

ICS 编号
CCS 编号

团体标准

T/CHES XXX—20XX

输水工程沼蛤监测技术导则

Technical guideline for *Limnoperna fortunei* monitoring in water
transfer project

（征求意见稿）

20XX-XX-XX 发布

20XX-XX-XX 实施

中国水利学会 发布

目 次

前 言 III

1 范围 4

2 规范性引用文件 4

3 术语和定义 4

4 总体要求 5

5 监测断面布设 5

 5.1 一般规定 5

 5.2 监测断面 5

6 成贝 6

 6.1 主要器具 6

 6.2 监测频率与采样时间 6

 6.3 样品采集 7

 6.4 样品分析 7

7 幼虫 7

 7.1 试剂 7

 7.2 主要器具 7

 7.3 监测频率与采样时间 8

 7.4 样品采集 8

 7.5 样品分析 8

8 环境 DNA 9

 8.1 试剂 9

 8.2 主要器具 9

 8.3 监测频率与采样时间 9

 8.4 样品采集 9

 8.5 样品分析 10

9 伴生菌落 10

 9.1 试剂 11

 9.2 主要器具 11

 9.3 监测频率与采样时间 11

 9.4 样品采集 11

 9.5 样品分析 11

10 监测报告 11

附录 A（资料性）水下机器人选用原则 13

附录 B（资料性）成贝记录表 14

附录 C（资料性）幼虫记录表及鉴定图 17

附录 D（资料性）环境 DNA 记录表 21

附录 E（资料性）环境 DNA 浓度试验流程 22

附录 F（资料性）伴生菌落记录表 23

参考文献 24

前 言

根据中国水利学会团体标准制修订计划安排，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。

本文件为 10 章和 6 个附录，主要内容包括范围，规范性引用文件，术语和定义，总体要求，监测断面布设，成贝，幼虫，环境 DNA，伴生菌落，监测报告等。

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这些专利的责任。

本文件由中国水利学会归口。执行过程中如有意见或建议，请寄送至中国水利学会（地址：北京市西城区白广路二条 16 号，邮编 100053），以便今后修订时参考。

本文件主编单位：清华大学。

本文件参编单位：河南科技大学，南水北调中线建设管理局，南水北调东线总公司，北京市水务局，北京自来水集团技术研究院。

本文件主要起草人：徐梦珍、赵娜、傅旭东、张家豪、常志兵、王树磊、梁建奎、张爱静、肖新宗、刘梅、王峰、雷发楷、杨瑶、王聪聪、杨蓉、张淑珍、赵红磊、刘波、王敏、李玉仙、张晓岚、温颖、张静。

输水工程沼蛤监测技术导则

1 范围

本文件规定了沼蛤潜在适生区内的输水工程及其水源地、受水区沼蛤样品的采集、处理、保存及分析工作。

本文件适用于对工程的沼蛤入侵风险、水源地的沼蛤引入风险和受水区的沼蛤扩散风险的评估，以及对沼蛤防治措施效果的评估。

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 20001.4-2015 标准编写规则 第4部分：试验方法标准
- GB/T 40226-2021 环境微生物宏基因组检测 高通量测序法
- SL 219-2013 水环境监测规范
- SL 733-2016 内陆水域浮游植物监测技术规程
- SC/T 9402-2010 淡水浮游生物调查技术规范
- T/CHES 55-2021 技术供水系统沼蛤防治导则
- T/CHES 56-2021 输水工程沼蛤防治系统技术导则

