

糕点中菌落总数测量结果的不确定度的评定

赵 丽, 胡宝翠, 王琳琳, 刘建洋, 张子臣*

(山东标准检测技术有限公司, 济南 250100)

摘 要: 目的 对糕点中菌落总数的测量结果进行不确定度评定。**方法** 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》对糕点中菌落总数进行测定, 建立数学模型, 分析检验结果的影响因素, 对不确定度因素的影响进行评价。**结果** 置信水平为 95%, 包含因子 $k=2$, 得 10 批样品的扩展不确定度分别为: 0.2156、0.1194、0.1267、0.1293、0.1298、0.1163、0.1293、0.1155、0.1181、0.1243。**结论** 糕点菌落总数检验中重复性检验和培养基的菌落生长率对不确定度影响最大, 需要在检测过程中进行注意。

关键词: 糕点; 菌落总数; 不确定度; 评定

Evaluation of uncertainty of aerobic plate count in pastry

ZHAO Li, HU Bao-Cui, WANG Lin-Lin, LIU Jian-Yang, ZHANG Zi-Chen*

(Shandong Standard Inspection Technology Co., Ltd. Jinan 250100, China)

ABSTRACT: Objective To evaluate the uncertainty of aerobic plate count in pastry. **Methods** The evaluation of the uncertainty of the measurement results of the aerobic plate count in pastry was determined according to GB 4789.2-2016 *National Food Safety Standard-Food Microbiological Examination-Serobic Plate Count*. The mathematical model was established, the influencing factors of test results were analyzed, and the influence of uncertainty factors were evaluated. **Results** On condition that the confidence level was 95%, including factor $k=2$, the expanded uncertainty of 10 samples were 0.2156, 0.1194, 0.1267, 0.1293, 0.1298, 0.1163, 0.1293, 0.1155, 0.1181 and 0.1243 respectively. **Conclusion** The repeatability test and the colony growth rate of the culture medium have the greatest influence on the uncertainty in the total number test of pastry colonies, which needs attention in the process of test.

KEY WORDS: pastry; aerobic plate count; uncertainty; evaluation

1 引 言

菌落总数是判断食品清洁状态和预测食品的耐保藏性的标志, 是评价食品污染程度的重要指标, 因此准确检测食品的菌落总数具有重要的食品卫生学意义。测量不确定度是与测量结果相关联的参数, 用以表征合理赋予被测量值的分散性^[1]。影响菌落总数检验结果不确定度的因素很多, 多数实验室仅考虑样品称量、稀释、样品加样体积均值、重复性检测对不确定度的影响^[2-6]。目前没有一个数

学模型能涵盖并量化全部影响因素, 袁平等^[7,8]建立的数学模型只包含了重复测定引入的 A 类不确定度和由稀释引入的 B 类不确定度。本研究依据 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》^[9]对糕点中菌落总数进行测定, 并对糕点菌落总数检验进行不确定度评定, 对影响不确定度的分量进行分析和评定。除了分析样品稀释、样品加样体积均值、重复性检验对不确定度的影响, 还增加了平板上菌落数、培养基的菌落生长率引入的不确定度。通过量化各影响因素, 比较各影响因素对

*通讯作者: 张子臣, 副高级工程师, 主要研究方向为食品质量安全研究。E-mail: sst_zzc@163.com

*Corresponding author: ZHANG Zi-Chen, Senior Engineer, Shandong Standard Inspection Technology Co., Ltd. Jinan 250100, China. E-mail: sst_zzc@163.com

不确定度的贡献大小,明确了不确定度的来源,能针对性的对检验过程进行有效控制,从而提高测量结果的准确性。为各类食品中菌落总数不确定度评定方法的探索提供参考依据。

2 材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 样品来源

选取 2017-2019 年检验的糕点样品,共计 10 批进行分析。

2.1.2 实验试剂

平板计数琼脂(北京陆桥技术有限公司责任公司)。

2.1.3 实验仪器

SPX-250BSH-II 生化培养箱(上海新苗医疗器械制造有限公司); LDZX-50KBS 立式压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂); HBM-400B 样品匀质机(天津市恒奥科技发展有限公司); ME2002 电子天平(精度 0.01 g, 梅特勒-托利多仪器有限公司)。

