

ICS 13.020
CCS Z 01

DB32

江 苏 省 地 方 标 准

DB 32/T 4005-2020

淡水浮游藻类监测技术规范

Technical specification for monitoring planktonic algae in fresh water

2021-03-04 发布

2021-04-04 实施

江苏省市场监督管理局 发布

目 次

前言.....	II
1 范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 术语和定义.....	1
4 监测原则.....	2
5 试剂和材料.....	2
6 仪器和设备.....	2
7 监测步骤.....	3
8 质量保证和质量控制.....	6
附录 A（资料性）显微镜标尺校准方法.....	8
附录 B（资料性）硅藻样品前处理方法.....	9
附录 C（资料性）定量样品前处理方法.....	10
附录 D（资料性）定量样品种类鉴定和计数.....	11

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由江苏省生态环境厅提出并归口。

本文件起草单位：江苏省苏州环境监测中心、江苏省环境监测中心、江苏省常州环境监测中心。

本文件主要起草人：李继影、徐恒省、张咏、徐东炯、吕学研、牛志春、陈桥、蔡琨、沈伟、陈瑜、沈丽娟、景明、张翔。

淡水浮游藻类监测技术规范

1 范围

本文件规定了淡水浮游藻类的监测原则、试剂和材料、仪器和设备、监测步骤、质量保证和质量控制要求。

本文件适用于湖泊、水库、河流等水体类型中淡水浮游藻类（粒径 $>3\mu\text{m}$ ）的监测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

HJ/T 91 地表水和污水监测技术规范

SL 733 内陆水域浮游植物监测技术规程

DB32/T 3202 湖泊水生态监测规范

3 术语和定义

GB/T 20000.1界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

浮游藻类 planktonic algae

水中营浮游生活方式的藻类植物，易于在风和水流的作用下作被动运动，不包括细菌（蓝藻除外）和其他植物，淡水中常见浮游藻类主要包括蓝藻（*Cyanophyta*）、绿藻（*Chlorophyta*）、硅藻（*Bacillariophyta*）、裸藻（*Euglenophyta*）、甲藻（*Pyrrophyta*）、金藻（*Chrysophyta*）、黄藻（*Xanthophyta*）和隐藻（*Cryptophyta*）等门类。

3.2

浮游藻类优势种 dominant species of planktonic algae

浮游藻类群落中在数量或生物量方面占有优势地位的种类，对群落结构和群落环境的形成有明显控制作用的种类。

3.3

浮游藻类密度 planktonic algae density

单位体积中某种类或全部浮游藻类的数量。本文件规定浮游藻类密度以细胞数表示，单位为cells/L。

3.4

浮游藻类生物量 planktonic algae biomass

单位体积中某种类或全部浮游藻类的质量。本文件规定浮游藻类生物量以湿重表示，单位为mg/L。

3.5

藻类水华 algal bloom

淡水水体中藻类大量繁殖的一种自然生态现象，表现特征为悬浮在水中或水色明显变化。

4 监测原则

4.1 科学性原则

监测断面（点位）及监测结果应具有代表性，能够全面反映监测区域淡水浮游藻类的整体状况。

4.2 可操作性原则

淡水浮游藻类监测需要综合考虑人力、资金和后勤保障等条件，充分利用现有资源，立足于环境监测业务化及环境管理需求。

4.3 持续性原则

考虑到生物群落演替长期性、复杂性等特点，建议监测断面（点位）、方法、时间和频次等一经确定，应保持持续性，对水生态环境状况持续跟踪。

4.4 保护性原则

监测以保护和恢复为最终目标，因此在监测过程中应避免对野生生物造成伤害，避免超出客观需要的采样。

4.5 安全性原则

野外监测相关人员应接受专业培训，并做好安全防护措施。

5 试剂和材料

5.1 本文件所用试剂均应为符合国家标准的分析纯试剂、蒸馏水或同等纯度的水。

5.2 鲁哥氏液：称取 60 g 碘化钾溶于 100 mL 蒸馏水中，待完全溶解后，加入 40 g 碘，摇动至碘完全溶解，加蒸馏水定容到 1000 mL，制成鲁哥氏液，然后贮存于磨口棕色试剂瓶中。

