

王桂营, 李宏俊, 邵魁双, 等. 基于环境 DNA 评价鸭绿江口底栖生态质量状况[J]. 海洋学报, 2024, 46(3): 75–88. doi:10.12284/hyxb2024058  
Wang Guiying, Li Hongjun, Shao Kuishuang, et al. Evaluation of benthic ecological quality status in the Yalu River Estuary based on environmental DNA[J]. Haiyang Xuebao, 2024, 46(3): 75–88. doi:10.12284/hyxb2024058

# 基于环境 DNA 评价鸭绿江口底栖生态质量状况

王桂营<sup>1</sup>, 李宏俊<sup>1</sup>, 邵魁双<sup>1</sup>, 刘滨玮<sup>1</sup>, 楚奇<sup>1</sup>, 叶金清<sup>1\*</sup>

(1. 生态环境部国家海洋环境监测中心, 辽宁 大连 116023)

**摘要:** 为研究环境 DNA 鉴定底栖生物评价生态质量状况的应用潜力, 本研究采集 17 份鸭绿江口底栖生物样品, 分别利用环境 DNA 与形态学进行鉴定, 并对所得生态质量评价指数 (AMBI、BENTIX、香浓-维纳  $H'$ 、M-AMBI) 进行比较分析。结果显示: 环境 DNA 鉴定生物隶属于 10 纲 16 目 19 科 20 属 22 种, 形态学鉴定生物隶属于 9 纲 27 目 43 科 55 属 57 种, 共有生物 10 种; 两种鉴定方法得出的 AMBI 指数间 ( $R = 0.428, p = 0.043, y = 0.32x + 1.08$ )、BENTIX 指数间 ( $R = 0.430, p = 0.043, y = 0.28x + 3.59$ ) 存在显著一致性, 而香浓-维纳  $H'$  指数间存在显著差异性; 两种鉴定方法得出的 AMBI 等级间、M-AMBI 等级间相似性较高, 分别为 51.02%、44.90%; 两种鉴定方法得出的 AMBI 与 M-AMBI 等级更符合实际情况, 且评价鸭绿江口整体生态质量状况为良。本研究表明, 基于环境 DNA 鉴定底栖生物评价生态质量状况, 在海洋环境监测调查中具有较高的应用潜力。

**关键词:** 环境 DNA; 底栖生物; 生态质量

中图分类号: Q145<sup>+</sup>.2; P714<sup>+</sup>.4

文献标志码: A

文章编号: 0253-4193(2024)03-0075-14

## 1 引言

海洋生物通过细胞分裂、排泄分泌物、组织器官脱落等方式, 不断将具有自身遗传信息的细胞释放到环境中, 从而形成环境 DNA<sup>[1-2]</sup>。环境 DNA 技术是指从环境中直接提取总 DNA 片段进行检测分析, 可有效反映环境中生存过的生物种类与生物多样性<sup>[3]</sup>。环境 DNA 鉴定具有诸多优势: 省时省力、节约成本、受自然环境因素影响小、拓宽监测调查范围、无需研究者具备较高的分类鉴定能力<sup>[2-6]</sup>。

鸭绿江口位于辽宁省丹东市境内, 是陆海相互作用最强烈的区域之一<sup>[7]</sup>。由于环境污染加剧与海岸线延伸, 使得鸭绿江口附近海域生态系统遭受一定程度的破坏<sup>[8]</sup>。应用生物指数准确评价目前生态质量状况, 是生态系统恢复的重要前提<sup>[9]</sup>。2000 年欧盟组织

颁布的《欧盟水框架指令》, 极大程度上促进了生物指数的发展<sup>[10]</sup>。目前研究使用最广泛的底栖生物指数包含 AMBI 指数、BENTIX 指数、香浓-维纳  $H'$  指数、M-AMBI 指数等<sup>[11-15]</sup>。AMBI 指数已在欧洲、美洲、非洲被广泛应用, 并证实可有效评价河口及近岸海域底栖生态质量状况<sup>[16]</sup>; BENTIX 指数源于 AMBI 指数, 仅减少生态分组数量避免分组有误; 香浓-维纳  $H'$  指数由 Shannon 和 Wiener 提出<sup>[12]</sup>, 主要描述生物群落的生态学特性, 也可监测底栖生物群落结构变化, 被认为是较好的生态质量评价指数<sup>[13]</sup>。M-AMBI 指数是包含 AMBI 指数、香浓-维纳  $H'$  指数、生物种类数量的综合性指数, 被研究者认为可以更加有效地反映人为活动对生态质量的破坏<sup>[17]</sup>。

本研究基于环境 DNA 与形态学鉴定方法, 监测鸭绿江口附近海域生态质量状况。比较分析两种鉴

收稿日期: 2023-09-06; 修订日期: 2024-01-17。

基金项目: 业务化监测项目(鸭绿江口生态综合监测示范)。

作者简介: 王桂营(1994—), 男, 河北省衡水市人, 主要从事生物多样性研究。E-mail: 2761982646@qq.com

\* 通信作者: 叶金清(1986—), 男, 高级工程师, 辽宁省大连市人, 主要从事生物多样性研究。E-mail: jqye@nmemc.orc.cn

定方法得出的生态质量评价指数间的相关性与差异性、生态质量评价等级间的相似性。希望为今后应用环境 DNA 技术监测生态质量状况提供可行思路,进而为生态环境修复、资源合理利用提供重要实验依据。

## 2 材料与方法

### 2.1 研究区域与采样

2020年9月,在鸭绿江口附近海域开展底栖生物调查,设置17个站位定点采样(图1)。环境DNA鉴

定样品采集:每站位使用0.05 m<sup>2</sup>抓斗式采泥器取样2次,深度为表层至5 cm;过滤水分,去除杂质,2次采样均置于50 mL离心管内混合均匀;-20℃冰箱保存运送至实验室,转入-80℃冰箱保存直至环境DNA提取。形态学鉴定样品采集:将环境DNA采集完成后的全部沉积物样品,通过孔径0.5 mm网筛分选底栖生物,并用5%甲醛溶液进行固定保存;实验室内形态鉴定、称重与计数等操作,严格参照《海洋调查规范第6部分:海洋生物调查》(GB/T 12763.6-2007)<sup>[18]</sup>进行。

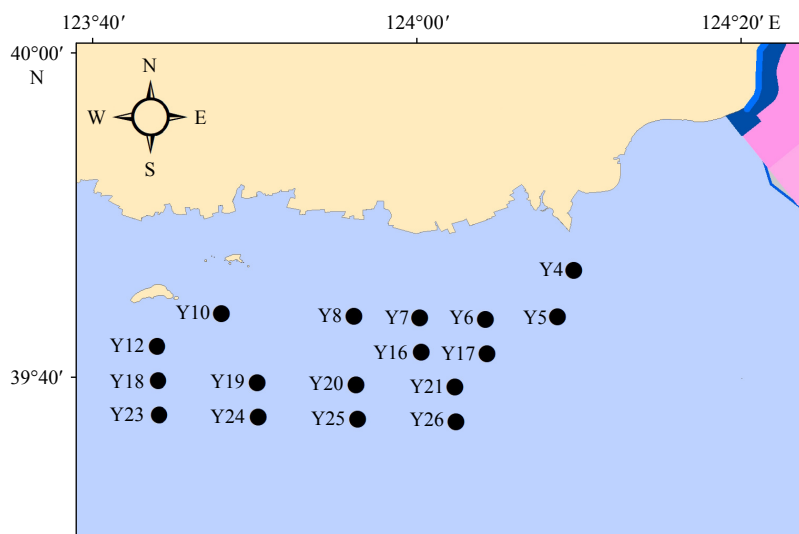


图1 鸭绿江口采样站位分布

Fig. 1 Distribution of sampling stations in the Yalu River Estuary

### 2.2 环境DNA鉴定方法

实验室使用前用紫外线灯处理至少15 min,操作桌面使用5%漂白剂擦拭<sup>[19]</sup>。将-80℃保存的环境DNA沉积物样品取出解冻,使用FastDNA<sup>®</sup> Spin Kit for Soil试剂盒提取沉积物环境DNA<sup>[20]</sup>,提取后的DNA使用NanoDrop 2000进行质量检测。利用底栖生物通用引物(正向引物 mlCOIintF: GGWACWGGWTGAA CWGTWTAYCCYCC;反向引物 jgHCO2198: TANAC YTCNGGRTGNCCRAARAAYCA)扩增COI区域片段<sup>[21]</sup>,该引物已被证实适用于扩增底栖生物,且扩增成功率高于其他通用引物<sup>[21-22]</sup>。PCR反应体系(50 μL)包含DNA模板20 ng(5 μL)、通用引物各1.25 μL、PrimeSTAR Max 25 μL、ddH<sub>2</sub>O 17.5 μL;PCR反应流程为98℃ 3 min、35个PCR循环(98℃ 15 s, 47℃ 30 s, 72℃ 45 s)、72℃ 7 min延伸。将上述获得的产物序列再次扩增,插入测序接口与index序列。扩增产物经2%琼脂糖电泳检测后用Qiagen PCR production purification kit纯化产物,纯化产物经NanoDrop 2000定量后进行样品

