

罗非鱼中菌落总数测量结果的不确定度评定

王爱雯, 吴学贵*, 周梅秀, 李玉锦, 黄雪, 黄肖凤

(海南威尔检测技术有限公司, 澄迈 571924)

摘要: **目的** 对罗非鱼中菌落总数测量结果进行不确定度评定。**方法** 采用平板计数法测定罗非鱼中的菌落总数, 通过建立数学模型, 识别不确定度来源, 对不确定度来源进行分析, 估算出各不确定度分量对测量不确定度的影响, 最终合成测量结果的相对标准不确定度。**结果** 被测样品中细菌总数为 23000 CFU/g, 在 95% 的置信区间下, 扩展不确定度为 920 CFU/g($k=2$)。 **结论** 样品重复测定和结果修约是影响该方法不确定度的主要因素, 因此该方法测量不确定度的评定对检测结果准确度的提高具有指导意义。

关键词: 菌落总数; 罗非鱼; 不确定度

Evaluation of uncertainty in measurement results of aerobic plate count in tilapia

WANG Ai-Wen, WU Xue-Gui*, ZHOU Mei-Xiu, LI Yu-Jin, HUANG Xue, HUANG Xiao-Feng

(Hainan Willtest Technology Co., Ltd., Chengmai 571924, China)

ABSTRACT: Objective To evaluate the uncertainty of the total bacterial colony in tilapia. **Methods** The total number of colonies in tilapia was determined by plate counting method, the source of uncertainty was identified by establishing mathematical model, the source of uncertainty was analyzed, the influence of each uncertainty component on the measurement uncertainty was estimated, and the relative standard uncertainty of the measurement results was finally synthesized. **Results** The total number of bacteria in the samples was 23,000 CFU/g, and the extended uncertainty was 920 CFU/g ($k=2$) with a 95% confidence interval. **Conclusion** The main factors affecting the uncertainty of this method are the repeated determination of samples and the modification of results. Therefore, the evaluation of the uncertainty of the method is of guiding significance for the improvement of the accuracy of the test results.

KEY WORDS: aerobic plate count; tilapia; uncertainty

1 引言

在食品卫生质量评价过程中, 菌落总数是非常重要的一个指标, 食品中的菌落总数计数对于食品检验和食品安全具有重要的意义。另外菌落总数作为食品日常检测中最常见的卫生检验指标, 可以精确地表明细菌污染食品的程度, 因此在食品原料生产、成品的加工、包装与运输过程中都需要监测菌落总数指标^[1-4]。

为了确保检测结果的准确性, 从而提高测量不确定度评定的有效性^[5], 为食品检验提供更为准确的依据, 在菌落总数检测中我们尤为关注影响测量结果准确性的因素, 例如培养条件、取样、重复性和样品保存条件等^[6,7]。按照 SN/T 4091-2015《食品微生物学测量不确定度评估指南》, 对样品中菌落总数各不确定度分量的来源进行分析, 通过建立测量模型, 采用合成标准不确定度的方法, 评定菌落总数的不确定度^[8]。本文就加工厂生产的罗非鱼鱼片菌落

*通讯作者: 吴学贵, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。E-mail: 412992054@qq.com

*Corresponding author: WU Xue-Gui, Master, Engineer, Hainan Willtest Technology Co., Ltd., Laocheng Hi-tech Industry Demonstration Zone, Chengmai 571924, China. E-mail: 412992054@qq.com

总数测定结果进行不确定度评定, 并确定其置信区间, 以期类似检测条件下菌落总数不确定度的评定提供参考。通过对数据进行测量不确定度评定, 可以提升实验结果可信性、可比性及可接受性, 具有非常重要的现实意义^[9]。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

罗非鱼片: 通威(海南)水产食品有限公司生产的样品。平板计数琼脂培养基(批号: 20181212, 青岛海博公司); 氯化钠(批号: 20190307, 天津科密欧化学试剂有限公司)。

