

# 计算活菌的最可能数值的通用计算机程序

吴 唯 民

(清华大学环境工程系)

赵一章 张 辉 徐元生

(中国科学院成都生物研究所)

**摘要** 作者提出了一种使用 BASIC 语言的计算活菌的最可能数 (MPN) 值的计算机程序。该程序可用于计算任意个平行管数和任意稀释倍数下的 MPN 值,并能作 95% 置信水平的区间估计和进行拟合度检验。

**关键词** 活菌;最可能数值;活菌计数方法;计算机程序

自从本世纪三十年代 Hoskins 提出用最可能数 (MPN) 值来检测水中的肠道菌<sup>[1]</sup>以来,MPN 法已广泛应用于食品、公共卫生、环境监测和废水生物处理等领域中。目前常用的 MPN 法,是将被检样品按 10 倍的稀释倍数逐级稀释在特定的培养基中,而每个稀释级有 1 支、或 3

支、或 5 支培养管。在一定条件下培养后,根据观察的结果 (如培养管内是否混浊、产酸、产气体等)确定每个稀释级中的阳性 (有菌) 和阴性 (未长菌) 管数,按微生物学试验书籍上预先编制的 MPN 表计算被检样品中的活菌数<sup>[2-4]</sup>。

在研究中我们发现利用现有的 MPN 表有

很多局限。首先,现有的 MPN 表上往往没有列出置信区间,使研究者无法知道所得结果的精度。为了考察活菌计数方法和所得结果的好坏,往往需要作拟合度检验或假设检验,而现有的 MPN 表不提供这类信息。通过数学模拟发现,增加每个稀释等级的平行培养管数,可以提高 MPN 计数的精度。近年来有的研究者还用数学模拟的方法探讨能否用减少稀释倍数来提高计数精度,例如 Russek 等人认为用 2 倍的稀释倍数可以获得比 10 倍稀释倍数更小的 MPN 值的标准偏差<sup>[5]</sup>。MacDonell 等人还提出在中间稀释级增加平行管数,而在较高和较低的稀释级采用较少的平行管数来提高计数精度和减少工作量<sup>[6]</sup>。这些提高计数精度的设想和方法,靠现有的 MPN 表是不能实现的。国内的研究者近年来也注意到了现有 MPN 表的局限性,例如许正宇等人建议用单管六个稀释级代替现行的单管四个稀释级检测肠道菌<sup>[7]</sup>。目前,看来最好的克服现有 MPN 表的局限性的方法是用计算机计算 MPN 值。这样,研究者能按自己的要求自由地设定计数试验的条件。近年来国外不少人提出了一些计算 MPN 值的程序<sup>[5,8,9]</sup>,但多适用于专用计算器。作者在国外研究者工作的基础上提出了一种改进的 MPN 值算法,这里用 BASIC 语言编制成程序介绍给读者。

### (一) 计算原理

1. MPN 计数法的概率论原理<sup>[3,10]</sup>: 假设细菌不互相凝聚,也不互相排斥,而是在水中随机分布;即使只接种一个细胞,在培养管内也能观察出它的生长;在稀释被检样品时,各培养管中的菌数服从 Poisson 分布。如果稀释级数为  $K$  ( $K \geq 1$ ),被检样品原液的活菌的 MPN 值由下式解出:

$$\sum_{i=1}^K V_i S_i = \sum_{i=1}^K (n_i - S_i) V_i / (e^{V_i d} - 1) \quad (1)$$

式中  $i$ ——被检样品的稀释级数 ( $i = 1, \dots, K$ );

$V_i$ ——第  $i$  级管中的被检样品量 (ml);

$n_i$ ——第  $i$  级的平行培养管数;

$S_i$ ——第  $i$  级的阴性(无菌)管数;

$d$ ——被检样品的 MPN 值 (cell/ml)。

2. MPN 值和置信区的算法: 对式 (1) 求解  $d$  常用改进的 Newton-Raphson 法<sup>[5]</sup>。首先给定  $d$  的一个初值  $d_0$ , 然后按式 (2) 进行迭代计算,直至  $d$  值变化很小为止。

$$d_{n+1} = d_n + U(d_n) / I(d_n) \quad (2)$$

$$U(d_n) = \sum_{i=1}^K (n_i - S_i) V_i / (e^{V_i d_n} - 1) - \sum_{i=1}^K V_i S_i \quad (3)$$

$$I(d_n) = \sum_{i=1}^K n_i V_i^2 / (e^{V_i d_n} - 1) \quad (4)$$

式中  $d_{n+1}$ ——第  $n$  次迭代所得的  $d$  值,  $n = 0, 1, \dots$ 。

作者建议按下式给定初值  $d_0$ :

$$d_0 = \left[ \sum_{i=1}^K (n_i - S_i) / \sum_{i=1}^K V_i S_i \right]^{\frac{1}{2}} \quad (5)$$

