

基于 ISO19036:2019 评估饮用水中大肠菌群的测量不确定度

钟文涛^{1,2} 卢琳^{1,2} 李政¹ 周培华^{1,2} 洪振柏^{1,2} 周丛^{1,2}

(1. 湖南省产商品质量检验研究院, 湖南 长沙 410007;

2. 食品安全监测与预警湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410007)

摘要: [目的] 参考 ISO19036:2019 对饮用水中大肠菌群的测量不确定度进行评估。[方法] 通过设计试验方案, 分别评估技术不确定度(u_{tech})、基质不确定度(u_{matrix})和分布不确定度(u_{distrib}), 并综合 3 个分量的数值计算合成不确定度($u_c(y)$)和扩展不确定度(U)。[结果] 对 GB 4789.3—2016 第二法进行测量不确定度评估后, 得到的技术不确定度为 0.120 2 log(CFU/mL), 基质不确定度为 0.1 log(CFU/mL), 分布不确定度分别为 0.065 5, 0.026 1 log(CFU/mL), 当结果为 440 CFU/mL 时, 扩展不确定度为 0.34 log(CFU/mL), 表示为 $(2.64 \pm 0.34) \log(\text{CFU/mL})$ 。[结论] ISO19036:2019 对食品中微生物定量检测方法进行测量不确定度评估相较目前国内标准更科学、更便捷。

关键词: 测量不确定度; 技术不确定度; 基质不确定度; 分布不确定度

Estimation of measurement uncertainty of coliforms in drinking water according to ISO19036:2019

ZHONG Wentao^{1,2} LU Lin^{1,2} LI Zheng¹ ZHOU Peihua^{1,2} HONG Zhenbai^{1,2} ZHOU Cong^{1,2}

(1. Hunan Provincial Institute of Product and Commodity Goods Quality Inspection, Changsha, Hunan 410007, China;

2. Hunan Provincial Key Laboratory of Food Safety Monitoring and Early Warning, Changsha, Hunan 410007, China)

Abstract: [Objective] This study aimed to estimate the measurement uncertainty of coliforms in drinking water according to ISO19036:2019. [Methods] By designing protocols, the technical uncertainty (u_{tech}), matrix uncertainty (u_{matrix}) and distribution uncertainty (u_{distrib}) were estimated respectively, and the combined uncertainty ($u_c(y)$) and extended uncertainty (U) were calculated by combining the values of the three components. [Results] After estimating the measurement uncertainty of the second method of GB 4789.3—2016, the technical uncertainty was 0.120 2 log(CFU/mL), the matrix uncertainty was 0.1 log(CFU/mL), and the distribution uncertainty was 0.065 5 log(CFU/mL) and 0.026 1 log(CFU/mL). When the result was 440 CFU/mL, the extended uncertainty was 0.34 log(CFU/mL), expressed as $(2.64 \pm 0.34) \log(\text{CFU/mL})$. [Conclusion] According to ISO19036:2019, the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations of microorganisms in food is more scientific and convenient compared to current domestic standards.

Keywords: measurement uncertainty; technical uncertainty; matrix uncertainty; distributional uncertainty

测量不确定度(measurement uncertainty, MU)的评估是实验室质量管理的重要内容,在实验室资质认定和实验室认可的评审过程中,均要求体系文件中包含测量不确定度的评估程序^[1-2],必要时能正确使用,以便更加客观公正地表示分析结果。在食品检验领域,微生物在样

品中分布具有随机性,检验周期长达 2~5 d,因此其结果的测量不确定度评估相对于化学法过程更复杂、数据更离散。在微生物检验过程中,通过方法验证、仪器校准、参加能力验证或使用标准物质等一系列实验室管理措施可有效提高结果的可靠性,但测量不确定度仍不能完全

基金项目: 湖南省市场监督管理局科技计划项目(编号:2024KJJH05); 湖南省自然科学基金一部门联合基金项目(编号:S2024JJBMLH0442)

通信作者: 周丛(1978—),男,湖南省产商品质量检验研究院正高级工程师,硕士。E-mail:3489785@qq.com

收稿日期: 2024-01-30 **改回日期:** 2024-06-05

消除^[3-4]。

近年来,有关如何评估食品微生物检验方法的测量不确定度研究较多^[5-10],其多采用RB/T 151—2016方法,或自行设计试验方案,在如何科学便捷评估微生物测量不确定度上未能形成统一意见。实验室通常可使用“自上而下”和“自下而上”两种方法评估测量不确定度。“自上而下”法是基于“黑匣子”策略,通过最终结果的标准偏差反映试验过程中数据总体偏离的程度,而“自下而上”法是逐项分析试验流程中可能产生数据偏离的不确定度来源,对每个分量加权计算后得到最终结果的测量不确定度,两种方法各有优势,但结果趋于一致^[11-13],显然“自上而下”法具有更高的可接受性。

