团体标准

T/CSES XXXX—XXXX

|  |  |
| --- | --- |
| ICSZ01 | 13.020.01  |

基于环境DNA的水生生物评价技术指南

Technical guidelines for environmental DNA application in bioassessment of aquatic organisms

XXXX - XX - XX发布

XXXX - XX - XX实施

中国环境科学学会  发布

目次

[前言 II](#_Toc102147705)

[引言 III](#_Toc102147706)

[1 范围 1](#_Toc102147707)

[2 规范性引用文件 1](#_Toc102147708)

[3 术语和定义 1](#_Toc102147709)

[4 生物评价 2](#_Toc102147710)

[4.1 评价过程 2](#_Toc102147711)

[4.2 采样频次与时间 2](#_Toc102147712)

[4.3 采样布点 2](#_Toc102147713)

[4.4 环境DNA宏条形码监测 3](#_Toc102147714)

[4.5 生物评价方法 3](#_Toc102147715)

[附录A （规范性） 采样信息记录表 7](#_Toc102147716)

[附录B （资料性） Faith’s 系统发育多样性指数计算方法 8](#_Toc102147717)

[附录C （规范性） 生物完整性指数构建流程 9](#_Toc102147721)

[参考文献 11](#_Toc102147722)

1. 前言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由南京大学提出。

本文件由中国环境科学学会归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

1. 引言

评价我国淡水生态系统的生物多样性和水生态健康已经成为我国水生态环境保护工作的一个重要内容。充分发挥新一代基于环境DNA的高通量生物监测潜力和价值，规范基于环境DNA技术的水生生物评价指数和分析方法，制定本文件。

基于环境DNA的水生生物评价技术指南

* 1. 范围

本文件规定了基于环境DNA宏条形码监测数据的水生生物评价相关指数和计算方法。

本文件适用于我国淡水生态系统的水生生物评价。

* 1. 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

LY/T 3191 林木DNA条形码构建技术规程

T/CSES XXX 水生生物监测 环境DNA宏条形码法

* 1. 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

环境DNA environmental DNA；eDNA

通过从环境介质（水、土壤、沉积物、空气等）或混合生物组织中提取的DNA。

* + 1.

操作分类单元 operational taxonomic unit；OTU

DNA宏条形码测序数据按照一定的序列相似性阈值进行聚类，获得的用于表征物种的分子水平的分类单元。

扩增序列变体 amplicon sequence variants；ASV

DNA宏条形码技术中，通过生物信息学剔除PCR扩增和测序产生的错误序列后形成的独特DNA序列，即每条序列至少有一个碱基不相同，可以根据ASV的序列差异进行物种鉴定。

分子分类单元 molecular taxonomic unit

DNA宏条形码监测分类工作中的客观操作单位，有特定的名称和序列分类特征，如ASV和OTU。

相对丰度 relative abundance

样品中分配到某一分类单元的序列数占该样品序列总数的比例。

生物多样性指数 biodiversity index

特定生物类群的系统发育多样性或分类单元（如分子分类单元或分类单元）多样性的度量。

生物指数 biological index；BI

基于特定生物类群的丰富度/相对丰度，并与其敏感性或耐受性结合而成的单一指数或记分值。

生物完整性指数 index of biological integrity；IBI

将一组与周围环境关系密切、受干扰后反应敏感、可代表目标生物群落的各种结构和功能属性的生物参数整合成单一记分值的指数，可以对水体进行生物完整性健康评价。

优势分类单元 dominant taxonomic unit

群落中相对丰度排前列的一个或数个分类单元。

* 1. 生物评价
		1. 评价过程

基于环境DNA的水生生物评价过程包括采样、环境DNA宏条形码监测和生物评价等，评价方法示意图见图1。



1. 基于环境DNA的水生生物评价方法示意图
	* 1. 采样频次与时间

根据监测目的和监测条件选择年度监测（3个水期：丰水期、平水期、枯水期）、季度监测（春夏秋冬）或月度监测（每月一次）。针对重点关注区域和突发环境问题，可阶段性开展每日/周监测。采样时间需综合考虑靶向监测类群的生态特征和生活史及水体类型。如湖库中需要考虑生物类群的季节性分层，溪流、河流中需考虑迁移物种的分布模式（如鱼类洄游）。

