

ICS 13.020

CCS Z06

# 团 体 标 准

T/CQSES \*\*-202\*

## 基于环境 DNA 的长江水生生物监测与 完整性评价技术导则 (征求意见稿)

Technical guideline for environmental DNA-based biomonitoring and  
biological integrity evaluation for aquatic organisms in the Yangtze  
River  
(Draft)

202\*-\*\*-\*\*发布

202\*-\*\*-\*\*实施

重庆市环境科学学会 发布



## 目 次

前 言 .....	II
1 范围 .....	3
2 规范性引用文件 .....	3
3 术语和定义 .....	3
4 技术流程 .....	4
5 基于环境 DNA 的长江水生生物监测 .....	5
6 长江水生生物完整性评价 .....	11
附录 A .....	15
附录 B .....	18
附录 C .....	32
参考文献 .....	32

## 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。

本文件由中国环境科学研究院提出，重庆市环境科学学会归口。

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。

本文件起草单位：中国环境科学研究院、广东工业大学、上海海洋大学、白洋淀流域生态环境保障中心。

本文件主要起草人：闫振广、乔桥、凌佳楠、王书平、周静博、张远、李晨虹、孙福红、范俊韬、郑欣、门姝慧、王鹏远。

本文件为首次发布。

# 基于环境 DNA 的长江水生生物监测与完整性评价技术导则

## 1 范围

本文件规定了基于环境 DNA 技术对长江水生生物进行监测和完整性评价的技术要求。

本文件适用于在长江流域范围内，对水生生物进行监测与生物完整性的评价，其他流域可参照使用。

## 2 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。

GB/T 30989 高通量基因测序技术规程

GB/T 35537 高通量基因测序结果评价要求

GB/T 40226 环境微生物宏基因组检测 高通量测序法

HJ 91.2 地表水环境质量监测技术规范

HJ 1295 水生态监测技术指南 河流水生生物监测与评价（试行）

HJ 1296 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）

SL/T 793 河湖健康评估技术导则

SN/T 4278 国境口岸医学媒介昆虫 DNA 条形码鉴定操作规程

T/CSES 81 淡水生物监测 环境 DNA 宏条形码法

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

### 3.1

**生物完整性 biological integrity**

生态系统具备支持和维护区域内平衡的、完整的、自适应的生物群落的能力，生物群落具有与自然生境状态相适应的物种组成、多样性和功能组织。

[来源：HJ 1295—2023，3.6，有修改]

### 3.2

#### 环境 DNA environmental DNA

环境样品中发现的源自于许多不同生物体的 DNA 复杂混合物，环境样品包括土壤、沉积物、水或空气等，样品中含有完整细胞、游离 DNA、甚至完整的生物体。

### 3.3

#### DNA 条形码 DNA barcode

一种利用生物体细胞核或细胞器中特定的、标准的短 DNA 序列来快速鉴别和分类物种的分子工具，该序列具备种间变异性和种内保守性。

### 3.4

#### 索引 index

通过 PCR 或文库准备过程中为每个样品添加一个短序列的核苷酸碱基对，允许多个样品在一个高通量测序运行中被汇集。这个序列对于运行中的每个样本都是不同的，并使序列能够在测序后分配回它们来自的样本。

[来源：T/CSES 81—2023，3.10]

### 3.5

#### 操作分类单元 operational taxonomic unit; OTU

将测序得到的海量序列根据相似性聚类策略分组，获得的在分子水平上表征物种的单元。

[来源：DB11\_T 2358-2024，3.8，有修改]

