

方法介绍

稀释平板法的误差分析

游长芬 施亚琴 周德智

(中国科学院南京土壤研究所)

在土壤微生物生态研究领域中,微生物数量分析是一项基本的测定项目,也是研究工作者用以判断土壤性状的重要生物学指标之一。然而现有的测定方法不能完全反映土壤微生物的真实情况^[1,2]。长期以来,不少研究工作者为此进行了大量工作,并提出了许多分析方法^[3,4]。但迄今为止,所拟定的方法尚不能满足生态学研究上的需要。作为常规分析的稀释平板法,目前仍为大多数土壤微生物工作者普遍采用。

稀释平板法能从平板上挑取纯培养的菌株,也能反映微生物在土壤中的相对密度,同时操作比较简便。不足之处是某些微生物细胞易为土壤颗粒吸附,细胞团块不易分散,而且菌体在稀释过程容易死亡,加之分析操作中存在许多问题,致使方法的精密度不高。本文主要应用稀释平板法取得的大量数据,对该方法的精密度,误差来源以及试验结果的可靠性等问题进行了讨论。

一、材料和方法

本文所用的数据,系随机选自1960年以来大量土壤微生物分析资料($n=959$)*,包括细菌、真菌和放线菌。分析结果均四次重复。按照统计分析方法计算了结果的平均值(\bar{x}),标准差(S)和变异系数(CV%)。计算式分别为:

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + x_3 + \dots + x_n}{n} = \frac{\sum_{i=1}^{i=n} x_i}{n}$$

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{i=n} (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

$x_i - \bar{x}$ —— 离均差; n —— 样本数; $n-1$ —— 自由度; $CV\% = (S/\bar{x}) \times 100$ 。

为便于对平均值间进行比较,根据t检验原理^[5]和微生物数量分析的适用范围,制作了显著差异临界值表,计算式为:

$$D = t_{\alpha} \sqrt{(S_1^2/n_1) + (S_2^2/n_2)}$$

式中, t_{α} 系在一定概率下的t表值

* 部份数据引自土壤所微生物室常规分析记录。

自由度为 $(n_1 - 1) + (n_2 - 1)$

S_1 , n_1 , S_2 , n_2 , 分别为欲比较的二个样品的标准差和重复数。

二、问题和讨论

1. 稀释平板法的分析精密度及其适宜的测定范围

为了弄清在现有实验室条件下, 稀释平板法的分析精密度, 我们分别对真菌、细菌、放线菌的大量分析数据, 以样本平均值 \bar{x} 为横坐标($n = 4$), 变异系数 $CV\%$ 为纵坐标, 对它们的相互关系进行了研究(图 1)。采用变异系数这一统计参数是因为它说明了数据的相对离散程度。这些数据是从多年来积累的资料中随机选用的, 包括不同时间, 不同操作者进行的工作。从图 1 可以清楚的看出, 微生物数量大小与变异系数的变化幅度有明显关系, 即菌数平均值愈小, 变异系数的波动范围愈大, 但在菌数平均值超过一定数量时, 变异系数的波动范围明显缩小并趋于稳定。看来真菌以菌数平均值 20 为此稳定范围的下限, 细菌、放线菌以菌数 40—50 为此范围的下限。

图 2 所列的直方图, 是用以说明菌数测定值的变异系数在这个稳定范围的分布情况, 其中真菌菌数测定值(平均值)选用了 20—100 区间所有的结果, 细菌、放线菌测定值选用了 50—200 区间的全部结果。从直方图可以看出, 三种菌类的测定值, 基本上都分布在变异系数 5%—30% 这一范围。统计表明, 在上述范围内细菌测定值的出现频数占全部测定值的 84.2%, 真菌、放线菌分别占 85.9% 和 92.3%。