5.3 甲醛溶液： φ (HCHO) =37%~40%。

5.4 盐酸溶液： φ (HCL) =37%。

5.5 硝酸溶液： ρ (HNO₃) =1.42 g/mL。

5.6 过氧化氢溶液： φ (H₂O₂) =30%。

5.7 乙醇溶液： φ (C₂H₆O) =75%。

6 仪器和设备

6.1 野外采样

- 6.1.1 采水器：2 L。
- 6.1.2 水桶：5 L 或 10 L。
- 6.1.3 25 号浮游生物网：200 目，筛绢孔径为 0.064 mm。
- 6.1.4 具刻度无色透明采样瓶：1 L、2 L、5 L 等。
- 6.1.5 具刻度塑料螺口样品瓶：100 mL。
- 6.1.6 塞氏盘：ø20 cm，配重锤及带刻度的绳索。

6.2 样品前处理

- 6.2.1 虹吸管：ø2 mm~3 mm。
- 6.2.2 尖头玻璃管：与虹吸管配套，尖头部位使用孔径 0.064 mm 的筛绢包裹封盖。
- 6.2.3 洗耳球。
- 6.2.4 玻璃试管：15 mL。
- 6.2.5 离心管：15 mL，玻璃或塑料。
- 6.2.6 水浴锅。
- 6.2.7 离心机：相对离心力可达到 $1000 \times g$ （转速 3000 rpm~4000 rpm）以上。
- 6.2.8 漩涡混匀器。
- 6.2.9 超声波清洗仪。

6.3 实验室显微镜观测

- 6.3.1 显微镜：配备 10 倍、20 倍、40 倍或 60 倍物镜、100 倍物镜，10 倍或 15 倍目镜。
- 6.3.2 目测微尺和台测微尺。
- 6.3.3 浮游生物计数框：0.1 mL，内框 20 mm×20 mm，横竖划分为 10×10 行，共 100 个计数小格，每个计数小格内框为 2 mm×2 mm。
- 6.3.4 移液器：最大量程为 100 μL ~200 μL ，也可用刻度滴管代替。
- 6.3.5 载玻片：25.4 mm×76.2 mm，厚 0.8 mm。
- 6.3.6 盖玻片：22 mm×22 mm，厚 0.17 mm。
- 6.3.7 镊子。
- 6.3.8 计数器。

6.4 其他辅助设备

- 6.4.1 防护设备：救生衣、水裤、防水服、防晒服、防寒服、高筒胶鞋、橡胶手套、急救包等。
- 6.4.2 现场记录设备：GPS、照相机、中性笔、记号笔、铅笔、标签、采样记录表等。
- 6.4.3 一般实验室和现场常用仪器和设备。

7 监测步骤

7.1 野外采样程序

7.1.1 采样点位的确定

7.1.1.1 根据水体的自然生态类型、人类干扰的空间特性和点位周边生态环境等确定采样点位。

7.1.1.2 监测断面的布设和采样点位的确定应符合 HJ/T 91 的规定。

7.1.2 监测时间的设定

常规监测一般按季节或水期开展，在条件允许的情况下，建议每月监测一次。专项性监测频次视具体情况确定。发生藻类水华时段可适当加密监测频次。监测时间的确定需考虑下列事项：

- a) 若进行逐季或逐月监测，各季或各月监测的时间间隔应基本相同；
- b) 同一湖泊（水库）的监测应力求水质、水文及生物采样时间上同步；
- c) 考虑到浮游藻类的日变化，监测时间尽量选择在一天的同一时段。

7.1.3 采样断面（点位）环境观测

采集样本前，应先对现场环境情况进行观察、记录和拍照；尽可能全面检测和记录水深、透明度、pH值、水温、溶解氧等常规理化指标及水文信息；也可以同步采集水样进行水化学指标的实验室分析。

7.1.4 样品的采集

7.1.4.1 定量样品采集

采集浮游藻类样品时，需根据采样点位的水深设置采样层次。水深<5 m或混合均匀的水体，不分层，在水面下0.5 m处采集；水深为5 m~10 m时，分别在水面下0.5 m处和透光层（深度以3倍透明度计）底部采集；水深>10 m时，分别在水面下0.5 m处、1/2透光层和透光层底部采集。分层采样按照由浅到深的顺序，使用采水器采集1 L~5 L水样。将各层次采集的样品倒入事先准备的清洁水桶，充分混匀后，取1 L~5 L水样装入样品瓶。

