

基于eDNA技术的白洋淀微型生物群落监测

陈家琪, 董丽, 麻晓梅, 田凯, 白洁, 赵彦伟

引用本文:

陈家琪, 董丽, 麻晓梅, 等. 基于eDNA技术的白洋淀微型生物群落监测[J]. 农业环境科学学报, 2021, 40(8): 1773–1786.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11654/jaes.2021-0632>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

白洋淀流域水文连通对浮游植物群落的影响

田艺苑, 杨薇, 刘强, 王烜, 赵彦伟

农业环境科学学报. 2021, 40(7): 1538–1547 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-1337>

白洋淀水环境风险受体脆弱性评价

王欢欢, 尹心安, 田凯, 刘世存, 赵彦伟, 孙家君

农业环境科学学报. 2020, 39(11): 2606–2612 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0554>

不同植物类型复合垂直流人工湿地根系微生物群落结构的研究

蒋旭瑶, 吉喜燕, 黄德英, 张继彪

农业环境科学学报. 2019, 38(1): 176–183 <https://doi.org/10.11654/jaes.2018-0250>

钝化材料对农田土壤Cd形态及微生物群落的影响

兰玉书, 袁林, 杨刚, 程蓉, 石楷岐, 高本汗

农业环境科学学报. 2020, 39(12): 2743–2751 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0637>

基于宏转录组研究蔬菜秸秆发酵体系细菌群落

丁建莉, 魏丹, 金梁, 李艳, 李樵, 吴凯

农业环境科学学报. 2020, 39(11): 2653–2660 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0269>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

陈家琪, 董丽, 麻晓梅, 等. 基于eDNA技术的白洋淀微型生物群落监测[J]. 农业环境科学学报, 2021, 40(8): 1773–1786.

CHEN J Q, DONG L, MA X M, et al. Microbial community monitoring in Baiyangdian Lake based on eDNA technology[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2021, 40(8): 1773–1786.



开放科学 OSID

基于eDNA技术的白洋淀微型生物群落监测

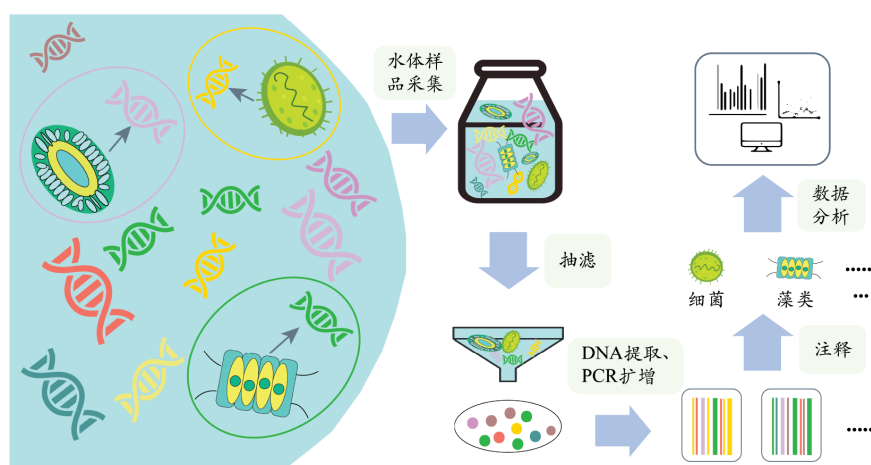
陈家琪, 董丽, 麻晓梅, 田凯, 白洁, 赵彦伟*

(北京师范大学环境学院, 水环境模拟国家重点实验室, 北京 100875)

摘要:传统形态学监测无法识别绝大多数微生物, 环境DNA(eDNA)宏条形码技术提供了一种新型高效的生物监测手段。以白洋淀为例, 采用eDNA宏条形码测序技术, 开展白洋淀微型生物群落监测, 揭示了白洋淀微型生物群落组成、序列数、多样性等的时空分布, 比较了eDNA技术和传统形态学方法对藻类的检出能力, 分析了eDNA技术的灵敏度和还原力。结果表明:eDNA宏条形码技术检出白洋淀7个微生物类群的4 569个OTU, 分属于567个种, 其中细菌(除蓝藻门)最多, 原生动物次之, 古细菌最少; 时间上, 白洋淀主要微生物类群秋季生物多样性最高, 夏季次之, 微生物类群的序列数、门与属水平的相对丰度也呈现出明显的季节特征。空间上, 优势门类在各采样点的分布大致相似, Epsilonbacteraeota等部分相对丰度较少的门类分布明显不均衡; 时间和空间变化均影响白洋淀微型生物群落的组成和分布, 季节变化的影响更显著; eDNA比传统形态学方法具有更高的检出能力, 二者联合使用更有利于全面获取微生物组成信息。研究全面揭示了白洋淀微型生物群落信息, 探索了eDNA宏条形码技术在北方湿地的应用, 印证了该技术的高效性和灵敏度。

关键词:eDNA宏条形码; 白洋淀; 微生物群落; 生物监测

中图分类号:Q938 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2021)08-1773-14 **doi:**10.11654/jaes.2021-0632



Microbial community monitoring in Baiyangdian Lake based on eDNA technology

CHEN Jiaqi, DONG Li, MA Xiaomei, TIAN Kai, BAI Jie, ZHAO Yanwei*

(State Key Laboratory of Water Environmental Simulation, School of Environment, Beijing Normal University, Beijing 100875, China)

Abstract: A vast majority of microbes are unable to be monitored based on traditional morphological methods, which restricts its application; in contrast, environmental DNA(eDNA) metabarcoding provides a new and efficient biomonitoring method. In this study, the

收稿日期: 2021-06-01 录用日期: 2021-07-20

作者简介: 陈家琪(1997—), 女, 山西晋中人, 硕士研究生, 从事环境DNA分子生态学研究。E-mail: 201921180010@mail.bnu.edu.cn

*通信作者: 赵彦伟 E-mail: aweil974@bnu.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金项目(52070020); 水体污染控制与治理科技重大专项(2018ZX07110001)

Project supported: The National Natural Science Foundation of China(52070020); The Major Science and Technology Program for Water Pollution Control and Treatment(2018ZX07110001)

microbial communities in Baiyangdian Lake were examined by eDNA metabarcoding, and the spatiotemporal distribution of community composition, reads, and biodiversity of microbes in Baiyangdian Lake were identified. At the same time, algae detection ability was evaluated by comparing the eDNA and traditional morphological methods, and the sensitivity and flexibility of eDNA were analyzed. The results showed that: In Baiyangdian Lake, a total of 4 569 operational taxonomic units of seven microbial communities were detected based on eDNA metabarcoding and belonged to 567 species, of which bacteria (except Cyanobacteria) were the most abundant, followed by protozoa and the archaea were the least, respectively. In terms of time, the biodiversity of the main microbial communities in Baiyangdian Lake was the highest in autumn followed by that in summer, and the reads and relative abundance at the phylum or genus level of the microbial groups also showed obvious seasonal characteristics. Spatially, the distribution of dominant phyla at each sampling point was roughly similar, while the distribution of those relatively less abundant, such as Epsilonbacteraeota, was clearly unbalanced. The composition and distribution of microbial communities in Baiyangdian Lake were affected by temporal and spatial variations, and the effect of temporal variation was more significant. eDNA metabarcoding has a higher detection ability than traditional morphological methods, and the combination of these two methods is more conducive for acquiring comprehensive information to identify microbial components. The study reveals the composition of microbial communities in Baiyangdian Lake, explores the application of eDNA metabarcoding in northern wetlands, and demonstrates the high efficiency and sensitivity of eDNA technology.

Keywords: eDNA metabarcoding; Baiyangdian Lake; microbial community; biomonitoring

白洋淀是华北地区最大的内陆浅水湖泊湿地,被誉为“华北之肾”,其对维持区域生态平衡和保护生物多样性发挥着生态安全屏障作用^[1]。长期以来,受人为和自然双重胁迫的影响,白洋淀面临水质下降与水体富营养化^[2]、湿地萎缩^[3]、生物多样性下降^[4]等生态环境问题,因此亟待加强生态管理与综合修复。生物与生态监测可以用来评估生态现状,查明存在的生态问题,识别退化的驱动因子,为管理与修复提供重要的基础信息与依据,开展白洋淀生物监测具有重要意义。

微型生物群落是生物监测的重要类群之一,其主要由细菌、真菌、藻类、原生动物以及小型后生动物等在显微镜下才能观测到的微小生物组成。微型生物群落是湿地生态系统中生物要素的重要组成,对外界环境条件的变化十分敏感,在物质循环和能量流动中发挥着重要作用,其个体或群落变化可以客观地反映水体变化^[5-8],在生态监测实践中应用广泛。传统的基于形态学与生理生化特征的生物分类鉴定虽然能基本满足自然生态系统中常规物种的监测,但该方法在检测数量和种类上有先天不足,加之受鉴定人员的主观影响,很难对体积微小的微型生物实现精准识别。为实现对微型生物的全面评估,需要突破传统生物监测方法的瓶颈,探索高灵敏度的生物监测新技术。

环境DNA (Environmental DNA, eDNA) 技术为微型生物群落监测提供了新手段。该技术是DNA条形码与高通量测序方法的结合,又称eDNA宏条形码 (Metabarcoding) 技术,其主要通过对目标DNA片段