2.2 实验方法

称取 25 g 样品于 225 mL 含灭菌稀释液的无菌均质袋内,经充分振摇后制成 1:10 的均匀稀释液。选择 2~3 个稀释度,取 1 mL 样品匀液于无菌平皿内,每个稀释度做 2 个平皿。注入 46 °C 左右平板计数琼脂 15~20 mL,转动混匀,同时做空白对照。待琼脂凝固后,翻转平皿,放置 (36.0±1) °C 恒温培养箱内培养(48±2) h。计数方法参考 GB 4789.2-2016 进行。

3 结果与分析

3.1 不确定度来源分析

菌落总数的不确定度主要有由系统性效应和随机效应引起,不确定度来源见图 1

3.2 数学模型

本研究用数学模型为:

$$Y=X$$

式中 Y, 样品菌落总数;

X, 检验结果

检验结果 X 受很多因素影响,其中人员计数、取样均匀性等引入的不确定度可通过规范操作来避免或减少,故可忽略。本文主要分析样品稀释、样品加样体积均值、平板上菌落数、培养基的菌落生长率、重复性检验引入的不确定度。

3.3 不确定度各分量评定

3.3.1 样品稀释引入的相对标准不确定度 $u_{rel}(F)$

固体样品检验过程中稀释引入的相对标准不确定度包括开始的 10 倍稀释(25 g 检样+225 mL 稀释液)和后续连续 10 倍稀释(1 mL 前一步样品稀释匀液+9 mL 稀释液)操作。每步引入的相对标准不确定度 $u_{rel}(F_i)$ 可由下式计算^[10]

$$u^2_{rel}(F_i) = \frac{D_i^2}{C_i + D_i} [u^2_{rel}(C_i) + u^2_{rel}(D_i)]$$

式中 C_i 为第 i 步稀释时的被稀释的固体样品质量或样品稀释匀液体积(C_1 为 25 g, C_2 、 C_3 、 $C_4 \cdots C_i$ 为 1 mL);

D_i 为稀释液体积(D_1 为 225 mL, D_2 、 D_3 、 $D_4 \cdots D_i$ 为 9 mL)。

实验中第 2 步稀释与以后各步稀释相同,则稀释引入的相对标准不确定度为:

$$u^2_{rel}(F) = u^2_{rel}(F_1) + u^2_{rel}(F_2) + \cdots + u^2_{rel}(F_i)$$

$$= u^2_{rel}(F_1) + a \times u^2_{rel}(F_2)$$

其中 a 为首次稀释以后的稀释次数

本次实验中,使用最大称量 2200 g 的天平,根据检定证书称量范围为 0~500 g 时,最大允许误差为 0.05 g, 250 mL 量筒,允许误差分别为 0.05 g 和 2 mL。根据 JJG 646-2006《移液器检定规程》^[11],稀释中用的 10 和 1 mL 移液枪,吸取 9 和 1 mL 液体时,容量允许误差分别为 ±0.6%和±1.0%。以上器具均按均匀分布计算属于 B 类不确定度。则:

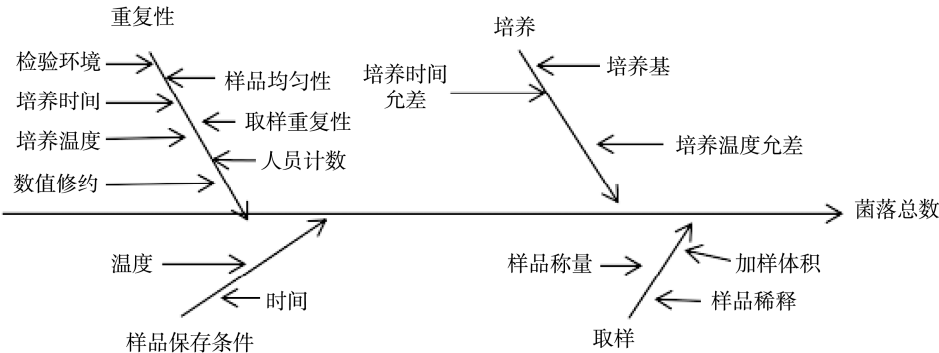


图 1 菌落总数检验不确定度来源
Fig.1 Source of uncertainty in colony count test

天平的相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(25 \text{ g}) = \frac{0.05}{25 \times \sqrt{3}} = 0.00115$$

量筒的相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(225 \text{ mL}) = \frac{2}{225 \times \sqrt{3}} = 0.00513$$

移液枪的相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(9 \text{ mL}) = \frac{0.6\%}{9 \times \sqrt{3}} = 0.000385$$

$$u_{\text{rel}}(1 \text{ mL}) = \frac{1.0\%}{1 \times \sqrt{3}} = 0.00577$$

根据公式, 第 1 步稀释引入的相对标准不确定度为:

$$u^2_{\text{rel}}(F_1) = \frac{225^2 \times (0.00115^2 + 0.00513^2)}{(25 + 225)^2} = 2.2388 \times 10^{-5}$$

第 2 步及以后各步稀释引入的相对标准不确定度为:

$$\begin{aligned} u^2_{\text{rel}}(F_2) &= u^2_{\text{rel}}(F_3) = \dots = u^2_{\text{rel}}(F_i) \\ &= \frac{9^2 \times (0.00577^2 + 0.000385^2)}{(1 + 9)^2} = 2.7087 \times 10^{-5} \end{aligned}$$

本研究中菌落总数检验计数结果在稀释度 $10^{-1} \sim 10^{-2}$ 范围内, 则稀释引入的相对标准不确定度为:

$$\begin{aligned} u^2_{\text{rel}}(F) &= 2u^2_{\text{rel}}(F_1) + u^2_{\text{rel}}(F_2) \\ &= 4.4776 \times 10^{-5} + 2.7087 \times 10^{-5} = 7.1863 \times 10^{-5} \end{aligned}$$

3.3.2 样品加样体积均值引入的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(V)$

胡巖等^[12]认为培养基计数平板上的加样体积均值为 1 mL, 不确定度来源有移液器的容量允差, 温度偏离引起的加样体积涨缩和移液枪头本身的涨缩。其中温度偏离引起的加样体积涨缩和移液枪头本身的涨缩引入的相对标准不确定度和忽略不计。根据 JJG 646-2006^[11], 样品加样体积均值引入的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(V)$ 为:

$$u^2_{\text{rel}}(V) \approx u^2_{\text{rel}}(1 \text{ mL}) = 0.00577^2 = 3.329 \times 10^{-5}$$

3.3.3 平板上菌落数引入的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(N)$

在一系列充分混匀的样品稀释液中, 细菌数的随机性符合泊松分布^[12], 所以平板上的菌落数的不确定度可用泊松分布表示。平板上菌落数引入的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(N)$ 为:

$$u^2_{\text{rel}}(N) = \frac{1}{N} = \frac{1}{X}$$

N: 1ml 样品稀释液中细菌数;

X: 平板上菌落数。

本次研究 10 批样品的 $u^2_{\text{rel}}(N)$ 分别为: 8.3612×10^{-3} 、 3.0675×10^{-4} 、 7.5758×10^{-4} 、 9.2593×10^{-4} 、 9.5969×10^{-4} 、 1.2531×10^{-4} 、 9.2593×10^{-4} 、 7.8616×10^{-5} 、 2.2936×10^{-4} 、 6.0976×10^{-4} 。

