

HJ

中华人民共和国国家生态环境标准

HJ 1216—2021

水质 浮游植物的测定 0.1 ml 计数框- 显微镜计数法

Water quality — Determination of phytoplankton — 0.1 ml chamber
— 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	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
13 废物处置	7
附录 A（规范性附录） 随机视野方式方法检出限的计算.....	8
附录 B（资料性附录） 显微镜视野面积的测量和计算.....	9
附录 C（资料性附录） 浮游植物计数原始记录表.....	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 0.1 ml 计数框-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：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 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 0.1 ml 计数框-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 0.1 ml 计数框-显微镜计数法。

本标准适用于地表水中浮游植物的密度测定。

样品浓缩 50 倍时，对角线方式计数方法检出限为 9.2×10^3 cells/L；行格方式计数方法检出限为 3.0×10^3 cells/L；全片方式计数方法检出限为 9.2×10^2 cells/L；随机视野方式计数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

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，用于定量计数浮游植物。

3.3

检出限 detection limit

单次计数过程中，发现的概率不低于 99%时最低的浮游植物密度。

4 方法原理

在显微镜下，利用 0.1 ml 计数框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 丙三醇 ($\text{HOCH}_2\text{CHOHCH}_2\text{OH}$)。
- 5.5 鲁哥氏碘液:

称取 60 g 碘化钾 (5.2), 溶于 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。

6 仪器和设备

- 6.1 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
- 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 正置或倒置生物显微镜: 物镜 4×、10×、20×、40×, 目镜 10×或 15×。
- 6.6 浓缩装置: 1 L~2 L 筒形分液漏斗或量筒。
- 6.7 样品瓶: 50 ml 具塞棕色玻璃广口瓶。
- 6.8 超声波发生装置: 工作频率 40 kHz, 水浴方式。
- 6.9 微量移液器: 100 μl 。
- 6.10 0.1 ml 浮游植物计数框: 面积 20 mm×20 mm, 框内划分横竖各 10 行格, 共 100 个小方格。
- 6.11 盖玻片: 面积 22 mm×22 mm, 厚度小于 0.2 mm。
- 6.12 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。
- 6.13 目镜分划板: 又称目镜测微尺, 5 mm/50 DIV, 分划值为 0.1 mm。
- 6.14 计数器。
- 6.15 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

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。也可根据调查研究目的确定。

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 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, 待底部还剩少许水样 (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。样品采集后冷藏避光运输。

如有定性样品采集的技术规范，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 的相关规定进行定量样品的采集。

用采水器（6.3）采集样品至定量采样瓶（6.4）中，一般采集不少于 500 ml 样品。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。定量样品采集后，样品瓶不应装满，以便摇匀。

注 1：有些浮游植物（如蓝藻）常浮于水面或成片、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 样品的保存

7.2.1 定性样品

定性样品采集后立即加入鲁哥氏碘液（5.5），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固定。定性样品在室温避光条件下可保存 3 周；1℃~5℃冷藏避光条件下可保存 12 个月。活体样品在 4℃~10℃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（5.5）固定，用量为水样体积的 1.0%~1.5%。也可将鲁哥氏碘液（5.5）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℃~5℃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（5.5）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（5.5），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 混匀样品

每次取样前，采用上下颠倒至少 30 次的方式充分混匀所采样品，混匀动作要轻。

8.2 定性样品的分析

在显微镜（6.5）下观察定性样品（7.1.1），鉴定浮游植物的种类。优势种类鉴定到种，其他种类至少鉴定到属。部分物种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 定量样品的分析

8.3.1 试样制备

8.3.1.1 预检

将样品放至室温，用微量移液器（6.9）取 0.1 ml 混匀样品，注入 0.1 ml 浮游植物计数框（6.10）中，用盖玻片（6.11）将计数框（6.10）完全盖住，静置片刻，无气泡可观察样品，如有气泡应重新取样。随机选取若干计数小格或视野，初步估计浮游植物的数量。

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，应进行超声波分散处理：

- a) 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；
- b) 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。