过去凭经验曾对稀释平板法提出过一个适宜的测定范围: 真菌 20—200, 细菌、放线菌和固氮菌 30—300(菌数/每平皿)*, 显然这一幅度与图 1 所反映的规律比较接近。看来真菌以 20 为下限是可取的, 但细菌、放线菌以 30 为下限似乎偏低。原定真菌上限为 200, 细菌、放线菌为 300 均有值得讨论之处。在实际工作中, 平皿内真菌菌数超过 100, 细菌、放线菌超过 200, 由于菌落生长过于紧密, 已很难准确计数。根据以上结果, 确定真菌上限为 80—100, 下限为 20, 细菌、放线菌上限为 150—200, 下限为 40—50 似更为适宜。

2. 稀释平板法的操作误差分析

在稀释平板法的分析步骤中, 涉及到称量、容量等一系列计量操作。由于每个测量值都具有可测误差, 为了计算分析结果的最大误差, 以保证最后的结果不超出预定的误差范围, 需要考虑分析过程中各个可测误差的传播。根据误差传递规则^[6]包括加、减在内的绝对可测误差, 按下式: 设 $R = A + B - C$ $\Delta R = \Delta A + \Delta B + \Delta C$ 直接传递到结果; 包括乘除在内的相

对可测误差, 按下式: 设 $R = A \times B / C$ 则 $\frac{\Delta R}{R} = \frac{\Delta A}{A} + \frac{\Delta B}{B} + \frac{\Delta C}{C}$ 直接传递到结果。

下面对稀释平板法各操作步骤与结果计算关系作一分析。稀释平板法的结果计算式:

$$\text{每克干土中菌数(个)} = \frac{\text{平皿中的菌数(个)} \times 10 \times \text{稀释倍数} \times 100}{\text{干土百分数}}$$

