

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2020.02.001

基于高通量测序探讨大宁河 不同水华期真核浮游生物群落组成

施军琼, 张明, 杨燕君, 贺新宇,
刘黎, 付君珂, 米文梅

三峡库区生态环境教育部重点实验室/西南大学 生命科学院, 重庆 400715

摘要: 为探究不同水华时期对真核浮游生物群落组成的影响, 对三峡库区大宁河支流水华中、后期进行采样, 通过镜检法对浮游植物进行定性和定量分析, 并利用 Illumina MiSeq 测序平台对真核浮游生物 18S rRNA 基因的 V4 可变区进行测序, 结果表明: 大宁河采样点水华中期(DNH1)优势蓝藻主要为铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)和水华鱼腥藻(*Anabaena flos-aquae*), 而水华末期(DNH2)以隶属硅藻门的直链藻属(*Melosira*)占优势。水华中期和末期真核浮游生物分别涵盖了 9 纲 989 种和 9 纲 922 种。水华中期绿藻纲所占比例最大, 为 34.88%, 水华末期羽藻纲所占比例最大, 为 31.42%。此外, 与中期相比, 水华末期硅藻纲和前口纲的丰度比水华中期高, 但双壳纲和颚足纲的丰度明显降低, 表明不同水华时期, 真核浮游生物群落结构变化显著, 同时, 真核浮游生物群落变化可能影响蓝藻水华的生消过程。

关键词: 水华; 真核浮游生物; 群落结构; 大宁河; 高通量测序

中图分类号: Q948

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2020)02-0001-07

浮游生物群落的多样性对其生存的海洋、湖泊、河流等生态系统结构和功能的多样性起着非常重要的作用, 由于其生命周期短, 对水体的物理、化学等因素变化反应灵敏, 因此被视为水体生态系统质量的“指示剂”^[1-2]。真核浮游生物是水域生态系统的重要组成部分, 丰度很高, 是生命与非生命系统联系的关键环节^[3]。因此, 研究真核浮游生物的多样性, 对于揭示水生生态系统的物质循环和能量流动有着重要的作用。

受全球变暖和人类活动的影响, 水体富营养化进程加快, 导致水体出现水华现象。赵苑等研究了微型浮游生物在整个黄海水华过程中的变化, 聚球藻和微微型浮游生物在水华前期较高, 水华期随着浮游植物的大量暴发, 生物量迅速下降, 直至水华后期, 生物量又有所升高^[4], 表明水华的生消过程对微型及微型浮游生物有一定的影响^[5-6]。然而, 由于真核浮游生物个体微小、形态学鉴定困难, 导致了微型真核浮游生物的研究相对较少。

基于高通量测序技术的 DNA 宏条形码研究使得评估环境样品的生物多样性及复杂的群落结构成为可能^[7]。目前用于真核生物的 DNA 条形码基因包括核基因 ITS、18S rRNA 基因和 28S rRNA 基因等^[8-9]。在辽河干流环境样本的浮游真核藻类研究中, 高通量测序技术和光学显微镜观察的丰度结果类似, 并且高通量测序技术弥补了光学显微镜观察中丢失的种类信息^[10]。

大宁河流域是三峡水库的典型支流之一, 由于内源性营养物的富集和库区蓄水的影响^[11], 大宁河近年来水华暴发频繁, 如 2007—2008 年主要以绿藻、硅藻和甲藻等水华为主^[12], 2010 年春季为拟多甲藻水

收稿日期: 2019-02-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(41877410); 中央高校基本业务费专项资金项目(XDJK2019C044)。

作者简介: 施军琼(1977—), 女, 实验师, 博士, 主要从事藻类生理生化及分子生态学的研究。

华^[13], 2011 年春季为小球藻水华^[14], 2015 年发生以绿藻为优势藻种的水华, 偶尔伴有甲藻、硅藻和隐藻水华^[15]. 虽然大宁河水华的研究被大量报道, 但主要偏向于水华与环境因子关系的研究^[13-14], 而针对蓝藻水华对真核浮游生物群落组成变化的研究还未见报道. 因此, 本研究对大宁河水华发生中、后期进行调查, 利用高通量测序的方法, 分析真核微型浮游生物的多样性及其生物群落结构的变化, 以期为进一步探讨真核浮游生物在水生态系统及蓝藻水华过程中的作用提供参考.