3.3.4 培养基的菌落生长率引入的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(R)$

菌落总数测定中所用的平板计数琼脂为非选择性培养基, 本实验室使用的是商品化培养基, 通过目标菌

半定量划线法得到生长指数 G , 根据 G 的大小评价培养基的质量^[13]。每个培养皿上 G 最大为 16, 本实验室 2017~2019 年对平板计数琼脂进行质控, 得到几批平板计数琼脂的 G 值平均值为 14.92, 其菌落生长率 R 可表示为:

$$R = \frac{14.92}{16} = 0.9323$$

故其误差范围为 $1 - 0.9323 = 0.0677$, 假定其为矩形分布, 其相对标准不确定度为:

$$u^2_{\text{rel}}(R) = \left(\frac{0.0677}{\sqrt{3}} \right)^2 = 1.5278 \times 10^{-3}$$

3.3.5 重复性检验引起的不确定度 $u_{\text{rel}}(\overline{\lg X})$

重复性检测引起的不确定度属 A 类不确定度, 糕点样品检验采用三级采样方案, 即同一批次产品采 5 个样品进行检验。在 2017-2019 年检验的糕点样品中选择 10 批样品检验结果通过计算合并样品标准差来进行不确定度评价^[14]。每份样品检验结果的离散性较大, 故对检验结果取对数值, 计算出 5 次检验结果对数值的平均值进行相对标准不确定度评价, 检验结果见表 1

合并样品标准差

$$Sp(\lg X) = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^m \sum_{i=1}^n (\lg X_i - \overline{\lg X})^2}{m(n-1)}} = \sqrt{\frac{0.32491}{10 \times 4}} = 0.090126$$

其中其中选取样品总批数 $m=10$; 每批样品重复测量次数 $n=5$

$$\begin{aligned} u_{\text{rel}}(\overline{\lg X}) &= \frac{S(\lg X)}{\sqrt{n}} = \frac{0.090126}{\sqrt{5}} = 0.040306 \\ u^2_{\text{rel}}(\overline{\lg X}) &= 1.6246 \times 10^{-3} \end{aligned}$$

3.4 合成标准不确定度和扩展不确定度

综合各分量不确定度得糕点中菌落总数检验的合成标准不确定度为:

$$u_c(y) = \sqrt{u^2_{\text{rel}}(F) + u^2_{\text{rel}}(V) + u^2_{\text{rel}}(N) + u^2_{\text{rel}}(R) + u^2_{\text{rel}}(\overline{\lg X})}$$

扩展不确定度 $U = k \times u_c(y)$

取置信水平为 95%, 包含因子 $k=2$, 则 10 批样品的扩展不确定度分别为: 0.2156、0.1194、0.1267、0.1294、0.1299、0.1163、0.1294、0.1155、0.1181、0.1244。

3.5 报告结果

以表 1 中的 2 号样结果为例, 菌落总数结果对数值的平均值为 $(3.519 \pm 0.1194)(\lg)$, 取值区间为 3.3991~3.6379($\lg$), 取其反对数即样品中平均菌落总数为 2507~4344 CFU/g, 即 $2.5 \times 10^3 \sim 4.3 \times 10^3$ CFU/g。

表 1 10 批糕点样品菌落总数检测结果及分析
Table 1 Results of colony count test of 10 batches of pastry samples and analysis

