

HJ

中华人民共和国国家生态环境标准

HJ 1215—2021

水质 浮游植物的测定 滤膜-显微镜计数法

Water quality—Determination of phytoplankton—
Filtration membrane-Microscope counting method

本电子版为正式标准文本，由生态环境部环境标准研究所审校排版。

2021-11-29 发布

2022-06-01 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	2
6 仪器和设备	2
7 样品	3
8 分析步骤	4
9 结果计算与表示.....	6
10 精密度	6
11 质量保证和质量控制.....	7
12 废物处置	7
附录 A（规范性附录） 方法检出限计算方法.....	8
附录 B（资料性附录） 惠普尔目镜分划板标定	9
附录 C（资料性附录） 丝状体、似球形群体浮游植物细胞数量估算	12
参考文献	13

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滤膜-显微镜计数法。

本标准的附录 A 为规范性附录，附录 B 和附录 C 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。

本标准主要起草单位：浙江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、浙江省海洋监测预报中心、浙江省杭州生态环境监测中心、浙江省宁波生态环境监测中心、江苏省常州环境监测中心和自然资源部第二海洋研究所。

本标准生态环境部 2021 年 11 月 29 日批准。

本标准自 2022 年 6 月 1 日起实施。

本标准由生态环境部解释。



水质 浮游植物的测定 滤膜-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滤膜-显微镜计数法。

本标准适用于地表水中浮游植物的快速测定。

当样品最大过滤体积为 1000 ml 时，方法检出限为 40 cells/L。方法检出限计算方法详见附录 A。

2 规范性引用文件

本标准引用了下列文件或其中的条款。凡是注明日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本标准。凡是未注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本标准。

GB/T 14581	水质 湖泊和水库采样技术指导
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微小藻类植物，通常浮游植物就是浮游藻类，包括原核的蓝藻和其它各类真核藻类。

3.2

计数单位 counting unit

显微镜视野下选择计数的最小单元，如细胞。

3.3

浮游植物密度 density of phytoplankton

单位体积内浮游植物的细胞数，cells/L。

3.4

显微镜计数视野 microscope counting field

显微镜视野中限定一定面积的区域，用来定量计数浮游植物。

4 方法原理

样品通过一定孔径的滤膜，群体、丝状体及单细胞浮游植物截留在滤膜上，滤膜经透明处理后在显微镜下镜检。

5 试剂和材料

除非另有说明,分析时均使用符合国家标准和分析纯试剂,实验用水为新制备的去离子水或蒸馏水。

5.1 碘 (I_2)。

5.2 碘化钾 (KI)。

5.3 甲醛溶液: $w(\text{HCHO})=37\%\sim 40\%$ 。

5.4 鲁哥氏碘液:

称取 60 g 碘化钾 (5.2) 溶解在 100 ml 水中,再加入 40 g 碘 (5.1),充分搅拌使其完全溶解,加水定容至 1000 ml,转移至棕色磨口玻璃瓶,室温避光保存。

5.5 显微镜浸没油: $n_D^{23}=1.515$ 或 $n_E^{23}=1.518$,配透明玻璃滴棒。

5.6 滤膜:混合纤维素酯膜,直径 25 mm,孔径 $0.45\ \mu\text{m}\sim 3\ \mu\text{m}$ 。

注:每批次滤膜应进行水化测试和油透明测试,满足可水化和可透明要求后方可使用。将 1 张未使用的滤膜放入盛水的烧杯中,若滤膜被水完全浸润,则滤膜可水化。取 1 张未使用的滤膜,置于滴有显微镜浸没油的载玻片上,若滤膜被浸没油完全浸润,则滤膜可透明。

6 仪器和设备

6.1 25 号浮游生物网:网孔直径 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 定性采样瓶:30 ml~100 ml 广口聚乙烯瓶。

6.3 采水器:不锈钢或有机玻璃材质,圆柱形。容量和深度规格要满足采样要求。

6.4 定量采样瓶:1 L~2 L 广口聚乙烯瓶。

6.5 冷藏箱。

6.6 真空抽滤装置:包括漏斗(直径 25 mm,容积 200 ml)、多孔聚酯滤膜支撑板、收集瓶、真空泵(相对真空度 $\leq -17\ \text{kPa}$,可调)。