大肠菌群是食品中常见的卫生指标菌,反映了食品生产、销售过程中是否存在粪便污染,也是食品检验机构日常工作中检测频次最高的微生物项目。大肠菌群检验普遍采用GB 4789.3—2016的第二法。研究拟应用ISO19036:2019方法,对GB 4789.3—2016第二法进行测量不确定度评估,其中包括平板计数过程和可疑菌确认过程,旨在为实验室开展相关工作提供参考思路。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

结晶紫中性红胆盐琼脂(VRBA)、煌绿乳糖胆盐(BGLB):北京陆桥技术股份有限公司、青岛海博生物技术有限公司;

氯化钠:分析纯,中国医药集团有限公司。

1.1.2 主要仪器设备

电子天平:TXB6201L型,日本Shimadzu公司;

电子天平:MW-3000C型,上海凯士电子有限公司;

生化培养箱:IPP400型,德国Memmert公司;

生化培养箱:SPX-250B-III型,天津市泰斯特仪器有限公司;

移液器:0.1~1 mL,德国Eppendorf公司;

移液器:0.1~1 mL,大龙兴创实验仪器(北京)股份有限公司;

拍击式均质器:BagMixer 400型,法国Interscience公司;

涡旋混匀仪:Lab dancer型,德国IKA公司。

1.2 测量不确定度评估方法

1.2.1 样品的选择与处理 取10桶同一品牌、同一批次自然污染的桶装饮用水,试验前,将水桶封口处用75%酒精消毒,移入洁净间内待测。

1.2.2 技术不确定度评估方法 技术不确定度为操作人

员在取样、混匀、梯度稀释、培养基配制、培养过程及菌落计数等操作过程中带入的不确定度。依据ISO19036:2019,技术不确定度的评估有3种方式,按优先级分别为基于实验室内再现性标准偏差、基于实验室间方法确认的再现性标准偏差或基于能力验证结果的再现性标准偏差进行评估。其中第一种方式可在独立的实验室内完成,最接近大部分实验室的实际工作情况,试验方案如图1所示。

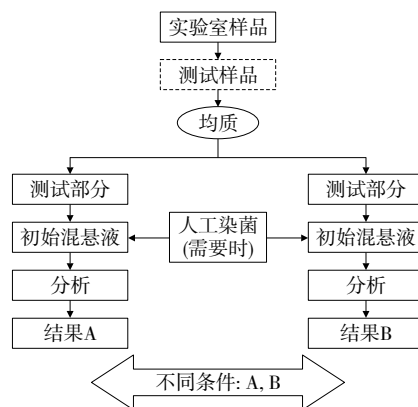


图1 使用实验室内再现性标准偏差评估技术不确定度的试验方案

Figure 1 Protocol for evaluating technical uncertainty using intra-laboratory reproducibility standard deviation

技术不确定度评估过程中,需充分考虑可能影响结果的关键技术因素^[14-15],包括人员、试剂和仪器设备等,并保证结果A和结果B在尽可能不同的条件下得出。该评估设计的差异化试验方案见表1。

无菌条件下打开桶装水封口后,由检验员A和检验员B独立操作,分别对每份样品取2个测试部分按照GB 4789.3—2016第二法流程进行取样和梯度稀释,经VRBA琼脂在(36±1)℃培养24~48 h,各得到20个初步计数结果,从每块平板上分别挑取10个可疑菌落接种BGLB肉汤进行确证试验,根据阳性菌占比对初步计数结果进行修正后得到最终计数结果,确保初步计数结果和最终计数结果均在可接受范围内。计算2个测试部分平板上菌落数的平均值,经常用对数转换后计算实验室内再现性标准偏差,即可得到技术不确定度数值。

1.2.3 可接受结果判定 依据ISO19036:2019中可接受结果判定的表述,结合GB 4789.3—2016第二法要求,满足至少有一个稀释度的菌落数在15~150 CFU/平板,同时在确证过程中,至少有1/2的疑似菌被确证为目标菌时的结果为可接受结果。

表 1 技术不确定度评估试验条件差异对照表

Table 1 Comparison table for differences in experimental conditions for evaluation of technical uncertainty

