

附件 2

《水质 浮游植物的测定 显微镜计数法（征求意见稿）》
编制说明

《水质 浮游植物的测定 显微镜计数法》

标准编制组

二〇二一年三月

项目名称：水质 浮游植物的测定 显微镜计数法

项目统一编号：2014-25

项目承担单位：云南省生态环境监测中心

编制组主要成员：张榆霞、铁程、金玉、李爱军、施择、赵琦琳、
李颖

环境标准研究所技术管理负责人：曹宇、余若祯

生态环境监测司项目负责人：楚宝临

目 录

1	项目背景.....	1
1.1	任务来源.....	1
1.2	工作过程.....	1
2	标准制订的必要性分析.....	3
2.1	浮游植物的环境危害.....	3
2.2	相关环保标准和环保工作的需要.....	3
3	国内外相关分析方法研究.....	4
3.1	主要国家、地区及国际组织相关分析方法研究.....	4
3.2	国内相关分析方法研究.....	10
3.3	本方法与国内外相关分析方法的关系.....	11
4	标准制订的基本原则和技术路线.....	14
4.1	标准制订的基本原则.....	14
4.2	标准制订的技术路线.....	14
5	方法研究报告.....	16
5.1	方法研究的目标.....	16
5.2	方法原理.....	16
5.3	试剂和材料.....	16
5.4	仪器和设备.....	16
5.5	样品.....	17
5.6	分析步骤.....	18
5.7	方法主要参数的研究和确定.....	22
5.8	结果计算与表示.....	31
5.9	精密度.....	31
5.10	质量保证和质量控制.....	33
5.11	注意事项.....	34
6	方法验证.....	34
6.1	方法验证方案.....	34
6.2	方法验证过程.....	36
7	方法比对.....	36
7.1	比对依据.....	36
7.2	比对内容和方法.....	37
7.3	比对过程.....	37
7.4	比对结果.....	37
7.5	比对结论.....	38
8	与开题报告的差异说明.....	38
9	参考文献.....	39
	附件 方法验证报告.....	41

《水质 浮游植物的测定 显微镜计数法（征求意见稿）》

编制说明

1 项目背景

1.1 任务来源

2014年4月，原环境保护部发布了《关于开展2014年度国家环境保护标准项目实施工作的通知》（环办函〔2014〕411号），根据通知要求，云南省生态环境监测中心承担了《水质 浮游藻类藻密度的测定 对角线法》（项目统一编号为2014-25）国家环保标准的制订工作。

1.2 工作过程

1.2.1 成立标准编制组和编写开题报告

2014年6月，签署环境保护标准项目任务合同书后，云南省生态环境监测中心成立了标准编制组。根据原环境保护部对国家环境保护标准制修订项目的相关要求，编制组在前期完成国家科技重大专项《滇池流域水环境综合管理支撑技术与平台建设》（2010ZX07102-006）的课题中“滇池浮游藻类监测技术规范研究”的基础上，收集与所制定方法相关的规范及涉及藻密度测定方法的标准和文献，并进行整理、分析和论证，设计实验方案，确定方法技术路线，编制了开题报告和标准草案。

1.2.2 召开开题论证会

2015年1月22日，由原环境保护部科技标准司组织专家进行了开题论证。论证委员会通过该标准的开题论证，同时提出修改意见和建议：（1）将标准名称改为《水质 浮游藻类藻密度的测定 显微镜计数法》，明确适用范围为“地表水”；（2）补充国外相关标准查询的内容，完善方法技术路线和方法验证方案，进一步明确方法的性能指标；（3）进一步研究样品的采集、保存和预处理方法；（4）根据藻密度选择不同的计数方法，结果表示应包括藻细胞数量和藻个体数量；（5）完善质量保证和质量控制措施。

1.2.3 开展实验室内研究工作

2015年2月至12月，编制组按照专家论证意见，将方法名称改为《水质 浮游藻类藻密度的测定 显微镜计数法》；并在查询和收集国内外相关标准和文献资料的基础上，进一步调研省内外环境监测站关于藻类密度计数方法、整理已有实验成果，修改和完善了标准方法的实验方案，组织云南省昆明市站、大理州站、玉溪市站，开展了三种计数方法（对角线计数法、行格计数法、全片计数法）适用范围、藻类计数浓度对计数结果、水样保存方法和期限、超声波处理效果、质量保证和质量控制措施的方法研究，形成了《水质 浮游藻类藻密度的测定 显微镜计数法》草案和编制说明、以及方法验证方案。

1.2.4 组织专家论证方法验证方案

2016年1月26日，由原环境保护部标准研究所组织召开了《水质 浮游藻类藻密度的测定 显微镜计数法（2014-25）》专家研讨会。论证委员会在听取标准草案和标准编制说明内容介绍后，提出修改意见和建议：（1）将标准名称改为《水质 浮游植物的测定 显微镜计数法》；（2）降低每次藻细胞最少计数量，并对精密度进行测定；（3）计数方法中，增加随机视野法；进一步加强研究，确定样品超声处理和匀质化的参数；（4）建议加强与相关标准方法编制单位的沟通，进一步规范标准文本（方法检出限、精密度、质量控制方法等）；（5）建议完成以上研究后，开展方法验证。

1.2.5 组织6家实验室进行方法验证

2016年1月至6月，编制组按照专家论证意见，将方法名称改为《水质 浮游植物的测定 显微镜计数法》，计数方式中增加随机视野法；在进一步查询和收集国内外相关标准和文献资料的基础上，完成了“降低每次藻细胞最少计数量后精密度测定”、“超声处理和匀质化试验”等研究，从方法检出限、精密度、质量控制方法等方面进一步规范标准文本。形成了《水质 浮游植物的测定 显微镜计数法》草案和编制说明、以及方法验证方案。

2016年7月至2017年5月，组织6家有资质的实验室进行了方法验证工作，6家实验室都具备了测定浮游藻类的显微镜和相应的前处理设备、以及从事生物监测工作多年的检测人员，统一派发了4个不同含量水平的实际样品；并编写了《水质 浮游植物的测定 显微镜计数法》验证报告。

1.2.6 组织专家论证标准征求意见稿和编制说明

2017年6月，编写了《水质 浮游植物的测定 显微镜计数法》的标准文本征求意见稿及编制说明。

2019年3月，由生态环境部环境标准研究所组织召开了《水质 浮游植物的测定 显微镜计数法》征求意见稿专家研讨会。论证委员会在听取标准征求意见稿和标准编制说明内容介绍后，提出修改意见和建议：（1）用泊松统计模型，使用0.1 ml计数框、最大浓缩倍数（50）条件下计算方法检出限；附录A中，完善检出限计算公式；（2）与《水质 浮游植物的测定 滤膜法》的编制单位统一精密度（再现性限、重复性限）的表示方法；（3）与《水质 浮游植物的测定 滤膜法》的编制单位统一方法适用范围、规范性引用文件、术语和定义、试剂、样品的采集和保存；（4）文本中对方法准确度不做要求。

2019年4月至12月，针对2019年3月研讨会提出的意见，我们开展了以下工作：（1）11月，与《水质 浮游植物的测定 滤膜法》的编制单位浙江省环境监测中心共同讨论，对标准文本中的“方法适用范围、规范性引用文件、术语和定义、试剂、样品的采集和保存”等内容的修改进行了统一；（2）11月，开展《水质 浮游植物的测定 显微镜计数法》与《水质 浮游植物的测定 滤膜法》的方法比对；（3）对照专家意见，对标准文本和编制说明进行修改。

2020年3月至4月，对照标准所意见，对标准文本和编制说明进行修改。

1.2.7 召开标准征求意见稿技术审查会

2020年6月5日由生态环境部环境标准研究所组织召开了征求意见稿技术审查会。审查委员会听取了标准征求意见稿和标准编制说明的内容介绍,经质询、讨论后,形成审查意见:(1)标准编制单位提供的材料齐全,内容完整;(2)标准编制单位对国内外方法标准及文献进行了充分调研;(3)标准定位准确,技术路线合理可行。方法验证内容完善。审查委员会通过本标准征求意见稿的技术审查。建议按照以下意见修改完善后,提请公开征求意见。具体意见为:(1)修改标准文本中“浮游植物”的定义;(2)建议编制单位对标准中有关检出限的相关内容进行进一步调研和论证;(3)建议根据专家意见进一步完善标准文本及编制说明。

2020年6月至10月,针对征求意见稿技术审查会提出的意见,我们开展了以下工作:(1)修改了标准文本中“浮游植物”的定义,按照专家意见将“浮游植物”的定义修改为“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。”;(2)对标准中有关检出限的相关内容进行进一步调研和论证,并将相关内容补充到编制说明中;(3)已按照专家意见进一步完善标准文本及编制说明。

2 标准制订的必要性分析

2.1 浮游植物的环境危害

浮游植物(Phytoplankton)一般指浮游藻类,是悬浮于水中生活的微小藻类植物^[1]。它作为水体中的初级生产者,分布广泛,适应性强,在水生生态系统食物链中占据着十分重要的地位^[2]。随着富营养化问题的日益严重,作为富营养化的生态系统响应之一的浮游藻类异常增殖,即形成藻类水华。水华发生后,水体表面被大量蓝藻覆盖而呈蓝绿色,一方面影响水体景观,另一方面产生有异味的有机物质,第三方面有些藻类还会分泌毒素。总之,浮游藻类的异常增殖严重破坏了水体功能和周围环境。

2.2 相关环保标准和环保工作的需要

2.2.1 相关环保标准

浮游植物含有叶绿素,能利用光能进行光合作用,将无机物转变为有机物,供其他消费性生物利用,是湖泊中主要初级生产者。浮游藻类的种类组成特点和数量分布等生态特征,能敏感地反映复杂的环境因子变动^[3],因此其群落结构特征和变化趋势是水环境监测、水质评价、水环境污染研究、水体生态修复和治理的重要内容^[4-8]。

目前,国内没有以浮游植物的数量(藻密度)为控制指标的排放标准或质量标准。《地表水环境质量标准》(GB 3838-2002)中与浮游植物有关的指标是表3中的微囊藻毒素LR,该指标的限值参考了世界卫生组织(WHO)饮用水中微囊藻毒素LR限值(1 μg/L)。2001年中国环境监测总站《关于印发湖泊(水库)富营养化评价方法及分级技术规定》(总站生字(2001)090号)和2011年原环境保护部《关于印发<地表水环境质量评价办法(试行)>的通知》,采用综合营养状态指数法对湖泊、水库进行富营养状态评价,也只涉及到叶绿素

a、总磷、总氮、透明度和高锰酸盐指数等 5 个参数，没有浮游植物的数量（藻密度）这个指标。

澳大利亚和新西兰环保委员会和农业资源委员会 2000 年发布的《淡水和海水质量导则》（Australian and New Zealand Guidelines for Fresh and Marine Water Quality）提出，当藻类密度超过 2×10^6 个/L 时，其产生的藻毒素对人畜饮用安全就可能产生不利影响，应对藻类进行去除后才能供人畜使用。当藻类密度达到 1.5×10^7 个/L 时，就不建议皮肤接触。

世界卫生组织（WHO）制定的饮用水中微囊藻毒素 LR 的最高允许含量为 $1 \mu\text{g/L}$ 。

目前我国针对饮用水中浮游植物密度限值的研究主要以微囊藻毒素 LR 的浓度限值为依据，开展饮用水中浮游植物密度限值研究。施玮等^[9]发现同一水域连续一年或几年中浮游植物细胞密度与微囊藻毒素 LR 浓度有较好的相关性，利用浮游植物细胞密度可估算该水域的微囊藻毒素 LR 浓度。据此提出了饮用水源中浮游植物细胞的安全限值： 1.0×10^4 个/L、警戒限值： 2.1×10^5 个/L、危险限值： 1.2×10^6 个/L。

2.2.2 环保工作的需要

藻类是湖泊中主要初级生产者，在水生态系统中具有重要地位。藻类的组成结构和数量变化能对水体富营养化做出显著而迅速的响应。近年来，特别是 2007 年太湖蓝藻水华引起的饮用水危机以来，蓝藻水华一直备受各级管理部门和社会各界关注。目前大多数学者普遍认同蓝藻水华是在富营养化水体中蓝藻大量增殖，水体中叶绿素 *a* 浓度超过 10 mg/L 或藻细胞超过 1.5×10^7 个/L，并在水面形成一层蓝绿色或有恶臭的浮沫。我国报道发生水华的蓝藻共 26 种，其中微囊藻属 10 种，鱼腥藻属 (*Anabaena*) 12 种，拟鱼腥藻属 (*Anabaenopsis*)、束丝藻属 (*Aphanizomenon*)、浮丝藻属 (*Planktothrix*) 和拟浮丝藻属 (*Planktothricoides*) 各 1 种，国外记载了约 89 种。蓝藻水华通过产生毒素、死亡分解时使水体缺氧和破坏正常的食物网威胁饮用水安全、公众健康和景观环境，造成严重的经济损失和社会问题。几乎全世界的主干水系，包括非洲的维多利亚湖、欧洲的波罗的海、北美的伊利湖等都出现过严重的蓝藻水华。我国是世界上蓝藻水华发生最为严重、分布最广泛的国家之一，太湖、巢湖和滇池是蓝藻水华发生最为严重的湖泊。藻类密度是全国“三湖一库”藻类水华预警和应急监测的一项重要指标。

3 国内外相关分析方法研究

3.1 主要国家、地区及国际组织相关分析方法研究

美国公共卫生协会（American Public Health Association, APHA）、美国自来水协会（American Water Works Association, AWWA）、水环境联合会（Water Environment Federation, WEF）联合制定的《Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater》^[10]对浮游藻类的计数、误差的估计等方面进行了规定。

英国和欧洲标准《Water quality—Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopy》（BS EN 15204: 2006）^[11]对浮游藻类样品的保存、样品的准备、计数、质量保证、不确定度的评估等方面进行了全面细致的规定。

英国标准《Water quality—Enumeration of micro-organisms in water samples—Guidance of variation of result with particular reference to the contribution of uncertainty of measurement》(BS 8496: 2007) [12]中提出了在水生微生物定量分析中, 测量不确定度的评估方法, 并分析了实际案例。

美国 ASTM 标准《Standard classification for sampling phytoplankton in surface waters》(ASTM D4149-82) [13]规定了采集浮游藻类的常用技术和常用工具。

美国 ASTM 标准《Standard Test Method for Analysis of Phytoplankton in Surface Water by the Sedgwick-Rafter Method》(ASTM D4148-82) [14]中对样品的保存、样品的前处理、藻细胞密度的测定过程、精密度和偏差的计算方法进行了规定。