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

输水工程沼蛤入侵 *Limnoperna fortunei invasion in water tranfer project*

沼蛤由原生存地随输工程侵入到另一个新的环境，并对工程的输水效能、水质以及受水区的生态系统造成危害的现象。

注：输水工程沼蛤入侵过程包括从水源地的引入、在工程中的定植和在受水区的扩散。

3.2

沼蛤潜在适生区 *Potential inhabiting regions of Limnoperna fortunei*

气候、水文、水动力等条件可适宜沼蛤生存、繁殖、扩张的地区。

3.3

沼蛤幼虫密度 *Limnoperna fortunei laval/veliger density*

某一时间内单位水体中现存浮游沼蛤幼虫的数量，用个体数表示。

注：沼蛤幼虫密度的单位为个/m³。

3.4

沼蛤成贝密度 *Limnoperna fortunei mussel density*

某一时间内单位面积上附着的沼蛤成贝的数量，用个体数表示。

注：沼蛤成贝密度的单位为个/m²。

3.5

沼蛤体长 *Limnoperna fortunei shell length*

沼蛤个体的长度，指沼蛤个体表面两点之间的最长长度。

注：沼蛤体长的单位为 mm。

3.6

沼蛤伴生菌落 **Bacterial communities associated with *Limnoperna fortunei* colonization**
附着在沼蛤表面及周围的微生物群落。

3.7

沼蛤环境 DNA (eDNA) **Environmental DNA (eDNA) of *Limnoperna fortunei***
水体样品中存在的沼蛤的遗传物质，包括细胞内外的 DNA。

3.8

实时荧光定量 PCR **Quantitative Real-time PCR**

一种在 DNA 扩增反应中，以荧光化学物质测聚合酶链式反应 (PCR) 循环后产物总量的方法。

4 总体要求

4.1 对沼蛤潜在适生区内的输水工程及其水源地、受水区的沼蛤宜进行监测。

4.2 输水工程宜进行沼蛤成贝监测。成贝监测宜在典型工程段进行。成贝监测包括工程或结构停水后的常规监测和工程通水期间的水下机器人监测。两种成贝监测方法的选择原则为：

(a) 对有条件停水检修的工程段宜采用常规监测；

(b) 对无条件停水检修的工程段宜参考附录 A 选择水下机器人监测。

4.3 输水工程及其水源地、受水区宜开展沼蛤幼虫、eDNA 监测。

4.4 输水工程停水期间宜进行沼蛤伴生菌落监测。

4.5 监测完成后宜评估沼蛤的入侵风险和沼蛤防治措施的效果。

4.5.1 入侵风险应包括输水工程的沼蛤入侵风险、水源地的沼蛤引入风险及受水区的沼蛤扩散风险。

4.5.2 应通过比较沼蛤防治措施实施前后的沼蛤密度来评估防治效果。

5 监测断面布设

5.1 一般规定

5.1.1 应充分考虑项目监测的目的和需求。

5.1.2 应与水质监测站等已有监测断面相结合。

5.1.3 应符合经济、便捷和长期监测的要求。

5.1.4 应具有较好的代表性，能反映一定范围内水体中沼蛤的实际分布状况。

5.1.5 应具有较好的整体性，能反映工程沿线沼蛤的整体分布情况。

5.2 监测断面

5.2.1 成贝

5.2.1.1 成贝监测断面应覆盖从工程首部到尾部的不同结构段及重要分水口。

5.2.1.2 停水渠段或结构均应进行常规监测。针对常规监测，应根据结构沿线的成贝密度分布情况确定断面间距、数量，具体规定如下：

(a) 沿线最高密度和最低密度比小于 1.5 倍时，宜在结构进口、中间、出口位置设置 3 个监测断面；

(b) 沿线最高密度和最低密度比大于 1.5 倍时，应按照变化梯度加密监测断面，并在

密度突变、过渡处设置监测断面，监测断面数量根据需要可设置 5-7 个。

5.2.1.3 水下机器人监测应根据工程实际情况和需求确定监测断面。

5.2.2 幼虫

5.2.2.1 工程内部幼虫监测断面应与成贝监测断面对应。

5.2.2.2 应选择水流稳定的断面采样。

5.2.2.3 应充分考虑水体类型特点与监测的目的、需求，断面布设应具有代表性，能反映断面整体的情况。

5.2.2.4 水面宽度小于 50m，可在中心布设 1 条采样垂线（点）；水面宽度为 50-100m 的，应布设左右 2 条采样垂线（点）；水面宽度大于 100m 的，采样垂线（点）不得少于左、中、右 3 条（个）。

