



## (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105868545 B

(45)授权公告日 2018.01.16

(21)申请号 201610179071.1

(22)申请日 2016.03.28

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105868545 A

(43)申请公布日 2016.08.17

(73)专利权人 中国科学院城市环境研究所

地址 361021 福建省厦门市集美大道1799号

(72)发明人 蔡超 安新丽 张又弛 朱永官

(51)Int.Cl.

G01F 1/00(2006.01)

审查员 王华

权利要求书2页 说明书8页

### (54)发明名称

一种地下水生态系统健康评价方法

### (57)摘要

本发明公开了一种地下水生态系统健康评价方法,利用地下水微生物完整性指数作为判断指标,包括以下步骤:微生物群落丰富度指数计算:收集微生物细胞,提取基因组DNA,并进行PCR扩增;切割目的条带进行纯化,定量所得PCR产物双末端测序;候选生物参数确定:设定参照点与受损点,选取与步骤中丰富度相关、群落组成相关和对干扰耐受能力相关的参数作为计算生物完整性指数的候选参数;确定微生物完整性指数值:进行指数值分布范围分析和判别能力分析,筛选生物参数;生态系统的健康检测:以步骤中参照点微生物完整性指数值分布的95%分位数最佳值。本发明具有较强的敏感性,可以快速、灵敏、准确、全面客观地反映地下水生态系统健康状况。

1. 一种地下水生态系统健康评价方法, 利用地下水微生物完整性指数作为判断指标, 其特征在于, 包括以下步骤:

A、微生物群落丰富度指数计算:

收集地下水样品中的微生物细胞, 提取微生物基因组DNA, 以DNA为模板, 针对16S rRNA的V4-V5可变区, 并进行PCR扩增; 采用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测得到的PCR产物, 切割目的条带进行纯化, 定量所得PCR产物, 进行测序; 过滤掉低质量序列并挑选代表性序列进行聚类与注释, 随机从每个样品中挑选出相同数目的序列, 进行稀有化分析并计算微生物群落丰富度指数;

B、候选生物参数确定:

设定参照点与受损点, 选取与步骤A) 中丰富度相关、群落组成相关和对干扰耐受能力相关的参数作为计算生物完整性指数的候选参数, 计算干扰耐受参数与栖境参数的最适值, 确定关键环境因子的敏感和耐受微生物分类单元;

C、确定微生物完整性指数值:

对步骤B) 中确定的候选生物参数进行指数值分布范围分析和判别能力分析, 筛选生物参数, 采用比值法计算各样点中筛选到的各生物参数分值, 累加各参数分值得到各样点的生物完整性指数值;

D、生态系统的健康检测:

以步骤C) 中参照点微生物完整性指数值分布的95%分位数作为健康评价标准的最佳值, 低于该值的分布范围进行5等分, 靠近95%分位数的一等分代表被测样点处于健康状态, 随后依次是亚健康、一般、较差和极差的划分标准。

2. 根据权利要求1所述的地下水生态系统健康评价方法, 其特征在于, 步骤A) 中扩增的PCR产物采用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测, 切割目的条带进行纯化, 定量所得PCR产物, 在测序平台进行测序; 测序得到的序列reads, 采用生物信息学软件过滤掉低质量序列, 生成OTU table, 挑选代表性序列并进行OTUs的聚类与注释, 随机从每个样品中挑选出相同数目的OTU序列, 利用生物信息学软件进行稀有化分析并计算微生物群落丰富度指数。

3. 根据权利要求1所述的地下水生态系统健康评价方法, 其特征在于, 步骤B) 中通过以下公式计算干扰耐受参数与栖境参数的最适值:

$$U_k = \sum_{i=1}^m x_i y_{ki} / \sum_{i=1}^m y_{ki}$$

式中,  $x_i$  表示样点环境变量值;  $y_{ki}$  表示属种k在i号样品中的相对丰度;  $U_k$  表示属种k的最适值。

4. 根据权利要求1所述的地下水生态系统健康评价方法, 其特征在于, 步骤D) 中:

地下水样点微生物完整性指数值  $\leq 0.65$ , 地下水生态系统为极差状况, 水体生态系统健康为V类水平;

$0.65 < \text{微生物完整性指数值} \leq 1.30$ , 地下水生态系统为较差状况, 水体生态系统健康为IV类水平;

$1.30 < \text{微生物完整性指数值} \leq 1.95$ , 地下水生态系统为一般状况, 水体生态系统健康为III类水平;

$1.95 < \text{微生物完整性指数值} \leq 2.60$ , 地下水生态系统为亚健康状况, 水体生态系统健康为II类水平;

2.60 < 微生物完整性指数值 ≤ 3.25, 地下水生态系统为健康状况, 水体生态系统健康为I类水平。

5. 根据权利要求1所述的地下水生态系统健康评价方法, 其特征在于, 具体包括以下步骤:

1) 将待检样品的微生物细胞进行收集, 提取微生物基因组DNA, 以DNA为模板, 针对16S rRNA的V4-V5可变区, 并进行PCR扩增;

2) 将步骤1) 得到的PCR产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测, 切割目的条带进行纯化, 定量所得PCR产物, 在测序平台进行测序;

3) 测序得到的序列reads, 采用生物信息学软件过滤掉低质量序列, 生成OTU table, 挑选代表性序列并进行OTUs的聚类与注释; 随机从每个样品中挑选出相同数目的OTU序列, 利用生物信息学软件进行稀有化分析并计算微生物群落丰富度指数;

4) 候选生物参数确定: 设定参照点与受损点, 选取与丰富度相关的参数、与群落组成相关的参数和与干扰耐受能力有限的参数作为计算生物完整性指数的候选参数; 采用典范对应分析和加权平均回归的方法计算干扰耐受参数与栖境参数的最适值, 确定关键环境因子的敏感和耐受微生物分类单元;

5) 对4) 确定的候选生物参数进行指数值分布范围分析和判别能力分析, 筛选生物参数, 并对筛选的生物参数进行Pearson相关分析;

6) 采用比值法计算各样点中由5) 筛选到的各生物参数分值, 累加各参数分值得到各样点的微生物完整性指数值;

7) 以参照点微生物完整性指数值分布的95%分位数作为健康评价标准的最佳值, 低于该值的分布范围进行5等分, 靠近95%分位数的一等分代表被测样点处于健康状态, 随后依次是亚健康、一般、较差和极差的划分标准;

8) 将6) 计算得到的各样点微生物完整性指数值参照7) 建立的健康评价标准, 评价各样点生态系统的健康状况。

## 一种地下水生态系统健康评价方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及环境污染监测和评价技术领域,主要是利用地下水微生物完整性指数作为判断指标,来评价地下水生态系统健康的方法。

### 背景技术

[0002] 地下水是地球上最丰富且分布最广泛的淡水资源。近年来,随着经济社会的快速发展,人类过度干扰地下水系统而又不加以保护,导致部分区域地下水水质恶化、形态结构破坏、水文条件变化、生境退化以及重要或敏感生物消失,甚至酿成难以弥补的严重后果。因此,开展地下水生态系统健康评价研究,建立有效的评价指标和科学方法,准确诊断地下水生态系统健康状况,将对地下水可持续利用与管理以及促进地下水生态系统健康发展具有重大意义。

[0003] 目前,国内外对地下水的评价主要从水文地质条件与污染物分布等方面展开。例如,专利“一种地下水环境质量评价方法”(201410314367.0)和“一种地下水污染源强评价方法”(201510616503.6)分别以地下水中污染物浓度与污染源强为指标评价地下水,孙才志在《基于ArcView\_WOE的下辽河平原地下水生态系统健康评价》一文中通过含水层上覆气带特征、含水层渗透系数和地下水矿化度等十个地下水环境指标构建评价体系。但是,这些评价方法均不能直接反映地下水生态系统的健康状况。在水体生态系统中,生产者、消费者和分解者共同构成系统生物群落,在生存环境受到干扰后,这些生物将产生各异的生物学响应。如果能够利用其反应敏感的生物参数对水体生态系统进行评价,将更好更直接地掌握水体生态系统健康状况。生物完整性指数方法便是基于此发展的水体生态系统健康评价方法,该方法以鱼、大型无脊椎动物、藻类或浮游生物等生产者和消费者为研究对象,从生物类群的组成和结构来反映水体生态系统的健康状况,定量描述生物特性与非生物因子的关系,建立对环境干扰最敏感的生物参数,通过比较参数值与参考系统的标准值对水体生态系统健康水平进行评价。但是,地下水生态系统中由于大型生物丰度低,生物信息匮乏,基于生产者和消费者发展的生物完整性指数方法并不适用于地下水生态系统健康评价领域。