编制组检索到国外有关浮游藻类测定—显微镜计数法共 5 个, 详见表 3-1。对国外有关显微镜计数法测定浮游藻类方法的采样工具、样品的保存、样品的前处理、浓缩、计数对象、浮游植物在计数框中的分布、计数方式、适宜测定的浮游植物的密度、计数量与精密度、检出限等内容总结如下。

3.1.1 采样工具

由 ASTM 出版的《Standard classification for sampling phytoplankton in surface waters》(ASTM D4149-82) [13]规定了采集浮游藻类的常用技术。使用者结合研究需要、采样区情况和浮游藻类的天然特性选择适合的技术。

定性样品的采集常用浮游生物网和泵。

浮游生物网在很多情况下是一种非常实用的采样工具。大多数的浮游生物网由绸或尼龙材料制成。由于某些微型浮游生物 (10 μm ~50 μm) 和超微型浮游生物 (<10 μm) 不能够被生物网截取, 所以浮游生物网不能用于定量样品的采集。

泵采样系统一般由: 泵、流量计、基座和浓缩网构成。从特定深度抽取水样, 水样经过浓缩网将浮游藻类富集在网上。

定量样品的采集常用克拉克颠倒浮游藻类采样器 (Clarke-Bumpus plankton sampler)、Juday 浮游植物阱 (Juday plankton trap)、采水瓶 (water sampling bottle)。

克拉克颠倒浮游藻类采样器 (Clarke-Bumpus plankton sampler) 是一种用网来富集浮游藻类的半定量采样装置。由经过校准的流量计测定进入采样器水样的体积实现定量。

Juday 浮游植物阱 (Juday plankton trap) 与克拉克颠倒浮游藻类采样器 (Clarke-Bumpus plankton sampler) 非常类似, 可以从所需深度采集特定大小的样品。

采水瓶 (water sampling bottle) 由使用者操作, 能够在特定深度关闭水样瓶, 而汲取到特定深度的水样。采水瓶 (water sampling bottle) 是适应性最强、最简单的定量采样工具。

该标准指出浮游藻类在时间和空间上的不均匀分布和种类构成的变化, 使得采集具有代表性的样品十分困难, 采样方案必须能够顾及不同的深度和范围。

3.1.2 样品的保存

为了保证分析工作完成前, 水样中的浮游藻类尽可能不发生变化, 需向采集到的样品中加入保护剂, 保存于适宜的环境中, 并在规定的时间内完成分析。

《Water quality—Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted

microscopy》(BS EN 15204: 2006) [11]中根据样品的用途进行规定：定性样品不加保护剂，4℃~10℃暗处保存，36h内完成分析；定量样本加入鲁哥氏液，常温暗处保存3周，1℃~5℃保存一年。鲁哥氏液在室温避光条件下可保存1年。

表 3-1 国外有关浮游藻类计数方法一览表

序号	标准编号	标准名称	来源	原理	适用范围	备注
1	BS EN 15204: 2006	Water quality-Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopy (水质—浮游植物的计数倒置显微镜法指导标准)	英国欧洲标准	使用倒置显微镜和沉淀池等装置对海洋和淡水中浮游植物的数量及种类组成进行测定	海洋和淡水中浮游植物数量和种类组成的测定	
2	BS 8496: 2007	Water quality-Enumeration of micro-organisms in water samples-Guidance of variation of result with particular reference to the contribution of uncertainty of measurement (水质—水样中微生物的计数—结果误差中测量不确定度的贡献量)	英国标准	通过评估平行样测定结果的一致性程度，判断测定方法是否符合有关质控要求	任何类型的水样	
3	ASTM D4148-82	Standard Test Method for Analysis of Phytoplankton in Surface Water by the Sedgwick-Rafter Method (用赛奇威客椽法分析地表水中浮游植物的标准测定方法)	美国标准	使用显微镜观察置于塞奇威客椽计数片中的水样，对水样中的浮游植物进行种类鉴定和密度测定	海洋和淡水中浮游植物数量和种类组成的测定	
4	ASTM D4149-82	Standard classification for sampling phytoplankton in surface waters(地表水中浮游植物分类采样标准)	美国标准		内陆地表水中浮游植物定性和定量的采集	规定了采集定量、定性样品的技术及工具。定性样品的采集工具为浮游生物网和泵定量样品的采集工具为克拉克颠倒浮游藻类采样器 (Clarke-Bumpus plankton sampler)、Juday 浮游植物阱 (Juday plankton trap)、采水瓶 (water sampling bottle) 等
5	ASTM D4137-82	Standard Practice for Preserving Phytoplankton Samples (浮游植物样品保存标准)	美国标准		内陆地表水样品的保存	通过向采集到的水样中按比例的添加鲁哥试剂或福尔马林试剂延长样品的保存期

3.1.3 样品的前处理

《Water quality—Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopy》(BS EN 15204: 2006)^[11]中非常重视样品的混匀，将混匀样品视为对检测结果有重大影响的步骤。对混匀的目的、方式、时间和力度进行了描述：能够保证正常计数时，最少的晃动时间和强度；向三个方向轻摇混匀，使吸附在一起的颗粒物和藻细胞相互分开。摇的力量过大，可能导致气泡的产生和群体的解离。

《Water quality—Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopy》(BS EN 15204: 2006)^[11]中指出：为了便于细胞计数，可以用超声波震荡仪对群体形式的浮游植物进行处理，以促进群体细胞的解离，同时要避免过度处理造成浮游植物细胞的破损。

3.1.4 浓缩

ASTM 出版的《Standard Test Method for Analysis of Phytoplankton in Surface Water by the Sedgwick-Rafter Method》(ASTM D4148-82)^[14]中并没有给出样品需要被浓缩或稀释的客观标准，而是提出了应依据镜检结果和经验决定是否需要进行浓缩或稀释处理。该标准中提出量筒沉淀法是最常用的浓缩方式。浓缩步骤为：将水样充分混匀后加入量筒，并记录水样体积，待浮游藻类经充分沉淀后，小心移去大部分上层水样，并记录此时的水样体积，计算浓缩倍数。根据水样高度，按照 4 h/cm 计算沉淀时间。此外，该标准还给出另外一种类似重量法的沉淀方式，步骤为：称取约 1g 左右的水样于容器中，并记录准确的称重结果，待水样中的浮游藻类充分沉淀后，移去大部分上层水样，并进行称重。根据两次称重结果计算浓缩倍数。

《Water quality—Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopy》(BS EN 15204: 2006)^[11]中提出：浓缩水样中的浮游藻类比较耗时，且会引入误差，因此，应当尽量避免。可以采用沉淀、离心或过滤的方式进行浓缩。沉淀是最常用的浓缩方式。在底部安装有阀门的量筒可以作为浓缩装置。沉淀过程应在避光、恒温的环境中进行。同时需要避免水样的蒸发。某些浮游藻类可能会保持悬浮或粘附在沉淀器壁上。为了达到良好的沉淀效果，在沉淀过程中，应定时快速转动沉淀器，以松动粘附在沉淀器壁上的浮游藻类，促进水样中的浮游藻类充分沉淀。

《Water quality—Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopy》(BS EN 15204: 2006)^[11]中对沉淀装置提出的要求是：加入到沉淀器中水样的高度不能超过沉淀器底部直径的 5 倍。

3.1.5 计数对象

由于存在单细胞、多细胞和群体性的浮游植物，计数对象的确定对计数结果具有十分重大的影响。

《Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater》^[10]并未明确规定计数对象为细胞还是群体，而是指出了两者的优缺点：以细胞为对象，则计数结果较为准确，但比较费时；以细胞个体或是群体为计数对象则非常方便，但计数结果较为不准确。使用者可根据

根据自己的需求和实际情况进行选择，但需在结果报告中进行说明。

《Water quality—Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopy》(BS EN 15204: 2006)^[11]将情况分为三种：(1) 当群体中的浮游植物细胞个体较易被辨识时，可将细胞作为计数对象。(2) 当同种浮游植物群体中所含的细胞数量变化不大时，可将群体作为计数对象，用群体数乘上群体中浮游植物细胞的平均数。(3) 当不具备上述 2 个条件时，采用超声波震荡或水解的方式离散群体中的细胞，然后以细胞为对象开始计数。

《Standard Test Method for Analysis of Phytoplankton in Surface Water by the Sedgwick-Rafter Method》(ASTM D4148-82)^[14]中以浮游植物细胞作为计数对象。该标准指出：如果在计数过程中遇到群体形式的浮游植物，并且无法对群体中的细胞进行计数时，可以采用估计的方式得到群体中的细胞总数；如果在计数过程中，遇到条状的浮游藻类，可以根据单位长度中含有的细胞数量乘以条状浮游藻类的长度得到细胞总数。

3.1.6 浮游植物在计数框中的分布

浮游植物在计数框中的分布对于选取计数框中部分区域进行计数的方法有较大的影响。对于随机视野、对角线或行格等，这类仅对计数框中部分区域进行观察和计数的方法，它们的准确性的保障以及对误差的估计，均是以浮游植物随机分布于计数框中为前提。

《Water quality—Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopy》(BS EN 15204: 2006)^[11]中非常重视浮游藻类在计数框（沉淀池）中的分布。在计数之前，应在低倍数下，对整个计数框（沉淀池）进行观察，已确认浮游藻类是否为随机分布。

《Water quality—Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopy》(BS EN 15204: 2006)^[11]、《Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater》^[10]中，按照泊松分布模型，对计数结果 95%置信区间进行估计，并根据检测工作的精度要求，提出所需观察计数的视野数量或需计数的浮游藻类的数量，但估计的前提是浮游藻类随机分布于计数框中。

为了确保浮游藻类随机分布于计数框中，《Water quality—Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopy》(BS EN 15204: 2006)^[11]中提出了一些措施。例如：在向计数框（沉淀池）中加注水样前，计数框（沉淀池）和水样应在室温下放置足够长的时间，以确保它们的温度相同。如果存在温度差，会引起浮游藻类的趋中分布。

3.1.7 计数方式

《Water quality—Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopy》(BS EN 15204: 2006)^[11]中提出了 3 种计数方式：(1) 选取一定数量的随机视野进行观察和计数。(2) 对计数框上的一个或多个行条中的浮游藻类进行观察和计数。(3) 对整个计数框（适用于低藻密度样品）中的浮游藻类进行观察和计数。同时也指出：随机视野法能够在工作量相对不大（相对于观察计数整个计数框）的情况下，给出相对最准确的结果。因为藻类的沉淀或多或少会有一些趋中，如果采用行条法，观察中间部分的行条，可能导致过高估计藻密度，而观察靠边的行条可能导致过低估计藻密度，随机视野法能够克服这

个问题。

对于选取多少视野或行条，《Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater》^[10]和《Water quality—Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopy》(BS EN 15204: 2006)^[11]中的规定是：依据对检测工作的精度要求，用泊松分布模型进行确定。

《Standard Test Method for Analysis of Phytoplankton in Surface Water by the Sedgwick-Rafter Method》(ASTM D4148-82)^[14]中提出了 2 种计数方式：(1) 对计数框上的一个或多个行条中的浮游藻类进行观察计数，该方法适用于藻细胞密度较低的水样。(2) 随机选取计数框中的若干区域，对其中的浮游藻类进行观察和计数，该方法适用于藻细胞密度较高的水样。该标准同时指出：对于藻细胞的计数量，并没有统一的标准，根据大多数测定人员的建议，藻细胞的计数量应至少为 100 个。

3.1.8 适宜测定的浮游植物的密度

计数框中浮游藻类的密度，对测定过程和结果有重要的影响。《Water quality—Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopy》(BS EN 15204: 2006)^[11]中对计数框（沉淀池）中的藻类密度给出了定性要求：藻细胞之间、藻细胞与颗粒杂质之间不应相互粘合或堆叠；当随机抽取视野或计数格进行观察计数时，过低的藻密度将导致大的随机误差；过高的藻密度将会导致观察计数的困难，造成计数时间过长和测定人员的疲劳。

3.1.9 计数量与精密度

《Water quality—Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopy》(BS EN 15204: 2006)^[11]中提出：“视野或浮游藻类的计数量由测定所需的精度决定。”、“精度可以由标准偏差、相对标准偏差、95%置信区间占均值的百分比等表示”、“在日常分析工作中，应事先设定精度”。

相对标准偏差与浮游藻类计数量的关系根据式 (1) 进行计算。

$$D = \frac{1}{\bar{x}} \sqrt{\frac{s^2}{n}} = \frac{1}{\bar{x}} \sqrt{\frac{\bar{x}}{n}} = \frac{1}{\sqrt{\sum x}} \quad (1)$$

式 (1) 中： n ——计数的视野数

\bar{x} ——每个视野中浮游藻类的平均数量

$\sum x$ ——总浮游藻类计数量

如果将精密度（以相对标准偏差表示）设定为 5%，根据式 (1) 进行计算得：

$$\sum x = \left(\frac{1}{0.05}\right)^2 = 400 \quad (2)$$

即应该至少计数 400 个浮游藻类。需要观察的视野数由计数量决定。

如果精密度由置信区间表示，则利用式 (3) 进行计算：

$$D = \frac{t}{\sqrt{\sum x}} \quad (2)$$

当自由度为 ∞ ，置信度为 95%（双侧）时， $t \approx 2$ 。浮游藻类计数量为 400 个时，95%置

信区间为测定结果的±10%。对于 D 的估计，只有当浮游藻类在计数框中的分布为随机分布时才是有效的。否则只能作为粗略的近似值。

注意事项：如果精密度表示的是浮游藻类的总数，那么这个精密度不能用于表示单个种类浮游藻类测定结果的精密度。

《Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater》^[10]中提出：如果当浮游藻类的分布为随机分布且数量满足泊松分布时，计数误差可有式（4）估计。

$$\frac{2}{\sqrt{N}}(100\%) \quad (4)$$

例如：如果计数量为 100 个，95%置信区间为±20%。当计数量为 400 个时，95%置信区间为±10%。

3.1.10 检出限

《Water quality — Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopy》(BS EN 15204:2006)^[11]提出检出限是浮游植物测定方法的重要性能指标。对于随机分布于计数框中的单种藻类，检出限可由泊松统计模型（式 5）得出。

$$n_{det} = \frac{-\ln(\alpha) \times f_{total}}{V \times f_{counted}} \quad (5)$$

式中： α ——显著水平；

n_{det} ——检出限；

f_{total} ——计数框的总视野数；

$f_{counted}$ ——被计数的视野数。

3.2 国内相关分析方法研究

国内关于藻类数量分析方法较早的文献见于 20 世纪 80 年代^[15]。方法有显微镜法、可见分光光度法、库尔特法、流式细胞计数显微镜法^[16]。其中，关于显微镜法的应用比较多，分为倒置显微镜^[16-18]和正置显微镜法^[1,19-21]。虽然倒置显微镜可以检出样品中的大多数种属^[17]，但由于其需要特殊的计数装置，且没有相应的产品和售后，未能在国内普及使用。正置显微镜法在国内的多数实验得到采用，对于计数方式主要分为视野法^[1,19]、行格法^[1,20]、全片计数法^[21]和对角线法^[22-23]。对角线法在国内的实验室被广泛采用，但鲜有文献报道。