1 材料与方法

1.1 样品采集

样品采集于 2014 年 8 月 1 日和 8 月 18 日. 8 月 1 日, 大宁河入江口出现较大规模的水华过程, 水体呈现蓝绿色, 表现出典型的蓝藻水华特征, 铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)细胞数为 4.15×10^8 个/L, 定为水华发生的中期, 编号为 DNH1; 而 8 月 18 日, 在样点区水体清澈, 水色透明, 微囊藻细胞数为 1.05×10^6 个/L, 定为水华发生的末期, 编号为 DNH2. 因此, 在该处进行水样采集及真核浮游生物的分析. 样品采集点见图 1.

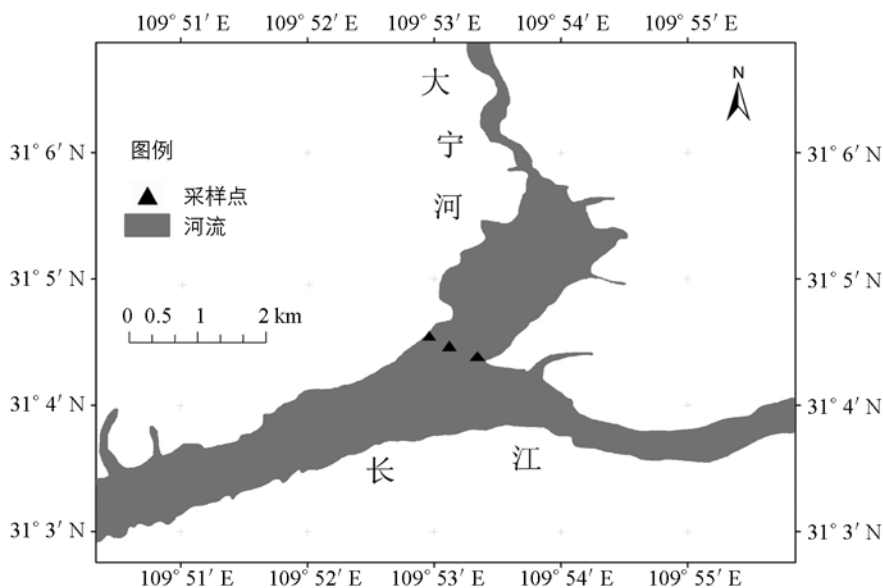


图 1 样品采集点

1.2 理化指标的测定

分别于水华中、后期用多参数水质分析仪 DS5/DS5X (Hydrolab, 美国) 现场测定以下参数: 水温、pH、电导率、溶解氧 (DO)、氧化还原电位 (ORP) 和浊度; 透明度 (SD) 用塞氏盘进行测量. 水体中总氮、总磷、正磷酸盐、铵态氮、硝酸盐氮及可溶性总氮等指标测定方法参照《水和废水监测分析方法》^[16].

1.3 浮游植物的采集及定性和定量分析

浮游植物定性样品用 25 μ 浮游植物网在水体表面呈“ ∞ ”形来回拖动数次, 捞取浓缩藻样并加适量鲁哥氏液现场固定. 定量样品取表层水样 1 L, 用 Lugol 溶液固定后, 沉淀 96 h, 将水样浓缩至 30 mL, 保存并用浮游植物计数框进行计数. 浮游植物定性和定量分析均使用 Nikon E-Ci 显微镜, 物种的鉴定参照中国淡水藻志和《中国淡水藻分类》^[17].