[0004] 地下水生态系统中的分解者主要是微生物,它们是水体自我净化的基础。微生物群落特性与水生态环境具有高度相关性,微生物的变化比水文地球化学指标的变化更为敏感,其结构特征和功能状态可以反映地下水生态系统对污染输入胁迫的响应。在水体污染严重区域,生产者和消费者的丰度及多样性显著减少,数据可获得性难度增加,而微生物作为分解者,功能活性极其活跃,群落结构多样性高,随着测序技术的发展与完善,Illumina等高通量测序技术可以克服传统分子生物学方法通量低、准确性低等缺点,更加快速、灵敏获取更全面的环境微生物群落结构信息,从而更加综合客观地认识地下水环境中原位微生物在污染胁迫下生态特征的变化。因此,通过构建基于地下水微生物群落特性的生物完整性指数方法,考察地下水生态系统中微生物群落结构变化,可望提供更全面更准确的评价地下水生态系统健康状况,为我国地下水生态系统健康评价和管理提供更全面的科学基础

与技术支持。

## 发明内容

[0005] 本发明的发明目的在于打破现有技术应用的局限性,提高评价结果的准确性和客观性,应用微生物群落结构信息计算微生物完整性指数,提供一种利用微生物完整性指数来评价地下水水质生态系统的健康评价方法。

[0006] 为了实现上述目的,本发明采用的技术方案为:

[0007] 一种地下水生态系统的健康评价方法,利用地下水微生物完整性指数作为判断指标,包括以下步骤:

[0008] A、微生物群落丰富度指数计算:

[0009] 收集地下水样品中的微生物细胞,提取微生物基因组DNA,以DNA为模板,针对16S rRNA的V4-V5可变区,并进行PCR扩增;

[0010] 检测得到的PCR产物,切割目的条带进行纯化,定量所得PCR产物,后进行双末端测序;

[0011] 过滤掉低质量序列并挑选代表性序列并进行聚类与注释,随机从每个样品中挑选出相同数目的序列,进行稀有化分析并计算微生物群落丰富度指数;

[0012] B、候选生物参数确定

[0013] 设定参照点与受损点,选取与步骤A)中丰富度相关、群落组成相关和对干扰耐受能力相关的参数作为计算生物完整性指数的候选参数,计算干扰耐受参数与栖境参数的最适值,确定关键环境因子的敏感和耐受微生物分类单元;

[0014] C、确定微生物完整性指数值

[0015] 对步骤B)中确定的候选生物参数进行指数值分布范围分析和判别能力分析,筛选生物参数,采用比值法计算各样点中筛选到的各生物参数分值,累加各参数分值得到各样点的生物完整性指数值;

[0016] D、生态系统健康评价

[0017] 以步骤C)中参照点微生物完整性指数值分布的95%分位数作为健康评价标准的最佳值,低于该值的分布范围进行5等分,靠近95%分位数的一等分代表被测样点处于健康状态,随后依次是亚健康、一般、较差和极差的划分标准。

[0018] 本发明的有益效果为:运用微生物群落结构完整性指数可以综合评价地下水生态系统,具有较强的敏感性,可以快速、灵敏、准确、全面地反映地下水生态系统健康状况。将微生物完整性指数应用于评价地下水生态系统健康状况必将进一步补充和完善地下水健康评价体系,为地下水生态系统健康分级评价提供科学依据,也为该区域地下水资源的可持续利用和管理提供支撑。本发明可广泛适用于地下水生态系统健康评价,在时间和空间动态都能进行长期和短期的监测,具有广阔的应用前景。