《水和废水监测分析方法（第四版）》、《湖泊富营养化调查规范（第二版）》、《湖泊生态调查观测与分析》3 个文献通常作为藻密度测定的重要规范性文献。3 个文献中，藻密度测定都是在计数框内进行的。我国通用的计数框是由玻璃条组成的方框，面积为 20 mm×20 mm、容量为 0.1 ml，框内划分横直各 10 行格，共 100 个小方格。为减少工作量，一般不对整个计数框内水样中的浮游植物都计数，而只选取其中一部分样品计数。选取过程是一个次级抽样过程，故要考虑到抽样的大小和代表性，常用行格法和视野法。

行格法：对计数框上的第 2 行、5 行、8 行三行共 30 个小方格进行计数，现已较少采用。
视野法：在计数框上选取 100 个~500 个视野，计数的视野应均匀分布在计数框的全部面积内。视野法需要利用测微尺量得在一定放大倍数下的视野直径，然后按圆面积计算求得视野

面积。如果设备相同，放大倍数不变的情况下，该面积为一常数。

对于计数误差，3个文献均做了相似规定“不大于±15%”，但对误差的描述分别为“两片计数个数相差”、“每次计数的结果与其平均值之差”、“相对偏差”。对计数误差描述的不一致容易产生歧义和统计结果的不可比，需要加以统一。此外，计数误差会因计数量的不同而不同，一般地计数量越大误差越小。3个文献均未对计数量做出明确的规定，只有《湖泊生态调查观测与分析》规定了“浮游植物计数值至少在300以上”。

2020年2月12日发布、4月12日实施的《水华遥感与地面监测评价技术规范（试行）》（HJ1098-2020）规定了淡水水体蓝藻水华遥感监测方法、地面监测方法和水华程度评价方法等内容。在水华地面监测部分，提出的藻密度分析方法为显微镜计数法（镜检法）和便携式仪器法，显微镜计数法仍采用行格法和视野法，并要求两片计数相差不大于15%。对开展常规监测时采用的显微镜计数法，本标准说明：待相关环境监测分析方法标准发布后，按相关标准执行。

3.3 本方法与国内外相关分析方法的关系

本方法在计数对象、计数方式、最少计数量、材料和试剂使用、检出限计算等主要部分与国内外相关分析方法的关系详见表3-2。

3.3.1 计数对象

《Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater》^[10]并未明确规定计数对象为细胞还是群体，而是指出了各自的优缺点；《Water quality—Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopy》（BS EN 15204: 2006）^[11]和《Standard Test Method for Analysis of Phytoplankton in Surface Water by the Sedgwick-Rafter Method》^[14]（ASTM D4148-82）以浮游植物细胞作为计数对象。

考虑到以浮游植物细胞作为计数对象，具有计数结果较为准确的优点，多数国外有关标准以浮游植物细胞作为计数对象，本方法将浮游植物作为计数对象。

3.3.2 计数方式

《Water quality—Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopy》（BS EN 15204: 2006）^[11]中提出了3种计数方式，分别为随机视野计数、行格计数和全片计数；《Standard Test Method for Analysis of Phytoplankton in Surface Water by the Sedgwick-Rafter Method》（ASTM D4148-82）^[14]中提出了2种计数方式，分别为随机视野计数和行格计数。《水和废水监测分析方法（第四版）》提出了行格计数和全片计数。

计数方式的选择主要依据待测水样中浮游植物藻细胞的密度，原则是密度越高选择观察面积越大的计数方式，例如：全片计数法，密度越低选择观察面积越小的计数方式，例如：随机视野法。

本方法的计数方式有：全片计数、行格计数、对角线计数和随机视野计数，各计数方式对应相应的浮游植物细胞密度，依据待测水样的浮游植物细胞密度，选用相应的计数方式。

3.3.3 最少计数量

《Water quality-Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopy》(BS EN 15204: 2006) [1]中提出：“视野或浮游藻类的计数量由测定所需的精度决定。”，并给出了相应的计算方法。当相对标准偏差为5%时，则需至少计数400个浮游植物细胞。

本方法通过方法研究发现：当重复测定结果间的相对标准偏差要求为15%时，每次显微镜计数，浮游植物细胞的总计数量应有500个~1500个。

表 3-2 本方法与国内外相关分析方法关系汇总表

序号	主要内容	本方法规定	国内外相关分析方法规定
1	计数对象	浮游植物细胞	《Water quality—Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopy》(BS EN 15204: 2006) 和《Standard Test Method for Analysis of Phytoplankton in Surface Water by the Sedgwick-Rafter Method》(ASTM D4148-82)以浮游植物细胞作为计数对象。
2	计数方式	全片计数、行格计数、对角线计数和随机视野计数	《Water quality—Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopy》(BS EN 15204: 2006)有3种计数方式，分别为随机视野计数、行格计数和全片计数；《Standard Test Method for Analysis of Phytoplankton in Surface Water by the Sedgwick-Rafter Method》(ASTM D4148-82)有2种计数方式，分别为随机视野计数和行格计数。《水和废水监测分析方法(第四版)》的计数方式为行格计数和全片计数。
3	计数量	每次显微镜计数，浮游植物细胞的总计数量应有500~1500个	《Water quality—Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopy》(BS EN 15204: 2006)规定当相对标准偏差为5%时，则需至少计数400个浮游植物细胞。
4	材料和试剂	采样工具为浮游生物网和有机玻璃采水器；水样固定剂为鲁哥试剂	《水和废水监测分析方法(第四版)》、《湖泊富营养化调查规范(第二版)》、《Standard classification for sampling phytoplankton in surface waters》(ASTM D4149-82)等规定的采样工具均有浮游生物网和有机玻璃采水器，水样固定剂均为鲁哥试剂。
5	检出限	应用泊松分布模型得出了全片计数、行格计数、对角线计数和随机视野计数的检出限	《Water quality—Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopy》(BS EN 15204: 2006)中采用泊松统计模型计算检出限。

3.3.4 材料和试剂使用

《水和废水监测分析方法(第四版)》《湖泊富营养化调查规范(第二版)》、《水华遥感

与地面监测评价技术规范（试行）》（HJ1098-2020）、《Standard classification for sampling phytoplankton in surface waters》（ASTM D4149-82）^[13]等规定了采集浮游藻类的常用工具。以上标准规范中，定性样品的采集和定量样品采集均使用了浮游生物网和有机玻璃采水器。本标准规定的采样工具也为浮游生物网和有机玻璃采水器，分别用于定性样品的采集和定量样品的采集。

《水和废水监测分析方法（第四版）》、《湖泊富营养化调查规范（第二版）》、《水华遥感与地面监测评价技术规范（试行）》（HJ1098-2020）规定用鲁哥氏液作为水样固定剂，加入量为每 1000 ml 水样加入 15 ml 固定剂。本方法规定的固定剂种类和用量与其相同。

3.3.5 检出限计算

欧盟标准《Water quality-Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopy》（BS EN 15204: 2006）^[11]提出检出限是浮游植物测定方法的重要性能指标。对于随机分布于计数框中的单种藻类，检出限可由泊松统计模型得出。

《Water quality-Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopy》（BS EN 15204: 2006）在“3 Terms and definitions（条款和定义）”中关于“3.3 detection limit（检出限）”的定义为：“minimum number and/or size of a specific taxon or group of organisms in a sample at which its presence can be detected with a specified probability（在指定概率下，样品中可被检测到的最低生物量）”。检出限具体的确定方法在“7.3.2.3 Quantitative detection limit（定量检出限）”中给出。检出限可由泊松统计确定，计算公式为：

$$n_{det} = -\ln(\alpha) \cdot \frac{f_{total}}{(V \cdot f_{counted})} \quad (6)$$

式中： α is the level of significance;（显著度）

n_{det} is the detection limit;（检出限）

f_{total} is the total number of microscope fields in the chamber;（计数框内显微镜视野总数）

$f_{counted}$ is the number of fields counted;（被计数的视野数）

V is the volume of the sub-sample in the chamber.（计数框内样品的体积）

式 6 由泊松分布的概率函数（式 7）推导得出：

$$P(x) = \frac{e^{-\lambda} \lambda^x}{x!} \quad (7)$$

其中： $P(x)$ 为概率、 λ 为分布的平均值、 x 为预期值（对于检出限取值为 0）。具体推导步骤为：

步骤（1）对式 7 两端同时取对数可得：

$$\lambda = -\ln P(x) \quad (8)$$

步骤（2）将式 8 代入浮游植物密度公式（式 9）得到的式 10。

$$n = \frac{\lambda}{V} \cdot \frac{f_{total}}{f_{counted}} \quad (9)$$

$$n = -\frac{\ln P(x)}{V} \cdot \frac{f_{total}}{f_{counted}} \quad (10)$$

式 10 与欧盟标准《Water quality-Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopy》(BS EN 15204: 2006) 中检出限的计算公式(式 6)是相同的。式 10 中的 $P(x)$ 相当于式 6 中的 α 。

本方法参考《Water quality-Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopy》(BS EN 15204: 2006)^[11], 应用泊松分布模型得出全片计数、行格计数、对角线计数和随机视野计数检出限。具体计算过程详见 5.7.4。

4 标准制订的基本原则和技术路线

4.1 标准制订的基本原则

本标准编制的基本原则是既参考国际先进标准及相关技术, 同时结合国内监测机构的实际情况, 对优选的技术和标准进行相关的技术验证, 确保方法标准的科学性、先进性和可操作性, 并满足以下条件:

1) 方法的测定范围满足相关环保工作的要求; 本方法规定了测定水中浮游植物的显微镜计数方法, 适用于地表水中浮游植物密度的测定。本方法的测定范围为: 10^5 cells/L~ 10^9 cells/L, 能够适用于贫营养型和富营养型湖泊的浮游植物藻细胞密度的测定。本方法的检出限能够满足澳大利亚和新西兰环保委员会和农业资源委员会 2000 年发布的《淡水和海水质量导则》(Australian and New Zealand Guidelines for Fresh and Marine Water Quality) 藻类密度限值要求。

2) 方法准确可靠, 满足各项方法特性指标的要求; 本方法精密度为 2.4%~11.4%, 能够满足《水和废水监测分析方法(第四版)》两片计数结果个数相差 15% 以下的要求。

3) 方法具有普遍适用性, 易于推广使用。本方法所涉及的材料和工具均易购买, 分析测试成本低, 操作步骤简单易行。对于具有一定浮游植物鉴别能力的测试人员, 本方法易于使用。

4.2 标准制订的技术路线

标准编制组在对国际先进标准、国内相关文献和监测机构开展相关监测的充分调研基础上, 确定测定对象、适用范围及计数方式, 组织云南省生态环境厅驻昆明市生态环境监测站、大理州环境监测站、玉溪市环境监测站等单位对水样的保存方法和保存期限、样品的前处理方法、质量控制和保证、以及全片计数、行格计数、对角线计数和随机视野计数等 4 种计数方式的测定范围和检出限等方面开展了研究, 确定了方法测定范围、检出限和精密度。编制了测定方法和方法验证方案, 组织 6 家有资质的实验室进行了方法验证, 根据验证结果, 形成了标准文本和编制说明。

本标准制定的技术路线, 见图 4-1。

5 方法研究报告

5.1 方法研究的目标

1) 基于目前各地开展浮游植物密度测定方法不统一的现状, 研究建立以显微镜和浮游藻类计数框为工具的水中浮游植物测定国标方法。

2) 明确浮游植物的计数对象, 统一前处理方法, 确定浮游植物细胞密度 4 种显微镜计数方式的适用范围、检出限和精密度, 提出质量控制技术要求和注意事项。

5.2 方法原理

在显微镜下, 对水样中的浮游藻类进行人工分类和计数, 统计单位体积水样中各种藻类细胞的数量。

5.3 试剂和材料

关于定量样品的保存, 《水和废水监测分析方法(第四版)》和《湖泊富营养化调查规范(第二版)》均规定在 1000 ml 水样中加入 15 ml 鲁哥氏液作固定剂。

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

5.3.1 碘化钾 (KI)。

5.3.2 碘 (I_2)。

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

5.3.4 鲁哥氏液 (Lugols solution):

称取 60 g 碘化钾 (5.3.1), 溶于 1000 ml 实验用水中, 再加入 40 g 碘 (5.3.2), 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。

5.4 仪器和设备

《Standard classification for sampling phytoplankton in surface waters》(ASTM D4149-82)^[13]、《水和废水监测分析方法(第四版)》^[20]等国内外标准规范, 均使用 25 号浮游生物网采集定性样品。浮游生物网为 25 号筛绢网, 网孔直径为 0.064mm, 网呈圆锥形, 网口套在铜环上, 网底端有出水开关活塞。

《Water quality-Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopy》(BS EN 15204: 2006)^[11]中指出: 为了便于细胞计数, 可以用超声波震荡仪对群体形式的浮游植物进行处理, 以促进群体细胞的解离, 同时要避免过度处理造成浮游植物细胞的破损。

5.4.1 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。

5.4.2 采样瓶: 30 ml 棕色玻璃广口瓶 (具塞)。

5.4.3 显微镜: 物镜 5×、10×、20×、40×倍, 目镜 10×或 15×。

5.4.4 浓缩装置: 筒形分液漏斗, 1 L。

5.4.5 样品瓶: 50 ml 的棕色玻璃广口瓶 (具塞)。

5.4.6 超声波发生装置: 工作频率 40 kHz。

- 5.4.7 微量移液器：100 μl。
- 5.4.8 藻类计数框：0.1 ml、面积 20 mm×20 mm，框内划分横直各 10 行格，共 100 个小方格。
- 5.4.9 盖玻片：面积 22 mm×22 mm，厚度小于 0.2 mm。
- 5.4.10 计数器。
- 5.4.11 显微镜物镜测微尺。
- 5.4.12 显微镜目镜测微尺。
- 5.4.13 一般实验室常用仪器和设备。

5.5 样品

5.5.1 样品的采集

5.5.1.1 定性样品

参照《水和废水监测分析方法（第四版）》，使用浮游生物网（5.4.1）采集定性样品。

5.5.1.2 定量样品

参照 HJ/T 91 和 HJ/T 494 的相关规定进行水样的采集和保存。采集水样的体积一般不少于 0.5 L；当水体中的浮游植物密度低于 10⁶ cells/L，不少于 1 L。

