

实验室菌落计数精密度控制的研究 ——影响精密度的因素

程苏云 任锦玉 童哲 汪炜

(浙江省疾病预防控制中心,浙江 杭州 310009)

摘要:为提高食品中菌落总数测定的准确性,采用7组实验人员对含菌量在一定范围内的标本同时检测;不同实验人员对同一批平皿菌落数进行计数比对,实验者对同一份标本进行重复加样检验,以统计学方法对实验数据进行分析。通过多个实验表明,试样的均衡性、读数误差控制范围的正确确定以及样本菌量的正确估计,都是影响实验室菌落计数精密度控制的因素。提示今后应针对这些影响因素,研究有效的控制方法。

关键词 集落计数,微生物 因素分析,统计学 质量控制

中图分类号:R15 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-8456(2001)05-0011-03

在食品卫生微生物检验中,菌落总数测定是一项常规的微生物检验项目。从我国的食品卫生标准看,绝大多数食品都制定了菌落总数的限量要求,而菌落总数测定这一实验的准确性,受多个因素的影响,只有通过对其影响因素的分析控制,才能保证食品中菌落总数检测的准确性和客观性。

1 方法与材料

1.1 方法

检验人员对相同含菌量的标本进行菌落总数测定,标本前处理方法 取含菌圆片滤纸一张,置10 mL 灭菌生理盐水中,充分溶解,使纤维呈均匀絮状,吸取该溶液1 mL到9 mL 灭菌生理盐水中,制成1:10稀释液,依次类推,直至 10^{-5} 、 10^{-6} 稀释。分别取 10^{-5} 、 10^{-6} 稀释液进行菌落总数测定,方法按GB 4789.2—94方法^[1]进行。

对同一平皿菌落数计数比对方法 取菌落数30~300个平皿7块,分别计数,第一次计数后,去掉计数标记,将平皿置冰箱保存。第二天对平皿重新计数,分别计算两次计数的平均值。

同标本菌落计数及重复性检验方法 大肠杆菌肉汤培养物(37 24 h培养物),乳酸菌制品(乳酸菌的含量为 1×10^8 CFU/g),保健食品(胶囊剂型),副溶血性弧菌培养物(37 24 h培养物)。以上4类标本,根据不同标本含菌量的估计,选择不同的稀释度作为计数用稀释度。大肠菌为 10^{-9} ;乳酸菌为 10^{-7} ;保健食品为 10^{-1} ;副溶血性弧菌 10^{-8} 。菌落计

数选用的培养基,除了乳酸菌用特定的培养基(改良TIA培养基)^[2]外,其它均用普通营养琼脂培养基。每一类标本同一稀释度分别吸1 mL,注入灭菌平皿中,各类标本重复14次,然后倾注相应的培养基,经培养后做菌落计数。

1.2 材料

含菌滤纸圆片由本中心消杀实验室提供。

实验用的培养基按GB 4789及GB/T 16347标准配方进行配制。

测试标本来源 大肠杆菌为ATCC25922菌株;乳酸菌制品及保健食品为送检胶囊产品;副溶血性弧菌为本实验室保存的菌株。

2 结果

2.1 7组实验人员对相同含量的菌片检测结果见表1。

表1 7组人员菌落计数结果

实验者编号	计数结果 X_n	与均数误差	与均数误差率 %
A	1.885×10^6	2.16×10^5	12.94
B	1.890×10^6	2.21×10^5	13.24
C	1.540×10^6	1.29×10^5	7.70
D	1.465×10^6	1.04×10^5	6.23
E	1.622×10^6	2.04×10^5	12.22
F	1.570×10^6	9.90×10^4	5.93
G	1.770×10^6	1.01×10^5	6.05

注:7组检测数据的平均数为:每张 $\bar{x} = 1.677 \times 10^6$ CFU,误差率 = $\frac{x_n - \bar{x}}{\bar{x}} \times 100\%$;均数的标准差为: $s = 1.754 \times 10^5$ 。

依据统计学原理,正态分布下 95% 的可信区间为每张 $2.01 \times 10^6 \sim 1.33 \times 10^6$ CFU ($\bar{x} \pm 1.96 s$),所检测的 7 组数据全在这一范围;如果按 $\bar{x} \pm 1 s$,可信区间为每张 $1.844 \times 10^6 \sim 1.4936 \times 10^6$ CFU,所检测的数据中有 3 组不在这一范围。如果按实验者间误差不大于 10% 的要求,实验结果中也有 3 组数据大于 10%。

