

附件 7

《水质 浮游植物的测定 滤膜法（征求意见稿）》
编制说明

《水质 浮游植物的测定 滤膜法》

标准编制组

二〇二〇年九月

项目名称：水质 浮游植物的测定 滤膜法

项目统一编号：2014-20

承担单位：浙江省环境监测中心

编制组主要成员：晁爱敏 于海燕 徐杭英 魏铮 洪正昉 俞建

周胜利 姚建良 胡尊英 顾卿

标准所技术管理负责人：曹宇 余若祯

生态环境监测司质管处项目负责人：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 | 2 |
| 2.1 浮游植物和水华及危害 | 2 |
| 2.2 相关标准和环保工作的需要 | 3 |
| 3 国内外相关分析方法研究 | 3 |
| 3.1 主要国家、地区及国际组织相关分析方法研究 | 3 |
| 3.2 滤膜法研究 | 7 |
| 4 标准制订的基本原则和技术路线 | 9 |
| 4.1 基本原则 | 9 |
| 4.2 标准制定的技术路线 | 9 |
| 5 方法研究报告 | 10 |
| 5.1 方法研究目标 | 10 |
| 5.2 方法原理 | 11 |
| 5.3 试剂和材料 | 11 |
| 5.4 仪器和设备 | 11 |
| 5.5 样品 | 12 |
| 5.6 分析步骤 | 13 |
| 5.7 结果计算与表示 | 42 |
| 5.8 方法有效性研究 | 42 |
| 5.9 质量控制与质量保证 | 63 |
| 6 方法验证 | 64 |
| 6.1 验证方案 | 64 |
| 6.2 验证过程 | 65 |
| 7 与开题报告的差异说明 | 65 |
| 8 参考文献 | 66 |
| 附一方法验证报告 | 68 |

《水质 浮游植物的测定 滤膜法（征求意见稿）》

编制说明

1 项目背景

1.1 任务来源

为适应生态环境保护工作新形势，进一步完善国家环境保护标准体系，2014年7月，原环境保护部办公厅下发了《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），明确了《水质 浮游植物的测定 滤膜法》标准立项，项目编号为2014-20。

2014年6月，签订《水质 浮游植物的测定 滤膜法》项目任务合同书，标准制定的承担单位为浙江省环境监测中心。

1.2 工作过程

1.2.1 成立标准编制组

浙江省环境监测中心成立标准编制组，成员均为从事多年生物监测工作的专业技术人员。

1.2.2 相关标准及文献调研

通过国内外相关分析方法比较研究，结合当前我国浮游植物监测方法不完善和环境管理需求现状，提出制定标准的必要性，确定研究内容和技术路线，完成标准开题论证报告和标准草案编写。

1.2.3 召开研讨会，开展方法前期研究

2015年3月16日召开研讨会，专家组提出“继续按照技术导则编制标准草案和开题论证报告，继续分析本方法的可行性，包括滤膜透明后直接镜检的可行性，过滤再洗脱后再镜检的可行性；同时研究方法的适用性；明确技术路线、方法实施具体方案”。编制组逐条落实专家意见，简化并最终确立实验方案，开展方法研究。

1.2.4 召开标准开题论证会

2016年1月召开标准开题论证会，论证委员会认为标准编制单位提供的材料齐全，内容较为详实完整，格式较为规范；标准使用范围、主要研究内容及编制的标准技术路线合理可行。同时，提出进一步开展方法研究，确定方法适用范围，开展标准的实验参数适应性研究，完善质量保证和质量控制措施；建议与相关标准编制单位加强沟通，规范标准文本。

1.2.5 开展标准方法研究和方法验证

进一步完善标准研究内容、技术路线和质量保证措施，开展标准技术参数适应性研究，包括滤膜孔径、滤膜品牌、过滤真空压力、过滤体积和镜检方法等研究；编制标准验证方案，组织完成了6家有资质的实验室间的方法验证；编写《水质 浮游植物的测定 滤膜法》文本

和编制说明征求意见稿。

1.2.6 召开标准征求意见稿研讨会

2019年3月27日，召开了标准征求意见稿研讨会。专家提出：规范检出限给出方式，用泊松统计模型计算方法检出限时，给出最大过滤体积，并在文本附录中完善检出限计算公式；统一精密度表述水平，取消“重复性限和再现性限”技术术语，建议与《水质 浮游植物的测定 显微镜计数法》（2014-25）作方法比较，规范相关术语等；对准确度不作要求。

1.2.7 修改完善标准文本和编制说明征求意见稿

按照专家意见，对标准文本和编制说明进行修改完善。在附录中增加检出限计算公式，确定最大过滤体积的方法检出限，统一精密度表述。增加与《水质 浮游植物的测定 显微镜计数法》标准的比较试验，包括“随机视野法、条带法、对角线法和全片法”比较试验。对标准文本和编制说明中的术语表述进行了进一步规范。

1.2.8 召开标准征求意见稿技术审查会

2020年6月5日，召开标准征求意见稿技术审查会通过技术审查。技术审查会上，专家提出“修改标准文本中“浮游植物”的定义；建议对标准中有关检出限的相关内容进行进一步调研和论证；建议在标准中明确部分具体操作细节”。标准编制组按照专家意见，对标准征求意见稿文本和编制说明一一修改。

2 标准制订的必要性

2.1 浮游植物和水华及危害

2.1.1 浮游植物

浮游植物是无胚而具叶绿素的自养叶状体孢子植物，个体间大小相差悬殊，包括所有生活在水中营浮游生活方式的低等植物。浮游植物作为一个重要的营养级代表，是水生态系统监测中不可缺少的内容。研究表明，在所有用于指示水质的水生生物类群中，按种类数统计，浮游植物约占25%，居第二位。

2.1.2 水华及危害

浮游植物与水体富营养化关系密切，水体富营养化的最直接表现就是“水华”。“水华”导致水质恶化，水生态系统失衡，甚至威胁饮用水水源安全。蓝藻水华因毒素危害而备受关注。蓝藻毒素能引起头痛、恶心、发烧、腹泻、接触皮炎、麻痹等；也可累及牲畜及鱼类的死亡。藻类水华近年来的频繁发生，对人类健康及水生态系统产生了严重危害。2007年8月，太湖发生大面积蓝藻水华，引发举世瞩目的无锡水危机事件；2014年，美国五大湖之一的伊利湖暴发蓝藻水华，超过40万人的主要水源被切断。

2.2 相关标准和环保工作的需要

2.2.1 环保工作的需要

水体富营养化控制是我国水污染防治行动计划的重要内容之一。开展浮游植物监测与评价,可反映浮游植物群落现状及演变趋势,为水华预警和及时采取预防措施提供重要技术支持。近年来,“水华”发生频次增加,环保部门开展了大量的浮游植物监测工作。目前,我国尚未发布地表水中浮游植物的测定方法标准,现有参考资料中,《水和废水分析方法》(第四版,增补版)、《湖泊富营养化调查规范》(中国环境科学出版社,1990)和《水生生物监测手册》(原国家环保局1993年),存在监测过程不规范、数据之间可比性较差等问题。因此,研究制定浮游植物监测方法标准,为各地提供统一的方法依据,已成为当务之急。

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

各国政府非常重视水环境中浮游植物监测,许多国家和地区根据浮游植物密度对蓝藻水华实行分级监测,不同级别采用不同应对措施。世界卫生组织(WHO)规定了浮游植物的藻密度监测等级标准:藻密度低于2万 cells/ml时,为低健康风险;高于10万 cells/ml时,为中度不良健康影响;形成肉眼可见的浮膜(cyanobacterial scums)时,有威胁健康的高风险可能性。欧盟水框架指令(2000/60/EC)要求规范化利用浮游植物丰度和组成来评估地表水生态质量。澳大利亚国家健康与医药研究委员会和国家资源管理部委员会联合发布了澳大利亚饮用水指南,提出了澳大利亚水体蓝藻管理等级框架。澳大利亚和新西兰环保委员会和农业资源管理委员会2000年联合发布的《淡水和海水质量导则》(Australian and New Zealand guidelines for fresh and marine water quality)规定了藻密度水平与安全等级。韩国环境部(Ministry of Environment South Korea)发布了藻类水华预警等级框架。美国环保署为防控饮用水中藻毒素影响,对公共水系统的监测和管理提出建议(EPA815-R-15-010-2015),建议明确规定水中蓝藻的藻密度。

3.1.1 浮游植物计数方法与标准

3.1.1.1 浮游植物计数方法

浮游植物定量是浮游植物监测的核心,主要有三种方法:一是浮游植物或群体计数,给出单位体积的细胞数;二是测量浮游植物生物量或生物体积;三是确定浮游植物叶绿素a浓度。浮游植物计数是最普遍、可靠的估算浮游植物现存量的方法(McAlice, 1971)。浮游植物计数单位主要有密度(细胞或个体),细胞面积和细胞体积,由于细胞面积和细胞体积测定过于繁琐,在实际工作中较多采用浮游植物细胞密度法。

浮游植物计数单位可为细胞、群体,丝状体或球形群体。目前,没有相关规定或法则约定球形群体、丝状体应该被当成个体还是细胞来计数。但无论采取哪种方法,其前提和原则是样品及样品间的分析要求必须保持一致。

镜检计数有三种情况:计数框沉淀室样品的计数、计数框中的浓缩样品的计数、滤膜过滤样品的计数。赛吉计数框和0.1ml计数框属于浓缩样品计数框,滤膜法属于滤膜过滤样品

计数。

浮游植物细胞计数方法须根据研究对象及目标而定。如 Petroff-hausser 细菌计数板可以定量直径范围为 1~5 μm 的细胞；Haemocytometers 血球计数板定量直径范围为 5~75 μm 的细胞；Palmer maloney 定量直径范围为 5~150 μm 的细胞；Sedgewick rafter 计数框定量直径范围为 50~500 μm 的细胞。滤膜法(Mc Nabb,1960; Holmes, 1962; Fournier, 1978; Hader,1991) 对浮游植物直径大小没有明确限制。

3.1.1.2 浮游植物计数方法

联合国教科文组织 (UNESCO) 1978 年规定可用滤膜法对浮游植物进行数量估计。滤膜法是一种快速的浮游植物计数方法，将一定体积的水样通过一定孔径的滤膜，群体细胞、丝状体及单细胞浮游植物被截留在滤膜上，然后直接在滤膜上进行藻类计数，无需样品预先浓缩。计数密度通过控制过滤体积来实现。

欧洲标准委员会 (CEN) 颁布了《water quality –Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopy (Utermöhl technique) (EN 15204 2006)》，规定使用 utermöhl 计数框对浮游植物计数，适用于大部分浮游植物群落分析，尤其是对寡营养水体浮游植物群落组成的分析。由 APHA (American Public Health Association, 美国公共卫生协会)、AWWA (American Water Works Association, 美国自来水协会)、WEF (Water Environment Federation, 水环境联合会) 联合制定的《Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater》(22nd edition) 规定了多种浮游植物定量计数方法。包括高倍镜方法，如 Sedgwick-Rafter 框法；中等放大倍数法，如 Palmer-Maloney 微型浮游植物计数法；高倍放大倍数法，可在高倍镜下镜检浮游植物，需使用油镜。此外，还有滤膜法、沉淀载玻片法、Lackey 法及硅藻计法等。该标准对浮游植物计数单位及质量控制等内容作了说明。

美国公共卫生协会 APHA (1995) 提出了微型浮游植物 (3~20 μm) 和超微型浮游植物 (0.7~3 μm) 的分析计数方法，将样品通过 20 μm 孔径的微孔滤膜过滤，然后在 Neubauer cell 或血球计数板上直接对滤出液进行计数。

国际组织和国外关于浮游植物密度测定的标准和方法不多，详见表 1。

表 1 国际上浮游植物计数方法

| 组织和国家 | 标准名称 | 计数方法 | 适用范围 |
|------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------|
| 欧洲标准委员会 (CEN) | water quality –Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopy(Utermöhl technique)“(CEN 2004 , EN 15204 2006) | 沉淀—utermöhl 计数框 | 河流及湖泊浮游植物丰度，种类组成及生物体积研究，适用于寡营养水体 |
| APHA (美国公共卫生协会、美国自来水协会、水环境联合会联合制定) | 《 Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater》(22 th edition) | “Sedgwick-Rafter 或 Membrane filtration | —— |
| 联合国教科文组织 (UNESCO) | 滤膜法 | Membrane | —— |

| | | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|------------|
| (1974) | | filtration 和 Sedgwick-Rafter | |
| 澳大利亚环境管理及生态部 Austrian Department of Environmental Management and Ecology (Gertraud H.1999) | A Phytoplankton Methods Manual for Australian Freshwaters for Australian Freshwaters | Utermöhl technique 及 Sedgwick-Rafter | 淡水水体浮游植物评价 |
| 美国环境保护署 (EPA) | Survey of the Nation's Lakes Quality Assurance Project Plan EPA841-B-07-003 | 相关 Quality assurance | 湖泊, 池塘及水库 |

3.1.2 国外几种常见的计数框

3.1.2.1 Utermöhl 计数框

Utermöhl 计数框是一个复合计数框, 底部是计数室和一个用来沉淀样品的柱状沉淀器。Utermöhl 柱状沉淀器一般为 5~100ml。Utermöhl 计数框有底载玻片和顶载玻片, 沉淀器中的样品沉淀到底载玻片上, 沉淀的浮游植物可以被观察、分析和计数。计数室是一个直径 2.5cm 的圆洞, 用盖玻片盖住形成计数室 (chamber)。沉淀型计数框有两种计数策略, 即随机选择计数区域和全片计数, 后者一般适用于低密度样品或偶见种鉴定。十字分析法一般不推荐。Utermöhl 计数框对原始样品的浮游植物计数结果表述为 cells/ml。

3.1.2.2 Sedgwick-Rafter 计数框

赛吉计数框 (Sedgwick-Rafter Counting Chamber) 也是浮游生物计数时常用的一种计数框, 简称 S-R 框, 其计数板尺寸约 76 mm×40mm, 样品池 50mm 长、2mm 宽、1mm 深, 基部有 1000 个 1mm×1mm 的正方形格, 样品池容积 1ml, 每格代表 1 μ l。用 whipple 视野或随机格法。Whipple 视野法是借助 whipple grid 目镜测微尺提供计数网格。随机格法是随机选择赛吉计数框计数方格, 将单细胞或者球形群体计数, 并约定靠近或者在方格上边界和左边界的藻类计入总数, 在下边界或右边界的藻类不计入总数。计数方格选择是从随机方格 1 水平右移 5 格至方格 2, 对方格 2 进行藻类计数, 以此类推。

3.1.2.3 Lund 微型浮游生物计数框

Edward (2010) 报道了 Lund 微型浮游生物计数框的使用。赛吉计数框可对中等至大尺寸的浮游植物计数, 但计数框的深度及盖玻片的厚度影响光学聚焦, 使得小的种类很难计数和鉴定, 甚至有时会忽略。Lund 计数框可用于计数小的浮游植物细胞, 通过薄的盖玻片降低了计数池深度, 使高倍物镜的使用成为可能 (Lund, 1951)。样品镜检前最好用浮游生物网过滤, 除去大型或者长丝状藻类以免堵塞计数池, 采用视野法计数。

3.1.2.4 滤膜法

滤膜法在生物领域应用较多, 如测定海洋初级生产力、浮游植物干重, 分析微型及超微型浮游植物等。Edward G. B 和 David C. S (2010) 对滤膜法进行了阐述, 包括样品过滤体积、前处理、镜检和计数等。滤膜法是一种较快速的浮游植物计数方法, 浮游植物被浓缩到

滤膜上，然后进行显微计数（Fourier, 1981）。美国《Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater》（2012）详细介绍了滤膜法，包括封片方法，可做到永久计数。

3.1.3 国内相关分析方法研究

浮游植物定量方法包括分光光度法、库尔特法、流式细胞计数法和镜检法（侯建军等, 2004）。镜检法应用较广泛，包括倒置显微镜法（余梅, 2004）和正置显微镜法。镜检载体基本为计数框，其中 0.1ml 计数框在我国环境监测系统应用广泛。0.1ml 计数框面积为 20 mm × 20 mm、容量为 0.1ml，基部均分为 100 小格，每小格形成的体积为 1 μ l。国内浮游植物测定方法汇总见表 2。

目前，国内无相关浮游植物监测数据质量控制规定。《淡水浮游生物研究方法》未规定数据质量控制方法，仅在硅藻种类比例计数中约定长条法至少计数 250 个硅藻。《水生生物监测手册》推荐浮游植物镜检计数最好每个视野 5 个~10 个。《水和废水监测分析方法》规定，如果两片的计数个数相差 15%以上，则进行第三片计数。《海洋监测规范》仅规定浮游植物定量计数时，每个水样取三个分样，取平均值。水利部《内陆水域浮游植物监测技术规范》（SL 733-2016）中规定，浮游植物计数 2 个标本片，如 2 片计数结果相差 15%以上，则进行第 3 片计数，取其中数值相近 2 片的平均值，并规定每片浮游植物计数宜为 500~1500 个。SL 733-2016 规定，每个视野的浮游植物平均数须对应相应的计数视野数，如浮游植物平均数/视野为 3 个~5 个时，需要计数 300 个视野；浮游植物平均数/视野为 6 个~10 个时，计数 150 个视野；浮游植物平均数/视野为 10~50 个时，计数 50 个视野。按照 Gertraud 和 Roger（1990）计算计数误差，当计数 150 或 300 个视野时，其计数误差约为 6.6%~5.2%；当计数 50 个视野时，计数误差在 4%~8.9%。实际监测工作中，控制计数误差在 10%以下非常耗时且困难。

国内浮游植物测定参考方法详见表 2。

表 2 国内有关浮游植物测定的可参考方法汇总

| 方法出处 | 计数方法 | |
|-----------------------------|--------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| 《水和废水监测分析方法》 （第四版）2002 年 | 浓缩-0.1ml 框法 （长条计数法或视野法及全片法） | 长条计数法：第 2、5、8 行 视野法：计数 100 个视野，计数两片，取平均值，如两片计数结果个数相差 15%以上，则进行第三片计数，取其中个数相近两片的平均值。 |
| 《湖泊富营养化调查规范》 （第二版）1990 年 | 浓缩-0.1ml 框法 （视野法） | 对计数区域进行约定。计数 100~500 个视野，均匀分布在计数框中，每一样品计数两片，取平均值，每次计数结果与平均值之差不大于 15%。 |
| 《水生生物监测手册》（原国家环保局）1993 年 | 浓缩-0.1ml 框 | 长条计数法 |
| | 浓缩-1ml 框 | 未规定计数方法，推荐与目镜测微尺配合，计数重现性较好。 |
| | 滤膜法 | 长条法或视野法，制片过程繁琐，耗时长 |
| | 硅藻种类比例计数-滤膜封片 | 长条计数法，单独针对硅藻封片。 |
| | 倒置显微镜法 | 随机计数不重叠视野，直至优势种的计数不少于 |

| 方法出处 | 计数方法 | |
|-------------------------------------------------------|-----------|------------------------------------------|
| | | 100 个单位。因沉淀室构造不统一，未做详细介绍。 |
| 《内陆水域浮游植物监测技术规程》 (SL733-2016) | 0.1ml 计数框 | 根据藻密度和视野中个体数不同，分全片计数法和视野计数法。 |
| 《海洋监测规范 第 7 部分 近海污染生态调查和生物调查》 (GB 17378.7-2007) | 沉淀计数法 | 0.25 ml 定制计数框，全片或视野法。 |
| | 直接计数法 | 5ml, 10ml, 20ml, 50ml, 100ml 沉降器，全片或视野法。 |
| | 浓缩计数法 | 逐级浓缩，定容至 10ml，采用 0.25ml 计数框计数。 |

3.2 滤膜法研究

浮游植物测定方法均有局限性。美国《Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (22nd)》(APHA, AWWA, WEF) 中规定，赛吉计数框定量检出限约在 30~10⁴cells/ml，不适合鉴定直径小于 10~15 μ m 的浮游植物，不适合高倍镜分析。《Water quality-Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopy (Utermöhl technique)》(BS EN15204:2006) 规定，Utermöhl 计数框适用于寡营养水体，中营养或者富营养水体样品在沉淀计数框中会出现叠加现象，且会低估微型浮游植物密度。《水和废水监测分析方法》(第四版) 中，0.1ml 框检出限较高，尤其对于中、低密度样品检测结果的变异系数较大，结果间的重复性较差，且低密度下 0.1ml 框全片计数法较为耗时。

赛吉计数框、Utermöhl 计数框、0.1ml 计数框或滤膜法，均须对样品进行浓缩。前三种计数框完成沉淀浓缩样品处理至少耗时 24~48h。滤膜法无需沉淀浓缩样品，样品过滤即完成浓缩和样品制备，大大缩短了前处理时间。滤膜法计数载体为滤膜而非计数框，镜检藻密度变化可通过控制过滤体积实现。

3.2.1 滤膜装片制备方法

《水生生物监测手册》中的浮游植物滤膜封片制作过程较为复杂，样品过滤完毕，需经梯度的乙醇溶液抽滤、脱水，再用无水乙醇处理，操作过程较繁琐。

《Freshwater Algae: Identification and Use as Bioindicators》(Edward G. Bellinger & David C. Sigeo) 介绍了三种滤膜处理方法：逐级脱水法、油透明盖玻片转移法。其中油透明法操作易行，滤膜过滤完成后，取一滴浸没油滴在载玻片上，将滤膜置于滴有浸没油的载玻片上，在滤膜上加两滴浸没油，盖上盖玻片即可镜检。《freshwater algae Identification and use as Bioindicators》中介绍了两种滤膜计数法，其一 MPN 法，其二视野法，视野法在镜检中应用较多。

美国《Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (22nd)》(APHA, AWWA, WEF) 在 Part10000 部分 Biological Examination 介绍了滤膜浓缩、滤膜装片制备及滤膜计数。其中“滤膜透明处理过程”相对于《水生生物监测手册》和《Freshwater Algae: Identification and Use as Bioindicators》(Edward G. Bellinger & David C. Sigeo)，实践性更强，其“烘箱加热使滤膜透明”技术将透明时间由原来的 24h~48 h 缩短至 1h~2 h，大

大缩短了检测时间，可满足水华暴发期间对监测数据的快速需求。

3.2.2 滤膜装片计数方法

滤膜法与计数框法在计数方法上一致。其镜检计数方法、计数精密度、计数规则均可参考计数框法。

《A Phytoplankton Methods Manual for Australian Freshwaters》(Gertraud Hotzel & Roger Croome, 1990) 中规定，浮游植物计数单元可为单细胞、丝状体或群体，主要依赖于浮游植物的自然存在形式。通常镜检不只在单一的倍数下完成，相对较大的细胞或群体可在 100 倍下完成，大部分可在 200 倍下计数。如果微微型浮游植物较多，还需在 400 倍下计数，最后分别统计计入总数。样品取样前，需充分混匀 50 次以上。美国《Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (22nd)》中，建议搅拌沉淀样品 50 次~100 次，确保充分混匀。McAlice (1971) 推荐计数框计数 30 个视野，一般可涵盖 90%~95% 的出现的藻类种属；计数 25 个视野，可涵盖 80~90% 的出现藻类的种属。

3.2.2.1 最小计数量

最小计数量无统一规定，它决定了计数误差，即精密度，方法的精密度水平与个体种类有关。精密度应最先确定，精密度水平的确定取决于项目要求。绝大部分种类精密度水平可设定在±20% (Lund, et al., 1958)。计数误差公式参考下式。式中 N 为计数的自然个体数，一般的种类计数 100 个~150 个，即可达到约 20% 的计数误差。

$$\text{计数误差} (\pm\%) = \frac{2}{\sqrt{N}} \times 100$$

3.2.2.2 丝状体或似球形群体计数

浮游植物形态各异，尤其是丝状体、似球形群体大小差异显著。为获得准确计数，样品中丝状体和群体的细胞数须单独列出，如鱼腥藻丝状体可能含有 5~1000 个细胞，微囊藻群体可能含有 10~1000 个细胞。对于细胞容易辨认、长度规则的丝状体，观察计数 30 个丝状体的每个丝状体的细胞数，计算 30 个丝状体的细胞均值即为样品中丝状体平均值。首先要确定样品中 30 个丝状体细胞分布是否为正态分布，若呈偏态分布要选择中值而非平均值。对于蓝藻的丝状体，可依据 Sichel distribution 计算精密度 (Laslett et al., 1997)。计算公式如下：

$$\sqrt{\frac{2}{N}} \times 100 = \text{precision}(\pm\%)$$

式中 N 为计数单位，如果要达到±20% 的精密度，需计数 50 个丝状体；达到±30% 的精密度需计数 23 个丝状体，需确定每个丝状体的细胞数。具体可参考澳大利亚和新西兰农业与资源管理委员会国家指南《Agriculture and Resource Management Council of Australia and New Zealand national protocol》中蓝藻监测部分 (Jones, 1997b)。相对于丝状体，群体细胞数较难确定。计数 30 个群体的每个群体的细胞数，若符合正态分布，则计算 30 个群体的细胞平均值；若符合偏态分布，则计算 30 个群体细胞的中值。也可通过群体直径与细胞数回归方程进行似球形群体细胞数估算 (Reynolds, 1978)。

3.2.2.3 每个视野计数要求

我国仅《水生生物监测手册》提及“藻密度最好每个视野 5 个~10 个左右”。美国《Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (22nd)》提到“滤膜法无需预先浓缩,但测试封片需首先完成,以确保在滤膜每个视野 10 个~20 个自然单位”。每个视野中藻类个数决定了计数误差或精密度水平。《Sedgwick rafter cell counts: A procedural analysis》(william J. Woelkerling, Robert R. Kowal & Stephen B. Gouch. Hydrbiologia vol. 48, 2, pag. 95-107, 1976)详细描述了赛吉计数框使用方法,包括计数策略以及获取较高的精密度及准确度数据方法。《Phytoplankton sampling with the sedgwick rafter cell》(McAlice, B. J., Limnology and Oceanography. V 16, no. 1, P. 19-28.)中提供了一套准确且可重复的视野取样方法。滤膜法为显微镜镜检计数提供了一种简单可靠的方法,与沉淀浓缩计数框法相比,可更快地获取数据结果,实现永久封片计数。

4 标准制订的基本原则和技术路线

4.1 基本原则

(1) 方法的等效性。方法的测定范围满足环保工作要求。与国外标准方法、现行方法进行比较研究,方法的检出限要求低于现有方法。

(2) 方法准确可靠。满足各项方法特性指标的要求。与国外标准方法和现行方法进行比较研究,新的标准方法具有较好的结果重现性。

(3) 方法具有普遍适用性,易于推广使用。方法操作需求简单,能实现浮游植物的快速测定,应用基础和前景好,便于推广使用。

4.2 标准制定的技术路线

标准制定主要以美国《Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater(22nd)》(APHA, AWWA, WEF) Part10000 Biological Examination 为参考,结合欧盟标准《Water quality-Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopy (Utermöhl technique)》(BS EN 15204:2006)、美国环保署《Survey of the Nation's Lakes Quality Assurance Project Plan(August 2007 DRAFT)》(EPA841-B-07-003)、英国《Freshwater Algae Identification and Use as Bioindicators》(Edward G.Bellinger & David C. Sige) part 2.5 of chapter 2: Microscope counts of species populations、美国湖沼与海洋学会《A simple and reliable method for making permanent mounts of phytoplankton for light and fluorescence microscopy》(Limnol. Oceanogr., 1987)中规范标准及相关技术研究,同时结合国内实际,研究制定《水质 浮游植物的测定 滤膜法》。

在技术方法上,参考国外《Sedgwick rafter cell counts: A procedural analysis》(william J. Woelkerling, Robert R. Kowal & Stephen B. Gouch. Hydrbiologia vol. 48, 2, pag. 95-107, 1976)、《Phytoplankton sampling with the sedgwick rafter cell》(McAlice, B. J., Limnology and Oceanography. V 16, no. 1, P. 19-28.)、英国《Freshwater Algae Identification and Use as Bioindicators》(Edward G.Bellinger & David C. Sige) part 2.5 of chapter 2: Microscope counts of species populations 中计数框的计数策略、最佳视野取样及统计分析方法、澳大利亚《A

phytoplankton methods Manual for Australian Freshwaters》(Gertraud Hotzel & Roger Croome, 1990) part 4 Analysis of samples (4.4.10 Statistics of counting and 4.4.11 Remarks on counting filaments and colonies) 等, 开展滤膜法的方法适用性研究, 包括与其他方法比较、滤膜适用性、真空压力、计数策略、过滤体积、检出限和精密度等内容。标准研究技术路线见图 1。

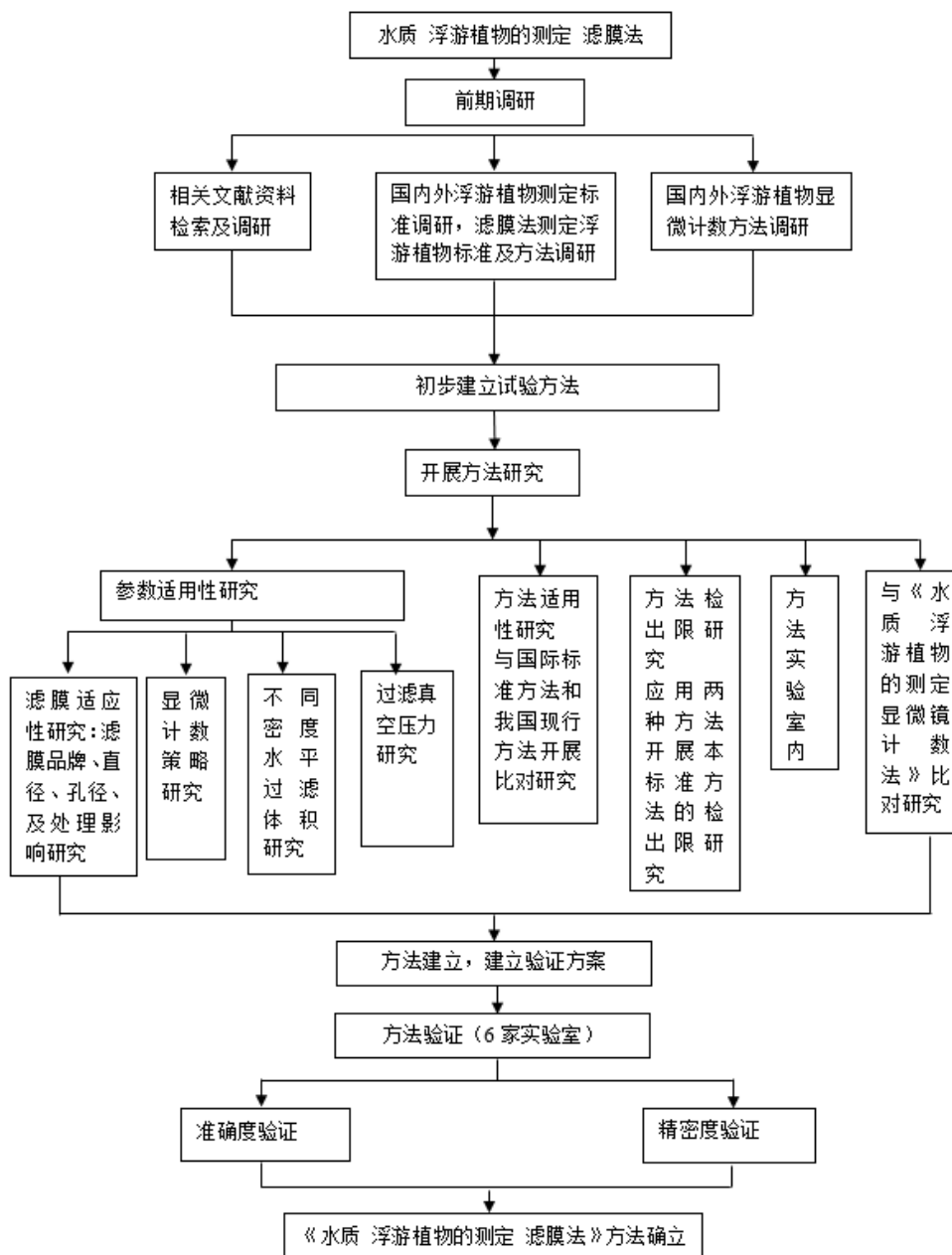


图 1 标准制定技术路线

5 方法研究报告

5.1 方法研究目标

(1) 建立以滤膜为计数载体, 适用于河流、湖泊及水库中浮游植物密度的快速测定方法。

(2) 建立可靠的浮游植物监测质量控制方法。明确浮游植物计数对象，统一前处理方法，确定浮游植物镜检计数方式，检出限计算方法，精密度确定方法，提出质量控制要求。

(3) 研发基于滤膜法的浮游植物滤膜封片、制片技术，为制备可长期保存的浮游植物样品玻片奠定研究基础。

5.2 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被截留在滤膜上，滤膜经透明处理后，在显微镜下对浮游植物进行分类计数。