5.5.2 样品的保存

5.5.2.1 定性样品

定性样品中不加入甲醛溶液（5.3.3）和鲁哥氏液（5.3.4）。

定性样品应避光保存在 4 °C~10 °C 的环境中，保存时间不超过 36 h。

国内文献并未对定性样品保存进行说明，本标准参考《Water quality—Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopy》（BS EN 15204: 2006）^[1]所述方法进行定性样品保存。

5.5.2.2 定量样品

定量样品每 1000 ml 加入 15 ml 鲁哥氏液（5.3.4）。

参照《Water quality-Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopy》（BS EN 15204: 2006）^[1]，加入鲁哥氏液（5.3.4）的定量样品置于室温、避光条件下，保存期限为 3 周；置于 1 °C~5 °C、避光保存条件下，保存期限为 12 个月。样品在保存过程中，应每周检查鲁哥氏液（5.3.4）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（5.3.4），直到样品的颜色恢复为黄褐色。

参照《湖泊生态调查观测与分析》^[1]、《Water quality-Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopy》（BS EN 15204: 2006）^[1]，若保存时间超过 1 年，每 100 ml 样品需加入甲醛溶液（5.3.3）4 ml。

5.6 分析步骤

5.6.1 混匀样品

每次取样前，必须采用上下颠倒样品瓶至少 100 次的方式充分混匀样品。

参考《Water quality-Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopy》(BS EN 15204: 2006) [11]，采用上下颠倒样品瓶的方式进行样品混匀。在整个测定过程中，每当要从母样中取出子样时，必须在取样之前充分混匀母样，并立即取样。混匀时为了避免产生气泡和破坏藻细胞，不应采取激烈晃动样品瓶的方式混匀样品。

在专家研讨会上，有专家指出混匀次数必须足够，可定为 100 次。标准编制组采纳了该意见。

5.6.2 定性样品的分析

在显微镜（5.4.3）下观察定性样品，鉴定浮游植物的种类，并建立清单，为定量分析做好准备。

藻类的种类鉴定需要专业的知识和训练。分类依据参考《中国淡水藻类：系统、分类及生态》 [24]或《中国淡水藻志》 [25]。

一般情况下，鉴定到属即可，也可根据调查的需要，确定需鉴定到的分类单位。

5.6.3 定量样品的分析

5.6.3.1 调整浮游植物密度

当定量样品（5.5.2.2）中的浮游植物细胞密度过低（低于 10^7 cells/L）时，需要对水样进行浓缩；当定量样品（5.5.2.2）中的浮游植物细胞密度过高（高于 10^8 cells/L）时，需要对水样进行稀释；以保证试样中的浮游植物细胞密度在 10^7 cells/L~ 10^8 cells/L 之间，使加入计数框中的 0.1 ml 样品含有 500 个~10000 个浮游植物细胞。表 5-1 为推荐选用的水样浓缩或稀释倍数。

表 5-1 推荐选用的水样浓缩或稀释倍数

原水样中藻细胞的密度水平	浓缩/稀释倍数	浓缩/稀释后 0.1 ml 测定水样中藻细胞数量 (cells)
$10^5 \sim 10^6$	浓缩 50 倍	500~5000
$10^6 \sim 10^7$	浓缩 10 倍	1000~10000
$10^7 \sim 10^8$	原水	1000~10000
$10^8 \sim 10^9$	稀释 10 倍	1000~10000
$>10^9$	稀释 100 倍	1000~10000

定量样品（5.5.2.2）中的浮游植物细胞密度过低（低于 10^7 cells/L）时，如果直接测定原水样，可能会导致测定结果的精密度较差，且有较多的浮游藻类被遗漏，此时需要对水样进行浓缩；定量样品（5.5.2.2）中的浮游藻类细胞密度过高（高于 10^8 cells/L）时，如果直接测定原水样，可能会造成工作量过大，计数时间过长，藻类计数框（5.4.8）内水样蒸发形

成气泡等问题，此时需要对水样进行稀释。

通过研究，适宜计数的浮游植物细胞密度为 10^7 cells/L $\sim 10^8$ cells/L。需根据原水样中浮游植物细胞密度，参考表 3 的浓缩稀释倍数，将水样中的藻类密度调整至 10^7 cells/L $\sim 10^8$ cells/L。

1) 水样浓缩

1 L 定量样品 (5.5.2.2) 摇匀倒入浓缩装置 (5.4.4)，静置 48 h 后，用细小虹吸管吸取上层清液，直至浮游植物沉淀物体积约 20 ml，旋开活塞放入 100 ml 量筒中，再用少许上层清液冲洗浓缩装置 1 \sim 3 次，一并放入量筒中，再用上层清液定容至浓缩倍数所需体积。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 (5.4.4) 器壁。

2) 水样稀释

对于细胞聚集成团的浮游植物定量样品 (5.5.2.2)，如不具备以下 2 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。

赵洋甬^[26]等对超声波频率和作用时间对处理效果的影响进行了研究。研究结论为：用超声波处理含微囊藻群体较大的水样，能更为快捷、科学地计数出水体中微囊藻细胞的浓度；当超声波频率为 40 kHz，处理时间约 9 min 时，能够达到最佳处理效果，水体中微囊藻分布较均匀，计数的相对偏差较小，且微囊藻细胞浓度仅损失 10%左右。

取混匀的 30 ml 定量样品于样品瓶 (5.4.5) 中，用超声波发生装置 (5.4.6) 在频率为 40 kHz 下，处理约 10 min。在显微镜下进行超声波处理后的水样观察，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 (5.5.2.2) 或经超声处理后的样品，用蒸馏水定容至刻线。如要保存稀释后的样品，应注意补充鲁哥氏液 (5.3.4)，使鲁哥氏液 (5.3.4) 的浓度与稀释前一致。

稀释水样的步骤为：根据稀释倍数，准确量取混匀后的水样 10 ml \sim 50 ml 于容量瓶中，用蒸馏水定容至刻线，充分摇匀后立即取 30 ml 于样品瓶 (5.4.5) 中。需要注意的是：如要保存稀释后的样品，应注意补充鲁哥氏液，使鲁哥氏液的浓度与稀释前一致。

5.6.3.2 显微镜计数

1) 准备

将试样放至室温，用微量移液器 (5.4.7) 取 0.1 ml 混匀试样，注入藻类计数框 (5.4.8) 中，用盖玻片 (5.4.9) 将藻类计数框 (5.4.8) 完全盖住，静置约 5min 后开始计数。藻类计数框 (5.4.8) 内应无气泡，如有气泡应重新取样。

2) 计数

根据藻类计数框 (5.4.8) 中试样所含浮游植物细胞数量，选用适合的计数方式，使测定过程中浮游植物细胞的总计数量有 500 个 \sim 1500 个。表 5-2 为推荐选用的计数方式。

表 5-2 推荐选用的计数方式

0.1 ml 试样中浮游植物细胞的数量 (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

①全片计数。在显微镜下，逐一观察藻类计数框（5.4.8）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，并记录下每行的分类计数结果。

②行格计数。在显微镜下，逐一观察藻类计数框（5.4.8）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，并记录下每个小格的分类计数结果。

③对角线计数。在显微镜下，逐一观察位于藻类计数框（5.4.8）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，并记录下每个小格的分类计数结果。

④随机视野。在显微镜下，随机抽取一定数量的视野，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。计数前应测量显微镜视野面积。

3) 显微镜视野面积测量

采用随机视野法计数前，应测量显微镜视野面积。测量方法为用刻有一定刻度的测微尺来测量，先用绝对长度的物镜测微尺（5.4.11）来标定不表示绝对长度的目镜测微尺（5.4.12），再用目镜测微尺测量视野直径，最后计算视野的面积。

①测量工具

a) 物镜测微尺。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 小格，每小格等于 10 μm。物镜测微尺见示意图 5-1。

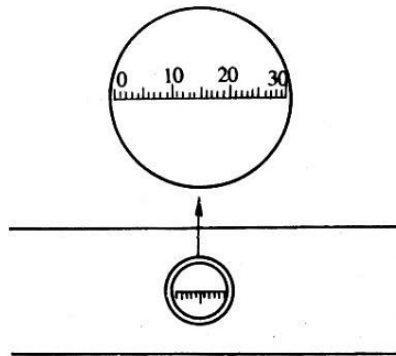


图 5-1 物镜测微尺示意图

b) 目镜测微尺。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。目镜测微尺见示意图 5-2。

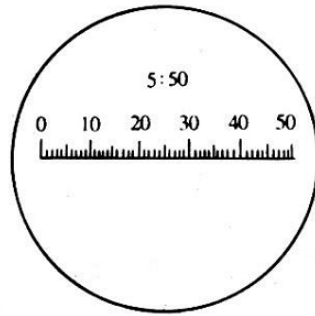


图 5-2 目镜测微尺示意图

②显微镜视野面积测量步骤

a) 装入目镜测微尺。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) 装入物镜测微尺。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。

c) 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 5-3。

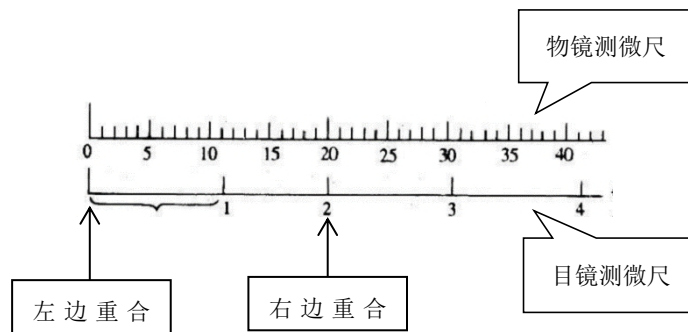


图 5-3 物镜测微尺标定目镜测微尺示意图

记录二条重合线间的目镜测微尺的格数和物镜测微尺的格数。按照式 (11) 进行计算，得到目镜测微尺所代表的实际长度。

$$\text{目镜测微尺每格的实际长度}(\mu\text{m}) = \frac{\text{两重合线间物镜测微尺的小格数} \times 10\mu\text{m}}{\text{两重合线间目镜测微尺的小格数}} \quad (11)$$

例如，在 $10\times$ 物镜下，目镜测微尺的 10 格等长于物镜测微尺的 10 格，即目镜测微尺每小格的长度为 $10\mu\text{m}$ 。一般情况下，当目镜为 $10\times$ 时，若物镜为 $4\times$ ，目镜测微尺每小格的长度为 $25\mu\text{m}$ ；若物镜为 $10\times$ ，目镜测微尺每小格的长度为 $10\mu\text{m}$ ；若物镜为 $40\times$ ，目镜测微尺每小格的长度为 $2.5\mu\text{m}$ ；若物镜为 $100\times$ ，目镜测微尺每小格的长度为 $1\mu\text{m}$ 。

d) 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，求得视野面积。

5.7 方法主要参数的研究和确定

根据显微镜计数法的特点，试样中浮游植物细胞的密度、选用的计数方法、浮游植物细胞的计数量等因素，对观察到的浮游植物种类数量、测定结果的精密度等有较为明显的影响。

为了确定影响测定方法性能的主要因素，标准编制组组织云南省生态环境监测中心、云南省生态环境厅驻昆明市生态环境监测站、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，分别采集富营养、中营养、贫营养湖泊水样，并将每种水样中的浮游植物细胞密度调整至 10^6 cells/L、 10^7 cells/L 和 10^8 cells/L 水平，然后用全片计数、行格计数、对角线计数方式进行重复测定 (>7 次)。重复测定的结果汇总于表 5-3~表 5-5。

表 5-3 贫营养湖浮游藻类藻细胞密度重复测定结果汇总

对角线法					
浓缩倍数	重复测定次数	平均细胞计数 (cells)	平均测定结果 (10^6)	平均观察到的种类 (属)	相对标准偏差 (%)
原水样	18	38	3.8	6	29.75
10 倍浓缩	14	253.71	2.54	11	17.88
100 倍浓缩	14	1003.64	1.00	14	7.55
行格法					
浓缩倍数	重复测定次数	平均细胞计数 (cells)	平均测定结果 (10^6)	平均观察到的种类 (属)	相对标准偏差 (%)
原水样	19	84.84	2.83	9	28.36
10 倍浓缩	14	657.79	2.19	14	7.27
100 倍浓缩	计数时间过长，藻类计数框试样干枯				
全片法					
浓缩倍数	重复测定次数	平均细胞计数 (cells)	平均测定结果 (10^6)	平均观察到的种类 (属)	相对标准偏差 (%)
原水样	15	266.6	2.67	12	28.91
10 倍浓缩	4	1996	2.00	16	8.87
100 倍浓缩	计数时间过长，藻类计数框试样干枯				

表 5-4 中营养湖浮游藻类藻细胞密度重复测定结果汇总

对角线法					
浓缩倍数	重复测定次数	平均细胞计数 (cells)	平均测定结果 (10 ⁷)	平均观察到的 种类(属)	相对标准偏差 (%)
10 倍稀释	7	24.71	2.47	4	45
原水样	7	223.71	2.24	10	34
10 倍浓缩	7	1645.71	1.65	18	13
行格法					
浓缩倍数	重复测定次数	平均细胞计数 (cells)	平均测定结果 (10 ⁷)	平均观察到的 种类(属)	相对标准偏差 (%)
10 倍稀释	7	73.29	2.44	5	41
原水样	7	585.29	1.95	12	18
10 倍浓缩	7	3229.57	1.08	18	5.4
全片法					
浓缩倍数	重复测定次数	平均细胞计数 (cells)	平均测定结果 (10 ⁷)	平均观察到的 种类(属)	相对标准偏差 (%)
10 倍稀释	7	189	1.89	9	26
原水样	7	1721.57	1.72	13	12
10 倍浓缩	计数时间过长, 藻类计数框试样干枯				

表 5-5 富营养湖浮游藻类细胞密度重复测定结果汇总

对角线法					
稀释倍数	重复测定次数	平均细胞计数 (cells)	平均测定结果 (10 ⁸)	平均观察到的 种类(属)	相对标准偏差 (%)
100 倍稀释	7	39.29	3.93	3	14
10 倍稀释	7	109.86	1.10	3	8.6
原水	7	842.86	0.84	2	5.8
行格法					
稀释倍数	重复测定次数	平均细胞计数 (cells)	平均测定结果 (10 ⁸)	平均观察到的 种类(属)	相对标准偏差 (%)
100 倍稀释	7	64	2.13	3	35
10 倍稀释	7	455.57	1.52	5	10
原水	7	3859	1.29	8	4.2
全片法					
稀释倍数	重复测定次数	平均细胞计数 (cells)	平均测定结果 (10 ⁸)	平均观察到的 种类(属)	相对标准偏差 (%)
100 倍稀释	7	152.14	1.52	3	9.6