## 4 技术流程

基于环境 DNA 对长江水生生物进行监测与完整性评价的技术流程见图 1。

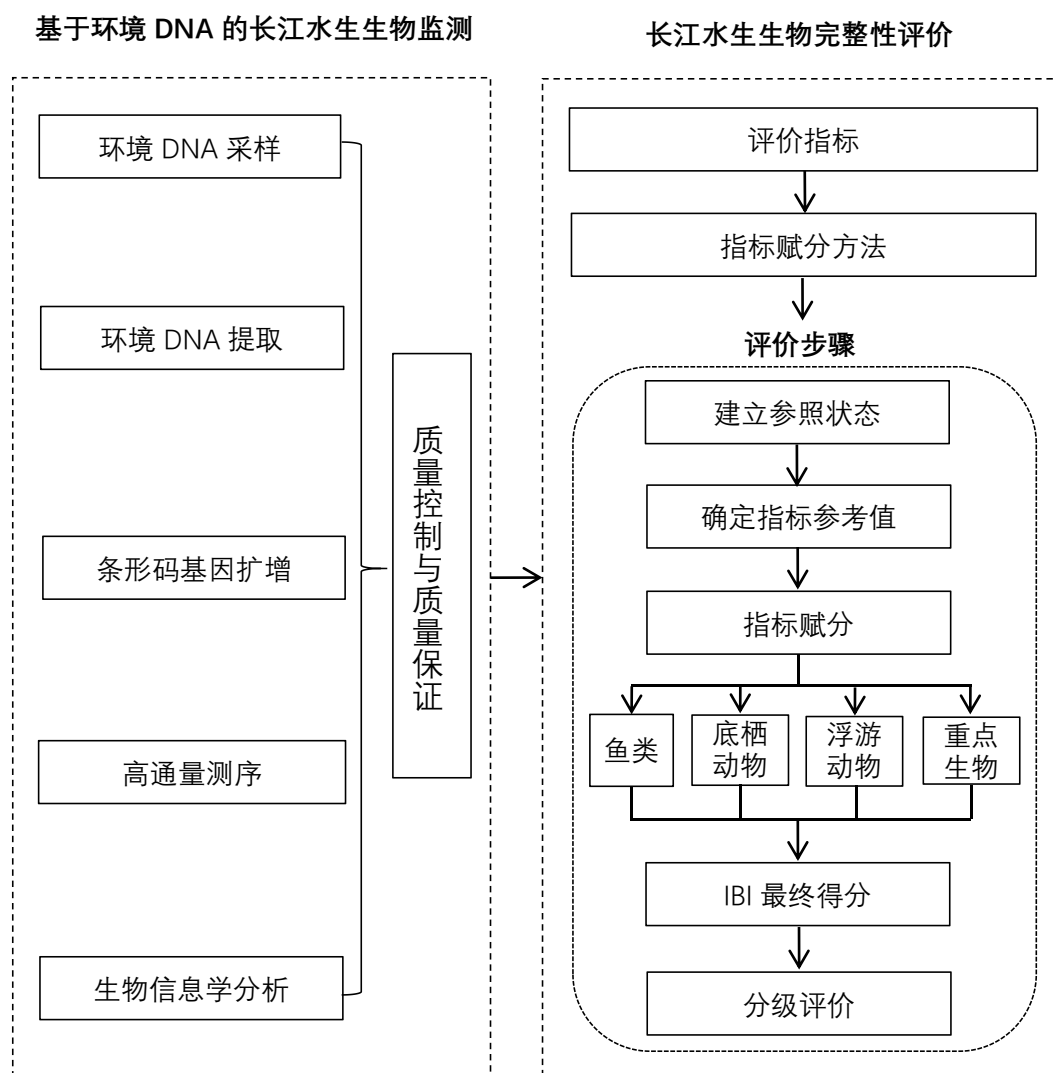


图 1 基于环境 DNA 的长江水生生物监测与完整性评价技术流程

## 5 基于环境 DNA 的长江水生生物监测

### 5.1 环境 DNA 采样

#### 5.1.1 目标生物类群及采样介质

监测目标生物类群包括：鱼类、大型底栖无脊椎动物、浮游动物和重点保护水生生物等，其常见采样介质及适用水体类型见表 1。

表 1 监测的目标水生生物类群及其环境 DNA 采样介质

水生生物类群	常用采样介质	适用水体类型
鱼类	水体	河流、湖库
大型底栖无脊椎动物	表层沉积物	河流、浅水湖泊
浮游动物	水体	湖泊
重点保护水生生物	根据栖息环境确定	有重点保护水生生物分布的水体

### 5.1.2 采样点位、频次和时间

#### 5.1.2.1 总体要求

根据水文和污染等情况，避开死水区、回水区和排污口处，选取代表性点位取样，并记录采样点位的环境状况。在河口感潮河段，宜在退潮期采样，并记录采样时的潮汐状况。

#### 5.1.2.2 采样点位的布设

可参考生态环境部公布的长江水生态考核水体（附录 A）或长江水生生物监测点位（附录 B），也可根据需要自行确定。

#### 5.1.2.3 采样垂线的设置

参照 HJ 91.2 执行，具体为：水面宽度 $\leq 50$  m 时，采样垂线数设为 1 条（中泓线）； $50$  m $<$ 水面宽度 $\leq 100$  m 时，采样垂线数设为 2 条（左、右岸有明显水流处）；水面宽度 $>100$  m 时，采样垂线数设为 3 条（左、中、右）。湖库采样不设断面，对于无明显功能区别的湖库，可用网格法均匀设置采样垂线，否则按水体类别针对不同水域分别设置采样垂线。

#### 5.1.2.4 采样垂线上采样点的设置

参照 HJ 91.2 执行，具体为：水深 $\leq 5$  m 时，设置 1 个采样点（水面下 0.5 m，水深不足 1 m 时，在 1/2 水深处）； $5$  m $<$ 水深 $\leq 10$  m 时，设置 2 个采样点（水面下 0.5 m，水底上 0.5 m）；水深 $>10$  m 时，设置 3 个采样点（水面下 0.5 m，中层 1/2 水深处，水底上 0.5 m）。

#### 5.1.2.5 采样频次

依据研究或工作需要而定。

#### 5.1.2.6 采样时间

可按水期、季节或实际研究需要等确定。

### 5.1.3 采样方法

#### 5.1.3.1 水样

a) 采集方法。样品采集时，使用清洗干净的玻璃或不锈钢采水器，在不同水体深度采集样品，同时对采样现场环境进行拍照记录。

## T/CQSES \*\* -202\*

b) 样品过滤。样品应现场过滤，或冷藏保存并于采样后 24 小时内过滤收集环境 DNA。每个采样点的样品过滤前应对抽滤装置清洁消毒（如，用大于 1.5% 次氯酸钠消毒液浸泡抽滤装置 10 min 以上并洗净，再用 70% 乙醇去除抽滤装置的消毒液残留）。对于比较干净的水体，宜将一份水样过滤于同一张滤膜（一般孔径为 0.45 μm）；对于浑浊水样可换多张滤膜过滤。每个样品抽滤前，应采用相同体积的无菌水代替样品进行过滤获得滤膜，作为空白对照。

c) 水样过滤体积。一般情况下，长江水体中环境 DNA 的水样过滤体积宜为 5 L 以上。

d) 浑浊样品的处理。对于明显浑浊的水样，应放置于 4℃ 静置 30 min 后取上层澄清水样过滤。

e) 滤膜样品的保存。过滤完成后，将滤膜样品转移至无菌离心管或冻存管中，置于液氮或干冰中冷冻运输，或者置于保存溶液（无水乙醇或其他合适的保存剂）中运输。需要长期保存的滤膜样品置于 -80℃ 保存。

### 5.1.3.2 沉积物样品

使用抓泥斗或其他便利工具，采集表层沉积物（0~5 cm）50 g（湿重）以上，剔除杂物及明显的生物残体后，收集至无菌离心管中，现场干冰保存。需要长期保存的样品置于 -80℃ 保存。

## 5.2 环境 DNA 提取

### 5.2.1 样品预处理

#### 5.2.1.1 滤膜样品

对于在保存剂中保存的滤膜样品，在 DNA 提取之前需进行预处理。根据选择的 DNA 提取方法，必要时以抽滤等方式先将保存剂（如乙醇）清洗干净，然后将滤膜剪碎，再利用研磨珠和裂解液将滤膜振荡破碎。

#### 5.2.1.2 沉积物样品

将样品均质后冷冻干燥并混匀。

### 5.2.2 DNA 提取

根据采样介质不同，可选择适宜的 DNA 提取试剂盒，按照试剂盒的使用说明书提取环境 DNA。常见的 DNA 提取方法包括苯酚氯仿抽提法、离心柱法或磁珠法等，可参见常规分子生物学实验方法或参照 GB/T 40226。

