前　言

本标准是《海洋监测规范》的第7部分，是在HY 003.9—91行业标准的基础上修订而成的。本标准规定了海洋监测中近海污染生态调查和生物监测的方法和技术要求。

GB 17378.1—1998　海洋监测规范　第1部分：总则

GB 17378.2—1998　海洋监测规范　第2部分：数据处理与分析质量控制

GB 17378.3—1998　海洋监测规范　第3部分：样品采集、贮存与运输

GB 17378.4—1998　海洋监测规范　第4部分：海水分析

GB 17378.5—1998　海洋监测规范　第5部分：沉积物分析

GB 17378.6—1998　海洋监测规范　第6部分：生物体分析

GB 17378.7—1998　海洋监测规范　第7部分：近海污染生态调查和生物监测

本标准的附录A、附录B是提示的附录。

本标准由国家海洋局提出。

本标准由国家海洋标准计量中心归口。

本标准由国家海洋局第三海洋研究所负责起草。

本标准主要起草人：张水浸、洪君超、张春明、许昆灿、陈维岳、金涛。

中华人民共和国国家标准

海洋监测规范
第7部分：近海污染生态调查和生物监测

GB 17378.7—1998

The specification for marine monitoring
Part7: Ecological survey of offshore pollution and biological monitoring

1 范围

本标准规定了近海污染生态调查和生物监测的样品采集、实验、分析、资料整理等方法的技术要求。

本标准适用于近海环境污染的生物学调查、监测和评价。

2 引用标准

下列标准所包含的条文，通过在本标准中引用而构成为本标准的条文。本标准出版时，所示版本均为有效。所有标准都会被修订，使用本标准的各方应探讨使用下列标准最新版本的可能性。

GB 17378.1—1998 海洋监测规范 第1部分：总则
GB 17378.2—1998 海洋监测规范 第2部分：数据处理与分析质量控制
GB 17378.3—1998 海洋监测规范 第3部分：样品采集、贮存与运输
GB 17378.4—1998 海洋监测规范 第4部分：海水分析
GB 17378.5—1998 海洋监测规范 第5部分：沉积物分析
GB 17378.6—1998 海洋监测规范 第6部分：生物体分析
GB 12763—91 海洋调查规范

3 定义

本标准采用下列定义

3.1 生物监测 biological monitoring

利用生物的个体、种群、群落等不同层次或机体的各不同水平（器官、细胞、亚细胞等）对环境质量变化所产生的反应来评价、判断环境健康状况的方法。

3.2 监测生物 monitoring organism

定期以某种或某几种生物为对象，分析测定其体内污染物质的含量，以反映环境污染的时空变化。这些生物对象称为监测生物。目前用作监测生物的有牡蛎、贻贝、蛤仔等。

3.3 指标生物 index organism

指能反映某种特殊生态环境的生物种类。如：对某种污染物质有很强的忍受能力的种类或对某种污染物敏感的种类。

3.4 毒性试验 toxicity test

将生物体置于试验条件下，施加污染物的影响，然后观察、测定生物异常或死亡效应的试验。包括急性、亚急性、慢性毒性试验。

国家质量技术监督局1998-06-22批准　　1999-01-01实施

3.5 剂量 dosage

通常指进入生物体的毒物的量。但在进行水生生物毒性试验时，也可用于表示试验海水溶液污染物的浓度。

3.6 效应 effectiveness

毒物作用于生物体，引起机体各种功能异常或死亡反应的现象。

3.7 试液 test solution

用作毒性试验的毒物溶液或排污口水样的不同浓度的稀释液。

3.8 稀释度 dilution

试液被稀释的程度(倍数)。

3.9 受试生物 test organism

用作毒性试验的生物。受试生物通常要求是对该试验毒物比较敏感的种类。

3.10 受试时间 testing time

或称致毒时间。系指受试生物直接接触试液的起止时间范围。

3.11 半数致死浓度 half lethal concentration

在一定观察期内，造成50%的受试生物死亡的毒物浓度。以LC_{50}表示。例如：48h-LC_{50}，系指经48h致毒试验，50%的受试生物致死的浓度。

3.12 半数效应浓度 half effect concentration

在一定观察期内，导致50%的受试生物出现某种异常反应(如：回避、摄食率和呼吸率改变、平衡丧失等等)的毒物浓度。以EC_{50}表示。例如：96h-EC_{50}，表示经96h致毒试验，50%的受试生物出现异常反应的浓度。

4 一般规定

4.1 项目和方法

4.1.1 浮游生物生态调查

4.1.2 大型底栖生物生态调查

4.1.3 潮间带生物生态调查

4.1.4 叶绿素a的测定

——荧光光度法

——分光光度法

4.1.5 粪大肠菌群检测

——发酵法

——滤膜法

4.1.6 细菌总数测定

——平板计数法

——荧光显微镜直接计数法

4.1.7 生物毒性试验

4.1.8 鱼类回避反应实验

4.1.9 滤食率测定

4.1.10 赤潮毒素——麻痹性贝毒的检测

附录A(提示的附录)：污染生态调查资料常用评述方法。

附录B(提示的附录)：几种受试动物亲体产卵和幼虫阶段的培养条件表。

4.2 说明

4.2.1 在调查、监测中，应依据目的、任务、性质，认真考虑生物调查、监测内容。一般而言，在基线(背

景)调查和环境质量综合评价中,4.1.1～4.1.6条是必测的;在危害调查和排污口、倾废区、海上石油开发区等的监视、监测中,可选测4.1.7～4.1.9条;而赤潮毒素——麻痹性贝毒的检测,通常只在赤潮发生区和赤潮多发季节定期监测,或发现可疑的麻痹性贝毒(PSP)中毒事件时应用。

4.2.2 污染生态调查资料常用评述方法(附录A),运用时应慎重,尽可能比较几种方法所得的结果,并与传统的生态描述方法结合,进行综合分析。

4.2.3 几种受试动物的亲体产卵和幼虫阶段培养条件(见附录B)因生物地区性很强,各地用其进行毒性试验时,尚应进行必要的试养。

4.2.4 在生物监测中,对生物体(监测生物)内污染物质累积量的测定,也是主要内容之一。其分析测定方法见GB 17378.6。

5 浮游生物生态调查

5.1 调查内容和方法

5.1.1 调查内容

5.1.1.1 生物调查

——浮游植物的种类组成和数量分布;

——浮游动物的生物量、种类组成和数量分布。

5.1.1.2 环境调查

根据污染调查的目的、类型及污染源的性质,酌情考虑调查和监测项目。赤潮的环境调查和监测,特别应考虑营养盐(N、P、Si)、溶解氧、化学耗氧量、pH、水色、微量重金属铁和锰、叶绿素a等的测定。

5.1.2 调查类型

5.1.2.1 现状调查(或称基础调查)

掌握调查海域浮游生物的种类组成、数量分布、季节变化等生态学现状,该海域的污染生态监测、评价,提供背景资料。

此类调查的站位布设应与环境监测设站相一致。若站位较密,工作量太大,浮游生物可考虑间站取样。调查时间最好每月一次,于大潮期间进行。

5.1.2.2 监测性调查

掌握污染海域,尤其是赤潮频发区的浮游生物(特别是赤潮生物种)的动态及其与环境的关系。通过长期资料积累,为环境和赤潮的预测、预报做好必要的准备工作。

此类调查,站位布设不宜过多,可在现状调查的基础上,选择若干"热点"设站定期取样分析。一旦发现异常,应密切注意其动向,适当增加调查次数,并按现状调查的站位,进行一次较全面的调查。一般每月大潮期间进行一次,在赤潮常发期(4～10月),5d左右调查监测一次,并设置对照测站。

5.1.2.3 应急跟踪调查

是在突发性污染事故(如溢油)或发生赤潮时,所采取的应急性行动。调查、监测必须尽快赶赴现场取样,并持续到直观迹象消失。每天或隔天采样一次。站位布设应根据污染或赤潮发生范围,按梯度变化酌情而定。同时应在事故范围之外,选取1～2个站作对照。

