

邻苯二甲酸酯对土壤微生物群落多样性的影响

谢慧君¹, 石义静², 滕少香², 王文兴^{1*}

(1. 山东大学环境研究院, 济南 250100; 2. 山东大学环境科学与工程学院, 济南 250100)

摘要: 邻苯二甲酸酯(PAEs)是存在最广泛的有机有毒污染物之一. 利用 BIOLOG 和 ARDRA 方法, 分别考察了不同浓度 PAEs 对土壤微生物代谢多样性和遗传多样性的影响. 结果表明, 不同浓度 PAEs 处理的土壤的平均颜色变化率(AWCD)值随时间增加的幅度不同, PAEs 浓度越高, AWCD 值增幅越小, 对微生物代谢活性的抑制作用越大; 不同浓度 PAEs 处理样品中微生物群落生理代谢活性和碳代谢类群表现出明显差异, 空白和低浓度土壤微生物以糖类和羧酸类代谢群为优势类群, 而中浓度和高浓度土壤微生物以多胺类代谢群为优势类群; 主成分分析也显示碳代谢类型出现差异, PC1 就能将 4 个样品很好地分开, 与 PC1 正相关程度较高的碳源有 L-天冬酰胺酸、4-羟基苯甲酸和 D-苹果酸, 负相关的碳源有 D-半乳糖醛酸、*i*-赤藻糖醇、 γ -羟基丁酸和 1-磷酸葡萄糖. ARDRA 带型分析表明不同的土壤样品的多样性指数随着 PAEs 浓度的增加而增加, 短时间内 PAEs 能增加土壤微生物群落的代谢多样性.

关键词: 邻苯二甲酸酯; BIOLOG; 限制酶多态性分析; 群落

中图分类号: X171.5 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2009)05-1286-06

Impact of Phthalic Acid Esters on Diversity of Microbial Community in Soil

XIE Hui-jun¹, SHI Yi-jing², TENG Shao-xiang², WANG Wen-xing¹

(1. Environment Research Institute, Shandong University, Ji'nan 250100, China; 2. College of Environmental Sciences and Engineering, Shandong University, Ji'nan 250100, China)

Abstract: Phthalic acid esters (PAEs) are one of the most extensive organic and poisonous pollutants. BIOLOG and ARDRA method were used to analyze the impact of PAEs on microbial diversity in soil. BIOLOG analysis shows that the increase of average well color development (AWCD) is different in soils dealt with different concentrations of PAEs. With a higher PAEs concentration, the AWCD increases more slowly and the metabolic activity decreases more quickly. Physiological metabolism activity and carbon metabolic group show obvious difference in different samples. Although metabolic groups of carbohydrates and carboxylic acids were the dominant groups in control sample and low concentration sample, the dominant group is main polyamines in middle and high concentration samples. Principal component analysis (PCA) shows the differences of carbon metabolism. Four samples could be separated by PC1. Substrates of high positive correlation coefficients with PC1 were L-asparagine, 4-hydroxy benzoic acid and D-malic acid, but D-galacturonic acid, *i*-erythritol, γ -hydroxybutyric acid and glucose-1-phosphate showed high negative correlation. ARDRA analysis showed that the diversity index decreased, with the increased concentration of PAEs. In a short time, PAEs could increase the diversity of microbial genotype in soil.

Key words: phthalic acid esters(PAEs); BIOLOG; ARDRA; community

邻苯二甲酸酯(phthalic acid esters, PAEs), 是一类重要的有机有毒化合物, 它们被广泛用作油漆溶剂、塑料改性剂、涂料等的增塑剂, 也被用作农药载体、驱虫剂、化妆品、香味品、润滑剂和去泡剂的生产原料, 除此之外, 在家具、汽车、电线电缆、服装等行业也有广泛的应用^[1,2]. 据估计, 每年全世界 PAEs 的产量可高达数百万 t^[3], 虽然这些化工产业都经过了一定的处理, 但是在土壤、水和大气中仍然能够检到较高浓度的 PAEs, 成为地球上最广泛存在的污染物之一^[4,5], 尤其是土壤成为 PAEs 的主要的汇^[6].

