J. Lake Sci.(湖泊科学), 2027, 39(4):000-000
DOI 10.18307/2027.0435
©2027 *by Journal of Lake Sciences*

水库底栖动物环境 DNA 垂直分布特征及其对水质生物监测的启示

——以温州四座水库为例*

钟姝彤[1]，谢凌珊[1]，魏　铮[2]，周　莹[2]，盛天进[1]，陈锦贤[1]，连　纲[2]，王备新[1**]
（1：南京农业大学植物保护学院，南京 211800）
（2：浙江省生态环境监测中心，杭州　310012）

摘　要：探究水环境 DNA（environmental DNA，eDNA）的空间分布特征，对于规范 eDNA 采样策略，提高水生生物多样性监测与生态评价的可靠性与可比性具有重要意义。深水型水库受热力作用影响，水体垂向呈现显著的温度分层现象，水生生物 eDNA 信号在不同水层间的分布特征可能影响它们在水生态监测中的适用性。然而，目前对深水水库中底栖动物 eDNA 信号的垂直分布特征的认识仍较有限，尚无一致结论。本研究以温州地区 4 座深水水库为研究对象，于 2023 年 10 月采集了 26 个样点的表层、中层和底层合计 78 个水体 eDNA 独立样本和 4 个阴性对照样本，并同步监测 10 项水质理化指标。测序后获得原始序列，经生信分析与质控（去除低质量序列及污染/嵌合序列），并基于中国底栖动物条形码参考数据库进行物种注释后，共获得 31,486 条底栖动物有效序列，并以 97%序列相似度聚类得到 255 个可操作分类单元（OTUs），隶属 3 门 6 纲 19 目，其中节肢动物占主导地位（221 个 OTUs）。表层水体的序列多度与 OTU 数略高于中层和底层，但不同水层之间无显著差异。不同水层间底栖动物群落物种组成也无显著差异，但各水层特有 OTU 的组成存在差异。表层水体的 Shannon 和 Simpson 多样性指数高于底层，其中 Simpson 指数差异显著。基于不同水层 eDNA 群落构建的 BMWP 指数与表层水质综合指数（WQI）的评价结果有较好的对应关系，各水库水质总体处于“良”等级。上述结果表明四座水库 10 月份不同水层的底栖动物 eDNA 信号在特有物种组成和 Simpson 多样性指数方面呈现出显著的垂直分布差异，但表层水样的底栖动物 eDNA 生物评价结果可反映水库表层水质。本研究为深水水库底栖动物 eDNA 垂向分布规律的理解及生物监测采样策略的优化提供了参考数据。
关键词：eDNA；底栖动物；水库；垂直分布；生物监测

Vertical distribution of benthic macroinvertebrate eDNA in reservoirs and its implications for water quality bioassessment: evidence from four reservoirs in Wenzhou, China*

Zhong Shutong[1], Xie Lingshan[1], Wei Zheng[2], Zhou Ying[2], Sheng Tianjin[1], Chen Jinxian[1], Lian Gang[2] & Wang Beixin[1**]
(1: College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 211800, P.R.China)
(2: Zhejiang Provincial Ecological Environment Monitoring Center, Hangzhou 310012, P.R.China)

Abstract: Understanding the spatial distribution patterns of aquatic environmental DNA (eDNA) is essential for standardizing eDNA sampling protocols and for ensuring the reliability and comparability of aquatic biodiversity monitoring and ecological assessments across studies. Deep reservoirs often exhibit pronounced vertical thermal stratification, and differences in the distribution of aquatic organism eDNA among water layers may affect its applicability in aquatic ecological monitoring. However, knowledge of the vertical distribution of benthic macroinvertebrate eDNA in deep reservoirs remains limited, and no consistent

* 2026-01-11 收稿；2026-08-1 收修改稿；2026-08-18 录用。
国家自然科学基金项目(32271631)资助.
** 通信作者；Email: wangbeixin@njau.edu.cn。

conclusions have yet been reached. In this study, four deep reservoirs in Wenzhou, China, were investigated in October 2023. A total of 78 independent water eDNA samples were collected from the surface, middle, and bottom layers at 26 sampling sites, along with four field negative controls; 10 physicochemical variables of surface water were measured simultaneously. After sequencing, we obtained the raw sequences. Following bioinformatics analysis and quality control (removal of low-quality sequences and contaminant/chimeric sequences), and species annotation based on the Chinese Freshwater Macroinvertebrate Barcode Library (CMBL), we obtained 31,486 valid benthic macroinvertebrate sequences, which were clustered using a 97% sequence similarity threshold to yield 255 operational taxonomic units (OTUs), representing 3 phyla, 6 classes, and 19 orders, with Arthropoda being the dominant group (221 OTUs). Sequence abundance and OTU richness were slightly higher in the surface layer than in the middle and bottom layers, although the differences among water layers were not statistically significant. No significant differences in overall benthic macroinvertebrate community composition were detected among water layers, whereas the composition of layer-specific OTUs differed significantly. The Shannon and Simpson diversity indices were higher in the surface layer than in the bottom layer, with a significant difference detected for the Simpson index. Water-quality assessments based on BMWP scores derived from eDNA communities in different water layers were generally consistent with the surface-water Water Quality Index (WQI), and the overall water quality of all reservoirs was classified as "good." These results indicate that benthic macroinvertebrate eDNA signals in the four reservoirs exhibited significant vertical differences in the composition of layer-specific OTUs and the Simpson diversity index in October, whereas the eDNA-based biological assessment using surface-water samples adequately reflected surface-water quality. Our study provides insights into understanding the vertical distribution of benthic macroinvertebrate eDNA and optimizing biological monitoring strategies in deep reservoirs.
Keywords: eDNA; benthic macroinvertebrates; reservoir; vertical distribution; biomonitoring

生物多样性监测可为区域和全球生物多样性现状评估和未来变化趋势分析提供重要数据[1-2]，建立标准化的监测技术规范对评估结果的可靠性和可比性十分重要[3-4]。环境 DNA（environmental DNA，eDNA）通常是指生物体通过排泄物、分泌物、脱落细胞、组织碎片或死亡残体等形式释放并保留于水体、沉积物、土壤或空气等环境介质中的遗传物质[5-6]。基于 eDNA 的宏条形码分析通常包括 eDNA 样品的采集与富集、DNA 提取、特定片段的 PCR 扩增、高通量测序及生物信息学分析等步骤来获取目标生物类群的分子信号，最后通过物种注释推断物种存在情况、群落组成及相对序列丰度等特征[6]。与传统调查方法相比，eDNA 分析具有非侵入性、灵敏度高和结果数字化等特点[7-9]，被认为在未来淡水生物多样性监测和水生态质量评价中具有广泛的应用前景[5,9]。经过 20 余年的发展，eDNA 技术已由早期技术探索阶段逐步进入方法优化和标准化建设阶段[10]。

生物释放到水环境中的 DNA 经过降解、扩散和沉降等物理生物过程，随机或聚集分布于水体和沉积物中。这一物理过程产生的 eDNA 在水体中的水平分布和垂直分布特征，可能受不同水体类型（流动水体、静水水体、浅水型和深水型水体）的水文、水体理化特征影响而不同，揭示这些特征和阐明相关机制，对深入了解 eDNA 的环境行为和 eDNA 技术标准化有积极作用[11-12]。

已有研究指出，部分水库在水深超过约 7 m 时可能形成温跃层，温度分层可进一步影响水体溶解氧等理化指标的垂向分布[13]。同时，深水水体中的热分层结构以及溶解氧、pH 和叶绿素等理化指标的垂直分布特征，往往会随季节变化发生显著改变。尽管已有研究初步揭示了海洋环境中底栖动物 eDNA 的垂直分布可能受温跃层限制[14]，但在深水水库和湖泊等淡水水生态系统中，底栖动物释放的 eDNA 在水体的不同深度及沉积物中的垂直分布格局及其影响因素仍有待进一步揭示。

底栖动物具有对水质变化敏感、种类多样性高和分布广等特点，因而被广泛应用于水质生物评价实践[15-16]。在深水水库和湖泊中，底栖动物的主要栖息生境包括库岸带底栖生境和深水区沉积物生境[17]。然而，传统的深水水库底栖动物的采样方法通常存在采样难度大，采集到的物种数和个体数量较低等不足。同时，基于传统采样结果计算的底栖动物生物指数，其评价结果的合理性还不是十分清楚[18]。eDNA 技术能否为深水型水库底栖动物多样性监测及水生态健康评价困境提供新的解决途径，目前仍有待研究。

本文以浙江省温州市 4 座水深超过 10 米的深水水库为研究对象，通过采集不同深度水层的 eDNA

样品，分析底栖动物 eDNA 在水体垂直方向上的分布特征；同时，比较基于 eDNA 检测获得的底栖动物分类单元数据计算的生物指数与表层水体理化指标评价结果之间的一致性。研究结果有助于加深对我国亚热带地区深水型水库底栖动物 eDNA 垂直分布规律及其生态评价应用潜力的认识，并可为深水淡水水体中底栖动物 eDNA 采样方案的优化提供参考数据。