* + 1. 采样布点
			1. 概述

参照《河流水生态环境质量监测与评价技术指南（征求意见稿）》和《湖库水生态环境质量监测与评价技术指南（征求意见稿）》[1, 2]设置环境DNA采样点位。遵循连续性原则、一致性原则、代表性原则和可行性原则。还需结合环境DNA的空间分布特征，综合考虑靶向监测类群的生态和生活史、水体类型、水体大小、深度、分层、连通性、基质、温度、水文和水化学等因素的影响。另外，生活污水可能含有残留的生物DNA，采样位点布设宜尽量避免污水排放渠，污水处理厂，养殖和垂钓区域，并详实记录。填写采样记录表，见附录A。

* + - 1. 溪流、河流断面的布设

参照《河流水生态环境质量监测与评价技术指南（征求意见稿）》[1]的规定设置监测断面，每个监测断面根据河流的宽度和深度设置采样点位。详实记录河流、溪流的地形特征（如地形、河岸结构、河床沉积物、人工改造等）、流速、水温、pH等影响环境DNA扩散的因素。在缓慢流动的低地溪流和河流中，环境DNA样品反映几百米内的生物分布，建议间隔1 km设置采样点。快速流动的高山溪流和河流中，建议采样位点间隔10 km以上。

* + - 1. 湖泊、水库监测点位的布设

参照《湖库水生态环境质量监测技术指南（征求意见稿）》[2]，根据监测任务目标、湖库形态、湖库面积大小、湖库水文特征、水环境质量等情况，确定监测点位数量和布设位置。深水型湖泊建议间隔5 m深度分层采样。

* + 1. 环境DNA宏条形码监测
			1. 生物类群的选择
				1. 河流生物评价常用生物类群包括：鱼类、大型底栖无脊椎动物和着生藻类。湖库生物评价常用生物类群包括：鱼类、大型底栖无脊椎动物、浮游植物、水生植物和浮游动物。
				2. 根据评价目的和水体类型，考虑每个类群的特点、生命周期选择适合的水生生物类群。比如，环境变化的长期效应评价首选鱼类、大型底栖无脊椎动物等生物群落，环境变化的短期效应评价则选用浮游植物、浮游动物和着生藻类等生物群落。
			2. 生物监测方法

环境DNA宏条形码生物监测的不同基质环境DNA采集、环境DNA提取、宏条形码扩增测序、生物信息学分析、生物统计表获取、质量控制与评价按照T/CSES XXX的规定执行，根据监测的生物类群选取合适的监测方法。

* + 1. 生物评价方法

生物评价可采用的生物多样性指数、生物指数、生物完整性指数见表1。利用环境DNA技术对监测区域采集的环境DNA样品中鱼类、大型底栖无脊椎动物、浮游动物、水生维管植物、浮游植物和着生藻类等进行定性（或相对定量）分析，获取各物种的相对丰度，并用于各类生物指数的计算。

1. 基于环境DNA宏条形码监测的生物评价指数

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 生物指数 | 类型 | 适用生物类群 | 定性/定量 | eDNA适用性 |
| Faith’s 系统发育多样性指数 | 生物多样性指数 | 各类群 | 定性 | 高 |
| 丰富度 |
| 香农-威纳指数 | 各类群 | 定量 | 中 |
| 辛普森指数 |
| Pielou均匀度指数 |
| 第一优势度 | 生物指数 | 各类群 | 定量 | 中 |
| 前三优势度 |
| 综合硅藻指数 | 着生藻类 | 定量 | 中 |
| BMWP指数 | 大型底栖无脊椎动物 | 定性 | 高 |
| BI生物指数 | 大型底栖无脊椎动物 | 定量 | 中 |
| 鱼类保有指数 | 鱼类 | 定性 | 高 |
| 生物完整性指数 | 生物完整性指数 | 浮游植物、着生藻类、浮游动物、大型底栖无脊椎动物和鱼类 | 定性/定量 | 中 |