1.4 真核浮游生物群落结构分析

各样点现场所取 250 mL 水样混合后, 经 0.22 μ m 滤膜现场抽滤, 低温下保存, 并送至诺禾致源公司进行 18S rDNA 高通量测序. 经 Illumina MiSeq 测序平台, 利用双末端测序 (Paired-End) 的方法, 构建小片段文库进行双末端测序. 并通过对 Reads 拼接过滤, 为了研究样品物种的组成多样性信息, 用 Uparse 软件 (Uparse v7.0.1001, <http://drive5.com/uparse/>)^[18] 对所有样品的全部 Effective Tags 序列聚类, 以 97% 的一致性 (Identity) 将序列聚类成为 OTUs (Operational Taxonomic Units) 结果, 对获得 OTUs 聚类进行物种注释及丰度分析.

1.5 数据处理及分析

根据 OTU 列表中的各样品物种丰度情况, 应用软件 Mothur 中的 summary. Single 命令, 计算物种丰度指数 Chao 指数和群落多样性指数 Shannon 指数. 对藻类计数结果进行加权求均值, 并采用 EXCEL 及 Orgin 8.6 进行图表的绘制.

2 结果与分析

2.1 水华期浮游植物组成

大宁河水华中期(图 2a), 共检出藻类 5 门 15 属, 包括蓝藻门(3 属), 绿藻门(6 属), 硅藻门(4 属), 甲藻门(1 属), 裸藻门(1 属). 其中所占比例最大的是蓝藻门, 为 84%; 优势种为微囊藻, 所占比例为 62.7%, 其次为鱼腥藻 12.5%. 蓝藻为水华优势种, 主要为微囊藻水华, 细胞数为 4.15×10^8 个/L.

水华末期(图 2b)共检出藻类 4 门 18 属, 其中隶属硅藻门的直链藻属占据优势, 为 35.7%, 其次为隶属绿藻门的绿球藻, 为 32.2%, 而微囊藻仅为 1.6%. 与水华中期相比, 水华优势种发生了更替和变化.

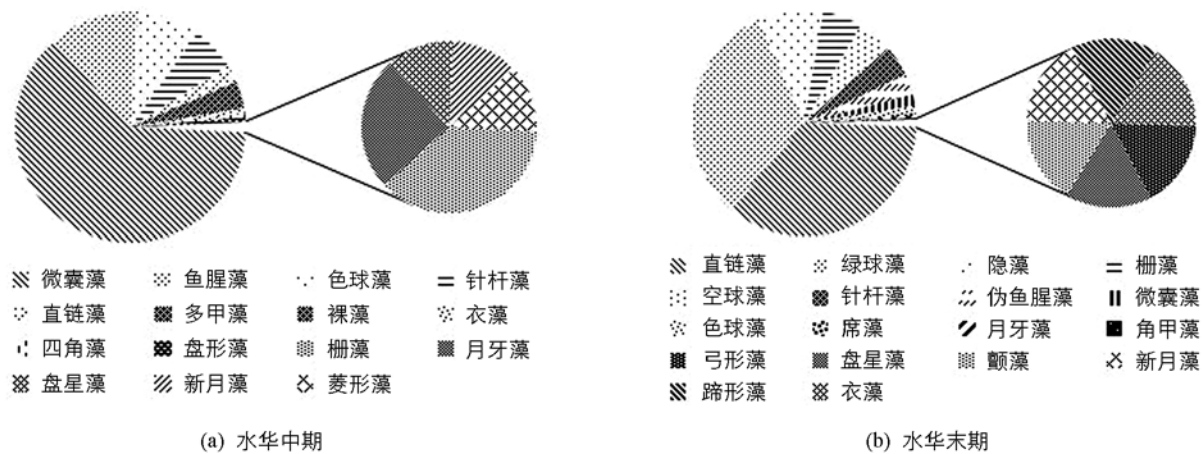


图 2 大宁河浮游植物群落结构组成

2.2 不同水华时期环境变量

2 次采样的主要环境参数的变化见表 1, 大宁河 2 次采样测得的平均透明度分别为 37cm 和 71cm, 差异较大, 第 2 次采样时的 ORP 降低, 总磷和正磷酸盐质量浓度下降, 但 pH 升高, 总氮、可溶性总氮和氨氮质量浓度均增加.

