

DOI: 10.5846/stxb202007221920

王晨, 陶孟, 李爱民, 施鹏, 杨江华, 王志浩, 张效伟. 基于环境 DNA 宏条形码技术的秦淮河生物多样性研究. 生态学报, 2022, 42(2): 611-624.

Wang C, Tao M, Li A M, Shi P, Yang J H, Wang Z H, Zhang X W. Research on the biodiversity of Qinhuai River based on environmental DNA metabacrodng. Acta Ecologica Sinica, 2022, 42(2): 611-624.

# 基于环境 DNA 宏条形码技术的秦淮河生物多样性研究

王 晨<sup>1</sup>, 陶 孟<sup>1</sup>, 李爱民<sup>1,\*</sup>, 施 鹏<sup>1</sup>, 杨江华<sup>1,2</sup>, 王志浩<sup>2</sup>, 张效伟<sup>1,2</sup>

1 南京大学环境学院, 污染控制与资源化研究国家重点实验室, 南京 210023

2 南京易基诺环保科技有限公司, 南京 211100

**摘要:** 秦淮河是南京的母亲河, 其生物多样性受城市化进程影响面临严重威胁, 而物种资源调研是生物多样性保护的基础。环境 DNA 宏条形码技术较形态学监测是一种简单高效、灵敏度高的新型监测技术。为探究秦淮河浮游生物、底栖动物及鱼类的生物多样性, 于 2019 年 7 月, 采用环境 DNA 宏条形码技术对其进行了探究, 并分析了秦淮河上下游间的差异及环境因子对其群落结构的影响。结果表明: 秦淮河共监测到浮游动物 13 属 22 种 407 个操作分类单元(Operational Taxonomic Units, OTUs), 浮游植物 85 属 60 种 4445 个 OTUs, 底栖动物 16 属 17 种 212 个 OTUs, 鱼类 53 属 44 种 1663 个 OTUs。其中浮游动物以游泳轮虫目(*Ploima*)和双甲目(*Diplostraca*)为主, 共占浮游动物 63.37%, 浮游植物以隐藻门(*Cryptomonas*)和褐藻门(*Ochrophyta*)为主, 共占浮游植物 88.11%, 底栖动物中节肢动物门(*Arthropoda*)占比最高, 达 91.67%, 鱼类中鲤形目(*Cypriniformes*)占比最高, 达 69.99%。与秦淮河历史形态学监测数据相比, 环境 DNA 宏条形码技术在物种丰度鉴定方面显著高于传统形态学鉴定的物种丰度。通过主坐标分析和 PERMANOVA 检验, 发现秦淮河下游、上游南支和上游北支间有极显著差异( $P < 0.001$ )。其中浮游动物、浮游植物和底栖动物受分组影响更大, 分组对鱼类的影响相对较小。下游  $\alpha$  多样性较上游更为贫乏, 上游南支(南京)  $\alpha$  多样性较上游北支(句容)更丰富。浮游生物和底栖动物均表现出了明显的随距离增加而衰减的趋势。冗余分析表明, 较低营养级的生物对环境因子的变化更为敏感, 浮游生物和底栖动物的主要影响因子为总氮、总有机碳、总磷、氨氮、化学需氧量和溶解氧。鱼类的影响因子为溶解氧、总有机碳、总氮、总磷和化学需氧量。研究通过对秦淮河生物多样性的调研, 可为秦淮河的生物多样性保护提供理论参考。

**关键词:** 秦淮河; 环境 DNA 宏条形码; 生物多样性; 环境因子

## Research on the biodiversity of Qinhuai River based on environmental DNA metabacrodng

WANG Chen<sup>1</sup>, TAO Meng<sup>1</sup>, LI Aimin<sup>1,\*</sup>, SHI Peng<sup>1</sup>, YANG Jianghua<sup>1,2</sup>, WANG Zhihao<sup>2</sup>, ZHANG Xiaowei<sup>1,2</sup>

1 State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, School of the Environment, Nanjing University, Nanjing 210023, China

2 Nanjing E-genomics Technology Company Limited, Nanjing 211100, China

**Abstract:** Qinhuai River is the mother river of Nanjing, and its biodiversity is seriously threatened by the process of urbanization. The survey of species resources is the basis of biodiversity protection. Compared with morphological monitoring, the environmental DNA metabacrodng is a simple, efficient and sensitive new monitoring technology. In order to explore the biodiversity of plankton, zoobenthos and fish in Qinhuai River, the environmental DNA metabacrodng was used to explore it in July 2019, the differences between upstream and downstream of Qinhuai River were analyzed, and the

**基金项目:** 长江(江苏段)生态承载力及环境修复技术研究(2018008); 扬子江水生态健康评估研究

**收稿日期:** 2020-07-22; **网络出版日期:** 2021-09-10

\* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: liaimin@nju.edu.cn

relationship between the community composition of Qinhuai River and environmental variables was evaluated. The results showed that a total of 13 genus, 22 species and 407 operational taxonomic units (OTUs) of zooplankton, 85 genus, 60 species and 4445 OTUs of phytoplankton, 16 genus, 17 species and 212 OTUs of zoobenthos, 53 genus, 44 species and 1663 OTUs were detected through the environmental DNA metabarcoding. Among them, *Ploima* and *Diplostraca*, accounting for 63.37%, were dominant species in zooplankton community at the order level. The most abundant species in phytoplankton community at the phylum level were *Cryptomonas* and *Ochrophyta*, accounting for 88.11%. The zoobenthos were dominated by *Arthropoda* at the phylum level, which accounted for 91.67%. The *Cypriniformes* accounting for 69.99%, were dominants in fish of different samples at the order level. Compared with the historically morphological monitoring data of Qinhuai River, the environmental DNA metabarcoding technique was more powerful than the morphological method in assessment of species richness. Through the principal coordinate analysis (PCoA) and PERMANOVA test, a significant difference ( $P < 0.001$ ) was found among downstream, the south branch of upstream and the north branch of upstream of Qinhuai River. Zooplankton, phytoplankton and zoobenthos were more affected by the group of sites than fish. Alpha( $\alpha$ ) diversity of downstream in Qinhuai River was poorer than that of upstream, and Alpha( $\alpha$ ) diversity of the south branch of upstream (Nanjing) was richer than that of the north branch (Jurong). All of the taxa of Qinhuai River except fish showed strong relationship between geographical distance (km) and biotic community similarity based on Bray-Curtis distance. Redundancy analysis (RDA) showed that organisms with lower trophic levels were more sensitive to changes in the environmental factors. The main influencing factors in plankton and zoobenthos community distribution were total nitrogen (TN), total organic carbon (TOC), total phosphorus (TP), ammonia nitrogen ( $\text{NH}_3\text{-N}$ ), chemical oxygen demand (COD) and dissolved oxygen (DO). While the key factors in fish community distribution were DO, TOC, TN, TP and COD. Our results can provide a theoretical reference for the protection of the biodiversity of Qinhuai River.

**Key Words:** Qinhuai River; environmental DNA metabarcoding; biodiversity; environmental variables

淡水生态系统虽仅占地球表面的0.8%,但其独特的生境却为全球6%的已知物种提供了栖息地<sup>[1]</sup>。而它所面临的生物多样性危机却不断加深,据世界自然基金组织(World Wide Fund for Nature, WWF)报道<sup>[2]</sup>,到2014年,淡水脊椎动物的地球生命力指数(Living Planet Index, LPI)已经下降了83%。随着淡水生态系统生物多样性不断丧失<sup>[3]</sup>,生物多样性保护也受到了广泛的关注和认可<sup>[4-5]</sup>,而物种资源调研作为生物多样性保护的基础,其紧迫性不容小觑。

秦淮河是南京的母亲河,但近几十年来,剧烈的城市化进程严重破坏了秦淮河的水生生态系统。目前针对秦淮河生物多样性的研究较少,已有研究主要集中在秦淮河局部河段的常规水质指标分布<sup>[6]</sup>、细菌的群落结构<sup>[7-8]</sup>、单一物种群落结构<sup>[9-13]</sup>和水资源保护与治理途径<sup>[14]</sup>上,缺乏对秦淮河生物多样性全貌的整体调研。而生物多样性的调研对调研技术的科学性、全面性均提出了更高的标准,先前零散的调查<sup>[10-13]</sup>已无法满足现阶段的研究和管理需求。

环境DNA宏条形码技术是将高通量测序(High throughput sequencing, HTS)技术与生物识别的DNA条形码相结合,利用HTS获得条形码基因扩增子,通过生物信息学手段分析鉴定群落的物种组成<sup>[15]</sup>。相较于传统的条形码,环境DNA宏条形码因具有更高的扩增速度、精度以及更低的成本而受到了广泛的关注<sup>[16-17]</sup>。大量研究表明,环境DNA宏条形码可用于水生生态系统的生物监测<sup>[17-20]</sup>。不同的引物对生物类群的偏好不同<sup>[15]</sup>,线粒体细胞色素C氧化酶亚基I(COI)<sup>[21-22]</sup>、18S-V9 rDNA<sup>[23-24]</sup>和12S rRNA<sup>[25-26]</sup>分别广泛用于大型无脊椎动物、真核生物和脊椎动物多样性研究。国内环境DNA宏条形码在淡水生态系统中的应用虽有报道,但主要集中在个别种群<sup>[27-28]</sup>,全面的生物多样性监测在国内报道较为罕见。

