

综述

doi: 10.7541/2024.2023.0409

## 水生生物环境DNA监测技术的发展、应用与标准化

谷思雨<sup>1</sup> 陈凯<sup>1</sup> 金小伟<sup>2</sup> 李文攀<sup>2</sup> 陈晓飞<sup>3</sup> 熊晶<sup>4</sup> 汤敏喆<sup>4</sup> 姜传奇<sup>1</sup>  
熊杰<sup>1</sup> 李涛<sup>1</sup> 张琪<sup>1</sup> 崔永德<sup>1</sup> 曾宏辉<sup>1</sup> 何舜平<sup>1</sup> 王业耀<sup>2\*</sup> 缪炜<sup>1\*</sup>

(1. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 2. 中国环境监测总站, 北京 100012; 3. 湖北省生态环境科学研究院, 武汉 430072; 4. 湖北省生态环境监测中心站, 武汉 430072)

**摘要:** 水生生态系统是保障国家生态安全的重要基础。水生生物在水生态系统中扮演着核心角色, 是研究水体演变的重要依据, 是维护水生态健康的关键。传统水生生物调查和监测通常采用形态学方法, 但其存在专业知识要求高、难以标准化和自动化及费时耗力等缺陷。环境DNA (Environmental DNA, 简称eDNA) 技术是一种通过监测环境中存在的DNA片段来识别特定生物物种的方法, 可以实现基于水体中DNA分子进行水生生物的鉴定和监测, 为水生生物的常态化监测提供了一个准确、便捷、可标准化和自动化实施的方案。文章介绍了eDNA技术的基本原理, 总结回顾了eDNA技术从萌芽到广泛科研应用的发展历史和过程, 介绍了基于eDNA的宏条形码和宏基因组等各类水生生物鉴定监测技术; 阐述了eDNA技术在保护种、入侵种及生物类群监测和水生态评估等各领域的应用; 分析了eDNA技术当前面临的物种参考序列数据库不完善等各类挑战; 提出了通过优化完善数据库、样品采集方法、评价指标和参数、样品保藏、数据分析和存储等来推动eDNA技术标准化和自动化, 以解决当前面临的挑战。同时, 基于eDNA技术当前的发展阶段, 提出了在我国水体结合专业形态分类鉴定开展水生生物eDNA技术标准化监测的实施建议。

**关键词:** 环境DNA技术; 标准化; 水生生物监测; 宏条形码测序技术; 宏基因组测序技术; eDNA数据库

中图分类号: S932 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2024)08-1443-16



水生生态系统为人类提供了至关重要的水资源, 用于满足农业、工业和家庭消费等方面的需求。然而, 在过去的一个世纪里, 由于人类对水生生态系统的压力急剧增加, 全球生物多样性持续下降, 水生生态系统正面临着日益严重的威胁, 对生态系统服务和地球健康产生了负面影响<sup>[1, 2]</sup>。水生生物在水生态系统中扮演着核心角色, 是研究水体演变的重要依据, 也是维护水生态健康的关键。水生生物种类众多、分布广泛、对环境变化敏感, 通过对水生生物的监测, 可以全面反映水环境状况, 为水污染治理提供真实、详尽的科学基础。然而, 传统的水生生物监测方法存在许多局限, 包括需要专业知识

高、时间和人力成本高、难以标准化和自动化、可能对环境造成破坏等诸多问题<sup>[3-8]</sup>。

随着科技的持续进步, 特别是DNA条形码技术和高通量测序技术的广泛应用, 环境DNA (Environmental DNA, 简称eDNA) 技术迅速发展。eDNA技术以其独特的优势, 为我们提供了一种非侵入性、高效的方式来探测和监测生物物种的存在和分布, 即使对于难以直接观察或捕捉的物种, 这项技术也能够胜任<sup>[9]</sup>。在环境监测领域, eDNA技术为水质、生态系统健康和环境污染的评估提供了有力工具。同时, 政府法规的制定及公众对生态监测和科学研究的日益关注也推动了eDNA技术的广

收稿日期: 2023-12-12; 修订日期: 2024-03-25

基金项目: 科技基础资源调查专项(2022FY100400); 第三次新疆综合科学考察项目(2021xjkk0604); 国家自然科学基金(U22A20454)资助 [Supported by the Science & Technology Fundamental Resources Investigation Program (2022FY100400); the Third Xinjiang Scientific Expedition Program (2021xjkk0604); the National Natural Science Foundation of China (U22A20454)]

作者简介: 谷思雨(1995—), 女, 博士; 研究方向为基因组学。E-mail: gusiuyu@ihb.ac.cn

通信作者: 王业耀, 博士, 研究员; E-mail: wangyy@cncmc.cn 缪炜, 博士, 研究员; E-mail: miaowei@ihb.ac.cn \*共同通信作者

泛应用。因此, eDNA技术的兴起代表了科学、环境保护和技术创新之间的协同作用, 为未来的生态和环境问题提供了有力的解决途径。

## 1 eDNA技术简介

eDNA是指生物体释放在环境中的DNA<sup>[10, 11]</sup>。eDNA有多种来源, 包括动物的细胞、皮肤、黏液、血液、分泌物、唾液、精子、卵、粪便、尿液和植物的根、叶、果实、花粉等释放出来的DNA分子, 甚至各种生物的腐烂体等。由于eDNA的来源多样、涵盖广泛, 使得研究者对于eDNA的概念存在一定争议。总体而言, eDNA的概念可分为广义和狭义两种。广义的eDNA概念包括微生物、中小型生物和大型生物群落的细胞内和细胞外DNA, 主要用于生物多样性调查和对不同生物类群进行环境监测等研究。另一种狭义的eDNA概念仅指大型生物释放到环境中的DNA (主要或仅限于细胞外DNA), 主要用于监测入侵或濒临灭绝的物种, 或者在生态学中用于调查动植物群落并研究水生生态系统中的生物多样性模式<sup>[12]</sup>。在实际采样中, 样品中eDNA的组成更符合广义eDNA概念, 因此被广泛使用<sup>[12]</sup>。

根据DNA样品的环境来源, 可以将eDNA分为水eDNA、沉积物eDNA、土壤eDNA或空气eDNA等<sup>[12]</sup>。水eDNA是指生物体释放的存在于水体中的DNA分子。水生生物的eDNA以各种形式存在于水体中, 包括来自生物排泄物、脱落的细胞、死亡细胞或分解组织的DNA片段<sup>[13, 14]</sup>、整个细胞或微生物体、已破裂或分解的细胞碎片<sup>[15, 16]</sup>、主动释放到环境中的细胞外DNA, 以及细菌和病毒DNA。

eDNA技术是指从环境样品(水体、土壤和沉积物等)中直接提取DNA片段后利用测序技术进行

定性或定量分析, 确定取样环境中生物的种类和数量, 以达到物种监测目的的技术<sup>[17, 18]</sup>。在水环境中的应用是其中的一个重要领域, 通过收集水环境样品, 提取DNA并进行高通量测序, 通过与已知的数据库进行对比来识别与样本中的DNA片段匹配的物种, 以确定哪些生物物种的eDNA存在于样本中(图1)。

## 2 eDNA技术的发展历程

由于自然界中很多微生物不可培养, 或者丰度极低, 并且基于培养的方法会严重扭曲自然环境中的微生物组成, 因此“环境DNA”即直接从环境样本中获取微生物DNA的想法开始萌芽<sup>[19, 20]</sup>。1987年, 环境DNA (eDNA)这个概念被首次提及<sup>[19]</sup>, 并报道了从沉积物提取环境DNA的操作规程<sup>[20]</sup>。这一研究推动eDNA技术进入了探索阶段(图2)。

1990年, Giovannoni等<sup>[21]</sup>首次基于16S核糖体DNA (16S rDNA)研究了细菌多样性, 他们利用聚合酶链式反应(PCR)从马尾藻海洋小浮游生物的自然种群中扩增16S rDNA基因克隆文库, 并进行系统发育分析, 揭示了新的微生物群SAR11及与富氧光合生物有关的谱系。随后, 1998年首次提出了宏基因组方法, 这种方法允许直接获取未培养的土壤生物的基因组<sup>[22]</sup>。2003年, DNA条形码概念的提出代表着eDNA技术正式兴起<sup>[23]</sup>, 通过文献计量, 发现关于“Environmental DNA”的出版物数目在2003年后出现大幅度增长(图2)。DNA条形码, 即利用一段较短的DNA序列作为物种快速鉴定的标记, 并希望以此建立DNA序列和生物物种之间一一对应的关系<sup>[23, 24]</sup>。例如线粒体细胞色素C氧化酶亚基 I (*CO I*) 基因区域能够区分动物界近亲物种<sup>[23, 25]</sup>。16S rDNA也常用于细菌鉴定<sup>[26]</sup>。核糖体DNA的内部转录间

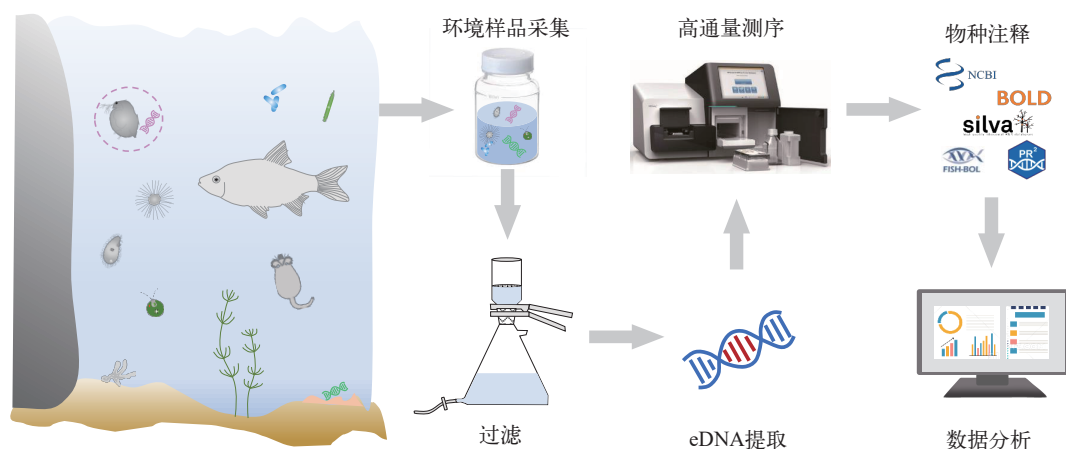


图1 eDNA技术的基本流程

Fig. 1 The workflow of eDNA technology

隔区(ITS)被用于真菌的研究<sup>[27]</sup>。还有许多其他标记基因也已被用于不同生物类群和系统发育水平的生物多样性分析, 包括18S rDNA、MiFish和rbcL等<sup>[28—32]</sup>。