关键技术因素	影响途径	条件 A	条件 B
培养基	提供营养、筛选典型菌	北京陆桥技术股份有限公司	青岛海博生物技术有限公司
培养箱	细菌培养	德国 Memmert 公司	天津市泰斯特仪器有限公司
拍击式均质器、涡旋仪混匀	样液混匀	法国 Interscience 公司、德国 IKA 公司	手摇混匀
移液器	梯度稀释	德国 Eppendorf 公司	大龙兴创实验仪器(北京)股份公司
人员	试验操作和计数	检验员 A	检验员 B

1.2.4 基质不确定度评估方法 基质不确定度是由于微生物在食品基质中的分布存在不均匀性和随机性,导致采样部分不能代表整批样品的微生物污染程度。ISO19036:2019中提供了3种基质不确定度的评估方式。根据样品性状,均匀性良好的非黏性液体样品和粉末样品(如奶粉)基质不确定度较小,可以直接使用定值0.1 log(CFU/g)或0.1 log(CFU/mL);对于难以完全混匀的样品,基质不确定度可通过设计试验方案,对同一基质样品在尽可能一致的试验条件下得到至少11个可接受结果,计算重复性标准偏差得出;可以根据之前实验室评估的数据或引用来源于其他参考实验室测得的数据,作为相似基质不确定度的近似值。该评估使用的样品为饮用水,可以使用定值作为基质不确定度数值。

1.2.5 分布不确定度评估方法 分布不确定度基于统计学维度,体现了微生物在起始样品匀液和梯度稀释过程中随机分布的特点。根据检验方法学间的差异,仅基于平板倾注、平板涂布的方法需考虑泊松不确定度(u_{Poisson});例如大肠菌群、金黄色葡萄球菌等微生物检验项目,需要对可疑菌落进行确证,还需要额外考虑确证不确定度(u_{conf});对基于最可能数(most probable number, MPN)的方法,需要考虑MPN不确定度(u_{MPN})。上述3种分布不确定度均可通过简单计算或查询检索表的形式快速得出。

1.2.6 合成不确定度和扩展不确定度评估方法 分别将技术不确定度的平方、基质不确定度的平方以及相关分布不确定度的平方加和后再开平方,即得到对应的合成不确定度。需要注意的是,当某个分量的不确定度小于最大不确定度分量的1/5时,该分量的影响可忽略,不列入合成不确定度的公式计算。扩展不确定度通过合成不确定度乘以包含因子($k=2$)来计算。

2 结果与分析

2.1 技术不确定度评估结果

将试验得到的数据代入式(1)计算实验室内再现性标准偏差,得到技术不确定度的评估结果。

$$u_{\text{tech}} = S_{\text{IR}} = \sqrt{\frac{1}{2n} \sum_{i=1}^n (y_{iA} - y_{iB})^2}, \quad (1)$$

式中:

S_{IR} ——实验室内再现性标准偏差;

n ——实验室样品数量;

i ——样品序号, $i=1 \sim n (n \geq 10)$;

y_{iA} ——条件A下得出的数值, log(CFU/mL);

y_{iB} ——条件B下得出的数值, log(CFU/mL)。

根据GB 4789.3—2016第二法标准要求和技术不确定度试验方案,测得10份饮用水中大肠菌群的最终结果见表2。

根据式(1)和表1可知,技术不确定度 $u_{\text{tech}} = S_{\text{IR}} =$

$$\sqrt{\frac{0.2891}{220}} = 0.1202 \text{ CFU/mL}。$$

2.2 基质不确定度评估结果

饮用水为非黏性液体,较容易混合均匀,基质不确定度可取定值,即 $u_{\text{matrix}}=0.1 \text{ CFU/mL}$ 。

2.3 分布不确定度评估结果

GB 4789.3—2016第二法的操作流程中涉及了平板计数过程和可疑菌确证过程,因此该评估仅需考虑泊松不确定度和确证不确定度。

对于某一结果的泊松不确定度,按式(2)进行计算。

$$u_{\text{Poisson}} = \frac{1/\ln(10)}{\sqrt{\sum C}} = \frac{0.4343}{\sqrt{\sum C}}, \quad (2)$$

式中:

$\sum C$ ——计算结果时所使用的菌落总数, CFU/mL。

以条件A时的样品1的数据为例,平板上用于计算的菌落总数为44,根据式(2)计算 $u_{\text{Poisson}} = \frac{0.4343}{\sqrt{44}} = 0.0655 \text{ CFU/mL}$ 。