间等体积混合。构建好目标文库,使用Illumina Miseq进行测序。

高通量测序下机数据,使用Trimmomatic软件进行质量筛选,使用QIIME软件识别并剔除疑问序列。操作分类单元(Operational Taxonomic Units, OTUs)聚类处理,使用USEARCH序列比对工具,按照97%的相似程度对上述获得序列进行聚类归并和OTUs划分,并选择OTUs组内丰度最高序列作为OTUs代表序列。使用SEED V1.46软件<sup>[23]</sup>,将OTUs代表序列比对到美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)数据库中进行生物注释。比对注释结果只包含序列覆盖率大于85%、相似度大于90%的结果<sup>[24]</sup>。

### 2.3 形态学鉴定方法

实验室内使用体视显微镜对底栖生物样品进行分类鉴定与计数。参考书籍为《中国海洋生物图集》<sup>[25]</sup>、《中国近海多毛环节动物》<sup>[26]</sup>、《大连近海无脊椎动物》<sup>[27]</sup>、《中国动物志(无脊椎动物第四十三卷)》<sup>[28]</sup>、

《胶州湾大型底栖生物鉴定图鉴》<sup>[29]</sup>。

## 2.4 生态质量评价指数及评价标准

### 2.4.1 AMBI 指数与 BENTIX 指数

$$\text{AMBI} = [(0 \times \% \text{G I}) + (1.5 \times \% \text{G II}) + (3 \times \% \text{G III}) + (4.5 \times \% \text{G IV}) + (6 \times \% \text{G V})] \div 100, \quad (1)$$

$$\text{BENTIX} = (6 \times \% \text{GS} + 2 \times \% \text{GT}) \div 100, \quad (2)$$

式中, GS = G I + G II, GT = G III + G IV + G V; %G I 至 %G V 表示 G I 至 G V 类群生物丰度分别占总类群生物丰度的比例乘 100。

根据底栖生物对生态质量状况变化的敏感程度, 将底栖生物分成 5 个生态组<sup>[30]</sup>。G I: 对有机物质或污染物质富集非常敏感; G II: 对有机物质或污染物质富集不敏感; G III: 能够耐受过量有机物质或污染物质富集; G IV: 第二级机会生物(轻度到严重失衡状况下的过渡生物); G V: 第一级机会生物(严重失衡状况下的生物)<sup>[17]</sup>。

### 2.4.2 香浓-维纳 $H'$ 指数

$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \log_2 p_i, \quad (3)$$

式中,  $S$  为生物种类数量;  $p_i$  为物种  $i$  的个体比例, 通过  $N_i/N$  ( $N_i$  是物种  $i$  个体数量,  $N$  是样品个体总数量) 的比值计算<sup>[31]</sup>。

### 2.4.3 M-AMBI 指数

M-AMBI 指数是包含 AMBI 指数、 $H'$  指数、生物种类数量的综合指数。M-AMBI 指数参考基准值确定方法: 等级优参考基准值取 AMBI 指数数据序列最小值 0.024(0.132), 取  $H'$  指数与生物种类数量数据序列最大值 1.598(3.471)、8(14)(括号内为形态学鉴定参考基准值)<sup>[32]</sup>; 等级劣参考基准值均分别为 6、0、0。

### 2.4.4 评价标准值

《欧盟水框架指令》建议生态质量状况评价划分 5 个等级, 因此生态质量评价指数将生态状况划分为 5 个等级: 优(未被污染)、良(轻度污染)、中(中度污染)、差(高度污染)、劣(严重污染), 见表 1。

表 1 生态质量评价指数标准值

生物指数	优	良	中	差	劣	参考文献
AMBI 指数	0~1.2	1.2~3.3	3.3~4.3	4.3~5.5	>5.5	文献[33]
BENTIX 指数	4~6	3~4	2.5~3	2~2.5	0	文献[34]
$H'$ 指数	$\geq 4$	3~4	2~3	1~2	<1	文献[35]
M-AMBI 指数	>0.77	0.53~0.77	0.39~0.53	0.2~0.39	<0.2	-

注:“-”代表 M-AMBI 指数标注值由软件计算得到。

## 2.5 统计分析

采用 AMBI v5.0 软件, 计算 AMBI 指数与 M-AMBI 指数(名录不包含的生物, 采用名录同属生物代替)<sup>[36]</sup>; 采用 BENTIX Add-In v.1.0 软件, 计算 BENTIX 指数<sup>[37]</sup>; 采用 PRIMER 6.0 软件, 计算  $H'$  指数<sup>[38]</sup>; 采用 SPSS17.0 软件, 进行 Pearson 相关性分析; 采用 Origin 软件, 进行系统聚类分析; 采用 Origin 与 R 语言程序软件, 绘制本文图片。

## 3 结果与分析

### 3.1 环境 DNA 与形态学鉴定结果

高通量测序共检测出有效序列 120.5 万条, 其中高质量序列 112.5 万条; 每站位高质量序列在 5.0 万至 8.6 万条之间, 平均 6.6 万条。将高质量序列按照 97% 的相似程度, 进行聚类整合与 OTUs 划分共获得 2 639 个 OTUs, 每站位 OTUs 数在 112~504 之间。从操作分类单元(OTUs)稀释曲线(图 2)得出以 97% 相似程度作为阈值, 测序量足够覆盖大部分生物种类。将获得的 OTUs 代表序列与 NCBI 数据库进行比对, 其中 22 个 OTUs 注释为底栖生物, 底栖生物注释率(注释为底栖生物 OTUs 数量/总 OTUs 数量)在 0.95%~4.73% 之间, 见表 2。

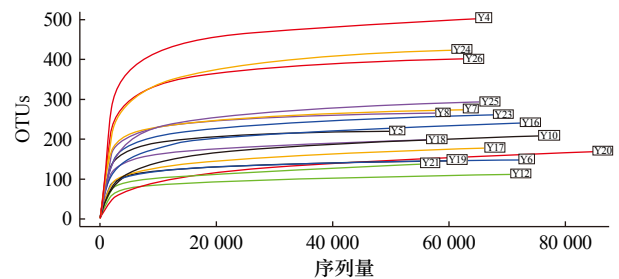


图 2 OTUs 随序列量的稀释曲线

Fig. 2 Dilution curve of OTUs with sequence size

表 2 底栖生物注释率结果统计

Table 2 Statistics of benthic annotation rate results

站位	Y4	Y5	Y6	Y7	Y8	Y10	Y12	Y16	Y17
注释率/%	1.39	1.36	4.73	2.55	2.26	2.39	3.57	3.32	3.93
站位	Y18	Y19	Y20	Y21	Y23	Y24	Y25	Y26	
注释率/%	3.03	2.05	2.37	3.62	1.53	0.95	2.38	1.00	

环境 DNA 鉴定底栖生物隶属于 10 纲 16 目 19 科 20 属 22 种, 每站位生物种类数量在 3~8 个之间, 并将每个站位生物相对丰度百分比进行统计绘图(图 3)。形态学鉴定底栖生物隶属于 9 纲 27 目 43 科 55 属 57 种, 每个站位生物种类数量在 2~14 个之间, 并将每站位生物相对丰度百分比进行统计绘图(图 4), 两种

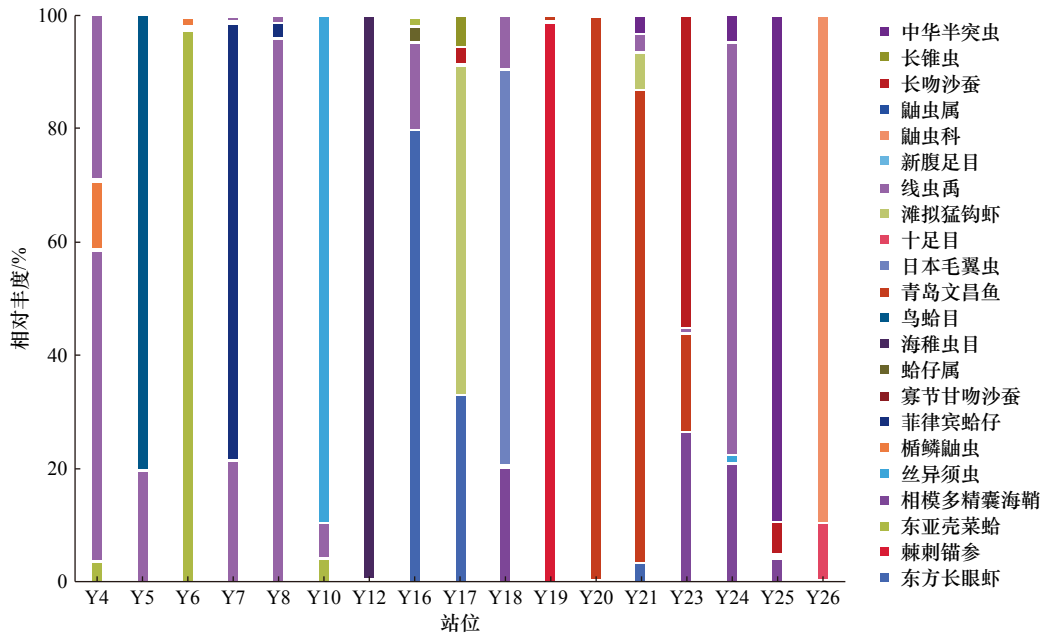


图3 环境 DNA 鉴定底栖生物相对丰度

Fig. 3 Environmental DNA identification of the relative abundance of benthic organisms