测序技术为eDNA技术提供了强大的工具。在早期, 传统Sanger测序技术<sup>[33]</sup>为开发大型DNA条形码参考文库提供了最有效的方法。但是传统的DNA测序技术的限制在于测序通量低、速度相对较慢, 且成本较高, 因此在处理大规模样本和复杂DNA混合物时存在困难<sup>[24]</sup>。直到2005年, 高通量测序技术(二代测序技术)开始出现, 尤其是Illumina等高通量测序平台和技术的发展, 使得开展大规模eDNA测序得以实现。高通量测序平台具有更快的测序速度、更长的读取长度、更低的成本及更高的数据产出能力<sup>[24]</sup>。高通量测序技术与eDNA技术的结合, 推动了eDNA技术从探索阶段向验证阶段的迅速发展(图2)。通过使用高通量测序技术, 研究人员陆续开展了在海洋、淡水、土壤和肠道微生物群等各种生态系统的环境样本中的研究, 例如Ficetola等<sup>[17]</sup>通过水体eDNA, 监测了淡水样本中牛蛙的存在。利用COI DNA条形码的短片段, 用于从底栖动物样本中提供淡水大型无脊椎动物的物种水平鉴定<sup>[34]</sup>。利用对16S rDNA条形码测序研究饮食对小鼠肠道微生物组成的影响<sup>[35, 36]</sup>等。近年来第三代测序技术在长度和测序精度上的提升, 又对基于eDNA的水生生物多样性研究提供了助力。高通量测序技术的不断进步使得eDNA技术变得更加精确和可靠, 成为生物多样性研究和环境管理的重要工具。

目前, eDNA技术已经进入技术标准化阶段。在已进行的eDNA技术验证研究中, 逐渐认识到eDNA监测结果受各种因素影响<sup>[37, 38]</sup>。因此当前的研究焦点集中在制定和规范化eDNA监测技术标准<sup>[39—43]</sup>、呼吁实施eDNA监测技术的规范化<sup>[44, 45]</sup>, 这被视为进入技术常态化应用阶段的必要前提。近年来, 国内外陆续发布了关于eDNA监测技术标准化的文件和规范, 囊括了采样点选择(河流、湖泊、库塘等)、样品采集与处理(水、沉积物、生物膜、混合生物样等)、eDNA提取、eDNA分析(扩增、测序、注释、统计)等方面的规范化实施内容。这些努力推动了eDNA监测技术的标准化, 但在其所囊括的内容中还依然存在不少问题有待解决<sup>[40]</sup>, 并且还有一部分问题未受到充分的关注。

综合来看, eDNA监测技术目前正积极朝着标准化的方向发展, 未来5—10年或将是eDNA监测技术标准化急速发展的时期, 到2030年前后, 预期将基本完成采样方案、样品处理方法、分子实验方案、监测结果和评估方法的标准化。届时, 热点区域特定研究对象eDNA监测的样品重复检出度、eDNA降解时间周期、eDNA空间转移的有效距离、eDNA存在形态等eDNA生态学过程的关键参数将完成相应积累, 进而推动eDNA技术的广泛应用。

### 3 基于eDNA的水生生物监测技术

基于eDNA的水生生物调查方法主要可以分为三个方面, 包括特异性引物扩增测序、通用引物扩增测序和全部DNA测序(图3)。

特异性引物扩增测序是一种使用特定于目标

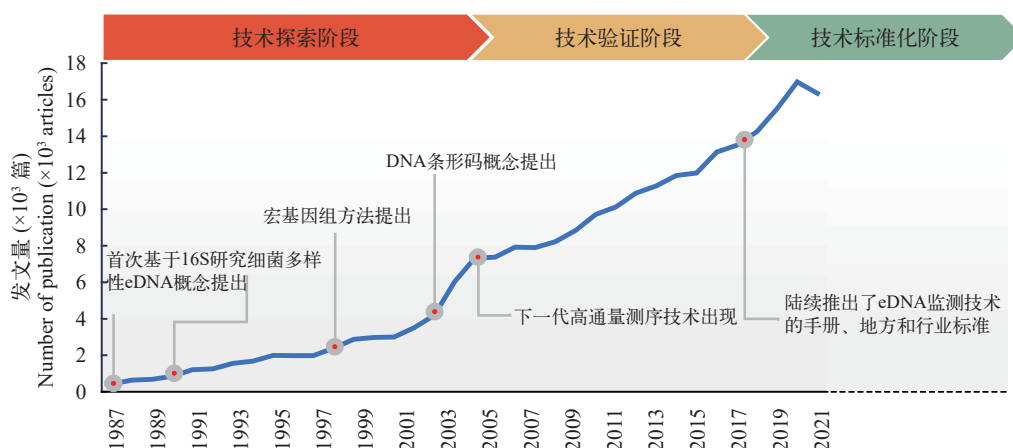


图2 eDNA技术相关论文发表情况及发展阶段

Fig. 2 Publications and development stages of eDNA technology

原始数据来源于Web of Science, 通过关键词“Environmental DNA”检索, 对每年相关发文章量进行计算

The raw data is obtained from Web of Science, where a search is performed using the keyword “Environmental DNA”, and the quantity of publications is computed for each year

物种的引物来扩增环境中存在的目标生物物种的DNA的方法。PCR、实时荧光定量PCR (qPCR)和微滴式数字PCR (ddPCR)是在环境DNA中进行物种特异性分析的主要手段。引物和探针的设计是基于目标生物物种已知的DNA序列,通过引物扩增得到目标物种特异性DNA片段,添加探针能够提高扩增的特异性,并获得eDNA浓度等关键信息。许多研究采用qPCR和ddPCR来量化鱼类种群的丰度<sup>[46-48]</sup>。通过特异性引物扩增测序对自然环境中的eDNA进行分析可以高效、敏感地揭示目标生物,尤其是对于稀有、濒危、保护和旗舰物种<sup>[49]</sup>,以及最新出现的入侵物种<sup>[50, 51]</sup>等,对于已知物种的监测具有特异性和准确性。

通用引物扩增测序的主要方法是宏条形码测序技术(Metabarcoding),是一种用于鉴定环境样本中多个物种的eDNA监测技术<sup>[23, 52, 53]</sup>。它通过通用引物扩增和测序获得环境中多种生物的特定DNA区域(原生动物和藻类推荐使用核糖体来源的基因;鱼类、底栖动物和枝角类等浮游动物推荐使用线粒体来源的基因;水生植物推荐使用叶绿体来源的基因)来实现(图4),可以用于更广泛的生物多样性调查<sup>[54]</sup>。宏条形码技术的优点包括高度特异性,通过通用引物选择性地扩增目标类群的DNA片段,针对特定的生物类群进行研究,从而提高监测特异性。此外,PCR扩增过程相对迅速和经济,适用于大批量样品的快速筛查和比较分析。然而,它也存在一些缺点,首先,具有引物依赖性,可能无法有效扩增未知物种或未充分描述的物种;其次,扩增过程可能引入偏差,使结果与实际物种组成偏离<sup>[55]</sup>;此外,基因进化速率差异可能会导致物种实际分化和进化速率不一致,加上物种分化的时间尺度差异,从而导致物种间的分辨率不尽相同,因此仅通过单

一的基因、较短的序列难以得到种水平的准确注释的,物种注释的准确性可能面临挑战。

全部DNA测序方法也称为宏基因组测序技术(Metagenomics),是对环境样品中的所有DNA进行测序,而不仅仅是特定引物扩增的部分。这种方法可以同时监测和识别环境中存在的多个物种的DNA<sup>[56, 57]</sup>。与宏条形码技术相比,宏基因组方法提供了更广泛的物种信息。宏基因组技术的优势包括无需特异引物,它对所有eDNA进行测序,能够获得来自不同类群多个物种的DNA序列信息,因此无需事先设计引物。并且,高通量测序技术可以同时产生大量的DNA序列数据,提供更详细和全面的物种组成信息,还可以获得功能基因信息。此外,它有能力识别新物种或未经充分描述的物种的DNA序列,具有更高的灵敏度。同时,它也可以识别和研究微生物中的新基因和新功能<sup>[58]</sup>,揭示微生物群落的功能潜力和代谢能力<sup>[57]</sup>,对于研究微生物在生态系统中的功能和相互作用具有重要意义<sup>[56, 59]</sup>。然而,宏基因组测序费用高、数据量庞大、分析和处理复杂度高、需要较强的计算资源和专业的分析方法,并且生物基因组的组装和注释存在挑战,尤其是对于未知物种和新功能的解析。

在宏基因组技术的基础上,进一步衍生出了线粒体宏基因组技术(Mito-metagenomics)<sup>[60]</sup>,它是直接应用宏基因组技术测序得到的reads与建立的目标生物完整线粒体基因组数据库进行比对,从而识别研究样品中存在的真核生物线粒体序列,进而获得目标生物群落的物种组成和丰度信息。这种方法的优势在于,能够准确识别混合样品中的物种,即使在存在同类物种的情况下,物种注释也能保持高度准确。有研究表明,这可能是替代宏条形码技术解决物种注释准确性的有效方法<sup>[60]</sup>。然而,线粒

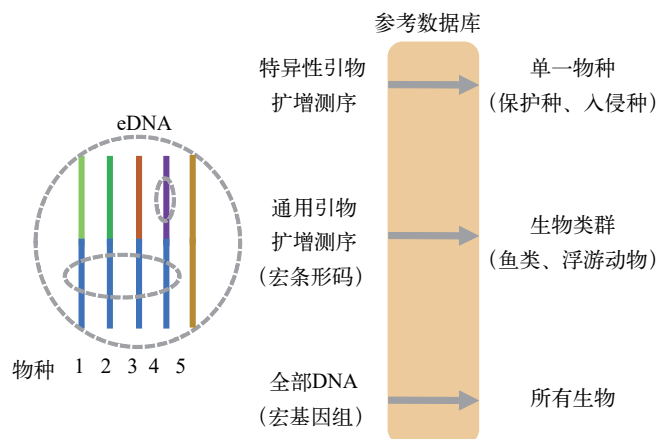


图3 基于eDNA的水生生物监测技术

Fig. 3 eDNA-based aquatic organism monitoring technology



体宏基因组技术也存在两个缺点, 一是线粒体序列在宏基因组中所占比例较低, 因此需要增加测序量; 二是不同物种细胞中线粒体的拷贝数存在差异, 因此直接使用比对结果来估算物种相对丰度可能不够准确。