表 1 采样期间理化参数

参数	DNH1	DNH2
温度/℃	26.01(25.96~26.39)	26.09(26.0~27.01)
溶解氧/(mg·L ⁻¹)	7.70(7.55~8.21)	8.03(7.82~8.24)
电导率/(μS·cm ⁻¹)	341(339.17~342.27)	326(321.12~328.27)
pH	7.27(7.12~7.54)	8.03(7.93~8.24)
氧化还原电位(ORP)/mV	424(419.67~426.00)	362(358.73~372.12)
透明度/cm	37(36.5~37.6)	71(70.2~71.4)
总氮/(mg·L ⁻¹)	2.801(2.72~2.87)	3.361(3.29~3.427)
总磷/(mg·L ⁻¹)	0.141(0.137~0.149)	0.117(0.110~0.123)
可溶性总氮/(mg·L ⁻¹)	2.463(2.372~2.587)	3.132(3.029~3.227)
氨氮/(mg·L ⁻¹)	0.065(0.054~0.069)	0.092(0.090~0.094)
硝酸盐氮/(mg·L ⁻¹)	1.108(1.02~1.23)	0.946(0.921~0.967)
正磷酸盐/(mg·L ⁻¹)	0.028(0.023~0.031)	0.012(0.010~0.013)

2.3 测序数据分析

通过 Miseq 高通量测序并优化后,共获得 411 237 条序列,总碱基数为 124 556 800 bp,平均碱基长度为 304 bp,其中 281~380 bp 长度的序列占总序列数的 99.03%(表 2)。

表 2 真核浮游生物有效序列的数量及分布

长度/bp	数量	百分比/%
1—280	1 808	0.44
281—380	407 252	99.03
381—480	2 177	0.53

对测序获得的序列进行随机抽样,利用各样品的测序量在不同测序深度时的 OTU 数目构建曲线,其中 OTU 序列差异水平在 0.03,即相似度为 97%的水平上进行运算。水华中期和末期真核浮游生物稀释曲线随测序数量的增加物种丰度呈现前期增加而后期已逐渐趋于平坦(图 3),说明样本的测序深度足够,可以代表物种的丰度。同时可以看出水华中期 OTU 数量多于水华末期。

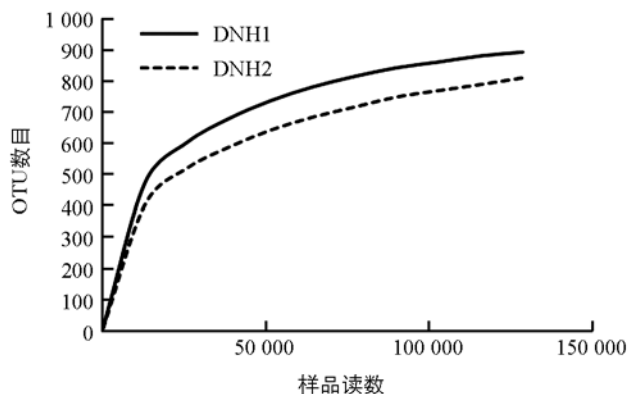


图 3 不同时期真核浮游生物 OTU 稀释曲线

2.4 水华不同时期真核浮游生物的丰度和多样性指数

采用 Qiime, 在 97% 相似度下将其聚类为用于物种分类的 OTUs, 统计各样品在不同 OTUs 中的丰度信息, 2 个样品共产生 1 005 条 OTUs, 共有的 OTUs 数目为 702。通过应用 Mothur 软件计算各样品的丰度和多样性指数, Chao 指数是衡量群落丰度的指数, 水华中期和末期分别为 953.0 和 935.5, 说明水华中期群落丰度较高。对于群落的多样性, 如果每一个体都属于不同的种, 多样性指数就最大; 如果每一个体都属于同一种, 则其多样性指数就最小。水华中期和末期 Shannon 指数分别为 5.505 和 4.922, 水华中期多样性较高(表 3)。