### 5.2.3 DNA 质量检测

DNA 提取后，应对其浓度和质量进行检测。一般用于后续扩增实验的样本 DNA 浓度应不低于 1 ng/ $\mu$ L，最佳浓度范围为 10 ng/ $\mu$ L 以上。DNA 样品在 230 nm、260 nm 和 280 nm 处的吸光度比值应符合以下要求：OD<sub>260/280</sub> 应在 1.7~2.0 之间，OD<sub>260/230</sub> 应大于 2.0。

### 5.2.4 DNA 样品保存

提取后的环境 DNA 样品分装保存于 -80°C，避免反复冻融。

## 5.3 条形码基因扩增

### 5.3.1 扩增引物的确定

针对不同的水生生物类群或重点保护水生生物，选择特异性的一对或多对引物对目标类群的条形码基因进行扩增。推荐引物可参照 T/CSES 81—2023 或相关文献报道。对于旗舰物种中华鲟和长江江豚，可参照附录 C 的特异性引物及扩增方式进行扩增，其他旗舰物种条形码基因的扩增可参考相关文献。

### 5.3.2 索引的添加

针对大批量样品的扩增，可在引物序列前添加索引（一般 6~8 bp）以区分样品。

### 5.3.3 基因扩增

#### 5.3.3.1 PCR 反应体系

总体积一般为 25  $\mu$ L，一般包括扩增缓冲液、dNTPs、引物、Taq DNA 聚合酶和模板 DNA，各组分浓度和体积参照 PCR 反应试剂盒使用说明书，并可根据实验情况进行调整，剩余体积用灭菌超纯水补齐。

#### 5.3.3.2 PCR 反应程序

PCR 反应程序的一般设置为：95 °C 预变性 5 min；95 °C 变性 30 s，53 °C 退火 30 s，72 °C 延伸 45 s，行 35 个循环；然后，72 °C 延伸 10 min。实验过程中可根据具体情况进行调整。

#### 5.3.3.3 阴性和阳性对照

分别以灭菌超纯水和含有目的片段的 DNA 作为 PCR 扩增的阴性和阳性对照。

#### 5.3.3.4 扩增产物的检测

用 1%~2% 的琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物，结果应呈现单一清晰明亮、无拖尾的条带，且扩增产物的分子量应符合预期。对于单一生物的条形码基因扩增产物，可通过测序鉴定扩增产物是否正确。若电泳检测显示样品出现非目的条带，可参照 SN/T 4278 的规定对扩增产物进行纯化。用 DNA 浓度分光光度计检测扩增产物的浓度，并保存于 -20°C 或以下温度条件。

## T/CQSES \*\* -202\*

### 5.4 高通量测序

#### 5.4.1 文库构建

##### 5.4.1.1 混库

对于大批量样品,可将已经在 PCR 扩增时添加了索引的同一个引物的 PCR 扩增产物进行等比例混库,混库体积应大于 200  $\mu\text{L}$ 。混库后对样品行琼脂糖凝胶电泳,确定目的条带位置符合预期。

##### 5.4.1.2 末端处理

选择相关的试剂盒,按照试剂盒使用说明书进行操作,将混库产物中的 DNA 末端补平,并在 5' 段进行磷酸化和 3 端添加 dA 尾,以产生黏性末端。

##### 5.4.1.3 接头连接

使用相关试剂盒,按照试剂盒使用说明书进行操作,给末端处理产物添加接头。连接时一般推荐的接头和末端处理产物的摩尔比在 10: 1-200: 1 之间,具体依据试剂盒说明书确定。对接头连接产物进行磁珠纯化,去除多余接头。

##### 5.4.1.4. 文库扩增

根据实际需求可对文库进行扩增,以增加文库浓度,提高文库质量。

##### 5.4.1.5 文库质检

对文库长度分布和浓度进行检测,评价文库质量。利用电泳检测文库长度,确保长度符合预期。利用 Qubit 等方法检测文库浓度,一般要求最低浓度应达到 1~3  $\text{ng}/\mu\text{L}$ 。

#### 5.4.2 高通量测序

对于质检合格的文库,按照 GB/T 30989 和 GB/T 35537 的规定进行高通量测序,每个样本的预期序列数应不低于 30000 条,可根据具体情况调整。

### 5.5 生物信息学分析

#### 5.5.1 下机数据预处理与数据清洗

- a) 根据样本索引将序列分配于不同样本中;
- b) 合并双端测序的序列,并去除测序接头、样本索引和引物序列;
- c) 基于滑动窗口法修剪去除低质量碱基,窗口内碱基平均质量一般要求 $>Q20$ ;
- d) 去除序列长度过短(一般 $<50\text{ bp}$ )的 Reads。
- e) 识别并去除嵌合体序列;

f) 剔除阴性对照中的污染序列。

### 5.5.2 构建 OTU

a) 序列去重后，将相似性 $\geq 97\%$ 的序列聚类成 OTU；

b) 识别与 OTU 内其他序列平均距离最小的序列作为代表性序列，并检测去除代表性序列中可能的嵌合体序列；

c) 将测序得到的序列比对到每个 OTU 的代表性序列，获得每个 OTU 在每个样品中的序列数；

d) 对于非稀有物种的一般性检测，去除低丰度（一般总序列数为 1~5）的 OTU。

### 5.5.3 物种注释与统计

a) 根据目标基因和扩增区域，选择合适的条形码基因数据库，如 SLIVA 数据库（常用于 16S/18S rRNA 基因序列比对）、BOLD 数据库（常用于 COI 基因序列比对）、Mitofish 数据库（常用于 12S 基因序列比对）；

b) 将 OTU 序列与数据库中的信息进行比对分析，综合考虑置信度得分（一般 $\geq 0.7$ ）、序列一致性（一般 $\geq 97\%$ ）、比对覆盖度（一般 $\geq 80\%$ ）和 E 值（一般 $\leq 1e-5$ ）等，确定物种注释信息；