对于确证不确定度,可通过ISO19036:2019中表3进行检索,或按式(3)进行计算。

$$u_{\text{conf}} = \frac{1}{2.303} \sqrt{\frac{(n_c + 0.5)(n_p - n_c + 0.5)n_p^2}{(n_p + 1)^2(n_p + 2)n_c^2}}, \quad (3)$$

式中:

表2 10份饮用水中大肠菌群的最终结果
Table 2 Summary table of results for coliforms in 10 drinking waters

样品 <i>i</i>	条件 A		条件 B		差的平方 ($y_{iA} - y_{iB}$) ²
	大肠菌群总数(确证后) $x_{iA}/(\text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1})$	对数转换值 $y_{iA}/(\log \text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1})$	大肠菌群总数(确证后) $x_{iB}/(\text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1})$	对数转换值 $y_{iB}/(\log \text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1})$	
1	440	2.643 5	400	2.602 1	0.001 7
2	490	2.690 2	700	2.845 1	0.024 0
3	620	2.792 4	370	2.568 2	0.050 3
4	610	2.785 3	780	2.892 1	0.011 4
5	540	2.732 4	810	2.908 5	0.031 0
6	490	2.690 2	530	2.724 3	0.001 2
7	250	2.397 9	570	2.755 9	0.128 1
8	600	2.778 2	570	2.755 9	0.000 5
9	440	2.643 5	350	2.544 1	0.009 9
10	340	2.531 5	510	2.707 6	0.031 0

n_p ——被测试的疑似菌落总数;

n_c ——确证为阳性的菌落总数。

以条件 A 时的样品 1 的数据为例,所有被挑取的 10 个可疑菌落均确证为大肠菌群阳性,检索 ISO19036:2019 表 3,得到 $u_{\text{conf}}=0.026 1 \text{ CFU/mL}$ 。

2.4 合成不确定度和扩展不确定度评估结果

该评估不涉及 MPN 不确定度,因此合成不确定度可按式(4)进行计算。

$$u_c(y) = \sqrt{u_{\text{tech}}^2 + u_{\text{matrix}}^2 + u_{\text{Poisson}}^2 + u_{\text{conf}}^2} \quad (4)$$

其中,最大的不确定度分量为 $u_{\text{tech}}, u_{\text{matrix}}/u_{\text{tech}}, u_{\text{Poisson}}/u_{\text{tech}}$ 及 $u_{\text{conf}}/u_{\text{tech}}$ 均 >0.2 ,因此所有不确定度分量均需纳入最终合成不确定度的计算,则合成不确定度 $u_c(y) = \sqrt{0.120 2^2 + 0.1^2 + 0.065 5^2 + 0.026 1^2} = 0.171 5 \text{ CFU/mL}$ 。

当 k 值取 2(相当于 95% 的置信水平)时,扩展不确定度按式(5)进行计算。为避免修约误差累计造成的影响,对结果的修约在最后完成,一般保留两位小数。

$$U = 2 \times u_c(y) \quad (5)$$

因此,试验评估得到的扩展不确定度 $U=2 \times 0.171 5 = 0.34 \text{ CFU/mL}$ 。

2.5 结果表示

以条件 A 时的样品 1 的数据为例,大肠菌群计数的最终结果为 $4.4 \times 10^2 \text{ CFU/mL}$,换算成常用对数为 $2.64 \log(\text{CFU/mL})$,最终扩展不确定度为 $(2.64 \pm 0.34) \log(\text{CFU/mL})$ 。在应用该不确定度时还需注明“报告的扩展测量不确定度依据 ISO19036:2019 进行评估,基于合成标准不确定度乘以包含因子 $k=2$,置信水平 95%”。

3 结论

ISO19036:2019 在技术层面上对旧版本作出了较大篇幅的修订,采用“自上而下”的思路,分为评估技术不确定度、基质不确定度和分布不确定度 3 个分量,综合后计算出合成不确定度和扩展不确定度。在使用不同方法评估不同基质的测量不确定度时,可利用实验室的历史数据,通过“搭积木”的方式得到结果,大大降低了重复工作,相比旧版本更科学、更便捷。RB/T 151—2016 基于 ISO19036:2006 制定,在执行过程中其科学性和可操作性还有进一步优化的空间^[5,16-17],目前该标准参照 ISO19036:2019 思路已启动了修订工作。

参考文献

[1] 国家市场监督管理总局, 国家标准化委员会. 检测和校准实验室能力的通用要求: GB/T 27025—2019[S]. 北京: 中国标准出版社, 2019: 1-20.
State Administration for Market Regulation, Standardization Administration of China. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories: GB/T 27025—2019[S]. Beijing: Standards Press of China, 2019: 1-20.