1 材料与方法

1.1 样点设置

在浙江省温州市的 4 个水库（赵山渡水库、桥墩水库、泽雅水库和珊溪水库）设置 26 个调查样点（图 1）。赵山渡水库属于飞云江流域，库容 3.41×10^7 m^3，水域面积 3.8 km^2，正常蓄水位 22 m[19]。桥墩水库属于鳌江流域，库容 8.13×10^7 m^3，水域面积 2.15 km^2，正常蓄水位 52.19 m[20]。泽雅水库属于瓯江流域，库容 5.58×10^7 m^3，水域面积 1.56 km^2，正常蓄水位 108.6 m[21]。珊溪水库属于飞云江流域，库容 1.82×10^9 m^3，水域面积 31.66 km^2，正常蓄水位 142 m[22]。

采样点设置依据《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）》（HJ 1296-2023）[23]，兼顾流域面积和岸线形态，其中赵山渡水库 3 个样点（ZSD1～ZSD3）、桥墩水库 4 个（QD1～QD4）、泽雅水库 4 个（ZY1～ZY4）和珊溪水库 15 个（SX1～SX15）。

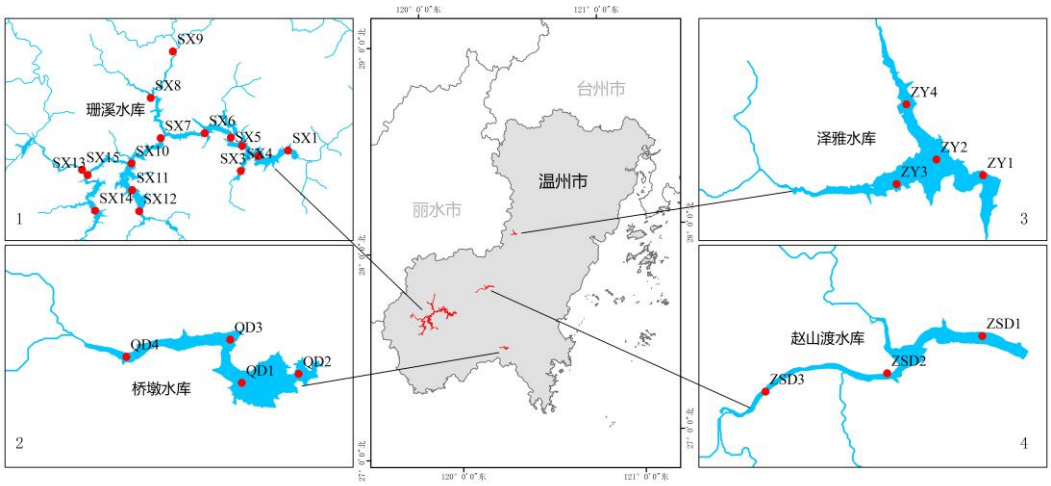


图 1 赵山渡、桥墩、泽雅和珊溪水库在温州市的分布及采样点

Fig.1 Sampling sites at reservoirs of Zhao Shandu (ZSD), Qiaodun (QD), Zeya (ZY) and Shanxi (SX) in Wenzhou city

1.2 环境因子测定

2023 年 10 月 15—25 日，使用便携式水质分析仪（Mettler Toledo，SG 9）现场测定水温（WT）、溶解氧（DO）、pH 值和电导率（EC）。依据《水和废水监测分析方法》运用散射光浊度法测定浊度（NTU），碱性过硫酸钾消解紫外分光光度法测定总氮（TN），钼酸铵分光光度法测定总磷（TP），纳氏试剂分光光度法测定氨氮（NH_4^+-N）的浓度，采用稀释与接种法测定五日生化需氧量（BOD_5），采用重铬酸钾法测定化学需氧量（COD）[24]。

1.3 eDNA 样品采集

参照《淡水生物环境 DNA 监测技术方法（DB32/T 4539-2023）》采集 eDNA 样品[25]。采样前对所有材料和仪器进行 DNA 痕迹去除处理，采样时佩戴一次性无菌手套操作，每个样点用无菌采样瓶采集水样。参考 Lawson Handley 等的方法[26]，每个样点依次采集不同深度水层的水样：距水底约 1 m 处采集底层水样，以避免底泥扰动对水样的影响；中层水样采集于水体中部（约为最大水深的 1/2），表层水样采

集于水面下 0.5 m 处。该分层采样方法有助于比较表层、中层和底层水体中 eDNA 信号的垂向差异。每个深度的水层采集 3 个 500 mL 水样，合并后过滤至同一张 0.45 μm 孔径玻璃微纤维滤膜（Whatman GF/F）上，过滤装置为 Nalgene 300-4100 过滤器。过滤后的滤膜放入 5 mL 冻存管，做好标记，暂存于液氮中，返回实验室后在 -20 ℃ 环境下保存。此外，每个水库另以等量超纯水进行同步过滤，作为野外阴性对照，用于监测采样和过滤过程中可能产生的污染，26 个样点合计采集 82 个环境 DNA 样品（78 个水库水样加 4 个阴性对照）。

1.4 DNA 提取、扩增与测序

滤膜上富集的 eDNA 通过 Ezup 柱式动物基因组 DNA 抽提试剂盒提取，按照试剂盒操作说明完成。使用通用引物 mlCOIintF / jgHCO2198 扩增线粒体 COI 基因，正向引物为 mlCOIintF: 5’-GGWACWGGWTGAACWGTWTAYCCYCC-3’，反向引物为 jgHCO2198:5’-TANACYTCNGGRTGNCCRAARAAYCA - 3’，目标片段长度约为 313 bp[27-29]。在每对引物的 5’ 末端添加了 8 个碱基标签，以区分测序组内不同样品。本研究采用 25 μL 反应体系：12.5 μL MIX（北京擎科，金牌 MIX）、9.5 μL DEPC 水（上海生工）、1 μL 正向引物（10 μM）、1 μL 反向引物（10 μM）和 1 μL DNA 模板。扩增程序如下：94 ℃，5 min；16 个循环：95 ℃，10 s，62℃，30 s，72℃，60 s；25 个循环：95 ℃，10 s，46℃，30 s，72 ℃，30 s；65 ℃，5 min。每个 eDNA 样品进行 3 次 PCR 技术重复， PCR 产物通过质量分数为 2%的琼脂糖凝胶电泳检测（目标条带明亮且单一）后，将同一样品的 3 次 PCR 产物等量混合。混合后的样品由南京派森诺基因科技有限公司按常规流程再次扩增后，在 Illumina HiSeq 2500 平台 250 bp PE 模式下进行测序。测序样品总数为 85 个（含 4 个野外阴性对照和 3 个 PCR 扩增阴性对照），分 3 个测序文库完成测序，每个文库的测序量约为 4×10^6 reads，平均测序深度约为 1.41×10^5 reads/样品。本研究未单独设置 DNA 提取空白（extraction blank）对提取过程进行质控，为本研究的局限之一。

1.5 数据分析

参考 Chen 等的方法[30]开展生物信息学分析，主要包括以下步骤：（1）序列拼接，对双端原始序列（paired-end reads）进行拼接，保留重叠长度＞10 bp 且拼接成功的序列，其余序列予以删除。（2）质量控制，采用 10 bp 滑动窗口法对拼接序列进行质控，截去窗口内平均质量值＜30 的序列；同时删除长度＜50 bp、含不确定碱基，或引物区域错配数＞2 的序列。（3）样本分流与引物去除，根据样本特异性条形码对序列进行分流，并切除条形码及引物序列，获得各样本有效序列。（4）嵌合体过滤，采用 UCHIME 算法对序列进行嵌合体检测与去除[31]。（5）OTU 聚类，采用 UCLUST 算法按照 97% 的序列相似性阈值对高质量序列进行聚类，获得可操作分类单元（Operational Taxonomic Units, OTUs）[32]。（6）污染序列控制，参考 Keck 等的方法[33]，首先删除任一阴性对照中相对比例 ＞0.1%的 OTU，其次去除单序列 OTU 及相对丰度低于 0.005% 的低丰度 OTU，最后剔除样品拆分后总序列数低于 1000 reads 的低序列量样本[29]。（7）分类学注释，将过滤后的 OTU 采用 BLASTn 算法与中国淡水大型底栖无脊椎动物条形码数据库（https://cfmlib.njau.edu.cn）进行比对，保留序列相似度 ≥95%（属级分类单元注释可靠性参考） 且覆盖度 ≥50% 的分类单元用于后续群落分析和相关指数计算[29]。