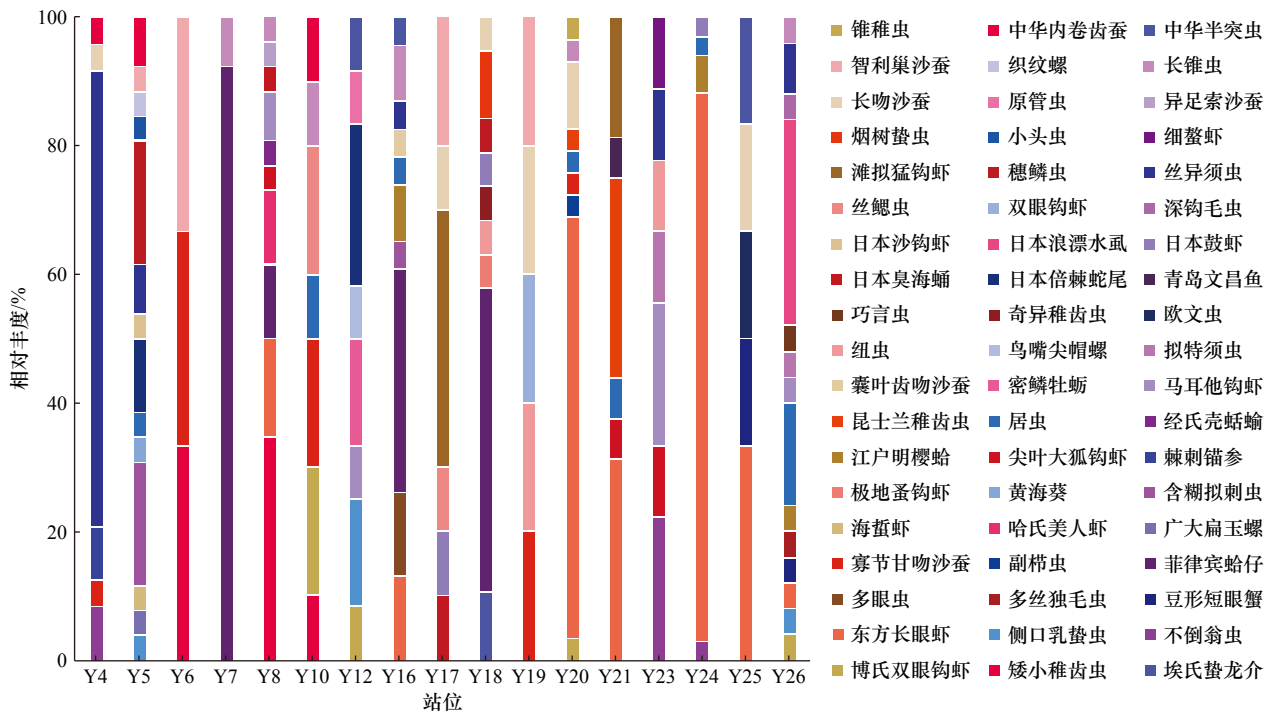


图4 形态学鉴定底栖生物相对丰度

Fig. 4 Morphological identification of the relative abundance of benthic organism

鉴定方法共有生物 10 种(表 A1)。

环境 DNA 与形态学鉴定结果差别较大,主要是由基因数据库不完善和监测技术本身性质造成的。基因数据库不完善致使大量 OTUs 未被注释,导致环境 DNA 鉴定生物种类较少。环境 DNA 技术监测某一区域(范围)内的生物种类,而形态学监测某一点的生物种类,二者具有本质上的区别,从而导致每个站

位间环境 DNA 鉴定生物种类具有较高重合性。

### 3.2 生态质量评价指数比较分析

本研究均选取 OTUs 注释为底栖生物的数据进行指数计算,这是因为 AMBI 指数、BENTIX 指数、M-AMBI 指数本身性质均是建立在底栖生物类群上进行计算的。根据上述软件计算生态质量评价指数,并将计算结果进行统计(表 A2)。

9个站位 AMBI1 指数高于 AMBI2 指数、7个站位 BENTIX1 指数高于 BENTIX2 指数、3个站位  $H'1$  指数高于  $H'2$  指数、9个站位 M-AMBI1 指数高于 M-AMBI2 指数(图 5)。AMBI1 与 AMBI2 指数存在显著一致性(Pearson 单侧:  $R = 0.428, p = 0.043, y = 0.32x + 1.08$ )、BENTIX1 与 BENTIX2 指数存在显著一致性(Pearson 单侧:  $R = 0.430, p = 0.043, y = 0.28x + 3.59$ ) (图 6),  $H'1$  与  $H'2$  指数存在显著差异性(Friedman:  $\chi^2 = 7.118, p < 0.05$ )。AMBI1 与 BENTIX1、AMBI2 指数存在显著相关性; BENTIX1 与 AMBI2、BENTIX2 指数存在显著相关性;  $H'1$  与 M-AMBI1 指数存在显著相关性; AMBI2 与 BENTIX2 指数存在显著相关性; BENTIX2 与 M-AMBI2 指数存在显著相关性;  $H'2$  与 M-AMBI2 指数存在显著相关性(图 7)。

### 3.3 生态质量评价等级比较分析

根据生态质量评价指数标准值, 将计算所得评价指数划分为优(1)、良(2)、中(3)、差(4)、劣(5)5个等级(1~5为等级代替值), 并将等级结果进行统计(表 A2)。

58.82%的站位 AMBI1 与 AMBI2 等级相同、41.18%的站位 BENTIX1 与 BENTIX2 等级相同、11.76%的站位  $H'1$  与  $H'2$  等级相同、52.94%的站位 M-AMBI1 与 M-AMBI2 等级相同(图 8)。AMBI1 与

AMBI2 等级百分比最为相近, M-AMBI1 与 M-AMBI2 等级百分比相近程度次之(图 9)。将全部评价等级进行聚类分析, 结果显示站位间相似性较低, 选取 40% 相似性为分组标准, 站位可划分为 5 类; 将环境 DNA 鉴定评价等级进行聚类分析, 结果显示站位间相似性较低, 选取 40% 相似性为分组标准, 站位可划分为 7 类; 将形态学鉴定评价等级进行聚类分析, 结果显示站位间相似性较低, 选取 40% 相似性为分组标准, 站位可划分为 5 类(图 10)。将不同评价等级进行聚类分析, 结果显示评价等级间相似性较低, 选取 40% 相似性为分组标准, 评价等级可划分为 6 类, AMBI1 与 AMBI2(51.02%)、M-AMBI1 与 M-AMBI2(44.90%)、BENTIX1、BENTIX2、 $H'1$ 、 $H'2$ (图 10)。

根据各评价等级均值以及分组情况: AMBI1 与 AMBI2、M-AMBI1 与 M-AMBI2 评价鸭绿江口整体生态质量状况为良, 比较符合实际生态质量状况; BENTIX1、 $H'1$ 、 $H'2$  评价鸭绿江口生态质量状况受污染程度偏高, 而 BENTIX2 评价偏低, 比较不符合实际生态质量状况。