5.3 试剂和材料

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

5.3.1 碘化钾 (KI)。

5.3.2 碘 (I₂)。

5.3.3 市售甲醛：φ (HCHO) = 40%。

5.3.4 鲁哥氏固定液：将 60g 碘化钾 (5.3.1) 溶解在 1L 蒸馏水或去离子水中，然后加入 40 g 碘 (5.3.2)，充分摇匀直至完全溶解。当溶液接近饱和时会有沉淀出现，使用前需去除沉淀。室温暗处保存 1 年。

5.3.5 市售透明油：显微镜浸没油或香柏油 ($n_D^{23} = 1.515$ 或 $n_E^{23} = 1.518$) 和透明玻璃滴棒。

5.3.6 滤膜：微孔混合纤维素酯膜 (Mixed ester/cellulose ester Filters)，直径 25mm，孔径 0.45~3 μm。

按以下方法对每批次滤膜进行油透明测试和水化测试，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透，则滤膜可透明。

5.4 仪器和设备

5.4.1 正置或倒置显微镜：物镜 5×、10×、20×、40×；目镜 10×。

5.4.2 真空泵：17 kPa 压力以下可调。

5.4.3 烘箱：70 °C ± 2 °C 可调。

5.4.4 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。

5.4.5 盖玻片：25 mm × 25 mm

5.4.6 载玻片：25 mm × 76 mm

注：载玻片或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。

5.4.7 目镜分划板：WHIPPLE GRID。

5.4.8 1mm 镜台测微尺。

5.4.9 无齿扁咀镊子。

5.4.10 凉片板。

5.4.11 25号浮游生物网：网孔直径为0.064mm,网呈圆锥形，网口套在铜环上，网低端有出水开关活塞。

5.4.12 1L~2L样品瓶，50ml样品瓶，材质为玻璃、聚丙烯或聚乙烯。

5.4.13 冷藏采样箱：2℃~8℃。

5.4.14 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。

注：样品采集瓶有PE瓶，PVC瓶和硬质玻璃瓶。PE瓶材质柔软，易吸附碘，导致碘从瓶壁挥发，使样品处于未固定状态。PE瓶较难密封，细菌可通过螺纹纹路进入，使样品处于低固定液浓度状态。玻璃瓶和硬质PVC瓶适合储存样品，但玻璃瓶和硬质PVC瓶质地较脆，不适合样品的运输。样品运输推荐选用PE瓶，到达实验室后将样品从PE瓶中转入PVC瓶或玻璃瓶。

5.5 样品

5.5.1 样品的采集

浮游植物样品采集点位设置参照HJ/T91的相关规定执行。若湖泊、水库水体是圆形或接近圆形的，则应从此岸至彼岸至少设两个相互垂直的采样断面；若是狭长的区域，则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。

浮游植物在水中不仅水平上有差异，而且垂直分布也有不同。若只采集表层水体则不能代表整个水层的浮游植物的实际情况。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0.5m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2m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3m~6m（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，河流可不分层，直接在水面下0.5m处采样，或在下层（河底上0.5m）加采一样，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）常上浮在水表面或有成片、成带分布的情况，在采样时应加以注意。采样时间应尽量在一天的相近时间，例如在上午的8点~10点时。

浮游植物样品分析专业性和复杂性较强，在考虑项目目标和考虑工作量的情况下可以根据实际情况操作。

5.5.1.1 定性样品

使用25号浮游生物网（5.4.11）采集定性样品。关闭浮游生物网（5.4.11）低端出水开关活塞，在水面表层至0.5m水深处以20cm/s~30cm/s的速度做“∞”形往复缓慢拖动约1min~3min，也可在水中沿表层拖滤1.5m³~5.0m³体积的水体。将浮游生物网（5.4.11）提出水面，水体自然通过网孔，待底部还剩少许水体（5ml~10ml）时，将底端出口伸入采样瓶（5.4.12）中，打开底端活塞收集定性样品。

5.5.1.2 定量样品

采集 1L~2 L 水至样品瓶（5.4.12）中，立刻加入 10ml 鲁哥氏液固定（5.3.4），浮游植物密度较高时，采水量可适当减少；浮游植物密度较低时，采水量可适当增加。样品采集后应立刻加入鲁哥氏液固定（5.3.4），若浮游植物密度过低，应酌情增加采水量。样品瓶可在实验室加好鲁哥氏液（5.3.4）带至现场。

注：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。

5.5.2 样品的保存

5.5.2.1 定性样品

定性样品应避光保存在 4℃ ~ 10℃ 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。高密度样品（108 cells/L 及以上）保存前需稀释，避免样品因氧损耗发生降解。

5.5.2.2 定量样品

每 1000ml 定量样品中加入 15ml 鲁哥氏液（5.3.4）。室温条件下可保存 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，直到样品的颜色恢复为黄褐色。

若定量、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（5.3.3）固定，每 100ml 样品加入 4ml 甲醛溶液（5.3.3）。

5.6 分析步骤

5.6.1 试样制备

5.6.1.1 预检

完成预检装片（5.6.1.2~5.6.1.5），判断样品浮游植物密度（5.6.2），以便于样品的后续分析。

5.6.1.2 样品摇匀

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

5.6.1.3 过滤体积

样品浮游植物密度在 10^8 cells/L 以上时，推荐过滤体积 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，推荐过滤体积 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 5ml 时，用实验用水将样品再悬浮，最后在悬浮样品中加入几滴鲁哥氏液固定（5.3.4）。

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。

5.6.1.4 样品过滤

用量筒、定量移液器或移液枪（5.4.14）快速量取适量体积的样品，将定量样品加入微孔滤膜过滤器（5.4.4）漏斗中，静止 2 min~3 min，使用真空泵（5.4.2）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。

5.6.1.5 装片制备

样品过滤完成后，用无齿扁咀镊子取下滤膜，保持有藻面朝上，放在滴有 2 滴显微镜浸没油的载玻片上，再用透明玻璃滴棒在滤膜上滴 2 滴显微镜浸没油，将载玻片放入凉片板，置于烘箱中，70 °C ± 2 °C 加热 2 h。2 h 后取出凉片板，观察滤膜是否透明。若已透明，再用透明滴棒在滤膜上滴 2 滴显微镜浸没油，盖上盖玻片，装片制备完成。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。加盖盖玻片时，切勿扰动滤膜。滤膜法分析步骤示意图详见图 2。

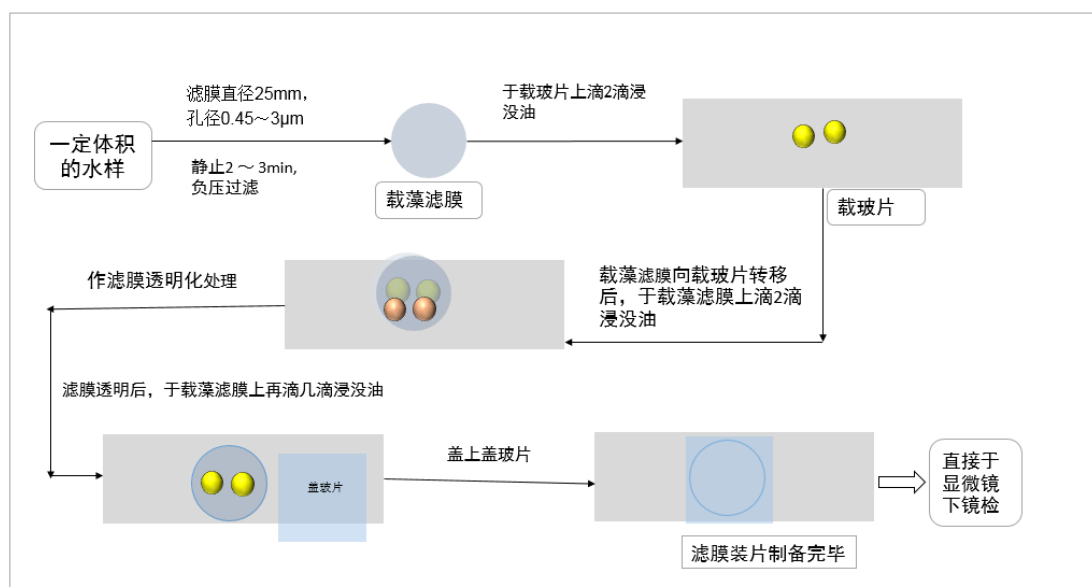


图 2 滤膜法分析步骤示意图

5.6.2 显微计数

5.6.2.1 显微镜标定

计数前标定显微镜，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 Grid 目镜分划板和 1mm 镜台测微尺。

5.6.2.1.1 WHIPPLE GRID 目镜分划板及标定

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（图 3）。WHIPPLE GRID 包含一个大格，大格被均分成 100 个小格，其中心格子又被均分成 25 个小

方格。镜台测微尺规格为 1mm，均分成 100 等分，每分格代表 10 μ m（图 4）。

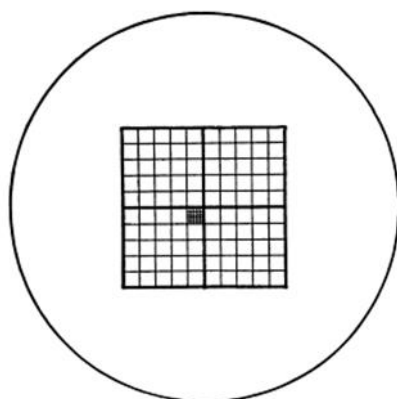


图 3 Whipple Grid 目镜测微尺 100div

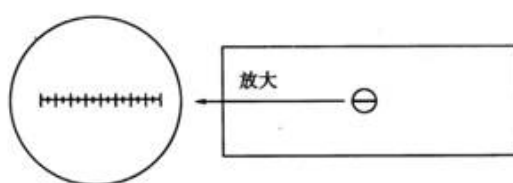


图 4 镜台测微尺 0.01mm/100div

WHIPPLE GRID 标定步骤：

- (1) 将目镜测微尺 Whipple Grid 刻度朝下装入显微镜目镜的隔板上；
- (2) 将镜台测微尺放在显微镜下，刻度朝上。低倍观察，对准焦距，使视野中镜台测微尺刻度清晰；

(3) 转动目镜，使目镜测微尺 WHIPPLE GRID 与镜台测微尺刻度平行，移动载物台，使两尺重叠，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。镜台测微尺每格长度 10 μ m，在一定目镜和物镜组合放大倍数下，目镜测微尺的校准结果即每格的长度：

目镜测微尺每格长度=（镜台测微尺格数 \times 镜台测微尺每格长度）/与镜台测微尺重复的目镜测微尺格数，将校准数据填入表 3。依据表 3 完成表 4。

表 3 目镜测微尺 Whipple Grid 校准结果

| 目镜 & 物镜组合 | 校准内容 | | | | |
|-----------|------|-----------|----|----------------|----|
| | 次数 | 大格/ mm | 均值 | 中格/ μ m | 均值 |
| 10X & 10X | 1 | | | | |
| | 2 | | | | |
| | 3 | | | | |
| 10X & 20X | 1 | | | | |
| | 2 | | | | |

| | | | | | |
|-----------|---|--|--|--|--|
| | 3 | | | | |
| 10X & 40X | 1 | | | | |
| | 2 | | | | |
| | 3 | | | | |
| 10X & 4X | 1 | | | | |
| | 2 | | | | |
| | 3 | | | | |

表 4 Whipple Grid 面积计算结果 (mm²)

| 目镜& 物镜组合 | 校准内容 | | |
|-------------|------|---------------------------------|----|
| | 次数 n | WHIPPLE GRID 面积/mm ² | 均值 |
| 10X & 10X | 1 | | |
| | 2 | | |
| | 3 | | |
| 10X & 20X | 1 | | |
| | 2 | | |
| | 3 | | |
| 10X & 40X | 1 | | |
| | 2 | | |
| | 3 | | |
| 10X & 4X | 1 | | |
| | 2 | | |
| | 3 | | |

5.6.2.1.2 目镜视场视野面积标定

显微镜观察时，所看到的明亮圆形范围叫视场，视场大小由目镜里的视场光栅决定。视场直径也称视场宽度，是指显微镜下观察到的圆形视场内所能容纳被检物体的实际范围。视场视野是由视场直径所决定的圆形面积。不同放大倍数下的视场直径可经镜台测微尺校准，视场面积通过计算圆面积而得。具体校准方法参见 5.6.2.1.1。

5.6.2.2 计数

将装片置于显微镜下用 whipple 视野或目镜视场视野对装片进行显微计数，记录装片中浮游植物种类及数量。

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，处于上边界及左边界线的藻类不计入总数；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。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需估算。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。视野在滤膜上的移动示例见图 5。

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 5。

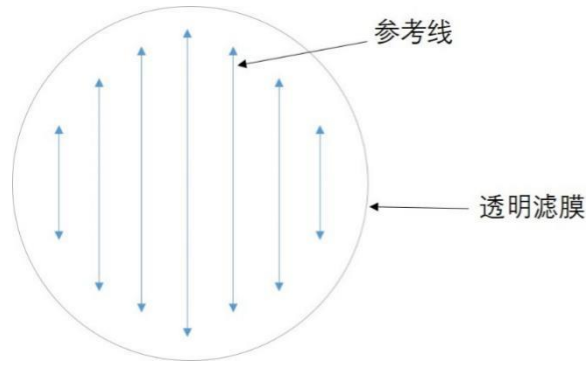


图 5 显微镜视野在滤膜上的移动示例

表 5 不同样品推荐视野类别及计数视野数

| 样品 | 推荐视野类别 | 推荐计数视野数 |
|---------------------------------------------------------|-----------|---------|
| 高密度样品 (10 ⁸ cells/L及以上) | Whipple视野 | 大于10个 |
| 中密度样品 (10 ⁶ cells/L~10 ⁷ cells/L) | Whipple视野 | 大于20个 |
| 低密度样品 (10 ⁶ cells/L以下) | 目镜视场视野 | 大于20个 |

5. 6. 2. 3 丝状体或似球形群体细胞数估算

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，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，丝状体细胞数=中值×丝状体数目 (Gertraud Hötzel and Roger Croome, 1990)。

通过群体直径估算似球形群体细胞数，估算公式见式 (1)。

$$\log_{10} y = 2.991 \log_{10} x - 2.80 \quad (1)$$

式中：y——细胞数；

x——平均群体直径，μm。

使用该公式估算微囊藻群体细胞数时需满足：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可按照丝状体细胞数的确定方法，估算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大小的平均细胞数。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。当然这是粗略估计而非精确计数，使用这种方法需要在工作记录表上加以说明 (Gertraud Hötzel and Roger Croome, 1990)。

5.6.3.4 最小计数量

最小计数量决定了计数误差。计数误差即精密度，精密度水平取决于项目目标。绝大部分种类，个体细胞或者小的群体，精密度水平可设定±20% (Lund,et al.,1958)；计数 100 个个体可达到 20%的精密度。计数误差公式参考公式 (2)。

$$\text{计数误差} (\pm\%) = \frac{2}{\sqrt{N}} \quad (2)$$

式中 N 为计数的自然个体数。如果计数 100 个个体数，则计数误差为±20%；如果计数 400 个个体数，则计数误差为±10%。若误差减半需增加 4 倍的计数量。通常，种类计数 100~150 个即可达到约 20%的计数误差。计数误差应明确是针对总分类单元，还是针对某一种类。

5.6.3.5 检出限及测定下限

按照《环境监测分析方法标准制修订技术导则》(HJ 168)附录 A1.1.1 方法确定滤膜法检出限。按照样品分析的全部步骤，对浮游植物密度为方法检出限的 2~5 倍的浮游植物样品进行 7 次平行测定，计算测定结果的标准偏差，根据公式 (3) 计算方法的检出限，再根据检出限确定方法的检测下限。

$$\text{MDL} = t_{(n-1, 0.99)} \times S \quad (3)$$

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 时，置信度为 99%时的 t 分布（单侧）；

S：n 次平行测定的标准偏差；

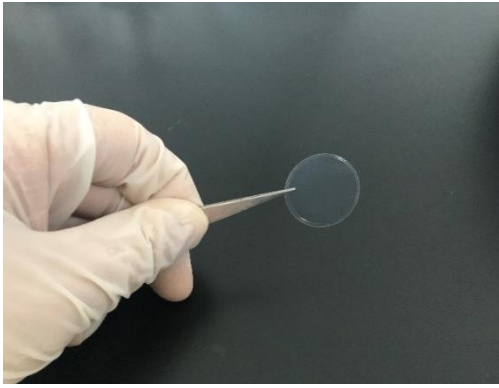
根据 t 值表，查得当 n = 7 时， $t_{(n-1, 0.99)} = 3.143$ ，求得 MDL，则检测下限 = MDL×4。

5.6.4 方法主要参数的研究和确定

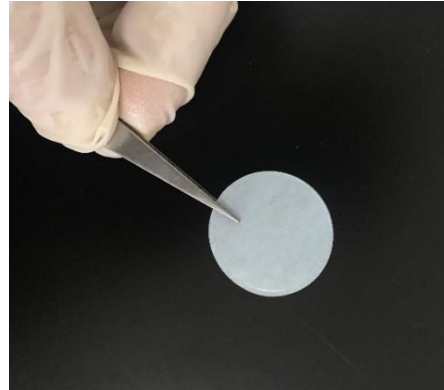
5.6.4.1 滤膜适应性研究

5.6.4.1.1 滤膜直径

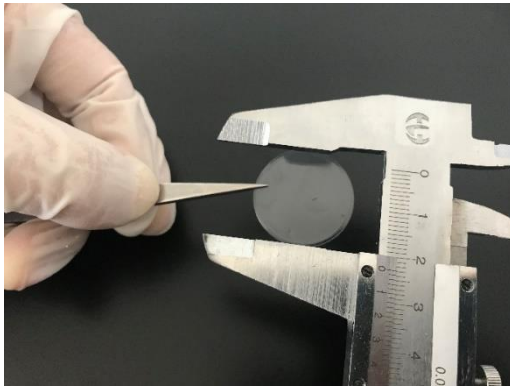
分别选择 0.45μm、3μm、5μm、8μm 等 4 种规格的进口滤膜和国产滤膜开展滤膜延展性试验，使用游标卡尺测量处理前后滤膜直径，分析透明时间对滤膜直径影响。滤膜透明处理及滤膜直径测量详见图 6，国产滤膜与进口滤膜比较详见表 6 和表 7。



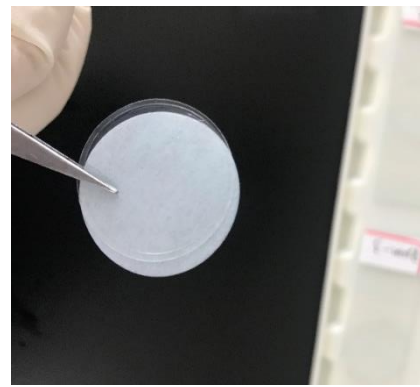
A 透明滤膜



B 滤膜透明前后重叠



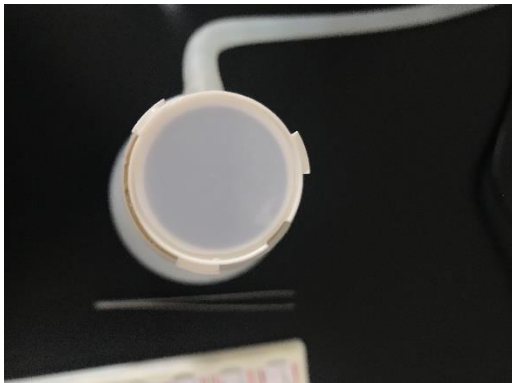
C 透明滤膜测量



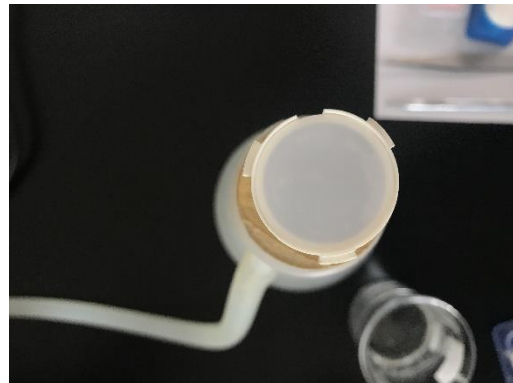
D 滤膜透明前后比较

图 6 透明处理及滤膜直径测量照片

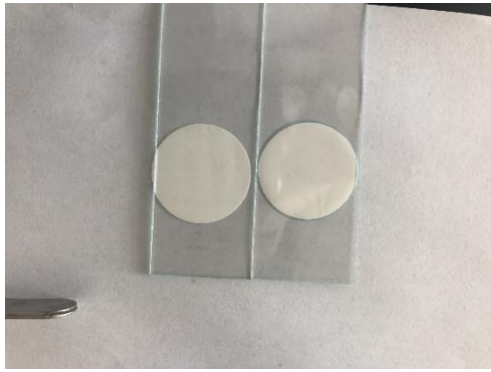
与进口滤膜相比，国产滤膜直径稍小于进口滤膜，但能满足实验要求。国产滤膜透明速度较快，易卷曲，浸没油损耗多。需特别注意卷曲国产滤膜压片，多加几滴显微镜浸没油使滤膜平铺，再滴几滴浸没油，加盖玻片压片。国产滤膜与进口滤膜比较详见图 7。



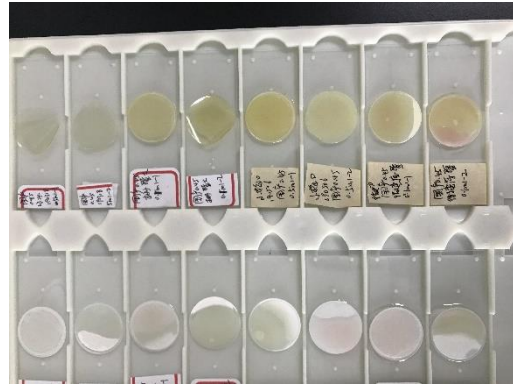
A 国产滤膜装配



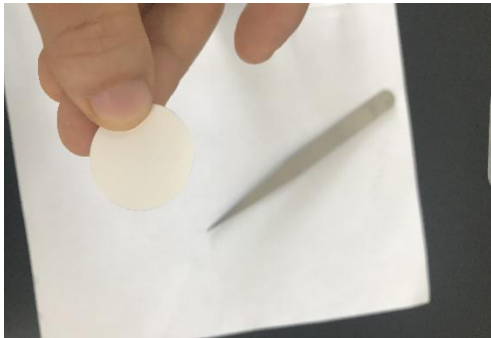
B 进口滤膜装配



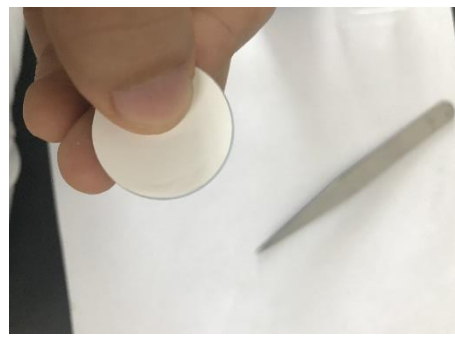
C 进口滤膜（左）及国产滤膜（右）比较



D 国产滤膜（上）及进口滤膜（下）透明后比较



E 进口滤膜与直径 25mm 滤膜隔片重叠



F 国产滤膜未与直径 25mm 滤膜隔片重叠

图 7 国产滤膜与进口滤膜比较相关图片

不同规格的进口滤膜延展性分析结果表明，在滤膜透明前、滤膜透明处理 2h、透明处理 12h 以上条件下，高、中及低密度水平样品藻密度实验室间检测结果分别为： $9.77E+07$ cells/L、 $9.55E+07$ cells/L 和 $9.48E+07$ cells/L； $4.18E+06$ cells/L、 $4.08E+06$ cells/L 和 $4.05E+06$ cells/L；和 $6.95E+04$ cells/L、 $6.80E+04$ cells/L、 $6.75E+04$ cells/L；结果间相对标准偏差分别为 1.57%，1.57%，1.57%。不同透明时长对进口滤膜直径和检测结果的影响详见表 6 和表 8。

不同规格国产滤膜检测结果表明，在滤膜透明前、滤膜透明处理 2h，透明处理 12h 以上条件下，对四种样品编号分别为 FSJR，JNU-Scene，XMKL，JNU-Micro 的实样检测结果分别为 $1.18E+07$ cells/L； $5.23E+09$ cells/L； $2.63E+08$ cells/L； $1.88E+10$ cells/L，四种实样结果间的相对标准偏差分别为 2.40%，2.40%，2.40%，2.40%；不同透明时长对国产滤膜直径和检测结果的影响详见表 7 和表 9。

研究结果表明，透明过程对国产滤膜、进口滤膜直径无明显影响，透明时长不影响检测结果。

表 6 不同透明时长对进口滤膜直径的影响

| 透明时间 2h | 0.45 μ m 孔径滤膜 | | 3 μ m 孔径滤膜 | | 5 μ m 孔径滤膜 | | 8 μ m 孔径滤膜 | |
|----------|-------------------|-------|----------------|-------|----------------|-------|----------------|-------|
| (单位 mm) | 透明前 | 透明后 | 透明前 | 透明后 | 透明前 | 透明后 | 透明前 | 透明后 |
| 平行 1 | 25.20 | 25.20 | 25.20 | 24.72 | 25.00 | 24.70 | 25.00 | 24.72 |
| | 25.10 | 24.62 | 25.20 | 24.72 | 25.00 | 24.72 | 25.30 | 24.52 |
| 平行 2 | 25.10 | 24.60 | 25.30 | 24.70 | 25.00 | 24.52 | 25.10 | 24.90 |
| | 25.10 | 24.70 | 25.30 | 24.82 | 25.00 | 24.25 | 25.10 | 25.00 |
| 平行 3 | 25.00 | 25.00 | 25.20 | 24.68 | 25.00 | 24.60 | 24.80 | 24.90 |
| | 25.00 | 24.72 | 25.14 | 24.72 | 25.00 | 24.68 | 25.00 | 24.90 |
| 平均值 | 25.08 | 24.81 | 25.22 | 24.73 | 25.00 | 24.58 | 25.05 | 24.82 |
| SD | 0.08 | 0.24 | 0.06 | 0.05 | 0.00 | 0.18 | 0.16 | 0.17 |
| 直径变化 | 0.28 | | 0.50 | | 0.42 | | 0.23 | |
| 透明时间>12h | 透明前 | 透明后 | 透明前 | 透明后 | 透明前 | 透明后 | 透明前 | 透明后 |
| 平行 1 | 25.20 | 24.52 | 25.20 | 24.72 | 25.00 | 24.70 | 25.00 | 25.00 |
| | 25.10 | 25.00 | 25.20 | 24.72 | 25.00 | 24.72 | 25.30 | 24.72 |
| 平行 2 | 25.10 | 24.60 | 25.30 | 24.72 | 25.00 | 24.72 | 25.10 | 24.70 |
| | 25.10 | 24.60 | 25.30 | 25.20 | 25.00 | 25.10 | 25.10 | 24.72 |
| 平行 3 | 25.00 | 24.80 | 25.20 | 24.90 | 25.00 | 25.00 | 24.80 | 24.72 |
| | 25.00 | 24.72 | 25.14 | 25.00 | 25.00 | 25.10 | 25.00 | 25.00 |
| 平均值 | 25.08 | 24.71 | 25.22 | 24.88 | 25.00 | 24.89 | 25.05 | 24.81 |
| SD | 0.08 | 0.17 | 0.06 | 0.20 | 0.00 | 0.20 | 0.16 | 0.15 |
| 直径变化 | 0.38 | | 0.35 | | 0.11 | | 0.24 | |

