

中华人民共和国国家生态环境标准

HJ □□□-202□

水质 浮游植物的测定 显微镜计数法

Water quality—Determination of Phytoplankton
—Microscope counting method

(征求意见稿)

202□-□□-□□发布

202□-□□-□□实施

生态环境部 发布

目 次

前 言.....	ii
1 适用范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 术语和定义.....	1
4 方法原理.....	1
5 试剂和材料.....	1
6 仪器和设备.....	2
7 样品.....	2
8 分析步骤.....	3
9 结果计算与表示.....	5
10 精密度.....	6
11 质量保证和质量控制.....	6
12 注意事项.....	6
附录 A（规范性附录） 随机视野方式检出限的计算.....	7
附录 B（资料性附录） 显微镜视野面积的测量.....	8

前 言

为贯彻《中华人民共和国环境保护法》《中华人民共和国水污染防治法》，防治水生态环境污染，改善生态环境质量，规范水中浮游植物的测定方法，制定本标准。

本标准规定了测定地表水中浮游植物的显微镜计数法。

本标准的附录A为规范性附录，附录B为资料性附录。

本标准首次发布。

本标准由生态环境部生态环境监测司、法规与标准司组织制订。

本标准起草单位：云南省生态环境监测中心。

本标准验证单位：上海市环境监测中心、中国科学院水生生物研究所、云南省生态环境厅驻昆明市生态环境监测站、江苏省无锡环境监测中心、云南省生态环境厅驻玉溪市生态环境监测站和云南省生态环境厅驻大理州生态环境监测站。

本标准生态环境部202□年□□月□□日批准。

本标准自202□年□□月□□日起实施。

本标准由生态环境部解释。

水质 浮游植物的测定 显微镜计数法

1 适用范围

本标准规定了测定水中浮游植物的显微镜计数法。

本标准适用于地表水中浮游植物的测定。

当使用 0.1 ml 计数框，样品浓缩 50 倍时，对角线方式方法检出限为 9.2×10^3 cells/L；行格方式方法检出限为 3.0×10^3 cells/L；全片方式方法检出限为 9.2×10^2 cells/L；随机视野方式的方法检出限与观察的视野数、显微镜视野面积有关，按附录 A 计算。

2 规范性引用文件

本标准引用了下列文件或其中的条款。凡是不注日期的引用文件，其有效版本适用于本标准。

HJ/T 91 地表水和污水监测技术规范

HJ 494 水质采样技术指导

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

浮游植物 phytoplankton

在水中营浮游生活的藻类植物，通常浮游植物就是浮游藻类，包括原核的蓝藻门和其它各类真核藻类。

3.2

显微镜计数视野 microscope counting field

显微镜视野中一定面积的计数区域。

3.3

检出限 detection limit

在 99% 概率下，样品中可被检测到的最低浮游植物密度。

4 方法原理

在显微镜下，对样品中的浮游植物进行人工分类和计数，计算单位体积样品中各种类浮游植物的细胞数量。

5 试剂和材料

除非另有说明，分析时均使用符合国家标准的分析纯试剂，实验用水为新制备的去离子

水或蒸馏水。

5.1 碘化钾 (KI)。

5.2 碘 (I₂)。

5.3 甲醛溶液: $\omega(\text{CH}_2\text{O})=37\%$ 。

5.4 鲁哥氏液 (Lugols solution)

称取 60 g 碘化钾 (5.1), 溶于 1000 ml 水中, 再加入 40 g 碘 (5.2), 充分搅拌使其溶解, 静置 24 h 以上。鲁哥氏液在室温避光条件下可保存 1 年。