由于部分理化环境因子不满足正态分布假设，采用 Kruskal－Wallis 非参数检验比较四座水库间环境因子的差异[34]。当 Kruskal－Wallis 检验结果达到显著水平时，进一步采用两两 Wilcoxon 秩和检验进行事后比较，并采用 Benjamini－Hochberg（BH）方法对多重比较 P 值进行校正[35-36]。对于低于检出限的 TP 数据（＜0.01 mg/L），按检出限的一半，即 0.005 mg/L 进行统计分析[37]。

水质评价分别采用水质综合指数 WQI（Water Quality Index, WQI）和底栖动物 BMWP（Biological Monitoring Working Party）指数[38]。WQI 指数通过整合多个水质参数为单一指标（公式见下文），有助于降低多维环境数据的复杂性，并提高不同样点间水质状况的可比性。参考 Hu 等的方法[39]，WQI 指数水质评价等级划分方法为：优（90-100）、良（70-90）、中（50-70）、差（25-50）和极差（0-25）。

WQI 指数计算公式：

$$\mathrm{WQI} = \frac{\sum_{\{i=1\}}^{n}(C_i P_i)}{\sum_{\{i=1\}}^{n} P_i} \tag{1}$$

式中：n 是参与计算的水质参数数量，i 是第 i 个水质参数，C_i 是第 i 个参数的质量评分，P_i 是第 i 个参数的权重（参数相对权重和归一化因子计算见附表Ⅰ）。

计算 BMWP 指数的科级分类单元的记分值来自《水生态监测技术指南：河流水生生物监测与评价（试行）》（HJ 1295—2023）[40]。选择 BMWP 指数，一是因为该指数计算不需要多度数据，避免了 eDNA 方法监测结果无法直接定量的不足，二是计算 BMWP 指数只需要科级分类单元的敏感值就可以，Serrana 等发现在 DNA 参考数据库不完整的情况下，在水质生物评价实践中，eDNA OTU 注释到科级水平比属和种级水平更有优势[41]。

BMWP 指数计算公式如下：

$$\mathrm{BMWP} = \sum_{i=1}^{N_z} F_i \tag{2}$$

式中：N_Z 是科级分类单元数；i 是第 i 个科；Fi 是科 i 的记分（敏感值）。

采用 Shannon 多样性指数（H'）和 Simpson 多样性指数（D）计算基于序列相对丰度的群落多样性，公式如下[42]：

Shannon 多样性指数(H')计算公式：

$$H' = -\sum_{i=1}^{S} P_i \ln P_i \tag{3}$$

Simpson 多样性指数（D）计算公式：

$$D = 1 - \sum_{i=1}^{S} P_i^2 \tag{4}$$

式中，P_i 是群落中第 i 个 OTU 的相对序列丰度，S 是群落 OTUs 数。

基于样点（水层）分类单元序列相对多度矩阵计算和构建不同样点（水层）间的 Bray－Curtis 相异性指数距离矩阵，通过非度量多维尺度分析（Non-metric Multidimensional Scaling, NMDS）可视化不同样点（水层）间群落组成变化[43-44]。采用置换多元方差分析（Permutational Multivariate Analysis of Variance, PERMANOVA）检验不同水库、样点（水层）间的所有和特有群落组成差异[45]。考虑到底栖动物有效序列数整体相对较低，若进一步进行 rarefaction 抽平处理，可能造成部分样品有效信息损失或影响样品保留，因此本文未进行 rarefaction 抽平，而是基于质控后的 OTU 矩阵的相对多度数据进行后续分析。

采用典范对应分析（Canonical Correspondence Analysis, CCA）探究环境因子与底栖动物群落关系。为降低环境变量间多重共线性的影响，应用方差膨胀因子（Variance Inflation Factor, VIF）检验环境因子间的共线性，剔除 VIF > 10 环境因子(有明显共线性)，环境因子对群落结构影响的显著性采用置换检验进行评估[46]。分析前，对分类单元序列多度矩阵进行 Hellinger 转换；为消除量纲和数值尺度差异，对环境变量进行 Z-score 标准化处理[47]。

采用线性混合效应模型（Linear Mixed-Effects Model, LMM）分析不同水层对底栖动物群落 Shannon 和 Simpson 多样性指数的影响[48-49]。由于 OTU 数量和序列数属于计数型数据，且存在过度离散现象，因此采用负二项分布的广义线性混合模型（Negative Binomial Generalized Linear Mixed Model, NB-GLMM）分析不同水层对 OTU 数量和序列数的影响[50]。在上述两个模型中，水层为固定效应，水库为随机效应。所有分析均通过 vegan 等软件包在 R（v4.1.0）中实现[51-52]。

2 结果

2.1 环境因子

Kruskal－Wallis 检验结果显示，不同水库间水温、溶解氧、pH、浊度、BOD_5、营养盐指标（TN，TP 和氨氮）均存在显著差异（表 1），电导率（$H = 3.615$，$P = 0.306$）和 COD（$H = 7.331$，$P = 0.062$）差

异不显著。两两 Wilcoxon 秩和检验并经 BH 校正后发现，珊溪水库水温显著高于赵山渡和泽雅；TN 浓度显著低于赵山渡、桥墩和泽雅；氨氮和 BOD_5 显著低于赵山渡和桥墩；赵山渡水库 TP 显著高于桥墩和珊溪。桥墩水库的 DO 显著低于珊溪水库（附表II）。

表 1 四座水库环境因子的特征及差异*

Tab.1 Characteristics and differences in environmental variables among the four reservoirs

环境变量	赵山渡	桥墩	泽雅	珊溪	*H*	*P*
WT（℃）	22.87±0.32[b]	25.98±0.41[ab]	25.20±0.20[b]	26.26±0.27[a]	16.398	<0.001
DO（mg/L）	8.69±0.04[ab]	6.79±0.54[b]	8.13±0.02[ab]	8.12±0.31[a]	15.301	0.002
pH	7.11±0.15[a]	6.89±0.09[a]	6.86±0.02[a]	7.03±0.13[a]	10.545	0.014
Turbidity（NTU）	20.34±1.14[a]	10.20±3.92[a]	7.47±0.73[a]	6.55±1.53[a]	11.408	0.010
EC（μS/cm）	52.67±4.74	53.10±8.53	46.45±7.71	46.07±8.11	3.615	0.306
NH_4^+-N（mg/L）	0.083±0.009[b]	0.064±0.011[b]	0.032±0.004[ab]	0.033±0.005[a]	15.294	0.002
TN（mg/L）	0.90±0.02[a]	0.77±0.07[a]	0.86±0.09[a]	0.44±0.05[b]	19.425	<0.001
TP（mg/L）	0.037±0.006[a]	0.020±0.000[b]	0.006±0.003[c]	0.015±0.006[b]	15.810	0.001
COD（mg/L）	13.67±0.58	11.75±0.96	13.75±4.43	11.00±0.93	7.331	0.062
BOD_5（mg/L）	3.00±0.10[a]	2.88±0.13[a]	3.25±0.93[ab]	2.56±0.12[b]	10.454	0.015

*数据以均值±标准差表示。H 和 P 分别为 Kruskal–Wallis 检验的统计量和显著性概率；同一行无共同小写字母表示经 BH 校正的两两 Wilcoxon 秩和检验差异显著（$P<0.05$）。

2.2 不同水层底栖动物群落组成特征及与环境的关系

四座水库 73 个 eDNA 样品（有 5 个未成功扩增）共获得 1,636,492 条原始序列，每样品平均 22,418 条。经分类学注释后，共检测到 31,486 条底栖动物有效序列 255 个 OTUs，隶属 3 门 6 纲 19 目（附图Ⅰ）。各样品底栖动物有效序列数为 5–1,912 条，优势类群为节肢动物门（221 个 OTUs），其次为软体动物门（26 个 OTUs）和环节动物门（8 个 OTUs）。

不同水层间底栖动物 eDNA 序列数显示表层水体（n＝25，483±393）略高于中层（n＝24，398±342）和底层（n＝24，409±317）。OTU 数量方面，表层、中层和底层水体分别检出 175、184 和 175 个 OTUs，其中共有 OTUs 为 112 个（图 2）。NB-GLMM 分析结果表明，水层对 OTU 丰富度（Wald $\chi^2 = 0.679$，df＝2，$P = 0.712$）及序列数（Wald $\chi^2 = 0.802$，df＝2，$P = 0.670$）均无显著影响（表 2），其中软体动物门以及双翅目、鞘翅目和 EPT 类群（蜉蝣目、襀翅目和毛翅目）的 OTU 数量在不同水层间的差异不显著（$P > 0.05$）。但是各水层特有 OTUs 组成的 PERMANOVA 分析显示其存在显著差异（$R^2 = 0.061$，F＝1.433，$P = 0.001$）。底层水体中的双翅目特有 OTUs 数量（64%）的占比明显高于中层（48.65%）和表层水体（42.31%），底层和表层水体中均检出了寡毛纲特有 OTUs，表层水体中蜉蝣目特有 OTUs 相对较多。另外表层水体中的特有 OTU 序列（177 条）明显高于中层（100 条）和底层（74 条）。

