

微生物生态研究中基于 BIOLOG 方法的数据分析

王 强¹, 戴九兰², 吴大千¹, 余 悦¹, 申天琳¹, 王仁卿^{1,2,*}

(1. 山东大学生命科学院, 山东 济南 250100; 2. 山东大学环境研究院, 山东 济南 250100)

摘要: BIOLOG 微平板法作为一种方便快速的微生物检验技术, 已广泛应用于环境微生物检测, 微生物生态研究等方面, 发挥着越来越重要的作用。该方法可以获得关于微生物群落碳源利用能力的大量数据, 反映出关于微生物活性的丰富信息。然而大量的数据也对解释和分析提出了挑战, 分析了应用于 BIOLOG 产生数据的统计分析方法, 对常用的 AWCD 值计算, 多样性指数计算, 主成分分析 (PCA), 聚类分析, 相关、回归等方法深入探讨, 阐述各自的功能、不足以及在应用中容易出现的问题。另外也对一些不常见的方法, 如非参数多元分析 (Non-Parametric version of MANOVA/ Permutation version of MANOVA)、动力学参数分析、多元回归树、典范对应分析等也进行了讨论。通过对不同方法应用目标和原理的分析论述了各自优缺点, 对微生物生态研究中基于 BIOLOG 方法数据分析的选择应用提供参考。

关键词: BIOLOG; 多元统计; 环境微生物; 数据分析; 微生物生态

Statistical analysis of data from BIOLOG method in the study of microbial ecology

WANG Qiang¹, DAI Jiulan², WU Daqian¹, YU Yue¹, SHEN Tianlin¹, WANG Renqing^{1,2,*}

1 Institute of Ecology and Biodiversity, College of Life Science, Shandong University, Ji'nan 250100, China

2 Environment Research Institute, Shandong University, Ji'nan 250100, China

Abstract: The BIOLOG method has been widely used to study microbial community dynamics and has proved to be a useful tool in the research of microbial ecology. As a quick and convenient method, it can provide a great amount of data which reflect community-level physiological profiling of microbial communities. However, the analysis and interpretation of these multivariate data has turned out to be one of the intractable challenges in studies. This work included different methods previously applied in BIOLOG analysis and clarified the purposes and functions of these statistical methods. AWCD (Average well color development) value, diversity indices, PCA (principal component analysis), cluster analysis, correlation analysis and regression analysis were discussed according to their purposes, along with common mistakes and abuses. We also involved a Non-Parametric version of MANOVA, catabolic profiles methods, canonical correspondence analysis and multiple regression tree analysis as extensions. This work will help the application of the BIOLOG method and improve understanding of the functions of microorganisms in ecosystems.

Key Words: BIOLOG; multivariate statistics; environmental microbes; data analysis; microbial ecology

微生物是地球化学循环中的重要组成部分, 由于其分布广泛, 对环境敏感、易变异, 且在生态系统中具有不可替代的作用, 近年来受到了越来越多的重视^[1-2]。BIOLOG 微平板技术最初应用于临床, 目的是鉴别纯化培养后的病原微生物。Garland 等 1991 年首次将其应用于描述混合的微生物群体特征^[3]。该方法操作简单, 获得数据量丰富, 能反映微生物种群的总体活性, 近十几年来在微生物生态及环境微生物检测方面应用十分广

基金项目: 山东省环境保护重点科技资助项目 (2006007); 国家自然科学基金青年基金资助项目 (408010088/D010504); 山东省自然科学基金重点资助项目 (Z2006D04)

收稿日期: 2008-11-12; **修订日期:** 2009-04-06

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: wrq@sdu.edu.cn

泛。BIOLOG 方法通过测定微生物对不同碳源利用程度的差异来表征其生理特性的不同,在研究空间及时间尺度上微生物群落变化方面有较好的应用。其原理是通过直接在微平板中进行针对微生物群体的培养,并实时监测其引起的光吸收度变化,籍以表征其生理特征^[3-4]。

