生态毒理学报
Asian Journal of Ecotoxicology
第 17 卷 第 4 期 2022 年 8 月
Vol. 17, No.4 Aug. 2022

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20211101003
薛棋文, 杨江华, 张丽娟, 等. eDNA 宏条形码监测沉积物原生生物群落多样性[J]. 生态毒理学报,2022, 17(4): 175-186
Xue Q W, Yang J H, Zhang L J, et al. Using environmental DNA metabarcoding to monitor community diversity of protist in sediments [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2022, 17(4): 175-186 (in Chinese)

eDNA 宏条形码监测沉积物原生生物群落多样性

薛棋文[1], 杨江华[2], 张丽娟[2], 张效伟[2,#], 雷春生[1,*]

1. 常州大学环境与安全工程学院,常州 213164
2. 污染控制与资源化研究国家重点实验室,南京大学环境学院,南京 210023

收稿日期:2021-11-01　　**录用日期**:2021-12-29

摘要: 原生生物个体小、繁殖快,对污染物敏感,是沉积物环境污染重要指示类群。传统基于形态学的方法难以快速准确地反映沉积物中原生生物的群落组成和物种多样性,严重制约了其在水生态评估中的应用。本研究采用环境 DNA 宏条形码方法,基于真核 18S rRNA 基因片段分析了太湖流域沉积物原生生物的群落结构及其时空差异,筛选了可用于太湖流域沉积物生态评估的原生生物指标,建立了基于原生生物的水生态评估方法。结果显示,利用环境 DNA 技术在太湖流域沉积物共检出原生生物群落有 2 468 个分类单元(OTU),属于 13 门 44 纲,至少在 2 个平行样本出现的 OTU 占总 OTU 的 84.25%,春季(3 月)与秋季(8 月)原生生物群落组成差异明显。评价结果表明,目前太湖流域原生生物群落完整性整体处于亚健康和一般水平。

关键词: eDNA 宏条形码;原生生物;生态健康评价;监测技术
文章编号: 1673-5897(2022)4-175-12　　**中图分类号**: X171.5　　**文献标识码**: A

Using Environmental DNA Metabarcoding to Monitor Community Diversity of Protist in Sediments

Xue Qiwen[1], Yang Jianghua[2], Zhang Lijuan[2], Zhang Xiaowei[2,#], Lei Chunsheng[1,*]
1. School of Environmental and Safety Engineering, Changzhou University, Changzhou 213164, China
2. State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, School of the Environment, Nanjing University, Nanjing 210023, China

Received 1 November 2021　　**accepted** 29 December 2021

Abstract: Protists are small, sensitive to pollutants and with rapid reproduction, which can be used to indicate the status of sediment pollution. The traditional morphology-based monitoring of protist is difficult to quickly and accurately reflect the community composition and species diversity of protist in sediments, which seriously restricts its application in bioassessment. Here the community structure and temporal and spatial differences of sediment protist community in Tai Lake Basin were analyzed by the environmental DNA metabarcoding and the eukaryotic 18S rRNA gene fragment. The protist indexes that can be used for sediment bioassessment in Tai Lake Basin were

基金项目:国家自然科学基金青年基金资助项目(41807482);江苏省自然科学基金青年基金资助项目(BK20180331);国家重大"水专项"(2018 ZX0720801004)
第一作者:薛棋文(1992—),男,硕士研究生,研究方向为生态毒理学,E-mail: 286229926@qq.com
* **通讯作者**(Corresponding author), E-mail: 2692557282@qq.com
\# **共同通讯作者**(Co-corresponding author), E-mail: zhangxw@nju.edu.cn

screened, and the water ecological assessment method based on protist was established. The results show that there are 2 468 OTU taxons in the protobiotic community detected by environmental DNA technology in the sediments of Tai Lake Basin, belonging to 13 phyla and 44 classes. The OTU in at least two parallel samples accounts for 84.25% of the total OTU. There is a significant difference in the composition of protobiotic community between spring (March) and autumn (August), At present, the integrity of protist community in Tai Lake Basin is at the sub-health and general level.

Keywords: eDNA metabarcoding; protist; ecological health assessment; monitoring technology

原生生物是由单细胞组成的微生物[1],分布广泛,以细菌、藻类等为食,并被后生生物等捕食,在水生食物网中占有重要地位[2]。而且,部分原生生物以水体中的碎屑或腐殖质为食,担任着净化水体的重要功能,是食物链中不可或缺的一环[3]。原生生物生长周期短,对水环境变化极为敏感,是水体富营养化重要的指示生物之一。例如富营养的湖泊与水质较好的湖泊中纤毛虫的丰度存在巨大差异,在富营养化湖泊中纤毛虫丰度更高[4]。

目前,原生生物监测主要基于自微型生物群落监测方法(PFU 法)[5]。将泡沫塑料块放入监测的水体中富集原生生物,带回实验室后使用显微镜人工观察原生生物群落的组成,判断监测水体区域的受污染状况。虽然此方法操作易上手、成本较低,但是重污染地区原生生物聚集较慢,影响评估结果[6],具有一定的局限性。监测沉积物中原生生物则需要将环境样品长时间风干,使用培养皿对孢子(原生生物在干旱条件下存活方式)进行培养[7],在显微镜下人工计数需要耗费大量时间与精力且保存不易。同时原生生物易受到环境因子的影响而改变自身形态这一特性对人工鉴定造成了很大的困难[8]。

环境 DNA(eDNA)宏条形码技术为监测沉积物原生生物多样性提供了新的方法。生物参与生态过程时,会向环境中释放含有 DNA 的分泌物,例如血液、粪便、脱落的组织结构等[9]。这些游离于环境中的生物 DNA 片段被称为环境 DNA[10]。随着测序技术发展,高通量测序(high-throughput sequencing)因其可以一次性将数据量巨大的 DNA 条形码碱基信息进行分类,使获取环境中物种 DNA 信息成为了可能[11]。结合聚合酶链式反应技术(PCR)可以识别环境中存在的低丰度的物种信息[12]。该技术最大的特点是能够将环境中微量存在的 DNA 条形码碱基序列片段几何数量级的扩增,从而获得环境中生物多样性的信息[13]。eDNA 宏条形码比传统方法具有更高的敏感度[14],不需要目标物种在采样位点被观测到[15]。eDNA 技术检测物种不直接对生物体进行采样,具有对稀有和难以捕捉物种的实地调查能力[16]。目前环境 DNA 宏条形码技术已经被用于监测鱼类、浮游等水生生物中[17],但在我国湖泊沉积物研究中尚不多见。因此本项目拟以太湖流域为对象:(1)建立基于环境 DNA 宏条形码技术监测沉积物原生生物多样性的方法;(2)评估沉积物原生生物完整性指数与水生态健康的关系。

1 材料与方法(Materials and methods)

