

DOI: 10.5846/stxb202003130525

王强, 梁玉, 范小莉, 张文馨, 何欢, 戴九兰. 微生物生态研究中 BIOLOG 方法数据分析及 R 语言实现. 生态学报, 2021, 41(4): 1514-1527.

Wang Q, Liang Y, Fan X L, Zhang W X, He H, Dai J L. Data analysis and R demonstration for application of BIOLOG microarrays technique in microbial ecology study. Acta Ecologica Sinica, 2021, 41(4): 1514-1527.

微生物生态研究中 BIOLOG 方法数据分析及 R 语言实现

王 强¹, 梁 玉², 范小莉², 张文馨², 何 欢³, 戴九兰^{3,*}

1 山东省林业外资与工程项目管理站, 济南 250014

2 山东省林业科学研究院, 济南 250014

3 山东大学环境研究院, 青岛 266237

摘要: 微生物生态研究中, 对微生物群落结构、群落特征以及其与环境因素的关系的揭示, 一直受到广泛关注; 适当的数据分析方法有助于更清晰地刻画微生物群落结构特征, 明确其与环境因素的关系。结合实例, 对微生物生态研究中基于 BIOLOG 微平板技术的数据分析方法进行梳理, 分别介绍数据读取整理、特征指数计算、非限制性排序、限制性排序、聚类分析、环境向量拟合、蒙特尔检验等常用数据操作及生态分析方法; 针对不同方法结论, 结合研究目标和生态理论给出具有统计学意义的解释, 并评价不同方法特点及适用场景; 分析过程以 R 语言实现, 并提供全部代码。结果表明, BIOLOG 方法产生数据能从多个角度表征微生物群落功能特征, 并结合环境指标梯度进行分析; 但 BIOLOG 数据可能不满足正态性分布, 在基于正态分布的分析前应提前进行检验; 排序分析时应慎用主成分分析, 可优先采用其他基于距离矩阵的排序方法; R 语言能够简化 BIOLOG 数据读取及操作, 易于完成各类统计分析。本研究能够对微生物生态研究者科学选择应用统计分析方法、提高数据处理效率提供直接参考。

关键词: BIOLOG; R 语言; 多元统计; 群落结构; 生物多样性; 微生物生态

Data analysis and R demonstration for application of BIOLOG microarrays technique in microbial ecology study

WANG Qiang¹, LIANG Yu², FAN Xiaoli², ZHANG Wenxin², HE Huan³, DAI Jiulan^{3,*}

1 Forestry Foreign Investment and Project Management Station of Shandong Province, Ji'nan 250014, China

2 Forestry Science Institute of Shandong Province, Ji'nan 250014, China

3 Environmental Research Institute of Shandong University, Qingdao 266237, China

Abstract: In the study of microbial ecology, there have been increasing concerns about community patterns and their relationship with environmental factors. Selecting appropriate statistical methods not only provides a better understanding of the microbial community structure and pattern but also clarifies the effects of environmental factors on the microbial community. Based on practical examples, this paper summarized the statistical methods for BIOLOG data in microbial ecology study, including data input, indicator indices calculation, unconstrained ordination, constrained ordination, clustering analysis, environmental factor fitting, Mantel test, and so on. The statistical results were discussed based on study purposes and ecological theories, and the applicability of those methods was also evaluated. All analysis was conducted with R programming. The results show that BIOLOG microarrays techniques effectively reveal the physiological

基金项目: 国家重点研发计划 (2018YFD0800303); 国家自然科学基金 (41977144); 山东省重点研发计划 (2018GSF117024); 中国博士后基金 (2017T100488)

收稿日期: 2020-03-13; **网络出版日期:** 2020-07-31

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

profiles of the microbial community. Moreover, this technique can be appropriately used to analyze the relationship between microbial profiles and their environmental factors. Here, we should recognize that the pre-inspections are required, as BIOLOG data maybe not in a normal distribution. For ordination analysis, some other applications of distance-based ordination methods are safer than Principal Component Analysis (PCA), which should be given a second thought. The priority should be given to the ordination analysis based on the distance matrix rather than PCA. Furthermore, R programming facilitates the BIOLOG data manipulation. The study can help researchers choose proper analysis in microbial ecology study and increase the efficiency of data manipulation.

Key Words: BIOLOG; R language; multivariate statistics; community structure; biological diversity; microbial ecology

微生物群落在全球生态循环中占据重要地位,也具有重要的作用^[1],从不同层次和角度对微生物群落及生态特征进行揭示一直是学界研究热点^[2-4]。自 Garland 等 1991 年首次将 BIOLOG 方法用于微生物群落生理特征检测^[5],数十年来该方法在微生物群落和生态研究中得到大量应用,从碳源利用功能多样性的角度刻画了微生物群落生理特征^[6-10]。BIOLOG 平板包括革兰氏阴性板、生态板、MT 板、真菌板、SF-N 和 SF-P 板等多种类型^[11],不同平板针对研究对象不同,操作方法不同,但均能产生大量多维数据用以表征微生物群落的功能多样性^[12-14]。

在微生物生态研究中关于数据分析方法已有学者专门讨论,但重点多在于理论层面,且对分子生物学范畴关注较多^[15-17]。相比分子方法,BIOLOG 方法产生数据局限于生理活性,受到关注较少;但由于其数据的多维度、时间依赖、环境相关等特点,同样需要对分析过程进行深入探讨,如数据读取、整理、统计方法选择,统计结果展示,统计结果解释等。然而,由 BIOLOG 方法的相对小众性,缺少专为此编写的成熟数据处理软件,大量数据处理需要研究者手动完成,耗时费力,容易出错;在应用排序、聚类、差异性分析等方法时,也没有一定标准或参考。不仅如此,在分析中常用的 canoco 软件^[18-19],也容易产生版权问题。已有研究对 BIOLOG 方法统计分析做过探讨^[20],其后不断有研究者联系讨论统计方法选择及实现方式,可见这仍是当前微生物生态研究领域的难点。