5.1.3 调查方法

5.1.3.1 采水

浮游植物调查,一般只需采水样。测站水深在15 m以内的浅海,采表、底两层;水深大于15 m的采表、中、底三层。若需要详细了解其垂直分布,可按0、3、5、10、15 m和底层等层次采样。当有必要进行昼夜连续观测时,可每间隔2 h(或3 h)按上述层次采样一次。

5.1.3.2 拖网

通常用于浮游动物采样。浮游植物拖网采样,可考虑在需要详细分析种类组成时采用。一般只需用按规定的网具自海底至水面作垂直拖网采样。若需了解其垂直分布,可按5～0 m、10～5 m、底～10 m

等层次作垂直分层拖网。若需进行昼夜连续观测，应与浮游植物采水样的时间间隔一致。

5.2 海上调查

5.2.1 采样工具和设备

5.2.1.1 采水器，用于采集浮游植物样品。

——颠倒采水器；

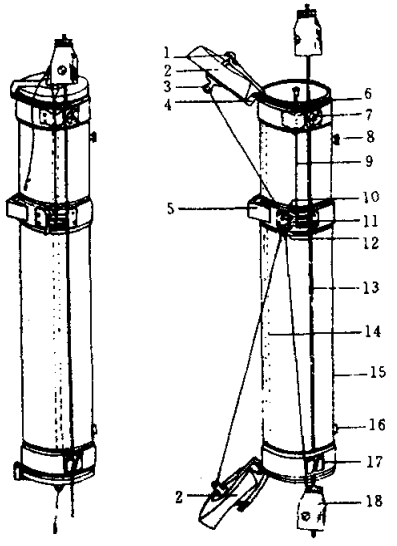
——卡盖式采水器：结构见图1。

5.2.1.2 网具

——浅水Ⅰ型浮游生物网：用于采集大型浮游动物及鱼卵、仔稚鱼等。规格见表1和图2；

——浅水Ⅱ型浮游生物网：用于采集中、小型浮游动物。规格见表2和图3；

——浅水Ⅲ型浮游生物网：用于采集浮游植物样品，供分析种类组成时采用。规格见表3和图4。



1—内侧拉钩；2—卡盖；3—金属环；4—金属活页；5—把手；6—弹簧；7—固定夹螺丝；
8—气门；9—触杆；10—上挂钩；11—弹簧片；12—下挂钩；13—钢丝绳；
14—橡皮拉筋；15—采水筒；16—出水嘴；17—钢丝绳槽；18—使锤

图1 卡盖式采水器

表1 浅水Ⅰ型浮游生物网规格

部位		尺寸和材料
网口部		内径 50 cm，网口面积 0.20 m^2， 网圈用直径 10 mm 的圆钢条
过滤部	1	长 5 cm，细帆布
	2	长 135 cm，CQ14 或 JP_{12}筛绢
网底部	3	直径 9 cm，长 5 cm，细帆布
全长		145 cm

表 2 浅水Ⅱ型浮游生物网规格

部位		尺寸和材料
网口部		内径 31.6 cm，网口面积 0.08 m^2，网圈用直径 10 mm 的圆钢条
头锥部	1	长 35 cm，细帆布，中圈直径 50 cm，网圈用直径 10 mm 的圆钢条
过滤部	2	长 100 cm，CB36 或 JP_{36}筛绢
网底部	3	直径 9 cm，长 5 cm，细帆布
全长		140 cm

表 3 浅水Ⅲ型浮游生物网规格

部位		尺寸和材料
网口部		内径 37 cm，网口面积 0.1 m^2，网圈用直径 10 mm 的圆钢条
过滤部	1	长 5 cm，细帆布
	2	长 130 cm，JF_{62}或 JP_{80}筛绢
网底部	3	直径 9 cm，长 5 cm，细帆布
全长		140 cm

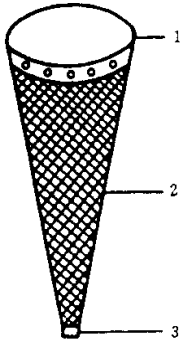


图 2 浅水Ⅰ型浮游生物网

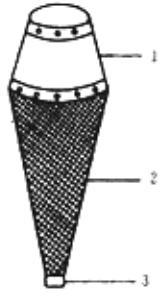


图 3 浅水Ⅱ型浮游生物网

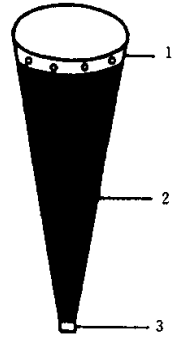


图 4 浅水Ⅲ型浮游生物网

5.2.1.3 网底管

浮游生物网末端收集标本的装置，结构如图 5。其外径为 9 cm，所用筛绢套与浮游生物网网衣的筛绢规格一致。

5.2.1.4 闭锁器

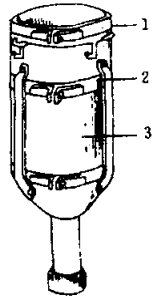
分层采集时控制浮游生物网网口关闭的装置。常用的 QQC2-2 型闭锁器的结构及使用情况如图 6 和图 7。

5.2.1.5 流量计

测量浮游生物网滤水量的装置，结构如图 8。使用时安装于网口半径的中点，通过水流驱动其叶轮转动，记录器记录转数，经必要的换算，可求出流经网具的实际水量。

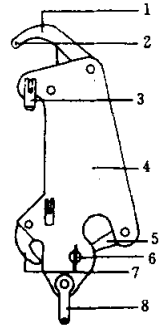
未经厂方标定的流量计，使用前应于平静海区经现场标定后方可使用。标定方法是将流量计按实际使用时的位置，安装在不带网衣的网圈上；并按实际采样时的拖网速度从一定深度(10 m 或 30 m)垂直拖至表层，记录其转数。如此反复 5～10 次，取得平均值，再计算每转的流量，则为流量计标定值。此值

至少需保留三位有效数字。



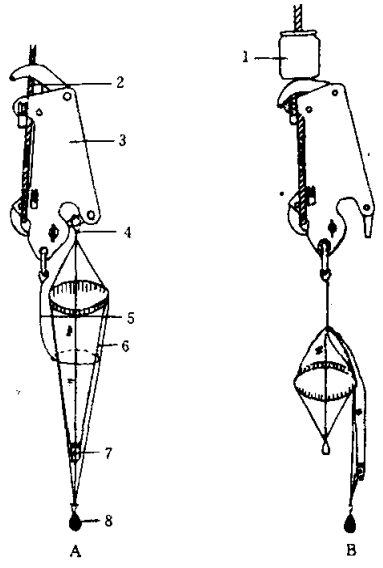
1—连接网底部的压圈；
2—固定筛绢套的压圈；3—筛绢套

图 5　网底管



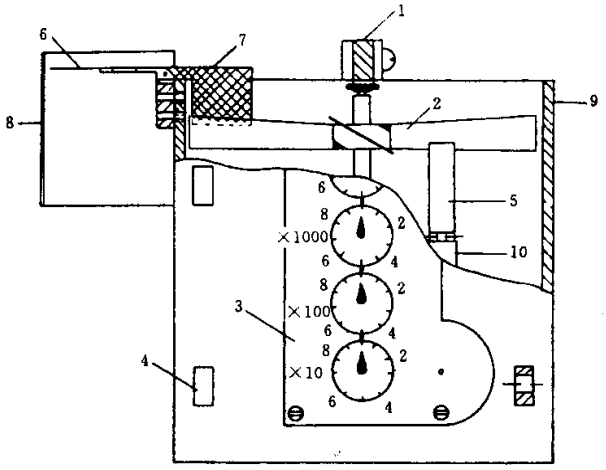
1—击柄；2—保险孔；3—插销；
4—壳体；5—闭销钩；6—保险钩；
7—钢丝绳挂钩；8—卸扣

