

GUM 法评定菊粉菌落总数的测量不确定度

祖新, 刘煜, 李羽翡, 仝伟建, 杨晓楠 (甘肃省食品检验研究院, 甘肃兰州 730030)

摘要 [目的]采用 JJF1059.1—2012《测量不确定度评定与表示》规定的 GUM 法对实验室菊粉菌落总数的测量进行不确定度评定。[方法]依据 GB4789.2—2010《食品安全国家标准食品微生物学检验菌落总数测定》来进行测定和结果判定,结合对测定过程中引入的不确定度分量进行评定,最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]菊粉菌落总数为 1.5×10^4 CFU/g, 扩展不确定度为 0.4×10^4 。[结论]此方法可用于对菊粉样品的菌落总数进行不确定度评定,适用于复现检测条件下菊粉及其他粉状食品菌落总数不确定度的评定。

关键词 GUM 法; 菊粉; 菌落总数; 不确定度

中图分类号 TS207.4 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2016)34-0056-03

Measurement Uncertainty for Evaluating Total Number of Bacterial Colony in Inulin by Using GUM Method

ZU Xin, LIU Yu, LI Yu-fei et al (Gansu Province Food Inspection Institute, Lanzhou, Gansu 730030)

Abstract [Objective] To evaluate the uncertainty in the measurement of total number of bacterial colony in inulin in the laboratory by the method of GUM specified in JJF1059.1-2012 "Evaluation and expression of uncertainty in measurement". [Method] The determination and results of the judgment were directed by GB 4789.2-2010 "National food safety standard: Food microbiological examination of total number of bacterial colony". The uncertainty components were introduced in the experiment. Finally, synthetic method was used to calculate and assess the uncertainty of total number of bacterial colony. [Result] Total number of bacterial colony in inulin was 1.5×10^4 CFU/g, and the expanded uncertainty was 0.4×10^4 . [Conclusion] This method can be used in the uncertainty assessment of total number of bacterial colony in inulin, and it is also suitable for evaluating the uncertainty in the measurement of total number of bacterial colony in inulin or other powdery food under repetition test conditions.

Key words GUM method; Inulin; Total number of bacterial colony; Uncertainty evaluation

测量结果不确定度评定是实验室质量体系的重要组成部分,在 CNAS—CL07: 2011《测量不确定度的要求》中规定检测实验室应有能力对每项有数值要求的测量结果进行测量不确定度评估。菊粉(Inulin)是近几年发展起来的优质功能性膳食纤维食品,作为可直接入口的食品,菌落总数指标检测是判定其卫生质量的有效方法。根据新版的国家计量技术规范 JJF 1059.1—2012《测量不确定度评定与表示》^[1],笔者采用 GUM(Guide to the expression of uncertainty in measurement)法对实验室菊粉菌落总数的测量进行不确定度评定,以期在实验室工作中菊粉及其他粉状固体食品菌落总数检测结果不确定度的评定提供参考。

1 原理与方法

1.1 测试原理 依据《食品安全国家标准食品微生物学检验菌落总数测定》^[2](GB4789.2—2010)和《测量不确定度评定与表示》(JJF 1059.1—2012),在规定复现性测量条件下,检测人员对同批次乳粉样品进行操作,然后对检测结果进行不确定度评定。

1.2 复现性测量条件

1.2.1 环境条件。二级生物安全实验室;空气洁净度:整体 10 000 级,洁净工作台 100 级;温度(20 ± 4)℃,相对湿度 $\leq 85\%$ 。

