

DOI:10.19853/j.zgjsps.1000-4602.2022.11.016

基于eDNA技术的河湖水生生物群落结构特征解析

周佳莹^{1,2,3}, 耿世伟⁴, 郑博洋^{1,2,3}, 李海笑^{1,2,3}, 王乃丽⁵, 卢学强^{1,2,3}

(1. 南开大学 环境科学与工程学院, 天津 300350; 2. 天津市跨介质复合污染环境治理技术重点实验室, 天津 300350; 3. 天津市环境生物地球化学循环调控技术国际联合研究中心, 天津 300350; 4. 天津经济技术开发区生态环境局, 天津 300450; 5. 天津市环科检测技术有限公司, 天津 300191)

摘要: 基于eDNA技术对天津市9个河湖水体的水生生物群落结构及其影响因子进行了分析,结果表明,原核生物优势类群为蓝藻门(*Cyanophyta*)、放线菌门(*Actinobacteria*)、变形菌门(*Proteobacteria*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*);真核生物优势类群为淡色藻门(*Ochrophyta*)、纤毛虫(*Ciliophora*)、丝足虫(*Cercozoa*)。市外河道的蓝藻水华问题最严重且原核生物多样性显著低于其他水体,市内景观水体的水质较好且真核生物多样性显著高于其他水体。地理位置、盐度和化学污染是影响水体生物群落结构的主要环境因子,同类型水体的原核生物群落结构相似,而盐度和水质是影响水生生物群落结构的最关键因素。研究结果还表明,eDNA技术具有高效、物种覆盖度高等特点,可用于大范围生物监测。

关键词: 水生态系统; eDNA; 群落结构; 生物多样性; 天津

中图分类号: TU992 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4602(2022)11-0091-07

Analysis of Aquatic Biological Community Composition in Rivers and Lakes Based on eDNA Technology

ZHOU Jia-ying^{1,2,3}, GENG Shi-wei⁴, ZHENG Bo-yang^{1,2,3}, LI Hai-xiao^{1,2,3},
WANG Nai-li⁵, LU Xue-qiang^{1,2,3}

(1. College of Environmental Science and Engineering, Nankai University, Tianjin 300350, China; 2. Tianjin Key Laboratory of Environmental Technology for Complex Trans-Media Pollution, Tianjin 300350, China; 3. Tianjin International Joint Research Center for Environmental Biogeochemical Technology, Tianjin 300350, China; 4. Ecology and Environment Bureau of Tianjin Economic-Technological Development Area, Tianjin 300450, China; 5. Tianjin Huanke Environmental Test Company, Tianjin 300191, China)

Abstract: The eDNA technology was applied to analyze the aquatic biological community composition and influencing factors in nine rivers and lakes in Tianjin. The dominant prokaryotes were *Cyanophyta*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* and *Bacteroidetes*, and the dominant eukaryotes were *Ochrophyta*, *Ciliophora* and *Cercozoa*. The problem of cyanobacteria bloom was the most serious in rivers

基金项目: 天津市科技计划项目(20YDTPJC01440、21YFNSNS00220); 国家水体污染控制与治理科技重大专项(2018ZX07110-007)

通信作者: 卢学强 E-mail: luxq@nankai.edu.cn

outsides the city, and the prokaryotic biodiversity was significantly lower than that of other water bodies. The water quality of urban landscape water was better, and the eukaryotic biodiversity was significantly higher than that of other water bodies. Geographical location, salinity and chemical pollution were the main environmental factors affecting the biological community composition of water bodies. The community composition of prokaryotes in the same type of water bodies was similar to each other. Salinity and water quality were the most important factors affecting the aquatic biological community composition. eDNA technology has the characteristics of high efficiency and high species coverage, which can be used for large-scale biological monitoring.

Key words: aquatic ecosystem; eDNA; community composition; biodiversity; Tianjin

水生态系统为人类提供各种资源和服务,水生生物指标可以反映水生态系统的状态,对水生生物群落结构的监测和评估,是对水生态系统进行有效管理和保护的基础^[1]。传统的生物群落结构研究多基于人工物种形态学鉴别,调查结果对人为依赖性强,往往群落的物种覆盖度较低。eDNA技术,是指从水体、沉积物、空气等环境介质中提取生物遗留的DNA,通过聚合酶链式反应(PCR)、高通量测序(HTS)和生物信息学分析,高效分析水生态系统中目标种或整个群落组成的一种方法^[2]。与基于物种形态学鉴定的传统方法相比,eDNA技术具有人为影响小、物种覆盖度高等特点。鉴于此,笔者尝试利用eDNA技术对天津市典型河湖水生态系统进行探究。天津市位于海河流域下游,水系众多,也是陆海交汇的生态脆弱带和生态敏感带,生态学价值和意义突出。在研究中,选择天津市不同位置的9个河湖水体,对其生物群落结构特征及主要环境影响因子进行了解析。本研究不仅有助于加强对北方滨海地区水生态系统特征的了解,还可为建立基于eDNA技术的快速水生生物多样性监测提供案例支撑。