5.2.2.5 根据水深的不同，应进行分层采样，具体要求如下：

（a）对于水深小于 1.5m 的水体，可在水面 0.5m 以下采集 1 个样本；

（b）当水深大于 1.5m 且小于 3m 时，应在水面以下 0.5、1.5、2.5m 处分别采集 1 个样本；

（c）当水深大于 3m 且小于 5m 时，应在水面以下 0.5、1.5、2.5、3.5、4.5m 处分别采集 1 个样本；

（d）当水深大于 5m 时，应在水面以下 0.5、1.5、2.5、3.5、4.5m 处分别采集 1 个样本。

5.2.2.6 分层采样应满足水体类型特点及项目监测目的与需求，可根据实际情况适当调整垂线上的样本数。

5.2.3 伴生菌落

伴生菌落采样断面应与停水期间成贝采样断面对应。

5.2.4 环境 DNA

沼蛤 eDNA 采样点可根据前期研究及水体类型特点、实际需求等确定。

6 成贝

6.1 主要器具

- （a）数码相机；
- （b）皮尺；
- （c）油灰刀；
- （d）钢卷尺；
- （e）自封袋；
- （f）体式显微镜；
- （g）医用手套；
- （h）水下机器人。

6.2 监测频率与采样时间

6.2.1 常规监测应与工程停水检修结合。

6.2.2 水下机器人监测频率宜不少于每 3 个月 1 次。

6.3 样品采集

6.3.1 常规成贝采集

6.3.1.1 确定采样断面，断面信息（结构形式、采样断面环境、附着情况等）应记录在表 B.1。拍照留存样点信息，具体包括整体环境照片、样方照片、细部照片等，拍照应放上尺子，从不同方位拍摄 3-6 张照片。

6.3.1.2 选定采样位置后划定 1 个样方。样方面积应根据成贝附着密度判断，应保证最后采集到的成贝数量不少于 200 个。用油灰刀将样方内的成贝刮下，用封口袋收集，贴上标签，记录日期和编号。

6.3.1.3 每个断面应至少采集 3 个样本，覆盖淡水壳菜附着的高密度区、中密度区与低密度区。

6.3.1.4 应用游标卡尺测量沼蛤对水泥壁面的腐蚀坑深度，将信息记录附表 B.1 中。

6.3.2 水下机器人监测图像采集

6.3.2.1 采用水下机器人监测应保证每个断面采集的图像带标尺，图像格式为.jpeg 且清晰。

6.3.2.2 图像采集信息应计入附表 B.2 中。

6.4 样品分析

6.4.1 成贝常规监测

6.4.1.1 应将采集的成贝样本带回实验室对体长进行测量和分析，体长测量结果记入附表 B.3。

6.4.1.2 应对成贝样本进行计数，且计算成贝最大附着密度 $D_{\max}$ 和成贝平均附着密度 D_{mean} ，按公式（1）和（2）计算：

$$D_{\max} = \text{MAX} (D_1, D_2, \dots, D_n) \quad (1)$$

$$D_{\text{mean}} = D_1 \times p_1 + D_2 \times p_2 + \dots + D_n \times p_n \quad (2)$$

式中：

$D_{\max}$ ——成贝最大附着密度，个/ m^2 ；

D_{mean} ——成贝平均附着密度，个/ m^2 ；

D_i ——第 i 个样方的成贝密度，个/ m^2 ；

p_i ——密度为 D_i 的成贝附着面积占断面总面积的比例，%；

n ——样方数量，个。

6.4.2 成贝水下机器人监测

应用基于图像自动识别的软件系统（基于图像识别软件 BASEGRAIN 二次开发，网址：<https://basement.ethz.ch/download/tools/basegrain.html>）对水下机器人采集的图像进行辨识、计数和测量，该软件输入的为.jpeg 格式的图片，输出的为每个沼蛤成贝的长轴长（体长）和短轴长，进而可计算沼蛤的附着密度，相关结果可记入附表 B.2。

7 幼虫

7.1 试剂

4%甲醛溶液：体积分数为 4%。

7.2 主要器具

（a）数码相机；

- (b) 浮游生物网：25 号、200 目；
- (c) 直流泵；
- (d) 蓄电池；
- (e) 定容水桶：50L；
- (f) 麻绳：直径 5mm，长度 10m；
- (g) 样品瓶：50mL、100mL；
- (h) 滴管；
- (i) 医用手套。