1.1 研究区域

太湖流域的河流、水库和湖荡等设置 82 个点位,每个点位一共采取 3 份等体积沉积物样本,共采集 246 份样品。分别在 2019 年 3 月和 8 月采集沉积物用于原生生物群落分析,采样位点图如图 1 所示。

1.2 样品的采集与处理

每个点位用尺寸为 300 mm×208 mm×150 mm (长×宽×高)的皮特森抓泥器采集 4 次,抓取表层深度约 5 cm 的沉积物,累计采集 0.125 ~ 0.25 m^2,采样过程中避免水体的扰动。将底泥混匀后取 50 g 装入离心管中。每个位点采集 3 个平行样品。现场用干冰保存,实验室内用-80 ℃冰箱保存。

1.3 实验方法

用冻干机将样品中的水分冻干后拍打混匀,每份样品取约 0.3 mg,使用 QIAGEN power soil kit 100 试剂盒提取沉积物中 DNA。使用 18S RNA V9 引物(上游引物序列 CCTTCYGCAGGTTCACCTAC,下游引物序列 TCCCTGCCHTTTGTACACAC)进行 PCR 扩增。PCR 在 96 孔板中进行,每个 96 孔板均设有 3 个阴性对照(无菌水)。PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测是否存在非特异性扩增。PCR 反应体系如下:2×Vazyme taq 酶 12.5 μL、上游引物 0.5 μL、下游引物 0.5 μL、DNA 样品 1 μL、无酶水 10.5 μL。反应条件为:(1)在 95 ℃条件下预变性 3 min;(2) 95 ℃变性 30 s;(3)62 ℃退火 30 s;(4)72 ℃延伸 15 s

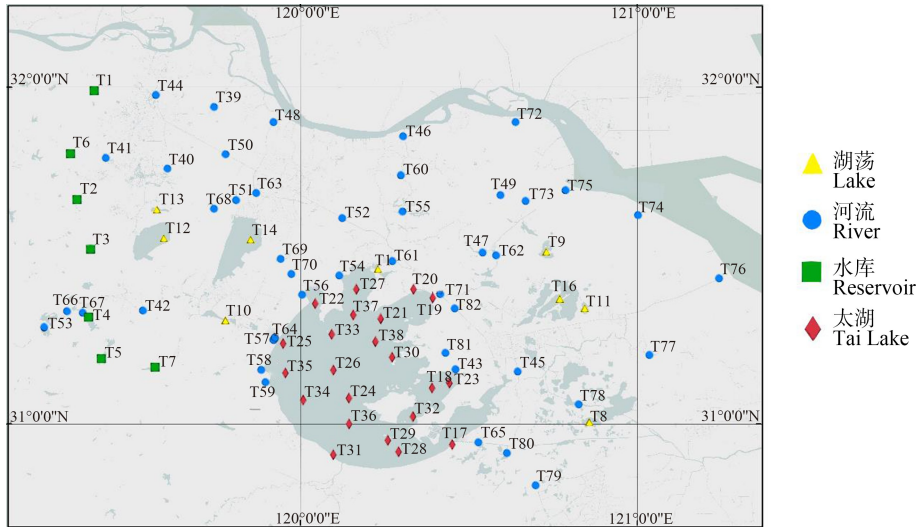

图 1　采样位点分布图

Fig. 1　Sampling sites map

循环;(5)重复 2 到 4 步骤循环 28 次;(6)末次延伸 72 ℃ 5 min。

PCR 产物利用 Ion torrent Proton 平台进行高通量测序[18]。在 EcoView 软件中去除 Q<20 的序列,保留读长 130 ~ 170 bp 的序列;使用 UCHIME 软件筛查嵌合子序列信息,避免嵌合子污染去除重复、低频序列,保留 unique 序列并排除测序过程中的随机误差;使用 USEARCH 程序类聚相似度 97% 以上的分类单元(OTU),类聚阈值参考 18S rRNA 基因通用类聚标准;在 Protist Ribosomal Reference database (PR2)数据库(版本号 4.14.0)进行物种信息注释,并将注释为古菌、细菌、叶绿体、线粒体和未知的序列去除,注释结果从属关系混乱的物种按照域界门纲目科属种顺序重新划分,3 份平行样本中物种 OTU 出现 2 次及以上保留,数据四舍五入取整数均值。以上操作在 Linux 系统中完成。基于物种 OTU 水平、门水平和属水平上分析 eDNA 技术区分物种 alpha-多样性的季节差异,使用 T 值检验来判定;基于 OTU 与属水平上分析 beta-多样性不同季节的差异,将 OTU 注释文件在 R 语言中进行数据统计分析。

1.4　指数计算方法

基于 OTU 分类单元水平与属水平分析,使用 R 语言 Vegan 包计算 alpha-多样性与 beta-多样性。alpha-多样性计算公式如下。

丰富度(Richness)指数计算公式:Richness 即为 OTU 分类单元数

香农(Shannon)指数计算公式:$H=-\sum(P_i)\times(\ln P_i)$,$P_i$ 代表个体数与总体数之比

均匀度(Pielou)指数计算公式:$P=\frac{H}{\ln S}$,P 为均匀度指数,H 为香农指数,S 代表物种数

基于 OTU 分类单元水平与属水平计算方法重复性指数,公式如下所示[19]:

3 个平行样本 OTU 的交叉率=3×共有的 OTU 数目/(平行 1 的 OTU 数目+平行 2 的 OTU 数目+平行 3 的 OTU 数目)。

考虑权重的 OTU 交叉率=(平行 1 共有的序列数+平行 2 共有的序列数+平行 3 共有的序列数)/(平行 1 的序列数+平行 2 的序列数+平行 3 的序列数)。

至少 2 个平行样本出现的 OTU 交叉率=(2×只在 2 个平行中出现的 OTU 数目+3×3 个平行共有的 OTU 数目)/(平行 1 的 OTU 数目+平行 2 的 OTU 数目+平行 3 的 OTU 数目)。

1.5　原生生物完整性评估

根据上述步骤得到的数据构建原生生物完整性指数,该方法主要是筛选对环境干扰有明显变化的原生生物多样性指数来定量描述生物特性与环境影响因子的关系。首先根据原生生物特征筛选指标;计算出多样性指数的分布并做相关性分析筛选合适的指数;计算原生生物指标值以及确定生物完整性指数的计算方法;确定评价标准。按照以下步骤进行构建:首先确定参考点与受损点,在以往的研究中水库位点常被认为是生境较好的地带,太湖流域北

部的湖泊与河流均长期处于水污染影响的状态,水质处于中国地表水标准 3 类水以下,故参考点选取水库位点,受损点选取太湖北部地区位点,本研究取 T1、T2、T3 和 T6 水库位点为参考点,取 T46、T48、T72 和 T75 河流位点为受损点,取相同位点 3 份平行样本中多样性指数均值计算原生生物完整性指数。随着参考点与受损点变化,能够明显区分参考点与受损点的参数称为显著性差异指数,呈现上升趋势的以 5% 分位数作为参考值,下降趋势的以 95% 分位数作为参考值。统一的参数量纲分值计算:下降的参数分数为参考值/参数值;上升的参数分数为(最大值-参考值)/(最大值-参考值)。最后统一进行分数汇总,按照 25%、50% 和 75% 人为划分太湖流域生态健康状态等级。