* + - 1. 生物多样性指数
				1. Faith’s 系统发育多样性指数（*PD Faith*）

Faith’s系统发育多样性指数（*PD Faith*）为基于特定群落的分子分类单元的序列构建的系统发育树上所有分支的总长度，具体计算方法和案例见附录B。按照公式（1）计算：

 ()

式中：

*PD Faith* ——Faith’s系统发育多样性指数；

n ——系统发育树中分支的数目；

*Bi* ——第i个分支的长度。

一般生态状况较好时，系统发育多样性指数更高。

* + - * 1. 丰富度（*S*）

丰富度指分子分类单元数目（如ASV或OTU数目）或注释的物种分类单元数目（如种或属的数目）。

一般生态状况较好时，总分类单元数更高。

* + - * 1. 香农-威纳（Shannon-Wienner）指数（*H′*）

香农-威纳指数（）按照公式（2）计算：

 ()

式中：

*H′*——香农-威纳指数；

 ——分类单元i的相对丰度；

*S* ——总分类单元数目。

一般生态状况较好时，香农-威纳指数更高。

* + - * 1. 辛普森（Simpson index）指数（*D）*

辛普森指数*（D）*按照公式（3）计算：

 ()

式中：

*D*——辛普森指数；

——分类单元i的相对丰度；

*S* ——总分类单元数目。

一般生态状况较好时，辛普森指数更高。

* + - * 1. Pielou均匀度指数（*J）*

Pielou均匀度指数（*J*）按照公式（4） 计算：

 ()

式中：

*J* ——Pielou均匀度指数；

——香农-威纳指数；

*S*——总分类单元数目。

* + - 1. 生物指数
				1. 第一优势度

第一优势度为第一优势分类单元的相对丰度。一般生态状况较好时，第一优势度更低。

* + - * 1. 前三优势度

前三优势度（）为前三优势分类单元的累积相对丰度，按照公式（5）计算：

 ()

式中：

——前三优势度；

——第i个优势分类单元的相对丰度。

一般生态状况较好时，前三优势度更低。

* + - * 1. BMWP指数

BMWP指数按照公式（6）计算：

 ()

式中：

——BMWP指数；

*Fi*——分类单元i对应科的敏感值，河流推荐值参考《河流水生态环境质量监测与评价技术指南》附表J.1，湖库推荐值参考《湖库水生态环境质量监测与评价技术指南》附表A.1。

一般生态状况较好时，BMWP指数更高。

* + - * 1. BI生物指数

BI 生物指数按照公式（7）计算：

 ()

式中：

BI——BI 生物指数；

——分类单元i的相对丰度；

——分类单元i对应科的耐污值，河流推荐值参考《河流水生态环境质量监测与评价技术指南》附表K.1，湖库推荐值参考《湖库水生态环境质量监测与评价技术指南》附表B.1。

一般生态状况较好时，BI指数更低。

* + - * 1. 综合硅藻指数（Comprehensive Diatom Index，CDI）

综合硅藻指数（CDI）按照公式（8）、公式（9）计算：

 ()

 ()

式中：

CDI ——综合硅藻指数；

WMS ——硅藻基于环境因子的加权平均值；

ak——硅藻分类单元k的相对丰度；

sk——硅藻分类单元k对应种对环境的敏感值，推荐值参考《河流水生态环境质量监测与评价技术指南》附表L.1；

vk——硅藻分类单元k对应种对环境的指示值，推荐值参考《河流水生态环境质量监测与评价技术指南》附表L.1。

一般生态状况较好时，CDI指数更低。

* + - * 1. 鱼类保有指数（FOEI）

鱼类保有指数（FOEI）的结果按照公式（10）计算：

 ()

