

船舶压载水中外来入侵鱼类的快速检测技术

刘璐¹, 陈治^{2,3}, 李扬⁴, 樊鑫^{1*}

1. 山东交通学院 船舶与港口工程学院, 山东 威海 264209;
2. 海南热带海洋学院 热带海洋生物资源利用与保护教育部重点实验室, 海南 三亚 572022;
3. 海南热带海洋学院 海南省热带海洋渔业资源保护与利用重点实验室, 海南 三亚 572022;
4. 威海市生态环境监控中心, 山东 威海 264200

摘要:为消除压载水中外来入侵鱼类对生态环境的潜在威胁,解决传统的入侵物种检测方法存在的不足和局限性,采用传统调查方法并结合环境DNA宏条形码技术对压载水中大量样本的物种鉴定及目标物种进行信息获取,构建外来物种数据库,并进行定性检测及定量评估,探索建立适合我国国情的监测理论和方法,综合分析评估鱼类潜在入侵风险,为我国众多港口进行压载水处理和管控提供理论依据,并最终为降低鱼类入侵风险甚至达到零风险提供技术支持。

关键词:船舶压载水;入侵鱼类;快速检测;环境DNA

中图分类号:U691+.6;R185.3+2

文献标志码:A

文章编号:1672-0032(2023)01-0110-09

引用格式:刘璐,陈治,李扬,等.船舶压载水中外来入侵鱼类的快速检测技术[J].山东交通学院学报,2023,31(1):110-118.

LIU Lu, CHEN Zhi, LI Yang, et al. Fast detection technology for alien invasive fish in ship ballast water [J]. Journal of Shandong Jiaotong University, 2023, 31(1): 110-118.

0 引言

生物入侵、环境污染、资源过度开发和气候变化带来的环境问题已对全球生态系统构成巨大威胁^[1]。近年来,以人类为传播媒介的生物入侵事件在全球范围愈演愈烈。密集的航运业、水产品和水生宠物贸易及水产养殖等导致外来水生生物快速传播,进而引发生物入侵^[2]。每年通过船舶货运进入我国的压载水超过3.5亿t,且还在以年均5%左右的速度递增^[3]。

据统计,为保证航行的安全性和稳定性,一条普通的商业散货船在单次航程中携带的压载水约3万t,船舶压载水每天携带的海洋生物多达7000种。大量的浮游植物、浮游动物、无脊椎动物幼虫、鱼卵和仔稚鱼及成鱼被压载水从原有海域带到新的海域。船舶压载水已成为无意间引入外来水生生物的最主要途径^[4]。外来物种从被引入到成为入侵物种一般需要经过3个阶段:到达→建群→扩散,最终达到某种相对稳定的状态^[5],而且一旦入侵成功,极易造成生态失衡或疾病流行(疟疾、乙脑、霍乱、登革热等)^[6]。因此,对压载水实施有效处理和管控已成为港口船舶管理的必要措施和关键步骤。很多国家都采用多种检测方法和监测手段,研究和监测压载水引入的鱼类。

远洋运输在全球对外贸易货物运输中发挥着不可替代的主导作用。2020年我国港口完成货物吞吐量145.5亿t,包括沿海港口94.8亿t和内河港口50.7亿t,位居世界第一,同比增长4.3%。内河等

收稿日期:2022-06-24

基金项目:国家自然科学基金项目(32002389);山东交通学院博士科研启动基金项目(BS201902051、BS201902055)

第一作者简介:刘璐(1988—),女,山东济宁人,工学博士,主要研究方向为分子生态学研究,E-mail:liulou@163.com。

*通信作者简介:樊鑫(1989—),男,江苏泰州人,工学博士,主要研究方向为海洋生态学研究,E-mail:fxpositivity@163.com。

级航道里程 6.73 万 km。港口规模不断扩大,货物吞吐量超过 2 亿 t 的港口达 24 个。中国出入境船舶压载水输入和输出总量巨大,基本呈逐年增长趋势。压载水的输入量从 2015 年的约 2.8 亿 t 增至 2020 年的约 3.6 亿 t,增幅近 50%^[7]。通过压载水传播到我国海域的海洋入侵生物的种类和数量越来越多^[8-9],给我国海洋环境保护带来了前所未有的挑战,对我国近岸养殖业和人民生命财产安全构成严重威胁。

因此,需重点关注被压载水引入到我国海域的外来生物有哪些?它们是否有成为入侵物种的潜在风险?通过完善压载水潜在入侵生物档案库并构建早期监测预警技术体系和平台,对压载水引入中国海域的外来生物数量、分布及其对中国境内其他生物和环境造成的影响实行有效的跟踪监测,成为我国港口远洋船舶管理和海洋生态环境保护的当务之急,这也是防止压载水生物入侵的最直接、最有效的方式。