2 结果(Results)

2.1 原生生物群落组成

利用环境 DNA 技术检测出 82 个位点共有 6 215 个 OTU,其中原生生物有 2 468 个 OTU,占总序列数的 13%(图 2),隶属 13 门 44 纲(表 1)。其中有 70% 的分类单元能注释到种,79% 的分类单元能注释到属,91% 的分类单元能注释到科,97% 的分类单元能注释到目,98% 的分类单元能注释到纲,99% 的分类单元能注释到门。OTU 序列数优势类群为纤毛虫门、丝足虫门、锥足亚门、甲藻门和顶复门等(图 2),其中纤毛虫门分类单元占原生生物总分类单元的 37%,丝足虫门分类单元占原生生物总分类单元的 30%,锥足亚门分类单元占原生生物总分类单元的 10%,甲藻门分类单元占原生生物总分类单元的 9%,顶复门分类单元占原生生物总分类单元的 5%。

2.2 方法重复性研究

选取 2 次采样位点中 97 个位点的样本,样本包含 2 个季度采样重合位点,每个位点样本包含 3 个平行样本,共计 291 个样本。

基于 OTU 计算与基于属多样性指数 CV 值分布绝大部分均处于 0.15 以下,可知环境 DNA 宏条形码技术具有很好的方法重复性。随机抽取 1 个点位(共 3 份平行样本)的方法重复性研究示意图如图 3 所示。3 个平行样本均检出的 OTU 占总 OTU 的 21.7%,至少在 2 个平行样本检出的 OTU 占总 OTU 的 47%。若考虑序列权重,3 个平行样本 OTU 交叉率达到 63.50%,至少在 2 个平行样本检出的 OTU 所占比例达到 84.25%。3 个平行样本出现的属平均值的交叉率平均值为 37.70%,至少在 2 个平行样本出现的属交叉率均值为 62.15%。基于权重 3 个平行样本出现的属交叉率均值为 91.33%,基于权重至少在 2 个平行样本出现的属交叉率均值为 97.13%。基于 OTU 的多样性指数丰富度 CV 值均值为 12.5%;香农指数 CV 值均值为 4.9%;均匀度 CV 值均值为 4.5%。基于属的多样性指数丰富度 CV 值均值为 9.3%;香农指数 CV 值均值为 4%;均匀度 CV 值均值为 3.7%,alpha-多样性 CV 值分布如图 4 所示。

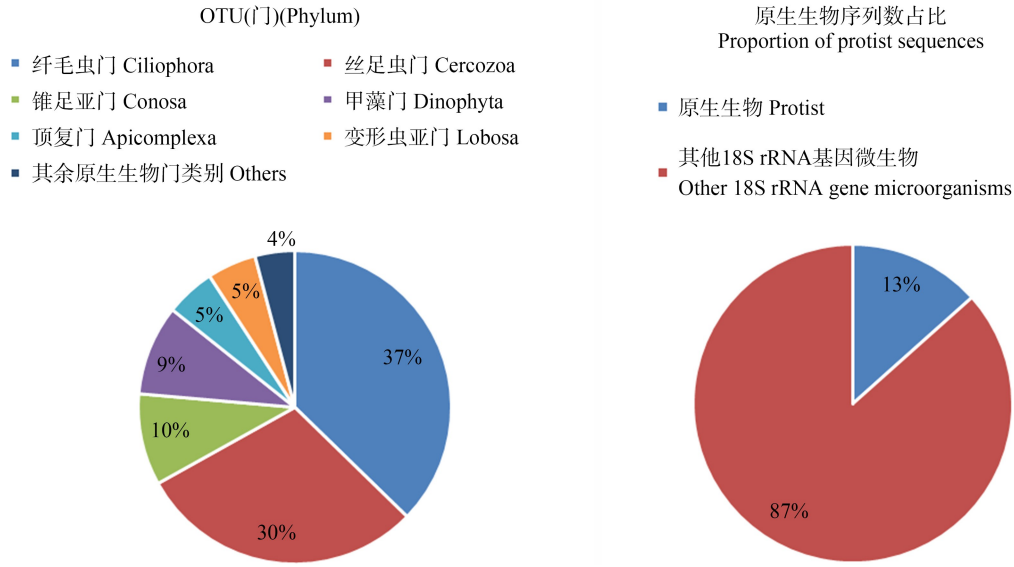

图 2 原生生物 OTU 分布

Fig. 2 Distribution of OTU in protist

表 1　物种注释表

Table 1　Taxa annotation table

界 Kingdom	门 Phylum	纲 Class
囊泡虫 Alveolata	顶复门 Apicomplexa	Apicomplexa
	纤毛虫门 Ciliophora	Armophorea
		Ciliophora-6
		Ciliophora-8
		Colpodea
		异毛纲 Heterotrichea
		核残迹纲 Karyorelictea
		Litostomatea
		Nassophorea
		寡膜纲 Oligohymenophorea
		叶咽纲 Phyllopharyngea
		Plagiopylea
		前口类 Prostomatea
		旋毛纲 Spirotrichea
	甲藻门 Dinophyta	甲藻纲 Dinophyceae
	Perkinsea	Syndiniales
		Perkinsida
变形虫门 Amoebozoa	Breviatea	Breviatea
	锥足亚门 Conosa	始变形虫下门 Archamoebea
		黏菌纲 Mycetozoa-Myxogastrea
	变形虫亚门 Lobosa	叶足亚门 Variosea
		Discosea-Flabellinia
		Discosea-Longamoebia
		Lobosa
		Lobosa-G1
		变形虫纲 Tubulinea
无根虫门 Apusozoa	Apusomonadidae	Apusomonadidae_
	Hilomonadea	Group-1
		Planomonadida
古虫界 Excavata	盘嵴亚界 Discoba	眼虫门 Euglenozoa
		渗养门 Heterolobosea
		雅各巴虫 Jakobida
	后滴门 Metamonada	Parabasalia
		副基体纲 Preaxostyla
有孔虫界 Rhizaria	丝足虫门 Cercozoa	Endomyxa
		Endomyxa-Phytomyxea
		Filosa
		Filosa-Granofilosea
		Filosa-Imbricatea
		Filosa-Sarcomonadea
		Filosa-Thecofilosea
		Novel-Clade
		Globothalamea
有孔虫门 Foraminifera		Monothalamids

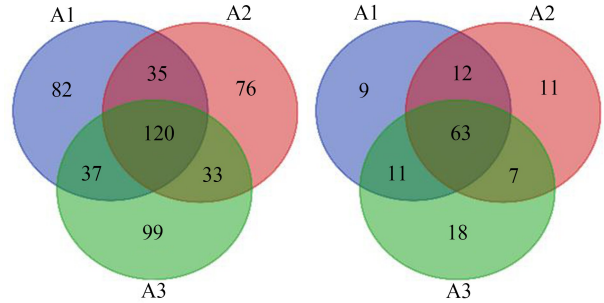

图 3　方法重复性研究示意图

注:A1 ~ A3 代表相同位点的 3 个平行样本。

Fig. 3　Schematic diagram of method repeatability study

Note: A1 ~ A3 represent three parallel samples of the same samples.