## 4 讨论

本次研究 58.36% 的 OTUs 未被注释, 高于以往研

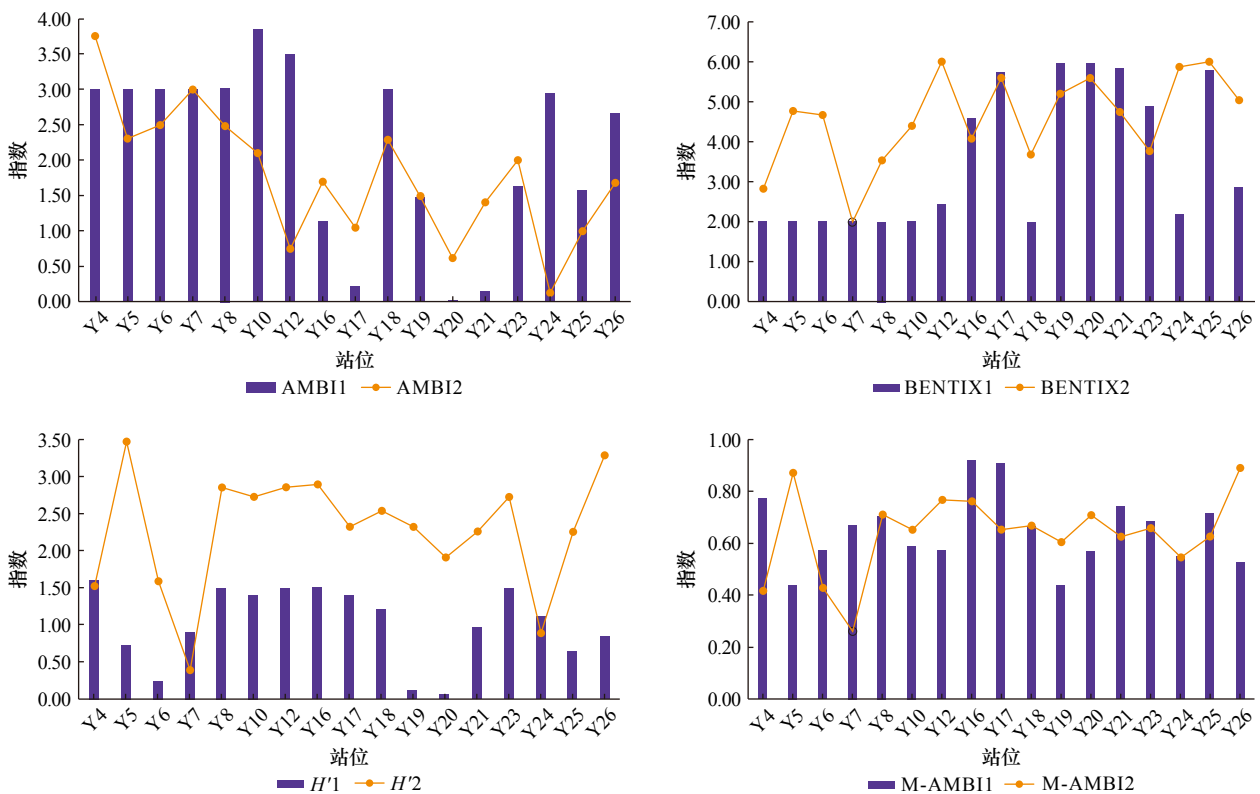


图 5 生态质量评价指数

Fig. 5 Ecological quality assessment index

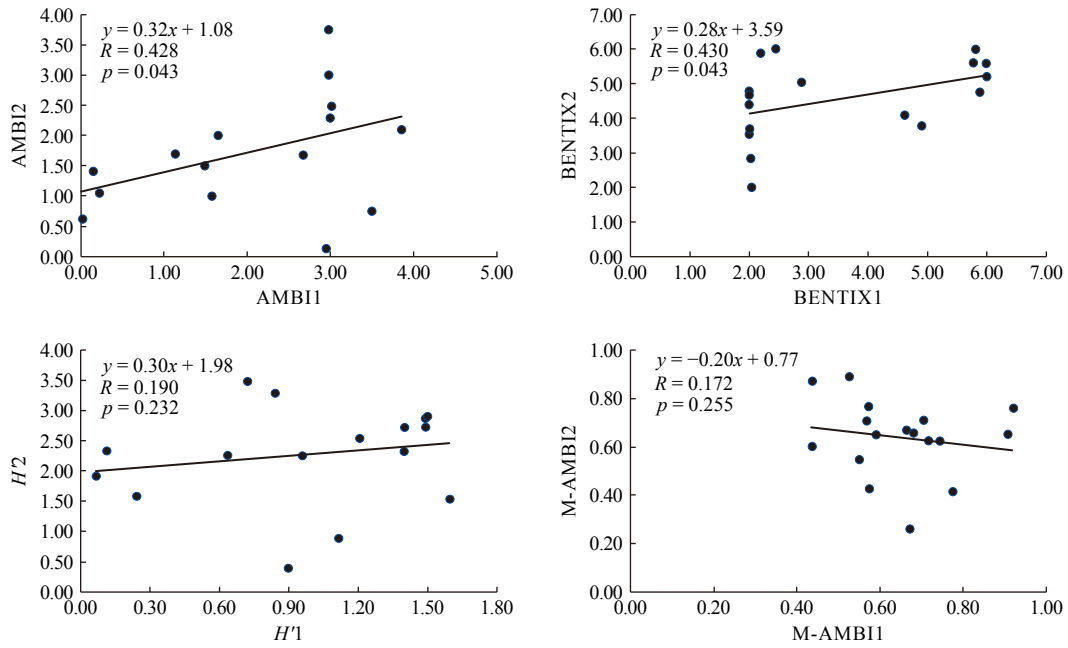


图 6 生态质量评价指数拟合  
Fig. 6 Ecological quality assessment index fitting

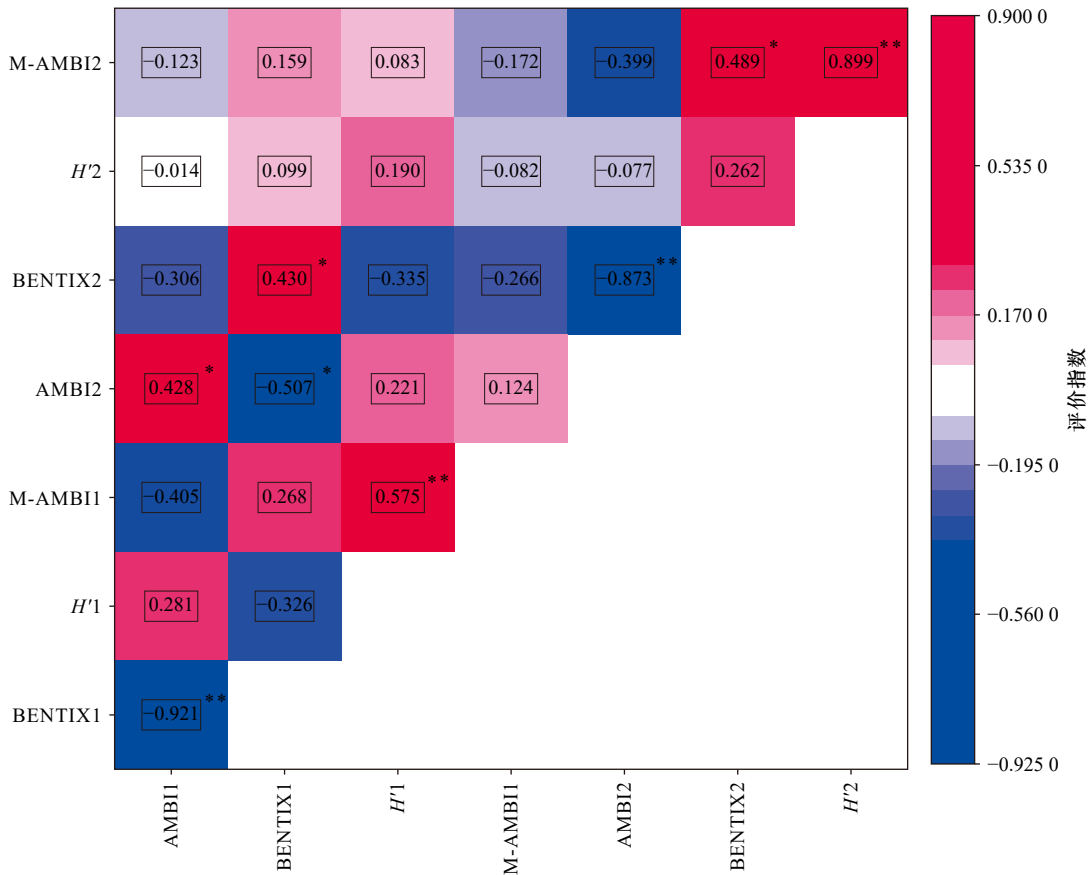


图 7 生态质量评价指数 Pearson 相关性热图  
Fig. 7 Heat map of Pearson correlation of ecological quality assessment index

\*\*表示  $p < 0.01$ , \*表示  $p < 0.05$   
\*\* Indicates  $p < 0.01$ , \* indicates  $p < 0.05$