式中：

FOEI——鱼类保有指数，%；

*FO*——评价河湖调查获得的鱼类种类数量（剔除外来物种）（种）；

*FE*——1980s 以前评价河湖的鱼类种类数量（种）。

一般生态状况较好时，FOEI指数更高。

* + - 1. 生物完整性指数（IBI）

IBI 的构建包括参照状态的选择、候选指数的建立、核心指数的筛选、指数计算、评价及验证等一般性流程，具体步骤参考文件《河流水生态环境质量监测与评价技术指南》和《湖库水生态环境质量监测与评价技术指南》[1-2]。本文件建议在构建eDNA宏条形码的生物完整性指数时优先选择物种有无数据，适当选择相对丰度数据（应符合附录C中表C.1、表C.2的规定）。

1.
2. （规范性）
采样信息记录表

表A.1 采样信息记录表

监测单位： 采样人： 采集日期： 年 月 日 记录表编号：

|  |  |
| --- | --- |
| 点位名称： | 位点编号： |
| 采样位点及周边生境照片: |
| 经度: 度 分 秒 | 纬度: 度 分 秒 | 海拔（m）：  |
| 生境条件 |
| 水深（m） | 气温 | 水温 |
| pH | 透明度 | 溶氧量 |
| 流速（m/s） | 叶绿素a（mg/L） | 电导率 |
| 水域特征  | □溪流源头 □浅水(可涉水)溪流或河流 □过渡性溪流 □深水河流 □大型河流 □封闭型浅水湖泊 □浅水湖泊 □封闭型深水湖泊 □深水湖泊 □大型深水水库 □中小型水库  |
| 底质类别 | □淤泥 □泥沙 □粘土 □粗砂 □砾石 □岩土 □其他： |
| 周边生境类型 | □森林 □农田 □草地 □沼泽 □灌丛 □裸地 □居民居住区 □其他: |
| 河道变化 | □渠道化 □天然河道 □土坝 □混凝土加固堤岸 □石块加固堤岸  |
| 围网养殖情况 | □无 □少量（1/5 <围网宽度占河面宽度< 1/4）□一般（围网宽度占河面宽度的1/4~1/2）□较严重（1/2 <围网宽度占河面宽度的< 2/3）□严重（围网宽度占河面宽度的≥ 2/3） |
| 养殖种类 | □鱼，种类：□虾，种类：□其他，种类： |
| 其他潜在eDNA影响因素： □污水排放渠 □污水处理厂 □垂钓区域 □其他： |
| 采样介质 | □ 水样 □沉积物 □生物膜 □ 混合浮游动物组织 □混合底栖动物组织 |

1. （资料性）
Faith’s 系统发育多样性指数计算方法
	1. Faith’s 系统发育多样性指数（Faith’s Phylogenetic diversity，*PD Faith*）计算示意图

如图B.1所示，基于分类单元a、b、c、d构建的系统发育树A的遗传多样性指数PD Faith-A为13，基于分类单元e、f、g构建的系统发育树B的遗传多样性指数*PD Faith-B*为9。

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |

1. 基于分类单元a、b、c、d构建的系统发育树A b）基于分类单元e、f、g构建的系统发育树B

图B.1 Faith’s 系统发育多样性指数计算示意图

* 1. 系统发育多样性指数计算方法

Faith’s 系统发育多样性的计算可通过R语言“picante”安装包中的代码获得：

pd (samp, tree, include.root=TRUE)

其中samp指分子分类单元-位点矩阵；tree为基于分子分类单元序列相似性构建的系统发育树；include.root 指构建的系统发育树是否有根（root）。

* 1. 系统发育树构建方法

利用环境DNA宏条形码监测获得的分子分类单元（如ASV或OTU）对应的序列，根据数据量大小、物种的亲缘关系、所需系统发育树精确程度等条件，选择合适的系统发育树构建方法。具体的构树方法参考LY/T 3191的规定。

在比较不同样品的遗传多样性应选用统一的系统发育树构建方法。

1. （规范性）
生物完整性指数构建流程

生物完整性指数构建参考基于形态学监测的生物评价文件《河流水生态环境质量监测与评价技术指南》和《湖库水生态环境质量监测与评价技术指南》[1-2]。 适用于环境DNA宏条形码监测的候选参数清单见表C.1和表C.2。