该方法是揭示微生物群落间差异的强大工具且反馈数据量十分丰富,每一个孔的吸光度均可作为样品的一个变量。然而大量的数据也带来了解释的困难,因此针对数据的深入而合理的分析非常必要^[5]。对于微平板产生的多元变量更应该详加阐释,合适的统计分析方法显得尤为重要。对统计方法错误的选择和应用不但不能利用和分析微平板产生的信息,而且还可能导致错误的结论^[6],分析方法选择上的混乱和单一性的同时存在更严重限制了该研究方法的功能,因而制约了对环境微生物多样性及微生物生态的研究。

本文总结分析基于 BIOLOG 微平板操作的统计分析方法,按照研究目的将已有应用的统计分析方法归类,并分析各种方法的优缺点,进一步提出根据不同研究目的选择不同方法的原则。这一数据分析方法的梳理对微生物研究中基于 BIOLOG 方法的数据分析选择应用提供参考,并可进而更深入理解微生物群体生理活性特征。

1 BIOLOG 方法原理及研究目标

BIOLOG 微平板主要包括 GN 板(用于革兰氏阴性好氧菌的鉴定),GP 板(用于格兰仕阳性好氧菌的鉴定),ECO 板(用于微生物特性和群落分析研究)等,在微生物生态研究中 ECO 板的应用较为常见^[7]。几类平板的研究对象均为可好氧培养且相对生长较快的类群,因此其所反映的也是研究样本内具有上述特征的类群^[8]。平板上小孔中分别装有不同的碳源和四唑盐染料,微生物在利用碳源的过程中产生自由电子,与染料反应会产生颜色变化,颜色的深浅可以反映微生物对碳源的利用程度。由于不同种类的微生物,或者不同微生物类群利用碳源的能力不同,因此产生的不同碳源利用模式即可表征微生物群落差异^[4]。所得到的原始数据为各孔的吸光度数值。一般研究者会每隔 12h 或 24h 读数 1 次,连续读取若干天(一般 7d)。GN 板、GP 板均有 95 种碳源,ECO 板含有 31 种碳源(每板 3 个重复),另外都含有一个不加碳源的空白孔作为对照。每个孔的吸光度数值或其颜色变化与否的二分变量均可以纳入分析,因此 BIOLOG 微平板可以提供大量多维数据。

对微生物生态的研究较多集中于不同环境下的微生物结构及功能多样性的研究,监测不同环境因子对微生物的影响或微生物对不同影响因素的响应。基于 BIOLOG 方法的研究目标一般可分为以下几个方面:

- (1) 比较研究样品间微生物群落差异;
- (2) 根据微生物群落特征对研究样品进行排序;
- (3) 与环境因子或处理方法联系进行分析解释。

其中前针对前两项的研究方法有部分重叠,但又各有所侧重。本文从以上研究目标出发,对经常采用的统计分析方法进行总结,分析如何运用微平板产生的大量多维数据。另外,对样品重复的设置与数据的标准化等方面做系统阐述。

2 比较研究样品间微生物群落差异

对不同样本进行的研究,如对不同森林类型土壤微生物的比较,对不同水体、不同农田类型微生物的比较,污染物对微生物的影响,不同时间环境微生物的变化等等,希望验证微生物群落是否存在差异。BIOLOG 多维数据存在的差异可以通过单一数值指标及多元统计两种方式来实现。

2.1 单时间点计算的单一数值指标

每孔平均吸光度变化(AWCD),用以衡量微生物利用不同碳源的整体能力。这是最常用的一种方法,通常经过对一系列读数时间的 AWCD 值变化趋势的差异来分析样品间微生物群落的不同。一般认为变化幅度较大的样品具有较高的碳源利用能力,也往往具有较高的微生物丰度^[4]。

AWCD 值之外,以照度量动植物多样性的思想,Zak 等提出基于 BIOLOG 微平板的功能多样性指数的计算方法^[9];研究者进而扩展出均匀度的概念,用以表征微生物对碳源的利用程度和利用模式^[10-11]。