表 7 不同透明时长对国产滤膜直径的影响

| 透明时间 2h | 0.45 μm 孔径滤膜 | | 3 μm 孔径滤膜 | | 5 μm 孔径滤膜 | | 8 μm 孔径滤膜 | |
|------------|-------------------------|-------|----------------------|-------|----------------------|-------|----------------------|-------|
| (单位 mm) | 前 | 后 | 前 | 后 | 前 | 后 | 前 | 后 |
| 平行 1 | 24.20 | 24.30 | 24.82 | 24.10 | 24.80 | 23.94 | 25.00 | 23.84 |
| | 24.52 | 24.32 | 24.70 | 23.70 | 24.80 | 24.00 | 25.00 | 24.12 |
| 平行 2 | 24.72 | 24.10 | 24.92 | 23.76 | 24.80 | 24.32 | 24.90 | 24.12 |
| | 24.52 | 23.84 | 24.92 | 24.36 | 24.90 | 24.12 | 24.92 | 24.42 |
| 平行 3 | 24.82 | 24.10 | 24.72 | 23.74 | 24.82 | 24.00 | 24.80 | 24.10 |
| | 24.52 | 24.00 | 24.72 | 23.74 | 25.00 | 24.12 | 24.72 | 24.32 |
| 平均值 | 24.55 | 24.11 | 24.80 | 23.90 | 24.85 | 24.08 | 24.89 | 24.15 |
| SD | 0.21 | 0.18 | 0.10 | 0.27 | 0.08 | 0.14 | 0.11 | 0.20 |
| 直径变化 | 0.44 | | 0.90 | | 0.77 | | 0.74 | |
| 透明时间 > 12h | 前 | 后 | 前 | 后 | 前 | 后 | 前 | 后 |
| 平行 1 | 24.20 | 24.50 | 24.82 | 24.12 | 24.80 | 24.10 | 25.00 | 24.10 |
| | 24.52 | 24.10 | 24.70 | 24.10 | 24.80 | 24.12 | 25.00 | 24.10 |
| 平行 2 | 24.72 | 23.50 | 24.92 | 24.00 | 24.80 | 24.10 | 24.90 | 24.20 |
| | 24.52 | 24.12 | 24.92 | 23.74 | 24.90 | 24.20 | 24.92 | 24.30 |
| 平行 3 | 24.82 | 23.80 | 24.72 | 23.74 | 24.82 | 24.00 | 24.80 | 23.80 |
| | 24.52 | 24.00 | 24.72 | 24.20 | 25.00 | 24.10 | 24.72 | 23.84 |
| 平均值 | 24.55 | 24.00 | 24.80 | 23.98 | 24.85 | 24.10 | 24.89 | 24.06 |
| SD | 0.21 | 0.34 | 0.10 | 0.20 | 0.08 | 0.06 | 0.11 | 0.20 |
| 直径变化 | 0.55 | | 0.82 | | 0.75 | | 0.83 | |

表 8 进口滤膜不同透明时间对检测结果的影响

| 密度水平 | 处理 | 平行号 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | mean1 | mean2 | mean3 | SD(cells/L) | RSD(%) |
|------|-----------|-----|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-------------|--------|
| 高密度 | 0 | 1# | 9.32E+07 | 1.11E+08 | 1.02E+08 | 1.06E+08 | 1.01E+08 | 9.32E+07 | 1.01E+08 | 9.77E+07 | 9.60E+07 | 1.51E+06 | 1.57% |
| | | 2# | 9.82E+07 | 9.96E+07 | 9.04E+07 | 1.02E+08 | 1.05E+08 | 9.41E+07 | 9.82E+07 | | | | |
| | | 3# | 1.02E+08 | 1.10E+08 | 1.07E+08 | 1.00E+08 | 9.51E+07 | 1.00E+08 | 1.02E+08 | | | | |
| | | 4# | 1.07E+08 | 1.09E+08 | 1.06E+08 | 9.87E+07 | 8.54E+07 | 8.38E+07 | 9.84E+07 | | | | |
| | | 5# | 8.66E+07 | 9.35E+07 | 9.15E+07 | 9.37E+07 | 8.73E+07 | 7.88E+07 | 8.86E+07 | | | | |
| | 透明时间 2h | 1# | 9.12E+07 | 1.08E+08 | 9.93E+07 | 1.03E+08 | 9.87E+07 | 9.12E+07 | 9.86E+07 | 9.55E+07 | | | |
| | | 2# | 9.61E+07 | 9.74E+07 | 8.84E+07 | 9.94E+07 | 1.03E+08 | 9.20E+07 | 9.60E+07 | | | | |
| | | 3# | 9.99E+07 | 1.08E+08 | 1.04E+08 | 9.79E+07 | 9.30E+07 | 9.79E+07 | 1.00E+08 | | | | |
| | | 4# | 1.05E+08 | 1.07E+08 | 1.04E+08 | 9.65E+07 | 8.35E+07 | 8.20E+07 | 9.62E+07 | | | | |
| | | 5# | 8.47E+07 | 9.15E+07 | 8.95E+07 | 9.16E+07 | 8.54E+07 | 7.70E+07 | 8.66E+07 | | | | |
| | 透明时间 >12h | 1# | 9.04E+07 | 1.07E+08 | 9.85E+07 | 1.02E+08 | 9.79E+07 | 9.04E+07 | 9.78E+07 | 9.48E+07 | | | |
| | | 2# | 9.53E+07 | 9.66E+07 | 8.77E+07 | 9.86E+07 | 1.02E+08 | 9.13E+07 | 9.52E+07 | | | | |
| | | 3# | 9.91E+07 | 1.07E+08 | 1.04E+08 | 9.71E+07 | 9.23E+07 | 9.71E+07 | 9.94E+07 | | | | |
| | | 4# | 1.04E+08 | 1.06E+08 | 1.03E+08 | 9.58E+07 | 8.28E+07 | 8.13E+07 | 9.55E+07 | | | | |

| 密度水平 | 处理 | 平行号 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | mean1 | mean2 | mean3 | SD(cells/L) | RSD(%) |
|-------|-----------|-----|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-------------|--------|
| | | 5# | 8.40E+07 | 9.07E+07 | 8.88E+07 | 9.09E+07 | 8.47E+07 | 7.64E+07 | 8.59E+07 | | | | |
| 中密度水平 | 0 | 1# | 4.63E+06 | 4.01E+06 | 4.51E+06 | 3.94E+06 | 4.20E+06 | 4.04E+06 | 4.22E+06 | 4.18E+06 | 4.10E+06 | 6.45E+04 | 1.57% |
| | | 2# | 4.17E+06 | 4.07E+06 | 4.25E+06 | 4.39E+06 | 4.25E+06 | 3.92E+06 | 4.17E+06 | | | | |
| | | 3# | 3.74E+06 | 4.11E+06 | 4.09E+06 | 4.04E+06 | 3.97E+06 | 3.98E+06 | 3.99E+06 | | | | |
| | | 4# | 4.35E+06 | 3.82E+06 | 4.22E+06 | 4.11E+06 | 4.34E+06 | 4.10E+06 | 4.16E+06 | | | | |
| | | 5# | 3.95E+06 | 4.32E+06 | 4.73E+06 | 4.56E+06 | 4.34E+06 | 4.14E+06 | 4.34E+06 | | | | |
| | 透明时间 2h | 1# | 4.53E+06 | 3.92E+06 | 4.41E+06 | 3.85E+06 | 4.11E+06 | 3.95E+06 | 4.13E+06 | 4.08E+06 | 4.10E+06 | 6.45E+04 | 1.57% |
| | | 2# | 4.08E+06 | 3.98E+06 | 4.15E+06 | 4.30E+06 | 4.15E+06 | 3.83E+06 | 4.08E+06 | | | | |
| | | 3# | 3.66E+06 | 4.02E+06 | 4.00E+06 | 3.95E+06 | 3.88E+06 | 3.89E+06 | 3.90E+06 | | | | |
| | | 4# | 4.25E+06 | 3.73E+06 | 4.12E+06 | 4.02E+06 | 4.24E+06 | 4.01E+06 | 4.06E+06 | | | | |
| | | 5# | 3.86E+06 | 4.23E+06 | 4.63E+06 | 4.46E+06 | 4.24E+06 | 4.05E+06 | 4.24E+06 | | | | |
| | 透明时间 >12h | 1# | 4.49E+06 | 3.89E+06 | 4.38E+06 | 3.82E+06 | 4.08E+06 | 3.92E+06 | 4.10E+06 | 4.05E+06 | 4.10E+06 | 6.45E+04 | 1.57% |
| | | 2# | 4.05E+06 | 3.95E+06 | 4.12E+06 | 4.26E+06 | 4.12E+06 | 3.80E+06 | 4.05E+06 | | | | |
| | | 3# | 3.63E+06 | 3.99E+06 | 3.97E+06 | 3.92E+06 | 3.85E+06 | 3.86E+06 | 3.87E+06 | | | | |
| | | 4# | 4.22E+06 | 3.70E+06 | 4.09E+06 | 3.99E+06 | 4.21E+06 | 3.98E+06 | 4.03E+06 | | | | |
| | | 5# | 3.83E+06 | 4.19E+06 | 4.59E+06 | 4.42E+06 | 4.21E+06 | 4.02E+06 | 4.21E+06 | | | | |

| 密度水平 | 处理 | 平行号 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | mean1 | mean2 | mean3 | SD(cells/L) | RSD(%) |
|-------|-----------|-----|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-------------|--------|
| 低密度水平 | 0 | 1# | 6.75E+04 | 8.73E+04 | 9.08E+04 | 9.41E+04 | 8.98E+04 | 9.07E+04 | 8.67E+04 | 6.95E+04 | 6.83E+04 | 1.07E+03 | 1.57% |
| | | 2# | 6.03E+04 | 6.79E+04 | 6.50E+04 | 6.48E+04 | 6.40E+04 | 6.22E+04 | 6.40E+04 | | | | |
| | | 3# | 5.23E+04 | 5.15E+04 | 5.38E+04 | 4.92E+04 | 4.31E+04 | 5.70E+04 | 5.12E+04 | | | | |
| | | 4# | 6.33E+04 | 8.10E+04 | 7.62E+04 | 7.18E+04 | 7.71E+04 | 7.29E+04 | 7.37E+04 | | | | |
| | | 5# | 7.86E+04 | 7.10E+04 | 7.82E+04 | 6.48E+04 | 6.68E+04 | 7.29E+04 | 7.20E+04 | | | | |
| | 透明时间 2h | 1# | 6.61E+04 | 8.53E+04 | 8.88E+04 | 9.20E+04 | 8.78E+04 | 8.87E+04 | 8.48E+04 | 6.80E+04 | | | |
| | | 2# | 5.90E+04 | 6.64E+04 | 6.36E+04 | 6.33E+04 | 6.26E+04 | 6.08E+04 | 6.26E+04 | | | | |
| | | 3# | 5.11E+04 | 5.04E+04 | 5.26E+04 | 4.81E+04 | 4.22E+04 | 5.57E+04 | 5.00E+04 | | | | |
| | | 4# | 6.19E+04 | 7.93E+04 | 7.46E+04 | 7.02E+04 | 7.54E+04 | 7.13E+04 | 7.21E+04 | | | | |
| | | 5# | 7.69E+04 | 6.95E+04 | 7.65E+04 | 6.33E+04 | 6.53E+04 | 7.13E+04 | 7.05E+04 | | | | |
| | 透明时间 >12h | 1# | 6.55E+04 | 8.47E+04 | 8.81E+04 | 9.13E+04 | 8.71E+04 | 8.80E+04 | 8.41E+04 | 6.75E+04 | | | |
| | | 2# | 5.85E+04 | 6.59E+04 | 6.31E+04 | 6.28E+04 | 6.21E+04 | 6.03E+04 | 6.21E+04 | | | | |
| | | 3# | 5.07E+04 | 5.00E+04 | 5.22E+04 | 4.78E+04 | 4.18E+04 | 5.53E+04 | 4.96E+04 | | | | |
| | | 4# | 6.14E+04 | 7.86E+04 | 7.40E+04 | 6.96E+04 | 7.48E+04 | 7.07E+04 | 7.15E+04 | | | | |
| | | 5# | 7.63E+04 | 6.89E+04 | 7.59E+04 | 6.28E+04 | 6.48E+04 | 7.07E+04 | 6.99E+04 | | | | |

表 9 国产滤膜透明时间不同对检测结果的影响

| 子样品编号 | 透明时间 | 平行号 | 藻密度(cells/L) | Mean1 | Mean2 | SD | RSD (%) |
|-----------|------|-----|--------------|----------|----------|----------|---------|
| FSJR | 0h | 1 | 1.21E+07 | 1.21E+07 | 1.18E+07 | 2.84E+05 | 2.40% |
| | | 2 | 1.22E+07 | | | | |
| | 2h | 1 | 1.17E+07 | 1.17E+07 | | | |
| | | 2 | 1.17E+07 | | | | |
| | 14h | 1 | 1.16E+07 | 1.16E+07 | | | |
| | | 2 | 1.16E+07 | | | | |
| JNU-Scene | 0h | 1 | 5.49E+09 | 5.38E+09 | 5.23E+09 | 1.26E+08 | 2.40% |
| | | 2 | 5.26E+09 | | | | |
| | 2h | 1 | 5.29E+09 | 5.19E+09 | | | |
| | | 2 | 5.08E+09 | | | | |
| | 14h | 1 | 5.25E+09 | 5.14E+09 | | | |
| | | 2 | 5.03E+09 | | | | |
| XMKL | 0h | 1 | 3.25E+08 | 2.70E+08 | 2.63E+08 | 6.30E+06 | 2.40% |
| | | 2 | 2.14E+08 | | | | |
| | 2h | 1 | 3.14E+08 | 2.60E+08 | | | |
| | | 2 | 2.06E+08 | | | | |
| | 14h | 1 | 3.11E+08 | 2.58E+08 | | | |
| | | 2 | 2.05E+08 | | | | |
| JNU-Micro | 0h | 1 | 1.94E+10 | 1.93E+10 | 1.88E+10 | 4.51E+08 | 2.40% |
| | | 2 | 1.93E+10 | | | | |
| | 2h | 1 | 1.87E+10 | 1.86E+10 | | | |
| | | 2 | 1.86E+10 | | | | |
| | 14h | 1 | 1.85E+10 | 1.85E+10 | | | |
| | | 2 | 1.84E+10 | | | | |

5.6.4.1.2 滤膜孔径

选取 0.45 μm 、3 μm 、5 μm 和 8 μm 等规格滤膜，对中、低密度实际样品开展滤膜法检测。结果表明，滤膜孔径的增加将导致中密度样品藻密度数量下降，但滤膜孔径变化对中密度样品检测结果的相对标准偏差无明显影响。温州泽雅水库样品分析结果表明，0.45 μm 、3 μm 、5 μm 和 8 μm 规格滤膜检测结果的相对标准偏差均小于 7%，不同孔径滤膜不影响中密度样品的检测结果。结果详见表 10 和图 8~图 10。

表 10 滤膜孔径对中密度样品检测结果的影响

| 孔径 | 藻密度均值 (cells/ml) | SD (cells/ml) | RSD (%) |
|--------------------|------------------|---------------|---------|
| 0.45 μm | 8989 | 258 | 2.9 |
| 3 μm | 9024 | 603 | 6.7 |
| 5 μm | 7771 | 248 | 0.8 |
| 8 μm | 7852 | 352 | 4.5 |

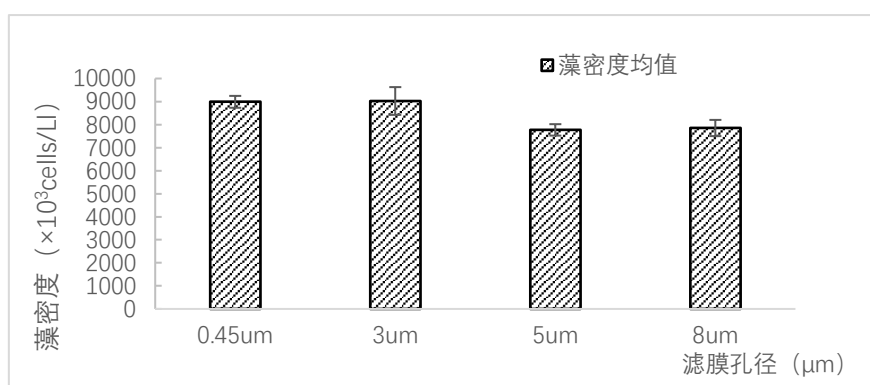


图 8 不同孔径滤膜处理后的中密度样品检测结果
(样品来源：温州泽雅水库)

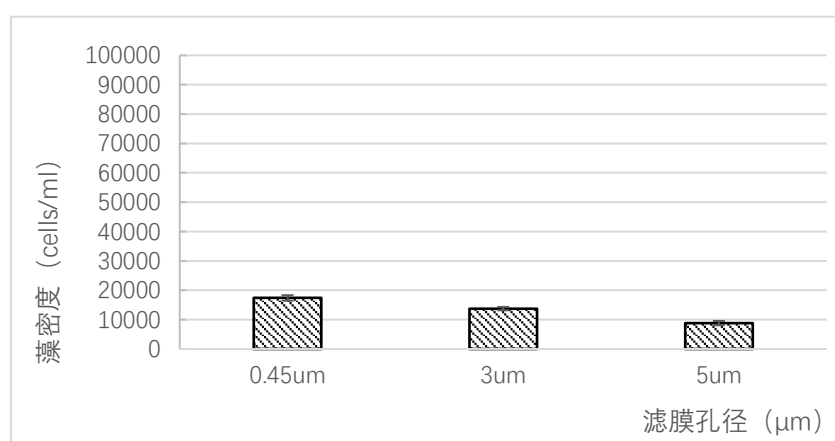


图 9 不同孔径滤膜处理后的中密度样品镜检结果
(样品来源：富春江严子陵钓台)

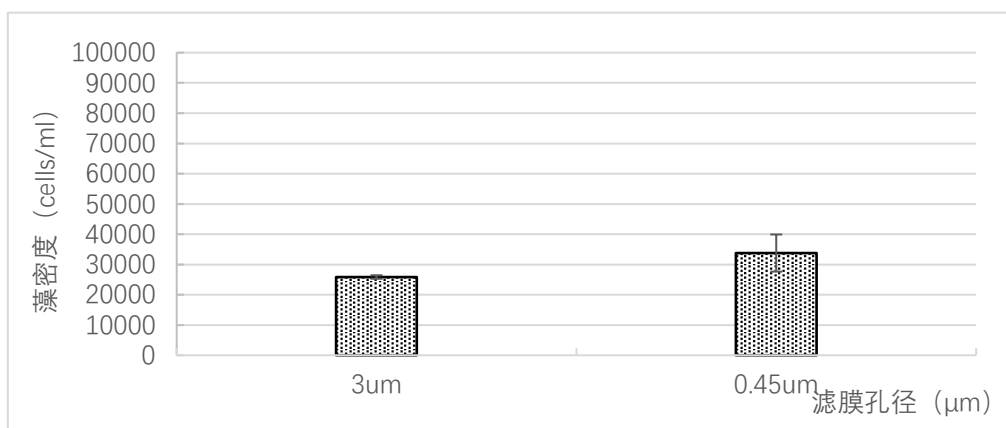


图 10 不同孔径滤膜处理后的中密度样品镜检结果
(样品来源: 湖州小梅口)

滤膜孔径的增加会导致低密度样品藻密度数量下降, 相对标准偏差也明显升高, 滤膜孔径对低密度样品的影响详见图 11 和表 11。与中密度样品相比, 滤膜孔径显著影响低密度样品的检出数量, 滤膜孔径的增加导致检测结果偏低。尽管滤膜孔径影响样品检出数量, 但 0.45μm, 3μm, 5μm 和 8μm 规格滤膜的检测结果无明显差异。滤膜孔径除影响低密度样品检测数量外, 不影响分析结果。

表 11 不同孔径滤膜处理后的低密度样品藻类镜检结果

| 孔径 | 藻密度均值 (cells/ml) | SD (cells/ml) | RSD (%) |
|--------|------------------|---------------|---------|
| 0.45μm | 6441 | 605 | 9.4 |
| 3μm | 4045 | 108 | 2.7 |
| 5μm | 3371 | 600 | 17.8 |
| 8μm | 2595 | 432 | 16.6 |

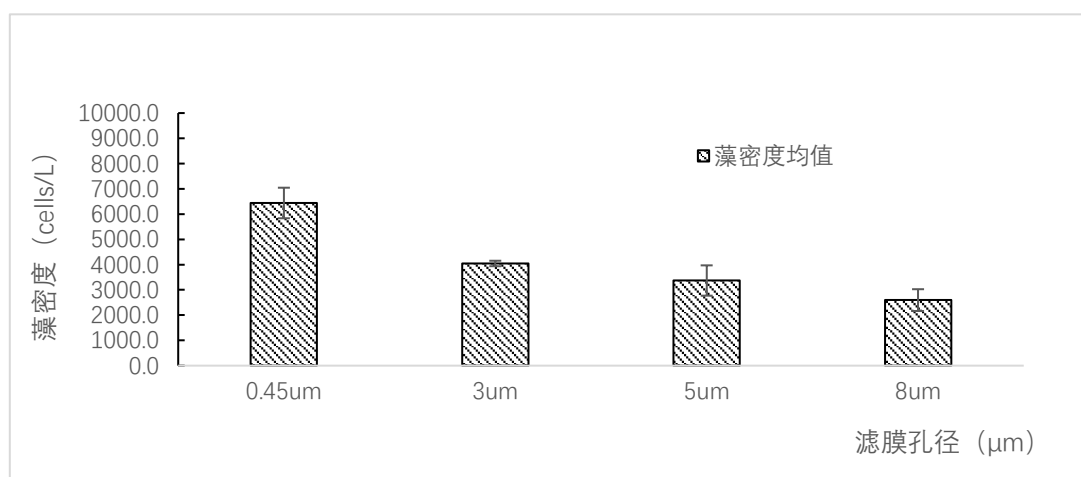


图 11 不同孔径滤膜处理后的泽雅低密度样品镜检结果
(样品来源: 温州泽雅水库)

尽管滤膜孔径不影响分析结果, 但与大孔径滤膜相比, 小孔径滤膜的视野观察效果较

佳。与 5 μm 或者 8 μm 孔径滤膜相比，0.45 μm 孔径滤膜视野效果较佳。大孔径滤膜不适合分析尺寸较小的浮游植物样品。一般情况下，0.45 μm ~3 μm 的滤膜较合适，低密度样品建议选择 0.45 μm 孔径的滤膜。

5.6.4.1.3 滤膜品牌

选择进口和国产滤膜分别对 2 种野外水样 (FSJR201903, XMKL201905) 和 2 种实验室培养样品 (JNU-Scene, JNU-Micro) 开展滤膜法测定，研究滤膜品牌对检测结果的影响。结果表明，滤膜品牌对四种样品分析结果间的相对标准偏差在 7.09%~11.63%之间，。滤膜品牌对检测结果的影响详见表 12。

表 12 滤膜品牌对检测结果的影响

| 子样品编号 | 滤膜 | 平行号 | 藻密度 (cells/L) | Mean ₁ | Mean ₂ | 标准偏差 | 相对标准偏差 |
|-----------|----|-----|------------------|-------------------|-------------------|----------|--------|
| FSJR | 进口 | 1 | 1.08E+07 | 1.05E+07 | 1.13E+07 | 1.17E+06 | 10.31% |
| | | 2 | 1.02E+07 | | | | |
| | 国产 | 1 | 1.21E+07 | 1.21E+07 | | | |
| | | 2 | 1.22E+07 | | | | |
| JNU-Scene | 进口 | 1 | 4.43E+09 | 4.86E+09 | 5.12E+09 | 3.63E+08 | 7.09% |
| | | 2 | 5.29E+09 | | | | |
| | 国产 | 1 | 5.49E+09 | 5.38E+09 | | | |
| | | 2 | 5.26E+09 | | | | |
| XMKL | 进口 | 1 | 2.64E+08 | 2.29E+08 | 2.49E+08 | 2.87E+07 | 11.51% |
| | | 2 | 1.94E+08 | | | | |
| | 国产 | 1 | 3.25E+08 | 2.70E+08 | | | |
| | | 2 | 2.14E+08 | | | | |
| JNU-Micro | 进口 | 1 | 1.55E+10 | 1.64E+10 | 1.79E+10 | 2.08E+09 | 11.63% |
| | | 2 | 1.72E+10 | | | | |
| | 国产 | 1 | 1.94E+10 | 1.93E+10 | | | |
| | | 2 | 1.93E+10 | | | | |

5.6.4.2 真空压力

美国《Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (22nd)》要求过滤真空压力控制在 50 kPa (小于 25mm Hg) 以下，待样品过滤剩余 5 mm 的液层时，关掉真空泵，使用低真空压力 (大约 12 kPa, 2~3 mm Hg) 过滤剩余液体。根据压力单位换算公式，50Kpa 约等于 15 in Hg, 约 375mm Hg, 与 25mm Hg 相差甚远，显然“...50kPa (小于 25mm Hg) ...”的表述有误，应为“小于 25 in Hg”。Limnd Oceanogr (1987) 指出，过滤真空压力应小于三分之一标准大气压，按照单位换算，约等于 10 in Hg, 约 33 kPa。

为研究真空压力对细胞形态的影响，分析了不同真空压力下藻类形态变化，结果表明，当真空压力小于 50 kpa 时，藻类基本不会因为过滤压力而导致其自身形态的改变。尽管 50 kPa 真空压力基本不影响藻类形体特征的改变，但实际操作中，建议将真空压力控制在 17 kPa 以下甚至更低，以尽可能地保留藻类自然形态。不同过滤压力处理后藻类形态变化情况

详见表 13。

表 13 真空压力对藻类形态特征的影响

| 真空泵压力范围 kPa | 真空压力 | 不同样品藻类形态变化 |
|----------------|------|--------------------------------------------------|
| | kPa | |
| 34 kPa~51 kPa | 51 | 甲藻、硅藻、隐藻，金藻无明显变化，蓝藻和隐藻能明显辨认，裸藻藻体有轻微紧缩现象，但均不影响计数。 |
| | 41 | |
| | 34 | |
| 17 kPa~34 kPa | 27 | 各种藻类形态特征均无明显变化 |
| <17 kPa | 13 | |
| | 6 | |

随机抽取丽水市饮用水源地黄村水库样品，分别使用手持式过滤和真空泵过滤，分析不同过滤方式对检测结果的影响，每处理 3 个平行。结果表明，手持式过滤和真空过滤两种处理方式检测结果间的相对标准偏差仅为 4.81%，采用手持式过滤或真空过滤不影响检测结果。尽管手持式过滤器能提供更小的过滤压力（大概 10mm Hg, 约 1.3Kpa 压力），但其平行样间的标准偏差和相对标准偏差均大于真空抽滤法，即真空抽滤处理的检测结果稳定性更好。手动压力有限且不能完全均匀，液体无法快速通过滤膜，导致样品滞留在手持过滤器的滤膜上发生聚集，导致样品在滤膜室短暂滞留。建议选择真空抽滤方式过滤样品。不同过滤方式对样品检测结果的影响详见表 14。

表 14 过滤方式对黄村水库样品分析结果的影响

| 过滤方式 | 均值 (cells/ml) | SD (cells/ml) | RSD (%) |
|---------------|---------------|---------------|---------|
| 手持式过滤 | 2325 | 744 | 32.0 |
| 真空泵过滤 | 2488 | 238 | 9.6 |
| 均值 (cells/ml) | 2406 | | |
| SD (cells/ml) | 116 | | |
| RSD (%) | 4.81 | | |

5.6.4.3 视野类别及计数视野数

样品镜检绝对量与计数视野数有关。选择 whipple 视野和目镜视场视野两种视野法同时开展滤膜法、0.1ml 框和 S-R 框的最适视野数研究。

5.6.4.3.1 低密度水平

(1) 滤膜法-视野类别

用视野法对低密度 4#和低密度 5#样品镜检计数，均计数 48~96 个视野，分析视野类别对检测结果的影响。低密度 5#样品检测结果表明，两种视野法检测结果的相对标准偏差均小于 7%，检测结果间的变异系数为 10%。低密度 4#检测结果表明，两种视野法检测结果间的相对标准偏差为 13.7%。低密度 4#和低密度 5#样品视野类别对检测结果的影响详见表 15 和表 16。

表 15 不同视野类别对低密度 5#检测结果

| 类别 | 平均值 cells/ml | SD (cells/ml) | RSD (%) | 计数 视野数 |
|---------------|-----------------|---------------|---------|-----------|
| whipple 视野 | 46130 | 2970 | 6.4 | 72 |
| 目镜视场视野 | 39930 | 2480 | 6.2 | 48 |
| 平均值 (cells/L) | 43030 | | | |
| SD (cells/L) | 4384 | | | |
| RSD (%) | 10.2 | | | |

表 16 不同视野类别对低密度 4#检测结果

| 视野类别 | Whipple 视野 | 目镜视场视野 |
|---------------|------------|--------|
| 藻密度 (cells/L) | 2370 | 1950 |
| 均值 (cells/L) | 2160 | |
| SD (cells/L) | 297 | |
| RSD (%) | 13.7 | |

将低密度 5#样品分别过滤 1ml, 5ml, 10ml, 25ml, 50ml, 100ml 不同体积, 用滤膜法对 6 种过滤样品检测, 分析视野类别对检测结果的影响。

结果表明, 过滤体积为 1ml 时, 两种视野类别的检测结果间差异显著; 过滤体积在 5ml~100ml 时, 两种视野类别检测结果间无显著差异; 过滤体积为 1ml 时, 目镜视场视野法结果精度显著高于 whipple 视野法。低密度 5#样品不同过滤体积不同视野类别的检测结果详见图 12。

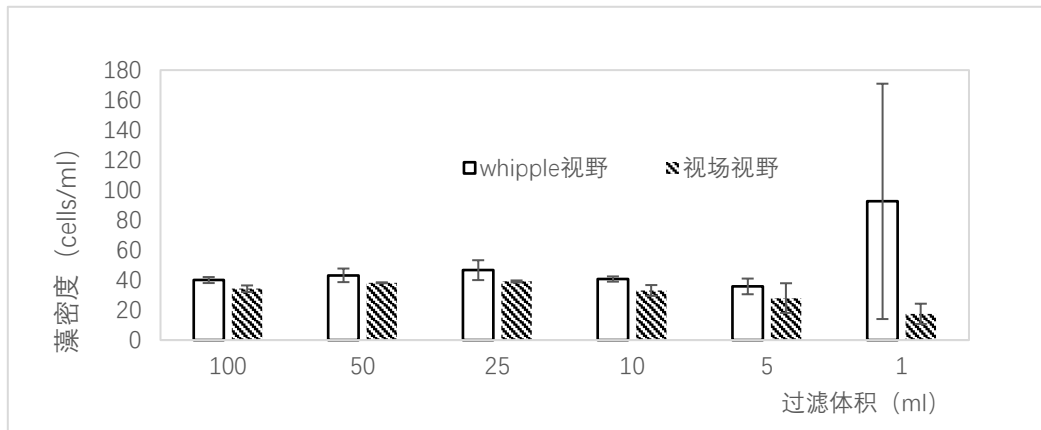


图 12 低密度 5#样品不同过滤体积不同视野类别的检测结果

视野类别基本不影响低密度样品检测结果, 较低密度样品镜检时建议选用目镜视场视野法。

(2) 滤膜法-视野数

将低密度 5#样品藻密度与视野数作散点图, 分析检测结果随计数视野数变化。当计数的视场视野数在 14 及以上时, 样品藻密度水平基本确定; 当计数的 whipple 视野数在 14 及以上时, 藻密度亦趋于稳定。whipple 视野和视场视野法的检测结果间标准偏差小于 5 cells/L,