R 语言是为统计和数据处理而诞生的软件,具有优良的数据存储处理、数组运算、统计分析等功能,具有自由、免费、开源等特点^[21-22]。其语法简洁优雅,功能强大,在生物信息学、基因数据分析、空间分析、时间序列分析等领域均有优秀表现。当前 R 官方网站有 15000 多个扩展程序包 (packages),且在不断增加,形成了非常成熟的应用生态^[21]。

本研究采用 BIOLOG ECO 板研究案例,以 R 语言为工具,从原始文本数据开始,全过程实现数据读取、整理、统计分析,并针对分析结果,结合研究目标给出统计学解释。研究结果对 BIOLOG 微生物生态研究中统计分析方法选择、提高数据处理效率有直接参考作用。

1 实验数据与分析流程

1.1 实验数据

采用数据为招远矿山周边部分土壤样品测量数据^[23],选择 6 个样品,以样品的 BIOLOG ECO 板培养数据和重金属有效态含量数据进行分析。

BIOLOG ECO 板培养自 12 h 开始测量,每隔 12 h 测量一次,至 132 h 共测量 11 次。重金属有效态数据作为环境指标,每个样本测定 3 次重复。

BIOLOG ECO 板读数为 txt 文本数据,重金属有效态数据以 csv 格式存储。

1.2 分析方法

将 BIOLOG 数据导入并整理,进行一元特征指标计算、组间差异检验、排序、聚类等分析。应用常见分析

方法如 AWCD (Average Well Color Density, 平均吸光度)、ANOVA (Analysis of Variance, 方差分析)、MANOVA (Multivariate analysis of variance, 多元方差分析)、NP-KW test (Kruskal-Wallis test, 克鲁斯卡尔-沃利斯检验)、PCA (Principal Component Analysis, 主成分分析)、RDA (Redundancy Analysis, 冗余分析)、CA (Canonical Analysis, 典范分析)、CCA (Canonical Correspondence Analysis, 典范对应分析)、PRC (Principal Response Curve, 主成分响应曲线)、PCoA (Principal Coordinate Analysis, 主坐标分析)、Db-RDA (distance-based Redundancy Analysis, 基于距离的冗余分析)、NMDS (Nonmetric Multidimensional Scaling, 非度量多维尺度分析)、Mantel test (蒙特尔检验)等;各方法所需数据形式(原始数据或距离矩阵)及相互关系如图 1 所示。其中排序分析包含限制性排序和非限制性排序;非限制性排序直接探索 BIOLOG 数据内部规律,限制性排序则纳入环境变量(重金属含量数据),探讨其作为自变量对因变量 BIOLOG 数据的影响^[24]。本文主要对 BIOLOG 数据分析进行探讨,侧重对群落结构的解释(排序),对环境因子自身的特征探索分析及模型拟合($Y=f(X)$)分析方法等内容不做涉及。

2 数据导入与整理

2.1 数据导入

BIOLOG 方法数据文件应予以合理命名,便于批量读取及整理。数据读取后得到文本格式对象,要提取其中有效信息。本例中有效吸光度在文本的 51—58 行,构建应用 `bio.get()` 函数,读取得到含有 66 项 BIOLOG 数据的列表(list);环境指标数据通过 `read.csv()` 函数读入(代码见 https://yunpan.360.cn/surl_yPE4EhVDxL3,下同)。

2.2 数据整理

列表是 R 语言中数据嵌套关系的一种形式,由于读取过程而产生,内容选择可以采用 `$` 或 `[[ ]]` 两种形式^[25]。将列表中各样本重新命名后转化为数据框(data frame)形式进行计算,31 个碳源孔吸光度减去对照孔,负值归零,得到用于分析的数据 `biolog.31`;把样本信息、重复信息、读取时间信息以新列的形式加入数据集中,生成 `biolog.31.aid`,为后续分析及作图做准备。

3 一元特征指数计算和组间差异检验

3.1 一元特征指标

本文一元特征指标指用单一数字表征微生物群落功能特征的指标,如平均吸光度(Average Well Color Density, AWCD)、Shannon 多样性指数等。

AWCD 为 31 个碳源吸光度的平均值,是一个有关研究几乎必用的指标,衡量微生物利用碳源的能力^[11,20]。R 语言中可以使用 `apply()` 和 `mean()` 函数,针对各行一次性完成。

除了以平均值表征碳源利用综合能力之外,可以从对不同碳源利用能力多样性的角度分析,计算多样性指数^[26-27]。大部分多样性指数发源于植物群落研究,可以使用 `vegan` 包的 `vegdist()` 函数求取^[28]。

一元特征指标由单一测量时间信息得出,可以综合多个时间研究其变化趋势。图 2 为培养期间 AWCD 值变化情况,同一个时间 3 个重复均以散点图画在图上,之后进行线性拟合。可以发现,样本 2 的 AWCD 值增加最快,表明群落碳源利用功能最强;其次为样本 3,样本 6、4、1 的 AWCD 值依次降低但区分度不高,样本 5 培养前期变化较小,后期超过了样本 1。

实际研究中,基于研究目标不同,同样也可以对多样性指数等作图,探索变化规律^[29]。

由图 2 可见,84 小时附近各样本间读数区分度较好,可以对该时间点读数信息进行深入分析,如差异性检验、排序、聚类等。

3.2 组间差异检验

3.2.1 一元指标组间差异检验

为验证 84 小时各样本 AWCD 是否有差异,进行方差分析,使用 `oneway.test()` 函数。结果表明, P 值为

0.1698, 即 84 小时 6 个样本 AWCD 值间不存在显著差异。进一步检验数据是否符合正态分布, 使用 `shapiro.test()` 函数, P 值为 0.04154, 即数据不满足正态分布, 因此须采用非参数检验考察样本间差异性是否显著。