进行高通量测序,将所得序列与标准数据库进行比对,获取环境中的物种组成及丰度等信息^[9-10]。eDNA技术是近年生态学领域最重要的技术之一,其快速发展,推动了物种识别方法从传统形态学鉴定向分子生物学领域转变,极大提高了人类从生态系统中获取数据的能力。因具有通量高、易发现新物种,在探究生物群落组成和检测物种多样性方面更准确快捷等优势^[11], eDNA技术已被广泛应用在鱼类^[12]、哺乳动物^[13]、藻类^[14-15]等多种生物群落的监测中,并逐渐被应用到入侵物种^[16]和濒危物种^[17]的研究中。eDNA宏条形码技术在白洋淀的浮游动物监测^[18]、沉积物细菌多样性研究^[19]等方面有过初步应用,但尚未对白洋淀的微型生物群落开展过全面的监测和研究。

本研究采用eDNA宏条形码技术,对白洋淀微型生物群落进行监测和分析,明确了白洋淀微型生物的分布和组成,比较论证了eDNA方法在白洋淀生物监测中的灵敏度和高效性,揭示了白洋淀微型生物群落的多样性变化,探究了季节变化和空间变化对白洋淀微型生物群落的影响。

1 材料与方法

1.1 样品采集及形态学鉴定

选取白洋淀9个点位采集水样(图1),采集时间分别为2020年4月(春季)、6月(夏季)、9月(秋季)和11月(冬季)。每个采样点用水质采样器(JC-8000B)采集2 L地表水,其中1 L用于eDNA宏条形码分析,将水样立即转移到冰中,并在6 h内进行抽滤,滤膜孔径为0.45 μm ,直径为50 mm,抽滤体积为250~300

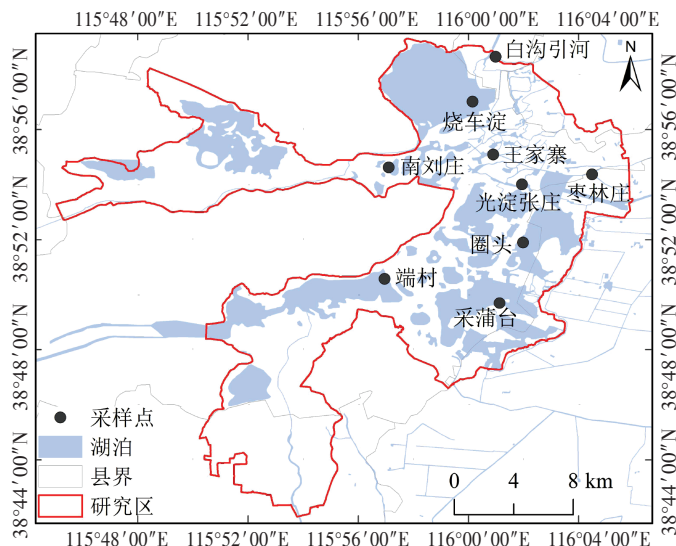


图1 研究区及采样点分布图

Figure 1 Study area and locations of sampling sites

mL。抽滤后立即将滤膜取下,放置在2 mL无菌离心管内,并在 $-20\sim-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 范围内保存直至DNA提取。

为便于分析对比,采用形态学鉴定方法进行藻类鉴定。用于形态学鉴定的1 L水样立即加入10 mL鲁哥试剂固定,静置48 h后,抽取上层清液并将下层沉淀浓缩至30 mL左右,用光学显微镜对浓缩后的样品进行鉴定。

1.2 DNA提取、PCR扩增和高通量测序

采用Magen Hipure土壤DNA试剂盒从样本中提取DNA,使用Qubit® dsDNA HS分析试剂盒检测提取到DNA的浓度。

16S rRNA测序被广泛应用在原核生物的分类鉴定中,真核生物则主要应用18S rRNA测序,因微生物既有原核生物又有真核生物,本研究同时进行了16S rRNA和18S rRNA测序。以20~30 ng DNA为模板,采用包含序列“CCTACGGRBGCASCAG-KVRVGAAT”的正向引物和包含序列“GGACTAC-NVGGGTWTCTAATCC”的反向引物扩增原核生物16S rRNA的V3和V4区。对于真核生物,扩增的是18S rRNA的V7和V8区,其正反向引物分别包含序列“CGWTAACGAACGAG”和“AICCATTC AATCGG”。PCR扩增体系为25 μL ,其中包含TransStart缓冲液2.5 μL ,dNTPs 2 μL ,正向引物和反向引物各1 μL ,模板DNA 20 ng。原核生物和真核生物的扩增方案不同,原核生物:94 $^{\circ}\text{C}$ 初始变性3 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性5 s,57 $^{\circ}\text{C}$ 退火90 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸10 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 最终延伸5 min,

共循环24次。真核生物:94 $^{\circ}\text{C}$ 初始变性5 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s,57 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 最终延伸5 min,共循环25次。扩增后的产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳检测。

通过Qubit3.0荧光仪(Invitrogen, Carlsbad, CA)检测DNA文库浓度。将文库定量到10 nmol $\cdot\text{L}^{-1}$,按Illumina MiSeq(Illumina, San Diego, CA, USA)仪器使用说明进行PE250/FE300双端测序,由MiSeq自带的MiSeq控制软件(MCS)读取序列信息。

1.3 生物信息学分析

双端测序得到的正反向Reads首先进行两两组装连接,过滤拼接结果中含有N的序列,保留序列长度大于200 bp的序列。经过质量过滤、去除嵌合体序列后,最终得到的序列用于可操作分类单元(Operational Taxonomic Units, OTU, 等同于传统分类学中的“种”)分析,使用VSEARCH(1.9.6)进行序列聚类,序列的相似性设为97%。之后用RDP Classifier(Ribosomal Database Program)贝叶斯算法对OTU的代表性序列进行物种分类学分析,并在不同物种分类水平下统计每个样本的群落组成,最后综合多篇文献中的微生物名录,对检测到的结果进行筛选分类^[20-22]。其中16S rRNA的参考数据库为Silva 132^[23],18S rRNA的参考数据库为Protist Ribosomal Reference(PR2)^[24]。

本文所有的数据分析均是基于高通量测序获得的OTUs序列。为了直观地展示所检测到的微生物群落的序列和分类信息,本研究将门水平的序列数和

OTU数进行了对数(lg)转换。需特别说明的是,真核生物的注释数据库存在分类信息和正常分类级别无法对应的情况(真菌类群和无脊椎后生动物类群),为进行统一,本研究在统计各分类级别数目时遵循了数据库的规则,但在后续的分析中仍然按照正常的分类处理。

基于上述结果,主要对藻类优势度、季节间差异及微型生物类群的多样性指数进行了计算,同时也比较分析了检出的白洋淀微型生物群落的组成和丰度以及序列数的四季变化。

1.3.1 藻类优势度

物种优势度(Y)表示原核藻类或真核藻类类群某一物种所占的优势程度,计算公式为:

$$Y = \frac{n_i}{N} \times f_i$$

式中: n_i 为第*i*种藻类的个数; N 为所有藻类总个数; f_i 为第*i*种藻类在各采样点出现的频率^[25]。为便于比较,本文对原核藻类和真核藻类优势度分别进行计算,其中传统形态学计算的是种水平的优势度,而eDNA宏条形码计算的是OTU的优势度。本文将优势度 $Y>0.02$ 的藻类确定为优势种。

1.3.2 ANOSIM分析

ANOSIM用于计算季节间差异,它是一种非参数检验方法,用于评估两组实验数据整体的相似性及相似的显著性。该方法主要有两个数值结果: R 用于评估不同组间是否存在差异, P 用于说明组间差异是否显著。

R 值计算公式为:

$$R = \frac{r_b - r_w}{0.25n(n-1)}$$

式中: r_b 表示组间距离排名的平均值; r_w 表示组内距离排名的平均值; n 表示样品总数^[26]。 R 的范围为 $[-1, 1]$, $R>0$ 说明组间差异大于组内差异, $R<0$ 说明组间差异小于组内差异。

P 值通过置换检验(Permutation test)获得。当 $P<0.01$ 时,差异显著。

本研究在R语言中用vegan包的anosim()函数分别对检测到的原核生物和真核生物进行了ANOSIM分析。

1.3.3 α 多样性指数

选用香农-威纳指数(H)反映样本中不同微型生物群落的生物多样性,在R语言中用vegan包的diversity()函数进行计算,计算公式为:

$$H = - \sum_{i=1}^S (p_i \log_x p_i)$$

式中: S 为群落物种丰富度指数,即OTU数; p_i 为物种*i*的相对丰度; x 通常为2或 $e^{[27]}$,本研究选取2为底数。

2 结果与分析

对36个水样进行高通量测序,获得2 730 899条原核生物序列和2 801 272条真核生物序列。为保证数据可比性,按照每个样本36 897条原核生物序列和33 484条真核生物序列的标准对测序结果进行随机抽平处理,36个样本最终共得到1 328 292条原核生物序列(占抽平前原核生物序列的48.64%)和1 205 424条真核生物序列(占抽平前真核生物序列的43.03%)。对抽平后的序列按照97%的相似性进行OTU聚类,获得4 629个OTU(原核生物1 517个、真核生物3 112个),其中4 580个OTU能被数据库注释到门水平以上(占总OTU的98.94%)。