结果间的相对标准偏差均在 10%以下，详见图 13。

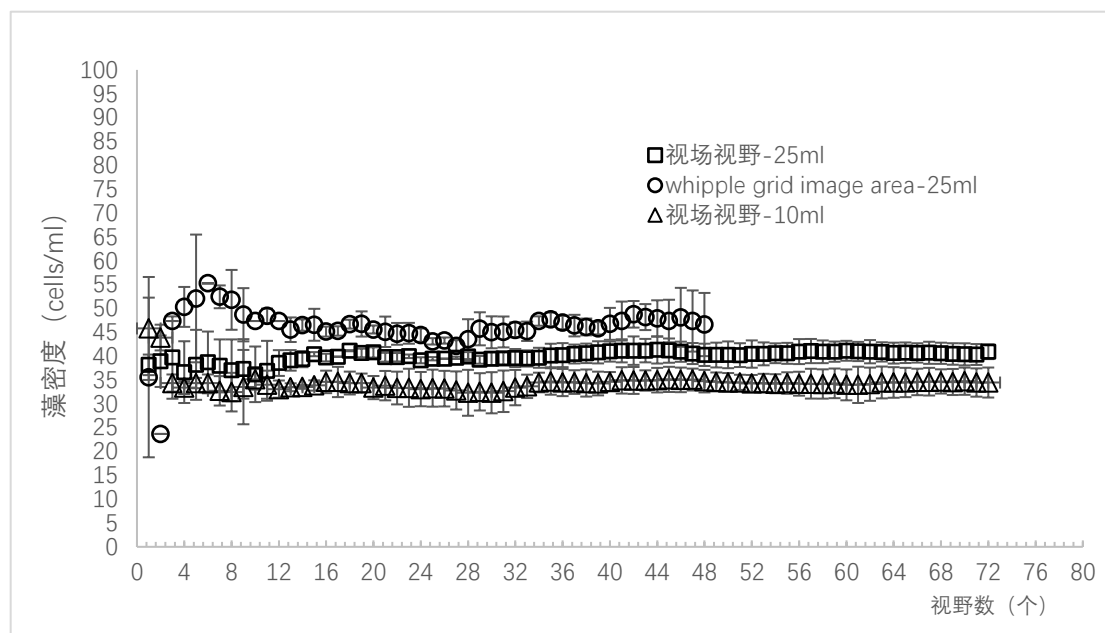


图 13 低密度 5#样品藻密度随计数视野数变化关系图

用目镜视场视野法和 whipple 视野法分别对样品低密度 4#和样品低密度 6#计数，分析计数视野数对结果影响。样品低密度 4#分析结果表明，当计数的视场视野数为 16 时，无论过滤体积，藻密度均趋于稳定，详见图 14。低密度 6#样品检测结果表明，当计数的 whipple 视野数在 16 及以上时，藻密度基本恒定，详见图 15。

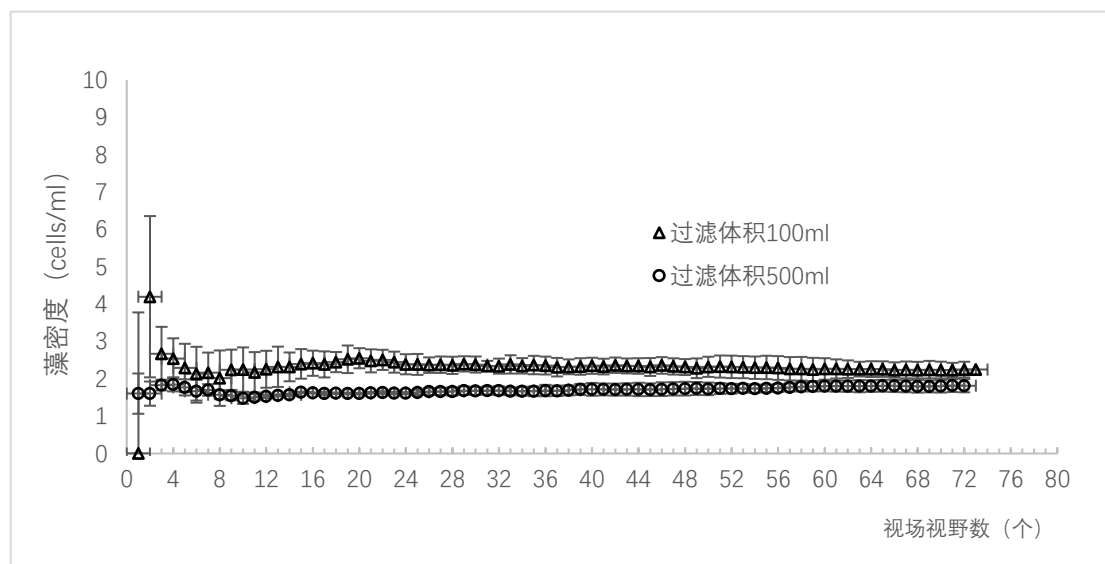


图 14 低密度 4#样品计数视野数与藻密度变化趋势图

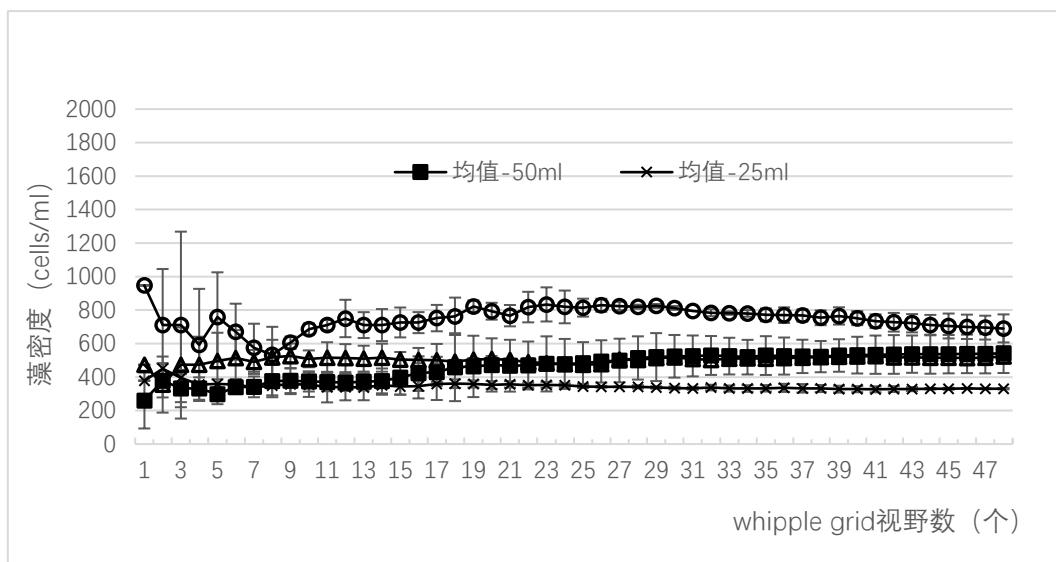


图 15 低密度 6#样品镜检的计数视野数与藻密度变化趋势图

综上，低密度样品在适宜的过滤体积下，两种计数视野类别基本不影响检测结果。当计数绝对样品量较少时，建议用区域面积较大的视野类别计数，如目镜视场视野，以增大计数的绝对数量，提高数据精度。

5.6.4.3.2 中密度水平

(1) 0.1ml 计数框-视野数

用 0.1ml 框对中密度水平的分水江水库样品和四明湖样品检测，每个子样品镜检计数 48 个 whipple 视野，分析计数视野数对镜检结果的影响。

分水江水库样品分析结果表明，当计数的 whipple 视野数在 8 及以上时，样品藻密度基本稳定；当计数 whipple 视野数在 24 及以上时，样品检测结果的 (n=10) 变异系数基本在恒定范围内变化，样品藻密度随视野数变化趋势详见图 16，检测结果的变异系数随视野数变化趋势详见图 17。四明湖样品分析结果表明，当计数 whipple 视野数在 7 及以上时，样品藻密度基本维持在 2.0×10^7 cells/L 水平，样品检测结果的变异系数 $\leq 10\%$ 。样品藻密度随计数视野数变化趋势详见图 18，变异系数随视野数变化趋势详见图 19。

当使用 0.1ml 计数框，选择 whipple 视野法对中密度水平样品计数时，建议计数的 whipple 视野数不少于 24。

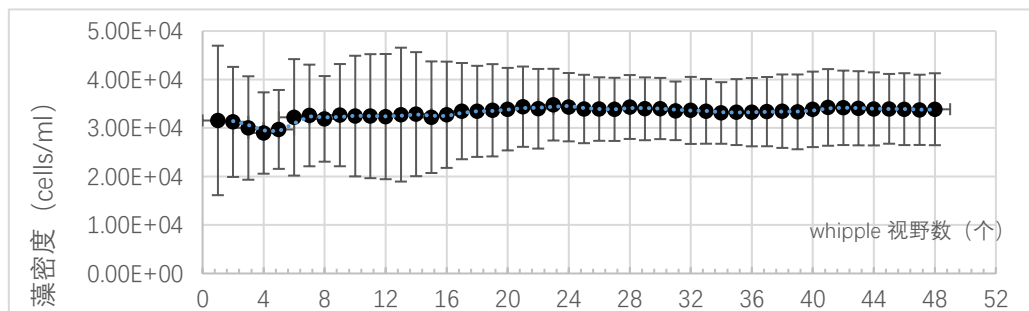


图 16 分水江水库子样品藻密度随 whipple 视野数变化趋势

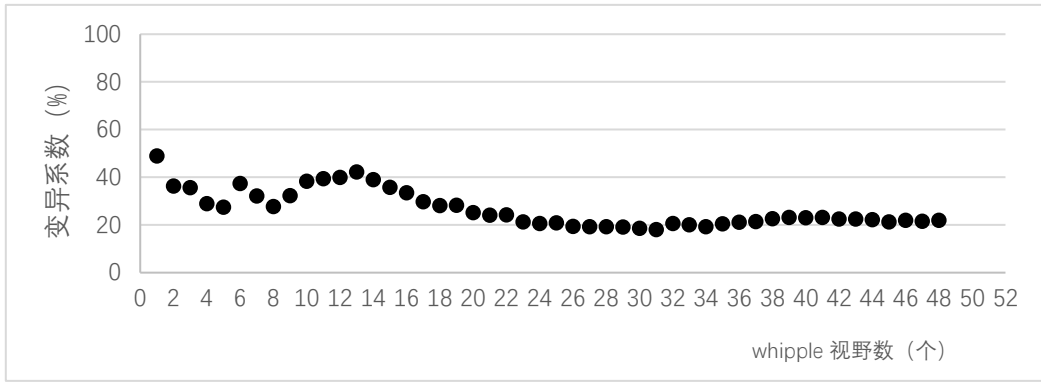


图 17 分水江水库子样品结果变异系数随 whipple 视野数变化趋势

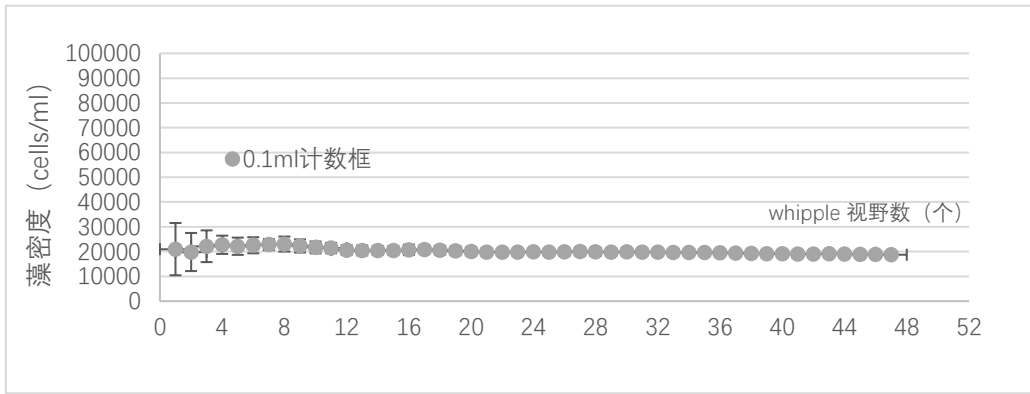


图 18 四明湖子样品藻密度随 whipple 视野数变化趋势

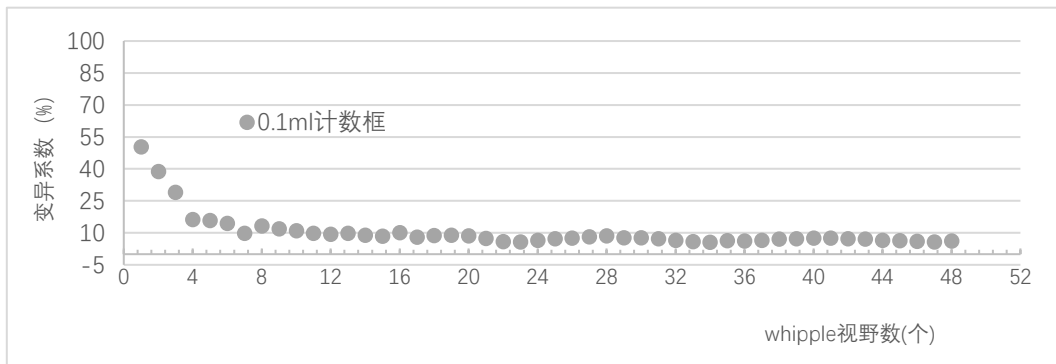


图 19 四明湖子样品结果变异系数随 whipple 视野数变化趋势

(2) S-R 计数框-视野数

S-R 计数框为国际通用浮游植物计数框。选择中密度水平的分水江及四明湖子样品，样品平行数 9，每平行计数 96 个 whipple 视野，分析 whipple 视野数对结果影响。

分水江样品分析结果表明，当计数的 whipple 视野数在 24 及以上时，样品藻密度检测结果基本维持不变；当计数的 whipple 视野数为 28 及以上时，样品检测结果的标准偏差(n=9)在恒定范围内变化，检测结果的变异系数 (%) 基本稳定，详见图 20 和图 21。

四明湖子样品在 S-R 计数框的分布与计数视野数无关，即计数的 whipple 视野数不影响镜检结果，随着计数视野数增加，四明湖子样品镜检结果的变异系数逐渐减小，当计数的

whipple 视野数在 13 及以上时，检测结果的变异系数基本在 10%以下变化，详见图 22 和图 23。

选择 S-R 计数框，采用 whipple 视野法对中密度水平样品镜检分析时，建议计数的 whipple 视野数在 28 及以上。

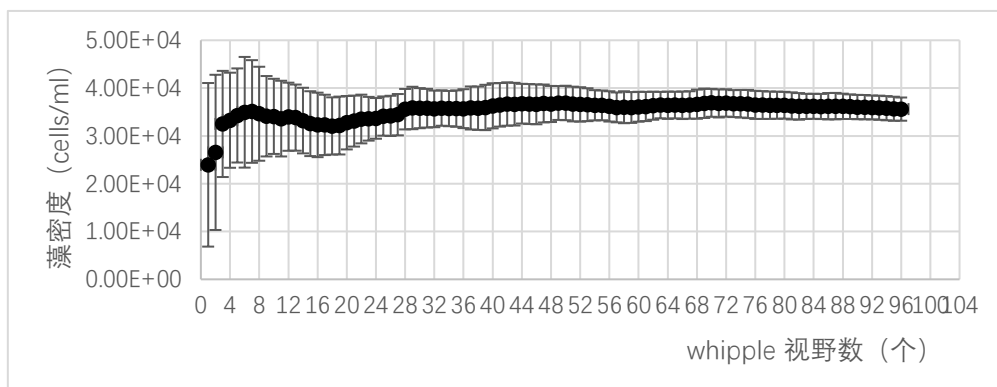


图 20 whipple 视野数对 S-R 框镜检结果的影响
(样品来源：桐庐分水江水库)

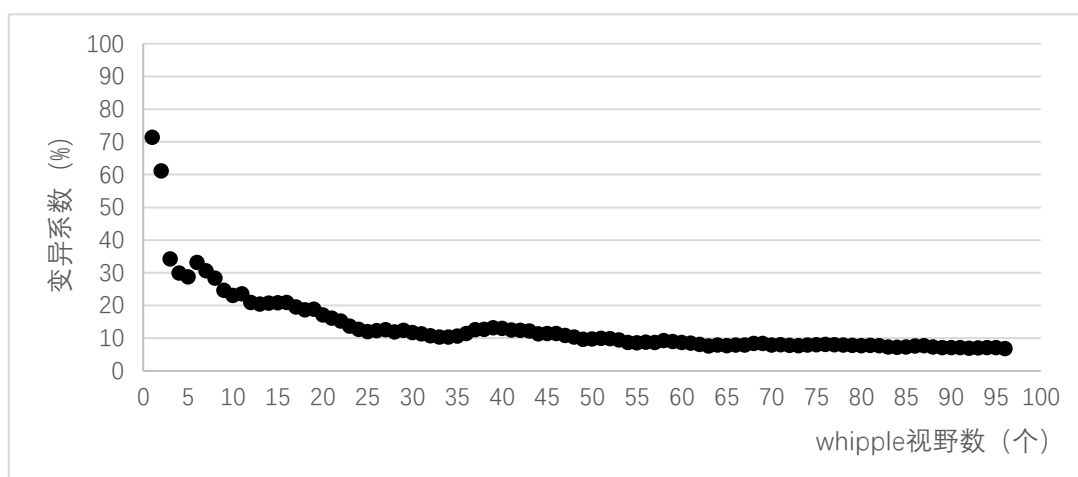


图 21 whipple 视野数对 S-R 计数框检测结果变异系数变化关系
(样品来源：桐庐分水江水库)

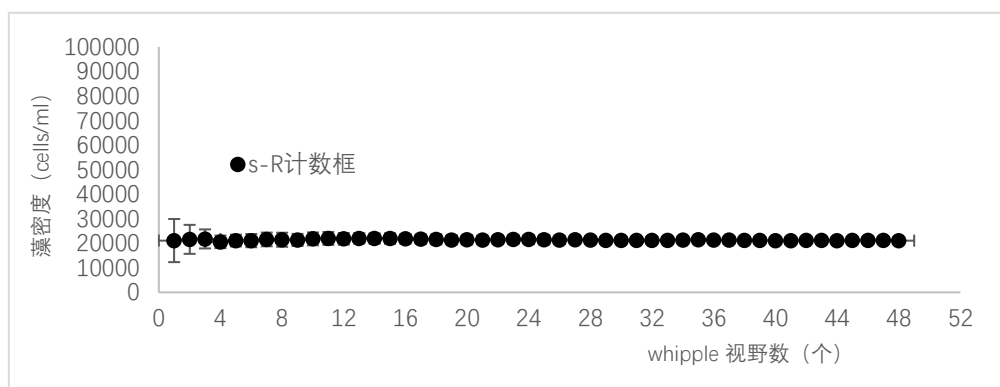


图 22 whipple 视野数对 S-R 框镜检结果的影响

(样品来源: 宁波四明湖)

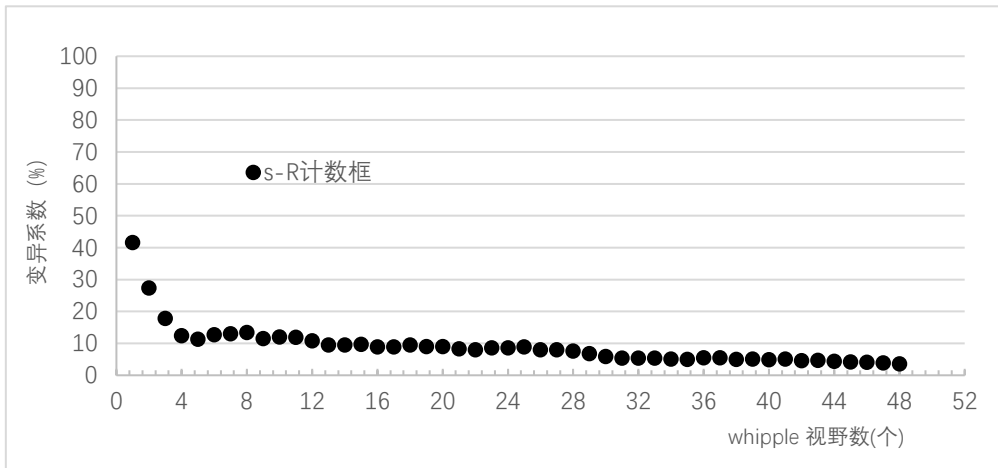


图 23 whipple 视野数变化对 S-R 计数框分析精密度的影响

(样品来源: 宁波四明湖)

(3) 滤膜法-视野数

选取分水江水库和四明湖中密度水平子样品, 研究 whipple 视野对滤膜法检测结果的影响, 样品平样数 12, 每平行计数 48 个 whipple 视野。

分水江水库样品分析结果表明, 当计数的 whipple 视野数为 8 及以上时, 样品藻密度基本恒定, 检测结果的标准偏差 (n=12) 随计数视野数增加而降低, 当计数的 whipple 视野数小于 10 时, 其变异系数 (%) 在 20% 左右变化; 当计数的 whipple 视野数在 10 及以上时, 其变异系数逐渐降低至 14%, 详见图 24 和图 25。

四明湖子样品在滤膜上的分布与计数视野数无关, 藻密度基本稳定在 2.0×10^7 cells/L, 当计数的视野数在 10~32 之间时, 其结果的变异系数较稳, 详见图 26 和图 27。

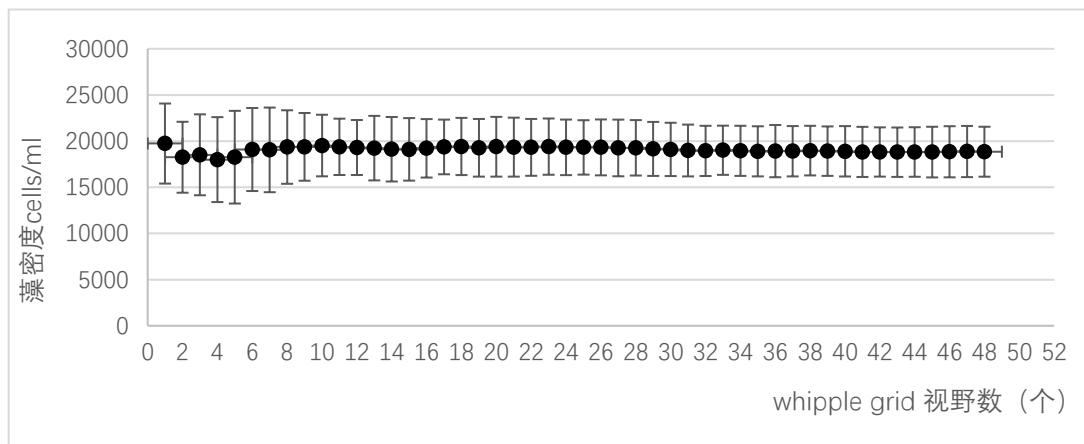


图 24 whipple 视野数对滤膜法镜检结果的影响

(样品来源: 桐庐分水江水库)

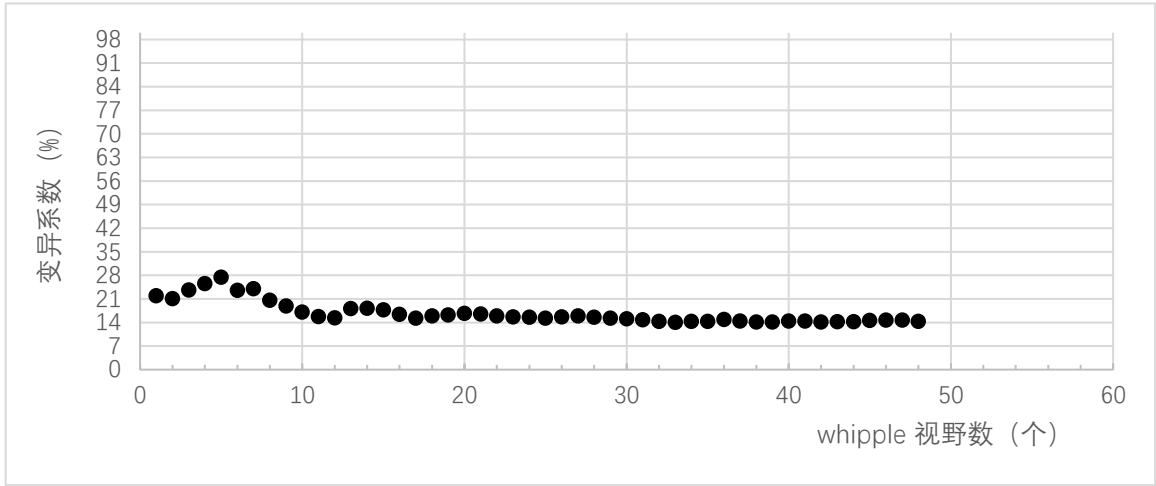


图 25 whipple 视野数对滤膜法检测结果精密度的影响
(样品来源: 桐庐分水江水库)

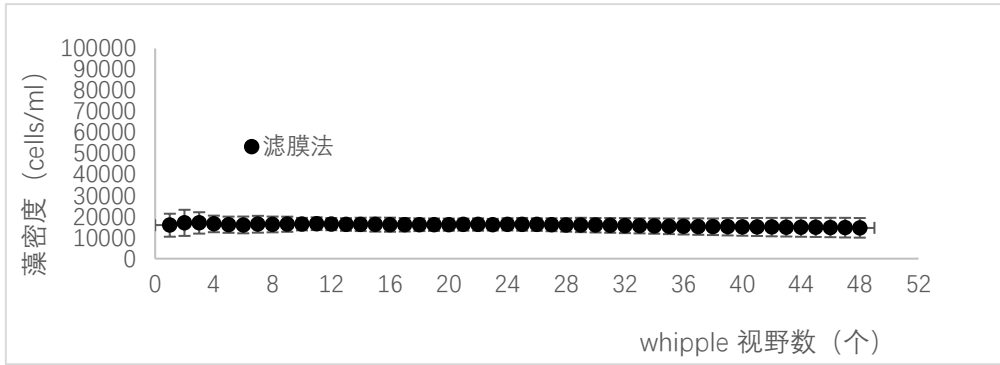


图 26 whipple 视野数对滤膜法镜检结果的影响
(样品来源: 宁波四明湖)

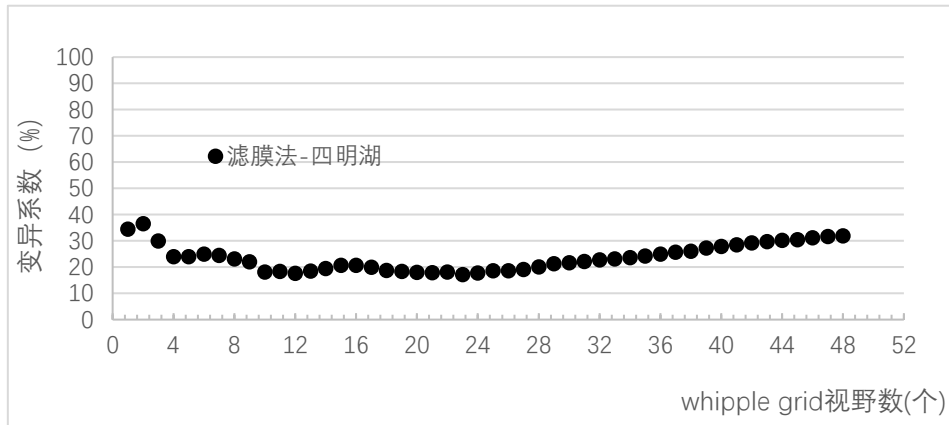


图 27 whipple 视野数对膜过滤法精密度的影响
(样品来源: 四明湖)

5.6.4.3.3 高密度水平

(1) 滤膜法-视野数

选择青山水库和泽雅水库高密度样品，分析 whipple 视野数对滤膜法检测结果的影响，平行数分别为 6 和 7，每平行计数 48 个 whipple 视野。

青山水库子样品检测结果表明，当计数的 whipple 视野数在 18 及以上时，样品的藻密度检测结果趋于稳定，结果的标准偏差 (n=6) 维持在较小范围，结果的变异系数在 5%~7% 之间范围，均小于 10%；whipple 视野数对青山水库子样品滤膜法镜检结果的影响详见图 28 和图 29。

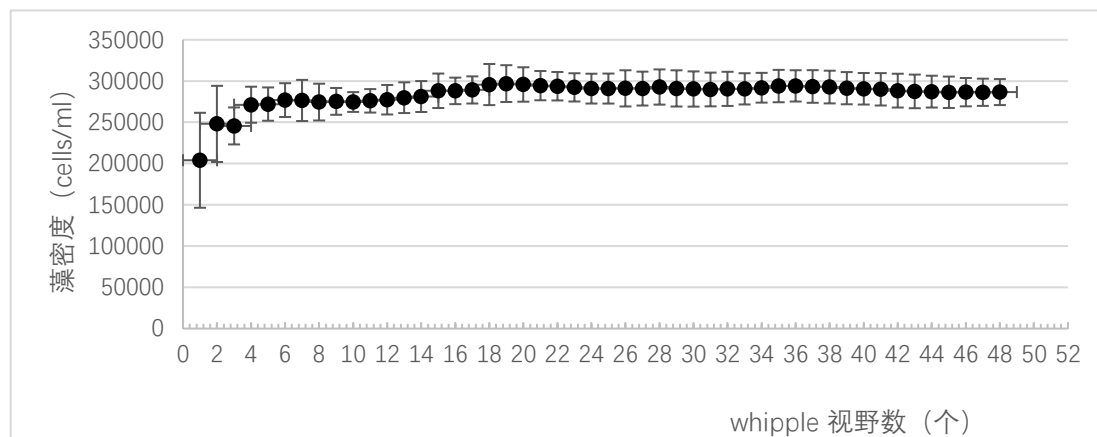


图 28 whipple 视野数对滤膜法镜检结果的影响 (n=6)
(样品来源: 临安青山水库)

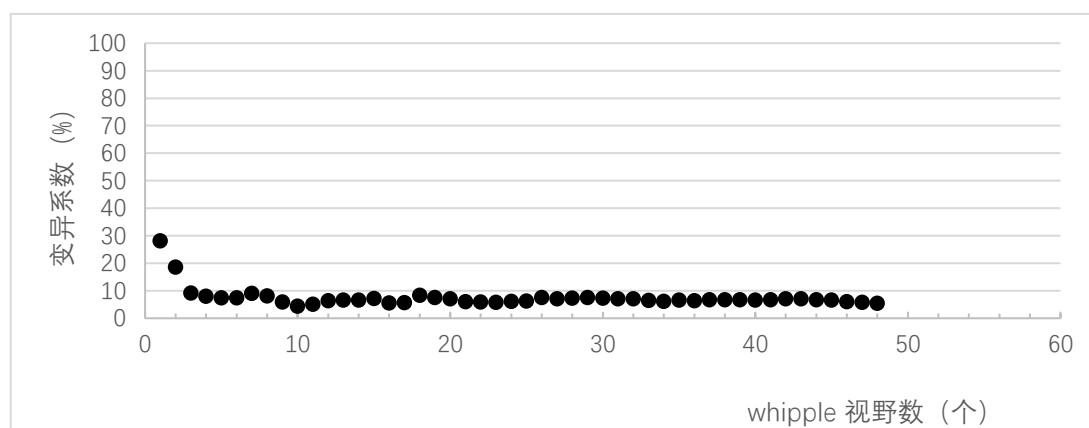


图 29 whipple 视野数对滤膜法精密度的影响
(样品来源: 临安青山水库)