c) 物种注释结果需进行人工校验，综合考虑选用的条形码片段、参考数据库的完整性、物种栖息环境等，结合专家经验谨慎确定，尽可能减少不确定性；

d) 每个样本的 OTU 统计表由 OTU 名称、序列、物种注释信息、序列数和序列相对丰度组成，每个点位检出的 OTU 相对丰度为所有生物重复样本的平均值。

e) 每个样品宜保留序列相对丰度 $> 0.01\%$ 的分子分类单元，且某个 OTU 在某一点位的生物重复样品中检出率不应低于 2/3，否则应舍弃。

## 5.6 质量控制与保证

### 5.6.1 质量控制

a) 在样品采集、DNA 提取、条形码基因扩增和测序阶段应分别设置阴性对照（无菌水）和阳性对照（已知物种组成的样本、特定物种样本或测序对照试剂）；

b) 每个采样点位应采集不少于 3 个重复样本，也可以在实验过程中设置 3 个技术重复；

c) 对于同一批实验数据，生物信息学分析流程及过滤等参数设置应保持一致；

d) 对于混合群落的宏条形码，注释物种的假阳性率和假阴性率均不应超过 10%；

## T/CQSES \*\* -202\*

e) 对于特定物种的条形码，如果出现假阴性，需要重新优化实验流程；如果出现假阳性，除优化实验流程外，如果是针对特定物种，也可以通过测序进行鉴别，如果能够区分则可以接受。

### 5.6.2 质量保证

a) 所有采样工作遵循标准化采样流程，使用无菌技术采集样品，避免样品间交叉污染。样品保存与运输应符合其环境特需性；

b) 实验场所应满足分子生物学实验室的各项条件，实验前应对实验室环境消毒灭菌，避免污染和交叉污染；

c) 每个样品应具备其特定编号，原始数据应归档保存，确保数据的可溯性。

## 6 长江水生生物完整性评价

### 6.1 评价指标

采用生物完整性指数（IBI）的方式进行评价，计算各生物类群 IBI 指数包括的评价指标，以及适用的水体类型见表 2。

### 6.2 指标赋分方法

根据评价指标的不同，分别利用比值法和偏离度法进行赋分，具体见表 2。

表 2 长江水生生物类群完整性评价指标、赋分方法及适用水体类型

序号	监测对象	评价指标	赋分方法	适用水体类型
1	鱼类	种类数	比值法	河流、湖泊、水库
		优势科	偏离度法	
2	大型底栖无脊椎动物	种类数	比值法	河流、浅水湖泊
		优势种	偏离度法	
3	浮游动物	多样性	比值法	湖泊
4	重点保护水生生物	种类数	比值法	有重点保护水生生物分布的水体

### 6.3 评价步骤

#### 6.3.1 建立参照状态

从人类活动干扰强度、河湖/库的物理形态结构，以及水环境质量等方面进行评估和筛选，确定未受或少受人类活动干扰的参照点位，具体参照 SL/T 793—2020 执行；无法获得

参照点位时，可采用最优状态法或历史数据法等确定参照状态，具体参照 HJ 1295—2023 执行。

### 6.3.2 确定指标参考值

指标参考值按照优先度取参照点位的实测平均值，或参照状态计算值，或专家评判的理想状态。对于重点保护水生生物种类数指标，以国家公布的期望值（附录 A）作为参考值。

### 6.3.3 指标赋分

#### 6.3.3.1 鱼类

a) 对于鱼类种类数指标，采用比值法赋分。首先按照式（1）计算比值：

$$\text{鱼类种类数比值} = \text{鱼类种类监测值} / \text{鱼类种类参考值} \quad (1)$$

获得比值后，再按照表 3 中的赋分标准对指标进行赋分：

表 3 鱼类种类数指标赋分标准

赋分	0	20	40	60	80	100
比值	≤50%	(50%, 60%]	(60%, 70%]	(70%, 80%]	(80%, 90%]	>90%

b) 对于鱼类优势科指标，采用偏离度法赋分。首先按照式（2）和（3）计算偏离度：

$$\text{鱼类优势科种类比例} = \text{鱼类前 2 位优势科种类数} / \text{鱼类总种类数} \quad (2)$$

$$\text{偏离度} = \frac{|\text{鱼类优势科种类比例监测值} - \text{鱼类优势科种类比例参考值}|}{\text{鱼类优势科种类比例参考值}} \quad (3)$$

获得偏离度值后，再按照表 4 中的赋分标准对指标进行赋分：

表 4 鱼类优势科指标赋分标准

赋分	0	20	40	60	80	100
偏离度	≥25%	(20%, 25%]	(15%, 20%]	(10%, 15%]	(5%, 10%]	[0, 5%)

c) 取鱼类种类数和鱼类优势科种类比例两项指标中得分较低者值作为鱼类完整性指数的得分。

#### 6.3.3.2 大型底栖无脊椎动物

a) 对于大型底栖无脊椎动物种类数指标，采用比值法赋分。首先按照式（4）计算比值：

$$\text{大型底栖无脊椎动物种类数比值} = \frac{\text{大型底栖无脊椎动物种类数监测值}}{\text{大型底栖无脊椎动物种类数参考值}} \quad (4)$$

获得比值后，再按照表 5 中的赋分标准对指标进行赋分：

表 5 大型底栖无脊椎动物种类数指标赋分标准

赋分	0	20	40	60	80	100
比值	≤20%	(20%, 30%]	(30%, 40%]	(40%, 60%]	(60%, 80%]	>80%

b) 对于大型底栖无脊椎动物优势种指标，采用偏离度法赋分。首先按照式（5）计算物种优势度，判定优势种，然后按照式（6）和（7）计算偏离度：

$$Y = (n_i/N) \times f_i \quad (5)$$

式中， $Y$  为物种优势度； $n_i$  为物种  $i$  的个体数； $N$  为物种的总个体数， $f_i$  为出现频率。

$Y$  值 > 0.02 的物种判定为优势种。

$$\text{底栖动物优势种个体比例} = \frac{\text{底栖动物优势种个体数}}{\text{底栖动物总个体数}} \quad (6)$$

$$\text{偏离度} = \frac{|\text{底栖动物优势种个体比例监测值} - \text{底栖动物优势种个体比例参考值}|}{\text{底栖动物优势种个体比例参考值}} \quad (7)$$