1 材料与方法

1.1 样品采集

选择天津市的4类共9个河湖(见图1)进行样品采集。①市外河道:独流减河上游(R1)、中游(R2)和下游(R3);②保护区内湖库:团泊洼水库(L1)、天鹅湖(L2)、北大港水库(L3);③校内景观水体:马蹄湖(L4)、东北角湿地(L5)、新开湖(L7);④市内景观河湖:津河(R4)、水上公园(L6)。其中,独流减河始建于1953年,为市外人工河道,全长67 km。团泊洼水库属于天津市自然保护区,是一座大

型平原水库,水域面积为5 100 hm²。天鹅湖位于独流减河的宽河槽湿地,原为鱼类养殖场,属于湿地自然保护区,面积为620 hm²,盐度较高、富营养化严重。北大港水库属于天津市自然保护区,面积为34 900 hm²,为备用水源地。马蹄湖与东北角湿地位于南开大学津南校区,前者为校内小型人工景观湖,面积为1.1 hm²,后者为再生水补给的小型湿地,面积为9.1 hm²。新开湖位于南开大学八里台校区,为建成时间较长的校内小型人工景观湖,面积为1.2 hm²。水上公园建于1950年,为大型市内景观湖,面积为12 500 hm²。津河为天津市内景观河道。

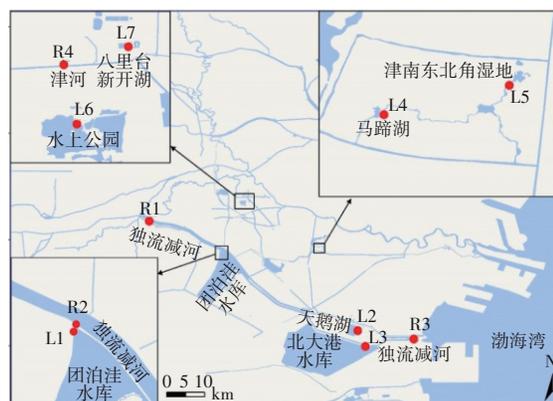


图1 采样点布置

Fig.1 Sampling sites

样品采集于2019年11月16日—20日,用采水器采集表层水样3~4 L,用无菌玻璃瓶保存,冰上冷藏带回实验室进行后续分析。

1.2 水样预处理及理化指标测定方法

采用无菌玻璃砂芯过滤装置和0.45 μm水系滤膜负压抽滤水样,收集携带生物遗传信息的细胞和组织等物质于滤膜上,回收滤膜于50 mL无菌离心管中,在-20℃冰箱中贮存至eDNA提取^[2]。使用盐

度计、pH计分别测定盐度和pH;采用高锰酸盐法测定 COD_{Mn} ;采用碱性过硫酸钾消解-紫外分光光度法测定总氮;采用钼酸铵分光光度法测定总磷。

1.3 DNA抽提、PCR扩增和高通量测序

用FastDNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals)提取eDNA,使用1%的琼脂糖凝胶电泳检测DNA的提取质量,使用NanoDrop2000测定DNA浓度及纯度。使用原核生物通用引物338F和806R以及真核生物通用引物573F和951R,分别对原核生物16S rRNA基因V3-V4可变区及真核生物18S rRNA基因V4可变区进行扩增^[3-4]。使用PCR仪(ABI GeneAmp® 9700)进行扩增,扩增程序设定为:95℃预变性3 min;95℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸30 s(27个循环);然后72℃稳定延伸10 min^[4]。将同样本的PCR产物混合后进行回收纯化、检测和定量,所有纯化后的PCR产物均匀混合用于后续测序。使用NEXTFLEX Rapid DNA-Seq Kit对PCR产物进行文库构建,利用Illumina公司的MiSeq PE300平台进行测序^[3](上海美吉生物医药科技有限公司)。