式中: 平皿中的菌数——为 0.1 毫升稀释液中的菌数。

10——由平皿中菌数折算成 1 毫升稀释液中菌数需乘倍数。

100——水份换算需用系数。

* 中国科学院土壤所微生物室: 土壤微生物研究法(1959 资料)。

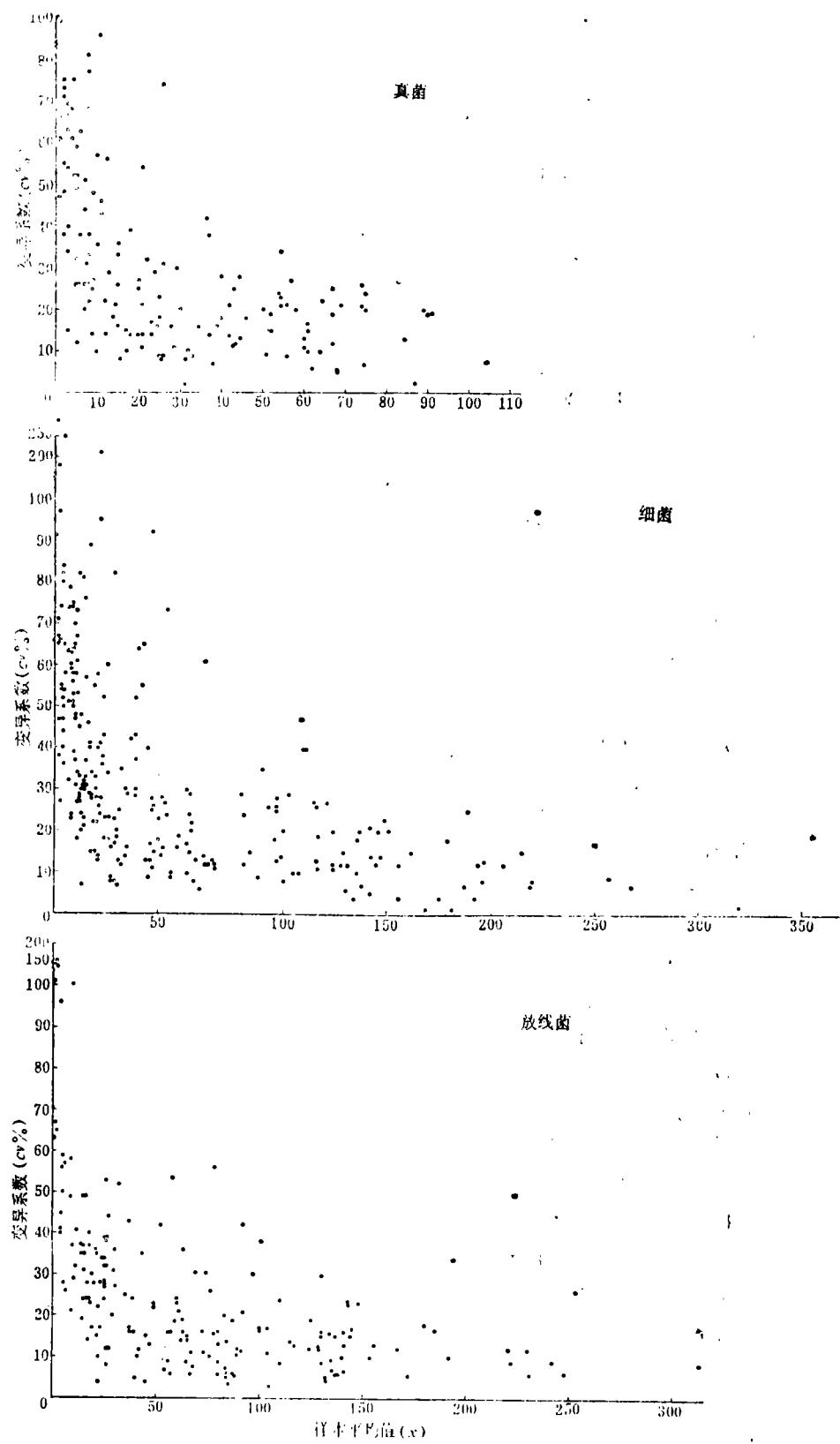


图 1 微生物数量与变异系数的散点图

首先估算干土百分数的可测误差,用感量百分之一天平,称约10克土样,其相对误差约在千分之一,但通常用差减法计算土壤水份,故相对误差实际上达不到这一标准。其次需要估计不同稀释度带来的可测误差。在选用稀释度为1:10时,由于只应用了100毫升量筒,读数误差 ± 1 毫升,这一步骤可测误差应为1%。再选用稀释度为1:100,在操作步骤中,还需用1毫升吸管(读数误差 ± 0.01)吸取1毫升土壤悬液,和10毫升刻度吸管(读数误差为 ± 0.1)吸取9毫升稀释用水。由于是吸取土壤悬液,未按照化学分析习惯对读数作半格估计,故这两步操作的可测误差均分别为1%。根据误差传递规则,其累计可测误差应为三次度量的相对误差之和,即 $1\% + 1\% + 1\% = 3\%$ 。同理,稀释度依次每增加10倍,则需递增可测误差2%。

关键的误差来自平皿中的菌落数。通常采用1毫升吸管量取0.1毫升(约二滴)稀释液于平皿中,待长出菌落后计算其中的菌数。由于1毫升吸管的读数误差为0.01毫升,用它量取0.1毫升,可测误差应为10%。不难想象,由此得出的菌落读数可测误差同样也达10%。

计算式中的水份换算系数100和乘数10均为常量,都可视作准确值。

根据误差传播规则,计算稀释平板法最后结果,应将以上分析的各操作步骤的可测误差相加在一起,显然其累计值超过了10%。因此稀释平板法分析结果的有效数字最多只能保持二位。