PAEs 的污染引起了国内外的高度重视, 目前有关这方面的研究主要集中在生物富集^[7]、食物链传递^[8]等生态评价和 PAEs 的环境降解行为上, 却很少涉及 PAEs 对土壤微生物的影响. 土壤微生物是土壤的重要生命体, 是土壤污染的敏感指示物, 其区系

组成、代谢活性及微生物多样性是反映土壤环境质量变化的主要生物学指标^[9]. 土壤微生物的研究方法已从传统的培养法发展到 BIOLOG 微平板技术^[10]、磷脂脂肪酸分析^[11]、分子生物学方法^[12]等.

以 BIOLOG 微孔板碳源利用为基础的定量分析为描述微生物群落功能多样性提供了一种更为简单、快速的方法^[13], 已广泛应用于评价不同类型的土壤微生物群落功能, 如森林土壤微生物群落^[14]、不同作物栽培下的土壤微生物群落^[15]、重金属污染土壤微生物结构^[16]等. ARDRA (amplified ribosomal DNA restriction analysis) 方法也常用于微生物群落的

收稿日期: 2008-06-07; 修订日期: 2008-09-15

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(20737001/B0705); 中国博士后科学基金项目(10000059311025)

作者简介: 谢慧君(1979~), 女, 博士, 讲师, 主要研究方向为环境微生物学, E-mail: xiehuij@sdu.edu.cn

* 通讯联系人, E-mail: wxwang@sdu.edu.cn

分析,其获得的谱带更为简单,易于分析,并且不受菌株是否是纯培养的限制不受宿主的干扰,具有特异性强,效率高的特点^[17]. Qvreas 等^[18]利用该方法考察了 2 种不同农田土壤微生物群落的差异. 张于光等^[19]研究了三江源地区不同的植物类型的土壤中固氮微生物群组的不同.

当大量的 PAEs 进入到土壤环境中,土壤微生物群落的数量、结构和多样性都会受到影响,而微生物的多样性对其所在的生态系统所发生的生化反应具有重要的影响,微生物的组成与活性能反映出生态系统的功能状况. 本研究结合 BIOLOG 微平板技术和 ARDRA 方法,从代谢多样性和遗传多样性 2 个方面分析了 PAEs 对土壤中细菌多样性的影响.

1 材料与方法

1.1 材料

新鲜土壤取自济南市百花公园无污染土壤,经风干、捻碎后过 60 目筛. 土壤的各项指标如下: 有机质 0.516 7%, 总氮 0.040 4%, 速溶 K 0.009%, 持水量 11%, pH 8.02.

DMP、DEP、DBP 和 DOP 均购自北京试剂厂,其他分子生物学试剂及生化试剂均购自宝生物工程(大连)有限公司, BIOLOG-ECO 微平板购自美国 Bio-Rad 公司.

1.2 土壤样品的处理

将 50 g 土壤样品分别按照某实际土样 PAEs 污染样品^[5]的 1、10 和 100 倍的量来处理土样,以未处理的土壤作为对照. 所有样品均在 25℃ 下培养 10 d, 然后同时研究其功能和遗传多样性.

1.3 BIOLOG-ECO 微平板分析

按照文献[20]报道的方法,将烘干的新鲜土壤加入到装有 100 mL 灭菌生理盐水(0.85%)的 250 mL 三角瓶中. 在旋涡振荡机上振荡 1 min 后,冰浴 1 min, 如此重复 3 次. 静置 5 min, 取 5 mL 上述土壤浸提液加入 45 mL 灭菌的生理盐水(0.85%)中稀释, 重复该步骤, 将稀释 1000 倍后的菌液加入 BIOLOG ECO 微平板中, 每孔加 150 μ L. 将接种的 BIOLOG ECO 微平板在 28℃ 恒温培养箱培养, 分别于 24、48、72、96、120、144、168、192 h 在 BIOLOG 微孔板读数仪上测定, 测定波长为 590 nm.