综上所述, eDNA技术方法提供了多种有力的工具, 在水生生物的研究中都具有重要的应用价值, 可根据研究目标、样品特性、预算和研究资源等因素选择合适的方法。未来, 这些eDNA技术方法将继续在生态学、环境监测和物种保护等领域发挥关键作用(图 5)。随着技术的进一步发展, 我们可以期待更精确、更高通量和更经济的eDNA分析方法的出现, 从而更好地理解 and 保护我们周围的自然世界。

## 4 水生生物eDNA监测技术的应用

### 4.1 保护生物学与入侵生物学

**濒危和稀有物种保护与管理** 濒危和稀有物种一直是生物调查的难点, 由于其生物量少、密度低, 使用传统方法很难监测到<sup>[61]</sup>。同时, 传统的调查方法如围网、拖网、电鱼等对调查对象及其所在生境破坏性大。这些方法不但有可能起不到

物种调查的作用, 甚至有的物种会被干扰导致死亡, 进而加速物种衰退。eDNA技术作为一种非入侵性的调查方法, 可以弥补传统监测方法的不足, 研究人员可以使用eDNA技术来确定其分布范围和丰度, 进而制定保护策略。近年来, eDNA技术已经成功监测了美洲大鲵(*Cryptobranchus alleaniensis*)<sup>[62]</sup>、欧洲泥鳅(*Misgurnus fossilis*)<sup>[63]</sup>、澳洲麦氏鲈(*Macquaria australasica*)<sup>[49]</sup>等稀有或濒危动物, 并且还可以发现数量极少的物种, 如认为消失多年的巴基斯坦彩蛙(*Latonia nigriventer*)<sup>[64]</sup>。eDNA技术被认为是一种有价值的工具, 是目前用于珍稀鱼类监测的传统监测方法的有效补充。

**入侵物种监测** 外来入侵物种监测是非常必要的, 外来入侵物种不仅对本地生物多样性构成潜在威胁, 而且可能导致生态系统结构和功能的变化。及时有效的监测外来入侵物种可以提供预警机制, 使我们能够更早地识别和干预入侵事件。通过及时采取适当的控制措施, 可以尽早遏制入侵物种的扩散, 最大限度地减少其对当地生态系统和经济的影响。近年来, 利用eDNA技术监测水生生态系统中的外来入侵物种已经取得了很多成功的案例, 例如: 入侵法国的北美牛蛙(*Rana catesbeiana*)<sup>[17]</sup>、

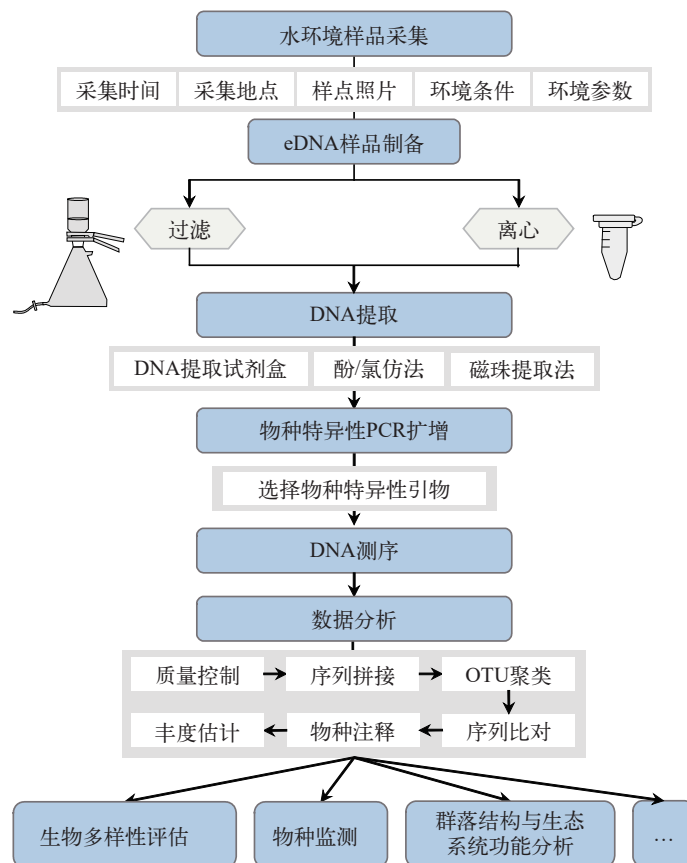


图 4 宏条形码测序技术的基本流程

Fig. 4 The workflow of metabarcoding sequencing technology

入侵美国的亚洲鲤(*Hypophthalmichthys molitrix*和*H. nobilis*)<sup>[65]</sup>、入侵欧洲的麦穗鱼(*Pseudorasbora parva*)<sup>[66]</sup>、入侵我国的眼斑拟石首鱼(*Sciaenops ocellatus*)<sup>[51]</sup>等,都证明了eDNA技术对于外来入侵物种监测的可行性。

#### 4.2 群落生物学

通过分析水中的eDNA,可以高效地监测水环境中存在的物种,包括鱼类、底栖动物、浮游动物、浮游植物和微生物等,并帮助确定它们的存在与分布范围。

在鱼类研究中,eDNA技术被广泛应用。科研人员可以通过分析水样中的鱼类eDNA,精确地监测水体中存在的不同鱼类物种,以及它们的分布和相对丰度。例如,Zhang等<sup>[67]</sup>使用eDNA宏条形码方法来评估3个不同大小水体的鱼类群落,并比较了在海岸线和内陆样本中捕获的鱼类物种丰富度。研究结果支持了基于eDNA的海岸线取样策略在生态系统中鱼类群落调查中的有效性,但也表明空间综合取样设计可以揭示单个物种更精细的分布模式。Wang等<sup>[68,69]</sup>利用eDNA方法研究了东海小黄鱼(*Larimichthys polyactis*)和大黄鱼(*Larimichthys crocea*)的分布和丰度,研究证明了eDNA方法在调查和监测重要海洋鱼类的自然资源方面的可行性和稳定性。

eDNA技术在水生底栖动物生物多样性方面的研究中也大有用处。底栖动物包括各种昆虫、蠕虫、甲壳类动物和软体动物。通过分析底栖动物的eDNA,可以确定存在于特定水体底栖环境中的各种物种,这提供了高效的生物多样性监测手段,有助于我们了解生态系统的健康状况以及环境变化的迹象。2021年,Lanzén等<sup>[70]</sup>应用eDNA宏条形码技术对全部底栖生物(针对后生动物COI基因和真核生物18S基因)进行了测序,通过比较宏条形码数据与形态分类数据之间的多样性、总体群落结构与物化参数的相关性来实现,评估宏条形码技术作为一种监测石油开采影响的技术的准确性。此外,还利用eDNA数据开发了新的生物指标,用于评估其在预测环境影响方面的性能。

浮游生物在水生态系统中扮演着重要的角色,eDNA技术可用于监测和研究它们的多样性和数量。通过分析浮游动物的eDNA,我们可以更深入地了解它们的季节性分布、食物链关系、生态功能以及对环境变化的响应。另一方面,通过分析浮游植物的eDNA,有助于监测富营养化、藻类水华问题,以及水体的整体健康状况。以白洋淀为例,2021年,陈家琪等<sup>[71]</sup>采用eDNA宏条形码测序技术,开展白洋淀微型生物群落监测,揭示了白洋淀微型

生物群落组成、序列数、多样性等的时空分布,全面揭示了白洋淀微型生物群落信息,印证了该技术的高效性和灵敏度。

eDNA技术不仅可以用于大型生物的研究,还可用于微生物群落的监测。分析水中微生物的eDNA有助于研究微生物多样性、污染物降解和水体生态系统的稳定性等。在Lee等<sup>[72]</sup>的研究中,基于eDNA的评估与传统的暴露评估(如化学和体外生物测定)一起应用,以评估受持久性有毒物质(PTSs)影响的底栖细菌群落的状况。研究描述了韩国西海岸淡水和海水沉积物样品中细菌群落的多样性和结构,并评估了它们与环境变量的关系,结果表明原位细菌群落的特征可以用于监测和评估沉积物质量。

#### 4.3 应用生物学

**生物多样性评估** eDNA技术可以提供水体中物种多样性的快速评估。通过对水样中的eDNA进行测序和分析,获得更全面的物种清单,并了解物种的相对丰度和分布格局。目前,该方法已广泛用于各大水体的物种多样性监测,包括海洋、湖泊、河流、池塘、沼泽和湿地等不同类型的水体<sup>[65,73-78]</sup>。这将有助于更好地了解生物多样性的分布和变化,为生态系统保护和管理提供重要的信息。

**早期疾病监测** eDNA技术在水生生物疾病监测方面也发挥着重要作用<sup>[79]</sup>。通过分析水体中的eDNA,监测对水生生物造成威胁的病原体及其可能宿主<sup>[80-83]</sup>。例如,鳃腺炎病毒、寄生虫和细菌等病原体会释放出DNA片段。通过监测病原体的存在和丰度变化,可以及早发现疾病暴发并采取适当的防控措施,以减轻对水生生物的影响。此外,eDNA技术还可用于研究水生生物与病原体之间的相互作用和物种-病原体关系<sup>[84]</sup>。通过分析水体中的eDNA,可以了解某一物种是否感染了特定的病原体,或者病原体的存在是否对该物种的生存和繁殖产生了影响。这有助于深入理解疾病的传播途径和潜在危害,为保护和管理水生生物提供科学依据。

**生态系统功能与生态健康评价** eDNA技术在生态系统功能与生态健康评价中的应用涵盖了多个关键领域。首先,可用于环境健康评估<sup>[85]</sup>,通过监测特定污染物、疾病或其他环境压力的影响,及早发现生态系统问题,以便采取纠正措施。此外,eDNA技术也支持食物网研究<sup>[86,87]</sup>,帮助我们理解生态系统内部的食物链和食物网络,揭示出食物网的复杂性。它还在生态系统服务研究中发挥关键作用<sup>[88,89]</sup>,用于评估生态系统提供的服务,如水质净化、土壤肥力和自然控制害虫,从而推动可持续资源管理。最后,eDNA技术在生态系统恢复方面

