

方知库
Eco-Environmental
Knowledge Web

环境科学

ENVIRONMENTAL SCIENCE

ISSN 0250-3301 CODEN HCKHDV
HUANJING KEXUE

环境DNA宏条形码监测湖泊真核浮游植物的精准性

张丽娟, 徐杉, 赵峥, 周小华, 冯庆, 杨江华, 李飞龙, 王志浩, 张效伟



■ 主办 中国科学院生态环境研究中心

■ 出版 科学出版社



2021年2月

第42卷 第2期
Vol.42 No.2

目次

2013~2017年中国PM _{2.5} 污染防治的健康效益评估	张梦娇, 苏方成, 徐起翔, 张瑞芹, 魏煜, 谢刘震 (513)
区域气象条件和减排对空气质量改善的贡献评估	武文琪, 张凯山 (523)
2016年1月京津冀地区大气污染特征与多尺度传输量化评估	姚森, 张哈宇, 王晓琦, 杨书申 (534)
广州市2020年春节期间烟花爆竹燃放对空气质量的影响	裴成磊, 王宇骏, 毕燕茹, 廉秀峰, 周倩妮, 王在华, 马理, 李梅 (546)
长三角地区一次区域污染过程中细颗粒物的来源解析及其光学特性	夏丽, 朱彬, 王红磊, 康汉青 (556)
南京市不同天气过程下颗粒物中水溶性离子分布特征及其来源解析	张杨, 王红磊, 刘安康, 陈魁, 张艺馨, 刘思晗 (564)
天津市冬季气溶胶吸湿因子的粒径分布特征	丁净, 张裕芬, 郑乃源, 张会涛, 余卓君, 李立伟, 元洁, 唐森, 冯银厂 (574)
输送、滞留叠加海上回流的长时间沙尘天气影响判断及贡献分析	张哲, 乔利平, 周敏, 黄丹丹, 安静宇, 郭会琴, 王红丽, 黄成, 董赵鑫, 王书肖 (584)
洛阳市秋冬季PM _{2.5} 中多环芳烃的污染特征、来源解析及健康风险评价	齐静文, 张瑞芹, 姜楠, 李利萍, 苗青青 (595)
郑州市臭氧污染变化特征、气象影响及输送源分析	王旭东, 尹沙沙, 杨健, 袁明浩, 张瑞芹, 李亚松, 卢轩 (604)
基于正交试验的臭氧及其前体物的非线性响应及控制方案	李光耀, 陈强, 郭文凯, 张瑞欣, 夏佳琦 (616)
汽车工业区大气挥发性有机物(VOCs)变化特征及来源解析	叶露, 邵菁菁, 俞华明 (624)
兰州市高分辨率人为源排放清单建立及在WRF-Chem中应用评估	郭文凯, 李光耀, 陈冰, 夏佳琦, 张瑞欣, 刘晓, 朱玉凡, 陈强 (634)
2010~2017年四川省机动车污染物排放趋势分析	李媛, 石嘉诚, 陈军辉, 潘玉瑾, 周虹辉, 范武波, 叶宏, 钱骏, 刘政 (643)
珠江三角洲海陆交互沉积物中镉生物有效性及生态风险评价	王芳婷, 包科, 陈植华, 黄长生, 张彩香, 赵信文, 刘学浩 (653)
乌梁素海流域地表水中全氟化合物分布、来源及其生态风险	史锐, 毛若愚, 张梦, 吕永龙, 宋帅, 赵纪新 (663)
乌梁素海冰盖中微塑料的分布特征及其与盐度、叶绿素a的响应关系	王志超, 杨建林, 杨帆, 杨文焕, 李卫平, 李兴 (673)
张家口清水河拦沙坝对磷输移、滞留的影响	王维, 李叙勇 (681)
三峡水库典型支流磷素赋存形态特征及其成因	杨凡, 王丽婧, 纪道斌, 李虹, 李莹杰, 李鑫, 许杨, 田盼, 吴雅婷 (688)
巢湖沉积物氮磷分布及污染评价	王艳平, 徐伟伟, 韩超, 胡维平 (699)
巢湖南淝河河口底泥污染特征及疏浚决策	杨盼, 杨春晖, 马鑫雨, 尹洪斌 (712)
氧化强化对氢氧化钙原位固磷效果的影响	徐楚天, 李大鹏, 岳薇, 吴宇涵, 孙培荣, 汤尧禹, 黄勇 (723)
降雨径流事件对三峡水库香溪河库湾甲烷释放的影响	陈敏, 许浩震, 王雪竹, 肖尚斌 (732)
典型喀斯特河流-水-气界面二氧化碳交换特性及其营养调控因素	刘睿, 张静, 陈祖胜, 倪茂飞, 刘文胜 (740)
江苏省代表性水源地抗生素及抗性基因赋存现状	王飞龙, 程逸群, 胡晓东, 朱金鑫, 李轶 (749)
尾矿库水体环境抗生素抗性基因的分布特征	黄福义, 朱永官, 苏建强 (761)
涡河流域中部地区地下水化学特征及其成因分析	郑涛, 焦团理, 胡波, 龚建师, 侯香梦, 王赫生 (766)
天津七里海湿地水化学组成及主要离子来源分析	何明霞, 张兵, 夏文雪, 崔旭, 王中良 (776)
秸秆覆盖与氮减施对土壤氮分布及地下水氮污染影响	张万锋, 杨树青, 孙多强, 靳亚红, 姜帅, 刘鹏 (786)
环境DNA宏条形码监测湖泊真核浮游植物的精准性	张丽娟, 徐杉, 赵峰, 周小华, 冯庆, 杨江华, 李飞龙, 王志浩, 张效伟 (796)
浮游植物群落及粒径结构对光吸收特性的影响	黄新, 施坤, 张运林, 朱广伟, 周永强 (808)
松花江干流2014~2019年夏季着生藻类群落结构特征及其对环境因子的响应	于宗灵, 陈威, 赵然, 李中宇, 董英莉, 张蕊, 王业耀, 金小伟 (819)
汛期前后老鹳河干流人类干扰下浮游细菌多样性及功能预测	韩雪梅, 龚子乐, 杨晓明, 李玉英, 陈兆进, 朱会会, 王凡梅 (831)
两种典型PPCPs在潜流人工湿地中的季节性去除效果及降解产物	李超予, 杨怡潇, 张宁, 谢慧君, 胡振, 张建 (842)
人工生态系统对城市河流中抗生素和ARGs的去除	周海东, 黄丽萍, 陈晓萌, 李丹妍, 李昕, 崔锦裕 (850)
紫外氯胺组消毒供水系统中病毒微生物的分布特征	韩雪, 孙坚伟, 张力, 王哲明, 白晓慧 (860)
高炉水渣负载硫化纳米零价铁对水中土霉素的去除	孙秋楠, 张荣斌, 邓曼君, 李远, 王学江 (867)
胺硫改性生物炭对水溶液中不同重金属离子的吸附特性及吸附稳定性	汪存石, 何敏霞, 周峰, 陈靛, 祝建中 (874)
电凝聚氧化耦合工艺的有机物处理特性及去除机制解析	谢新月, 许建军, 张少华, 刘雨果, 金鑫, 金鹏康 (883)
微米零价铁对剩余活性污泥和餐厨垃圾厌氧联合消化的加强效果及机制	陈圣杰, 姚福兵, 皮洲洁, 侯坤杰, 何丽, 李小明, 王东波, 杨麒 (891)
河南省典型工业区周边农田土壤重金属分布特征及风险评价	孟晓飞, 郭俊梅, 杨俊兴, 杨军, 郑国砥, 乔鹏炜, 卞建林, 陈同斌 (900)
南京市绿地土壤重金属分布特征及其污染评价	陈佳林, 李仁英, 谢晓金, 王红, 徐静, 邵京, 简静, 阿克居里·乌尔曼, 沈嘉, 央宗 (909)
复合改良剂FZB对砷污染土壤的修复效果	丁萍, 贺玉龙, 何欢, 余江 (917)
石灰配施有机物料修复酸性Cd污染稻田	李光辉, 成晴, 陈宏 (925)
叶面喷施纳米MnO ₂ 对水稻富集镉的影响机制	周一敏, 黄雅媛, 刘晓月, 李冰玉, 刘羽翼, 李卓晴, 王薪琪, 雷鸣 (932)
典型喀斯特地区土壤-作物系统镉的富集特征与污染评价	王锐, 邓海, 贾中民, 严明书, 周蛟, 董金秀, 王佳彬, 余飞 (941)
辣椒果实高中低镉累积型对镉的富集、转运特性及在亚细胞分布特点比较	邵晓庆, 贺章味, 徐卫红 (952)
4种草本植物对镉的富集特征	陈迪, 李伯群, 杨永平, 和兆荣, 李雄 (960)
不同施肥条件下紫色土旱坡地可溶性有机碳流失特征	熊子怡, 郑杰炳, 王丹, 王富华, 王鑫燕, 王子芳, 高明 (967)
降雨变化对荒漠草原植物群落多样性与土壤C:N:P生态化学计量特征的影响	高江平, 赵锐锋, 张丽华, 王军锋, 谢忠奎 (977)
水分管理对水稻生长与根际激发效应的影响特征	林森, 肖谋良, 江家彬, 魏亮, 李科林, 刘守龙, 祝贞科, 葛体达, 吴金水 (988)
铜胁迫对小麦根系微域微生物群落的影响	葛艺, 徐民氏, 徐绍辉, 徐艳 (996)
臭氧污染、氮沉降和干旱胁迫交互作用对杨树叶和细根非结构性碳水化合物的影响	李品, 周慧敏, 冯兆忠 (1004)
颗粒物有机源示踪物的筛选与应用综述	李源速, 吴爱华, 童梦雪, 栾胜基, 李鸷 (1013)
《环境科学》征订启事 (522) 《环境科学》征稿简则 (722) 信息 (748, 899, 924)	

环境 DNA 宏条形码监测湖泊真核浮游植物的精准性

张丽娟¹, 徐杉^{2,3}, 赵峥^{2,3}, 周小华^{2,3}, 冯庆^{2,3}, 杨江华¹, 李飞龙¹, 王志浩¹, 张效伟^{1,2,3*}

(1. 南京大学环境学院, 污染控制与资源化国家重点实验室, 南京 210023; 2. 昆明学院昆明滇池(湖泊)污染防治合作研究中心, 昆明 650214; 3. 昆明市河湖生态健康评估与修复院士工作站, 昆明 650214)