为了保证稀释平板法的结果与

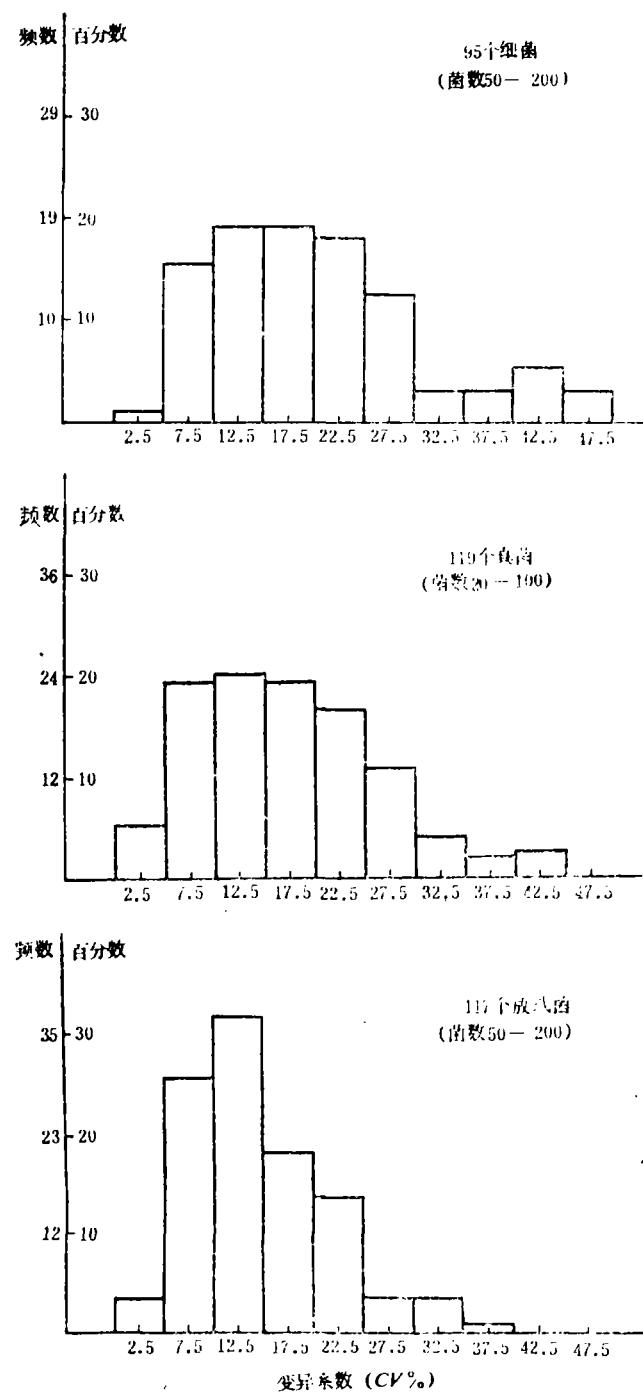


图2 微生物数量的变异系数分布图

其精密度相一致，表达的最好形式是浮点计数法，即数据表示为尾数和指数两部分。例如菌数123应舍去3，记为 1.2×10^2 。必须避免不顾试验误差，无根据的扩大有效数字的做法。

3. t 检验在评价分析结果中的应用

稀释平板法的分析结果，主要用于不同样本间的相互比较。由于方法的分析精密度不高，变异系数大，必须根据统计分析方法鉴别差异的可靠性，才能得出相应的结论。我们根据t检验原理和稀释平板法的适宜测定范围，计算出一个显著性差异临界值表(表1)。该表适用于三大菌类。只需求出欲比较的二个平均值(四次重复)和标准差，就可在表上交叉查出达到统计显著差异的临界值($p = 0.05$)。当供比较的两个平均数的差值大于或等于查表值时，表明差异达到了统计上显著水平($p \leq 0.05$)，反之，计算的差值小于查表值，则表明差异不显著($p > 0.05$)。例如样本1菌数平均值 $\bar{x}_1 = 60$ ，标准差 $S_1 = 16$ ，样本2菌数平均值 $\bar{x}_2 = 88$ ，标准差 $S_2 = 9.4$ ，问两个样本间的菌数是否确有差异？已知二个平均值差异为 $88 - 60 = 28$ 。在临界值表上，用近似于 $S_1 = 15$ 和 $S_2 = 10$ 的二个标准差值，交叉求出临界值22，因计算值28大于查表值22，表明二个样本的菌数差异达到统计显著水平($p < 0.05$)。

临界值表上部份注有*标志的位置，没有列出临界值，是因为相对应的二个标准差值差异过大，经方差比(F)检验，二个标准差之间有显著差异，不宜按t检验方法计算差异临界值。