获得偏离度值后，再按照表 6 中的赋分标准对指标进行赋分：

表 6 大型底栖无脊椎动物优势种指标赋分标准

赋分	0	20	40	60	80	100
偏离度	≥24%	(20%, 24%]	(16%, 20%]	(12%, 16%]	(8%, 12%]	[0, 8%)

c) 取大型底栖无脊椎动物种类数和优势种个体比例两项指标中得分较低者值作为大型底栖无脊椎动物完整性指数的得分。

### 6.3.3.3 浮游动物

以香农多样性指数表征浮游动物完整性，采用比值法赋分。首先按式（8）计算浮游动物的香农多样性指数，然后按式（9）计算比值：

$$H = -\sum_{i=1}^S (p_i \times \ln p_i) \quad (8)$$

式中， $P_i$  为第  $i$  种浮游动物的密度（传统监测）或 OTU 数量（环境 DNA 监测）百分比， $S$  为评价点位浮游动物的总物种数。

$$\text{浮游动物多样性比值} = \frac{\text{浮游动物香农多样性指数监测值}}{\text{浮游动物香农多样性指数参考值}} \quad (9)$$

获得比值后，再按照表 7 中的赋分标准对指标进行赋分，即为浮游动物完整性指数的得分。

表 7 浮游动物多样性指标赋分标准

赋分	0	20	40	60	80	100
比值	≤50%	(50%, 60%]	(60%, 70%]	(70%, 80%]	(80%, 90%]	>90%

#### 6.3.3.4 重点保护水生生物

以重点保护水生生物（国家 I 级和 II 级重点保护水生生物）种类数表征其完整性，采用比值法赋分。首先按照式（10）计算比值：

$$\text{重点保护水生生物种类数比值} = \frac{\text{重点保护水生生物种类数监测值}}{\text{重点保护水生生物种类数参考值}} \quad (10)$$

获得比值后，再按照表 8 中的赋分标准对指标进行赋分，即为重点保护水生生物完整性指数的得分。

表 8 重点保护水生生物种类数指标赋分标准

赋分	0	20	40	60	80	100
比值	≤30%	(30%, 40%]	(40%, 50%]	(50%, 60%]	(60%, 80%]	>80%

#### 6.3.4 水生生物完整性指数最终得分

针对某一评价点位，计算鱼类、大型底栖无脊椎动物、浮游动物和重点保护水生生物完整性指数得分的平均值，作为该点位水生生物完整性指数的最终得分。

#### 6.3.5 分级评价

根据完整性指数最终得分情况，按照表 9 中的分级标准对评价点位的水生生物完整性进行分级评价。

表 9 水生生物完整性评价等级划分

等级	优	良	中	差	劣
分值	>80	[80, 60)	[60, 40)	[40, 20)	≤20

## 附录 A

(资料性)

长江水生态考核试点水体名单及重点保护水生生物期望值

序号	省份	水体类型	水体	重点保护水生生物物种数
1	青海	河流	长江干流（青海）	3
2	四川		长江干流（四川）	24
3	四川		赤水河（四川）	12
4	四川		岷江	21
5	四川		嘉陵江（四川）	18
6	四川		沱江	16
7	四川		雅砻江	12
8	西藏		长江干流（西藏）	5
9	云南		长江干流（云南）	24
10	云南		赤水河（云南）	7
11	重庆		长江干流（重庆）	13
12	重庆		嘉陵江（重庆）	21
13	重庆		乌江（重庆）	16
14	贵州		赤水河（贵州）	9
15	贵州		乌江（贵州）	10
16	贵州		清水江	12
17	甘肃		白龙江	7
18	甘肃		嘉陵江（甘肃）	21
19	湖北		长江干流（湖北）	24
20	湖北		汉江（湖北）	15
21	湖南		长江干流（湖南）	24
22	湖南		湘江	22
23	湖南		资江	3

(续)

序号	省份	水体类型	水体	重点保护水生生物物种数	
24	湖南	河流	沅江	22	
25	湖南		澧水	5	
26	江西		长江干流（江西）	24	
27	江西		赣江	9	
28	陕西		汉江（陕西）	16	
29	陕西		嘉陵江（陕西）	21	
30	河南		丹江（河南）	/	
31	广西		湘江西源	/	
32	安徽		长江干流（安徽）	11	
33	江苏		长江干流（江苏）	12	
34	浙江		东苕溪	1	
35	浙江		西苕溪	1	
36	上海		长江干流（上海）	11	
37	上海		黄浦江	3	
38	云南		湖泊	滇池	6
39	贵州			草海	/
40	湖北			洪湖	/
41	湖南	洞庭湖		16	
42	江西	鄱阳湖		6	
43	安徽	巢湖		/	
44	江苏	太湖		/	
45	江苏	淀山湖—元荡（江苏）		/	
46	上海	淀山湖—元荡（上海）		/	
47	重庆	水库		三峡水库（重庆）	9
48	湖北		三峡水库（湖北）	9	

(续)

序号	省份	水体类型	水体	重点保护水生生物物种数
49	湖北	水库	丹江口水库（湖北）	5
50	河南		丹江口水库（河南）	5

## 附录 B

(资料性)

长江流域水生生物监测位点清单

序号	点位名称	经度	纬度	水体类型
1	直门达	97.2481	33.0219	河流
2	通天河大桥	95.8266	34.0358	河流
3	庚卓如瓦	96.9622	33.3438	河流
4	洛须镇温托村	98.9975	29.7111	河流
5	江达县邓科乡	97.9811	32.4644	河流
6	江达县波罗乡	98.6020	31.1879	河流
7	金江桥	100.5938	26.1838	河流
8	五孙庙	100.4039	26.5654	河流
9	金沙江树底桥	100.4373	27.0058	河流
10	龙洞	101.4627	26.5384	河流
11	新华	99.9583	26.9331	河流
12	三块石	104.4516	28.6317	河流
13	倒流子	103.8229	28.4728	河流
14	黄沙坡	104.2553	28.6469	河流
15	洗白	104.8118	27.4996	河流
16	岔河渡口	105.2893	27.7147	河流
17	洛甸河水文站	105.0408	27.6859	河流
18	金沙江岗托桥	98.5967	31.6178	河流
19	倮果	101.7888	26.6010	河流
20	石门子	104.5955	28.7406	河流
21	水磨沟村	99.0550	29.9381	河流
22	挂弓山	104.7162	28.7815	河流

(续)