摘要: 环境 DNA(eDNA) 宏条形码(metabarcoding)技术是一种基于分子的生物多样性高效监测手段, 近年来越来越多地被应用于生态环境中生物要素的监测和评估。开展 eDNA 宏条形码监测技术的标准化和规范化研究, 是将其业务化推广应用的前提。本研究以高原湖泊滇池和抚仙湖的真核浮游藻类为研究对象, 探究了基于 18S-V9 宏条形码测序深度对生物多样性监测的影响; 通过分析平行样本间物种分类单元的交叉率及 α 多样性的变异率(coefficient of variation, CV), 评估了 eDNA 宏条形码监测真核浮游藻类结果的精确性。并采用 eDNA 宏条形码监测数据评估了滇池和抚仙湖北部的真核藻类多样性。结果表明: ①测序深度显著影响宏条形码技术检出物种的数目, 适合滇池和抚仙湖北部的 eDNA 真核藻类多样性分析的测序深度为 $\geq 30\,000$ 条; ②重复样品($n=3$)间遗传分类单元(OTU)交叉率达到 $45.97\% \pm 1.67\%$, 可注释分类单元(属)交叉率达到 $64.21\% \pm 3.25\%$, α 多样性的变异率 $< 10\%$ 。③基于现有 DNA 条码数据库, 滇池和抚仙湖北部分别鉴定出真核藻类 75 属和 90 属, 覆盖本地历史记录形态学物种的 62.5% 和 71.05%。④滇池不同水深的真核藻类多样性无明显差异, 抚仙湖的真核藻类多样性具有显著垂直分布特征。和抚仙湖北部相比, 滇池真核藻类多样性显著偏低, 滇池南部的生物多样性明显高于中部和北部($P < 0.05$)。综上, 本研究建立了 eDNA 宏条形码技术监测结果的精确性评价方法, 验证了基于 18S-V9 引物监测真核浮游植物多样性的可行性, 结果可促进 eDNA 宏条形码监测技术推广与应用。

关键词: 环境 DNA(eDNA); 宏条形码; 真核浮游植物; 生物多样性; 精确性

中图分类号: X835 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2021)02-0796-12 DOI: 10.13227/j.hjxx.202007236

Precision of eDNA Metabarcoding Technology for Biodiversity Monitoring of Eukaryotic Phytoplankton in Lakes

ZHANG Li-juan¹, XU Shan^{2,3}, ZHAO Zheng^{2,3}, ZHOU Xiao-hua^{2,3}, FENG Qing^{2,3}, YANG Jiang-hua¹, LI Fei-long¹, WANG Zhi-hao¹, ZHANG Xiao-wei^{1,2,3*}

(1. State Key Laboratory of Pollution Control & Resource Reuse, School of the Environment, Nanjing University, Nanjing 210023, China; 2. Kunming Dianchi Lake Environmental Protection Collaborative Research Center, Kunming University, Kunming 650214, China; 3. Academician Workstation for Ecological Health Assessment and Rehabilitation of Rivers and Lakes in Kunming, Kunming 650214, China)

Abstract: Environmental DNA (eDNA) metabarcoding provides a fast and efficient way to obtain biodiversity information that has been widely used in aquatic biodiversity monitoring and assessment. To facilitate the application of eDNA metabarcoding in China, the accuracy of metabarcoding data needs to be further assessed. Here, the eukaryotic phytoplankton in Dianchi Lake and the northern portion of Fuxian Lake were examined. The effect of sequencing depth on species diversity was also explored, and accuracy was evaluated by comparing the taxon overlap and coefficient of variation (CV) of the α diversity index among biological replicates. The results showed that: ① Sequencing depth significantly affected the taxon number and accuracy of alpha diversity determinations. The suggested sequencing depth for metabarcoding of eukaryotic phytoplankton in Dianchi Lake and Fuxian Lake is at least 30 000. ② The OTU overlap was $45.97\% \pm 1.67\%$ among three biological replicates, the genera overlap was $64.21\% \pm 3.25\%$, and the CV of alpha diversity was less than 10%. ③ Seventy-five and 90 genera of eukaryotic algae were identified in Dianchi Lake and Fuxian Lake, respectively, covering 62.5% and 71.05% of the morphologically detected species, respectively. ④ There was no significant variation in the diversity of eukaryotic algae with depth in Dianchi Lake, while diversity showed significant vertical patterns in Fuxian Lake. Overall, eukaryotic algal diversity was significantly lower in Dianchi Lake compared to Fuxian Lake, and diversity in the southern portion of Dianchi Lake was significantly higher than that in the central and northern portions ($P < 0.05$). Our study demonstrates the feasibility and accuracy of using eDNA-based techniques to monitor eukaryotic phytoplankton diversity, which supports the widespread application of eDNA metabarcoding in China.

Key words: environmental DNA(eDNA); metabarcoding; eukaryotic phytoplankton; biodiversity; precision

环境 DNA(environmental DNA, eDNA)技术基于环境介质中生物遗传物质的分子序列分析, 可实现生物物种的高效识别与监测, 是本世纪以来生物多样性科学发展中最重要的技术进步。eDNA 宏条形码(metabarcoding)技术采用通用引物扩增环境

收稿日期: 2020-07-25; 修订日期: 2020-08-06

基金项目: 国家水体污染控制与治理科技重大专项(2018ZX07208-002)

作者简介: 张丽娟(1993~), 女, 博士研究生, 主要研究方向为分子生态学, E-mail: ljzhang1993@163.com

* 通信作者, E-mail: zhangxw@nju.edu.cn

DNA 中特定基因片段(即 DNA 条形码),借助高通量测序获得 DNA 条形码序列,通过与参考物种数据库比对获取水环境中生物的种类及相对丰度^[1]. 与传统形态学监测方法相比,环境 DNA 技术具有经济高效,流程标准化,重复性好和同时揭示遗传多样性和物种多样性等优势,是一种潜在补充甚至替代传统形态学的生物监测方法^[1,2]. 环境 DNA 宏条形码技术在对生态系统观测与评估的理论研究方面已经展现出极大的作用与价值. 然而,目前尚缺乏对该方法的标准化和规范化研究,严重限制了其在可考核的生态环境监测体系中的应用与推广.

规范化的 eDNA 宏条形码监测方法不仅可以实现对生态环境中物种丰富度的精准记录,而且可实现大尺度生物监测数据的跨时空比较,助力基于生物指数的水生态健康评价. 基于 eDNA 宏条形码技术生物多样性监测误差受多方面技术参数因素影响,如采样方法和体积、PCR 扩增(引物选择)、测序(测序平台和测序深度)及生物信息学过程(如数据筛选、OTU 聚类方法和 DNA 条形码数据库)等^[2]. 目前不同实验室开展 eDNA 研究选用的参数均不统一,难以实现跨实验室监测数据的整合与比较. 以真核浮游植物为例,eDNA 研究采集的水样体积在 50 mL~3 L 不等,但大多数研究的过滤水样小于 500 mL,选择的滤膜孔径范围包括 0.22~68 μm ^[3~6]. 目前用于真核浮游植物识别的 DNA 条形码区域包括核基因的 ITS、18S rDNA、28S rDNA 和叶绿体 *rbcL* 基因等^[7,8],其中 18S rDNA 基因具有更高的物种覆盖率及较为完善的条形码数据库,已被广泛应用于监测海洋和淡水真核藻类的组成结构^[4,8,9]. 不同研究中样品的测序深度相差超过 1 个数量级(3 000~100 000 条),不同生态系统的物种丰富度不同,所需的测序深度也有所不同. 目前,SILVA 数据库是国际上通用的核糖体小亚基 DNA 条形码数据库,其中 PR2 是专门针对 18S rDNA 条形码的数据库^[10],也有团队通过构建本土物种 DNA 条形码数据库以提高 eDNA 监测物种的准确性^[11,12]. 因此,建立统一和规范化的 eDNA 宏条形码技术监测流程具有重要的意义与价值.

建立 eDNA 宏条形码生物监测技术的精准度评价方法,是实现 eDNA 生物监测数据的质量控制的前提. 精准度是衡量监测技术结果可靠性的重要指标,它不仅体现了数据的稳定性和可信度,同时会影响跨时间和空间上监测数据的比较,并影响监测评价结果. 精准度包括精确性(重复性)和准确性(真实性),精确性指重复测量值之间的偏差,准确性指测量值和真实值之间的差距^[13]. 精确性越高,证明

监测方法更稳定,监测结果更可信. 但是目前我国的水生生物监测研究主要依赖基于形态学的调查方法,尚未明确系统地提出精确性计算方法及质量控制^[13~15]. 由于真实环境中的生物多样性未知,因此多用精确性来反映生物多样性监测方法的可靠性. 生物监测精确性的检验需同时考虑其生物重复和技术重复. 生物重复的精确性即在同一位点采集平行样品,分别进行实验处理所获得结果的偏差;技术重复的精确性则指对同一个生物样品做多次相同处理所获得结果的偏差^[16]. 对于单个环境 eDNA 样品,宏条形码技术直接获得的数据包括遗传分类单元(OTUs)数及其相对丰度、可注释的物种分类单元及其相对丰度. 根据这些技术数据特征,可计算单个位点物种多样性指数,包括物种丰富度、香农指数和 Pielou 均匀度等. 这些指数是衡量一个位点生物多样性最为常用的指标,也被用于评估水生态健康状况,比如,通过比较监测位点和参考位点之间的多样性指数,评价所监测位点水生态的好坏^[17~19]. 因此 eDNA 监测的精确性评价应包括遗传分类单元、可注释的物种分类单元及相应多样性指数等方面的评估.

本文以高原湖泊滇池和抚仙湖的真核浮游植物为研究对象,采用 eDNA 宏条形码生物监测技术监测真核浮游植物多样性的规范化流程,对两个湖泊的样品进行深度测序,获取适合滇池和抚仙湖藻类监测的测序深度;分别在遗传分类单元(OTU)和可注释物种分类单元(属水平)评估 eDNA 监测结果的精确性;根据以上研究结果对监测数据进行质量控制,最终获得滇池和抚仙湖的真核藻类图谱,对比和形态学监测结果的一致性;揭示滇池和抚仙湖真核藻类多样性的空间分布差异,探究并验证 eDNA 宏条形码技术监测我国湖泊真核浮游植物多样性的可行性.