1.4 土壤样品的 DNA 的提取和 PCR-ARDRA

土壤中总 DNA 的提取采用 LrNIQ-10 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒(天泽基因公司). 将提取的基因组 DNA 作为 PCR 的模板, 采用 16S rDNA 的通

用引物对^[21] 11f 和 1 492 r, 扩增产物为 1 500 bp.

PCR 反应体系为: 10 ng 模板, 20 pmol 引物, 2 mmol/L dNTPs, 2.5 μ L 10 $\times$ buffer, *Taq* 酶 1.5 IU, 补 ddH₂O 到 25 μ L. PCR 反应条件为: 95℃ 预变性 5 min, 30 个循环为: 95℃ 1 min, 50℃ 1 min, 72℃ 2 min, 最后 72℃ 延伸 10 min.

ARDRA 采用的限制性内切酶为 *Rsa* I, 采用 2% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测分析.

1.5 数据统计分析方法

1.5.1 孔平均颜色变化率 AWCD

采用孔平均颜色变化率法(average well color evelopment, AWCD)测定土壤微生物利用单一碳源的能力^[22]. AWCD 的计算公式为:

$$AWCD = \sum (C_i - R) / 31$$

式中, C_i 为各反应孔在 590 nm 下的光密度值; R 为 ECO 板对照孔的光密度值; $C_i - R < 0$ 的孔, 计算中记为 0, 即: $C_i - R \geq 0$ ^[23]; 每种碳源反应孔的平均颜色变化率 $AWCD_i = C_i - R$, 代谢指纹图谱中的 $AWCD_i$ 值为 3 次重复平均值.

1.5.2 主成分分析

主成分分析应用 SPSS (Version10.0 for Windows) 软件的 Data Reduction 程序, 绘图应用 Excel 2003 软件.

1.5.3 群落 Shannon 指数(H')

$$H = - \sum P_i \times \ln P_i$$

式中, $P_i = (C_i - R) / \sum (C_i - R)$. BIOLOG 数据处理时, P_i 表示有碳源的孔与对照孔的光密度值之差与整板总差的比值. 微生物群落多样性指数采用 Shannon-Weaver 指数(H')表示:

$$H' = - \sum (n_i / N) \ln (n_i / N)$$

式中, N 为所有波峰的面积, n_i 为每个波峰的面积. H' 可以反映种群内及种群之间的遗传多样性分布和差异^[24].

1.5.4 Bray-Curtis 法聚类分析

用 Biodiversity 软件中的 Bray-Curtis 法进行聚类分析, 绘制树状图^[25].

2 结果与讨论

2.1 PAEs 对土壤微生物代谢多样性的影响

本实验采用 BIOLOG 微平板培养 192 h 的数据, 来进行微生物代谢多样性分析. 平均颜色变化率(AWCD)是反映土壤微生物活性, 作为微生物整体

活性的一个重要指标^[26]. 31 种碳源不同培养时间的 AWCD 值见图 1, 结果表明, 不同 PAEs 浓度对土壤微生物 AWCD 值的影响有明显差异. 4 种样品的 AWCD 值在 48 h 之前的数值都很小, 说明在 48 h 之内碳源基本未被利用; 培养 48 h 后 AWCD 值出现了明显变化, 反映出此后碳源被大幅度利用. 其中, 空白土壤的 AWCD 值急剧升高, 平均增长率最大, 为 0.093, 而且在整个育温过程中始终大于受试土壤; 随着所加 PAEs 浓度的增大, AWCD 值平均增长率逐渐减小, 分别为 0.044、0.023、0.013. 这表明 PAEs 的加入降低了土壤微生物的代谢活性, 投加量越多, 对微生物代谢活性的抑制作用越大. 这与杨永华等^[27]对农药污染土壤中的微生物群落的研究结果一致, 其研究显示, 农药污染导致了土壤中微生物代谢功能多样性的下降.