序号	点位名称	经度	纬度	水体类型
23	江南镇沙嘴上	105.0390	28.7849	河流
24	纳溪大渡口(左岸)	105.2302	28.7488	河流
25	手爬岩	105.5430	28.8950	河流
26	沙溪口	105.9031	28.8813	河流
27	蒙姑	103.0314	26.5719	河流
28	贺龙桥	99.3892	28.1706	河流
29	拉鲊	101.9251	26.3652	河流
30	渭门桥	103.8247	31.7589	河流
31	镇平乡	103.7367	32.1636	河流
32	悦来渡口	103.7401	29.7273	河流
33	岷江青衣坝	103.7850	29.4974	河流
34	凉姜沟	104.6233	28.7799	河流
35	彭山岷江大桥	103.8916	30.2114	河流
36	岷江东青交界	103.8391	29.9044	河流
37	映秀	103.4779	31.0456	河流
38	岳店子下	103.8668	30.3575	河流
39	河口渡口	103.9887	29.1419	河流
40	月波	104.1599	29.0423	河流
41	雅砻江口	101.7996	26.6120	河流
42	雅江县城上游	101.0481	29.2033	河流
43	呷拉乡雅砻江	99.9788	31.6115	河流
44	柏枝沙滩	101.8198	27.1095	河流
45	长须干马乡	99.0061	32.7519	河流
46	沙溪(底)	105.9539	31.6200	河流

(续)

序号	点位名称	经度	纬度	水体类型
47	金溪电站	106.2619	31.1572	河流
48	上石盘	105.7408	32.3890	河流
49	金子	106.2278	30.2134	河流
50	烈面	106.1105	30.5035	河流
51	元西村	105.8373	32.5368	河流
52	伍嘉码头	106.2629	30.9585	河流
53	新政电站	106.2364	31.3108	河流
54	小渡口	106.0883	30.7336	河流
55	麻柳包	106.0343	31.4010	河流
56	醒觉溪	105.8272	28.8045	河流
57	宏缘	104.5339	30.6033	河流
58	拱城铺渡口	104.6806	30.0608	河流
59	大磨子	105.2593	28.9678	河流
60	李家湾	104.9747	29.1044	河流
61	老翁桥	105.0075	29.2658	河流
62	银山镇	104.9697	29.6872	河流
63	幸福村(河东元坝)	104.6532	29.9614	河流
64	脚仙村	105.0225	29.4413	河流
65	沱江大桥(底)	105.4288	28.8849	河流
66	和尚山	106.5287	29.5076	河流
67	江津大桥	106.2530	29.2670	河流
68	寸滩	106.5914	29.6180	河流
69	丰收坝	106.4643	29.3949	河流
70	沙溪镇	106.9358	29.7129	河流

(续)

序号	点位名称	经度	纬度	水体类型
71	北温泉	106.4351	29.8368	河流
72	井口(嘉陵江右岸)	106.4603	29.6633	河流
73	大溪沟	106.5533	29.5705	河流
74	梁沱(左岸)	106.4565	29.6012	河流
75	长江涪陵菜场沱	107.4045	29.7115	河流
76	麻柳嘴	107.4232	29.5955	河流
77	锣鹰	107.9491	29.3867	河流
78	江口镇烂泥坨	107.8386	29.2818	河流
79	鹿角	108.2845	29.1333	河流
80	大关桥	106.1795	26.8673	河流
81	六广	106.4354	27.0067	河流
82	乌江下五龙	106.8634	27.3012	河流
83	大乌江镇	107.6904	27.4009	河流
84	乌杨树	108.2381	27.9969	河流
85	沿河	108.5105	28.6225	河流
86	清池	105.9517	27.7390	河流
87	黄歧坳	106.2584	27.7817	河流
88	茅台	106.3742	27.8603	河流
89	九龙囤	105.9767	28.2917	河流
90	鲢鱼溪	105.7339	28.6078	河流
91	茶园岔河	107.4557	26.3604	河流
92	兴仁桥	107.7766	26.3247	河流
93	下司	107.7822	26.4944	河流
94	旁海	108.0799	26.7482	河流

(续)

序号	点位名称	经度	纬度	水体类型
95	茅坪	109.2569	26.7476	河流
96	崔家	110.6706	25.5236	河流
97	大冲口	110.7683	25.7272	河流
98	大源屋	111.1669	26.0130	河流
99	白果村	111.2676	26.2509	河流
100	白龙江两河口桥	104.4819	33.6975	河流
101	姚渡	105.4158	32.7865	河流
102	洛大	104.0030	33.9797	河流
103	固水子村	105.0792	33.3280	河流
104	白水江	106.1176	33.6034	河流
105	站儿巷	106.2945	33.7820	河流
106	烈金坝	106.2589	33.0438	河流
107	老君关	109.0742	32.7156	河流
108	黄金峡	107.8330	33.1934	河流
109	南柳渡	107.2239	33.1118	河流
110	兰滩	109.7911	32.8794	河流
111	八庙沟	105.9206	32.8315	河流
112	鲁光坪	106.1427	33.3117	河流
113	黄牛铺	106.8396	34.1950	河流
114	灶火庵	106.4677	33.9021	河流
115	凤州	106.6267	33.9567	河流
116	浙川史家湾	111.2159	33.0805	河流
117	荆紫关丹江河桥	111.0113	33.2533	河流
118	寺湾镇丹江河桥	111.1224	33.1605	河流

(续)

序号	点位名称	经度	纬度	水体类型
119	沈湾	111.6007	32.4650	河流
120	白家湾	112.0409	32.0584	河流
121	仙人渡	111.6943	32.2259	河流
122	陈家坡	110.9033	32.8046	河流
123	罗汉闸	112.5932	30.6898	河流
124	皇庄	112.5611	31.1851	河流
125	黑流渡	112.9414	30.5411	河流
126	转斗	112.4374	31.4598	河流
127	余家湖	112.1765	31.9142	河流
128	汉南村	113.4028	30.4045	河流
129	石到	113.5217	30.4183	河流
130	小河	113.9462	30.6805	河流
131	石牌港	112.5255	30.9930	河流
132	岳口	113.0696	30.5010	河流
133	宗关	114.2160	30.5772	河流
134	云池(白洋)	111.4379	30.4310	河流
135	调关	112.6330	29.6982	河流
136	柳口	112.4321	29.9714	河流
137	砖瓦厂	112.0619	30.2848	河流
138	观音寺	112.2854	30.2322	河流
139	荆江口	113.1264	29.4664	河流
140	南津关	111.2537	30.7687	河流
141	白浒山	114.6287	30.5484	河流
142	纱帽	114.0906	30.3083	河流