表C.1 一些适用于河流大型附着藻类、大型底栖无脊椎动物和鱼类的候选参数

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 类群 | 系统发育多样性 | 丰富度 | 物种组成 | 耐受性 | 功能性 |
| 着生藻类 | * 系统发育多样性
* 指示性藻类系统发育多样性
 | * 分类单元数
* 硅藻分类单元数
* 综合硅藻指数
* 指示性藻类分类单元数
 | * 第一优势度
* 前三优势度
* 香农-威纳指数
* 辛普森指数
* Pielou均匀度指数
* 指示性藻类相对丰度
 | * 耐受性分类单元数、相对丰度
* 敏感性分类单元数、相对丰度
* 畸变硅藻分类单元数、相对丰度
* 耐酸性分类单元数、相对丰度
* 耐碱性分类单元数、相对丰度
* 嗜中性分类单元数、相对丰度
 | * 运动型分类单元数、相对丰度
* 富营养化分类单元数、相对丰度
 |
| 大型底栖无脊椎动物 | * 系统发育多样性
* 指示性类群（软体动物、甲壳纲、水生昆虫、寡毛纲、摇蚊科、颤蚓科等）系统发育多样性
 | * 分类单元数
* 指示性类群（软体动物、甲壳纲、水生昆虫、寡毛纲、摇蚊科、颤蚓科等）分类单元数
 | * 第一优势度
* 前三优势度
* 香农-威纳指数
* 辛普森指数
* Pielou均匀度指数
* 指示性类群（软体动物、甲壳纲、水生昆虫、寡毛纲、摇蚊科、颤蚓科等）相对丰度
 | * BMWP指数
* BI生物指数
* 敏感性分类单元数、相对丰度
* 耐受性分类单元数、相对丰度
* EPT分类单元数、相对丰度
* ETO分类单元数、相对丰度
 | * 黏附性分类单元数、相对丰度
* 捕食者分类单元数、相对丰度
* 滤食者分类单元数、相对丰度
* 刮食者分类单元数、相对丰度
 |
| 鱼类 | * 系统发育多样性
* 指示性类群（如鲤鱼科）系统发育多样性
 | * 分类单元数
* 指示性类群（如鲤鱼科）分类单元数
 | * 第一优势度
* 前三优势度
* 香农-威纳指数
* 辛普森指数
* Pielou均匀度指数
* 指示性类群（如鲤鱼科）分类单元数
 | * 敏感性鱼类分类单元数、相对丰度
* 耐受性鱼类分类单元数、相对丰度
* 中等耐污鱼类分类单元数、相对丰度
 | * 中上层鱼分类单元数、相对丰度
* 中下层鱼分类单元数、相对丰度
* 植食性鱼分类单元数、相对丰度
* 杂食性鱼分类单元数、相对丰度
* 肉食性鱼分类单元数、相对丰度
* 底栖动物食性鱼分类单元数、相对丰度
* 浮游生物食性鱼分类单元数、相对丰度
* 产粘性卵鱼类分类单元数、相对丰度
 |
| 1. 表中参数仅为部分适用候选参数，可以根据研究区特点和监测能力增加或删减。EPT类群指蜉蝣目、襀翅目和毛翅目；ETO类群指蜉蝣目、毛翅目和蜻蜓目。
 |