1.4 统计分析方法

采用Trimmomatic (V0.35)软件对原始序列进行过滤处理,采用FLASH (V1.2.11)软件进行拼接,采用UPARSE (V7.0)软件去除嵌合体,根据97%相似度对序列进行OTU(分类操作单元)聚类^[5]。利用RDP (V11.5)分类器,比对Silva数据库(SSU132),对每条序列进行物种分类注释,设置比对阈值为0.7,得到OTU的物种分类学信息^[6]。基于Mothur (V1.30.2)软件分析计算Shannon指数、覆盖度Coverage等;基于R语言进行主坐标分析(PCoA)、冗余分析(RDA)和Spearman相关性分析,分析不同水体之间的 β 多样性以及环境因子与优势类群间的相关性。

2 结果与讨论

2.1 水体理化指标

9个水体的理化指标如表1所示。可知,各采样点的pH呈弱碱性(8.20~8.90)。大部分采样点盐度在0.35%~0.51%,但沿海采样点盐度较高,如:天鹅湖为2.65%、独流减河下游为1.05%、北大港水库为0.99%。天鹅湖(L2)水质最差,属于劣V类水体,市外河道(R1~R3)水质一般,属于V类水体。而

校内景观水体的水质可以达到地表水IV类水质标准,市内景观水体的水质最好,可以达到地表水III类水质标准。

表1 天津市9个水体的理化指标

Tab.1 Water quality for nine water bodies in Tianjin

项目	pH	盐度/ %	TN/ ($mg \cdot L^{-1}$)	TP/ ($mg \cdot L^{-1}$)	COD_{Mn} / ($mg \cdot L^{-1}$)
独流减河上游(R1)	8.22	0.35	0.87	0.34	11.78
独流减河中游(R2)	8.20	0.35	0.56	0.30	7.74
独流减河下游(R3)	8.43	1.05	0.35	0.13	9.76
津河(R4)	8.24	0.49	0.36	0.03	1.63
团泊洼水库(L1)	8.11	0.51	0.21	0.05	7.14
天鹅湖(L2)	8.38	2.65	1.83	0.64	54.08
北大港水库(L3)	8.49	0.99	0.48	0.06	11.62
马蹄湖(L4)	8.22	0.51	0.33	0.07	7.49
东北角湿地(L5)	8.20	0.41	0.38	0.08	9.63
水上公园(L6)	8.90	0.39	0.23	0.05	6.11
新开湖(L7)	8.78	0.49	0.78	0.09	6.37

2.2 生物群落解析

通过高通量测序共得到原核生物16S rRNA的有效序列数568 394条,序列平均长度为411,聚类得到1 340个OTU,共注释37门73纲200目354科624属915种;得到真核生物18S rRNA的有效序列数251 961条,序列平均长度为344,聚类得到734个OTU,共注释42门88纲126目143科257属411种。各样本文库的覆盖度都在99%以上,表明测序结果能够代表采样点生物群落的真实情况。

2.2.1 原核生物群落解析

原核生物属水平上的分析结果如图2所示。市外河道(R1~R3)的优势属为浮丝藻(*Planktothrix_NIVA-CYA_15*),该属同时也是校内景观水体(L4、L5、L7)的优势属,是蓝藻水华的常见属。市内景观河湖(R4、L6)的优势属为*hgcl_clade*,且该属与*CL500-29_marine_group*在除天鹅湖(L2)外的所有水体中广泛存在,王鹏等人^[7]研究表明,这两种属经常共同出现在含有蓝藻的环境中。天鹅湖的盐度过高,其原核生物群落以能适应高盐环境的微生物群落为主,Zhong等人^[8]研究表明,天鹅湖的优势属*Marivita*生长的最适宜盐度范围为2%~3%。

市外河道(R1~R3)的优势属主要属于蓝藻门(*Cyanophyta*),这与市外河道较高的氮、磷浓度相关。保护区内富营养化问题最严重的天鹅湖(L2)

的主要生物类群为变形菌门(*Proteobacteria*), 薛银刚等^[9]发现 *Proteobacteria* 对水体中有机质的代谢能力较强, 因而常成为富营养水体尤其是养殖水体中的优势菌。水质较好的市内景观河湖(R4、L6)的优

势生物为放线菌门(*Actinobacteria*), 这与 Pernthaler 等^[10]的研究结果类似。 *Actinobacteria* 体积较小, 能更好地躲避水体中原生动物的捕食, 因而常成为水质较好的缓滞流水体中的优势菌。