(续)

序号	点位名称	经度	纬度	水体类型
143	黄盖湖镇右	113.6003	29.8661	河流
144	中官铺	115.5045	29.8443	河流
145	风波港(右岸)	115.1860	30.2143	河流
146	刘佐(左岸)	116.1150	29.8233	河流
147	燕矶	115.0122	30.4067	河流
148	桑植打鼓泉渡口	110.1042	29.4551	河流
149	永定澄潭(区水厂)	110.4353	29.1253	河流
150	张公庙	111.6497	29.6008	河流
151	澧水三江口	111.2985	29.5884	河流
152	窑坡渡	111.8752	29.5937	河流
153	永定潭口	110.6358	29.1897	河流
154	沙河口	112.0933	29.2600	河流
155	大夫庙	111.5470	26.2790	河流
156	港子口	111.6426	26.5032	河流
157	归阳镇	112.1806	26.5371	河流
158	新塘铺	112.5813	26.7780	河流
159	城北水厂	112.6101	26.9122	河流
160	鱼石村	112.7319	26.9792	河流
161	樟树港	112.8021	28.5686	河流
162	熬洲	112.9325	27.3281	河流
163	桔子洲	112.9522	28.1678	河流
164	昭山	112.9978	27.9720	河流
165	马家河	113.0337	27.8489	河流
166	诸葛庙	111.6169	26.2068	河流

(续)

序号	点位名称	经度	纬度	水体类型
167	五强溪	110.9115	28.7746	河流
168	浦市上游	110.1115	28.0852	河流
169	陈家河(四水厂)	111.6428	28.9848	河流
170	武水汇合口	110.1655	28.2866	河流
171	侯家淇	110.3786	28.4107	河流
172	萝卜湾	110.0222	27.1486	河流
173	坡头	112.1176	28.9130	河流
174	城陵矶(右岸)	113.1722	29.4833	河流
175	天字一号	112.9158	29.6978	河流
176	陆城	113.2847	29.6083	河流
177	江南镇	113.4357	29.7631	河流
178	君山长江取水口	112.9747	29.4825	河流
179	桂花渡水厂	111.4266	27.2074	河流
180	桃谷山	112.1366	28.5419	河流
181	球溪	111.4460	27.6024	河流
182	万家嘴	112.3867	28.6168	河流
183	新化水厂	111.3031	27.7194	河流
184	晒谷滩电站	111.4106	27.3300	河流
185	坪口	111.0989	28.0478	河流
186	临资口	112.7300	28.7000	河流
187	瓦石矶	112.5285	28.7139	河流
188	株溪口	111.3272	28.3986	河流
189	新庙前	114.9242	25.9953	河流
190	青原七姑岭	115.0392	26.9731	河流

(续)

序号	点位名称	经度	纬度	水体类型
191	新干车头	115.3333	27.6854	河流
192	生米	115.8056	28.5417	河流
193	丰城小港口	115.8650	28.2619	河流
194	吴城赣江	116.0162	29.1884	河流
195	周坊	116.0439	28.7864	河流
196	吉里	116.1283	28.7783	河流
197	马当渡口	116.6519	29.9917	河流
198	湖口(右岸)	116.2008	28.7783	河流
199	彭泽红光村	116.4028	29.8592	河流
200	九江县大屋何	115.6928	29.8381	河流
201	陈家墩(右岸)	117.9648	31.0784	河流
202	皖河口(左岸)	116.9954	30.4892	河流
203	前江口(左岸)	117.2387	30.5734	河流
204	五步沟(右岸)	117.7376	30.8063	河流
205	民生水厂(右岸)	117.4523	30.6789	河流
206	三兴村(底)	118.4967	31.7788	河流
207	元宝圩(左岸)	117.7216	30.9985	河流
208	东西梁山	118.3568	31.5014	河流
209	乌江(左岸)	118.4947	31.8425	河流
210	塘浦	119.6054	30.6459	河流
211	荆湾	119.7782	30.8288	河流
212	铁路桥	120.0165	30.8817	河流
213	新港口	120.1269	30.9401	河流
214	递铺	119.6884	30.6529	河流

(续)

序号	点位名称	经度	纬度	水体类型
215	汪家埠	119.8675	30.2572	河流
216	城南翻水站	120.0723	30.5314	河流
217	东升	120.0678	30.6547	河流
218	城西大桥	120.0736	30.8652	河流
219	毗山	120.1368	30.8784	河流
220	团结闸	121.0486	31.7915	河流
221	高港码头(左岸)	119.8632	32.2851	河流
222	小河口上游(左岸)	119.0800	32.2429	河流
223	焦山尾(右岸)	119.5614	32.2264	河流
224	浏河(右岸)	121.3241	31.5468	河流
225	魏村(右岸)	119.9619	32.0070	河流
226	九乡河口	118.9495	32.1780	河流
227	下青龙港	120.4908	32.0512	河流
228	小湾(右岸)	120.2723	31.9401	河流
229	启东港	121.6081	31.7483	河流
230	朝阳农场	121.8908	31.1722	河流
231	崇明东滩(左岸)	121.9457	31.3911	河流
232	东风西沙	121.2768	31.7048	河流
233	白龙港(右岸)	121.7369	31.3092	河流
234	青草沙进水口	121.5459	31.4908	河流
235	淀峰	120.9792	31.0897	河流
236	夏字圩	121.1537	30.9723	河流
237	闵行西界	121.3439	30.9794	河流
238	吴淞口	121.5035	31.3836	河流

(续)