6 仪器和设备

6.1 浮游生物网: 25 号筛绢网, 网孔直径为 0.064 mm, 网呈圆锥形, 网口套在铜环上, 网底端有出水开关活塞。

6.2 采样瓶: 30 ml 棕色玻璃广口瓶 (具塞)。

6.3 显微镜: 物镜 4×、10×、20×、40×, 目镜 10×或 15×。

6.4 浓缩装置: 筒形分液漏斗, 1 L。

6.5 样品瓶: 50 ml 的棕色玻璃广口瓶 (具塞)。

6.6 超声波发生装置: 工作频率 40 kHz。

6.7 微量移液器: 100 μl 。

6.8 藻类计数框: 0.1ml、面积 20 mm×20 mm, 框内划分横直各 10 行格, 共 100 个小方格。

6.9 盖玻片: 面积 22 mm×22 mm, 厚度小于 0.2 mm。

6.10 计数器。

6.11 显微镜物镜测微尺。

6.12 显微镜目镜测微尺。

6.13 一般实验室常用仪器和设备。

7 样品

7.1 样品的采集

7.1.1 定性样品

使用浮游生物网 (6.1) 采集定性样品。关闭浮游生物网底端出水开关活塞, 在水面表层至 0.5 m 水深处 (或根据研究需要确定的其他水深), 以 20 cm/s~30 cm/s 的速度缓慢做“∞”形往复拖动约 1 min~3 min; 也可沿表层至 0.5 m 水深处缓慢拖动, 滤过 1.5 m³~5.0 m³ 体积的水体。将浮游生物网 (6.1) 提出水面, 水体自然通过网孔, 待底部还剩少许水体 (5 ml~10 ml) 时, 将底端出口伸入采样瓶 (6.2) 中, 打开底端活塞收集定性样品。

7.1.2 定量样品

按照 HJ/T 91 和 HJ 494 的相关规定进行样品的采集。

一般采集不少于 500 ml 样品。当水体中的浮游植物密度小于 10^6 cells/L，采集不少于 1 L 样品。

7.2 样品的保存

7.2.1 定性样品

定性样品在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷藏避光条件下可保存 36 h。高温环境下采集的定性样品在保存前需逐渐降温，避免温度变化过快对浮游植物细胞产生损伤。

7.2.2 定量样品

向每 1000 ml 定量样品中加入 15 ml 鲁哥氏液(5.4)。室温避光条件下可保存 3 周； $1\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷藏避光条件下可保存 12 个月。

样品在保存过程中，应每周检查鲁哥氏液的氧化程度，如果样品颜色变浅，则应向样品中补加适量鲁哥氏液，直到样品的颜色恢复为黄褐色。

若定量或定性样品含大量有机质、需储存 12 个月以上时，应加入甲醛溶液（5.3）固定，每 100 ml 样品加 4 ml 甲醛溶液（5.3）。

8 分析步骤

8.1 混匀样品

每次取样前，必须采用上下颠倒至少 100 次的方式充分混匀所采样品。

8.2 定性样品的分析

在显微镜（6.3）下观察定性样品（7.1.1），鉴定浮游植物的种类，并建立清单，为定量分析做好准备。

根据调查的需要，确定需鉴定到的分类单位，一般情况下，鉴定到属即可。

8.3 定量样品的分析

8.3.1 调整浮游植物密度

8.3.1.1 样品浓缩

当定量样品（7.1.2）中的浮游植物细胞密度小于 10^7 cells/L 时，需要对样品进行浓缩。样品中浮游植物细胞密度为 10^5 cells/L $\sim 10^6$ cells/L 时，样品浓缩 50 倍；样品中浮游植物细胞密度为 10^6 cells/L $\sim 10^7$ cells/L 时，样品浓缩 10 倍。最终使浓缩后加入计数框中的 0.1 ml 样品约含有 500 个 ~ 10000 个浮游植物细胞。样品中浮游植物细胞密度的初步判断可参照显微镜计数（8.3.2）进行。