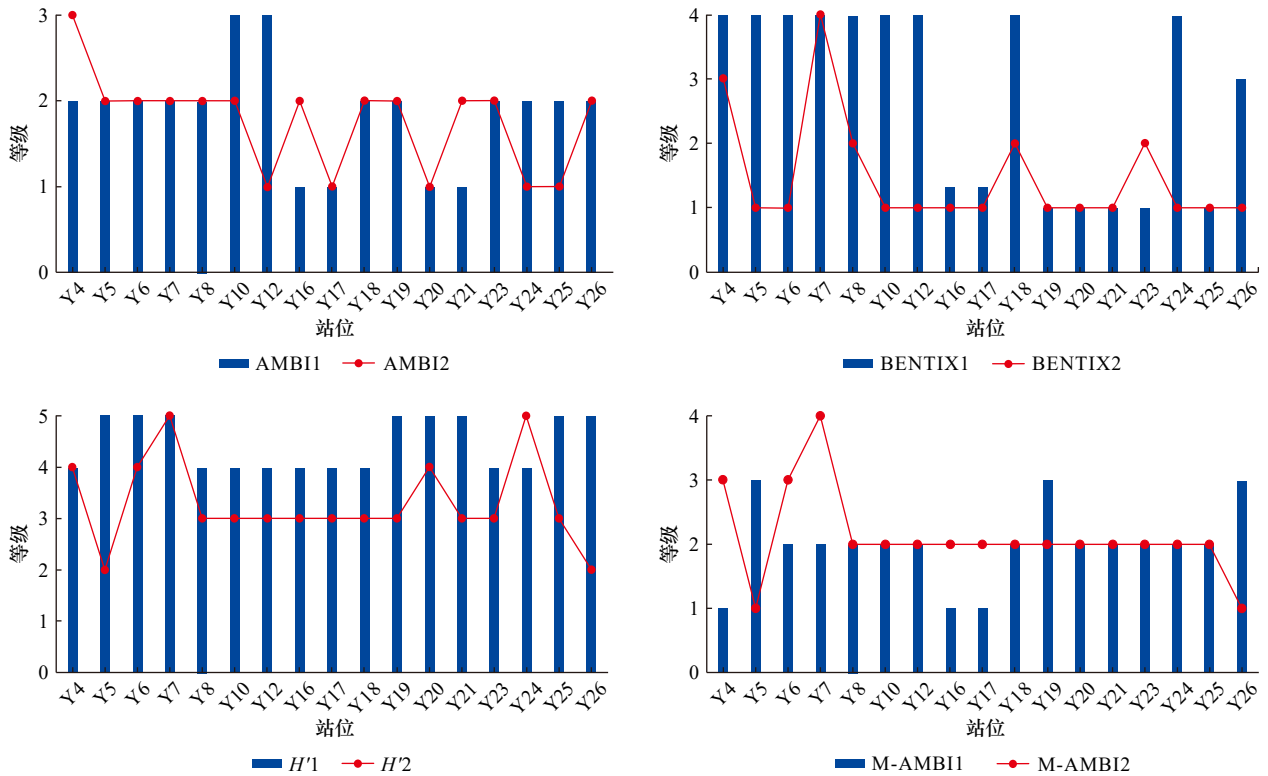


图 8 生态质量评价等级

Fig. 8 Ecological quality assessment level

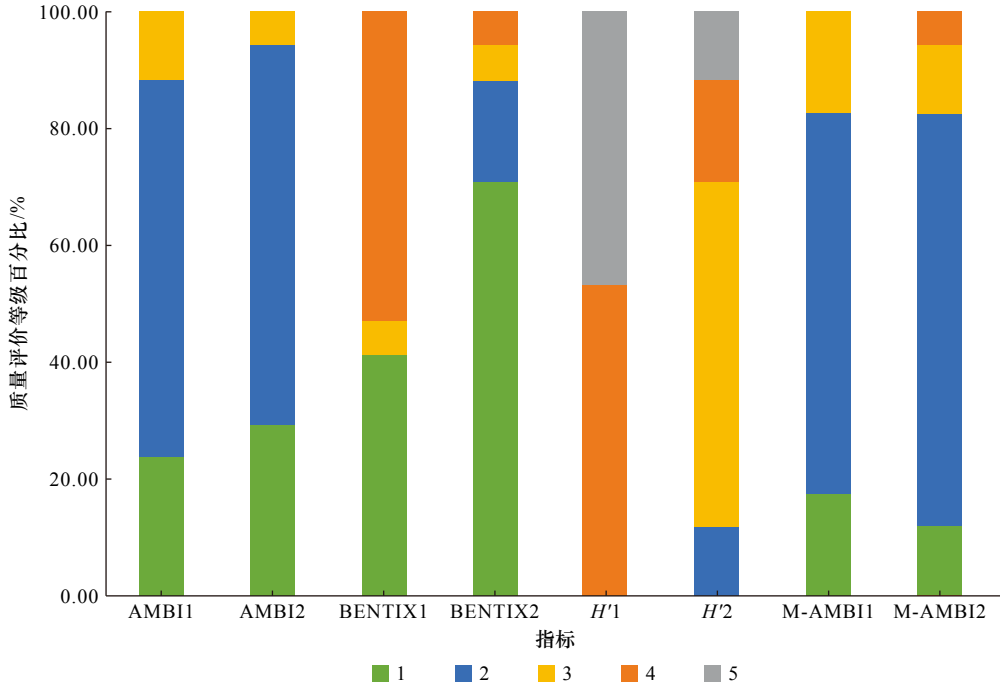


图 9 生态质量评价等级百分比

Fig. 9 Percentage of ecological quality assessment level

究未注释率 35.60%<sup>[39]</sup>。导致 OTUs 注释率偏低的原因主要有: 鸭绿江口海域受人为干扰与陆源性生物影响较大, 并且尚未找到适用于所有底栖生物的通用引物<sup>[40]</sup>; 鸭绿江口海域尚未建立底栖生物基因数据库,

致使大量 OTUs 无法被成功注释; 全球海洋生物调查显示我国未命名海洋生物占比较高, 并且鸭绿江口监测到的底栖生物种类数量偏低, 致使基因数据库所含该海域底栖生物基因数量较少<sup>[41-43]</sup>。

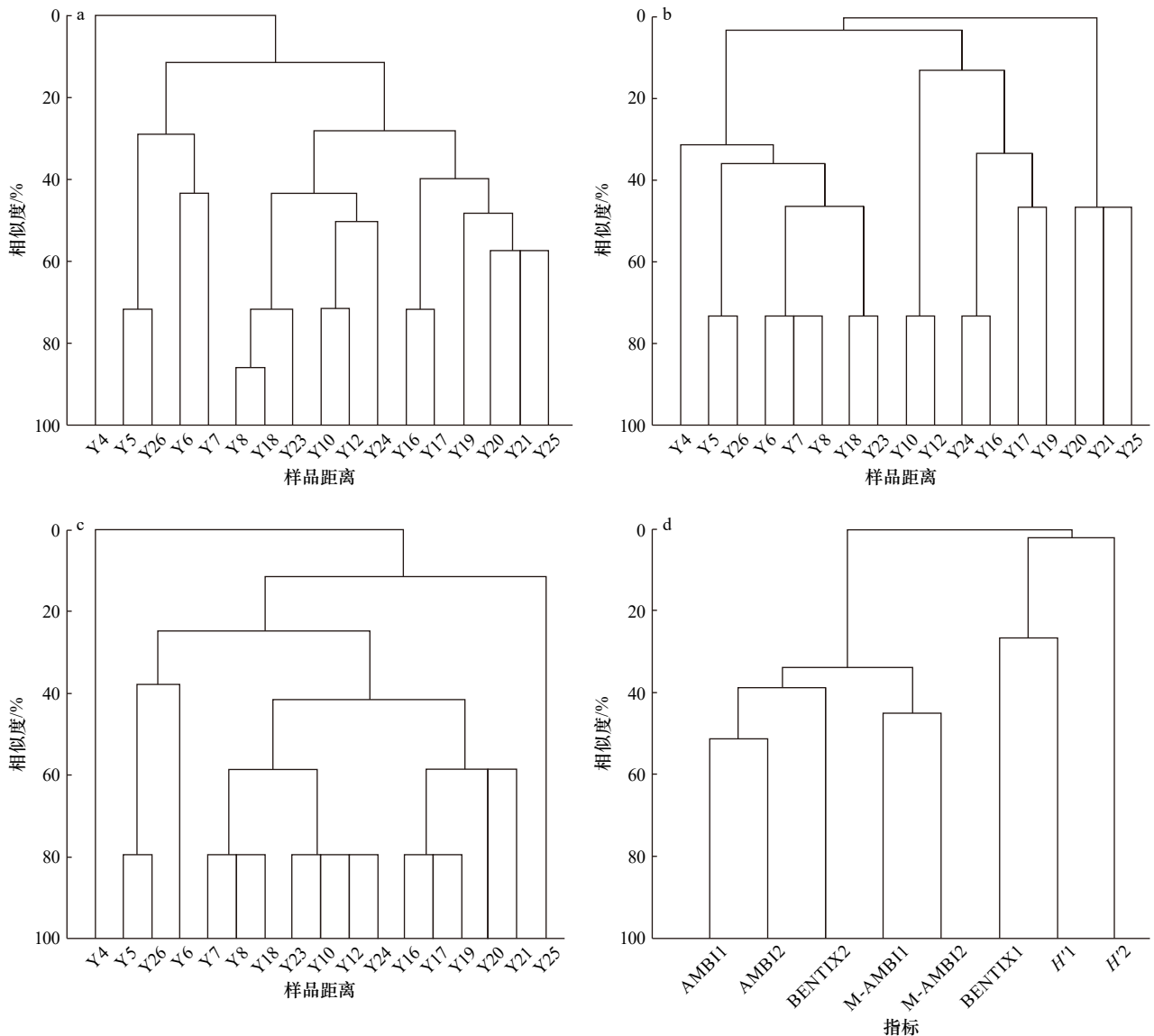


图 10 生态质量评价等级聚类树状图

Fig. 10 Clustered dendrogram of ecological quality assessment levels

a. 全部等级站位聚类; b. 环境 DNA 等级站位聚类; c. 形态学等级站位聚类; d. 全部等级聚类

a. All rank station clustering; b. environmental DNA rank station clustering; c. morphology rank station clustering; d. all rank clustering