序号	点位名称	经度	纬度	水体类型
239	临江	121.4603	31.1127	河流
240	草海中心	102.6428	24.9917	湖泊
241	灰湾中	102.6903	24.9136	湖泊
242	罗家营	102.7492	24.8900	湖泊
243	观音山东	102.7611	24.8372	湖泊
244	观音山中	102.7094	24.8372	湖泊
245	观音山西	102.6756	24.8372	湖泊
246	海口西	102.6300	24.7733	湖泊
247	滇池南	102.6364	24.7064	湖泊
248	白鱼口	102.6700	24.8100	湖泊
249	断桥	102.6596	25.0150	湖泊
250	草海杨关山	104.2144	26.8742	湖泊
251	草海中部	104.2451	26.8515	湖泊
252	朱家湾子	104.2283	26.8335	湖泊
253	万下河口	104.2110	26.8548	湖泊
254	刘家巷	104.2647	26.8491	湖泊
255	洪湖湖心 A	113.3537	29.8396	湖泊
256	杨柴湖	113.3429	29.7936	湖泊
257	排水闸	113.3789	29.8281	湖泊
258	洪湖湖心 B	113.3812	29.8817	湖泊
259	小港	113.4570	29.9284	湖泊
260	王垸村	113.2386	29.8821	湖泊
261	下新河	113.4010	29.9477	湖泊
262	洪湖 5#	113.4159	29.8760	湖泊

(续)

序号	点位名称	经度	纬度	水体类型
263	桐梓湖	113.2893	29.8118	湖泊
264	鹿角(洞)	112.9886	29.1541	湖泊
265	扁山	113.0556	29.3380	湖泊
266	东洞庭湖	112.9986	29.3300	湖泊
267	洞庭湖出口	113.1377	29.4429	湖泊
268	横岭湖	112.8661	28.8375	湖泊
269	虞公庙	112.8902	28.8297	湖泊
270	岳阳楼	113.0890	29.4027	湖泊
271	蒋家嘴	112.1646	28.8631	湖泊
272	万子湖	112.4109	28.8184	湖泊
273	南嘴	112.2989	29.0630	湖泊
274	小河嘴	112.3108	28.8516	湖泊
275	东洞庭湖湖心	112.8961	29.2454	湖泊
276	主湖体 1	112.8992	29.4279	湖泊
277	主湖体 4	112.8452	29.2062	湖泊
278	磊石山	112.9164	28.9722	湖泊
279	莲湖	116.4958	29.0215	湖泊
280	康山	116.4269	28.9406	湖泊
281	南矾山	116.3387	28.9924	湖泊
282	伍湖分场	116.2205	29.0559	湖泊
283	青岚湖	116.1468	28.4913	湖泊
284	三山	116.3182	29.1498	湖泊
285	星子	116.0511	29.4447	湖泊
286	老爷庙	116.0580	29.3730	湖泊

(续)

序号	点位名称	经度	纬度	水体类型
287	蚌湖	115.9990	29.2842	湖泊
288	鄱阳湖出口	116.1930	29.7272	湖泊
289	蛤蟆石	116.1298	29.6090	湖泊
290	都昌	116.1894	29.2455	湖泊
291	梅溪咀	116.3664	28.8000	湖泊
292	白沙洲	116.5497	29.1233	湖泊
293	湖滨	117.4203	31.6461	湖泊
294	黄麓	117.6331	31.5778	湖泊
295	新河入湖区	117.3832	31.5674	湖泊
296	西半湖湖心	117.3725	31.6527	湖泊
297	龟山	117.7559	31.6019	湖泊
298	东半湖湖心	117.6200	31.5220	湖泊
299	忠庙	117.4696	31.5658	湖泊
300	兆河入湖区	117.5605	31.4726	湖泊
301	天灯村	117.7900	31.5900	湖泊
302	炯炆	117.6674	31.6343	湖泊
303	花塘	117.5402	31.5606	湖泊
304	余家墩	117.4800	31.4800	湖泊
305	南淝河入湖区	117.3948	31.6862	湖泊
306	孤山	117.3520	31.6021	湖泊
307	派河入湖区	117.3212	31.6607	湖泊
308	梅梁湖心	120.1728	31.4686	湖泊
309	锡东水厂	120.3700	31.4478	湖泊
310	沙渚南	120.2461	31.3789	湖泊

(续)

序号	点位名称	经度	纬度	水体类型
311	竺山湖心	120.0373	31.3909	湖泊
312	兰山嘴	119.9583	31.2167	湖泊
313	胥湖心	120.4000	31.1717	湖泊
314	乌龟山南	120.2294	31.3103	湖泊
315	西山西	120.1897	31.1347	湖泊
316	拖山	120.1622	31.3919	湖泊
317	椒山	120.0969	31.3333	湖泊
318	漫山	120.2697	31.2328	湖泊
319	平台山	120.1033	31.2258	湖泊
320	十四号灯标	120.1506	31.0628	湖泊
321	泽山	120.2675	31.0136	湖泊
322	大雷山	120.0119	31.1364	湖泊
323	五里湖心	120.2617	31.5131	湖泊
324	大浦口	119.9736	31.2967	湖泊
325	东太湖	120.5358	31.0933	湖泊
326	元荡	120.8715	31.0700	湖泊
327	千灯浦口	120.9813	31.1876	湖泊
328	新华港	121.0073	31.1383	湖泊
329	汪洋荡	120.9351	31.1406	湖泊
330	淀山湖中	120.9600	31.1200	湖泊
331	急水港口	120.9229	31.1039	湖泊

## 附录 C

(资料性)

## 中华鲟和长江江豚条形码基因扩增引物

目标生物	基因名称	扩增方式	引物名称	引物序列 (5'-3')	产物长度 / (bp)
中华鲟	ND4	巢式 PCR	GAS4-F (第一轮)	CTACTAAAACCTTGGCGGATACG	313
			GAS4-R (第一轮)	TGTGGAGGCGTTCATAGTTAGGA	
			GAS4N-F (第二轮)	GACCGGGTCAATTTGTCTACG	113
			GAS4N-R (第二轮)	AGCCTCATGGGGTTTGGATG	
长江江豚	D-loop	PCR	YFPDloop-F	TATGTCCACTAGCCCTTCATAACC ATTA	102
			YFPDLoop-R	AGATCATTATTTAGCTACCCCCAC AAGC	

## 参考文献

- [1] 《长江流域水生生物完整性指数评价方法（试行）》（农长鱼发〔2021〕3号）
- [2] 《长江流域水生态监测方案（试行）》（环办监测函〔2022〕169号）
- [3] 《长江流域水生态考核指标评分细则（试行）》（环办水体〔2023〕10号）
- [4] 《广东省江河湖库水生态环境调查与评价技术指引（试行）》（2021年7月发布）