表 3 不同时期真核浮游生物丰度和多样性指数

样品	总序列数	分类序列数	有效序列数	OTU 数	Chao 指数	Shannon 指数
DNH1	197 244	189 454	7 080	989	953.0	5.505
DNH2	211 864	200 710	10 769	922	935.5	4.922

2.5 真核浮游生物群落结构分析

对所得到的 OTUs 进行注释后发现, 分别涵盖了 9 纲 989 种和 9 纲 922 种, 水华中期绿藻纲所占比例最大, 为 34.88%, 水华末期羽纹硅藻纲所占比例最大, 为 31.42% (图 4)。水华鉴定的镜检结果表明水华中期除蓝藻门外即为绿藻门, 水华末期则是硅藻门所占比例最高, 高通量测序结果和镜检结果一致。高通量测序结果注释得到的其他真核浮游生物还有颚足纲、双壳纲、前口纲、旋毛纲、甲藻纲、金藻纲等浮游生物。和水华中期相比, 水华末期的硅藻纲和前口纲的丰度较高, 双壳纲和颚足纲较低(图 4)。

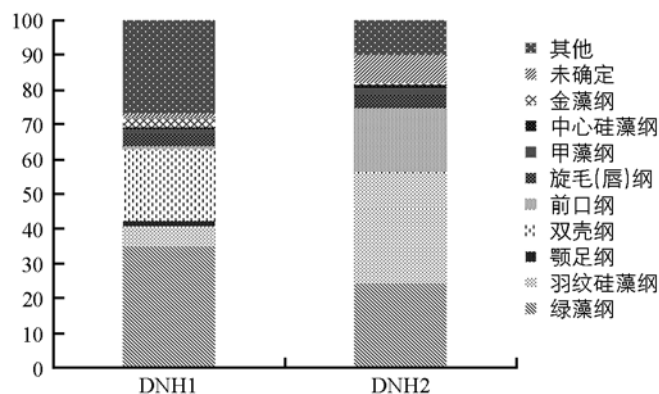


图 4 纲水平上的物种相对丰度柱形图

根据属水平的物种注释及丰度信息, 选取丰度排名前 35 的属及其在样品中的丰度信息绘制热图, 并从分类信息进行聚类找出水华生消过程中聚集较多的物种, 结果见图 5。水华中期主要为衣藻属 *Chlamydomonas*, 硅藻的一个属 *Discostella*, 顶复亚门的一个属 *Colpodella*, 弹跳虫属 *Halteria*; 水华末期主要聚类为 *Pedinomonas*, *Neochlorosarcina*, 隐核虫属 *Cryptocaryon*, 共生甲藻 *Symbiodinium*, 骨条藻属 *Skeletonema*。

tonema, 小环藻属 *Cyclotella* 和 *Teleaulax*. 与水华后期相比, 水华中期纤毛虫类的数量明显增多.

