

附件 3

《基于环境 DNA 的外来入侵水生动物分布
评估技术指南（征求意见稿）》
编 制 说 明

《基于环境 DNA 的外来入侵水生动物分布评估技术指南》

编 制 组

2025 年 6 月

目 录

1 项目背景	1
1.1 任务来源.....	1
1.2 工作过程.....	1
2 标准制（修）订必要性分析	2
2.1 制（修）订标准的法律法规依据.....	2
2.2 标准的制订是建立健全国家生物安全标准体系的重要补充.....	3
2.3 标准的制订是监测和评价外来入侵水生动物生态影响的客观需求.....	4
3 基于环境 DNA 的外来入侵水生动物监测评估与管理研究进展	4
3.1 国外外来入侵水生动物监测与管理研究.....	4
3.2 国内外外来入侵水生动物监测与管理研究.....	5
4 标准编制的基本原则和技术路线	6
4.1 基本原则.....	6
4.2 技术路线.....	6
5 标准框架结构	7
6 条文说明	8
6.1 适用范围.....	8
6.2 规范性引用文件.....	8
6.3 术语和定义.....	8
6.4 目标物种.....	10
6.5 评估程序.....	11
6.6 环境 DNA 样本采集.....	11
6.7 采样点阳性判定.....	15
6.8 分布评估.....	16
6.9 质量控制与质量保证.....	17
6.10 废弃物处理.....	17
6.11 评估报告编制.....	17
6.12 附录.....	18
7 与国内同类标准的水平对比和分析	18
8 标准实施建议	18

1 项目背景

1.1 任务来源

为适应国家生态环境保护工作需要，进一步完善国家生态环境标准体系，根据《关于开展 2021 年度国家生态环境标准项目实施工作的通知》（环办法规函〔2021〕312 号），生态环境部下达了国家生态环境标准《基于 eDNA 的外来入侵水生动物危害评估技术导则》制修订计划，项目统一编号为 2021-46。标准由中国环境科学研究院承担，云南大学和中国环境监测总站协作参与。

1.2 工作过程

按照《国家生态环境标准制修订工作规则》（国环法规〔2020〕4 号）的有关要求，项目承担单位组织专家和相关单位成立了标准编制组。编制组围绕项目目标，采用文献调研、资料分析等方法，整理分析了中国外来入侵水生动物管理方面的政策、法规、标准体系，并对国内外外来入侵水生动物分布调查、评估与管理现状深入研究。经多次研讨，编制组确定了标准编制工作的原则、程序、步骤和方法，形成开题报告和标准文本初稿。

2023 年 5 月 26 日，生态环境部自然生态保护司组织召开标准开题论证会。由来自中国科学院动物研究所、北京林业大学、中国水产科学研究院珠江水产研究所、北京大学、山东省农业科学院、浙江农林大学、南京农业大学、华中农业大学、中国检验检疫科学研究院等 9 家单位的专家组成专家论证组。标准编制组就标准制修订的背景情况、前期调研和实施方案等内容进行了详细汇报，专家组对项目开题材料进行质询和讨论，一致同意通过开题论证，并提出如下意见：（1）建议将标准题目改成《基于 eDNA 的外来入侵水生动物分布评估技术导则》；（2）明确目标物种。

2023 年 6 月至 2024 年 6 月，标准编制组针对专家组意见对标准进行了修改完善，形成《基于 eDNA 的外来入侵水生动物分布评估技术导则》征求意见稿文本和编制说明。

2024 年 7 月 19 日，生态环境部自然生态保护司组织召开标准征求意见稿技术审查会。由来自海关总署国际检验检疫标准与技术法规研究中心、中国农业科学院农业环境与可持续发展研究所、北京林业大学、北京大学、中国水产科学研究院珠江水产研究所、中国科学院动物研究所、南京大学、江苏省生态环境监测中心、生态环境部海河流域北海海域生态环境监督管理局生态环境监测与科学研究中心等 9 家单位的专家组成专家委员会。专家委员会一致通过该标准征求意见稿的技术审查，建议将标准名称修改为《基于环境 DNA 的外来入侵水生动物分布评估技术指南》，并建议进一步完善质量控制与质量保证技术要求，加强标准文本的规范化表述。

2024 年 7 月至 2025 年 1 月，标准编制组进一步根据征求意见稿技术审查会意见对标准征求意见稿文本和编制说明进行了修改完善，形成正式征求意见稿文本和编制说明。

2 标准制（修）订必要性分析

2.1 制（修）订标准的法律法规依据

生物多样性是人类赖以生存和发展的基础，保护生物多样性对全人类至关重要。《生物多样性公约》明确要求“防止引进、控制或消除那些威胁到生态系统、生境或物种的外来物种”。“昆明—蒙特利尔全球生物多样性框架”2030年全球行动目标提出“通过确定和管理引进外来物种的途径，防止重点外来入侵物种的引入和定居，消除、尽量减少、减少和/或减轻外来入侵物种对生物多样性和生态系统服务的影响，到2030年，将其他已知或潜在入侵外来物种的引进定殖率至少降低50%，消除或控制入侵外来物种，特别是在岛屿等优先地点。”我国是《生物多样性公约》的缔约方，要实现全球生物多样性保护的目标，需要精准掌握外来入侵物种的分布状况，尤其是针对外来入侵水生动物等难以计数调查的类群，亟需探讨分子生物学等高新技术在外来入侵物种监测评估中的规范化应用，指导我国水域开展外来入侵动物环境DNA检测和监测，推动国际环境保护合作，支撑国际公约履约。

2014年出台的《中华人民共和国环境保护法》中规定“保护生物多样性，保障生态安全，依法制定有关生态保护和恢复治理方案并予以实施。引进外来物种以及研究、开发和利用生物技术，应当采取措施，防止对生物多样性的破坏”，提及了引进外来物种要采取相应措施，避免对生态系统造成破坏。2020年我国颁布《中华人民共和国生物安全法》，2024年本法修订，明确将“防范外来物种入侵与保护生物多样性”纳入该法适用范围，第二章第十九条明确指出“国家建立生物安全标准制度。国务院标准化主管部门和国务院其他有关部门根据职责分工，制定和完善生物安全领域相关标准”。制订基于环境DNA的外来入侵水生动物评估标准，有助于填补现有法律框架中的监测和执法空白。

加强生物多样性保护，是生态文明建设的重要内容，是推动高质量发展的重要抓手。党中央、国务院高度重视生物多样性保护和外来入侵物种管控，习近平总书记在中共中央政治局第二十九次集体学习时提出“要实施生物多样性保护重大工程，强化外来物种管控，举办好《生物多样性公约》第十五次缔约方大会”。2021年10月，中共中央办公厅、国务院办公厅印发《关于进一步加强生物多样性保护的意見》，提出“到2025年，初步形成生物多样性可持续利用机制，基本建立生物多样性保护相关政策、法规、制度、标准和监测体系”的总体目标，强调“开展外来物种入侵、生物技术应用等对生物多样性的影响评价，明确评价方式、内容、程序，提出应对策略”。2022年5月，农业农村部联合自然资源部、生态环境部、海关总署部署推进《外来入侵物种管理办法》，要求“农业农村部会同有关部门制定外来入侵物种名录，实行动态调整和分类管理，建立外来入侵物种数据库，制修订外来入侵物种风险评估、监测预警、防控治理等技术规范”。积极监测、防治和管理外来物种入侵是加强我国生物多样性管理、保障生物安全的重要任务之一。基于环境DNA技术的外来入侵水生动物分布评估能够在现有法规框架下提供更精确、更高效的外来物种监测评估。