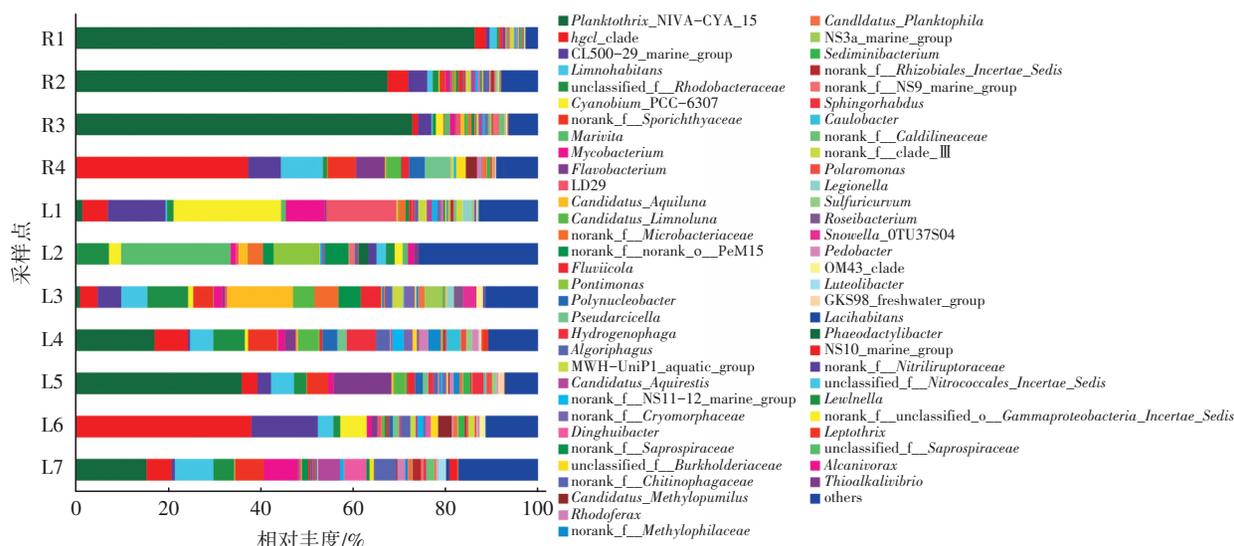


图2 原核生物属水平上的群落结构

Fig.2 Community structure of prokaryotes at genus level

2.2.2 真核生物群落解析

不同区域水体中真核生物群落结构在属水平上的差异较大(见图3)。其中, 天鹅湖(L2)与东北角湿地(L5)的优势属 *Diacronema*、黄群藻(*Synura*)的相对丰度均大于60%, 但在其他水体中未检出或者丰度极低; 异毛纲(*Heterotrichea*)仅存在于校内景观水体中。丰度较高且分布广泛的藻类有金色藻(*Chrysochromulina*)、硅藻(*Mediophyceae*)、A31、柄钟

藻(*Pedinellales*); 浮游动物有筒壳虫(*Tintinnidium*)、散毛亚纲(*Choreotrichia*)、刺激隐核虫(*Cryptocaryon*)、轮虫(*Ploimida*)及哲水蚤(*Calanoida*)。

不同区域水体中的真核生物群落结构在门水平上相似度较高。除天鹅湖外的其余水体主要以淡色藻门(*Ochrophyta*)、纤毛虫(*Ciliophora*)、丝足虫(*Cercozoa*)为优势门类。而天鹅湖的优势门类为滨海地区耐污种 *Pavlovophyceae*^[11]。