2.2 仪器设备

PL602-L 型电子天平(上海梅特勒-托利多公司, 分度值为 0.01 g); IUL 型拍击式均质器(上海德记行科技公司); 100 μL-1000 μL 移液器(德国 Eppendorf 公司); DKZ-1 型恒温振荡水槽(46 °C±1 °C, 上海一恒公司); GHP-9160 型恒温培养箱(30 °C±1 °C, 上海一恒公司)。

2.3 实验方法

2.3.1 样品的制备

取罗非鱼片 200 g 样品, 按 GB 4789.2-2016^[1]方法, 以无菌操作称取 25 g 样品放入盛有 225 mL 无菌生理盐水(0.85%)的无菌均质袋中, 用拍击式均质器均质 1 min, 制成 1:10 的待测液。

2.3.2 稀释

用 1 mL 移液器吸取 1:10 待测液 1 mL, 沿管壁缓慢加入盛有 9 mL 稀释液的无菌试管中, 涡旋混匀, 分别制成 1:100 的待测液 10 份; 以此继续稀释成 1:1000 等 10 倍系列稀释液各 10 份。

2.3.3 接种和培养

选择 1:100、1:1000 两个稀释度待测液, 各取 1 mL 分别加入无菌培养皿中, 同时, 吸取 1 mL 空白稀释液加入一个无菌平皿内作空白对照, 每皿中加入 15 mL~20 mL 平板计数琼脂培养基, 混匀, 待琼脂凝固后, 将平板翻转, (30±1) °C 培养(72±3) h。

2.3.4 菌落计数

选取菌落数在 30 CFU~300 CFU 之间, 无蔓延菌落生长的平板计数菌落总数, 记录稀释倍数和相应的菌落数量, 按下式(1)计算样品中菌落总数。

2.3.5 数学模型的建立

样品中细菌总数按下述公式计算:

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0.1n_2) \times d} \quad (1)$$

式中:

N : 样品中菌落总数;

$\sum C$: 平板(含适宜范围菌落数的平板)菌落总数之和;

n_1 : 第一稀释度(低稀释度)平板个数;

n_2 : 第二稀释度(高稀释度)平板个数;

d : 稀释因子(低稀释度)。

3 结果与分析

3.1 不确定度的来源分析

从测量过程和数学模型分析, 样品的测量不确定度主要来源于: 样品称样量 $u(m)$, 稀释倍数 $u(c)$, 加样体积 $u(V)$, 重复性测量 $u(x)$, 结果数值修约 $u(R_0)$ 等。

3.2 不确定度评价

3.2.1 称样量带来的相对标准不确定度

依据 JJG 1036-2008^[10]实验使用的天平经检定, 其扩展不确定度 $U=0.03 \text{ g}(k=2)$, 标准不确定度: $u(m) = \frac{0.03}{2} = 0.015 \text{ g}$, 当称样量为 25.01 g 时, 其相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(m) = \frac{0.015}{25.01} = 0.00060。$$

3.2.2 稀释倍数带来的相对标准不确定度

稀释问题是菌落总数检测过程中必不可少的部分^[11,12], 依据 JJG 196-2006^[13], 250 mL 量筒量入式容量最大允许误差(maximum permissible errors, MPEV)为±1.0 mL, 按均匀分布, 则不确定度分量为 $u(c) = \frac{1.0}{\sqrt{3}} = 0.57735 \text{ mL}$, 其

相对不确定度为: $u_{\text{rel}}(c) = \frac{0.57735}{250} = 0.00231$ 。

3.2.3 加样体积带来的相对标准不确定度

依据 JJG 646-2006^[14], 实验使用的移液器规格为 100 μL~1000 μL, 经校准, 当取样量为 1000 μL 时, 其相对标准不确定度为: $u_{\text{rel}}(V) = 0.003$ 。

3.2.4 重复性测量带来的相对标准不确定度

在相同条件下, 对同一份罗非鱼样品进行 10 次重复测量, 测量结果见表 1 所示:

表 1 罗非鱼中菌落总数测定结果
Table 1 aerobic plate count in tilapia

次数	稀释度测定值/(CFU/g)		平均值/(CFU/g)
	1:100	1:1000	
1	228/213	21/22	229
2	228/214	27/26	
3	218/254	25/25	
4	231/211	23/21	
5	225/237	25/20	
6	227/235	26/27	
7	232/219	20/24	
8	238/242	24/24	
9	217/231	16/26	
10	233/238	32/21	

依据 GB 4789.2-2016 中的 6.3.2 条款, 选 1:100 稀释梯度的测定值来计算样品结果, 根据贝塞尔公式:

$$s(x_k) = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}} = 1095 \quad \text{标准不确定度为: } u(\bar{x}) = s(\bar{x}) = \frac{1095}{\sqrt{10}} = 346$$

则相对标准不确定度为: $u_{\text{rel}}(\bar{x}) = \frac{u(\bar{x})}{\bar{x}} = \frac{346}{23000} = 0.0150$

3.2.5 修约引入的不确定度^[15]

检测结果为 22855 CFU/g, 修约为 23000 CFU/g, 修约间隔为 1000 CFU/g, 则修约引入的标准不确定度为:

$$u(R_0) = \frac{500}{\sqrt{3}} = 289 \text{ CFU/g.}$$

则相对标准不确定度为: $u_{\text{rel}}(R_0) = \frac{u(R_0)}{\bar{x}} = \frac{289}{23000} = 0.0126$.

3.3 合成相对标准不确定度、扩展不确定度

各分量的不确定度是相互独立的, 带入公式求得合成相对标准不确定度:

$$u_{\text{rel}}(X) = \sqrt{\frac{u_{\text{rel}}(m)^2 + u_{\text{rel}}(C)^2 + u_{\text{rel}}(V)^2}{+u_{\text{rel}}(\bar{x})^2 + u_{\text{rel}}(R_0)^2}} = 0.02$$

则标准不确定度为 $u(X) = u_{\text{rel}}(X) \times \bar{x} = 460 \text{ CFU/g}$

取扩展因子 $K=2$, 则扩展不确定度 $U = u(X) \times K = 920 \text{ CFU/g}$

3.4 不确定度结果表示^[16]

罗非鱼中菌落总数的扩展不确定度 U 为 920 CFU/g, $K=2$; 结果表示为 $C_x = (2.3 \pm 0.09) \times 10^4 \text{ CFU/g}$, $K=2$ 。

4 结 论

通过计算各个不确定度分量得出, 样品的称样量、稀释倍数、加样体积对检测结果的不确定度影响比较小; 样品的重复性测量、结果数值修约对结果的不确定度影响比较大, 且稀释倍数越高, 修约引入的不确定度也越大, 因此, 检测人员进行试验时, 应充分考虑样品的污染程度, 并选择最适稀释梯度进行检测, 避免高稀释倍数带来的影响, 同时也应注意样品稀释过程的操作, 提高检测结果的可靠性和准确性。

参考文献

- [1] GB 4789.2-2016 食品微生物学检验 菌落总数测定[S]. GB 4789.2-2016 Determination of total number of colonies in food microbiological inspection [S].
- [2] SN/T 4091-2015 食品微生物学测量不确定度评估指南[S]. SN/T 4091-2015 Guidelines for the evaluation of uncertainty in food microbiology measurements [S].
- [3] 岳苑, 马桂娟. 全脂奶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 total colony in

