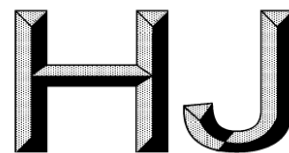


附件 6



# 中华人民共和国国家环境保护标准

HJ □□□-20□□

---

## 水质 浮游植物的测定 滤膜法

Water quality—Determination of Phytoplankton—Membrane filtration  
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.....	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
附录 A（规范性附录） 滤膜法检出限 .....	8
附录 B（资料性附录） 显微镜校准 .....	9
附录 C（资料性附录） 丝状体、似球形群体浮游植物细胞数估算 .....	11

## 前 言

为贯彻《中华人民共和国环境保护法》和《中华人民共和国水污染防治法》，保护生态环境，保障人体健康，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法。

本标准的附录A为规范性附录，附录B～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。

本标准起草单位：浙江省环境监测中心。

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、杭州市环境监测中心站、宁波市环境监测中心、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20□□年□□月□□日批准。

本标准自20□□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 滤膜法

## 1 适用范围

本标准规定了测定水中浮游植物的滤膜法。

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 1000 ml 时，方法定量检出限为 40 cells/L。

## 2 规范性引用文件

本标准引用了下列文件。凡是不注日期的引用文件，其有效版本适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验用水或实验方法

HJ/T 91 地表水和污水监测技术规范

## 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

**浮游植物密度** Density of phytoplankton

单位体积的浮游植物细胞数或个体数，cells/ml 或个体/ml。

### 3.3

**计数单位** counting unit

显微镜视野下可计数的最小单元，细胞或个体。

### 3.4

**自然单位** natural unit count

浮游植物在自然状态下的存在形式，如单细胞，丝状体或似球形群体。

### 3.5

**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。

## 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，对浮游植物进行分类计数。

## 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 碘化钾 (KI)。

5.2 碘 (I<sub>2</sub>)。

5.3 市售甲醛:  $\rho$  (HCHO) = 37%。

5.4 鲁哥氏液 (Lugols solution)

称取 60 g 碘化钾 (5.1) 溶解在 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。当溶液接近饱和时会有沉淀出现,使用前需去除沉淀。鲁哥氏液在室温避光条件下可保存 1 年。

5.5 市售透明油: 包括显微镜浸没油 ( $n_D^{23}=1.515$  或  $n_e^{23}=1.518$ ) 和透明玻璃滴棒。

5.6 滤膜: 微孔混合纤维素酯膜 (Mixed ester/cellulose ester Filters), 直径 25 mm, 孔径 0.45  $\mu\text{m}$ ~3  $\mu\text{m}$ 。

按以下方法对每批次滤膜进行水化测试和油透明测试,达到要求后方可使用。

(1) 将一张未使用的滤膜放入盛水的烧杯中,若滤膜被水完全浸透,则滤膜可水化。

(2) 另取一张未使用的滤膜,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 正置或倒置显微镜: 物镜 4 $\times$ 、10 $\times$ 、20 $\times$ 、40 $\times$ ; 目镜 10 $\times$ 。