2.2 标准的制订是建立健全国家生物安全标准体系的重要补充

根据生物多样性保护和管理工作需要，我国生态环境、农业农村、林业等部门陆续发布了一系列与外来入侵物种防控与管理相关的标准和技术导则，标准针对植物、昆虫等不同类群规定了外来入侵物种风险评估、调查监测、防控与监管等技术要求。我国现有外来入侵物种标准主要以预防和监测特定外来入侵物种为主，缺乏外来入侵水生动物调查、监测和评估标准。本标准的制定是对我国建立健全外来入侵物种标准体系的有力补充。

表 1 我国现行外来入侵物种标准统计

类别	标准名称	涉及类群
风险评估类	1 外来入侵植物对陆域自然保护区生物多样性影响评估技术导则 HJ 1345-2023	外来入侵植物
	2 外来物种环境风险评估技术导则 HJ 624-2011	所有类群
	3 外来昆虫引入风险评估规范 NY/T 1850-2010	昆虫
	4 外来草本植物安全性评估技术规范 NY/T 3669-2020	草本植物
	5 外来草本植物引入风险评估技术规范 NY/T 1851-2010	草本植物
	6 外来植物风险分析技术规程 飞机草 NY/T 1707-2009	特定草本植物
	7 外来昆虫风险分析技术规程 红棕象甲 NY/T 1706-2009	特定昆虫
	8 外来昆虫风险分析技术规程 椰心叶甲 NY/T 1705-2009	特定昆虫
调查监测类	1 外来入侵植物监测技术规程 少花蒺藜草 NY/T 2689-2015	特定草本植物
	2 外来入侵植物监测技术规程 刺萼龙葵 NY/T 2530-2013	特定草本植物
	3 外来入侵植物监测技术规程 大藻 NY/T 3076-2017	特定草本植物
	4 外来入侵植物监测技术规程 银胶菊 NY/T 3017-2016	特定草本植物
	5 外来入侵植物监测技术规程 长芒苋 NY/T 2688-2015	特定草本植物
	6 外来草本植物普查技术规程 NY/T 1861-2010	草本植物
	7 外来入侵植物监测技术规程 黄顶菊 NY/T 1866-2010	特定草本植物
	8 外来入侵植物监测技术规程 薇甘菊 NY/T 1865-2010	特定草本植物
	9 外来入侵植物监测技术规程 紫茎泽兰 NY/T 1864-2010	特定草本植物
	10 外来入侵植物监测技术规程 飞机草 NY/T 1863-2010	特定草本植物
	11 外来入侵植物监测技术规程 加拿大一枝黄花 NY/T 1862-2010	特定草本植物
	12 植物有害生物调查监测指南 GB/T 27618-2011	植物
	13 红火蚁疫情监测规程 GB/T 23626-2009	特定昆虫
	14 马铃薯甲虫疫情监测规程 GB/T 23620-2009	特定昆虫
	15 口岸外来林木害虫诱捕监测指南 SN/T 4797-2017	害虫
防控与监管类	1 替代控制外来入侵植物技术规范 NY/T 3668-2020	所有类群
	2 外来入侵杂草根除指南 NY/T 2155-2012	所有类群
	3 自然保护区外来入侵种管理规范 LY/T 2243-2014	所有类群

2.3 标准的制订是监测和评价外来入侵水生动物生态影响的客观需求

全面调查和评估生物资源是保护全球生物多样性的重要举措。对外来入侵水生动物而言,监测和评估的关键是检测目标物种的速度和效率。与传统物种监测方法相比,环境 DNA 最大的优势在于耗时短、成本低、灵敏度高。环境 DNA 技术利用遗传材料的独特序列片段来识别类群,一般无需直接接触目标类群,也无需进行繁重的基于形态学的分类鉴定,具有一定的成本效益优势。环境 DNA 技术的高灵敏度可以显著提高检出率,特别是对于那些发生在低密度、具有隐蔽生态、具有不连续分布特征或具有混淆准确识别的形态学特征的外来水生动物。环境 DNA 方法的快速性和高敏感性有助于在大空间尺度上尽早发现新的生物入侵,进而在其种群产生危害之前及时防控。因此,基于环境 DNA 技术开展外来水生动物监测,符合外来入侵物种监测与管理的客观要求。

3 基于环境 DNA 的外来入侵水生动物监测评估与管理研究进展

3.1 国外外来入侵水生动物监测与管理研究

3.1.1 国外外来入侵水生生物种监管法律法规及联合协议

与生物入侵相关的法律法规最初是为了控制病虫害和疾病的传入、保护人和动植物的健康而在国与国之间订立的检验检疫协定,起源于 18 世纪末。发展至今已有大约 50 多个与生物入侵有关的国际法律文件,主要包括《生物多样性公约》(CBD)、《国际植物保护公约》(IPPC)和世界自然保护联盟(IUCN)的《IUCN 预防外来入侵物种所造成的生物多样性丧失指南》等。

在国家外来入侵水生生物种监管方面,其通过的法律文件大都优先关注海水养殖、压舱水引入外来入侵物种等。2004 年 2 月,国际海事组织通过的《国际船舶压载水和沉积物控制和管理公约》对防止和减少船舶压载水造成的有害水生物和病原体的传播做出了详细的规定。1990 年 10 月 29 日美国通过了《外来有害水生生物预防与控制法》(NSNPCA),它是第一部美国国内关于外来物种通过压舱水侵入问题的法律。1996 年 10 月 26 日,美国国会通过了《国家入侵物种法》(NISA),将压舱水的管理范围扩大至美国所有水域。澳大利亚于 1991 年制订了世界上第一部《压舱水管理指南》,对可能带来水生外来物种的压舱水采取措施,并于 1999 年修订。挪威 1985 年发布的《鱼类和水生贝类动物繁殖法》,完全禁止任何活的海洋物种及其卵的引进;1992 年发布的《鲑类和淡水鱼类法》规定,活的溯河鲑类、淡水鱼类及其卵或鱼苗以及这些鱼的饵料动物,其引种需要许可证,除非特殊批准,禁止向淡水水域、峡湾和海域释放溯河鲑类或淡水鱼及其卵或鱼苗。

除了国家层面发布的法律、法规和方案以外,国外很多地区也针对水资源、水生态系统保护制定了联合协议。《多瑙河保护与可持续利用合作公约》禁止成员国向内陆国水系引进新物种。欧盟水框架指令(The EU water framework directive, WFD)明确提出要保护和提

高水生态状况，并提出了以水生生物为核心，涵盖生物、水文地貌和水体理化性质等的三类水生态状况评价体系，外来入侵水生物种已成为影响欧洲水体生态状况的因素之一。

3.1.2 国外环境 DNA 监测技术研究进展

早在 1987 年，遗传方法就开始应用于野外生态学研究。2000 年代早期，环境 DNA (eDNA) 被认为是在不分离目标生物的情况下，可以从沉积物、土壤、水或空气等环境样本中分离出来的 DNA。2008 年，Ficetola 等人在法国的一项野外生态学研究中首次将环境 DNA 方法应用于野生动物调查和评估，从水样中检测入侵蛙类。美国最早从 2009 年探索研究环境 DNA 技术，用于监测调查河流中鱼类。自 2011 年以来，全球与环境 DNA 研究相关论文超过 1700 余篇，美国发表论文居多，其次为欧洲，中国论文数约占全球总数的 5%。环境 DNA 技术已逐渐成为水生生物生态监测的重要手段，并广泛应用于动植物多样性调查、外来入侵物种检测及濒危物种监测。