1 材料与方法

1.1 生物监测位点选择

滇池是我国云南省最大的高原浅水型淡水湖泊,属长江流域金沙江水系. 随着周边城市化进程加速,滇池污染日益严重,为我国典型的富营养化湖泊^[20];抚仙湖为云南省第三大高原湖泊,发源于珠江水系,为深水型湖泊(最深处 ≥ 20 m),是典型的贫营养性湖泊^[21]. 本研究选取滇池的 12 个位点及抚仙湖北部的 4 个位点(FN1~FN4)收集水样(图 1). 基于地理和污染特征将滇池的位点分为滇池北(DN1~DN4)、滇池中(DM1~DM4)和滇池南(DS1~DS4)这 3 个区域. 其中滇池北部以建成的昆明主

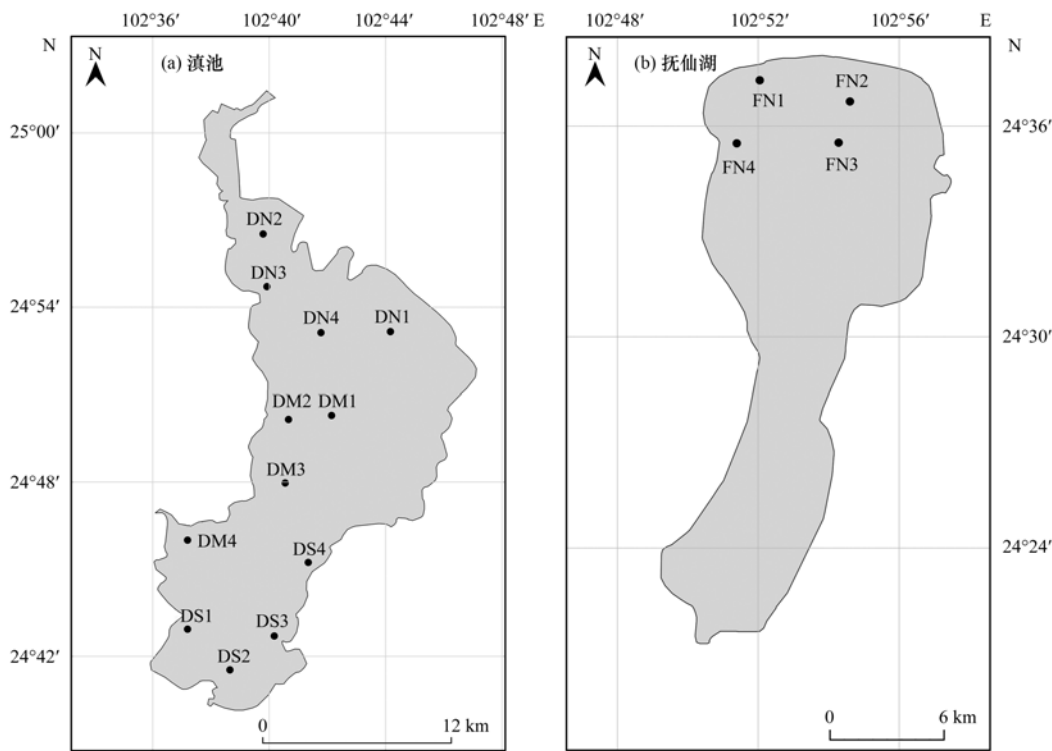


图1 采样位点分布示意
Fig. 1 Sampling sites in the study area

城区为主,滇池中部主要为正在建设的呈贡新区及旅游业为主,滇池北部则主要以农业种植为主^[22].

1.2 真核浮游植物 eDNA 宏条形码生物监测技术流程
具体的研究过程参照图 2.

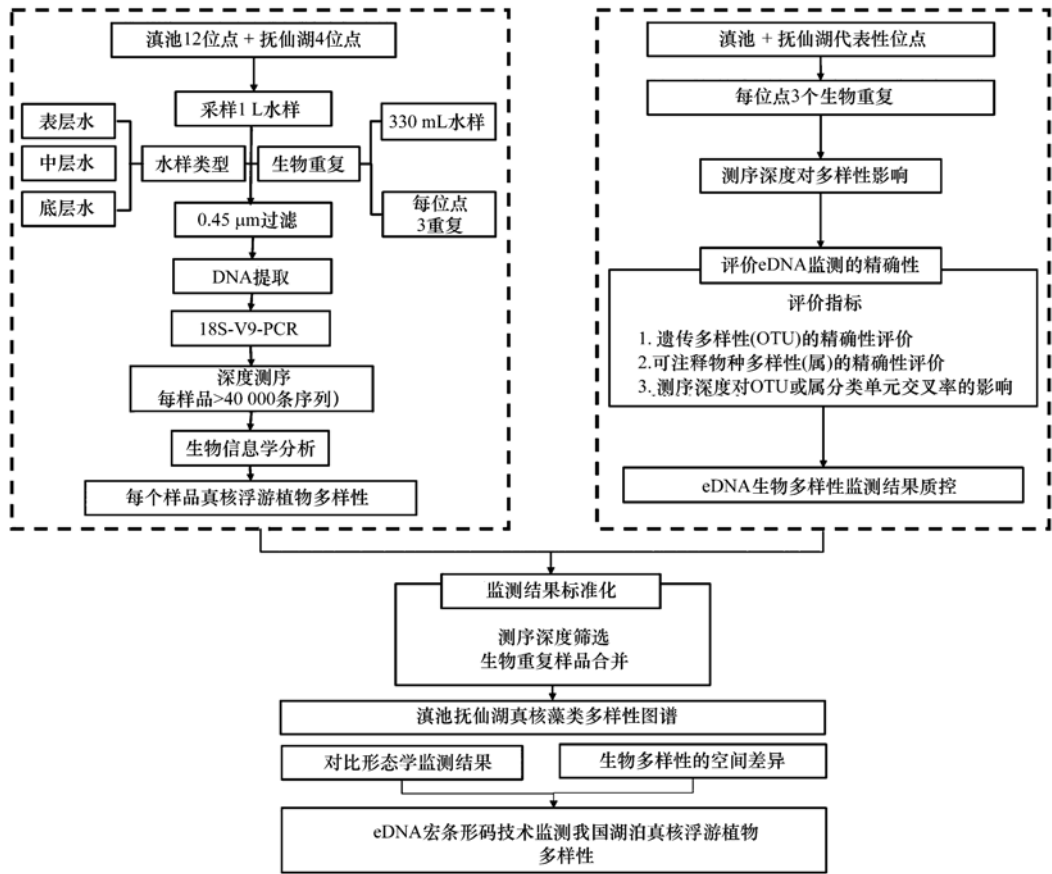


图2 本研究技术路线示意

Fig. 2 Flow chart for this study

1.2.1 环境 DNA 样品采集

每个点位采集水样 1 L. 为了分析不同水层的物种组成差异, 滇池 DN1 位点分别于水下 0.5 m (表层)、2 m (中层) 和 4 m (底层) 采集水样; 抚仙湖 FN1 位点于水下 0.5 m (表层)、10 m (中层) 和 20 m (底层) 分别采集水样. 每升水样分别过滤到 3 张 0.45 μm 的亲水性尼龙膜 (Merck Millipore, 美国), 即每张滤膜过滤水样 330 mL, 每个点位 3 个生物重复. 富集环境 DNA 的滤膜分别装入 5 mL 的离心管中, -20°C 保存.

1.2.2 DNA 提取及 PCR 扩增

采用 DNeasy PowerWater Kit 试剂盒 (QIAGEN, 德国) 提取环境 DNA. 利用通用引物 1380F 和 1510R 扩增真核浮游植物 18S rDNA 基因的 V9 区域, 扩增引物为 1380F: 5'-TCCCTGCCHTTTGTACA CAC- 3', 1510R: 5'-CCTTCYGCAGGTTACACCTAC- 3' [23]. PCR 扩增体系为 50 μL : 25 μL Phanta 聚合酶 (诺唯赞), 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 上游和下游引物各 1 μL , 2 μL 的模板 DNA 和 21 μL 的无酶水. PCR 反应在 SureCycler 8800 热循环仪 (Agilent Technologies, USA) 上进行. 反应程序为 98°C 预变性 30 s, 25 个循环反应, 98°C 变性 10 s, 59°C 退火 20 s, 72°C 延伸 10 s. PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测条带, 之后用 E. Z. N. A. TM E-Z 96 $\times$ 5 Cycle Pure Kit (OMEGA) 试剂盒纯化样品, 用 Qubit 2.0 测定纯化后 DNA 浓度.

1.2.3 文库构建及测序

每个纯化后 PCR 产物根据 100 ng 等量混合, 取混库后的 DNA 样品再次纯化 Agencourt AMPure XP kit (Becman Coulter, 美国), 利用 Ion Plus Fragment Library Kit 试剂盒 (Life Technologies, 美国) 构建测序文库. 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, 美国) 检测 DNA 文库质量. 将测序文库稀释至 100 $\text{pmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 采用试剂盒 Ion 540TM Kit-OT2 (Life Technologies, 美国) 将测序文库连接到 ISPs (ion

sphere particles) 的表面, 用 Ion S5TM 测序仪 (Life Technologies, 美国) 测序, 保证每个样品的序列数不少于 4 万条.

1.2.4 生物信息学分析

利用软件 MOTHUR 将 FASTQ 格式的文件转为 FASTA 和对应的质量文件; 在综合计算平台 QIIME (quantitative insights into microbial ecology v1.8.0) 上根据 barcode 不同分割样品序列, 进一步去除测序错误率高于 1%, 长度小于 100 bp 及出现次数小于 2 的序列. 用 USEARCH7 按照 97% 的相似性将序列聚类成可操作分类单元 (operational taxonomic units, OTUs), 并将其比对到公共数据库去除嵌合体, 序列比对归类到每个 OTU, 获得每个 OTU 在每个样品中的序列数. 基于 Python 语言对 OTUs 根据 PR2 数据库 (<https://github.com/pr2database/pr2database>) 进行物种注释 [24], 注释到真核藻类各个门的 OTUs 定义为真核藻类 OTUs, 进一步根据文献 [25] 中的藻类物种名录, 筛选中国淡水真核藻类 OTUs.

1.3 统计分析

1.3.1 α 多样性指数分析

在 R 语言中 Bioconductor 环境下, 用软件包 “vegan” 计算真核藻类群落的丰富度 S、

香农指数 [Shannon 指数, $H = - \sum (P_i)(\ln P_i)$], 式中 P_i 为此物种个体数占总个体数比例] 和 Pielou 均匀度 ($J = H/\ln S$). 单因素方差分析生物重复间多样性指数的差异.

1.3.2 测序深度对 OTU 或属数目及精确性影响

分别选择滇池 DN1 和抚仙湖 FN1 位点的表层水样进行深度测序, 每个样品序列数均大于 8 万条. 在 R 语言中用 “vegan” 包对每个样品序列按照 2 000 的等差测序深度随机抽样 100 次, 获得每个测序深度对应的真核藻类 OTU 或属数目, 在 Graphpad Prism 8 中绘图.

1.3.3 精确性评价指标计算

(1) 平行间 OTU 或属的交叉情况

$$3 \times \text{共有 OTU 或属数目} / (\text{平行 A 的 OTU 或属数目} + \text{平行 B 的 OTU 或属数目} + \text{平行 C 的 OTU 或属数目})$$
 基于权重的 OTU 或属交叉率 =

$$\frac{\text{平行 A 共有 OTU 或属序列数} + \text{平行 B 共有 OTU 或属的序列数} + \text{平行 C 共有 OTU 或属的序列数}}{\text{平行 A 序列数} + \text{平行 B 序列数} + \text{平行 C 序列数}}$$

至少出现在两个平行中的 OTU 或属交叉率 =

$$\frac{2 \times \text{只在两个平行共有的 OTU 或属数目} + 3 \times \text{三个平行共有的 OTU 或属数目}}{\text{平行 A 的 OTU 或属数目} + \text{平行 B 的 OTU 或属数目} + \text{平行 C 的 OTU 或属数目}}$$

(2) α 多样性的变异系数 (CV 值)

分别基于生物重复在 OTU 水平和属水平的丰富度, 香农指数和 Pielou 均匀度计算变异

系数.

$$\text{变异系数 CV} = \frac{\text{标准差}}{\text{平均值}}$$

1.3.4 不同空间尺度的生物多样性差异

单因素方差分析不同水深及不同区域生物多样性指数的差异,在 Graphpad Prism 8 中绘图.

2 结果与分析

测序共获4 426 086条原始序列,对原始序列过滤处理,获得高质量序列4 392 050条. DN1 和 FN1 表层水 6 个样品的平均序列89 560条,其余样品序列分布在41 642 ~ 47 000条. 对高质量序列进行 OTU 聚类,共获得3 960个 OTUs,其中有2 658个 OTUs 能被数据库注释,属于真核浮游藻类的 OTU 共1 040个,占总注释 OTUs 的 39.13%. 有 765 个 OTU 能被注释到属水平,占总序列数的 32.40%.