本研究以秦淮河为研究区域,利用环境DNA宏条形码评估秦淮河淡水生态系统中生物多样性,探究(1)秦淮河生物多样性的组成;(2)上下游生物多样性的差异;(3)生物多样性与环境因子的关系,以期对秦淮河

的生物多样性保护提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 采样点位及环境 DNA 样本采集

秦淮河位于长江下游,共有南北两源,北源句容河发源于句容市宝华山南麓,南源溧水河发源于南京市溧水区东庐山。于 2019 年 7 月,在秦淮河主干共设置 32 个采样点,具体采样点位信息见图 1、表 1。每个采样点位采集 3L 表层水样,采集后在 24h 内,每个点位 300mL 水样使用  $0.22\mu\text{m}$  无菌滤膜(广东环凯微生物科技有限公司)真空抽滤得到滤膜(各点位 5—7 个平行),滤膜保存至  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱中,直至 DNA 提取。

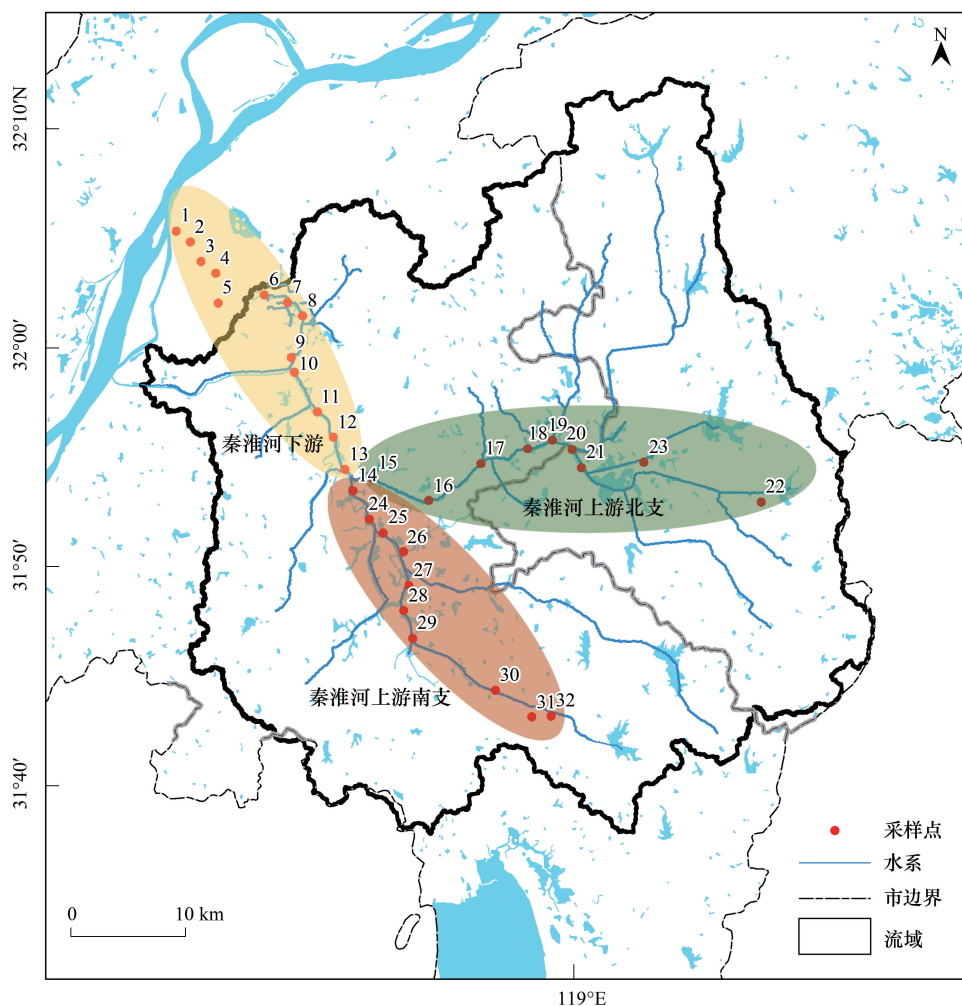


图 1 秦淮河采样点位图

Fig.1 Sampling sites in Nanjing city of Qinhuai River

图中数字表示采样点位序号

表 1 秦淮河点位分组

Table 1 Group of sites in Qinhuai River

分组 Group	点位 Sites
秦淮河下游 Lower Qinhuai River	点位 1—13
秦淮河上游南支 The south branch of upper Qinhuai River	点位 14、24—32
秦淮河上游北支 The north branch of upper Qinhuai River	点位 15—23

## 1.2 环境因子的测定

采用便携式水质参数仪 (HACH SL1000) 现场测定 pH 值和溶解氧 (DO); 采集后的水样运回实验室后在 24h 内测定完其理化指标。氨氮 ( $\text{NH}_3\text{-N}$ )、总磷 (TP) 和总氮 (TN) 使用国家标准方法测定; 亚硝酸盐氮 ( $\text{NO}_2\text{-N}$ ) 和硝酸盐氮 ( $\text{NO}_3\text{-N}$ ) 过  $0.45\mu\text{m}$  的水膜后使用离子色谱 (Thermo Fisher ICS5000+) 测定; 总有机碳 (TOC) 使用 TOC 仪 (耶拿 multi N/C 3100) 测定; 化学需氧量 (COD) 使用哈希 COD 仪 (DR 2800) 测定。

## 1.3 DNA 提取及 PCR 扩增

使用 MO BIO PowerSoil® DNA 分离试剂盒 (QIAGEN) 提取 DNA。提取完成后, 使用 NanoDrop 测定 DNA 的浓度及质量。针对不同生物类群选择不同的 PCR 引物进行测试, 详见表 2。12S 引物 PCR 扩增总体积  $50\mu\text{L}$ , 包含  $2\times\text{Taq Plus Master Mix II } 25\mu\text{L}$  (诺唯赞), 上下游引物各  $2\mu\text{L}$ , DNA 模板  $2\mu\text{L}$ ,  $\text{ddH}_2\text{O}$   $19\mu\text{L}$ , 扩增片段长度 170 bp; 扩增条件:  $95^\circ\text{C}$  预变性 3 min,  $95^\circ\text{C}$  变性 15 s,  $62.4^\circ\text{C}$  退火 20 s,  $72^\circ\text{C}$  延伸 20 s, 30 个循环。18S-V9 引物 PCR 扩增总体积  $50\mu\text{L}$ , 包含  $2\times\text{Phanta Max Master Mix } 25\mu\text{L}$  (诺唯赞), 上下游引物各  $2\mu\text{L}$ , DNA 模板  $2\mu\text{L}$ ,  $\text{ddH}_2\text{O}$   $19\mu\text{L}$ , 扩增片段长度 130 bp; 扩增条件:  $95^\circ\text{C}$  预变性 3 min,  $95^\circ\text{C}$  变性 20 s,  $59^\circ\text{C}$  退火 20 s,  $72^\circ\text{C}$  延伸 15 s, 25 个循环。COI 引物反应体系与 18S-V9 引物一致, 扩增片段长度 310 bp; 反应条件:  $95^\circ\text{C}$  预变性 2 min,  $95^\circ\text{C}$  变性 15 s,  $46^\circ\text{C}$  退火 30 s,  $72^\circ\text{C}$  延伸 40 s, 35 个循环。PCR 产物使用琼脂糖凝胶电泳检测, 琼脂糖凝胶浓度为 2%, 核酸染料采用 GelRed, 电泳电压 110V, 电泳时间 30min, 使用 100bp DNA Ladder 对产物 DNA 链长度进行大致划分。电泳完成后, 使用 ImageLab 判断电泳是否成功, 要求 PCR 扩增产物有目的条带, 且条带清晰单一, 阴性对照无显著条带。最后使用磁珠法对 PCR 产物进行纯化处理, 并利用 Qubit 测定纯化产物浓度, 纯化产物 DNA 浓度要求大于  $2.5\text{ ng}/\mu\text{L}$ 。