微生物对微平板上不同碳源利用能力的图被定义为 BIOLOG 代谢指纹图谱. 根据不同碳源利用的 $AWCD_i$ 值作图, 得到微生物群落代谢指纹图谱 (见图 2). 结果表明, 空白土壤微生物对 31 种碳源的利用程度远大于加入 PAEs 的 3 个土样样品. 其中, 在空白样代谢指纹图谱中 $AWCD_i \geq 0.3$ 的碳源空白有 18 种 (糖类 4 种, 羧基酸 5 种, 氨基酸类 4 种, 多聚物类 2 种, 多胺类 2 种, 其他 1 种) 占总碳源数的

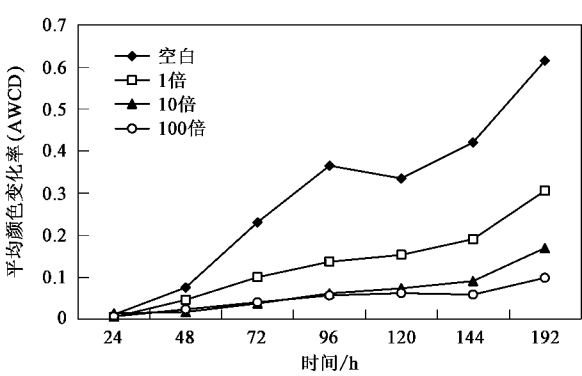
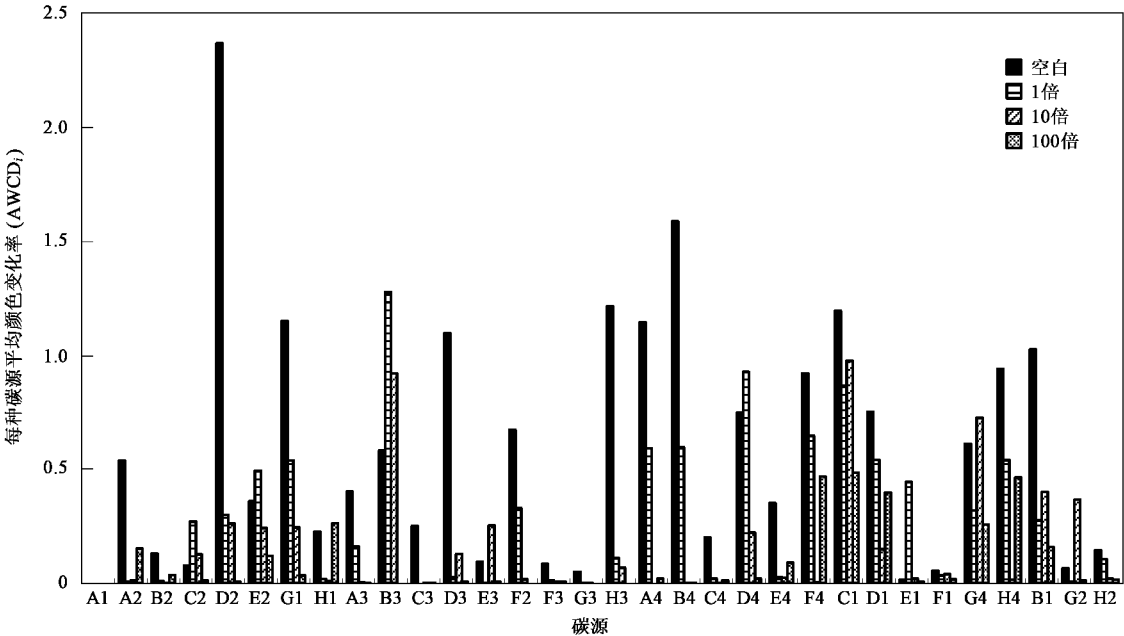