图 6　QQC2-2 型闭锁器结构示意图



A采样状态；B闭锁状态；1—使锤；2—钢丝绳；3—闭锁器；
4—网口曳绳；5—拦腰绳；6—浅水Ⅰ型浮游生物网；
7—网底管；8—沉锤

图 7　QQC2-2 型网具闭锁器的使用



1—轴梁；2—叶轮；3—计数器；4—吊环；5—止逆档片；6—流向片；
7—开启片；8—导流圈；9—壳体；10—蜗轮支承架

图 8 WQS_{1-1}型流量计结构示意

5.2.1.6 船上设备

——绞车、吊杆及钢丝绳：绞车应配有变速(0.3～1.5 m/s)排缆装置和计数器的电动绞车。若缺乏该设备，可用建筑用的升降机或手摇绞车代替。钢丝绳直径一般为 4.8 mm 左右。吊杆安装需高出船舷 3 m，跨舷距约 1 m。

——冲水设备：水泵、水管、水桶和吸水球(大的洗耳球)。

——照明设备：用于夜间作业照明。

5.2.1.7 其他用具及配备见表 4。

5.2.2 样品采集

5.2.2.1 出海前的准备

5.2.2.1.1 按调查项目、站数、层次，根据表 4 所列，准备足够的采样工具及已编号的各种标本瓶、固定剂、记录表等，装箱上船并放于适当位置，避免撞击和丢失；

5.2.2.1.2 认真检查船上设备是否运转正常，若遇故障，应及时排除或更换；

5.2.2.1.3 配制固定剂

浮游植物用碘液固定。其配制方法是将碘片(I_2)溶于 5%的碘化钾(KI)溶液中，使成饱和溶液。需要量按每升水样加该碘液 6～8 mL 准备。

浮游动物用 5%甲醛固定。不必事先配制，只须按标本瓶容量的 5%左右加入甲醛溶液即可。

5.2.2.2 到站前的准备

5.2.2.2.1 采集人员须提前到达工作岗位，再次检查网具及其附件、记录表及其他有关配备是否完善，发现问题及时处理；

5.2.2.2.2 船只到站时，先核对站位，待船停稳后，测其实际水深，确定采样层次及钢丝绳应放出的长度。

5.2.2.3 采样

5.2.2.3.1 浮游植物水样采集

1) 用颠倒采水器或卡盖式采水器，其使用方法及操作步骤与水质项目的采水类同。

2) 采样层次视调查需要、计划规定和海区各站实际水深而定。

3) 该水样务必与叶绿素 a 和水质项目的采水同步进行。

4) 所需水样量一般为 500 mL。

5) 采样后，应及时按每升水样加 6～8 mL 碘液固定。

5.2.2.3.2 垂直拖网：分别用浅水Ⅰ、Ⅱ型浮游生物网自底至表垂直拖曳采集浮游动物。若需网采浮游植物，则用浅水Ⅲ型网。其操作步骤均同：

1) 下网：每次下网前应检查网具有否破损，发现破损应及时修补或更换网衣；检查网底管和流量计是否处于正常状态，并把流量计指针拨至指零；放网入水，当网口贴近水面时，需调整计数器指针于零的位置；网口入水后，下网速度一般不能超过 1 m/s，以钢丝绳保持紧直为准；当网具接近海底时，绞车应减速，当沉锤着底，钢丝绳出现松弛时，应立即停车，记下绳长。

2) 起网：网具到达海底后可立即起网，速度保持在 0.5 m/s 左右；网口未露出水面前不可停车；网口离开水面时应减速并及时停车，谨防网具碰刮船底或卡环碰撞滑轮，使钢丝绳绞断，网具失落。

3) 样品的收集：把网升至适当高度，用冲水设备自上而下反复冲洗网衣外表面（切勿使冲洗的海水进入网口），使粘附于网上的标本集中于网底管内；将网收入甲板，开启网底管活门，把标本装入标本瓶，再关闭网底管活门，用洗耳球吸水冲洗筛绢套，如此反复多次，直至残留标本全部收入标本瓶中。

4) 样品固定：按样品体积的 5%量，加入甲醛溶液。

5.2.2.3.3 分层拖网：若需分层采集，必须在网具上装置闭锁器，按规定层次逐一采样。其操作步骤：

1) 下网：下网前必须使网具、闭锁器、钢丝绳、拦腰绳等处于正常采样状态（图 7A），下网时按垂直拖网方法。

2) 起网：网具降至预定采样水层下界时应立即起网，速度如垂直拖网；当网将达采样水层上界时，应减慢速度（避免停车，以防样品的外溢），提前打下使锤（提前量每 10 m 水深约 1 m）；当钢丝绳出现瞬间松弛或振动时，说明网已关闭（记录此时的绳长），可适当加快起网速度直至网具露出水面；之后，将闭锁状态（图 7B）的网具恢复成采样状态，并按垂直拖网法冲网和收集、固定标本。

3) 海上记录：各项样品采集完毕，应及时详细填写表 5 和表 6。所有海上记录应妥善保存，谨防受潮或遗失。

5.2.2.3.4 注意事项

——遇倾角超过 45°，应加重沉锤重新采样；

——遇网口刮船底或海底，应重新采样。

5.2.2.3.5 调查结束后的工作

1) 所有样品应装入牢固的标本箱内搬运。

2) 用过的网具、闭锁器和流量计等需用淡水冲洗，晾干后收藏。

3) 绞车、钢丝绳、计数器等需经擦拭，上油保养。

5.3 样品整理与分析

5.3.1 样品的整理

5.3.1.1 核对

根据海上记录表，认真核对采得的全部样品，若发现不符，需及时查找原因，不得任意更改原记录。

5.3.1.2 编号

依海上采集记录，按序对各类样品进行总编号，并填于浮游生物标本登记表中（表 7）。总编号力求简明，由能表示样品的采集海区、采集方式、采集网具、采集年份及标本序号的字母或代号表示，其规定如下：

5.3.1.2.1 采集海区：用调查海区汉语拼音第一个字母表示，渤海、黄海、东海、南海分别以 B、H、D、N 表示。

5.3.1.2.2 调查方式及网具：

Ⅰ——浅水Ⅰ型浮游生物网垂直拖网样品；

Ⅱ——浅水Ⅰ型浮游生物网垂直拖网样品；

Ⅲ——浅水Ⅱ型浮游生物网垂直拖网样品；

L——昼夜连续观测样品；

ch——垂直分层采集样品；

S——浮游植物采水样品。

5.3.1.2.3 年份用阿拉伯数字表示。

5.3.1.3 标签

——外标签：按总编号顺序编写，贴于各号标本瓶外，并涂腊或树脂保护。

——内标签：按以下标签式样填写，投入各标本瓶中。

总编号_____

_____年____月____日

站号_____

海上编号_____

（规格 cm：4×2.5）

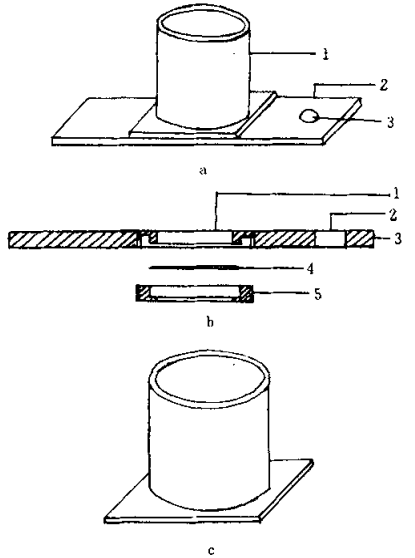
5.3.2 浮游植物样品的处理与分析

浮游植物水样的种类鉴定与计数，一般需按采样层次逐一分析。若时间不允许，在不影响计划要求前提下，可采用混合样计数，即：各层取等量(50 或 100 mL)混合，再按下述方法处理和分析。