表 2 DNA 提取引物信息

Table 2 Primer pairs used in this study

测定类群 Species	上游引物 (5'→3') Forward primer (5'→3')	下游引物 (5'→3') Reverse primer (5'→3')	区域 Region
浮游动物 Zooplankton <sup>[22]</sup>	GGWACWGGWTGAACWGTWTAYCCYCC	GGRGGRTASACSGTTCASCCSGTSCC	CO I
浮游植物 Phytoplankton <sup>[24]</sup>	TCCCTGCCHTTTGTACACAC	CCTTCYGCAGGTTACCTAC	18S-V9
底栖动物 Zoobenthos <sup>[22]</sup>	GGWACWGGWTGAACWGTWTAYCCYCC	GGRGGRTASACSGTTCASCCSGTSCC	CO I
鱼类 Fish <sup>[26]</sup>	ACACCGCCCGTCACTCT	CTTCCGGTACACTTACCATG	12S

简并引物 R=A/G, Y=C/T, S=C/G, W=A/T, H=A/C/T

## 1.4 高通量测序

委托南京易基诺环保科技有限公司进行测序。使用 NEBNext Fast DNA Library Prep Set for Ion Torrent (E6270) 试剂盒进行测序文库的构建。利用凝胶电泳对所构建的文库质量进行检查, 并使用 Qubit 进行文库浓度定量。最后选用 Chip 530 芯片在 Ion Torrent S5 平台进行二代测序。

## 1.5 生物信息学数据数据分析

根据 UPARSE 将序列以 97% 的相似性 (18S 和 COI) 和 99% (12S) 聚类到可操作的分类单元 (Operational Taxonomic Units, OTUs)。对于 18S 和 COI 的 OTU 使用核糖体数据库 (Ribosomal Database Project, RDP) 进行分类并在 Greengenes<sup>[29]</sup> 和 SILVA<sup>[30]</sup> 数据库中进行注释; 12S OTU 代表序列在 NCBI 中的核苷酸数据库 GenBank 中进行注释<sup>[31]</sup>。将分属同一类群的 OTU 组合, 以估计该类群的丰度。Shannon-Weiner 指数、主坐标分析、PERMANOVA 检验及相似性距离关系等统计分析均使用 R 软件 (3.5.3) 中的 vegan 包, 可视化绘图使用 R 软件中 ggplot2 包及 Origin 2020b。



2 结果与分析

2.1 秦淮河环境 DNA 物种注释

秦淮河 32 个采样点位环境 DNA 宏条形码测试结果及物种注释结果如表 3 所示。

表 3 秦淮河环境 DNA 宏条形码测试结果  
Table 3 Results of environmental DNA metabarcoding in Qinhuai River

		浮游动物 Zooplankton	浮游植物 Phytoplankton	底栖动物 Zoobenthos	鱼类 Fish
序列 Sequences		1109819	972263	240047	615400
分类单元 OTUs		407	4445	212	1663
注释结果 Results	门 Phylum	2	4	7	1
	纲 Class	5	8	10	1
	目 Order	7	15	8	14
	科 Family	13	44	10	26
	属 Genus	13	85	16	53
	种 Species	22	60	17	44

2.2 秦淮河物种分布

2.2.1 秦淮河浮游动物(目水平)分布

综合 32 个点位浮游动物目水平注释结果,秦淮河游泳轮虫目(*Ploima*)、双甲目(*Diplostraca*)和未归类的浮游动物(*unassigned zooplankton*)的序列数占比较高,分别占比 31.95%、31.42%和 27.40%。但是不同点位优势种占比差异较大,点位 9 中双甲目(*Diplostraca*)占比高达 95.91%,点位 15 中游泳轮虫目(*Ploima*)占比高达 75.08%,点位 27 和 28 中未归类的浮游动物(*unassigned zooplankton*)占比较高。

2.2.2 秦淮河浮游植物(门水平)分布

秦淮河中浮游植物的优势种群为隐藻门(*Cryptomonas*)、褐藻门(*Ochrophyta*)及绿藻门(*Chlorophyta*),其序列数占比分别为 46.35%、41.76%和 5.85%,占序列总数的 93.96%。点位 15 隐藻(*Cryptomonas*)占比最高,为 72.53%;点位 23 褐藻(*Ochrophyta*)占比最高,为 86.42%。上游北支(点位 15—23)呈现出,从上游到下游,隐藻占比逐渐下降而褐藻占比逐渐上升的趋势;下游(点位 1—13)除点位 6 外和上游南支(点位 14、点位 24—32),隐藻和褐藻占比变化不大。

2.2.3 秦淮河底栖动物(门水平)分布

秦淮河中底栖动物序列数占比较高的种群为节肢动物门(*Arthropoda*)和刺胞动物门(*Cnidaria*),其占比分别为 91.67%和 7.13%,占总序列的 98.8%。虽然软体动物门(*Mollusca*)在总序列中占比较低,但在点位 23 中占比达 45.75%。相较于浮游动物而言,底栖动物测得的总序列数较少,仅占 CO I 引物测序总数的 17.78%。

2.2.4 秦淮河鱼类(目水平)分布

鱼类属于辐鳍鱼纲,共检出 14 目。其中鲤形目(*Cypriniformes*)、虾虎鱼目(*Gobiiformes*)和鲱形目(*Clupeiformes*)为优势种群,占比分别为 69.99%、15.86%和 5.42%。鲤形目(*Cypriniformes*)在 32 个点位中占比均最高,占比区间为 51.81%—81.34%。除个别点位(点位 10、点位 24 和点位 25)外,秦淮河鱼类分布占比较为平均。

2.3 秦淮河生物多样性

Shannon-Weiner 指数常用来评价群落生境内的  $\alpha$  多样性。秦淮河的生物多样性状况如图 6 所示。秦淮河浮游动物 Shannon-Weiner 指数均值在 1.22—4.03 之间,点位 9 浮游动物多样性状况较差,上游浮游动物多样性比下游更丰富;浮游植物 Shannon-Weiner 指数均值范围为 3.64—6.48,上游南支浮游植物多样性均比较