2.1 白洋淀微型生物群落多样性

2.1.1 微型生物群落组成

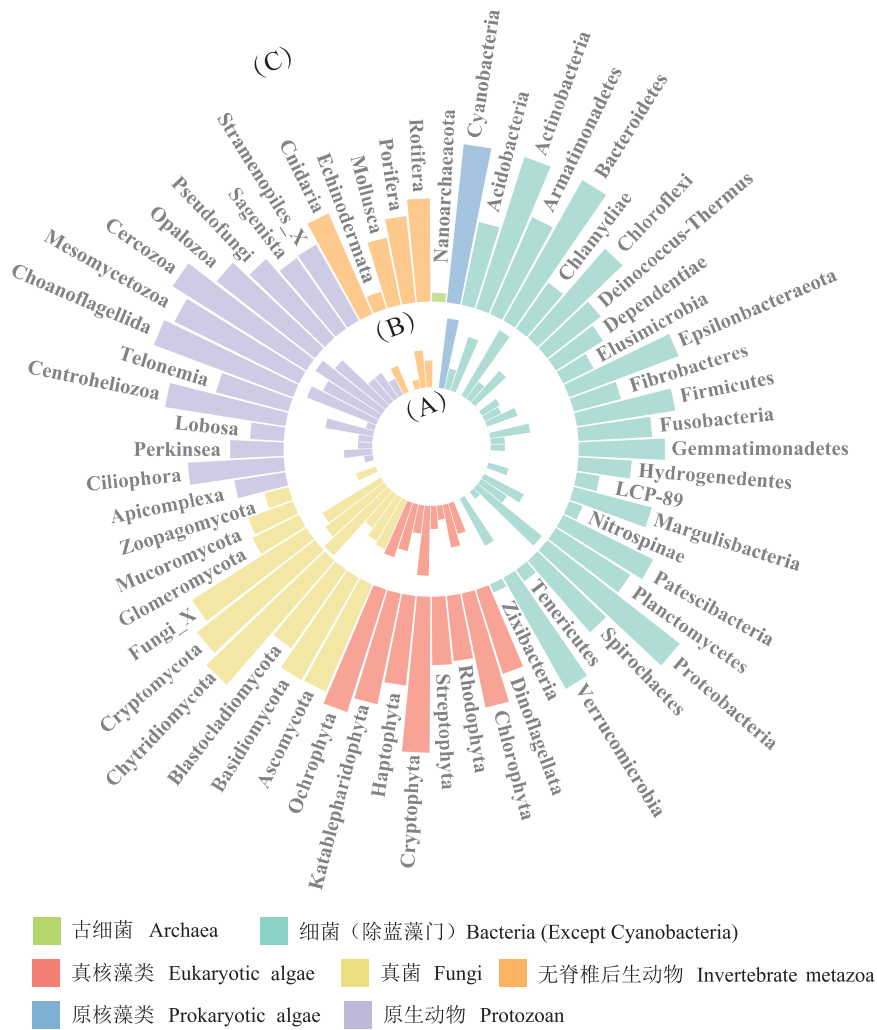
依据eDNA宏条形码测序中的OTU注释结果进行分类,检测到的白洋淀微型生物群落分为7个类群,包括原核与真核生物,原核生物包括古细菌、细菌(除蓝藻门)、原核藻类,真核生物包括真核藻类、真菌、原生动物、无脊椎后生动物。其中,细菌(除蓝藻门)的序列数和OTU数在原核生物中最多,原核藻类次之;真菌的序列数和OTU数在真核生物中最多,原生动物次之,无脊椎后生动物最少,这些微型生物类群的序列数和OTU数详见表1。按照这些OTU所能注释到的最高分类水平进行统计,它们分属于50个门、119个纲、228个目、386个科、614个属、567个种。

7个微型生物群落的组成见图2。由图2可见,变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)和放线菌门(Actinobacteria)三者序列数和OTU数在细菌(除蓝藻门)中占主要优势;隐藻门(Cryptophyta)在真核藻类中最丰富,其序列数占真核藻类总序列数的82.65%,OTU数占总OTU数的54.74%;真菌中最丰富的门类是壶菌门(Chytridiomycota)和隐真菌门(Cryptomycota),二者序列数分别占真菌总序列数的67.16%和22.15%,OTU数占总OTU数的56.15%和20.89%;丝足虫类(Cercozoa)占原生动物总序列数的53.15%,领鞭毛虫门(Choanoflagellida)占序列数的25.81%,二者在原生动物中占主要优势,它们的OTU

数分别占原生动物总 OTU 数的 39.90% 和 27.98%。后生动物中最丰富。原核藻类中仅检测到蓝藻门腔肠动物门(Cnidaria)和轮虫类(Rotifera)在无脊椎 (Cyanobacteria),其序列数和 OTU 数也较高。

表 1 微型生物群落注释结果
Table 1 The annotation results of microbial community

分类 Classification	生物类群 Community	序列数 Reads	OTU 数 OTUs	门 Phylum	纲 Class	目 Order	科 Family	属 Genes	种 Species
原核生物	古细菌	2	1	1	1	1	1	1	1
	细菌(除蓝藻门)	1 081 304	1 245	25	52	123	190	271	187
真核生物	原核藻类	244 050	227	1	3	9	41	46	42
	真核藻类	232 774	411	8	21	29	40	71	93
	真菌	538 419	1 489	1	9	14	30	101	112
	原生动物	423 097	1 158	13	28	47	82	107	114
	无脊椎后生动物	9 338	38	1	5	5	6	21	23
	不同分类水平总数统计			50	119	228	386	614	567



(A)每个门 OTU 数lg 转化结果;(B)每个门序列数lg 转化结果;(C)每个群落门水平名称
(A)The lg of OTUs at phylum level;(B) The lg of reads at phylum level;(C) The name of phylum level

图 2 白洋淀微型生物群落组成

Figure 2 Composition of microbial community in Baiyangdian Lake

2.1.2 藻类监测结果

基于eDNA宏条形码技术共注释到196个原核藻类OTU和287个真核藻类OTU,分属于9门21纲34目76科100属112种,其中蓝藻门(196个OTU)和隐藻门(163个OTU)的种类最丰富,Ochrophyta(55个OTU)和Katablepharidophyta(31个OTU)次之(图3A)。共有14个OTU被确定为优势种(表2),蓝藻门9个,隐藻门5个。OTU3的优势度最大(0.290 4),OTU134的优势度最小(0.021 7),这两个物种均属于隐藻门。

为验证eDNA宏条形码技术用于生物监测的可靠性,同步对秋季样品进行藻类的形态学鉴定。共鉴定出73种藻类,基本被eDNA宏条形码技术的监测结果所覆盖,分属于7门9纲18目31科46属,其中绿藻门(Chlorophyta, 35种)和硅藻门(Bacillariophyta, 17种)种类最丰富,分别占鉴定出所有藻类的47.95%和23.29%(图3B)。鉴定出的73种藻类中,15种被确定为优势种(表2),其中绿藻门种类最多,为6种,蓝藻门(Cyanophyta)4种,硅藻门3种,隐藻门1种,甲藻门

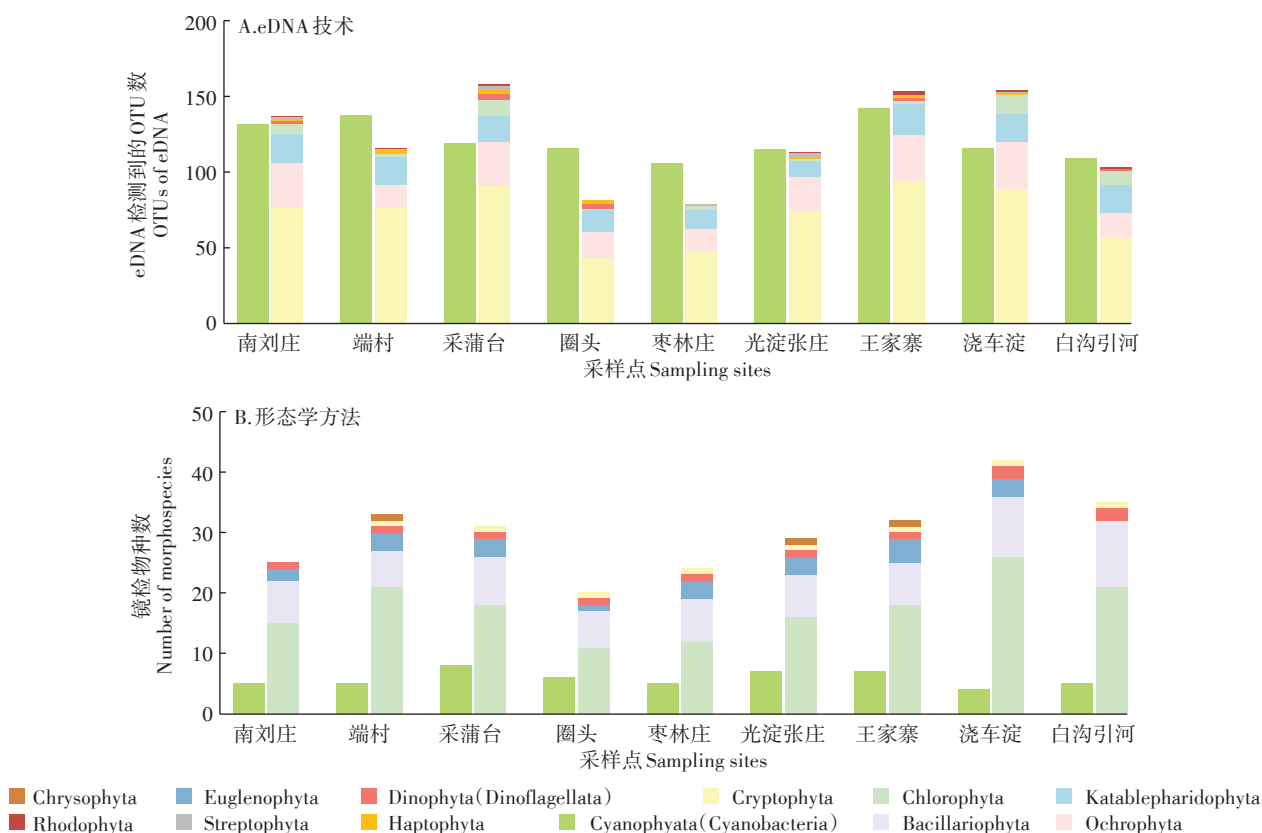
(Dinophyta)1种。伪鱼腥藻(*Pseudanabaena* sp.)为绝对优势种,优势度为0.750 2,四角十字藻(*Crucigenia lauterbornii*)为次优势种,优势度为0.195 3。