[0019] 进一步优化,步骤A中扩增的PCR产物采用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测,切割目的条带进行纯化,定量所得PCR产物,在MiSeq PE300等测序平台进行双末端测序;

[0020] 测序得到的序列reads,采用微生物16s rRNA分析管道QIIME等生物信息学软件过滤掉低质量序列,生成OTU table,挑选代表性序列并进行OTUs的聚类与注释,随机从每个样品中挑选出相同数目的OTU序列,利用QIIME等生物信息学软件进行稀有化分析并计算微

生物群落丰富度指数。

[0021] 微生物16s rRNA分析管道QIIME(Quantitative Insights Into Microbial Ecology)是一个专门针对于微生物群落的分析管道,可以进行OUT,以及多样性分析等等。拥有处理16s rRNA所需要的软件并呈现相应的处理结果。

[0022] reads(读长)是高通量测序中一个反应获得的测序序列。在测序过程中,一条DNA分子的两端都可以测序。先测其中的一端,获得一个reads,然后再转到另一端测序,获得另外一个reads。得到的这两个reads就是PE reads,PE reads 的获得有助于后期序列组装。

[0023] 采用新一代Illumina高通量测序技术获取更全面客观的地下水微生物群落结构信息(可包括数目极少的细菌和古菌),避免了有限的微生物群落信息造成M-IBI指数值计算的误差。

[0024] 进一步优化,步骤B)中通过以下公式计算干扰耐受参数与栖境参数的最适值:

$$[0025] \quad U_k = \sum_{i=1}^m X_i Y_{ki} / \sum_{i=1}^m Y_{ki}$$

[0026] 式中, $X_i$ 表示样点环境变量值; $Y_{ki}$ 表示属种k在i号样品中的相对丰度;U表示属种k的最适值。

[0027] 其中,步骤D)中:

[0028] 地下水样点微生物完整性指数值 $\leq 0.65$ ,地下水生态系统为极差状况,水质为V类水平;

[0029]  $0.65 < \text{微生物完整性指数值} \leq 1.30$ ,地下水生态系统为较差状况,水质为IV类水平;

[0030]  $1.30 < \text{微生物完整性指数值} \leq 1.95$ ,地下水生态系统为一般状况,水质为III类水平;

[0031]  $1.95 < \text{微生物完整性指数值} \leq 2.60$ ,地下水生态系统为亚健康状况,水质为II类水平;

[0032]  $2.60 < \text{微生物完整性指数值} \leq 3.25$ ,地下水生态系统为健康状况,水质为I类水平。

[0033] 本发明具体包括以下步骤:

[0034] 1)将待检样品的微生物细胞进行收集,提取微生物基因组DNA,以DNA为模板,针对16S rRNA的V4-V5可变区,并进行PCR扩增;

[0035] 2)将步骤1)得到的PCR产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测,切割目的条带进行纯化,定量所得PCR产物,在MiSeq PE300等测序平台进行双末端测序;

[0036] 3)测序得到的序列reads,采用微生物16s rRNA分析管道QIIME等生物信息学软件过滤掉低质量序列,生成OTU table,挑选代表性序列并进行OTUs的聚类与注释。随机从每个样品中挑选出相同数目的OTU序列,利用QIIME等生物信息学软件进行稀有化分析并计算微生物群落丰富度指数;

[0037] 4)候选生物参数确定:设定参照点与受损点,选取与丰富度相关的参数、与群落组成相关的参数和与干扰耐受能力有限的参数作为计算生物完整性指数的候选参数。采用典范对应分析和加权平均回归的方法计算干扰耐受参数与栖境参数的最适值,确定关键环境因子的敏感和耐受微生物分类单元;

[0038] 5)对4)确定的候选生物参数进行指数值分布范围分析和判别能力分析,筛选生物

参数,并对筛选的生物参数进行Pearson相关分析;

