

生活饮用水中总大肠菌群的不确定度评定

高继霞 周一帆^(通讯作者) 潘胜梅 刘铁兵 祁妍敏 邱兵

中国民用航空局民用航空医学中心, 北京, 100123;

摘要: 目的: 为提高实验室对生活饮用水中总大肠菌群检测的准确度, 减少实验误差, 保证检测结果的可靠性和准确性。方法: 在大肠杆菌菌悬液中加入实验室超纯水进行人工污染后进行双人比对实验, 分析检测过程中存在的不确定度分量, 进行测量不确定度的评定。结果: 生活饮用水总大肠菌群测量合成不确定度为 0.35, 扩展不确定度为 0.70。结论: 对本次生活饮用水总大肠菌群测量不确定度评定, 发现样品重复测量引入的不确定度为测量不确定度的主要来源。

关键词: 生活饮用水; 总大肠菌群; 不确定度评定

DOI: 10.69979/3029-2808.26.03.022

总大肠菌群是指一群在 37℃ 培养, 24h 内能发酵乳糖、产酸产气、需氧和兼性厌氧的革兰氏阴性无芽孢杆菌。在生活饮用水的微生物日常监测中, 大多采用总大肠菌群作为污染的关键性指标之一, 可在一定程度上反应水质受病原微生物污染的状况, 在水质的卫生学评价中有重要意义。测量不确定度是对测量结果可疑程度的一种定量表示。CNAS-CL07-2011《测量不确定度要求》^[1]中规定, 校准实验室应对其开展的全部校准项目(参数)评估测量不确定度。根据 GB/T5750.12-2023《生活饮用水标准检验方法》5.3.4.1 酶底物法 51 孔定量盘法^[2], 对同一生活饮用水中总大肠菌群单一样品重复测量 12 次后进行不确定度评定。

1 研究内容及方法

1.1 原理

以 GB/T 5750.12-2023《生活饮用水标准检验方法》为依据, 总大肠菌群能分解 MMO-MUG 培养基中的 ONPG, 产生 β-半乳糖苷酶色原体, 使溶液显示黄色, 以此检测水质中的总大肠菌群。

1.2 材料与仪器

1.2.1 材料

(1) 大肠杆菌 8099 (北京科展生物技术有限公司 E. c-W3-002)

(2) 生理盐水 (青岛海氏海诺英诺威消毒科技有限公司批号: 2024/2/16)

(3) 麦氏比浊管 (北京哲成科技有限公司批号: 0 K05)

(4) 科立得试剂 (IDEXX 爱德士公司批号: HW818)

(5) 51 孔定量盘: IDEXX 爱德士公司批号: DW014

J

1.2.2 主要仪器

(1) 恒温培养箱 (北京中兴伟业仪器有限公司 DH-420AB)

(2) 程控定量封口机封口 (美国爱德士公司 BioStron)

(3) 1ml 移液器 (Eppendorf 100-1000uL)

(4) 电动混匀器 (江苏新康医疗器械有限公司 XK80-A)

1.3 研究方法

(1) 菌悬液制备: 取工作菌株编号为 8099E. c-W3-002 的第二代大肠杆菌, 用 5.0ml 的吸管吸取 5ml 生理盐水溶液加入斜面试管内, 反复吹洗, 洗下菌苔。用 1ml 移液器吸取 1ml 洗脱液至无菌试管中, 电动混匀器混匀 20s。

(2) 人工污染水样: 用麦氏比浊管粗测菌悬液浓度为 3×10^8 /ml, 按照 1ml 菌悬液加 9ml 生理盐水进行 10 倍梯度稀释直至菌悬液浓度为 3×10^3 /ml, 然后用移液器取 150ul 菌悬液加入 1500ml 的纯水中混匀。

(3) 检测步骤: 用 100ml 量筒依次量取 100ml 污染的水样加入 120ml 无菌取样瓶中, 加入科立得试剂, 盖上盖子摇匀, 然后将全部水样倒入 51 孔定量盘, 使用专用的程控定量封口机封口。放入 36℃ 培养箱中培养 24h, 取出定量盘观察结果, 如果孔穴内的水样变成黄色则表示该孔穴中含有总大肠菌群。计算有黄色反应的孔穴