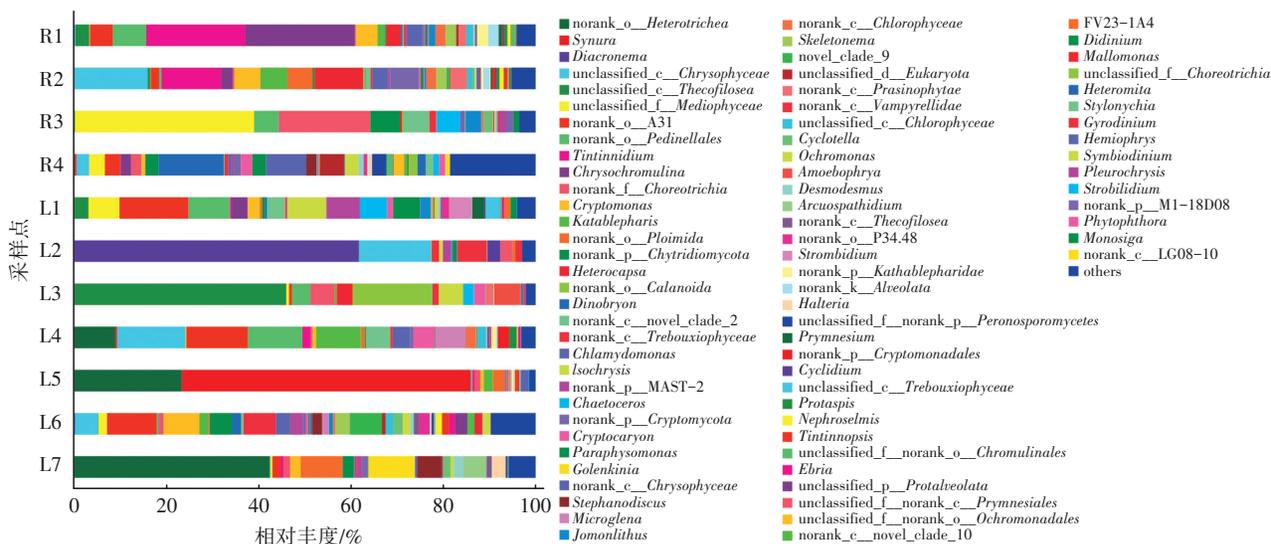


图3 真核生物在属水平上的群落结构

Fig.3 Community structure of eukaryote at genus level

2.3 生物多样性分析

2.3.1 α 生物多样性

采用Shannon指数和Rank-abundance曲线表征水生生物物种丰富度和群落均匀度,如图4所示。从图4(a)可以看出,市外河道的原核生物多样性(Shannon指数为 1.65 ± 0.34)显著低于其他类型水体($P < 0.05$),物种丰富度较低且群落组成较不均匀。这可能是因为市外河道中的蓝藻丰度过高,抢占了其他原核生物生长繁殖的空间和营养盐,导致群落丰富度和均匀度降低。其余采样点的原核生物Shannon指数均大于3.5,表明原核生物群落结构较稳定。由图4(b)可知,市内景观河湖的真核生物多样性(Shannon指数= 4.47 ± 0.18)显著高于其他类型水体($P < 0.05$),物种丰富度最高且物种分布最均匀,这可能与近年来建成区黑臭水体治理有关。

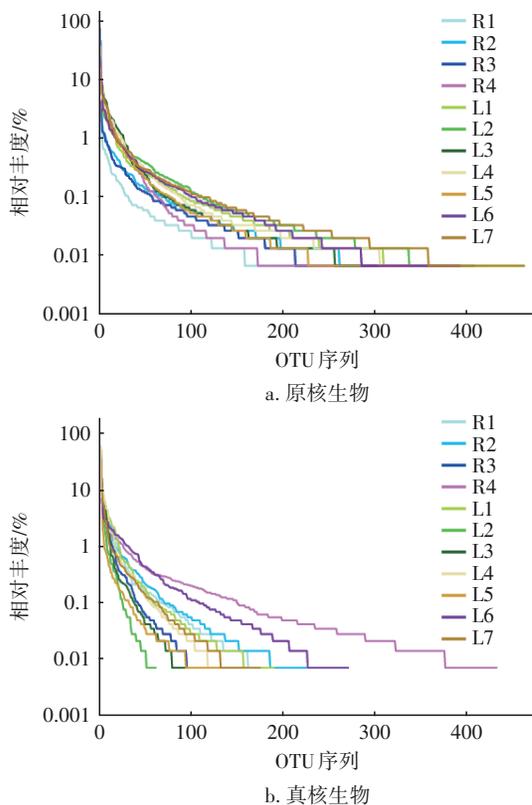


图4 Rank-abundance 曲线

Fig.4 Rank-abundance curve

2.3.2 β 生物多样性

基于Weighted UniFrac距离算法进行主坐标分析,表征水生生物群落结构差异,结果见图5。可知,同类水体的原核生物群落结构相似($PC1+PC2 > 70%$),但真核生物群落结构存在明显差异($PC1+$

$PC2 < 50%$)。可能的原因是:①真核生物个体更大,在水体中不容易发生迁移,导致不同采样点的真核生物群落结构差异较大;②原核生物对水生态系统中物质转化和能量流动起着重要作用,同类水体生态功能更一致,因此原核生物群落结构更相似。