2.1 测序深度对 OTU 和属分类单元数目的影响

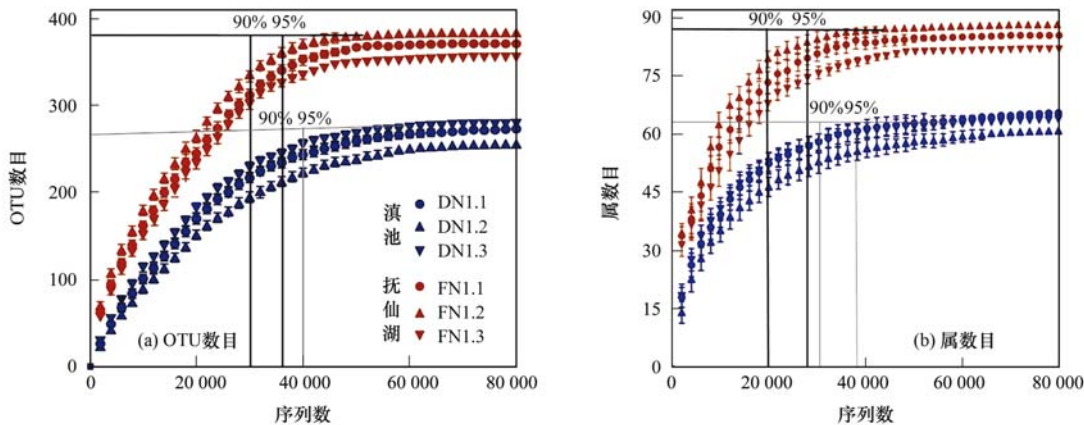


图3 真核藻类分类单元数目随着测序深度的变化

Fig. 3 Taxon number of Eukaryotic phytoplankton at different sequencing depths

2.2 基于环境 DNA 宏条形码监测生物多样性的精确性评价

2.2.1 遗传多样性(OTU)的精确性评价

3 个生物平行样品中均出现的 OTU 交叉率达到 45.97% ± 1.67%,至少在两个平行样中出现的 OTU 所占比例为 68.01% ± 1.98%. 3 个平行样品考虑序列数目权重的 OTU 交叉率达到 92.83% ±

对典型位点 eDNA 样品宏条形码深度测序结果的分析表明,随着测序深度的增加,获得的 OTU 和属数目均在不断增加,最后趋于平缓. 滇池 D1 监测到 266 个真核藻类 OTU, 36 000和40 000的测序深度可分别捕捉 90%和 95%的 OTU,当测序深度达到 38 000,稀释性曲线基本饱和. 抚仙湖 FN1 点位共发现 OTU 数目 374 个,当测序深度达到30 000和 36 000,检出 OTU 的数目分别达到 90%和 95%,当测序深度达到36 000,稀释性曲线基本饱和. 滇池 DN1 点位平均识别真核藻类 62 个属, 90%和 95%以上的属分别需要的测序深度是30 000和38 000条序,抚仙湖 FN1 位点的 OTU 平均注释到 83 个真核藻属,测序深度为20 000和28 000可分别获得 90%和 95%的属(图 3).

2.74% (表 1).

单因素方差分析显示生物重复之间的 OTU 多样性无显著差异 ($P > 0.1$). 基于多样性指数计算生物重复之间 OTU 多样性的 CV 值,丰富度的 CV 值为 7.54% ± 2.60%,香农指数和 Pielou 均匀度的 CV 值分别为 2.82% ± 1.70% 和 3.55% ± 1.59%,均低于 5% [表 1 和图 4(a)].

表 1 eDNA 宏条形码监测数据的精确性评价结果/%

Table 1 Biodiversity Precision assessment based on eDNA metabarcoding data/%

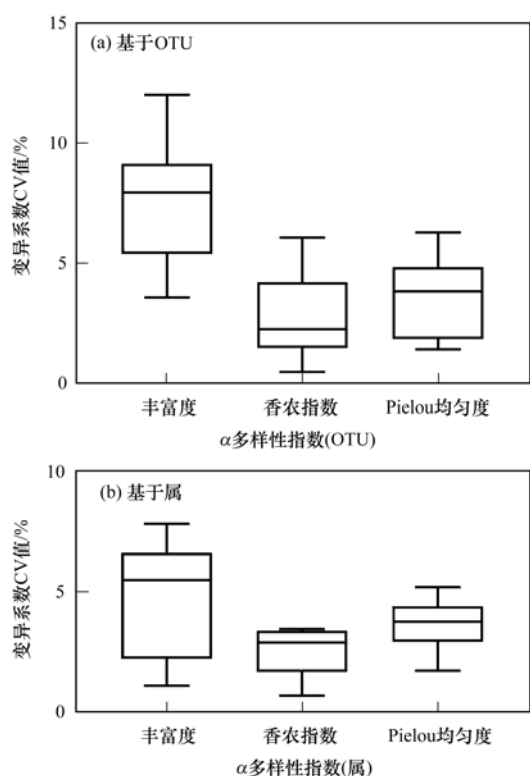
项目	分类单元交叉率		α 多样性指数 CV 值		
	3 个平行均出现	至少出现在两个平行	丰富度	香农指数	Pielou 均匀度
OTU 数目	45.97 ± 1.67	68.01 ± 1.98	7.54 ± 2.60	2.82 ± 1.70	3.55 ± 1.59
属数目	64.21 ± 3.25	84.16 ± 3.76	4.71 ± 2.30	2.51 ± 0.98	3.63 ± 0.95

2.2.2 可注释物种多样性(属分类单元)的精确性评价

在属水平上,3 个平行样品的交叉率达到 64.21% ± 3.25%,至少出现在两个平行样的属所占比例为 84.16% ± 3.76% (表 1). 若考虑序列数目权重,则 3 个平行样品的属交叉率达到 98.41% ±

0.51%.

单因素方差分析显示生物重复之间的属 α 多样性无显著性差异 ($P > 0.1$). 在属水平,丰富度的 CV 值为 4.71% ± 2.30%,香农指数和 Pielou 均匀度的 CV 值分别为 2.51% ± 0.98% 和 3.63% ± 0.95%,均小于 5% [表 1 和图 4(b)].

图4 基于 OTU 和属的 α 多样性指数的精确性Fig. 4 Degree of precision of α biodiversity index

2.2.3 测序深度影响 OTU 或属交叉率

Pearson 相关性分析显示在测序深度小于30 000 时,序列数和分类单元的交叉率显著正相关,其中与 OTU 水平的相关性更加明显(OTU 水平: $R^2 = 0.527$, $P < 0.0001$; 属水平: $R^2 = 0.288$, $P < 0.0003$). 随着测序深度的增加,交叉率也会逐渐平稳饱和. 当序列数为2 000 时,平行间 OTU 交叉率为 $26.81\% \pm 4.37\%$,当序列数达到30 000 时,OTU 交叉率为 $42.69\% \pm 1.78\%$,基本达到饱和. 属交叉率明显高于 OTU 交叉率,当测序深度为2 000 时,平行间属交叉率为 $41.46\% \pm 6.56\%$,测序深度达到22 000 时,属交叉率达超过67%,变化趋于平缓(图5).

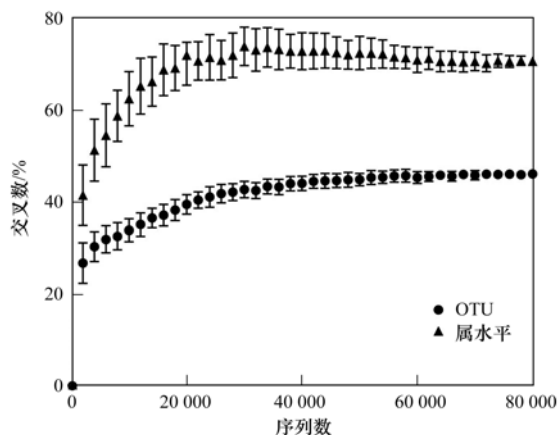


图5 生物重复间 OTU 或属水平的交叉率随测序深度的变化

Fig. 5 Overlap of OTU or genera among biological replicates at different sequencing depths

2.3 eDNA 宏条形码监测高原湖泊真核浮游植物多样性

2.3.1 eDNA 宏条形码监测滇池和抚仙湖真核浮游植物组成

eDNA 宏条形码共检出真核藻类 110 属,分属于 9 门 16 纲 32 目 66 科,其中绿藻门的种类最丰富,共识别出 30 科 53 属,在种类数量上占有绝对优势,和已有形态学研究结果一致. 角甲藻、衣藻和多甲角藻识别出的 OTUs 数目最多,冠盘藻和小环藻属次之. 冠盘藻、栅藻和裸甲藻的序列数最多,占真核藻类序列数的 30% 以上,其次为衣藻和隐藻属(图6).

滇池共监测到真核藻类 75 个属,分属于 8 门 13 纲 23 目 49 科. 其中绿藻门和硅藻门为主要优势类群,绿藻门有 33 属,占总序列数的 40.27%,共识别硅藻 14 属,占总序列数的 41.67%. 优势属为冠盘藻、栅藻和隐藻属(图6).

抚仙湖 10 个位点监测到真核藻类 90 个属,分属于 9 门 13 纲 29 目 56 科,绿藻门和硅藻门物种丰富度最高,绿藻门包含 42 个属,硅藻门 16 个属. 甲藻门相对丰度最高,占总序列的 40.94%,其次为硅藻门. 绝对优势种为裸甲藻属和衣藻属(相对丰度 $> 10\%$),其次为栅藻,多甲藻,原甲藻和金色藻属(图6).