7.3 监测频率与采样时间

7.3.1 宜对各监测断面幼虫密度进行不少于 1 年的监测，监测频率为每月 1 次。

7.3.2 应根据幼虫密度实测结果，判断繁殖高峰季节及繁殖间歇期。

7.3.3 在繁殖间歇期内，采样监测频率可为每月 1 次；在繁殖高峰期，采样频率宜为每周 1 次。

7.4 样品采集

7.4.1 针对目标水深，采用便携式直流水泵抽取 500-1000L 水样，浮游生物量越少、水样量越大。经 25 号浮游生物网过滤，滤液体积宜为 5-10mL。滤液收集在样品管（容积 20-50mL）中。

7.4.2 样品管贴好标签后，应放入便携式冰箱中保存并带回实验室镜检计数（24h 内处理）或加入甲醛溶液固定后带回实验室镜检计数（可 24h 后处理）。

7.4.3 与沼蛤栖息相关的现场测试项目如水温、pH、溶解氧、化学需氧量等的测定应按 SL 219-2013 的规定进行，结果记入附表 C.1。

7.4.4 采样完成后应填写沼蛤幼虫采样表（见附表 C.2）。

7.5 样品分析

7.5.1 水样的沉淀与浓缩

将样品管中水样移至 50ml 离心管中，且静置 4h 后，吸去上清液保留 5ml。如果藻类太多，可根据情况定浓缩后的体积。

7.5.2 发育阶段鉴定及计数

7.5.2.1 应将浓缩后的离心管内水样摇匀，用滴管吸取 1ml 溶液置于计数框内，在显微镜下观察沼蛤幼虫发育阶段和数量。如果藻类很多，可吸取 0.25ml 置于计数框内，再加清水稀释后观察。观察完成后，应用清水对计数框进行清洗，然后吸取一定体积的溶液继续观察，依次完成对浓缩后溶液的观测。

7.5.2.2 沼蛤幼虫的发育阶段包括 D 型期幼虫、前期面盘幼虫、后期面盘幼虫和蹼行期幼虫（附图 C.1），应将检测结果记录在幼虫检测结果记录表中（附表 C.3）。

7.5.2.3 应按公式（3）计算每个发育阶段的幼虫密度：

$$D = \frac{C}{V} \times 1000 \quad (3)$$

式中：

D——每个发育阶段的幼虫密度，个/m³；

C——镜检观测到的每个发育阶段的幼虫的数量，个；

V——经浮游生物网过滤的水体体积，L。

7.5.2.4 幼虫的总密度应为每个发育阶段幼虫密度之和。

8 环境 DNA

8.1 试剂

- (a) STE: 10mM Tris-HCl(pH = 8.0)、1mM EDTA(pH = 8.0)、100mM NaCl 的混合溶液;
- (b) TE 缓冲液: 10mM Tris-HCl(pH = 8.0)、1mM EDTA(pH = 8.0);
- (c) 1%SDS (十二烷基磺酸钠) 溶液;
- (d) 蛋白酶 K;
- (e) Tris 饱和酚 (pH = 8.0);
- (f) PCI: 酚-氯仿-异戊醇 (25: 24: 1);
- (g) 冰无水乙醇 (-20℃冷冻);
- (h) 2M 乙酸铵溶液;
- (i) DNA 提取试剂盒;
- (j) 预混实时荧光定量 PCR 反应体系 (mix);
- (k) 沼蛤特异性引物 (F:AGAACCCCAGCAGTTGACATAG; R:CCACCTAGAACTGGTAGTGAACTAAC);
- (l) 双蒸水;
- (m) 70%酒精。

8.2 主要器具

- (a) 采样瓶;
- (b) 抽滤泵;
- (c) 硝酸纤维素膜, 0.45 μm;
- (d) 冰箱;
- (e) 离心管;
- (f) 水浴锅;
- (g) 烘箱;
- (h) 离心机;
- (i) 振荡混匀器;
- (j) 分光光度计;
- (k) 荧光定量 PCR 仪;
- (l) 移液枪。