[0039] 6)采用比值法计算各样点中由5)筛选到的各生物参数分值,累加各参数分值得到各样点的微生物完整性指数值;

[0040] 7)以参照点微生物完整性指数值分布的95%分位数作为健康评价标准的最佳值,低于该值的分布范围进行5等分,靠近95%分位数的一等分代表被测样点处于健康状态,随后依次是亚健康、一般、较差和极差的划分标准;

[0041] 8)将6)计算得到的各样点微生物完整性指数值参照7)建立的健康评价标准,评价各样点生态系统的健康状况。

## 具体实施方式

[0042] 为详细说明本发明的技术内容、构造特征、所实现目的及效果,以下结合实施方式详予说明。

[0043] 微生物完整性指数(microbiome index of biotic integrity),以下简称M-IBI。

[0044] 首先选取内蒙古自治区某城市内尾矿库周边地下水,采集与尾矿库距离不同的样点地下水总计12个。选择人为活动明显、靠近尾矿库、可能有点源污染的9个样点为受损点(G1,G2,G3,G4,G5,G6,G7,G8,G9),选择远离尾矿库、无点源污染、受人为活动影响小、污染小的其余地下水样点作为参照点(G10,G11,G12)。测定各样点地下水水质酸碱度(pH),温度(T),溶解氧(DO),电导率(Ec)、氧化还原电位(Eh)、溶解性总固体(TDS)、总硬度(GH)、高锰酸钾指数、氨氮(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)、硝态氮(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)、亚硝态氮(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)、硫酸根(SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>)等多项理化指标,如表1所示。收集的地下水低温运回实验室,立即抽滤过膜收集微生物细胞,将膜置于-20℃保存备用。

[0045] 表1 包钢稀土尾矿库周边地下水理化特征(c/mg·L<sup>-1</sup>)

[0046]

	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
Ec	10.05	1.61	1.789	6.36	10.59	5.79	2.61	3.38	1.791	0.861	0.653	0.958
Eh	17.2	4.3	-245.7	-7.5	27.1	163.8	-71.4	-129.8	-62.3	-5.6	-156.3	-1.4
As(×10 <sup>-5</sup> )	12.2	7.6	24.8	4.8	8.1	7.4	40.6	15.5	88.5	24.9	34.1	27.8
Se(×10 <sup>-5</sup> )	4.4	4	4.5	2.1	2.4	1.7	3.4	4.8	0.9	1.2	1.1	1.4
TDS	7780	1210	1250	90	10100	5500	1920	2740	966	524	426	558
高锰酸钾指数	1.4	3.1	1.4	3	2	2.9	1.9	2.1	1.9	2.7	1.6	2.8
GH	3860	631	661	2900	5460	2700	811	1360	470	280	216	276
DO	2.81	0.32	0.26	0.48	3.78	4	2.05	1.24	5.42	1.41	1.28	2.52
T(℃)	11.4	9.7	10.6	10.9	11.4	9.3	10.2	11.1	13	12.3	10.6	11.1
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	2645	418	427	2489	4444	2491	627	913	332	16.1	2.54	18
Cl	1666	176	145	947	1417	682	303	500	161	33.6	16.8	48.2
NO <sub>3</sub>	5.1	0	0	9.25	0	0	0	0	0	0	0.5	0.6
NO <sub>2</sub> (×10 <sup>-5</sup> )	78	3	11	29.2	491	24	9	3	11	3	8	3
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	36.79	0.321	1.081	0.443	57.26	0.362	1.333	0.905	2.057	10.36	3.357	9.526
F	0.863	0.420	0.707	0.581	0.489	0.932	0.738	1.809	0.794	0.474	0.718	0.836
Na <sup>+</sup>	618	99.1	156	528	802	860	342	302	168	69.2	62.1	103
K <sup>+</sup>	17.2	4.14	5.48	8.35	40.4	8.25	5.51	8.85	7.02	11.9	6.95	15.1
Mg <sup>2+</sup>	548	66.8	71.2	319	797	260	102	180	68	47.7	33.6	54
Ca <sup>2+</sup>	535	144	111	617	643	537	132	219	90.2	15	28	21.1
CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	227	182	342	203	159	153	504	367	385	404	430	565
pH	6.98	7.49	7.73	7.43	7.47	7.34	7.59	7.73	7.69	7.66	7.7	7.83