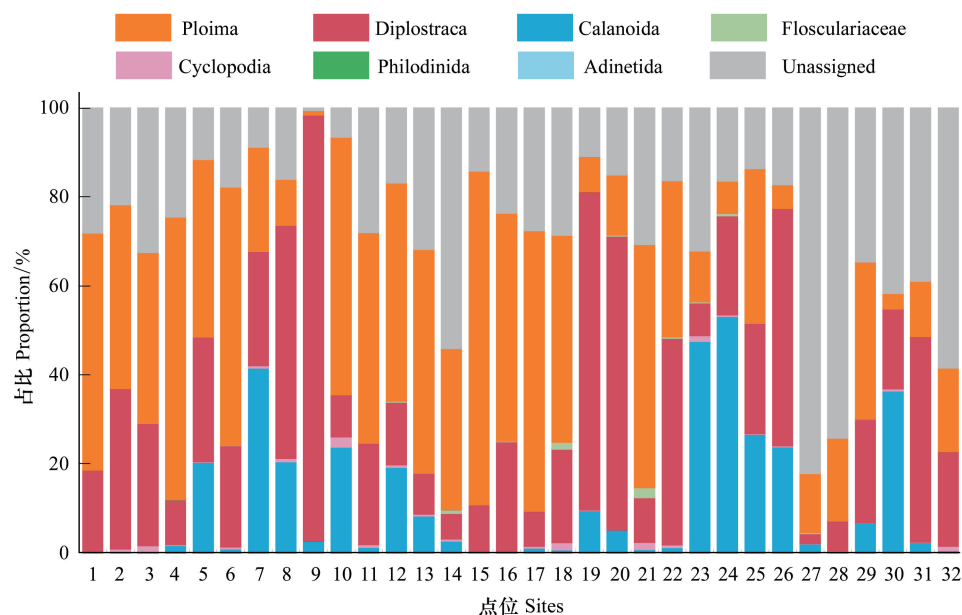


图2 秦淮河浮游动物目水平占比

Fig.2 Proportion of zooplankton classified in Order level in Qinhuai River

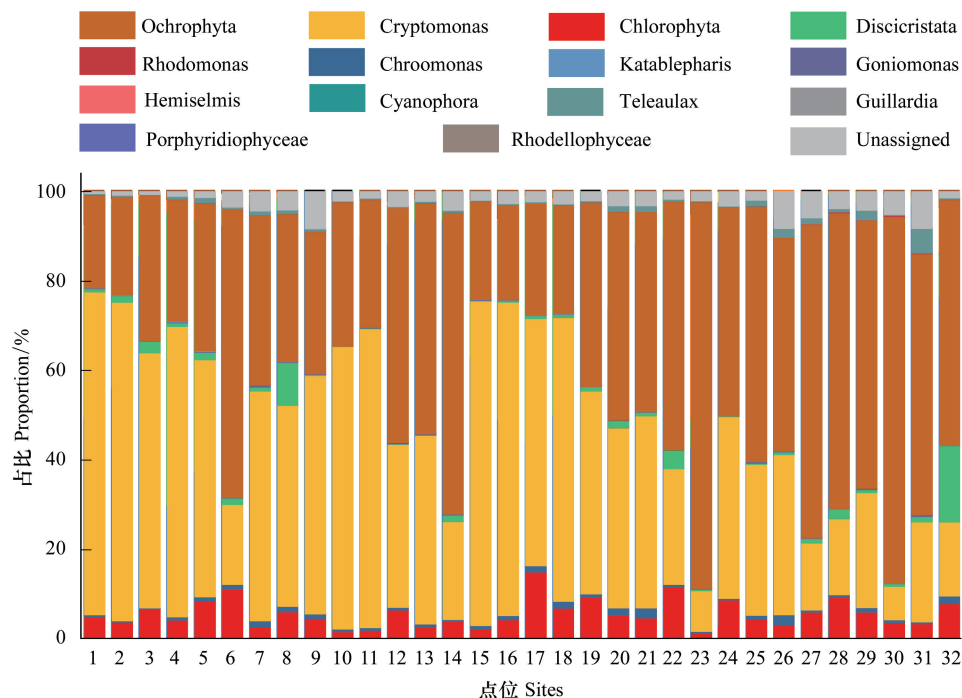


图3 秦淮河浮游植物门水平占比

Fig.3 Proportion of phytoplankton classified in Phylum level in Qinhuai River

丰富,上游北支和下游均呈现多样性从上游到下游逐渐降低的趋势;底栖动物 Shannon-Weiner 指数均值为 1.23—3.26,整体 Shannon-Weiner 指数偏低,点位 31、32 和下游底栖动物多样性更贫乏;秦淮河鱼类多样性丰富,Shannon-Weiner 指数均值为 5.22—6.36。

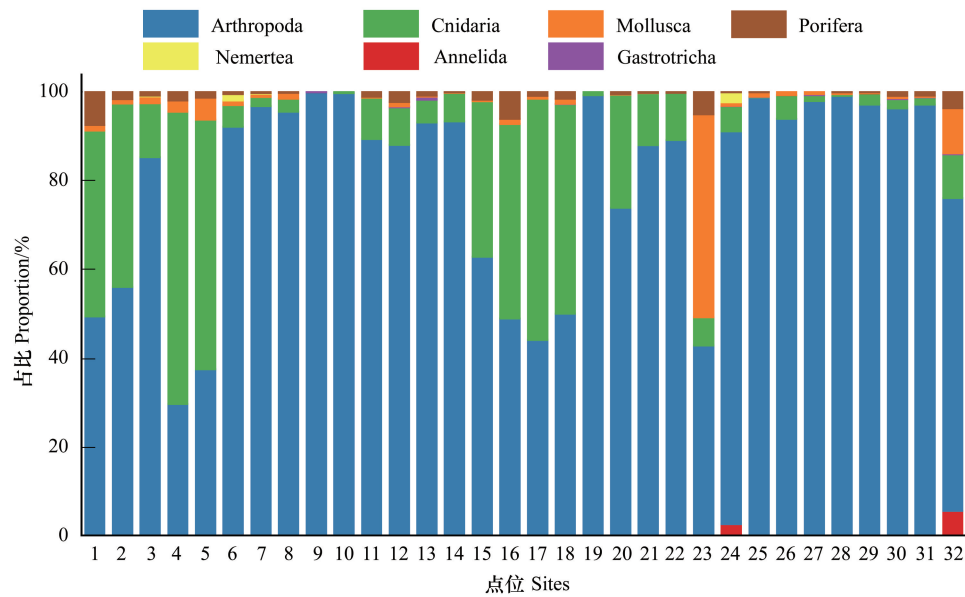


图 4 秦淮河底栖动物门水平占比

Fig.4 Proportion of zoobenthos classified in Phylum level in Qinhuai River

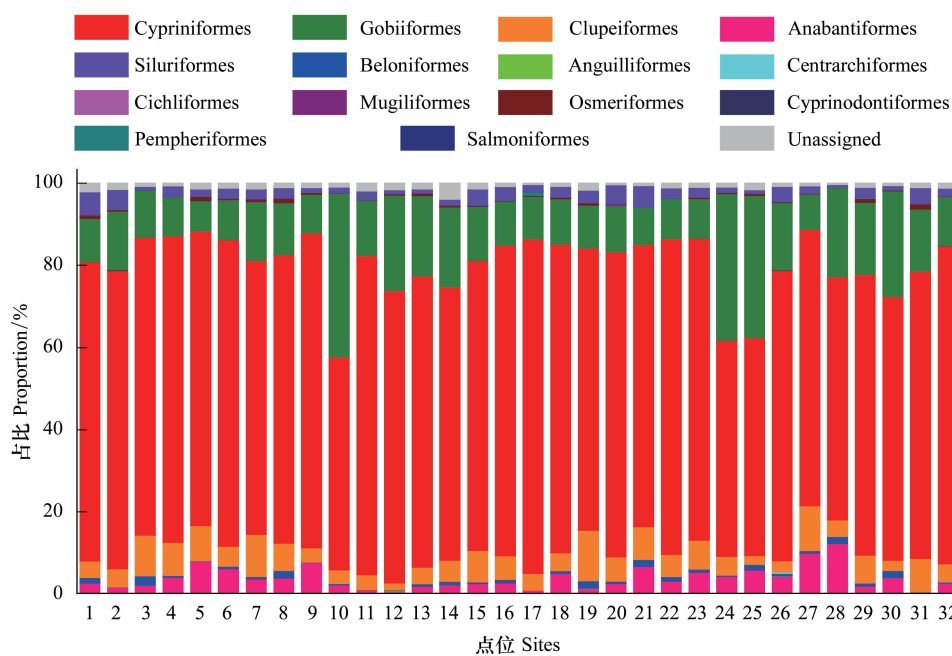


图 5 秦淮河鱼类目水平占比

Fig.5 Proportion of fish classified in Order level in Qinhuai River

## 2.4 秦淮河上下游差异

从 Shannon-Weiner 指数来看,如图 7 所示秦淮河上下游各群落  $\alpha$  多样性相差较小,为了能更直观地比较各个种群上下游间的差异,本研究对数据进行了降维,并利用 PERMANOVA 对组间差异从统计学上进行检验。

降维使用了主坐标分析,从可视化结果上看,除鱼类外,秦淮河上下游物种均有显著差异。浮游动物的 PCoA 图 PCo1 和 PCo2 共解释 40.65% 的差异,其中下游和上游北支均与上游南支差异显著;浮游植物的两个主坐标共解释 41.99% 的差异,结果与浮游动物类似;底栖动物的两个主坐标共解释 35.24% 的差异,上游南北

支差异显著;鱼类的两个主坐标共解释 24.615% 的差异,但 PCoA 图上各组并没有显著分开。因此对数据进行 PERMANOVA 检验,从统计学判断各组间是否有显著差异。

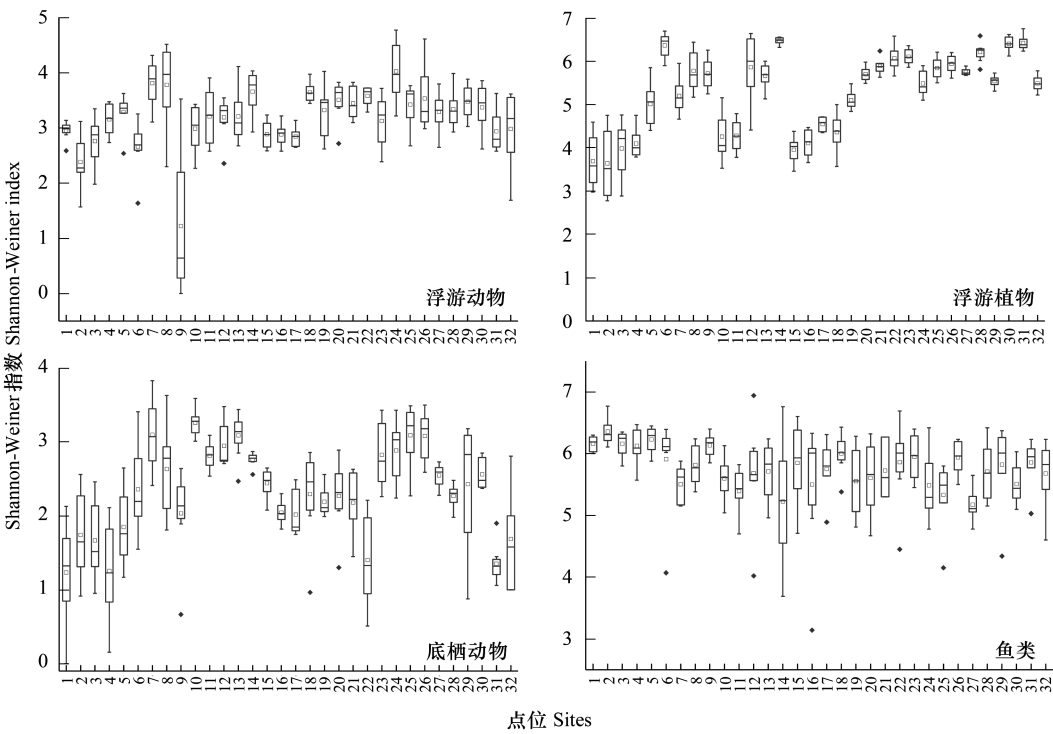


图 6 秦淮河生物多样性  
Fig.6 Alpha ( $\alpha$ ) diversity in Qinhuai River

由 PERMANOVA 检验可知,四类种群上下游各组间均有极显著差异( $P<0.001$ ),主坐标分析图重合较多分组的可解释部分( $R^2$ )较小,上下游各组间鱼类群落虽然有显著差异,但是  $R^2$  仅为 3.48%,表明上下游位置因素贡献显著但占比较小。上下游位置因素对浮游动物和浮游植物和底栖动物群落差异的贡献较大, $R^2$  分别为 11.34%、17.52%和 9.44%。秦淮河上游不同来源的两支间群落结构也有显著差异。