Kruskal-Wallis 检验是方差分析的一个非参数版本。非参数, 意味着不假设数据的正态分布形态背景, 但它假设各组有相同形状的分佈, 在 BIOLOG 数据差异性检验中应用较为合适^[30]。使用 `kruskal.test()` 函数实现, 结果表明, P 值为 0.05547, 接近 0.05 的阈值, 体现一定差异显著性。

3.2.2 多元指标组间差异检验

对多元数据的差异性检验常应用多元方差分析 (multivariate analysis of variance, MANOVA)。MANOVA 有两个前提, 一是多元正态性, 二是方差齐性。第一个前提说明变量要满足正态分布, 可以用 QQ 图来检验, 如果符合正态性, 则会呈现一条直线; 第二个前提要求各组样本协方差矩阵齐性, 可以用 M 盒检验完成^[25]。

应用 QQ 图检验, 发现数据不符合正态分布 (图 3)。但 MANOVA 方法有一定分布耐受性, 可以计算出结果, 显示数据样本间、读数间, 均显著差异。

对于不满足正态分布的数据应用非参数检验, 采用 `rrcov` 包的 `Wilks.test()` 函数, 方法选择 `rank`; 也可以用 `vegan` 包的 `adonis()` 函数。结果显示, 样本间、读数间均有显著差异, 表明各样本间 BIOLOG 吸光度变化具有显著差异。

4 多元分析

4.1 非限制性排序

4.1.1 主成分分析

主成分分析法 (Principal Component Analysis, PCA) 不仅常见于 BIOLOG 数据分析中, 在微生物生态其他类型数据, 如基因型、磷脂脂肪酸等分析中也经常用到^[26,31]。主成分分析有基于 `variance-covariance (scale1)` 和 `correlation (scale2)` 两种方式^[32]。第一种主要用于相同属性的数据集, 用于分析样本间的差异; 第二种主要用于不同属性的数据集, 如环境因子数据集, 单位、数量级都不一样, 挖掘变量间的相互关系。

对 84 小时 BIOLOG 数据进行主成分分析结果表明, 前两个主成分解释 63.062% 的数据信息, 双标图 (biplot) 将样本和指标放在同一图上, 能够清晰表现出各样本之间的差异, 本例中将同一样本的 3 个重复相连表现, 红色箭头表征不同碳源吸光度的变化梯度, 可以表现出不同样本在碳源吸光度 (A2—H4) 变化梯度上的分佈 (图 4)。

要深入分析不同碳源对主成分的贡献率, 找到特征碳源, 可以通过分析各变量在主成分的载荷 (loading) 完成^[31]。可以使用 `vegan` 包中 `score()` 函数实现。

PCA 是基于线性模型进行的分析, 需要数据基本服从正态分布, 在分析前应该对 BIOLOG 吸光度数据是否服从正态分布进行检验。前文对本例 BIOLOG 数据分析结果表明不服从多元正态分布, 因此需要用更加合