2.2 白洋淀微型生物组成的时空分布

2.2.1 微型生物群落的时间分布

对检出的原核生物和真核生物分别进行ANOSIM分析,结果显示:原核生物和真核生物的 R 值分别为0.648和0.621,且 P 值均小于0.01,季节间差异显著(图4)。

如图5所示,在白洋淀检出的6个主要微型生物类群中,秋季的香农-威纳指数均明显高于其他3个季节,说明秋季微型生物的种类最丰富,生物多样性最高,除无脊椎后生动物外,其他微型生物类群夏季的香农-威纳指数仅次于秋季。春季和冬季的生物多样性在各微型生物类群之间的分布不一致,其中原生动物和无脊椎后生动物春季的生物多样性要高于冬季,而其他4个微型生物类群正好相反。细菌(除蓝藻门)的香农-威纳指数在6个微型生物类群中最大,介于5.17~7.56之间,说明该类群的生物多样性最



每个采样点左右两个柱体分别代表原核藻类和真核藻类
Each sampling site has two columns representing prokaryotic algae and eukaryotic algae, respectively

图3 eDNA技术与形态学方法监测到的藻类数量比较

Figure 3 Comparison of the number of algae detected by eDNA and morphological method

表2 基于eDNA和传统形态学方法确定的藻类优势种

基于eDNA监测的藻类优势种			基于传统形态学鉴定的藻类优势种		
OTU名称 OTU_ID	优势度 Y	门 Phylum	种类 Species	优势度 Y	门 Phylum
OTU3	0.290 4	Cryptophyta	<i>Pseudanabaena</i> sp.	0.750 2	Cyanophyta
OTU20	0.216 0	Cryptophyta	<i>Crucigenia lauterbornii</i>	0.195 3	Chlorophyta
OTU53	0.175 7	Cyanobacteria	<i>Cryptomonas erosa</i>	0.176 6	Cryptophyta
OTU1767	0.153 6	Cryptophyta	<i>Scenedesmus</i> sp.	0.098 6	Chlorophyta
OTU5	0.098 4	Cyanobacteria	<i>Crucigenia tetrapedia</i>	0.080 4	Chlorophyta
OTU68	0.074 3	Cyanobacteria	<i>Merismopedia</i> sp.	0.073 4	Cyanophyta
OTU62	0.062 1	Cyanobacteria	<i>Raphidiopsis</i> sp.	0.048 8	Cyanophyta
OTU35	0.055 8	Cyanobacteria	<i>Cyclotella</i> sp.	0.048 0	Bacillariophyta
OTU222	0.036 8	Cyanobacteria	<i>Peridinium hirundinella</i>	0.040 9	Dinophyta
OTU52	0.030 7	Cyanobacteria	<i>Oscillatoria</i> sp.	0.032 7	Cyanophyta
OTU226	0.026 0	Cyanobacteria	<i>Scenedesmus quadricauda</i>	0.025 5	Chlorophyta
OTU45	0.023 7	Cyanobacteria	<i>Scenedesmus dimorphus</i>	0.024 6	Chlorophyta
OTU845	0.022 6	Cryptophyta	<i>Nitzschia acicularis</i>	0.024 2	Bacillariophyta
OTU134	0.021 7	Cryptophyta	<i>Nitzschia amphibia</i>	0.022 8	Bacillariophyta
			<i>Scenedesmus arcuatus</i>	0.020 2	Chlorophyta

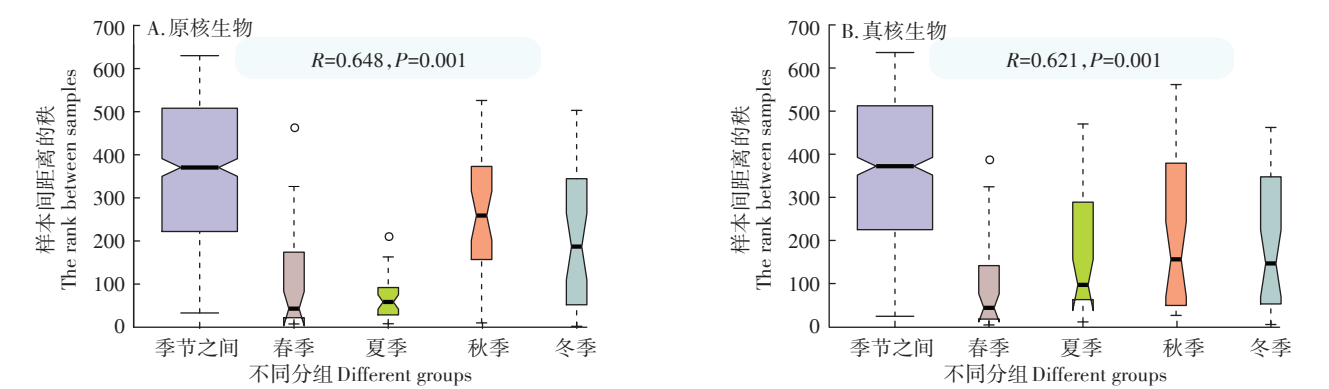


图4 原核生物和真核生物的ANOSIM分析图
Figure 4 ANOSIM analysis of prokaryotes and eukaryotes

高;无脊椎后生动物最小,范围在0.74~3.10。

序列数对比分析结果表明,白洋淀各微型生物类群分布有明显不同的季节特点(图6)。细菌(除蓝藻门)序列数在四季中均占绝对优势;真菌次之,且四季变化明显,表现为夏季>秋季>春季>冬季。序列占比同样较高的原生动物序列秋季分布要明显高于其他3个季节,无脊椎后生动物的序列数相对较少,且在冬季分布最多。原核藻类和真核藻类的季节变化特征较为相似,但和其他类群差异较大,它们的序列分布在冬季最多,夏季最少。OTU数量的总体季节变化趋势为秋季>夏季>春季>冬季,与多样性季节变化特点相吻合。

各微型生物类群代表物种在门和属水平的相对

丰度变化,也各自呈现出明显的季节特点。放线菌门是细菌(除蓝藻门)的优势群体,其秋季相对丰度要明显低于其他季节,而蓝藻门冬季和秋季的相对丰度显著高于春季和夏季(图7A)。壶菌门是真菌的优势群体,也是真核生物中最丰富的门类,其夏季相对丰度最高,平均值达到49.96%,冬季相对丰度最低,平均值仅有15.92%,季节差异明显。隐藻门在真核藻类中所占比例具有绝对优势,该门类在冬季相对丰度最高,这与真核藻类序列分布在冬季最多的结果相一致(图8A)。和门水平相比,各微型生物类群在属水平上的分布更为复杂,季节差异更为显著,详细见图7B和图8B。