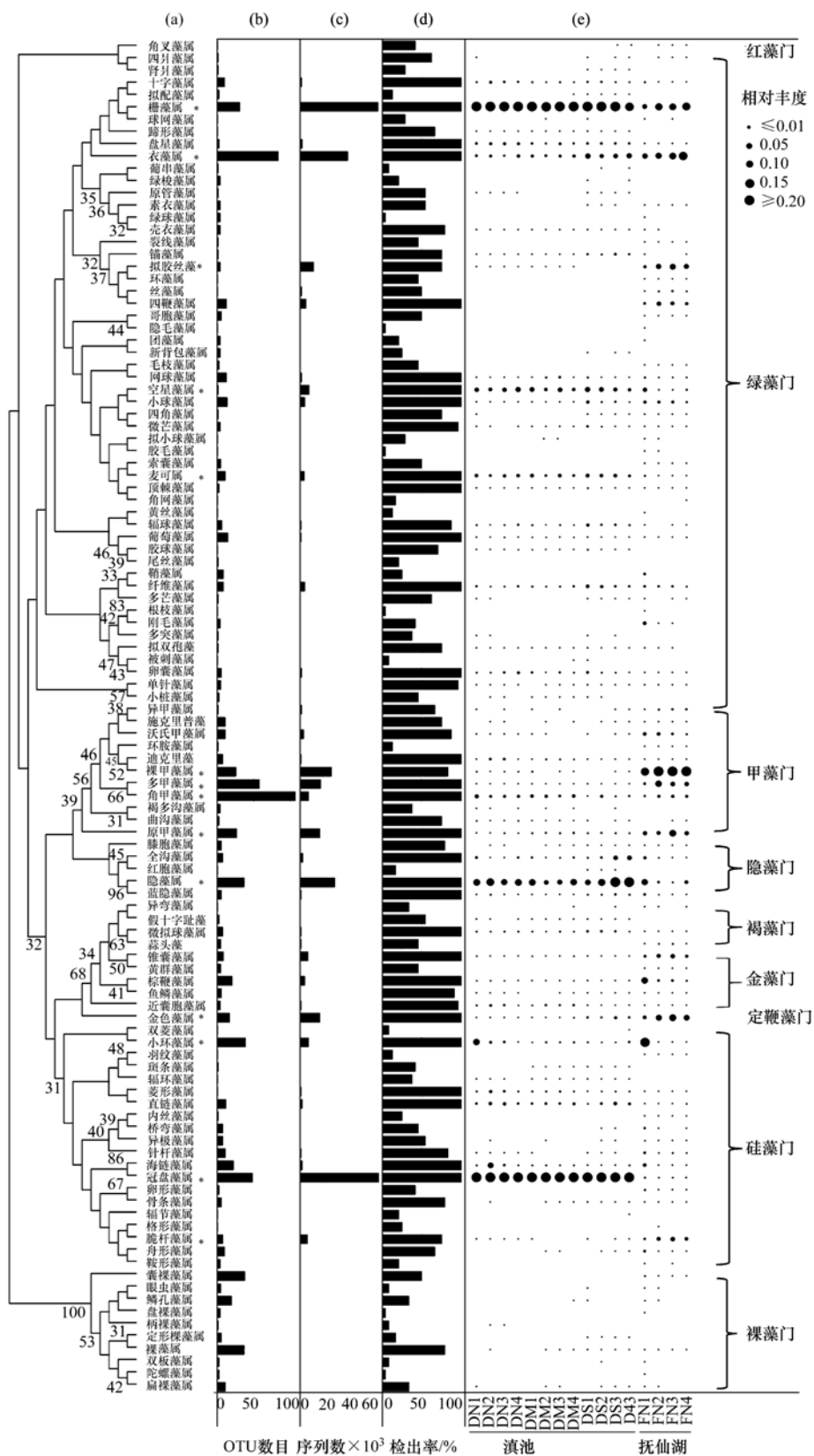
2.3.2 eDNA 宏条形码和传统形态学监测结果的比较

eDNA 宏条形码覆盖了滇池 62.5% 和抚仙湖 71.05% 的形态学监测数据,表明两种方法监测结果具有较高一致性(图7). 同时 eDNA 宏条形码检测到金藻门,褐藻门和定鞭藻门等显微镜鉴定未识别的类群. eDNA 识别滇池的真核藻类 75 属,包含王华等^[20]于 2016 年在滇池相似位点识别出 24 属真核藻类的 15 属. 抚仙湖 eDNA 识别 90 个真核藻类的属,覆盖了形态学识别出的 38 个真核藻属的 27 种^[26]. 滇池和抚仙湖通过传统形态学监测到的共有属 19 种,其中 14 种能被 eDNA 识别.

2.4 不同空间尺度生物多样性的差异

2.4.1 生物多样性的垂直差异

滇池 DN1 位点不同水深的真核藻类多样性无明显差异,抚仙湖 FN1 位点的真核藻类多样性具有显著垂直分布特征. 滇池属于浅水型湖泊,分别取 0.5、2 和 4 m 水深的样品进行生物多样性分析,基于 OTU 计算的真核藻类香农指数存在显著性差异($P = 0.015$),其余多样性参数无明显差异($P > 0.05$). 基于抚仙湖 FN1 位点的不同水深 OTU 数据获得的丰富度,香农指数和 Pielou 均匀度均存在显



(a) 基于条形码序列的系统进化关系,进化距离依据 K2P 模型计算,进化树构建基于邻接法; (b) 每个属对应的 OTU 数目; (c) 每个属对应的序列数; (d) 属的检出频率; (e) 属在每个点位的分布情况,点的大小代表特定属在该点位的相对丰度

图 6 eDNA 宏条形码监测表征的真核浮游植物群落

Fig. 6 Eukaryotic phytoplankton community composition characterized using eDNA metabarcoding

著性差异($P < 0.05$), 10 m 左右水层真核藻类的种类最丰富,生物多样性最高,均匀度也略高,其次为

表层水. 在可注释分类单元属水平,中层水(10 m)的真核藻类多样性显著高于表层水和底层水,但是

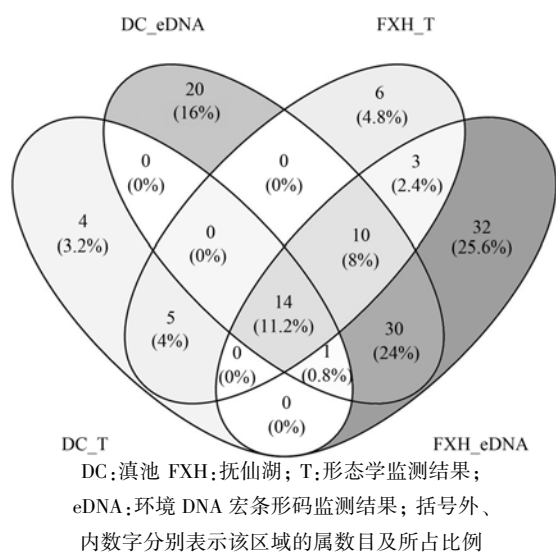


图7 eDNA 宏条形码和形态学监测真核浮游植物在属水平的比较
Fig. 7 Comparison of metabarcoding data with traditional monitoring data at the genus level

表层水和底层水的生物多样性无显著差异(图8).

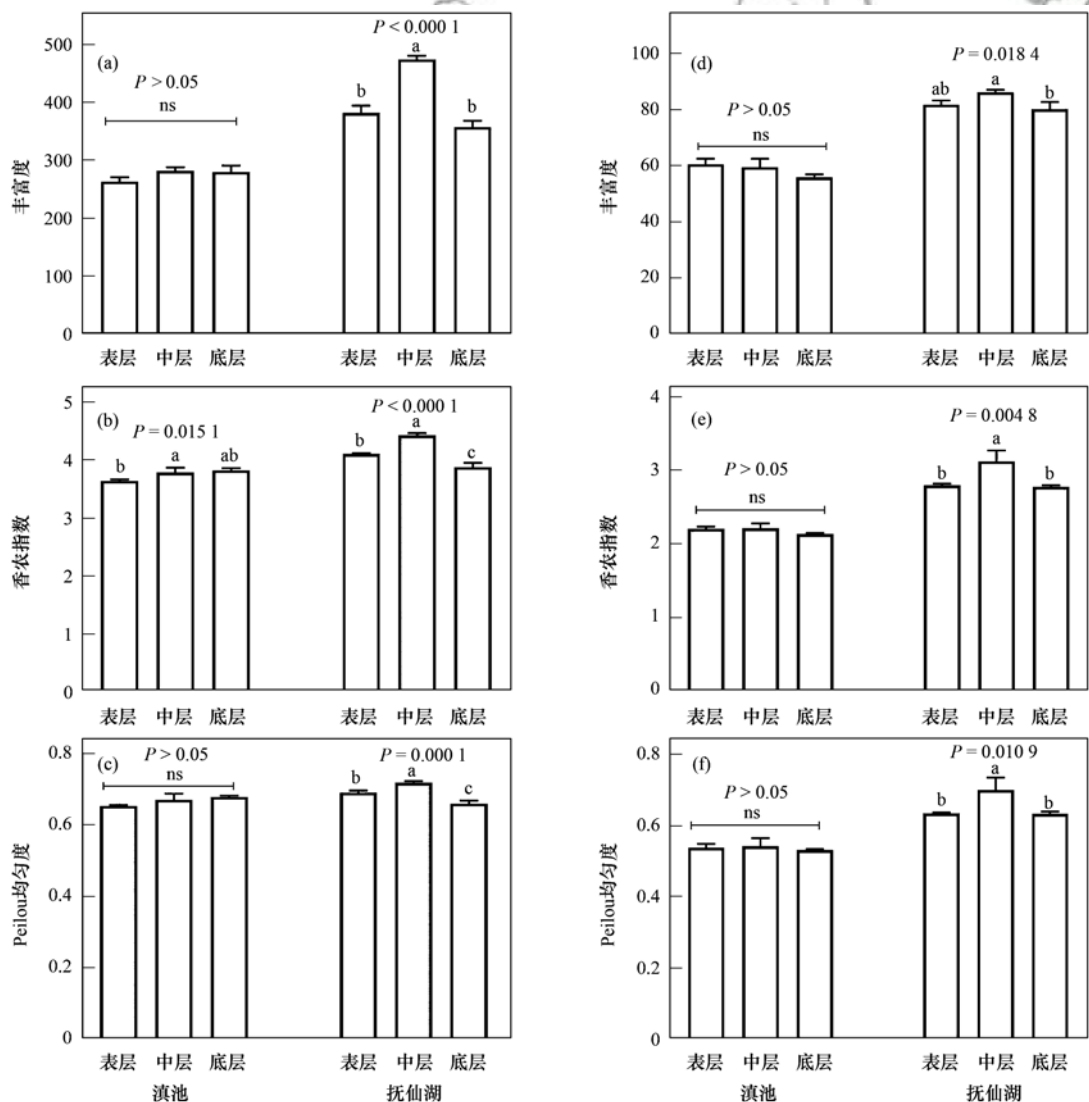
2.4.2 区域间生物多样性差异

抚仙湖北的生物多样性明显高于滇池各区域,滇池南部的生物多样性明显高于中部和北部. 基于 OTU 和属分类单元的真核藻类多样性结果均显示,滇池南部的丰富度和香农指数明显高于滇池中部和北部,滇池北和滇池中部的差异不显著. 抚仙湖北的真核藻类的 OTU 和属对应的香农指数分别为 4.55 ± 0.73 和 2.92 ± 0.17 ,生物多样性明显高于滇池不同区域($P < 0.05$,图9).