6.7 载玻片:25 mm \times 76 mm。

注:载玻片和盖玻片使用前应用浓盐酸和乙醇浸泡。若条件允许,选择可直接使用的载玻片或盖玻片。

6.8 盖玻片:25 mm \times 25 mm。

6.9 无齿组织镊子。

6.10 载玻片晾片板:适配同规格载玻片。

6.11 烘箱:70 $^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$,温度可调。

6.12 正置生物显微镜或倒置生物显微镜:物镜 4 \times 、10 \times 、20 \times 、40 \times ;目镜 10 \times 或 15 \times 。

6.13 载物台测微计:又称镜台测微计,1 mm/100 DIV,分划值为 0.01 mm。

注:DIV 指等分格,1 mm/100 DIV 即 1 mm 等分成 100 格。

6.14 惠普尔目镜分划板(Whipple grid):边长为 7 mm~10 mm 的正方形大格,划分为 100 个相同的正方形中格,位于中央的 1 个中格进一步划分为 25 个相同的正方形小格。

注:不具备惠普尔目镜分划板时,亦可使用同规格的网格型目镜分划板(即中央的中格未细分为 25 小格的网格型目镜分划板)。

6.15 计数器。

6.16 一般实验室常用设备。

7 样品

7.1 样品采集

7.1.1 定性样品

点位布设及采样频次按照 GB/T 14581、HJ/T 91 和 HJ 494 的相关规定执行。

使用 25 号浮游生物网（6.1）采集定性样品。关闭浮游生物网底端出水活塞开关，在水面表层至 0.5 m 水深处以 20 cm/s~30 cm/s 的速度做“∞”形往复，缓慢拖动约 1 min~3 min，待网中明显有浮游植物进入，将浮游生物网（6.1）提出水面，网内水自然通过网孔滤出，待底部剩少许水样（5 ml~10 ml）时，将底端出口移入定性采样瓶（6.2）中，打开底端活塞开关收集定性样品。采集分层样品时，用 25 号浮游生物网（6.1）过滤特定水层样品，其他步骤同采集表层样品。定性样品采集完成后及时将浮游生物网清洗干净。样品采集后放入冷藏箱（6.5）冷藏避光运输。

如有定性样品采集技术规范，按技术规范有关要求执行。

7.1.2 定量样品

按照 GB/T 14581、HJ/T 91 和 HJ 494 的相关规定采集定量样品。

使用采水器（6.3）采集 1 L~2 L 样品至定量采样瓶（6.4）中。若水体透明度较高，浮游植物数量较少时，应酌情增加采样体积。定量样品采集完成后，定量采样瓶（6.4）不应装满，以便摇匀。

注 1：有些浮游植物（如蓝藻）常上浮在水面或成片、条带分布，可在此水华密集区域采样作为峰值参考。

注 2：定量样品采集应在定性样品采集之前。应保持固定时间段采样，以便结果之间可相互比较。

7.2 样品保存

7.2.1 定性样品

定性样品采集后应立即加入鲁哥氏碘液（5.4）固定，用量为水样体积的 1.0%~1.5%。镜检活体样品不加鲁哥氏碘液（5.4）固定。定性样品在室温避光条件下可保存 3 周；1 °C~5 °C 冷藏避光条件下可保存 12 个月。活体样品 4 °C~10 °C 冷藏避光条件下可保存 36 h。

7.2.2 定量样品

定量样品采集后立即加入鲁哥氏碘液（5.4）固定，用量为水样体积的 1.0%~1.5%。也可将鲁哥氏碘液（5.4）提前加入定量采样瓶（6.4）中带至现场使用。定量样品在室温避光条件下可保存 3 周；1 °C~5 °C 冷藏避光条件下可保存 12 个月。