8.3 监测频率与采样时间

监测频率宜与幼虫监测频率一致。

8.4 样品采集

8.4.1 应在水体表面 10cm 以下采集水样 550-2000mL, 应 4℃冷藏保存, 时间不应超过 48h, 采样相关信息应计入附表 D.1。

8.4.2 应利用抽滤装置将水体中沼蛤的 eDNA 及泥沙等抽滤到硝酸纤维素膜上, 并-20℃冷冻保存至试验, 保存时间不应超过 1 年, 若保存时间超过一年, 应-80℃冷冻保存。

8.5 样品分析

8.5.1 环境 DNA 提取

8.5.1.1 滤膜中的 eDNA 可通过酚氯仿抽提，具体步骤如下：

- 将滤膜剪碎放入 2ml 的离心管中，加入 700 μ l STE+1%SDS 溶液和 50 μ l 蛋白酶 K，56℃水浴 3 小时。
- 水浴后，加入 400 μ l Tris 饱和酚，振荡均匀，并 13000r/min 离心 10 分钟。回收 600 μ l 上清液到新的离心管，并加入 600 μ l PCI 下层溶液，振荡均匀，13000r/min 离心 10 分钟，回收 400 μ l 上清液到新的离心管。
- 在回收的上清液中加入 2 倍体积的冰无水乙醇和 50 μ l 乙酸铵溶液。在 4℃环境下冷藏 15 分钟后，并在 4℃环境下 13000 r/min 离心 10 分钟。此时 DNA 已沉淀至离心管底部，缓慢倒掉管内液体。
- 加入 1000 μ l 70%酒精溶液，来回颠倒离心管后 4℃13000r/min 离心 10 分钟，缓慢倒掉管内液体。
- 50℃烘干后得到 DNA 样品用于下一步试验。

8.5.1.2 以沼蛤成贝闭壳肌为提取材料，重复 8.5.1.1 的步骤，得到阳性对照样品。以未使用的滤膜为提取材料，重复上述步骤，得到阴性对照样品。如采用商用试剂盒提取，提取步骤应按说明书进行。

8.5.2 实时荧光定量 PCR

将得到的 DNA 样品溶解至 50 μ l 的 TE 缓冲液中用作模板，同时利用分光光度计给出的吸光度比值 A260/A280、A260/A230 检测所提取 DNA 的质量：纯净的 DNA 样品 A260/A280 应大于 1.8，A260/A230 的比值应大于 2.0。质量满足要求后在体系中加入 1 μ l 模板、正反引物各 1 μ l、10 μ l mix、7 μ l 水，用于实时荧光定量 PCR 反应。反应设置为：95℃预变性 10min；50 个扩增循环，每个循环 95℃ 10s，62℃ 20s，72℃ 30s；熔解。

实时荧光定量 PCR 反应完成后，可获得熔解曲线与扩增曲线。试验样品熔解曲线熔解峰与阳性对照样品熔解峰匹配，可判断为特异性扩增，扩增 DNA 为沼蛤的 DNA；否则为引物二聚体等产物。从发生了特异性扩增的样品扩增曲线中可得到 Ct 值（也称 Cq 值），为反应体系中荧光信号强度达到阈值时所经历的扩增循环数。

8.5.3 数据分析

8.5.3.1 定性分析

Ct 值小于 40 表明样点可能存在沼蛤，作为早期预警标准。

8.5.3.2 定量分析

利用附录 E 所述步骤可得每个样品中的沼蛤 DNA 浓度，原水中沼蛤 DNA 浓度用下式计算：

$$C = \frac{C_l \times 50}{V \times 1000} \quad (4)$$

式中：

C——原水中的沼蛤 DNA 浓度，ng/ μ l；

C_l——样品中提取的沼蛤 DNA 浓度，ng/ μ l；

V——过滤到滤膜上的水体体积，ml。

9 伴生菌落

9.1 试剂

干冰。

9.2 主要器具

- (a) 冰箱;
- (b) 50ml 无菌离心管;
- (c) 无菌蒸馏水;
- (d) 无菌手套;
- (e) 无菌棉签;
- (f) 无菌采样袋。

9.3 监测频率与采样时间

9.3.1 菌落采样宜与工程或结构停水检修后的沼蛤成贝常规监测频率一致。

9.3.2 菌落采样宜在停水后 4-7 天进行。

9.4 样品采集

9.4.1 确定采样样点，记录样点断面信息，拍摄现场照片。用无菌蒸馏水润湿灭菌棉签（如果环境湿润可省略此步骤）后，用棉签擦拭沼蛤表面及足丝附近发育的菌丝，并保存在无菌离心管中。每个样点应采集至少 5 根棉签样。在无沼蛤附着的壁面重复上述操作，作为环境对照组。采样过程中，应设置 1 组棉签作为阴性对照。