3 讨论

3.1 测序深度对 eDNA 监测结果的影响

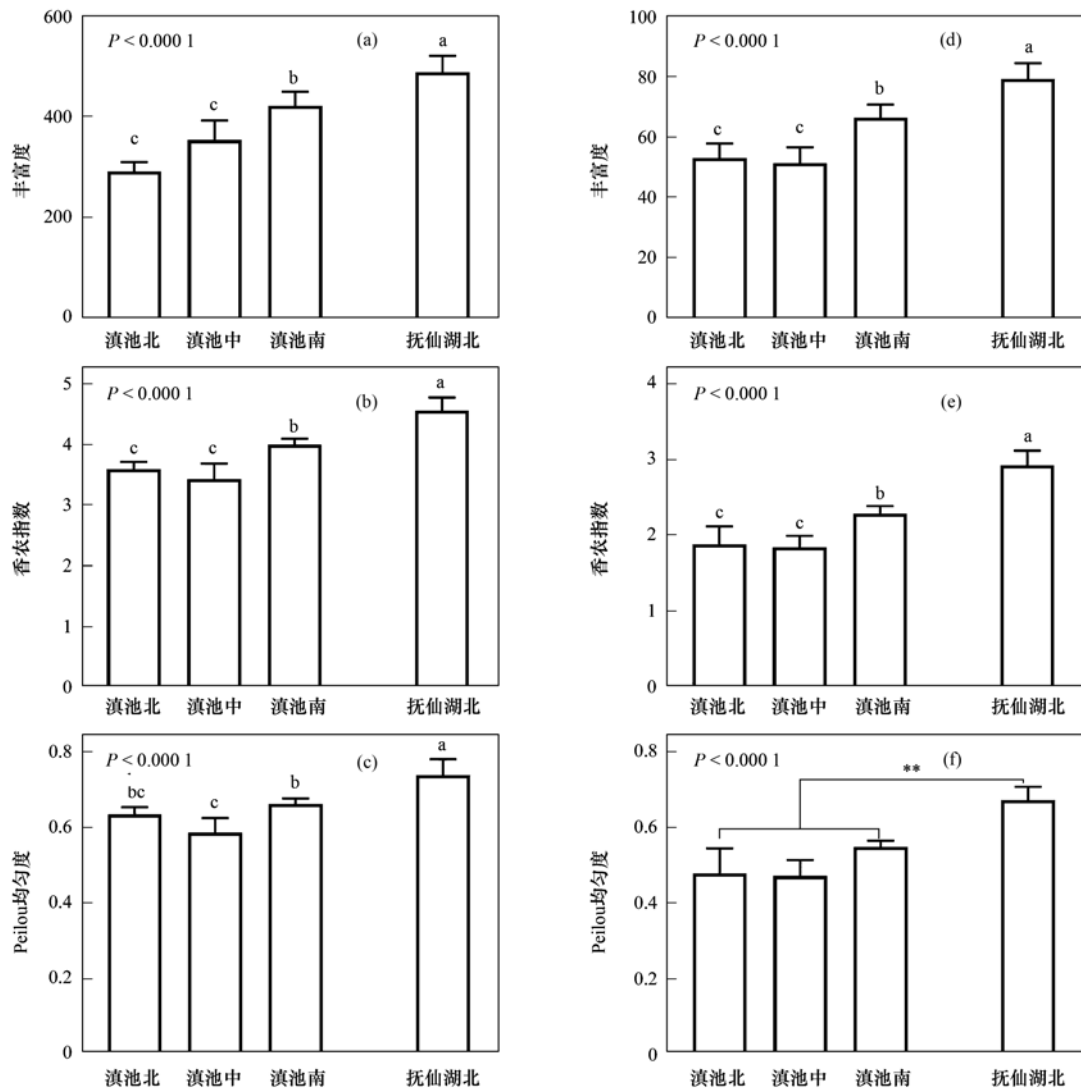
深度测序通常会提高物种多样性的监测力,但是随着测序深度的增加,成本也会不断增加,因此选择合适的测序深度,是 eDNA 监测方法需要进行质



(a) ~ (c) 基于 OTU 的生物多样性差异; (d) ~ (f) 基于可注释分类单元属的生物多样性差异;
ns: 无显著性差异 ($P > 0.05$); 不同字母表示显著性差异 ($P < 0.05$)

图8 滇池和抚仙湖不同水深的生物多样性差异

Fig. 8 Differences in biodiversity determined at different depths at the OTU and genus level



(a) ~ (c) 基于 OTU 的生物多样性差异; (d) ~ (f) 基于可注释分类单元属的生物多样性差异;

** 代表 $P < 0.01$; 不同字母表示显著性差异 ($P < 0.05$)

图 9 不同区域的生物多样性差异

Fig. 9 Biodiversity differences among regions

量控制的关键指标. 滇池和抚仙湖的真核藻属的稀释性曲线达到饱和和所需要的测序深度分别为38 000和36 000. 考虑到测序成本, 可选择获得 90% 属对应的测序深度, 即滇池和抚仙湖位点分别需要30 000和20 000条序列. 另外, 测序深度增加, OTU及属分类单元交叉率也会提高, 监测数据的精确性提高, 因此同时考虑属分类单元数目及交叉率, 则滇池北和抚仙湖北需要的测序深度分别为30 000和22 000条序列. 滇池真核藻类监测所需的测序深度高于抚仙湖, 这说明不同生态系统的生物多样性的复杂程度不同, 所需的测序深度也略有差别. 同时两个湖泊的真核藻属的稀释性曲线达到饱和和所需要的测序深度, 高于已有其他类群(如浮游动物)的eDNA监测所需要的测序通量^[27], 这可能和生物类群多样性的固有差异相关, 也可能是由于18S-V9引物扩增的序列中包含大量非藻类的序列, 导致序列

利用率下降.

3.2 生物多样性监测的精确性评价

为了确保监测结果的可靠性, 我国针对不同的监测指标, 分别制定了质控措施, 对监测方法和仪器的精密度与准确度提出明确要求. 环境 DNA 宏条形码技术作为一种新型生物多样性监测方法, 已广泛应用于水生态系统中的不同群落多样性研究, 但要将其推广应用到监测和管理部门, 需要充分保证监测数据的准确性. 本研究通过平行样分析 eDNA 监测结果的可重复性, 分别从遗传多样性 OTU 和可注释分类单元属水平构建 eDNA 监测精确性评价方法, 评价指标包括重复之间 OTU 或属的交叉率及 α 多样性指数的变异系数.

物种分类单元的交叉率是目前评价 eDNA 监测结果重复性最为常用的方法. 已有基于 454 焦磷酸测序平台的研究发现重复样本间 OTU 交叉率为

59.8%,在目水平的交叉率可达到 89.5%,说明更高的物种分类单元交叉率更高^[28]. 本研究中生物重复之间 OTU 交叉率为 $45.97\% \pm 1.67\%$,属交叉率达到 $64.21\% \pm 3.25\%$,考虑序列数目权重的 OTU 和属交叉率分别达到 $92.83\% \pm 2.74\%$ 和 $98.41\% \pm 0.51\%$. Wen 等^[17] 基于 Illumina 测序平台,用 16S-V4 引物扩增土壤中微生物多样性,发现不同测序重复之间在 OTU 水平的重复率为 39%,但是基于序列数目权重的 OTU 交叉率达到 99%,和本研究结果基本一致,说明平行样品之间交叉的 OTU 覆盖了高丰度的 OTU,每个平行样品特有的 OTU 为低丰度 OTU(如只具有 1 或 2 个序列的 OTUs). 有研究认为这些低丰度 OTUs 可能是实验室操作过程中引入的测序错误,如 PCR 扩增和测序过程中引入的低频率错误序列^[17],但是也有研究发现这些低丰度的 OTUs 可能是群落中的稀有物种,具有重要的生态功能^[29]. 因此,数据分析过程中,应该慎重选择 OTU 的筛选阈值.

物种丰富度,香农指数和 Pielou 均匀度是评估一个点位生物多样性和水生态健康状况最为常用的指标,本研究首先通过单因素方差分析,发现生物重复之间的误差,不会显著影响 α 多样性. 进一步比较了生物重复之间的变异系数,发现物种丰富的 CV 值 $<10\%$,香农指数和 Pielou 均匀度的 CV 值 $<5\%$,进一步说明 eDNA 监测结果的可靠性和稳定性.

平行样品间的生物多样性监测误差受多方面因素影响:①采样不均匀;②技术误差,如 DNA 提取(DNA 裂解效率),PCR 扩增(引物扩增偏好性及扩增条件),测序(测序平台的选择,测序深度及固有误差)及生物信息学过程(如数据筛选,OTU 聚类方法选择,嵌合子过滤等);③采样或实验室污染引入少量低丰度的序列误差等^[16,17]. 因此在 eDNA 监测过程中需要采集平行样品,同时针对每个处理步骤做好质控,也可针对每个过程设置对照,来识别和降低误差,保证数据质量和评估结果的可信度.

3.3 eDNA 监测真核浮游植物多样性的可行性

3.3.1 eDNA 宏条形码和形态学监测结果的一致性

滇池和抚仙湖北各监测到真核藻类 75 属和 90 属,分别覆盖了 62.5% 和 71.05% 形态学监测到的真核藻类^[20,26],其中 eDNA 识别的滇池(如栅藻属、隐藻属和冠盘藻属等)和抚仙湖(如衣藻属、锥囊藻属和脆杆藻属等)的优势属,在以往的形态学调查中也作为优势类群出现^[20,30,31],说明 eDNA 监测较高的还原力. 原理上,任意两个物种都存在基因序列的差异,因此形态学可监测到的物种几乎都可以被 DNA 宏条形码方法识别出来^[7]. 目前 DNA 宏条

形码未监测出来的物种,有很大一部分缺乏相应的 DNA 条形码数据,这一问题将会随着参考数据库的不断补充而解决^[32]. 相比于传统形态学,eDNA 宏条形码可以识别出更多的物种,尤其对于稀有物种和隐蔽物种,如金藻门和褐藻门. 已有大量研究也发现很多隐匿种及形态学分类特征不明显的物种可以被宏条形码技术检测到^[2,8,33],说明基于分子水平的物种识别方面具有更高的灵敏度和分辨率.

3.3.2 eDNA 宏条形码技术可以表征不同空间尺度真核藻类多样性的差异

垂直空间调查显示,滇池不同水深真核藻类多样性差别不大,但是抚仙湖不同水深的真核藻类多样性具有显著性差异,且抚仙湖 10 m 水深的生物多样性明显高于表层水和深层水,

这和已有基于形态学的研究结果一致^[34]. 这是由于抚仙湖是深水型湖泊,夏季具有明显的温跃层,抑制了水体的上下混合交换,进而导致浮游植物的垂直分布差异^[35]. 水平空间调查显示,抚仙湖北真核浮游植物的生物多样性高于富营养化的滇池,这可能是由于抚仙湖生态系统的生产力更低,营养资源有限,物种之间竞争更弱,从而保证更多的物种共存,生物多样性增加^[36]. 滇池南部的真核藻类多样性明显高于滇池北部和中部,可能由于人类活动导致不同区域的污染类型程度存在差异,影响了浮游植物的多样性.

4 结论

(1) 本研究通过分析平行样本间遗传分类单元和属分类水平的交叉率及 α 多样性的精确性两个指标,评估了 eDNA 监测真核浮游植物多样性的准确性. 当真核藻类 α 多样性的 CV 值 $<10\%$,且至少在两个重复之间出现的 OTU 或属的交叉率 $>50\%$ 时,说明平行生物样品间具有良好的重复性,可将同一位点不同重复之间的结果合并,用于后续点位甚至区域之间生物多样性比较.

(2) 测序深度显著影响监测到的物种分类单元数目及精确性评估结果,不同水体由于物种组成差异,所需要的测序通量存在差异. 本研究中,eDNA 宏条形码 18S-V9 监测高原湖泊滇池和抚仙湖的真核藻属,需要的测序深度不少于 30 000 条序列.