泽雅水库子样品检测结果表明，当计数 whipple 视野数在 6 及以上时，样品藻密度基本恒定，其标准偏差和变异系数 (n=7) 随计数视野数增加而降低，结果的变异系数基本在 10% 及以下变化。whipple 视野数对泽雅水库子样品滤膜法镜检结果的影响详见图 30 和图 31。

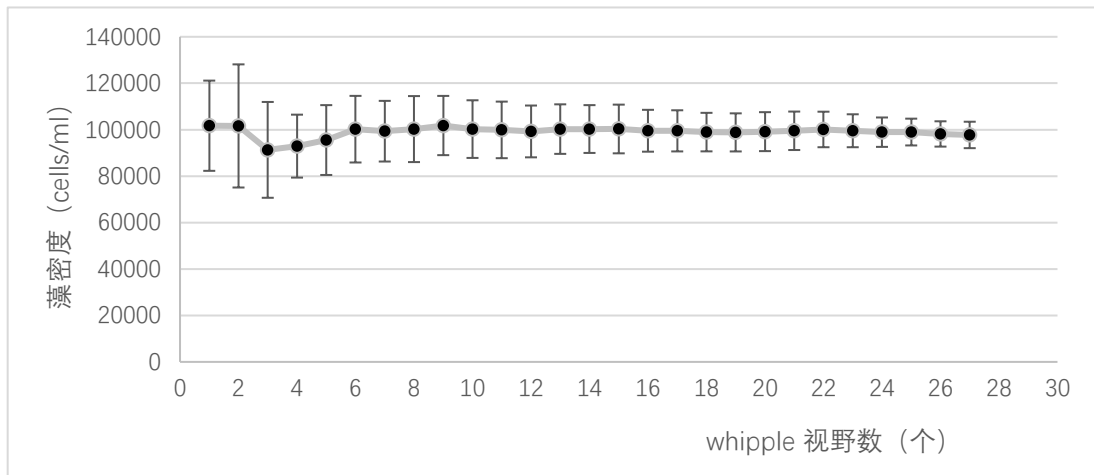


图 30 whipple 视野数对滤膜法镜检结果的影响 (n=7)
(样品来源: 温州泽雅水库)

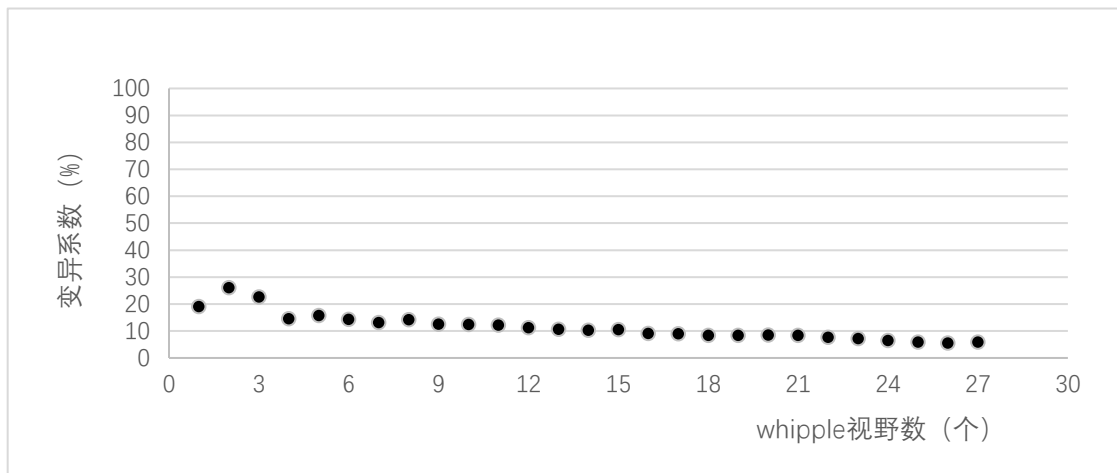


图 31 whipple 视野数对滤膜法精密度的影响 (n=7)
(样品来源: 温州泽雅水库)

(2) S-R 计数框-视野数

选取青山水库和泽雅水库样品, 分析高密度水平样品 whipple 视野数对 S-R 计数框结果的影响, 平行数分别为 7 和 10, 每平行计数 48~54 个 whipple 视野。

青山水库样品分析结果表明, 随着计数的 whipple 视野数的增加, 样品藻密度趋于稳定, 结果的标准偏差逐渐下降。当计数的 whipple 视野数在 10 及以上时, 样品藻密度趋于稳定, 检测结果的变异系数均小于 5%。Whipple 视野数对 S-R 计数框镜检结果的影响详见图 32~33。

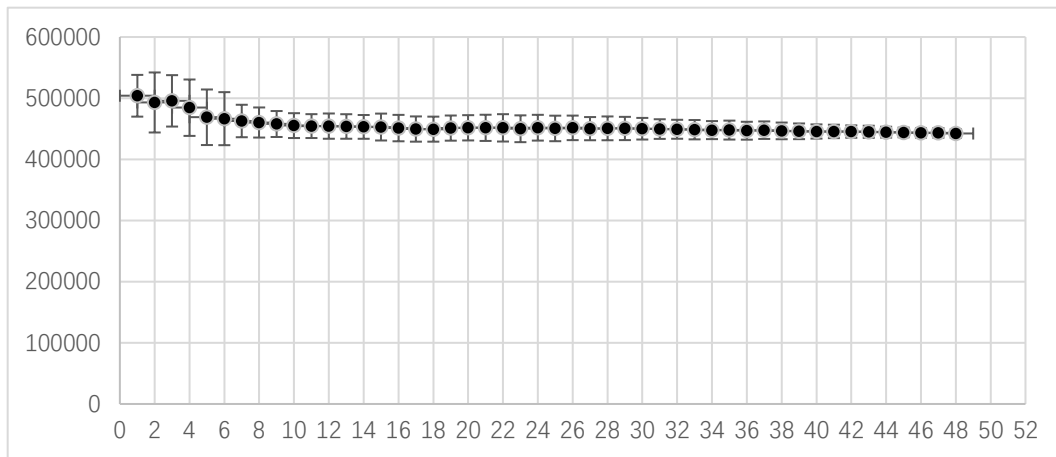


图 32 whipple 视野数对 S-R 框镜检结果的影响 (n=7)
(样品来源: 临安青山水库)

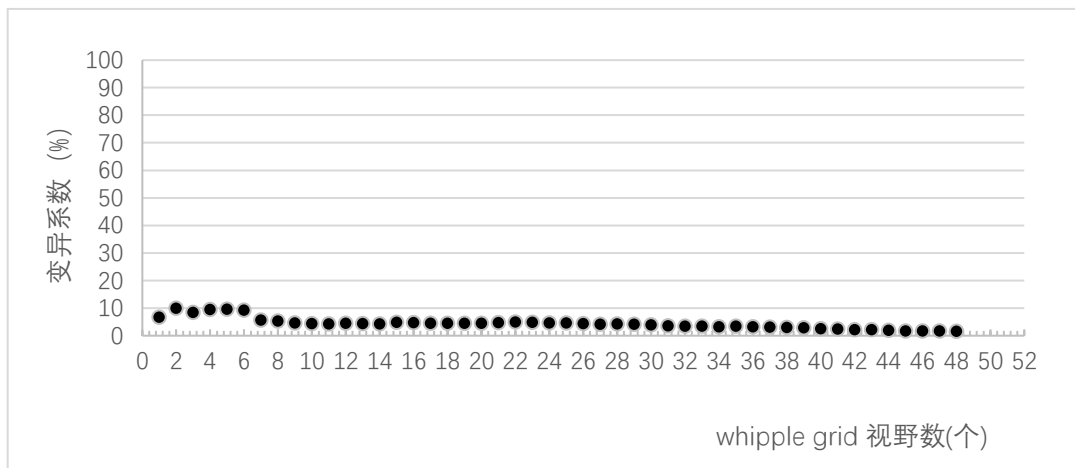


图 33 whipple 视野数对 S-R 框精密度的影响 (n=7)
(样品来源: 临安青山水库)

泽雅水库样品分析结果表明, 当计数的 whipple 视野数在 18 及以上时, 样品藻密度趋于稳定, 其结果的变异系数均小于 10%; Whipple grid 视野数对 S-R 计数框镜检结果的影响详见图 34 和图 35。

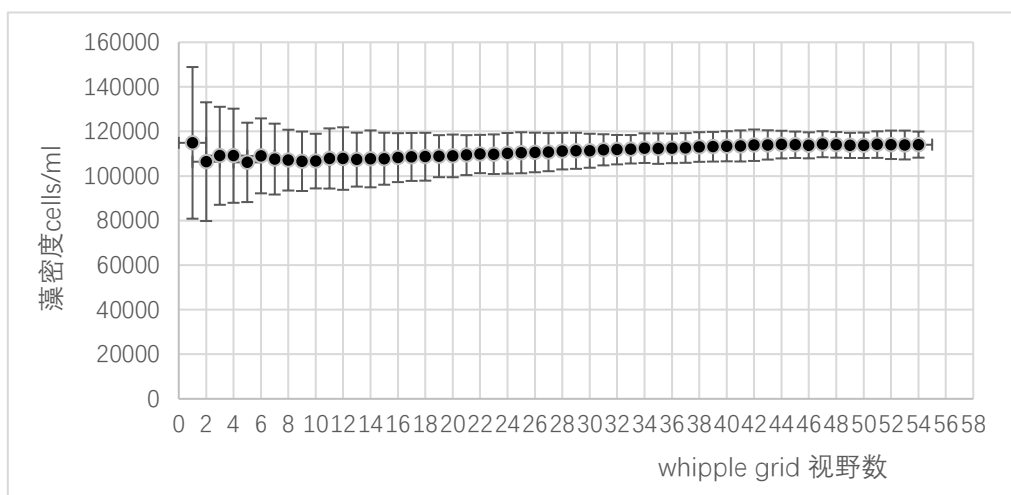


图 34 whipple 视野数对 S-R 框镜检结果的影响 (n=10)
(样品来源: 温州泽雅水库)

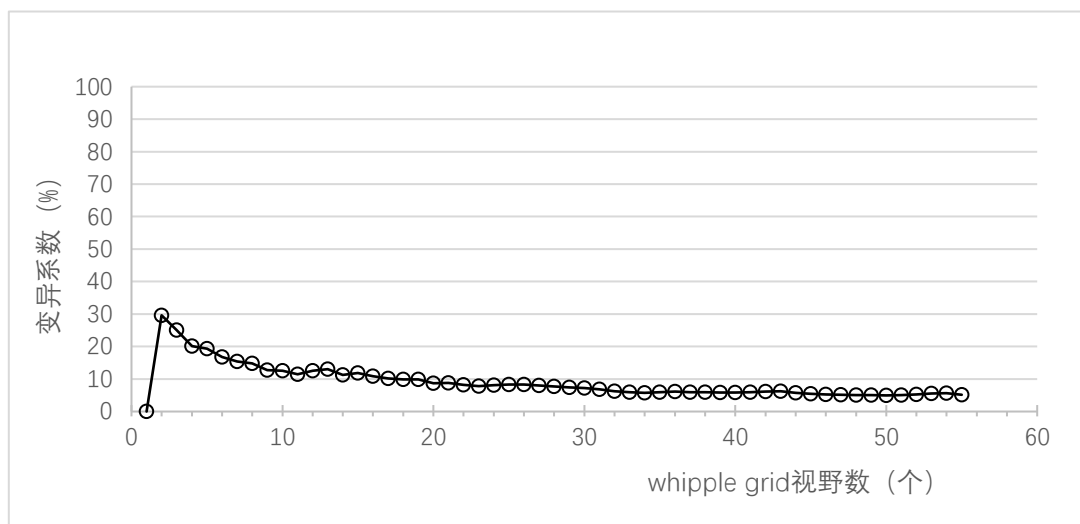


图 35 whipple 视野数对 S-R 框精密度的影响 (n=10)
(样品来源: 温州泽雅水库)

5.6.4.4 推荐过滤体积

研究代表不同藻类、不同密度水平及不同水体的 58 个样品的滤膜法检测结果, 分析过滤体积对滤膜法检测结果的影响, 并给出可推荐过滤体积。

研究表明, 高密度样品可推荐过滤体积为 0.5 ml~2 ml, 其中 0.5 ml 过滤体积的检测结果变异系数较小。中密度样品 (10^7 cells/L 数量水平) 可推荐过滤体积为 5 ml~10 ml, 其中 5 ml 过滤体积检测结果变异系数较小。中密度样品 (10^6 cells/L 数量水平) 可推荐过滤体积为 5 ml~25 ml, 25 ml 过滤体积检测结果的变异系数较小。不同密度水平可推荐过滤体积详见表 17。

表 17 样品的推荐过滤体积

| 藻密度数量水平 (cells/L) | 推荐过滤体积 | 备注 |
|-------------------|---------------|----------------------|
| 10 ⁸ | 0.5 ml~2 ml | 0.5 ml 结果变异系数较小 |
| 10 ⁷ | 5 ml~10 ml, | 5 ml 结果变异系数较小 |
| 10 ⁶ | 5 ml~25 ml, | 25 ml 结果变异系数较小 |
| 10 ⁵ | 10 ml~50 ml | 50 ml 结果变异系数较小 |
| 10 ⁴ | 5 ml~100 ml, | 25 ml、50 ml 结果变异系数较小 |
| 10 ³ | 50 ml ~200 ml | 200 ml 结果变异系数较小 |
| 10 ² | 500 ml | * |
| 10 ¹ | 1000 ml | * |

注：推荐过滤体积为平行样间 RSD (%) 较小的过滤体积。

“*” 样品过滤体积可能大于漏斗容量，为确保样品同质，需保证后续样品勿扰动滤膜上已截留样品；建议保持漏斗已有样品量占漏斗容量 75% 以上时，加入后续样品，直至后续样品完全加入漏斗。也可通过使用大容量漏斗解决。

关于滤膜法可推荐过滤体积，目前国内外尚无明确规定。美国水和废水（第 22 版）描述滤膜法：“every organism or cell counted should not represent more than about 25 organisms or cells in the natural sample”，即倍乘因子应该不大于 25。按此规定，滤膜法最大过滤体积为 25ml。Bellinger 和 Sigeo (2010) 描述滤膜法“推荐过滤体积在 1~200ml/cm²”，按本标准研究所用滤膜规格，推荐过滤体积为 2.8~580ml 范围。

5.7 结果计算与表示

样品浮游植物个体数或细胞数 N 依据计算公式 (4) 计算。

$$N = 1000 \times \frac{C}{Ac} \times \frac{At}{V} \quad (4)$$

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和细胞数；

At：滤膜有效面积（有效过滤面积），mm²；

Ac：计数面积（计数视野面积的和），mm²；

V：样品过滤体积，ml；

测定结果以科学计数法表示，保留两位有效数字。

5.8 方法有效性研究

5.8.1 与计数框法比较

通过滤膜法与 0.1ml 计数框、S-R 计数框比较，研究滤膜法的方法适用性。

5.8.1.1 高、中密度水平

选择代表湖泊，河流和水库的南太湖小梅口，桐庐分水江、临安青山水库及温州泽雅水

库的四种高、中密度水平的样品，优势种分别为蓝藻（浑浊样品）、甲藻、蓝藻（清洁样品）和硅藻，分别用 0.1ml 计数框、S-R 计数框和滤膜法检测，分析滤膜法适用性。

泽雅水库子样品分析结果表明：0.1ml 计数框，S-R 计数框和滤膜法三种方法的检测结果一致，各方法分析结果的变异系数在 4.9%~7.2%之间，其中 0.1ml 框变异系数最大，滤膜法和 S-R 计数框一致；方法间变异系数仅为 6.8%，三种方法的变异系数随计数的视野数增加而降低，当计数视野数在 8 及以上时，三种方法的变异系数趋于一致。泽雅水库样品不同检测方法比较结果详见表 18，方法精密度比较结果详见图 36。

表 18 泽雅水库样品多方法分析比较结果

| 测试平行数 | 藻密度 (cells/L) | | |
|---------------------|---------------|----------|----------|
| | 0.1ml 框 | S-R 框 | 滤膜法 |
| 1 | 9.86E+07 | 1.12E+08 | 1.01E+08 |
| 2 | 1.10E+08 | 1.16E+08 | 1.03E+08 |
| 3 | 1.06E+08 | 1.17E+08 | 9.48E+07 |
| 4 | 1.22E+08 | 1.25E+08 | 9.67E+07 |
| 5 | 1.16E+08 | 1.19E+08 | 1.07E+08 |
| 6 | 1.15E+08 | 1.14E+08 | 9.54E+07 |
| 7 | 1.23E+08 | 1.12E+08 | 1.06E+08 |
| 8 | 1.17E+08 | 1.08E+08 | — |
| 9 | 1.07E+08 | 1.15E+08 | — |
| 10 | 1.04E+08 | 1.04E+08 | — |
| \bar{X} (cells/L) | 1.12E+08 | 1.14E+08 | 1.00E+08 |
| SD (cells/L) | 8.11E+06 | 5.86E+06 | 4.93E+06 |
| RSD(%) | 7.26 | 5.13 | 4.92 |

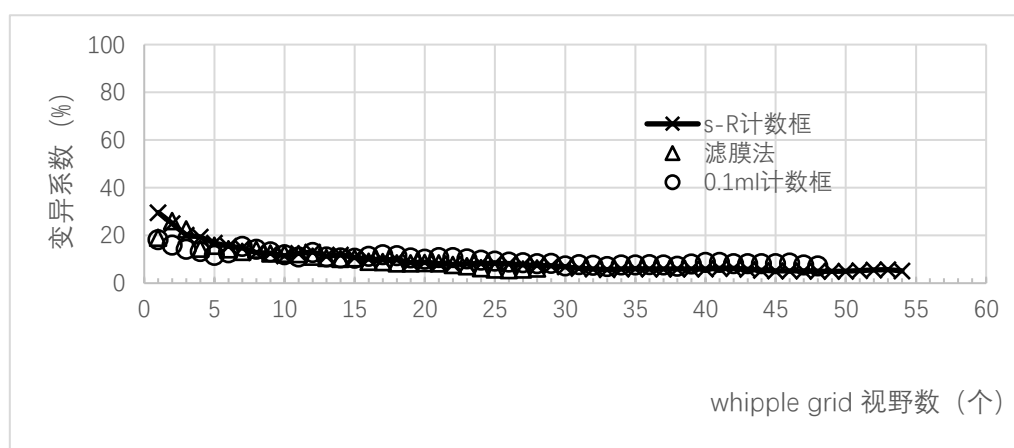


图 36 不同方法变异系数随计数的视野数变化趋势图
(样品来源：泽雅水库)

分水江子样品分析结果表明：0.1ml 计数框，S-R 计数框和滤膜法三种方法的检测结果无明显差异，各方法变异系数在 6.8%~16.9%之间，其中 0.1ml 框变异系数最大，滤膜法次

之，S-R 计数框法最小。方法间变异系数仅为 3.0%。分水江样品方法比较结果详见表 19。随着计数视野数的增加，三种检测结果的变异系数逐渐下降，其中滤膜法变异系数与 S-R 框无显著差异，当计数视野数在 24 个以上时，滤膜法变异系数与 S-R 框基本一致，滤膜法和 S-R 框精密度水平显著优于 0.1ml 框。分水江水库样品方法比较结果详见图 37。

表 19 分水江水库子样品多方法分析比较结果

| 测试平行数 | 藻密度 (cells/L) | | |
|---------------|---------------|----------|----------|
| | 0.1ml 框 | S-R 计数框 | 滤膜法 |
| 1 | 1.91E+07 | 3.34E+07 | 2.04E+07 |
| 2 | 2.41E+07 | 3.33E+07 | 1.88E+07 |
| 3 | 2.35E+07 | 3.50E+07 | 2.13E+07 |
| 4 | 3.37E+07 | 3.94E+07 | 1.76E+07 |
| 5 | 2.70E+07 | 3.39E+07 | 1.68E+07 |
| 6 | 2.98E+07 | 3.64E+07 | 1.49E+07 |
| 7 | 3.17E+07 | 3.97E+07 | 1.82E+07 |
| 8 | 2.44E+07 | 3.56E+07 | 1.69E+07 |
| 9 | 2.77E+07 | 3.44E+07 | 1.64E+07 |
| 10 | 3.24E+07 | — | 2.39E+07 |
| 11 | — | — | 2.19E+07 |
| 12 | — | — | 2.14E+07 |
| 平均值 (cells/L) | 2.73E+07 | 3.57E+07 | 1.90E+07 |
| SD (cells/L) | 4.64E+06 | 2.43E+06 | 2.71E+06 |
| RSD% (CV) | 16.98 | 6.81 | 14.22 |

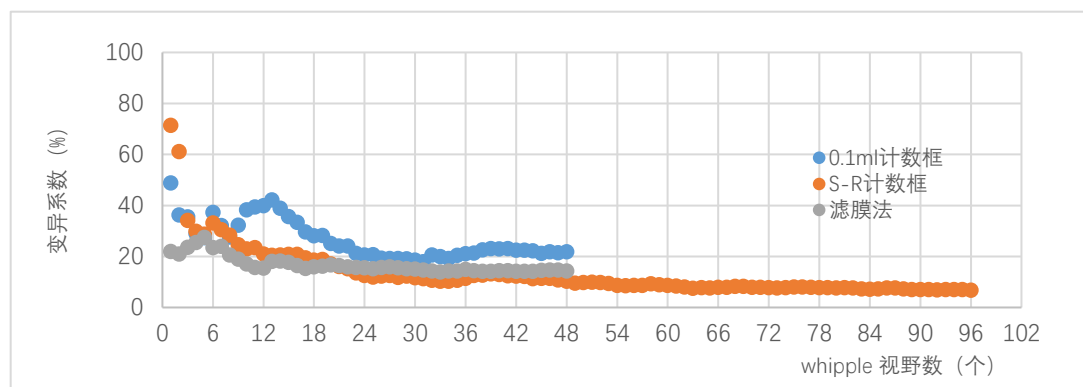


图 37 不同方法的变异系数随计数的视野数变化趋势图

(样品来源：分水江水库)

青山水库样品分析结果表明：0.1ml 框，S-R 框和滤膜法检测结果无显著差异，各方法结果变异系数在 1.6~6.8%之间，均小于 10%，0.1ml 框变异系数最大，滤膜法次之，S-R 框最小，与泽雅水库、分水江样品检测分析结果基本一致。三种方法分析结果间的变异系数仅为 2.60%。青山水库子样品方法比较结果详见表 20。

表 20 青山水库子样品多方法分析比较结果

| 测试平行数 | 藻密度 | | |
|-------------------------|----------|----------|----------|
| | 0.1ml 框 | S-R 法 | 滤膜法 |
| 1 | 4.14E+08 | 4.48E+08 | 2.87E+08 |
| 2 | 3.92E+08 | 4.52E+08 | 2.70E+08 |
| 3 | 4.00E+08 | 4.35E+08 | 2.75E+08 |
| 4 | 3.97E+08 | 4.32E+08 | 3.16E+08 |
| 5 | 3.76E+08 | 4.47E+08 | 2.87E+08 |
| 6 | 4.08E+08 | 4.40E+08 | 2.87E+08 |
| 7 | 3.35E+08 | 4.41E+08 | — |
| 平均值 \bar{x} (cells/L) | 3.89E+08 | 4.42E+08 | 2.87E+08 |
| SD (cells/L) | 2.66E+07 | 7.22E+06 | 1.58E+07 |
| RSD (%) | 6.83 | 1.63 | 5.52 |

青山水库高密度样品检测结果表明，当样品在 10^8 cells/L 数量级水平时，滤膜法与 0.1ml 框和 S-R 框变异系数差异不大。当计数的视野数在 10~20 个之间时，三种方法的变异系数一致。当计数视野数在 20 个以上时，0.1ml 框和滤膜法变异系数一致，S-R 框结果变异系数最小，详见图 38。

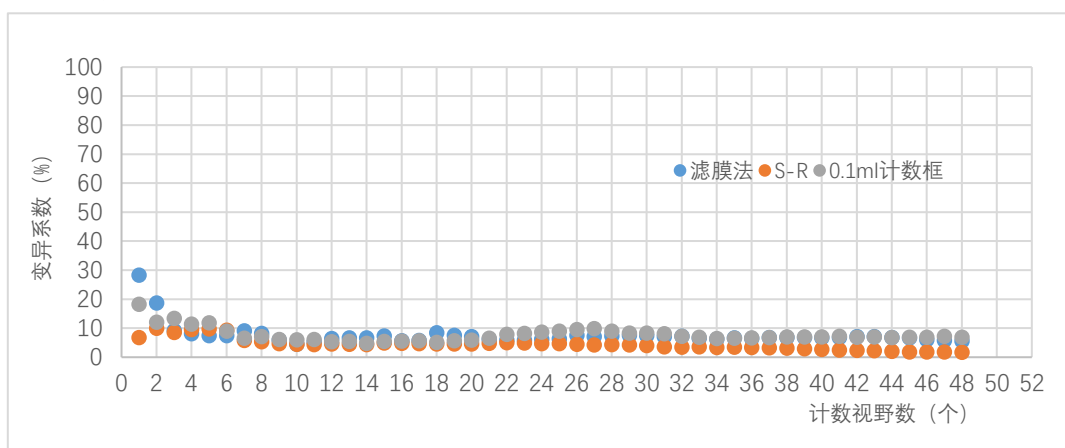


图 38 不同方法变异系数随计数的视野数变化趋势图

(样品来源：青山水库)

5.8.1.2 低密度水平

统计所有低密度样品检测结果，研究低密度水平滤膜法的适用性。

分析结果表明，样品藻密度在 10^3 cells/L 数量级水平时，滤膜法精密度水平显著高于 0.1ml 框。样品藻密度在 10^4 cells/L 和 10^5 cells/L 数量级水平时，各方法精密度水平均有增加，滤膜法精密度水平与 0.1ml 框相差不大，滤膜法总体优于 0.1ml 框法。低密度样品的滤膜法与 0.1ml 框法检测结果精密度比较见图 39。

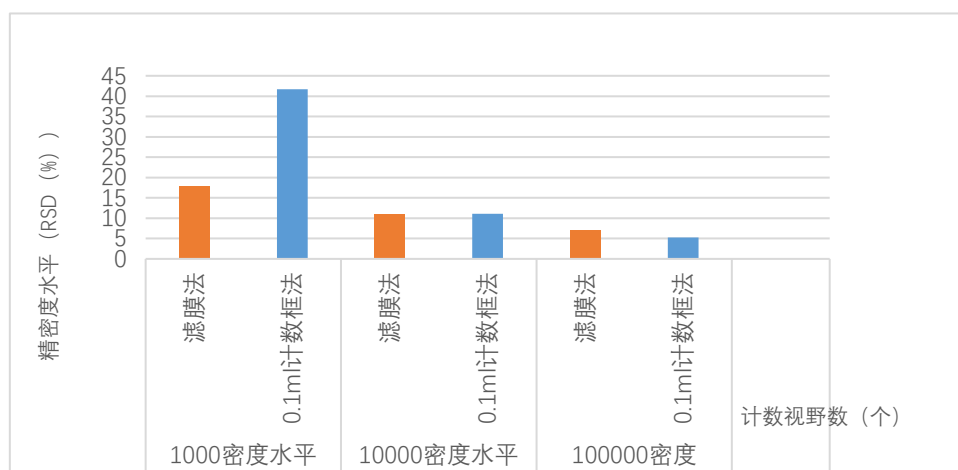


图 39 低密度样品 0.1ml 框与滤膜法的检测精密度水平比较

综上，滤膜法精密度水平总体优于 0.1ml 计数框法，与 S-R 计数框法相差不大，或仅次于 S-R 框。当样品藻密度在 10^3 cells/L 及以下时，滤膜法均检出，而 0.1ml 框法均未检出。

5.8.2 方法检出限研究

方法检出限是用特定方法在给定置信区间内从样品中定性检出待测物质的最低浓度或最小量。检出限在浮游植物分析中是一个很重要的性能指标，检出限依赖于计数视野数，而非藻个体数。浮游植物检出限和实验室的种属列表是一致的。

泽雅水库、分水江、南太湖小梅口及青山水库坝前等 4 种实样分别代表硅藻，甲藻，蓝藻（浑浊水体）和蓝藻（清澈水体）为优势种的水体。取上述样品，经逐级稀释，稀释倍率 10，获得两批同质样品，其一经 24 h 沉淀，1L 样品浓缩至 50ml，用 0.1ml 框检测总藻密度；其二用滤膜法检测总藻密度，各样品平行数 3，分析各样品沉淀 0.1ml 框和滤膜法检测结果的精密度及准确度，准确度用相对误差表示，精密度用相对标准偏差或变异系数（CV）表示。约定用 0.1ml 框、S-R 计数框和滤膜法多次重复测定的算术平均值为样品真值。通过 4 种实际样品的逐级稀释试验分析滤膜法检出限及检测下限。

5.8.2.1 泽雅水库子样品逐级稀释试验

泽雅水库样品约定真值： 1.09×10^8 cells/L。分析结果表明，各样品的 0.1ml 框和滤膜法检出范围不同，0.1ml 框检出范围在 10^4 cells/L ~ 10^7 cells/L 之间，滤膜法检出范围在 10 cells/L ~ 10^7 cells/L，两种方法的检出范围重叠在 10^4 cells/L ~ 10^7 cells/L。在重叠范围内，滤膜法检测结果的变异系数显著小于 0.1ml 框，滤膜法检测结果与理论藻密度相关性 ($y=1.2673x-6.1092$, $R^2=0.9999$) 高于 0.1ml 框 ($y=2.9198x+13.745$, $R^2=0.9988$)。与 0.1ml 框相比，滤膜法结果更接近理论值，0.1ml 框检测结果明显低于理论值。滤膜法精密度和准确度显著优于 0.1ml 框。泽雅水库各稀释样品 0.1ml 框-沉淀法及滤膜法检测结果详见表 21。

表 21 泽雅水库各稀释样品 0.1ml 框法及滤膜法检测结果

| 试验样品 | 0.1ml 框 | | | 理论真值 | 滤膜法 | | | 相对误差 RE (%) | |
|------|------------------------|-----------------|-----------|----------|------------------------|-----------------|-----------|-------------|-------|
| | \bar{x} (cells/L) | SD (cells/L) | CV (%) | | \bar{x} (cells/L) | SD (cells/L) | CV (%) | 沉淀法 | 滤膜法 |
| 泽稀 1 | 3.52E+06 | 2.14E+05 | 6.07 | 1.09E+07 | 8.25E+06 | 6.70E+04 | 0.81 | -67.7 | -24.3 |
| 泽稀 2 | 2.24E+05 | 7.86E+04 | 35.16 | 1.09E+06 | 9.09E+05 | 8.37E+03 | 0.92 | -79.4 | -16.6 |
| 泽稀 3 | 2.22E+04 | 5.97E+03 | 26.86 | 1.09E+05 | 1.38E+05 | 2.23E+04 | 16.16 | -79.6 | 26.6 |
| 泽稀 4 | 2.78E+03 | 1.74E+03 | 62.49 | 1.09E+04 | 1.30E+04 | 4.68E+03 | 36.05 | -74.5 | 19.3 |
| 泽稀 5 | 未检出 | — | — | 1.09E+03 | 6.50E+02 | 3.00E+02 | 46.00 | — | -40.4 |
| 泽稀 6 | 未检出 | — | — | 1.09E+02 | 3.82E+01 | 1.80E+01 | 47.14 | — | -65.0 |
| 泽稀 7 | 未检出 | — | — | 1.09E+01 | 6.40E+00 | 8.99E+00 | 141.42 | — | -41.3 |