[0047] 将冷冻保存的滤膜采用灭菌剪刀剪碎转移至DNA提取的破碎管中,DNA提取步骤参

照FastDNA Spin Kit for Soil(MP医疗,美国)试剂盒说明书进行。得到的DNA样品采用带有barcode序列的引物对(515F:5'-GTGCCAGCMGCCGCGG-3'和907R:5'-CCGTCGAATTCMTTTRAGTTT-3')对16S rRNA基因V4-V5区片段进行PCR扩增,扩增体系是包括40~50 ng模板DNA,25  $\mu$ L的2  $\times$  Premix ExTaq™聚合酶(TAKARA,Japan),0.5  $\mu$ L牛血清蛋白(BSA)(20 mg/mL,TAKARA,日本)以及10  $\mu$ M引物各1  $\mu$ L,用无菌水补充至50 $\mu$ L。扩增条件是95°C预变性3 min,随后94°C变性30 s,58°C退火1 min,72°C延伸1 min,30个循环,最后72°C延伸5 min。扩增得到的PCR产物采用通用DNA纯化试剂盒(天根,中国)进行纯化回收。所得纯化的DNA样品采用Quant-iTPicoGreen double-stranded DNA(dsDNA)试剂盒(Invitrogen,美国)进行定量,具体步骤参考试剂盒说明书进行。纯化的PCR扩增产物等份合并后,送至北京诺禾致源生物信息科技有限公司进行测序。测序采用双末端测序,测序平台采用IlluminaMiSeq PE300高通量测序平台。高通量测序分析共获得729,827条序列。通过不同的barcode序列区分并分配到相应的样品中,采用QIIME软件包去除获得序列中包含模糊碱基的,引物错配的或者多于6个碱基同聚物的序列,并过滤掉含有>20 bp低质量碱基的低质量序列,随后去掉引物序列。采用RDP classifier的方法生成OTU table(cutoff =97%),去除嵌合体序列和单一序列。选择每个OTU中丰度最大的序列为代表性序列,将代表性序列与Greengene database进行比对分类。为使样品间的序列数标准化,随机从每个样品中挑选最小数目19,221条序列,利用QIIME进行稀有化分析并计算地下水丰富度指数(Chao-1指数,Shannon指数,Simpson指数,物种累计数,偏Simpson指数,Observed species,均匀度指数以及PD\_whole\_tree进化多样性等)。

[0048] 通过CCA分析和蒙特卡罗(Monte Carlo)置换检验分析与微生物群落结构变化显著相关的环境因子。硒含量与微生物群落分布具有极显著相关关系( $P=0.008<0.01$ )。另增加其他影响微生物群落分布的主要因子溶解氧、温度、高锰酸钾指数,总共4个关键环境因子,它们在参照点和受损点中的分布见表2。然后利用加权平均回归方法计算各分类单元的最适值,其具体运算公式如下:

$$[0049] \quad U_k = \frac{\sum_{i=1}^m x_i y_{ki}}{\sum_{i=1}^m y_{ki}}$$

[0050] 式中, $x_i$ 表示样点环境变量值; $y_{ki}$ 表示属种k在i号样品中的相对丰度; $U_k$ 表示属种k的最适值。然后根据微生物对环境因子的最适值不同,并按照各样点环境因子的25%与75%百分位数为分界点,将其划分为对环境干扰的敏感种、中间种或耐受种(见表3)。

[0051] 表2 关键环境因子在受损点和参照点中的分布

[0052]