表 4 秦淮河组间差异 (PERMANOVA)

Table 4 PERMANOVA test indicating the differences between groups of Qinhuai River					
分组 Group		浮游动物 Zooplankton	浮游植物 Phytoplankton	底栖动物 Zoobenthos	鱼类 Fish
总 Total	$R^2$	0.11344	0.17522	0.0944	0.03477
	$F$	15.675	25.812	12.769	4.0708
	$P$	0.001 ***	0.001 ***	0.001 ***	0.001 ***
下游-上游南支 Downstream-south branch of upstream	$R^2$	0.11385	0.16755	0.04995	0.02156
	$F$	23.125	35.826	9.4629	3.6133
	$P$	0.001 ***	0.001 ***	0.001 ***	0.001 ***
下游-上游北支 Downstream-north branch of upstream	$R^2$	0.03502	0.06289	0.06347	0.02524
	$F$	6.0961	11.14	11.385	3.9616
	$P$	0.001 ***	0.001 ***	0.001 ***	0.001 ***
上游南支-上游北支 South branch of upstream-north branch of upstream	$R^2$	0.10468	0.16719	0.11642	0.03415
	$F$	16.603	28.508	18.709	4.7738
	$P$	0.001 ***	0.001 ***	0.001 ***	0.001 ***

\*\*\* 在  $P<0.001$  水平上显著



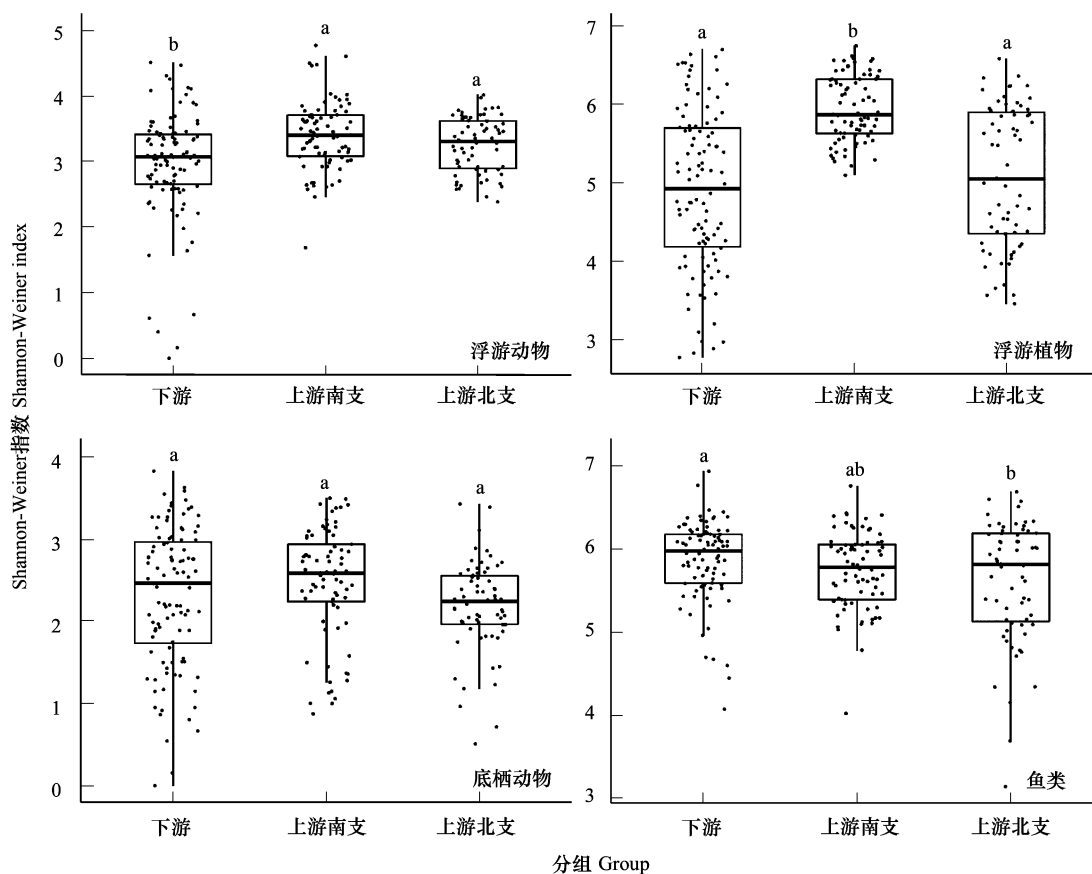


图7 秦淮河上下游生物多样性

Fig.7 Alpha ( $\alpha$ ) diversity in the upstream and downstream of Qinhuai River

## 2.5 秦淮河物种距离衰减变化

秦淮河不同物种的距离衰减变化 (Distance decay relationship, DDR) 趋势不一致。浮游动物、浮游植物和底栖动物都表现出了显著的生物相似性随距离增长而衰减的趋势 ( $P < 0.001$ ), 其中底栖动物的衰减趋势更强。鱼类没有表现出明显的距离衰减趋势, 详见图 9。

## 2.6 秦淮河物种群落与化学指标关系

为了评价秦淮河物种群落与环境因子 (TN、TOC、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 、TP、 $\text{NH}_3\text{-N}$ 、COD、和 DO) 之间的关系, 对其进行了冗余分析, 经过膨胀因子检验, 去除了共线性显著的  $\text{NO}_2\text{-N}$  和  $\text{NO}_3\text{-N}$ 。其结果如图 10 所示。置换检验结果表明所选的环境因子 (TN、TOC、TP、 $\text{NH}_3\text{-N}$ 、COD 和 DO) 均对浮游生物和底栖动物群落有极显著的影响 ( $P < 0.001$ ); 对鱼类群落结构而言, 具有极显著影响的是 DO、TOC、TN, 其次是 COD 和 TP,  $\text{NH}_3\text{-N}$  对其影响不显著。

就环境因子影响大小而言, 浮游动物的环境因子影响大小排序为:  $\text{TN} > \text{TOC} > \text{TP} > \text{NH}_3\text{-N} > \text{DO} > \text{COD}$ ; 浮游植物的环境因子影响大小排序为:  $\text{TOC} > \text{TN} > \text{DO} > \text{TP} > \text{COD} > \text{NH}_3\text{-N}$ ; 底栖动物的环境因子影响大小排序为:  $\text{TOC} > \text{COD} > \text{TN} > \text{TP} > \text{NH}_3\text{-N} > \text{DO}$ ; 鱼类的环境因子影响大小排序为:  $\text{TOC} > \text{DO} > \text{TN} > \text{COD} > \text{TP}$ 。

## 3 讨论

### 3.1 秦淮河物种组成及水质状况

调研期间, 秦淮河 32 个采样点位环境 DNA 宏条形码技术鉴定到: 浮游动物 13 属 22 种 407 个 OTUs; 浮游植物 85 属 60 种 4445 个 OTUs; 底栖动物 16 属 17 种 212 个 OTUs; 鱼类 53 属 44 种 1663 个 OTUs。其中浮