3.1.3 国外环境 DNA 监测、评估相关标准开展情况

随着环境 DNA 技术在水生生物鉴定研究中的成熟应用，越来越多的国家正在或已经制定基于环境 DNA 的生物监测和生态评价标准与规范。2015 年美国内务部 (USI) 和美国地质调查局 (USGS) 颁布了环境 DNA 采样技术规范。2019 年日本环境 DNA 学会发布《环境 DNA 采样、实验手册》。2020 年瑞士环境署联合苏黎世大学等单位形成环境 DNA 在水生生态系统生物监测和生物评价中的应用指南。2021 年欧盟科技合作联盟 (COST) 颁布了环境 DNA 生物评估方法指南。2021 年加拿大渔业和海洋部发布了使用靶向环境 DNA 分析管理水生入侵物种和濒危物种的指南。2022 年，澳大利亚农业、渔业和林业部门资助堪培拉国家参考中心发布了环境 DNA 测试验证指南，详细说明了物种特异性检测和条形码验证步骤。

3.2 国内外来入侵水生动物监测与管理研究

3.2.1 国内外来入侵水生物种监管法律法规

2001 年，原农业部发布《水产苗种管理办法》，要求加强重要水产苗种进口、出口审批和检疫，并规定国内如要异地引进水产苗种，应先到当地渔业行政主管部门办理检疫手续，经检疫合格后方可运输和销售。2020 年《中华人民共和国生物安全法》颁布后，2021 年 3 月《中华人民共和国长江保护法》完成修订，规定“禁止在长江流域开放水域养殖、投放外来物种或者其他非本地物种种质资源。”《全国重点生态系统保护和修复重大工程总体规划 (2021-2035 年)》明确把“外来入侵物种防治”列为海岸带生态保护和修复的主攻方向之一。

3.2.2 国内环境 DNA 监测技术研究进展

我国环境 DNA 技术在水生动物监测方面的研究起步虽晚，但发展较快，环境 DNA 技术在水生动物监测方面得到广泛应用。2021 年，中国环境监测总站启动《长江流域鱼类环境 DNA 试点监测、通量试点监测及水生生物样品采集》项目，江苏、安徽、江西等地逐步

开展长江流域鱼类环境 DNA 监测采样工作。2022 年，江苏省泰州市基于环境 DNA 技术完成了长江流域鱼类群落监测，记录鱼类 10 目 21 科 45 属 55 种，首次发现濒危物种长颌鲚 *Coiliaecetenes Jordan*。

3.2.3 国内环境 DNA 监测、评估相关标准开展情况

截至目前，我国与外来入侵物种、DNA 技术或环境 DNA 技术有关的标准包括原国家质量监督检验检疫总局发布的《国境口岸美洲大蠊形态及 DNA 条形码鉴定方法》（SN/T 4280.4-2016），北京市地方标准《鱼类贝类环境 DNA 识别技术规范》（DB11/T 2023-2022），江苏省地方标准《淡水生物环境 DNA 监测技术方法》（DB32/T 4539-2023），以及中国环境科学学会发布的系列团体标准《基于环境 DNA 的淡水生物评价技术指南》（T/CSES 82-2023）、《淡水生物监测 环境 DNA 宏条形码法》（T/CSES 81-2023）、《淡水生物 DNA 条形码构建技术规程》（T/CSES 80-2023）。我国现行标准中与环境 DNA 相关的较少，尚无基于环境 DNA 的外来入侵水生物种监测和评估标准。

4 标准编制的基本原则和技术路线

4.1 基本原则

4.1.1 科学性原则

环境 DNA 检测结果高度依赖科学、规范的环境水样采集，环境水样过滤和 DNA 提取等工作。基于生态学、分子生物学要求，应规范提取环境水样，严格实施实验操作规范，科学评估水域环境中外来入侵水生动物分布状况。

4.1.2 可操作性原则

标准制订在满足科学评价需要的同时，还应综合考虑外来入侵水生动物特征、评估水域特点、现有设备、成熟的技术软件、耗费的人力和资金等条件，使基于环境 DNA 开展的外来入侵水生动物分布评估技术指南切实可行，具有较强的实用性和可操作性。

4.2 技术路线

标准制订技术路线如图 1 所示。

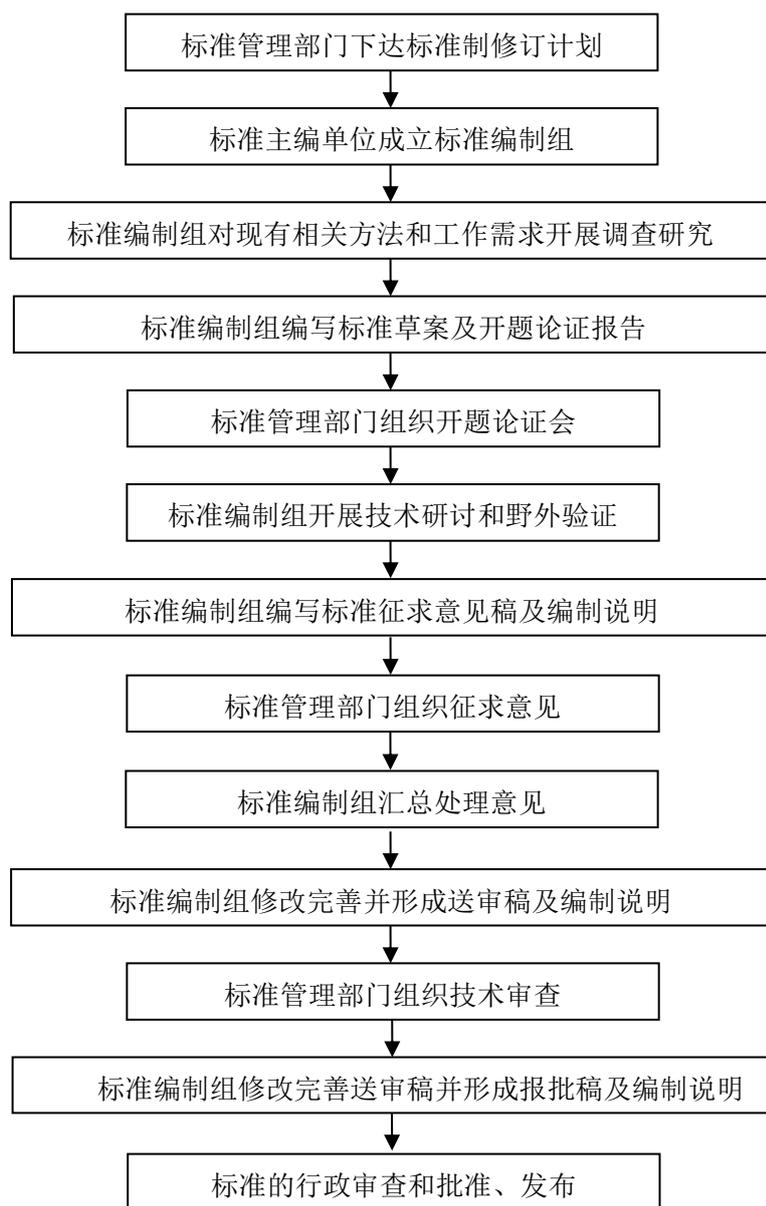


图1 技术路线

5 标准框架结构

本标准主要包括 12 个部分，具体如下：

- 1.适用范围；
- 2.规范性引用文件；
- 3.术语和定义；
- 4.目标物种；
- 5.评估程序；
- 6.环境 DNA 样本采集；
- 7.采样点阳性判定；