将全部定量样品摇匀倒入浓缩装置（6.4）中，静置 48 h。用细小虹吸管吸取清液置于烧杯中，直至浮游植物沉淀物体积约 20 ml。旋开浓缩装置（6.4）底部活塞，将浮游植物沉淀物放入 100 ml 量筒中。用少许清液冲洗浓缩装置（6.4）1 ~ 3 次，一并放入量筒中，再用

清液定容至所需浓缩倍数的体积。为了减少浮游植物吸附在浓缩装置壁上，在静置过程中，应适时轻敲浓缩装置器壁。

8.3.1.2 样品稀释

当定量样品（7.1.2）中的浮游植物细胞密度大于 10^8 cells/L 时，需要对样品进行稀释。样品中浮游植物细胞密度为 10^8 cells/L~ 10^9 cells/L 时，样品稀释 10 倍；样品中浮游植物细胞密度大于 10^9 cells/L 时，样品稀释 100 倍。经稀释使加入计数框中的 0.1 ml 样品约含有 500 个~10000 个浮游植物细胞。样品中浮游植物细胞密度的初步判断可参照显微镜计数（8.3.2）进行。

对于含有细胞聚集成团的浮游植物样品，当不满足以下两个条件中的任何一个时，稀释前需进行超声波处理：（1）群体中的浮游植物细胞个体较易被辨识，能够对群体中的细胞进行计数；（2）当群体中所含细胞数量与群体体积或长度有固定比例时，如空星藻、盘星藻、丝状藻等，可以将群体作为计数对象，依据比例得到浮游植物细胞数量。

超声波处理具体步骤为：取混匀的 30 ml 定量样品于样品瓶（6.5）中，用超声波发生装置（6.6）处理约 10 min 后，在显微镜下进行观察，如仍存在大量未分散的细胞团，则需延长超声波处理时间，直至能够准确计数。

根据稀释倍数，选取相应体积的容量瓶，量取不少于 25 ml 混匀后的定量样品或经超声波处理后的样品，用水定容至刻线。如要保存稀释后的样品，应注意补充鲁哥氏液，使稀释后样品中的鲁哥氏液浓度与稀释前一致。

8.3.2 显微镜计数

8.3.2.1 准备

将样品放至室温，用微量移液器（6.7）取 0.1 ml 混匀样品，注入藻类计数框（6.8）中，用盖玻片（6.9）将藻类计数框完全盖住，静置约 5 min 后，开始计数。藻类计数框内应无气泡，如有气泡应重新取样。

8.3.2.2 选取计数方式

根据 8.3.1 调整后的浮游植物的密度，选用合适的计数方式，使测定过程中浮游植物细胞的总数量为 500 个~1500 个。表 1 为推荐选用的计数方式。

表 1 推荐选用的计数方式

计数框中 0.1 ml 样品含有的浮游植物细胞数 (cells)	推荐的计数方式
500~1499	全片计数
1500~4999	行格计数
5000~10000	对角线计数、随机视野

8.3.2.3 计数

8.3.2.3.1 全片计数方式

在40×物镜下，逐一观察藻类计数框中全部100个小方格，分类计数每个小方格内所有浮游植物细胞，并用计数器（6.10）记录下每行的分类计数结果。若藻细胞体积较大，可降低物镜倍数。

8.3.2.3.2 行格计数方式

在40×物镜下，逐一观察藻类计数框中第2、5、8行，共30个小方格，分类计数每个小方格内所有浮游植物细胞，并用计数器（6.10）记录下每个小方格的分类计数结果。若藻细胞体积较大，可降低物镜倍数。

8.3.2.3.3 对角线计数方式

在40×物镜下，逐一观察位于藻类计数框对角线位置上的10个小方格，分类计数每个小方格内所有浮游植物细胞，并用计数器（6.10）记录下每个小方格的分类计数结果。若藻细胞体积较大，可降低物镜倍数。

8.3.2.3.4 随机视野方式

在40×物镜下，随机抽取一定数量的视野，分类计数每个视野内所有浮游植物细胞，并记录下每个视野的分类计数结果。若藻细胞体积较大，可降低物镜倍数。计数前应测量显微镜视野面积，测量方法参见附录B。