样品在保存过程中，应每周检查鲁哥氏碘液（5.4）的氧化程度，若样品颜色变浅，应向样品中补加适量的鲁哥氏碘液（5.4），直到样品的颜色恢复为黄褐色。

注：若样品需长期保存，应加入甲醛溶液（5.3），用量为水样体积的 4%。

8 分析步骤

8.1 试样制备

8.1.1 预检

按照 8.1.2~8.1.5 的要求完成预检装片，判断样品浮游植物密度，便于样品的后续分析。

8.1.2 混匀样品

每次取样前，采用上下颠倒至少 30 次的方式充分混匀样品，混匀动作要轻。

8.1.3 过滤体积

根据预检估算浮游植物密度，调整样品过滤体积，最终使滤膜上约有 40 个~ 10^5 个浮游植物细胞。不同预检估计密度水平下推荐的样品过滤体积见表 1。

表 1 推荐选用的样品过滤体积

预估浮游植物细胞密度水平 (cells/L)	推荐的样品过滤体积 V_0 (ml)
10^8 及以上	0.5~2
10^7	5~10
10^6	5~25
10^5	10~50
10^4	5~100
10^3	50~200
10^2	500
40	1000

注 1: 样品过滤体积大于漏斗容量时，应保证后续样品加入时不扰动滤膜上的浮游植物。
注 2: 样品过滤体积小于 5 ml 时，以实验用水再悬浮样品。首先用移液器 (6.16) 量取一定体积的样品至 10 ml~50 ml 规格的离心管中，再加入一定体积的实验用水，使悬浮后样品总体积在 5 ml 及以上即可，最后用胶头滴管 (6.16) 加入 2 滴~3 滴鲁哥氏碘液 (5.4) 固定。

8.1.4 样品过滤

用量筒或移液器 (6.16) 快速量取适量样品体积，将样品加入装有滤膜 (5.6) 的真空抽滤装置 (6.6) 漏斗中，静置 2 min~3 min，真空抽滤，至漏斗中有 0.5 cm 液层时关闭真空泵，使剩余液体完全通过漏斗，切忌抽干滤膜。

8.1.5 装片制备

样品过滤完成后，用无齿组织镊子 (6.9) 取下滤膜，保持截留浮游植物的一面向上，放在滴有 2 滴显微镜浸没油 (5.5) 的载玻片 (6.7) 上，再用透明玻璃滴棒在滤膜上滴 2 滴显微镜浸没油 (5.5)，将载玻片 (6.7) 放入载玻片晾片板 (6.10)，置于烘箱 (6.11) 中， $70\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 加热 2 h。2 h 后取出载玻片晾片板 (6.10)，观察滤膜是否透明。若已透明，再在滤膜上滴加 2 滴显微镜浸没油 (5.5)，盖上盖玻片

(6.8)，装片制备完成。若滤膜加热 2 h 后未透明，延长加热时间，不超过 24 h。盖上盖玻片 (6.8) 时，勿扰动滤膜。

8.2 定性样品分析

在显微镜 (6.12) 下观察定性样品，鉴定浮游植物的种类。优势种类鉴定到种，其他种类至少应鉴定到属。部分鉴定参考资料见参考文献。

注：种类鉴定除用定性样品观察外，还可吸取已完成计数的定量样品进行观察。

8.3 定量样品分析

8.3.1 显微镜标定

计数前标定显微镜 (6.12)，确定计数视野面积 (Whipple 视野或目镜视场视野)。显微镜标定工具包括载物台测微计 (6.13) 和惠普尔目镜分划板 (6.14)。惠普尔目镜分划板标定方法参见附录 B。

8.3.2 显微镜计数

不同密度水平样品推荐视野类别及计数视野数量见表 2。将装片 (8.1.5) 置于显微镜 (6.12) 载物台上，用 Whipple 视野或目镜视场视野进行镜检计数。较低密度水平样品计数，建议选择目镜视场视野计数。根据浮游植物细胞大小，选择目镜 10×、物镜 20× 或目镜 10×、物镜 40× 放大倍数镜检，记录每个视野的浮游植物种类及数量。

表 2 不同密度水平样品推荐视野类别及计数视野数

样品	推荐计数视野类别	推荐计数视野数
高密度水平 (10^8 cells/L 及以上)	Whipple 视野	>10 个
中密度水平 (10^6 cells/L ~ 10^7 cells/L)	Whipple 视野	>20 个
低密度水平 (10^6 cells/L 以下)	目镜视场视野	>20 个