7.1.4.2 定性样品采集

7.1.4.2.1 浮游藻类定性样品的采集应在定量样品采集结束后进行。

7.1.4.2.2 用25号浮游生物网在选定采样点的水面下0.5 m处作“∞”形循环缓慢拖动，拖动时间1 min~3 min。水样采集完毕后，将网从水中提出，待水滤去，轻轻打开浮游生物网底管的活栓，使水样流入样品瓶中。

7.1.5 样品的固定

7.1.5.1 定量和定性样品现场加入水样终体积1%~1.5%的鲁哥氏液进行固定。

7.1.5.2 藻类水华样品可根据情况酌情增加固定剂用量。

7.1.6 样品的保存

7.1.6.1 采集的样品应尽快固定，未固定的样品即活体定性样品，在4℃~10℃条件下避光保存，保持样品瓶中的样品上方留有一半以上的空间，并应在3 h内镜检。

7.1.6.2 鲁哥氏液固定的样品在1℃~5℃条件下避光保存不得超过12个月，常温保存不得超过3个月。长期保存时，加入甲醛溶液，用量为水样终体积的2%。保存时，每隔2~3周检查固定剂（定量样品可以观察鲁哥氏液颜色是否变淡），必要时进行添加，直至完成种类鉴定。

7.1.7 样品标识和记录

在样品瓶外侧标注样品编号、采样日期、水体名称、采样点位、采样人姓名以及样品类型。现场记录表格可参照SL 733的附录A。

7.2 实验室分析程序

7.2.1 显微镜的标尺校准

校准方法参见附录A。

7.2.2 定性分析

7.2.2.1 前处理

7.2.2.1.1 定性样品一般不做沉淀、浓缩，如溶液过多，可适当弃去部分上清液，再进行种类鉴定。

7.2.2.1.2 如果样品中硅藻过多，显微镜下难以鉴别硅藻种类，需要对硅藻内含物进行去除，前处理方法参见附录B。

7.2.2.2 种类鉴定

用移液器或刻度滴管吸取60 μL 左右样品瓶底部的定性样品滴到载玻片上，用镊子盖上盖玻片，制成标本片，在显微镜下，尽量鉴定到种，形态学可以区分的分开列出，常见种给出种名。每个样品应观察不少于2~3个标本片。建议有条件的实验室对于一些不能确认的优势种或常见种，开展分子生物学鉴定。

7.2.2.3 记录

在浮游藻类分析记录表填写样品相关信息。实验室分析表格可参照SL 733的附录B。重要的或优势种类应拍照记录。

7.2.3 定量分析

7.2.3.1 前处理

一般前处理方法参见附录C。当发生藻类水华时，可考虑原样或者原样稀释后计数。在藻类应急监测或要求快速报送数据的情况下，可采用原样固定离心后计数（准确量取100 mL~200 mL混匀后的水样于离心管中，以相对离心力 $1000 \times g$ （转速3000 rpm~4000 rpm）离心10 min~15 min，吸去部分上清液，定容至5 mL~10 mL，漩涡混匀洗下粘附在管壁上的藻类细胞，超声分散处理10 min~15 min，此悬浊液用于下一步镜检）。

7.2.3.2 种类鉴定和计数

将样品充分摇匀（手工或漩涡混匀器混匀），用移液器吸取0.1 mL样品到计数框中。移入之前用镊子将盖玻片斜盖在计数框上，在计数框的一边进样，另一边保持出气，避免气泡产生。注满后把盖玻片移正。种类鉴定要求同7.2.2.2，按种计数。藻类数量较多时可使用计数器，有条件的实验室可结合软件分析技术对藻类的种类进行识别和计数。计数方法参见附录D。