表 2 不同深度水层对 OTU 数和序列数影响的负二项分布广义线性混合模型（NB-GLMM）分析结果

Tab.2 Results of negative binomial generalized linear mixed models (NB-GLMMs) assessing the effects of different water layers on OTU richness and sequence counts

指标	OTU 数量			序列数		
比较因素	水层整体效应	中层 vs 表层	底层 vs 表层	水层整体效应	中层 vs 表层	底层 vs 表层
估计值	—	-0.030	-0.076	—	-0.189	-0.124
统计量（χ^2/z）	$\chi^2 = 0.679$	$z = -0.321$	$z = -0.819$	$\chi^2 = 0.802$	$z = -0.880$	$z = -0.575$
P 值	0.712	0.748	0.413	0.670	0.379	0.565

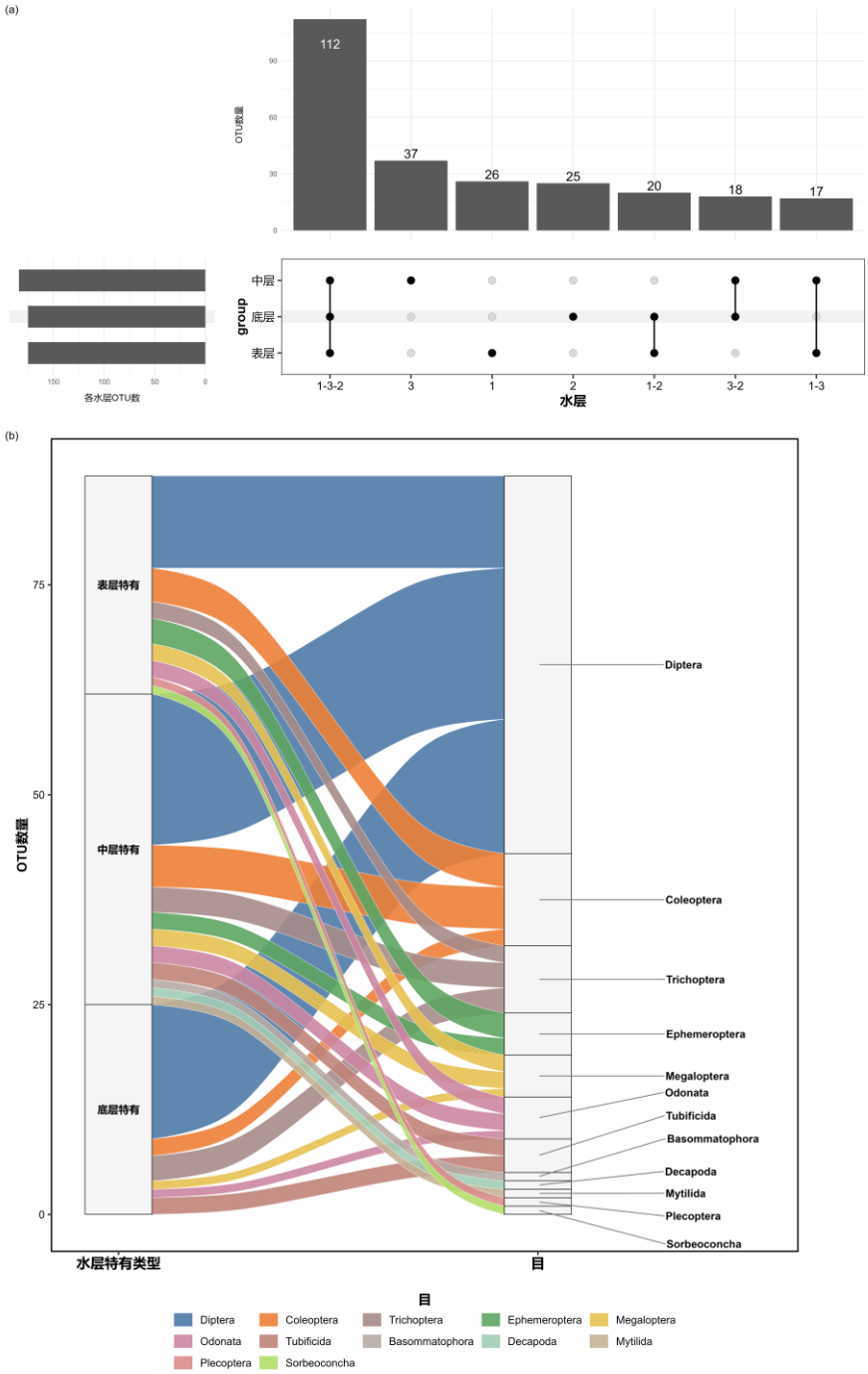


图 2 不同水层底栖动物 OTU 共享关系及特有类群组成

（a）不同水层 OTU 共享关系;（b）不同水层特有 OTU 目水平组成

Fig.2 OTU sharing relationships and composition of layer-specific taxa among water layers.

(a) OTU sharing patterns among water layers ; (b) Order-level composition of layer-specific OTUs

NMDS 排序结果显示（图 3），不同水库的样点在排序空间中呈现分化，而同一水库内不同水层的样

点相对聚集（Stress＝0.18）。PERMANOVA 结果表明，不同水库间的底栖动物群落组成存在显著差异（水库：R^2 = 0.424，F = 16.901，P = 0.001），而不同水层间的群落组成差异不显著（水层：R^2 = 0.017，F = 0.594，P＝0.972）。CCA 整体模型的置换检验结果显著（F＝2.49，P＝0.001）。CCA 前两轴累计解释了 58.3%的约束变异，其中 CCA1 和 CCA2 分别解释 32.8%和 25.5%。CCA 排序图显示，TN、TP 和浊度与群落组成的排序格局具有较强关联。

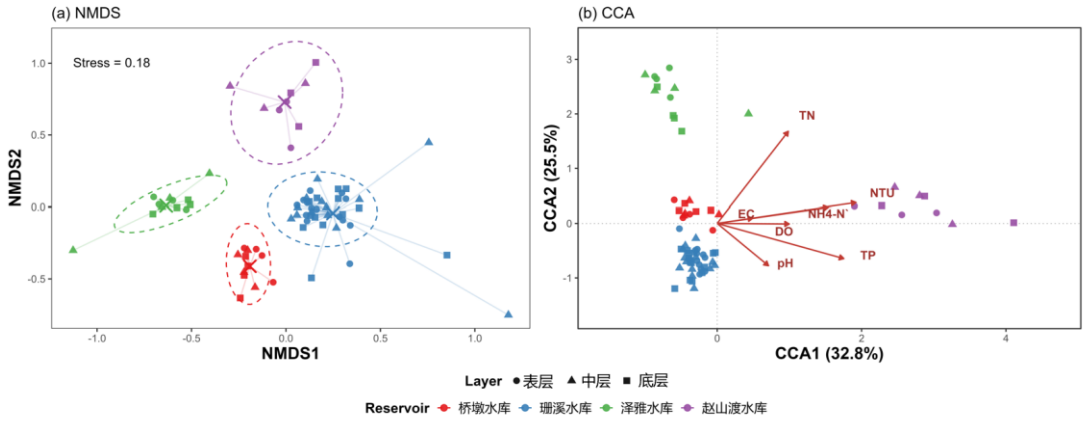


图 3 四座水库不同水层底栖动物 eDNA 群落组成的非度量多维尺度分析（NMDS）与典范对应分析（CCA）排序图

Fig.3 Non-metric multidimensional scaling (NMDS) and canonical correspondence analysis (CCA) ordinations of benthic macroinvertebrate eDNA community composition among different water layers in four reservoirs

基于 LMM 分析结果表明，不同水层间 Shannon 指数（F＝3.299，P＝0.043）和 Simpson 指数（F＝3.668，P=0.031）均存在显著差异。表层水体的 Shannon 指数（3.90±0.27）和 Simpson 指数（0.863±0.039）也均高于底层水体（Shannon：3.55±0.27；Simpson：0.815±0.039）。事后多重比较结果表明，表层水体的 Simpson 指数显著高于底层水体（P＝0.032）。表层水体的 Shannon 指数在数值上高于底层水体，但差异未达到统计学显著水平（P＝0.052）；其余水层间的差异均不显著（P＞0.05）。

表 3 不同水层间多样性指数的混合线性模型（LMM）分析结果

Tab. 3 Results of linear mixed models (LMMs) for diversity indices among water layers

	Shannon 指数			Simpson 指数		
比较因素	水层整体效应	中层 vs. 表层	底层 vs. 表层	水层整体效应	中层 vs 表层	底层 vs 表层
估计值	—	-0.048	-0.345	—	-0.010	-0.048
统计量（F/t）	F = 3.30	t = -0.332	t = -2.383	F = 3.67	t = -0.548	t = -2.581
P 值	0.043*	0.941	0.052	0.031*	0.848	0.032*