平均吸光度:

$$AWCD = \sum (C - R) / n$$

式中, C 为反应孔的吸光度, R 为对照孔的吸光度。表征微生物利用碳源的整体综合能力。

Shannon 多样性指数及 McIntosh 多样性指数:

$$H' = - \sum p_i \ln p_i$$

$$U = \sqrt{(\sum n_i^2)}$$

式中, p_i 为每一孔吸光度除以所有孔吸光度的和, 做这个除法的目的是对变量进行标准化, 消除在点样及培养过程中对吸光度变化带来的影响误差^[4]:

$$n_i = C_i - R$$

以上两个指数均表征微生物群体利用碳源能力的多样性, 同普通生态学中多样性指数含意。

Gini 指数^[12]:

$$G = \frac{\sum_{i=1}^W \sum_{j=1}^W |n_i - n_j|}{2W^2 \bar{x}}$$

式中, W 为平板孔数据(不包括对照, ECO 板为 31), $\bar{x}$ 为 AWCD 值。同样为对碳源利用多样性的表征, 但更加侧重于对差异性的描述^[12]。

Shannon 均一性指数:

$$S_E = H' / \ln S$$

S 是微生物可以利用的碳源数目, 即颜色有变化的孔数。

在应用中, 上述指标以 AWCD 值随时间的变化及用 Shannon 指数表征功能多样性较为常见。其中 AWCD 值随时间变化的趋势线具有直观可见的特点, 易于发现样品间碳源利用能力的不同, 更为研究者乐于使用。侯晓杰等用 AWCD 值的变化及香农指数差异研究不同施肥处理及地膜覆盖对微生物类群的影响, 马驿等以 AWCD 值和功能多样性不同考察农药对微生物的作用, 张海涵则用其中的指标, 如 AWCD 值及不同多样性指数, 来表征不同生态条件下油松的根际土壤微生物差异, 韩雪梅等以此检验不同电池内容物污染浓度下土壤微生物活性差异。这些参数在以上研究中均有较好应用^[13-16]。

然而在有些环境差异不太大的情况下, 这些指数并不能较敏感的区分样品的菌群差异。适当选取板中某一部分孔的数据进行分析时能更好的揭示差异。Bradley 研究了应用孔的数目与多样性指数敏感度的关系, 发现较少的孔数具有较高的敏感度, 并建议在适当情况下应该有选择的使用部分孔的数值, 即在计算时只考虑阳性孔, 而不是把所有孔都包括到计算中去^[17]。阳性孔的定义一般有以下几种: (1) 可以将吸光度变化幅度比对照孔大的孔均列为为阳性孔; (2) 也可以把比平均吸光度变化幅度大的孔定义为为阳性。不管如何定义, 目的都更集中地考察菌群利用效率更高的碳源, 进而更好的刻画微生物群体的生理活性面貌。确实, 选择高可变孔后计算能在样本间带来更多的差异, 使数据变得更加“敏感”, 但这种差异是否忠实的反映群落的差异, 抑或仅仅是由于孔的选择策略而带来的, 还需要进一步的研究和确认。最好辅以其他的研究方法, 如磷脂脂肪酸多态性分析, 及基于 DNA 或 RNA 的分子水平群落结构分析等, 通过相互印证对照, 从多个角度分析, 得到合乎客观实际的结论^[18]。

基于单一数值的比较具有方便直观的特点, 但由于这种计算方法不考虑碳源的分布方式, 无差异的对待不同碳源产生的数据, 因而不同的利用模式有可能计算出相同的多样性指数, 与真实情况产生差异。因此研究者也在探求直接针对多维数据的分析。

2.2 单时间点多维差异比较

样品有多个指标, 要进行显著性差异比较, 很容易想到多元方差分析(MANOVA), 因为该方法正是通过

对样本内数据变异及样本间数据变异程度的比较来确定样本间是否存在差异^[19]。但 MANOVA 方法不能直接应用于 BIOLOG 的数据。原因在于 BIOLOG 产生的变量较多,一般来讲远多于样品数,不能直接应用多元变量分析^[20]。为了克服这个困难发展出了各种方法。一种方法是首先通过主成分分析(PCA)或因子分析对变量中所含信息进行浓缩,进而再对提取出的主成分(PCs)进行后续分析。如 Glimm 等使用 GN 板研究先对 95 变量做 PCA 分析,基于协方差矩阵计算得到 5 个主成分,可解释变量中 75% 以上的变异。然后把得到的主成份得分应用于统计分析^[21];另一种方法是人为减少变量数目,Hitzl 等先把变量分类,在分析中只利用其中一类,减少变量数量,满足样品数多于变量数的要求,随后应用 MANOVA 检验^[20],从而发现样品间的差异。与 Bradley 的发现相似,碳源分类后,变量数据数目减少,同样有较好的敏感性,能揭示更加微小的差异^[17, 20]。其中基于主成分分析除了用于差异比较,也是排序的一种重要方法,后面详细介绍。