7.2.3.3 藻类密度计算

浮游藻类的细胞数量按公式（1）计算。

$$N = \frac{A}{A_c} \cdot \frac{V_s}{V_a} \cdot n \dots \dots \dots (1)$$

式中：

N ——每升水中浮游藻类的细胞数量，单位为每升细胞数量（cells/L）；

A ——计数框面积，单位为平方毫米（mm²）；

A_c ——计数面积（即视野面积×视野数或计数格的面积×计数格数），单位为平方毫米（mm²）；

V_s ——1 L水样浓缩后的样品体积，单位为毫升（mL）；

V_a ——计数框体积，单位为毫升（mL）；

n ——计数所得的浮游藻类的细胞数量。

可按本文件中所列常用计数框规格简化为公式（2）。

$$N = \frac{V_s}{A_c} \cdot 4000n \dots \dots \dots (2)$$

式中：

N ——每升水中浮游藻类的细胞数量，单位为每升细胞数量（cells/L）；

V_s ——1 L水样浓缩后的样品体积，单位为毫升（mL）；

A_c ——计数面积（即视野面积×视野数或计数格的面积×计数格数），单位为平方毫米（mm²）；

n ——计数所得的浮游藻类的细胞数量。

7.2.3.4 生物量分析

浮游藻类生物量分析采用体积测量法。生物量的测算可参考SL 733的附录D和DB32/T 3202的附录C。对样品中发现的藻类种类随机测量20个，计算其平均体积，对于数量较少无法达到测量20个的种类可查资料补充。对于长期监测的水体，浮游藻类体积的测定参数，可以每年根据藻类大小变化进行更新。根据“10⁹ μm³≈1 mg鲜藻重”的换算关系把浮游藻类细胞体积换算为生物量。

7.2.3.5 记录

在浮游藻类分析记录表填写样品相关信息。实验室分析表格可参照SL 733的附录B、附录C和附录E。

8 质量保证和质量控制

8.1 野外质量控制程序

8.1.1 样品的采集

8.1.1.1 制定合理的采样操作程序，确定采样时间、采样点位和采样层次，用符合质量要求的统一设备采样，采水量尽量保持一致，以保证采集的样品具有代表性和可比性。

8.1.1.2 保证所有野外设备处于良好的运行状态，须制定常规检查、维护和校准计划，以确保野外监测数据的质量。

8.1.1.3 合理安排各类样品采集顺序，尽量避免生物类群在采集前受到较大扰动。

8.1.1.4 及时在现场固定样品，正确填写样品标签。

8.1.1.5 及时清洗所有接触过样品的采样设备，并仔细检查，防止污染。

8.1.2 样品的运输

8.1.2.1 必须根据采样记录或登记表核对清点样品，以免有误或丢失。

8.1.2.2 运输中应仔细保管样品，以确保样品无破损、无污染。避免强光照射及强烈震动。

8.1.3 采样记录

规范采样记录，确保样品信息的完整性。

8.2 实验室质量控制程序

8.2.1 样品的交接与记录

8.2.1.1 样品交接时，应办理正式交接手续，由接收样品的工作人员记录其样品状态。

8.2.1.2 实验室应建立送检样品的唯一识别系统，确保任何时候的样品不会混淆。

8.2.2 种类鉴定和计数

8.2.2.1 移液器和计数框应经检定或校准合格后方可投入使用。

8.2.2.2 新种、新记录种必须保留典型、完好的样品，永久保存。

8.2.2.3 实验室应当保存并更新相关的分类学文献。

8.2.2.4 实验室间可联合建立藻类分类专家库。

8.2.2.5 样品鉴定完毕后，随机抽取 10% 样品，由不同实验室分析或藻类分类专家检查，以确保分类结果的可比性和准确性。

8.2.2.6 样品需计数 2 个标本片，如 2 次计数差异百分比超过 15% 时，计数结果取第 3 片与前两片相近数值的平均值。

计数差异百分比按公式 (3) 计算。

$$PDE = \frac{|n_1 - n_2|}{n_1 + n_2} \dots\dots\dots (3)$$

式中：

PDE——计数差异百分比，单位为百分比 (%)；

*n*₁ ——第 1 片计数的细胞数量，单位为每升细胞数量 (cells/L)；

*n*₂ ——第 2 片计数的细胞数量，单位为每升细胞数量 (cells/L)。

8.2.2.7 2 名人员分类差异百分比应不大于 50%，否则应重新分类计数。

分类差异百分比按公式 (4) 计算。

$$PctDiff = \{1 - \sum \min(a, b)\} \times 100\% \dots\dots\dots (4)$$

式中：

PctDiff——分类差异百分比，单位为百分比 (%)；

a ——第 1 名人员发现的第 1 种、第 2 种、第 3 种……第 *n* 种藻类数量占总数量的百分比，单位为百分比 (%)；

b ——第 2 名人员发现的第 1 种、第 2 种、第 3 种……第 *n* 种藻类数量占总数量的百分比，单位为百分比 (%)。

8.2.3 数据记录

记录实验室分析过程中所取得的相应数据，分析测试项目还应记录分析条件、分析方法，并描述如何从原始数据到最终结果的过程、数据转换步骤等。数据记录表应有分析人、复核人、审核人签字。