2016 年 1 月 26 日环保部标准研究所组织召开了本标准研制专家研讨会, 专家提出在原有 3 种计数方式的基础上增加随机视野计数方式。

按照专家意见, 标准编制组开展了随机视野计数方式影响因素的补充研究。对浮游植物

细胞密度水平为 10^8 cells/L 的同一份滇池水样，分别按照 50 个、100 个、150 个、200 个、250 个、300 个随机视野，分别进行了重复测定（表 5-6）。

表 5-6 不同视野数测定结果的精密度（用相对标准偏差表示）

随机视野数 (个)	视野面积占总面积 的比例 (%)	重复测定 次数	平均浮游植物 细胞计数量 (cells)	平均测定结果 (10^8 cells/L)	相对标准 偏差 (%)
50	1.13	7	158	1.39	13
100	2.27	7	299	1.32	11
150	3.40	7	444	1.30	9.8
200	4.54	7	594	1.31	8.2
250	5.67	7	731	1.29	8.8
300	6.80	7	881	1.29	9.0

通过对实验数据的分析和总结，明确了对显微镜计数法的性能具有显著影响的因素，以及每种计数方式的适用范围。

5.7.1 最小计数量的确定

根据测定结果（见表 5-3~表 5-5），发现如下规律：

1) 在同一浓缩倍数下，分别应用 3 种计数法进行重复测定，所观察到的平均浮游藻类的种类数量为：全片计数法>行格计数法>对角线计数法；

2) 应用同种计数方式，对不同浓缩/稀释倍数的水样进行重复测定，所观察到的平均浮游藻类的种类数量为：浓缩 100 倍>浓缩 10 倍>原水；对于滇池水样则是：原水>稀释 10 倍>稀释 100 倍；

3) 在同一浓缩倍数下，分别应用 3 种计数法进行重复测定，重复测定结果的相对标准偏差为：全片计数法<行格计数法<对角线计数法；

4) 应用同种计数方式，对不同浓缩/稀释倍数的水样进行重复测定，重复测定结果的相对标准偏差为：浓缩 100 倍<浓缩 10 倍<原水；对于滇池水样则是：原水<稀释 10 倍<稀释 100 倍；

总结以上规律发现：采用全片计数法和对水样进行浓缩处理，增加了浮游植物细胞的计数量，一方面能够增加所观察到的浮游植物的种类数量，另一方面还能够提高测定结果的精密度（以重复测定结果间的相对标准偏差表示）。

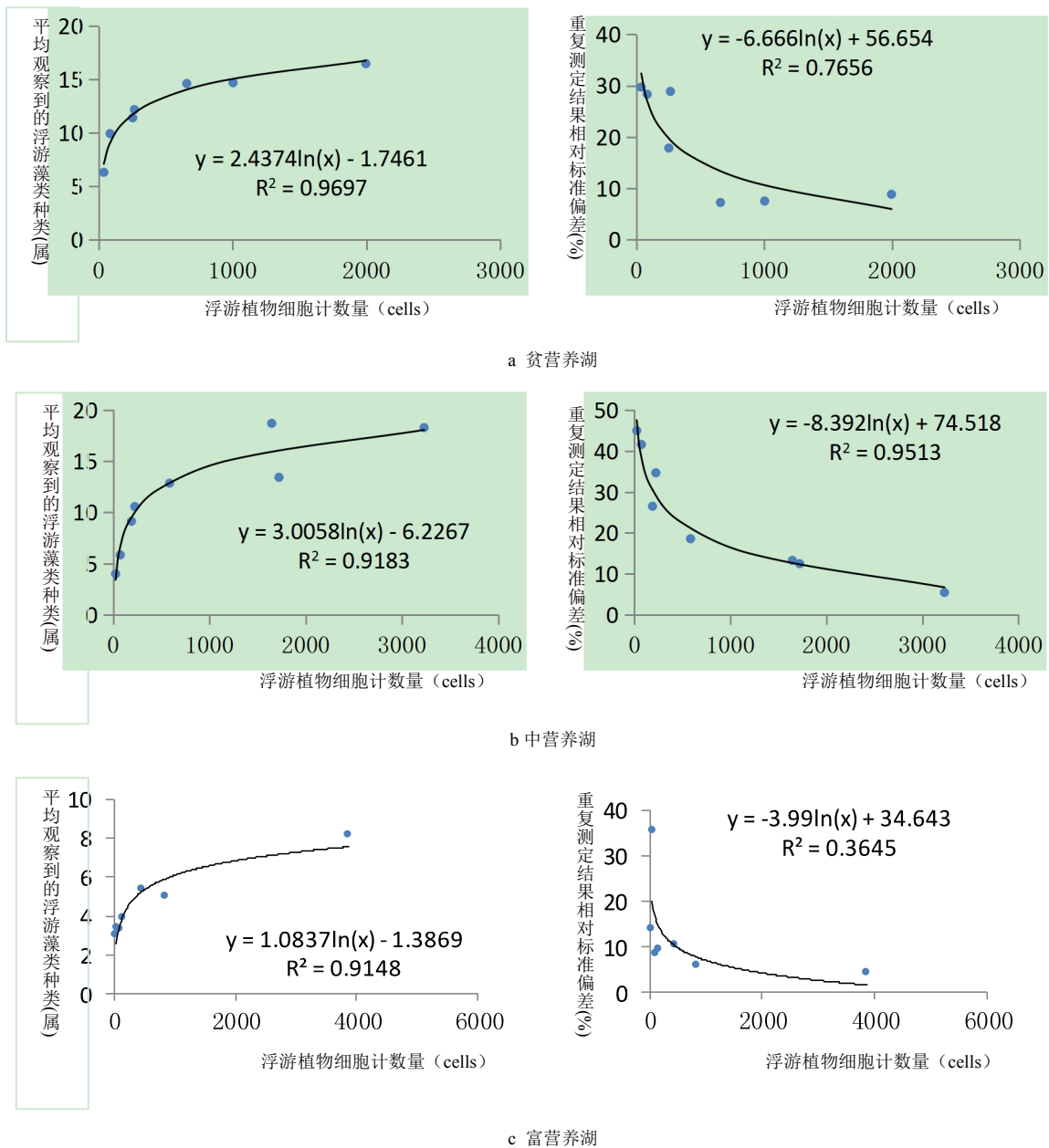


图 5-4 细胞计数量与平均观察到的种类数、重复测定相对标准偏差的关系

通过建立浮游植物细胞的计数量与观察到的浮游植物的种类数、以及与重复测定结果相对标准偏差间的关系，发现：

- 1) 随着浮游植物细胞计数量的增加，能够增加观察到的浮游植物种类数，并提高测定的精密度；
- 2) 随着浮游植物细胞计数量的继续增加，观察到的种类数和测定的精密度会逐渐趋于稳定；
- 3) 浮游植物细胞的计数量与平均观察到的浮游植物种类数，以及与测定的精密度呈一定的对数关系。

细胞计数量与平均观察到的种类数、重复测定相对标准偏差的关系见图 5-4。

根据试验结果（表 5-3~表 5-5、图 5-4），利用拟合方程估算不同精密度（重复测定结果间的相对标准偏差为：5%、10%、15%）下浮游植物细胞的最少计数量，详见表 5-7。

表5-7 不同精密度下浮游植物细胞最少计数量的估算结果

湖泊类型	拟合方程	不同精密度下浮游植物细胞最少计数量 (cells)		
		5%	10%	15%
贫营养湖	$y = -6.666 \ln(x) + 56.654$	2318.95	1095.31	517.35
中营养湖	$y = -8.392 \ln(x) + 74.518$	3959.35	2182.07	1202.58
富营养湖	$y = -3.99 \ln(x) + 34.643$	1684.66	481.15	137.42

从表 5-7 可知，当重复测定结果间的相对标准偏差要求为 15% 时，对于贫营养型湖泊，需要最少计数约 500 cells；对于中营养型湖泊，需要最少计数约 1200 cells；对于富营养型湖泊，需要最少计数约 140 cells。

对于不同营养型的湖泊，达到精密度要求的最小计数量不同。对于富营养型湖泊较少的计数量就可以达到精密度的要求。对于中营养型和贫营养型湖泊，则需要较多的计数量。

不同湖泊最少计数量不同的主要原因是：富营养型湖泊（例如滇池），浮游植物的种类较为单一，微囊藻作为优势种，其数量常常占到浮游植物总细胞数量的 80% 以上。因此，在显微镜计数中，测定人员能够将注意力集中在少数种类的浮游植物上，有利于提高测定的精密度。中营养型湖泊（例如洱海）和贫营养型湖泊（例如抚仙湖），浮游植物的种类较多且形态各异，呈现出种类较多但每种数量较少的特点，在显微镜计数中，测定人员需将较多的精力用于分辨浮游植物种类，影响了测定的精密度。

根据随机视野法的补充研究，同样发现浮游植物细胞计数量对测定结果的精密度具有显著的影响。随着视野数的增加，浮游植物细胞计数量也随之增加，同时测定结果的精密度也越好。当浮游植物细胞计数量超过 594 cells 时，精密度稳定在 9.04%~8.20%。详见图 5-5 不同视野数测定结果的精密度。从图 5-5 的实验结果和拟合方程估算结果来看，当藻细胞计数量为 500 cells 时，随机视野法重复测定结果间的相对标准偏差小于 10%。

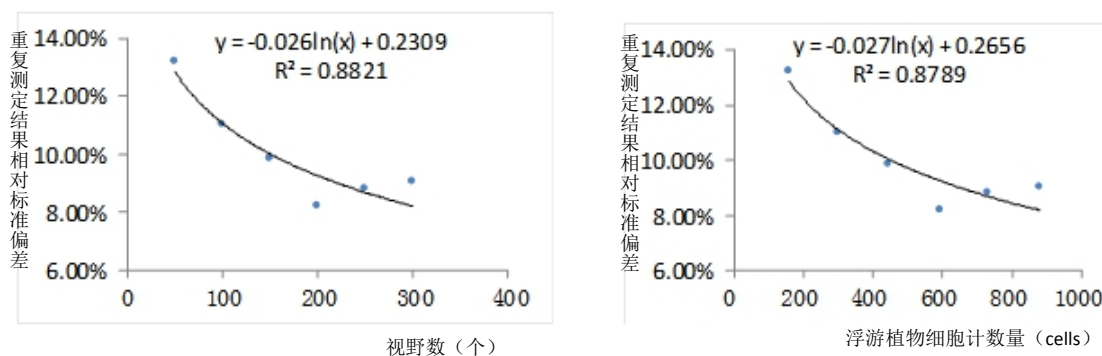


图 5-5 不同视野数测定结果的精密度

综合考虑测定人员的工作量和测定时间需控制在可以接受的范围内,同时又能达到测定不同营养型湖泊的精密度要求,因此规定:每次显微镜计数,浮游植物细胞的总计数量最少不低于 500 cells,当测定精密度难以达到质量控制要求时,可适当增加浮游植物细胞的总计数量,即:每次显微镜计数,浮游植物细胞的总计数量应有 500 cells~1500 cells。

5.7.2 适宜测定的密度和 4 种计数方式的适用范围

以浮游植物细胞的总计数量应有 500 cells~1500 cells 为基础,结合 4 种计数方式的特点,在加入计数框中的 0.1ml 样品应含有 500 个~10000 个细胞,并得出适宜测定的样品中藻细胞的密度为: 10^7 cells/L~ 10^8 cells/L。

根据加入计数框中 0.1 ml 样品含有的细胞个数,选用适宜的计数方式,以确保在测定过程中有 500~1500 个浮游植物细胞被观察和计数。4 种计数方式的观察面积占计数框面积的比例不同,按照观察面积排列:全片>行格>对角线>随机视野计数方式,因此它们的适用范围不同。4 种计数方式的测定范围为表 5-8。

表 5-8 4 种计数方式的适用范围

样品中浮游植物细胞的密度 (cells/L)	0.1 ml 样品中浮游植物细胞的数量 (cells)	适宜的计数方式
$0.5 \times 10^7 \sim 1.5 \times 10^7$	500~1500	全片计数
$1.5 \times 10^7 \sim 5.0 \times 10^7$	1500~5000	行格计数
$5.0 \times 10^7 \sim 1.0 \times 10^8$	5000~10000	对角线计数、随机视野

在实际测定工作中,应首先将水样中的浮游植物细胞密度调整至 10^7 cells/L~ 10^8 cells/L,使 0.1 ml 试样中含有 500~10000 个细胞,再参照表 10 选用适合的计数方式,以确保在测定过程中有 500~1500 个浮游植物细胞被观察和计数。

5.7.3 浮游植物在计数框中的分布对测定精密度的影响

《Water quality-—Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopy》(BS EN 15204: 2006) 很重视浮游植物在计数框中的分布,认为浮游植物随机分布是准确测定和估计测量不确定度的前提。

三家实验室用对角线计数方式,重复测定洱海、抚仙湖和滇池水样。统计分析测定结果(表 5-9)发现:当浮游植物在计数框中越符合泊松分布,重复测定结果的一致性越好。

表 5-9 三家实验室重复测定结果及统计分析结果

实验室	重复	第 1 格	第 2 格	第 3 格	第 4 格	第 5 格	第 6 格	第 7 格	第 8 格	第 9 格	第 10 格	测定结果 (cells/L)	Kolmogorov-Smirnov 泊松分布符合检验 渐进显著性 (双侧)	相对标准 偏差 (%)
A	1	0	13	4	14	10	14	16	15	4	5	9.5×10 ⁶	0.000	40
	2	3	0	7	27	2	0	3	2	2	5	5.1×10 ⁶		
	3	2	0	22	6	10	2	0	5	8	8	6.3×10 ⁶		
	4	1	1	12	1	1	2	3	4	20	2	4.7×10 ⁶		
	5	15	31	40	7	0	0	6	1	12	5	1.2×10 ⁷		
	6	10	8	5	6	5	12	11	2	1	0	6.0×10 ⁶		
	7	1	5	12	6	5	0	7	5	2	0	4.3×10 ⁶		
B	1	2	4	6	7	6	6	5	4	0	2	4.2×10 ⁶	0.274	21
	2	2	6	11	8	2	9	1	3	7	5	5.4×10 ⁶		
	3	5	4	5	8	1	8	0	6	4	5	4.6×10 ⁶		
	4	5	0	3	6	5	6	6	4	1	2	3.8×10 ⁶		
	5	2	3	6	2	4	2	2	2	1	2	2.6×10 ⁶		
	6	4	7	3	4	6	3	8	1	2	1	3.9×10 ⁶		
	7	3	2	6	7	4	5	2	1	0	5	3.5×10 ⁶		
C	1	7	5	9	8	15	6	12	5	13	6	8.6×10 ⁶	0.534	12
	2	5	5	11	5	18	11	12	13	13	6	9.9×10 ⁶		
	3	11	12	5	7	8	16	8	7	6	13	9.3×10 ⁶		
	4	17	5	6	5	12	10	8	9	6	5	8.3×10 ⁶		
	5	9	9	9	10	9	8	9	5	8	12	8.8×10 ⁶		
	6	6	8	5	9	11	5	6	7	5	8	7.0×10 ⁶		
	7	7	11	6	8	6	9	5	6	8	7	7.3×10 ⁶		