数,对照 GB/T5750.12-2023《生活饮用水标准检验方法》表 6 查出对应的总大肠菌群 MPN 值。结果以 MPN/100mL 表示。

(4)人员比对与时间比对:2 名实验人员按照 1.3.3 中的步骤分别在同一日上午和下午对 12 个平行样进行检测,每人检测 6 个平行样并记录结果^[3-4]。

1.4 统计学方法

首先对测量数据取对数,计算对数标准差,得到 A

表 1 样品重复测量结果

编号	阳性孔数	检测结果 (MPN/100ml)	lg Xi	(lg Xi - lg x)	(lg Xi - lg x) ²
1	7	7.5	0.875	-0.265	0.070225
2	11	12.4	1.093	-0.047	0.002209
3	15	17.8	1.250	0.11	0.0121
4	9	9.9	0.996	-0.144	0.020736
5	14	16.4	1.215	0.075	0.005625
6	12	13.7	1.137	-0.003	0.000009
7	11	12.4	1.093	-0.047	0.002209
8	14	16.4	1.215	0.075	0.005625
9	11	12.4	1.093	-0.047	0.002209
10	15	17.8	1.250	0.11	0.0121
11	14	16.4	1.215	0.075	0.005625
12	15	17.8	1.250	0.11	0.0121
均值	12.3	14.24	1.140	-0.008316	

$$u(rep) = s / \sqrt{n} = 0.0952 / \sqrt{12} = 0.0275$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\lg Xi - \overline{\lg x})^2}{n-1}} = \sqrt{\frac{0.099763}{12-1}} = 0.0952$$

标准不确定度为:

相对不确定度为:

$$u_{rel}(rep) = \frac{u(rep)}{\lg X} = \frac{0.0275}{1.14} = 0.0241$$

2.1.2 B 类不确定度

(1) 1mL 可调移液器引入的不确定度

1mL 可调移液器允许误差为 ±0.001mL,按均匀分布,其标准不确定度为 $\frac{0.001}{\sqrt{3}} = 0.000577$;重复测量的不确定度为 0.0005mL。设温差为 2℃,体积变化引入的不确定度为 $1 \times 2.1 \times 10^{-4} \times \frac{2}{\sqrt{3}} = 0.0002425$ mL。以上三项合成得出 1mL 可调移液器引入的相对不确定度为:

类不确定度;将移液器、量筒等测量过程中使用到的仪器引入的不确定度进行合成,得到 B 类不确定度;综合计算得到合成不确定度及扩展不确定度^[5-7]。计算过程使用 EXCEL2013 完成。

2 结果

2.1 测量不确定度的分量评定

2.1.1 A 类不确定度:样品重复测量引入的不确定度

对样品重复进行 12 次测定,结果见下表 1:

$$u_{rel}(v1ml \text{ 移液器}) = \frac{\sqrt{0.000577^2 + 0.0005^2 + 0.0002425^2}}{1} = 0.000801$$

(2) 100mL 量筒引入的相对不确定度

100 m 量筒允许误差为 ±1mL,按均匀分布,其标准不确定度为 $\frac{0.10}{\sqrt{3}} = 0.0577$;重复测量的不确定度为 0.0087mL。设温差为 2℃,体积变化引入的不确定度为 $100 \times 2.1 \times 10^{-4} \times \frac{2}{\sqrt{3}} = 0.0243$ mL。以上三项合成得出 100mL 量筒引入的相对不确定度为:

$$u_{rel}(100ml \text{ 量筒}) = \frac{\sqrt{0.0577^2 + 0.0087^2 + 0.0243^2}}{100} = 0.00058$$