检出限

按照 5.6.3.5，确定泽雅水库样品 0.1ml 框及滤膜法检出限。取编号为“泽稀 4”样品开展 0.1ml 框检出限分析，取编号“泽稀 6”样品开展滤膜法检出限分析。结果表明，0.1ml 框检出限为 3.6×10^3 cells/L，检测下限为 1.47×10^4 cells/L；滤膜法检出限为 170.9 cells/L，检测下限为 683.5 cells/L，滤膜法检出限及检测下限显著低于 0.1ml 框。0.1ml 框检测限测定结果详见表 22，滤膜法检出限测定结果详见表 23。

表 22 0.1ml 框检出限及检测下限测定结果（泽雅水库样品）

| 平行号 | 测试样品 |
|-----------------------|---------|
| 1 | 1100.0 |
| 2 | 2266.7 |
| 3 | 1000.0 |
| 4 | 2550.0 |
| 5 | 2400.0 |
| 6 | 3300.0 |
| 7 | 4333.3 |
| \bar{x} 1 (cells/L) | 2421.4 |
| 标准偏差 SD(cells/L) | 1171.5 |
| t 值 | 3.143 |
| 检出限 (cells/L) | 3682.1 |
| 测定下限 (cells/L) | 14728.4 |

表 23 滤膜法的检出限及检测下限测定结果（泽雅水库样品）

| 平行号 | | 测试样品 |
|---------------------|---|-------|
| 测定结果 (cells/L) | 1 | 231.6 |
| | 2 | 126.3 |
| | 3 | 168.4 |
| | 4 | 126.3 |
| | 5 | 210.5 |
| | 6 | 114.5 |
| | 7 | 81.4 |
| \bar{X} (cells/L) | | 151.3 |
| 标准偏差 SD(cells/L) | | 54.4 |
| <i>t</i> 值 | | 3.14 |
| 检出限 (cells/L) | | 170.9 |
| 测定下限 (cells/L) | | 683.5 |

5.8.2.2 分水江水库样品逐级稀释试验

分水江子样品约定真值为 2.73×10^7 cells/L。分析结果表明，沉淀法及滤膜法对逐级稀释样品的检出范围有显著差异。当理论藻密度在 2.73×10^2 cells/L 水平时，沉淀法-0.1ml 框未检出，滤膜法均检出。滤膜法检测结果的精密度显著高于 0.1ml 框，在检出浓度重叠范围内，滤膜法检测结果的变异系数小于 0.1ml 框，分水江各稀释样品的沉淀法及滤膜法检测结果详见表 24。

表 24 分水江样品各稀释样品沉淀法及滤膜法检测结果

| 试验样品 | 0.1ml 框 | | | 理论值 | 滤膜法 | | | 相对误差 (%) | |
|------------|----------------------------|-----------------|------------|----------|----------------------------|-----------------|------------|------------|--------|
| | 平均值 \bar{X} (cells/L) | SD (cells/L) | RSD (%) | | 平均值 \bar{X} (cells/L) | SD (cells/L) | RSD (%) | 0.1ml 框 | 滤膜法 |
| 分水江-逐级稀释 1 | 2.80E+06 | 2.91E+05 | 10.42 | 2.70E+06 | 2.87E+06 | 6.14E+04 | 2.14 | 3.54 | 6.24 |
| 分水江-逐级稀释 2 | 2.73E+05 | 3.35E+04 | 12.30 | 2.70E+05 | 2.85E+05 | 2.37E+04 | 8.32 | 0.95 | 5.58 |
| 分水江-逐级稀释 3 | 2.63E+04 | 2.68E+03 | 10.20 | 2.70E+04 | 3.09E+04 | 2.52E+03 | 8.15 | -2.55 | 14.47 |
| 分水江-逐级稀释 4 | 2.68E+03 | 8.08E+02 | 30.12 | 2.70E+03 | 1.62E+03 | 8.99E+01 | 5.54 | -0.62 | -39.94 |
| 分水江-逐级稀释 5 | 3.50E+02 | 2.86E+02 | 81.65 | 2.70E+02 | 2.93E+02 | 3.60E+01 | 12.30 | 29.63 | 8.35 |
| 分水江-逐级稀释 6 | 未检出 | — | — | 2.70E+01 | 1.73E+01 | 5.04E+00 | 29.12 | — | -35.93 |

检出限

实操中分水江逐级稀释样品部分损坏，故从分水江样品中重新制备分水江子样品开展 0.1ml 框和滤膜法的检出限测定，重新制备的样品命名为“新-分水江”。约定新-分水江样总藻密度 9.76×10^6 cells/L 为真值。取新-分水江-逐级稀释（4）（理论密度 9.76×10^2 cells/L）

开展 0.1ml 框检出限测定，取新-分水江-逐级稀释（5）（ $9.76 \times 10^2 \text{ cells/L}$ ）开展滤膜法测定。0.1ml 框检出限测定结果详见表 25，滤膜法检出限测定结果详见表 26。

表 25 沉淀- 0.1ml 框检出限及检测下限测定结果（分水江样品）

| 平行号 | | 测试样品重复数 | | | |
|---------------------|---|---------|---------|---------|---------|
| | | 1 | 2 | 3 | 平均值 |
| 测定结果 (cells/L) | 1 | 897.00 | 1794.00 | 897.00 | 1196.00 |
| | 2 | 2200.00 | 1100.00 | 1100.00 | 1466.67 |
| | 3 | 485.00 | 1455.00 | 970.00 | 970.00 |
| | 4 | 450.00 | 0.00 | 450.00 | 300.00 |
| | 5 | 2750.00 | 1650.00 | 0.00 | 1466.67 |
| | 6 | 1500.00 | 500.00 | 1000.00 | 1000.00 |
| | 7 | 900.00 | 900.00 | 450.00 | 750.00 |
| \bar{X} (cells/L) | | 1008.21 | | | |
| 标准偏差 SD (cells/L) | | 397.86 | | | |
| <i>t</i> 值 | | 3.143 | | | |
| 检出限 (cells/L) | | 1250.1 | | | |
| 测定下限 (cells/L) | | 5001.9 | | | |

表 26 滤膜法的检出限及检测下限测定结果（分水江样品）

| 平行号 | | 测试样品 |
|-------------------------|---|--------|
| 测定结果 (cells/L) | 1 | 42.11 |
| | 2 | 115.79 |
| | 3 | 94.74 |
| | 4 | 84.21 |
| | 5 | 63.16 |
| | 6 | 66.78 |
| | 7 | 122.11 |
| 平均值 \bar{X} (cells/L) | | 84.13 |
| 标准偏差 SD (cells/L) | | 29.05 |
| <i>t</i> 值 | | 3.143 |
| 检出限 (cells/L) | | 91.3 |
| 测定下限 (cells/L) | | 365.0 |

结果表明，0.1ml 框的检出限为 $1.25 \times 10^3 \text{ cells/L}$ ，检测下限为 $5.00 \times 10^3 \text{ cells/L}$ ；滤膜法检出限为 91.3cells/L，检测下限为 365.0cells/L，滤膜法检测限及检测下限显著低于 0.1ml 框。

5.8.2.3 小梅口样品逐级稀释试验

小梅口样品约定真值为 $3.2 \times 10^7 \text{ cells/L}$ 。分析结果表明，0.1ml 框和滤膜法检测结果差异明显。滤膜法在各稀释水平均检出，0.1ml 框在理论藻密度 $3.2 \times 10^2 \text{ cells/L}$ 及以下均未检出。滤膜法在小梅口各浓度水平检测结果 RSD (%) 总体小于 0.1ml 框。与 0.1ml 框相比，小梅

口各浓度水平滤膜法检测结果更接近理论值。小梅口各稀释样品的分析结果详见表 27。

表 27 小梅口样品各稀释样品沉淀法-0.1ml 框及滤膜法检测结果

| 平行号 | 0.1ml 框 | | | | 滤膜法 | | |
|------------|----------------------------|-----------------|-------------------|--------|----------------------------|-----------------|---------|
| | 平均值 \bar{X} (cells/L) | SD (cells/L) | 理论真值 (cells/L) | RSD(%) | 平均值 \bar{X} (cells/L) | SD (cells/L) | RSD (%) |
| 小梅口-逐级稀释 1 | 1.72E+06 | 1.20E+05 | 3.20E+06 | 7.00 | 2.49E+06 | 3.21E+05 | 12.87 |
| 小梅口-逐级稀释 2 | 2.81E+04 | 1.81E+04 | 3.20E+05 | 64.29 | 4.92E+05 | 1.34E+05 | 27.22 |
| 小梅口-逐级稀释 3 | 8.20E+02 | 2.55E+02 | 3.20E+04 | 31.04 | 5.10E+04 | 1.05E+03 | 2.05 |
| 小梅口-逐级稀释 4 | 4.25E+02 | 5.44E+02 | 3.20E+03 | 128.11 | 1.37E+03 | 1.00E+02 | 7.32 |
| 小梅口-逐级稀释 5 | 未检出 | — | 3.20E+02 | — | 2.35E+03 | 8.99E+01 | 3.82 |
| 小梅口-逐级稀释 6 | 未检出 | — | 3.20E+01 | — | 1.53E+02 | 8.99E+01 | 58.93 |

检出限

取“小梅口—逐级稀释 6”的 5 倍浓度开展小梅口滤膜法检出限测定。取“小梅口-逐级稀释 4”的 5 倍浓度开展小梅口 0.1ml 框检出限测定。结果表明，0.1ml 框的检出限为 6.80×10^3 cells/L，检测下限为 2.70×10^4 cells/L；滤膜法检出限为 255.85 cells/L，检测下限为 1023.4 cells/L。

小梅口样品 0.1ml 框检出限测定结果详见表 28，小梅口样品滤膜法检出限测定结果详见表 29。

表 28 小梅口样品 0.1ml 框的检出限及检测下限结果

| 平行号 | 测试样品 | |
|---------------------------|----------|----------|
| 测定结果 (cells/L) | 1 | 1.28E+04 |
| | 2 | 1.07E+04 |
| | 3 | 9.01E+03 |
| | 4 | 7.70E+03 |
| | 5 | 1.16E+04 |
| | 6 | 1.39E+04 |
| | 7 | 1.22E+04 |
| 平均值 \bar{X}_i (cells/L) | 1.11E+04 | |
| 标准偏差 SD(cells/L) | 2.17E+03 | |
| t 值 | 3.143 | |
| 检出限 (cells/L) | 6829.3 | |
| 测定下限 (cells/L) | 27317.1 | |

表 29 小梅口样品滤膜法的检出限及检测下限

| 平行号 | 测试样品 | |
|------|------|----------|
| 测定结果 | 1 | 2.04E+02 |

| | | |
|---------------------------|---|----------|
| (cells/L) | 2 | 1.30E+02 |
| | 3 | 3.89E+02 |
| | 4 | 2.96E+02 |
| | 5 | 2.17E+02 |
| | 6 | 2.76E+02 |
| | 7 | 2.56E+02 |
| 平均值 \bar{X}_t (cells/L) | | 2.52E+02 |
| 标准偏差 SD (cells/L) | | 8.14E+01 |
| t 值 | | 3.143 |
| 检出限 (cells/L) | | 255.8 |
| 测定下限 (cells/L) | | 1023.4 |

5.8.2.4 青山水库样品逐级稀释试验

青山水库样品约定真值为 3.77×10^8 cells/L。结果表明，0.1ml 框和滤膜法检测结果差异显著，滤膜法在各稀释样品均检出，0.1ml 框在理论藻密度 3.77×10^2 cells/L 及以下均未检出。滤膜法检测结果的精密度总体高于 0.1ml 框。0.1ml 框在 10^4 cells/L 至 10^7 cells/L 藻密度范围内检测结果的 RSD (%) 较高。滤膜法在 10^3 cells/L 至 10^7 cells/L 范围之间检测结果的 RSD (%) 较高，与 0.1ml 框相比，滤膜法优势更明显。青山水库各稀释样品 0.1ml 框和滤膜法检测结果详见表 30。

表 30 青山水库各稀释样品沉淀法-0.1ml 框及滤膜法检测结果

| 试验号 | 0.1ml 框 | | | | | 滤膜法 | | | |
|----------|-----------------|--------------|----------------|-----|--------|-----------------|--------------|-------|---------|
| | 藻密度均值 (cells/L) | SD (cells/L) | 理论密度 (cells/L) | RE% | RSD(%) | 藻密度均值 (cells/L) | SD (cells/L) | RE% | RSD (%) |
| 青-逐级稀释 1 | 1.68E+07 | 8.91E+04 | 3.77E+07 | -55 | 0.5 | 2.38E+07 | 2.51E+06 | -37.0 | 10.5 |
| 青-逐级稀释 2 | 9.93E+05 | 2.97E+04 | 3.77E+06 | -74 | 3.0 | 2.27E+06 | 1.37E+05 | -40.0 | 6.0 |
| 青-逐级稀释 3 | 1.26E+05 | 2.72E+04 | 3.77E+05 | -67 | 21.6 | 3.47E+05 | 1.04E+04 | -8.0 | 3.0 |
| 青-逐级稀释 4 | 1.09E+04 | 1.45E+03 | 3.77E+04 | -71 | 13.3 | 1.40E+04 | 3.02E+01 | -63.0 | 0.2 |
| 青-逐级稀释 5 | 3.33E+03 | 5.75E+03 | 3.77E+03 | -12 | 173.1 | 1.96E+03 | 5.20E+02 | -48.0 | 26.5 |
| 青-逐级稀释 6 | 未检出 | — | 3.77E+02 | — | — | 2.88E+02 | 1.44E+02 | -24.0 | 50.0 |
| 青-逐级稀释 7 | 未检出 | — | 3.77E+01 | — | — | 1.71E+02 | 9.89E+01 | 353.0 | 58.0 |

检出限

取“青-逐级稀释 7”样品的 5 倍浓度进行青山水库样品滤膜法检出限测定。取“青-逐级稀释 5”样品的 3 倍浓度开展青山水库样品 0.1ml 框检测限测定。青山水库样品 0.1ml 框检出限测定结果详见表 31，滤膜法检出限测定结果详见表 32。

表 31 沉淀-0.1ml 框的检出限及检测下限（青山水库样品）

| 平行号 | 测试重复数 | | 平均值 \bar{X} (cells/L) | |
|----------------|-------|------|-------------------------|------|
| | 1 | 2 | | |
| 测定结果 (cells/L) | 1 | 2850 | 3420 | 3135 |

| | | | | |
|---------------------------|---|---------|------|------|
| | 2 | 1400 | 1800 | 1600 |
| | 3 | 3780 | 1470 | 2625 |
| | 4 | 1185 | 395 | 790 |
| | 5 | 2970 | 2310 | 2640 |
| | 6 | 3355 | 3355 | 3355 |
| | 7 | 1240 | 3100 | 2170 |
| 平均值 \bar{X}_i (cells/L) | | 2330.71 | | |
| 标准偏差 SD(cells/L) | | 895.53 | | |
| t 值 | | 3.143 | | |
| 检出限 (cells/L) | | 2814.7 | | |
| 测定下限 (cells/L) | | 11258.6 | | |

青山水库样品检测限测定结果表明, 0.1ml 框的检出限为 2.81×10^3 cells/L, 检测下限为 1.13×10^4 cells/L; 滤膜法检出限为 244 cells/L, 检测下限为 978 cells/L。

表 32 滤膜法的检出限及检测下限 (青山水库样品)

| 平行号 | | 测试样品 |
|---------------------------|---|----------|
| 测定结果 (cells/L) | 1 | 236.333 |
| | 2 | 129.5061 |
| | 3 | 295.416 |
| | 4 | 275.722 |
| | 5 | 244.211 |
| | 6 | 139.549 |
| | 7 | 101.754 |
| 平均值 \bar{X}_i (cells/L) | | 203.213 |
| 标准偏差 SD(cells/L) | | 77.799 |
| t 值 | | 3.143 |
| 检出限 (cells/L) | | 244.0 |
| 测定下限 (cells/L) | | 978.0 |

5.8.2.5 检出限比较

综合四种样品的逐级稀释实验结果, 0.1ml 框检出限在 1.25×10^3 cells/L ~ 6.83×10^3 cells/L, 检测下限在 5.00×10^3 cells/L ~ 2.73×10^4 cells/L。滤膜法检出限在 91 cells/L ~ 244 cells/L, 检测下限在 365 cells/L ~ 978 cells/L 范围。即 0.1ml 框检出限在 10^3 cells/L 数量水平, 检测下限在 10^3 cells/L ~ 10^4 cells/L 数量范围; 滤膜法检出限在 10 cells/L ~ 100 cells/L 数量范围, 检测下限在 10^3 cells/L 数量级以下。滤膜法的检出限及检测下限更低。0.1ml 框及滤膜法检出限和检测下限比较详见表 33。

表 33 不同样品的检出限及检测下限数据汇总 (单位: cells/L)

| 方法 | 0.1ml 框 | | | 滤膜法 | | |
|------|------------------|-----|------|------------------|-----|------|
| | STDEV.S (n=7) | MDL | 检测下限 | STDEV.S (n=7) | MDL | 检测下限 |
| 样品名称 | | | | | | |

| | | | | | | |
|----------|---------|---------|----------|-------|--------|--------|
| 泽雅水库样品 | 1171.53 | 3682.11 | 14728.43 | 54.37 | 170.88 | 683.52 |
| 分水江样品 | 397.86 | 1250.47 | 5001.86 | 29.05 | 91.31 | 365.24 |
| 南太湖小梅口样品 | 2172.85 | 6829.27 | 27317.10 | 42.91 | 134.88 | 539.50 |
| 青山水库子样品 | 895.54 | 2814.66 | 11258.64 | 77.80 | 244.52 | 978.09 |



测定检测限的最大过滤体积在 500~1000 ml 之间。美国《Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (22nd)》(APHA, AWWA, WEF)描述滤膜法时指出:

“every organism or cell counted should not represent more than about 25 organisms or cells in the natural sample”, 即倍乘因子应该不大于 25, 按此规定,《水和废水监测分析方法》中 1L 样品浓缩至 30 ml 已偏离范围。Bellinger 和 Sigeo (2010) 指出滤膜法可推荐过滤体积在 1 ml/cm²~200 ml/cm², 按照本标准研究所用滤膜规格, 可推荐过滤体积应在 2.8 ml~580 ml 范围。

5.8.2.6 与 Utermöhl 计数框检出限比较

滤膜法与欧盟 Utermöhl 框(EN15204-2006)相似性比较详见表 34。

表 34 滤膜法与 Utermöhl 框比较结果

| 方法 | 滤膜法 | Utermöhl 计数框 | 说明 |
|---------|------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| 计数载体 |  滤膜 | 体积为 2.973ml 的圆柱形计数池: 本质为一定面积的圆平面  | Utermöhl 计数框装置比较复杂: 圆盘形计数框, 沉淀的藻类随机分布在计数盘底部。 滤膜: 藻类在真空压力下截留在滤膜上。 |
| 计数载体面积 | 滤膜有效面积: 283mm ² 至 290mm ² | 计数池底部面积: 531mm ² | 一致, 两者均为一定面积圆平面 |
| 浓缩方法 | 真空过滤 | 自然沉降 | 一致, 都是将样品中目标物通过一定方式收集在圆平面上。 |
| 处理时长 | 3h | 24~48h | 滤膜法耗时较短。 |
| 子样品体积 | 与样品藻密度有关, 最大体积 500ml~1000 ml。 | 取决于沉淀柱, 试样体积为 2.973ml, 10ml, 50ml, 100ml。 | utermöhl 计数池对样品处理浓缩倍数: 3~34 倍, 更适合寡营养水体。滤膜法广适。 |
| 显微镜 | 正置显微镜或倒置显微镜 | 倒置显微镜 | 基本一致。Utermöhl 计数框较厚需具备长工作距离的倒置显微镜。滤膜法无限制。 |
| 计数方法 | 视野法 | 视野法 | 一致 |
| 检出限 | 逐级稀释试验 | $n_{det} = -\ln(\alpha) \cdot f_{total} / (V \cdot f_{counted})^*$ | n_{det} 引自 EN 15204:2006(E) |
| 检出限相关因子 | ? | 计数视野数, 总视野数, 子样品体积 | — |

“*” Utermöhl 检出限计算公式中, n_{det} 为检出限, α 为显著性水平, f_{total} 为计数框视野总数, $f_{counted}$ 为计数视野数, V 为子样品的体积。

结果表明，除子样品体积、处理时长和检出限确定方法不一致外，滤膜法和 utermöhl 框其他相关技术参数描述相似或基本一致。

选取 10 个不同实样进行滤膜法测定，依照 Utermöhl 精密度公式计算滤膜法精密度，通过 spss (22nd) 软件作精密度与子样品体积、计数视野数、总视野数、视野面积等 4 参数作 pearson 相关分析。结果表明，滤膜法精密度与总视野数、视野面积显著相关 ($p < 0.01$, $d_f=9$)，计数视野数与子样品体积显著相关 ($p < 0.05$, $d_f=9$)。可见，滤膜法检出限相关因子包括计数视野数、视野总数和子样品体积，同 utermöhl 框精密度相关因子基本一致。Pearson 分析结果详见表 35。

表 35 滤膜法精密度水平与总视野数等参数的 pearson 相关性分析

| 类别 | 精密度 | 总视野数 | 计数视野数 | 子样品体积 | 每个计数视野面积 |
|----------|----------|---------|---------|---------|----------|
| 精密度 | 1 | 0.890** | 0.243 | -0.328 | -0.791** |
| | | 0.001 | 0.498 | 0.355 | 0.006 |
| 总视野数 | 0.890** | 1 | 0.386 | -0.218 | -0.640* |
| | 0.001 | | 0.271 | 0.545 | 0.046 |
| 计数视野数 | 0.243 | 0.386 | 1 | -0.671* | 0.177 |
| | 0.498 | 0.271 | | 0.034 | 0.625 |
| 子样品体积 | -0.328 | -0.218 | -0.671* | 1 | 0.058 |
| | 0.355 | 0.545 | 0.034 | | 0.874 |
| 每个计数视野面积 | -0.791** | -0.640* | 0.177 | 0.058 | 1 |
| | 0.006 | 0.046 | 0.625 | 0.874 | |

其中：“**”指 0.01 水平，相关性极显著；“*”指 0.05 水平，相关性显著。

5.8.2.7 滤膜法 n_{det}

依据 EN 15204:2006 计算滤膜法各逐级稀释各样品检出限。结果表明，当显著水平 $\alpha=0.05$ 时，滤膜法理论检出限在 19 cells/L~61 cells/L 之间；当显著水平 $\alpha=0.01$ 时，滤膜法的理论检出限在 29 cells/L~94 cells/L 之间，此结果与滤膜法逐级稀释实验测定的检出限测定结果 10cells/L~100cells/L 是吻合的。 n_{det} 法滤膜法检出限测定结果详见表 36。

表 36 n_{det} 法滤膜法检出限测定结果

| 试验样品 | 计数倍数 (X) | 视野类型 | 视野面积 (mm ²) | 子样品体积 (ml) | 滤膜有效面积 (mm ²) | Quantitative detection limit (cells/L) | |
|-----------|----------|------|-------------------------|------------|---------------------------|----------------------------------------|---------------|
| | | | | | | $\alpha=0.05$ | $\alpha=0.01$ |
| 泽雅子样品 | 20 | 视场视野 | 0.95 | 500 | 290 | 61 | 94 |
| 分水江子样品 | 20 | 视场视野 | 0.95 | 1000 | 286.52 | 19 | 29 |
| 南太湖小梅口子样品 | 20 | 视场视野 | 0.95 | 500 | 290 | 57 | 88 |
| 青山水库子样品 | 20 | 视场视野 | 0.95 | 500 | 290 | 57 | 88 |

综上所述，滤膜法检出限计算方法参照 EN 15204:2006 是科学有效的。所以，滤膜法检出限计算方法可参照式 (6)。

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

式(6)中, α 为显著性水平 (the level of significance); n_{det} 为检出限 (the detection limit); f_{total} : 计数框可镜检计数的视野总数 (the total number of microscope fields in the chamber); $f_{counted}$: 镜检计数的视野个数 (the number of fields counted);
 V : 计数框子样品体积或子样品体积 (the number of the sub-sample in the chamber)。

5.8.3 实验室内验证

取中密度样品 3# (1.98E+06 cell/L)、中密度样品 2# (4.78E+07 cell/L), 低密度样品 (2.42E+05 cell/L) 和高密度样品 (1.0E+08 cell/L), 由人员 A 和人员 B 按滤膜法检测, 计算标准偏差和相对标准偏差。结果表明, 人员 A 检测结果的标准偏差均小于 0.08, 相对标准偏差均小于 1.4%; 人员 B 检测结果的标准偏差均小于 0.08, 相对标准偏差均小于 0.5%。实验室内各样品检测结果详见表 37~38。

表 37 实验室人员 A 各样品检测结果

| 平行数 | 低密度 | 中密度 3# | 中密度 2# | 高密度 | |
|-------------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 测定结果 (cells/L) | 1 | 3.20E+05 | 3.35E+07 | 2.00E+06 | 5.99E+07 |
| | 2 | 2.17E+05 | 5.90E+07 | 1.91E+06 | 6.29E+07 |
| | 3 | 2.38E+05 | 5.04E+07 | 1.86E+06 | 6.07E+07 |
| | 4 | 2.64E+05 | 5.14E+07 | 2.00E+06 | 5.36E+07 |
| | 5 | 2.45E+05 | 5.01E+07 | 2.09E+06 | 5.45E+07 |
| | 6 | 1.89E+05 | 4.61E+07 | 2.02E+06 | 5.27E+07 |
| 平均值 X | 2.42E+05 | 4.78E+07 | 1.98E+06 | 5.73E+07 | |
| 标准偏差 SD | 0.07 | 0.08 | 0.02 | 0.03 | |
| 相对标准偏差 RSD (%) | 1.32 | 1.08 | 0.29 | 0.42 | |

注: 标准偏差 SD 和相对标准偏差 RSD (%) 均为测定值经对数 (以 10 为底) 转换后计算。

表 38 实验室人员 B 各样品检测结果

| 平行数 | 低密度 | 中密度 3# | 中密度 2# | 高密度 | |
|-------------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 测定结果 (cells/L) | 1 | 2.11E+05 | 6.14E+07 | 1.58E+06 | 1.09E+08 |
| | 2 | 2.04E+05 | 6.12E+07 | 1.61E+06 | 1.07E+08 |
| | 3 | 2.01E+05 | 5.15E+07 | 1.69E+06 | 1.01E+08 |
| | 4 | 2.07E+05 | 5.43E+07 | 1.76E+06 | 1.00E+08 |
| | 5 | 2.21E+05 | 5.24E+07 | 1.58E+06 | 1.25E+08 |
| | 6 | 2.39E+05 | 5.64E+07 | 1.83E+06 | 1.05E+08 |
| 平均值 X (几何均值) | 2.14E+05 | 5.60E+07 | 1.67E+06 | 1.08E+08 | |
| 标准偏差 SD | 0.03 | 0.03 | 0.03 | 0.08 | |
| 相对标准偏差 RSD (%) | 0.48 | 0.43 | 0.44 | 0.42 | |

注: 标准偏差 s_i 和相对标准偏差 RSD (%) 均为测定值经对数 (以 10 为底) 转换后计算。

实验室内人员比对结果表明, 高密度样品检测结果间的相对标准偏差较大, RSD (%) 值为 43.25%。中密度和低密度样品检测结果间的相对标准偏差均在 10% 左右。高、中和低

密度样品检测结果间的计数差异百分比（PDE）与相对标准偏差变化表现一致。中、低密度样品检测结果的精密度高高于高密度样品。实验室内人员间比对结果汇总表 39。

表 39 标准方法的实验室内人员间比对结果汇总

| 平行号 | | 高密度 | | 中密度水平试验 2 | | 中密度水平试验 1 | | 低密度 | |
|----------------------------------|---|----------|----------|-----------|----------|-----------|----------|----------|----------|
| | | 人员 A | 人员 B | 人员 A | 人员 B | 人员 A | 人员 B | 人员 A | 人员 B |
| 测定结果 (cells/L) | 1 | 5.99E+07 | 1.09E+08 | 2.00E+06 | 1.58E+06 | 3.35E+07 | 6.14E+07 | 3.20E+05 | 2.11E+05 |
| | 2 | 6.29E+07 | 1.07E+08 | 1.91E+06 | 1.61E+06 | 5.90E+07 | 6.12E+07 | 2.17E+05 | 2.04E+05 |
| | 3 | 6.07E+07 | 1.01E+08 | 1.86E+06 | 1.69E+06 | 5.04E+07 | 5.15E+07 | 2.38E+05 | 2.01E+05 |
| | 4 | 5.36E+07 | 1.00E+08 | 2.00E+06 | 1.76E+06 | 5.14E+07 | 5.43E+07 | 2.64E+05 | 2.07E+05 |
| | 5 | 5.45E+07 | 1.25E+08 | 2.09E+06 | 1.58E+06 | 5.01E+07 | 5.24E+07 | 2.45E+05 | 2.21E+05 |
| | 6 | 5.27E+07 | 1.05E+08 | 2.02E+06 | 1.83E+06 | 4.61E+07 | 5.64E+07 | 1.89E+05 | 2.39E+05 |
| 平均值 X | | 5.74E+07 | 1.08E+08 | 1.98E+06 | 1.67E+06 | 4.84E+07 | 5.62E+07 | 2.45E+05 | 2.14E+05 |
| 标准偏差 Si* ₁ | | 0.07 | 0.08 | 0.02 | 0.03 | 0.08 | 0.03 | 0.07 | 0.03 |
| 相对标准偏差 RSD (%) * ₂ | | 0.42 | 0.42 | 0.29 | 0.44 | 1.08 | 0.43 | 1.32 | 0.48 |
| 人员间 SD (cells/L) | | 3.57E+07 | | 2.15E+05 | | 5.47E+06 | | 2.22E+04 | |
| 人员间均值 (cells/L) | | 8.27E+07 | | 1.83E+06 | | 5.23E+07 | | 2.30E+05 | |
| 人员间 RSD (%) * ₃ | | 43.25 | | 11.78 | | 10.46 | | 9.68 | |
| PDE 计数差异百分比 (%) | | -30.58% | | 8.33% | | 7.40% | | 6.84% | |