环境 DNA 鉴定优势物种为青岛文昌鱼 (*Branchiostoma belcheri*)、丝异须虫 (*Heteromastus filiformis*)、相模多精囊海鞘 (*Perophora sagamiensis*)；形态学鉴定优势物种为东方长眼虾 (*Ogyrides orientalis*)、菲律宾蛤仔 (*Ruditapes philippinarum*)、丝异须虫 (*Heteromastus filiformis*)。环境 DNA 鉴定生物种类数量波动性较小，且空间上未发现明显的变化趋势；形态学鉴定生物种类数量波动性较大，且空间上随着远离海岸线波动性逐渐减缓。环境 DNA 与形态学鉴定得出的 AMBI 指数、BENTIX 指数、M-AMBI 指数评价生态质量状况的大致变化趋势均为随着空间远离海岸线生态质量逐渐改善；环境 DNA 鉴定得出的  $H'$  指数在空间上

未发现明显的变化趋势，而形态学鉴定得出的  $H'$  指数随着空间远离海岸线存在上升趋势并逐渐稳定。

根据以往研究：鸭绿江口附近海域底栖生态质量状况和沉积物重金属污染状况均有所改善，潜在生态风险总体属于低风险等级<sup>[44-45]</sup>。本次研究 AMBI 指数和 M-AMBI 指数评价鸭绿江口整体生态质量状况为良，比较符合实际生态质量状况；而底栖生物多样性指数普遍偏低。研究表明，调查区域内底栖生物的生存环境良好，仅人为活动作业（拖网作业）影响底栖生物种类数量与个体数量，从而降低底栖生态系统稳定性。建议渔业监管部门明确规定拖网使用权限，尽量减少网囊部对海底的扰动，具体方法如下：明确规定使用

拖网的最浅水深; 尽量减少近岸海域拖网频率; 网型管控减少拖曳距离、减少网板重量、减少网衣长度。

AMBI 指数和 BENTIX 指数主要评价底栖生物生存环境的质量状况, 无法区分人为环境压力与自然环境压力;  $H$  指数主要评价底栖生物群落多样性的质量状况, 无法区分人为活动干扰与生存环境干扰; M-AMBI 指数为综合性指数, 将生存环境质量状况、群落多样性质量状况以及种类数量相结合, 更能够有效反映实

际的生态质量状况。环境 DNA 和形态学鉴定得出的 AMBI 指数、M-AMBI 指数评价生态质量更符合实际情况, 且评价鸭绿江口整体生态质量状况为良。

环境 DNA 技术将会与机器学习、遥感、云服务、人工智能等新型科技相结合, 共同监测生态系统变化与质量状态。将多种新型科技相结合不仅可提供新颖的数据获取方式, 还可提供多方面、多层次的生态系统动态变化信息。

## 参考文献:

- [1] 吴昉晟, 唐永凯, 李建林, 等. 水生生物环境 DNA 检测技术及其应用 [J]. *水产学杂志*, 2018, 31(4): 48–52, 58. Wu Yunsheng, Tang Yongkai, Li Jianlin, et al. Detection technology and application of aquatic environmental DNA[J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2018, 31(4): 48–52, 58.
- [2] 卢珊. 常见水生动物与其环境 DNA 的定性定量关系 [D]. 南京: 南京师范大学, 2015. Lu Shan. Qualitative and quantitative relationship between common aquatic animals and their environmental DNA[D]. Nanjing: Nanjing Normal University, 2015.
- [3] 刘科均, 赖锡勋, 向劲, 等. 环境 DNA 技术在水域环境中的应用进展 [J]. *水产养殖*, 2023, 44(11): 16–21, 27. Liu Kejun, Lai Xixun, Xiang Jin, et al. Progress in the application of environmental DNA technology in aquatic environment study[J]. *Journal of Aquaculture*, 2023, 44(11): 16–21, 27.
- [4] 陈炼, 吴琳, 刘燕, 等. 环境 DNA metabarcoding 及其在生态学中的应用 [J]. *生态学报*, 2016, 36(15): 4573–4582. Chen Lian, Wu Lin, Liu Yan, et al. Application of environmental DNA metabarcoding in ecology[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2016, 36(15): 4573–4582.
- [5] 肖泽华, 董姗姗, 张振华, 等. 环境 DNA 在两栖动物监测中的应用研究进展 [J]. *生态学报*, 2023, 43(19): 7861–7873. Xiao Zehua, Dong Shanshan, Zhang Zhenhua, et al. Advances in the application of environmental DNA in amphibians monitoring[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2023, 43(19): 7861–7873.
- [6] 李飞龙, 杨江华, 杨雅楠, 等. 环境 DNA 宏条形码监测水生生态系统变化与健康状态 [J]. *中国环境监测*, 2018, 34(6): 37–46. Li Feilong, Yang Jianghua, Yang Ya'nian, et al. Using environmental DNA metabarcoding to monitor the changes and health status of aquatic ecosystems[J]. *Environmental Monitoring in China*, 2018, 34(6): 37–46.
- [7] 许秀娥, 毛誉洁, 宋吉尧, 等. 鸭绿江口湿地生态系统现状调查分析及对策研究 [J]. *海洋湖沼通报*, 2022, 44(5): 162–168. Xu Xiu'e, Mao Yujie, Song Jiyao, et al. Present situation investigation and countermeasures analysis of wetland ecosystem in Yalu River Estuary[J]. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2022, 44(5): 162–168.
- [8] 王桂营. 利用环境 DNA 分析鸭绿江口底栖生物多样性 [D]. 大连: 大连海洋大学, 2022. Wang Guiying. Analysis of benthic biodiversity in the Yalu River Estuary using environmental DNA[D]. Dalian: Dalian Ocean University, 2022.
- [9] 林和山, 俞炜炜, 刘坤, 等. 基于 AMBI 和 M-AMBI 法的底栖生态环境质量评价——以厦门五缘湾海域为例 [J]. *海洋学报*, 2015, 37(8): 76–87. Lin Heshan, Yu Weiwei, Liu Kun, et al. Assessing benthic ecological status in stressed Wuyuan Bay (Xiamen China) using AMBI and M-AMBI[J]. *Haiyang Xuebao*, 2015, 37(8): 76–87.
- [10] Simboura N, Argyrou M. An insight into the performance of benthic classification indices tested in Eastern Mediterranean coastal waters[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2010, 60(5): 701–709.
- [11] 刘旭东, 王振钟, 汪进生, 等. 基于多指数分析确定胶州湾底栖生态状况的参考条件 [J]. *海洋环境科学*, 2023, 42(4): 597–603. Liu Xudong, Wang Zhenzhong, Wang Jinsheng, et al. Multi-indices analysis to find out benthic ecological reference conditions of Jiaozhou Bay[J]. *Marine Environmental Science*, 2023, 42(4): 597–603.
- [12] 杨颖, 刘鹏霞, 周红宏, 等. 近 15 年长江口海域海洋生物变化趋势及健康状况评价 [J]. *生态学报*, 2020, 40(24): 8892–8904. Yang Ying, Liu Pengxia, Zhou Honghong, et al. Evaluation of the biodiversity variation and ecosystem health assessment in Changjiang Estuary during the past 15 years[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2020, 40(24): 8892–8904.
- [13] 于海燕, 李新正, 李宝泉, 等. 胶州湾大型底栖动物生物多样性现状 [J]. *生态学报*, 2006, 26(2): 416–422. Yu Haiyan, Li Xinzheng, Li Baoquan, et al. The species diversity of macrobenthic fauna in Jiaozhou Bay[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2006, 26(2): 416–422.
- [14] 彭广海, 付婧, 马增岭, 等. 基于 3 种生物指数的三沙湾养殖活动底栖环境效应研究 [J]. *海洋学报*, 2018, 40(4): 106–117. Peng Guanghai, Fu Jing, Ma Zengling, et al. Effects of mariculture activities on benthic environment based on analysis of three biotic indices in Sansha Bay[J]. *Haiyang Xuebao*, 2018, 40(4): 106–117.
- [15] 蔡文倩, 周娟, 林岩璇, 等. 基于底栖生物指数的辽东湾生态质量状况评价 [J]. *海洋科学*, 2016, 40(10): 105–112. Cai Wenqian, Zhou Juan, Lin Kuixuan, et al. Ecological quality status of Liaodong Bay using benthic indices[J]. *Marine Sciences*, 2016,