- 8.分布评估;
- 9.质量控制与质量保证;
- 10.废弃物处理;
- 11.评估报告编制;
- 12.附录。

6 条文说明

6.1 适用范围

本部分规定了标准适用对象，本标准适用于内陆水体外来入侵水生动物区域分布评估，符合生态环境部管理职能。

6.2 规范性引用文件

本标准引用了《实验室 生物安全通用要求》（GB 19489）、《核酸引物探针质量技术要求》（GB/T 34797）、《核酸提取纯化方法评价通则》（GB/T 37874）、《环境微生物宏基因组检测 高通量测序法》（GB/T 40226）、《野生动物及其制品 DNA 物种 鉴定技术规程》（GB/T 43650）、《水质 采样技术指导》（HJ 494）、《生物多样性观测技术导则 内陆水域鱼类》（HJ 710.7）、《水生态监测技术指南 河流水生生物监测与评价（试行）》（HJ 1295）、《水生态监测技术指南 湖泊和水库水生生物监测与评价（试行）》（HJ 1296）、《实验室生物废弃物管理要求》（SN/T 4835）中有关条款。

6.3 术语和定义

本部分为执行本标准制定的专门术语和容易引起歧义的名词进行定义。

（1）水生动物 aquatic animals

本定义综合参考了《水生动物疫病风险评估通则》（SC/T 7017）对“水生动物”的定义——“指生活史主要阶段生活在水中的各类动物（包括卵和配子）”，《水生生物调查技术规范》（DB11/T 1721）中对两栖动物、爬行动物、大型底栖动物进行的定义，将“水生动物”定义为“生活史全部或主要阶段生活在水中的各类动物（包括卵和配子），包括大型底栖动物、两栖动物、鱼类、爬行动物等”。

（2）外来水生动物 alien aquatic animals

本定义参考林业行业标准 LY/T 2243-2014 中对“外来种”的定义，即“在其过去或现在的自然分布范围及潜在扩散范围以外的种、亚种或以下的分类单元，包括该物种所有可能存活繁殖的部分、配子或繁殖体”，并根据本标准主要评估对象为水生动物，将“外来水生动物”定义为“出现在其过去或现在的自然分布范围及潜在扩散范围以外的水生动物、亚种或以下分类单元，包括该物种所有可能存活繁殖的部分”。

（3）外来入侵水生动物 invasive alien aquatic animals

本定义参考了《外来入侵物种管理办法》（中华人民共和国农业农村部 自然资源部 生态环境部 海关总署令 2022 年第 4 号）对“外来入侵物种”的定义——“传入定殖并对生态系统、生境、物种带来威胁或者危害，影响我国生态环境，损害农林牧渔业可持续发展和生物多样性的外来物种”，将外来入侵水生动物定义为“传入定殖并对生态系统、生境、物种带来威胁或者危害，影响我国生态环境，损害农林牧渔业可持续发展和生物多样性的外来水生动物”。

（4）环境 DNA environmental DNA (eDNA)

本定义综合参考了《鱼类贝类环境 DNA 识别技术规范》（DB11/T 2023-2022）对“环境 DNA”的定义——“从生物生活环境中直接提取到的不同物种 DNA 的总和，包含动植物脱落的细胞或游离的 DNA，可提供一个环境中生活物种的存在记录”，《淡水生物环境 DNA 监测技术方法》（DB32/T 4539-2023）对“环境 DNA”的定义——“环境介质（水、土壤、沉积物、生物膜、空气等）或混合生物组织中存在的脱氧核糖核酸（DNA）等生物遗传物质”，将环境 DNA 定义为“生物生活环境（水、沉积物等）中存在的脱氧核糖核酸（DNA）等生物遗传物质”。

（5）阳性对照 positive control

本定义参考了《国境口岸医学媒介昆虫 DNA 条形码鉴定操作规程》（SN/T 4278-2015）对“阳性对照”的定义——“在 PCR 扩增过程中，与受试样品平行进行的，在正常反应情况下，一定能产生 PCR 产物的 DNA 为反应模板，用于观察整个反应体系和反应过程是否正常，阳性对照应有 PCR 产物带产生”，将“阳性对照”定义为“确定能检出目标物种的样本，与受试样本平行进行，用于判断整个反应体系和反应过程是否可靠”。

（6）阴性对照 negative control

本定义参考了《国境口岸医学媒介昆虫 DNA 条形码鉴定操作规程》（SN/T 4278-2015）对“阴性对照”的定义——“在 PCR 扩增过程中，与受试样品平行进行的，用 ddH₂O 代替模板 DNA 而进行的对照反应，用于观察整个反应体系是否正常，确认没有受到污染，阴性对照没有 PCR 产物条带产生”，结合专家建议，将“阴性对照”定义为“确定不含目标物种的样本（例如无菌水），与受试样本平行进行，用于判断受试样本是否被污染”。

（7）最低检测限 limit of detection (LOD)

本定义综合参考了《生物技术 核酸靶序列定量方法的性能评价要求 qPCR 法和 dPCR 法》（GB/T 42077-2022/ISO 20395:2019）对“检出限”的定义，——“由给定的测量程序获得的测得值。其声称样品中不存在某种成分的误判概率为 β ，其存在某种成分的误判概率为 α ”，《转基因植物及其产品成分检测实时荧光定量 PCR 方法制定指南》（农业部 2259 号公告 -5-2015）对“检出限”的定义，——“样品中被稳定检出的最低 DNA 模板含量或浓度（不需要定量）”，结合专家建议，将“最低检测限”定义为“一定置信水平下可以检测到的目标物种

DNA 的最低浓度”。

(8) 定量聚合酶链式反应 quantitative polymerase chain reaction (qPCR)

本定义综合参考了《出口食品中常见鱼类及其制品的鉴伪方法 第1部分：石斑鱼成分检测 实时荧光 PCR 法》(SN/T 3589.1-2013)对“实时荧光 PCR”的定义——“在 PCR 扩增时加入带有荧光基团的特异性探针 (Taqman 探针) 或荧光染料, 使 PCR 产物的累积与荧光信号的累积完全同步, 实现 PCR 产物的实时监测”, 以及《马铃薯腐烂茎线虫的 qPCR 检测技术规程》(DB15/T 2855-2023)对“定量 PCR”的定义——“定量 PCR 技术(quantitative PCR, qPCR)是指在 PCR 反应体系中加入可与靶标 DNA 结合的荧光基团, 依据荧光信号的强度对扩增产物进行实时监测, 从而实现对初始靶标 DNA 模板量进行定量分析的技术。根据荧光信号来源可分为染料法和探针法”, 将“定量聚合酶链式反应”定义为“在聚合酶链式反应 (PCR) 的反应体系中加入可与目标物种 DNA 结合的带有荧光基团的特异性探针或荧光染料, 依据荧光信号的强度对扩增产物进行实时监测, 从而对初始目标物种 DNA 模板量进行定量分析”。