2. 3 水质评价

水质指数（WQI）和 BMWP 指数有较好的对应关系，具体为各水库表层水质指数（WQI）均值都在 80 分以上，评价等级为“良”， 赵山渡和桥墩水库表层 BMWP 指数评价等级也为“良”，但泽雅和珊溪水库的评价等级为“优”，另外四个水库的中层和底层的 BMWP 指数评价等级均为“良”，与表层水质指数的评价结果相对应。

表 4 水库 WQI 指数和不同水层水体 BMWP 指数评价结果

Tab.4 Water quality assessment of reservoirs and three water layers based on BMWP and WQI

水库	水层	BMWP 值	生物指标评价等级	WQI 指数	理化指标评价等级
赵山渡	表层	94.0±6.6	良（Ⅱ类）	80.63	良（Ⅱ类）
	中层	94.3±14.9	良（Ⅱ类）		
	底层	95.7±32.9	良（Ⅱ类）		
桥墩	表层	87.3±23.5	良（Ⅱ类）	80.48	良（Ⅱ类）
	中层	88.0±17.9	良（Ⅱ类）		
	底层	76.5±10.2	良（Ⅱ类）		
泽雅	表层	102.8±14.2	优（Ⅰ类）	84.53	良（Ⅱ类）
	中层	85.3±8.4	良（Ⅱ类）		
	底层	85.8±9.5	良（II类）		
珊溪	表层	101.2±21.9	优（Ⅰ类）	87.33	良（Ⅱ类）
	中层	98.2±33.7	良（Ⅱ类）		
	底层	94.4±34.1	良（Ⅱ类）		

3 讨论

国内深水水库底栖动物形态学方法监测到的物种组成主要以摇蚊科和寡毛纲为主 [53-55]，珊溪和赵山渡水库形态学方法监测到的 26 种底栖动物也同样以昆虫纲的摇蚊科（占比 50%）和寡毛纲（26%）为主[55]。但两个水库表层水体底栖动物 eDNA 分别检测到 124 个 和 85 个 OTUs，且以昆虫纲 OTUs 占绝对优势（占比 82.26%和 78.82%），寡毛纲的占比不到 1%。这些差异可能与采样介质和水体中底栖动物 eDNA 分子信号来源的多样化有关。深水水库底栖动物的传统调查方法主要采集库底沉积物样品，调查到的物种组成以适合在沉积层生活的寡毛纲和昆虫纲摇蚊科为主[53-55]，但是本研究采集的水样 eDNA 可能包括了生活在库底沉积环境和水库沿岸带浅水区的底栖动物释放的 eDNA 分子信号。相比水库与湖泊的敞水区，沿岸带通常具有更复杂的栖境结构与更强的生物—基质耦合，因此更易聚集并维持水生昆虫与腹足纲等类群[56]。相应地，本文 eDNA 监测到的水生昆虫（85.88%）与腹足纲（8.63%）检出比例高于传统深水区沉积物采样结果，提示沿岸带生物群落对分子信号的贡献更为突出。

尽管我们的结果显示三个深度水层的底栖动物群落物种组成、OTUs 数量以及序列数量均不存在显著差异，但不同深度水层特有底栖动物 OTU 组成存在显著差异。可能原因包括：其一，赵山渡与桥墩水库水深较浅，难以形成稳定分层；其二，泽雅与珊溪水库虽然具有潜在分层条件，但本研究野外调查发生在 10 月，属于季节性分层水体的翻转期，原有分层结构被削弱甚至被打破[57]。上述因素可能共同导致四座水库底栖动物 eDNA 信号在垂直尺度上总体表现为不显著的分层效应。关于大型湖泊中 eDNA 的扩散研究表明，受风生环流驱动，eDNA 可在约 33 小时内扩散至约 11 km 之外，但其垂直分布仍受水体分层结构约束[58]。这从侧面说明，在深水水体中 eDNA 的分布具有一定的垂直规律。

值得注意的是，我们同时发现不同深度水层特有底栖动物 OTU 组成存在显著差异。该结果提示，eDNA 宏条形码方法能够敏感地捕获不同生境中的特有动物类群[59]：例如，本研究底层水体（深水区）中检测到的特有双翅目 OTUs 数量最多，而表层水体（主要反映浅水区）中蜉蝣目特有 OTUs 相对更多。与之相一致，传统沿岸带与深水区水生昆虫定殖控制研究表明，浅水区与深水区的双翅目物种几乎不重叠，蜉蝣目主要分布于浅水区[60]。除特有 OTU 的差异外，不同水层对 Shannon 和 Simpson 指数的整体效应均达到显著水平；但事后比较结果显示，仅表层水体的 Simpson 指数显著高于底层水体，而表层与底层水体间的 Shannon 指数差异不显著。一个可能的解释是，不同水层中主要 OTU 的相对序列优势度在分布集中程度上存在差异。考虑到各水库中层与底层水样的实际取样深度存在差异，基于不同水库间中层与底层底栖动物 eDNA 信号比较结果的泛化可能会受到实际深度差异的影响。

在流域尺度上，底栖动物 eDNA 监测的评价结果与传统形态学方法具有可比性[61]。此外，已有研究指出，在 DNA 条形码参考库不完整的情况下，底栖动物 eDNA 分子信号注释到科水平仍可更可靠地揭示底栖动物群落与环境的关系[41]。本研究亦表明，基于底栖动物 eDNA 构建的 BMWP 指数与水质综合指数（WQI）的评价结果之间表现出较好的对应关系，提示水体 eDNA 监测在水库生态质量评价方面具有潜在应用前景。需要强调的是，本研究仅测量了表层水体的理化指标，而 BMWP 指数是基于不同水层的底栖动物 eDNA 计算获得，因此，二者在评价等级上的对应关系不宜简单解读为不同水层生物指数与理化环境之间存在直接耦合。同时，本研究并未采集沉积物环境 DNA[62]，因此，监测到的底栖动物物种与群落组成仅反映底栖动物释放到水体中的 eDNA 信号结果，并不等同于水库实际底栖动物群落结构。

此外，本研究中底栖动物有效序列在原始序列中的占比相对较低，可能与 COI 引物的广谱扩增特性、环境样品中非目标 DNA 的干扰以及深水环境中上覆水样对底栖动物群落代表性的有限性共同相关[63-65]。具体而言，本研究采用的 mlCOIintF/jgHCO2198 通用引物对后生动物具有广谱扩增能力[27]。与此同时，水环境样品中富含浮游生物、原生动物、真菌、植物及陆源生物等多类非目标 DNA。非目标 DNA 参与与目标 DNA 相同引物结合位点的竞争，并占用了大量测序通量，最终导致保留的目标底栖动物有效序列比例偏低[63]。

4 结论

底栖动物 eDNA 能够敏感地反映深水水库不同水层中底栖动物的物种组成、序列特征及群落结构变化特征。其垂直空间分布特征可能与底栖动物对不同栖境的偏好，如深水区沉积物和浅水区生境， 以及水体热分层及其季节性变化等因素有关。基于表层水样获得的底栖动物 eDNA 监测数据，与表层水体理化指标的评价结果有较好的对应关系。

考虑到我们的研究仅在秋季进行了一次采样，且水体理化数据仅来自表层水样。因此，其他季节底栖动物 eDNA 的垂直分布规律，以及不同水层底栖动物 eDNA 信号与相应水层间理化因子之间的关系，仍有待进一步研究。综上，本文结果可为深水水库底栖动物 eDNA 采样设计及水生态质量评价提供重要参考。

声明 (1)作者贡献：钟姝彤负责研究实施、数据分析、图表制作、论文初稿撰写及修改；谢凌珊、盛天进和陈锦贤参与样品采集与实验；魏铮、周莹和连纲参与数据整理和样点设置；通讯作者王备新负责研究构思、研究指导以及论文审阅和修改。所有作者均审阅并同意论文最终版本。(2)生成式人工智能及 AI 辅助技术使用声明：本论文写作及修改过程中，作者使用 ChatGPT 和 Deepseek 辅助进行英文文字润色。所有 AI 工具生成或建议的内容均经作者逐一审阅、核实并按需修订。论文全部内容由署名作者承担完整的学术责任。(3)数据可获得性：本研究相关数据可在合理请求下获取。读者可通过电子邮件联系第一作者或通信作者，说明所需数据及使用目的；经确认后，作者可提供相应数据及相关材料。

5 附录

附表I~V和附图I~II见电子版（DOI 10.18307/2027.0435）.