1.2.2 样品。菊粉样品 5 kg/袋,纯度 90%,购自甘肃白银熙瑞生物工程有限公司。

1.2.3 培养基与仪器。平板计数琼脂,购自广东环凯微生物科技有限公司;天平,型号 YP1201N,为上海精密科学有限

公司产品;试验所用玻璃器皿为天津市天玻玻璃仪器有限公司产品。

1.3 检测方法 称取 25 g 样品置于加入 225 mL 生理盐水的无菌均质袋中,用拍击式均质器拍打 1.5 min,制成 1:10 的样品匀液。根据对样品污染状况的估计,选择 3 个稀释度的样品匀液,进行 10 倍递增稀释时,每个稀释度分别吸取 1 mL 样品匀液于无菌平皿内,每个稀释度 2 个重复。同时,分别吸取 1 mL 空白稀释液加入 2 个无菌平皿内作为空白对照。及时将 20 mL 冷却至 46℃ 的平板计数琼脂培养基倾注平皿,并转动平皿使其混合均匀。待琼脂凝固后,将平板翻转, (36 ± 1)℃ 下培养 (48 ± 2) h。

通过肉眼观察,必要时用放大镜或菌落计数器,记录稀释倍数和相应的菌落数量。菌落计数以菌落形成单位(CFU)表示。

2 测量不确定度的评定

2.1 分析不确定度来源和建立测量模型 菌落总数测定虽然可以从计数平板直接记录,但并不是简单的直接测量^[3],依据《食品安全国家标准食品微生物学检验菌落总数测定》(GB4789.2—2010),样品检测需经过称量、混匀、均质、稀释、加样和培养等多个步骤,由此产生的随机效应及系统效应均会导致微生物检测的测量不确定度。测量不确定度一般来源于培养基生长率、培养条件、计量器具校准和人员操作等^[4-5],这些影响因子(X)与测量值(Y)之间存在复杂的函数关系,采用以下通用公式表示: $Y=f(X_1, X_2, \dots, X_n)$ 。

菌落总数测定控制图可反映测量过程始终处于统计控制状态,方便测量模型的建立。

根据菌落总数测定控制图(图 1),建立菊粉中菌落总数测量的数学评估模型为:

作者简介 祖新(1973-),男,河南巩义人,高级工程师,从事食品科学与工程研究。

收稿日期 2016-09-24

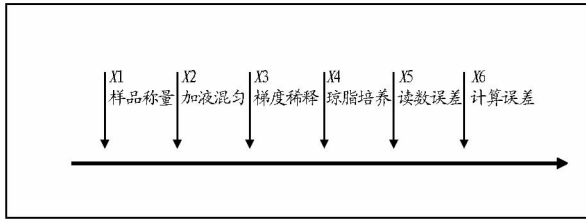


图 1 菌落总数测定控制过程

Fig. 1 The control process of determining total number of bacterial colony

$$Y = f(X_1, X_2, X_3, X_4, X_5, X_6) \quad (1)$$

式中, X_1 为称量误差, X_2 为制样稀释误差, X_3 为梯度稀释误差, X_4 为培养基生长率, X_5 为读数误差, X_6 为计算误差。

2.2 评定标准不确定度分量 菌落总数测量的的数学评估模型中 6 个不确定度分量相互独立, 为方便不确定度运算, 用相对标准不确定度来表示各相应的不确定度。

2.2.1 样品称量过程引入的相对标准不确定度 $U_{(X_1)}$ 。 无菌条件下用精度为 0.1 g 的电子天平称取样品 25.0 g, 根据电子天平检定证书给出的最大允差为 0.1 g, 对于按级使用的数字式仪表、适用标准不确定度 GUM 法的 B 类评定, 测量仪器最大允差误差导致的不确定度属于矩形(均匀)分布, 区间半宽度 $a = 0.1$ g, 包含因子 $k = \sqrt{3}$, 则由此引入的标准不确定度为:

$$U_{m1} = \frac{0.1 \text{ g}}{\sqrt{3}} = 0.058 \text{ g}$$

电子天平分辨率为 0.1 g, 由此引入的不确定度也适用 B 类评定, 服从矩形均匀分布, 区间半宽度 $a = 0.05$ g, 包含因子 $k = \sqrt{3}$, 则由此引入的标准不确定度为:

$$U_{m2} = \frac{0.05 \text{ g}}{\sqrt{3}} = 0.029 \text{ g}$$

不确定度分量 U_{m1} 和 U_{m2} 互不相关, 称量的合成标准不确定度可采用方根和方法得到:

$$U_{(取样)} = \sqrt{U_{m1}^2 + U_{m2}^2} = \sqrt{0.058^2 + 0.029^2} = 0.065 \text{ g}$$