2.2 实验人员对相同平皿菌落数的二次读数结果分别计算平均数和标准偏差,见表 2。A、B、C 三位实验人员在重复两次菌落计数后,按北欧标准^[3]标准偏差小于 7.7% 控制要求,从表 2 可以看出,实验者 A、B、C 各有两组数据 s 值大于 7.7%。

表 2 不同实验人员的菌落读数偏差比较

编号	A				B				C			
	a_1	b_1	x_1	s_1	a_2	b_2	x_2	s_2	a_3	b_3	x_3	s_3
1	173	198	185.5	13.4	186	204	195.0	9.2	183	172	177.5	6.2
2	172	206	189.0	17.9	218	181	199.0	18.5	177	192	184.5	8.1
3	150	158	154.0	5.2	162	166	164.0	2.4	160	168	164.0	4.8
4	161	152	156.5	5.8	164	152	158.0	7.6	167	150	158.5	10.7
5	162	163	162.5	0.6	173	174	173.5	0.6	166	169	167.0	1.8
6	152	162	157.0	6.4	157	163	160.0	3.8	157	162	159.5	2.9
7	172	181	176.5	5.1	177	179	178.0	1.1	173	181	177.5	4.5

表中 a 、 b 分别表示两次计数结果; x 表示两次计数的平均数; s 表示两次计数的标准偏差,其计算方法为: $\bar{x} = \frac{a+b}{2}$; $s = \frac{a-b}{x} \times 100\%$ 。

2.3 不同实验人员对相同平皿菌落计数,其数据的离散度、误差范围见表 3

表 3 A、B、C 三位实验人员计数误差范围估算

平皿编号	\bar{x}	s	$\frac{s}{\bar{x}} \times 100\%$	$\bar{x} \pm 18.2\%$
1	186.00	11.84	6.36	152.52 ~ 219.48
2	191.00	16.39	8.58	156.62 ~ 225.38
3	160.67	5.85	3.64	131.75 ~ 189.59
4	157.60	6.60	4.81	129.37 ~ 187.73
5	167.83	4.60	2.74	137.28 ~ 198.38
6	158.83	3.89	2.45	129.93 ~ 187.73
7	177.17	3.53	2.01	144.93 ~ 209.41

注:表示 \bar{x} 表示 A、B、C 三位实验人员对统一编号的平皿菌落数,计数数据的平均数; s 为计数数据的标准差; $\bar{x} \pm 18.2\%$ 为误差范围。

不同实验人员对同号平皿菌落计数,按 $\bar{x} \pm 18\%$ 的范围估算,所有实验数据均在这一范围,7 组数据的离散程度均小于 10%。

2.4 4 种不同标本各取一稀释度的一定量,分别 14 次加入 14 个平皿,观察各不同标本的离散度,结果见表 4。

表 4 中的数据表明,除了副溶血性弧菌的计数数据间误差及离散度较大外,其它 3 种标本的菌落计数离散度分别为 8.95%、11.21%、8.95%。

表 4 4 种不同标本均数离散度比较

标本名称	次数	\bar{x}	s	$\frac{s}{\bar{x}} \times 100\%$
大肠菌培养物(液体)	14	50.35	4.51	8.95
乳酸菌制品(粉剂)	14	82.64	9.62	11.21
保健食品(胶囊)	14	125.14	11.21	8.95
副溶血性弧菌培养物(液体)	14	4.64	1.61	34.69

3 讨论

3.1 食品微生物检验中的菌落总数测定,是一个定量指标,这一指标的准确测定,受多种因素的影响。要使检测值控制在 $\bar{x} \pm 1.96s$ 这一范围,需要对影响实验室菌落计数精密度的因素进行分析。首先标本前处理是否均匀,本次质控选用经细菌定量的滤纸片进行检测,由于滤纸纤维在稀释液中,难以呈悬液分布,每个实验人员在加样时差别就比较大。按常规的细菌计数要求,^[5]实验者之间的计数误差不超过 $\pm 10\%$ 的范围,在本次研究中,7 组数据中有 3 组超过 10% 以上,可见被检试样是否制成均匀的稀释悬液将直接影响菌落计数的精密度。采用何种标本作为控制实验室菌落计数的标准品,是一个值得探讨的问题。设想采用明胶圆片^[6]法。可以改善菌悬液的均匀性,这有待于进一步实验。从另一角度来看,菌落计数的精密度控制不超过 10% 的要求,在实际工作中还是有一定的难度。从检验试样的复杂性及受影响因素的多样性考虑,菌落计数精密度控制在 $\bar{x} \pm 1.96s$ 的范围比较合适。在理化检验精密度控制^[4]中,通过绘制质量控制图获得较好的精密度控制。我们认为菌落总数测定的实验室质量控制可以参照这一方法。