另外，在制表时，所选用的标准差值间隔为5，这已能满足实际应用需要。如需更精细的比较，也可以在相邻的数值间用内插法进行估算。

三、结语

稀释平板法是目前广泛采用的土壤微生物分析方法。本文通过大量分析数据进行的统计分析，初步认为：

1. 稀释平板法的适宜测定范围，真菌为每平皿20—100，细菌、放线菌为每平皿50—200。
2. 在上述测定范围内，稀释平板法的精密度稳定在变异系数5%—30%区间。
3. 现有方法的操作误差，仅滴加0.1毫升土壤悬液至平皿中一项就达10%，各操作步骤的累计误差则超过了10%。
4. 现有稀释平板法的分析结果，最多只能保留二位有效数字。表达结果的最好形式是采用浮点记数法。
5. 根据t检验原理和稀释平板法的最适测定范围，制作了在比较分析结果时便于使用的显著差异临界值表。

表1 显著差异临界值表
($p = 0.05$, $n_1 = n_2 = 4$)

	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60
5	9	14	19	*	*	*	*	*	*	*	*	*
10		17	22	27	33	39	*	*	*	*	*	*
15			26	31	36	41	47	52	58	*	*	*
20				35	39	44	49	55	60	66	72	77
25					43	48	53	58	63	68	74	80
30						52	56	61	66	71	77	82
35							61	65	70	75	80	85
40								69	74	78	83	88
45									78	82	87	92
50										87	91	96
55											95	100
60												104

土壤信息

用离子色谱法测定 土壤中的交换性盐基

N. T. Basta等人提出用一种快速、准确和精密的离子色谱法测定土壤的交换性盐基。主要步骤是，用1M醋酸铵的中性溶液提取土壤中的交换性盐基，提出液在400℃灼烧30分钟，残存物溶解在5mM HCl中，用Dionex 10型离子色谱仪进行交换性盐基量的测定。离子色谱法是基于用含低容量的H-型阳离子交换树脂的分离柱来分离阳离子和用OH-型的抑制柱来转化各种阳离子成相应的氢氧化物形态。5mM HCl和2.5mM HCl+2.5mM间-苯二胺二氢氧化物均被用作洗提液，分别测定一价和二价的交换性盐基。用电导法检测。

从本法和常用方法结果比较来看，离子色谱法、原子吸收光谱法和火焰光度计法测

得十种土壤中交换性钾的平均值分别为0.49、0.47和0.47毫摩尔/公斤土壤，交换性钠为0.09、0.09和0.08。交换性钙前两种方法测得为13.5和13.5，交换性镁为3.50和3.54。几种方法的结果是一致的。

离子色谱法有极高的灵敏度，一般可精确地测定ppm水平的阳离子，K、Na、Ca和Mg的检测下限分别为0.1、0.05、0.1和0.03毫克/升。K和Na在6分钟内同时测定，Ca和Mg在7分钟内同时测定。本法只需要少量样品，如2毫升左右的水溶液。

由于电导检测受温度影响，大多数离子溶液每升高摄氏一度，电导约增加2%，故在激烈的温度变动下，对峰高和基线稳定性均有明显的影响。要注意交换柱、洗提液和电导池房间的温度控制，实验表明，在21到24℃范围内K、Na、Ca和Mg的峰高没有可觉察的差别。另外，欲分析的溶液中的盐基含量要少。

(刘志光据Soil Sci. Soc. Am. J., 49:84—89, 1985)

本文没有讨论稀释平板法所有存在的问题。例如：(1)同一样品在不同稀释度下培养取得的菌数与稀释度并不成比例；(2)对某些易引起误差的操作步骤，方法中缺乏严格的规定，如怎样控制稀释水在灭菌过程中所引起的损耗；(3)在结果计算中一直存在着以干基或湿基计算两种方法。

参考文献

- [1] 陈华冀,土壤微生物学,第18页,上海科学技术出版社,1981。
- [2] Ценцов Б.В., Микробиология, 46(4):778, 1977.
- [3] Baath. E., Soil Biol. and Biochem., 12:385, 1980.
- [4] D. Parkinson, Methods for studying the ecology of soil micro-organism, Blackwell Scientific Publications, 1971.
- [5] R. A. 小戴,定量分析,第40页,上海科学出版,1980。
- [6] 刘光崧、蒋能慧,分析数据统计处理方法。土壤农业化学分析,第40页,科学出版社,1983。