它们的相对不确定度分别为:

$$U_{(X_1)} = \frac{U_{(取样)}}{m_{样}} = \frac{0.065 \text{ g}}{25 \text{ g}} = 0.26\%$$

2.2.2 样品稀释过程引入的相对标准不确定度 $U_{(X_2)}$ 。 样品稀释采用 250 mL 的量筒, 欧洲分析化学中心(EURACHEM)认为其不确定度服从三角分布, 适用 GUM 法 B 类评定, 量筒按照 JJG 196—2006《常用玻璃量器检定规程》^[6] 的容量允差为 2 mL, 则区间半宽度为 $a = 2$ mL, 包含因子 $k = \sqrt{6}$, 则量具的标准不确定度为:

$$U_{(b)} = \frac{0.2 \text{ mL}}{\sqrt{6}} = 0.82 \text{ mL} = 0.82 \text{ g}$$

量筒的标准不确定度体现在最终形成的 250 g 稀释液的相对不确定度, 即:

$$U_{(X_2)} = \frac{U_{(b)}}{m_{样}} = \frac{0.82 \text{ g}}{250 \text{ g}} = 0.33\%$$

2.2.3 样品梯度稀释过程引入的相对标准不确定度 $U_{(X_3)}$ 。 样品梯度稀释采用 1 mL 的无菌分度吸量管, 其不确定度服从三角分布, 适用 GUM 法 B 类评定, 吸量管按 JJG 196—2006《常用玻璃量器检定规程》的容量允差为 0.015 mL, 则区间半宽度为 $a = 0.015$ mL, 包含因子 $k = \sqrt{6}$, 则量具的标准不确定度为:

$$U_{(t)} = \frac{0.015 \text{ mL}}{\sqrt{6}} = 0.006 \text{ mL} = 0.006 \text{ g}$$

分度吸量管的标准不确定度体现在最终形成的 $m_{液} = 10$ g 的梯度稀释液的相对不确定度, 即:

$$U_{(X_3)} = \frac{U_{(t)}}{m_{液}} = \frac{0.006 \text{ g}}{10 \text{ g}} = 0.061\%$$

2.2.4 培养基生长率引入的相对标准不确定度 $U_{(X_4)}$ 。 根据培养基质量要求^[7] 和生产企业提供的培养基检测报告, 大肠埃希氏菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌的生长率(PR)分别为 0.95、1.10 和 0.87。

生长率以趋向 PR 值居多, 且超越 PR 值的概率为 0, 故适用于反正弦分布, 不确定度按 GUM 法的 B 类评定, 区间半宽度 $a = 1 - PR$, 包含因子 $k = \sqrt{2}$, 标准不确定度分别为: $U_{(大)} = \frac{0.05}{\sqrt{2}} = 0.035$ 。

$$U_{(金)} = \frac{0.1}{\sqrt{2}} = 0.071; U_{(枯)} = \frac{0.13}{\sqrt{2}} = 0.092。$$

由培养基引入的相对标准不确定度为:

$$U_{(X_4)} = \sqrt{U_{(大)}^2 + U_{(金)}^2 + U_{(枯)}^2} = \sqrt{0.035^2 + 0.071^2 + 0.092^2} = 0.12 = 12\%$$

2.2.5 人员读数引入的相对标准不确定度 $U_{(X_5)}$ 。 检测人员在查计培养基平板上的菌落时, 因读数经验以及计数平板上菌落的复杂状态而产生误差, 该误差通过不同人员对同一个培养基平板的菌落进行多次读数后统计得出, 利用公式 $\bar{C} = \frac{1}{20} \sum_{i=1}^{10} C_i$ 计算出平均值为 158.1。