6.2 真空泵: 17 kPa 压力以下可调。

6.3 烘箱: 70 $^{\circ}\text{C}$ ±2 $^{\circ}\text{C}$ 可调。

6.4 微孔滤膜过滤器: 包括漏斗 (直径 25 mm, 容量 200 ml)、多孔聚酯滤膜支撑板、收集瓶。

6.5 盖玻片: 25 mm×25 mm。

6.6 载玻片: 25 mm×76 mm。

注: 载玻片和盖玻片使用前需用浓盐酸和乙醇浸泡。若条件允许,可选择耐洁载玻片或盖玻片。

6.7 目镜分划板: WHIPPLE GRID。

6.8 1 mm 镜台测微尺。

6.9 凉片板。

6.10 无齿扁咀镊子。

6.11 25 号浮游生物网: 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。

6.12 1 L~2 L 样品瓶、50 ml 样品瓶, 材质为玻璃、聚丙烯或聚乙烯。

6.13 冷藏采样箱: 2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 。

6.14 一般实验室常用设备: 包括去离子水设备, 不同规格量筒, 移液管, 移液枪, 烧杯, 玻璃搅拌棒等。

## 7 样品

### 7.1 样品的采集

浮游植物样品采集点位设置参照 HJ/T 91 等的相关规定执行。若湖泊、水库水体是圆形或接近圆形的，应从此岸至彼岸至少设两个互相垂直的采样断面；若是狭长的区域，至少应设三个互相平行、间隔均匀的断面。河流水体：在一个采样断面上，水面宽小于 50 米时，只设中泓 1 条垂线；水面宽 50 米~100 米时，在左、右岸有明显水流处设 2 条垂线；水面宽大于 100 米时，在左、中、右设三条垂线。

浮游植物在水体中不仅水平上有差异，而且垂直分布也有不同。一般情况下，当湖泊、水库水深不足 1 米时，可在 1/2 水深处采样；当湖泊、水库水深不超过 2m 时，可在表层下 0.5 m 处采样，若水体透明度很低，可在底层加采一个样品与表层样品合成混合样；若水体超过 2 m 时、透明度较大，可按表层、透明度的 0.5 倍、1 倍、2.5 倍和 3 倍处各取一个样品，将各层样品混合均匀，再从混合样品中取样作为定量样品；也可在有光层内按 3 m~6 m（或更大间距）进行等间距采样。分层层数与监测目的有关，分层越密，获取的信息越详细。一般情况下，河流可不分层采样，直接在水面下 0.5 m 处采样，或在下层（河底上 0.5m）加采一个样品，两次混合即可。若需了解浮游生物垂直分布状况，不同层次分别采样后，不需混合。

有些浮游植物（如蓝藻）常上浮在水面或有成片、成带分布的情况，采样时应加以注意。应尽量保持在每天的相近时间采样，如上午 8 点~10 点时。

#### 7.1.1 定性样品

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开关活塞，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 1~3 min，也可沿表层至 0.5m 水深出缓慢拖动，滤过 1.5 m<sup>3</sup>~5.0 m<sup>3</sup> 体积的水体。将浮游生物网提出水面，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

采集 1 L~2 L 水至样品瓶（6.12）中，立刻加入 10ml 鲁哥氏液（5.4）固定，若浮游植物密度过低，应酌情增加采水量。样品瓶也可提前加好鲁哥氏液（5.4）带至现场。

注意：样品采集完成后，样品瓶中样品液面至瓶盖应留有一定空间，便于样品混匀。

### 7.2 样品的保存

#### 7.2.1 定性样品

定性样品应避光保存在 4 °C~10 °C 环境条件下，保存时间不超过 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

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 °C ~ 5 °C 冷藏避光条件下可保存 12 个月。

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

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 100ml 样品加 4ml 甲醛溶液 (5.3)。

## 8 分析步骤

### 8.1 试样制备

#### 8.1.1 预检

完成预检装片 (8.1.2~8.1.5)，判断样品浮游植物密度 (8.2.2)，以便于样品的后续分析。

#### 8.1.2 样品摇匀

样品过滤前，将样品瓶水平转动、垂直颠倒至少 30 s，充分混匀，混匀动作要轻且速度均匀。

#### 8.1.3 过滤体积

样品浮游植物密度在  $10^8$  cells/L 以上时，样品过滤体积 0.5 ml~2 ml；样品浮游植物密度在  $10^7$  cells/L 数量水平时，样品过滤体积 5 ml~10 ml；样品浮游植物密度在  $10^6$  cells/L 数量水平时，样品过滤体积 5 ml~25 ml；样品浮游植物密度在  $10^5$  cells/L 数量水平时，样品过滤体积 10 ml~50 ml。当样品过滤体积小于 5 ml 时，用实验用水将样品再悬浮，最后在悬浮样品中加几滴鲁哥氏固定液 (5.4)。