6 参考文献

[1] Chen JX, Lv JL, Huang GY *et al*. Diversity of macroinvertebrate in the middle and lower reaches of the Jinsha River based on eDNA metabarcoding. *J Lake Sci*, 2025, **37**(3): 940-961. DOI: 10.18307/2025.0331. [陈锦贤，吕佳林，黄贵英等. 基于 eDNA 宏条形码的金沙江中下游大型底栖无脊椎动物多样性. 湖泊科学, 2025, **37**(3): 940-961.]

[2] Dudgeon D, Strayer DL. Bending the curve of global freshwater biodiversity loss: What are the prospects *Biological Reviews*, 2025, **100**(1): 205-226. DOI: 10.1111/brv.13137.

[3] Pereira HM, Ferrier S, Walters M *et al*. Ecology. essential biodiversity variables. *Science*, 2013, **339**(6117): 277-278. DOI: 10.1126/science.1229931.

[4] Scholes RJ, Walters M, Turak E *et al*. Building a global observing system for biodiversity. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 2012, **4**(1): 139-146. DOI: 10.1016/j.cosust.2011.12.005.

[5] Altermatt F, Couton M, Carraro L *et al*. Utilizing aquatic environmental DNA to address global biodiversity targets. *Nature Reviews Biodiversity*, 2025, **1**(5): 332-346. DOI: 10.1038/s44358-025-00044-x.

[6] 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. *Molecular Ecology*, 2020, **29**(22): 4258-4264. DOI: 10.1111/mec.15643.

[7] Baird DJ, Hajibabaei M. Biomonitoring 2.0: A new paradigm in ecosystem assessment made possible by next-generation DNA sequencing. *Molecular Ecology*, 2012, **21**(8): 2039-2044. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2012.05519.x.

[8] Deiner K, Fronhofer EA, Mächler E *et al*. Environmental DNA reveals that rivers are conveyer belts of biodiversity information. *Nature Communications*, 2016, **7**: 12544. DOI: 10.1038/ncomms12544.

[9] Takahashi M, Saccò M, Kestel JH *et al*. Aquatic environmental DNA: A review of the macro-organismal biomonitoring revolution. *Science of the Total Environment*, 2023, **873**: 162322. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2023.162322.

[10] Yang HL, Zhang H, Du H. A framework for standardizing the processes of eDNA monitoring and an accessible vision of the future. *J Lake Sci*, 2023, **35**(1): 12-31. DOI: 10.18307/2023.0100. [杨海乐，张辉，杜浩. eDNA 监测方法标准化框架及未来图景. 湖泊科学, 2023, **35**(1): 12-31.]

[11] Zhong WJ, Yao M, Jin XW *et al*. Development of freshwater environmental DNA(eDNA): Achievements and challenges. *J Lake Sci*, 2025, **37**(4): 1091-1095. DOI: 10.18307/2025.0400. [钟文军，姚蒙，金小伟等. 淡水环境 DNA(eDNA)技术领域发展——成就与挑战. 湖泊科学, 2025, **37**(4): 1091-1095.]

[12] Goldberg CS, Turner CR, Deiner K *et al*. Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. *Methods in Ecology and Evolution*, 2016, **7**(11): 1299-1307. DOI: 10.1111/2041-210X.12595.

[13] Zheng YY, Liu SY, Liu H *et al*. Seasonal stratified characteristics of water bodies in a sub-deep reservoir. *Journal of Yunnan Agricultural University*: *Natural Science*, 2021, **36**(2): 359-370. DOI: 10.12101/j.issn.1004-390X(n).201907059. [郑莹莹，刘树元，刘虹等. 亚深型水库水体季节性分层特征研究. 云南农业大学学报：自然科学, 2021, **36**(2): 359-370.]

[14] Jeunen GJ, Lamare MD, Knapp M *et al*. Water stratification in the marine biome restricts vertical environmental DNA (eDNA) signal dispersal. *Environmental DNA*, 2020, **2**(1): 99-111. DOI: 10.1002/edn3.49.

[15] Tampo L, Kaboré I, Alhassan EH *et al*. Benthic macroinvertebrates as ecological indicators: Their sensitivity to the water quality and human disturbances in a tropical river. *Frontiers in Water*, 2021, **3**: 662765. DOI: 10.3389/frwa.2021.662765.

[16] Rosenberg DM, Resh VH. Freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates. London: Chapman & Hall, 1993.

[17] Ntislidou C, Bobori D, Lazaridou M. Suggested sampling methodology for lake benthic macroinvertebrates under the requirements of the European water framework directive. *Water*, 2021, **13**(10): 1353. DOI: 10.3390/w13101353.

[18] Solimini A G, Free G, Donohue I *et al*. Using benthic macroinvertebrates to assess ecological status of lakes: Current knowledge and way forward to support WFD implementation. Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2006.

[19] Liu XJ, Xia JH, Zeng Z *et al*. Research on spatial-temporal variation of turbidity and zonal identification in reservoir drinking water source. *Water Resources and Power*, 2022, **40**(1): 60-63. [刘秀君，夏继红，曾灼等. 水库型饮用水源浊度时空变化及分区识别研究. 水电能源科学, 2022, **40**(1): 60-63.]

[20]晓云. 鳌江流域"莫兰蒂"台风暴雨洪水分析. 浙江水利科技, 2017, **45**(3): 13-16.

[21] Zhang X, Zhou L. Design case of water supply project of gravitational flow water treatment plant on mountaintop in Wenzhou. *China Water & Wastewater*, 2023, **39**(24): 63-70. DOI: 10.19853/j.zgjsps.1000-4602.2023.24.011. [张星，周琳. 温州全重力山顶式水厂供水工程设计案例. 中国给水排水, 2023, **39**(24): 63-70.]

[22] Ren ML, Zhang Q, Zhao LP *et al*. Research and application of joint optimal flood operation of reservoir group considering flood forecast information. *China Flood & Drought Management*, 2025, **35**(3): 9-14, 20. DOI: 10.16867/j.issn.1673-9264.2025066. [任明磊，张琪，赵丽平等. 考虑洪水预报信息的水库群防洪联合优化调度研究与应用. 中国防汛抗旱, 2025, **35**(3): 9-14, 20.]

[23] 生态环境部. 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）（HJ 1296—2023）. 北京：中国环境出版社, 2023.

[24]国家环境保护总局《水和废水监测分析方法》编委会、魏复盛. 水和废水监测分析方法. 4 版. 北京：中国环境出版社, 2002.

[25] 江苏省生态环境厅. 淡水生物环 DNA 监测技术方法（DB32/T 4539—2023）. 南京：中国标准出版社，2023.

[26] Lawson Handley L, Read DS, Winfield IJ *et al*. Temporal and spatial variation in distribution of fish environmental DNA in England's largest lake. *Environmental DNA*, 2019, **1**(1): 26-39. DOI: 10.1002/edn3.5.

[27] Geller J, Meyer C, Parker M *et al*. Redesign of PCR primers for mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I for marine invertebrates and application in all-taxa biotic surveys. *Molecular Ecology Resources*, 2013, **13**(5): 851-861. DOI: 10.1111/1755-0998.12138.

[28] Leray M, Yang JY, Meyer CP *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. *Frontiers in Zoology*, 2013, **10**: 34. DOI: 10.1186/1742-9994-10-34.

[29] Wang Y, Chen K, Gao J *et al*. Environmental DNA of preservative ethanol performed better than water samples in detecting macroinvertebrate diversity using metabarcoding. *Diversity and Distributions*, 2021, **27**(10): 1989-2002. DOI: 10.1111/ddi.13284.

[30] Chen JX, Zang HM, Ning YS *et al*. The eDNA methods outperforming the traditional method in capturing the diversity of stream benthic macroinvertebrates. *Ecological Indicators*, 2025, **179**: 114254. DOI: 10.1016/j.ecolind.2025.114254.

[31] Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC *et al*. UCHIME improves sensitivity and speed of *Chimera* detection. *Bioinformatics*, 2011, **27**(16): 2194-2200. DOI: 10.1093/bioinformatics/btr381.

[32] Rideout JR, He Y, Navas-Molina JA *et al*. Subsampled open-reference clustering creates consistent, comprehensive OTU definitions and scales to billions of sequences. *PeerJ*, 2014, **2**: e545. DOI: 10.7717/peerj.545.

[33] Keck F, Brantschen J, Altermatt F. A combination of machine-learning and eDNA reveals the genetic signature of environmental change at the landscape levels. *Molecular Ecology*, 2023, **32**(17): 4791-4800. DOI: 10.1111/mec.17073.

[34] Kruskal WH, Wallis WA. Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association*, 1952, **47**(260): 583-621. DOI: 10.1080/01621459.1952.10483441.

[35] Wilcoxon F. Individual comparisons by ranking methods. *Biometrics Bulletin*, 1945, **1**(6): 80. DOI: 10.2307/3001968.

[36] Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series b*: *Statistical Methodology*, 1995, **57**(1): 289-300. DOI: 10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x.