2.3　原生生物群落 alpha-多样性季节差异

原生生物 alpha-多样性在不同季节存在显著差异。对比 2 个季度的丰富度指数、香农指数、均匀度指数、分类单元数优势物种门相对丰度,基于 OTU 分类单元水平与属水平进行分析。*T* 值检验分析整体性差异结果显示,基于 OTU 与基于属计算的丰富度指数在时间尺度上具有显著差异,而香农指数与均匀度则未见显著性差异(图 5)。基于 OTU 计算的原生生物优势物种丰富度指数,在不同季节中具有显著差异类群为纤毛虫门、甲藻门、顶复门和盘嵴亚界(图 6)。

2.4　原生生物群落 beta-多样性

进行春季(3 月)和秋季(8 月)原生生物群落主成分(PCA)分析,区分时间尺度上群落结构的变化。不同季节原生生物群落结构差异不显著(图 7)。

2.5　利用原生生物完整性指数评价水生态健康

不同季节指标筛选:本研究筛选了 2 个季度 15 个评价参数(表 2)。甲藻门丰富度、甲藻门香农指数、甲藻门相对丰度和纤毛虫相对丰度 4 个指数在 3 月的参考点与受损点之间具有显著性差异;纤毛虫香农指数、丝足虫丰富度、基于 OTU 的香农指数和基于 OTU 的丰富度在 8 月的参考点与受损点之间存在显著性差异(图 8)。

3 月的各类指数中,参考点与受损点之间甲藻门丰富度、甲藻门香农指数和甲藻门相对丰度呈下降趋势,纤毛虫相对丰度呈上升趋势。8 月的各类指数中,参考点与受损点之间基于 OTU 的丰富度、香农指数、丝足虫丰富度和纤毛虫香农指数均呈下降趋势。生物完整性指数校正表如表 3 所示,春季(3 月)与秋季(8 月)水生态健康评分标准如表 4 所示。评价结果显示,3 月与 8 月采样位点生态健康等级具有一致性(图 9)。