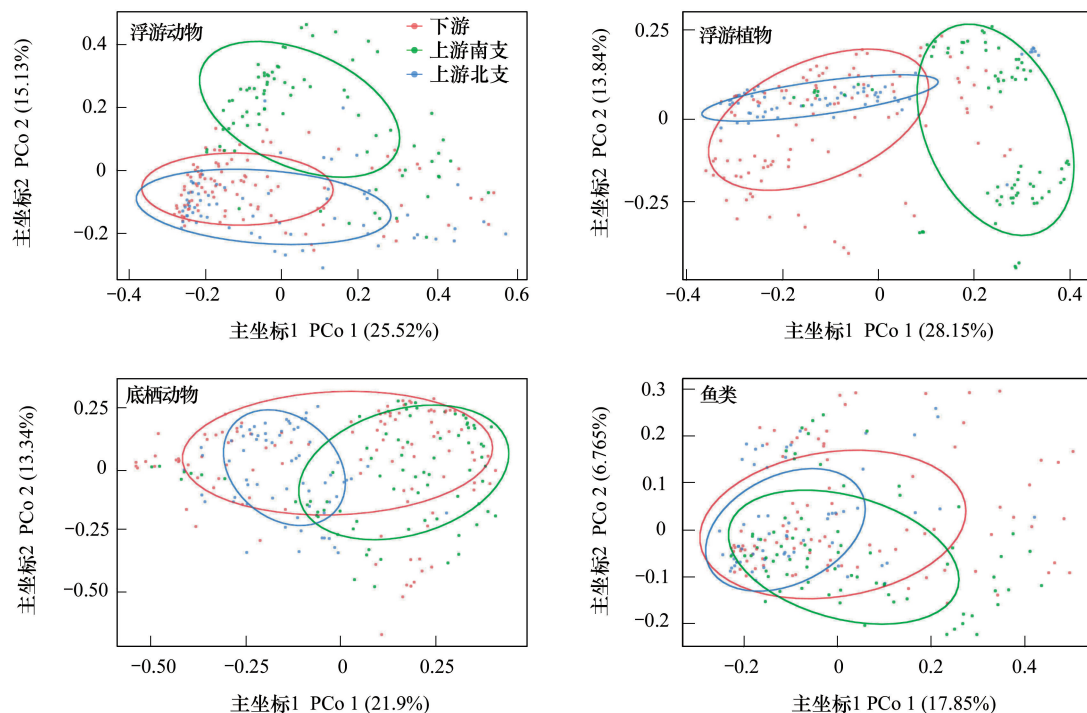


图 8 秦淮河主坐标分析

Fig.8 Principal coordinates analysis of species in Qinhuai River

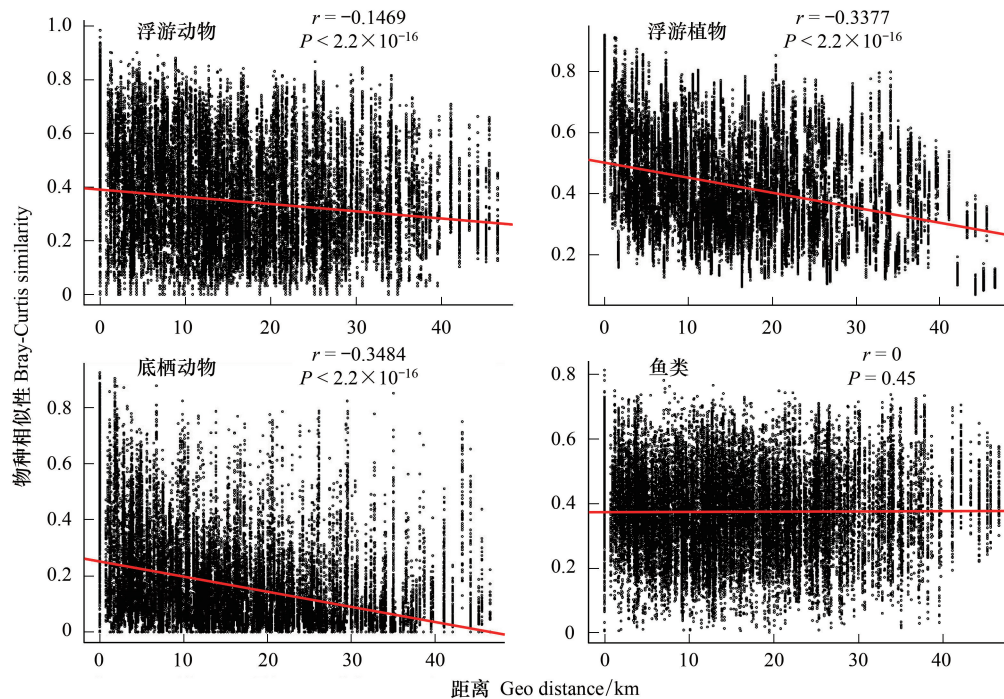


图 9 秦淮河物种距离衰减变化

Fig.9 Distance-decay relationship of community in Qinhuai River

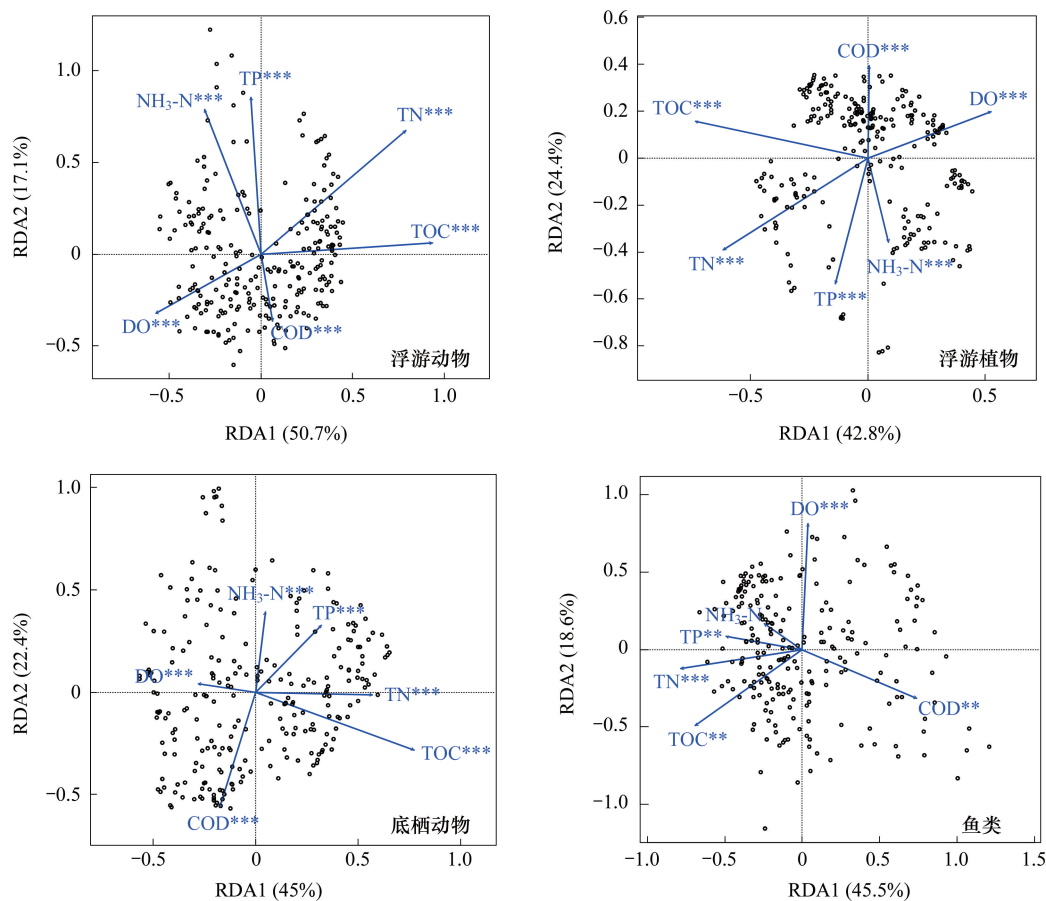


图 10 秦淮河物种群落与环境因子的冗余分析

Fig.10 Redundancy analysis ordination plot of OTUs of Qinhuai River constrained by environmental variables

游动物以游泳轮虫目(*Ploima*)和双甲目(*Diplostraca*)为主,共占比 63.37%;浮游植物以隐藻门(*Cryptomonas*)和褐藻门(*Ochrophyta*)为主,共占比 88.11%;底栖动物中节肢动物门(*Arthropoda*)占比最高,达 91.67%;鱼类中鲤形目(*Cypriniformes*)占比最高,达 69.99%。

石晓丹等<sup>[13]</sup>2005 年在秦淮河流域通过常规形态学鉴定共检出浮游动物 13 种,以轮虫为主,轮虫占全部种类的 69.2%,本次调研中,虽轮虫占比不及 2005 年,但也为秦淮河浮游动物中的优势种。石晓丹等<sup>[13]</sup>于 2005 年调研秦淮河的浮游植物,调研表明共检出 43 种,以硅藻门和绿藻门为主;严莹<sup>[10]</sup>于秋冬季对秦淮河的调研共检出浮游植物 37 种,以蓝藻和硅藻为主。本次调研中浮游植物的检出结果与以往的文献报道有较大差异,一方面是由于时间的变化,调研时间跨度较久,浮游植物的变化较大,另一方面由于检测方式有差异,今后将进一步探究秦淮河浮游植物的时间变化差异。吴东浩等<sup>[12]</sup>于 2009 年 4 月对秦淮河上游底栖动物进行调查,共获得 63 个底栖动物分类单元。其中节肢动物门占比最高,达 47.6%,这与本次调研有相似的结论,但本次调研中节肢动物门占比更高。秦淮河鱼类资源调研资料暂缺,但毛志刚等<sup>[32]</sup>于 2009—2010 年对太湖鱼类资源进行了调研,共捕获鱼类 40 属 50 种,其中鲤形目占比最高,为总数的 68%。徐念等<sup>[28]</sup>于 2016 年 1 月利用环境 DNA 宏条形码技术对长江中下游物种进行监测,结果也表明鲤形目在鱼类中占比高达 60%。本次调研与文献报道中的长江、太湖流域鱼类监测结果类似,这也与长江鱼类资源鲤科鱼类种类多<sup>[33]</sup>的特点相吻合。