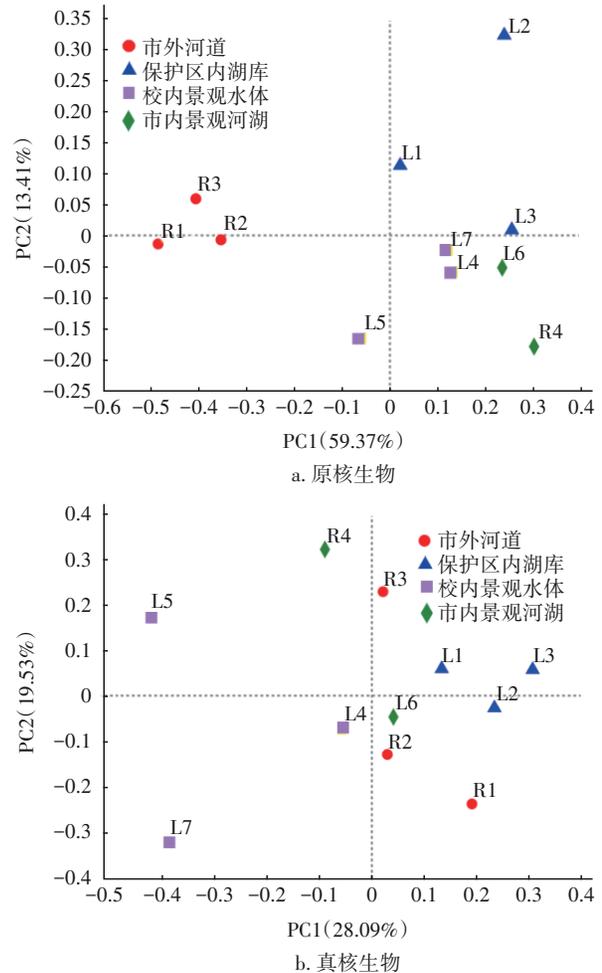


图5 生物群落结构的Weighted UniFrac加权主坐标分析

Fig.5 Weighted UniFrac principal coordinate analysis of biological community structure

2.4 生物群落结构与环境因子关联分析

在门水平上,将主要的生物类群与环境因子进行冗余分析,结果见图6。可知,环境因子共解释原核生物群落变异的61.26%,解释真核生物群落变异的46.79%,表明环境因子对原核生物群落组成的影响更大。由图6(a)可知,*Cyanophyta*与TP呈正相关,与TN、 COD_{Mn} 、pH和盐度呈负相关;*Proteobacteria*与环境因子之间主要呈正相关;*Actinobacteria*与pH呈正相关,与TP呈负相关。由图6(b)可知,*Ochrophyta*与pH、 COD_{Mn} 、TP、TN和盐度呈负相关;*Ciliophora*

与 COD_{Mn} 、TP、TN 和盐度呈负相关,与 pH 呈正相关;
Cercozoa 与环境因子的相关性较小。由于天鹅湖 (L2) 的水质差, TN、TP、 COD_{Mn} 和盐度都较高,但天鹅湖与其他样点的群落结构存在显著差异,这可能是导致图 6(b) 中环境因子与真核生物类群主要呈负相关,且相关性较弱的原因之一。