5.3.2.1 沉降计数法

5.3.2.1.1 主要仪器和设备：倒置显微镜、沉降器、盖玻片、计数器等。

沉降器基本结构如图 9 之 a、b，包括底板、沉降管、排水孔及盖玻片等。规格有 5、10、20、50、100mL 等不同容量。若无上述沉降器，可自己制作简易沉降器，只需取内径为 25mm(外径约 32mm)、高度为 20.4mm 的有机玻璃管粘于 43mm×40mm 的载玻片上即可(其容积为 10mL)，见图 9 之 c. 同理可制作其他规格的简易沉降器。但使用前需对其容积和底面积进行准确标定，并一一编号待用。



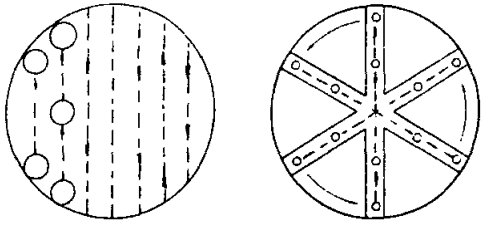
a—整体外形；1—沉降管；2—底板；3—排水孔；b—底板结构示意图；1—沉降槽；2—排水孔；3—底板；4—玻片；5—底套；c—简易沉降器；

图 9 沉降器

5.3.2.1.2 计数：每个水样应取三个分样计数，取平均值。计数操作过程：

1）取三个等容量的沉降器，分别注满经摇匀的水样，盖上盖玻片使不留气泡，静置 24h 以上。分样体积大小需视水样浑浊度和浮游植物的丰度而定；可一次性准备几个待计数的样品。

2）轻移上述沉降器于倒置显微镜下鉴定、计数。浮游植物数量较少时，应按图 10 之 a 中箭头方向计全数；若数量较大或计数微型藻类时，可于高倍镜下按图 10 之 b 中箭头方向计算一定面积上的细胞数，再依所计面积，换算为整个底面积上的总细胞数。鉴定、计数结果填于表 8。



a　　b

a—低倍镜下计数；b—高倍镜下计数

图 10　倒置显微镜下浮游植物计数法

5.3.2.2 直接计数法

本法适于赤潮发生期间或浮游植物细胞数量达每升 10^5 个以上时的计数。

5.3.2.2.1 主要仪器和设备：显微镜、计数框、取样管、盖玻片等。

计数框：取 0.25mm 厚的盖玻片，切割成细条状（宽约 2.5mm），按图 9～11 式样粘贴于普通载玻片上，务使框内边长分别为 50.0mm 和 20.0mm，亦即：框内面积为 1000mm²，容积为 0.25mL。为计数方便，框内载玻片上应刻划出 1mm 或 0.5mm 等距离垂线。

——取样管：可直接取用 0.25mL 的微型注射针筒，或取 2mL 分析用的移液管，截去上端，磨平，并装上小橡皮球即成。

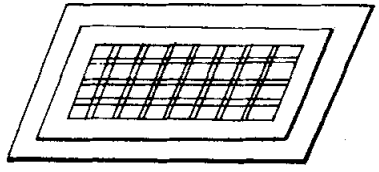


图 11　浮游植物计数框

5.3.2.2.2 计数：每份水样计数三个分样，取平均值。计数操作步骤：

1）将待计数水样摇匀，准确吸取 0.25mL 置于计数框内，盖上盖玻片使不留气泡。

2）移计数框于显微镜下鉴定计数。通常应按序计全数，若数量大，可考虑间行计数（若水样为未加固定剂的新鲜海水，计数前应向框内喷射少许醋酸蒸汽，以免某些生物活动而影响计数）。

3）将计数结果填于表 8 中。

5.3.2.3 浓缩计数法

5.3.2.3.1 仪器设备：与直接计数法类同。

5.3.2.3.2 计数操作步骤：

1）将静置 24h 以上的水样，用包扎有 JF_{62} 或 JP_{80} 号筛绢的吸管，轻轻吸去上清液，使水样浓缩至 10mL。浓缩时切勿搅动沉淀样品，否则需重新静置 24h 后再浓缩。通常一次不可能浓缩成 10mL，需把浓缩到一定体积的水样移至 50mL 左右的指形管中，经 24h 以上静置后再浓缩。

2）将浓缩后的样品全部移入已经标记 10mL 容积的指形管中，静置 24h 后，用吸管轻吸多余的清液，使液面凹处恰在标记上。

3）计数取样时，水样务必充分摇匀，用取样管迅速吸取 0.25mL 于计数框内，加盖盖玻片使不留气泡。之后的计数方法与直接计数法类同。计数结果填入表 8 中。

4）网采样品，可适当浓缩（或稀释），按本法计数。

5.3.2.4 计数注意事项

——计数时一般以种为单位分别计数。优势种、常见种、赤潮生物种应力求鉴定到种。

——凡失去色素或不足一半的残体，不在计数之列。

——胶质团大群体和浮游兰藻类等不易计数的种类，可用数量等级符号（＋＋＋、＋＋、＋）表示。

——对进入浮游生物中的底栖种类，均按细胞计数，并将它们作为单项列入浮游植物总量中。

——填表时，应特别注意不同计数方法的水样量、沉降量、浓缩量（或稀释量）、计数面积或计数量，并进行必要的换算。

5.3.3 浮游动物样品的处理与分析

浮游动物样品静置沉淀后进行必要浓缩，按序分别移入已备好内外标签的标本瓶中，待测定其生物量及计数。

5.3.3.1 湿重生物量测定

5.3.3.1.1 仪器及设备：扭力天平（感量 0.01g）、真空泵（10L）、布氏漏斗、抽滤瓶、筛绢（JF_{62} 或 JP_{80}），吸水纸、吸管、镊子等。

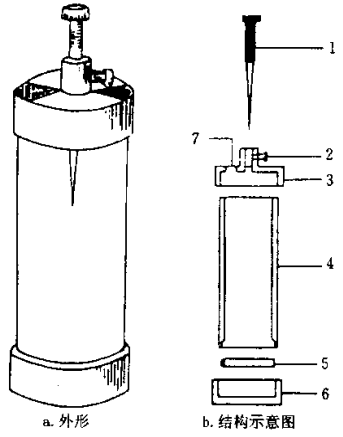
5.3.3.1.2 操作步骤：

1）筛绢标定：将上述筛绢剪成与漏斗内径等大，浸湿后铺于漏斗中，用真空泵抽去筛绢上多余水分，称取筛绢湿重并记录于表 9。该标定后的筛绢可反复使用。

2）样品测定：把标定过的筛绢铺于漏斗中，开动真空泵，倒入已剔除杂质的欲测样品；待水分滤干后关闭真空泵；小心取出带样品的筛绢放在吸水纸上，吸去多余水分；将样品（连同筛绢）置于扭力天平称重，并将结果填于表 10 的相应栏目中。

5.3.3.2 体积生物量测定

5.3.3.2.1 仪器及设备：浮游生物体积测量器（图 12）、50mL 的滴定管、真空泵（10L）、抽滤瓶、吸管、镊子等。



a. 外形　　b. 结构示意图

1—指针；2—固定螺丝；3—上盖；4—管筒；5—筛绢套；6—底盖；7—加水孔

图 12 浮游生物体积测量器

5.3.3.2.2 操作过程：

1）测量器体积标定：将一定体积的水（如 50.0mL）注入测量器中，排除底盖与筛绢之间的气泡；旋转测量器顶端指针使针尖恰好接触液面，用固定螺丝固定好指针位置；打开底盖，倒出注入的水，标定即

告完毕。

2）样品测定：将经除去杂质的样品倒入打开底盖的体积测量器中，用真空泵抽滤去样品中的水分；然后扭紧底盖，用滴定管（装好 50.0mL5%甲醛海水固定液）从测量器加水孔注入该固定液，排除底盖与筛绢之间的气泡（用小吸管吸取）使液面恰好与指针针尖接触为止；此时滴定管中剩余的固定液量即为被测样品的体积。测定结果填入表 9 中。

