品稀释过程中引入的相对标准不确定度; K 为 10 倍系列稀释次数; $u_{V'}$ 为样品稀释过程中稀释液体积引入的标准不确定度; u_V 为样品加样体积引入的标准不确定度; V' 为稀释过程中稀释液体积; V 为稀释过程中上一稀释度样品的体积。

3.2.5 合成不确定度 u_C 和扩展不确定度 U

测定结果的合成不确定度可由以下两个公式得出:

$$u_{\text{rel}}(C) = \sqrt{u_{\text{rel}}^2(\text{method}) + u_{\text{rel}}^2(V) + u_{\text{rel}}^2(v) + u_{\text{rel}}^2(d)} = 0.01$$

$$u_C = u_{\text{rel}}(C) \times \lg \bar{X} = 0.04$$

其中, $u_{\text{rel}}(C)$ 为合成相对标准不确定度; $u_{\text{rel}}(\text{method})$ 为方法重复性引入的相对标准不确定度; $u_{\text{rel}}(V)$ 为样品制备过程中稀释液体积引入的相对标准不确定度; $u_{\text{rel}}(V)$ 为样品加样体积引入的相对标准不确定度; $u_{\text{rel}}(d)$ 为样品稀释过程中引入的相对标准不确定度; u_C 为合成不确定度; $\lg \bar{X}$ 为测量结果对数转换值的平均值。

扩展不确定度 $U = k \times u_C = 0.08$ ($k=2$, 为包含因子)

3.2.6 结果报告

当测定结果以 3 个平行样品以及 3 次重复测定对数值的平均值表示时, 其取值区间分布于 $[-0.08, +0.08]$ 之间, 此时菌落总数测定结果相当于对数值再取反对数得其取值区间分布, 这个取值区间适用于任何一次测定^[11]。因此, 本次比对实验菌落总数为 $\lg \bar{X}_{\text{平均}} = \lg \bar{X} \pm 0.08 = 3.85 \pm 0.08$, 即 $3.77 \leq \lg X \leq 3.93$, 取反对数即得出 $5.9 \times 10^3 \leq X \leq 8.5 \times 10^3$ CFU/g。

4 结 论

菌落总数是食品微生物检验的常规项目之一^[12], 不同产品有不同的菌落总数限量标准, 有些可能只有 10 CFU/g, 有些却能高达几十万 CFU/g。当结果处于临界

值时,取值区间就显得尤为重要^[13]。关于菌落总数不确定度的评定,王海华等^[6]、岳苑等^[14]认为菌落总数存在发散性问题,不同的菌落之间有互生或拮抗等相互作用,是微生物测量不确定度评定的难点。如果是重复多次测量同一样品,可以直接使用贝塞尔公式计算其重复性测定引入的不确定度;但考虑到不同样品之间菌落总数存在较大的发散性,直接使用贝塞尔公式所得到的不确定度结果并不适合每个项目的不确定度评定^[15],因此本次比对实验是将计算得到的菌落数转换为对数值之后再计算其不确定度。

本研究中菌落总数测定结果的不确定度主要有以下几个来源^[7-9]:样品重复性测定引入的相对标准不确定度评定 $u_{rel}(\text{method})$;样品制备过程中稀释液体积引入的相对标准不确定度 $u_{rel}(V)$;样品加样体积引入的相对标准不确定度 $u_{rel}(V)$;样品稀释过程中引入的相对标准不确定度 $u_{rel}(d)$ 。除了以上列出的几个分量之外,彭永艳^[5]通过查阅大量文献总结出样品的均匀性、培养条件、培养基的灭菌时间等因素也会影响菌落总数不确定度的结果。但由于这些因素不好计算,且对总不确定度的贡献度比较小^[14],所以本文不纳入考虑。

综上,本次实验所用方法可有效评定菌落总数的不确定度,但现阶段仍需要进一步研究在食品中菌落总数不确定度评定方面存在的难题,以便为今后的食品微生物检测提供有力保障。

参考文献

- [1] CNAS-CL 07: 2011 测量不确定度的要求[S].
CNAS-CL 07: 2011 Measurement uncertainty requirements [S].
- [2] CNAS-GL 06: 2006 化学分析中不确定度的评估指南[S].
CNAS-GL 06: 2006 Guidance on evaluating the uncertainty in chemical analysis [S].
- [3] GB 4789.2-2016 食品安全国家标准食品微生物学检验 菌落总数测定[S].
GB 4789.2-2016 National food safety standard determination of total colony number in food—Microbiological examination [S].
- [4] 林景兰. 月饼中菌落总数测定结果不确定度的评估[J]. 食品安全导刊, 2018, 9(44): 59-62.
Lin JL. Evaluation of the uncertainty of the total number of bacterial colonies in mooncakes [J]. Food Saf Guide, 2018, 9(44): 59-62.
- [5] 彭永艳. 食品检验中菌落总数的不确定度评定[J]. 现代食品, 2017, 8(28): 81-83.
Peng YY. Evaluation of uncertainty of colony number in food inspection [J]. Mod Food, 2017, 8(28): 81-83.
- [6] 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. Assessment of uncertainty in the determination of colony number by capability verification [J]. J Food Saf Qual, 2015, 6(6): 2352-2355.
- [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 measurements [S].
- [8] 张丽欣. 食品中菌落总数的测定和不确定度分析[J]. 食品安全导刊, 2019, (3): 66-67.
Zhang LX. Determination and uncertainty analysis of the total number of bacterial colonies in food [J]. Food Saf Guide, 2019, (3): 66-67.
- [9] 郑爱华. 糕点类食品菌落总数测量结果不确定度的评定[J]. 食品安全导刊, 2016, (8): 71-72.
Zheng AH. Evaluation of uncertainty of measurement results of total bacterial colonies in pastry food [J]. Food Saf Guide, 2016, (8): 71-72.
- [10] JJG 646-2016 移液器检定规程[S].
JJG 646-2016 Verification regulation of pipette [S].
- [11] 刘荔, 李天荣. 膨化食品中菌落总数测定结果的不确定度评定[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, (9): 1158-1162.
Liu L, Li TR. Evaluation of uncertainty in the determination of colony in extruded food [J]. J Food Saf Qual, 2018, (9): 1158-1162.
- [12] 陈彩彦, 陈丹萍, 邓健娣. 食品中菌落总数测定的不确定度分析[J]. 食品安全导刊, 2016, (7): 54.
Chen CY, Chen DP, Deng JD. Analysis of uncertainty in the determination of total number of bacterial colonies in food [J]. Food Saf Guide, 2016, (7): 54.
- [13] 汪杨, 沈佳特, 何开勇, 等. 奶粉中菌落总数的不确定度评价[J]. 湖北农业科学, 2017, 56(13): 2521-2523.
Wang Y, Shen JT, He KY, et al. Uncertainty evaluation of colony in milk powder [J]. Hubei Agric Sci, 2017, 56(13): 2521-2523.
- [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. Evaluation of uncertainty in measurement of colony in whole milk powder [J]. Food Fermentation Sci Technol, 2018, 54(3): 124-126.
- [15] 周露, 马蓉. 藕粉中菌落总数测定结果不确定度的评定[J]. 安徽农学通报, 2017, 2(15): 132-134.
Zhou L, Ma R. Evaluation of uncertainty in the determination of colony in lotus root powder [J]. Anhui Agric Sci Bull, 2017, 2(15): 132-134.

(责任编辑: 王 欣)

作者简介



韦云, 助理工程师, 主要研究方向为食品安全。
E-mail: 1615830853@qq.com



周露, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品生物安全。
E-mail: zhoululu1982@sohu.com