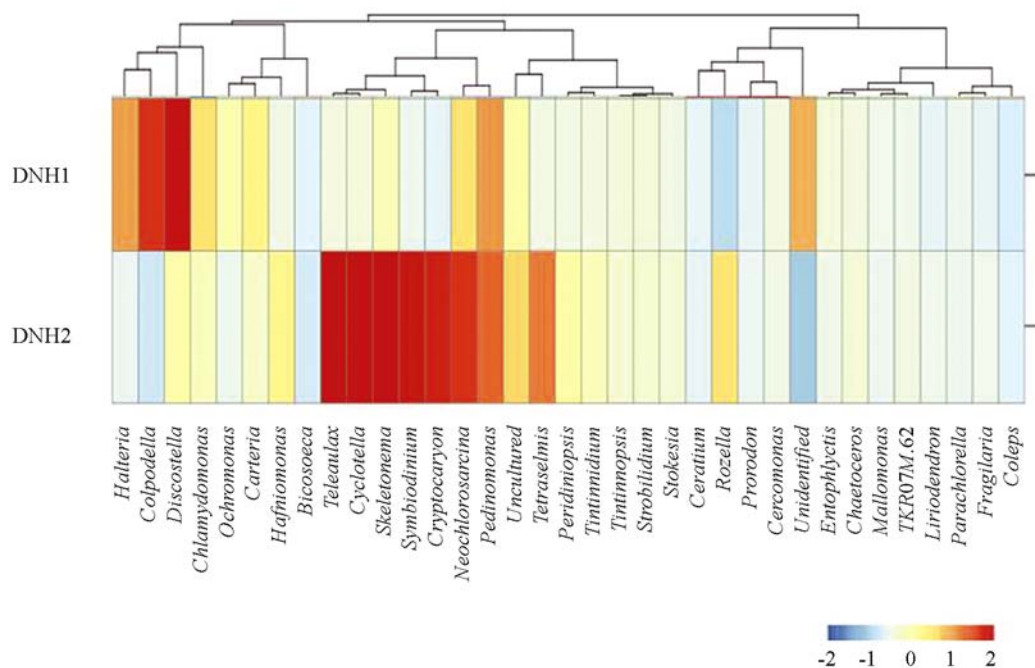


图 5 物种丰度聚类图

3 讨 论

物种的多样性是维持生态系统正常功能的前提条件^[19]. 浮游生物组成群落的多样性影响了海洋、湖泊、河流等生态系统结构和功能的多样性; 同时由于浮游植物生命周期短, 对水体的物理、化学等变化反应灵敏, 因此常用来指示水体生态系统质量^[1-2]. 营养水平是影响微型浮游生物结构组成的主要因子之一^[20], 太湖不同湖区真核浮游生物基因多样性的研究表明, 营养水平较低湖区的多样性高于营养水平高的地区, 占优势的主要是一些鞭毛藻、异养鞭毛虫、纤毛虫和真菌^[21]. 影响真核微型浮游生物群落结构的生物因子主要包括微食物网内部和后生浮游动物的捕食作用. 食物网内部的主要捕食者是纤毛虫和鞭毛虫, 纤毛虫在不同季节是细菌、超微型藻类和鞭毛虫的主要捕食者^[22-23]. 对比本研究两次采集样本的真核浮游生物数目, 水华末期 OTUs 数目和物种数目均较水华中期有所下降, 但在营养水平方面没有明显差异, 主要可能是由水华的不同时期或主要捕食者的差异所导致.

水华是水体富营养化的一种特征, 水华的不同时期对浮游生物群落有一定的影响. 渤海海域微型/微微型浮游植物多样性指数和种类数都是同年 7 月高于 5 月(5 月为褐潮暴发期, 7 月为褐潮暴发后期)^[24]. 秦皇岛褐潮期超微型浮游生物丰度及多样性研究发现, 微微型真核浮游生物在褐潮中期的丰度高于褐潮前期^[25], 这与国内相关研究结果相吻合. 推测其是由于大量微型浮游植物被贝类摄食, 微微型浮游植物获得更大生存空间所致. 而本研究对大宁河水华中期和末期真核浮游生物的研究表明, 水华中期的多样性高于水华末期, 推测浮游生物的丰度和种类受水华种类的影响. 和水华中期相比, 水华末期的硅藻和前口纲(原生动物纤毛虫门)的丰度较高, 但双壳纲(软体动物门)和颚足纲(节肢动物门)较低. 水华中期硅藻丰度低于末期, 主要是由于蓝藻对硅藻有抑制作用^[26], 而中期蓝藻所占比例为 84%. 双壳纲和颚足纲, 并非真核浮游生物, 在本研究被检测出可能是其幼虫. 双壳纲以海藻或浮游生物为食, 对微食物网的影响体现在两个方面: 一是对微食物网各生物类群的摄食, 二是释放营养盐影响微食物网各生物类群的生长. 颚足纲大多数为小型的甲壳动物, 种类繁多, 栖息环境各异.