1 船舶压载水防治生物入侵现状

压载水置换是防控外来生物入侵的常规操作^[10],是指将船舶在离港时在近岸海域所加的压载水在航行过程中更换为远洋海水,其中可能引入的远洋海洋生物一般难以在近岸海洋环境生存,可避免将其其他港口的近岸海水带入目的港而导致生物入侵。我国明确要求船舶必须安装压载水处理系统进行压载水置换,且要求在离岸超过 321.9 m 或水深大于 2000 m 的远洋中进行^[5]。但载质量超过 4 万 t 的船舶在大洋中更换压载水存在一定风险,影响航行安全^[11]。压载水置换对于距离较短的国际航运线路也较困难,置换水域的离岸距离可能无法满足国际海事组织(International Maritime Organization, IMO)的要求^[12-13]。

在航行过程中也可通过压载水处理系统对压载水进行生物杀灭处理。传统的处理手段有机械处理法、物理处理法和化学处理法等^[3]。机械处理法包括过滤法、旋流分离法,物理处理法包括加热法、紫外线照射法,化学处理法包括电解法、臭氧法和羟基自由基法等,但实际应用时均存在一定局限性,且不能杀灭压载水中的所有生物。目前还有部分国家没有施行压载水处理系统的装载要求,压载水不但没有在远洋海域中置换,而且没有进行生物杀灭处理,给海洋生物入侵埋下极大隐患,对近海生态环境保护造成严重威胁。

船舶是否安装了压载水处理系统,是采用压载水置换还是生物杀灭处理,均不能保证压载水排放的绝对安全性。对压载水引发的生物入侵应以防为主,防治结合。

2 船舶压载水中鱼类入侵的潜在风险

我国压载水的入侵生物监测对象大多为微生物、浮游植物和小型无脊椎动物等^[9,14-16],往往忽略鱼类等较大体型生物,很多学者认为压载水并不是外来鱼种入侵的主要途径,相关研究也没有引起足够重视。在压载水置换或排放时通常采用防护栅栏等设施粗滤压载水,但不能阻挡原生物、硅藻、真核生物幼体及桡足类等出入压载舱,在航运过程中经常出现防护栅栏和压载舱的泵叶被腐蚀甚至缺失等情况,这就为海洋鱼类(幼鱼、成鱼)等被泵入压载舱创造了机会^[17]。我国于 2018 年底正式加入《国际船舶压载水及沉积物控制与管理公约》,并于 2019 年正式履约,对压载水引入外来入侵生物的监测和管控仍处在经验摸索期。国外在压载水鱼类入侵方面的调查研究相对较早,已经有虾虎鱼(*Neogobius melanostomus*)、鲇(*Blenniidae*)、刺鱼(*Gasterosteus aculeatus*)、鲱(*Clupeidae*)、鲾(*Pleuronectidae*)、梭鱼(*Liza ramada*)、狮子鱼(*Pterois volitans/miles complex*)、褐菖鲈(*Sebastes marmoratus*)等被压载水引入和入侵的鱼类记录,其中,虾虎鱼和鲇为最常见种类,大多数鱼类曾被多次引入^[17-20]。穴居、底栖、耐缺氧和低温、卵小、耐盐幅宽或具有发达侧线系统的鱼类能够更好地适应压载水黑暗、缺氧和不平稳的环境。当鱼类随着压载水被排放至近岸港口时,礁石、洞穴等为这些鱼类提供了过渡环境。大多数鱼类因为不能适应当地的饵料、水文等条件而无法继续生存,只有极少数鱼类能够存活,经过到达、建群和扩散 3 个阶段

成为外来入侵物种。

鱼类一旦入侵成功,比其他入侵水生生物种类的活动能力更强,活动范围更广,生长更快,寿命更长,往往更难管控和治理,最终对当地海洋环境、海洋生物群落甚至渔业经济造成破坏,代价可能是海洋生物多样性减少或本土鱼类灭绝,海洋生态系统的结构和功能失调,给渔业经济造成巨大损失,本国需要支付高额的防治费用^[21]。通过其他途径,如观赏鱼引入、生物防控和人工养殖等入侵我国的非本土鱼类已对我国水域造成严重影响,如食蚊鱼、罗非鱼等^[22-25]。1985年,印度洋-太平洋海域的红狮子鱼首次被报道出现在美国加利福尼亚附近海域,随后的十几年逐渐发展成为美国南部大部分海域的优势物种,对当地鱼类和无脊椎动物的多样性产生负面影响。直到2016年,科学家根据连续8a的跟踪调查和研究推断,最终发现了红狮子鱼是通过压载水转运至美国太平洋沿岸港口并最终成为入侵物种^[19]。

3 船舶压载水入侵鱼类的传统检测方法

目前,压载水中入侵鱼类的监测及鉴定方法包括采用镜检(或荧光染色后镜检)等传统的形态学手段^[17,20],或采用流式细胞技术、激光质谱及透射光谱技术等方法监测浮游植物和微生物等单细胞生物^[26-28],这些方法能否用于压载水中的鱼类监测还有待验证。调查时,压载水满仓时通常采用浮游生物网、抄网和抽水泵捕获鱼类生物,在空仓时通常采用肉眼观察、先拍照后鉴定的方式。