Whipple 视野计数规则：视野中处于下边界及右边界线的藻类计入总数，处于上边界及左边界线的藻类不计入总数，如图 1。若出现丝状体等较大个体显著穿过两个或多个格子的边界时，应在低倍镜下单独计数，再计入总数。破损细胞不计数。丝状体或似球形群体细胞数估算参见附录 C。计数时宜缓慢移动显微镜载物台，应避免在一个区域重复抽样，确保滤膜上、下、左、右和中部区域的视野均有抽样。显微镜视野在滤膜上的移动方向如图 2 所示。

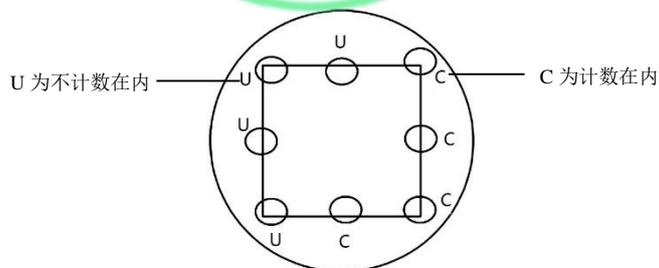


图 1 Whipple 视野计数约定规则示意图

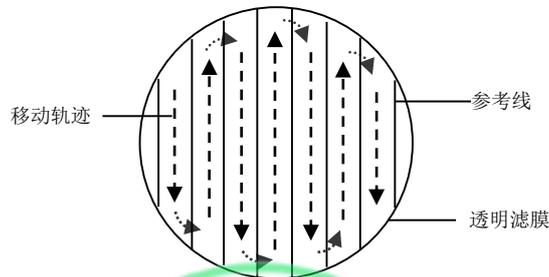


图2 显微镜视野在滤膜上的移动示意图

9 结果计算与表示

9.1 结果计算

样品中浮游植物的细胞密度按照公式(1)计算。

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

式中： N ——样品中浮游植物的细胞密度，cells/L；

A_f ——滤膜有效过滤面积， mm^2 ；

A_c ——计数面积（镜检计数的视野面积之和）， mm^2 ；

n ——显微镜观察计数的浮游植物细胞数，cells；

V_0 ——过滤样品的取样体积，ml；

1000——体积单位换算系数，ml/L。

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家实验室分别对含高密度水平（ 1.0×10^8 cells/L）、中密度水平（ 4.0×10^6 cells/L）和低密度水平（ 7.0×10^4 cells/L）的浮游植物样品进行了6次重复测定：实验室内相对标准偏差分别为0.18%~0.64%，0.22%~0.49%，0.37%~1.16%；实验室间相对标准偏差分别为：0.28%、0.68%、1.57%。计算精密度所用数据均经以10为底进行对数转换。高、中、低密度验证样品的实验室间95%置信区间见表3。

表3 高、中、低密度水平验证样品的实验室间95%置信区间

样品	均值 (cells/L)	95%置信区间 (cells/L)
高密度水平	9.8×10^7	$9.3 \times 10^7 \sim 1.0 \times 10^8$
中密度水平	4.0×10^6	$3.6 \times 10^6 \sim 4.4 \times 10^6$
低密度水平	7.0×10^4	$5.7 \times 10^4 \sim 8.2 \times 10^4$

11 质量保证和质量控制

11.1 最小计数量：优势种类计数最少 100 个~150 个。

11.2 每批次样品中，随机抽取 10% 的样品做平行测定，用计数差异百分比（percent difference in enumeration, PDE）评估数据的精密度。按照公式（2）计算 PDE。