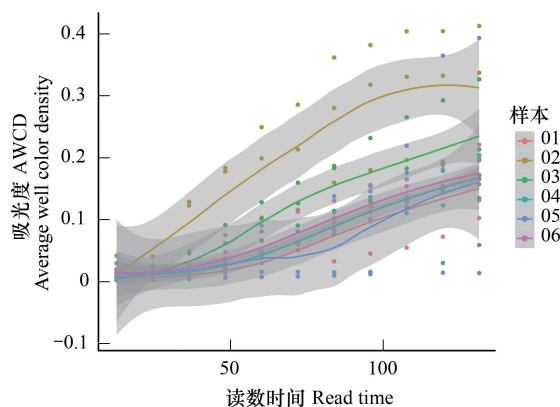


图 2 培养过程中 AWCD 变化趋势

Fig. 2 Developing trend of AWCD in the culturing period

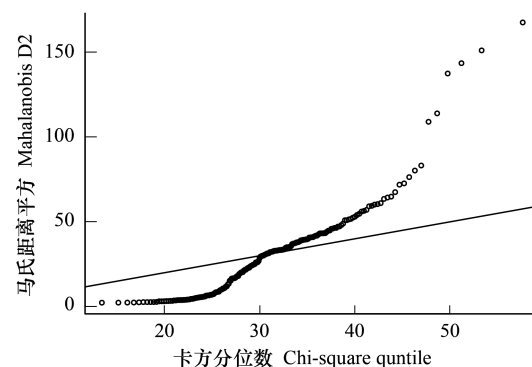


图 3 使用 QQ 图检验 BIOLOG 数据多元正态性

Fig. 3 QQ plot assessing multivariate normality of BIOLOG data

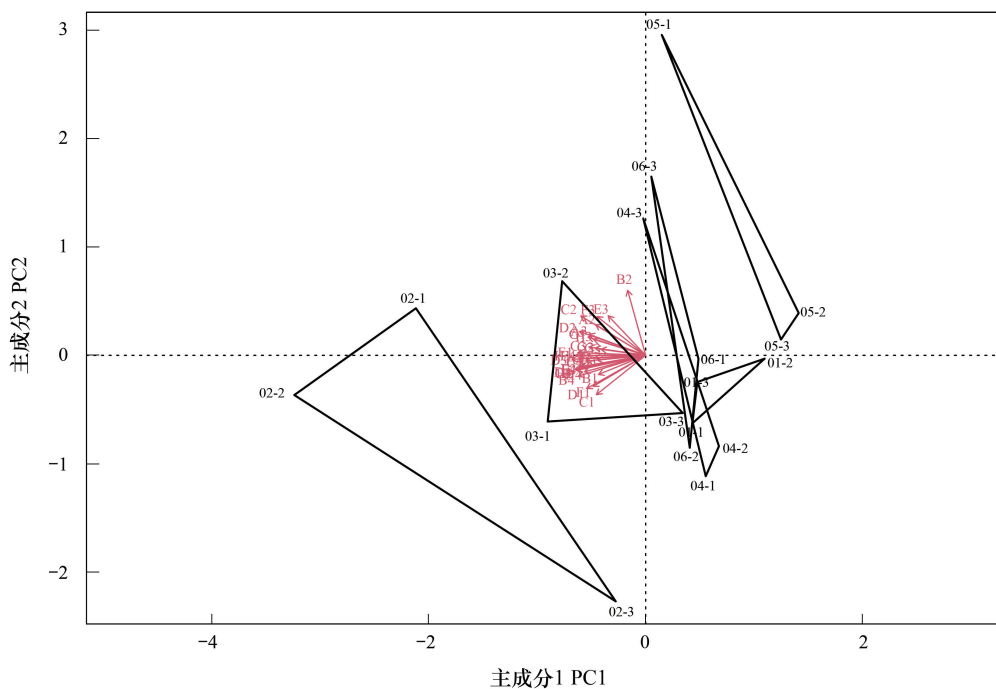


图 4 对 84 小时吸光度进行主成分分析(5 个样本重复以-1、-2、-3 表示)

Fig. 4 Principle Component Analysis of BIOLOG data at 84 hour (-1, -2, -3 represent for replications of 5 samples)

理的方式进行排序分析。

4.1.2 典范分析

典范分析(Canonical Analysis, CA)和 PCA 均为通过计算样本间距离进行的分析,不同在于 PCA 基于线性模型计算欧氏距离,而 CA 则基于单峰模型计算 χ^2 距离(卡方距离,Chi-Square distance)。结果表明,CA 应

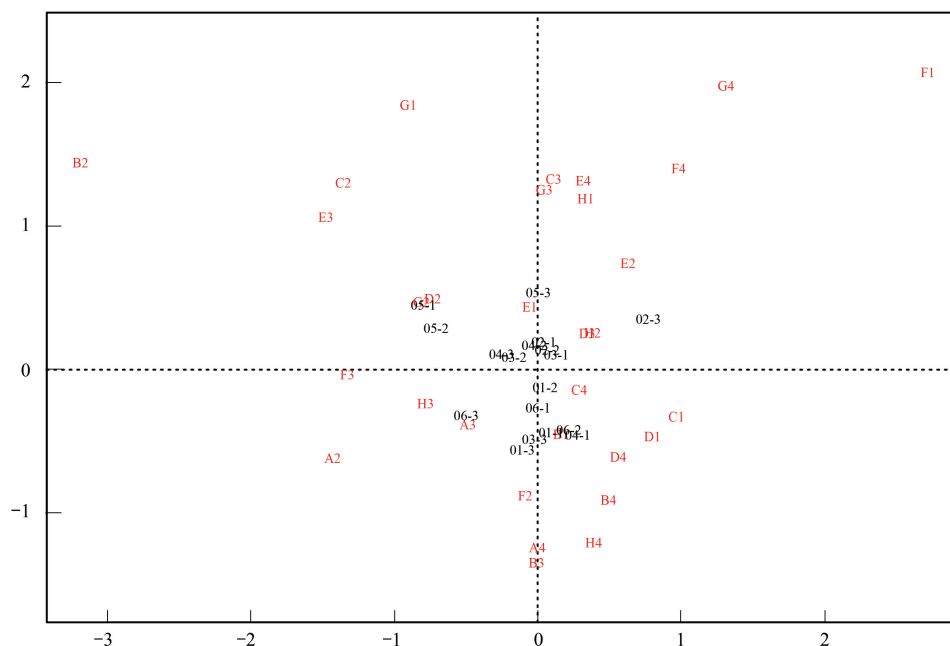


图 5 BIOLOG 数据 84 小时吸光度典范分析结果

Fig. 5 Canonical Analysis of BIOLOG data at 84 hour

A2—H4 为 31 个碳源吸光度

用于 BIOLOG 数据效果不好,前两个轴只能解释 39.536% 的信息,且对样本区分程度较差,如图 5 所示,不同碳源指向没有一致性。CA 是基于单峰模型的分析^[24],在微生物生态研究中应用较为少见。

4.1.3 主坐标分析

主坐标分析(Principal Coordinate Analysis, PCoA)与 PCA、CA 的区别在于距离计算方式。PCA 基于线性欧式距离、CA 基于 χ^2 距离,而 PCoA 通过不同的距离矩阵(伴随矩阵, association matrix)来进行分析,从而增加距离计算灵活性,得到更加合理的结果。该方法在分子生物学应用较多,基于基因序列计算距离,分析群落结构在不同处理间的差异^[33-35]。

分别基于比例差异矩阵(Percentage difference (aka Bray-Curtis) dissimilarity matrices)和海灵格距离矩阵(Hellinger distance)进行 PCoA 分析(图 6)。结果表明,PCoA 分析所得样本间差异区分度较高,能发现明确的群落特征;其中比例差异矩阵更能体现出吸光度变化特点,对于样本 2、5 有更好的区分。海灵格距离矩阵在比例差异矩阵的基础上进一步进行了开方转换,降低了吸光度数据大小的权重,相对不利于发现 BIOLOG 数