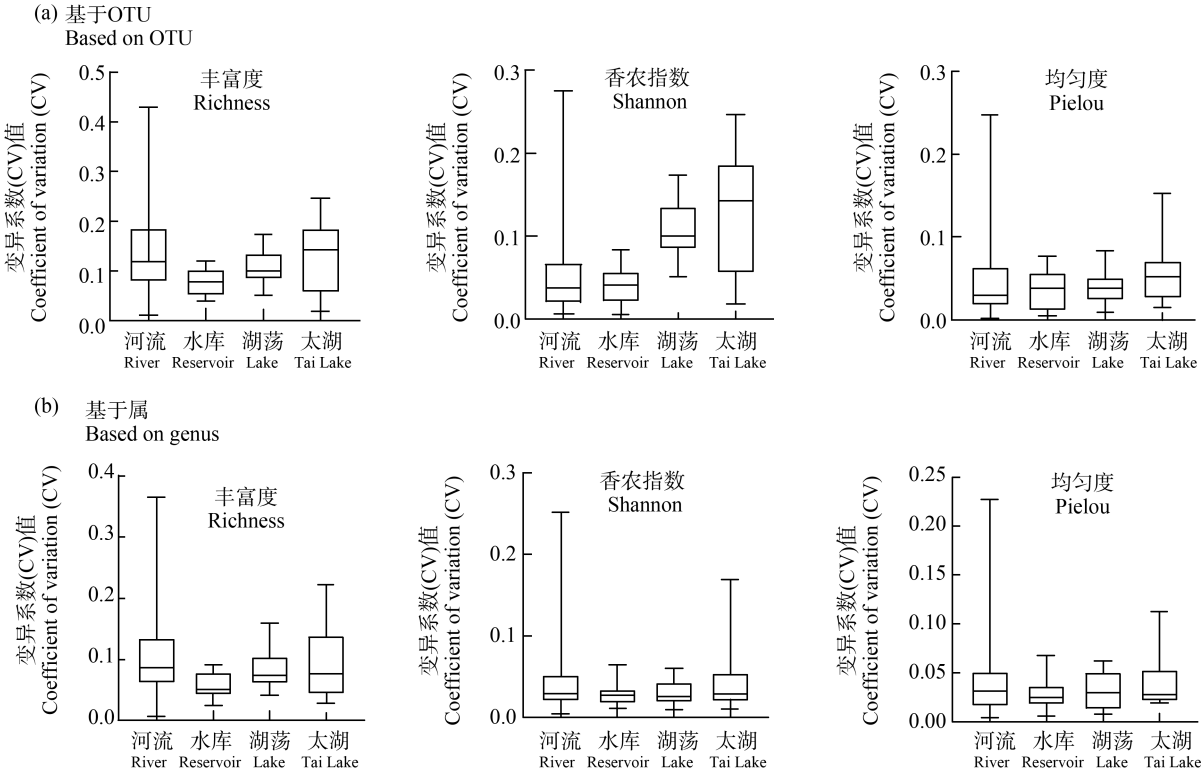

图 4 alpha-多样性指数 CV 值

Fig. 4 CV value of alpha diversity index

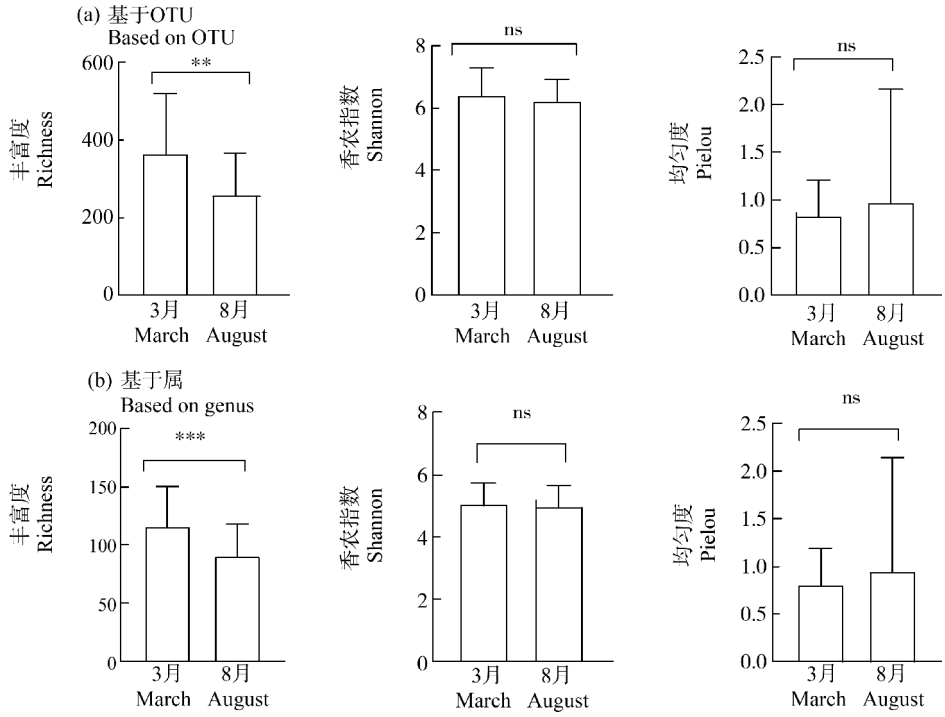

图 5 多样性指数非独立样本 *T* 值检验

注：** 代表 $P<0.001$；*** 代表 $P<0.0001$；ns 表示不显著。

Fig. 5 *T* value test of non independent samples based on OTU diversity index

Note: ** represents $P<0.001$; *** represents $P<0.0001$; ns represents not significant.

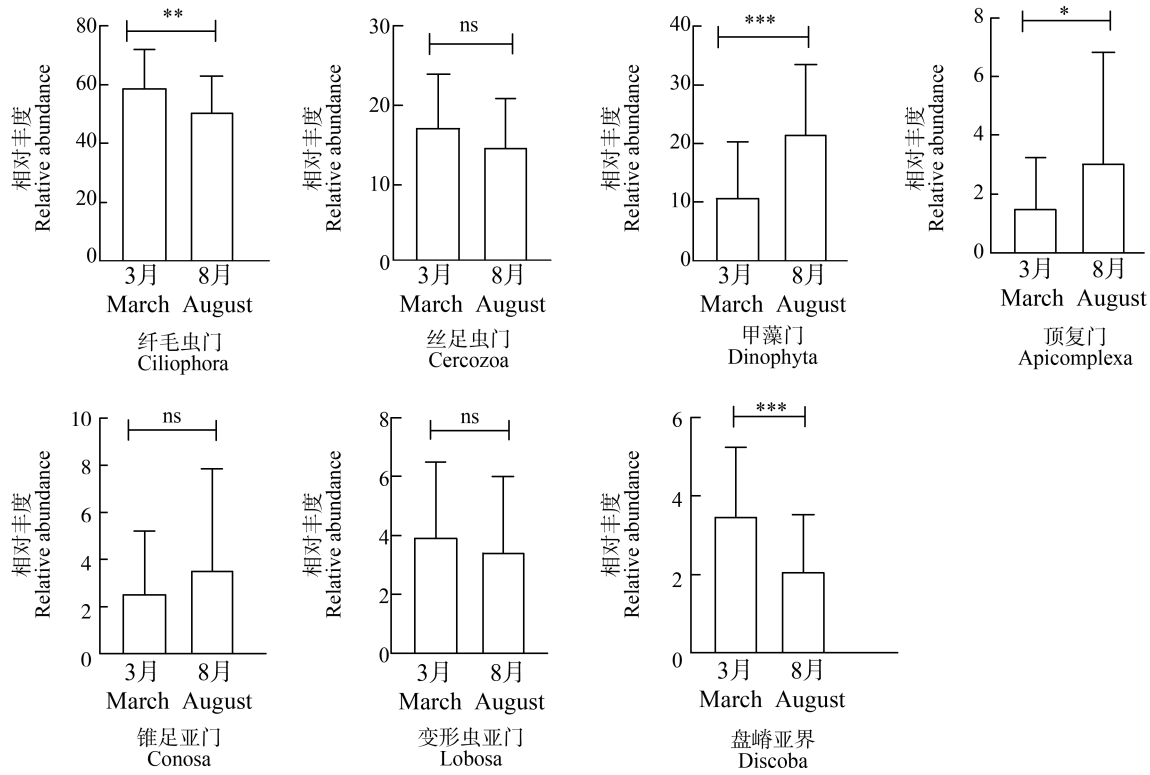

图 6　不同采样季节对原生生物优势物种的影响

注:* 代表 $P<0.05$,** 代表 $P<0.001$,*** 代表 $P<0.0001$;ns 表示不显著。

Fig. 6　Effects of different sampling seasons on dominant protist species

Note: * represents $P<0.05$; ** represents $P<0.001$; *** represents $P<0.0001$; ns represents not significant.

表 2　指数筛选表

Table 2　Index screening table

指数名称 Index name	指数差异(3 月) Difference of index (March)	指数差异(8 月) Difference of index (August)
丰富度 Richness	*	ns
香农指数 Shannon	**	ns
均匀度 Pielou	ns	ns
甲藻门丰富度 Richness of Dinophyta	ns	**
甲藻门香农指数 Shannon index of Dinophyta	ns	***
甲藻门均匀度 Pielou of Dinophyta	ns	ns
甲藻门相对丰度 Relative abundance of Dinophyta	ns	*
纤毛虫丰富度 Richness of Ciliophora	ns	ns
纤毛虫香农指数 Shannon index of Ciliophora	*	ns
纤毛虫均匀度 Pielou of Ciliophora	ns	ns
纤毛虫相对丰度 Relative abundance of Ciliophora	ns	*
丝足虫丰富度 Richness of Cercozoa	*	ns
丝足虫香农指数 Shannon index of Cercozoa	ns	ns
丝足虫均匀度 Pielou of Cercozoa	ns	ns
丝足虫相对丰度 Relative abundance of Cercozoa	ns	ns

注:* 表示差异显著。

Note: * represents significant.