图 1 4 个浓度梯度平均颜色变化率
Fig.1 AWCD of four concentrations

58.1%, 而 1 倍浓度的有 13 种 (糖类 2 种, 羧酸类 2 种, 氨基酸类 4 种, 多聚物类 3 种, 多胺类 2 种) 占总碳源数的 41.9%, 10 倍浓度的有 5 种 (羧酸类 1 种, 多聚物类 1 种, 多胺类 1 种, 其他 2 种) 占总碳源数的 16.1%, 100 倍浓度的仅有 4 种 (氨基酸类 1 种, 多聚物类 2 种, 多胺类 1 种) 占总碳源数的 12.9%; 代谢指纹图谱中 $AWCD_i \geq 0.8$ 的碳源空白有 10 种 (糖类 2 种, 羧酸类 2 种, 氨基酸类 3 种, 多聚物类 1 种, 多胺类 1 种, 其他 1 种) 占总碳源数的 32.2%, 1 倍浓度的有 3 种 (羧酸类 1 种, 氨基酸类 1 种, 多聚物类 1 种) 占总碳源数的 9.7%, 10 倍浓度的有 2 种



A2 ~ H1: 糖类, A3 ~ H3: 羧酸类, A4 ~ F4: 氨基酸类, C1 ~ F1: 多聚物类, G4 ~ H4: 多胺类, B1 ~ H2: 其他;
A1, A2, B1 为 BIOLOG ECO 板中碳源的序列号, AWCD_i 值为 ECO 板上 3 次重复的平均值

图 2 生理碳代谢指纹图谱

Fig.2 Metabolic fingerprint of carbon level physiological profiles

(羧酸类 1 种,多聚物类 1 种) 占总碳源数的 6.5%, 100 倍浓度的为 0;代谢指纹图谱中 $AWCD_i \geq 1.0$ 的碳源空白有 8 种(糖类 2 种,羧酸类 2 种,氨基酸类 2 种,多聚物类 1 种,其他 1 种)占总碳源数的 25.8%, 1 倍浓度的只有 1 种(羧酸类 1 种)占总碳源数的 3.2%, 而 10 倍和 100 倍浓度的为 0.

由此可见,PAEs 浓度的增加,对碳源利用的影响也增大,空白样总体上代谢碳源的种类远大于受试样,对同类碳源的代谢空白的 $AWCD_i$ 比受试样均高出 2 倍多.中浓度和高浓度 PAEs 对糖类和羧基酸类碳源的利用影响较大. 4 种样品中微生物群落生理代谢活性和碳代谢类群表现出明显差异,形成了各自独特的微生物类群.空白和低浓度土壤微生物以糖类和羧酸类代谢群为优势类群,而中浓度和高浓度土壤微生物以多胺类代谢群为优势类群.

对培养 192 h 的数据进行微生物群落功能主成分分析(PCA),结果表明,31 个主成分因子中前 9 个的方差贡献率分别为 36.62%、14.10%、12.10%、8.75%、7.84%、6.72%、4.42%、3.67% 和 3.51%,累积方差贡献率达到 96.72%(表 1).

表 1 主成分特征根			
Table 1 Principal components characteristic vector			
项目	特征根	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
PC1	11.04	35.62	35.62
PC2	4.37	14.10	49.72
PC3	3.75	12.10	61.82
PC4	2.71	8.75	70.57
PC5	2.43	7.84	78.41
PC6	2.08	6.72	85.12
PC7	1.37	4.42	89.54
PC8	1.14	3.67	93.21
PC9	1.09	3.51	96.72

提取可以聚集单一碳源变量的数据变异(累积方差贡献率)为 49.72% 的前 2 个主成分 PC1 和 PC2 (特征根分别为 11.04 和 4.37)来分析微生物群落功能多样性.由 192 h 主成分分析因子载荷图(见图 3)可见,4 种土壤样品在主成分坐标体系中分布差异十分明显,其中 PC1 就可以很好地区分开 4 种样品.

考察相关性矩阵可知对 PC1 和 PC2 贡献的特征向量系数 > 0.50 的碳源类型(表 2),对 PC1 贡献大的碳源有 18 种,其中糖类占 16.7%,羧酸类占 38.9%,氨基酸类占 22.2%,因此影响 PC1 的主要为羧酸类,其次是氨基酸类和糖类,对 PC2 贡献大的碳源仅有 4 种.