4 结 论

大宁河水华中期共检出藻类 5 门 15 属, 隶属蓝藻门的微囊藻为优势种, 所占比例为 62.7%; 水华末期

共检出藻类 4 门 18 属, 其中硅藻门的直链藻属占据优势, 为 40.6%。与水华中期相比, 水华优势种发生了更替和变化。水华中期和末期真核浮游生物分别涵盖了 9 纲 989 种和 9 纲 922 种, Chao1 指数分别为 953.0 和 935.5, 说明水华中期群落丰度较高; Shannon 指数分别为 5.505 和 4.922, 水华中期多样性较高。与水华中期相比, 水华末期的硅藻和前口纲的丰度较高, 但双壳纲和颚足纲较低, 表明了水华的种类和丰度显著影响真核生物群落结构。通过高通量测序的方法, 获得了大宁河不同水华时期真核浮游生物群落结构变化的特点, 克服了其难以从形态特征上进行准确分类的困难。

参考文献:

- [1] BIANCHI F, ACRI F, AUBRY F B, et al. Can Plankton Communities be Considered as Bio-Indicators of Water Quality in the Lagoon of Venice [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2003, 46(8): 964-971.
- [2] LI Q, ZHAO Y, ZHANG X, et al. Spatial Heterogeneity in a Deep Artificial Lake Plankton Community Revealed by PCR-DGGE Fingerprinting [J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2015, 33(3): 624-635.
- [3] 孙书存, 陆健健. 微型浮游生物生态学研究概述 [J]. *生态学报*, 2001, 21(2): 302-308.
- [4] ZHAO Y, ZHAO L, XIAO T, et al. Temporal Variation of Picoplankton in the Spring Bloom of Yellow Sea, China [J]. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 2013, 97(12): 72-84.
- [5] HYUN J, KIM K. Bacterial Abundance and Production during the Unique Spring Phytoplankton Bloom in the Central Yellow Sea [J]. *Marine Ecology Progress Series*, 2003, 252: 77-88.
- [6] 赵璧影. 蓝藻水华对真核微型浮游生物群落结构的影响 [D]. 南京: 南京师范大学, 2010.
- [7] POND S K. High Sensitivity of 454 Pyrosequencing for Detection of Rare Species in Aquatic Communities [J]. *Methods in Ecology and Evolution*, 2013, 4(6): 558-565.
- [8] 黄建敏, 李 菲, 刘云静, 等. 青篱柴转录组的高通量测序及分析 [J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2018, 40(4): 25-34.
- [9] KOLOKOTRONIS S O. Evaluating the Ribosomal Internal Transcribed Spacer (ITS) as a Candidate Dinoflagellate Barcode Marker [J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e42780.
- [10] 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.
- [11] 冯 静, 何太蓉, 韦 杰. 三峡工程蓄水前后库区水质变化及对策分析 [J]. *重庆师范大学学报(自然科学版)*, 2011, 28(2): 23-27.
- [12] 郑丙辉, 曹承进, 张佳磊, 等. 三峡水库支流大宁河水华特征研究 [J]. *环境科学*, 2009, 30(11): 3218-3226.
- [13] 洪尚波, 吴光应, 万 丹, 等. 三峡水库大宁河春季水华藻类分布及影响因子 [J]. *水资源保护*, 2012, 28(1): 80-84.
- [14] 刘 敏, 吴光应. 三峡库区大宁河 2010 年和 2011 年春季水华特征研究 [J]. *安全与环境工程*, 2013, 20(1): 100-104.
- [15] 黄亚男, 纪道斌, 龙良红, 等. 三峡库区典型支流春季特征及其水华优势种差异分析 [J]. *长江流域资源与环境*, 2017, 26(3): 461-470.
- [16] 国家环境保护局. 水和废水监测分析方法 [M]. 4 版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
- [17] 胡鸿钧. 中国淡水藻类 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1980.
- [18] FOUILLAND E, MOSTAJIR B. Revisited Phytoplanktonic Carbon Dependency of Heterotrophic Bacteria in Freshwaters, Transitional, Coastal and Oceanic Waters [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2010, 73(3): 419-429.
- [19] ANSOLA G, ARROYO P, SÁENZ DE MIERA L E. Characterisation of the Soil Bacterial Community Structure and Composition of Natural and Constructed Wetlands [J]. *Science of the Total Environment*, 2014(473-474): 63-71.
- [20] LEPERE C, BOUCHER D, JARDILLIER L, et al. Succession and Regulation Factors of Small Eukaryote Community Composition in a Lacustrine Ecosystem (Lake Pavin) [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(4): 2971-2981.
- [21] 陈美军, 孔繁翔, 陈非洲, 等. 太湖不同湖区真核微型浮游生物基因多样性的研究 [J]. *环境科学*, 2008, 29(3): 769-775.
- [22] ZINGEL P, AGASILD H, NÖGES T, et al. Ciliates are the Dominant Grazers on Pico- and Nanoplankton in a Shallow, Naturally Highly Eutrophic Lake [J]. *Microbial Ecology*, 2007, 53(1): 134-142.
- [23] WEISSE T, MÜLLER H, PINTO-COELHO R M, et al. Response of the Microbial Loop to the Phytoplankton Spring