2.2.2 微型生物群落的空间分布

某些生物类群门水平和属水平的相对丰度变化

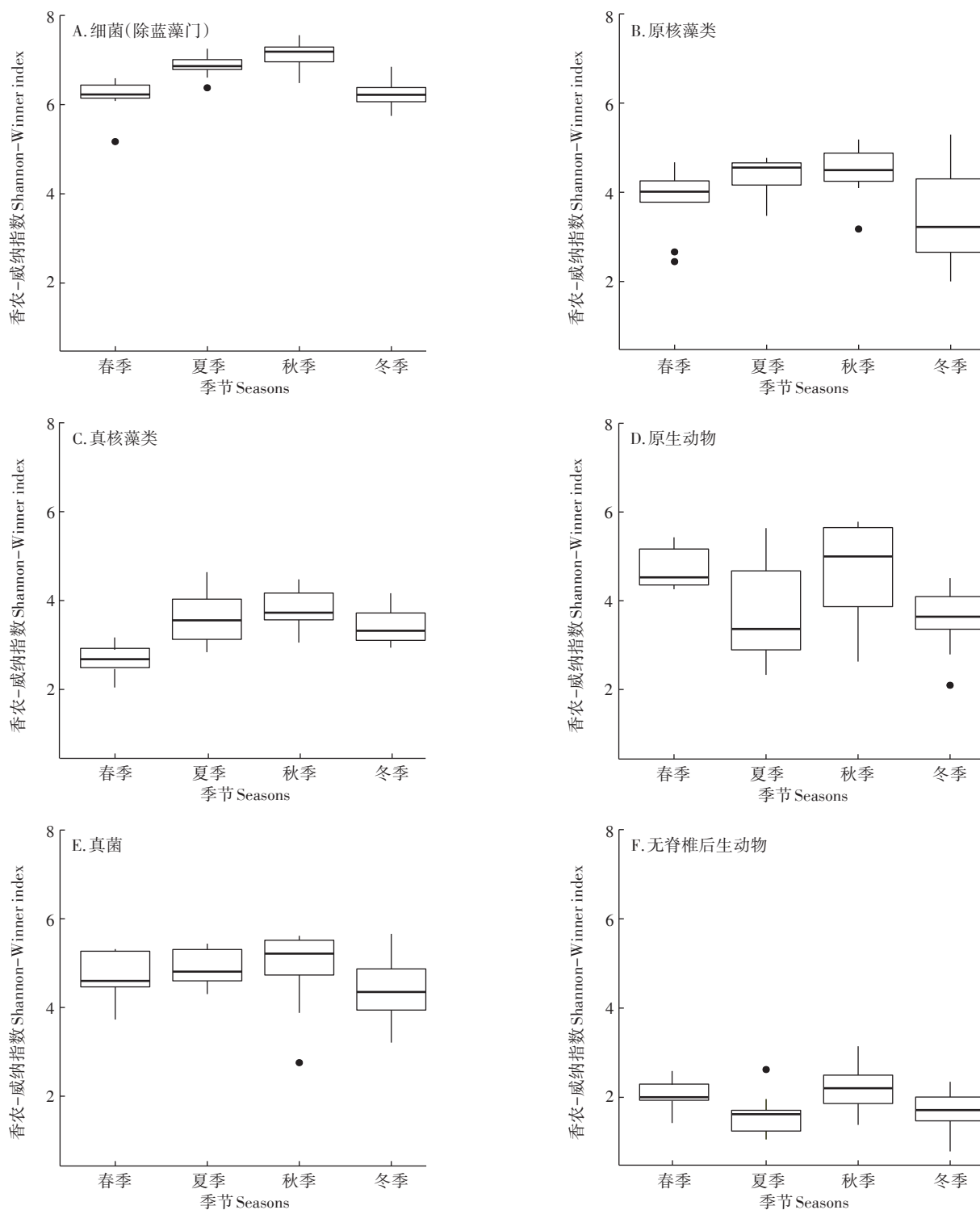
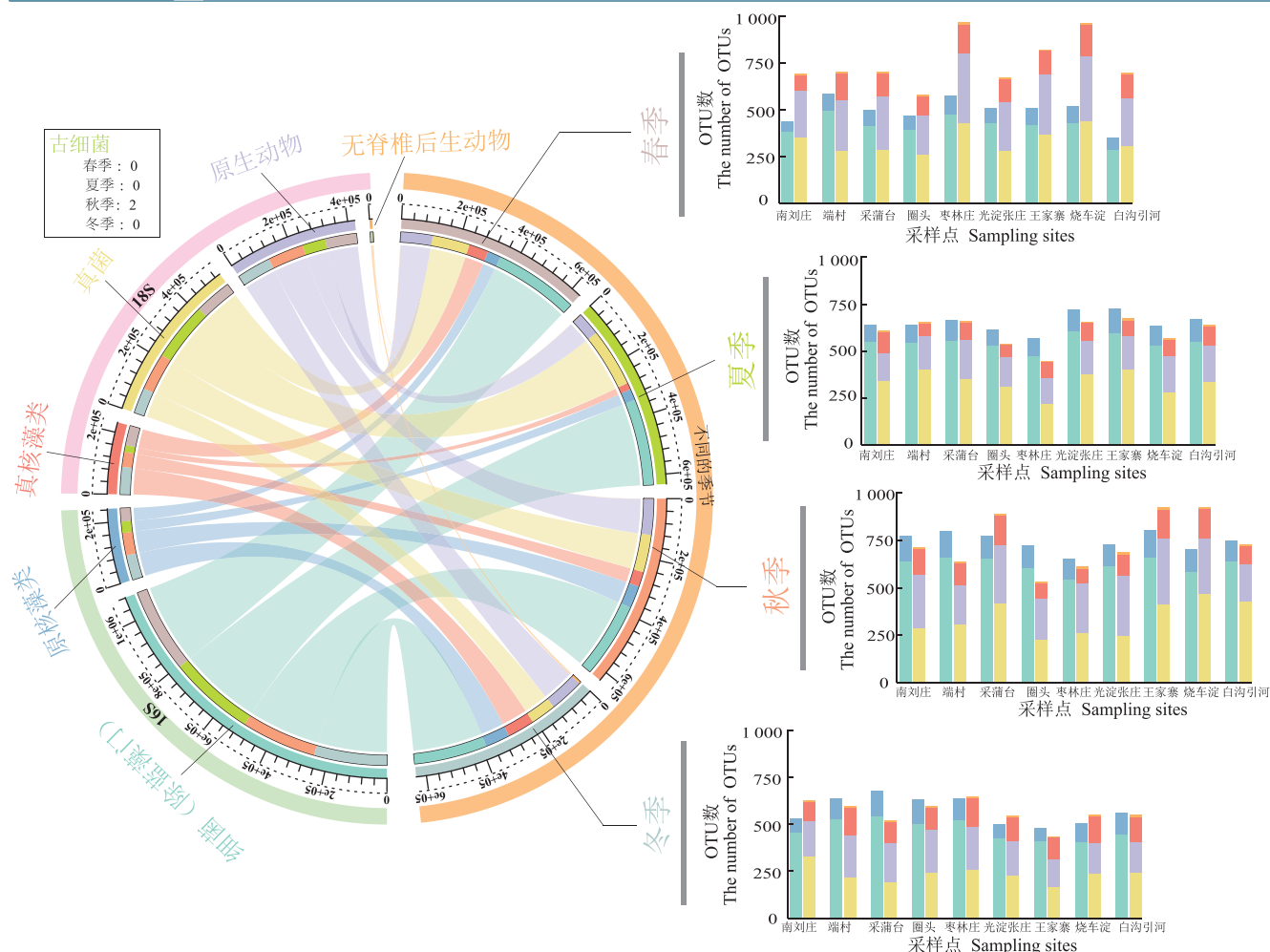


图5 白洋淀主要微生物群落香农-威纳指数四季变化

Figure 5 Seasonal variation of Shannon-Winner index of main microbial communities in Baiyangdian Lake

在采样点之间也有明显差异(图7和图8)。隶属于细菌(除蓝藻门)的 *Epsilobacteracota* 菌群,在南刘庄、枣林庄和光淀张庄3个点位秋季相对丰度较高,尤其是在枣林庄地区,该菌群相对丰度占比要远高于其他采

样点。与之相似,属水平上隶属于原核藻类蓝藻门的 *Planktothrix-NIVA-CYA-15*,在采蒲台和王家寨两个点位秋季相对丰度明显高于其他点位。隶属于原生动物领鞭毛虫门的 *Monosigidae_Group_O_X*,在秋季



左侧和弦图代表微生物类群序列数的季节分布;右侧柱状图代表不同采样点四季OTU数量。每个采样点左右两个柱体分别代表原核藻类和真核藻类

The chord diagram(left) represents the seasonal distribution of the reads of microbial communities, the bar chart(right) represents the OTUs of four seasons at different sampling sites. Each sampling site has two columns representing prokaryotic algae and eukaryotic algae, respectively

图6 微生物群落序列数和OTU数量对比

Figure 6 Comparison of reads and OTUs of microbial communities

枣林庄点位相对丰度显著高于其他点位。丝足虫类作为真核生物的优势种群,在四季各点位相对丰度的变化呈现出相似趋势,即在采蒲台和圈头这两个地区相对丰度较高,而在其他地区相对丰度较少。

3 讨论

3.1 白洋淀微型生物群落组成主要受时间变化影响

主成分分析结果表明(图9),白洋淀微型生物群落受时间变化的影响要大于受空间变化的影响,尤其是原核生物,在同一季节内不同采样点之间的相似度很高,而季节间的差异较为明显。真核生物同一季节内不同采样点之间的差异要大于原核生物,但相较而言,空间差异没有季节差异显著。因此,白洋淀微型