- 40(10): 105–112.
- [16] 蔡文倩, 刘录三, 孟伟, 等. AMBI 方法评价环渤海潮间带底栖生态质量的适用性 [J]. 环境科学学报, 2012, 32(4): 992–1000.  
Cai Wenqian, Liu Lusan, Meng Wei, et al. The suitability of AMBI to benthic quality assessment on the intertidal zones of Bohai Sea[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2012, 32(4): 992–1000.
- [17] 王桂营, 李宏俊, 孙艺, 等. 利用不同生物指数评价辽河口底栖生态质量适用性 [J]. 安徽农业科学, 2021, 49(18): 87–93, 104.  
Wang Guiying, Li Hongjun, Sun Yi, et al. Applicability of evaluation of benthic ecological quality of Liaohe Estuary by using different biological indexes[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2021, 49(18): 87–93, 104.
- [18] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 海洋调查规范: 第 6 部分 海洋生物调查: GB/T 12763.6–2007[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.  
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration. Specifications for oceanographic survey: Part 6 marine biological survey: GB/T 12763.6–2007[S]. Beijing: Standards Press of China, 2008.
- [19] Clark D E, Pilditch C A, Pearman J K, et al. Environmental DNA metabarcoding reveals estuarine benthic community response to nutrient enrichment—Evidence from an *in-situ* experiment[J]. *Environmental Pollution*, 2020, 267: 115472.
- [20] Dineen S M, Aranda R, Anders D L, et al. An evaluation of commercial DNA extraction kits for the isolation of bacterial spore DNA from soil[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 109(6): 1886–1896.
- [21] Leray M, Yang J Y, Meyer C P, et al. 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[J]. *Frontiers in Zoology*, 2013, 10: 34.
- [22] Geller J, Meyer C, Parker M, et al. Redesign of PCR primers for mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I for marine invertebrates and application in all-taxa biotic surveys[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2013, 13(5): 851–861.
- [23] Větrovský T, Baldrian P. The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses[J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e57923.
- [24] Zhan A B, Hulák M, Sylvester F, et al. High sensitivity of 454 pyrosequencing for detection of rare species in aquatic communities[J]. *Methods in Ecology and Evolution*, 2013, 4(6): 558–565.
- [25] 黄宗国, 林茂. 中国海洋生物图集 [M]. 北京: 海洋出版社, 2012: 1–317.  
Huang Zongguo, Lin Mao. An Illustrated Guide to Species in China's Seas[M]. Beijing: China Ocean Press, 2012: 1–317.
- [26] 杨德渐, 孙瑞平. 中国近海多毛环节动物 [M]. 北京: 农业出版社, 1988: 1–352.  
Yang Dejian, Sun Ruiping. Polychaeta in China's Nearshore Waters[M]. Beijing: China Agriculture Press, 1988: 1–352.
- [27] 曹善茂. 大连近海无脊椎动物 [M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 2017: 1–334.  
Cao Shanmao. Invertebrates in Dalian Nearshore Waters[M]. Shenyang: Liaoning Science and Technology Publishing House, 2017: 1–334.
- [28] 任先秋. 中国动物志 无脊椎动物 第四十三卷 [M]. 北京: 科学出版社, 2012: 1–651.  
Ren Xianqiu. Fauna Sinica: Invertebrata: Vol. 43 [M]. Beijing: Science Press, 2012: 1–651.
- [29] 李新正, 王洪法. 胶州湾大型底栖生物鉴定图谱 [M]. 北京: 科学出版社, 2016: 1–365.  
Li Xinzheng, Wang Hongfa. Identification Atlas of Macro Benthos in Jiaozhou Bay[M]. Beijing: Science Press, 2016: 1–365.
- [30] Mulik J, Sukumaran S, Dias H Q. Is the benthic index AMBI impervious to seasonality and data transformations while evaluating the ecological status of an anthropized monsoonal estuary?[J]. *Ocean & Coastal Management*, 2020, 186: 105080.
- [31] 陈怡卉, 汪振华, 章守宇, 等. 大陈岛礁海域甲壳类生物多样性特征 [J]. 生态学报, 2023, 43(23): 9630–9642.  
Chen Yihui, Wang Zhenhua, Zhang Shouyu, et al. Research on multiple dimensions of crustacean diversity in the sea area around Dachen Islands[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2023, 43(23): 9630–9642.
- [32] Dauvin J C, Ruellet T. Polychaete/amphipod ratio revisited[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2007, 55(1/6): 215–224.
- [33] Blanchet H, Lavesque N, Ruellet T, et al. Use of Biotic Indices in semi-enclosed coastal ecosystems and transitional waters habitats—Implications for the implementation of the European Water Framework Directive[J]. *Ecological Indicators*, 2008, 8(4): 360–372.
- [34] Chainho P, Costa J L, Chaves M L, et al. Influence of seasonal variability in benthic invertebrate community structure on the use of biotic indices to assess the ecological status of a Portuguese Estuary[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2007, 54(10): 1586–1597.
- [35] Medeiros J P, Chaves M L, Silva G, et al. Benthic condition in low salinity areas of the Mira Estuary (Portugal): lessons learnt from freshwater and marine assessment tools[J]. *Ecological Indicators*, 2012, 19: 79–88.
- [36] Paganelli D, Forni G, Marchini A, et al. Critical appraisal on the identification of Reference Conditions for the evaluation of ecological quality status along the Emilia-Romagna Coast (Italy) using M-AMBI[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2011, 62(8): 1725–1735.
- [37] Mulik J, Sukumaran S, Srinivas T, et al. Comparative efficacy of benthic biotic indices in assessing the Ecological Quality Status (Eco-QS) of the stressed Ulhas Estuary, India[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2017, 120(1/2): 192–202.
- [38] Clarke K R, Gorley R N. Primer E-v5: user manual/tutorial[R]. Plymouth: PRIMER-E Limited, 2001: 1–3.
- [39] Leray M, Knowlton N. DNA barcoding and metabarcoding of standardized samples reveal patterns of marine benthic diversity[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(7): 2076–2081.
- [40] 高养春, 李海涛, 王孝程, 等. 利用宏 DNA 条形码研究浮游动物多样性——以鸭绿江口为例 [J]. 生态学报, 2020, 40(11): 3822–3832.  
Gao Yangchun, Li Haitao, Wang Xiaocheng, et al. Research on zooplankton diversity using DNA-based metabarcoding technique: a case

- study in the Yalujiang Estuary[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2020, 40(11): 3822–3832.
- [41] Appeltans W, Ahyong S T, Anderson G, et al. The magnitude of global marine species diversity[J]. *Current Biology*, 2012, 22(23): 2189–2202.
- [42] Mora C, Tittensor D P, Adl S, et al. How many species are there on earth and in the ocean?[J]. *PLoS Biology*, 2011, 9(8): e1001127.
- [43] 刘卫霞. 北黄海夏、冬两季大型底栖生物生态学研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2009.  
Liu Weixia. Study on the ecology of macrobenthos in North Yellow Sea in summer and winter[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2009.
- [44] 程岩, 刘月, 李富祥, 等. 鸭绿江口及毗邻浅海沉积物重金属富集特征与潜在生态风险比较 [J]. *环境科学研究*, 2011, 24(5): 516–525.  
Cheng Yan, Liu Yue, Li Fuxiang, et al. Comparative study of enrichment features and potential ecological risks of heavy metals in sediments of the Yalu River Estuary and its adjacent shallow sea area[J]. *Research of Environmental Sciences*, 2011, 24(5): 516–525.
- [45] 李红军, 程岩, 杜益晓, 等. 鸭绿江口生源要素的垂直分布及对环境变化的响应 [J]. *环境化学*, 2022, 41(12): 4068–4076.  
Li Hongjun, Cheng Yan, Du Yixiao, et al. Vertical distribution of the biogenic elements and their response to the environmental change in the Yalu River Estuary[J]. *Environmental Chemistry*, 2022, 41(12): 4068–4076.