样点	关键环境因子	样点数	极小值	极大值	均值	标准差
受损点	溶解氧(mg/L)	9	0.26	5.42	2.26	1.86
	温度(°C)	9	9.3	13	10.84	1.09
	高锰酸钾指数(mg/L)	9	1.4	3.1	2.19	0.66
	硒(mg/L)	9	$9 \times 10^{-5}$	$4.8 \times 10^{-4}$	$3.1 \times 10^{-4}$	$1.4 \times 10^{-4}$
参照点	溶解氧(mg/L)	3	1.41	2.52	1.74	0.68
	温度(°C)	3	10.6	12.3	11.3	0.87
	高锰酸钾指数(mg/L)	3	1.6	2.8	2.37	0.67
	硒(mg/L)	3	$1.1 \times 10^{-4}$	$1.4 \times 10^{-4}$	$1.23 \times 10^{-4}$	$1.5 \times 10^{-5}$



[0053] 表3 对环境因子敏感和耐受的微生物分类属个数汇总

[0054]

与环境因子关系	微生物分类属种类数
硒敏感	25
硒耐受	29
厌氧	30
好氧	67
高温敏感	57
耐高温	72
有机物敏感	28
有机物耐受	32

[0055] 选取与丰富度相关的参数、与群落组成相关的参数和与对干扰耐受能力有限的参数作为计算生物完整性指数的参数。对参数进行分布范围分析,根据参照点和受损点的数据计算各生物参数值,分析生物参数对人类干扰的反应,挑选出对人类干扰反应单向递增或递减的候选指标,剔除掉分布范围太大或太小的指数,总共确定了26种候选生物参数(见表4)。

[0056] 表4 地下水微生物生物完整性指数的候选生物参数

[0057]

序号	指标	对干扰增加的响应	序号	指标	对干扰增加的响应
M1	香农指数 (Shannon)	减少	M14	氧气耐受属相对丰度	增加
M2	辛普森指数 (Simpson)	减少	M15	硒耐受属相对丰度	增加
M3	偏辛普森指数 (Invsimp)	减少	M16	硒敏感属相对丰度	减少
M4	物种累计数 (S)	增加	M17	有机物耐受相对丰度	增加
M5	最高优势分类单元相对丰度	增加	M18	有机物敏感相对丰度	增加
M6	前2优势分类单元相对丰度总和	增加	M19	高温耐受属相对丰度	减少
M7	前3优势分类单元相对丰度总和	增加	M20	高温敏感属相对丰度	增加
M8	前4优势分类单元相对丰度总和	增加	M21	污染耐受属相对丰度 <sup>a</sup>	减少
M9	前5优势分类单元相对丰度总和	增加	M22	污染敏感属相对丰度 <sup>b</sup>	增加
M10	氧气敏感属相对丰度	减少	M23	pielou均匀度指数 (J)	减少
M11	Chao 1指数	减少	M24	PD_whole tree	减少
M12	Observed species	减少	M25	<i>Pseudidiomarina</i> 属相对丰度	减少
M13	<i>Methyloversatilis</i> 属相对丰度	减少	M26	<i>Thiobacillus</i> 属相对丰度	减少

[0058] 随后对候选参数指标进行判别能力分析和相关性分析,筛选或淘汰不能充分反映地下水生态系统受损情况的参数。判别能力分析即对剩余参数在参照点和受损点的分布做箱体图,比较各指数在参照点和受损点的25%~75%分位数范围即箱体四分位范围(IQ)。根据箱体的重叠情况,对IQ(生物判别能力)赋予不同的值,如无重叠,IQ=3;部分重叠,但各自中位数值都在对方箱体范围之外,IQ=2;仅一个中位数值在对方箱体范围之内,IQ=1;各自中位数值都在对方箱体范围之内,IQ=0。获得可以参与计算M-IBI的4个生物参数:M13(*Methyloversatilis*属相对丰度);M20(高温敏感属相对丰度);M25(*Pseudidiomarina*属相对丰度);M26(*Thiobacillus*属相对丰度)

[0059] 经过上述判别能力分析后,选取IQ判别的指数用SPSS 22.0作Pearson相关性分析,若量参数相关性较高( $|R| \geq 0.75$ ),表明二者所反映的信息重叠性较大,选择其中之

一参数用于构建M-IBI评价体系。M13和 M25具有显著相关( $P < 0.05$ ),但是 $r = 0.67 < 0.75$ ,所以这4个参数都将用于M-IBI评价体系标准指数值的计算(见表5)。