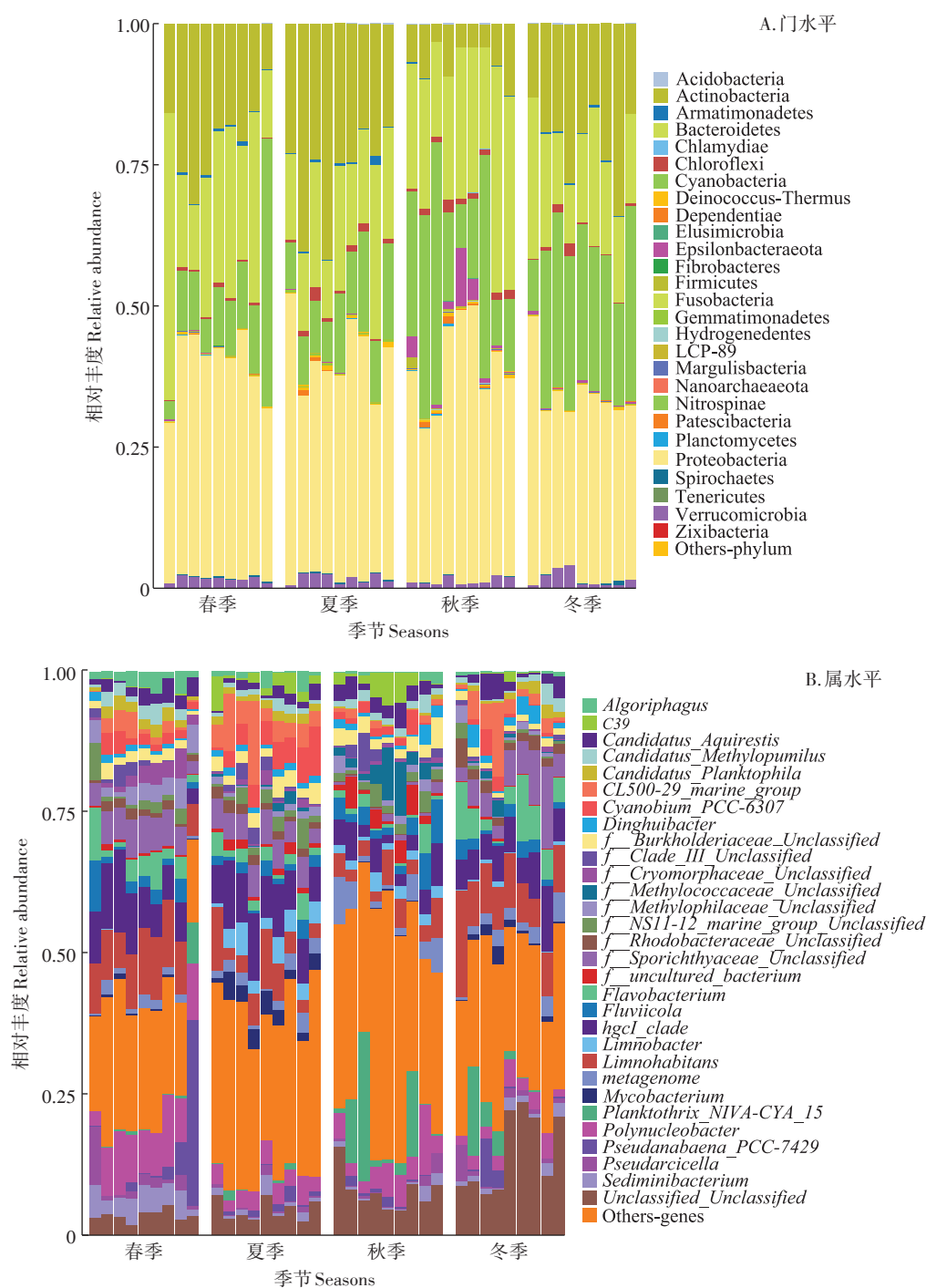
生物群落组成主要受时间变化的影响。

白洋淀地处亚欧大陆东部季风区,暖温带半干旱地区,全年四季分明。在春季和夏季,适宜的水温有利于微型生物群落的生长繁殖;秋季,随着水温的逐渐下降,微型生物的种类逐渐减少;冬季水温最低,微型生物的种类最少。为进一步分析本研究中出现秋季微型生物群落多样性高于夏季的情况,对采样时间段内白洋淀水温的历史监测值进行了统计,结果表明:白洋淀4月末(春季)的水温在18℃左右,6月初(夏季)的水温在24℃左右,9月中下旬(秋季)的水温在23℃左右,11月中下旬(冬季)的水温在11℃左右。本研究中,夏季的采样时间处于春末夏初,水温未达到最高值,是微型生物群落大量繁殖的前期;而

秋季采样时间处于夏末秋初,水温和夏季接近,处于微型生物群落大量繁殖的后期。已有研究表明,水温是对微型生物物种数量和丰度影响最大的环境因子^[28],因此夏、秋两季采样时间早于典型季节性环境

条件发生时间可能是造成本研究秋季多样性指数偏高的主要原因。

阳小兰等^[29]的研究发现,白洋淀整体处于轻度富营养化状态,部分区域呈中度富营养化,富营养程度



从左至右依次为南刘庄、端村、采蒲台、圈头、枣林庄、光淀张庄、王家寨、烧车淀、白沟引河。图8同
From left to right are Nanliuzhuang, Duancun, Caiputai, Quantou, Zaolinzhuang, Guangdian Zhangzhuang, Wangjiazhai, Shaochedian and Baigou River. The same as figure 8

图7 原核生物门、属水平(Top30)相对丰度图

Figure 7 Phylum and genus(Top30) relative abundance of prokaryotes

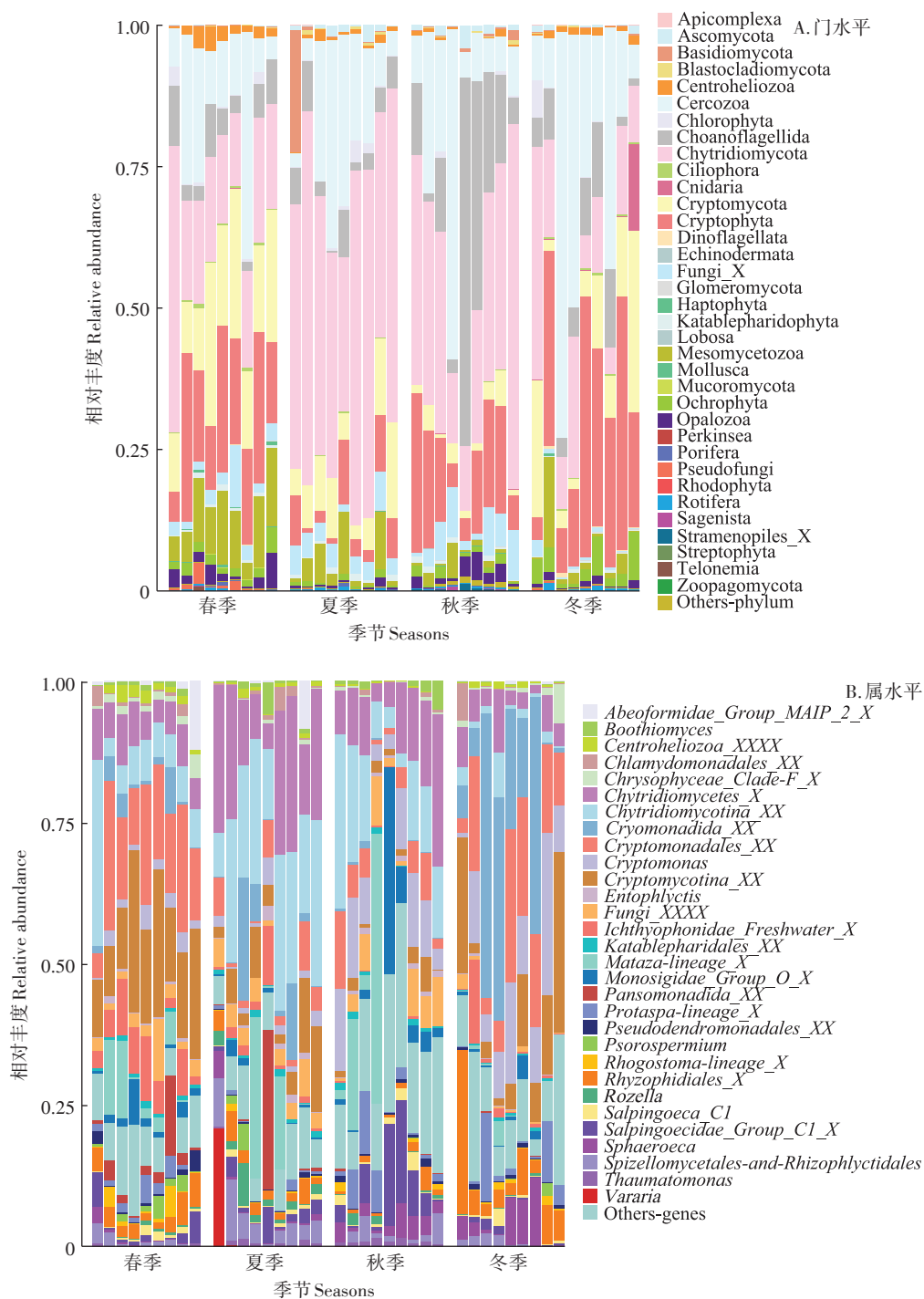


图8 真核生物门、属水平(Top30)相对丰度图

Figure 8 Phylum and genus(Top30) relative abundance of eukaryotes

在夏秋两季较高。藻类是水体富营养化的重要指示生物^[30], 本研究中, 藻类(原核藻类和真核藻类)相对丰度在夏季和秋季较低, 在冬季最高。推测造成这种现象的原因可能是夏秋两季水温适合包括藻类在内的多种微生物的繁殖, 尤其是真菌类群中的壶菌门, 在夏季的平均相对丰度占比达到49.96%, 这在一