推导式 (5) 按以下步骤,先设  $U(d_0) = 0$ ,

$$\begin{aligned} \text{即} \quad & \sum_{i=1}^K (n_i - S_i) V_i / (e^{V_i d_0} - 1) \\ & - \sum_{i=1}^K V_i S_i = 0 \end{aligned} \quad (6)$$

将  $e^{V_i d_0}$  用 Taylor 级数展开,由式 (6) 得

$$\begin{aligned} & \sum_{i=1}^K (n_i - S_i) / \left( d_0 + \frac{V_i d_0^2}{2} + \frac{V_i^3 d_0^3}{6} + \dots \right) \\ & - \sum_{i=1}^K V_i S_i = 0 \end{aligned} \quad (7)$$

假设  $d_0 + \frac{V_i d_0^2}{2} + \frac{V_i^3 d_0^3}{6} + \dots \approx d_0^2$ , 代入式 (7) 得

$$d_0 = \left[ \sum_{i=1}^K (n_i - S_i) / \sum_{i=1}^K V_i S_i \right]^{\frac{1}{2}}$$

MPN 的 95% 置信区间估计按 Cochran 提出的方法<sup>[10]</sup>,用下式的反对数求得:

$$I_*(d) \pm 1.96(1/[d\sqrt{I(d)}])$$

3. 拟合度检验: 如前所述,在推导计算 MPN 值的方程式 (1) 时假设细菌随机分布,而在各稀释管中的菌数服从 Poisson 分布。为了确定 MPN 试验方法的有效性时,往往要做

```

1000: DIM N(10), M(10), K(10), E(10), U(10), V(10),
      R(10)
1010: D = 0
1120: INPUT "NO. OF DIL. LEVEL?"; D1
1122: LPRINT "NUMBER OF DIL. LEVEL:"; D1
1124: LPRINT "REPLICATES AT LEVEL:";
1125: FOR I = 1 TO D1
1128: INPUT "REPLICATES AT LEVEL?"; N(I)
1130: LPRINT N(I);
1133: NEXT I
1135: LPRINT " "
1136: INPUT "VOL. OF LARGEST DIL.?"; V1
1140: LPRINT "VOL. OF LARGEST DIL.:"; V1
1145: V = 10
1150: INPUT "DILUTION FACTOR?"; D2
1155: LPRINT "DILUTION FACTOR:"; D2
1160: LPRINT "ENTER MPN AS:";
1200: FOR I = 1 TO D1
1205: INPUT "ENTER MPN AS?"; M(I)
1210: LPRINT M(I);
1220: NEXT I
1230: LPRINT " "
1240: A = 0
1290: FOR I = 1 TO D1
1295: IF M(I) > N(I) THEN 1320
1300: NEXT I
1310: M(D1) = M(D1) - 1
1315: A = 1
1320: FOR I = 1 TO D1
1325: IF M(I) > N(I) THEN 1160
1330: NEXT I
1335: D = 0
1340: N1 = 0
1345: M1 = 0
1350: FOR I = 1 TO D1
1355: M1 = M1 + M(I)
1360: N1 = N1 + N(I)
1365: V(I) = V/D2^(I-1)
1370: NEXT I
1390: L1 = 0
1395: FOR I = 1 TO D1
1400: L1 = L1 + V(I) * (N(I) - M(I))
1410: NEXT I
1420: D = M1/SQR(L1 * M1)
1425: U = Q: J = 0
1430: FOR I = 1 TO D1
1435: E1 = V(I) * D
1440: IF E1 < 200 GOTO 1460
1445: E1 = 0
1450: GOTO 1465
1460: E1 = 1/(EXP(E1) - 1)
1465: U = U + (M(I) * V(I)) * E1 - V(I) * (N(I) - M(I))
1470: J = J + ((V(I) ^ 2) * N(I)) * E1
1475: NEXT I
1480: D3 = D + (U/J)
1490: IF ABS(D - D3) > .0001 THEN 1710
1620: IF A = 1 GOTO 1665
1630: LPRINT "MPN = "; (INT(10000 * D)/10000) *
      (10/V1); "CELL/ML"
1640: GOSUB 1730
1650: GOSUB 1980
1660: GOTO 1670
1665: LPRINT "MPN"; (INT(10000 * D)/10000) * (10/
      V1); "CELL/ML"
1670: INPUT "CONTINUE? Y/N"; AS
1680: IF AS = "Y" THEN 1160
1700: END
1710: D = D3: GOTO 1425
1730: L2 = 0
1732: FOR I = 1 TO D1
1734: K(I) = N(I) * (V(I) ^ 2)
1736: E(I) = V(I) * D
1738: IF E(I) < 200 GOTO 1750
1740: E(I) = 0
1745: GOTO 1752
1750: E(I) = 1/(EXP(E(I)) - 1)
1752: L2 = L2 + K(I) * E(I)
1753: NEXT I
1760: C3 = 1.96 * (1/(D * SQR(L2)))
1761: C1 = LN(D) - C3
1770: C2 = C1 + 2 * C3
1780: LPRINT "CONFIDENCE INTERVAL"
1790: LPRINT (V/V1) INT(10000 * EXP(C1))/10000;
      "-"; (V/V1) INT(10000 * EXP(C2))/10000
1810: RETURN
1980: R(1) = N(1) * (EXP((-V(1)) * D))
2000: IF R(1) < (.9E - 37) GOTO 2020
2010: GOTO 2030
2020: R(1) = 1E - 37
2030: FOR I = 2 TO D1
2031: R(I) = N(I) * (EXP(-V(I) * D))
2032: NEXT I
2040: Q = 0
2050: FOR I = 1 TO D1
2060: Q = Q + (N(I)) * ((N(I) - M(I)) - R(I)) ^ 2 /
      R(I) * (N(I) - R(I))
2070: NEXT I
2090: IF D1 = 3 LET L1 = 5.991
2100: IF D1 = 4 LET L1 = 7.815
2110: IF D1 = 5 LET L1 = 9.488
2120: IF D1 = 6 LET L1 = 11.07
2130: IF D1 = 7 LET L1 = 12.592
2140: IF D1 = 8 LET L1 = 14.067
2150: IF D1 = 9 LET L1 = 15.507
2160: IF D1 = 10 LET L1 = 16.919
2180: IF Q > L1 GOTO 2210
2190: LPRINT "ASSUMPTION ACCEPTED"
2200: RETURN
2210: LPRINT "ASSUMPTION REJECTED"
2220: RETURN