[37] Helsel DR. *Statistics for Censored Environmental DataUsing Minitab® and R*: Helsel/Statistics for Environmental Data 2E. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.2011 DOI: 10.1002/9781118162729.

[38] Armitage PD, Moss D, Wright JF *et al*. The performance of a new biological water quality score system based on macroinvertebrates over a wide range of unpolluted running-water sites. *Water Research*, 1983, **17**(3): 333-347. DOI: 10.1016/0043-1354(83)90188-4.

[39] Hu H, Wei XY, Liu L *et al*. Supervised machine learning improves general applicability of eDNA metabarcoding for reservoir health monitoring. *Water Research*, 2023, **246**: 120686. DOI: 10.1016/j.watres.2023.120686.

[40] 生态环境部. 水生态监测技术指南：河流水生生物监测与评价（试行）（HJ 1295—2023）. 北京: 中国环境出版社, 2023.

[41] Serrana JM, Li B, Sumi T *et al*. Implications of taxonomic and numerical resolution on DNA metabarcoding-based inference of benthic macroinvertebrate responses to river restoration. *Ecological Indicators*, 2022, **135**: 108508. DOI: 10.1016/j.ecolind.2021.108508.

[42] Ma KP, Liu YM. Methods for measuring biodiversity of biological communities Ⅰ. Methods for measuring α-diversity (Ⅱ). *Biodiversity Science*, 1994, **2**(4): 231-239. [马克平, 刘玉明. 生物群落多样性的测度方法 Ⅰα多样性的测度方法(下). 生物多样性, 1994, **2**(4): 231-239.]

[43] Bray JR, Curtis JT. An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. *Ecological Monographs*, 1957, **27**(4): 325-349. DOI: 10.2307/1942268.

[44] Minchin PR. An evaluation of the relative robustness of techniques for ecological ordination. *Vegetatio*, 1987, **69**(1): 89-107. DOI: 10.1007/BF00038690.

[45] Anderson MJ. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology*, 2001, **26**(1): 32-46. DOI: 10.1111/j.1442-9993.2001.01070.pp.x.

[46] ter Braak CJF. Canonical correspondence analysis: A new eigenvector technique for multivariate direct gradient analysis. *Ecology*, 1986, **67**(5): 1167-1179. DOI: 10.2307/1938672.

[47] Zuur AF, Ieno EN, Elphick CS. A protocol for data exploration to avoid common statistical problems. *Methods in Ecology and Evolution*, 2010, **1**(1): 3-14. DOI: 10.1111/j.2041-210X.2009.00001.x.

[48] Bolker BM, Brooks ME, Clark CJ *et al*. Generalized linear mixed models: A practical guide for ecology and evolution. *Trends in Ecology & Evolution*, 2009, **24**(3): 127-135. DOI: 10.1016/j.tree.2008.10.008.

[49] Bates D, Mächler M, Bolker B *et al*. Fitting linear mixed-effects models Usinglme4. *Journal of Statistical Software*, 2015, **67**(1): 1-48. DOI: 10.18637/jss.v067.i01.

[50] Brooks ME, Kristensen K, van Benthem KJ *et al*. glmmTMB balances speed and flexibility among packages for zero-inflated generalized linear mixed modeling. *The R Journal*, 2017, **9**(2): 378. DOI: 10.32614/rj-2017-066.

[51] R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2009.

[52] Oksanen J, Simpson GL, Blanchet FG *et al.* vegan: Community Ecology Package. R package, CRAN, 2025. DOI: 10.32614/CRAN.package.vegan.

[53] Chi SY, Wei CZ, Hu J *et al*. Correlation between macroinvertebrates and plankton in two deep eutrophic reservoirs. *J Lake Sci*, 2020, **32**(4): 1060-1075. DOI: 10.18307/2020.0415. [池仕运，韦翠珍，胡俊等.富营养深水水库底栖动物群落与浮游生物相关性分析.湖泊科学, 2020, **32**(4): 1060-1075.]

[54] Chi SY, Wei CZ, Hu J *et al*. Preliminary study of macroinvertebrate communities in Nanwan Reservoir. *Environmental Protection Science*, 2018, **44**(6): 34-41. DOI: 10.16803/j.cnki.issn.1004-6216.2018.06.007. [池仕运，韦翠珍，胡俊等. 南湾水库底栖动物群落结构初步研究. 环境保护科学, 2018, **44**(6): 34-41.]

[55] Cui X, Dong ZC, Zhu SN *et al*. Macro-invertebrates community structure and its relationship with environmental factors in Shanxi hydroproject. *Environmental Science & Technology*, 2024, **47**(3): 1-9. DOI: 10.19672/j.cnki.1003-6504.2347.23.338. [崔洵，董增川，朱圣男等. 珊溪水利枢纽大型底栖无脊椎动物群落结构及与环境因子的关系. 环境科学与技术, 2024, **47**(3): 1-9.]

[56] Li MJ, Zhang Y, Zhang Y *et al*. Effects of littoral zone utilization on benthic macroinvertebrate community structure: A case study of Lake Hongze. *J Lake Sci*, 2022, **34**(6): 2055-2070. DOI: 10.18307/2022.0620. [黎明杰，张又，张颖等. 湖滨带开发利用对大型底栖动物群落结构的影响：以洪泽湖为例. 湖泊科学, 2022, **34**(6): 2055-2070.]

[57] Wang XD, Chen XC, Huang YY *et al*. Formation process of thermal stratification in Zeya Reservoir and its influence on dissolved oxygen in water. *Water & Wastewater Engineering*, 2008, **34**(3): 37-38. DOI: 10.13789/j.cnki.wwe1964.2008.03.007. [王晓冬，陈雪初，黄莹莹等. 泽雅水库热成层形成过程及其对水体溶解氧的影响. 给水排水, 2008, **34**(3): 37-38.]

[58] Li ZY, Ramón CL, Bogdanowicz S *et al*. Tracing environmental DNA transport in a large lake with synthetic DNA microparticles and hydrodynamic modeling. *Environmental Science & Technology*, 2026, **60**(4): 3519-3531. DOI: 10.1021/acs.est.5c11071.

[59] Jeunen GJ, Knapp M, Spencer HG *et al*. Environmental DNA (eDNA) metabarcoding reveals strong discrimination among diverse marine habitats connected by water movement. *Molecular Ecology Resources*, 2019, **19**(2): 426-438. DOI: 10.1111/1755-0998.12982.

[60] Hare L. Sediment colonization by littoral and profundal insects. *Journal of the North American Benthological Society*, 1995, **14**(2): 315-323. DOI: 10.2307/1467783.

[61] Brantschen J, Blackman RC, Walser JC *et al*. Environmental DNA gives comparable results to morphology-based indices of macroinvertebrates in a large-scale ecological assessment. *PLoS One*, 2021, **16**(9): e0257510. DOI: 10.1371/journal.pone.0257510.

[62] Pawlowski J, Bruce K, Panksep K *et al.* Environmental DNA metabarcoding for benthic monitoring: A review of sediment sampling and DNA extraction methods. *Science of the Total Environment*, 2022, **818**: 151783. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.151783.

[63] Collins RA, Bakker J, Wangensteen OS *et al*. Non-specific amplification compromises environmental DNA metabarcoding with COI. *Methods in Ecology and Evolution*, 2019, **10**(11): 1985-2001. DOI: 10.1111/2041-210X.13276.

[64] Leese F, Sander M, Buchner D *et al*. Improved freshwater macroinvertebrate detection from environmental DNA through minimized nontarget amplification. *Environmental DNA*, 2021, **3**(1): 261-276. DOI: 10.1002/edn3.177.

[65] Brandt MI, Pradillon F, Trouche B *et al.* Evaluating sediment and water sampling methods for the estimation of deep-sea biodiversity using environmental DNA. *Scientific Reports*, 2021, **11**: 7856. DOI: 10.1038/s41598-021-86396-8.