国内外大量学者研究表明环境 DNA 宏条形码技术在物种多样性调研方面较传统形态学监测具有显著优势,其具有节省时间、人力成本,不需要专业的形态学鉴定人员等优点<sup>[16—17]</sup>。且其鉴定结果中的物种丰度较

传统形态学监测更高<sup>[34-35]</sup>。本次调研虽未利用形态学监测进行对比,但与历史文献等相对比,结论具有一定的相似性,同时也为秦淮河整体的类群调研提供了新的思路与方法。

根据 Shannon-Weiner 指数分级评价标准(表 5)<sup>[36]</sup>,秦淮河浮游动物,1 个点位多样性“一般”,水体呈现中污染状态,占比 3.12%;9 个点位多样性“较丰富”,水体呈现轻度污染,占比 28.13%;22 个点位处于“丰富”,水体清洁,占比 68.75%。秦淮河所有点位的浮游植物多样性均为“丰富”。底栖动物中,8 个点位多样性“一般”,占比 25%;19 个点位多样性“较丰富”,占比 59.38%;5 个点位多样性“丰富”,占比 15.62%。秦淮河鱼类 Shannon-Weiner 指数均大于 5,均属于“丰富”级别。总的来说,多样性指数较低的点位多处于下游和上游南支,下游处于城市住宅中心,属于居民密集区,受人为活动影响较大,可能因此多样性较低,水体污染较重;秦淮河上游两支,总体上游南支(南京)α 多样性较上游北支(句容)更丰富。

表 5 Shannon-Wiener 指数( $H'$ )分级评价标准

Table 5 The evaluation standard of Shannon-Wiener index ( $H'$ )

指数范围 Range	级别 Level	评价状态 Status	水体污染程度 Pollution degree
$H' > 3$	丰富	物种种类丰富,个体分布均匀	清洁
$2 < H' \leq 3$	较丰富	物种丰富度较高,个体分布比较均匀	轻污染
$1 < H' \leq 2$	一般	物种丰富度较低,个体分布比较均匀	中污染
$0 < H' \leq 1$	贫乏	物种丰富度低,个体分布不均匀	重污染
$H' = 0$	极贫乏	物种单一,多样性基本丧失	严重污染

### 3.2 秦淮河生物多样性空间差异

本次调研结果表明浮游动物和浮游植物各点位占比差异较大,整体空间变化趋势相似,可能是由于部分浮游动物以浮游植物为食<sup>[37]</sup>;底栖动物上游北支与下游近江(长江)点位丰富度更高;鱼类群落种类整体分布更为均匀,鲤形目在各点位均为优势种。空间分布上,主坐标分析和 PERMANOVA 组间差异检验表明秦淮河下游、上游南支和上游北支间有极显著差异( $P < 0.001$ )。其中浮游动物、浮游植物和底栖动物受分组影响更大, $R^2$ 分别为 0.113、0.175 和 0.094,分组对鱼类的影响相对较小, $R^2$ 仅为 0.035。除鱼类外,整体上游南支多样性指数(Shannon-Weiner 指数)更高,物种更为丰富,表明秦淮河上游南支(南京)水质状况更好。距离衰减关系常用来评估物种对地理或环境距离的响应程度。由于不同生物对同一景观的敏感度不同,因此不同物种的距离衰减关系不同。秦淮河的四个类群中,除鱼类外,其余三个类群均表现出了明显的随距离增加而衰减的趋势。浮游动物、浮游植物和底栖动物显著的距离衰减趋势表明扩散可能导致它们的组成变化<sup>[38]</sup>。鱼类没有表现出明显的距离衰减趋势可能是由于鱼类迁徙能力强,分布广泛<sup>[31]</sup>,这也与鱼类 α 多样性指数较为均匀一致。秦淮河生物群落结构和分布的探究,有助于今后制定秦淮河生物多样性监测的采样方案;探究地理距离对其群落结构的影响便于今后更好地确定秦淮河生物多样性保护的重点。

### 3.3 环境因子对秦淮河生物群落分布的影响

生物群落分布受环境因素的综合影响,不同水体中环境因素对群落结构的影响也存在差异。相关研究表明,氮、磷等营养盐能调节浮游植物生长<sup>[39]</sup>,而浮游植物作为生产者是生态系统中消费者食物来源之一,从而也会对其他生物造成影响。Zhou 等<sup>[40]</sup>发现水温、TP、TN、COD 和 TOC 是影响太湖中浮游动物的主要环境因子;任辉等<sup>[41]</sup>通过冗余分析发现叶绿素 a、溶解氧、盐度、水温、TN 和 pH 对珠江河南沙河浮游植物群落结构影响最为密切;陈丽等<sup>[42]</sup>通过典范对应分析发现拉萨河底栖动物群落结构的主要影响因子为海拔、COD、硫化物、pH、TP 和 TN。本次调研结果表明,环境因子对秦淮河生物具有显著的影响,其中 DO、COD、TOC 以及氮磷营养盐对浮游生物和底栖动物均有极显著影响( $P < 0.001$ ),结论与上述结论类似。本次调研中发现秦淮河鱼类群落分布主要受 TOC、DO、TN、COD 和 TP 影响,这与李艳利等<sup>[43]</sup>在河段尺度上对浑太河鱼类群落分布的影响环境因子探究结果类似。



冗余分析结果还进一步表明,不同营养级的生物对环境因子的敏感程度有差异。较低营养级的生物对环境因子的变化更为敏感,比如  $\text{NH}_3\text{-N}$  对浮游生物和底栖动物均有显著的影响,但对鱼类的影响并不显著。

#### 4 结论

(1) 基于环境 DNA 宏条形码技术,秦淮河共监测到浮游动物 22 种 407 个 OTUs,浮游植物 60 种 4445 个 OTUs,底栖动物 17 种 212 个 OTUs,鱼类 44 种 1663 个 OTUs。其中浮游动物以游泳轮虫目和双甲目为主,浮游植物以隐藻门和褐藻门为主,底栖动物中节肢动物门占比最高,鱼类中鲤形目占比最高。环境 DNA 宏条形码技术在物种丰度鉴定方面较传统形态学监测更具优势。

(2) 通过主坐标分析和 PERMANOVA 检验,发现秦淮河下游、上游南支和上游北支间有极显著差异 ( $P < 0.001$ )。下游  $\alpha$  多样性较上游更为贫乏,上游南支(南京)  $\alpha$  多样性较上游北支(句容)更丰富。四个类群中,除鱼类外,均表现出了明显的随距离增加而衰减的趋势。

(3) 冗余分析表明,较低营养级的生物对环境因子的变化更为敏感,浮游生物和底栖动物的主要影响因素为 TN、TOC、TP、 $\text{NH}_3\text{-N}$ 、COD 和 DO。鱼类的影响因子为 DO、TOC、TN、TP 和 COD。