另外较新的一个方法就是近几年发展的非参数多元分析,即 PMANOVA 方法^[17, 22]。该方法的零假设同样为平均值相等,但与 ANOVA 不同的是,对其检验不是通过 F 检验,而是通过 Wilks' Λ 统计进行的。在显著度检验的过程中,通过在组间对不同样本千万次的置换重复来获得样本间差异的统计显著性^[5]。PMANOVA 较 MANOVA 有两个优势,即适用于样本数少于变量数的实验和不需要满足变量分布假设。该方法优于先做 PCA 分析再把所得主成分做 ANOVA 分析,因为前主成分分析后只有 PCs 中包含的变异被纳入分析,而 PMANOVA 则包含绝大部分变异^[17]。

2.3 基于整个培养过程的比较

如前所述,对于 AWCD 值变化过程可以进行直观的比较,从而发现利用能力的不同。另外,还有研究者将 AWCD 值变化曲线积分求线下面积进行比较^[10],这种方法可以得到具体的数值,实现形式上的定量比较。

另外,其他基于整个培养过程动力学的比较也有应用,所有基于动力学的过程都需要连续的培养及吸光度读取。通过对培养过程各孔或整个平板吸光度变化的分析可以发现微生物群落需要多长时间才能达到碳源利用的最快速率,最大的吸光度变化,及吸光度变化到最大值一半时所需的时间^[10, 23-24]。另外,由于培养曲线呈 S 型,研究者倾向于使用 Logistic 方程或修改的 Logistic 方程来对其进行拟合,又如 Verschuere 等提出 Gompertz 方程曲线的应用,也可做出拟合及对其参数进行分析^[25]。

$$OD_{590} = A \times \exp[-\exp(\mu_m \times e \times 1/A \times (\lambda - t) + 1)]$$

参数含义见图 1。

经拟合后得到的 Logistic 曲线或龚珀兹曲线的参数,如滞后度、斜率、渐近线等均可纳入分析。如将每个

孔的吸光度数据均进行拟合,再以所得参数作为变量进行 PCA 分析,以此反映群落的差异^[7, 24]。但由于基于动力学曲线的分析较为敏感,因此接种密度必须严格控制,最好保证接种时吸光度的均一性^[24],另外读数时间也有要求,一般来讲培养刚开始一段时间可以读取数据密集一些。

3 基于多维数据的样本排序

简单的分析样品间差异往往难以满足研究需求,特别是在处理样品较多时,往往需要对其进行排序,进而确定其各自不同特点。常用的方法有主成分分析(PCA)、因子分析、聚类分析等。

PCA 是最常用的一种方法,大多数对 BIOLOG 数据进行的分析都会用到^[7]。BIOLOG 方法给出了关于微生物群落的大量数据信息,但这些数据间往往存在着较多的信息重复,因为微生物对某些碳源的利用方式可能是相似的。直接利用这些数据分析不但极为复杂,而且很可能因为变量间存在多重共线性

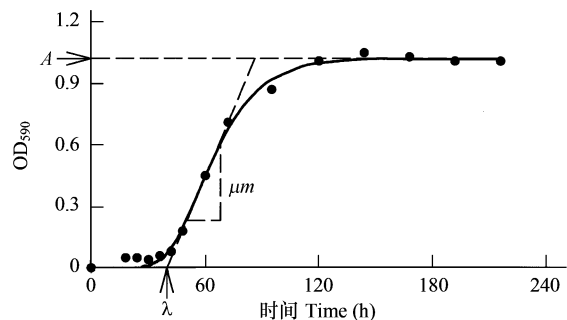


图1 BIOLOG 孔吸光度变化曲线, Gompertz 方程的拟合^[25]

Fig. 1 The color development in the BIOLOG well fitted to the Gompertz equation^[25]