3.2 菌落计数的读数误差是影响实验室菌落计数精密度的另一因素。读数误差有实验者自身读数的误差和实验者之间的读数误差。按西欧的标准相对误差率不超过 7.7%,而 A、B、C 三位实验人员均有两组数据相对误差率超过,其合格率偏低,有 28.57% 数据误差率偏高。在表 3 可以看出,实验者之间的读数误差均控制在 $\bar{x} \pm 18\%$ 的范围。这一标准是否真正适用我们的实验,需要更多的数据来证

实。

3.3 从不同类的标本菌落计数看,选择合适的稀释度进行菌落计数,也是影响菌落计数精密度的因素之一。从表4结果可以看出,由于对副溶血性弧菌培养液菌液浓度估计不准确,选择计数所用的稀释度偏高,造成计数时平皿菌落数偏少,这样所得菌落计数结果均数离散率明显大于大肠菌培养液均数离散率。目前在我国的某些食品的卫生标准中,细菌或霉菌指标较低。如保健食品^[7]霉菌和酵母菌指标为25 CFU/mL(g),这一指标对于固体试样来说,在试样经10倍稀释的计数平皿上,平均菌落数不能超过2.5个,而实际上较少的菌落数可能造成菌落计数的精密度下降,使检验数据的客观性受到影响。

综上所述,对于实验室菌落计数精密度的控制

是多方面的,有主观因素和客观因素,如何对这些因素进行有效控制,有待进一步研究。

参考文献:

- [1] GB 4789—94. 食品卫生检验方法(微生物学部分)[S].
- [2] GB/T 16347—1996. 乳酸菌饮料检验方法[S].
- [3] 北欧食品分析委员会编. 微生物实验室质量保证准则[S]. 1994.
- [4] 陈楚良,主编. 卫生化学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1992.
- [5] 莫世华. 消毒及医院感染知识问答[M]. 杭州:浙江科学技术出版社, 1997.
- [6] 李影林,主编. 培养基手册[M]. 长春:吉林科学技术出版社, 1991.
- [7] GB 16740—1997. 保健(功能)食品通用标准[S].

Study of accuracy of aerobic plate count in laboratory/Cheng Suyun, Ren Jinyu, Tong Zhe, et al. //Chinese Journal of Food Hygiene. - 2001, 13(5): 11~13

Abstract: To improve the accuracy of aerobic plate count in food, 7 groups of laboratory technicians tested the samples with the same amount of bacterium simultaneously. The result that 3 laboratory technicians made aerobic plate count to the same lot of samples was contrasted, laboratory technicians repeatedly added samples in the same plate and tested them. The results were analysed by statistics methods separately. The results show that homogeneity of samples, correct determine of control range of reading errors and correct estimation of bacterium account are elements that affect accuracy of aerobic plate count.

Author's address: Cheng Suyun, Center of Disease Prevention and Control of Zhejiang Province, Hangzhou, 310009, PRC.

Key Words: Colony Count, Microbial Factor Analysis, Statistical Quality Control

卫生部关于食品添加剂使用问题的复函

卫法监函[2001]109号

海南省卫生厅:

你厅《关于食品添加剂使用情况问题的请示》收悉。经研究,函复如下:

一、根据《食品添加剂使用卫生标准》(GB 2760—1996),亚硫酸盐的使用范围不包括面条、面饼等产品以及生产该类产品所使用的主要原料面粉。

对检出亚硫酸盐的面条、面饼等产品应当禁止生产经营,同时依据《食品卫生法》第四十二条的规定予以处罚。

二、《食品添加剂使用卫生标准》(GB 2760—1996)中,其备注栏中的“其他品种”系指使用范围内的品种。此复。

中华人民共和国卫生部
二〇〇一年七月二十日