8.3.1.2 调整浮游植物密度

适宜测定的浮游植物密度为 10^7 cells/L~ 10^8 cells/L。若定量样品（7.1.2）中的浮游植物细胞密度低于 10^7 cells/L，应浓缩样品；若定量样品（7.1.2）中的浮游植物细胞密度高于 10^8 cells/L，应稀释样品。最终使加入计数框中的 0.1 ml 样品约含有 500 个~10000 个浮游植物细胞。

样品浓缩：将全部定量样品摇匀倒入浓缩装置（6.6）中，避免阳光直射的环境下，静置 48 h。用细小虹吸管吸取上清液置于烧杯中，直至浮游植物沉淀物体积约 20 ml。旋开浓缩装置（6.6）底部活塞，将浮游植物沉淀物放入 100 ml 量筒中。用少许上清液冲洗浓缩装置（6.6）1~3 次，将冲洗水一并放入量筒中，再用上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，在静置初期，应适时轻敲浓缩装置器壁。虹吸过程中，吸液口与浮游植物沉淀物间距离应大于 3 cm。如水样中浮游植物密度极低，采样量 1 L 及以上时，可多次浓缩，即每次浓缩后再静置 24 h~48 h，重复浓缩操作，调整至所需浓缩倍数体积。浓缩后的样品可根据需要，经超声处理后计数。

样品稀释：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分散处理后的样品，用水定容至刻线。如要保存稀释后的样品，应注意补充鲁哥氏碘液（5.5），使稀释后的样品中的鲁哥氏碘液浓度与稀释前一致。

注：超声波分散处理具体步骤为取混匀的定量样品于样品瓶（6.7）中，用超声波发生装置（6.8）处理约 10 min 后，在显微镜（6.5）下观察，如仍存在大量未分散的细胞团，则应延长超声波处理时间，直至能够准确计数。超声波分散处理过程中应注意水温，防止过热造成水分蒸发和浮游植物细胞结构被破坏。

8.3.2 显微镜计数

8.3.2.1 装片

同 8.3.1.1 步骤进行装片。可根据需要，用滴管吸取少许丙三醇（5.4）均匀涂抹盖玻片四周，以防止计数框水分蒸发形成气泡。涂抹时应避免渗入计数框。

8.3.2.2 选取计数方式

根据调整后样品（8.3.1.2）中浮游植物的密度，选用一种适当的计数方式，使测定过程中浮游植物细胞的总计数量为 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
500~1500	全片计数
1500~5000	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，逐一观察浮游植物计数框中全部 100 个小方格，分类计数每个小方格内所有浮游植物细胞，并记录每行的分类计数结果。若浮游植物细胞体积较大时，可降低物镜倍数。

8.3.2.3.2 行格计数方式

在 40×物镜下，逐一观察浮游植物计数框中第 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，并记录每个小格的分类计数结果。若浮游植物细胞体积较大时，可降低物镜倍数。

8.3.2.3.3 对角线计数方式

在 40×物镜下，逐一观察位于浮游植物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，并记录每个小格的分类计数结果。若浮游植物细胞体积较大时，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，并记录每个视野的分类计数结果。若浮游植物细胞体积较大时，可降低物镜倍数。计数前应测量或计算显微镜视野面积，测量和计算方法参见附录 B。

8.3.2.3.5 计数要求

每一样品装片计数两次。两次浮游植物细胞总计数结果相对偏差应在±15%以内，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在±15%以内的两次计数结果的平均值。

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) 进行计算。

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

式中：N——样品中浮游植物的密度，cells/L；

A——计数框面积，mm²；

HJ 1216—2021

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计数面积为总视野面积， mm^2 ；

n ——显微镜观察计数的浮游植物细胞数，cells；

V ——计数框容积，ml；

V_1 ——稀释或浓缩后的试样体积，ml；

V_0 ——稀释或浓缩前的样品体积，ml；

1000——体积换算系数，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水平分别为 1×10^7 cells/L、 3×10^7 cells/L、 5×10^7 cells/L、 1×10^8 cells/L 的湖泊样品进行了 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	$8.6 \times 10^6 \sim 1.3 \times 10^7$
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	$9.6 \times 10^7 \sim 1.4 \times 10^8$