$$\text{PDE} = \frac{|\bar{N}_1 - \bar{N}_2|}{\bar{N}_1 + \bar{N}_2} \quad (2)$$

式中：PDE——计数差异百分比，%；

\bar{N}_1 ——平行样 1 测定结果的均值，cells/L；

\bar{N}_2 ——平行样 2 测定结果的均值，cells/L。

11.3 定期标定显微镜，标定目镜分划板及视野面积，每年至少 1 次。

12 废物处置

实验中产生的废液应分类收集，集中保管，依法委托有资质的单位进行处理。



附录 A
(规范性附录)
方法检出限计算方法

附录 A 给出了方法检出限的计算方法。方法检出限与计数视野数、可计数视野总数及子样本体积有关。假设样品在滤膜上符合随机分布，可通过泊松统计确定其检出限，计算公式见公式 (A.1)。

$$MDL = \frac{N_e}{n_e \times V_0} \times \ln 0.01 \quad (A.1)$$

式中：MDL——显著性水平 0.01 时的方法检出限，cells/L；

N_e ——可计数视野总数；

n_e ——观察的计数视野数；

V_0 ——样品的过滤体积，L；

0.01——显著性水平。

附录 B
(资料性附录)
惠普尔目镜分划板标定

B.1 标定工具

B.1.1 载物台测微计

载物台测微计(6.13)如图 B.1 所示,是一块特制的载玻片,其中央有一个小圆圈。圈内刻有分度,将长度为 1 mm 的直线等分为 100 个小格,每个小格长度等于 10 μm 。

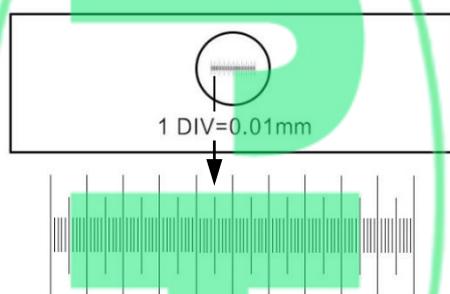


图 B.1 载物台测微计示意图

B.1.2 惠普尔目镜分划板

惠普尔目镜分划板(6.14)如图 B.2 所示,是一种网格型目镜分划板,外观为刻有方格的玻璃圆盘,包含 1 个大格,大格被等分成 100 个中格,中心位置的 1 个中格又被等分为 25 个小格。标定惠普尔目镜分划板,以计算不同放大倍数下的 Whipple 视野面积。使用载物台测微计(6.13)标定惠普尔目镜分划板。载物台测微计规格为 1 mm,均分成 100 等分,每小格代表 10 μm 。

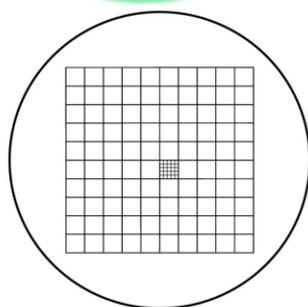


图 B.2 惠普尔目镜分划板示意图

B.2 惠普尔目镜分划板标定步骤

B.2.1 将惠普尔目镜分划板（6.14）刻度向下装入目镜隔板上。

B.2.2 将载物台测微计（6.13）放在显微镜载物台上，刻度朝上。先用低倍镜对焦，使视野中载物台测微计标尺刻度清晰。

B.2.3 转动目镜，使惠普尔目镜分划板标尺与载物台测微计标尺刻度平行，移动载物台使载物台测微计标尺与惠普尔目镜分划板标尺重叠，再使两尺的“0”刻度完全重合。定位后，查找确定两尺第2个完全重合的刻度，计数两组重合刻度之间惠普尔目镜分划板的格数 N_w 和载物台测微计标尺的格数 N_s ，如图 B.3 所示。载物台测微计每格长度 $10\ \mu\text{m}$ ，在一定放大倍数下，惠普尔目镜分划板的标定结果即是每格的长度。