注 1：当样品过滤体积大于漏斗容量时，需保证后续样品加入不扰动滤膜上的浮游植物。

#### 8.1.4 样品过滤

用量筒、定量移液器或移液枪 (6.14) 定量量取样品体积，将样品加入微孔滤膜过滤器 (6.4) 漏斗中，静止 2 min~3 min，使用真空泵 (6.2) 抽滤，控制真空压力不高于 17 kPa (5 in Hg)，抽滤至漏斗中有 0.5 cm 液层时关掉真空泵，使剩余液体完全通过漏斗。切忌抽干滤膜，抽滤过程一次完成，不建议后续加入样品，以免影响滤膜上浮游植物的分布。

注：当样品过滤体积大于漏斗容量时，需保证后续样品加入不扰动滤膜上的浮游植物。

#### 8.1.5 装片制备

样品过滤完成后，用无齿扁咀镊子 (6.10) 取下滤膜，保持有藻面朝上，放在滴有 2 滴显微镜浸没油 (5.5) 的载玻片 (6.6) 上，再用透明玻璃滴棒 (5.5) 在滤膜上滴 2 滴显微镜浸没油 (5.5)，将载玻片 (6.6) 放入凉片板 (6.9)，置于烘箱 (6.3) 中，70 °C ± 2 °C 加热 2 h。2 h 后取出凉片板 (6.9)，观察滤膜是否透明。若已透明，再在滤膜上滴 2 滴显微镜浸没油 (5.5)，盖上盖玻片 (6.5)，装片制备完毕。若滤膜加热 2 h 后未透明，可延长加热时

间，建议不超过 24 h。加盖盖玻片（6.5）时，勿扰动滤膜。

## 8.2 显微计数

### 8.2.1 显微镜标定

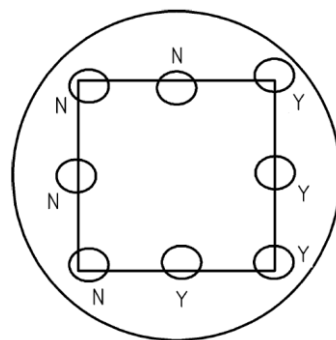
计数前标定显微镜（6.1），确定计数视野面积（Whipple 视野或目镜视场视野）。显微镜标定设备包括 Whipple 目镜分化板（6.7）和 1mm 镜台测微尺（6.8）。Whipple 目镜分划板标定详见资料性附录 B。

### 8.2.2 计数

装片（8.1.5）置于显微镜（6.1）载物台上，用 whipple 视野法或目镜视场视野法进行镜检计数，记录每个视野的浮游植物种类及数量。根据藻细胞大小，选择 200x、400x 放大倍数对藻类进行分类计数。

whipple 视野法计数规则：视野中处于下边界及右边界线的藻类计入总数（Y），处于上边界及左边界线的藻类不计入总数（N）；从里到外，计数每一个接触计数边界的藻类，忽略每一个接触非计数边界的藻类，详见图 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，需在低倍镜下单独计数，再计入总数。丝状体或似球形群体细胞数估算详见资料性附录 C。计数时，缓慢移动显微镜载物台，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示例详见图 2，需避免在一个区域重复抽样。

较低密度样品计数时，建议选择目镜视场视野法。不同样品推荐视野类别及计数视野数详见表 1。



注：Y 为计数在内，N 为不计数在内。

图 1 浮游植物计数约定规则

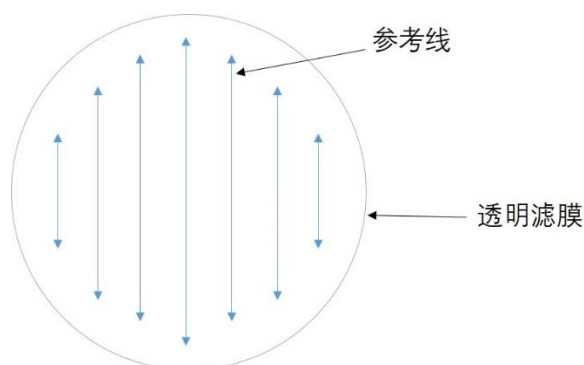




图 2 显微镜视野在滤膜上的移动示例

表1 不同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
高密度样品 (10 <sup>8</sup> cells/L及以上)	Whipple视野	大于10个
中密度样品 (10 <sup>6</sup> cells/L~10 <sup>7</sup> cells/L)	Whipple视野	大于20个
低密度样品 (10 <sup>6</sup> cells/L以下)	目镜视场视野	大于20个