[0060] 表5 4个生物指数Pearson相关性分析(\*代表显著相关)

[0061]

	M25	M13	M26
M25	1		
M13	0.67*		
M26	0.008	0.39	
M20	-0.09	-0.12	-0.24

[0062] 采用比值法计算各样点各生物参数分值,累加各个参数分值得到各样点的M-IBI指数值。具体步骤:①对于随干扰增大而数值越低的生物参数,以95%分位数为最佳期望值,参数分值为:该生物参数值/95%分位数;②对于随干扰增大而数值越低的生物参数,以5%分位数为最佳期望值,参数分值为:(最大参数值-该生物参数值)/(最大参数值-5%分位数)。经计算后,得到的分值的分布范围为0~1,如果 $> 1$ ,则都记为1。计算各样点的M-IBI值,所用的比值法的计算公式见表6。

[0063] 表6 比值法计算4个生物参数值的公式

[0064]

生物参数	计算公式
<i>Pseudidiomarina</i> 属相对丰度(M25)	$M25 / 0.143 \times 100$
<i>Methyloversatilis</i> 属相对丰度(M13)	$M13 / 0.563 \times 100$
<i>Thiobacillus</i> 属相对丰度(M26)	$M26 / 0.865 \times 100$
高温敏感属相对丰度(M20)	$1 - M20 / 1.399 \times 100$

[0065] 最后,以参照点M-IBI值分布的95%分位数(3.25)作为健康评价标准的最佳值,低于该值的分布范围进行5等分,靠近95%分位数的一等分代表被测样点处于健康状态,随后依次是亚健康、一般、较差和极差的划分标准(见表7)。最终确定的M-IBI的评价等级为: $2.6 < M-IBI \leq 3.25$ 为健康, $1.95 < M-IBI \leq 2.6$ 为亚健康, $1.3 < M-IBI \leq 1.95$ 为一般, $0.65 < M-IBI \leq 1.3$ 为较差, $M-IBI \leq 0.65$ 为极差。将地下水各样点计算的M-IBI指数值对照构建的健康评价标准,评价各样点生态系统健康状况。在尾矿库周边地下水的样点中,4个样点是健康状况,占总样点的33.3%;2个样点是亚健康状况,占总样点的16.7%;5个样点是一般状况,占41.7%;1个样点是较差状况,占8.3%(见表8)。受损点靠近尾矿库污染源,受人类活动干扰比较大,健康状况比较差,处于亚健康、一般或者更低(较差)的水平;参照点(G10、G11和G12)远离尾矿库,受周围人类活动干扰较小,该区域的地下水生态系统受到破坏较小,处于健康水平。

[0066] 表7尾矿库周边地下水M-IBI指数健康评价标准

[0067]

M-IBI指数值	健康标准	水质类别
2.60 ~3.25	健康	I
1.95~2.60	亚健康	II
1.30 ~1.95	一般	III

0.65~1.30	较差	IV
≤0.65	极差	V

[0068] 表8 尾矿库周边地下水各样点M-IBI指数评价结果

[0069]

样点	样点类别	M-IBI值	健康评价	水质类别
G1	受损点	1.69	一般	III
G2	受损点	2.25	亚健康	II
G3	受损点	1.55	一般	III
G4	受损点	1.58	一般	III
G5	受损点	1.92	一般	III
G6	受损点	0.98	较差	IV
G7	受损点	2.80	健康	I
G8	受损点	1.81	一般	III
G9	受损点	2.05	亚健康	II
G10	参照点	3.25	健康	I
G11	参照点	3.20	健康	I
G12	参照点	2.89	健康	I

[0070] 综上所述,微生物生物完整性指数(M-IBI)可以很好的适用于地下水生态系统健康状况的评价。

[0071] 以上所述仅为本发明的实施例,并非因此限制本发明的专利范围,凡是利用本发明说明书内容所作的等效结构或等效流程变换,或直接或间接运用在其他相关的技术领域,均同理包括在本发明的专利保护范围内。