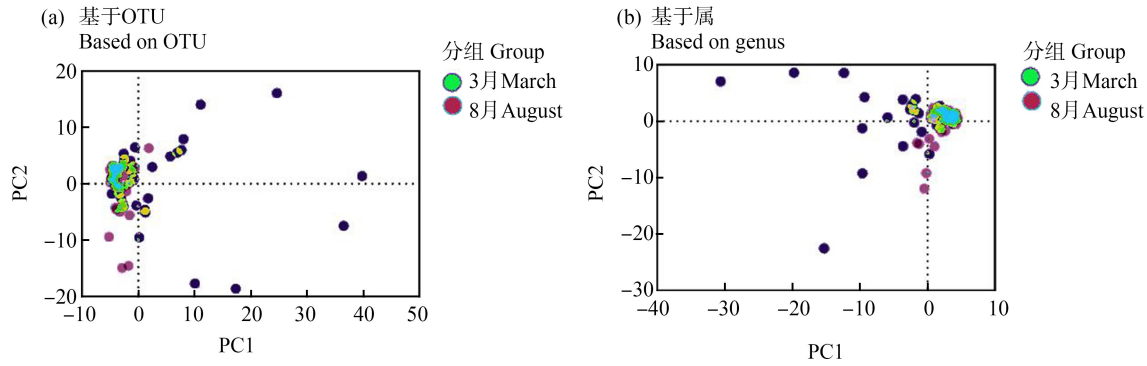

图 7 原生生物群落 PCA 分析

Fig. 7 PCA analysis of protist community

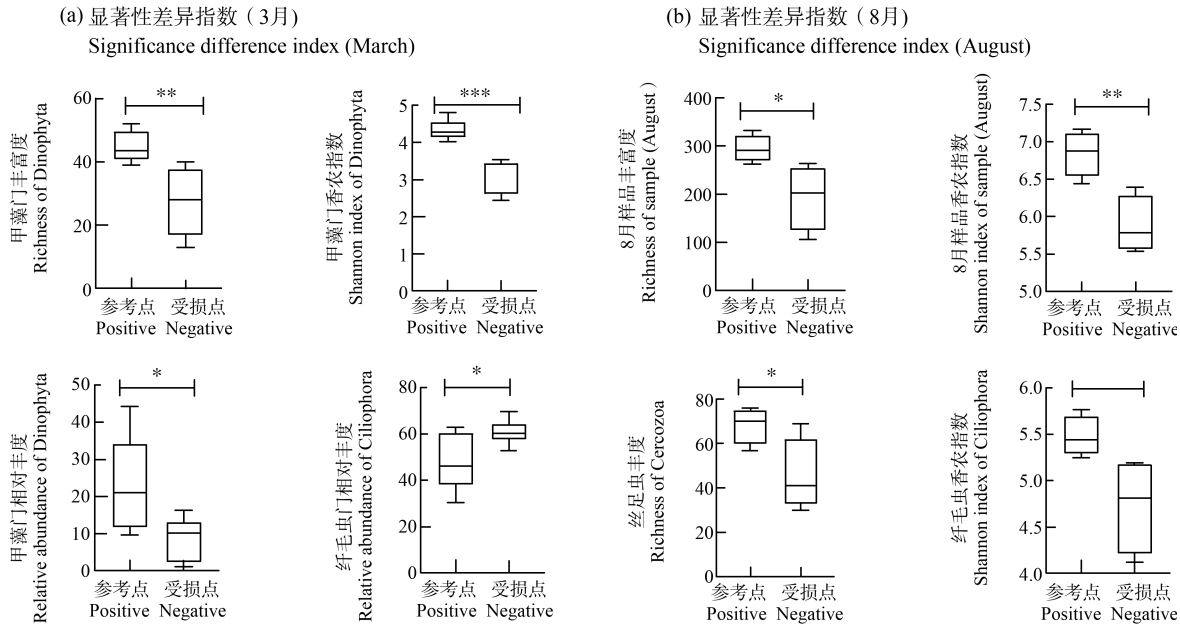

图 8 原生生物完整性差异指数

Fig. 8 Protist community index screening

表 3 指数校正表

Table 3 Index correction table

指数名称 Index name	校正公式 Updating formula
生物多样性指数(3 月) Biodiversity index (March)	
甲藻门丰富度 Richness of Dinophyta	(52−49)/(42−X)
甲藻门香农指数 Shannon index of Dinophyta	(4.808−4.479)/(4.808−X)
甲藻门相对丰度 Relative abundance of Dinophyta	(0.439−0.307)/(0.439−X)
纤毛虫相对丰度 Relative abundance of Ciliophora	30.53%/X
生物多样性指数(8 月) Biodiversity index (August)	
丰富度 Richness	(396−379)/(396−X)
香农指数 Shannon index	(7.25−7.17)/(7.25−X)
纤毛虫香农指数 Shannon index of Ciliophora	(6.36−5.92)/(6.36−X)
丝足虫丰富度 Richness of Cercozoa	(102−95)/(102−X)

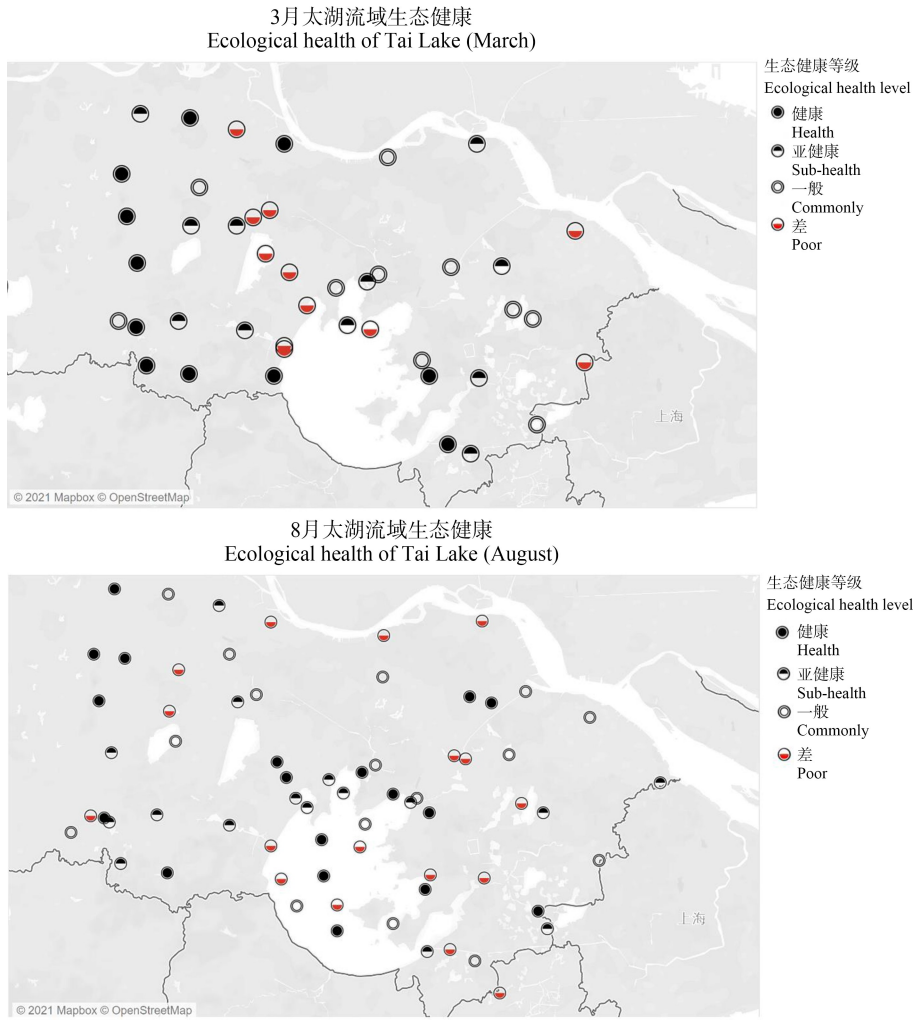

图 9　太湖流域生态健康等级分布

Fig. 9　Distribution of ecological health grades in Tai Lake Basin

表 4　原生生物完整性指数标准

Table 4　Integrity index standard of benthic protist

百分位数 Percentile	健康状态 Health status	完整性指数范围(3 月) Integrity index range (March)	完整性指数范围(8 月) Integrity index range (August)
>75%	健康 Health	>1.436	>0.92
50% ~75%	亚健康 Sub-health	1.3 ~1.436	0.675 ~0.92
25% ~50%	一般 Commonly	1.14 ~1.3	0.47 ~0.675
<25%	差 Poor	<1.14	<0.47