9 结果计算与表示

9.1 结果计算

样品中浮游植物细胞密度（cells/L），按照公式（1）进行计算：

$$N = 1000 \times \frac{A}{A_c} \times \frac{n}{V} \times \frac{V_1}{V_0} \quad (1)$$

式中：N——每升水中浮游植物的数量，cells/L；

n——浮游植物细胞显微镜计数量，cells；

A——计数框面积，mm²；

A_c——计数面积，当计数方式为对角线、行格和全片时计数面积分别为A/10、3A/10和A，当计数方式为随机视野时为计数的总视野面积，mm²；

V——计数框体积，mL；

V₀——稀释或浓缩前的取样体积，mL；

V₁——稀释或浓缩后的体积，mL。

9.2 结果表示

测定结果以科学计数法表示，保留 2 位有效数字。

10 精密度

6 家实验室分别用全片计数、行格计数、对角线计数和随机视野计数对浮游植物密度为 1×10^7 cells/L、 3×10^7 cells/L、 5×10^7 cells/L、 1×10^8 cells/L 的实际样品进行了 7 次重复测定，实验室内的相对标准偏差分别为 2.4%~11%，2.9%~10%，2.7%~11%，4.8%~8.2%；实验室间相对标准偏差分别为 22%、5.6%、7.1%、21%。计算测定结果对数值的 95%置信区间，再取反对数得到的实验室间 95%置信区间见表 2。

表 2 实验室间 95%置信区间

计数方式	均值	95%置信区间
全片方式 (cells/L)	1.1×10^7	$0.86 \times 10^7 \sim 1.3 \times 10^7$
行格方式 (cells/L)	3.3×10^7	$3.1 \times 10^7 \sim 3.5 \times 10^7$
对角线方式 (cells/L)	5.6×10^7	$5.2 \times 10^7 \sim 6.0 \times 10^7$
随机视野 (cells/L)	1.2×10^8	$0.96 \times 10^8 \sim 1.4 \times 10^8$

11 质量保证和质量控制

11.1 浮游植物均匀性

在开始显微镜计数前，应确认浮游植物在计数框中分布的均匀性。使用低倍数物镜观察浮游植物在整个计数框中的分布情况，若分布不均匀，应重新取样。

11.2 最少计数量

在单次测定中，浮游植物细胞计数总量不少于 500 个。当发现测定精度难以达到要求时，可适当增加每次测定中浮游植物细胞的计数总量。

11.3 精密度控制

每一样品测定两次。两次计数结果相对偏差应 $\leq 15\%$ ，否则应增加计数一次，直至某两次计数结果符合这一要求为止。测定结果为相对偏差 $\leq 15\%$ 的两次计数结果的平均值。

12 注意事项

12.1 如遇到一个浮游植物细胞的一部分在行格或视野内，而另一部分在行格或视野外，在行格上线或视野上半圈的细胞不计数，而在行格下线或视野下半圈的细胞计数。

12.2 计数过程中，如果发生样品水分蒸发，在计数框中形成气泡，则弃去本片重新取样计数。

附录 A
(规范性附录)
随机视野方式检出限的计算

附录 A 给出了随机视野方式检出限的计算公式。随机视野方式的检出限与观察的视野数、视野面积和计数框面积有关，当取样体积为 0.1 ml 时，可根据测定情况按公式 (A.1) 计算检出限：

$$MDL = \frac{-\ln 0.01 \times S}{n \times s \times f} \times 10^{12} \quad (\text{A.1})$$

式中： MDL ——检出限，cells/L；
 n ——随机视野数，个；
 S ——计数框的面积， cm^2 ；
 s ——一个视野的面积， μm^2 ；
 f ——浓缩倍数。