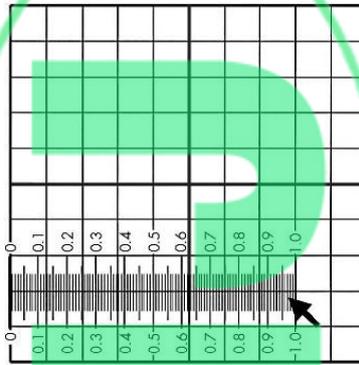


图 B.3 载物台测微计标定惠普尔目镜分划板示意图

惠普尔目镜分划板中格的标定边长按照公式（B.1）计算。

$$L_e = L_s \times \frac{N_s}{N_w} \quad (\text{B.1})$$

式中： L_e ——惠普尔目镜分划板的中格边长， μm ；

L_s ——载物台测微计标尺上单格的长度， μm ；

N_s ——两组重合刻度线之间载物台测微计标尺的格数；

N_w ——两组重合刻度线之间惠普尔目镜分划板上中格的格数。

将计算数据填入表 B.1。依据表 B.1 完成表 B.2。

表 B.1 惠普尔目镜分划板标定结果

物镜、目镜组合	次数	大格边长/mm	均值	中格边长/ μm	均值
物镜 4 \times 、目镜 10 \times	1				
	2				
	3				
物镜 10 \times 、目镜 10 \times	1				
	2				
	3				
物镜 20 \times 、目镜 10 \times	1				
	2				
	3				
物镜 40 \times 、目镜 10 \times	1				
	2				
	3				

表 B.2 惠普尔目镜分划板面积计算结果

物镜、目镜组合	次数	惠普尔目镜分划板大格面积/ mm^2	均值
物镜 4 \times 、目镜 10 \times	1		
	2		
	3		
物镜 10 \times 、目镜 10 \times	1		
	2		
	3		
物镜 20 \times 、目镜 10 \times	1		
	2		
	3		
物镜 40 \times 、目镜 10 \times	1		
	2		
	3		

附录 C

(资料性附录)

丝状体、似球形群体浮游植物细胞数量估算

C.1 丝状体细胞数估算

取多个丝状体的多次计数平均值或者中位数作为丝状体的平均细胞数。一般选择计数 30 个丝状体，分析 30 个丝状体的细胞数量分布，若呈正态分布，按照公式 (C.1) 计算丝状体总细胞数量。

$$N_T = \bar{N}_t \times n_t \quad (\text{C.1})$$

式中： N_T ——丝状体总细胞数，cells；
 \bar{N}_t ——丝状体平均细胞数，cells/个；
 n_t ——丝状体数目，个。

若呈偏态分布，按照公式 (C.2) 计算丝状体总细胞数量。

$$N_T = M \times n_t \quad (\text{C.2})$$

式中： N_T ——丝状体总细胞数，cells；
 M ——丝状体平均细胞数中位值，cells/个；
 n_t ——丝状体数目，个。

C.2 似球形群体细胞数估算

通过群体直径估算似球形群体细胞数。按照公式 (C.3) 计算似球形群体细胞数。

$$\log_{10} N_c = 2.99 \log_{10} d_c - 2.80 \quad (\text{C.3})$$

式中： N_c ——似球形群体细胞数，cells；
 2.99——线性回归方程的斜率；
 d_c ——平均群体直径， μm ；
 2.80——线性回归方程的截距。

使用该公式估算微囊藻群体细胞数时，测量似球形群体体积应忽略群体的表层胶被，群体直径为充满细胞部分的直径；将非球形群体视为圆柱体、卵圆体估算群体体积；应随机测量至少 30 个群体，以获得合理的群体平均体积，平均群体直径为等同于群体平均体积的似球形群体的直径。

特别大的群体，可通过目镜分划板对大群体的一小部分面积进行细胞计数，然后估算整个群体面积总细胞数，并在工作记录表上加以说明。

参考文献

- [1] 胡鸿钧, 魏印心. 中国淡水藻类——系统、分类及生态[M]. 北京: 科学出版社, 2006.
- [2] 中国孢子植物志编辑委员会. 中国淡水藻志, 1-22 卷[M]. 北京: 科学出版社, 1998-2016.
- [3] 胡鸿钧, 李尧英, 魏印心等. 中国淡水藻类[M]. 北京: 科学技术出版社, 1980.
- [4] 胡鸿钧. 水华蓝藻生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2011.
- [5] 刘 威, 朱远生, 黄迎艳译. 欧洲硅藻鉴定系统[M]. 广州: 中山大学出版社, 2012.
- [6] 章宗涉, 黄祥飞. 淡水浮游生物研究方法[M]. 北京: 科学出版社, 1991.