采用传统形态学鉴定方法进行压载水中生物监测可直观鉴定所检测生物并对样本生物量化,有效区分活体和死亡个体,增加监测结果的准确性。传统形态学鉴定法的局限性是:1)效率低、费用高^[26],早期发现和快速采取措施是应对生物入侵的关键环节,但在早期入侵阶段,生物量较小,传统的形态学检测方法工作量大,形态鉴定试验周期长,且容易低估潜在入侵风险,待检测报告出来可能为时已晚,船舶或已靠港排放压载水,使入侵防控变得被动;2)对形态鉴定人员的专业知识水平要求高^[27];3)灵敏度低,许多类群有变态发育的特点,不同生活史阶段的形态结构和习性发生较大变化,部分类群在同一生活史时期的形态学特点极为相似,增加了物种鉴定的难度,大多数情况也只能鉴定到科或科以上分类阶元^[29]。采样方式和物种自身形态特征也对鱼类物种鉴定工作产生较大影响。样品保存不当导致形态特征缺失,给准确的分类鉴定造成困难^[30]。目前亟需建立集快速、准确、高灵敏度、高分辨率于一体的监测压载水外来鱼种的试验方法。

4 环境 DNA 宏条形码技术的应用

环境 DNA(environment DNA, eDNA)是生物体释放到环境中的 DNA 的总称,主要来源于生物体的配子、皮肤碎屑、粘黏或排泄物等^[31]。该技术从环境样品(水体、土壤、空气等)中直接提取 DNA 开展生物信息监测,不分离任何目标生物。

eDNA 技术在 20 世纪 80 年代首先应用在微生物的群落研究中。Ficetola 等^[31]在 2008 年采用水中提取的 DNA 监测到美国牛蛙的分布情况,开启了 eDNA 在水生生物实时监测中的应用研究。该技术已应用于生物多样性评价、水生生物监测和珍稀濒危物种的保护等研究领域^[32-35]。DNA 宏条形码技术是采用基因组内一段标准化的 DNA 片段鉴定生物物种的分子鉴定技术,目前在物种的快速鉴定和起源、进化等研究领域得到了广泛应用^[36-38]。eDNA 宏条形码技术通过提取环境样品中的 DNA 并使用条形码基因通过引物扩增,利用聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)和二代测序等技术,在短时间内获得可操作分类单元(operational taxonomic units, OTUs),通过与具有可靠物种分类信息的 DNA 条形码参照序列比对,可实现对大量样本的物种鉴定及目标物种的信息获取^[39-41]。传统的 DNA 条形码技术仅从单一样品中获取 DNA 信息,eDNA 宏条形码技术可直接从环境样品或生物混合样品中大批量识别物种^[41-42],省时、高效、成本低,如图 1 所示。