多次读数是对被测量指标进行独立重复观测, 不确定度适用于 GUM 法的 A 类评定, 采用贝塞尔公示计算试验标准偏差 $S(C) = \sqrt{\frac{1}{10-1} \sum_{i=1}^{10} (C_i - \bar{C})^2} = 1.91$, 相对标准偏差为 $S(r) = S(C)/\bar{C} = 1.21\%$ 。

实际检测中每个平板由两名检测人员读数, 2 次读数平均值引起的标准不确定度分量为: $U = \frac{S(r)}{\sqrt{2}} = 0.86\%$ 。

2.2.6 菌落总数计算的相对标准不确定度 $U_{(X_6)}$ 。 为测试计算引入的不确定度, 同一稀释度接种 10 个平板, 利用公式 $\bar{C} = \frac{1}{20} \sum_{i=1}^{10} C_i$ 计算出每个平板的平均菌落总数为 150.6×10^2 CFU/g。

采用贝塞尔公示计算试验标准偏差 $S(C) = \sqrt{\frac{1}{10-1} \sum_{i=1}^{10} (C_i - \bar{C})^2} = 11.35$, 相对标准偏差为 $S(r) = S(C)/\bar{C}$

$\bar{C} = 7.53\%$ 。

按照检测标准要求,对处于适宜计数范围的菌落数计算2个平板的平均值。此次乳粉检验,在 10^{-2} 倍计数值分别为158和151,对被测量进行独立重复测的得值,按A类标准计算不确定度: $U = \frac{S(r)}{\sqrt{2}} = \frac{S(r)}{\sqrt{2}} = 5.33$,计算出相对不确定度

$U_{(x_6)}$ 为3.54%。

2.3 合成标准(相对)不确定度 影响菊粉菌落总数检测不确定度的各自由度均不相关,则合成标准相对不确定度的通用公式为:

$$U_c(y) = \sqrt{\sum_{i=1}^N \left[\frac{\partial f}{\partial x_i} \right]^2 u^2(x_i)}$$

灵敏系数 $\frac{\partial f}{\partial x_i}$ 在菌落总数检测各自由度中均为1,则合成

标准相对不确定度公式简化为:

$$\begin{aligned} U_c(y) &= \sqrt{\sum_{i=1}^N u^2(x_i)} \\ &= \sqrt{U_{(x_{11})}^2 + U_{(x_{12})}^2 + U_{(x_{13})}^2 + U_{(x_{14})}^2 + U_{(x_{15})}^2 + U_{(x_{16})}^2} \\ &= \sqrt{0.26^2 + 0.33^2 + 0.06^2 + 12^2 + 0.86^2 + 3.54^2} \\ &= 12.54\% \end{aligned}$$

2.4 菊粉菌落总数测量不确定度表示 菌落总数检测涉及健康安全,这类检测一般取包含概率 $p = 95\%$,即不确定度包含因子 $k = 2$,则扩展不确定度: $U_p = k \cdot u(N) = 2 \times 150.6 \times 12.54\% / 10^{-2} \approx 4\ 000$ CFU/g。因此,菊粉菌落总数为: $Y = (1.5 \pm 0.4) \times 10^4$ CFU/g; $k = 2$ 。

3 讨论

3.1 菌落总数测量的主要不确定度分量的解析 菌落总数测量的不确定度主要来源于培养基的菌落生长率 $U_{(x_{14})}$;其次来源于菌落总数计算 $U_{(x_{16})}$ 和测量人员查计菌落数 $U_{(x_{15})}$ 的误差;称量和稀释过程引入的不确定度剃度稀释较小,其中的剃度稀释,理论上每增加一级就应多一次分量计算,但考虑规范操作下剃度稀释对不确定度影响有限,正常个数级别的剃度稀释分量甚至可以忽略不计。部分文献将样品自身均匀性也列为重要的不确定度来源^[8],虽然考虑了一些实际情况,但不符合采集样品应具有代表性的基本原则。此次检测选取的菊粉样品在制样环节可作到均匀一致,不考虑其不确定度分量,建立的评定方法同样适用于其他粉状食品。