## 附录

表 A1 鸭绿江口底栖生物名录  
Table A1 List of benthic organisms at the Yalu River Estuary

种名	拉丁名	环境DNA鉴定	形态学鉴定
埃氏蛭龙介	<i>Terebella ehrenbergi</i>		*
矮小稚齿虫	<i>Prionospio pygmaea</i>		*
博氏双眼钩虾	<i>Ampelisca bochi</i>		*
不倒翁虫	<i>Sternaspis sculata</i>		*
侧口乳蛭虫	<i>Thelepus plagiostoma</i>		*
东方长眼虾	<i>Ogyrides orientalis</i>	*	*
东亚壳菜蛤	<i>Musculista senhausia</i>	*	
豆形短眼蟹	<i>Xenophthalmus pinnotheroides</i>		*
栉鳞鲎虫	<i>Heterolepidoderma</i>	*	
多丝独毛虫	<i>Tharyx multifilis</i>		*
多眼虫	<i>Polyophthalmus pictus</i>		*
菲律宾蛤仔	<i>Ruditapes philippinarum</i>	*	*
副栉虫	<i>Paramphicteis angustifolia</i>		*
寡节甘吻沙蚕	<i>Glycinde gurjanovae</i>	*	*
广大扁玉螺	<i>Natica ampla</i>		*
哈氏美人虾	<i>Callinassa harmandi</i>		*
蛤仔属	<i>Ruditapes sp.</i>	*	
海蜚虾	<i>Latreutes anoplonyx</i>		*
海稚虫目	Spionida	*	
含糊拟刺虫	<i>Linopherus ambigua</i>		*
黄海葵	<i>Anthopleura xanthogrammia</i>		*
极地蚤钩虾	<i>Pontocrates altamarimus</i>		*
棘刺锚参	<i>Protankyra bidentata</i>	*	*

续表 A1

种名	拉丁名	环境DNA鉴定	形态学鉴定
尖叶大狐钩虾	<i>Grandifoxus cuspis</i>		*
江户明樱蛤	<i>Moerella jedoensis</i>		*
经氏壳蛞蝓	<i>Philine kinglipini</i>		*
居虫属	<i>Naineris</i> sp.		*
昆士兰稚齿虫	<i>Prionospio queenslandica</i>		*
马尔他钩虾属	<i>Melita</i> sp.		*
密鳞牡蛎	<i>Ostrea denselamellosa</i>		*
囊叶齿吻沙蚕	<i>Nephtys caeca</i>		*
拟特须虫	<i>Paralacydonia paradoxa</i>		*
鸟蛤目	Cardiida	*	
鸟嘴尖帽螺	<i>Capulus dilatatus</i>		*
纽虫属	<i>Lineus</i> sp.		*
欧文虫	<i>Owenia fusiformis</i>		*
奇异稚齿虫	<i>Paraprionospio pinnata</i>		*
巧言虫	<i>Eulalia viridis</i>		*
青岛文昌鱼	<i>Branchiostoma belcheri</i>	*	*
日本倍棘蛇尾	<i>Amphioplus japonicus</i>		*
日本臭海蛭	<i>Travisia japonica</i>		*
日本鼓虾	<i>Alpheus japonica</i>		*
日本浪漂水虱	<i>Cirolana japonensis</i>		*
日本毛翼虫	<i>Mesochaetopterus japonicus</i>	*	
日本沙钩虾	<i>Byblis japonicus</i>		*
深钩毛虫	<i>Sigambra bassi</i>		*
十足目	Decapoda	*	
双眼钩虾	<i>Ampelisca</i> sp.		*
丝鳃虫	<i>Cirrutulus tentaculatu</i>		*
丝异须虫	<i>Heteromastus filiformis</i>	*	*
穗鳞虫	<i>Halosydropsis pilosa</i>		*
滩拟猛钩虾	<i>Harpiniopsis vadicularis</i>	*	*
细螯虾	<i>Leptochela gracilis</i>		*
线虫属	<i>Rhabditophanes</i> sp.	*	
相模多精囊海鞘	<i>Perophora sagamiensis</i>	*	
小头虫	<i>Capitella capitata</i>		*
新腹足目	Lepetellida	*	
烟树蛭虫	<i>Pista typha</i>		*
异足索沙蚕	<i>Lumbrineris heteropoda</i>		*

续表 A1

种名	拉丁名	环境DNA鉴定	形态学鉴定
鼬虫科	Chaetonotidae	*	
鼬虫属	Chaetonotus sp.	*	
原管虫	Protula tubularia		*
长吻沙蚕	Glycera chirori	*	*
长锥虫	Haploscoloplos elongatus	*	*
织纹螺	Nassarius sp.		*
智利巢沙蚕	Diopatra chiliensis		*
中华半突虫	Phyllodoce sinensis	*	*
中华内卷齿蚕	Aglaophamus sinensis		*
锥稚虫	Aonides oxycephala		*

注: \*表示存在该物种。

表 A2 生态质量评价指数与评价等级

Table A2 Ecological quality evaluation index and evaluation level

站位	指标								等级							
	AMB11	BENTIX1	H'1	M-AMB11	AMB12	BENTIX2	H'2	M-AMB12	AMB11	BENTIX1	H'1	M-AMB11	AMB12	BENTIX2	H'2	M-AMB12
Y4	2.98	2.03	1.60	0.77	3.75	2.83	1.52	0.42	2	4	4	1	3	3	4	3
Y5	3.00	2.00	0.72	0.44	2.31	4.77	3.47	0.87	2	4	5	3	2	1	2	1
Y6	3.00	2.00	0.24	0.57	2.50	4.67	1.59	0.43	2	4	5	2	2	1	4	3
Y7	2.98	2.04	0.90	0.67	3.00	2.00	0.39	0.26	2	4	5	2	2	4	5	4
Y8	3.01	2.01	1.50	0.71	2.48	3.54	2.85	0.71	2	4	4	2	2	2	3	2
Y10	3.85	2.00	1.40	0.59	2.10	4.40	2.72	0.65	3	4	4	2	2	1	3	2
Y12	3.50	2.44	1.49	0.57	0.75	6.00	2.86	0.77	3	4	4	2	1	1	3	2
Y16	1.14	4.61	1.50	0.92	1.70	4.09	2.89	0.76	1	1	4	1	2	1	3	2
Y17	0.22	5.76	1.40	0.91	1.05	5.60	2.32	0.65	1	1	4	1	1	1	3	2
Y18	3.00	2.01	1.21	0.66	2.29	3.68	2.54	0.67	2	4	4	2	2	2	3	2
Y19	1.49	5.99	0.11	0.44	1.50	5.20	2.32	0.60	2	1	5	3	2	1	3	2
Y20	0.02	5.98	0.07	0.57	0.62	5.59	1.91	0.71	1	1	5	2	1	1	4	2
Y21	0.15	5.87	0.96	0.74	1.41	4.75	2.25	0.62	1	1	5	2	2	1	3	2
Y23	1.65	4.90	1.49	0.68	2.00	3.78	2.73	0.66	2	1	4	2	2	2	3	2
Y24	2.95	2.19	1.12	0.55	0.13	5.88	0.89	0.55	2	4	4	2	1	1	5	2
Y25	1.57	5.80	0.64	0.72	1.00	6.00	2.25	0.63	2	1	5	2	1	1	3	2
Y26	2.67	2.88	0.84	0.53	1.68	5.04	3.28	0.89	2	3	5	3	2	1	2	1

注: 标注1代表环境DNA鉴定、标注2代表形态学鉴定。

## Evaluation of benthic ecological quality status in the Yalu River Estuary based on environmental DNA

Wang Guiying<sup>1</sup>, Li Hongjun<sup>1</sup>, Shao Kuishuang<sup>1</sup>, Liu Binwei<sup>1</sup>, Chu Qi<sup>1</sup>, Ye Jinqing<sup>1</sup>

(1. National Marine Environmental Monitoring Centre, Ministry of Ecology and Environment, Dalian 116023, China)

**Abstract:** Investigating the potential for application of environmental DNA to identify benthic organisms for evaluating ecological quality status collection of 17 benthic samples from the Yalu River Estuary, environmental DNA and morphological identification and comparative analyses of the resulting ecological quality assessment indices (AMBI, BENTIX, Shannon-Wiener  $H'$ , M-AMBI) were used, respectively. The results show: environmental DNA identification of organisms belonging to 10 class, 16 orders, 19 families, 20 genera and 22 species, morphological identification of organisms belonging to 9 class, 27 orders, 43 families, 55 genera and 57 species, with a total of 10 organisms; the two methods of identification yielded AMBI inter-index ( $R = 0.428$ ,  $p = 0.043$ ,  $y = 0.32x + 1.08$ ), BENTIX inter-exponential ( $R = 0.430$ ,  $p = 0.043$ ,  $y = 0.28x + 3.59$ ) significant consistency exists, while there was significant difference between the Shannon-Wiener  $H'$  indices; the two methods of identification yielded AMBI intergrade, M-AMBI intergrade higher similarity, 51.02%, 44.90%, respectively; the AMBI and M-AMBI grades from the two identification methods were more in line with the actual situation and evaluated the overall ecological quality status of the Yalu River Estuary as good. This study demonstrates that the identification of benthic organisms based on environmental DNA to evaluate the ecological quality status has a high potential for application in marine environmental monitoring surveys.

**Key words:** environmental DNA; benthic organism; ecological quality