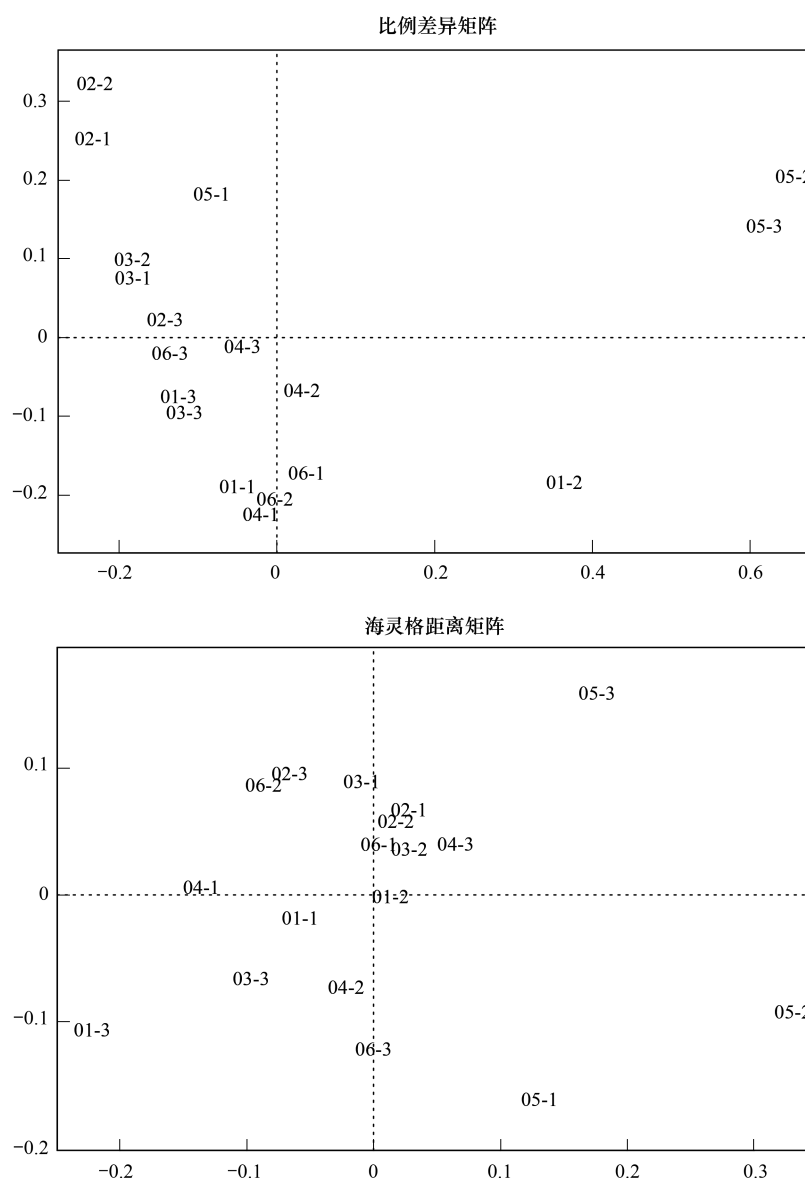


图 6 基于比例差异和海灵格距离矩阵的主坐标分析

Fig. 6 PCoA by Percentage difference and Hellinger distance dissimilarity matrices

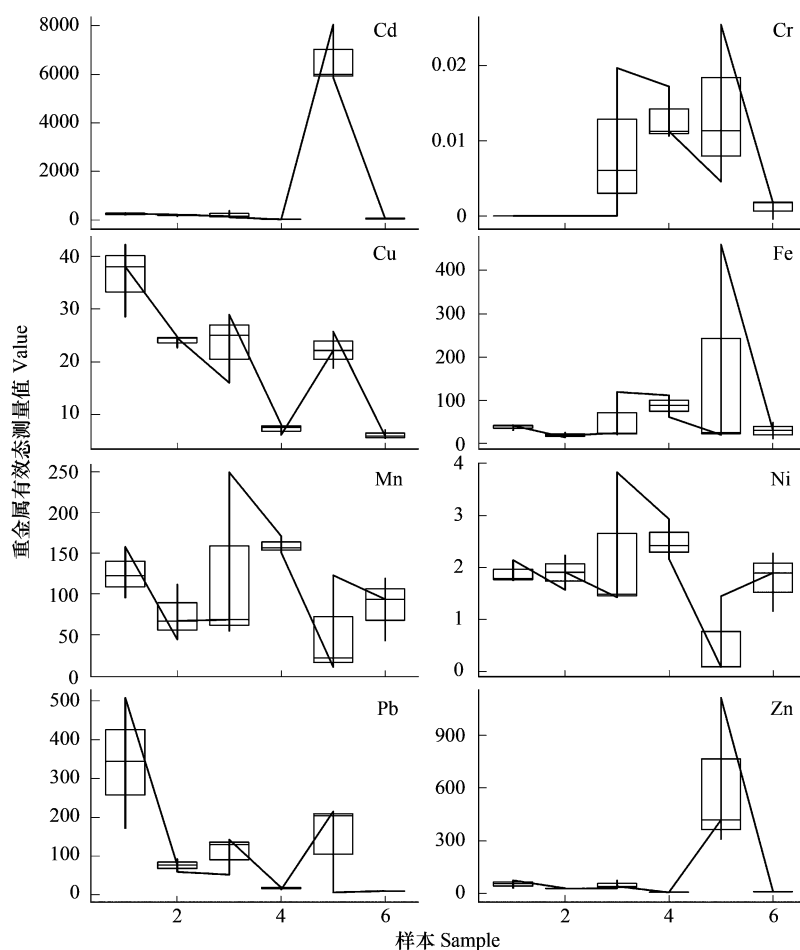


图8 各样本不同重金属有效态含量

Fig.8 Available contents of heavy metal in soil samples

4.2.2 冗余分析

冗余分析(Redundancy Analysis, RDA)是基于PCA的扩展,通过自变量环境指标对因变量生物指标的多元回归,揭示二者之间的联系和关系^[32]。一直有研究将本方法用于环境或其他微生物指标与 BIOLOG 数据的关系分析^[38-39]。