也有重要应用<sup>[90]</sup>, 用于监测植被和野生动物的重新引入效果, 确保受损生态系统的快速和有效恢复, 为生态环境的保护和重建提供了有力工具。

## 5 eDNA技术在水生生物监测中面临的挑战

尽管eDNA技术已经在多个领域得到了应用和发展, 并且已经验证了在水生生态系统中的灵敏性和有效性, 但仍存在一系列待解决的问题。例如, 生物是否都可被eDNA技术监测到? 监测到的生物是否能准确鉴定? 生物量多少? 这一系列问题妨碍了eDNA技术向技术常态化应用阶段的发展, 并且在eDNA监测数据转化为实际应用方面需要克服许多技术难题(图 6)。

### 5.1 eDNA来源的不确定性

在水体中, 水生生物eDNA的来源非常广泛, 包括活体、死亡个体、粪便、衰败的组织等。这可能导致eDNA的种类和数量在不同时间和空间发生变化, 从而引入样本来源的偏差和误差, 无法提供准确的物种存在和数量信息。此外, eDNA在水体中可以发生空间迁移, 无法排除来自采样区域之外的eDNA (异源eDNA) 被运输并沉积在采样区域的可能性<sup>[3, 91]</sup>, 比如通过捕食者的粪便沉积<sup>[92]</sup>, 捕食者、食腐动物或人类交通对死亡样本的运输, 含有eDNA的沉积物的重新安置(例如, 土壤和沉积物回收项目)或者养殖场、居民区的废水排放等<sup>[93]</sup>。虽然这些eDNA信号会随着时间的推移逐渐降解, 但针对eDNA来源对目标物种eDNA丰度和分布的潜在影响进行更有力的研究, 对实现eDNA技术成为可靠的生态监测工具至关重要。

### 5.2 假阴性、假阳性

eDNA技术在实际应用中存在假阴性和假阳性

的问题。假阴性指的是当目标物种实际存在于环境中时, 但通过eDNA分析未能监测到该物种的情况。假阴性可能由多种因素引起, 包括采样量不足、DNA降解、PCR反应抑制等<sup>[94, 95]</sup>。如果样本采集不全面或采样量过小, 目标物种的eDNA可能无法被充分提取, 从而导致监测不到。此外, eDNA在环境中容易受到各种因素的影响而降解, 例如氧化、紫外线辐射等, 这也可能导致目标物种的eDNA无法被监测到。另外, 一些环境条件或其他物质的存在可能会抑制PCR反应, 从而导致假阴性结果。

假阳性则是指当目标物种实际上不存在于环境中, 但通过eDNA分析却给出了阳性的结果。这可能由污染、交叉反应、PCR扩增错误等因素引起<sup>[96]</sup>。在样本收集和处理的過程中, 可能会发生外源性DNA的污染, 例如来自实验室或野外的其他物种DNA<sup>[97]</sup>。PCR扩增可能会出现交叉反应, 即在扩增过程中与目标物种的DNA片段具有相似序列的其他物种DNA被错误地扩增。此外, PCR反应本身也可能存在错误, 例如引物设计不准确或扩增条件设置不当, 这些都可能造成假阳性结果出现。

### 5.3 物种定量和丰度估计

使用eDNA技术来估计物种的丰度是充满挑战的。目前在水生生态系统中已经做了一些研究, 在自然水体中<sup>[98, 99]</sup>和人工水体中<sup>[100, 101]</sup>均证明了水体中eDNA组成与其高通量测序reads数间呈明显线性关系, eDNA技术可以利用物种特异性引物集和qPCR来测量相对种群丰度。但是由于eDNA的含量与物种的丰度之间的关系复杂且受到多种因素的影响, 如物种生物量、DNA释放速率和eDNA降解速率等。而且, eDNA的浓度受到多种干扰因素

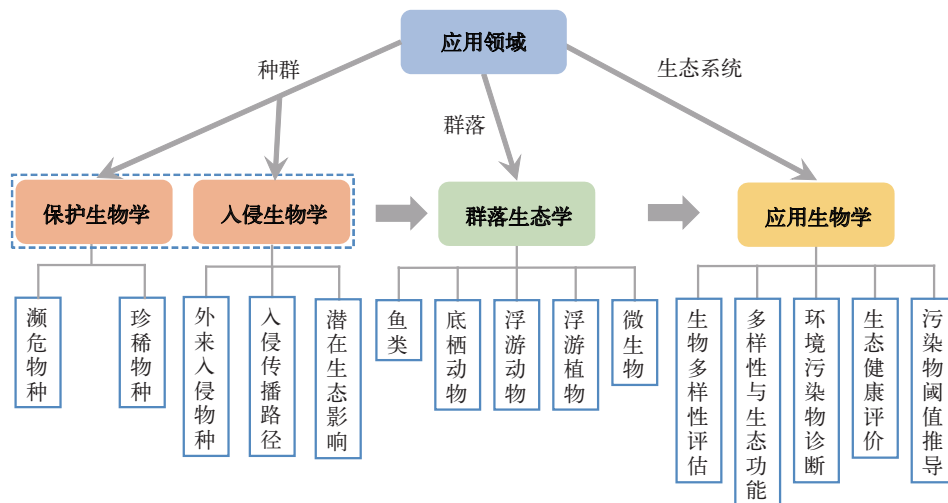


图 5 水生生物eDNA技术的应用

Fig. 5 Application of aquatic eDNA technology

的影响,例如环境条件、生物体特性、样品处理和DNA提取过程等。这些因素可能导致eDNA的浓度在不同样品之间存在差异,进而影响物种的定量和丰度估计<sup>[97]</sup>。因此,需要继续研究eDNA的起源、状态、趋势和传输如何影响丰度的估计,才能更好地理解在估计丰度时产生的误差<sup>[9]</sup>。迄今为止,虽然准确地定量物种仍是一个挑战,可以看出eDNA技术对于评估物种生物量具有良好的应用前景。后续的发展方向一方面可尝试建立不同物种/类群个体数目与eDNA相对丰度之间的相关关系和模型,利用类似标准曲线法通过DNA相对丰度进行物种/类群定量;另一方面,对于部分重要物种,可通过研究不同个体,筛选其差异DNA序列,以序列的多样性来评估环境中该物种的个体数目,实现定量分析。

#### 5.4 数据库的缺失

尽管在过去十几年中eDNA技术得到广泛应用,但由于缺乏一个统一完整的eDNA条形码数据库,该技术的推广受到限制。目前存在一些常见的数据库,如NCBI、SILVA、PR2、BLOD等,然而这些数据库存在问题。NCBI是全球最大的核酸序列库,但由于数据是由各研究者自行上传,其质量参差不齐,这导致其中存在大量冗余和错误的序列,从而影响了其作为参考数据库的准确性。而SILVA、PR2和BLOD等数据库则存在一定的偏好性,只针对部分类群进行数据收集,覆盖范围较

小。其中,SILVA数据库是包含了细菌、古菌和真核生物rDNA基因的综合数据库,但更侧重于原核生物。PR2为针对真核微生物核糖体小亚基SSU rDNA基因的数据库,主要以原生生物为主。BLOD为真核生物条形码数据库。因此,在当前的研究中,由于数据库的不完善,常常出现无法准确鉴定甚至错误鉴定水生生物物种的情况。

## 6 水生生物eDNA监测技术的标准化

在eDNA采集和分析过程中,不同实验室和研究者之间可能存在方法差异和技术偏差,这可能导致结果的不可比性和不确定性。建立一套统一的标准化流程,并开展大规模的验证研究,有助于提高eDNA技术的可靠性和可重复性。

### 6.1 准确和完善的物种条形码参考数据库

eDNA数据库是支持eDNA技术应用的最为重要的基础资源之一。建立全面准确的eDNA参考数据库被视为该技术的关键要素。当前数据分析主要依赖于公共数据库,一方面缺乏针对我国各类水体中水生生物eDNA参考序列,另一方面,公共数据库存在部分数据来源杂、可信度不高的缺点。同时,公共数据库具有不同类型的授权策略,因此在未来常态化监测甚至商业应用中可能存在一定障碍。针对上述问题,目前,我国各单位、高校和公司已经在积极构建eDNA条形码参考序列数据库。中国科学院水生生物研究所牵头构建了水生生物eDNA

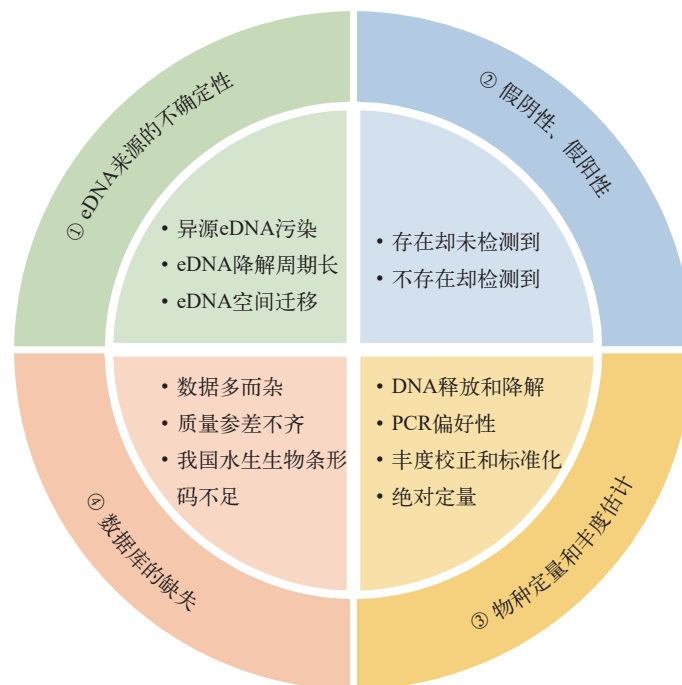


图6 eDNA技术在水生态系统监测中面临的挑战

Fig. 6 Challenges of eDNA technology in aquatic ecosystem monitoring



数据库(AeDNA, <http://aedna.ihb.ac.cn/>)<sup>[102]</sup>。该数据库整合了DNA条形码和基因组两种类型的参考序列, 包括18S、28S、ITS、*CO I*、12S、*rbcL*等各类DNA条形码, 总计60余万条。覆盖了鱼类、水生植物、底栖动物、浮游动物及浮游植物等五大生态类群, 涉及超过6万种水生生物。数据库包含了各种水域环境, 如江、河、湖、海、湿地、冰川和温泉, 构建团队贡献了6万余条参考序列, 提供了我国丰富的各类水体生境信息。水生生物eDNA数据库是目前我国覆盖类群最广, 含有我国水生生物条形码序列最多的数据库。另外, 其他单位也在积极构建相关参考序列数据库。如南京农业大学牵头成功构建了中国淡水底栖无脊椎动物条形码数据库(含800余个底栖动物物种, 1100余条线粒体*CO I*条形码)<sup>[103]</sup>; 美格基因收集了多个公共数据库, 构建了包括*CO I*、12S、18S、16S等常见宏条形码标志基因的参考序列库(<http://cloud.magigene.com>)。这些数据库的建设不仅为科学研究提供了强大的支持, 还促进了数据的共享和合作, 有助于推动我国在水生生物领域的研究和保护工作。