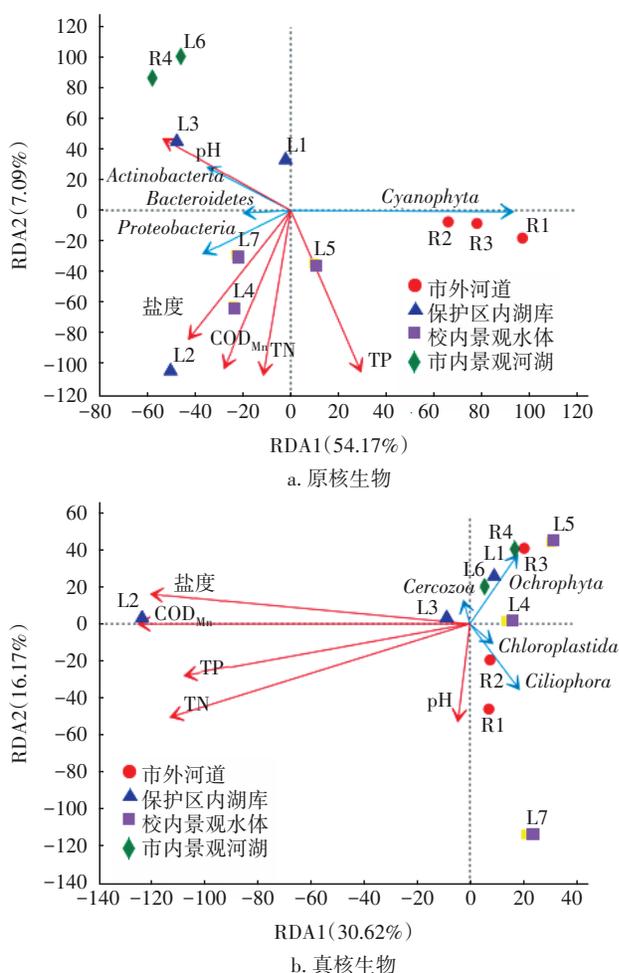


图 6 生物群落与环境因子之间的冗余分析

Fig.6 Redundancy analysis of biological community and aquatic environmental parameters

进一步在属水平上将总丰度前 50 的优势类群与环境因子进行 Spearman 相关性分析,结果如图 7 所示 (“*”表示 $0.01 < P \leq 0.05$, “**”表示 $0.001 < P \leq 0.01$, “***”表示 $P \leq 0.001$)。优势类群受盐度和 COD_{Mn} 的影响最大,其次是 TN 和 TP,而 pH 的影响最小。原核生物中,放线菌和拟杆菌与盐度呈显著正相关,主要分布在天鹅湖以及入海口,而 *hgcl_clade* 和 *CL500-29_marine_group* 与 TN、TP、 COD_{Mn} 呈显著负相关,主要分布在水质较好的室内景观水体。真

核生物如金藻、硅藻、绿藻以及原生动物等与高盐度、水体氮磷污染及有机污染呈现显著负相关。显然,盐度和水质污染是影响本地区水体中群落结构的关键要素, Xie 等^[12] 的研究也表明盐度是主导水生生物群落结构变化的主要自然因素,此外还受有机污染等人为因素影响。

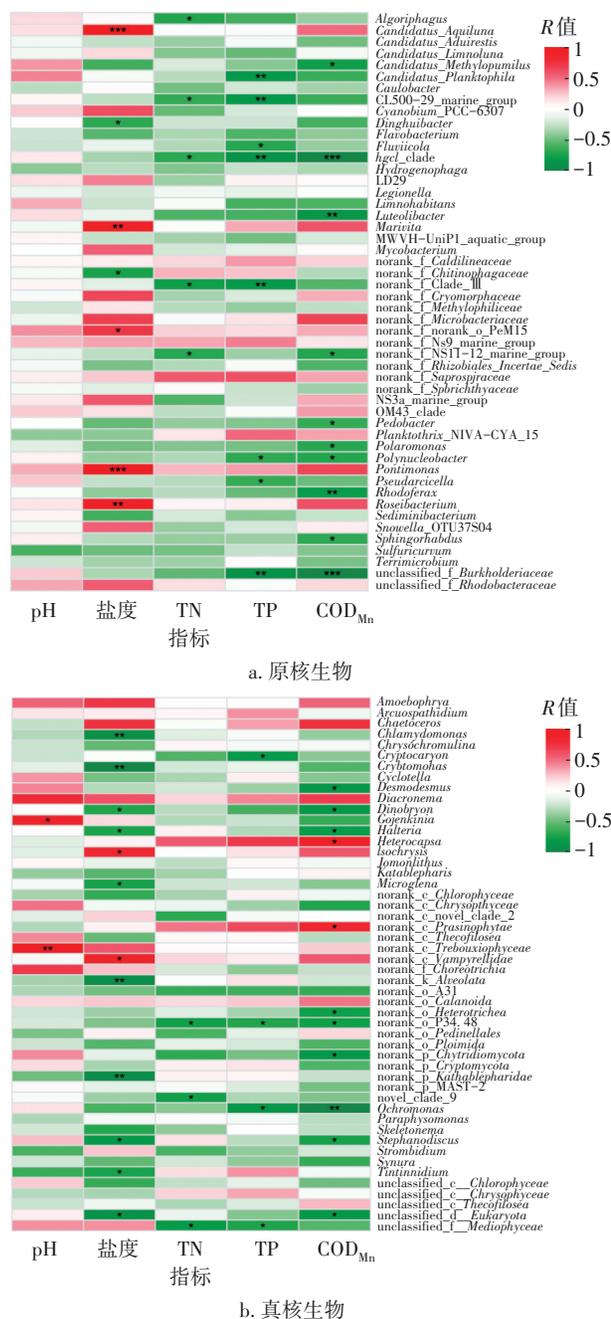


图 7 原核生物/真核生物优势类群与环境因子的 Spearman 相关性分析

Fig.7 Spearman correlation analysis between the dominant prokaryotes/eukaryotes groups and environmental factors