采用vegan程序包的rda()函数,重金属有效态作为自变量、84小时BIOLOG吸光度数据作为因变量进行分析,可知重金属有效态含量可解释BIOLOG吸光度数据中51.89%的方差信息,作图可直观发现各样本在重金属含量梯度上的分布(图9)。可见各样本在Cr和Fe的梯度上分散度最高,可以进一步考虑这两种环境因素在塑造形成目前微生物群落特征过程中发挥的影响。

RDA本质上是自变量环境指标对因变量生物指标的多元回归,自变量也不局限在一组数据,可以同时考察两组数据对BIOLOG的影响,如,将有效态重金属和土壤理化性质同时纳入分析,即偏冗余分析方法(Partial RDA),和偏相关分析类似,可用于控制特定变量的影响。

4.2.3 典范对应分析

典范对应分析(Canonical Correspondence Analysis, CCA)是在CA的基础上,基于单峰模型计算 χ^2 距离后,结合多元回归分析因变量与自变量之间的关系。鉴于CA分析BIOLOG数据效果不佳,本文不再深入讨论CCA方法。

实际研究中,有应用CCA的案例。如在方差分解之后,进一步分析不同环境因子与BIOLOG数据间的相

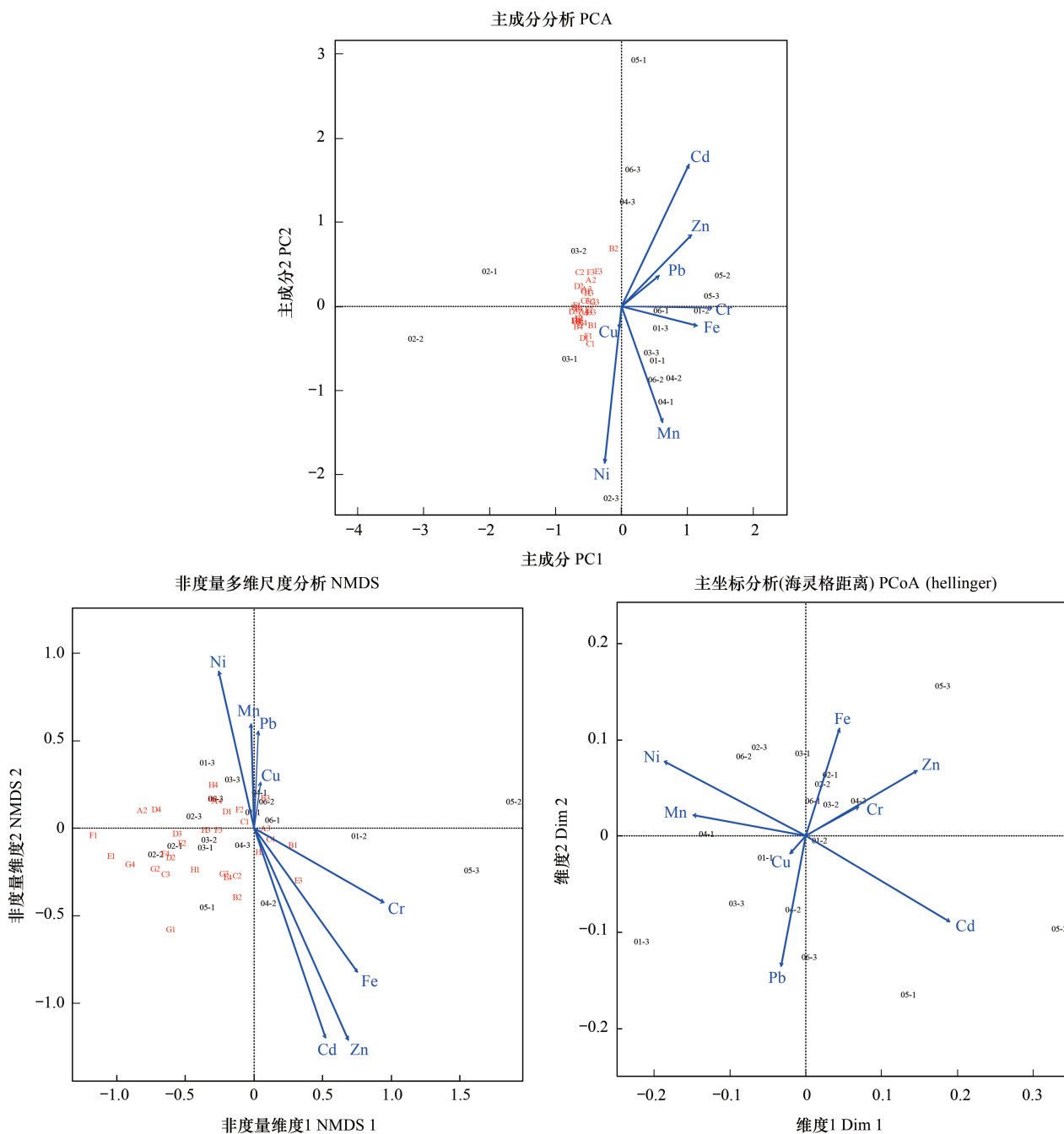


图 12 对 3 种非限制性排序的环境向量拟合

Fig. 12 Environmental fitting of 3 unconstrained ordination

不是严格的统计检验;聚类本身不能代表群落特征,必须结合环境指标进行分析;在表现数据信息方面,聚类反映的信息含量一般比排序要少。

4.4 蒙特尔检验

蒙特尔检验(Mantel test)是对两个矩阵相关关系的检验,检验相关性是否显著。这种方法多用于植物生态学研究,考察不同植物群落间相关关系。微生物生态研究中,在基于测序的方法中也有采用,如在限制性排序后,进一步分析环境因子与细菌与真菌的关系^[43]。