5.3.3.3 个体计数

浅水Ⅰ、Ⅱ型浮游生物网采集的样品分别用于大型和中、小型浮游动物（包括夜光藻）的种类鉴定和计数。

5.3.3.3.1 仪器及设备：体视显微镜、普通显微镜、计数框、取样管、计数器、镊子、解剖针等。

——计数框：取直径为 8cm 左右的培养皿，于其内粘上若干玻璃条即可（如图 13）。玻璃条间距根据体视显微镜视野而定。

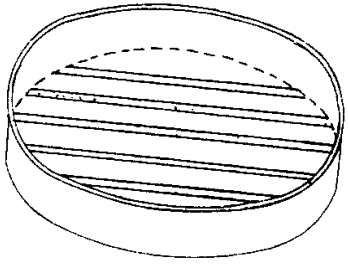
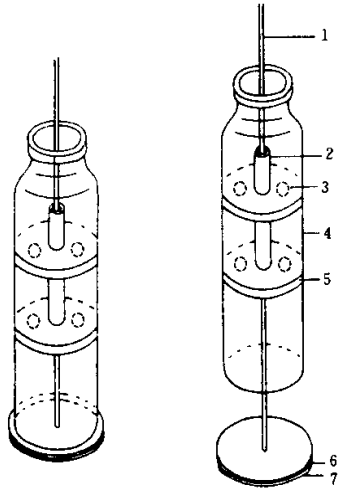


图 13 计数框

——取样管：将内径 2.2cm 的指形管底部截去、磨平，使成长约 8cm 的管子；剪取二块厚度约0.7cm 橡皮塞，做成直径与管子内径相等的隔板；分别于两隔板的圆心和两侧打二个小孔，于圆心处套入一根内径约 2.5mm 的玻璃管；将隔板装入上述管子中，使下隔板与管子下端的体积恰为 10mL 或 5mL；另取一细铜棒（直径约 2mm）做提柄，于下端连接一块略大于管子直径的圆铜板，板上粘上与铜板等大的橡皮垫；将此提柄插入管内，即成如图 14 的取样管。取样时，将取样管插入已知体积的标本容器中，通过提柄的上下运动使样品混匀；然后迅速使橡皮垫封闭管子的下端再移出取样管；将取出的样品全部置于浮游动物计数框即可。



1—提柄；2—玻璃管；3—排气孔；4—指形管；5—隔板；6—橡皮垫；7—铜板

图 14 取样管

5.3.3.3.2 计数：标本数量较少的应全部计数；若数量较大，应先将个体大的标本（如水母、虾类、箭虫等）全部拣出分别计数；其余样品稀释成适当体积，再用浮游动物取样管取样计数。计数结果填于表10和表11中。

5.3.3.4 注意事项

——计数时一般以种为单位分别计数；优势种、常见种应力求鉴定到种。

——生物量测定时，遇有含水量多的、较大型的浮游动物（如：水母、海樽等），应在所填表格相应的备注栏里注明，以备查用。

——所有浮游动物的残损个体，以有头部的计数。

——填表或计算时，应注意样品体积、取样计数量、样品稀释倍数及滤水量等的换算。

5.3.4 样品的保存

经鉴定、计数后的所有样品，需收集装回原标本瓶中妥善保存，以备复查或进一步深入研究。长期保存样品的标本瓶密封性能要好，必要时可封腊保存。样品的内外标签要完整。

用碘液固定的浮游植物样品，保存时需按水样量加入一定量的甲醛溶液，使成为5%的甲醛固定液。

定期检查保存的样品，以防固定液干涸或标本霉变。

5.4 资料整理

5.4.1 浮游植物细胞数的统计

采水和网采的浮游植物数量分别以个/L和个/m^3表示，计数结果需按不同计数方法换算、统计。

5.4.1.1 沉降计数法和直接计数法的统计按式(1)计算：

$$N=\frac{n}{V}\times 1\,000 \qquad (1)$$

式中：N——每升水样的藻类细胞数，个/L；

n——三个分样的总细胞数或其平均值，个；

V——三个分样的总体积或其平均值，mL。

5.4.1.2 浓缩计数法的统计按式(2)计算：

$$N=\frac{nV'}{VV''} \qquad (2)$$

式中：N——每升水样的藻类细胞数，个/L；

n——取样计数所得的细胞数，个；

V——采水量，L；

V'——水样浓缩的体积，mL；

V''——取样计数的体积，mL。

5.4.1.3 网采浮游植物数量计算见5.4.2.1和5.4.2.3。

5.4.2 浮游动物生物量和个体数的统计

5.4.2.1 滤水量计算

a) 根据流量计的转数(r)计算滤水量〔如式(3)〕：

$$V=nV_0 \text{ 或 } V=n\frac{SD}{n_0} \qquad (3)$$

式中：V——滤水量，m^3；

V_0——流量计的标定值，m^3/r；

S——浮游生物网网口面积，m^2；

D——流量计标定时的平均拖曳距离，m；

n_0——流量计标定时的平均转数，r；

n——实际采样时流量计的转数，r。

b) 若流量计已经厂方标定，可按厂方提供的公式和参数计算滤水量。

5.4.2.2 根据绳长计算滤水量：若无流量计，滤水量计算可用式(4)：

$$V=SD \quad \cdots\cdots (4)$$

式中：V——滤水量，m^3；

S——浮游生物网网口面积，m^2；

D——采样时放出的绳长，m。

5.4.2.2 湿重生物量和体积生物量计算

湿重生物量以 mg/m^3 表示，体积生物量以 mL/m^3 表示，计算如式(5)：

$$B=\frac{S}{V} \quad \cdots\cdots (5)$$

式中：B——湿重生物量，mg/m^3 或体积生物量，mL/m^3；

S——样品湿重 mg 或样品体积，mL；

V——滤水量，m^3。

5.4.2.3 个体数的计算

浮游动物个体数以个/m^3 表示，计算如式(6)：

$$N=\frac{n}{V}\div a \quad \cdots\cdots (6)$$

式中：N——每立方米水体中的个体数，个/m^3；

n——取样计数所得的个体数，个；

V——滤水量，m^3；

a——取样体积与样品总体数之比。

5.4.3 图表绘制

5.4.3.1 填写统计表

1) 将上述各种统计数据分别填入相应的表格中(表 7～表 11)。

2) 按分类系统，将上述各表数据分别汇总于表 12 和表 13 中。

5.4.3.2 绘制数量分布图

根据表 12 和表 13 统计数据，绘制浮游生物平面分布图。为便于资料比较，按以下统一标准作图。

5.4.3.2.1 浮游植物

1) 总量：小于 5×10^2、5×10^2、1×10^3、5×10^3、1×10^4、5×10^4、1×10^5、5×10^5、1×10^6、5×10^6、1×10^7 和大于 10^7(个/L)。

2) 主要种(包括夜光藻或其他赤潮生物)：小于 10^2、1×10^2、5×10^2、1×10^3、5×10^3、1×10^4、5×10^4、1×10^5、5×10^5、1×10^6、5×10^6、1×10^7 和大于 10^7(个/L)。