(3) eDNA 宏条形码技术显著提高了两个典型湖泊中真核浮游植物的物种监测效率. eDNA 监测到的真核藻属覆盖了传统形态学监测的 62% 以上,同时 eDNA 可以检测到更多传统形态学尚未识别的真核藻属,具有更高的灵敏性. 另外 eDNA 宏条形码监测结果显示,在滇池和抚仙湖北不同区域间存

在显著的生物多样性差异,表明该技术可以表征和区分不同空间尺度的真核浮游植物多样性,具有高分辨率。

(4)本研究证实新型的 eDNA 宏条形码技术可应用于湖泊真核浮游植物多样性监测。和传统形态学相比,eDNA 宏条形码监测具有多方面优势:如采样可在时间上提高采样频率,空间上设置更多的监测位点,可用于真核浮游植物群落的跨生态系统和跨时间比较。为进一步推动 eDNA 宏条形码监测技术的规范化,未来可开展跨实验室比对验证实验,通过采用统一的 eDNA 宏条形码标准化分析流程,在不同实验室由不同操作者进行重复,对监测结果进行验证比较;并在推广实践过程中需要评估监测结果的准确性,并且做好质量控制。

参考文献:

- [1] Zhang X W. Environmental DNA Shaping a new era of ecotoxicological research [J]. *Environmental Science & Technology*, 2019, **53**(10): 5605-5612.
- [2] Debroas D, Domaizon I, Humbert J F, *et al.* Overview of freshwater microbial eukaryotes diversity: a first analysis of publicly available metabarcoding data [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2017, **93**(4), doi: 10.1093/femsec/fix023.
- [3] Machado K B, Targueta C P, Antunes A M, *et al.* Diversity patterns of planktonic microeukaryote communities in tropical floodplain lakes based on 18S rDNA gene sequences [J]. *Journal of Plankton Research*, 2019, **41**(3): 241-256.
- [4] Reboul G, Moreira D, Bertolino P, *et al.* Microbial eukaryotes in the suboxic chemosynthetic ecosystem of Movile Cave, Romania [J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2019, **11**(3): 464-473.
- [5] Tragin M, Vaulot D. Novel diversity within marine Mamiellophyceae (Chlorophyta) unveiled by metabarcoding [J]. *Scientific Reports*, 2019, **9**(1), doi: 10.1038/s41598-019-41680-6.
- [6] Sze Y, Miranda L N, Sin T M, *et al.* Characterising planktonic dinoflagellate diversity in Singapore using DNA metabarcoding [J]. *Metabarcoding and Metagenomics*, 2018, **2**(1), doi: 10.3897/mbmg.2.25136.
- [7] 张宛宛, 谢玉为, 杨江华, 等. DNA 宏条形码 (metabarcoding) 技术在浮游植物群落监测研究中的应用 [J]. *生态毒理学报*, 2017, **12**(1): 15-24.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] Guillou L, Bachar D, Audic S, *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**(D1): D597-D604.
- [11] Decelle J, Romac S, Stern R F, *et al.* PhytoREF: a reference database of the plastidial 16S rRNA gene of photosynthetic eukaryotes with curated taxonomy [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2015, **15**(6): 1435-1445.
- [12] Tragin M, Vaulot D. Green microalgae in marine coastal waters: the Ocean Sampling Day (OSD) dataset [J]. *Scientific Reports*, 2018, **8**, doi: 10.1038/s41598-018-32338-w.
- [13] Markert B, 王美娥, Wünschmann S, 等. 环境质量评价中的生物指示与生物监测 [J]. *生态学报*, 2013, **33**(1): 33-44.
- [14] Bernd M, Wang M E, Wünschmann S, *et al.* Bioindicators and biomonitoring in environmental quality assessment [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2013, **33**(1): 33-44.
- [15] 阴琨, 王业耀, 许人骥, 等. 中国流域水环境生物监测体系构成和发展 [J]. *中国环境监测*, 2014, **30**(5): 114-120.
- [16] Yin K, Wang Y Y, Xu R J, *et al.* Constitution and development of national river basin water environmental biomonitoring system [J]. *Environmental Monitoring in China*, 2014, **30**(5): 114-120.
- [17] 李黎, 王瑜, 林岩璇, 等. 河流生态系统指示生物与生物监测: 概念、方法及发展趋势 [J]. *中国环境监测*, 2018, **34**(6): 26-36.
- [18] Li L, Wang Y, Lin K X, *et al.* Bioindicator and biomonitoring used for river ecosystem: Concepts, approaches and trends [J]. *Environmental Monitoring in China*, 2018, **34**(6): 26-36.
- [19] Zhan A B, He S, Brown E A, *et al.* Reproducibility of pyrosequencing data for biodiversity assessment in complex communities [J]. *Methods in Ecology and Evolution*, 2014, **5**(9): 881-890.
- [20] Wen C Q, Wu L Y, Qin Y J, *et al.* Evaluation of the reproducibility of amplicon sequencing with Illumina MiSeq platform [J]. *PLoS One*, 2017, **12**(4), doi: 10.1371/journal.pone.0176716.
- [21] 秦娇娇, 王艳. 浮游植物多样性指数的应用及评价 [J]. *沈阳师范大学学报(自然科学版)*, 2014, **32**(4): 502-505.
- [22] Qin J J, Wang Y. Application and evaluation of phytoplankton diversity indexes [J]. *Journal of Shenyang Normal University (Natural Science Edition)*, 2014, **32**(4): 502-505.
- [23] 顾礼明, 曹慧敏, 范铭芳, 等. 大型湖库浮游植物生物多样性研究进展综述 [J]. *污染防治技术*, 2019, **32**(4): 37-39.
- [24] Gu M L, Cao H M, Fan M F, *et al.* Research progress of phytoplankton biodiversity in large lakes and reservoirs: a review [J]. *Pollution Control Technology*, 2019, **32**(4): 37-39.
- [25] 王华, 杨树平, 房晟忠, 等. 滇池浮游植物群落特征及与环境因子的典范对应分析 [J]. *中国环境科学*, 2016, **36**(2): 544-552.
- [26] Wang H, Yang S P, Fang S Z, *et al.* Canonical correspondence analysis of relationship between characteristics of phytoplankton community and environmental factors in Dianchi Lake [J]. *China Environmental Science*, 2016, **36**(2): 544-552.
- [27] 董云仙. 云南九大高原湖泊藻类研究进展 [J]. *环境科学导刊*, 2014, **33**(2): 1-8.
- [28] Dong Y X. Research and development of algae in the nine plateau lakes in Yunnan [J]. *Environmental Science Survey*, 2014, **33**(2): 1-8.
- [29] 凌祯, 史正涛, 徐杉, 等. 滇池湖滨带叶绿素 a 与营养盐空间分布特征 [J]. *水文*, 2020, **40**(1): 76-80.
- [30] Ling Z, Shi Z T, Xu S, *et al.* Spatial distribution characteristics of chl a and nutrient Salt in Dianchi lakeside [J]. *Journal of China Hydrology*, 2020, **40**(1): 76-80.

- [23] Amaral-Zettler L A, McClimment E A, Ducklow H W, *et al.* A method for studying protistan diversity using massively parallel sequencing of V9 hypervariable regions of small-subunit ribosomal RNA genes [J]. *PLoS One*, 2009, **4** (12), doi: 10.1371/annotation/50c43133-0df5-4b8b-8975-8cc37d4f2f26.
- [24] Morard R, Darling K F, Mahé F, *et al.* PFR2: a curated database of planktonic foraminifera 18S ribosomal DNA as a resource for studies of plankton ecology, biogeography and evolution [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2015, **15** (6): 1472-1485.
- [25] 胡鸿钧, 魏印心. 中国淡水藻类——系统、分类及生态 [M]. 北京: 科学出版社, 2006.
- Hu H J, Wei Y X. The freshwater algae of China-systematics, taxonomy and ecology [M]. Beijing: Science Press, 2006.
- [26] 孔祥虹. 抚仙湖浮游植物的时空格局 [D]. 武汉: 湖北大学, 2015.
- [27] Yang J H, Zhang X W, Xie Y W, *et al.* Zooplankton community profiling in a eutrophic freshwater ecosystem-Lake Tai basin by DNA metabarcoding [J]. *Scientific Reports*, 2017, **7** (1), doi: 10.1038/s41598-017-01808-y.
- [28] Zhang A B, He S, Brown E A, *et al.* Reproducibility of pyrosequencing data for biodiversity assessment in complex communities [J]. *Methods in Ecology and Evolution*, 2014, **5** (9): 881-890.
- [29] Jousset A, Bienhold C, Chatzinotas A, *et al.* Where less may be more: how the rare biosphere pulls ecosystems strings [J]. *The ISME Journal*, 2017, **11** (4): 853-862.
- [30] 吉正元, 刘绍俊, 施艳峰, 等. 抚仙湖浮游植物群落结构周年变化及水质生物评价 [J]. *海洋湖沼通报*, 2019, (3): 78-86.
- Ji Z Y, Liu S J, Shi Y F, *et al.* Annual variation of phytoplankton community structure in Fuxian Lake and bioassessment of its water quality [J]. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2019, (3): 78-86.
- [31] 张梅, 李原, 王若南. 滇池浮游植物种类的动态变化 [J]. *云南大学学报(自然科学版)*, 2006, **28** (1): 73-77.
- Zhang M, Li Y, Wang R N. Dynamic variation for the species of phytoplankton in Dianchi Lake, China [J]. *Journal of Yunnan University (Natural Sciences Edition)*, 2006, **28** (1): 73-77.
- [32] Abad D, Albaina A, Aguirre M, *et al.* Is metabarcoding suitable for estuarine plankton monitoring? A comparative study with microscopy [J]. *Marine Biology*, 2016, **163** (7), doi: 10.1007/s00227-016-2920-0.
- [33] Leblanc K, Quéguiner B, Diaz F, *et al.* Nanoplanktonic diatoms are globally overlooked but play a role in spring blooms and carbon export [J]. *Nature Communications*, 2018, **9** (1), doi: 10.1038/s41467-018-03376-9.
- [34] 牛远, 孔祥虹, 余辉, 等. 抚仙湖夏季热分层时期浮游植物空间分布特征 [J]. *生态学杂志*, 2016, **35** (7): 1865-1871.
- Niu Y, Kong X H, Yu H, *et al.* Spatial distribution of phytoplankton community during summer stratification in Lake Fuxian [J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2016, **35** (7): 1865-1871.
- [35] 潘继征, 熊飞, 李文朝, 等. 抚仙湖浮游植物群落结构、分布及其影响因子 [J]. *生态学报*, 2009, **29** (10): 5376-5385.
- Pan J Z, Xiong F, Li W C, *et al.* Structure, distribution and its impact factors of phytoplankton community in Fuxian Lake [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2009, **29** (10): 5376-5385.
- [36] 陈小林, 陈光杰, 卢慧斌, 等. 抚仙湖和滇池硅藻生物多样性与生产力关系的时间格局 [J]. *生物多样性*, 2015, **23** (1): 89-100.
- Chen X L, Chen G J, Lu H B, *et al.* Long-term diatom biodiversity responses to productivity in lakes of Fuxian and Dianchi [J]. *Biodiversity Science*, 2015, **23** (1): 89-100.