未来, 针对我国不同水体中的水生生物, 建立相应的生境、流域和水生生物类群的条形码序列数据库对准确鉴定和监测水生生物至关重要。因此, 可能需要大力建设各类重要水体的水生生物条形码参考序列库。从策略上来讲, 对于重点监测类群, 比如鱼类, 可采用传统形态分类加条形码测序的方法建库。而对于微型生物而言, 监测的目的本身可能只关注大的功能类群, 加之其本身形态鉴定较为困难, 难以实现种阶元的鉴定, 可采用新兴的高通量建库方法, 如三代测序, 同时辅以重点指示种类传统建库。

## 6.2 标准化的野外和实验室流程

针对应用eDNA技术的局限性, 第二个关键要素是建立一套标准化的野外和实验室操作流程, 核心在于确保在不同地点和研究项目中能够以一致的方式收集、处理和分析eDNA样本, 从而保证数据的可比性和结果的可信度。

在野外方面, 标准化的操作流程包括采样方法的选择、采集设备的选择和维护、样本的正确保存和标识、以及采集信息的记录<sup>[39, 61, 104–106]</sup>。这些流程必须经过精心设计和细致操作, 防止样本污染和数据失真, 确保野外数据的质量。

在实验室方面, 标准化的操作流程包括样本的制备<sup>[15, 106]</sup>、DNA提取<sup>[107–110]</sup>、PCR扩增<sup>[111–118]</sup>、测序和数据分析<sup>[39]</sup>。这意味着这些步骤都要遵循一致的步骤和方法, 这有助于降低误差, 提高数据

的一致性和可重复性。同时, 建立标准化的实验室流程还能够确保不同实验室之间的结果可以相互比较, 从而推动更广泛的合作和共享数据。

## 6.3 指标/参数/评价体系

克服eDNA技术应用局限性的另一重要对策是为不同的生物类群建立定制的指标、参数和评价体系, 关键在于认识到不同的生物类群在eDNA监测中可能表现出不同的特征和行为, 因此需要适应性强的评估工具来更准确地了解它们的存在和丰度。

以水生生态系统为例, 每个水生生物类群都可能对环境有独特的响应, 因此建立特定的指标和参数对于深入研究和有效监测至关重要。这包括确定哪些基因或序列片段最适合用于特定类群的监测, 以及需要考虑哪些生物学特征和生态环境因素可获得准确的丰度信息。例如, 对于鱼类, 可能需要考虑其生活史、洄游习惯和栖息地选择等因素, 而对于浮游植物, 可能需要关注其季节性和环境耐受性。此外, 不同的评价体系可以根据类群的特点来设计, 以更好地反映它们在生态系统中的作用和重要性。这可以包括建立丰度指数、多样性指标或生态功能参数, 以更全面地评估水生生物群落的健康和稳定性。

## 6.4 样品保藏、数据分析和存储

样品保藏、数据分析和存储方面建立标准化的流程也是非常重要的。随着eDNA技术的发展, 研究人员在野外采样、实验室操作和生物信息数据处理过程中所使用的方法和程序需要遵守高透明度的原则, 从而提高eDNA监测技术的可重复性和可信度<sup>[9, 119]</sup>。

**样品保藏** 在环境监测过程中, 将会产生大量的样品, 包括已制备的eDNA测序样品和已完成提取的DNA样品。建立标准化的样品收集、标记和储存流程可以有效防止样品污染、降解或丢失。环境样品在制备完成后应迅速冷冻保存(−80℃或液氮)或脱水保存<sup>[120]</sup>(在有条件后应尽快存入−20℃或−80℃超低温冰箱, 可延长保存时间), 并使用标签记录重要信息, 如采集时间和地点等。已完成提取的DNA样品应做好标记后保存于−80℃超低温冰箱, 避免反复冻融。

**数据分析** 数据分析是eDNA技术的核心部分, 建立标准化的数据处理和分析流程可以确保结果的一致性和可重复性。建立统一的数据处理过程包括序列质量控制、去除污染序列、物种鉴定和丰度估计等步骤。此外, 数据处理和分析流程应具备可再现性<sup>[121]</sup>。对eDNA数据的预处理、聚类 and 物种注释的步骤和方法提供详细的描述和文档,

这包括使用的工具、软件和算法,以及参数设置和数据过滤的准则,并存储在一个补充存储库中,如 DRYAD(<http://datadryad.org/>)、Github(<https://github.com/github>)或 FIGSHARE (<http://figshare.com>)<sup>[9]</sup>。Sandve等<sup>[121]</sup>提出了计算研究可重复性可遵循的10条规则,确保描述足够清晰和详尽,以使其他研究人员能够重现数据处理和分析过程。

**数据存储** 数据存储方面的标准化涉及到数据的长期保存和共享。建立合适的数据存储和管理系统,包括数据的记录 and 数据的归档,有助于确保数据的安全性和可访问性。此外,促进数据共享和开放获取是提高eDNA研究效益的关键因素,因此需要制定共享政策和标准数据格式。

数据存储分为公开和非公开两种方式。首先,公开可共享的来自任何高通量测序的原始FASTQ文件都可提交到公共数据库,对于中国而言,国家基因组科学数据中心(National Genomics Data Center, NGDC)的数据管理体系GSA (Genome Sequence Archive)是一个很好的选择。此外,也可以选择提交到美国的NCBI的SRA (Sequence Read Archive)数据库或欧洲核苷酸序列ENA (European Nucleotide Archive)数据库。如涉及到国家和各级政府部门实施的项目,可以按规定将数据保存到国家指定的数据平台,如国家微生物科学数据中心(National Microbiology Data Center)等。如涉及到非公开的监测数据,相关单位可自行建立小型数据存储中心或采用数据云服务,实现数据的集中存储、备份和管理,有助于确保数据的安全性和可管理性。

此外,相关的数据信息,如样品采集地点和时间、采样方法、实验处理步骤、环境条件等,对于其他研究人员理解和使用数据至关重要。数据报告和标准可以参考基因组学领域的MIGS (Minimum Information about a Genome Sequence)和MIXS (Minimum Information about any (x) Sequence)标准<sup>[122]</sup>。这些标准定义了关于基因组学和序列数据的最低信息要求,包括实验设计、数据处理、样品信息等,有助于确保报告的信息充分、一致和可比。

总之,通过在样品保藏、数据分析和存储方面建立标准化流程,研究人员可以更有效地利用eDNA技术进行长期的生态研究和监测工作。这不仅有助于提高数据质量、可比性和可信度,还促进了科学合作和数据共享,从而更好地推动了环境保护和生物多样性研究的进展。

## 6.5 水生生物eDNA监测技术标准化实施的策略

为了推动水生生物eDNA监测技术标准化实施,可考虑制定相关的规范手册和标准。

规范手册和标准应包括样品采集(人类活动区、排放区、养殖区)、样品前处理(过滤方法、滤膜选择)、实验操作(DNA提取)、引物选择(鱼类、植物、浮游生物、底栖动物等)和数据分析(参考数据库、物种注释阈值、阳性/阴性阈值)等方面的操作建议,以提高水生生物eDNA监测的准确性和可重复性。

同时可考虑开展水生生物eDNA监测技术标准化实施的试点工作。试点工作可以在少数重点水体优先展开,例如松花江流域和赤水河流域等河流生态系统,太湖、滇池和洱海等湖泊生态系统,以及丹江口水库等水库生态系统。在试点工作进行时,可以优先考虑鱼类、底栖动物和浮游生物等几大类群,并将传统形态鉴定与eDNA监测同时进行。一方面可结合形态学鉴定方法构建不同生境、流域的水生生物eDNA条形码参考序列库。另一方面,可对两类数据进行比较,考察eDNA技术标准化流程的准确性和适用性,从而进行优化完善,推进eDNA技术的常态化应用。

在鉴定策略上,有必要设置合适的物种鉴定阈值和置信值。按置信值确定可注释分类阶元,以保证鉴定结果的可靠性。可根据不同生境和流域的水生生物条形码参考序列子库,结合需常态化监测的物种,设置物种清单,确保清单内物种的鉴定准确性。同时,结合通用库,实现清单外物种的鉴定(如入侵种、新种等)。总体来说,在鉴定策略上可对鉴定结果进行分级,以保证结果的准确性。

## 7 总结与展望

eDNA技术在生物多样性研究和环境监测中具有广阔的前景。它为生物多样性评估、物种监测与保护、早期疾病监测与生态健康评估、以及水质监测等方面提供了一种高效、准确和非侵入性的方法。随着技术的不断发展和应用的扩展,eDNA技术展现出了在水生生态系统保护中的巨大潜能。

在未来的研究中,eDNA技术的发展应聚焦于以下几个方面:(1)技术改进和方法标准化:未来的研究将致力于改进eDNA技术的灵敏度、分辨率和高通量性。这包括开发更先进的DNA提取、测序和分析方法,以提高数据的准确性和可靠性。此外,还需要标准化和统一eDNA样品的采集、处理和分析流程,以确保结果的可比性和重复性。(2)多样性评估与功能研究:除了物种鉴定和监测,未来的研究将关注对eDNA数据的更深入分析,以了解生物多样性的动态变化和生态功能。这可能包括通过分析eDNA数据中的基因组和功能元素,揭示物种之间

的相互作用和生态功能。这将有助于更好地理解生物多样性的维持机制和生态系统的功能, 并为生态恢复和可持续发展提供支持。(3)大数据和生物信息学: 随着eDNA数据的快速积累, 未来的研究将涉及对大规模eDNA数据的处理、管理和分析。这将需要发展高效的生物信息学工具和算法, 以应对海量数据的挖掘和解读。同时, 还需要建立数据共享和协作平台, 促进多学科间的合作与交流。(4)应用领域的拓展: 未来的研究将进一步扩展eDNA技术各个领域的应用范围。还可以将eDNA技术与其他监测方法和技术相结合, 如遥感、传感器网络和人工智能等, 以实现更全面、精确和多尺度的环境监测。