## 9 结果计算与表示

### 9.1 结果计算

样品的浮游植物个体数或细胞数  $N$  依据公式 (1) 计算。

$$N = 1000 \times \frac{C}{A_c} \times \frac{A_t}{V} \quad (1)$$

式中:  $N$ ——每升样品中浮游植物个体数或细胞数;

$C$ ——计数的浮游植物个体数或细胞数;

$A_t$ ——滤膜有效面积 (有效过滤面积), mm<sup>2</sup>;

$A_c$ ——计数面积 (镜检计数的视野面积之和), mm<sup>2</sup>;

$V$ ——样品的过滤体积, ml。

### 9.2 结果表示

测定结果以科学计数法表示, 保留两位有效数字。

## 10 精密度

6 家实验室分别对含高密度 (1.0×10<sup>8</sup>cells/L)、中密度 (4.02×10<sup>6</sup>cells/L) 和低密度 (6.95×10<sup>4</sup>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 为底对数进行转换。高、中、低密度验证样品的实验室间 95% 置信区间见表 2。

表2 高、中、低密度验证样品的实验室间95%置信区间

高密度样品 (cells/L)		中密度样品 (cells/L)		低密度样品 (cells/L)	
均值	95% 置信区间	均值	95% 置信区间	均值	95% 置信区间
9.79×10 <sup>7</sup>	9.29×10 <sup>7</sup> ~1.03×10 <sup>8</sup>	4.02×10 <sup>6</sup>	3.62×10 <sup>6</sup> ~4.43×10 <sup>6</sup>	6.95×10 <sup>4</sup>	5.72×10 <sup>4</sup> ~8.18×10 <sup>4</sup>

## 11 质量保证和质量控制

11.1 最小计数量。一般情况下，浮游植物种类的计数误差可设定±20%，优势种种类计数最少 100~150 个。要达到 10%的计数误差，需增加 4 倍的计数量。计数误差应指明是针对浮游植物总分类单元，还是针对某一类。

11.2 每批次样品中，随机抽取 10%的样品做平行双样测定，计算计数差异百分比（PDE），浮游植物总密度的 PDE 因项目要求而定。PDE 按式（2）计算，公式（2）中 Lab1 和 Lab2 分别代表平行双样的检测结果。

$$PDE = \left[ \frac{|lab_1 - lab_2|}{lab_1 + lab_2} \right] \times 100\% \quad (2)$$

11.3 定期校准显微镜，标定目镜分划板及视野面积，一年至少一次。

11.4 每批次滤膜作延展性测试，要求滤膜透明处理前后直径变化在 1.0 mm 以内。

11.5 从事浮游植物鉴定的技术人员需定期参加专业技术培训。定期开展人员或实验室间比对，比对数据结果分析参照 11.2。

附录 A  
(规范性附录)  
滤膜法检出限

附录 A 给出了滤膜法检出限计算方法。滤膜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，可通过泊松统计来确定其定量检测限 MDL。MDL 计算公式见下式。

$$MDL = \frac{-\ln\alpha \times n_{total}}{V \times n_{counted}}$$

式中：

$MDL$ —置信水平  $\alpha$  的方法检出限，单位：个/升或细胞数/升；

$\alpha$ —置信水平，一般选择置信水平 0.01 或 0.05；

$n_{counted}$ —参与计数的视野数，个；

$n_{total}$ —可用于观察的计数视野总数，个；

$V$ —样品过滤体积，L。

附录 B  
(资料性附录)  
显微镜校准

B.1 目镜分划板

标定目镜分划板，以计算不同放大倍数下的计数视野面积。whipple grid 是一种网格型目镜分划板，外观为刻有方格的玻璃圆盘，包含一个大格，大格被均分成 100 中格，其中心位置处格子又被均分成 25 个小格。Whipple grid 分划板详见图 B.1。使用台测微尺标定 Whipple grid 分划板。镜台测微尺规格为 1mm，均分成 100 等分，每分格代表  $10\ \mu\text{m}$ ，台测微尺详见图 B.2。