“*₁, *₂”数据经以 10 为底对数转化；“*₃”数据未经对数转化。

5.8.4 与《显微镜计数法（2014-25）》比较

根据标准研讨会专家意见，开展《水质 浮游植物的测定 滤膜法》（2014-20）与《水质 浮游植物的测定 显微镜计数法》（2014-25）方法比较试验。

选取来自不同水体 6 个样品，包含 2 个实验室独立培养的样品，4 个野外水样开展试验。高密度样品编号分别为 XMKL190516，ZYR190516，JNU-Diatom。中密度样品编号为 FSJ-R190318。低密度样品编号为“JNU-Dino”和“低密度验证样品”。《显微镜计数法》包含对角线法，行格法，随机视野法和全片计数法。试验设计如下：①高密度样品：对角线法、随机视野法与滤膜法比较。②中密度样品：全片法、对角线法、行格法（2、5、8）与滤膜法比较。③低密度样品：全片法，行格法（2、5、8）与滤膜法比较。

高密度样品比较结果表明，XMKL190516 子样品对角线法，随机视野法和滤膜法检测结果分别为 2.45E+08cells/L、2.75E+08cells/L、2.29E+08 cells/L，结果间的相对标准偏差为 9.24%。ZYR20190216 子样品对角线法，随机视野法和滤膜法藻密度检测结果分别为 9.30E+07cells/L，1.00E+08 cells/L，1.00E+08 cells/L；结果间的相对标准偏差为 5.27%。JNU-Diatom 子样品对角线法，随机视野法和滤膜法藻密度检测结果分别为 2.03E+08 cells/L，2.63E+08 cells/L，3.76E+08 cells/L；结果间的相对标准偏差为 18.12%。可见，高密度样品对角线法、随机视野法与滤膜法结果间无显著差异，结果间相对标准偏差在 5.27%~18.12%之间。JNU-Diatom 样品为丝状体，丝状体换算会导致结果间相对标准偏差偏大。两种标准方法分析样品耗时差异明显，显微镜计数法每样品的分析耗时远高于滤膜法。

综上所述，高密度样品的检测分析时，滤膜法优于显微镜计数法。高密度样品显微镜计数法与滤膜法分析结果详见表 40。

表 40 高密度水平样品显微镜计数法与滤膜法检测结果

| 样品编号 | 藻密度 (cells/L) | | | |
|-------------|---------------|----------|----------|-----------|
| | 平行数 | 对角线法 | 随机视野法 | 滤膜法 |
| XMKL190516 | 1 | 2.34E+08 | 2.48E+08 | 2.64E+08 |
| | 2 | 2.40E+08 | 2.96E+08 | 1.94E+08 |
| | 3 | 2.63E+08 | 2.80E+08 | — |
| | 平均值 | 2.45E+08 | 2.75E+08 | 2.29E+08 |
| | SD | 1.51E+07 | 2.46E+07 | 5.00E+07 |
| | RSD(%) | 6.14 | 8.96 | 21.83 |
| | 均值' | 2.50E+08 | | |
| | SD' | 2.34E+07 | | |
| | RSD' (%) | 9.35 | | |
| ZYR20190216 | 平行数 | 对角线 | 随机视野 | 滤膜法 |
| | 1 | 8.48E+07 | 9.12E+07 | 1.01E+08* |
| | 2 | 9.47E+07 | 1.06E+08 | 1.03E+08* |
| | 3 | 9.96E+07 | 1.04E+08 | 9.48E+08* |
| | 平均值 | 9.30E+07 | 1.00E+08 | 1.00E+08 |
| | SD | 7.54E+06 | 7.93E+06 | 4.93E+06 |
| | RSD(%) | 8.1 | 7.91 | 4.91 |
| | 均值' | 9.77E+07 | | |
| | SD' | 4.04E+06 | | |
| RSD' (%) | 4.14 | | | |
| JNU-Diatom | 平行数 | 对角线法 | 随机视野法 | 滤膜法 |
| | 1 | 1.98E+08 | 2.56E+08 | 3.63E+08 |
| | 2 | 1.91E+08 | 2.64E+08 | 3.90E+08 |
| | 3 | 2.20E+08 | 2.68E+08 | — |
| | 平均值 | 2.03E+08 | 2.63E+08 | 3.76E+08 |
| | SD | 1.52E+07 | 6.07E+06 | 1.94E+07 |
| | RSD(%) | 7.49 | 2.31 | 5.15 |
| | 均值' | 2.81E+08 | | |
| | SD' | 8.78E+07 | | |
| RSD' (%) | 31.30 | | | |

注：“*”指 7 次平行测试中的 3 次测定结果。

中密度样品比较结果表明，FSJR20190516 子样品全片法，对角线法，行格法和滤膜法检测结果分别为 1.47E+07cells/L，1.76E+07cells/L，1.58E+07cells/L，1.05E+07 cells/L，结果的相对标准偏差分别为 4.97%，6.57%，3.71%，4.10%，各结果间相对标准偏差为 20.67%。中密度水平样品显微镜计数法与滤膜法检测结果详见表 41。

“低密度验证子样品”全片法，行格法(2、5、8)和滤膜法检测结果分别为 2.33E+05cells/L，1.56E+05 cells/L 和 6.95E+04 cells/L，结果的相对标准偏差分别为 33.29%，32.73%，16.84%，

各结果间的相对标准偏差为 53.63%。JNU-Dino 子样品全片法，行格法和滤膜法的检测结果分别为 2.73E+05cells/L，4.22E+05 cells/L，2.79E+05 cells/L，结果的相对标准偏差分别为 5.59%，38.94%，2.33%。

可见，低密度样品全片法和行格法检测结果间的变异性较大，滤膜法用于低密度水平样品检测优势明显。显微镜计数法中，低密度样品全片法测定比行格法稳定，但较耗时，显微镜全片法完成一个优势种计数需 60min。低密度样品显微镜计数法与滤膜法比较结果详见表 5.8.4-2。

表 41 中、低密度水平样品显微镜计数法与滤膜法分析结果

| 样品编号 | 总藻密度 (cells/L) | | | | |
|--------------|----------------|----------|----------|----------|------------|
| | 平行数 | 全片法 | 对角线 | 行格法 | 滤膜法 |
| FSJR20190516 | 1 | 1.40E+07 | 1.78E+07 | 1.52E+07 | 1.08E+07 |
| | 2 | 1.55E+07 | 1.87E+07 | 1.59E+07 | 1.02E+07 |
| | 3 | 1.47E+07 | 1.64E+07 | 1.64E+07 | - |
| | 均值 | 1.47E+07 | 1.76E+07 | 1.58E+07 | 1.05E+07 |
| | SD | 7.31E+05 | 1.16E+06 | 5.87E+05 | 4.30E+05 |
| | RSD(%) | 4.97 | 6.57 | 3.71 | 4.10 |
| | 均值' | 1.47E+07 | | | |
| | SD' | 3.03E+06 | | | |
| 低密度验证子样品 | 1 | 3.20E+05 | - | 2.00E+05 | 8.67E+04 * |
| | 2 | 2.10E+05 | - | 1.67E+05 | 6.40E+04 * |
| | 3 | 1.70E+05 | - | 1.00E+05 | 5.12E+04 * |
| | 均值 | 2.33E+05 | - | 1.56E+05 | 6.95E+04 |
| | SD | 7.77E+04 | - | 5.09E+04 | 1.17E+04 |
| | RSD(%) | 33.29 | - | 32.73 | 16.84 |
| | 均值' | 1.53E+05 | | | |
| | SD' | 8.19E+04 | | | |
| JNU-Dino | 1 | 2.90E+05 | - | 5.33E+05 | 2.75E+05 |
| | 2 | 2.70E+05 | - | 5.00E+05 | 2.84E+05 |
| | 3 | 2.60E+05 | - | 2.33E+05 | - |
| | 均值 | 2.73E+05 | - | 4.22E+05 | 2.79E+05 |
| | SD | 1.53E+04 | - | 1.64E+05 | 6.51E+03 |
| | RSD(%) | 5.59 | - | 38.94 | 2.33 |
| | 均值' | 3.25E+05 | | | |
| | SD' | 8.42E+04 | | | |
| RSD(%)' | 25.92 | | | | |

注：“*”处为滤膜法 6 次平行测试中的 3 次测定结果。

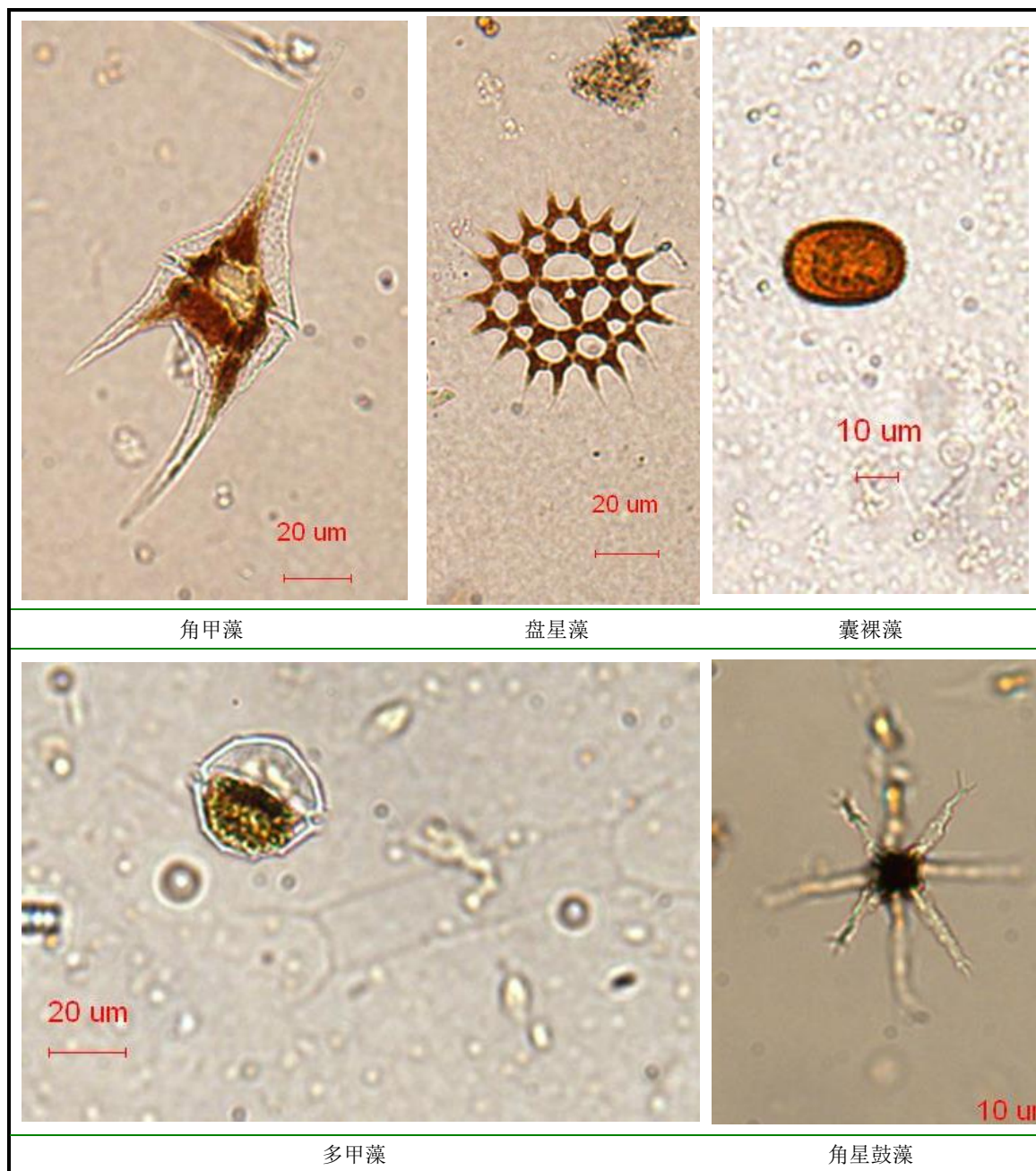
综上所述，滤膜法对于高密度、中密度和低密度水平的样品检测均有优势。显微镜计数法中，对角线法，随机视野法及行格法对中、高密度样品检测有优势。全片法、随机视

野法、行格法及对角线法对低密度样品的检测有较大局限性，尽管全片法适合低密度样品的检测，但镜检耗时较长。

5.8.5 滤膜装片镜检照片

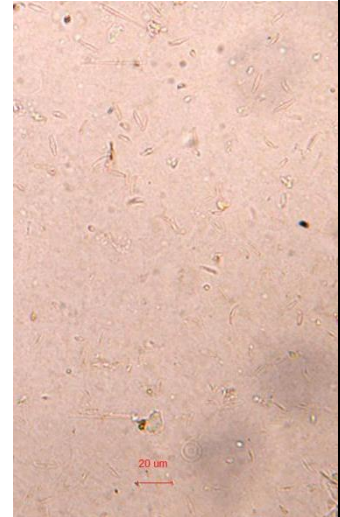
标准编制组在标准编制过程中拍摄了滤膜装片的显微照片，是对滤膜法有效性的直观证明。滤膜装片的显微照片详见表 42。可见，不同藻类的滤膜法显微照片与传统显微照片无明显差异。

表 42 滤膜装片的显微镜照片





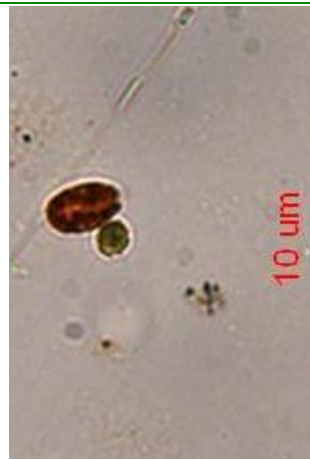
浮游植物 sp.



长曲壳藻



隐藻, 鼓藻, 锥囊藻



隐藻 2



网球藻



叉星鼓藻



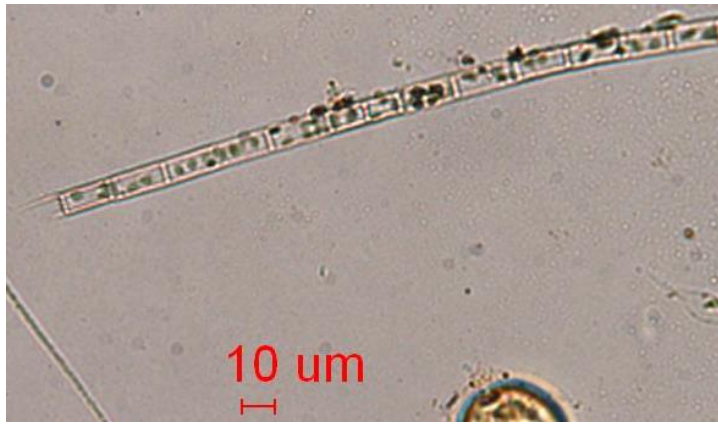
桥弯藻, 小环藻



小环藻，桥弯藻



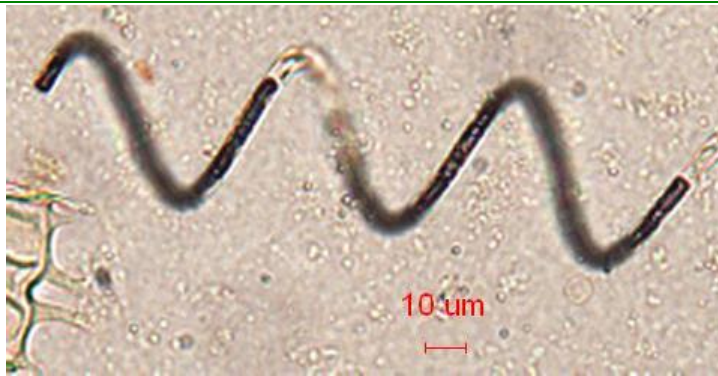
颤藻



直链藻



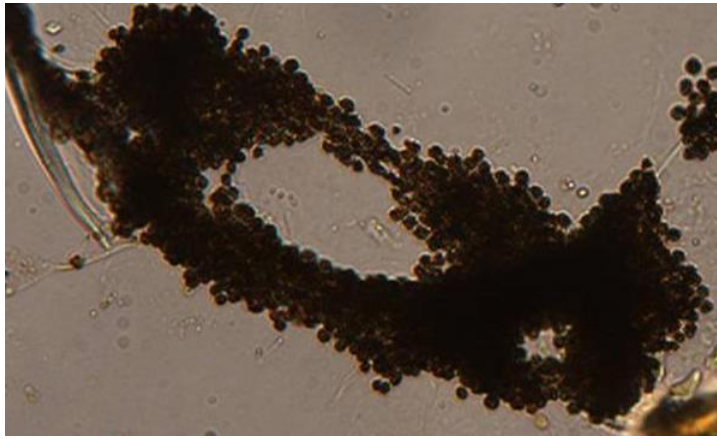
博氏藻



直链藻螺旋变形



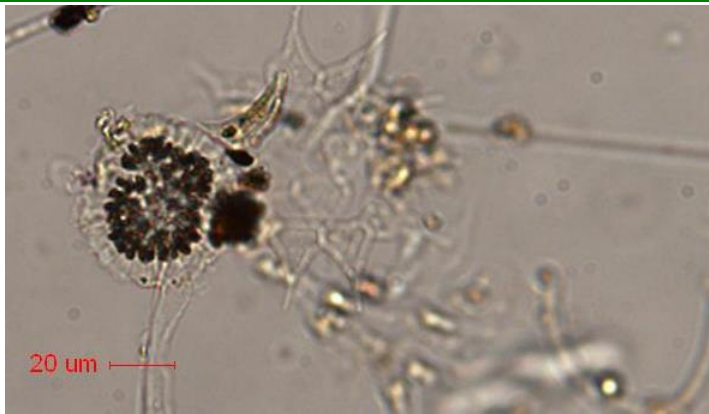
欧式藻



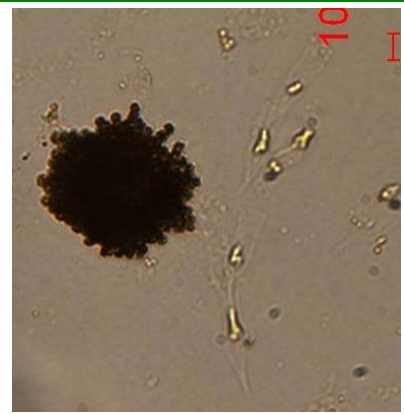
铜绿微囊藻



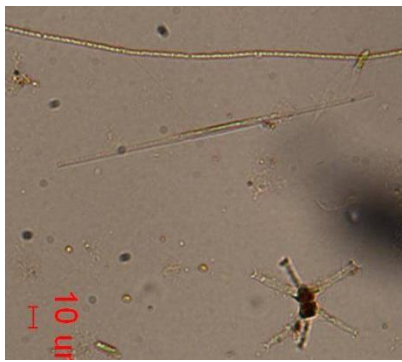
隐藻, 小环藻



浮游植物 sp



微囊藻.sp, 锥囊藻



矛丝藻 sp. 角星鼓藻, 针杆藻



叉星鼓藻



盘星藻, 直链藻, 角甲藻



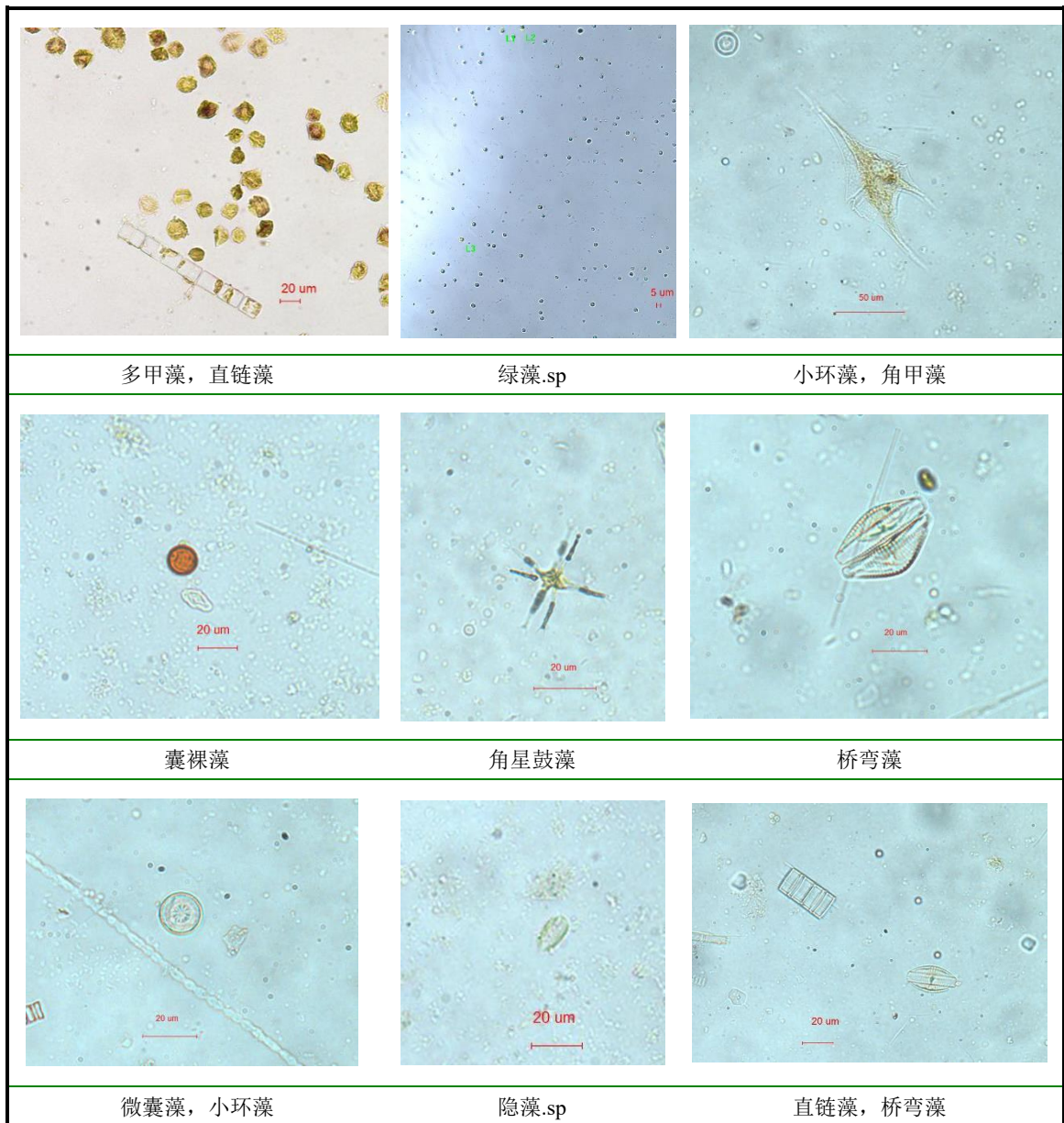
颤藻



十字藻



多甲藻



说明：表 42 中所示的显微图片底色与 CCD 拍照系统曝光设置有关。

5.9 质量控制与质量保证

5.9.1 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 计算公式详见式 (7)。

$$PDE = \left[\frac{|lab1 - lab2|}{lab1 + lab2} \right] \times 100\% \dots\dots\dots (7)$$

5.9.2 最小计数量。最小计数量决定计数误差，计数误差取决于项目要求。绝大部分浮游植物种类的计数误差可设定±20%，一般的种类计数 100~150 个，即满足 20%的计数误差。若要达到 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。

5.9.3 定期开展显微镜校准，包括对目镜测微尺、视野面积的校准，一年至少一次。

5.9.4 对每批次滤膜进行延展性测试，要求滤膜处理前后直径变化在 1.0mm 以内。

5.9.5 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 5.9.1。

6 方法验证

依据《环境监测 分析方法标准制修订技术导则》（HJ 168-2010）要求，按照《水质 浮游植物的测定 滤膜法》验证方案开展不同密度水平的精密度，准确度的实验室间验证工作。

6.1 验证方案

6.1.1 参与方法验证的实验室

表 43 方法验证单位及实验人员

| 序号 | 验证实验室 | 姓名 | 性别 | 职务或职称 |
|----|--------------|-----|----|-------|
| 1 | 上海市环境监测中心 | 汤琳 | 女 | 教授级高工 |
| | | 朱梦杰 | 男 | 工程师 |
| 2 | 江苏省常州环境监测中心 | 沈丽娟 | 女 | 工程师 |
| | | 沈伟 | 男 | 工程师 |
| 3 | 浙江省海洋监测预报中心 | 杜伟 | 男 | 工程师 |
| | | 高亮亮 | 女 | 工程师 |
| 4 | 宁波市环境监测中心 | 胡建林 | 男 | 高工 |
| | | 屈晓萍 | 女 | 高工 |
| 5 | 杭州市环境监测中心站 | 王昂 | 男 | 工程师 |
| | | 陈芳 | 女 | 高工 |
| 6 | 自然资源部第二海洋研究所 | 戴鑫峰 | 男 | 副研究员 |
| | | 王鹏斌 | 男 | 副研究员 |

6.1.2 方案验证具体方案

按照《环境监测 分析方法标准制修订技术导则》（HJ 168-2010）的要求，选择高、中、低密度的水样及准标准品，于 6 家实验室进行方法验证。

标准编制组根据富营养化水平与浮游植物密度关系，确定高、中及低密度样品。浮游植物密度与富营养化关系详见表 44。

表 44 浮游植物密度与富营养化水平的关系

| 浮游植物密度水平 | 浮游植物密度（cells/L） | 富营养化水平 |
|----------|----------------------------------|----------|
| 高 | 10 ⁸ 及以上 | 富营养或重富营养 |
| 中 | 10 ⁶ ~10 ⁷ | 中营养-富营养 |
| 低 | 0~10 ⁵ | 中营养及以下 |

精密度验证：将高（ 1.0×10^8 cells/L 及以上）、中（ 4.02×10^6 cells/L）、低（ 6.95×10^4 cells/L）密度水平的样品分配到各验证实验室：中密度样品为实验室培养的藻类，高、低密度样品均为地表水实样。各实验室按照本标准开展方法精密度验证和准确度验证；每个样品重复测定 6 次，分别计算样品浮游植物总密度平均值、标准偏差及相对标准偏差。

准确度验证：选择经 6 家实验室按标准方法测定的样品 1#（ 2.93×10^8 cells/L）、样品 2#（ 4.02×10^6 cells/L）作为“准标准品”，其平均值为“约定真值”，开展加标-样品 1#、加标-样品 2# 的空白加标回收测定，加标量分别为 1.47×10^7 cells/L 和 2.01×10^6 cells/L，每个样品重复测定 6 次，分别计算加标-样品 1# 和加标-样品 2# 的浮游植物总密度的平均值、标准偏差、相对标准偏差，并计算其空白加标回收率。

6.2 验证过程

按照《环境监测 分析方法标准制修订技术导则》（HJ 168-2010）规定，于 2018 年 1 月至 2019 年 5 月，组织本标准实验室间验证，分别在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等 6 家实验室开展方法验证。

（1）实验室间方法验证准备。筛选确定有资格和相关能力的方法验证单位，准备验证样品，确定验证计划及实施方案。在方法验证前，通过各种交流形式保证参加验证的操作人员熟悉方法原理、操作步骤和流程，确保验证过程中使用的仪器、设备、试剂等符合方法要求。

（2）数据处理和统计分析。对所测数据进行实验室内和实验室间平均值、标准偏差和相对标准偏差的分析，通过专业统计分析软件，分析实验室内和实验室间 95% 置信区间。标准方差和相对标准偏差均为经以 10 为底对数转换后计算。

（3）具体验证数据详见附件一《方法验证报告》。

（4）方法验证结论

精密度：6 家实验室分别对含高密度（ 1.08×10^8 cells/L）、中密度（ 4.02×10^6 cells/L）和低密度（ 6.95×10^4 cells/L）的浮游植物实际样品进行了 6 次重复测定；实验室内的标准偏差范围分别为 0.01~0.05，0.01~0.03，0.02~0.06；实验室内的相对标准偏差范围分别为 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%；6 家实验室内置信区间分别为 $8.26 \times 10^7 \sim 1.10 \times 10^8$ cells/L； $3.01 \times 10^6 \sim 4.63 \times 10^6$ cells/L； $4.62 \times 10^4 \sim 9.68 \times 10^4$ cells/L；实验室间置信区间分别为 $9.29 \times 10^7 \sim 1.03 \times 10^8$ cells/L； $3.62 \times 10^6 \sim 4.43 \times 10^6$ cells/L； $5.72 \times 10^4 \sim 8.18 \times 10^4$ cells/L。

6 家实验室分别对加标量为 1.47×10^7 cells/L 和 2.01×10^6 cells/L 的加标-样品 1# 和加标-样品 2# 进行了 6 次空白加标回收测定，加标-样品 1# 和加标-样品 2# 的回收率范围分别为 44.8~75.7% 和 108.8%~179.8%；回收率分别为 $58.1 \pm 12.2\%$ 和 $150.5 \pm 23.1\%$ 。

7 与开题报告的差异说明

本标准主题内容在与开题报告保持一致的前提下，丰富完善了标准研究内容。相对于开题报告，本标准简化了“滤膜法透明处理步骤”，增加了方法适用性研究内容，研究和确定

了标准方法的重要技术参数，增加了标准方法的实验室内比对试验，增加了与《水质 浮游植物的测定 显微镜计数法》(2014-25) 标准方法的比较试验。

8 参考文献

- [1] 国家环保总局 2002.水和废水监测分析方法(第四版).中国环境科学出版社.
- [2] 国家环保总局 1992.水生生物监测手册.东南大学出版社.
- [3] 侯建军等 2004.赤海藻细胞计数方法比较研究.中国公共卫生. 8: 907-908.
- [4] 黄祥飞 2000.湖泊生态调查观测与分析.中国标准出版社
- [5] 金相灿,屠清瑛 1990.湖泊富营养化调查规范(第二版).中国环境科学出版社.
- [6] 余梅 2004.藻类检测和计数新方法-倒置式显微镜法.给水排水, 30(4): 41-42.
- [7] 章宗涉,黄祥飞 1991.淡水浮游生物研究方法.科学出版社.
- [8] HJ/T 91-2002 地表水和污水监测技术规范.中国环境科学出版社.
- [9] HJ 168-2010 环境监测 分析方法标准制修订技术导则.中国环境科学出版社.
- [10] HJ 565-2010 环境保护标准编制出版技术指南.中国环境科学出版社.
- [11] Anderson, P. and Kristensen, H.S. 1995. Rapid and precise identification and counting of thecate dinoflagellates using epifluorescence microscopy. In Lassus P., Arzul, G., Erard-Le Denn, E., Gentien, P and Marcaillou-Le Baut, C.(eds), Harmful Marine Algal Blooms. Lavoisier, Paris, France, pp. 713-718.
- [12] APHA (American Public Health Association), Standard methods for the examination of water and waste water, 22th edn, APHA, Washington D.C.
- [13] Bill Brierley, et al., 2007. Guidance on the quantitative analysis of phytoplankton in Freshwater Samples.Phytoplankton Counting Guidance_v1.
- [14] CEN (2004). *Water quality – Guidance standard for the routine analysis of phytoplankton abundance and composition using inverted microscopy (Utermöhl technique)* CEN TC 230/WG 2/TG 3/N83, May 2004.
- [15] Edward G. B. and David C.S. 2010. Freshwater Algae Identification and Use as Bioindicators.A John & Sons, Ltd, Publication.
- [16] Evans, J.H.1972. A modified sedimentation system for counting algae with an inverted microscope. Hydrobiol., 40, 247-250.
- [17] Fournier R.O.1978.Membrane filters for estimating cell numbers. In Sournia,A.(ed.), Phytoplankton Manual- Monographs on Oceanographic Methodology. UNESCO, Paris, France, P. 190.
- [18] Gertraud H and Roger C. 1999. A Phytoplankton Methods Manual for Australian Freshwaters’, LWRDC Occasional Paper 22/99.Land and Water Resources Research and Development Corporation.
- [19] Hader D.P.,1991. Advanced methods in photobiology of Protists-Review. Acta Protozool., 30, 135-156.
- [20] Hamilton, P.B., Proulx, M., Earle, C. 2001. Enumerating phytoplankton with an upright

- compound microscope using a modified settling chamber. *Hydrobiologia* 444, 171–175.
- [21] Holmes R. W., 1962. The preparation of marine phytoplankton for microscopic examination and enumeration on molecular filters. *Spec. Scient. Rep. US Fish Wildl. Serv., Fish.*, 433, 1-6.
- [22] Kristiina V. et al., 2007. Intercalibrations of freshwater phytoplankton analyses. *Boreal Environment Research* 12: 561-569.
- [23] Lund, J. W., Kipling, G. Le Cren, E. D. (1958) The inverted microscope method of estimating algae numbers and the statistical basis of estimation by counting. *Hydrobiology* 11, 143-170.
- [24] Lund, J. W. 1951. A Sedimentation technique for counting algae and other organisms. *Hydrobiology* 3, 390-394.
- [25] Mc Nabb, 1960. Enumeration of freshwater phytoplankton concentrated on the membrane filter. *Limnol. Oceanogr.*, 5, 57-61.
- [26] McAlaice, B. J. 1971. Phytoplankton sampling with the Sedgwick Rafter cell. *Limnology and Oceanography* 16, 19-28.
- [27] Rosemary, P. and James G.M., 2000. A rapid Utermöhl method for estimating algal numbers. *Journal of Plankton Research*, 22:2255-2262.
- [28] Standard Operating Procedure for Phytoplankton Analysis, 2010.
- [29] UNESCO 1974. A review of methods used for quantitative phytoplankton studies, Final report of SCOR Working Group 33, UNESCO Technical Papers in Marine Science, 18, Paris.
- [30] Utermöhl, H. 1931. Neue Wege in der quantitative Erfassung des Planktons. *Verhandlungen der international Vereinigung für theoretische und angewandte. Limnologie* 5, 567-596.
- [31] Utermöhl H. 1958. 'Zur Vervollkommung der quantitativen Phytoplankton Methodik' (Towards a perfection of quantitative phytoplankton methodology), *Mitteilungen der Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie*, 9, 1-38.
- [32] William J. W. 1976. sedgwick rafter cell counts: a procedural analysis. *Hydrobiologia* vol. 48, 2, pag. 95-107.
- [33] The American Society of Limnology and Oceanography, Inc. 1987. A simple and reliable method for making permanent mounts of phytoplankton for light and fluorescence microscopy. *Limnol. Oceanogr.*, 32(5), 1154-1159.
- [34] 由文辉. 1995. 淀山湖着生藻类群落结构与数量特征. *环境与科学*(5): 59-62.
- [35] Reynolds C. S. and Jaworski G. H. M. 1978. Enumeration of Natural Microcystis Populations. *Br. Phycol. J.*, 13:269-277.