(上接第55页)

以做到层层把关,人人参与,严防异物混入产品中。产品装袋前必须严格落实专职检品人员对产品逐一进行正反两面检查,及时挑出不良品并正确处理,反馈给前道工序和管理人员,确认无异物混入、产品合格方可装袋。

3 结语

物理污染物的种类非常多,来源非常广,上述这些物理污染物在水产品加工企业普遍存在,也是顾客投诉的主要原因,所以应按上述预防措施严格控制。另一方面,通过上述

3.2 菌落总数测量数学模型 菌落总数测量不是直接测量,能通过直接测定得到结果,因此不能将菌落总数测量作为直接测量,而将测量的数学模型写为 $y = x$,这种错误的测量模型既不是菌落数测定的计算公式,也不能用作菌落数测定的不确定度评定。该研究以公式(1)作为不确定度测量模型,符合GUM法通用要求,也符合微生物类复杂检测的实际情况。

3.3 关于重复测量评定不确定度 据报道,对同一样品重复测量多次,计算菌落总数测量结果的算术平均值及标准差,从而计算测量结果的不确定度。因此,将这种方法称为评定测量重复性带来的不确定度。这种方法是为评定不确定度而重复多次检测同一产品,不但不适用于实际检测工作,也不符合不确定度评定方法,GUM法要求测量不确定度报告应包含不确定度来源,灵敏系数等内容,这类方法都不能合理提供。

3.4 关于菌落总数计算不确定度的多次测量 测定菌落总数计算的相对标准不确定度 $U_{(x_6)}$,笔者对同一稀释度多次测量,计算该不确定度分量的相对标准偏差,只要复现性测量条件不变,后续菌落总数的不确定度计算均可采用此值而无须重复操作。

3.5 不确定度的动态变化 当出现检测人员调整、称量器具更换等变化时,菌落数检测的有关不确定度分量就会出现相应的变化,在评定菌落数测定(检测)的不确定度时,应及时重新评定这些发生变化的有关不确定度分量。

参考文献

- [1] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 测量不确定度评定与表示: JJF 1059.1—2012[S]. 北京:中国标准出版社,2013.
- [2] 中华人民共和国卫生部. 菌落总数测定:GB 4789.2—2010 食品微生物学检验[S]. 北京:中国标准出版社,2010.
- [3] 谢平会,遇小杰,薛成玉,等. 测量不确定度在食品菌落总数检测中的评定[J]. 中国卫生检验杂志,2011,21(10):2576,2578.
- [4] 林蓉. 食品菌落总数检测中的不确定度分析[J]. 科技与创新,2015,40(16):89-90.
- [5] 张勇,王闻卿,张勇琪,等. 评定食品中菌落总数的不确定度[J]. 临床医药文献电子杂志,2015,2(5):811-812.
- [6] 中华人民共和国国家质量技术监督检验检疫总局. 常用玻璃量器检定规程:JJG 196—2006[S]. 北京:中国计量出版社,2007.
- [7] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品微生物学检验 培养基和试剂的质量要求:GB 4789.28—2013[S]. 北京:中国标准出版社,2014.
- [8] 胡颀,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):761-775,770.

措施的实施,能规范员工的行为、提高卫生意识,而员工意识的提升则能更好地执行预防措施,从而实现持续改进,最终能减少物理污染带来的危害和投诉量,增加利润和提升企业信誉。

参考文献

- [1] 肖尧荣. 食品物理性污染的检测及防范[J]. 食品研究与开发,1991(1):33-36.
- [2] 中华人民共和国卫生部. 食品安全国家标准 食品生产通用卫生规范:GB 14881—2013[S]. 北京:中国标准出版社,2013.
- [3] 陈云华,孔繁明,陈争,等. 食品安全管理体系 水产品加工企业要求:GB/T 27304—2008[S]. 北京:中国标准出版社,2009.