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，浮游植物细胞总计数量不少于 500 个。如果测定精度难以达到要求，可适当增加每次测定中浮游植物细胞的计数总量。

12 注意事项

12.1 如果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，则按照在行格上

边界及左边界或视野上半圈的细胞不计数，在行格下边界及右边界或视野下半圈的细胞计数。破损细胞或细胞残体不计数。

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。

13 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)
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。当浓缩 f 倍时，按照公式 (A.1) 计算方法检出限。

$$\text{MDL} = -\frac{A}{n_e \times V \times s \times f} \times \ln 0.01 \times 10^8 \quad (\text{A.1})$$

式中：MDL——方法检出限，cells/L；
 A ——计数框面积， cm^2 ；
 n_e ——观察的随机视野数，个；
 V ——计数框容积，L；
 s ——显微镜 1 个视野的面积， $\mu\text{m}^2/\text{个}$ ；
 f ——浓缩倍数；
0.01——显著性水平；
 10^8 ——面积换算系数， $\mu\text{m}^2/\text{cm}^2$ 。

附录 B
(资料性附录)
显微镜视野面积的测量和计算

B.1 显微镜视野面积的测量

B.1.1 原理

用载物台测微计标定目镜分划板，再用目镜分划板测量视野直径，计算视野的面积。

B.1.2 测量工具

B.1.2.1 载物台测微计

载物台测微计(6.12)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 个小格，每个小格长度等于 10 μm 。

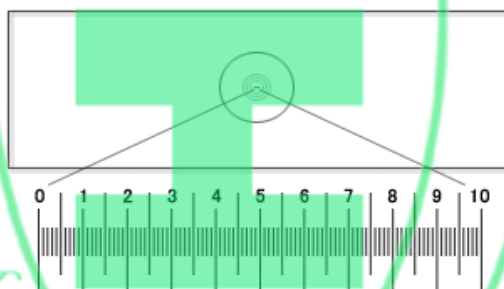


图 B.1 载物台测微计示意图

B.1.2.2 目镜分划板

目镜分划板(6.13)是一块有刻度的圆形玻璃片，通常刻度是将 5 mm 分划为 50 格。使用前应用载物台测微计进行标定。

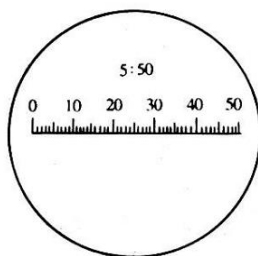


图 B.2 目镜分划板示意图

B.1.3 显微镜视野面积测量步骤

B.1.3.1 装入目镜分划板（6.13）。旋下目镜上的目透镜，将目镜分划板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.1.3.2 装入载物台测微计（6.12）。将载物台测微计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.1.3.3 载物台测微计标定目镜分划板。先用低倍镜观察，对准焦距，待看清载物台测微计标尺的刻度后，转动目镜，使目镜分划板的标尺与载物台测微计的标尺相平行，并使它们的左边第一条刻度线相重合，再向右寻找两尺的另一条重合刻度线。载物台测微计标定目镜分划板见图 B.3。