[2] 国家市场监督管理总局. 检验检测机构资质认定评审准则[Z]. 2023-05-30.
State Administration for Market Regulation. Rules for the review of qualification accreditation of inspection and testing institutions[Z]. 2023-05-30.

[3] DIAS F R S, LOURENÇO F R. Top-down evaluation of the matrix effects in microbial enumeration test uncertainty[J]. Journal of Microbiological Methods, 2020, 171: 105864.

- [4] SINGH K A, RAI R, NAIR S S. Review on development of assigned value microbiological reference materials used in food testing[J]. *Food Microbiology*, 2022, 102: 103904.
- [5] 许瑞清, 赵海霞, 武瑞杰, 等. 整体法评定食品中大肠菌群的测量不确定度[J]. *食品工程*, 2023(3): 40-43.
XU R Q, ZHAO H X, WU R J, et al. Uncertainty in measurement of coliform in food by holistic method[J]. *Food Engineering*, 2023(3): 40-43.
- [6] 田浩, 李光耀, 张凡, 等. 饮用水中铜绿假单胞菌检测结果的不确定度评定[J]. *现代食品*, 2021(3): 206-209.
TIAN H, LI G Y, ZHANG F, et al. Evaluation of uncertainty of detection results of *Pseudomonas aeruginosa* in drinking water [J]. *Modern Food*, 2021(3): 206-209.
- [7] 魏敏, 姜华军, 王言爽, 等. 食品中霉菌和酵母计数的不确定度评定[J]. *食品安全导刊*, 2023(11): 111-113.
WEI M, JIANG H J, WANG Y S, et al. Uncertainty evaluation of the enumeration of molds and yeasts in food[J]. *China Food Safety Magazine*, 2023(11): 111-113.
- [8] 游元丁, 赵阳, 林雪丹, 等. 食品中金黄色葡萄球菌测量不确定度评定[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(6): 2 468-2 473.
YOU Y D, ZHAO Y, LIN X D, et al. Evaluation of uncertainty in measurement of *Staphylococcus aureus* in food[J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2021, 12(6): 2 468-2 473.
- [9] 胡雪梅, 李卫春, 于芳, 等. 生鲜乳中菌落总数的不确定度测量[J]. *草食家畜*, 2023(3): 37-41.
HU X M, LI W C, YU F, et al. Uncertainty evaluation of total bacterial colonies in fresh milk[J]. *Grass-Feeding Livestock*, 2023(3): 37-41.
- [10] 赵琪, 甄珍. 单核细胞增生李斯特氏菌 MPN 法结果测量不确定度评定[J]. *中国口岸科学技术*, 2022, 4(5): 77-81.
ZHAO Q, ZHEN Z. Uncertainty assessment of results measurement of *Listeria monocytogenes* by MPN method[J]. *China Port Science and Technology*, 2022, 4(5): 77-81.
- [11] RENATO COUTO A, REBELLO LOURENÇO F. Bottom-up and top-down measurement uncertainty evaluation for multivariate spectrophotometric procedures[J]. *Microchemical Journal*, 2023, 193: 109194.
- [12] BURR T, CROFT S, FAVALLI A, et al. Bottom-up and top-down uncertainty quantification for measurements[J]. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 2021, 211: 104224.
- [13] LEE J H, CHOI J H, YOUN J S, et al. Comparison between bottom-up and top-down approaches in the estimation of measurement uncertainty[J]. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 2015, 53(7): 1 025-1 032.
- [14] DIAS F R S, LOURENÇO F R. Measurement uncertainty evaluation and risk of false conformity assessment for microbial enumeration tests[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2021, 189: 106312.
- [15] WEISSFELD A S. Estimation of uncertainty of measurement in microbiology[J]. *Clinical Microbiology Newsletter*, 2010, 32 (22): 171-175.
- [16] 弓耀忠, 王媛慧, 张婷. 微生物不确定度的理论与实践[J]. *食品工程*, 2022(4): 77-79.
GONG Y Z, WANF Y H, ZHANG T. Theory and practice of microbial uncertainty[J]. *Food Engineering*, 2022(4): 77-79.
- [17] 王瑞兴, 王礼霞, 胡巖. 食品微生物定量检测的测量不确定度评估指南之商榷[J]. *中国卫生检验杂志*, 2023, 33(5): 638-640.
WANG R X, WANG L X, HU D. Discussion on the evaluation guidelines for measurement uncertainty in quantitative detection of food microorganisms[J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2023, 33(5): 638-640.