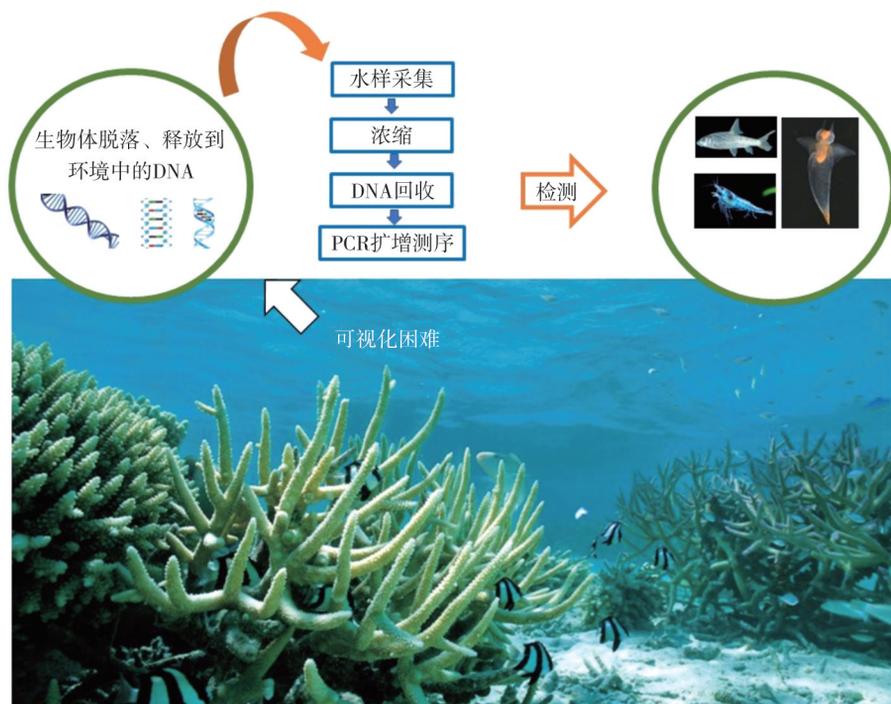


图 1 eDNA 宏条形码技术示意图

目前,eDNA 宏条形码技术应用到船舶压载水入侵生物的监测研究处于发展阶段^[43-50],国内尚未见相关研究。2015年,Zaiko 的研究团队发表关于 eDNA 宏条形码可用于压载水生物多样性调查和入侵生物监测的研究结果,通过细胞色素氧化酶(cytochrome oxidase subunit I, COI)基因开展欧洲蜗牛(*Peringia ulvae*)这一入侵生物的监测和风险评估研究^[47]。2019年,Rey 等^[49]采用 eDNA 宏条形码技术在压载水中检测到非本地物种的桡足类生物。Gerhard 等^[50]采用 16S rRNA 基因对美国 20 个港口 41 个压载舱进行基于 eDNA 宏条形码技术的微生物调查,结果显示 5 艘商船压载水中的大肠杆菌含量超标,未达到压载水排放标准。目前,基于 eDNA 宏条形码技术开展压载水中入侵鱼类的调查研究尚未见报道。

未来研究中可选择我国航运发达的沿海港口为研究区域,以外来入港船舶为研究对象,通过明确压载水 eDNA 样品采集的位置和途径,设计针对船舶压载水的高质量的 eDNA 采样方法,通过高通量测序和 eDNA 宏条形码分析,结合形态学分析方法,准确、快速鉴定我国海域船舶压载水中的外来鱼种。eDNA 宏条形码检测比形态学检测更灵敏,为提高物种的检出率和降低假阳性率,可基于 eDNA 宏条形码技术进行多方位采样和设置阴性对照,对比港口附近海域本土鱼种的调查研究,验证压载水中外来鱼种的鉴定结果。初步构建通过船舶压载水引至我国海域的有潜在入侵风险的外来鱼种信息数据库和物种 DNA 条形码的标准数据库。完善基于 eDNA 宏条形码技术的压载水外来鱼种的鉴定方法,揭示外来鱼种在中国海域入侵的潜在风险,向我国外来入侵物种防控工作发出预警,为我国压载水处理和管控提供理论依据和资源信息共享平台,为其他水生生物通过压载水入侵我国海域的调查研究提供参考依据和技术支撑。

船舶压载水外来入侵鱼类监测评价体系如图 2 所示。分别采集、调查压载舱中压载水、船舶所在港口附近海域水样,基于 eDNA 宏条形码测序的技术手段,对压载水和港口水域、近岸海域中的鱼类物种信息进行对比、排除,将测序片段与 NCBI、EMBL、BOLD 等数据库比对,参考船舶航行路径和压载水更换地点等数据信息,初步确定外来鱼种信息。与形态学鉴定结果进行相互印证,揭示压载水引入外来鱼类的种类组成,通过定量 PCR 开展外来鱼种的定量评估。结合历史调查数据和公开文献报道,收集鱼种自然分布海域的经纬度、温度、盐度、深度、pH 值、溶解氧等基础环境参数,通过与我国近岸海域的相应参数的对比分析,寻找不同海域间的异同,对比有记录的成功入侵海洋鱼类的共有特征及其与环境因子间的关