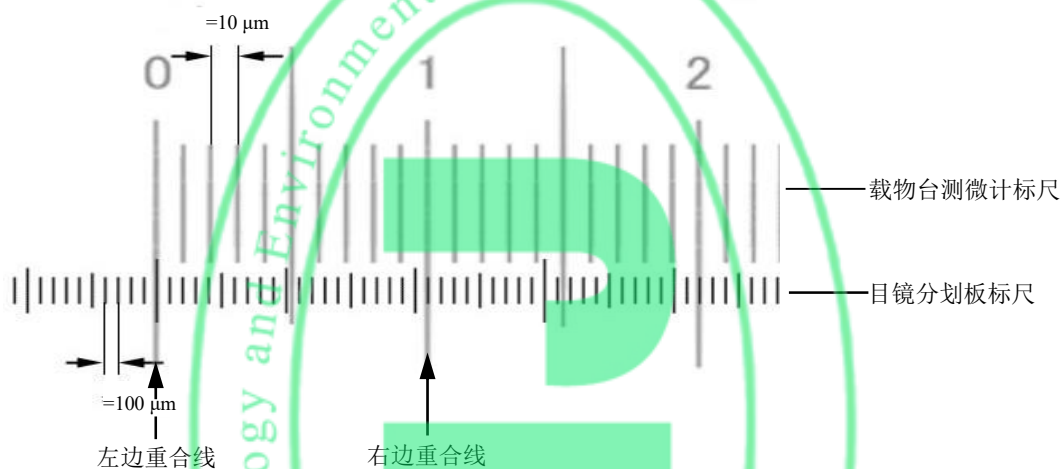


图 B.3 载物台测微计标定目镜分划板示意图

B.1.3.4 记录两条重合刻度线间的目镜分划板标尺的格数 N_w 和载物台测微计标尺的格数 N_s 。按照公式 B.1 计算目镜分划板标尺 1 格所代表的实际长度 L_e 。

$$L_e = \frac{N_s}{N_w} \times 10 \quad (\text{B.1})$$

式中： L_e ——目镜分划板标尺 1 格所代表的实际长度， μm ；
 N_s ——两条重合刻度线之间载物台测微计标尺的格数，个；
 N_w ——两条重合刻度线之间目镜分划板标尺的格数，个；
 10——载物台测微计标尺上单格的长度， μm 。

B.1.3.5 测量显微镜视野面积。用标定后的目镜分划板，测量视野的直径 d ，再用圆面积公式计算视野面积 s 。

$$s = \pi \times \frac{d^2}{4} \quad (\text{B.2})$$

式中： s ——显微镜 1 个视野的面积， μm^2 ；
 π ——圆周率；
 d ——显微镜视野直径， μm ；
 4——直径和半径换算系数 2 的平方。

B.2 显微镜视野面积的计算

B.2.1 原理

通过显微镜的目镜所观察到的圆形区域称为视野。按照公式（B.3）计算视野直径，再利用圆面积公式计算视野面积，单位为 mm²。

$$d = \frac{FN}{M'_0} \quad (\text{B.3})$$

式中： d ——显微镜视野直径，mm；

FN ——目镜视场数，mm；

M'_0 ——标准物镜放大率。

B.2.2 目镜视场数

目镜视场数等于目镜的直径，单位为 mm。标准化设计和生产的显微镜，在其目镜上通常会有视场数的标识。常见的显微镜目镜视场数有：18、20、22、25、26.5 等。

B.2.3 物镜的放大率

指物镜的放大倍数。生物显微镜常用的物镜放大率有 4×、10×、20×、40× 和 100×。浮游生物计数常用的物镜放大率为 20× 和 40×。

附 录 C
 (资料性附录)
 浮游植物计数原始记录表

浮游植物的原始记录表参见表 C.1。

表C.1 浮游植物计数原始记录表

采样日期:				样品编号:							
方法依据:				设备名称及编号:							
浓缩倍数:				稀释倍数:							
取样量 (ml):				计数方式: <input type="checkbox"/> 全片计 <input type="checkbox"/> 行格 <input type="checkbox"/> 对角线 <input type="checkbox"/> 随机视野							
浮游植物 名称	第一片计数量 (cells)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	合计
.....											
总计											
浮游植物 名称	第二片计数量 (cells)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	合计
.....											
总计											
两片计数相对偏差 (%):				计数总数平均值 (cells):							
样品浓度 (cells/L):											
注 1: 本表格为计数中使用的原始记录表格;											
注 2: 计数量序号“1~10”,可根据计数方式按小格、行和视野填入计数结果。											

分析日期:

分析人:

校核人:

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.