(9) 定量循环 quantification cycle (C_q)

本定义综合参考了《生物技术 核酸靶序列定量方法的性能评价要求 qPCR 法和 dPCR 法》(GB/T 42077-2022/ISO 20395:2019)对“定量循环”的定义——“<qPCR>反应产生的荧光超越足以区分背景信号阈值时的循环数”, 以及《实时荧光定量 PCR 仪性能评价通则》(GB/T 42753-2023)对“C_t 值”的定义——“每个 PCR 反应管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环次数”, 将“定量循环”定义为“qPCR 反应时每个管内产生的荧光信号达到设定阈值时所经历的循环数”。

6.4 目标物种

目标物种依据农业农村部、生态环境部等公开发布的外来入侵物种管理名单确定, 可根据农业农村部、生态环境部等公开发布和修编的外来入侵物种名录同步更新。截至目前, 我国公开发布的外来入侵物种名单有农业农村部、自然资源部、生态环境部、住房和城乡建设部、海关总署、国家林草局联合发布的《重点管理外来入侵物种名录》, 原国家环保总局和中国科学院发布的《中国第一批外来入侵物种名单》(环发〔2003〕11号), 原环境保护部和中国科学院联合发布的《中国第二批外来入侵物种名单》(环发〔2010〕4号)、《中国外来入侵物种名单(第三批)》(公告 2014 年 第 57 号)、《中国自然生态系统外来入侵物种名单(第四批)》(公告 2016 年 第 78 号)。我国主要外来入侵水生动物主要包括美国牛蛙 *Rana catesbeiana*、红耳彩龟 *Trachemys scripta elegans*、大鳄龟 *Macrolemys temminckii*、福寿螺 *Pomacea canaliculata*、稻水象甲 *Lissorhoptrus oryzophilus*、克氏原螯虾 *Procambarus clarkii*、豹纹翼甲鲶 *Pterygoplichthys pardalis*、红腹锯鲑脂鲤 *Pygocentrus nattereri*、尼罗罗非鱼 *Oreochromis niloticus*、齐氏罗非鱼 *Coptodon zillii*、食蚊鱼 *Gambusia*

affinis、鳄雀鳝 *Atractosteus spatula* 等。

6.5 评估程序

基于环境DNA的外来入侵水生动物区域分布评估工作内容包括环境DNA样本采集、采样点阳性判定、分布评估、报告编制等过程。评估程序如图2所示。

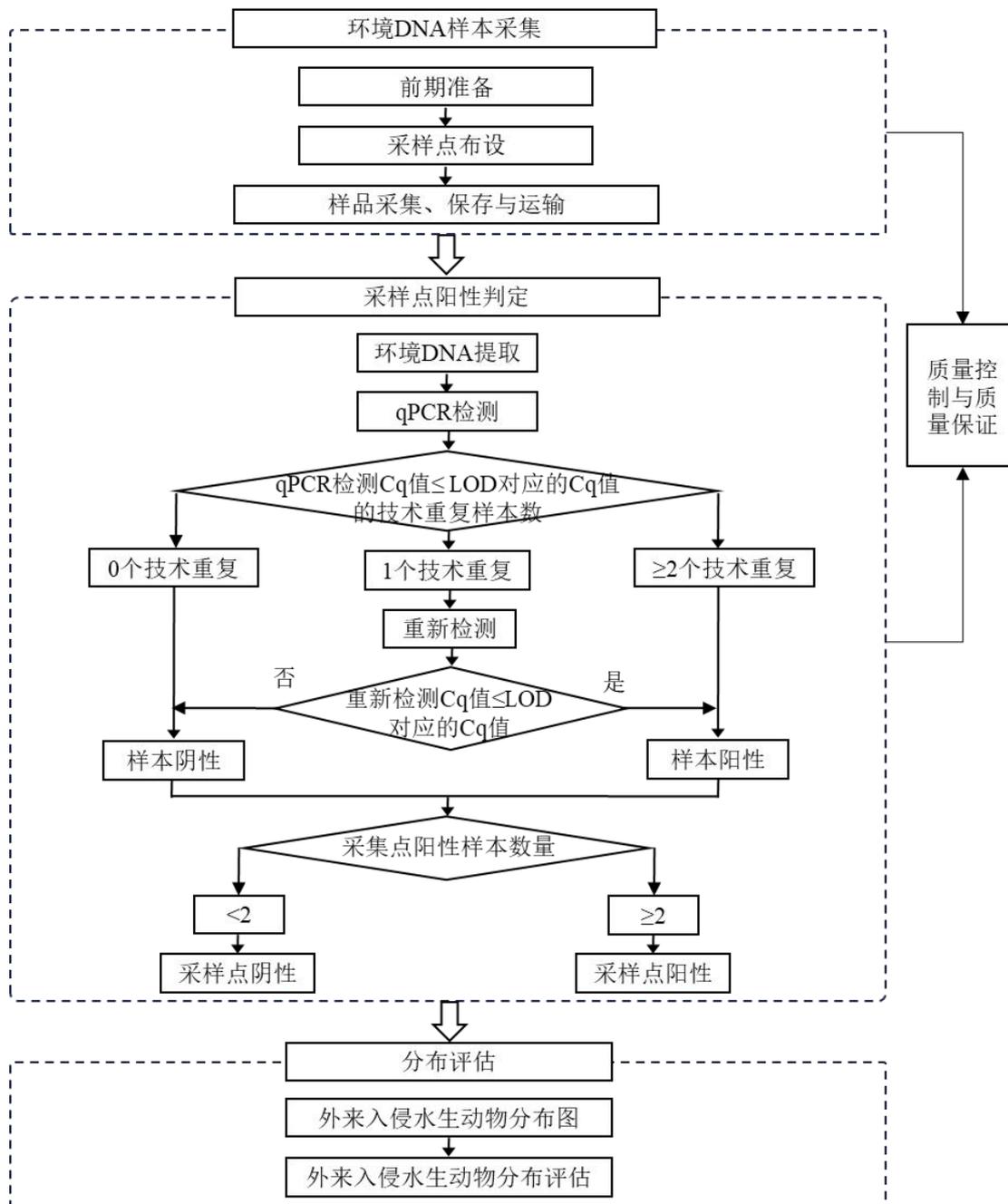


图2 评估程序

6.6 环境 DNA 样本采集

6.6.1 前期准备

通过文献查阅、问卷调查、访问调查、现场踏勘等形式，收集评估区域和目标物种相关资料，包括评估区域空间结构（含水域类型、水域地理位置、水域是否为独立水体等）、水

文特征（含水域水位、水量、水深、流速、流向、水体洁净度，水域面积、长度、宽度、温度、pH 值，水域地形、水底基质、河床结构等）、气候特征（含年均温、降水量、蒸发量等），以及目标物种分布特征（含物种类群、物种空间分布状况、物种潜在适生区、物种适生境类型等）、遗传信息（含物种 DNA 条形码、物种特异性引物和探针等）、生活史特征（物种生长发育阶段、物种繁殖周期、物种季节变化特征等）。