5.4.3.2.2 浮游动物：

1) 湿重生物量：小于 25、25、50、100、250、500、10^3、大于 10^3(mg/m^3)。

2) 体积生物量：小于 0.1、0.1、0.2、0.5、1.0、2.5、5.0、10.0 和大于 10.0(mL/m^3)。

3) 主要种或主要类别的个体数量：小于 1、1、5、10、25、50、100、250、500、10^3 个和，大于10^3(个/m^3)。

5.4.3.3 注意事项

——参与资料整理，校对人员，均应在图表上签名备查。

——所有水文、化学等调查项目的分析方法和资料整理，均按 GB 17378.1～17378.6 的规定进行。

——报告编写完毕，应及时把所有资料整理报出、归档。

表 4　浮游生物生态调查工具器材及药品一览表

序号	品　名	规　格	数　量	备　注	序号	品　名	规　格	数　量	备　注
1	卡盖式采水器	HQM_{1-2}	2 个	可选用其中一种	25	钢丝扎头	4～6mm	若干	
2	颠倒采水器		2 个		26	锉子	三角锉	1 把	
3	浅水Ⅰ型浮游生物网	见正文	2～4 个		27	扳手	大、中号	各 1 把	
4	浅水Ⅱ型浮游生物网	见正文	2～4 个		28	钢丝钳	264mm	1 把	
5	浅水Ⅲ型浮游生物网	见正文	2 个		29	尖嘴钳		1 把	
6	网底管		3～4 个		30	螺丝刀	大、中、小	各 1 把	
7	闭锁器	QQC_2-2	2 个		31	剪刀	医用剪刀	1 把	
8	沉锤	5～30kg	若干		32	镊子	尖头及钝头	各 1 把	
9	流量计	WQS_{2-1}	2～3 个	或 WQS_{1-1}	33	绳索		若干	
10	偏角器		1 个		34	棉纱绳		若干	
11	使锤	250～500g	2～4 个		35	铁钉		若干	
12	标本箱		视需要量		36	铁丝线		若干	
13	标本瓶	500mL	视需要量		37	胶布		若干	可用于补网
14	量筒(塑料)	25mL	1～2 根	加固定剂用	38	针、线		若干	补网用
15	定量加液器	5 或 10mL	1 个	加固定剂用	39	手电筒		2 把	
16	福尔马林	36%甲醛溶液	视需要量		40	工作日记本		每人一本	
17	碘液	见正文	视需要量		41	铅笔	HB	若干	
18	浮游生物海上采集记录表	附记录板	视需要量		42	铅笔刀		1 把	
19	浮游动物分层拖网采集记录表	附记录板	视需要量		43	皮或棉手套		每人 1～2 付	
20	水桶	中号手提桶	2 个		44	工作服	衣、裤、鞋	每人一套	
21	洗耳球		2 个		45	安全帽		每人一个	
22	转环		2 个		46	雨具		每人一套	
23	卸扣	10mm	4～6 个		47	工具箱		一个	
24	羊角圈		若干	备用	48	出海箱		视需要量	盛网具、文具等

表 5　浮游生物海上采集记录表

第_____页

站　号		水深,m		海　区		调查船	
标定站位	纬度　经度		实测站位	纬度　经度			
调查时间	自　年　月　日　时　分至　月　日　时　分						

采集项目		瓶　号	绳长,m	倾　角(°)		流　量　计		备　注
				开　始	终　了	号　码	转　数	
垂直拖网	浅水Ⅰ型浮游生物网							
	浅水Ⅱ型浮游生物网							
	浅水Ⅲ型浮游生物网							
采水	层							
	层							
	层							
	层							
	层							
	层							
	层							
	层							
海　况(记事)		(采水量　mL)						

采集者_____　记录者_____　校对者_____

表 6　浮游动物垂直分层拖网采集记录表

第_____页

站　号		水深,m		海　区		调查船	
标定站位	纬度　经度			实测站位	纬度　经度		
网　型		采集时间		自　年　月　日　时　分至　月　日　时　分			

采集层次 m	瓶　号	绳长,m			倾角 (°)		备　注
		放出	闭锁时	实际绳长	上升时	扔锤时	
海　况（记事）							

采集者_____　记录者_____　校对者_____

表 7　浮游生物标本登记表

调查海区_____调查船_____　　第_____页

标本编号	海上瓶号	站号	实测站位	日期 年月日	时间 时分	水深 m	层次 m	采水量 mL	网型	倾角(°)		流量计		绳长 m	滤水量 m^3	备　注
										开始	终了	转数	标定值			

编号者_____　计算者_____　抄录者_____　校对者_____

表 8　浮游植物细胞数量计数记录表

第___页

标本编号_____站号_____层次_____(m)采水量_____(mL)

浓缩体积_____(mL)计数体积_____(mL)调查时间_____计数时间_____

种　　名	数　　量	小计(个)	个/L	备　　注

硅藻种数(个)		数量(个)				
甲藻种数(个)		数量(个)				
其　　他(个)		总量(个)				

采集者_____　记录者_____　校对者_____

表 9　浮游动物生物量测定表

标本编号	筛绢＋样品湿重 或 海水＋样品体积	筛绢湿重 或 海水体积 m^3	样品湿重 或 样品体积 m^3	滤水量 m^3	生物量 mg/m^3 或 mL/m^3	备　注

测定日期_____　测定者_____

表 10 _____型浮游动物个体计数记录表

第____页

标本编号_____站号_____水深_____(m)层次_____(m)

滤水量_____(m^3)取样_____调查时间____年____月____日计数时间____时____分

种　　名	数　量(个)	小计(个)	总计	个/m^3	备　注
种数		总个体数(个)			

计数者_____统计者_____校对者_____

表 11　夜光藻数量计数记录表

第____页

调查时间：_____年_____月_____日至_____年_____月_____日　调查海区_____

标本编号	站号	取样	计数数量（个）	总个数（个）	滤水量 m^3	个/m^3	备　注

计数者_____统计者_____校对者_____

表 12　浮游植物数量统计表

第_____页

海区_____采样方法_____调查时间_____年_____月

站　　号																	
采样时间	日　　期																
	时　　分																
层　　次,m																	
总 种 数 (个)																	
总细胞数 (个)																	
种　　名	细　胞　数　量																

注：细胞数量单位，个/m^3。

填表者_____　校对者_____

表 13　浮游动物数量统计表

第_____页

海区_____网型_____调查时间_____年_____月

站　　号																	
采样时间	日　期																
	时　分																
层　　次，m																	
生物量，mg/m^3 或 mL/m^3																	
总　种　数　（个）																	
个　体　数　（个）																	
种　　名	个　　体　　数																

注：个体数单位，个/m^3。

填表者_____　校对者_____

6 大型底栖生物生态调查

6.1 调查内容和方法

6.1.1 调查内容

6.1.1.1 生物调查

6.1.1.1.1 鉴定生物种类，测定栖息密度和生物量，分析其相对丰度和群落多样性。

确定群落中的主要种，并尽可能测量其个体大小，年龄结构、性别比例等。有条件的可做干湿比和灰重、生长率、生殖率。

6.1.1.1.2 主要种类体内污染物质测定。

6.1.1.2 环境调查

6.1.1.2.1 环境特点 海区的地理环境、形态和沉积物、状况、污染源的位置等。

6.1.1.2.2 水文气象 天气状况、水温、水深、水色、透明度、流(流速、流向)。

6.1.1.2.3 沉积物粒度、有机质、氧化还原电位、硫化物、底温。

污染物的测定项目应根据污染源的性质选定，分析方法见 GB 17378.4—1998 和 GB 17378.5。

6.1.2 调查方法

调查之前，应对调查水域的基本状况有所了解，包括陆上和海上污染源的位置分布、海区的沉积物类型、海流、泥沙运动和底栖生物的基本特点等。并应进行必要的社会调查，特别要注意沿海工业和海上工程建设对海区环境的影响，为制定调查方案提供依据。

6.1.2.1 站位布设

站位的布设应根据污染源的位置和分布，结合海区的水文、水质、沉积物底质的环境资料综合考虑。特别要注意水深、沉积类型和底栖动物区系异同。并尽量使调查站位与沉积物污染调查一致，以便更好地反映沉积物污染对底栖生物的影响。同时还应选择生态类型相同的非污染点或断面作为参照，以便进行资料对比和评价。

6.1.2.1.1 与污染源有关的调查

城市工业排污、海上石油平台及海上倾废区等点源污染的调查，可按点源污染的浓度梯度布设直线型或辐射型的站位，站位多少可根据实际需要酌定。一般在封闭和半封闭的海湾、河口或在复杂沉积类型的水域应密些，在浅海或沉积类型均匀的水域可适当疏些。