系,初步探讨外来鱼种在我国海域成为入侵物种的潜在风险。构建鱼类通过压载水引至我国海域的有潜在入侵风险的外来鱼种信息库。

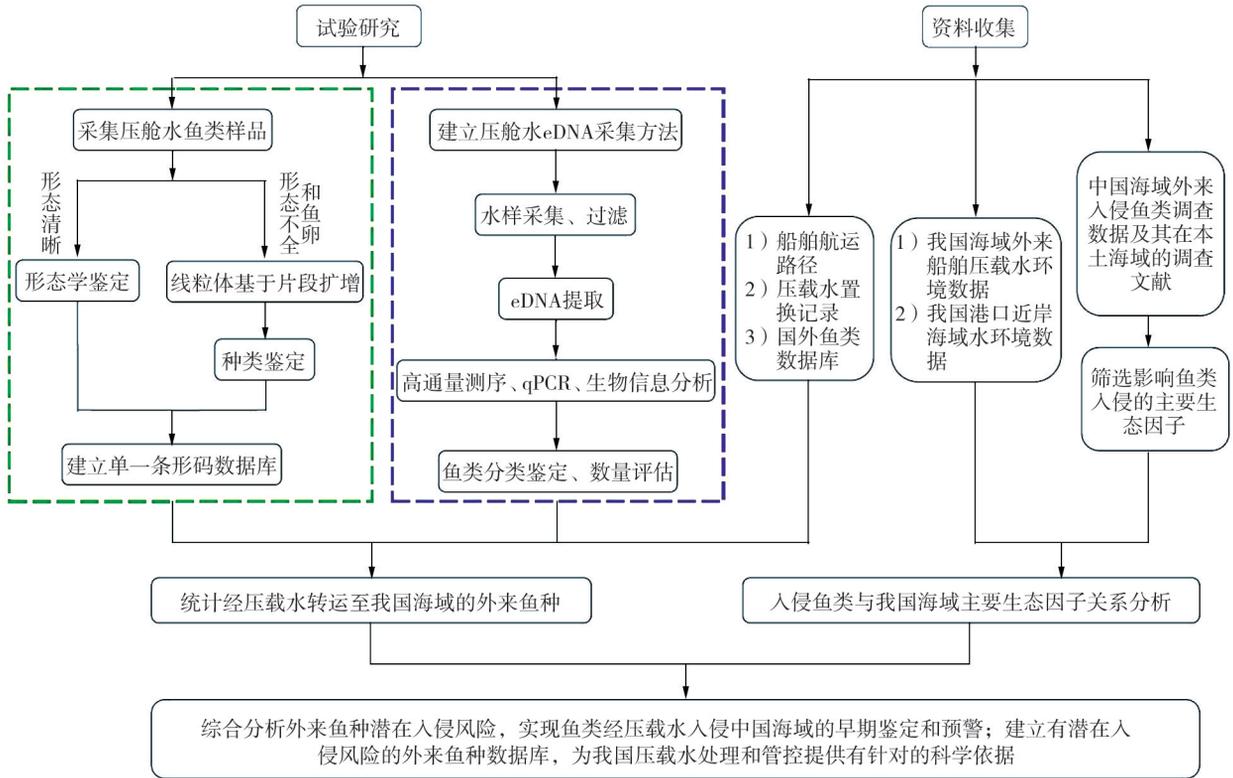


图2 船舶压载水外来入侵鱼类监测评价体系

5 新方法应用的影响因素和局限性

科学合理的取样方法是压载水检测的基础,对生物入侵风险管理非常重要,但目前公约中未规定压载水检测采样的标准化方法。船舶没有专用的压载水采样口,可利用的采样途径有测深管、消防管道开口、人孔、通气孔和压载水排放口,根据这些管、孔的大小可归类为大孔采样和小孔采样,但每种采样途径都有一定的局限性。在对进港船舶开展压载水生物监测调查时,为保证监测结果的准确性,根据不同的船型和装载情况,选择的取样具体位置和方法也不同^[51-52]。需摸索出一套合理、可行的采集eDNA样品的取样方法,保证所采集到的水样具有代表性,是保证研究结果准确性的前提。采集压载水水样,通过采水器法、潜水泵法、隔膜泵法和管道采样法及不同的采样途径,采取控制变量等方法,结合核酸定量分析和定量PCR检测,探索eDNA的最佳采样途径,确定适用于压载水的高质量eDNA采样方法。优化样品收集保存技术,有效地规避样品间交叉污染,设置阴性对照,提升鉴定结果的准确性和可靠性。

不同的数据分析方式可能给快速检测外来鱼种带来不同的检测结果,比如分项目阅读值的不同设置方法可能引起结果的假阴性,影响外来物种的有效鉴别和检出,适当选择和设置生物信息学工具及参数尤为重要^[53],注意开发准确性更高的软件包,增强不同研究结果的对比性及准确性。

参考数据库的不完整性和不准确性是限制采用eDNA宏条形码技术进行船舶压载水中外来物种检测的主要障碍^[54],数据库不完整将大大降低入侵鱼种的检出率,应尽快构建完善的物种DNA条形码参考数据库、建立全球范围的资源信息共享和应用平台,推动该技术的应用与推广。检测外来鱼种应建立健全外来入侵鱼种和各港口附近海域本土鱼类资料数据库,以便准确判定检测到的生物是否为外来入侵鱼种。

最优目标基因的选择是影响采用 eDNA 宏条形码技术进行船舶压载水外来物种检测的另一重要因素。目前已有不少针对鱼类设计的 eDNA 宏条形码通用引物^[55-57],其目标基因彼此存在差异,导致鱼类鉴定方面的通用性差异较大。需根据实际调查的海域状况和有记录的鱼类出现记录及具体的预试验等设定目标基因。鱼类种间差异的阈值认定也不固定。标准的动物 DNA 条形码主要为线粒体细胞色素 c 氧化酶亚基 I 基因,但鱼类 eDNA 宏条形码主要选用线粒体 12S 核糖体或 16S 核糖体基因,变异速度不稳定^[58],且扩增片段多小于 200 bp(碱基对 base-pair)。鱼类物种系统发育分析过程的种间差异阈值目前也尚无定论。

在船舶压载水采用 eDNA 宏条形码技术鉴定入侵鱼类的种类相对简单,但如何实现入侵鱼类的定量评估仍存在争议,未来可开发准确鉴别特定外来物种和相关近缘物种的特异性条形码,探索影响 eDNA 与生物量线性关系的生物和非生物因素,校正优化 eDNA 定量方法^[59]等方面的研究手段,促进 eDNA 技术在压载水入侵生物防治中的应用。

参考文献:

- [1] 鞠瑞亭,李慧,石正人,等.近十年中国生物入侵研究进展[J].生物多样性,2012,20(5):581-611.
JU Ruiting, LI Hui, SHI Zhengren, et al. Progress of biological invasions research in China over the last decade [J]. Biodiversity Science, 2012,20(5):581-611.
- [2] LOCKWOOD J L, HOOPES M F, MARCHETTI M P. Invasion ecology [M]. Chichester, West Sussex: Wiley-Blackwell Scientific Publications, 2013.
- [3] 笄靖.船舶压载水中有害生物的处理技术研究[J].船舶工程,2016,38(增刊2):120-123.
DA Jing. Research on treatment technology of harmful aquatic organisms in ship ballast water [J]. Ship Engineering, 2016,38 (Suppl. 2):120-123.
- [4] ARDURA A, ZAIKO A, MARTINEZ J, et al. Environmental DNA evidence of transfer of North Sea molluscs across tropical waters through ballast water [J]. Journal of Molluscan Studies, 2015, 81:495-501.
- [5] 刘艳,吴惠仙,薛俊增.海洋外来物种入侵生态学研究[J].生物安全学报,2013,22(1):8-16.
LIU Yan, WU Huixian, XUE Junzeng. The ecology of invasions by marine exotic species [J]. Journal of Biosafety, 2013,22 (1):8-16.
- [6] 吴昊,丁建清.入侵生态学最新研究动态[J].科学通报,2014,59(6):438-448.
WU Hao, DING Jianqing. Recent progress in invasion ecology [J]. Chinese Science Bulletin, 2014,59(6):438-448.
- [7] 交通运输部.2020年交通运输行业发展统计公报[R].北京:交通运输部,2021.
- [8] 白敏冬,张芝涛,薛晓红.海洋外来有害生物和病原体防治新技术[M].北京:海洋出版社,2010.
- [9] 吴惠仙,边佳胤,王飞飞,等.中国大陆到港船舶压载水生物研究[J].上海海洋大学学报,2018,27(3):455-459.
WU Huixian, BIAN Jiayin, WANG Feifei, et al. Research of organisms in ballast water of ships arriving in the mainland of China [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2018,27(3):455-459.
- [10] International Maritime Organization. IMO (2004) International convention for the control and management of ships' ballast water and sediments [J/OL]. (2015-12-15) [2022-03-20]. <https://www.westpandi.com/publications/notice-to-members/2016-2017/notice-to-members-no-20-20162017/>.
- [11] 王朝晖,陈菊芳,杨宇峰.船舶压载水引起的有害赤潮藻类生态入侵及其控制管理[J].海洋环境科学,2010,29(6):922-934.
WANG Zhaohui, CHEN Jufang, YANG Yufeng. Control and management of harmful algal bloom species introduced by ballast water [J]. Marine Environmental Science, 2010,29(6):922-934.
- [12] WOODWARD J B, PARSONS M G, TROESCH A W. Ship operational and safety aspects of ballast water exchange at sea [J]. Canadian Journal of Chemistry, 1994,31(4):315-326.
- [13] 郝林华,石红旗,王能飞,等.外来海洋生物的入侵现状及其生态危害[J].海洋科学进展,2005,23(增刊):121-126.
HAO Linhua, SHI Hongqi, WANG Nengfei, et al. Present status and ecological harming of alien marine organism invasion [J]. Advances in Marine Science, 2005,23(Suppl.):121-126.
- [14] 王雷,薛俊增,吴惠仙.中国到港船舶压载水中致病菌分析及检测[J].船舶工程,2020,42(2):92-98.