A 为最大吸光度, λ 为到达指数增长期所需时间(时滞相), μ_m 为最大吸光度变化率

(Multicollinearity)而引起极大的误差。为了充分而有效利用数据,往往通过使变量简化降维的方式找到较少的新指标来代替原来较多的旧变量,从而确定微生物群落落在不同季节、区域,或者在不同处理下的差异^[19, 26]。PCA 应用的如此广泛的另一个原因在于它可以把复杂的数据通过二维或三维的图标表现出来,相似的样品分布位置相近,从而使研究者得以直观的感受群落差异的所在(图 2)。另外,如 3.2 中所述,PCA 分析后所得到的主成份值也可用以分析检验组间差异或者与环境因子进行相关分析。

主成分是原始变量的线性组合,能够代表大部分原始数据的信息。压缩的过程可以通过协方差矩阵或相关矩阵两种方式,一般软件中默认的压缩方式为相关矩阵方式。两种不同的压缩方式会得到不同的主成份和样本间距离,大部分研究者在进行主成分分析时使用默认设置,即以相关矩阵方式对数据进行压缩。哪种处理方式更加合理还存在争议, Glimm 等提出,尽管基于相关矩阵的 PCA 具有样本间标度不变性的优势,但由于它也在某种程度上忽略了不同样本间变量的巨大变异度,牺牲了数据本身的信息,因此基于协方差矩阵的计算是更为合理的^[21]。这两种矩阵变换的差异在多数文献中未予考虑,也未给出变换方式,是在这种方法使用上的不足。

PCA 方法基于一个时间点的吸光度计算,多利用吸光度作为变量进行分析,也有以底物是否利用得出二元变量矩阵进行分析的,但不论哪种方法,敏感度都不太高,不足以表现出某些比较微小的差异^[7, 28]。另外,PCA 中的 PCs 含义不甚显著,可以进一步使用因子分析,通过对载荷矩阵的旋转使之含义更加明确。PCA 分析后的得到的主成分(PCs)也可以纳入到与环境因子的相关分析中,其各自的载荷即为代表不同碳源的程度^[29]。

因子分析由主成分分析发展而来,主要区别在于:主成分分析是通过原始数据的协方差矩阵或相关矩阵的变换,尽可能最大限度解释原始数据的变异;而因子分析可以理解为一个隐变量模型,有较强的模型假设,可以有很多方法来估计隐变量。因子分析的结果经过旋转,可以更合理地解释与原始变量的关系^[26]。

聚类分析的基本原理是通过对各样本多元变量(各孔吸光度)的分析来确定样本间的差异(或相似度),由此相似的样本会较为接近,差异大的样本距离较远,从而直观的了解各样本的相似度和关系^[5]。这种方法多用来分析非连续性的数据,如 DNA 信息或氨基酸序列,但在 BIOLOG 数据处理中也有应用(图 3)^[9, 30-31]。

然而不同的距离计算方法有时会导致不同的聚类结果,因此在使用中一定要注意^[21]。另外一种聚类应用则与因子分析中确定不同碳源的利用程度目的相似,通过分析得到碳源的不同分类,在同一分类中的碳源较其他分类中的碳源具有更高的相似度。该方法也可用以确认在培养过程中菌群对何种碳源有更高的利用,和多样性指数结合分析,可以得到碳源对不同的多样性指数贡献的差异。

4 与环境因子或处理方法联系进行分析解释

研究了微生物群落的差异和分析了不同样品间的关系,研究人员往往希望得到这种差异与环境因子间的关系,这就需要联系环境因子进行分析。最常用的是相关分析和回归分析:AWCD 值,多样性指数,PCA 分析的主成份等,均可作为由 BIOLOG 原始数据抽提的新变量分析与环境因子的关系^[20, 27, 29]。希望研究某类环境因子的影响同时希望排除其他环境因子影响时可以尝试偏相关分析。另外,多元回归树分析方法可以直观地展示不同环境因子对生物指标的影响,也是一个不错的方法^[32]。不过该方法虽已有在微生物领域的应