样品 编号	检验结果					取对数					均值	残差平方和
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	$\lg X_1$	$\lg X_2$	$\lg X_3$	$\lg X_4$	$\lg X_5$	$\overline{\lg X}$	$\sum_{i=1}^n (\lg X_i - \overline{\lg X})^2$
1	1300	1200	1100	980	1400	3.114	3.079	3.041	2.991	3.146	3.114	0.01474
2	3300	2500	3700	4200	2600	3.519	3.398	3.568	3.623	3.415	3.519	0.03773
3	1400	1200	1400	1600	1000	3.146	3.079	3.146	3.204	3.000	3.146	0.02439
4	850	1200	1400	850	1100	2.929	3.079	3.146	2.929	3.041	2.929	0.03615
5	1100	1100	1000	1100	910	3.041	3.041	3.000	3.041	2.959	3.041	0.00543
6	7800	8700	8200	7500	7700	3.892	3.940	3.914	3.875	3.886	3.892	0.00261
7	1200	850	1400	1100	850	3.079	2.929	3.146	3.041	2.929	3.079	0.03615
8	13000	9600	14000	12000	15000	4.114	3.982	4.146	4.079	4.176	4.114	0.02240
9	3200	2900	4500	5200	6000	3.505	3.462	3.653	3.716	3.778	3.505	0.07332
10	1400	1700	1300	1200	2600	3.146	3.230	3.114	3.079	3.415	3.146	0.07200
总计												0.32491

4 结论与讨论

本研究对糕点中菌落总数测量结果的不确定度进行了评定,通过对各不确定度分量进行计算和分析表明,糕点菌落总数检验中重复性检验和培养基的菌落生长率对不确定度影响最大。整个重复实验是由不同操作者在一定时间段内在相同检验环境、设备条件下获得的积累数据,因此重复性检测引入的不确定度主要受操作者、检验环境、培养温度、培养时间、菌落重叠、计数、修约、样品的均匀性等的影响。因此通过提高操作者的操作技能,在进行试验时提高检测结果的准确性以降低重复性检测引入的不确定度。如进行倾注培养基后要充分混匀,以减少菌落重叠;计数菌落时,避免漏计和重复计数;充分考虑样品污染程度并选择适宜的稀释度^[5,15]等。培养基的菌落生长率与培养基的质量^[16]有很大关系,需要每个实验室通过多次计算不同批次培养基菌落生长率得到,而不能一概而论为0.7^[12]。在日常检验中通过培养基质控,对比选择质量好的培养基来降低菌落生长率引入的不确定度。样品稀释和平板上菌落数对不确定度影响较小,样品加样体积均值引入的不确定度最小。

进行不确定评定时,所有影响结果的分量都应该考虑进去,通过选择适用性和可行性的试验方案,尽可能多的考虑多种影响检验结果的因素,加以量化,引入到测量不确定度评定中来,以保证检验结果的准确性。本研究也只是重点讨论了样品稀释、样品加样体积均值、平板上菌落数、培养基的菌落生长率、重复性检验引入的不确定度。

在整个检验过程中除了上述因素外,结果还受样品储存条件、样品均匀性、样品称样质量、样品中细菌的不稳定性等因素的影响。虽然大多数人^[17,18]认为这些因素对不确定度的影响很小,但这些因素对不确定度的影响确实存在,在进行不确定度评定时实验室应注意这些因素的控制。

参考文献

[1] RB/T 151-2016 食品微生物定量检测的测量不确定度评定指南[S]. RB/T 151-2016 Guidelines for the estimation of measurement uncertainty of food microbiological quantitative detection [S].

[2] 刘荔,李天容.膨化食品中菌落总数测定结果的不确定度评定[J].食品安全质量学报,2018,9(5): 1158-1162. Liu L, Li TR. Uncertainty evaluation of measurement of aerobic plate count in puffed food [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(5): 1158-1162.

[3] 吕志敏,于佳,管宁.食品包装用纸中酵母菌计数测量不确定度的评定[J].检验检疫学刊,2020,30(1): 47-49. Lv ZM, YU J, Guan N. Evaluation of measurement uncertainty on determination of yeast count in food paper [J]. J Inspect Quarant, 2020, 30(1): 47-49.

[4] 车方萍,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,2018,14(36): 100-102. Chen FP, Zhao MY, Chen Y. Evaluation of uncertainty in measurement of total number of colonies in foods(pastry) [J]. Mod Food, 2018, 14(36): 100-102.