3　讨论(Discussion)

3.1　生物信息数据库

准确的原生生物监测仍然需要进一步完善本土物种 DNA 条形码数据库。由于我国还未建立本土原生生物物种注释数据库,本次原生生物的注释采用的是国际通用的 PR2 数据库,仍然存在无法注释的 OTU,注释结果并不能完全包含太湖流域沉积物原生生物信息,未来尚需开展大规模的本土物种 DNA 信息建库的研究工作。

3.2　eDNA 技术的重复性评价

环境 DNA 宏条形码技术在监测与评价生物系统多样性方面体现出了极大的应用潜力[20],但是关

于该技术对沉积物原生生物监测的重复性与稳定性的研究较少[21]。精准度会影响监测结果在时间尺度与空间尺度上的比较[22],重复性是一个重要的衡量依据,体现了一项监测技术的稳定性与可行度[23]。使用环境 DNA 技术分析的对象主要是 OTU[24],因此基于分类单元的技术重复性分析结果举足轻重。本研究中发现虽然至少在 2 个平行样本中检出的 OTU 的平均交叉率只有 47%,但是基于序列权重的交叉率达到 84.25%,说明平行样本间共有的 OTU 覆盖了绝大多数的优势物种,某一个平行中特有的 OTU 主要为低丰度 OTU,在环境中分布不均匀,并不影响技术重复性研究的最终结论,这一现象侧面反映了环境 DNA 技术具有极高的获取环境中物种信息的能力。

3.3 沉积物原生生物多样性的季节差异

基于 OTU 与基于属计算的原生生物 alpha-多样性指数在丰富度上存在着显著性差异,然而其他指数并不存在类似差异,丰富度指数表示 OTU 的分类单元数,说明 3 月原生生物群落比 8 月具有更多的种,而 8 月原生生物群落在丰度、分布上与 3 月差别并不明显。beta-多样性在季节上差异不显著,这可能是由于沉积物中的环境 DNA 存在随着时间的累积过程,反映的是近段时间内生物组成,另外,相比水样中的 DNA,沉积物 DNA 受外界温度、光照、水流等因素影响更小。

3.4 环境 DNA 技术监测沉积物原生生物的展望

利用水环境中的各种生物多样性参数的指标来评价生境整体的好坏,这些指标被称为水质生物评价参数[25]。国内使用该方法评价生态健康已有 60 多年,相比理化参数,生物指数可以更加直接地指示生态健康。水体中的原生生物主要生活在沉积物中,迁移活动依靠水流等被动作用,因此生物活动位置较其他水体生物稳定[26]。沉积物是污染物长期汇集的场所,易受污染的影响而改变群落结构与生物多样性[27],所以沉积物原生生物群落的各种生物多样性指数可以反映长期以来水环境生态健康状态[28]。

太湖流域一直以来是环境监测评价研究的热点地区,大多数研究基于浮游动植物[29]、水体大型生物如鱼类[30]开展研究,鲜有研究关注沉积物中的原生生物群落[31]。在环境 DNA 技术的支撑下,构建基于原生生物完整性指数用于评价水生态健康[32],使用原生生物完整性指数来评价水生态健康具有一定意义上的方法学补充与数据参考价值[33],但参考点与受损点的选取不可避免存在着研究人员的主观因素,不能完全代表监测区域的水生态健康状态。常规监测中,建议使用沉积物原生生物群落来构建生物完整性指数用于评价长期的生态健康状态。沉积物中污染物浓度与组成更多反映了水环境长期的变化趋势,起伏较低、更为稳定,同时不受光照等影响,底层水温主要受季节变化的影响,温度变化波动较小。

环境 DNA 技术为弥补了传统监测方法的不足[34],不依赖于专业物种鉴定专家,更加快速高效且可标准化,不需要对沉积物原生生物进行培养,降低了时间成本[35],避免了因培养条件限制而遗漏重要物种的可能性。未来通过进一步的技术研发,如数据库完善、方法的标准化,可实现在实际的水生态环境监测和评估上的广泛应用。

通讯作者简介:雷春生(1976—),男,博士,教授,主要研究方向为水体微污染。

共同通讯作者简介:张效伟(1978—),男,博士,教授,主要研究方向为生物多样性监测与生态系统健康评估。

参考文献(References):

[1] Geisen S. Thorough high-throughput sequencing analyses unravels huge diversities of soil parasitic protists [J]. Environmental Microbiology, 2016, 18(6): 1669-1672

[2] Titeux N, Henle K, Mihoub J B, et al. Biodiversity scenarios neglect future land-use changes [J]. Global Change Biology, 2016, 22(7): 2505-2515

[3] Plutzer J, Karanis P. Neglected waterborne parasitic protozoa and their detection in water [J]. Water Research, 2016, 101: 318-332

[4] 李静, 卢文轩, 张雷燕, 等. 夏季蓝藻水华期间太湖河口区和敞水区纤毛虫群落组成及水平分布[J]. 水生生物学报, 2014, 38(5): 860-867
Li J, Lu W X, Zhang L Y, et al. Community compositions and horizontal distribution of ciliates in Lake Taihu during the cyanobacterial bloom in summer [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2014, 38(5): 860-867 (in Chinese)

[5] 沈韫芬, 顾曼如, 龚循矩, 等. 微型生物监测新技术[J]. 北京: 中国建筑工业出版社, 1994: 36-38

[6] 马正学, 宋玉珍, 刘红岩. 用原生动物评价黄河兰州段的水质[J]. 中国环境科学, 1994, 14(6): 401-406
Ma Z X, Song Y Z, Liu H Y. Assessment of pollution in Lanzhou reach of Huanghe River by using protozoan communities [J]. China Environmental Science, 1994, 14

(6): 401-406 (in Chinese)

[7] Robertson L J, Clark C G, Debenham J J, et al. Are molecular tools clarifying or confusing our understanding of the public health threat from zoonotic enteric protozoa in wildlife? [J]. International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife, 2019, 9: 323-341

[8] Rakshit D, Sahu G R, Mohanty A K, et al. Bioindicator role of tintinnid (Protozoa: Ciliophora) for water quality monitoring in Kalpakkam, Tamil Nadu, south east coast of India [J]. Marine Pollution Bulletin, 2017, 114(1): 134-143