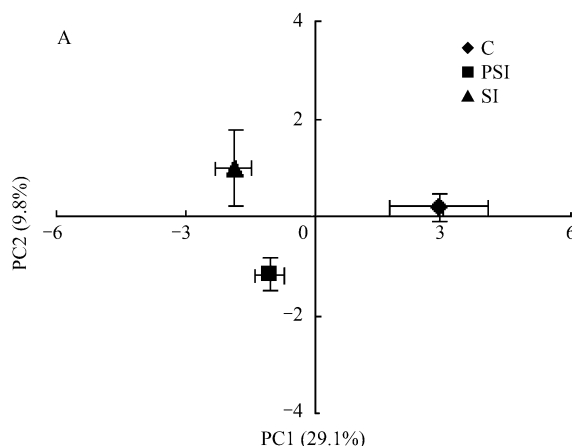


图2 不同灌溉方式微生物碳源利用能力差异,引自张永利等^[27]; PCA 分析揭示了不同灌溉方式的差异

Fig. 2 Principal components analysis (PCA) of BIOLOG plate data profiles revealed the patterns of microbial communities in differently irrigated soil^[27]

用^[33],但还没有应用于 BIOLOG 数据分析的先例。

典范对应分析 (CCA) 方法最初应用于植被分析^[34],Bossio 等 1995 首次应用于 BIOLOG 吸光度数据,使用的是 CANOCO 软件^[35]。这种方法直接把 BIOLOG 微平板吸光度作为表征微生物群落的变量与环境因子进行分析,研究这两组变量之间的关系。CCA 从对应分析发展而来,将对应分析与多元回归分析相结合,最终可以把样地、物种和环境因素的排序结果表示在同一个排序图上^[34]。作为基于单峰模型的一个统计方法,CCA 显然比较适用于对不同生物物种的分析。但不足之处在于 BIOLOG 数据是吸光度的变化值,且一般情况下样品较少,是否适合 CCA 要求的数据分布可能无法满足严格的统计学验证^[21]。

无论是相关分析、回归分析还是 CCA,都可以找到环境因子对微生物指标的“影响”,但那只是在统计上的相关性,对其解释还需要仔细考察环境,从专业知识出发慎重考虑。

5 其他

统计需要重复,但由于经费的限制往往不可能设置太多,特别是 GN 板。但如果要寻找环境微生物的差异,必须设置重复,否则即使发现了差异在统计上也是无效的^[3, 21]。ECO 板一块板上有 3 个重复,较为经济,为环境微生物研究中所常见采用。而重复的设置也存在争议,一般认为应从一个样地(水域、空气等)取来 3—4 份样品互为重复,且每一重复为该样地若干点的混合^[36-37];而取来一份样品(即使是混合的),在实验时再分成几份是不合理的。另外,虽然没有数据分布检验的分析是不完整的,但基于 BIOLOG 的数据分析一般都没有检验,这不能说不是一个缺陷^[5]。孔的吸光度需要经过校正、剔除,如减去对照孔、除以 AWCD 以减轻接种密度的差异,负值归零,异常值不纳入分析以保证 CCA 结果的稳定^[4, 7, 35]。

6 小结

针对 BIOLOG 方法产生数据的分析方法较多,必须根据研究目的选择合适者应用。另外,重复的设置必须仔细考虑,在统计的意义上,没有重复是不能得到差异显著的结论的。更进一步,不同的统计方法对培养方式也有不同要求,如选用 PCA、多样性指数来度量差异,理论上只需要一个时间点的数据即可;而基于动力学曲线的分析则需要较准确的初始浊度校正及较多的读数次数,这些均需在实验开始之前仔细考虑。合理的培养方法加上合适的统计分析,BIOLOG 技术会对环境微生物生态的研究带来更大的方便和帮助。

References:

- [1] Fierer N, Bradford M A, Jackson R B. Toward An Ecological Classification of Soil Bacteria. *Ecology*, 2007, 88 (6):1354-1354.
- [2] Konopka A, Oliver L, Turco R F. The Use of Carbon Substrate Utilization Patterns in Environmental and Ecological Microbiology. *Microbial Ecology*, 1998, 35 (2):103-115.
- [3] Garland J L, Mills A L. Classification and Characterization of Heterotrophic Microbial Communities on the Basis of Patterns of Community-Level Sole-Carbon-Source Utilization. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, 57 (8):2351-2359.
- [4] Garland J L. Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, 1997, 24 (4):289-300.
- [5] Ramette A. Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, 2007, 62 (2):142-160.
- [6] Murtaugh P A. Simplicity and Complexity in Ecological Data Analysis. *Ecology*, 2007, 88 (1):56-62.
- [7] Preston-Mafham J, Boddy L, Randerson P F. Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source utilisation profiles — a critique. *FEMS Microbiology Ecology*, 2002, 42 (1):1-14.
- [8] Smalla K, Wachtendorf U, Heuer H, Liu WT, Fomey L. Analysis of BIOLOG GN Substrate Utilization Patterns by Microbial Communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, 64 (4):1220-1225.

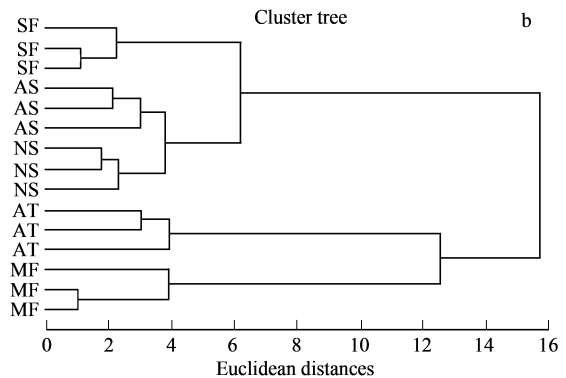


图3 基于 BIOLOG 数据对不同样地进行的聚类分析,引自韩雪梅等^[29]

Fig. 3 Cluster analysis of BIOLOG data in different sampling sites^[29]