9.4.2 离心管上记录样点编号、采样时间。将样品放于冰箱内-20℃保存，并在 24h 内进行测序处理。

9.4.3 将样点编号、采样时间和样点环境描述等信息记入附表 F.1。

9.5 样品分析

9.5.1 样品处理

样品采集完成后，按《GB/T 40226-2021 环境微生物宏基因组检测 高通量测序法》依次进行提取基因组 DNA、PCR 扩增和产物纯化、测序文库构建、双端测序。此部分工作可交由商业测序公司完成。

9.5.2 数据分析

原始测序数据经序列拼接、嵌合体去除等质控流程后，应以 97%相似度聚类为 OTU 单元，与 silva128/16s_bacteria 对比，进行物种注释。根据 OTU 注释结果识别其中潜在的致病微生物，致病微生物可参考国家病原微生物资源库（<https://www.nprc.org.cn/#/>）。

10 监测报告

10.1 监测工作完成后应完成监测报告。

10.2 监测报告应评估沼蛤的入侵风险和沼蛤防治措施效果中的至少 1 项。根据要求的监测范围，沼蛤入侵风险应至少包括水源地的引入风险、工程中的定植风险、受水区的扩散风险 3 项中的 1 项。

10.3 监测报告应至少包括下列内容：

- a) 监测机构名称、联系方式和地址、检测员、样品接收时间、样品监测时间及报告时

间；

b) 工程概况、监测范围、监测方法、监测数据、结果及建议。

附录 A

(资料性)

水下机器人选用原则

- A.1** 水下机器人摄像头应能高分辨率成像，拍摄图片应有标尺。
- A.2** 水下机器人应具有很好的抗逆流及障碍回避能力，且能适应复杂环境。
- A.3** 水下机器人应具有长期续航能力。

附录 B

(资料性)

成贝记录表

表 B.1~表 B.3 给出了成贝采样和分析用到的记录表。

表 B. 1 成贝常规采样记录表

采样时间			断面(照片)编号		
断面桩号			断面结构类型		
腐蚀坑 1 深度 (mm)			腐蚀坑 1 深度 (mm)		
.....			腐蚀坑 n 深度 (mm)		
样方 1 距离结构 入口距离 (m)		样方 1 距离渠 底深度 (m)		样方 1 采样面 积 (m ²)	
样方 2 距离结构 入口距离 (m)		样方 2 距离渠 底深度 (m)		样方 2 采样面 积 (m ²)	
.....					
样方 n 距离结构 入口距离 (m)		样方 n 距离渠 底深度 (m)		样方 n 采样面 积 (m ²)	
备注					

检测人员签字:

分析人员签字:

校核人员签字:

表 B.2 成贝水下机器人监测记录表

图像采集时间		断面（照片）编号	
断面桩号		断面结构类型	
样方 1 距离结构 入口距离（m）		样方 1 距离渠底 深度（m）	
样方 2 距离结构 入口距离（m）		样方 2 距离渠底 深度（m）	
.....			
样方 n 距离结构 入口距离（m）		样方 n 距离渠底 深度（m）	
备注			

检测人员签字：

分析人员签字：

校核人员签字：

表 B.3 成贝体长结果记录表

样点（样方）编号：

采样日期：

个体号	体长（mm）	个体号	体长(mm)
1#		19#	
2#		20#	
3#		21#	
4#		22#	
5#		23#	
6#			
7#			
8#			
9#			
10#			
11#			
12#			
13#			
14#			
15#			
16#			
17#			
18#			
密度			

检测人员签字：

分析人员签字：

校核人员签字：

附录 C

(资料性)