[9] Yang J H, Zhang X W. eDNA metabarcoding in zooplankton improves the ecological status assessment of aquatic ecosystems [J]. Environment International, 2020, 134: 105230

[10] Xie Y W, Wang J Z, Yang J H, et al. Environmental DNA metabarcoding reveals primary chemical contaminants in freshwater sediments from different land-use types [J]. Chemosphere, 2017, 172: 201-209

[11] Zhang L J, Yang J H, Li H Z, et al. Development of the transcriptome for a sediment ecotoxicological model species, *Chironomus dilutus* [J]. Chemosphere, 2020, 244: 125541

[12] Li J Y, Su L, Wei F H, et al. Bioavailability-based assessment of aryl hydrocarbon receptor-mediated activity in Lake Tai Basin from Eastern China [J]. The Science of the Total Environment, 2016, 544: 987-994

[13] Xie Y W, Wang J Z, Wu Y, et al. Using *in situ* bacterial communities to monitor contaminants in river sediments [J]. Environmental Pollution, 2016, 212: 348-357

[14] Wu W X, Liu H B. Disentangling protist communities identified from DNA and RNA surveys in the Pearl River-South China Sea Continuum during the wet and dry seasons [J]. Molecular Ecology, 2018, 27(22): 4627-4640

[15] Sweeney B W, Battle J M, Jackson J K, et al. Can DNA barcodes of stream macroinvertebrates improve descriptions of community structure and water quality? [J]. Journal of the North American Benthological Society, 2011, 30(1): 195-216

[16] Martins F M S, Galhardo M, Filipe A F, et al. Have the cake and eat it: Optimizing nondestructive DNA metabarcoding of macroinvertebrate samples for freshwater biomonitoring [J]. Molecular Ecology Resources, 2019, 19(4): 863-876

[17] 李飞龙, 杨江华, 杨雅楠, 等. 环境 DNA 宏条形码监测水生态系统变化与健康状态[J]. 中国环境监测, 2018, 34(6): 37-46
Li F L, Yang J H, Yang Y N, 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)

[18] 高旭, 杨江华, 张效伟. 浮游动物 DNA 宏条形码标志基因比较研究[J]. 生态毒理学报, 2020, 15(2): 61-70
Gao X, Yang J H, Zhang X W. Study on the selection of marker genes in zooplankton DNA metabarcoding monitoring [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2020, 15(2): 61-70 (in Chinese)

[19] 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 (in Chinese)

[20] 孙晶莹, 杨江华, 张效伟. 环境 DNA(eDNA)宏条形码技术对枝角类浮游动物物种鉴定及其生物量监测研究[J]. 生态毒理学报, 2018, 13(5): 76-86
Sun J Y, Yang J H, Zhang X W. Identification and biomass monitoring of zooplankton Cladocera species with eDNA metabarcoding technology [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2018, 13(5): 76-86 (in Chinese)

[21] van der Loos L M, Nijland R. Biases in bulk: DNA metabarcoding of marine communities and the methodology involved [J]. Molecular Ecology, 2021, 30(13): 3270-3288

[22] Sleith R S, Katz L A. Ubiquity or not ubiquity: That is the question [J]. Molecular Ecology, 2019, 28(22): 4842-4844

[23] Keeley N, Wood S A, Pochon X. Development and preliminary validation of a multi-trophic metabarcoding biotic index for monitoring benthic organic enrichment [J]. Ecological Indicators, 2018, 85: 1044-1057

[24] Jiang J G, Shen Y F. Use of the aquatic protozoa to formulate a community biotic index for an urban water system [J]. Science of the Total Environment, 2005, 346(1-3): 99-111

[25] 蔡琨, 张杰, 徐兆安, 等. 应用底栖动物完整性指数评价太湖生态健康[J]. 湖泊科学, 2014, 26(1): 74-82
Cai K, Zhang J, Xu Z A, et al. Application of a benthic index of biotic integrity for the ecosystem health assessment of Lake Taihu [J]. Journal of Lake Sciences, 2014, 26(1): 74-82 (in Chinese)

[26] Delavenne J, Keszler L, Castelin M, et al. Deep-sea benthic communities in the largest oceanic desert are structured by the presence of polymetallic crust [J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 6977

[27] Peralta-Maraver I, Galloway J, Posselt M, et al. Environ-

mental filtering and community delineation in the streambed ecotone [J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 15871

[28] 苏玉, 曹晓峰, 黄艺. 应用底栖动物完整性指数评价滇池流域入湖河流生态系统健康[J]. 湖泊科学, 2013, 25(1): 91-98
Su Y, Cao X F, Huang Y. Stream ecosystem health assessment of inflow rivers in Lake Dianchi Catchment by using Benthic Integrity Biotic Index (B-IBI) [J]. Journal of Lake Sciences, 2013, 25(1): 91-98 (in Chinese)

[29] Dawson J, Pillay D, Roberts P J, et al. Declines in benthic macroinvertebrate community metrics and microphytobenthic biomass in an estuarine lake following enrichment by hippo dung [J]. Scientific Reports, 2016, 6: 37359

[30] Trebitz A S, Hoffman J C, Grant G W, et al. Potential for DNA-based identification of Great Lakes fauna: Match and mismatch between taxa inventories and DNA barcode libraries [J]. Scientific Reports, 2015, 5: 12162

[31] 刘霞, 陆晓华, 陈宇炜. 太湖浮游硅藻时空演化与环境因子的关系[J]. 环境科学学报, 2012, 32(4): 821-827
Liu X, Lu X H, Chen Y W. Long-term evolution of planktonic diatoms and their relationships with environmental factors in Lake Taihu [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2012, 32(4): 821-827 (in Chinese)

[32] 张翔, 张效伟, 杨江华, 等. 应用物种DNA条形码识别太湖流域部分底栖无脊椎动物种类[J]. 环境监控与预警, 2016, 8(6): 18-21, 25
Zhang X, Zhang X W, Yang J H, et al. Applying DNA barcoding for identification of some invertebrate macrozoobenthos at Taihu Lake Basin [J]. Environmental Monitoring and Forewarning, 2016, 8(6): 18-21, 25 (in Chinese)

[33] Stapanian M A, Micacchion M, Adams J V. Wetland habitat disturbance best predicts metrics of an amphibian index of biotic integrity [J]. Ecological Indicators, 2015, 56: 237-242

[34] Abdullah Al M, Xue Y Y, Xiao P, et al. DNA metabarcoding reveals the significant influence of anthropogenic effects on microeukaryotic communities in urban waterbodies [J]. Environmental Pollution, 2021, 285: 117336

[35] Chen W D, Ren K X, Isabwe A, et al. Stochastic processes shape microeukaryotic community assembly in a subtropical river across wet and dry seasons [J]. Microbiome, 2019, 7(1): 138 ◆