总体而言, eDNA技术的发展可按定性、定量、功能分析三步走战略, 通过技术改进、方法标准化、数据库标准化, 实现物种定性监测的标准化和常态化。在此基础上, 探索基于eDNA定量监测水生生物的方法, 最终实现利用eDNA对生态系统功能进行评估, 为水生生物多样性保护、生态系统管理和环境决策提供支撑。

(作者声明本文符合出版伦理要求)

#### 参考文献:

- [1] He Q, Silliman B R. Climate change, human impacts, and coastal ecosystems in the anthropocene [J]. *Current Biology*, 2019, **29**(19): R1021-R1035.
- [2] Pimm S L, Jenkins C N, Abell R, *et al.* The biodiversity of species and their rates of extinction, distribution, and protection [J]. *Science*, 2014, **344**(6187): 1246752.
- [3] Darling J A, Mahon A R. From molecules to management: adopting DNA-based methods for monitoring biological invasions in aquatic environments [J]. *Environmental Research*, 2011, **111**(7): 978-988.
- [4] Dejean T, Valentini A, Miquel C, *et al.* Improved detection of an alien invasive species through environmental DNA barcoding: the example of the American bullfrog *Lithobates catesbeianus* [J]. *Journal of Applied Ecology*, 2012, **49**(4): 953-959.
- [5] Drinkwater E, Robinson E J H, Hart A G. Keeping invertebrate research ethical in a landscape of shifting public opinion [J]. *Methods in Ecology and Evolution*, 2019, **10**(8): 1265-1273.
- [6] Rosati M, Cantonati M, Fenoglio S, *et al.* Is there an ideal protocol for sampling macroinvertebrates in springs [J]? *Journal of Freshwater Ecology*, 2016, **31**(2): 199-209.
- [7] Kelly R P, Port J A, Yamahara K M, *et al.* Using environmental DNA to census marine fishes in a large mesocosm [J]. *PLoS One*, 2014, **9**(1): e86175.
- [8] Wheeler Q D, Raven P H, Wilson E O. Taxonomy: impediment or expedient [J]? *Science*, 2004, **303**(5656): 285.
- [9] Deiner K, Bik H M, Mächler E, *et al.* Environmental DNA metabarcoding: transforming how we survey animal and plant communities [J]. *Molecular Ecology*, 2017, **26**(21): 5872-5895.
- [10] Bohmann K, Evans A, Gilbert M T P, *et al.* Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring [J]. *Trends in Ecology & Evolution*, 2014, **29**(6): 358-367.
- [11] Thomsen P F, Willerslev E. Environmental DNA—An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity [J]. *Biological Conservation*, 2015(183): 4-18.
- [12] Pawlowski J, Apothéloz-Perret-Gentil L, Altermatt F. Environmental DNA: what's behind the term? Clarifying the terminology and recommendations for its future use in biomonitoring [J]. *Molecular Ecology*, 2020, **29**(22): 4258-4264.
- [13] Kelly R P, Port J A, Yamahara K M, *et al.* Environmental monitoring. Harnessing DNA to improve environmental management [J]. *Science*, 2014, **344**(6191): 1455-1456.
- [14] Sassoubre L M, Yamahara K M, Gardner L D, *et al.* Quantification of environmental DNA (eDNA) shedding and decay rates for three marine fish [J]. *Environmental Science & Technology*, 2016, **50**(19): 10456-10464.
- [15] Cooper M K, Villacorta-Rath C, Burrows D, *et al.* Practical eDNA sampling methods inferred from particle size distribution and comparison of capture techniques for a Critically Endangered elasmobranch [J]. *Environmental DNA*, 2022, **4**(5): 1011-1023.
- [16] Turner C R, Barnes M A, Xu C C Y, *et al.* Particle size distribution and optimal capture of aqueous microbial eDNA [J]. *Methods in Ecology and Evolution*, 2014, **5**(7): 676-684.
- [17] Ficetola G F, Miaud C, Pompanon F, *et al.* Species detection using environmental DNA from water samples [J]. *Biology Letters*, 2008, **4**(4): 423-425.
- [18] Haile J, Froese D G, MacPhee R D E, *et al.* Ancient DNA reveals late survival of mammoth and horse in interior Alaska [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, **106**(52): 22352-22357.
- [19] Brock T D. The Study of Microorganisms in Situ Progress and Problems [M]. Cambridge University Press, 1987: 1-17.
- [20] Ogram A, Sayler G S, Barkay T. The extraction and purification of microbial DNA from sediments [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 1987, **7**(2/3): 57-66.
- [21] Giovannoni S J, Britschgi T B, Moyer C L, *et al.* Genetic

- diversity in Sargasso Sea bacterioplankton [J]. *Nature*, 1990, **345**(6270): 60-63.
- [22] Handelsman J, Rondon M R, Brady S F, *et al.* Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products [J]. *Chemistry & Biology*, 1998, **5**(10): R245-R249.
- [23] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, *et al.* Biological identifications through DNA barcodes [J]. *Proceedings. Biological sciences*, 2003, **270**(1512): 313-321.
- [24] Shokralla S, Spall J L, Gibson J F, *et al.* Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research [J]. *Molecular Ecology*, 2012, **21**(8): 1794-1805.
- [25] Meusnier I, Singer G A C, Landry J F, *et al.* A universal DNA mini-barcode for biodiversity analysis [J]. *BMC Genomics*, 2008(9): 214.
- [26] Flanagan J L, Brodie E L, Weng L, *et al.* Loss of bacterial diversity during antibiotic treatment of intubated patients colonized with *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2007, **45**(6): 1954-1962.
- [27] Nilsson R H, Kristiansson E, Ryberg M, *et al.* Intraspecific ITS variability in the Kingdom fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification [J]. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 2008(4): 193-201.
- [28] Miya M, Sato Y, Fukunaga T, *et al.* MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species [J]. *R Royal Society Open Science*, 2015, **2**(7): 150088.
- [29] Hugerth L W, Muller E E L, Hu Y O O, *et al.* Systematic design of 18S rRNA gene primers for determining eukaryotic diversity in microbial consortia [J]. *PLoS One*, 2014, **9**(4): e95567.
- [30] Karst S M, Dueholm M S, McIlroy S J, *et al.* Retrieval of a million high-quality, full-length microbial 16S and 18S rRNA gene sequences without primer bias [J]. *Nature Biotechnology*, 2018, **36**(2): 190-195.
- [31] Zhang S, Zhao J, Yao M. A comprehensive and comparative evaluation of primers for metabarcoding eDNA from fish [J]. *Methods in Ecology and Evolution*, 2020, **11**(12): 1609-1625.
- [32] Miya M, Gotoh R O, Sado T. MiFish metabarcoding: a high-throughput approach for simultaneous detection of multiple fish species from environmental DNA and other samples [J]. *Fisheries Science*, 2020, **86**(6): 939-970.
- [33] Sanger F, Nicklen S, Coulson A R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1977, **74**(12): 5463-5467.
- [34] Hajibabaei M, Shokralla S, Zhou X, *et al.* Environmental barcoding: a next-generation sequencing approach for biomonitoring applications using river benthos [J]. *PLoS One*, 2011, **6**(4): e17497.
- [35] Murphy E F, Cotter P D, Healy S, *et al.* Composition and energy harvesting capacity of the gut microbiota: relationship to diet, obesity and time in mouse models [J]. *Gut*, 2010, **59**(12): 1635-1642.
- [36] Serino M, Luche E, Gres S, *et al.* Metabolic adaptation to a high-fat diet is associated with a change in the gut microbiota [J]. *Gut*, 2012, **61**(4): 543-553.
- [37] Cristescu M E, Hebert P D N. Uses and misuses of environmental DNA in biodiversity science and conservation [J]. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 2018(49): 209-230.
- [38] Darling J A, Pochon X, Abbott C L, *et al.* The risks of using molecular biodiversity data for incidental detection of species of concern [J]. *Diversity & Distributions*, 2020, **26**(9): 1116-1121.
- [39] Yang H L, Wu J M, Zhang H, *et al.* Environmental DNA metabarcoding utilization efficiency in monitoring large river fish species composition: a case study in the Wuhan transect of the Yangtze River [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2021, **28**(6): 796-807. [杨海乐, 吴金明, 张辉, 等. 大型河流中鱼类组成的eDNA监测效率: 以长江武汉江段为例 [J]. 中国水产科学, 2021, **28**(6): 796-807.]
- [40] Loeza-Quintana T, Abbott C L, Heath D D, *et al.* Pathway to Increase Standards and Competency of eDNA Surveys (PISCeS)—advancing collaboration and standardization efforts in the field of eDNA [J]. *Environmental DNA*, 2020, **2**(3): 255-260.
- [41] Yang H, Du H, Qi H, *et al.* Effectiveness assessment of using riverine water eDNA to simultaneously monitor the riverine and riparian biodiversity information [J]. *Scientific Reports*, 2021, **11**(1): 24241.
- [42] Leese F, Bouchez A, Abarenkov K, *et al.* Why We Need Sustainable Networks Bridging Countries, Disciplines, Cultures and Generations for Aquatic Biomonitoring 2.0: a Perspective Derived from the DNAqua-net COST Action [M]. *Next Generation Biomonitoring: Part 1*. Amsterdam: Elsevier, 2018: 63-99.
- [43] Minamoto T, Miya M, Sado T, *et al.* An illustrated manual for environmental DNA research: water sampling guidelines and experimental protocols [J]. *Environmental DNA*, 2021, **3**(1): 8-13.
- [44] Dickie I A, Boyer S, Buckley H L, *et al.* Towards robust and repeatable sampling methods in eDNA-based studies [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2018, **18**(5): 940-952.
- [45] Nicholson A, McIsaac D, Macdonald C, *et al.* An analysis of metadata reporting in freshwater environmental DNA research calls for the development of best practice guidelines [J]. *Environmental DNA*, 2020, **2**(3): 343-349.
- [46] Jiang W, Zhao H, Deng J, *et al.* Detection of aquatic