幼虫记录表及鉴定图

表 C.1~表 C.3 给出了成虫采样和分析用到的记录表。图 C.1 给出了幼虫不同发育阶段的鉴定图。

表 C.1 环境参数记录表

样点 编号	水温 (℃)	pH	溶解氧 (mg/L)	化学需氧量 (mg/L)	生化需氧量 (mg/L)	氨氮 (mg/L)	总氮 (mg/L)	大肠杆菌数 (MPN/mL)	硫酸根浓度 (mg/L)
1									
2									
3									
4									
5									
.....									
n									

检测人员签字:

分析人员签字:

校核人员签字:

表 C.2 幼虫现场采样记录表

样点编号	采样时间	样点位置	采样深度	采样体积	样品浓缩体积	备注
1						
2						
3						
4						
5						
.....						
n						

检测人员签字：

分析人员签字：

校核人员签字：

表 C.3 幼虫密度记录表

样点编号:

采样日期:

单位: 个/m³

样点编号	D 型期幼虫	前期面盘幼虫	后期面盘幼虫	蹒行期期幼虫	全部幼虫
1					
2					
3					
4					
5					
.....					
n					

检测人员签字:

分析人员签字:

校核人员签字:



(a) D-型幼虫



(b) 前期壳顶幼虫



(c) 过渡期壳顶幼虫



(d) 后期壳顶幼虫



(e) 蹒行幼虫

图 C.1 沼蛤幼虫不同发育阶段鉴定图

附录 D

(资料性)

环境 DNA 记录表

表 D.1 给出了 eDNA 记录表。

表 D.1 eDNA 记录表

样点编号	采样时间	样点位置	采样体积	抽滤体积	样点环境描述 (水深、流速、 水温)	备注
1						
2						
3						
4						
5						
.....						
n						

检测人员签字：

分析人员签字：

校核人员签字：

附录 E

(资料性)

环境 DNA 浓度试验流程

E.1 用缓冲液将沼蛤成贝闭壳肌提取的 DNA 分别稀释 10、100、1000、10000、100000 倍，重复 8.5.2 的步骤，得到每种浓度对应的 Ct 值。

E.2 将 5 组 DNA 浓度 C_I 及其 Ct 值的对数值按下式进行拟合，可得扩增效率 a 和截距 b ：

$$\lg(C_I) = \lg(1 + a)Ct + b \quad (\text{E1})$$

式中：

C_I ——样品中沼蛤 DNA 浓度；

Ct ——反应体系中荧光信号强度达到阈值时所经历的扩增循环数；

a ——扩增效率；

b ——截距。

E.3 利用公式 (E1) 和每个样品的 Ct 值可求每个样品中的沼蛤 DNA 浓度。

附录 F

(资料性)

伴生菌落记录表

表 F.1 给出了伴生菌落采样记录表。

表 F. 1 伴生菌落采样记录表

样点编号	样点桩号	采样时间	样点环境描述	备注
1				
2				
3				
4				
5				
.....				
n				

检测人员签字:

分析人员签字:

校核人员签字:

参考文献

- [1] 徐梦珍, 王兆印, 段学花. 输水管线中淡水壳菜(*Limnoperna fortunei*)的防治研究[J]. 给水排水, 2009, 35(5): 205-208.
- [2] 徐梦珍. 底栖动物沼蛤对输水通道的入侵及防治试验研究[D]. 北京: 清华大学水利水电工程系, 2012.
- [3] 姚国友. 水工混凝土结构的贻贝侵蚀与防治技术研究[D]. 北京: 清华大学水利水电工程系, 2012.
- [4] 张晨笛, 徐梦珍, 王兆印, 王莹, 于鲲. 沼蛤幼虫管道湍流灭杀试验研究 I: 水力学特征[J]. 水利学报, 2016, 47(11): 1405-1417.
- [5] 张晨笛, 徐梦珍, 王兆印, 刘玮, 于丹丹, 王大强. 沼蛤幼虫管道湍流灭杀试验研究 II: 灭杀效果[J]. 水利学报, 2016, 47(12): 1510-1518.
- [6] Xia Z. Q., Johansson M. L., Gao Y. C., Zhang L., Haffner G. D., Macisaac H. J., Zhan A. B. Conventional versus real-time quantitative PCR for rare species detection[J]. Ecology and Evolution, 2018, 8(23): 11799-11807.