3 结论

基于eDNA技术对天津市9个典型河湖水体的生物群落结构进行了解析,共注释原核生物37门73纲200目354科624属915种,注释真核生物42门88纲126目143科257属411种,实现了从细菌到藻类再到浮游动物的水生生物检测。由于eDNA技术具有引物依赖性,研究注释结果主要集中在细菌、藻类以及浮游生物等微小水生生物类群,但与传统方法相比,基于eDNA技术的水生生物监测方法显著提高了检测物种数量,能够更加全面地反映水生生物群落结构与生物多样性特征,同时该方法还具有检测效率高、人为干扰小等特点,是一个具有良好应用前景的新型生物监测技术。此外还发现,地理位置、水体类型、栖息地环境、化学污染、盐度等因素都会影响水体的生物群落结构。

参考文献:

- [1] 李飞龙, 杨江华, 杨雅楠, 等. 环境DNA宏条形码监测水生生态系统变化与健康状态[J]. 中国环境监测, 2018, 34(6): 37-46.
- LI Feilong, YANG Jianghua, YANG Yanan, *et al.* Using environmental DNA metabarcoding to monitor the changes and health status of aquatic ecosystems [J]. Environmental Monitoring in China, 2018, 34(6): 37-46 (in Chinese).
- [2] RUPPERT K M, KLINE R J, RAHMAN M S. Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: a systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA [J]. Global Ecology and Conservation, 2019, 17: e00547.
- [3] FADROSH D W, MA B, GAJER P, *et al.* An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform [J]. Microbiome, 2014, 2(1): 6.
- [4] STAT M, HUGGETT M J, BERNASCONI R, *et al.* Ecosystem biomonitoring with eDNA: metabarcoding across the tree of life in a tropical marine environment [J]. Scientific Reports, 2017, 7: 12240.
- [5] YANG J H, JEPPE K, PETTIGROVE V, *et al.* Environmental DNA metabarcoding supporting community assessment of environmental stressors in a field-based sediment microcosm study [J]. Environmental Science & Technology, 2018, 52(24): 14469-14479.
- [6] QUAST C, PRUESSE E, YILMAZ P, *et al.* The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools [J]. Nucleic Acids Research, 2013, 41(D1): D590-D596.
- [7] 王鹏, 陈波, 李传琼, 等. 赣江南昌段丰水期细菌群落特征[J]. 中国环境科学, 2016, 36(8): 2453-2462.
- WANG Peng, CHEN Bo, LI Chuanqiong, *et al.* Bacterial communities in Nanchang section of the Ganjiang River in wet season [J]. China Environmental Science, 2016, 36(8): 2453-2462 (in Chinese).
- [8] ZHONG Z, HOU T, HONG C, *et al.* *Marivita lacus* sp. nov., isolated from a saline lake [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2015, 65: 1889-1894.
- [9] 薛银刚, 刘菲, 孙萌, 等. 太湖竺山湾春季浮游细菌群落结构及影响因素[J]. 环境科学, 2018, 39(3): 1151-1158.
- XUE Yingang, LIU Fei, SUN Meng, *et al.* Community structure and influencing factors of bacterioplankton in spring in Zhushan Bay, Lake Taihu [J]. Environmental Science, 2018, 39(3): 1151-1158 (in Chinese).
- [10] PERNTHALER J, POSCH T, SIMEK K, *et al.* Predator-specific enrichment of *Actinobacteria* from a cosmopolitan freshwater clade in mixed continuous culture [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(5): 2145-2155.
- [11] ZHANG X, YANG S, SUN J, *et al.* The first record of *Pavlova pinguis* (Pavlovophyceae, Haptophyta) in China seas [J]. Acta Oceanologica Sinica, 2018, 37(10): 28-32.
- [12] XIE Y, HONG S, KIM S, *et al.* Ecogenomic responses of benthic communities under multiple stressors along the marine and adjacent riverine areas of northern Bohai Sea, China [J]. Chemosphere, 2017, 172: 166-174.

作者简介:周佳莹(1996-),女,浙江宁波人,硕士研究生,主要研究方向为生态修复。

E-mail:zhoujiaying555@163.com

收稿日期:2021-01-11

修回日期:2021-03-07

(编辑:刘贵春)