[5] 王爱雯,吴学贵,周梅秀,等.罗非鱼中菌落总数测量结果的不确定度评定[J].食品安全质量检测学报,2020,11(5): 1492-1495. Wang AW, Wu XG, Zhou MX, et al. Evaluation of uncertainty in measurement results of aerobic plate count in tilapia [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(5): 1492-1495.

[6] 华晶忠,于丽,刘笑笑,等.发酵樱菜中菌落总数平板计数结果不确定

- 度的评定[J]. 东北农业科学, 2019, 44(3): 71-73.
- Hua JZ, Yu L, Liu XX, *et al.* Evaluation on uncertainty of plate counting results on colonies count in fermented *Lepidium sativum* [J]. J Northeast Agric Sci, 2019, 44(3): 71-73.
- [7] 袁平, 吴春敏, 林仲, 等. 食品中菌落总数测定不确定度评定数学模型的建立[J]. 预防医学论坛, 2016, 22(7): 540-542, 545.
- Yuan P, Wu CM, Lin Z, *et al.* Establishment of mathematical model for evaluation of uncertainty in determination of total bacterial count in food [J]. Forum Prev Med, 2016, 22(7): 540-542, 545.
- [8] 沈小芳, 陆永梅, 张雁, 等. 微生物菌落总数检验中不确定度的评定[J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(3): 769-770.
- Shen XF, Lu YM, Yan Z, *et al.* Evaluation of uncertainty in microbial colony count test [J]. Chin J Health Insp, 2011, 21(3): 769-770.
- [9] 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-Food microbiological examination-Aerobic plate count [S].
- [10] Seppo IN. Uncertainty of quantitative determinations derived by cultivation of microorganisms [M]. Helsinki: Advisory Commission for Microbiology, 2003.
- [11] JJG 646-2006 移液器检定规程[S].
- JJG 646-2006 Verification regulation of pipette [S].
- [12] 胡巖, 贾松树, 李素芳, 等. 论菌落数测定(检测)的不确定度及其评定[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(6): 761-764, 770.
- Hu D, Jia SS, Li SF, *et al.* Evaluation of uncertainty in microbial colony count test [J]. Chin J Health Insp, 2015, 25(6): 761-764, 770.
- [13] GB 4789.28-2013 食品安全国家标准 食品微生物学检验 培养基和试剂的质量要求[S].
- GB 4789.28-2013 National food safety standard- Food microbiological examination -Quality requirements for media and reagents [S].
- [14] 张霞. 微生物检验中不确定度的评定[J]. 中国卫生检验杂志, 2003, 13(2): 141-142.
- Zhang X. Evaluation of inaccuracy in microbiological tests [J]. Chin J Health Insp, 2003, 13(2): 141-142.
- [15] 修宏宇. 橙汁中菌落总数检测结果的不确定度评定[J]. 计量技术, 2019, (9): 6-9.
- Xiu HY. Evaluation of the uncertainty of the total number of colonies in orange juice [J]. Metrol Technol, 2019, (9): 6-9.
- [16] John PG, Daniel L, Zachary J, *et al.* Culture medium brand choice impacts colonys warming behavior among industrial *Bacillus* isolates and the accuracy of aerobic plate counts [J]. J Microbiol Method, 2020, (172): 105891.
- [17] 李欣楠. 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* as feed microorganism additive [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(11): 3414-3418.
- [18] 雷志文. 食品微生物实验室质量管理手册[M]. 北京: 中国标准出版社, 2006.
- Lei ZW. Handbook of quality management of food microbiology laboratory [M]. Beijing: China Standards Publishing House, 2006.
- Lei ZW. Hanbook of quality management of food microbiology laboratory [M]. Beijing: China Standards Publishing House, 2006.
- (责任编辑: 李磅礴)

作者简介



赵 丽, 硕士, 中级工程师, 主要研究方向为食品微生物检验。
E-mail: sst_zl163.com



张子臣, 副高级工程师, 主要研究方向为食品质量安全研究。
E-mail: sst_zzc@163.com。