对于仅观察计数框中部分区域的计数方式（对角线、行格、随机视野计数方式），浮游植物在计数框中的分布对测定的精密度有较大影响。因此，需对浮游植物在计数框中的分布提出要求和检查措施：在开始计数前在显微镜的低放大倍数下，对浮游植物在计数框中的分布进行确认，当满足随机分布时才开始计数。

5.7.4 显微镜计数法检出限的研究

《环境监测 分析方法标准制修订技术导则》（HJ 168-2010）的方法检出限定义为：用特定分析方法在给定的置信度内可从样品中定性检出待测物质的最低浓度或最小量。一般确定方法为：按照样品分析的全部步骤，重复 n ($n \geq 7$) 次空白试验，将各测定结果换算为样品中的浓度或含量，计算 n 次平行测定的标准偏差，按式 12 计算方法检出限。

$$MDL = t_{(n-1,0.99)} \times S \quad (12)$$

式中： MDL ——方法检出限

n ——样品的平行测定次数；

t ——自由度为 $n-1$ ，置信度为 99% 时的 t 分布（单侧）；

S —— n 次平行测定的标准偏差。

由于浮游植物测定的显微镜计数法与化学分析方法有很大的不同，很难应用《导则》中规定的方法确定本方法的检出限。

借鉴欧盟标准《Water quality-Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopy》（BS EN 15204: 2006）^[11]中对浮游植物类检出限的计算方法，将本方法的检出限定义为：对于单种藻类，在单次计数过程中，发现它的概率不低于 99% 时最低的藻细胞密度即为检出限”。

由于在低密度水平时，藻细胞在计数框上的分布符合泊松分布。使用泊松分布模型（式 13），计算满足上述检出限定义的藻细胞密度。

$$P(x) = \left(\frac{e^{-\lambda} \lambda^x}{x!} \right)^n \quad (13)$$

式中： $P(x)$ ——单个计数格中出现 x 个藻细胞时的概率；

λ ——单个计数格中浮游植物细胞平均数量，个；

x ——预计单个计数格中浮游植物细胞的数量，个；

n ——观察的计数格数，个。

为了便于计算，并结合本测定方法，将检出限的定义适当转化为：对于单种藻类，连续观察 n 个计数格，未发现它的概率为 0.01 时，所对应的水样中的浮游植物细胞密度。根据检出限的定义： $P(x) = 0.01$ 、 $x=0$ ，求 λ 。带入式 13 得到式 14：

$$\lambda = -\frac{1}{n} \ln 0.01 \quad (14)$$

式中： λ ——单个计数格中浮游植物细胞平均数量，个；

n ——观察的计数格数，个；

再将 λ 的计算结果带入式 15，即可得出到检出限。

$$DL = N\lambda/v \quad (15)$$

式中： DL ——检出限，cells/L；

N ——计数框中计数格的总数，个；

v ——加入计数框中的水样的体积，L。

在本方法中 $N=100$ 个， $v=0.0001$ L。

对角线计数法的检出限：从 100 个计数格中，对位于对角线的 10 个 ($n=10$) 进行观察和计数，当每个计数格中的藻细胞数量均为 0 的概率为 0.01 时，根据式 9 和式 10 求得 $\lambda=0.46$ 个、 $DL=4.6 \times 10^5$ cells/L。

行格计数法的检出限：对位于 2、5、8 行的 30 个 ($n=30$) 计数格进行观察和计数，检出限为 $DL=1.5 \times 10^5$ cells/L。

全片计数法的检出限：当对整个计数框中全部 100 个计数格逐一观察、计数时，如果观察过程十分细致，计数框中仅有 1 个浮游植物细胞也能够被检出。因此，决定检出限的步骤为：从样品中吸取 0.1 ml 装入计数框时，吸取到 0 个藻细胞的概率为 0.01 时，样品中藻细胞的密度。此时需将式 13、式 14 中各参数的意义调整为：

$P(x)$ ——0.1 ml 水样中含有 x 个藻细胞时的概率；

λ ——0.1 ml 中含有藻细胞的平均数量，个

x ——预计 0.1 ml 水样中含有藻细胞的数量，个

n ——从水样中取样的次数，次。

将式 15 改为式 16：

$$DL = \lambda/v \quad (16)$$

式中： DL ——检出限，cells/L；

v ——吸取水样的体积，L。

此时： $P(x)=0.01$ ， $x=0$ 个， $n=1$ 次， $v=0.0001$ L，代入公式后求 $\lambda=4.6$ 个、全片计数法的 $DL=4.6 \times 10^4$ cells/L。

随机视野法的检出限与观察的视野数、视野面积和计数框面积有关，可按照式 17 和式 18 进行计算：

$$\lambda = -\frac{1}{n} \ln 0.01 \quad (17)$$

$$DL = \frac{\lambda \times S}{s \times v} \times 10^8 \quad (18)$$

式中： λ ——单个视野中浮游植物细胞平均数量，个

n ——随机视野数，个

DL ——检出限，cells/L；

S ——计数框的面积， cm^2 ；

s ——一个视野的面积， μm^2 ；

v ——加入计数框中的水样的体积，L。

在本研究中，对显微镜经校准得知放大倍数为 400 倍时，1 个视野的面积为 $s=90716.80 \mu\text{m}^2$ ，计数框的面积为 $S=4 \text{ cm}^2$ 。在观察了 $n=300$ 个随机视野的情况下，经计算随机视野法的检出限 $DL=6.8 \times 10^5$ cells/L。

根据以上计算结果，在不对水样进行浓缩/稀释处理的情况下，对角线计数、行格计数、全片计数和随机视野计数方式的检出限见表 5-10。

表 5-10 4 种计数方式的检出限

计数方法	对角线计数	行格计数	全片计数	随机视野计数
检出限 (cells/L)	4.6×10^5	1.5×10^5	4.6×10^4	6.8×10^5

注：使用 0.1 ml 计数框、样品浓缩 50 倍时，本方法的检出限：对角线方式为 9.2×10^3 cells/L；行格方式为 3.0×10^3 cells/L；全片方式为 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。

5.8 结果计算与表示

5.8.1 浮游植物细胞密度

$$N = 1000 \times \frac{A}{A_c} \times \frac{n}{V} \times \frac{V_1}{V_0} \quad (19)$$

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， mm^2 ；

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， mm^2 ；

V ——计数框体积，mL；

V_0 ——稀释或浓缩前的取样体积，mL；

V_1 ——稀释或浓缩后的体积，mL。

5.8.2 优势度

某一属（门）的优势度可采用公式（式 20）计算：

$$D = \frac{a_i}{a} \times 100\% \quad (20)$$

式中： D ——某一属（门）的优势度；

a_i ——为某一属（门）浮游植物细胞数量；

a ——所有种类浮游植物细胞总数。

5.9 精密度

云南省生态环境监测中心、云南省生态环境厅驻昆明市生态环境监测站、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按照本方法，分别采集富营养、中营养、贫营养湖泊水样，用稀释或浓缩方式将水样中的浮游藻类密度调整至 10^6 cells/L、 10^7 cells/L、 10^8 cells/L 水平后，用全片计数法、行格计数法、对角线计数法，对每一浓度样品计数 7 次，报出 7 次计数结果（表 5-11~表 5-13）。

表 5-11 贫营养湖泊的实验室内相对标准偏差

水样浓度	方法	1	2	3	4	5	6	7	均值	相对标准偏差 (%)	平均观察到的种类 (属)	
XA 10 ⁶	全片	2.05	1.68	3.68	2.33	2.85	2.85	3.58	2.72	27	12	
	行格	3.38	3.12	2.4	3.52	3.38	2.47	2.58	2.98	16	9	
	对角	4.10	4.25	3.01	5.02	3.65	3.35	4.5	3.98	17	6	
XB 10 ⁷	全片	计数时间过长, 藻类计数框干枯										
	行格*	2.13	2.27	2.12	2.12	2.39	2.05	2.27	2.17	5.5	14	
	对角	3.00	2.94	2.14	2.48	2.21	2.01	3.00	2.54	17	11	
XC 10 ⁸	全片	计数时间过长, 藻类计数框干枯										
	行格	计数时间过长, 藻类计数框干枯										
	对角*	1.14	1.00	0.99	1.03	0.95	0.92	1.00	1.00	6.5	14	

表 5-12 中营养湖泊的实验室内相对标准偏差

水样浓度	方法	1	2	3	4	5	6	7	均值	相对标准偏差 (%)	平均观察到的种类 (属)	
XA 10 ⁶	全片	1.57	2.72	2.07	1.68	2.34	1.49	1.36	1.89	26	9	
	行格	3.23	1.87	4.27	2.33	1.53	1.40	2.47	2.44	41	6	
	对角	3.20	1.60	3.70	4.00	1.60	1.50	1.70	2.47	45	4	
XB 10 ⁷	全片*	1.74	1.48	1.57	1.89	2.10	1.72	1.55	1.72	12	13	
	行格*	1.72	1.59	1.88	2.42	1.71	1.82	2.51	1.95	18	13	
	对角	3.57	1.72	2.75	1.97	2.62	1.68	1.35	2.24	34	11	
XC 10 ⁸	全片	计数时间过长, 藻类计数框干枯										
	行格	1.08	1.02	1.04	1.11	1.12	1.17	1.01	1.08	5.4	18	
	对角*	1.92	1.28	1.51	1.86	1.70	1.70	1.55	1.65	13	19	

表 5-13 富营养湖泊的实验室内相对标准偏差

水样浓度	方法	1	2	3	4	5	6	7	均值	相对标准偏差 (%)	平均观察到的种类 (属)	
XA 10 ⁶	全片	1.72	1.33	1.41	1.61	1.67	1.45	1.46	1.52	9.6	3	
	行格	1.73	2.86	2.10	3.43	1.87	1.70	1.23	2.13	35	3	
	对角	4.60	4.12	3.50	3.21	4.60	3.50	4.01	3.93	14	3	
XB 10 ⁷	全片*	1.48	1.21	1.22	1.45	1.24	-	-	1.32	10	7	
	行格*	1.63	1.76	1.42	1.61	1.51	1.30	1.41	1.52	10	5	
	对角	1.03	1.21	1.15	1.05	1.22	0.98	1.05	1.10	8.6	3	
XC 10 ⁸	全片	计数时间过长, 藻类计数框干枯										
	行格	1.19	1.33	1.30	1.30	1.30	-	-	1.28	4.2	8	
	对角*	0.828	0.785	0.910	0.866	0.778	0.877	0.856	0.84	5.8	2	

注: *为采用表 10 推荐的方法进行测定

云南省生态环境监测中心对浮游藻类细胞密度水平为 10^8 cells/L 的同一份滇池水样，采用随机视野法，在 50 个、100 个、150 个、200 个、250 个、300 个随机视野下，进行 7 次重复测定。测定结果列于表 5-14 中。

表 5-14 随机视野法测定富营养型湖泊的实验室内相对标准偏差

随机视野数	重复测定结果 (10^8 cells/L)							平均测定结果 (10^8 cells/L)	相对标准偏差 (%)
	1	2	3	4	5	6	7		
50	1.68	1.48	1.43	1.38	1.44	1.09	1.24	1.39	13
100	1.62	1.26	1.38	1.31	1.21	1.22	1.23	1.32	11
150	1.52	1.41	1.26	1.27	1.33	1.21	1.13	1.30	9.8
200*	1.47	1.29	1.40	1.27	1.36	1.19	1.19	1.31	8.2
250*	1.49	1.32	1.34	1.25	1.31	1.17	1.15	1.29	8.8
300*	1.50	1.29	1.35	1.25	1.33	1.16	1.17	1.29	9.0

注：*为采用表 10 推荐的方法进行测定

汇总分析各实验室按照表 10 推荐的方法进行重复测定的结果，全片计数方式的相对标准偏差为 10.1%~12.5%、行格计数方式相对标准偏差为 5.5%~18.6%、对角线计数方式相对标准偏差为 5.8%~13.3%、随机视野方式相对标准偏差为 8.2%~9.0%。详见表 5-15。

表 5-15 各实验室内 4 种计数方式的相对标准偏差汇总表

计数方式	相对标准偏差 (%)	
	范围	平均
全片计数	10~12	11
行格计数	5.5~18	11
对角线计数	5.8~13	8.5
随机视野	8.2~9.0	8.6

5.10 质量保证和质量控制

5.10.1 浮游植物分布均匀性

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。计数前，应在低倍数下观察整个计数框，确认浮游植物在计数框中的分布情况。分布不符合要求时，应重新取样后再次确认。浮游植物细胞在计数框中的分布要求见示意图 5-6。

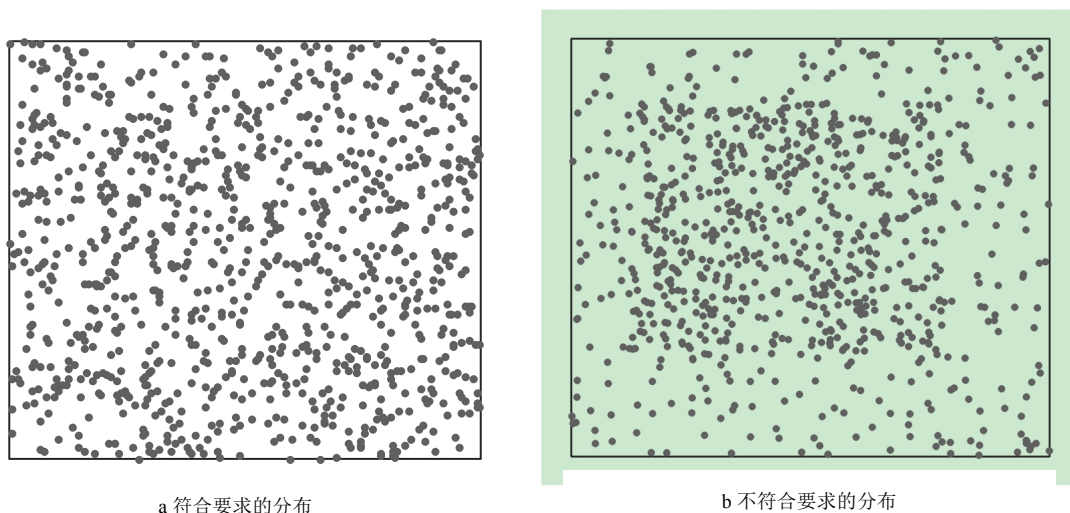


图 5-6 浮游植物细胞在计数框中的分布要求示意图

5.10.2 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。

5.10.3 精密度控制

每一样品测定两次。两次计数结果相对偏差应不大于 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小于 15%的两次计数结果的平均值。