6.6.2 采样点布设

截至目前，我国环保部门发布了系列基于形态学鉴定的水生生物多样性观测技术导则、水生生物监测与评价标准，针对河流、湖库水生生物监测点布设提出了规范化的要求。原环境保护部 2014 年发布的《生物多样性观测技术导则 淡水底栖大型无脊椎动物》（HJ 710.8-2014）建议分层级布点。其中，湖泊和水库划分为入口区、深水区等不同区域，每个区域分别设置 1 至若干个横断面，同一横断面上每隔一定距离设置样点。河流划分为河口区、上中下游河段等区域，每个区域设置间隔数公里至数十公里的断面，同一断面上每隔一定距离设置一个采样点，采样点布设状况与河流宽度密切相关，若河流宽度不超过 200m，在每个断面的中部或靠岸一侧设置 1 个采样点；若河流宽度在 200m 以上，在每个断面的中部和左、右两侧分别布设 1 至多个采样点，采样点间距 100~200m。针对溪流和可涉水河流，该标准规定要按照溪流或可涉水河流的底质类型、水深和流速、水面宽度、人类活动干扰程度等设置样点。生态环境部 2023 年发布的《水生态监测技术指南 河流水生生物监测与评价（试行）》（HJ 1295-2023）建议河流采用固定长度法或河宽比确定监测河段，可涉水河流的监测河段长度宜小于 10km，不可涉水河流的监测河段长度宜小于 50km，每个河段布设 2~5 个监测点位。生态环境部 2023 年发布的《水生态监测技术指南 湖泊和水库水生生物监测与评价（试行）》（HJ 1296-2023）建议将湖库分为湖库滨岸带、沿岸带等不同区域，每个区域布设监测点位，监测点位数量参照湖库区域面积确定。

本标准结合我国基于形态学鉴定的水生生物多样性观测方法、生物评价方法以及专家经验，按照《水生态监测技术指南 河流水生生物监测与评价（试行）》（HJ 1295-2023）要求设置河段，将河流划分成河口区、上游、中游、下游等区域，河段长度视河流类型及河流宽度调整，一般来说，可涉水河流的河段长度设为 100m；不可涉水河流的河段长度可设为 1000m，也可按河流宽度倍数确定。每个河段内均匀布设 3~5 个采样点，采样点数目依据水体形态特点、水文特征、目标物种分布特征调整。河流采样点点位布设示意图参见图 3。采样点应全面覆盖河段范围。每个采样点平行采集 3 个样本。

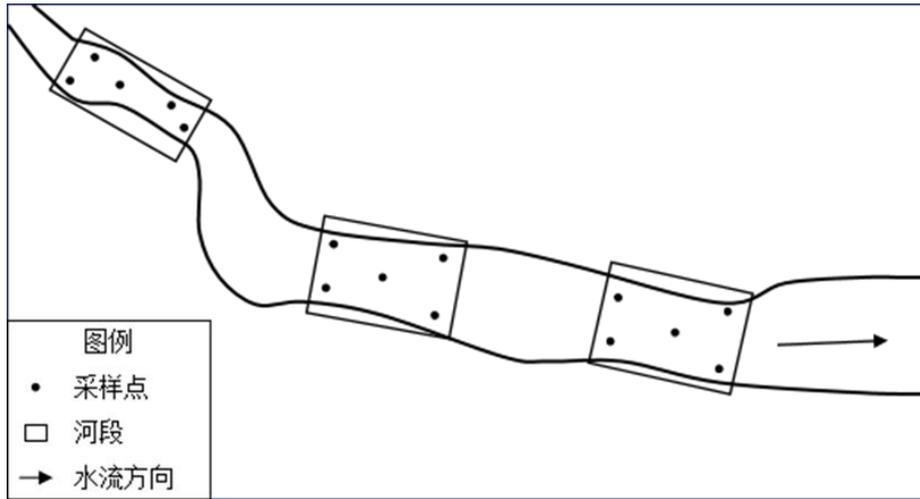


图3 河流干流外来入侵水生动物环境 DNA 采样点布设示意图

本标准参照《水生态监测技术指南 湖泊和水库水生生物监测与评价（试行）》（HJ 1296-2023）规定将湖泊和水库分为不同的湖库区，如湖库滨岸带、沿岸带、湖库心区、主要河流出入口等。每个湖库区依据其面积设置采样点，湖库区采样点数量参见表 2，采样点数量可依据水体形态特点、水文特征、目标物种分布特征等差异调整，大型湖库区宜适当增加采样点点位。采样点应全面覆盖湖库区范围。每个采样点平行采集 3 个样本。湖泊和水库采样点点位布设示意图参见图 4。河道型或狭长型湖库，参照河流进行点位布设。水田参照湖库进行点位布设。

表 2 湖库区采样点点位布设参考数量

湖库区面积 A (km^2)	$A < 50$	$50 \leq A < 500$	$500 \leq A < 1000$	$1000 \leq A < 2000$	$A \geq 2000$
点位数量 N (个)	$3 \leq N < 10$	$10 \leq N < 15$	$15 \leq N < 20$	$20 \leq N < 30$	$30 \leq N < 50$

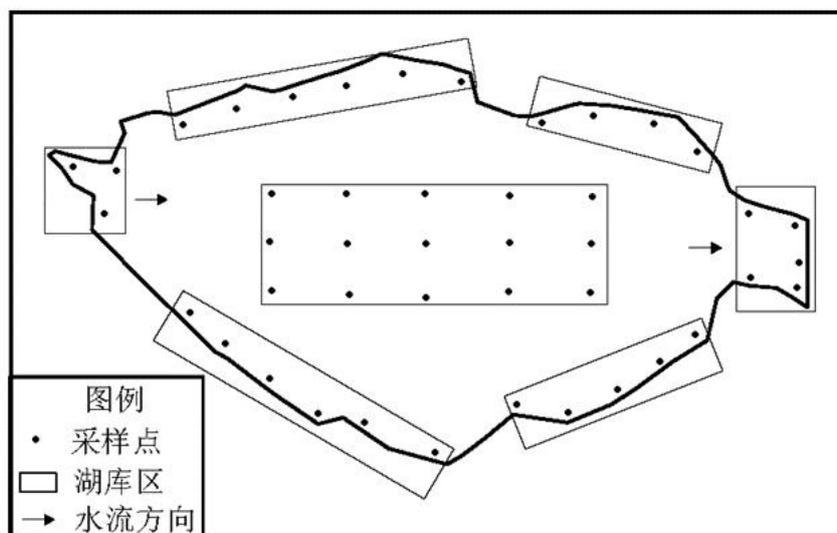


图 4 湖泊和水库外来入侵水生动物环境 DNA 采样点布设示意图

一般来说，环境 DNA 样本采集不仅应考虑 DNA 的空间分布特征，还应考虑水体流动、环境降解、环境干扰等影响。海鲜市场、餐馆排放废水以及家庭生活污水可能含有目标物种的 DNA，进而导致环境 DNA 分析结果不能真实地反映外来入侵水生动物分布情况。因此，在设置采样点时，应掌握评估区域内水产养殖区、污水排放口等分布状况，避开评估区域内排污口、养殖区、垂钓区等局部特殊区域。