- WANG Lei, XUE Junzeng, WU Huixian. Analysis and detection of pathogenic bacteria in ballast water of oceanic vessels moored in Chinese coastal ports[J]. *Ship Engineering*, 2020,42(2):92-98.
- [15] GHABOOLLI S, ZHAN A, PAOLUCCI E, et al. Population attenuation in zooplankton communities during transoceanic transfer in ballast water[J]. *Ecology and Evolution*, 2016, 17:6170-6177.
- [16] 杨帆,李捷,于淑婷,等.船舶压载水浮游生物检测方法研究进展[J]. *环境科学与技术*,2017,40(4):45-49.
YANG Fan, LI Jie, YU Shuting, et al. Advances in detection of plankton in ballast water[J]. *Environmental Science & Technology*, 2017,40(4):45-49.
- [17] WONHAM M J, CARLTON J T, RUIZ G M, et al. Fish and ships: relating dispersal frequency to success in biological invasions[J]. *Marine Biology*,2000,136:1111-1121.
- [18] SEEBENS H, GASTNER M T, BLASIUS B, et al. The risk of marine bioinvasion caused by global shipping[J]. *Ecology Letters*, 2013, 16(6):782-790.
- [19] MACISAAC H J, DE ROY E M, LEUNG B, et al. Possible ballast water transfer of Lionfish to the eastern Pacific Ocean [J]. *Plos One*, 2016, 11(11):e0165584.
- [20] HANSEN H, KARLSBAKK E. Pacific false kelpfish, *Sebastes marmoratus* (Cuvier, 1829) (Scorpaeniformes, Sebastidae) found in Norwegian waters[J]. *Bioinvasions Records*, 2018, 7(1):73-78.
- [21] 潘勇,曹文宣,徐立蒲,等.鱼类入侵的过程、机制和研究方法[J]. *应用生态学报*,2007,18(3):687-692.
PAN Yong, CAO Wenxuan, XU Lipu, et al. Process, mechanism, and research method of fish invasion[J]. *Chinese Journal Applied Ecology*, 2007,18(3):687-692.
- [22] 李振宇,解炎.中国外来入侵种[M].北京:中国林业出版社,2002.
- [23] 何舜平,陈宜瑜.中国淡水鱼类濒危现状及致危原因分析:保护中国的生物多样性[M].北京:中国环境科学出版社,2001.
- [24] 解炎,李振羽,汪松.中国入侵物种综述:保护中国的生物多样性(二)[M].北京:中国环境科学出版社,1996.
- [25] 汪松,乐佩琦,陈宜瑜.中国濒危动物红皮书:鱼类卷[M].北京:科学出版社,1998.
- [26] HOELL I, OLSEN R, HESS-ERGA O, et al. Application of flow cytometry in ballast water analysis-biological aspects[J]. *Management of Biological Invasions*,2017,8(4):575-588.
- [27] EMAMI K, ASKARI V, ULLRICH M, et al. Characterization of bacteria in ballast water using MALDI-TOF mass spectrometry[J/OL]. *Plos One*, 2012, 7:e38515[2012-03-21]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038515>.
- [28] MAHON A R, BARNES M A, LI F, et al. DNA-based species detection capabilities using laser transmission spectroscopy[J/OL]. *Journal of the Royal Society Interface*, 2013, 10:20120637 [2012-05-21]. <http://dx.doi.org/10.1098/rsif.2012.0637>.
- [29] 刘璐,孙典荣,李纯厚,等. DNA 条形码技术在鳎科鱼类鉴定中的应用[J]. *中国海洋大学学报*,2016,46(11):178-186.
LIU Lu, SUN Dianrong, LI Chunhou, et al. Application of DNA barcoding in classification of mugilidae fishes[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2016, 46(11):178-186.
- [30] DRAKE J M, LODGE D M. Rates of species introductions in the Great Lakes via ships' ballast water and sediments[J]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2007, 64:530-538.
- [31] FICETOLA G F, MIAUD C, POMPANON F, et al. Species detection using environmental DNA from water samples[J]. *Biology Letters*, 2008, 4:423-425.
- [32] 李飞龙,杨江华,杨雅楠,等.环境 DNA 宏条形码监测水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'nan, 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.
- [33] 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.
SHAN Xiujuan, LI Miao, WANG Weiji. Application of environmental DNA technology in aquatic ecosystem[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(3):23-29.
- [34] 李萌,尉婷婷,史博洋,等.环境 DNA 技术在淡水底栖大型无脊椎动物多样性监测中的应用[J]. *生物多样性*,2019,

27:480-490.

LI Meng, WEI Tingting, SHI Boyang, et al. Biodiversity monitoring of freshwater benthic macroinvertebrates using environmental DNA[J]. Biodiversity Science, 2019,27:480-490.