- species using environmental DNA [J]. *Journal of Hydroecology*, 2016, **37**(5): 1-7. [姜维, 赵虎, 邓捷, 等. 环境DNA分析技术——一种水生生物调查新方法 [J]. 水生生态学杂志, 2016, **37**(5): 1-7.]
- [47] Yan H G, Dong Z L, Ma T T, *et al.* Detection and biomass assessment of *Procypris rabaudi* based on environmental DNA [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2022, **46**(6): 1018-1026. [闫卉果, 董智玲, 马婷婷, 等. 基于环境DNA的岩原鲤检测及生物量评估 [J]. 水产学报, 2022, **46**(6): 1018-1026.]
- [48] Capo E, Spong G, Koizumi S, *et al.* Droplet digital PCR applied to environmental DNA, a promising method to estimate fish population abundance from humic-rich aquatic ecosystems [J]. *Environmental DNA*, 2021, **3**(2): 343-352.
- [49] Cardás J B, Deconinck D, Márquez I, *et al.* New eDNA based tool applied to the specific detection and monitoring of the endangered European eel [J]. *Biological Conservation*, 2020(250): 108750.
- [50] Takahara T, Minamoto T, Doi H. Using environmental DNA to estimate the distribution of an invasive fish species in ponds [J]. *PLoS One*, 2013, **8**(2): e56584.
- [51] Wang X, Zhang H, Lu G, *et al.* Detection of an invasive species through an environmental DNA approach: the example of the red drum *Sciaenops ocellatus* in the East China Sea [J]. *The Science of the Total Environment*, 2022(815): 152865.
- [52] Cristescu M E. From barcoding single individuals to metabarcoding biological communities: towards an integrative approach to the study of global biodiversity [J]. *Trends in Ecology & Evolution*, 2014, **29**(10): 566-571.
- [53] Lamb P D, Hunter E, Pinnegar J K, *et al.* How quantitative is metabarcoding: a meta-analytical approach [J]. *Molecular Ecology*, 2019, **28**(2): 420-430.
- [54] Ji Y, Ashton L, Pedley S M, *et al.* Reliable, verifiable and efficient monitoring of biodiversity via metabarcoding [J]. *Ecology Letters*, 2013, **16**(10): 1245-1257.
- [55] Bik H M, Porazinska D L, Creer S, *et al.* Sequencing our way towards understanding global eukaryotic biodiversity [J]. *Trends in Ecology & Evolution*, 2012, **27**(4): 233-243.
- [56] New F N, Brito I L. What is metagenomics teaching us, and what is missed [J]? *Annual Review of Microbiology*, 2020(74): 117-135.
- [57] Hugenholtz P, Tyson G W. Metagenomics [J]. *Nature*, 2008(455): 481-483.
- [58] Béjà O, Aravind L, Koonin E V, *et al.* Bacterial rhodopsin: evidence for a new type of phototrophy in the sea [J]. *Science*, 2000, **289**(5486): 1902-1906.
- [59] Kunin V, Copeland A, Lapidus A, *et al.* A bioinformatician's guide to metagenomics [J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2008, **72**(4): 557-578.
- [60] Garrido-Sanz L, Senar M À, Piñol J. Relative species abundance estimation in artificial mixtures of insects using mito-metagenomics and a correction factor for the mitochondrial DNA copy number [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2022, **22**(1): 153-167.
- [61] Shan X J, Li M, Wang W J. Application of environmental DNA technology in aquatic ecosystem [J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, **39**(3): 23-29. [单秀娟, 李苗, 王伟继. 环境DNA (eDNA)技术在水生生态系统中的应用研究进展 [J]. 渔业科学进展, 2018, **39**(3): 23-29.]
- [62] Olson Z H, Briggler J T, Williams R N. An eDNA approach to detect eastern hellbenders (*Cryptobranchus a. alleganiensis*) using samples of water [J]. *Wildlife Research*, 2012, **39**(7): 629.
- [63] Sigsgaard E E, Carl H, Møller P R, *et al.* Monitoring the near-extinct European weather loach in Denmark based on environmental DNA from water samples [J]. *Biological Conservation*, 2015(183): 46-52.
- [64] Renan S, Gafny S, Bina Perl R G, *et al.* Living quarters of a living fossil-Uncovering the current distribution pattern of the rediscovered Hula painted frog (*Latonia nigriventer*) using environmental DNA [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2017, **26**(24): 6801-6812.
- [65] Jerde C L, Mahon A R, Chadderton W L, *et al.* "Sight-unseen" detection of rare aquatic species using environmental DNA [J]. *Conservation Letters*, 2011, **4**(2): 150-157.
- [66] Davison P I, Copp G H, Créach V, *et al.* Application of environmental DNA analysis to inform invasive fish eradication operations [J]. *Die Naturwissenschaften*, 2017, **104**(3/4): 35.
- [67] Zhang S, Lu Q, Wang Y, *et al.* Assessment of fish communities using environmental DNA: effect of spatial sampling design in lentic systems of different sizes [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2020, **20**(1): 242-255.
- [68] Wang X Y, Lu G Q, Zhao L L, *et al.* Assessment of fishery resources using environmental DNA: small yellow croaker (*Larimichthys polyactis*) in East China Sea [J]. *PLoS One*, 2020, **15**(12): e0244495.
- [69] Wang X Y, Lu G Q, Zhao L L, *et al.* Assessment of fishery resources using environmental DNA: the large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) in the East China sea [J]. *Fisheries Research*, 2021(235): 105813.
- [70] Lanzén A, Dahlgren T G, Bagi A, *et al.* Benthic eDNA metabarcoding provides accurate assessments of impact from oil extraction, and ecological insights [J]. *Ecological Indicators*, 2021(130): 108064.
- [71] Chen J Q, Dong L, Ma X M, *et al.* Microbial community monitoring in Baiyangdian Lake based on eDNA technology [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2021, **40**(8): 1773-1786. [陈家琪, 董丽, 麻晓梅, 等. 基于eDNA技术的白洋淀微型生物群落监测 [J]. 农业环境科学学报, 2021, **40**(8): 1773-1786.]
- [72] Lee A H, Lee J, Hong S, *et al.* Integrated assessment of

- west coast of South Korea by use of benthic bacterial community structure as determined by eDNA, concentrations of contaminants, and *in vitro* bioassays [J]. *Environment International*, 2020(137): 105569.
- [73] Stoeckle M Y, Jason A, Zachary C P, *et al.* Trawl and eDNA assessment of marine fish diversity, seasonality, and relative abundance in coastal New Jersey, USA [J]. *ICES Journal of Marine Science*, 2021, **78**(1): 293-304.
- [74] Zou K, Chen J, Ruan H, *et al.* eDNA metabarcoding as a promising conservation tool for monitoring fish diversity in a coastal wetland of the Pearl River Estuary compared to bottom trawling [J]. *Science of the Total Environment*, 2020(702): 134704.
- [75] Weitemier K, Penaluna B E, Hauck L L, *et al.* Estimating the genetic diversity of Pacific salmon and trout using multigene eDNA metabarcoding [J]. *Molecular Ecology*, 2021, **30**(20): 4970-4990.
- [76] Pukk L, Kanefsky J, Heathman A L, *et al.* eDNA metabarcoding in lakes to quantify influences of landscape features and human activity on aquatic invasive species prevalence and fish community diversity [J]. *Diversity and Distributions*, 2021, **27**(10): 2016-2031.
- [77] Luo S, Liu Z C, Wang S, *et al.* Zooplankton diversity in Bao'an Lake based on metagenomic approach [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2022, **46**(11): 1719-1729. [罗帅, 刘真诚, 王粟, 等. 基于宏基因组的保安湖浮游动物多样性研究 [J]. 水生生物学报, 2022, **46**(11): 1719-1729.]
- [78] Liu B, Liu Z C, Luo S, *et al.* Molecular diversity of protists in two typical urban wetlands in Heilongjiang Province, Longfeng wetland and Hulan Estuary wetland [J]. *Genomics and Applied Biology*, 2022, **41**(2): 352-362. [刘斌, 刘真诚, 罗帅, 等. 黑龙江省典型城市湿地龙凤湿地和呼兰河口湿地的原生生物分子多样性 [J]. 基因组学与应用生物学, 2022, **41**(2): 352-362.]
- [79] Amarasiri M, Furukawa T, Nakajima F, *et al.* Pathogens and disease vectors/hosts monitoring in aquatic environments: potential of using eDNA/eRNA based approach [J]. *The Science of the Total Environment*, 2021(796): 148810.
- [80] Alfano N, Dayaram A, Axtner J, *et al.* Non-invasive surveys of mammalian viruses using environmental DNA [J]. *Methods in Ecology and Evolution*, 2021, **12**(10): 1941-1952.
- [81] Huver J R, Koprivnikar J, Johnson P T J, *et al.* Development and application of an eDNA method to detect and quantify a pathogenic parasite in aquatic ecosystems [J]. *Ecological Applications*, 2015, **25**(4): 991-1002.
- [82] Gamage C D, Sato Y, Kimura R, *et al.* Understanding leptospirosis eco-epidemiology by environmental DNA metabarcoding of irrigation water from two agro-ecological regions of Sri Lanka [J]. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2020, **14**(7): e0008437.
- [83] Sato Y, Mizuyama M, Sato M, *et al.* Environmental DNA metabarcoding to detect pathogenic *Leptospira* and associated organisms in leptospirosis-endemic areas of Japan [J]. *Scientific Reports*, 2019, **9**(1): 6575.
- [84] Bass D, Christison K W, Stentiford G D, *et al.* Environmental DNA/RNA for pathogen and parasite detection, surveillance, and ecology [J]. *Trends in Parasitology*, 2023, **39**(4): 285-304.
- [85] Wang P, Yan Z, Yang S, *et al.* Environmental DNA: an emerging tool in ecological assessment [J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2019, **103**(5): 651-656.
- [86] Li F, Guo F, Gao W, *et al.* Environmental DNA biomonitoring reveals the interactive effects of dams and nutrient enrichment on aquatic multitrophic communities [J]. *Environmental Science & Technology*, 2022, **56**(23): 16952-16963.
- [87] Visser F, Merten V J, Bayer T, *et al.* Deep-sea predator niche segregation revealed by combined cetacean biollogging and eDNA analysis of cephalopod prey [J]. *Science Advances*, 2021, **7**(14): eabf5908.
- [88] Pansu J, De Danieli S, Puissant J, *et al.* Landscape-scale distribution patterns of earthworms inferred from soil DNA [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2015(83): 100-105.
- [89] Xie Y, Wang J, Yang J, *et al.* Environmental DNA metabarcoding reveals primary chemical contaminants in freshwater sediments from different land-use types [J]. *Chemosphere*, 2017(172): 201-209.
- [90] Yang J, Zhang X. eDNA metabarcoding in zooplankton improves the ecological status assessment of aquatic ecosystems [J]. *Environment International*, 2020(134): 105230.
- [91] Mahon A R, Jerde C L, Galaska M, *et al.* Validation of eDNA surveillance sensitivity for detection of Asian carps in controlled and field experiments [J]. *PLoS One*, 2013, **8**(3): e58316.
- [92] Merkes C M, Mccalla S G, Jensen N R, *et al.* Persistence of DNA in carcasses, slime and avian feces may affect interpretation of environmental DNA data [J]. *PLoS One*, 2014, **9**(11): e113346.
- [93] Ling L X, Fan G, Hu Y, *et al.* Integrating environmental DNA technology and traditional fish survey to reveal the diversity of fishes in the rivers on the Chongming Island [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2022, **31**(6): 1434-1444. [凌岚馨, 范共, 胡云, 等. 环境DNA技术与传统捕捞揭示崇明岛内河鱼类多样性 [J]. 上海海洋大学学报, 2022, **31**(6): 1434-1444.]
- [94] Wilson I G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, **63**(10): 3741-3751.
- [95] Ge Y S, Cheng Q Q. Environmental DNA and its application in aquatic biodiversity [J]. *Fishery Information &*