蒙特尔检验的原假设是两个矩阵间没有相关关系,较小的 P 值证明拒绝原假设,即矩阵间存在相关关

系。对 84 小时 BIOLOG 吸光度数据和重金属有效态数据进行相关性分析,结果表明,不论采用 Spearman 还是 Pearson 方法, P 值均为 0.002,即二组数据均存在显著相关关系。这也说明上述针对两组数据做进行的各种分析是合理有依据的。

5 讨论

本文在 R 语言环境下进行了 AWCD 值、多样性指数计算,组间差异检验,排序、聚类 and 蒙特尔检验等分析。其中 AWCD 值、多样性指数描述样本内吸光度的特征,属于生态研究中的样方内 α 多样性,排序则进行样本间特征比较,考察 β 多样性。在传统生态科学研究中,这些多样性指标可以用来考察物种更新速率、物种周转变换等规律;微生物生态中得到这些指标,也能对群落研究有所借鉴和启发。分析过程中快速、准确的计算方法,能解放出更多精力用于思考科学问题,会对研究工作走向深入提供助力。

实际研究中还有很多可以用于 BIOLOG 数据分析的方法,篇幅所限没有纳入。如针对培养曲线进行方程拟合并分析参数、Pathway 富集分析、相似性分析 (Analysis of similarities, Anosim)、典范变异分析 (Canonical variate analysis, CVA)、去趋势对应分析 (Detrended correspondence analysis, DCA)、BIOLOG 指标作为因变量与环境指标的建模等,均可结合研究目标选用^[44-45]。如对原生函数图不满意,可提取分析结果中关键数据,使用 R 语言中 ggplot2 程序包^[46],或导入 Origin 等作图软件中作图。附件中也给出使用 ggplot2 包对 PCA 结果作图示例,供参考。

参考文献 (References):

- [1] Fuhrman J A. Microbial community structure and its functional implications. *Nature*, 2009, 459(7244): 193-199.
- [2] Friedman J, Higgins L M, Gore J. Community structure follows simple assembly rules in microbial microcosms. *Nature Ecology & Evolution*, 2017, 1(5): 0109.
- [3] Zehr J P, Jenkins B D, Short S M, Steward G F. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure; a cross-system comparison. *Environmental Microbiology*, 2003, 5(7): 539-554.
- [4] Fierer N, Jackson J A, Vilgalys R, Jackson R B. Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(7): 4117-4120.
- [5] 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.
- [6] 田雅楠,王红旗. Biolog 法在环境微生物功能多样性研究中的应用. *环境科学与技术*, 2011, 34(3): 50-57.
- [7] 胡可,王利宾. BIOLOG 微平板技术在土壤微生物生态研究中的应用. *土壤通报*, 2007, 38(4): 819-821.
- [8] Xu W H, Ge Z W, Poudel D R. Application and optimization of Biolog EcoPlates in functional diversity studies of soil microbial communities. *MATEC Web of Conferences*, 2015, 22(3): 04015.
- [9] Choi K H, Dobbs F C. Comparison of two kinds of Biolog microplates (GN and ECO) in their ability to distinguish among aquatic microbial communities. *Journal of Microbiological Methods*, 1999, 36(3): 203-213.
- [10] Cheng H, Xu W N, Luo T, Xia L, Xiang H Y, Ma P F, Xia D. Microbial functional diversity as affected by different engineered eco-restoration methods at Xiangjiaba hydropower station. *Journal of Environmental Engineering*, 2020, 146(3): 04019125.
- [11] 郑华,欧阳志云,方治国,赵同谦. BIOLOG 在土壤微生物群落功能多样性研究中的应用. *土壤学报*, 2004, 41(3): 456-461.
- [12] Chen J W, Hanke A, Tegetmeyer H E, Kattelman I, Sharma R, Hamann E, Hargeshimer T, Kraft B, Lenk S, Geelhoed J S, Hettich R L, Strous M. Impacts of chemical gradients on microbial community structure. *The ISME Journal*, 2017, 11(4): 920-931.
- [13] 刘燕,李世雄,尹亚丽,赵文,王玉琴. 基于 Biolog 指纹解析黑土退化草地土壤微生物群落特征. *生态环境学报*, 2019, 28(7): 1394-1403.
- [14] 向泽宇,张莉,张全发,刘伟,王根绪,王长庭,胡雷. 青海不同林分类型土壤养分与微生物功能多样性. *林业科学*, 2014, 50(4):