相关性分析表明,与 PC1 正相关程度较高的碳

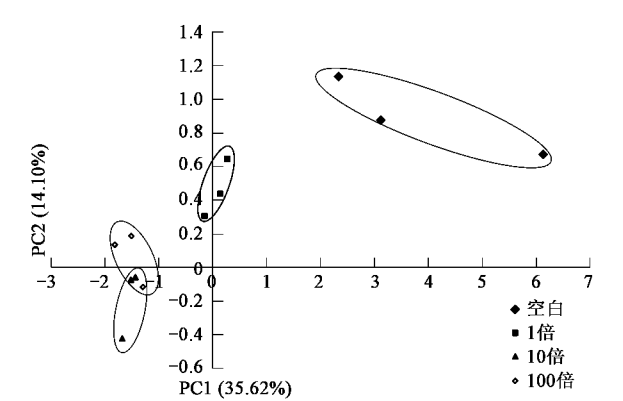


图 3 192 h 主成分分析因子载荷

Fig. 3 Loadings of principal component analysis after 192 h cultivation

源有 L-天冬酰胺酸、4-羟基苯甲酸和 D-苹果酸,负相关的碳源有 D-半乳糖醛酸、*i*-赤藻糖醇、 γ -羟基丁酸和 1-磷酸葡萄糖.结果表明,4 种样品中土壤微生物在这些碳源的利用能力上有差异,也可能是由于加入了不同浓度的 PAEs,使得代谢这些碳源的微生物群落产生了差异.

表 2 前 2 个主成分贡献的特征向量 ≥ 0.50 的碳源数目		
Table 2 Numbers of C sources with loadings ≥ 0.50 grouped		
碳源	PC1	PC2
糖类	3	1
羧基酸	7	1
氨基酸类	4	0
多聚物类	1	1
多胺类	1	0
其他	2	1
合计	18	4

4 种处理土壤的微生物群落代谢多样性类型的比较结果,可以提供不同处理对土壤微生物群落影响的信息.由图 3 可以看出,经过处理的土壤在 PCA1 轴上的得分值较低,与空白土壤的得分差别较大,说明 PAEs 对土壤微生物碳源利用的影响较大,这可能是微生物生长受到了抑制导致的结果,并且 PAEs 浓度越大,微生物受到的抑制作用越强.

2.2 PAEs 对土壤微生物遗传多样性的影响

土壤中微生物限制酶多态性分析见图 4,从中可以看出,4 种处理土壤微生物的 16S rDNA 片段对内切酶均有多个切点,并经重复实验可获得稳定的酶切图谱.随 PAEs 投加量增大而条带增多的趋势,说明 PAEs 的投加刺激了土壤中某些特异菌种的出现,使群落遗传多样性发生变化.

以 Shannon-Weaver 公式计算 4 个浓度梯度的土壤微生物的酶切条带多样性指数如图 5 所示,结果

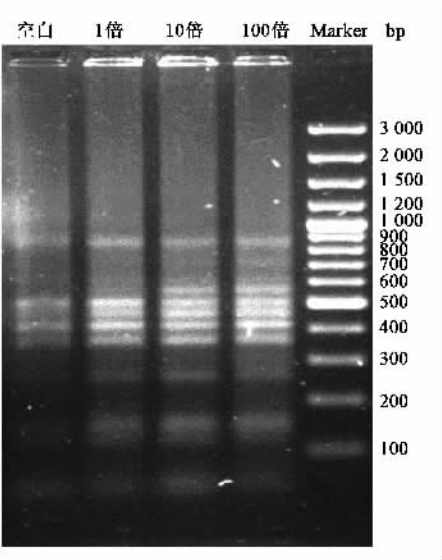


图 4 各处理土壤 16S rDNA ARDRA 分析

Fig.4 ARDRA fingerprints of soil microbes

表明,多样性指数 H' 随着 PAEs 浓度的增加而增大,这与重金属对土壤微生物多样性的影响不同^[7].将限制酶多态性分析的带形进行统计分析,结果如图 6 所示,对树状图进行截取,相似性取 50%.结果表明,投加 PAEs 后,低浓度(b)、中等浓度(c)和高浓度(d)土样中微生物菌群相似性 > 50%,但与空白(a)相似性较低,4 个系统的微生物菌群可区分为两大类.因此,PAEs 在短时间内会增加土壤微生物的代谢活性,但能增加微生物的遗传多样性.