- whole milk powder [J]. Food Ferment Sci Technol, 2018, 54(3): 124-126.
- [4] 张云龙. 烧烤制品菌落总数检验中不确定度的评定[J]. 工程科技, 2019, 14: 124-126. Zhang YL. Assessment of uncertainty in the examination of the total colony of barbecue products [J]. Eng Sci Technol, 2019, 14: 124-126.
- [5] 修敏. 食品检验中菌落总数的不确定度[J]. 中国医药指南, 2019, 17(25): 23-24. Xiu M. Uncertainty of the total number of colonies in food inspection [J]. Guide Chin Med, 2019, 17(25): 23-24.
- [6] 饶秋华, 刘兰英, 何肖云. 水产饲料中细菌总数测量不确定度的评定[J]. 福建农业科技, 2017, 9: 3-5. Rao QH, Liu LY, He XY. Evaluation of uncertainty in measurement of total bacteria in aquatic feed [J]. Fujian Agric Sci Technol, 2017, 9: 3-5.
- [7] 朱勇. 食品中菌落总数测定不确定度评定的应用[J]. 中国卫生产业, 2017, (18): 41-44. Zhu Yong. Application of uncertainty evaluation for the determination of total colony in food [J]. Chin Health Ind, 2017, (18): 41-44.
- [8] 卢福荣, 魏忠艳, 周雪, 等. 面包中菌落总数测定测量结果不确定度评定[J]. 现代食品, 2019, 16(43): 134-137. Lu FR, Wei ZY Zhou X, et al. uncertainty evaluation of measurement results of total number of colonies in bread [J]. Mod Food, 2019, 16(43): 134-137.
- [9] 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 blind sample evaluation results of total food colony determination [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(14): 3780-3783.
- [10] JJG 1036-2008 电子天平检定规程[S]. JJG 1036-2008 Verification regulations for electronic balances [S].
- [11] 罗丽. 浅谈《样品中细菌总数测定》的稀释计算[J]. 生物化工, 2018, 4(6): 91-92. Luo L. Dilution calculation of "determination of total bacteria in samples" [J]. Biochem Eng, 2018, 4(6): 91-92.
- [12] 褚一凡, 陈登宇, 刘从森, 等. 做好微生物学实验教学物品准备的几点体会[J]. 卫生职业教育, 2018, (18): 122-123. Chu YF, Chen DY, Liu CS, et al. Some experiences in preparing experimental teaching materials for microbiology [J]. Health Vocational Ed, 2018, (18): 122-123.
- [13] JJG 196-2006 常用玻璃量器检定规程[S]. JJG 196-2006 Verification regulations for common glass measuring instruments [S].
- [14] JJG 646-2006 移液器检定规程[S]. JJG 646-2006 Pipette verification regulations [S].
- [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 colony detection results in orange juice [J]. Metrol Technol, 2019, 9: 6-9.
- [16] JJF 1059.1-2012 测量不确定度评定与表示[S]. JJF 1059.1-2012 Evaluation and expression of measurement uncertainty [S].

(责任编辑: 王 欣)

作者简介



王爱雯, 助理工程师, 主要研究方向为食品微生物检测。
E-mail: 806378699@qq.com



吴学贵, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。
E-mail: 412992054@qq.com



“茶学研究”专题征稿函

茶叶源于中国, 与咖啡、可可并称为世界三大饮料。茶叶可鲜食, 也可以加工精制备用, 具有降压、提神等多种保健功能, 且含有多种有机化学成分和无机矿物元素。国内外对茶叶市场需求稳定增长, 我国的茶产业增长潜力巨大, 茶已成为社会生活中不可缺少的健康饮品和精神饮品。

鉴于此, 本刊特别策划了“茶学研究”专题, 主要围绕茶叶的贮藏保鲜、精深加工、品质评价、生物化学和功能性成分、香气成分分析、污染物分析检测、茶树生长代谢、茶叶资源的质量标准化等方面展开论述和研究, 综述及研究论文均可。

本刊主编吴永宁研究员、专题主编肖文军教授及编辑部全体成员特别邀请您为本专题撰写稿件, 综述、研究论文、研究简报均可, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。

本专题计划在 2020 年 6 月出版, 请在 2020 年 4 月 15 日前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并经审稿合格后优先发表。

希望您能够通过各种途径宣传此专题, 并积极为本专题推荐稿件和约稿对象。

同时, 希望您能够推荐该领域的相关专家并提供电话和 E-mail。

感谢您的参与和支持!

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com(注明茶学研究专题)

E-mail: jfoodsqa@126.com(注明茶学研究专题)

《食品安全质量检测学报》编辑部