6.6.3 采样时间和深度

本标准的目的是反映评估区域外来入侵水生动物分布状况。采样时间和频次应根据目标物种的生命周期和生物节律（如水生动物的季节变化和日变化等）、评估目的等因素确定，针对重点关注区域或突发入侵事件，可开展更高频次的采集。一般来说，鱼类的采样时间参照《生物多样性观测技术导则 内陆水域鱼类》（HJ 710.7）要求执行，根据鱼类生物学特点及水文条件的变化规律，于繁殖季开展采样。底栖动物采样时间参照《生物多样性观测技术导则 淡水底栖大型无脊椎动物》（HJ 710.8）要求执行，一般在春末至秋末开展采样。爬行动物采样时间参照《生物多样性观测技术导则 爬行动物》（HJ 710.5）执行，根据爬行动物生活习性及其气候条件，一般根据其活动盛期于繁殖季节开展采样。两栖动物采样时间参照《两栖爬行动物野外调查技术规程》（DB23/T 3227-2022）执行，根据两栖动物生活史特点以及活动规律于最活跃的 4~10 月开展采样。此外，2021 年欧盟科技合作联盟（COST）颁布的环境 DNA 生物评估方法指南中提到，当评估区域水体混合较为均匀时，可直接采集表层水，当评估区域水体分层明显时，宜分层采集。《生物多样性观测技术导则 内陆水域鱼类》（HJ 710.7）规定了流动水体中物种分层采集要求，水深小于 1m 时可进行表层采集，水深介于 1m 和 3m 之间时可进行表层和底层采集，水深大于 3m 时可开展表层、中层和底层采集。基于此，本标准建议根据目标物种栖息地偏好、目标物种迁移特征、区域水动力情况等因素确定采样深度。

6.6.4 样本采集、保存与运输

根据评估区域水域水文特征和目标物种类群，选取采集设备和采集方法，获取采样点位具有代表性的沉积物样本或水体样本。一般来说，目标物种为鱼类时宜采集水体样本，目标物种为大型底栖动物时宜采集沉积物样本。水体样本采集按照《环境微生物宏基因组检测 高通量测序法》（GB/T 40226-2021）、《淡水生物环境 DNA 监测技术方法》（DB32/T 4539-2023）的规定执行，结合技术审查会专家建议，使用无菌器材采集 1~3L 不等的水体样本，现场过滤至一定孔径（0.45~5 μ m）的滤膜上。浊度较大的水体样本应先 4℃ 静置再过滤。水体样本最后一次过滤的滤膜置于无菌容器-20℃ 低温保存。或者加入固定剂进行保存，固定剂可为乙醇固定剂，也可以为三羟甲基氨基甲烷盐酸溶液、乙二胺四乙酸溶液、氯化钠溶液、十二烷基硫酸钠、无菌水等多种试剂配制的 Longmire's 固定剂。沉积物样本采集按照《水质 采样技术指导》（HJ 494-2009）、《淡水生物环境 DNA 监测技术方法》（DB32/T 4539-2023）

的规定执行，采集表层沉积物（0~5cm），剔除砾石及大体积生物残体，置于无菌容器中-20℃低温保存。

样本保存和运输期间应严格按《环境微生物宏基因组检测 高通量测序法》（GB/T 40226-2021）要求操作，将环境 DNA 水体样本最后一次过滤的滤膜或剔除大体积生物残体的沉积物样本保存于无菌容器中，立即置于干冰或-80℃进行保存。若不能即刻转移，可暂存于≤4℃条件下（如冰盒），30 分钟内转移至干冰或-80℃保存。保存和运输过程中应避免反复冻融。样本采集和处理间隔不宜超过 24 小时。

6.7 采样点阳性判定

6.7.1 环境 DNA 提取

环境DNA样本采集后，首先按照《环境微生物宏基因组检测 高通量测序法》（GB/T 40226-2021）的要求，借助物理和化学方法充分释放滤膜和沉积物中蕴含的DNA，去除样本中蛋白质、脂类、多糖、RNA等杂质。然后基于《16种鱼类成分定性检测方法实时荧光PCR法》（SN/T 5636-2023）DNA提取方法手工完成环境DNA提取，或者采用等效的商业化DNA提取试剂盒提取样本DNA。最后参照《核酸提取纯化方法评价通则》（GB/T 37874）评价DNA浓度和纯度，要求样本DNA质量浓度不低于1ng/μL，最佳质量浓度范围为10ng/μL~100ng/μL，在260nm和280nm波长处的吸光度值比值（OD_{260nm}/OD_{280nm}）应在1.7~1.9范围内，OD_{260nm}/OD_{230nm}应大于2.0。有效的DNA样本分装为2份，一份在-80℃长期保存用于存档，另一份保存在-20℃用于后续qPCR检测，避免反复冻融。

6.7.2 qPCR 检测

环境DNA提取、分装后，基于同等条件对平行样进行PCR检测。PCR是分子生物学领域功能最强大的技术之一，传统PCR主要对PCR扩增产物进行定量和定性分析，无法准确定量初始目标物种DNA的模板量，无法实时检测扩增反应。qPCR利用荧光信号的变化实时监测扩增反应中每个循环扩增产物量的变化，通过C_q值和标准曲线对初始目标物种DNA模板量进行定量分析。与传统PCR相比，qPCR灵敏度高、特异性强，适合快速检测水域环境中水生动物DNA。

qPCR 检测步骤如下：首先，按照《核酸引物探针质量技术要求》（GB/T 34797）技术要求设计目标物种引物和探针。然后，使用美国国立生物技术信息中心（NCBI）局部相似性基本查询工具（BLAST 工具）比对引物序列与目标基因组和其他非目标物种（如近缘物种）的基因组，确保引物与非目标基因不会有较高的同源性，且不会与基因组中的其他区域（例如同源基因或转录本）发生交叉扩增。之后，进一步通过凝胶电泳法进行特异性验证，记录目标物种特异性引物和探针、反应体系及反应条件。最后，利用目标物种特异性引物和探针对 DNA 进行 qPCR 扩增。每个样本设置 3 个技术重复，获得每个平行样 qPCR 检测的循环数（C_q 值）。

6.7.3 采样点阳性结果判定

分别对比三份技术重复样本与标准溶液的 qPCR 检测结果，基于一定规则判定样本是否为阳性，并进一步确定阳性采样点。具体步骤如下：

首先，依据《野生动物及其制品 DNA 物种 鉴定技术规程》（GB/T 43650）要求提取、纯化目标物种组织 DNA，定量检测 DNA 浓度，制备标准溶液，标准溶液的浓度梯度不少于 5 个。其次，基于标准溶液浓度的对数值与定量 PCR 的循环数（Cq 值）关系绘制标准曲线，以 95% 的检出率为标准置信水平确定目标物种 DNA 的最低检测限 LOD，明确 LOD 所对应的 Cq 值。再次，对技术重复样本完成 qPCR 检测，基于下列规则判定样本是否为阳性：

（1）二份及以上 qPCR 技术重复样本检测 Cq 值均 \leq LOD 对应的 Cq 值，判定该样本阳性，检出目标物种成分。（2）仅一份 qPCR 技术重复样本检测 Cq 值 \leq LOD 对应的 Cq 值，应重新检测该平行样，重新检测后该平行样仍为阳性，判定样本阳性，检出目标物种成分；否则，判定样本阴性，未检出目标物种成分。（3）样本中无阳性技术重复样本，判定该样本阴性，未检出目标物种成分。最后，明确各采样点的阳性样本数，当采样点中存在 2 个及以上阳性样本时，判定采样点为阳性。

6.8 分布评估

依据评估区域阳性采样点数量、位置等信息，基于核密度、反距离加权插值等方法绘制外来入侵水生动物分布图，示例见图 5、图 6，结合目标物种历史分布信息评估外来入侵水生动物空间分布状况。