5.11 注意事项

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, 则按照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。

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。

6 方法验证

6.1 方法验证方案

6.1.1 验证实验室和人员情况

有 6 家单位参加了方法验证工作, 参与方法验证的实验室、验证人员的基本情况见表 6-1。

表 6-1 参与方法验证实验室、验证人员基本情况表

姓名	性别	年龄	职务或职称	所学专业	参加分析 工作年限	所在单位名称
汤琳	女	42	教授级高级工程师	生物监测	17	上海市环境监测中心
朱梦杰	女	35	工程师	生物监测	13	
李仁辉	男	52	研究员	浮游植物研究	30	中科院水生生物研究所
马苏超	男	25	在读研究生	水生生物	3	
李娅萍	女	39	高级工程师	生物监测	15	云南省生态环境厅 驻昆明市生态环境 监测站
黄丽娟	女	37	工程师	监测分析	11	
张军毅	男	35	高级工程师	生物监测	9	江苏省无锡环境监 测中心
朱冰川	女	31	工程师	生物监测	7	
刘绍俊	男	32	工程师	监测分析	5	云南省生态环境厅 驻玉溪市生态环境 监测站
杨一艳	女	29	助理工程师	监测分析	3	云南省生态环境厅 驻大理州生态环境 监测站

6.1.2 方法验证方案

根据《环境监测分析方法标准制修订技术导则》(HJ 168-2010)和《国家环境保护标准制修订工作管理办法》(以下简称“导则”)的要求,组织了6家有资质的实验室进行验证。根据影响方法精密度的主要因素和数理统计学的要求,编制方法验证方案,确定样品含量水平、分析人员、分析设备、分析时间、分析方法及重复测定次数等。验证内容主要包括实验室内精密度和实验室间精密度,验证单位按HJ 168-2010中表D1-5的要求完成方法验证报告。

6家实验室按照方法操作步骤,对4个微囊藻细胞密度水平分别为: 1×10^7 cells/L、 3×10^7 cells/L、 5×10^7 cells/L、 1×10^8 cells/L的水样,分别用表6-2所对应的方法,平行测定7次后,分别计算微囊藻细胞密度测定结果、实验室内相对标准偏差、实验室间相对标准偏差、重复性限、再现性等各项参数。

表 6-2 测定不同微囊藻密度水平样品适宜的计数方法

样品编号	微囊藻密度水平 (cells/L)	适合的计数方式
1	1×10^7	全片计数
2	3×10^7	行格计数
3	5×10^7	对角线计数
4	1×10^8	随机视野

6.2 方法验证过程

6.2.1 工作过程

联系并确定 6 家方法验证单位。按照方法验证方案准备实验用品，与验证单位确定验证时间。在方法验证前，对参加验证的试验人员说明验证内容、要求及步骤方法，对试验过程中有疑问或有问题的地方进行解答或指导，统一发放验证样品。按《环境监测分析方法标准制订技术导则》（HJ 168-2010）的规定，提供验证报告表格。

方法各项特性指标达到预期要求。具体的方法验证报告，见附件一。

6.2.2 方法验证结论

1) 全片计数法

6 家实验室对浮游植物细胞密度为 1×10^7 cells/L 的样品进行测定，重复测定 7 次，实验室内相对标准偏差为 2.4%~11%，实验室间相对标准偏差为 22%，实验室间 95%置信区间为 0.86×10^7 cells/L~ 1.30×10^7 cells/L。

2) 行格计数法

6 家实验室对浮游植物细胞密度为 3×10^7 cells/L 的样品进行测定，重复测定 7 次，实验室内相对标准偏差为 2.9%~10%，实验室间相对标准偏差为 5.6%，实验室间 95%置信区间为 3.08×10^7 cells/L~ 3.47×10^7 cells/L。

3) 对角线计数法

6 家实验室对浮游植物细胞密度为 5×10^7 cells/L 的样品进行测定，重复测定 7 次，实验室内相对标准偏差为 2.7%~11%，实验室间相对标准偏差为 7.1%，实验室间 95%置信区间为 5.20×10^7 cells/L~ 5.99×10^7 cells/L。

4) 随机视野计数法

6 家实验室对浮游植物细胞密度为 1×10^8 cells/L 的样品进行测定，重复测定 7 次，实验室内相对标准偏差为 4.8%~8.2%，实验室间相对标准偏差为 21%，实验室间 95%置信区间为 0.96×10^8 cells/L~ 1.43×10^8 cells/L。

该方法实验室内相对偏差、实验室间相对偏差的最终值达到预期要求。具体的方法验证报告，见附件一。

7 方法比对

根据 2019 年 3 月 27 日在北京召开的《水质 浮游植物的测定 显微镜计数法》国家环境保护标准研讨会的专家意见，云南省生态环境监测中心对《水质 浮游植物的测定 显微镜计数法》和《水质 浮游植物的测定 滤膜法》开展了方法比对实验。

7.1 比对依据

- 1) 《水质 浮游植物的测定 显微镜计数法》（征求意见稿）
- 2) 《水质 浮游植物的测定 滤膜法》（征求意见稿）
- 3) 《环境监测分析方法标准制修订技术导则》（修订 HJ 168-2010 征求意见稿）

7.2 比对内容和方法

根据《环境监测分析方法标准制修订技术导则》(HJ 168-2020)中有关要求, 比对内容为“测定结果显著性差异检验”, 即: 采用配对样品 t 检验判定两种方法的测定结果是否具有显著差异。具体方法为:

1) 采集并制备 10 个浓度(含量)水平接近的实际样品, 分别用 2 种方法进行测定, 获得 10 组配对测定数据, 并计算配对差值, 见表 7-1。

表 7-1 配对测定记录表

样本编号	显微镜计数法测定结果 (cells/L)	滤膜法测定结果 (cells/L)	配对差值 (cells/L)
1	A ₁	B ₁	d ₁
2	A ₂	B ₂	d ₂
3	A ₃	B ₃	d ₃
4	A ₄	B ₄	d ₄
5	A ₅	B ₅	d ₅
6	A ₆	B ₆	d ₆
7	A ₇	B ₇	d ₇
8	A ₈	B ₈	d ₈
9	A ₉	B ₉	d ₉
10	A ₁₀	B ₁₀	d ₁₀

2) 获得配对差值的算术平均值 \bar{d} 、及配对差值的标准差 S_d ;

3) 按式 21 计算检验统计量;

$$t = \frac{\bar{d}}{S_d/\sqrt{n}} \sim t(n-1, 0.95) \quad (21)$$

4) 若 $P(T \leq t)$ 双尾” $< \alpha=0.05$ 则两种方法的测定结果有显著差异; 反之, 则两种方法的测定结果没有显著差异。

7.3 比对过程

云南省生态环境监测中心于 2019 年 11 月 12 日采集了抚仙湖 10 个点的水样(采样点如图 1), 全部样品按照每 1000 ml 加入 15 ml 鲁哥氏液的方法保存。经初步镜检后, 采用沉淀浓缩法制备成浮游植物细胞密度水平为 10^7 cells/L 的 10 个样品。每个样品经充分混匀后均分为 2 份, 分别按照《水质 浮游植物的测定 显微镜计数法》和《水质 浮游植物的测定 滤膜法》进行测定。

7.4 比对结果

云南省生态环境监测中心于 2019 年 11 月 29 日, 同一检测人员采用同一显微镜, 采用 2 个方法完成全部样品的平行测定。10 个样品两片计数结果的相对偏差分别为: 显微镜计数法 3.21%~13.69%、滤膜法 0.29%~18.46%, 均达到方法质控指标要求。测定结果和统计检验结果见表 7-2。

表 7-2 测定结果和检验统计量

样品编号	测定结果 (cells/L)		配对差值 (cells/L)
	显微镜法	滤膜法	
1	5.15×10^7	1.75×10^7	3.40×10^7
2	6.20×10^7	1.94×10^7	4.26×10^7
3	5.15×10^7	1.77×10^7	3.38×10^7
4	6.28×10^7	1.68×10^7	4.60×10^7
5	6.08×10^7	1.26×10^7	4.82×10^7
6	7.04×10^7	1.63×10^7	5.41×10^7
7	6.29×10^7	1.62×10^7	4.67×10^7
8	6.05×10^7	1.50×10^7	4.55×10^7
9	5.24×10^7	1.33×10^7	3.91×10^7
10	5.19×10^7	1.26×10^7	3.93×10^7
配对差值的算数平均值 \bar{d} (cells/L)			4.29×10^7
配对差值的标准差 S_d (cells/L)			6.46×10^6
检验统计量 t			21.01

7.5 比对结论

经查 t 值表（双尾），当自由度为 10， P 为 0.05 时， $T=2.228$ 。根据表 2 检验统计结果（ $t=21.01$ ）， $P(T \leq t)$ 双尾” $< \alpha=0.05$ ，说明《水质 浮游植物的测定 显微镜计数法》和《水质 浮游植物的测定 滤膜法》的测定结果有显著差异。

《水质 浮游植物的测定 滤膜法》测定结果显著低于《水质 浮游植物的测定 显微镜计数法》的主要原因是：滤膜法在制片过程中，需要在 70 °C 烘箱中干燥 2 h。虽然滤膜表面有油膜保护，但浮游植物细胞结构极其脆弱，在高温条件下形状及颜色易发生变化，主要表现为细胞变小，颜色变淡，在显微镜计数中增加了辨识难度。

8 与开题报告的差异说明

本标准原名称为《水质 浮游藻类藻密度的测定 对角线法》。

2015 年 1 月 22 日开题论证时，专家建议将标准名称改为《水质 浮游藻类藻密度的测定 显微镜计数法》。

2016 年 1 月 26 日方法验证前，召开的专家研讨会提出将标准名称改为《水质 浮游植物的测定 显微镜计数法》。

计数方式由原来申请立项的 1 种藻密度测定方式（对角线）增加到了 4 种藻密度测定方式（对角线、行格、全片、随机视野）。

9 参考文献

- [1] 黄祥飞. 湖泊生态调查观测与分析[M]. 北京:中国标准出版社, 1999.
- [2] 刘晓江, 施心路, 齐桂兰等. 淡水藻类在监测水质和净化污水中的应用[J]. 生物学杂志, 2010, 27(6): 76-78,86.
- [3] Corner E.D.S. & Davies A.G.. Plankton as a factor in the nitrogen and phosphorus cycles in the sea[J]. *Advances in Marine Biology*, 1971, 9: 101-204.
- [4] APHA, AWWA and WPCF. Standard methods for the examination of water and wastewater, 20th edition[M]. Washington: American Public Health Association, 1999.
- [5] 宋 芬, 王卫民, 单保庆等. 马颊河与徒骇河浮游植物群落特征及水质初步评价[J]. 华中农业大学学报, 2011, 30(3): 364-370.
- [6] 王亚尼, 周序协, 张桂蓉等. 大茶湖浮游藻类调查与水质初步评价[J]. 华中农业大学学报, 2013, 32(3): 118-123.
- [7] 周春丽. 滇池浮游生物周年演替及其重污染湖湾生态修复前后浮游生物的变动规律[D]. 武汉: 中国科学院水生生物研究所, 2009.
- [8] 况琪军, 马沛明, 胡征宇等. 湖泊富营养化的藻类生物学评价与治理研究进展[J]. 安全与环境学报, 2005, 5(2): 87-91.
- [9] 施玮, 蒋颂辉, 朱惠刚. 饮用水源中藻类限值研究[J]. 净水技术特刊, 2002:15-19.
- [10] APHA, AWWA and WPCF. Standard methods for the examination of water and wastewater: 22th edition[M]. Washington: American Public Health Association, 2012.
- [11] British Standard. Water quality—Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopy: BS EN 15204:2006 [S].
- [12] British Standard. Water quality—Enumeration of micro—organisms in water samples—Guidance on the estimation of variation of results with particular reference to the contribution of uncertainty of measurement: BS 8496:2007[S].
- [13] ASTM International. Standard Classification for Sampling Phytoplankton in Surface Waters: ASTM D4149-82(2012) [S].
- [14] ASTM International. Standard Test Method for Analysis of Phytoplankton in Surface Water by the Sedgwick-Rafter Method: ASTM D4148-82(2012) [S].
- [15] 周云龙. 淡水水域浮游植物调查的方法[J]. 生物学通报, 1984, (2): 15-18.
- [16] 侯建军, 黄邦钦, 戴相辉. 赤潮藻细胞计数方法比较研究[J]. 中国公共卫生, 2004, 20(8): 907-908.
- [17] 贺小芮, 周俊杰. 倒置显微镜计数法检测浮游藻类[J]. 中国给水排水, 2004, 20(11): 98-100.
- [18] 余 梅. 藻类检测和计数新方法—倒置式显微镜法[J]. 给水排水, 2004, 30(4): 41-42.
- [19] 金相灿, 屠清瑛. 湖泊富营养化调查规范: 第 2 版 [M]. 北京:中国环境科学出版社, 1990: 239-245.
- [20] 国家环境保护总局. 水和废水分析方法: 第 4 版[M]. 北京:中国环境科学出版社, 2002:

701-707.

- [21] 李志勇, 刘 津, 高东微. 瓶装饮用水中浮游藻类计数方法研究[J]. 食品科技, 2009, 34(7): 266-270.
- [22] 张榆霞, 金 玉, 施 择等. 富营养化水体藻类显微镜计数方法改进研究[J]. 福建分析测试, 2014, 1: 13-16.
- [23] 李爱军, 张榆霞, 金 玉等. 滇池水华生物表征指标的优选研究[J]. 国家水体污染控制与治理科技重大专项, 2015, 7.
- [24] 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.
- [25] 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.
- [26] 赵洋甬, 马静军, 肖国起. 微囊藻细胞计数法研究[J]. 福建分析测试, 2010, 19(3): 76-78.