(4) 基于环境 DNA 宏条形码技术对秦淮河生物多样性的刻画,可为秦淮河生物多样性的保护提供理论参考。

#### 参考文献 (References):

- [1] Dudgeon D, Arthington A H, Gessner M O, Kawabata Z I, Knowler D J, L  v  que C, Naiman R J, Prieur-Richard A H, Soto D, Stiassny M L J, Sullivan C A. Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 2006, 81(2): 163-182.
- [2] WWF. Living Planet Report-2018: Aiming Higher. Switzerland: WWF, 2018.
- [3] Reid A J, Carlson A K, Creed I F, Eliason E J, Gell P A, Johnson P T J, Kidd K A, MacCormack T J, Olden J D, Ormerod S J, Smol J P, Taylor W W, Tockner K, Vermaire J C, Dudgeon D, Cooke S J. Emerging threats and persistent conservation challenges for freshwater biodiversity. *Biological Reviews*, 2019, 94(3): 849-873.
- [4] Wang W, Feng C T, Liu F Z, Li J S. Biodiversity conservation in China: a review of recent studies and practices. *Environmental Science and Ecotechnology*, 2020, 2: 100025.
- [5] Crofts R. Linking geoconservation with biodiversity conservation in protected areas. *International Journal of Geoheritage and Parks*, 2019, 7(4): 211-217.
- [6] 李跃飞, 夏永秋, 李晓波, 熊正琴, 颜晓元. 秦淮河典型河段总氮总磷时空变异特征. *环境科学*, 2013, 34(1): 91-97.
- [7] 徐慧敏, 刘为锋, 吴燕, 唐启彤, 汤新政, 黄睿, 沈烽, 赵大勇. 南京内秦淮河浮游细菌群落结构分析. *环境科学与技术*, 2016, 39(S1): 1-5.
- [8] Li J, Li Y, Qian B, Niu L H, Zhang W L, Cai W, Wu H N, Wang P F, Wang C. Development and validation of a bacteria-based index of biotic integrity for assessing the ecological status of urban rivers: a case study of Qinhuai River basin in Nanjing, China. *Journal of Environmental Management*, 2017, 196: 161-167.
- [9] Xu Y, Yang F, Liu Y, Wang Z J, Wang J, Wang G X, Li R H. Genetic diversity of *Microcystis* populations in a bloom and its relationship to the environmental factors in Qinhuai River, China. *Microbiological Research*, 2011, 167(1): 20-26.
- [10] 严莹. 秦淮河秋冬季浮游植物群落与环境因子典范对应分析. *河海大学学报: 自然科学版*, 2013, 41(6): 505-510.
- [11] 卢绪鑫. 秦淮河与白马湖后生浮游动物群落结构的比较研究[D]. 南京: 南京师范大学, 2019.
- [12] 吴东浩, 刘伟, 赵煜, 张哲海, 王备新. 秦淮河上游水体大型底栖无脊椎动物群落结构及水质生物评价. *环境监测管理与技术*, 2010, 22(5): 19-22, 30-30.
- [13] 石晓丹, 阮晓红. 南京外秦淮河浮游动植物初步调查研究. *人民长江*, 2008, 39(3): 51-53, 56-56.
- [14] 蒋燕华, 于正广. 江苏省秦淮河流域水资源保护与治理途径探讨//中国水利学会 2015 学术年会论文集. 南京: 中国水利学会, 2015: 3-3.
- [15] Ruppert K M, Kline R J, Rahman M S. Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: a systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA. *Global Ecology and Conservation*, 2019, 17: e00547.
- [16] Hering D, Borja A, Jones J I, Pont D, Boets P, Bouchez A, Bruce K, Drakare S, H  nfling B, Kahlert M, Leese F, Meissner K, Mergen P, Reyjol Y, Segurado P, Vogler A, Kelly M. Implementation options for DNA-based identification into ecological status assessment under the European Water Framework Directive. *Water Research*, 2018, 138: 192-205.
- [17] Gibson J F, Shokralla S, Curry C, Baird D J, Monk W A, King I, Hajibabaei M. Large-scale biomonitoring of remote and threatened ecosystems via high-throughput sequencing. *PLoS One*, 2015, 10(10): e0138432.

- [18] Andruszkiewicz E A, Starks H A, Chavez F P, Sassoubre L M, Block B A, Boehm A B. Biomonitoring of marine vertebrates in Monterey Bay using eDNA metabarcoding. *PLoS One*, 2017, 12(4): e0176343.
- [19] Cilleros K, Valentini A, Allard L, Dejean T, Etienne R, Grenouillet G, Iribar A, Taberlet P, Vigouroux R, Brosse S. Unlocking biodiversity and conservation studies in high-diversity environments using environmental DNA (eDNA): a test with Guianese freshwater fishes. *Molecular Ecology Resources*, 2019, 19(1): 27-46.
- [20] Stat M, John J, Dibattista J D, Newman S J, Bunce M, Harvey E S. Combined use of eDNA metabarcoding and video surveillance for the assessment of fish biodiversity. *Conservation Biology*, 2019, 33(1): 196-205.
- [21] Carew M E, Pettigrove V J, Metzeling L, Hoffmann A A. Environmental monitoring using next generation sequencing: rapid identification of macroinvertebrate bioindicator species. *Frontiers in Zoology*, 2013, 10(1): 45.
- [22] Leray M, Yang J Y, Meyer C P, Mills S C, Agudelo N, Ranwez V, Boehm J T, Machida R J. A new versatile primer set targeting a short fragment of the mitochondrial COI region for metabarcoding metazoan diversity: application for characterizing coral reef fish gut contents. *Frontiers in Zoology*, 2013, 10(1): 34.
- [23] Minerovic A D, Potapova M G, Sales C M, Price J R, Enache M D. 18S-V9 DNA metabarcoding detects the effect of water-quality impairment on stream biofilm eukaryotic assemblages. *Ecological Indicators*, 2020, 113: 106225.
- [24] Malviya S, Scalco E, Audic S, Vincent F, Veluchamy A, Poulain J, Wincker P, Iudicone D, De Vargas C, Bittner L, Zingone A, Bowler C. Insights into global diatom distribution and diversity in the world's ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(11): E1516-E1525.
- [25] Port J A, O'donnell J L, Romero-Maraccini O C, Leary P R, Litvin S Y, Nickols K J, Yamahara K M, Kelly R P. Assessing vertebrate biodiversity in a kelp forest ecosystem using environmental DNA. *Molecular Ecology*, 2016, 25(2): 527-541.
- [26] Valentini A, Taberlet P, Miaud C, Civade R, Herder J, Thomsen P F, Bellemain E, Besnard A, Coissac E, Boyer F, Gaboriaud C, Jean P, Poulet N, Roset N, Copp G H, Geniez P, Pont D, Argillier C, Baudoin J M, Peroux T, Crivelli A J, Olivier A, Acqueberge M, Le Brun M, Møller P R, Willerslev E, Dejean T. Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Molecular Ecology*, 2016, 25(4): 929-942.
- [27] 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. *生态毒理学报*, 2018, 13(5): 76-86.
- [28] 徐念, 熊美华, 邵科, 阙延福, 李键庸. 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. *环境科学研究*, 2020, 33(5): 1187-1196.
- [29] DeSantis T Z, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie E L, Keller K, Huber T, Dalevi D, Hu P, Andersen G L. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(7): 5069-5072.
- [30] Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner F O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 2012, 41(D1): D590-D596.
- [31] Zhang Y, Pavlovskaya M, Stoica E, Prekrasna I, Yang J H, Slobodnik J, Zhang X W, Dykyi E. Holistic pelagic biodiversity monitoring of the Black Sea via eDNA metabarcoding approach: from bacteria to marine mammals. *Environment International*, 2020, 135: 105307.
- [32] 毛志刚, 谷孝鸿, 曾庆飞, 周露洪, 王小林, 吴林坤, 曹萍, 孙明波. 太湖鱼类群落结构及多样性. *生态学杂志*, 2011, 30(12): 2836-2842.
- [33] 曹文宣. 长江鱼类资源的现状与保护对策. *江西水产科技*, 2011, 4(2): 1-4.
- [34] Serrana J M, Miyake Y, Gamboa M, Watanabe K. Comparison of DNA metabarcoding and morphological identification for stream macroinvertebrate biodiversity assessment and monitoring. *Ecological Indicators*, 2019, 101: 963-972.
- [35] Schroeder A, Stanković D, Pallavicini A, Gionechetti F, Pansera M, Camatti E. DNA metabarcoding and morphological analysis-Assessment of zooplankton biodiversity in transitional waters. *Marine Environmental Research*, 2020, 160: 104946.
- [36] 李娣, 李旭文, 牛志春, 张军毅, 徐东炯, 李继影, 陈明, 陈志芳, 曹毅, 李朝, 卜伟, 于红霞. 江苏省不同营养状况湖泊底栖动物群落结构与多样性比较. *生态毒理学报*, 2017, 12(1): 163-172.
- [37] 夏品华, 马健荣, 李存雄, 林陶, 詹金心, 伍庆. 红枫湖水库冬春季浮游生物群落与环境因子的典范对应分析. *环境科学研究*, 2011, 24(4): 378-386.
- [38] Tornero I, Boix D, Bagella S, Pinto-Cruz C, Caria M C, Belo A, Lumbreras A, Sala J, Compte J, Gascón S. Dispersal mode and spatial extent influence distance-decay patterns in pond metacommunities. *PLoS One*, 2018, 13(8): e0203119.
- [39] Biggs B J F. The contribution of flood disturbance, catchment geology and land use to the habitat template of periphyton in stream ecosystems. *Freshwater Biology*, 1995, 33(3): 419-438.
- [40] Zhou J, Qin B Q, Zhu G W, Zhang Y L, Gao G. Long-term variation of zooplankton communities in a large, heterogenous lake: Implications for future environmental change scenarios. *Environmental Research*, 2020, 187: 109704.
- [41] 任辉, 田恬, 杨宇峰, 王庆. 珠江口南沙河涌浮游植物群落结构时空变化及其与环境因子的关系. *生态学报*, 2017, 37(22): 7729-7740.
- [42] 陈丽, 王东波, 君珊. 拉萨河流域大型底栖动物群落结构及其与环境因子的关系. *生态学报*, 2019, 39(3): 757-769.
- [43] 李艳利, 李艳粉, 徐宗学. 影响浑太河流域鱼类群落结构的不同尺度环境因子分析. *环境科学*, 2014, 35(9): 3504-3512.