- Bloom in a Large Prealpine Lake [J]. *Limnology and Oceanography*, 1990, 35(4): 781-794.
- [24] 宋 伦, 吴 景, 刘卫东, 等. 渤海褐潮过程生物多样性分析 [C] //中国环境科学学会 2016 年学术年会论文集. 海南海口, 2016: 939-949.
- [25] 马 玉, 汪 岷, 夏 骏, 等. 秦皇岛褐潮期超微型浮游生物丰度及多样性研究 [J]. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2016, 46(6): 142-150.
- [26] KEATING K I. Blue-Green Algal Inhibition of Diatom Growth: Transition from Mesotrophic to Eutrophic Community Structure [J]. *Science*, 1978, 199(4332): 971-973.

Community Structure Characteristics of Eukaryotic Plankton During the Cyanobacterial Blooms Using High-Throughput Sequencing

SHI Jun-qiong, ZHANG Ming, YANG Yan-jun, HE Xin-yu,
LIU Li, FU Jun-ke, MI Wen-mei

Key Laboratory of Eco-environments in Three Gorges Reservoir Region, Ministry of Education/
School of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: To explore the effect of cyanobacterial bloom on the composition of eukaryotic plankton community, a survey was conducted in the Daning river, a tributary of the Three Gorges Reservoir, during the middle and last stages of the bloom. Qualitative and quantitative analyses of phytoplankton were carried out with microscopic examination, and the 18S rRNA gene V4 variable region was sequenced using the 454-pyrosequencing technology. The results indicated that *Microcystis aeruginosa* and *Anabaena flos-aquae* were the most dominant species in the middle stage of the bloom, but *Melosira* belonging to Bacillariophyta was dominant in the last stage. Eukaryotic planktons in the bloom involved 9 classes (989 species) and 9 classes (922 species) at the middle and the last stage, respectively. In the middle stage, Chlorophyceae was the dominant group, accounting for about 34.88% of the total biomass, while Pennatae was the dominant group, accounting for 31.42% of the total, in the last stage. Moreover, compared with that in the middle stage, the abundance of Diatomaceae and Prostomatea increased and the abundance of Bivalvia and Maxillopoda dropped significantly in the last stage, suggesting that a significant change existed in the community of eukaryotic micro-plankton in different stages of the bloom, and the change of the eukaryotic micro-plankton community might have an effect on the fluctuation of cyanobacterial bloom.

Key words: bloom; eukaryotic plankton; community structure; the Daning river; high-throughput sequencing

责任编辑 周仁惠