定程度上削弱了部分微生物, 包括藻类的相对丰度, 尽管这些生物(如部分藻类)的绝对丰度可能显著高于其他季节, 也可能是受eDNA宏条形码技术无法判定检测到的是否为活体生物^[31]的影响, 检测到较多死亡个体残留的DNA所致。

空间上, 各采样点的微生物组成、多样性、序列

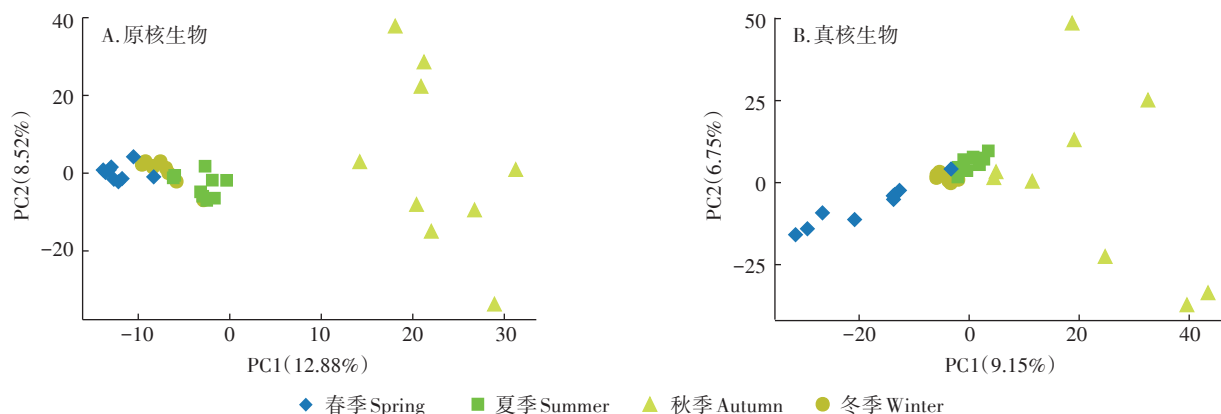


图9 原核生物和真核生物的主成分分析图

Figure 9 Principal component analysis of prokaryotes and eukaryotes

数等信息分布规律性不够突出,变形菌门、拟杆菌门、放线菌门、蓝藻门等原核生物的优势门类及壶菌门、丝足虫类、领鞭毛虫门、隐藻门等真核生物的优势门类的相对丰度在不同采样点均较高,且差异较小。相反,相对丰度较低的某些门类,如原核生物的Epsilonbacteraeota、真核生物的Basidiomycota等的相对丰度在不同采样点之间差异明显。原因可能有两方面:一是白洋淀生态补水随机性较强,补水不稳定,会频繁扰动水体,使得水动力条件不稳定,底泥与水体的交换频繁,部分死体生物也进入了样本,对不同采样点的微型生物群落检测造成干扰;二是采样点密度较小,未覆盖整个淀区,可能会使监测到的结果具有片面性,今后应根据具体情况合理设计优化布点与采样方案,高密度设置采样点,开展重复校验性检测,进行长期跟踪监测,使之更能反映实际,更有利于分析时空变化的影响。

3.2 eDNA 技术用于白洋淀微型生物群落监测的优势与不足

在针对白洋淀微型生物群落进行的16S rRNA和18S rRNA高通量测序研究中,大量细菌(除蓝藻门)、原核藻类、真核藻类、真菌、原生动物类群,少量的无脊椎后生动物类群以及微量的古细菌类群被检出,填补了白洋淀微型生物群落多样性调查的空缺,也印证了eDNA宏条形码技术用于生物多样性监测的潜力。相较于传统形态学方法,eDNA宏条形码技术可识别出更多的物种,包括定鞭藻门(Haptophyta)、红藻门(Rhodophyta)、链型植物(Streptophyta)、Katablepharidophyta等显微镜未识别到的物种,以及以往白洋淀未报道过的藻类^[32-34],丰富了白洋淀藻类名录和微型生物群落数据库。王靖淇等^[35]、张丽娟等^[36]和杨海乐

等^[37]的研究已表明,eDNA宏条形码对传统形态学监测结果有较高的还原性,并可检测到一些传统方法无法识别的稀有物种和隐匿物种,说明eDNA技术在生物多样性监测中有重要应用潜力。

本研究也揭示了eDNA宏条形码技术存在的一些问题,如无法将所有的OTU注释到种水平、eDNA检测对传统形态学监测到的物种覆盖度低等。原因在于自然界中有大量未被发现、培养和测序的物种,其基因序列在数据库中不存在,导致数据库信息与自然界实际存在的物种不对等,无法注释^[35,38]。测序平台^[39]、特异基因、引物的选择^[40-41]等实验条件以及季节、水温、流速等自然条件变化也会影响产物的有无和相对丰度。

可见,eDNA宏条形码技术发展初期,仍需要与传统形态学鉴定方法紧密结合^[42],才能构建可靠的多维生物监测系统。但随着eDNA技术的不断完善和发展,该方法不仅会用于大规模的生物监测,更有望融合到生物多样性监测的标准程序中。

4 结论

(1)白洋淀水样eDNA宏条形码分析共检测到7个微型生物类群,分别为古细菌、细菌(除蓝藻门)、原核藻类、真核藻类、真菌、原生动物和无脊椎后生动物,注释得到4 569个OTU,按这些OTU所能注释到的最高分类水平统计,分属于567个种。其中,细菌(除蓝藻门)和真菌分别是原核生物和真核生物的优势类群。

(2)白洋淀微型生物群落分布与组成受时间影响更大。原核生物和真核生物均有显著的季节间差异,且各主要微型生物类群的生物多样性、序列数和物种

相对丰度都呈现出季节分布特征。优势门类在各采样点的微生物组成、多样性、序列数等信息分布规律性不够突出,在不同采样点的空间分布没有明显差异,Epsilonbacteraeota、Planktothrix-NIVA-CYA-15等丰度较低的种群呈现出区域分布特征。

(3)eDNA技术和传统形态学的藻类监测结果具有相似性,且eDNA技术可检测到更多传统形态学不能识别的藻类,两种监测手段结合可获得更全面的生物组成信息。

参考文献:

- [1] 刘春兰,谢高地,肖玉. 气候变化对白洋淀湿地的影响[J]. 长江流域资源与环境, 2007, 16(2): 245-250. LIU C L, XIE G D, XIAO Y. Impact of climatic change on Baiyangdian Wetland[J]. *Resource and Environment in Yangtze Basin*, 2007, 16(2): 245-250.
- [2] 杨丽伟,陈诗越. 白洋淀水环境质量评价[J]. 南水北调与水利科技, 2015, 13(3): 457-462. YANG L W, CHEN S Y. Assessment of water environment quality of Baiyangdian Lake[J]. *South-to-North Water Transfers and Water Science & Technology*, 2015, 13(3): 457-462.
- [3] 秦珊,崔建升,剧泽佳,等. 人为干扰条件下白洋淀底栖动物群落变化及其主要环境影响因子分析[J]. 环境科学学报, 2021, 41(3): 1123-1133. QIN S, CUI J S, JU Z J, et al. Changes of benthic invertebrate community in Baiyangdian Lake and analysis of main environment factors under the condition of human disturbance[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2021, 41(3): 1123-1133.
- [4] 陈红,曹建智. 白洋淀湿地现状分析及修复对策研究[J]. 中小企业管理与科技(下旬刊), 2016(11): 109-110. CHEN H, CAO J Z. Current situation analysis and restoration countermeasure study of Baiyangdian Wetland[J]. *Management & Technology of SME (Next Issue)*, 2016(11): 109-110.
- [5] 韩宏蕾,施心路,白昕. 微生物在水质监测中的作用和意义[J]. 环境科学与管理, 2007(5): 147-150. HAN H L, SHI X L, BAI X. The function and significance of microscopic organisms in water quality surveillance[J]. *Environmental Science and Management*, 2007(5): 147-150.
- [6] LIU L, LIU M, WILKINSON D M, et al. DNA metabarcoding reveals that 200- μ m-size-fractionated filtering is unable to discriminate between planktonic microbial and large eukaryotes[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2017, 17(5): 991-1002.
- [7] 杨江华. 太湖流域浮游动物物种多样性与环境污染群落生态效应研究[D]. 南京:南京大学, 2017: 15. YANG J H. Study of zooplankton and community effects of environmental pollution communities in Taihu Lake basin[D]. Nanjing: Nanjing University, 2017: 15.
- [8] 朱昶宇,陆凯晖,伊珍珍. 珠江浮游真核微生物分子多样性及其与水环境的关系[J]. 水生生物学报, 2020, 44(1): 187-202. ZHU C Y, LU K H, YI Z Z. Molecular diversities of planktonic microbial eukaryotes in the Pearl River and their relationship with water environment[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2020, 44(1): 187-202.
- [9] TABERLET P, COISSAC E, POMPANON F, et al. Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding[J]. *Molecular Ecology*, 2012, 21(8): 2045-2050.
- [10] 王靖淇. DNA宏条形码技术对不同水环境中微生物群落结构的研究[D]. 沈阳:辽宁大学, 2017: 4-7. WANG J Q. The research on microbial community structure in different water environment through DNA metabarcoding technology[D]. Shenyang: Liaoning University, 2017: 4-7.
- [11] VALENTINI A, TABERLET P, MIAUD C, et al. Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding[J]. *Molecular Ecology*, 2016, 25(4): 929-942.
- [12] ZHANG S, LU Q, WANG Y Y, et al. Assessment of fish communities using environmental DNA: Effect of spatial sampling design in lentic systems of different sizes[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2020, 20(1): 242-255.
- [13] TAICHIRO I, MASAKI M, MASAYUKI U, et al. Tropical-forest mammals as detected by environmental DNA at natural saltlicks in Borneo[J]. *Biological Conservation*, 2017, 210(1): 281-285.
- [14] 张宛宛. 基于DNA宏条形码技术的浮游植物群落多样性监测研究[D]. 南京:南京大学, 2017. ZHANG W W. Study on biodiversity monitoring of phytoplankton community based on DNA barcoding technology[D]. Nanjing: Nanjing University, 2017.
- [15] LIU S Y, GIBSON K, CUI Z M, et al. Metabarcoding analysis of harmful algal species in Jiaozhou Bay[J]. *Harmful Algae*, 2020, 92: 101772.
- [16] EGAN S P, GREY E, OLDS B, et al. Rapid molecular detection of invasive species in ballast and harbor water by integrating environmental DNA and light transmission spectroscopy[J]. *Environmental Science & Technology*, 2015, 49(7): 4113-4121.
- [17] 徐念,熊美华,邵科,等. 长江中下游环境DNA宏条形码生物多样性检测技术初步研究[J]. 环境科学研究, 2020, 33(5): 1187-1196. XU N, XIONG M H, SHAO K, et al. Preliminary study on environmental DNA metabarcoding for detecting biodiversity in the middle and lower reaches of the Yangtze River[J]. *Research of Environmental Sciences*, 2020, 33(5): 1187-1196.
- [18] 张蒙,孙泉琼,方楠,等. DNA条形码技术在白洋淀流域浮游动物调查中的应用[J]. 河北大学学报(自然科学版), 2019, 39(2): 217-224. ZHANG M, SUN X Q, FANG N, et al. Application of DNA barcode on survey of zooplankton in Baiyangdian watershed[J]. *Journal of Hebei University (Natural Science Edition)*, 2019, 39(2): 217-224.
- [19] 于妍,王悦悦,方杜贤,等. 白洋淀表层沉积物细菌多样性及影响因素[J]. 环境工程学报, 2021, 15(3): 1121-1130. YU Y, WANG Y Y, FANG D X, et al. Bacterial diversity in surface sediments of Baiyangdian and its influencing factors[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2021, 15(3): 1121-1130.
- [20] LI F L, PENG Y, FANG W D, et al. Application of environmental DNA metabarcoding for predicting anthropogenic pollution in rivers[J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52(20): 11708-11719.
- [21] ZHANG Y, PAVLOVSKA M, STOICA E, et al. Holistic pelagic biodiversity monitoring of the Black Sea via eDNA metabarcoding approach: From bacteria to marine mammals[J]. *Environment International*, 2020, 135: 105307.