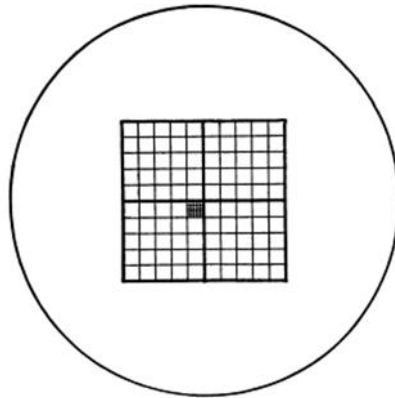


图 B.1 目镜测微尺 100div

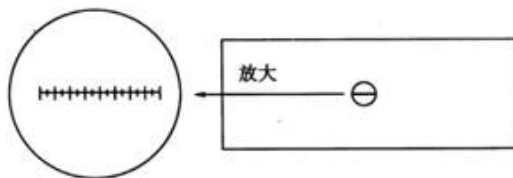


图 B.2 台测微尺 0.01mm/100Div

B.2 Whipple grid 标定步骤

B.2.1 将 whipple grid 刻度朝下装入目镜隔板上；

B.2.2 将台测微尺放在显微镜载物台上，刻度朝上。先低倍对焦，使视野中台测微尺刻度清晰；

B.2.3 转动目镜，使 whipple grid 与镜台测微尺刻度平行，移动载物台至两尺重叠，再使两尺的“0”刻度完全重合，定位后，仔细寻找两尺第二个完全重合的刻度，计数两重合刻度之间目镜测微尺的格数和镜台测微尺的格数。台测微尺每格长度  $10\ \mu\text{m}$ ，在一定放大倍数下，目镜测微尺的标定结果即每格的长度：

目镜测微尺每格长度=（台测微尺 n 格×台测微尺每格长度）/与台测微尺重合的目镜测微尺格数，将数据填入表 B.1。依据表 B.1 完成表 B.2。

表 B. 1 Whipple grid 目镜分划板标定结果

目镜 & 物镜组合	次数 n	大格/mm	均值	中格/ $\mu\text{m}$	均值
10X & 10X	1				
	2				
	3				
10X & 20X	1				
	2				
	3				
10X & 40X	1				
	2				
	3				
10X & 4X	1				
	2				
	3				

表 B. 2 Whipple grid 面积计算结果

目镜& 物镜组合	次数 n	Whipple grid 面积/ $\text{mm}^2$	均值
10X & 10X	1		
	2		
	3		
10X & 20X	1		
	2		
	3		
10X & 40X	1		
	2		
	3		
10X & 4X	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估算

##### C.1 丝状体细胞数估算

取多个藻丝体的多次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，通过分析 30 个丝状体的细胞数分布，若呈正态分布，丝状体总细胞数=平均值×丝状体数目；若呈偏态分布，丝状体总细胞数=中值×丝状体数目（Gertraud Hötzel and Roger Croome, 1990）。

##### 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，估算公式见式（1）。

$$\log_{10}y = 2.99\log_{10}x - 2.80 \dots\dots\dots (1)$$

式中：y——细胞数；

x——平均群体直径， $\mu\text{m}$ 。

使用该公式对微囊藻群体估算细胞数时需满足：似球形群体体积测量时，需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；最后计算时，平均群体直径为等同于群体平均体积的球形群体的直径，需随机测量至少 30 个群体，以获得合理的群体平均体积（Reynolds and Jaworski, 1978）。

似球形群体细胞数估算也可按照丝状体细胞数的确定方法，确定似球形群体的细胞数。或者，还可以确定要测定的每一个群体的细胞数，而不是估计一定大小平均细胞数。对于特别大的群体，可以通过目镜分划板计数群体的一小部分面积的细胞数，然后估计整个群体中相似面积的总细胞数。当然这是粗略计数而非精确计数，使用这种方法需要在工作记录表上说明（Gertraud Hötzel and Roger Croome, 1990）。