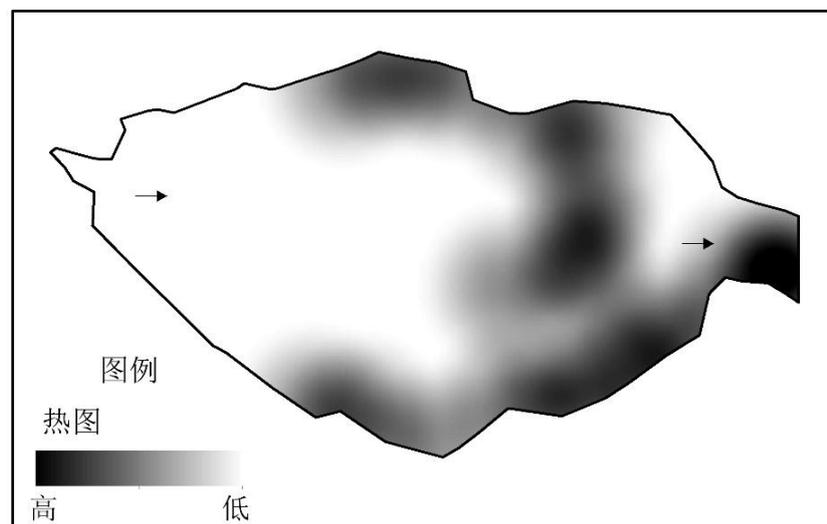


图 5 基于核密度法绘制的内陆湖库外来入侵水生动物分布图

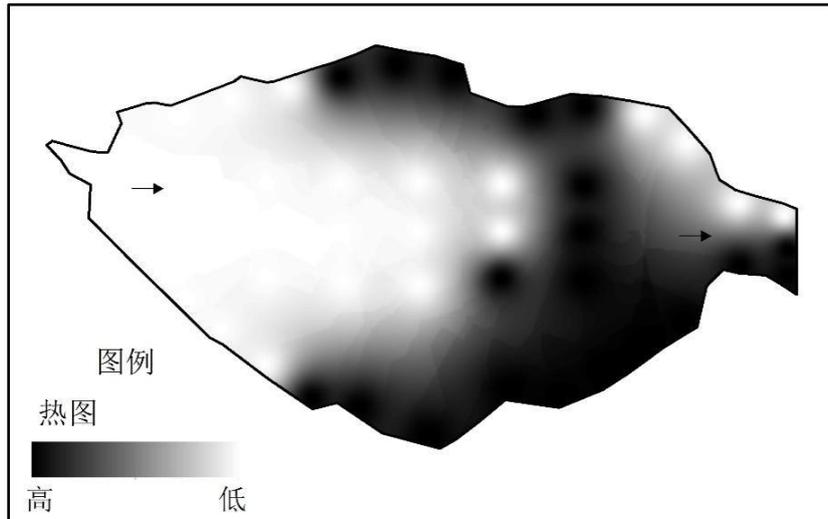


图 6 基于反距离加权插值法绘制的内陆湖库外来入侵水生动物分布图

6.9 质量控制与质量保证

6.9.1 质量控制

在环境 DNA 样本采集阶段，每批样本均设置阴性对照，阴性对照为无菌水。避免样本采集、保存和运输期间的外源污染。

在 qPCR 检测过程中，每批样本检测均设置阳性对照和阴性对照，阳性对照为等体积已知浓度目标物种 DNA，阴性对照为无菌水，阳性对照、阴性对照及样本同步进行 qPCR 扩增，用于排除检测过程中污染造成的假阳性。

每个采样点平行采集 3 个样本，qPCR 扩增过程设置 3 个技术重复。

6.9.2 质量保证

环境 DNA 样本采集工作人员应掌握水生动物野外观测标准及相关知识，严格按照要求完成规定的采样点数、样本数。按照《淡水生物环境 DNA 监测技术方法》（DB32/T 4539）规定，环境 DNA 样本采集前应彻底灭菌设备和装置，保证野外采样和前处理过程无外源污染。环境 DNA 样本检测实验室过程应防止样本污染，定期进行紫外线灭菌处理，定期对各操作室开展环境样本潜在污染 PCR 检测，并做好数据记录和样本保存。

6.10 废弃物处理

废弃物的分类、收集、存放和集中处理应按照《实验室 生物安全通用要求》（GB 19489-2008）和《实验室生物废弃物管理要求》（SN/T 4835-2017）的规定执行，其中生物废弃物在处理之前应采用高压灭菌、消毒或灼烧等方式灭活，对含核酸染料的废液和废胶应单独收集，及时报有资质实验室统一处理，并做好处理记录。

6.11 评估报告编制

本部分对评估报告编制的基本内容提出了要求，要求评估报告包括前言、评估区域概况、

目标物种概述、评估方法和流程、评估结果、对策与建议等内容。规定了评估报告的编写大纲及格式。

6.12 附录

本标准含 11 个附录，包括“主要外来入侵水生动物名单”、“环境 DNA 样本采集前期收集资料清单”、“河流、湖库外来入侵水生动物环境 DNA 采样点布设示意图”、“环境 DNA 固定剂”、“qPCR 检测信息记录表”、“最低检测限确定方法”、“外来入侵水生动物分布图示例”、“基于环境 DNA 的外来入侵水生动物分布评估报告编写格式”等 8 个资料性附录，包括“目标物种引物特异性验证”、“野外质量控制与保证”、“实验室质量控制与保证”等 3 个规范性附录。

7 与国内同类标准的水平对比和分析

国内尚无专门针对外来入侵水生动物环境 DNA 评估技术标准。北京市地方标准《鱼类贝类环境 DNA 识别技术规范》（DB11/T 2023-2022）规定了利用环境 DNA 技术识别地表水域鱼类和贝类的技术要求，江苏省地方标准《淡水生物环境 DNA 监测技术方法》（DB32/T 4539-2023）规定了利用环境 DNA 宏基因组技术监测淡水生物的采样、监测内容、步骤及质量控制与保证，中国环境科学学会发布了系列团体标准《基于环境 DNA 的淡水生物评价技术指南》（T/CSES 82-2023）、《淡水生物监测 环境 DNA 宏条形码法》（T/CSES 81-2023）和《淡水生物 DNA 条形码构建技术规程》（T/CSES 80-2023），规定了淡水生物 DNA 条形码构建方法，环境 DNA 宏条形码法技术监测淡水生物的方法、质量控制与质量保证，以及基于环境 DNA 宏条形码法技术监测数据的淡水生物评价方法。以上标准未针对外来入侵水生动物提出区域分布评估方法，未涉及基于环境 DNA 定量 PCR 检测技术评估区域淡水生物分布的技术要求，本标准的制定是对我国建立健全外来入侵水生物种标准体系的有力补充。

8 标准实施建议

本标准集合了 PCR 快速检测技术、水生生物监测评估方法的优点，有针对性地提出了适合我国内陆河流、湖库的外来入侵水生动物快速检测及分布评估的规定，为全国外来入侵水生动物普查与监测工作提供了技术支撑。因此，建议尽快发布本标准，并开展标准的宣贯工作，规范基于环境 DNA 技术的外来入侵水生动物分布评估工作。

随着 DNA 技术的快速崛起和发展，本标准中的环境 DNA 样本采集和检测方法也可能会随之发生变化。因此，建议在本标准实施过程中，发现问题应及时向生态环境部反馈，以利于本标准的修改完善。