CONTENTS

Health Impact Attributable to the Control of PM _{2.5} Pollution in China During 2013-2017	ZHANG Meng-jiao, SU Fang-cheng, XU Qi-xiang, <i>et al.</i> (513)
Contributions of Emissions Reduction and Regional Meteorological Conditions to Air Quality Improvement	WU Wen-qi, ZHANG Kai-shan (523)
Air Pollution Characteristics and Quantitative Evaluation of Multi-scale Transport in the Beijing-Tianjin-Hebei Region in January, 2016	YAO Sen, ZHANG Han-yu, WANG Xiao-qi, <i>et al.</i> (534)
Influence of Burning Fireworks on the Atmosphere During the Spring Festival in Guangzhou in 2020	PEI Cheng-lei, WANG Yu-jun, BI Yan-ru, <i>et al.</i> (546)
Source Apportionment and Optical Properties of Fine Particles Associated with Regional Pollution in the Yangtze River Delta	XIA Li, ZHU Bin, WANG Hong-lei, <i>et al.</i> (556)
Distribution Characteristics and Source Analysis of Water-soluble Ions in Particulate Matter Under Different Weather Processes in Nanjing	ZHANG Yang, WANG Hong-lei, LIU An-kang, <i>et al.</i> (564)
Size Distribution of Aerosol Hygroscopic Growth Factors in Winter in Tianjin	DING Jing, ZHANG Yu-fen, ZHENG Nai-yuan, <i>et al.</i> (574)
Time-Determination and Contribution Analysis of Transport, Retention, and Offshore Backflow to Long-Term Sand-Dust Coupling	ZHANG Zhe, QIAO Li-ping, ZHOU Min, <i>et al.</i> (584)
Characterization, Sources, and Health Risks of PM _{2.5} -bound PAHs During Autumn and Winter in Luoyang City	QI Jing-wen, ZHANG Rui-qin, JIANG Nan, <i>et al.</i> (595)
Characteristics, Meteorological Influences, and Transport Source of Ozone Pollution in Zhengzhou City	WANG Xu-dong, YIN Sha-sha, YANG Jian, <i>et al.</i> (604)
Nonlinear Response Characteristics and Control Scheme for Ozone and Its Precursors Based on Orthogonal Experimental Methods	LI Guang-yao, CHEN Qiang, GUO Wen-kai, <i>et al.</i> (616)
Characteristics and Source Apportionment of Volatile Organic Compounds (VOCs) in the Automobile Industrial Park of Shanghai	YE Lu, TAI Qing-qing, YU Hua-ming (624)
Establishment of a High-resolution Anthropogenic Emission Inventory and Its Evaluation Using the WRF-Chem Model for Lanzhou	GUO Wen-kai, LI Guang-yao, CHEN Bing, <i>et al.</i> (634)
Trends in Vehicle Emissions in Sichuan Province, 2010-2017	LI Yuan, SHI Jia-cheng, CHEN Jun-hui, <i>et al.</i> (643)
Bioavailability and Ecological Risk Assessment of Cadmium in the Sea-Land Interaction Sediments of the Pearl River Delta	WANG Fang-ting, BAO Ke, CHEN Zhi-hua, <i>et al.</i> (653)
Distribution, Sources, and Ecological Risks of Polyfluoroalkyl Substances in the Surface Water of the Wuliangsuhai Watershed	SHI Rui, MAO Ruo-yu, ZHANG Meng, <i>et al.</i> (663)
Distribution Characteristics of Microplastics in Ice Sheets and Its Response to Salinity and Chlorophyll a in the Lake Wuliangsuhai	WANG Zhi-chao, YANG Jian-lin, YANG Fan, <i>et al.</i> (673)
Effect of Check Dam on Phosphorus Transport and Retention in the Qingshui River, in Zhangjiakou City	WANG Wei, LI Xu-yong (681)
Characteristics of Phosphorus Speciation and Genesis in Typical Tributaries of the Three Gorges Reservoir	YANG Fan, WANG Li-jing, JI Dao-bin, <i>et al.</i> (688)
Distribution of Nitrogen and Phosphorus in Lake Chaohu Sediments and Pollution Evaluation	WANG Yan-ping, XU Wei-wei, HAN Chao, <i>et al.</i> (699)
Sediment Pollution Characteristics and Dredging in the Nanfei River Estuary, Chaohu Lake	YANG Pan, YANG Chun-hui, MA Xin-yu, <i>et al.</i> (712)
Effect of Oxidation Strengthening on In-situ Phosphorus Immobilization of Calcium Hydroxide	XU Chu-tian, LI Da-peng, YUE Wei, <i>et al.</i> (723)
Impact of Rainfall-Runoff Events on Methane Emission from Xiangxi Bay of the Three Gorges Reservoir	CHEN Min, XU Hao-ting, WANG Xue-zhu, <i>et al.</i> (732)
Water-air Carbon Dioxide Exchange and Nutritional Controls in a Typical Karst River	LIU Rui, ZHANG Jin, CHEN Zu-sheng, <i>et al.</i> (740)
Occurrence of Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes in Representative Drinking Water Resources in Jiangsu Province	WANG Long-fei, CHENG Yi-qun, HU Xiao-dong, <i>et al.</i> (749)
Diversity and Abundance of Antibiotic Resistance Genes in Tailings Ponds	HUANG Fu-yi, ZHU Yong-guan, SU Jian-qiang (761)
Hydrochemical Characteristics and Origin of Groundwater in the Central Guohe River Basin	ZHENG Tao, JIAO Tuan-li, HU Bo, <i>et al.</i> (766)
Hydrochemical Characteristics and Analysis of the Qilihai Wetland, Tianjin	HE Ming-xia, ZHANG Bing, XIA Wen-xue, <i>et al.</i> (776)
Effects of Straw Mulching and Nitrogen Reduction on the Distribution of Soil Nitrogen and Groundwater Nitrogen Pollution	ZHANG Wan-feng, YANG Shu-qing, SUN Duo-qiang, <i>et al.</i> (786)
Precision of eDNA Metabarcoding Technology for Biodiversity Monitoring of Eukaryotic Phytoplankton in Lakes	ZHANG Li-juan, XU Shan, ZHAO Zheng, <i>et al.</i> (796)
Effect of Phytoplankton Community Composition and Size Structure on Light Absorption Properties	HUANG Xin, SHI Kun, ZHANG Yun-lin, <i>et al.</i> (808)
Periphytic Algae Community Structure and Its Relation to Environment Factors in the Main Stream of the Songhua River from 2014 to 2019	YU Zong-ling, CHEN Wei, ZHAO Ran, <i>et al.</i> (819)
Diversity and Function Prediction of Bacterioplankton Under Human Disturbance in the Main Stream of the Laoguan River Before and After the Flood Season	HAN Xue-mei, GONG Zi-le, YANG Xiao-ming, <i>et al.</i> (831)
Seasonal Removal Efficiency and Degradation Products of Two Typical PPCPs in Subsurface Flow Constructed Wetlands	LI Chao-yu, YANG Yi-xiao, ZHANG Ning, <i>et al.</i> (842)
Removal of Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes from Urban Rivers Using Artificial Ecosystems	ZHOU Hai-dong, HUANG Li-ping, CHEN Xiao-meng, <i>et al.</i> (850)
Distribution Characteristics of Viruses Microorganisms in a Water Supply System with Combined Ultraviolet Chloramine Disinfection	HAN Xue, SUN Jian-wei, ZHANG Li, <i>et al.</i> (860)
Removal of Oxytetracycline from Water Using Blast Furnace Slag Loaded Sulfide Nanoscale Zero-valent Iron	SUN Qiu-nan, ZHANG Rong-bin, DENG Man-jun, <i>et al.</i> (867)
Heavy Metal Ion Adsorption Properties and Stability of Amine-sulfur Modified Biochar in Aqueous Solution	WANG Cun-shi, HE Min-xia, ZHOU Feng, <i>et al.</i> (874)
Characteristics and Removal Mechanism of an Electro-Hybrid Ozonation-Coagulation System in the Treatment of Organic Matters	XIE Xin-yue, XU Jian-jun, ZHANG Shao-hua, <i>et al.</i> (883)
Enhancement Effects and Mechanisms of Microscale Zero Valent Iron on the Performance of Anaerobic Co-digestion of Waste Activated Sludge and Food Waste	CHEN Sheng-jie, YAO Fu-bing, PI Zhou-jie, <i>et al.</i> (891)
Spatial Distribution and Risk Assessment of Heavy Metal Pollution in Farmland Soils Surrounding a Typical Industrial Area of Henan Province	MENG Xiao-fei, GUO Jun-mei, YANG Jun-xing, <i>et al.</i> (900)
Distribution Characteristics and Pollution Evaluation of Heavy Metals in Greenbelt Soils of Nanjing City	CHEN Jia-lin, LI Ren-ying, XIE Xiao-jin, <i>et al.</i> (909)
Remediation Effect of Compound Modifier FZB on Arsenic and Cadmium Contaminated Soil	DING Ping, HE Yu-long, HE Huan, <i>et al.</i> (917)
Remediation of Cd Contaminated Acidic Rice Fields Using the Combined Application of Lime and Organic Matter	LI Guang-hui, CHENG Qing, CHEN Hong (925)
Effect and Mechanism of Foliar Application Nano-MnO ₂ on Cadmium Enrichment of Rice	ZHOU Yi-min, HUANG Ya-yuan, LIU Xiao-yue, <i>et al.</i> (932)
Characteristics of Cadmium Enrichment and Pollution Evaluation of a Soil-Crop System in a Typical Karst Area	WANG Rui, DENG Hai, JIA Zhong-min, <i>et al.</i> (941)
Comparison of Enrichment and Transport of Cadmium in the Fruit of High and Low Enrichment Pepper Varieties and Its Distribution in Subcells	SHAO Xiao-qing, HE Zhang-mi, XU Wei-hong (952)
Cadmium Accumulation Characteristics of Four Herbs	CHEN Di, LI Bo-qun, YANG Yong-ping, <i>et al.</i> (960)
Characteristics of Dissolved Organic Carbon Loss in Purple Soil Sloping Fields with Different Fertilization Treatments	XIONG Zi-yi, ZHENG Jie-bing, WANG Dan, <i>et al.</i> (967)
Effects of Precipitation Changes on Plant Community Diversity and Soil C:N:P Ecological Stoichiometric Characteristics in a Desert Steppe of China	GAO Jiang-ping, ZHAO Rui-feng, ZHANG Li-hua, <i>et al.</i> (977)
Effect of Water Management on Rice Growth and Rhizosphere Priming Effect in Paddy Soils	LIN Sen, XIAO Mou-liang, JIANG Jia-bin, <i>et al.</i> (988)
Effects of Copper Pollution on Microbial Communities in Wheat Root Systems	GE Yi, XU Min-min, XU Shao-hui, <i>et al.</i> (996)
Ozone Pollution, Nitrogen Addition, and Drought Stress Interact to Affect Non-structural Carbohydrates in the Leaves and Fine Roots of Poplar	LI Pin, ZHOU Hui-min, FENG Zhao-zhong (1004)
Review of Screening and Applications of Organic Tracers in Fine Particulate Matter	LI Yuan-ju, WU Ai-hua, TONG Meng-xue, <i>et al.</i> (1013)