- [22] LI F L, FLORIAN A, YANG J H, et al. Human activities' fingerprint on multitrophic biodiversity and ecosystem functions across a major river catchment in China[J]. *Global Change Biology*, 2020, 26(12): 6867–6879.
- [23] QUAIST 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): 590–596.
- [24] BITTNER L, DOLAN J R, PAWLOWSKI J, et al. The Protist Ribosomal Reference database (PR2): A catalog of unicellular eukaryote Small Sub-Unit rRNA sequences with curated taxonomy[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41: 597–604.
- [25] 莫丹玫. 千岛湖浮游植物群落结构多样性及其鉴定方法的研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2016: 10–11. MO D M. Community structures of phytoplankton and comparison on them between two identification methods in Lake Qiandaohu[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2016: 10–11.
- [26] CLARKE K R. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure[J]. *Austral Ecology*, 1993, 18(1): 117–143.
- [27] 方精云, 沈泽昊, 唐志尧, 等. “中国山地植物物种多样性调查计划”及若干技术规范[J]. 生物多样性, 2004, 12(1): 5–9. FANG J Y, SHEN Z H, TANG Z Y, et al. The protocol for the survey plan for plant species diversity of China's mountains[J]. *Biodiversity Science*, 2004, 12(1): 5–9.
- [28] 张森. 呼兰河口湿地微生物群落结构特征及其与环境因子相关性研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨师范大学, 2015: 49–50. ZHANG M. Study about correlation between microbial community and environmental factors in Hulan estuary wetland[D]. Harbin: Harbin Normal University, 2015: 49–50.
- [29] 阳小兰, 张茹春, 毛欣, 等. 白洋淀水体氮磷时空分布与富营养化分析[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(24): 370–373. YANG X L, ZHANG R C, MAO X, et al. Spatiotemporal distribution and eutrophication of nitrogen and phosphorus in Baiyangdian Lake[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2018, 46(24): 370–373.
- [30] 辛思洁, 叶菁, 王义祥. 浅谈浮游藻类及其在水体富营养化研究中的应用[J]. 化学工程与装备, 2018(8): 272–273, 276. XIN S J, YE J, WANG Y X. A brief discussion on planktonic algae and its application in the study of water eutrophication[J]. *Chemical Engineering & Equipment*, 2018(8): 272–273, 276.
- [31] 赵明, 赵梦迪, 马春艳, 等. 环境DNA在水域生态中的研究进展[J]. 中国水产科学, 2018, 25(4): 714–720. ZHAO M, ZHAO M D, MA C Y, et al. Studies on the application of the environmental DNA in aquatic eco-system[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2018, 25(4): 714–720.
- [32] 王军静. 白洋淀浮游植物时空分布及粒级研究[D]. 保定: 河北大学, 2011: 24–28. WANG J J. The spatio-temporal variation of phytoplankton community and size-fractionated chlorophyll-a in Baiyangdian Lake[D]. Baoding: Hebei University, 2011: 24–28.
- [33] 李娜, 周绪申, 孙博闻, 等. 白洋淀浮游植物群落的时空变化及其与环境因子的关系[J]. 湖泊科学, 2020, 32(3): 772–783. LI N, ZHOU X S, SUN B W, et al. Spatiotemporal variation of phytoplankton community and its relationship with environmental factors in the Lake Baiyangdian[J]. *Journal of Lake Sciences*, 2020, 32(3): 772–783.
- [34] 林楚翹, 易雨君, 李春晖, 等. 白洋淀浮游生物群落动态变化与生物量模拟研究[J]. 水利水电技术, 2020, 51(12): 169–179. LIN C Q, YI Y J, LI C H, et al. Dynamic change and biomass simulation of plankton community in Baiyangdian Lake[J]. *Water Resources and Hydropower Engineering*, 2020, 51(12): 169–179.
- [35] 王靖淇, 王书平, 张远, 等. 高通量测序技术研究辽河真核浮游藻类的群落结构特征[J]. 环境科学, 2017, 38(4): 1403–1413. WANG J Q, WANG S P, ZHANG Y, et al. Community structure characteristics of eukaryotic planktonic algae in Liaohe River through high-throughput sequencing[J]. *Environmental Science*, 2017, 38(4): 1403–1413.
- [36] 张丽娟, 徐杉, 赵峥, 等. 环境DNA宏条形码监测湖泊真核浮游植物的精准性[J]. 环境科学, 2021, 42(2): 796–807. ZHANG L J, XU S, ZHAO Z, et al. Precision of eDNA metabarcoding technology for biodiversity monitoring of eukaryotic phytoplankton in lakes[J]. *Environmental Science*, 2021, 42(2): 796–807.
- [37] 杨海乐, 吴金明, 张辉, 等. 大型河流中鱼类组成的eDNA监测效率——以长江武汉江段为例[J]. 中国水产科学, 2021, 28(6): 796–807. YANG H L, WU J M, ZHANG H, et al. Efficiency of using environmental DNA metabarcoding to monitoring large river fish species composition: A case study in the Wuhan transect of the Yangtze River[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2021, 28(6): 796–807.
- [38] 宋伦, 吴景, 宋广军, 等. 基于环境DNA技术的辽东湾真核微藻群落结构特征[J]. 生态学报, 2020, 40(17): 6243–6257. SONG L, WU J, SONG G J, et al. Characteristics of phytoplankton community structure in Liaodong Bay based on environmental DNA technology[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2020, 40(17): 6243–6257.
- [39] SINGER G A C, FAHNER N A, BARNEs J G, et al. Comprehensive biodiversity analysis via ultra-deep patterned flow cell technology: A case study of eDNA metabarcoding seawater[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 5991.
- [40] ZHANG S, ZHAO J D, YAO M. A comprehensive and comparative evaluation of primers for metabarcoding eDNA from fish[J]. *Methods in Ecology and Evolution*, 2020, 11(12): 1609–1625.
- [41] 陈炼, 吴琳, 刘燕, 等. 环境DNA metabarcoding及其在生态学研究中的应用[J]. 生态学报, 2016, 36(15): 4573–4582. CHEN L, WU L, LIU Y, et al. Application of environmental DNA metabarcoding in ecology[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2016, 36(15): 4573–4582.
- [42] HUO S L, LI X C, XI B D, et al. Combining morphological and metabarcoding approaches reveals the freshwater eukaryotic phytoplankton community[J]. *Environmental Sciences Europe*, 2020, 32(1): 1–14.