```

图1 计算 MPN 的程序

拟合度检验。根据 Russek 等的建议<sup>[7]</sup>,当  $K \geq 2$  时,可以采用根据实验数据算出的 MPN 值进行  $\chi^2$  检验来进行判断。其中

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^K n_i (S_i - E_i)^2 / E_i (n_i - E_i) \quad (8)$$

式中

$$E_i = n_i e^{-V_i} V_i^d \quad (9)$$

如果由式 (8) 计算出的  $\chi^2$  大于数理统计表中自由度为  $K-1$  的  $\chi^2_{(K-1)}$ , 则假设被拒绝; 反之, 假设被接受, 即菌数近似服从 Poisson 分布。

### (二) 计算机程序和使用说明

图 1 是根据公式 (1)~(9) 编制的使用 BASIC 语言的程序。它已在 SHARP PC-1500 型计算机上调通。该程序也可在其他能用 BASIC 语言的计算机上使用。本程序不仅可以代替目前微生物学试验手册上的 MPN 表, 还具有以下功能: (1) 用户可任选稀释倍数, 整数倍数与非整数倍数均可; (2) 每个稀释级的平行培养管数可从 1 至 10 内任选, 不同的稀释级可以用不同支数的平行培养管, 第一级稀释管的被检样品量可以任意选定; (3) 能进行 95% 置信水平的区间估计; (4) 能进行拟合检验。表 1 为程序的使用说明。

表 1 MPN 计算机程序操作说明

显 示	说 明
NO. OF DIL. LEVEL?	输入稀释级数 K
REPLICATES AT LEVEL?	依次输入第 1 至 K 级的平行管数 $n_i$
VOL. OF LARGEST DIL?	输入第 1 级稀释管的被检样品量 $V_1$
DILUTION FACTOR?	输入稀释倍数 f
ENTER MPN AS? (运算、打印结果)	依次输入第 1 至 K 级的阳性管数 ( $n_i - s_i$ )
CONTINUE? Y/N	输入字符 Y, 则以前面已输入的 $K, n_i, V_1$ 和 f 为条件, 输入新的 ( $n_i - s_i$ ) 继续计算; 输入字符 N 或除 Y 以外的任何字符, 则运行结束。

### (三) 计算例

例 1. 某 MPN 试验采用 3 个稀释级, 每级均用五支管, 每管的被检样品量逐级依次为 10、1、0.1ml, 检出阳性管数逐级依次为 5、4、1 支管。在本试验中,  $K=3, n_i=5, 5, 5$