6.1.2.1.2 一般性的普查

作为一般性的污染普查，可按方格式布设站位，断面的布设主要考虑水深和盐度梯度的变化。

6.1.2.2 调查类型和次数

6.1.2.2.1 基线(背景)调查：最好每月一次，至少按生物季节(春 3～5 月、夏 6～8 月、秋 9～11 月、冬 12～2 月)一年调查 4 次。

6.1.2.2.2 监测性调查：根据各地实情和需要，选择若干固定月分和若干站点定期取样分析。为便于比较，所选月分和站位，应与基线调查时的时间和站位相应。

6.1.2.2.3 应急调查；若遇偶发污染事故，倾废、赤潮等，应跟踪监测，并于事故后进行若干次危害评价调查。

6.1.2.3 取样面积、次数和手段

6.1.2.3.1 采泥样 一般使用 0.1m^2 采泥器，每站取 5 次；在港湾中或无动力设备的小船上，可用 0.05m^2采泥器，每站取 5 次。特殊情况下，不少于 2 次。

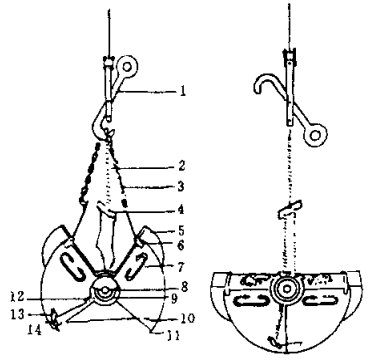
6.1.2.3.2 拖网取样 必须在调查船低速(2kn 左右)时进行。如船只无 1～3kn 的低速档，可采用低速间歇开车进行拖网。每站拖网时间一般为 15min；半定量取样，拖网时间 10min(以网具着底始算起至起网止)。深水拖网，可适当延长时间。

6.2 样品采集

6.2.1 采集工具和设备

6.2.1.1 采泥器

6.2.1.1.1 曙光采泥器：是目前国内较普遍使用的一种采集工具(图 15)，主要由两个可活动的颚瓣构成。两瓣的张口面积为 0.1m²。两颚瓣顶部由一条铁链连接，当铁链被挂到钢丝绳末端的挂钩上时，两颚瓣呈开放状态(图 15 之 a)。采泥器一经触及海底，挂钩锤端即下垂与铁链脱钩。当采泥器上提时，通过挂钩对横梁的拉力，连接两颚瓣的钢丝绳拉紧，使两颚瓣闭合，将沉积物取入。



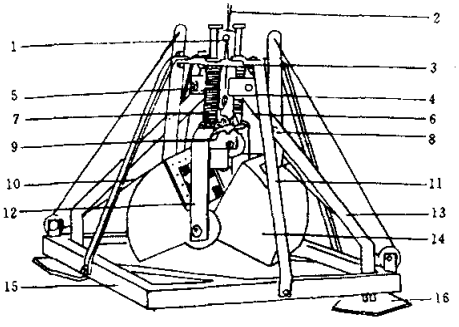
a. 开放状态　　b. 闭合状态

1—挂钩；2—钢丝绳；3—铁链；4—横梁；5—配重；
6—固定板；7—提环；8—主轴；9—滑轮；10—绳环；
11—铲刀；12—挡块；13—弯板；14—小滑轮

图 15 曙光采泥器

深水(500m 以上)采泥，为避免两颚瓣在水层中自行关闭，应换上带重锤的挂钩，并在两颚瓣的外面附加配重，以增加采泥器的重量。

6.2.1.1.2 弹簧采泥器：此种采泥器主要靠弹簧作用使左右颚插入沉积物内取样。两瓣的张口面积为 0.1m²(图 16)。操作时，把采泥器放在框架(规格 cm：65×55×30，木制)上，将负载板插入导管中，在负载板的下孔中插入一铁销，上孔中插入一长铁杆，另在铁杆下方基架台上放一块三角铁。然后，用铁杆将负载板撬起，左右挂钩分别钩住两颚瓣限动臂上的眼环，使弹簧被压缩受力。这时再把左右颚瓣臂向上推，使之与释放杆上的制动栓卡在一起，两颚瓣即成开放状态。



1—负载板；2—连接吊杆钢丝绳；3—基架台；4—环；5—挂钩；6—导管；7—弹簧；8—制动栓；9—眼环；
10—闭合绳；11—支撑架；12—限动臂；13—释放杆；14—颚瓣；15—基架；16—启动板

图 16 弹簧采泥器结构示意图

当采泥器平稳地降至海底时，由两个启动板的触底带动释放杆将导管周围的环托起，挂钩即脱落，在弹簧的作用下颚瓣插入底质内。此时，制动栓也互相脱离。当钢丝绳上提时，两瓣闭合(图 17)将沉积物取入。

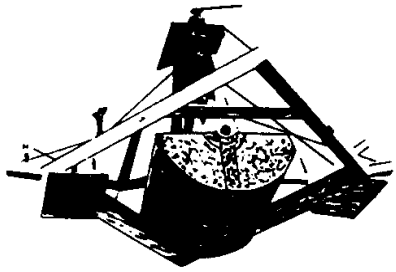


图 17　弹簧采泥器工作状态

在风浪较大和遇到砂底的情况下，均宜使用弹簧采泥器，还应加配重。

6.2.1.1.3　“大洋-50”型采泥器：结构基本与曙光采泥器相同，取样面积为 0.05m²。适于无动力设备的小船在内湾取样。

6.2.1.2　拖网

6.2.1.2.1　阿拖网：如图 18。网架用钢板或钢管制成，网口呈长方形，两边皆可在着底时进行工作。为便于网口充分张开，口缘的网架上绕有钢丝绳(φ4～6mm)。网袋长度为网口宽度的 2.5～3 倍。进口处网目较大(2cm)，尾部较小(0.7cm)。为使柔软的小动物免受损坏，可在网内近尾部附加一个大网目的套网以使之与大动物隔开。

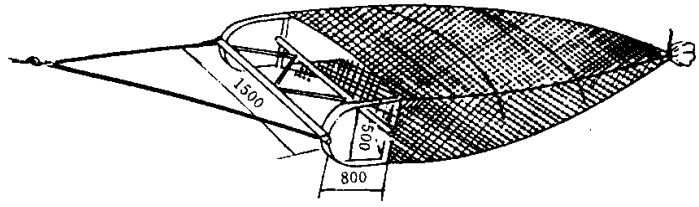


图 18　阿拖网　　单位：mm

该网网口宽度可根据调查船吨位及调查海区酌定。在一般调查船上用 1.5m 宽的即可。船上起重设备差，或在内湾调查，也可用 0.7～1m 宽的小型网。深水调查，一般多用宽度为 3m 的大型网，其网架也要相应加重。

拖网时，为减轻网衣的承受力，应用两根粗绳分别扣结在网架两侧边上，并将其另一端绕结在网袋末端，避免网内泥砂多时网衣破裂。

6.2.1.2.2　三角形拖网：如图 19。网架为钢质材料，呈三角形，架的四周横连三根圆钢，起加固作用。网口宽度，大小及网衣结构与阿拖网相同。三角形拖网适于沿岸浅水和底质较复杂的海区。

6.2.1.2.3　双刃拖网：如图 20。网架长方形，以刀刃形铁板作网口的上下缘，连接网口的网叉分为两段，其中有一段用线绳或麻绳连接，以防网口卡于底上岩石，荷重过大时，导致网具丢失或发生危险。网口宽度有 60cm 和 80cm 两种，网袋的长度为宽度的 2 倍。该网具适于硬底、碎石或砂砾沉积物、区域工作。