附一

方法验证报告

方法名称： 水质 浮游植物的测定 滤膜法

项目主编单位： 浙江省环境监测中心

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、自然资源部第二海洋研究所。

项目负责人及职称： 晁爱敏 高级工程师

通讯地址： 浙江省杭州市西湖区学院路 117 号 电话： 0571—89975322

报告编写人及职称： 晁爱敏（高级工程师）

报告日期： 2019 年 6 月 20 日

1 原始数据

1.1 实验室基本情况

按照《环境监测 分析方法标准制修订技术导则》(HJ 168-2010)的规定,组织了6家有资质的验证实验室对《水质 浮游植物的测定 滤膜法》进行了方法验证。参与方法验证的实验室及人员情况、使用仪器情况、使用试剂及溶液情况分别详见表1-1、表1-2和表1-3。

表 1-1 参加方法验证的实验人员情况表

| 序号 | 验证实验室 | 姓名 | 性别 | 年龄 | 职务或职称 |
|----|--------------|-----|----|----|-------|
| 1 | 上海市环境监测中心 | 汤琳 | 女 | 44 | 教授级高工 |
| | | 朱梦杰 | 男 | 37 | 工程师 |
| 2 | 江苏省常州环境监测中心 | 沈丽娟 | 女 | 39 | 工程师 |
| | | 沈伟 | 男 | 31 | 工程师 |
| 3 | 浙江省海洋监测预报中心 | 杜伟 | 男 | 38 | 工程师 |
| | | 高亮亮 | 女 | 36 | 工程师 |
| 4 | 宁波市环境监测中心 | 胡建林 | 男 | 37 | 高工 |
| | | 屈晓萍 | 女 | 44 | 高工 |
| 5 | 杭州市环境监测中心站 | 王昂 | 男 | 38 | 工程师 |
| | | 陈芳 | 女 | 52 | 高工 |
| 6 | 自然资源部第二海洋研究所 | 戴鑫峰 | 男 | 37 | 副研究员 |
| | | 王鹏斌 | 男 | 34 | 副研究员 |

表 1-2 使用仪器情况登记表

| 编号 | 备注 | 仪器名称 | 规格型号 | 仪器出厂编号 | 性能情况 | 备注 |
|----|-------------|-----------|---------------------|------------|------|----|
| 1 | 上海市环境监测中心 | 荧光显微镜 | ZEISS Scope.A1 | 3323000518 | 正常 | — |
| | | 电热鼓风干燥箱 | 上海一恒科技 BPH-90 | 612923 | 正常 | — |
| | | 耐洁过滤器(套装) | PN4203 | 052615 | 正常 | — |
| 2 | 江苏省常州环境监测中心 | 光学显微镜 | Nikon eclipse 80i | 25099 | 正常 | — |
| | | 电热恒温鼓风干燥箱 | DHG-9140A | 25175 | 正常 | — |
| | | 耐洁过滤器(套装) | PN4203 | 052615 | 正常 | — |
| 3 | 浙江省海洋监测预报中心 | 荧光显微镜 | ZEISS AXIOSTAR PLUS | 08_040 | 正常 | — |
| 3 | | 电热恒温鼓风干燥箱 | DGG-9203A | S0042 | 正常 | — |

| 编号 | 备注 | 仪器名称 | 规格型号 | 仪器出厂编号 | 性能情况 | 备注 |
|----|--------------|-------------|------------------|---------|------|----|
| | | 耐洁过滤器（套装） | PN4203 | 052615 | 正常 | — |
| 4 | 宁波市环境监测中心 | 电热恒温鼓风干燥箱 | DHG-9245A | 044593 | 正常 | — |
| | | 生物显微镜 | OLYMPUS BX51 | — | 正常 | — |
| | | 耐洁过滤器（套装） | PN4203 | 052615 | 正常 | — |
| 5 | 杭州市环境监测中心站 | Olympus 显微镜 | OLYMPUS CX31 | 1M25563 | 正常 | — |
| | | 生物显微镜 | OLYMPUS BX51 | 762 | 正常 | — |
| | | 恒温干燥箱 | DHG-9070A | 825 | 正常 | — |
| | | 耐洁过滤器（套装） | PN4203 | 052615 | 正常 | — |
| 6 | 自然资源部第二海洋研究所 | 显微镜 | OLYMPUS CX31RTSF | 8F08686 | 正常 | — |
| | | 电热鼓风干燥箱 | DH8T-9240A | 1005305 | 正常 | — |
| | | 耐洁过滤器（套装） | PN4203 | 052615 | 正常 | — |

表 1-3 使用试剂及溶液情况登记表

| 编号 | 备注 | 名称 | 生产厂家 规格 | 纯化处理 | 备注 |
|----|-------------|------------------|------------------|------|----|
| 1 | 上海市环境监测中心 | 去离子水 | 自制 | — | — |
| | | 鲁哥氏固定液 | 自制 | — | — |
| | | 透明油 | 海德创业（北京）生物科技有限公司 | — | — |
| | | 耐洁载玻片盖片 | 海德创业（北京）生物科技有限公司 | — | — |
| | | 微孔混合纤维素酯膜 | 广州盎洋生物科技有限公 | — | — |
| | | Whipple grid 测微尺 | 海德创业（北京）生物科技有限公司 | — | — |
| | | 镜台测微尺 | 海德创业（北京）生物科技有限公司 | — | — |
| 2 | 江苏省常州环境监测中心 | 去离子水 | 自制 | — | — |
| | | 鲁哥氏固定液 | 自制 | — | — |
| | | 透明油 | 海德创业（北京）生物科技有限公司 | — | — |
| | | 耐洁载玻片盖片 | 海德创业（北京）生物科技有限公司 | — | — |

| | | | | | |
|---|----------------------|------------------|------------------|---|---|
| | | 微孔混合纤维素酯膜 | 广州盎洋生物科技有限公司 | — | — |
| | | Whipple grid 测微尺 | 海德创业（北京）生物科技有限公司 | — | — |
| 3 | 浙江省海洋 监测预报中 心 | 去离子水 | 自制 | — | — |
| | | 鲁哥氏固定液 | 自制 | — | — |
| | | 透明油 | 海德创业（北京）生物科技有限公司 | — | — |
| | | 耐洁载玻片盖片 | 海德创业（北京）生物科技有限公司 | — | — |
| | | 微孔混合纤维素酯膜 | 广州盎洋生物科技有限公 | — | — |
| | | Whipple grid 测微尺 | 海德创业（北京）生物科技有限公司 | — | — |
| 4 | 宁波市环境 监测中心 | 去离子水 | 自制 | — | — |
| | | 鲁哥氏固定液 | 自制 | — | — |
| | | 透明油 | 海德创业（北京）生物科技有限公司 | — | — |
| | | 耐洁载玻片盖片 | 海德创业（北京）生物科技有限公司 | — | — |
| | | 微孔混合纤维素酯膜 | 广州盎洋生物科技有限公 | — | — |
| | | Whipple grid 测微尺 | 海德创业（北京）生物科技有限公司 | — | — |
| 5 | 杭州市环境 监测中心站 | 去离子水 | 自制 | — | — |
| | | 鲁哥氏固定液 | 自制 | — | — |
| | | 透明油 | 海德创业（北京）生物科技有限公司 | — | — |
| | | 耐洁载玻片盖片 | 海德创业（北京）生物科技有限公司 | — | — |
| | | 微孔混合纤维素酯膜 | 广州盎洋生物科技有限公 | — | — |
| | | Whipple grid 测微尺 | 海德创业（北京）生物科技有限公司 | — | — |
| 6 | 自然资源部 第二海洋研 究所 | 去离子水 | 自制 | — | — |
| | | 鲁哥氏固定液 | 自制 | — | — |
| | | 透明油 | 海德创业（北京）生物科技有限公司 | — | — |
| | | 耐洁载玻片盖片 | 广州盎洋生物科技有限公 | — | — |
| | | 微孔混合纤维素酯膜 | 海德创业（北京）生物科技有限公司 | — | — |
| | | Whipple grid 测微尺 | 海德创业（北京）生物科技有限公司 | — | — |

1.2 方法精密度验证

1.2.1 方法精密度测试数据

表 1-4 浮游植物实际样品精密度测试数据

验证单位：浙江省海洋监测预报中心

测试日期：2019年1月22日

| 平行号 | | 试验样品类别 | | |
|-------------------------|---|----------|----------|----------|
| | | 高密度 | 中密度 | 低密度 |
| 测定结果 (cells/L) | 1 | 9.32E+07 | 4.63E+06 | 6.75E+04 |
| | 2 | 1.11E+08 | 4.01E+06 | 8.73E+04 |
| | 3 | 1.02E+08 | 4.51E+06 | 9.08E+04 |
| | 4 | 1.06E+08 | 3.94E+06 | 9.41E+04 |
| | 5 | 1.01E+08 | 4.20E+06 | 8.98E+04 |
| | 6 | 9.32E+07 | 4.04E+06 | 9.07E+04 |
| 平均值 \bar{X} (cells/L) | | 1.01E+08 | 4.22E+06 | 8.67E+04 |
| 标准偏差 SD | | 0.029 | 0.029 | 0.053 |
| RSD (%) | | 0.37 | 0.44 | 1.07 |

表 1-5 浮游植物实际样品精密度测试数据

验证单位：杭州市环境监测中心站

测试日期：2019年1月28日

| 平行号 | | 试验样品类别 | | |
|-------------------------|---|----------|----------|----------|
| | | 高密度 | 中密度 | 低密度 |
| 测定结果 (cells/L) | 1 | 9.82E+07 | 4.17E+06 | 6.03E+04 |
| | 2 | 9.96E+07 | 4.07E+06 | 6.79E+04 |
| | 3 | 9.04E+07 | 4.25E+06 | 6.50E+04 |
| | 4 | 1.02E+08 | 4.39E+06 | 6.48E+04 |
| | 5 | 1.05E+08 | 4.25E+06 | 6.40E+04 |
| | 6 | 9.41E+07 | 3.92E+06 | 6.22E+04 |
| 平均值 \bar{X} (cells/L) | | 9.82E+07 | 4.17E+06 | 6.40E+04 |
| 标准偏差 SD | | 0.023 | 0.017 | 0.018 |
| RSD (%) | | 0.29 | 0.26 | 0.37 |

表 1-6 浮游植物实际样品精密度测试数据

验证单位：宁波市环境监测中心

测试日期：2019年2月19日

| 平行号 | | 试验样品类别 | | |
|-------------------|---|----------|----------|----------|
| | | 高密度 | 中密度 | 低密度 |
| 测定结果 (cells/L) | 1 | 1.02E+08 | 3.74E+06 | 5.23E+04 |
| | 2 | 1.10E+08 | 4.11E+06 | 5.15E+04 |
| | 3 | 1.07E+08 | 4.09E+06 | 5.38E+04 |
| | 4 | 1.00E+08 | 4.04E+06 | 4.92E+04 |

| | | | | |
|-------------------------|---|----------|----------|----------|
| | 5 | 9.51E+07 | 3.97E+06 | 4.31E+04 |
| | 6 | 1.00E+08 | 3.98E+06 | 5.70E+04 |
| 平均值 \bar{X} (cells/L) | | 1.02E+08 | 3.99E+06 | 5.12E+04 |
| 标准偏差 S_i | | 0.023 | 0.015 | 0.041 |
| RSD (%) | | 0.28 | 0.22 | 0.88 |

表 1-7 浮游植物实际样品精密度测试数据

验证单位：江苏省常州环境监测中心

测试日期：2019年2月28日

| 平行号 | | 试验样品类别 | | |
|-------------------------|---|----------|----------|----------|
| | | 高密度 | 中密度 | 低密度 |
| 测定结果 (cells/L) | 1 | 1.07E+08 | 4.35E+06 | 6.33E+04 |
| | 2 | 1.09E+08 | 3.82E+06 | 8.10E+04 |
| | 3 | 1.06E+08 | 4.22E+06 | 7.62E+04 |
| | 4 | 9.87E+07 | 4.11E+06 | 7.18E+04 |
| | 5 | 8.54E+07 | 4.34E+06 | 7.71E+04 |
| | 6 | 8.38E+07 | 4.10E+06 | 7.29E+04 |
| 平均值 \bar{X} (cells/L) | | 9.84E+07 | 4.16E+06 | 7.37E+04 |
| 标准偏差 S_i | | 0.051 | 0.021 | 0.037 |
| RSD (%) | | 0.64 | 0.32 | 0.76 |

表 1-8 浮游植物实际样品精密度测试数据

验证单位：自然资源部第二海洋研究所

测试日期：2019年3月8日

| 平行号 | | 试验样品类别 | | |
|-------------------------|---|----------|----------|----------|
| | | 高密度 | 中密度 | 低密度 |
| 测定结果 (cells/L) | 1 | 8.66E+07 | 3.95E+06 | 7.86E+04 |
| | 2 | 9.35E+07 | 4.32E+06 | 7.10E+04 |
| | 3 | 9.15E+07 | 4.73E+06 | 7.82E+04 |
| | 4 | 9.37E+07 | 4.56E+06 | 6.48E+04 |
| | 5 | 8.73E+07 | 4.34E+06 | 6.68E+04 |
| | 6 | 7.88E+07 | 4.14E+06 | 7.29E+04 |
| 平均值 \bar{X} (cells/L) | | 8.86E+07 | 4.34E+06 | 7.20E+04 |
| 标准偏差 S_i | | 0.029 | 0.028 | 0.035 |
| RSD (%) | | 0.36 | 0.42 | 0.71 |

表 1-9 浮游植物实际样品精密度测试数据

验证单位：上海市环境监测中心

测试日期：2019 年 4 月 10 日

| 平行号 | | 实验样品类别 | | |
|-------------------------|---|----------|----------|----------|
| | | 高密度 | 中密度 | 低密度 |
| 测定结果 (cells/L) | 1 | 9.54E+07 | 3.71E+06 | 7.43E+04 |
| | 2 | 9.90E+07 | 3.23E+06 | 7.07E+04 |
| | 3 | 1.05E+08 | 3.26E+06 | 7.44E+04 |
| | 4 | 9.74E+07 | 3.17E+06 | 7.77E+04 |
| | 5 | 9.80E+07 | 3.28E+06 | 6.51E+04 |
| | 6 | 1.01E+08 | 2.96E+06 | 5.46E+04 |
| 平均值 \bar{X} (cells/L) | | 9.93E+07 | 3.27E+06 | 6.95E+04 |
| 标准偏差 Si | | 0.01 | 0.03 | 0.06 |
| RSD (%) | | 0.18 | 0.49 | 1.16 |

1.3 方法准确度验证

1.3.1 方法准确度测试数据

表 1-10 浮游植物试样准确度测试数据

验证单位：浙江省海洋监测预报中心

测试日期：2019 年 1 月 22 日

| 平行号 | | 加标-样品 1# | 加标-样品 2# |
|-------------------|---|----------|----------|
| 测试数据 (cells/L) | 1 | 9.90E+06 | 3.03E+06 |
| | 2 | 1.04E+07 | 3.31E+06 |
| | 3 | 1.00E+07 | 2.87E+06 |
| | 4 | 1.02E+07 | 3.17E+06 |
| | 5 | 1.02E+07 | 2.91E+06 |
| | 6 | 9.12E+06 | 3.11E+06 |
| 平均值 (cells/L) | | 9.97E+06 | 3.07E+06 |
| 加标量 (cells/L) | | 1.47E+07 | 2.01E+06 |
| 回收率 (%recovery) | | 68.0 | 152.4 |

表 1-11 浮游植物试样准确度测试数据

验证单位：杭州市环境监测中心站

测试日期：2019 年 1 月 28 日

| 平行号 | | 加标-样品 1# | 加标-样品 2# |
|----------------|---|----------|----------|
| 测试数据 (cells/L) | 1 | 2.94E+06 | 3.24E+06 |
| | 2 | 8.70E+06 | 3.46E+06 |
| | 3 | 7.50E+06 | 3.15E+06 |
| | 4 | 1.07E+07 | 2.80E+06 |
| | 5 | 9.00E+06 | 2.75E+06 |

| 平行号 | 加标-样品 1# | 加标-样品 2# |
|-----------------|----------|----------|
| 6 | 1.06E+07 | 2.81E+06 |
| 平均值 (cells/L) | 8.25E+06 | 3.04E+06 |
| 加标量 (cells/L) | 1.47E+07 | 2.01E+06 |
| 回收率 (%recovery) | 56.3 | 150.9 |

表 1-12 浮游植物试样准确度测试数据

验证单位：宁波市环境监测中心

测试日期：2019 年 2 月 19 日

| 平行号 | 加标-样品 1# | 加标-样品 2# | |
|-----------------|----------|----------|----------|
| 测试数据 (cells/L) | 1 | 6.24E+06 | 3.18E+06 |
| | 2 | 6.54E+06 | 3.26E+06 |
| | 3 | 7.20E+06 | 3.34E+06 |
| | 4 | 6.12E+06 | 3.43E+06 |
| | 5 | 7.38E+06 | 2.63E+06 |
| | 6 | 6.84E+06 | 3.11E+06 |
| 平均值 (cells/L) | 6.72E+06 | 3.16E+06 | |
| 加标量 (cells/L) | 1.47E+07 | 2.01E+06 | |
| 回收率 (%recovery) | 45.8 | 157.0 | |

表 1-13 浮游植物试样准确度测试数据

验证单位：江苏省常州环境监测中心

测试日期：2019 年 2 月 28 日

| 平行号 | 加标-样品 1# | 加标-样品 2# | |
|-----------------|----------|----------|----------|
| 测试数据 (cells/L) | 1 | 7.98E+06 | 3.42E+06 |
| | 2 | 8.70E+06 | 3.57E+06 |
| | 3 | 7.74E+06 | 3.58E+06 |
| | 4 | 7.86E+06 | 3.71E+06 |
| | 5 | 8.52E+06 | 3.65E+06 |
| | 6 | 1.01E+07 | 3.77E+06 |
| 平均值 (cells/L) | 8.48E+06 | 3.62E+06 | |
| 加标量 (cells/L) | 1.47E+07 | 2.01E+06 | |
| 回收率 (%recovery) | 57.9 | 179.8 | |

表 1-14 浮游植物试样准确度测试数据

验证单位：自然资源部第二海洋研究所

测试日期：2019 年 3 月 8 日

| 平行号 | 加标-样品 1# | 加标-样品 2# | |
|----------------|----------|----------|----------|
| 测试数据 (cells/L) | 1 | 6.12E+06 | 2.06E+06 |
| | 2 | 7.20E+06 | 2.29E+06 |
| | 3 | 6.96E+06 | 2.14E+06 |
| | 4 | 6.42E+06 | 2.09E+06 |
| | 5 | 7.71E+06 | 2.28E+06 |

| | | | |
|-----------------|---|----------|----------|
| | 6 | 4.95E+06 | 2.28E+06 |
| 平均值 (cells/L) | | 6.56E+06 | 2.19E+06 |
| 加标量 (cells/L) | | 1.47E+07 | 2.01E+06 |
| 回收率 (%recovery) | | 44.8 | 108.8 |

表 1-15 浮游植物试样准确度测试数据

验证单位: 上海市环境监测中心

测试日期: 2019 年 4 月 10 日

| 平行号 | 加标-样品 1# | 加标-样品 2# | |
|-----------------|----------|----------|----------|
| 测试数据 (cells/L) | 1 | 1.25E+07 | 2.99E+06 |
| | 2 | 1.04E+07 | 3.05E+06 |
| | 3 | 1.27E+07 | 3.06E+06 |
| | 4 | 1.18E+07 | 3.03E+06 |
| | 5 | 9.72E+06 | 3.17E+06 |
| | 6 | 9.48E+06 | 3.28E+06 |
| 平均值 (cells/L) | 1.11E+07 | 3.10E+06 | |
| 加标量 (cells/L) | 1.47E+07 | 2.01E+06 | |
| 回收率 (%recovery) | 75.7 | 153.9 | |

2 方法验证数据汇总

2.1 方法精密度数据汇总

表 2-1 浮游植物实际样品精密度测试数据汇总表

| 实验室号 | 高密度样品 | | | | | 中密度样品 | | | | | 低密度样品 | | | | |
|---------------------|---------------------|------|--------|----------|----------|---------------------|------|--------|----------|----------|---------------------|------|--------|----------|----------|
| | \bar{X} (cells/L) | Si | RSD(%) | 95%置信区间 | | \bar{X} (cells/L) | Si | RSD(%) | 95%置信区间 | | \bar{X} (cells/L) | Si | RSD(%) | 95%置信区间 | |
| | | | | 下限 | 上限 | | | | 下限 | 上限 | | | | 下限 | 上限 |
| 1# | 1.01E+08 | 0.03 | 0.37 | 9.37E+07 | 1.08E+08 | 4.22E+06 | 0.03 | 0.44 | 3.92E+06 | 4.52E+06 | 8.67E+04 | 0.05 | 1.07 | 7.66E+04 | 9.68E+04 |
| 2# | 9.82E+07 | 0.02 | 0.29 | 9.27E+07 | 1.04E+08 | 4.17E+06 | 0.02 | 0.26 | 4.00E+06 | 4.35E+06 | 6.40E+04 | 0.02 | 0.37 | 6.13E+04 | 6.68E+04 |
| 3# | 1.02E+08 | 0.02 | 0.28 | 9.68E+07 | 1.08E+08 | 3.99E+06 | 0.01 | 0.22 | 3.85E+06 | 4.13E+06 | 5.12E+04 | 0.04 | 0.88 | 4.62E+04 | 5.61E+04 |
| 4# | 9.84E+07 | 0.05 | 0.64 | 8.66E+07 | 1.10E+08 | 4.16E+06 | 0.02 | 0.32 | 3.95E+06 | 4.36E+06 | 7.37E+04 | 0.04 | 0.76 | 6.74E+04 | 8.01E+04 |
| 5# | 8.86E+07 | 0.03 | 0.36 | 8.26E+07 | 9.45E+07 | 4.34E+06 | 0.03 | 0.42 | 4.05E+06 | 4.63E+06 | 7.20E+04 | 0.03 | 0.71 | 6.61E+04 | 7.80E+04 |
| 6# | 9.93E+07 | 0.01 | 0.18 | 9.58E+07 | 1.03E+08 | 3.27E+06 | 0.03 | 0.49 | 3.01E+06 | 3.53E+06 | 6.95E+04 | 0.06 | 1.16 | 6.06E+04 | 7.83E+04 |
| \bar{X} (cells/L) | 9.79E+07 | | | | | 4.02E+06 | | | | | 6.95E+04 | | | | |
| Si | 0.02 | | | | | 0.05 | | | | | 0.08 | | | | |
| RSD(%) | 0.28 | | | | | 0.68 | | | | | 1.57 | | | | |
| 95%置信上限 | 1.03E+08 | | | | | 4.43E+06 | | | | | 8.18E+04 | | | | |
| 95%置信下限 | 9.29E+07 | | | | | 3.62E+06 | | | | | 5.72E+04 | | | | |

结论：精密度：6家实验室分别对含高密度（ 1.00×10^8 cells/L）、中密度（ 4.02×10^6 cells/L）和低密度（ 6.95×10^4 cells/L）的浮游植物实际样品进行了6次重复测定：实验室内的标准偏差范围分别为0.01~0.05，0.01~0.03，0.02~0.06；实验室内的相对标准偏差范围分别为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%；实验室内置信区间分别为8.26E+07~1.10E+08 cells/L；3.01E+06~4.63E+06 cells/L；4.62E+04~9.68E+04 cells/L；实验室间置信区间分别为9.29E+07~1.03E+08 cells/L；3.62E+06~4.43E+06 cells/L；5.72E+04~8.18E+04 cells/L。标准偏差及相对标准偏差计算所用全部数据均经以10为底的对数转换。

2.2 方法准确度数据汇总

表 2-2 浮游植物试验样空白加标测试数据汇总

| 实验室号 | 回收率 (%recovery) | |
|------|-----------------|----------|
| | 加标-样品 1# | 加标-样品 2# |
| 1# | 68.0 | 152.4 |
| 2# | 56.3 | 150.9 |
| 3# | 45.8 | 157.0 |
| 4# | 57.9 | 179.8 |
| 5# | 44.8 | 108.8 |
| 6# | 75.7 | 153.9 |
| 均值 | 58.1 | 150.5 |
| 标准偏差 | 12.2 | 23.1 |

结论：准确度：6 家实验室分别对加标量为 $1.47\text{E}+07\text{cells/L}$ 和 $2.01\text{E}+06\text{cells/L}$ 的加标-样品 1#和加标-样品 2#进行了 6 次空白加标回收测定，加标-样品 1#和加标-样品 2#的回收率范围分别为 $44.8\%\sim 75.7\%$ 和 $108.8\%\sim 179.8\%$ ；回收率分别为 $58.1\% \pm 12.2\%$ 和 $150.5\% \pm 23.1\%$ 。

3 方法验证结论

标准编制组在进行方法验证报告统计时，所有数据全部采用，未进行取舍。方法精密度和准确度统计结果能满足方法特性性能指标要求。

3.1 精密度

6 家实验室分别对含高密度水平 ($1.0 \times 10^8\text{cells/L}$)、中密度水平 ($4.02 \times 10^6\text{cells/L}$) 和低密度水平 ($6.95 \times 10^4\text{cells/L}$) 的浮游植物实际样品进行了 6 次重复测定：实验室内的标准偏差范围分别为 $0.01\sim 0.05$, $0.01\sim 0.03$, $0.02\sim 0.06$ ；实验室内的相对标准偏差范围分别为 $0.18\%\sim 0.64\%$, $0.22\%\sim 0.49\%$, $0.37\%\sim 1.16\%$ ；实验室间相对标准偏差分别为： 0.28% , 0.68% , 1.57% ；6 家实验室内置信区间分别为 $8.26\text{E}+07\sim 1.10\text{E}+08\text{ cells/L}$ ； $3.01\text{E}+06\sim 4.63\text{E}+06\text{ cells/L}$ ； $4.62\text{E}+04\sim 9.68\text{E}+04\text{ cells/L}$ ；实验室间置信区间分别为 $9.29\text{E}+07\sim 1.03\text{E}+08\text{ cells/L}$ ； $3.62\text{E}+06\sim 4.43\text{E}+06\text{ cells/L}$ ； $5.72\text{E}+04\sim 8.18\text{E}+04\text{ cells/L}$ 。计算标准偏差和相对标准偏差的所用数据均经以 10 为底对数转换。

3.2 准确度

6 家实验室分别对加标量为 $1.47\text{E}+07\text{cells/L}$ 和 $2.01\text{E}+06\text{cells/L}$ 的加标-样品 1#和加标-样品 2#进行了 6 次空白加标回收测定，加标-样品 1#和加标-样品 2#的回收率范围分别为 $44.8\%\sim 75.7\%$ 和 $108.8\%\sim 179.8\%$ ；回收率分别为 $58.1\% \pm 12.2\%$ 和 $150.5\% \pm 23.1\%$ 。