表C.2一些适用于湖库的浮游植物、浮游动物、大型无脊椎动物及鱼类候选参数

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 类群 | 系统发育多样性 | 丰富度 | 物种组成 | 耐受性 | 功能性 |
| 浮游植物 | * 系统发育多样性
* 指示性藻类（真核藻类/蓝藻/绿藻/硅藻/隐藻）系统发育多样性
 | * 分类单元数
* 指示性藻类（真核藻类/蓝藻/绿藻/硅藻/隐藻）分类单元数
 | * 真核藻类第一优势度
* 蓝藻第一优势度
* 真核藻类前三优势度
* 蓝藻前三优势度
* 香农-威纳指数
* 辛普森指数
* Pielou均匀度指数
* 指示性藻类（真核藻类/蓝藻/绿藻/硅藻/隐藻）相对丰度
 | * 耐受性分类单元数、相对丰度
* 敏感性分类单元数、相对丰度
* 畸变硅藻分类单元数、相对丰度
* 耐酸性分类单元数、相对丰度
* 耐碱性分类单元数、相对丰度
* 嗜中性分类单元数、相对丰度
 | * 可食藻类分类单元数、相对丰度
* 不可食藻类分类单元数、相对丰度
* 运动型分类单元数、相对丰度
* 富营养化分类单元数、相对丰度
 |
| 浮游动物 | * 系统发育多样性
* 枝角类系统发育多样性
* 桡足类系统发育多样性
* 轮虫系统发育多样性
* 指示性类群系统发育多样性
 | * 分类单元数
* 枝角类分类单元数
* 桡足类分类单元数
* 轮虫分类单元数
* 指示性类群分类单元数
 | * 第一优势度
* 前三优势度
* 香农-威纳指数
* 辛普森指数
* Pielou均匀度指数
* 枝角类相对丰度
* 桡足类相对丰度
* 轮虫相对丰度
* 指示性类群相对丰度
 | * 耐受性分类单元数、相对丰度
* 敏感性分类单元数、相对丰度
 | * 藻食性分类单元数、相对丰度
* 肉食性分类单元数、相对丰度
 |
| 大型无脊椎动物 | * 系统发育多样性
* 指示性类群（软体动物、甲壳纲、水生昆虫、寡毛纲、摇蚊科、颤蚓科等）系统发育多样性
 | * 分类单元数
* 指示性类群（软体动物、甲壳纲、水生昆虫、寡毛纲、摇蚊科、颤蚓科等）分类单元数
 | * 第一优势度
* 前三优势度
* 香农-威纳指数
* 辛普森指数
* Pielou均匀度指数
* 指示性类群（软体动物、甲壳纲、水生昆虫、寡毛纲、摇蚊科、颤蚓科等）相对丰度
 | * BMWP指数
* BI生物指数
* 敏感性分类单元数、相对丰度
* 耐受性分类单元数、相对丰度
* EPT分类单元数、相对丰度
* ETO分类单元单元数、相对丰度
 | * 黏附性分类单元数、相对丰度
* 捕食者分类单元数、相对丰度
* 滤食者分类单元数、相对丰度
* 刮食者分类单元数、相对丰度
 |
| 鱼类 | * 系统发育多样性
* 指示性类群（如鲤鱼科）系统发育多样性
 | * 分类单元数
* 指示性类群（如鲤鱼科）分类单元数
 | * 第一优势度
* 前三优势度
* 香农-威纳指数
* 辛普森指数
* Pielou均匀度指数
* 指示性类群（如鲤鱼科）分类单元数
 | * 敏感性鱼类分类单元数、相对丰度
* 耐受性鱼类分类单元数、相对丰度
* 中等耐污鱼类分类单元数、相对丰度
 | * 中上层鱼类分类单元数、相对丰度
* 中下层鱼类分类单元数、相对丰度
* 植食性鱼类分类单元数、相对丰度
* 杂食性鱼类分类单元数、相对丰度
* 肉食性鱼类分类单元数、相对丰度
* 底栖动物食性鱼类分类单元数、相对丰度
* 浮游生物食性鱼类分类单元数、相对丰度
* 产粘性卵鱼类分类单元数、相对丰度
 |
| 1. 表中参数仅为部分适用候选参数，可以根据研究区特点和监测能力增加或删减。大型无脊椎动物耐污值见《河流水生态环境质量监测与评价技术指南》和《湖库水生态环境质量监测与评价技术指南》附录列表，耐污值≤4为敏感性种类，耐污值≥6为耐受性种类。
 |

参考文献

[1] 中国环境监测总站等. 河流水生态环境质量监测与评价技术指南（征求意见稿） （环办标征函〔2020〕49号）.

[2] 中国环境监测总站等. 湖库水生态环境质量监测与评价技术指南（征求意见稿） （环办标征函〔2020〕49号）.

[3] 《水利部河长办关于印发<河湖健康评价指南（试行）>的通知》（第43号）.