2.2 合成不确定度及扩展不确定度

$$u_{rel}(合成) = \sqrt{0.0241^2 + 0.000801^2 + 0.00058^2} = 0.0246$$

则合成不确定度为: 0.0246 × 14.24 = 0.350304

取置信水平为 95%,包含因子 k=2,则扩展不确定度为 0.350304 × 2 ≈ 0.70

2.3 结果报告

生活饮用水酶底物 51 孔定量盘法测总大肠菌群，测量结果为 (14.24±0.70) MPN/ML

3 讨论

一直以来，饮用水卫生为人民群众关注的话题，其受众人群众广，健康影响大^[8]。生活饮用水中总大肠菌群检验结果关乎群众健康，然而，检验结果不确定度评定是对测量结果质量的定量表征，能准确表征检验结果的可信度。因此，测量不确定度的评定至关重要。

影响微生物检测结果不确定度的因素较多，例如样品的均匀性、取样温度、取样体积、培养基质量、培养温度条件允差、计量器具校准、操作人员技能等，但它们对测量不确定度的贡献较小。本研究是根据 GB5750-2023《生活饮用水标准检验方法》中“51 孔定量盘法”测总大肠菌群”。相比发酵法，此法操作简便，24h 即可报结果，提高了检测效率。

本文中，A 类不确定度指样品重复测量引入的不确定度，B 类不确定度包括可调移液器引入的不确定度和量筒引入的不确定度，在同时，我们考虑到了温度变化、不同人员操作等不确定度的引入，结果显示，样品重复测量引入的不确定度影响最大，而 B 类不确定度在合成不确定度中贡献较小，姚丽芳等^[9]对大肠菌群 MPN 计数法不确定度进行评估，结论与本研究结论相同。张霞^[10]对微生物检测不确定度进行了评定，其结论也与本研究结论一致。但生活饮用水大肠菌群的测定作为精密测量，B 类不确定度仍不可忽略，以便反映最真实准确的测量结果。

本研究充分考虑了检测过程中存在的不确定度分量，较为先进的采取了人员比对和时间比对的方案，以能够穷尽检测过程中的不确定度分量，更好的保证检测结果的准确性和可信度。但因实验室条件有限，受限于只有一个恒温培养箱，故培养温度不确定度未能体现，需要改善实验室条件后进一步研究。

综上，在分析过程中应强实验人员试验操作的培训以及在试验过程中应将样品充分混匀后再取样，以保证结果的准确性，提高检测水平。

参考文献

- [1] 中国合格评定国家认可委员会 CNAS-CL07-2011 测量不确定度要求
- [2] 国家市场监督管理总局. GB/T5750.12-2023 生活饮用水标准检验方法 第 12 部分：微生物指标[S]. 北京：中国标准出版社，2023.
- [3] 张炜煜，王忞，杨修军，等. 生活饮用水中总大肠菌群 MPN 法的不确定度评定[J]. 中国卫生检验杂志，2019，29(21):2600-2603.
- [4] 俞晓蕾. MPN 法在生活饮用水总大肠菌群检测中的应用效果及不确定度分析[J]. 临床医药文献电子杂志，2021，8(34):107-109.
- [5] 甄珍. 食品中大肠菌群测定结果不确定度的评定[J]. 高师理科学刊，2011，31(5):63-65.
- [6] 张乔珊，王莉. 茶叶中大肠菌群测定的不确定度分析评定[J]. 现代食品，2017，(21):124-128.
- [7] 于倩，宋瑛瑛，宋雅芸，等. 枸杞中大肠菌群检测不确定度的评定[J]. 现代食品，2022，28(4):175-177，184.
- [8] 刘笑笑，蔡玉红，于丽，等. 多管发酵法测定生活饮用水中总大肠菌群不确定度的评定[J]. 中国食品添加剂，2019，30(5):123-127.
- [9] 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.
- [10] 姚丽芳，朱洪坤，李蔚，等. 大肠菌群 MNP 计数法不确定度评估[J]. 食品安全质量检测学报，2016，7(1)，193-196.

作者简介：高继霞（1995.02-），女，汉族，陕西延安人，本科，检验技师，主要从事民航公共卫生研究。
通讯作者：周一帆（1997.05-），男，汉族，山东济宁人，硕士研究生，研究实习员，从事民航公共卫生研究。

基金项目：民航安全能力建设项目“民航公共卫生监测预警能力提升”[编号：2024-164]。