附件一

方法验证报告

方法名称：水质 浮游植物的测定 显微镜计数法

项目承担单位：云南省生态环境监测中心

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

项目负责人及职称：张榆霞 正高级工程师

通讯地址：云南省昆明市环城西路 539 号 电话：0871-64142052

报告编写人及职称：铁程 高级工程师

报告日期：2017 年 5 月 3 日

1 原始测试数据

6家实验室参加了方法验证，实验室编号1—上海市环境监测中心；2—中国科学院水生生物研究所；3—云南省生态环境厅驻昆明市生态环境监测站；4—江苏省无锡环境监测中心；5—云南省生态环境厅驻玉溪市生态环境监测站；6—云南省生态环境厅驻大理州生态环境监测站。

1.1 实验室基本情况

附表 1-1 参加验证的人员情况登记表

姓名	性别	年龄	职务或职称 和从事的岗位	参加分析工作 年限 (年)	所在单位名称
汤琳	女	42	教授级高工、生物监测	17	上海市环境监测中心
朱梦杰	女	35	工程师、生物监测	13	
李仁辉	男	52	研究员、浮游植物研究	30	中国科学院水生生物研究所
马苏超	男	25	在读研究生、水生生物	3	
李娅萍	女	39	高级工程师、生物监测	15	云南省生态环境厅驻昆明市生态环境监测站
黄丽娟	女	37	工程师、监测分析	11	
张军毅	男	35	高级工程师、生物监测	9	江苏省无锡环境监测中心
朱冰川	女	31	工程师、生物监测	7	
刘绍俊	男	32	工程师、监测分析	5	云南省生态环境厅驻玉溪市生态环境监测站
杨一艳	女	29	助理工程师、监测分析	3	云南省生态环境厅驻大理州生态环境监测站

附表 1-2 使用仪器情况登记表

实验室编号	仪器名称	规格型号	性能状况	备注
1	生物显微镜	奥林巴斯 BH-2	正常	/
2	生物显微镜	OLYMPUS-BX22	正常	/
3	生物显微镜	LeicaDM2500	正常	/
4	生物显微镜	尼康 80i	正常	/
5	生物显微镜	LeicaDM2500	正常	/
6	生物显微镜	OLYMPUS-BX53	正常	/

1.2 方法精密度测试数据

各验证实验室对4个不同微囊藻细胞密度的实际样品，按全程序每个样品平行测定微囊藻细胞密度7次，分别计算不同细胞密度样品的测定平均值、标准偏差、相对标准偏差等各

项参数。精密度测试数据见附表 1-3-1~附表 1-3-6。

附表 1-3-1 实验室 1 精密度测试原始数据

验证单位：上海市环境监测中心

测试日期：2016 年 12 月

平行号		样品 1 全片计数	样品 2 行格计数	样品 3 对角线	样品 4 随机视野
测定结果 (cells/L)	1	0.892×10^7	3.66×10^7	7.02×10^7	1.22×10^8
	2	0.658×10^7	3.74×10^7	5.32×10^7	1.03×10^8
	3	0.756×10^7	3.24×10^7	6.21×10^7	1.06×10^8
	4	0.763×10^7	3.64×10^7	7.09×10^7	1.05×10^8
	5	0.706×10^7	3.11×10^7	5.47×10^7	0.99×10^8
	6	0.851×10^7	2.96×10^7	6.03×10^7	1.12×10^8
	7	0.816×10^7	3.83×10^7	5.81×10^7	0.96×10^8
平均值 \bar{x}_i (cells/L)		0.777×10^7	3.45×10^7	6.14×10^7	1.06×10^8
标准偏差 s_i (cells/L)		0.0817×10^7	0.344×10^7	0.698×10^7	0.0867×10^8
相对标准偏差 RSD_i (%)		11	10	11	8.1

附表 1-3-2 实验室 2 精密度测试原始数据

验证单位：中国科学院水生生物研究所

测试日期：2016 年 12 月

平行号		样品 1 全片计数	样品 2 行格计数	样品 3 对角线	样品 4 随机视野
测定结果 (cells/L)	1	1.06×10^7	3.25×10^7	4.98×10^7	1.01×10^8
	2	1.08×10^7	2.98×10^7	5.31×10^7	1.01×10^8
	3	1.03×10^7	3.15×10^7	5.60×10^7	0.960×10^8
	4	1.02×10^7	2.93×10^7	5.22×10^7	1.06×10^8
	5	1.04×10^7	2.88×10^7	5.50×10^7	1.04×10^8
	6	1.09×10^7	3.03×10^7	4.88×10^7	1.20×10^8
	7	1.05×10^7	3.02×10^7	4.91×10^7	0.997×10^8
平均值 \bar{x}_i (cells/L)		1.05×10^7	3.03×10^7	5.20×10^7	1.04×10^8
标准偏差 s_i (cells/L)		0.0254×10^7	0.128×10^7	0.288×10^7	0.0770×10^8
相对标准偏差 RSD_i (%)		2.4	4.2	5.5	7.4

附表 1-3-3 实验室 3 精密度测试原始数据

验证单位：云南省生态环境厅驻昆明市生态环境监测站

测试日期：2016 年 12 月

平行号		样品 1 全片计数	样品 2 行格计数	样品 3 对角线	样品 4 随机视野
测定结果 (cells/L)	1	1.11×10^7	3.07×10^7	5.58×10^7	0.881×10^8
	2	1.10×10^7	3.35×10^7	5.54×10^7	0.972×10^8
	3	1.05×10^7	3.19×10^7	5.57×10^7	1.08×10^8
	4	1.07×10^7	3.24×10^7	5.61×10^7	0.885×10^8
	5	1.10×10^7	3.11×10^7	4.91×10^7	0.875×10^8
	6	1.04×10^7	3.22×10^7	5.46×10^7	0.921×10^8
	7	1.03×10^7	3.18×10^7	5.92×10^7	0.926×10^8
平均值 \bar{x}_i (cells/L)		1.07×10^7	3.20×10^7	5.55×10^7	0.934×10^8
标准偏差 s_i (cells/L)		0.0316×10^7	0.0926×10^7	0.329×10^7	0.0727×10^8
相对标准偏差 RSD_i (%)		3.0	2.9	5.9	7.8

附表 1-3-4 实验室 4 精密度测试原始数据

验证单位：江苏省无锡环境监测中心

测试日期：2016 年 12 月

平行号		样品 1 全片计数	样品 2 行格计数	样品 3 对角线	样品 4 随机视野
测定结果 (cells/L)	1	1.48×10^7	3.70×10^7	5.69×10^7	1.61×10^8
	2	1.40×10^7	3.39×10^7	5.49×10^7	1.73×10^8
	3	1.41×10^7	3.40×10^7	5.13×10^7	1.49×10^8
	4	1.64×10^7	3.56×10^7	5.05×10^7	1.61×10^8
	5	1.50×10^7	3.78×10^7	5.33×10^7	1.47×10^8
	6	1.60×10^7	3.62×10^7	5.37×10^7	1.68×10^8
	7	1.46×10^7	3.42×10^7	5.51×10^7	1.53×10^8
平均值 \bar{x}_i (cells/L)		1.50×10^7	3.55×10^7	5.37×10^7	1.59×10^8
标准偏差 s_i (cells/L)		0.0899×10^7	0.157×10^7	0.223×10^7	0.0977×10^8
相对标准偏差 RSD_i (%)		6.0	4.4	4.2	6.2

附表 1-3-5 实验室 5 精密度测试原始数据

验证单位: 云南省生态环境厅驻玉溪市生态环境监测站

测试日期: 2016 年 12 月

平行号		样品 1 全片计数	样品 2 行格计数	样品 3 对角线	样品 4 随机视野
测定结果 (cells/L)	1	1.02×10^7	3.15×10^7	5.47×10^7	1.40×10^8
	2	1.07×10^7	3.23×10^7	5.03×10^7	1.36×10^8
	3	1.01×10^7	3.32×10^7	5.36×10^7	1.49×10^8
	4	1.10×10^7	3.20×10^7	5.18×10^7	1.41×10^8
	5	1.08×10^7	3.09×10^7	5.18×10^7	1.29×10^8
	6	1.14×10^7	3.63×10^7	5.23×10^7	1.47×10^8
	7	1.13×10^7	3.21×10^7	5.29×10^7	1.40×10^8
平均值 \bar{x}_i (cells/L)		1.08×10^7	3.26×10^7	5.25×10^7	1.40×10^8
标准偏差 s_i (cells/L)		0.0501×10^7	0.177×10^7	0.142×10^7	0.0668×10^8
相对标准偏差 RSD_i (%)		4.7	5.4	2.7	4.8

附表 1-3-6 实验室 6 精密度测试原始数据

验证单位: 云南省生态环境厅驻大理州生态环境监测站

测试日期: 2016 年 12 月

平行号		样品 1 全片计数	样品 2 行格计数	样品 3 对角线	样品 4 随机视野
测定结果 (cells/L)	1	0.98×10^7	2.91×10^7	6.05×10^7	1.05×10^8
	2	0.94×10^7	3.11×10^7	6.54×10^7	1.09×10^8
	3	1.05×10^7	3.44×10^7	5.81×10^7	1.10×10^8
	4	1.09×10^7	3.36×10^7	6.39×10^7	1.02×10^8
	5	0.95×10^7	3.17×10^7	5.96×10^7	1.24×10^8
	6	1.00×10^7	3.36×10^7	5.77×10^7	1.21×10^8
	7	1.02×10^7	3.61×10^7	5.40×10^7	1.12×10^8
平均值 \bar{x}_i (cells/L)		1.00×10^7	3.28×10^7	5.99×10^7	1.12×10^8
标准偏差 s_i (cells/L)		0.0548×10^7	0.233×10^7	0.386×10^7	0.0783×10^8
相对标准偏差 RSD_i (%)		5.5	7.1	6.5	7.0

2 方法验证数据汇总

2.1 精密度测定数据汇总

附表 2-1 6 家实验室精密度测试数据汇总表

实验室编号	样品 1 (全片计数)			样品 2 (行格计数)		
	\bar{x}_i	s_i	RSD_i	\bar{x}_i	s_i	RSD_i
1	0.777×10^7	0.0817×10^7	11%	3.45×10^7	0.344×10^7	10%
2	1.05×10^7	0.0254×10^7	2.4%	3.03×10^7	0.128×10^7	4.2%
3	1.07×10^7	0.0316×10^7	3.0%	3.20×10^7	0.0926×10^7	2.9%
4	1.50×10^7	0.0899×10^7	6.0%	3.55×10^7	0.157×10^7	4.4%
5	1.08×10^7	0.0501×10^7	4.7%	3.26×10^7	0.177×10^7	5.4%
6	1.00×10^7	0.0548×10^7	5.5%	3.28×10^7	0.233×10^7	7.1%
$\bar{\bar{x}}$	1.08×10^7			3.3×10^7		
S'	0.237×10^7			0.184×10^7		
RSD'	22%			5.6%		
实验室编号	样品 3 (对角线计数)			样品 4 (随机视野计数)		
	\bar{x}_i	s_i	RSD_i	\bar{x}_i	s_i	RSD_i
1	6.14×10^7	0.698×10^7	11.1%	1.06×10^8	0.0867×10^8	8.2%
2	5.20×10^7	0.288×10^7	5.5%	1.04×10^8	0.0770×10^8	7.4%
3	5.55×10^7	0.329×10^7	5.9%	0.934×10^8	0.0727×10^8	7.8%
4	5.37×10^7	0.223×10^7	4.2%	1.59×10^8	0.0977×10^8	6.2%
5	5.25×10^7	0.142×10^7	2.7%	1.40×10^8	0.0668×10^8	4.8%
6	5.99×10^7	0.386×10^7	6.5%	1.12×10^8	0.0783×10^8	7.0%
$\bar{\bar{x}}$	5.58×10^7			1.19×10^8		
S'	0.395×10^7			0.251×10^8		
RSD'	7.1%			21%		

2.2 实验室间 95%置信区间

附表 2-2 6 家实验室精密度测试数据汇总表（对数转换后）

实验室编号	样品 1（全片计数）			样品 2（行格计数）		
	\bar{x}_i	s_i	RSD_i	\bar{x}_i	s_i	RSD_i
1	6.89	0.05	0.67%	7.54	0.04	0.59%
2	7.02	0.01	0.15%	7.48	0.02	0.24%
3	7.03	0.01	0.19%	7.50	0.01	0.16%
4	7.17	0.03	0.36%	7.55	0.02	0.25%
5	7.03	0.02	0.29%	7.51	0.02	0.30%
6	7.00	0.02	0.33%	7.51	0.03	0.41%
$\bar{\bar{x}}$	7.02			7.52		
S'	0.09			0.03		
RSD'	1.3%			0.34%		
95%置信区间	7.02±0.09			7.52±0.03		
实验室编号	样品 3（对角线计数）			样品 4（随机视野计数）		
	\bar{x}_i	s_i	RSD_i	\bar{x}_i	s_i	RSD_i
1	7.79	0.05	0.63%	8.02	0.03	0.43%
2	7.72	0.02	0.31%	8.02	0.03	0.39%
3	7.74	0.02	0.32%	7.97	0.03	0.41%
4	7.73	0.02	0.23%	8.20	0.03	0.33%
5	7.72	0.01	0.15%	8.15	0.02	0.26%
6	7.78	0.03	0.36%	8.05	0.03	0.38%
$\bar{\bar{x}}$	7.75			8.07		
S'	0.03			0.09		
RSD'	0.40%			1.1%		
95%置信区间	7.75±0.03			8.07±0.09		

附表 2-3 实验室间 95%置信区间（对数转换转回后）

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	$0.96 \times 10^8 \sim 1.4 \times 10^8$

3 方法验证结论

1) 精密度:

全片计数法: 6家实验室对浮游植物细胞密度水平为 1×10^7 cells/L 的样品, 采用全片计数法重复测定 7 次, 实验室内相对标准偏差为 2.4%~11%, 实验室间相对标准偏差为 22%, 实验室间 95%置信区间为 0.86×10^7 cells/L~ 1.30×10^7 cells/L。

行格计数法: 6家实验室对浮游植物细胞密度水平为 3×10^7 cells/L 的样品, 采用行格计数法重复测定 7 次, 实验室内相对标准偏差为 2.9%~10%、实验室间相对标准偏差为 5.6%、实验室间 95%置信区间为 3.08×10^7 cells/L~ 3.47×10^7 cells/L。

对角线计数法: 6家实验室对浮游植物细胞密度水平为 5×10^7 cells/L 的样品, 采用对角线计数法重复测定 7 次, 实验室内相对标准偏差为 2.7%~11%、实验室间相对标准偏差为 7.1%, 实验室间 95%置信区间为 5.20×10^7 cells/L~ 5.99×10^7 cells/L。

随机视野计数法: 6家实验室对浮游植物细胞密度水平为 1×10^8 cells/L 的样品, 采用对随机视野计数法重复测定 7 次, 实验室内相对标准偏差为 4.8%~8.2%、实验室间相对标准偏差为 21%, 实验室间 95%置信区间为 0.96×10^8 cells/L~ 1.43×10^8 cells/L。

2) 在标准验证过程中, 未剔除任何数据。该方法实验室内相对偏差的最终值达到预期要求。