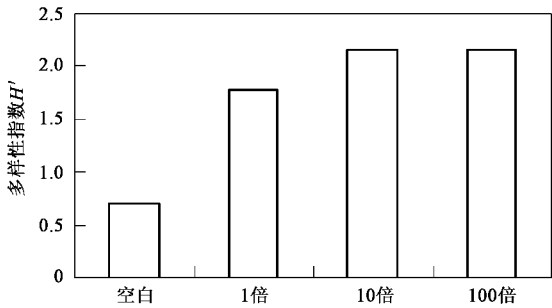


图 5 土壤微生物多样性指数

Fig.5 Soil microbial diversity index

3 结论

通过 BIOLOG 和 ARDRA 这 2 种方法研究了 PAEs 对土壤中微生物代谢和遗传多样性的影响. BIOLOG 结果表明不同浓度 PAEs 处理的土壤的 AWCD 值随时间增加的幅度不同,PAEs 浓度越高、AWCD 值增幅越小,平均增长率由 0.093 降为

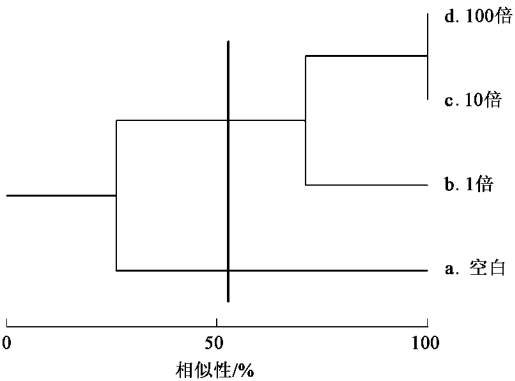


图 6 土壤微生物酶切带型的聚类分析

Fig.6 Dendrogram derived from ARDRA fingerprint

0.013. 主成分分析也显示碳代谢类型出现差异,空白和低浓度土壤微生物以糖类和羧酸类代谢群为优势类群,而中浓度和高浓度土壤微生物以多胺类代谢群为优势类群. ARDRA 分析结果表明不同样品多样性指数 H' 随着 PAEs 浓度的增加而增大,聚类分析表明低浓度(b)、中等浓度(c)和高浓度(d)土样中微生物菌群相似性 > 50%,但与空白(a)相似性较低,4 个系统的微生物菌群可区分为两大类. 因此,PAEs 在短时间内会增加土壤微生物的代谢活性,但能增加微生物的遗传多样性.

参考文献:

[1] 吴杰民. 聚烯烃类农膜及酞酸酯类(PAEs)在环境中的残留及生物降解前景[J]. 环境科学, 1994, 15 (2): 77-80.

[2] Prokupková G, Holadová K, Poustka J, *et al.* Development of a solid-phase microextraction method for the determination of phthalic acid esters in water [J]. Anal Chim Acta, 2002, 457: 211-223.

[3] Polo M, Llompart M, Garcia-Jares C, *et al.* Multivariate optimization of a solid-phase microextraction method for the analysis of phthalate esters in environmental waters[J]. J Chromatogr A, 2005, 1072: 63-72.

[4] Wang L, Cai Y, He B, *et al.* Cloud point extraction coupled with HPLC-UV for the determination of phthalate esters in environmental water samples [J]. J Environ Sci, 2007, 19 (7): 874-878.

[5] 莫测辉, 蔡全英, 吴启堂, 等. 我国城市污泥中邻苯二甲酸脂的研究[J]. 中国环境科学, 2001, 21(4): 362-366.

[6] Zeng F, Cui K, Xie Z, *et al.* Phthalate esters (PAEs): Emerging organic contaminants in agricultural soils in peri-urban areas around Guangzhou, China [J]. Environ Pollut, 2008, 156(2):425-434.