8.2.4 剩余样品的处置

实验室分析剩余的生物样品至少保留 3 个月，有条件的实验室可长期保存。

8.2.5 资料保存

基础分类学参考文献文库是藻类鉴定必不可少的辅助工具，实验室应按需求购买、收集和保存。

附 录 A
(资料性)
显微镜标尺校准方法

- A.1 将目测微尺放入 10 倍或 15 倍目镜内（一般刻度面应朝下），将台测微尺当作标本片，用 10 倍或 20 倍物镜进行观察，使台测微尺刻度清晰成像。
- A.2 台测微尺的刻度一般每小格 10 μm 。转动目镜并移动载物台，使目测微尺与台测微尺平行，目测微尺的边沿刻度与台测微尺的 0 点刻度重合，然后数出目测微尺 10 格相当于台测微尺多少格，用这个格数去乘 10 μm ，其积表示目测微尺 10 格代表台测微尺上的长度，也可以换算为目测微尺每格代表实际标本的长度。
- A.3 用台测微尺测出视野的直径，按 πr^2 计算视野面积。
- A.4 用作测量和计数物镜镜头（10 倍、20 倍、40 倍、60 倍、100 倍）的每一种搭配，也都应作同样的校准和记录。
- A.5 一般研究级显微镜均有自动校准标尺功能。

附 录 B
(资料性)
硅藻样品前处理方法

B.1 盐酸-硝酸法

摇匀浓缩后的水样，吸取1 mL~2 mL放入玻璃试管中，加入与样品等量的盐酸溶液，静置24 h；沸水浴加热3 h~4 h后静置24 h，弃去上清液，保留沉淀；加入2倍体积的硝酸溶液沸水浴加热5 h~6 h，直至产生白色絮状沉淀为止；静置24 h，弃去上清液，保留沉淀。

B.2 双氧水法

吸取1 mL~2 mL水样放入离心管中，加入2 mL过氧化氢溶液和8 mL硝酸溶液，放置于超声波清洗仪中处理10 min~20 min，如标本不变白或不完全透明，可以适当延长处理时间。

将上述方法处理后的硅藻样品高速离心后去除上清液，用蒸馏水多次清洗至中性后，使用75%乙醇溶液保存。

附 录 C
(资料性)
定量样品前处理方法

- C.1 在无色透明采样瓶中直接进行样品的沉淀、浓缩，静置沉淀时间至少需要 48 h。
- C.2 使用与虹吸管连接的尖头玻璃管以虹吸方式缓慢吸去上层的清液，不能搅动或吸出浮在表面和沉淀的藻类。
- C.3 最后剩余约 50 mL~70 mL 时，将沉淀物转移至容积为 100 mL 的样品瓶中，用吸出的上清液冲洗采样瓶 2~3 次，将冲洗液合并到样品瓶中。
- C.4 在计数时，一般定容到 50 mL，如果首次虹吸后水样体积较大，需要沉淀 24 h 后再次虹吸；浓缩后的样品较为浑浊时，可稀释后再计数，稀释后的样品需要再补充固定剂保存；针对水华水样（藻类细胞数多）较多的种类，可取一定量的水样用蒸馏水稀释后单独计数，其他藻种用原浓缩后样品计数。