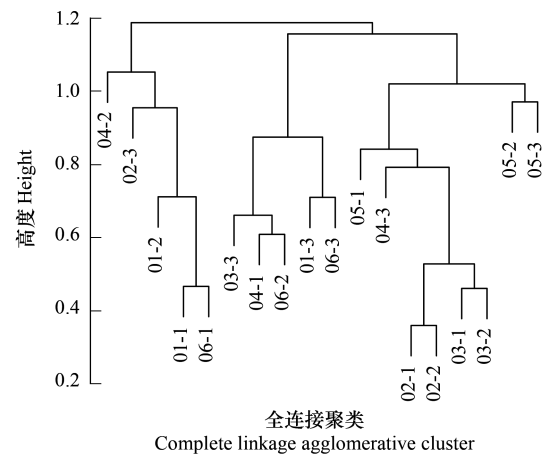


图 13 BIOLOG 84 小时吸光度聚类分析

Fig. 13 Cluster analysis of 84 h BIOLOG data

- 22-31.
- [15] Paliy O, Shankar V. Application of multivariate statistical techniques in microbial ecology. *Molecular Ecology*, 2016, 25(5): 1032-1057.
- [16] Ramette A. Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, 2007, 62(2): 142-160.
- [17] Schloss P D, Larget B R, Handelsman J. Integration of Microbial Ecology and Statistics: a test to compare gene libraries. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(9): 5485-5492.
- [18] 李美霖, 陈宇眺, 洪晓富, 乔宇颖, 王青霞, 陈喜靖, 沈阿林, 喻曼. 不同氮肥管理方式对稻田土壤微生物群落结构的影响. *浙江农业学报*, 2020, 32(2): 308-316.
- [19] 王青霞, 李美霖, 陈喜靖, 苏瑶, 喻曼, 沈阿林. 秸秆还田下氮肥运筹对水稻各生育期土壤微生物群落结构的影响. *应用生态学报*, 2020, 31(3): 935-944.
- [20] 王强, 戴九兰, 吴大千, 余悦, 申天琳, 王仁卿. 微生物生态研究中基于 BIOLOG 方法的数据分析. *生态学报*, 2010, 30(3): 817-823.
- [21] R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>, 2020.
- [22] Ihaka R, Gentleman R. R: a language for data analysis and graphics. *Journal of Computational and Graphical Statistics*, 1996, 5(3): 299-314.
- [23] 王强. 山东省两个典型矿区微生物生态特性及其环境指示作用研究[D]. 济南: 山东大学, 2010.
- [24] Legendre P, Legendre L F J. *Numerical Ecology*. Amsterdam: Elsevier, 2012.
- [25] Kabacoff R. *R in Action: Data Analysis and Graphics with R*. 2nd ed. Shelter Island: Manning, 2015.
- [26] 赵辉, 周运超, 任启飞. 不同林龄马尾松人工林土壤微生物群落结构和功能多样性演变. *土壤学报*, 2020, 57(1): 227-238.
- [27] 刘辉, 吴小芹, 任嘉红, 陈丹. 荧光假单胞菌与红绒盖牛肝菌共接种对杨树根际土壤酶活性及微生物多样性的影响. *林业科学*, 2019, 55(1): 22-30.
- [28] Oksanen J, Blanchet F G, Friendly M, Kindt R, Legendre P, McGlinn D, Minchin P R, O'Hara R B, Simpson G L, Solymos P, Stevens M H H, Szoecs E, Wagner H. *Vegan: Community Ecology Package*. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>, 2020.
- [29] Sofo A, Ricciuti P. A standardized method for estimating the functional diversity of soil bacterial community by Biolog[®] EcoPlates[™] assay—The case study of a sustainable olive orchard. *Applied Sciences*, 2019, 9(19): 4035.
- [30] Chavan S, Nadanathangam V. Shifts in metabolic patterns of soil bacterial communities on exposure to metal engineered nanomaterials. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2020, 189: 110012.
- [31] 刘秉儒, 张秀珍, 胡天华, 李文金. 贺兰山不同海拔典型植被带土壤微生物多样性. *生态学报*, 2013, 33(22): 7211-7220.
- [32] Borcard D, Gillet F, Legendre P. *Numerical Ecology with R*. 2nd ed. Cham: Springer, 2018.
- [33] Nakatsu C H, Byappanahalli M N, Nevers M B. Bacterial community 16S rRNA gene sequencing characterizes riverine microbial impact on Lake Michigan. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 996.
- [34] Holmes S, Huber W. Home | Modern Statistics for Modern Biology. <http://web.stanford.edu/class/bios221/book/index.html>, 2019.
- [35] Prosser J I. Putting science back into microbial ecology: a question of approach. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2020, 375(1798): 20190240.
- [36] Siles J A, Öhlinger B, Cajthaml T, Kistler E, Margesin R. Characterization of soil bacterial, archaeal and fungal communities inhabiting archaeological human-impacted layers at Monte Iato settlement (Sicily, Italy). *Scientific Reports*, 2018, 8: 1903.
- [37] Dundore-Arias J P, Felice L, Dill-Macky R, Kinkel L L. *Frontiers*, 2019. Carbon amendments induce shifts in nutrient use, inhibitory, and resistance phenotypes among soilborne *streptomyces*. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 498.
- [38] Kohler F, Hamelin J, Gillet F, Gobat J M, Buttler A. Soil microbial community changes in wooded mountain pastures due to simulated effects of cattle grazing. *Plant and Soil*, 2005, 278(1/2): 327-340.
- [39] Kaneda S, Křišťálek V, Baldrian P, Malý S, Frouz J. Changes in functional response of soil microbial community along chronosequence of spontaneous succession on post mining forest sites evaluated by biolog and SIR methods. *Forests*, 2019, 10(11): 1005.
- [40] 刁婵, 鲁显楷, 田静, 张永清, 莫江明, 于贵瑞. 长期氮添加对亚热带森林土壤微生物碳源代谢多样性的影响. *生态学报*, 2019, 39(18): 6622-6630.
- [41] Budroni M, Mannazzu I, Zara S, Saba S, Pais A, Zara G. Composition and functional profiling of the microbiota in the casts of *Eisenia fetida* during vermicomposting of brewers' spent grains. *Biotechnology Reports*, 2020, 25: e00439.
- [42] Wang Q, Dai J L, Yu Y, Zhang Y L, Shen T L, Liu J S, Wang R Q. Efficiencies of different microbial parameters as indicator to assess slight metal pollutions in a farm field near a gold mining area. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2010, 161(1/4): 495-508.
- [43] Ma J C, Nergui S, Han Z M, Huang G N, Li H R, Zhang R, Zhu L Y, Liao J F. The variation of the soil bacterial and fungal community is linked to land use types in northeast China. *Sustainability*, 2019, 11(12): 3286.
- [44] Guckert J B, Carr G J, Johnson T D, Hamm B G, Davidson D H, Kumagai Y. Community analysis by Biolog: curve integration for statistical analysis of activated sludge microbial habitats. *Journal of Microbiological Methods*, 1996, 27(2/3): 183-197.
- [45] 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.
- [46] Wickham H. *Ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. 2nd ed. Switzerland: Springer, 2016.