附表I　WQI 计算参数的相对权重和归一化因子

Attached Tab.I The relative weights and the normalization factors of parameters for WQI calculation

参数	Pi	100	90	80	70	60	50	40	30	20	10	0
WT/(℃)	1	21/16	22/15	24/14	26/12	28/10	30/5	32/0	36/2	40/-4	45/-6	>45/<-6
DO/(mg/L)	4	≥7.5	>7	>6.5	>6	>5	>4	>3.5	>3	>2	≥1	<1
pH	1	7	7-8	7-8.5	7-9	6.5-7	6-9.5	5-10	4-11	3-12	2-13	1-14
Turbidity/(NTU)	2	<5	<10	<15	<20	<25	<30	<40	<60	<80	≤100	>100
EC/（μS/cm）	1	<750	<1000	<1250	<1500	<2000	<2500	<3000	<5000	<8000	≤12000	>12,000
TN/(mg/L)	2	<0.1	<0.2	<0.35	<0.5	<0.75	<1	<1.25	<1.5	<1.75	≤2	>2
TP/(mg/L)	1	<0.01	<0.02	<0.05	<0.1	<0.15	<0.2	<0.25	<0.3	<0.35	≤0.4	>0.4
$NH4^{+}$-N/(mg/L)	3	<0.01	<0.05	<0.1	<0.2	<0.3	<0.4	<0.5	<0.75	<1.0	≤1.25	>1.25
COD/(mg/L)	3	<5	<10	<20	<30	<40	<50	<60	<80	<100	≤150	>150
BOD_5/(mg/L)	3	<0.5	<2	<3	<4	<5	<6	<8	<10	<12	≤15	>15

附表II不同水库间环境因子的 Kruskal–Wallis 检验及 BH 校正后两两 Wilcoxon 比较结果

Attached Tab.II Kruskal–Wallis tests and BH-adjusted pairwise Wilcoxon comparisons of environmental factors among reservoirs

环境变量	Kruskal–Wallis H	P 值	赵山渡–桥墩 P_adj	赵山渡–泽雅 P_adj	赵山渡–珊溪 P_adj	桥墩–泽雅 P_adj	桥墩–珊溪 P_adj	泽雅–珊溪 P_adj
WT	16.398	<0.001*	0.062	0.062	0.026*	0.053	0.158	0.017*
DO	15.301	0.002*	0.062	0.062	0.061	0.061	0.019*	0.132
pH	10.545	0.014*	0.096	0.096	0.449	1.000	0.096	0.085
Turbidity	11.408	0.010*	0.104	0.104	0.055	0.470	0.120	0.176
EC	3.615	0.306	0.881	0.565	0.565	0.565	0.565	0.881
NH_4^+-N	15.294	0.002*	0.134	0.078	0.026*	0.061	0.018*	0.685
TN	19.425	<0.001*	0.078	1.000	0.017*	0.135	0.009*	0.009*
TP	15.810	0.001*	0.045*	0.0499*	0.030*	0.035*	0.160	0.035*
COD	7.331	0.062	0.208	1.000	0.051	1.000	0.375	0.655
BOD_5	10.454	0.015*	0.533	1.000	0.024*	1.000	0.024*	0.758

注：总体差异采用 Kruskal–Wallis 非参数检验；水库间两两比较采用 Wilcoxon 秩和检验，并采用 Benjamini–Hochberg（BH）方法校正多重比较 P 值。表中 P_adj 为 BH 校正后的 P 值，* 表示 $P < 0.05$。TP 中低于检出限的数值按检出限的一半进行统计分析。

附表III 基于 eDNA 的不同水层样品序列数及 OTU 分布统计

Attached Tab.III Sequence and OTU distribution statistics of eDNA samples from different water layers

水层	样本数	总序列数	序列数（均值±标准差）	OTU 数	平均 OTU 数（均值±标准差）
表层水体	25	12,084	483±394	175	43±11
中层水体	24	9,565	399±342	184	42±12
底层水体	24	9,837	410±317	175	40±14

附表IV 水层特有 OTU 组成的 PERMANOVA 及两两比较结果

Attached Tab.IV PERMANOVA and pairwise comparison results for the composition of water-layer-specific OTUs

两两比较	Df	R^2	F	原始 P 值	BH 校正后 P 值	结果
表层 vs 中层	1	0.043	1.344	0.002	0.003	显著
表层 vs 底层	1	0.049	1.450	0.003	0.003	显著
中层 vs 底层	1	0.048	1.507	0.001	0.003	显著

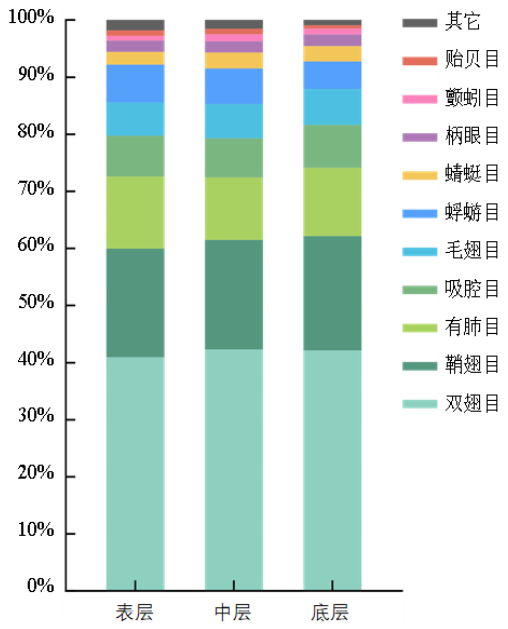
附表V 总体 OTU 群落组成的 PERMANOVA 结果

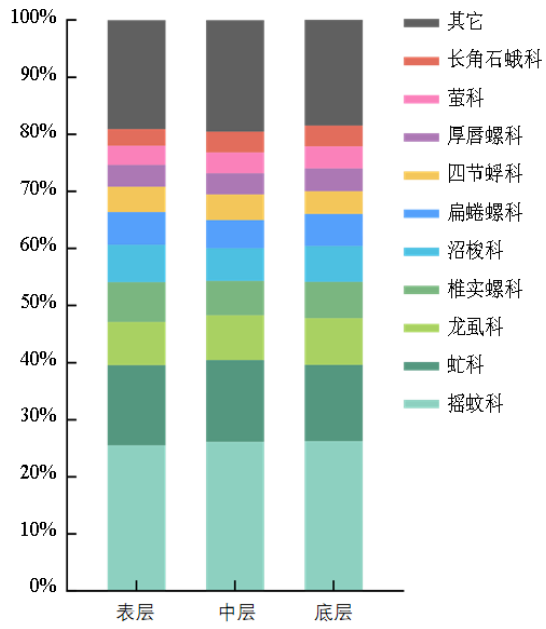
Attached Tab.V PERMANOVA results for overall OTU community composition

影响因素	Df	R^2	F	P 值	结果
水层	2	0.017	0.594	0.972	不显著
水库	3	0.424	16.901	0.001	显著
水层×水库总体模型	11	0.469	4.900	0.001	显著

附图I 不同水层检测的底栖动物目级（左）与科级（右）分类单元的 OTU 组成

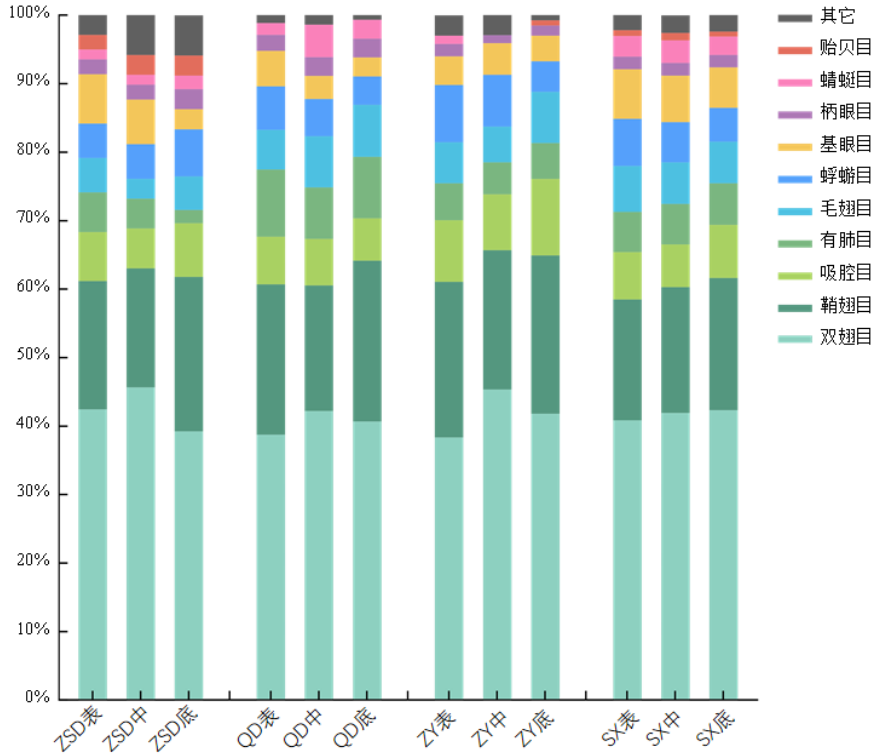
Attached Fig.I Taxa composition of benthic macroinvertebrates at order-level (left) and family-level (right) detected in different water layers





附图II 各水库不同水层检测的底栖动物目级分类单元的 OTU 组成

（ZSD：赵山渡；QD：桥墩；ZY：泽雅；SX：珊溪）

Attached Fig.II Taxa composition of benthic macroinvertebrates at order-level detected in different water layers of each reservoir

(ZSD: Zhao Shandu reservoir; QD: Qiaodun reservoir; ZY: Zeya reservoir; SX: Shanxi reservoir)