附 录 D
(资料性)
定量样品种类鉴定和计数

D.1 计数规则

计数一般从计数框的右下角开始,对于超出计数小格外的丝状、群体种类,可规定计数小格外左对角边缘区域不予计数,右对角边缘区域的藻类予以计数,计数规则见图D.1。

可根据监测的目的计数最大数量或最大生物量的藻类。

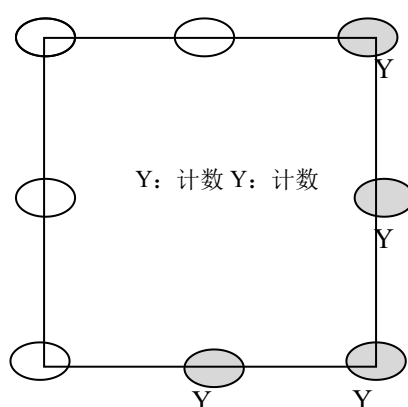


图 D.1 丝状、群体种类计数规则

D.2 计数面积

为减少工作量,每次抽样,一般不对整个计数框内的浮游藻类全部计数,只需选取其中一部分计数。选取过程是一个次级抽样过程,要考虑到抽样量的大小和代表性,正式计数前可以在显微镜下先大致判断藻类大小及在计数框内的分布情况,以选择适宜的计数面积,计数面积可参考表D.1。

表 D.1 每 0.1 mL 样品计数参考面积

形态	描述	尺寸	举例	计数面积
球状/短丝状/ 不规则状	极小的	粒径 $<5\ \mu\text{m}$	微囊藻个体、伪鱼腥藻、色球藻、平裂藻、蓝隐藻、曲壳藻等。	5 或 10 个计数小格.....
	中等的	粒径 $5\sim 10\ \mu\text{m}$	小环藻、小球藻、衣藻、栅藻等。	5 或 10 个 1/8、1/4、1/2 计数小格.....
	较大的	粒径 $10\sim 20\ \mu\text{m}$	舟形藻、圆筛藻、隐藻、鼓藻等。	5 或 10 个 1/4、1/2 计数小格.....
	大的	粒径 $>20\ \mu\text{m}$	微囊藻群体、新月藻、盘星藻、角甲藻等。	100 个计数小格。
长丝状	较大的及大的	长度 $>50\ \mu\text{m}$	长孢藻、浮丝藻、柱孢藻、长孢藻等。	根据大小计 10~100 个计数小格。

D.3 计数方法

D.3.1 常规计数方法

D.3.1.1 行格法

按照计数框上的第二、五、八行共30个计数小格进行藻类分类计数，计数方法见图D.2。

一									
二									
三									
四									
五									
六									
七									
八									
九									
十									

图 D.2 行格法

D.3.1.2 对角线法

按照计数框对角线上的计数小格进行进行藻类分类计数，每0.1 mL样品计数5或10格，直至达到30个小格，计数方法见图D.3。

一	1									
二		2								
三			3							
四				4						
五					5					
六						6				
七							7			
八								8		
九									9	
十										10

图 D.3 对角线法

D.3.1.3 视野法

计数的视野数目应根据样品中浮游藻类数量的多少来确定。每次抽样一般计数100~300个视野，可以先计数100个视野。如计数数值太少，再增加100个，以此类推。计数视野在计数框内尽量均匀分布。

D.3.1.4 简化对角线法

对于个体较小或数量较多的优势种类可采用简化对角线法。每个计数视野可规定在对角线计数小格的右下角；对角线计数小格可以选择1个视野面积或1/8、1/4、1/2的面积计数，计数方法见图D.4。

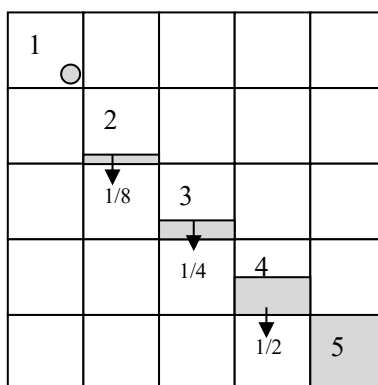


图 D.4 简化对角线法

D.3.2 硅藻计数方法

在常规计数时，先计硅藻的总数。取酸化处理后的样品制成定性标本片镜检，分别计算某个种类的硅藻占硅藻总量的百分比（计数100个左右的硅藻），最后换算为某个种类的硅藻在单位体积中的数量。

D.4 注意事项

D.4.1 常规计数方法的浮游藻类计数总量应在500个以上，优势种类计数量在50个以上，藻类细胞残体不予计数，未完成细胞分裂的按一个细胞计。

D.4.2 一个标本片应尽量快速鉴定完成，一般在40 min左右标本片会形成气泡，影响观察，需要再次取样分析。