- Strategy, 2020, **35**(1): 55-62. [葛玉双, 程起群. 环境DNA及其在水生生物多样性调查中的应用 [J]. 渔业信息与战略, 2020, **35**(1): 55-62.]
- [96] Qin C X, Zuo T, Yu G, *et al.* Advances in research of environmental DNA (eDNA) in biomass assessment of aquatic ecosystems [J]. *South China Fisheries Science*, 2020, **16**(5): 123-128. [秦传新, 左涛, 于刚, 等. 环境DNA在水生生态系统生物量评估中的研究进展 [J]. 南方水产科学, 2020, **16**(5): 123-128.]
- [97] Li C H, Ling L X, Tan J, *et al.* Challenge, breakthrough and future perspectives of environmental DNA technology in monitoring aquatic organisms [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2023, **32**(3): 564-574. [李晨虹, 凌岚馨, 谭娟, 等. 环境DNA技术在水生生物监测中的挑战, 突破和发展前景 [J]. 上海海洋大学学报, 2023, **32**(3): 564-574.]
- [98] Doi H, Inui R, Akamatsu Y, *et al.* Environmental DNA analysis for estimating the abundance and biomass of stream fish [J]. *Freshwater Biology*, 2017, **62**(1): 30-39.
- [99] Lacoursière-Roussel A, Rosabal M, Bernatchez L. Estimating fish abundance and biomass from eDNA concentrations: variability among capture methods and environmental conditions [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2016, **16**(6): 1401-1414.
- [100] Moyer G R, Díaz-Ferguson E, Hill J E, *et al.* Assessing environmental DNA detection in controlled lentic systems [J]. *PLoS One*, 2014, **9**(7): e103767.
- [101] Thomsen P F, Kielgast J, Iversen L L, *et al.* Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples [J]. *PLoS One*, 2012, **7**(8): e41732.
- [102] Chen K, Fang C C, Wu Z G, *et al.* AeDNA: aquatic environmental DNA database [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2022, **46**(11): 1741-1747. [陈凯, 方成池, 吴志刚, 等. AeDNA: 水生生物eDNA数据库 [J]. 水生生物学报, 2022, **46**(11): 1741-1747.]
- [103] Wang M, Yuan Y, Yu H Y, *et al.* Construction of barcode library of freshwater macroinvertebrate in China [J]. *Environmental Monitoring in China*, 2022, **38**(1): 36-44. [王萌, 苑艺, 于海燕, 等. 中国淡水大型底栖无脊椎动物条形码数据库构建 [J]. 中国环境监测, 2022, **38**(1): 36-44.]
- [104] Rees H C, Maddison B C, Middleditch D J, *et al.* Review: the detection of aquatic animal species using environmental DNA—a review of eDNA as a survey tool in ecology [J]. *Journal of Applied Ecology*, 2014, **51**(5): 1450-1459.
- [105] Hu Y X, Peng Y, Li R W, *et al.* Plankton diversity and community characteristics in Danjiangkou Reservoir based on environmental DNA metabarcoding [J]. *Journal of Lake Sciences*, 2021, **33**(6): 1650-1659. [胡愈忻, 彭玉, 李瑞雯, 等. 基于环境DNA宏条形码的丹江口水库浮游生物多样性及群落特征 [J]. 湖泊科学, 2021, **33**(6): 1650-1659.]
- [106] Goldberg C S, Turner C R, Deiner K, *et al.* Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species [J]. *Methods in Ecology and Evolution*, 2016, **7**(11): 1299-1307.
- [107] Deiner K, Walser J C, Mächler E, *et al.* Choice of capture and extraction methods affect detection of freshwater biodiversity from environmental DNA [J]. *Biological Conservation*, 2015(183): 53-63.
- [108] Niu C, Kebede H, Auld D L, *et al.* A safe inexpensive method to isolate high quality plant and fungal DNA in an open laboratory environment [J]. *African Journal of Biotechnology*, 2008, **7**(16): 2818-2822.
- [109] Renshaw M A, Olds B P, Jerde C L, *et al.* The room temperature preservation of filtered environmental DNA samples and assimilation into a phenol-chloroformisoamyl alcohol DNA extraction [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2015, **15**(1): 168-176.
- [110] Yuan S, Cohen D B, Ravel J, *et al.* Evaluation of methods for the extraction and purification of DNA from the human microbiome [J]. *PLoS One*, 2012, **7**(3): e33865.
- [111] Dethlefsen L, Huse S, Sogin M L, *et al.* The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing [J]. *PLoS Biology*, 2008, **6**(11): e280.
- [112] Ren Z, Wang F, Qu X, *et al.* Taxonomic and functional differences between microbial communities in Qinghai Lake and its input streams [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017(8): 2319.
- [113] Auinger B M, Pfandl K, Boenigk J. Improved methodology for identification of protists and microalgae from plankton samples preserved in Lugol's iodine solution: combining microscopic analysis with single-cell PCR [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, **74**(8): 2505-2510.
- [114] Giebner H, Langen K, Bourlat S J, *et al.* Comparing diversity levels in environmental samples: DNA sequence capture and metabarcoding approaches using 18S and COI genes [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2020, **20**(5): 1333-1345.
- [115] Medinger R, Nolte V, Pandey R V, *et al.* Diversity in a hidden world: potential and limitation of next-generation sequencing for surveys of molecular diversity of eukaryotic microorganisms [J]. *Molecular Ecology*, 2010, **19**(Suppl 1): 32-40.
- [116] Afzali S F, Bourdages H, Laporte M, *et al.* Comparing environmental metabarcoding and trawling survey of demersal fish communities in the Gulf of St. Lawrence, Canada [J]. *Environmental DNA*, 2021, **3**(1): 22-42.
- [117] 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.
- [118] Meyer C P. Molecular Molecular systematics of cowries (Gastropoda: Cypraeidae) and diversification patterns in the tropics [J]. *Biological Journal of the Linnean Society*, 2003, **79**(3): 401-459.
- [119] Nekrutenko A, Taylor J. Next-generation sequencing data interpretation: enhancing reproducibility and accessibility [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2012, **13**(9): 667-672.
- [120] Allison M J, Round J M, Bergman L C, *et al.* The effect of silica desiccation under different storage conditions on filter-immobilized environmental DNA [J]. *BMC Research Notes*, 2021, **14**(1): 106.
- [121] Sandve G K, Nekrutenko A, Taylor J, *et al.* Ten simple rules for reproducible computational research [J]. *PLoS Computational Biology*, 2013, **9**(10): e1003285.
- [122] Yilmaz P, Kottmann R, Field D, *et al.* Minimum information about a marker gene sequence (MIMARKS) and minimum information about any (x) sequence (MIXS) specifications [J]. *Nature Biotechnology*, 2011, **29**(5): 415-420.

## DEVELOPMENT, APPLICATIONS, AND STANDARDIZATION OF ENVIRONMENTAL DNA MONITORING TECHNOLOGY FOR AQUATIC ORGANISMS

GU Si-Yu<sup>1</sup>, CHEN Kai<sup>1</sup>, JIN Xiao-Wei<sup>2</sup>, LI Wen-Pan<sup>2</sup>, CHEN Xiao-Fei<sup>3</sup>, XIONG Jing<sup>4</sup>, TANG Min-Zhe<sup>4</sup>,  
JIANG Chuan-Qi<sup>1</sup>, XIONG Jie<sup>1</sup>, LI Tao<sup>1</sup>, ZHANG Qi<sup>1</sup>, CUI Yong-De<sup>1</sup>, ZENG Hong-Hui<sup>1</sup>,  
HE Shun-Ping<sup>1</sup>, WANG Ye-Yao<sup>2</sup> and MIAO Wei<sup>1</sup>

(1. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 2. China National Environment Monitoring Center, Beijing 100012, China; 3. Hubei Provincial Academy of Eco-Environmental Sciences, Wuhan 430072, China; 4. Hubei Ecological Environmental Monitoring Central Station, Wuhan 430072, China)

**Abstract:** Aquatic ecosystems play a pivotal role in ensuring national ecological security by serving as a fundamental foundation. Within these ecosystems, aquatic organisms occupy a central position, acting as crucial indicators for studying the evolution of water bodies and preserving aquatic ecological health. Traditional surveys and monitoring of aquatic organism have typically relied on morphological methods, which suffer from limitations such as high expertise requirements, standardization and automation difficulties, and time-consuming processes. Environmental DNA (eDNA) technology offers a promising alternative. This method identifies specific species by detecting DNA fragments present in the environment. By leveraging DNA molecules in water, eDNA technology provides an accurate, convenient, standardized, and automated approach for routine aquatic organism monitoring. This review introduces the basic principles of eDNA technology, summarizes the development history, and process of eDNA technology from its inception to widespread research applications. Furthermore, it explores various aquatic organism identification and monitoring technologies based on eDNA, including eDNA barcoding and metagenomics. The application of eDNA technology spans various fields, encompassing species conservation, invasive species monitoring, and aquatic ecological assessment. However, the review also addresses challenges confronting eDNA technology, such as the incompleteness of species reference sequence database. To tackle these challenges, the review suggests optimizing and enhancing databases, refining sample collection methods, and improving evaluation indicators, sample preservation, data analysis, and storage. Additionally, recommendations are provided for the standardized and automated implementation of aquatic organism eDNA monitoring in China, taking into account the current stage of development in eDNA technology.

**Key words:** Environmental DNA technology; Standardization; Aquatic organism monitoring; Metabarcoding sequencing technology; Metagenomic sequencing technology; eDNA database