NUMBER OF DIL. LEVEL: 3  
REPLICATES AT LEVEL: 5 5 5  
VOL. OF LARGEST DIL.: 10  
DILUTION FACTOR 10 ENTER MPN AS: 5 4 1  
MPN = 1.7238 CELL/ML CONFIDENCE INTERVAL  
0.6482-4.5843  
ASSUMPTION ACCEPTED

图 2 MPN 计算结果

( $i=1, 2, 3$ ),  $V_1=10, f$  (稀释倍数) = 10,  $n_i - s_i = 5, 4, 1$ 。计算机打印结果见图 2。MPN = 1.7238 cell/ml, 95% 置信区间为 0.6482—4.5843, 假设被接受。

例 2. 某试验中  $K=4, n_i=1, 1, 1, 1$  ( $i=1, 2, 3, 4$ ),  $V_1=10, f=10, n_i - s_i=1, 1, 0, 0$ 。MPN 计算结果见图 3, MPN = 2.3116 cell/ml, 95% 置信区间为 0.264—20.2373, 假设被接受。

NUMBER OF DIL. LEVEL: 4  
REPLICATES AT LEVEL: 1 1 1 1  
VOL. OF LARGEST DIL.: 10  
DILUTION FACTOR 10 ENTER MPN AS: 1 1 0 0  
MPN = 2.3116 CELL/ML CONFIDENCE INTERVAL  
0.264-20.2373  
ASSUMPTION ACCEPTED

图 3 MPN 计算结果

例 3. 某试验中  $K=4, n_i=2, 2, 5, 5$  ( $i=1, 2, 3, 4$ ),  $V_1=0.1, f=2, n_i - s_i=2, 2, 3, 1$ 。MPN 计算结果见图 4, MPN = 35.74 cell/ml, 95% 置信区间为 16.62—78.83, 假设被接受。

NUMBER OF DIL. LEVEL: 4  
REPLICATES AT LEVEL: 2 2 5 5  
VOL. OF LARGEST DIL.: 0.1  
DILUTION FACTOR 2 ENTER MPN AS: 2 2 3 1  
MPN = 35.74 CELL/ML CONFIDENCE INTERVAL  
16.62-78.83  
ASSUMPTION ACCEPTED

图 4 MPN 计算结果

例 4. 某试验中  $K=3, n_i=3, 3, 3$  ( $i=1, 2, 3$ ),  $V_1=10, f=10, n_i - s_i=1, 2, 2$ 。MPN 计算结果见图 5。MPN = 0.1949 cell/ml, 95% 置信区间为 0.0561—0.6769, 假设被拒绝。

NUMBER OF DIL. LEVEL: 3  
 REPLICATES AT LEVEL: 3 3 3  
 VOL. OF LARGEST DIL.: 10  
 DILUTION FACTOR 10 ENTER MPN AS: 1 2 2  
 MPN = 0.1949 CELL/ML CONFIDENCE  
 INTERVAL  
 0.0561—0.6769  
 ASSUMPTION REJECTED

图5 MPN 计算结果

从例1至例3中  $\chi^2$  检验的结果说明各稀释管中的菌数近似服从 Poisson 分布。例4的结果说明在该试验中认为菌数在95%的置信水平下服从 Poisson 分布的假设是不成立的。因此,有必要重做试验或对试验方法本身进行改进。引起菌数不符合 Poisson 分布的原因有多种,例如细菌结团结块,细菌粘附或附着在试管壁上或者稀释工具上,以及操作方法不当等。

## 参 考 文 献

- [1] Hoskins, J. K.: *J. Am. Water Works Assoc.*, **25**: 867—877, 1933.
- [2] APHA, Standard methods for the examination of Waste Water, 635—678, American Public Health Association, Washington D. C., 1971.
- [3] (日)微生物研究法讨论会编,程光胜等译:微生物实验法, 161—162, 科学出版社, 1981.
- [4] Pelczar, M. J., and Chan, E. C. S.: *Laboratory, exercises in microbiology*, 297—300, McGraw-Hill, Inc., 1977.
- [5] Russek, E., et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 1646—1650, 1983.
- [6] MacDonell, M. T., et al.: *J. Microbiological Methods*, **2**: 1—7, 1984.
- [7] 许正宇,夏元庆:环境科学学报, **5**(1), 46—53, 1985.
- [8] Koch, A.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**: 488—490, 1982.
- [9] MacDonell, M. T.: *Can. J. Microbiol.*, **29**: 621—623, 1983.
- [10] Cochran, W. G.: *Biometrics*, **5**: 105—116, 1950.