附录 B
(资料性附录)
显微镜视野面积的测量

B.1 原理

用物镜测微尺标定目镜测微尺，再用目镜测微尺测量视野直径，计算视野的面积。

B.2 测量工具

B.2.1 物镜测微尺

物镜测微尺(6.11)是一块特制的载玻片，其中央有一小圆圈。圆圈内刻有分度，将长1 mm 的直线等分为 100 小方格，每小方格等于 10 μm 。

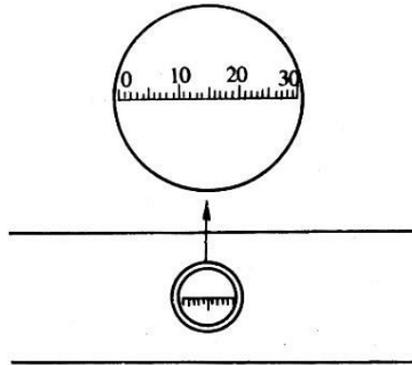


图 B.1 物镜测微尺示意图

B.2.2 目镜测微尺

目镜测微尺(6.12)是一块刻有刻度的圆形玻片，通常的刻度是将 5 mm 划分为 50 格。用前必须用物镜测微尺来标定。

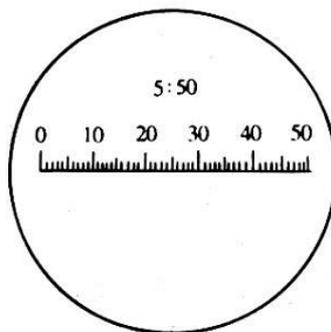


图 B.2 目镜测微尺示意图

B.3 显微镜视野面积测量步骤

B.3.1 装入目镜测微尺 (6.12)。旋下目镜上的目透镜，将目镜测微尺放入接目镜的中隔板上，使有刻度的一面朝下，再旋上目透镜，并装入镜筒内。

B.3.2 装入物镜测微尺 (6.11)。将物镜测微尺置于显微镜的载物台上，有刻度的一面朝上，并调整具有刻度的小圆圈至视野中央。

B.3.3 物镜测微尺标定目镜测微尺。先用低倍镜观察，对准焦距，待看清物镜测微尺的刻度后，转动目镜，使目镜测微尺的刻度与物镜测微尺的刻度相平行，并使它们的左边第一条线相重合，再向右寻找两尺的另一条重合线。物镜测微尺标定目镜测微尺见示意图 B.3。

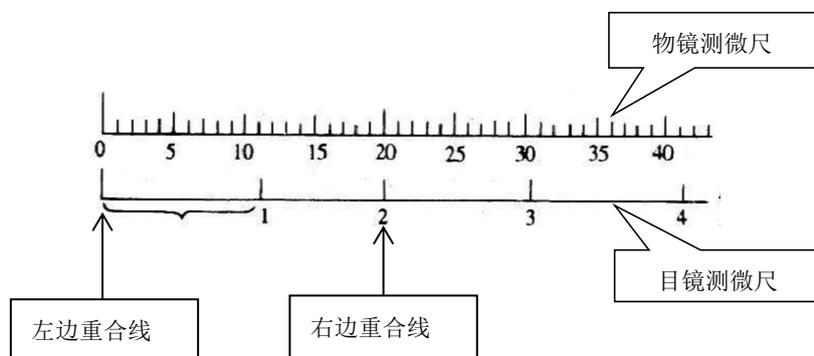


图 B.3 物镜测微尺标定目镜测微尺示意图

B.3.4 记录两条重合线间的目镜测微尺的格数 a 和物镜测微尺的格数 b 。按照公式 B.1 计算 1 格目镜测微尺所代表的实际长度 c 。

$$c = \frac{b}{a} \times 10\mu\text{m} \quad (\text{B.1})$$

B.3.5 测量显微镜视野面积。利用标定后的目镜测微尺，测量视野的直径，再利用圆面积公式计算视野面积，单位为 μm^2 。