- [35] RUPPERT K M, KLINE R J, RAHMAN M S. Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: a systematic review in methods, monitoring, and applications of global Edna [J]. Global Ecology and Conservation, 2019,17:e00547.
- [36] 刘璐,高天翔,韩志强,等. 中国近海梭梭拉丁名的更正[J]. 中国水产科学,2016,23:1108-1116.
LIU Lu, GAO Tianxiang, HAN Zhiqiang, et al. Latin name correction of *Liza affinis* from China [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2016,23:1108-1116.
- [37] LIU L, PANHWAR S, GAO T, et al. New genetic evidence from three keel-backed *Liza* species based on DNA barcoding confirms morphology-based identification [J]. Pakistan Journal of Zoology, 2017, 49:1901-1907.
- [38] VALENTINI A, TABERLET P, MIAUD C, et al. Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding [J]. Molecular Ecology, 2016, 25(4):929-942.
- [39] KUMAR S, CARLSEN T, MEVIK B H, et al. CLOTU: an online pipeline for processing and clustering of 454 amplicon reads into OTUs followed by taxonomic annotation [J]. BMC Bioinformatics, 2011, 12:182-187.
- [40] 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.
- [41] SHAWA J, CLARKEA L J, WEDDERBURNB S D, et al. Comparison of environmental DNA metabarcoding and conventional fish survey methods in a river system [J]. Biological Conservation, 2016, 197:131-138.
- [42] AYLAGAS E, BORJA A, IRIGOIEN X, et al. Benchmarking DNA metabarcoding for biodiversity-based monitoring and assessment [J]. Frontiers in Marine Science, 2016, 1(3):96.
- [43] JERDE C L, CHADDERTON W L, MAHON A R, et al. Detection of Asian carp DNA as part of a Great Lakes basin-wide surveillance program [J]. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 2013, 70(4):522-526.
- [44] LIN M X, ZHANG S, YAO M. Effective detection of environmental DNA from the invasive American bullfrog [J]. Biological Invasions, 2019, 21(7):2255-2268.
- [45] AMBERG J, MERKES C, STOTT W, et al. Environmental DNA as a tool to help inform zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, management in inland lakes [J]. Management of Biological Invasions, 2019, 10(1):96-110.
- [46] ARDURA A, ZAIKO A, MARTINEZ J, et al. Environmental DNA evidence of transfer of North Sea molluscs across tropical waters through ballast water [J]. Journal of Olluscan Studies, 2015, 81:495-501.
- [47] ZAIKO A, MARTINEZ J, SCHMIDT-PETERSEN J, et al. Metabarcoding approach for the ballast water surveillance: an advantageous solution or an awkward challenge [J]. Marine Pollution Bulletin, 2015, 92(1/2):25-34.
- [48] EGAN S P, GREY E, OLDS B, et al. Rapid molecular detection of invasive species in ballast and harbor water by integrating environmental DNA and light transmission spectroscopy [J]. Environmental Science and Technology, 2015, 49(7):4113-4121.
- [49] REY A, CARNEY K, QUINONES L, et al. Environmental DNA metabarcoding: a promising tool for ballast water monitoring [J]. Environmental Science and Technology, 2019, 53(20):11849-11859.
- [50] GERHARD W A, GUNSCH C K. Metabarcoding and machine learning analysis of environmental DNA in ballast water arriving to hub ports [J]. Environment International, 2019,124:312-319.
- [51] 徐加伟,付立东,吴桂涛. 船舶压载水取样探究 [J]. 中国水运,2016,16(6):12-14.
- [52] 张弛,薛俊增,鄧于豪,等. 船舶压载水浮游植物采样技术的比较 [J]. 上海海洋大学学报,2018,27:421-425.
ZHANG Chi, XUE Junzeng, SHAO Yuhao, et al. Effects of different sampling methods on the assessment of biomass quantity in ballast water [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2018,27:421-425.
- [53] SCOTT R, ZHAN A B, BROWN E A, et al. Optimization and performance testing of a sequence processing pipeline applied to detection of nonindigenous species [J]. Evolutionary Applications, 2018, 11(6):891-905.
- [54] WEIGAND H, BEERMANN A J, CIAMPOR F, et al. DNA barcode reference libraries for the monitoring of aquatic biota in Europe: gap-analysis and recommendations for future work [J]. Science of the Total Environment, 2019, 678:499-524.
- [55] SCHENEKAR T, SCHLETTERER M, LECAUDEY L A, et al. Reference databases, primer choice, and assay sensitivity for

- environmental metabarcoding; lessons learnt from a re-evaluation of an eDNA fish assessment in the Volga headwaters [J]. *River Research and Applications*, 2020, 36(7):1004–1013.
- [56] SHU L, LUDWIG A, PENG Z. Environmental DNA metabarcoding primers for freshwater fish detection and quantification; in silico and in tanks [J]. *Ecology and Evolution*, 2021, 11(3):8281–8294.
- [57] 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.
- [58] 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]. *Royal Society open science*, 2015, 2(7):150088.
- [59] 林渊源, 赵峥. 环境 DNA 技术在水生入侵生物监测中的应用 [J]. *生态毒理学报*, 2021, 16(6):1–12.
LIN Yuanyuan, ZHAO Zheng. Application of environmental DNA technologies in monitoring aquatic invasive species [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2021, 16(6):1–12.

Fast detection technology for alien invasive fish in ship ballast water

LIU Lu¹, CHEN Zhi^{2,3}, LI Yang⁴, FAN Xin^{1*}

1. *Naval Architecture and Port Engineering College, Shandong Jiaotong University, Weihai 264209, China;*

2. *Key Laboratory of Utilization and Conservation for Tropical Marine Bioresources, Hainan Tropical Ocean University, Ministry of Education,*

Sanya 572022, China; 3. *Hainan Key Laboratory for Conservation and Utilization of Tropical Marine Fishery Resources,*

Hainan Tropical Ocean University, Sanya 572022, China; 4. *Weihai Ecological Environment Monitoring Center, Weihai 264200 China*

Abstract: In order to eliminate the potential threat of alien invasive fish in ballast water to the ecological environment, and solve the shortcomings and limitations of traditional invasive species detection methods, traditional investigation methods combined with environmental DNA macro barcode technology are used to identify species and obtain information about target species in a large number of samples in ballast water. A database of alien fish species is built, and qualitative detection and quantitative evaluation are carried out. Monitoring theories and methods suitable for China's national conditions are explored and established to comprehensively analyze and evaluate the potential invasion risk of fish. Theoretical basis for ballast water treatment and control in many ports in China is provided, and finally technical support for reducing the invasion risk of fish and even reaching zero risk is offered.

Keywords: ship ballast water; invasive fish; rapid detection; environmental DNA

(责任编辑:王惠)