SF、AS、NS、AT、MF 为不同样地类型

- [9] Zak J C, Willing M R, Moorhead D L, Wildman H G. Functional diversity of microbial communities: A quantitative approach. *Soil Biology and Biochemistry*, 1994, 26 (9):1101-1108.
- [10] Hackett C A, Griffiths B S. Statistical analysis of the time-course of BIOLOG substrate utilization. *Journal of Microbiological Methods*, 1997, 30 (1):63-69.
- [11] Lupwayi N Z, Arshad M A, Rice W A, Clayton G W. Bacterial diversity in water-stable aggregates of soils under conventional and zero tillage management. *Applied Soil Ecology*, 2001, 16 (3):251-261.
- [12] Harch B D, Correll R L, Meech W, Kirkby C A. Using the Gini coefficient with BIOLOG substrate utilisation data to provide an alternative quantitative measure for comparing bacterial soil communities. *Journal of Microbiological Methods*, 1997, 30 (1):91-101.
- [13] Han X M, Guo W H, Wang R Q, Wang M C. Microbial communities in microcosm soils treated with battery waste. *Progress in Natural Science*, 2007, 17 (8):919-926.
- [14] Ma Y, Chen Z, Zeng Z. Effects of enrofloxacin on functional diversity of soil microbial communities. *Acta Ecologica Sinica*, 2007, 27 (8):
- [15] Hou X J, Wang J K, Li S P. Effects of different fertilization and plastic-mulching on functional diversity of soil microbial community. *Acta Ecologica Sinica*, 2007, 27 (2):
- [16] Zhang H, Tang M, Chen H, Du X G, Zheng H. Microbial communities in *Pinus tabulaeformis* mycorrhizosphere under different ecological conditions. *Acta Ecologica Sinica*, 2007, 17 (8):
- [17] Bradley R L, Shipley B, Beaulieu C. Refining numerical approaches for analyzing soil microbial community catabolic profiles based on carbon source utilization patterns. *Soil Biology and Biochemistry*, 2006, 38 (3):629-632.
- [18] Drenovsky R E, Feris K P, Batten K M, Hristova K. New and current microbiological tools for ecosystem ecologists: Towards a goal of linking structure and function. *American Midland Naturalist*, 2008, 160 (1):140-159.
- [19] Legendre P, Legendre L. *Numerical Ecology*. Elsevier, 1998.
- [20] Hitzl W, Henrich M, Kessel M, Insam H. Application of multivariate analysis of variance and related techniques in soil studies with substrate utilization tests. *Journal of Microbiological Methods*, 1997, 30 (1):81-89.
- [21] Glimm E, Heuer H, Engelen B, Smalla K, Backhaus H. Statistical comparisons of community catabolic profiles. *Journal of Microbiological Methods*, 1997, 30 (1):71-80.
- [22] Anderson M J. A New Method for Non-Parametric Multivariate Analysis of Variance. *Austral Ecology*, 2001, 26 (1):32-46.
- [23] Jon E Lindstrom, Barry P R, Braddock J F. Microbial community analysis: a kinetic approach to constructing potential C source utilization patterns. *Soil Biology and Biochemistry*, 1998, 30 (2):231-239.
- [24] Garland J L, Mills A L, Young J S. Relative effectiveness of kinetic analysis vs single point readings for classifying environmental samples based on community-level physiological profiles (CLPP). *Soil Biology and Biochemistry*, 2001, 33 (7-8):1059-1066.
- [25] Verschuere L, Fievez V, Vooren L, Verstraete W. The Contribution of Individual Populations to the BIOLOG Pattern of Model Microbial Communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 1997, 24 (4):353-362.
- [26] Zhang W T. *Advanced statistical course on SPSS*. Beijing: Higher Education Press, 2004: 213-220.
- [27] Zhang Y L, Dai J L, Wang R Q, Zhang J. Effects of long-term sewage irrigation on agricultural soil microbial structural and functional characterizations in Shandong, China. *European Journal of Soil Biology*, 2008, 44 (1):84-91.
- [28] Bucher A E, Lanyon L E. Evaluating soil management with microbial community-level physiological profiles. *Applied Soil Ecology*, 2005, 29 (1):59-71.
- [29] Niklinska M, Chodak M, Laskowski R. Characterization of the forest humus microbial community in a heavy metal polluted area. *Soil Biology and Biochemistry*, 2005, 37 (12):2185-2194.
- [30] Ellis R J, Thompson I P, Bailey M J. Metabolic Profiling as a Means of Characterizing Plant-Associated Microbial Communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 1995, 16 (1):9-18.
- [31] Han X M, Wang R Q, Liu J, Wang M C, Zhou J, Guo W H. Effects of vegetation type on soil microbial community structure and catabolic diversity assessed by polyphasic methods in North China. *Journal of Environmental Sciences*, 2007, 19 (10):1228-1234.
- [32] De'ath G. Multivariate Regression Trees: A New Technique for Modeling Species-Environment Relationships. *Ecology*, 2002, 83 (4):1105-1117.
- [33] Ge Y, He J Z, Zhu Y G, Zhang J B, Xu Z, Zhang L M, Zheng Y M. Differences in soil bacterial diversity: driven by contemporary disturbances or historical contingencies? *The ISME Journal*, 2008, 2 (3):254-264.
- [34] Ter Braak C J F. Canonical correspondence analysis: a new eigenvector technique for multivariate direct gradient analysis. *Ecology*, 1986, 67
- [35] Bossio D A, Scow K M. Impact of Carbon and Flooding on the Metabolic Diversity of Microbial Communities in Soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995, 61 (11):4043-4050.
- [36] Hurlbert S H. Pseudoreplication and the Design of Ecological Field Experiments. *Ecological Monographs*, 1984, 54 (2):187-211.
- [37] Liao M, Xie X M. Effect of heavy metals on substrate utilization pattern, biomass, and activity of microbial communities in a reclaimed mining wasteland of red soil area. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2007, 66 (2):217-223.

参考文献:

- [14] 马骅, 陈杖榴, 曾振灵. 恩诺沙星对土壤微生物群落功能多样性的影响. *生态学报*, 2007, 27(8): 3400-3406.
- [15] 侯晓杰, 汪景宽, 李世朋. 不同施肥处理与地膜覆盖对土壤微生物群落功能多样性的影响. *生态学报*, 2007, 27(2): 655-661.
- [16] 张海涵, 唐明, 陈辉, 杜小刚, 郑华. 不同生态条件下油松 (*Pinus tabulaeformis*) 菌根根际土壤微生物群落. *生态学报*, 2007, 27(12): 4394-4402.
- [26] 张文彤. *SPSS 统计分析高级教程*. 北京: 高等教育出版社, 2004: 213-220.