[7] Matsumoto M, Hirata-Koizumi M, Ema M, *et al.* Potential adverse effects of phthalic acid esters on human health: A review of recent studies on reproduction [J]. Regul Toxicol Pharm, 2008, 50 (1): 37-49.

[8] Chang B V, Wang T H, Yuan S Y. Biodegradation of four phthalate esters in sludge[J]. Chemosphere, 2007, 69(7):1116-1123.

[9] 滕应, 黄昌勇. 重金属污染对土壤的微生物生态效应及其修复研究进展[J]. 土壤与环境, 2002, **11**(1): 85-89.

[10] Bossio D A, Scow K M. Impact of carbon and flooding on the metabolic diversity of microbial communities in soils [J]. Appl Environ Microbiol, 1995, **61**: 4043-4050.

[11] He R, Ruan A, Jiang C, *et al.* Responses of oxidation rate and microbial communities to methane in simulated landfill cover soil microcosms [J]. Bioresour Technol, 2008, **99** (15): 7192-7199.

[12] 魏利, 马放, 王欣宇, 等. 基于 16S rDNA 不同靶序列对厌氧 ABR 反应器微生物多样性分析的影响[J]. 环境科学, 2008, **29**(3): 776-780.

[13] Preston-Mafham J, Boddy L, Randerson P F. Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source utilization profiles-a critique [J]. FEMS Microb Ecol, 2002, **42**: 1-14.

[14] 郑华, 陈法霖, 欧阳志云, 等. 不同森林土壤微生物群落对 BIOLOG-GN 板碳源的利用[J]. 环境科学, 2007, **28**(5): 1126-1130.

[15] 姚槐应, 何振立, 黄昌勇. 不同土地利用方式对红壤微生物多样性的影响[J]. 水土保持学报, 2003, **17** (2): 51-54.

[16] Cederlund H, Thierfelder T, Stenström J. Functional microbial diversity of the railway track bed [J]. Sci Total Environ, 2008, **397**: 205-214.

[17] 董慧明, 张颖, 张德民, 等. DNA 指纹图谱技术在土壤微生物多样性研究中的应用[J]. 微生物学杂志, 2007, **27** (1): 45-49.

[18] Qvrees L, Torsvik V. Microbial Diversity and Community Structure in Two Different Agricultural Soil Communities [J]. Microbiol Ecol, 1998, **36**: 303-315.

[19] 张于光, 王慧敏, 李迪强, 等. 三江源地区不同植被土壤固氮微生物的群落结构研究[J]. 微生物学报, 2005, **45**(3): 420-425.

[20] Chen J, Zhuang X, Xie H, *et al.* Associated impact of inorganic fertilizers and pesticides on microbial communities in soils [J]. World J Microbiol and Biotechnol, 2007, **23**: 23-29.

[21] Smit E, Leeflang P, Wemars K. Detection of shifts in microbial community structure and diversity in soil caused by copper contamination using amplified ribosomal DNA restriction analysis [J]. FEMS Microbiol Ecol, 1997, **23**: 249-261.

[22] Zak J C, Willig M R, Moorhead D L, *et al.* Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach [J]. Soil Biol Biochem, 1994, **26**: 1101-1108.

[23] Selman P C, Hart S C, Boyle S I, *et al.* Red alder (*Alnus rubra*) alters community-level soil microbial function in conifer forests of the Pacific Northwest, USA [J]. Soil Biol Biochem, 2005, **37** (10): 1860-1868.

[24] Yang Y H, Yao J, Hua X M. Effect of pesticide pollution against functional microbial diversity in soil [J]. J Microbiol, 2000, **20** (2): 23-25.

[25] Bray J R, Curtis J T. An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin [J]. Ecol Monogr, 1975, **27**: 325-349.

[26] Xu H, Xiao R, Zhu D, *et al.* Effect of long term fertilization on functional diversity of soil microbial community of the tea plantation [J]. Acta Ecologica Sinica, 2007, **27**(8): 3355-3361.

[27] 杨永华, 姚健. 农药污染对土壤微生物群落功能多样性的影响[J]. 微生物学杂志, 2000, **20**(2): 23-25.