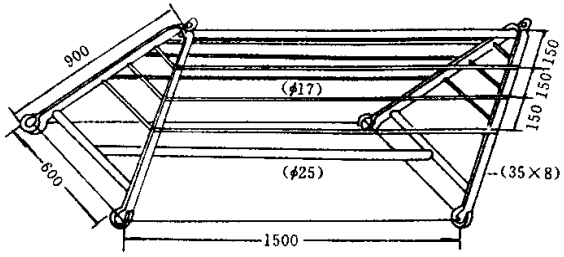


图 19 三角形拖网 单位:mm

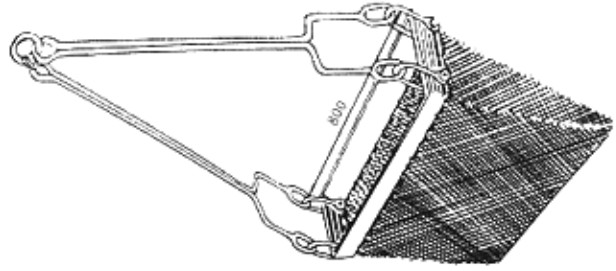
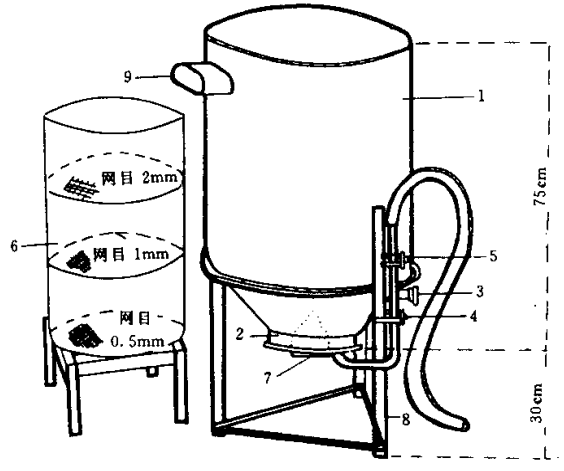


图 20 双刃拖网 单位:mm

6.2.1.3 淘洗设备

目前主要用漩涡分选装置。装置结构如图 21,主要由筒体、漩涡发生器、分流器(进水口、进水阀、分流阀)、生物收集器(套筛)、排渣阀、支架等组成。筒体直径 50cm,高 75cm(其中漏斗状部分 25cm),上方有一出水口;漩涡发生器安于漏斗部底侧,由一切成锲形的水管焊贴于近筒边(距离 1cm 左右),当进入的水流经此处,即受筒边阻挡而改变方向,并形成漩涡;分流器系控制水流强弱的装置,具双向流水控制阀门;生物收集器为一复合套筛和木架组成,套筛分三层,上层网目为 2mm,中层为 1mm,底层 0.5mm,用时与漩涡分选装置配套使用;排渣阀,分选样品时,封闭筒底洞口,样品分选完毕,启开将余渣排出。



1—筒体;2—漩涡发生器;3—进水管;4—进水阀;5—分流阀;6—生物收集器;
7—排渣阀;8—支架;9—出水口

图 21 漩涡分选装置

6.2.1.4 其他工具和器材见表 14。

表 14 大型底栖生物调查器材用品表

编号	品名	规格	数量	编号	品名	规格	数量
1	网具	(根据调查目的要求和海区底质情况选带)	各 2 个	30	指管	90×30、90×25mm	视站数而定
2	采泥器	(同上)	各 2 个	31	铁皮箱	浸制大型标本用	
3	套筛(过筛器)	见正文	2 套	32	标本桶	浸制大型标本用	
4	白铁盘	80×50cm 100×70cm	各 2 个	33	注射器	20mL	2 支
5	铁钩	长 1.5m	2 把	34	针头	20 号或 18 号	1 盒
6	小铲子	铁制	2 把	35	纱布		20m
7	镊子	大、中、小	各 3 把	36	白线绳	粗、细	各 1kg
8	剪子	解剖剪(不锈钢)及普通剪	各 2 把	37	拖网及采泥标签、竹签		视站数而定
9	刀子	不锈钢的普通刀及解剖刀(大小)	各 2 把	38	海上采集记录表		视站数而定
10	照像机	135 型	1 架	39	海上工作日志		2～3 本
11	解剖镜		2 架	40	木板记录夹		3 个
12	台架放大镜	25×0.10×0.5	2 架	41	绘图墨水		2 瓶
13	手执放大镜	10×	2 个	42	绘图笔杆及笔尖		4 支
14	秤(具钩及盘)	感量 50～100g	1 架	43	钳子	大、小	各 1 把
15	托盘式扭力天平	感量 0.01g	1 架	44	活扳手	大、小	各 1 把
16	闹钟		1 只	45	螺丝刀	大、中、小	各 1 把
17	薄荷脑		50g	46	钉锤		1 把
18	水合氯醛		500g	47	卡环(活链环)	大、小	各 10 个
19	乌来糖		500g	48	转环	大、小	各 5 个
20	酒精	95%		49	眼环	大、小	各 20 个
21	甲醛	36%	视站数而定	50	花兰螺丝		5 个
22	搪瓷盘	cm:70×50;100×40;40×30;30×20	各 2 个	51	量角器		
23	带盖搪瓷盘	cm:30×20;24×18	各 2 套	52	抽水泵	735W	1 台
24	搪瓷碗	直径 16、12cm	大小各 3 个	53	手电筒	大	2 把
25	下口瓶(或塑料桶)	10 000mL	2 个	54	太阳帽、安全帽		每人一个
26	漏斗	直径 18cm	2 个	55	太阳镜		每人一个
27	量杯(搪瓷)	1000、500mL	各 1 个	56	棉纱手套、皮手套		每人一付
28	培养皿	ϕ:7、9、12cm	各 5 套	57	雨具(雨衣、雨鞋)		每人一套
29	广口瓶	500、250、125、60、30mL 等	视站数而定	58	保健箱		
				59	硼砂(或六胺)		
				60	甘油		

6.2.2 甲板设备

6.2.2.1 绞车和吊杆 绞车和吊杆的负荷应能满足拖网和采泥的需要。拖网用的要能负荷 2000kg。绞车应能变速(快、中、慢三档),并配有自动排绳设备及绳索计数器,最好能配张力表、电子秤,以便从钢丝绳的张力及时了解网具是否到达海底和拖网状况,确保安全。吊杆一般装在主甲板后部,高出船舷 5m 左右,舷间距约 1m,可作回转运动。

专用于采泥器取样的绞车及吊杆应能负荷 500kg,使用弹簧采样器的负荷应为 2000kg。吊杆高出船舷的程度尽量减小,以能使用为度。

6.2.2.2 钢丝绳 拖网一般可用直径 8～10mm 的软质钢丝绳。其长度按调查海区的水深确定,备有足够用量。在专供采泥用的绞车上,一般用直径 4～6mm 的软质钢丝绳。

在钢丝绳与网具或采泥器相连接处应装有转环,以防操作过程钢丝绳扭曲或打结。拖网时,应附加保险绳,以便网具在海底碰到障碍物时,保险绳断开,不致丢失网具。

6.2.2.3 冲水设备 船上应装有水龙头及橡胶水管,供采泥和拖网后冲洗沉积物样品和工具。无供水设备时,应另备小型抽水泵。

6.2.3 样品采集和处理

6.2.3.1 采泥样

6.2.3.1.1 曙光采泥器的操作

1) 投放:将采泥器活门上的铁链挂在挂钩上,慢慢开动绞车,提升采泥器。随着钢丝绳拉紧,两颚瓣自动张开。采泥器上升到略超过船舷时,即转动吊杆将其送出舷外,待稳定后慢速下降,入水后再快速下降。放出的钢丝绳可稍长于水深。在浅海采样时,当放出的钢丝绳松弛时,即采泥器已着底,应立即停车,以防钢丝绳打结。在深水采样时,可根据钢丝绳倾角的大小,加适当的余量。

2) 提升:开始用慢速,离底后改用快中速,接近水面时,再用慢速。当采泥器超过船舷时,应立即停车,转动吊杆使之移近船舷或用铁钩将其钩入舷内,再慢慢下降,将采泥器放在一个预先准备好的白铁盘中。先打开采泥器两颚瓣上方的活门,从活门处观察沉积物的颜色、厚度和生物栖息情况等,并作好记录。然后将活门上的铁链重新挂于挂钩上,慢慢开动绞车,使采泥器上升离开铁盘,颚瓣即自动打开,使泥砂落入盘中。

6.2.3.1.2 弹簧采泥器的操作

1) 投放:方法基本与曙光采泥器相同。首先,在挂钩钩住眼环使颚瓣张开后,取下负载板,用卡环连接采泥器上的钢丝绳与绞车上的钢丝绳,然后慢慢开动绞车将提升起来的采泥器送出舷外,并投放。采泥器接近海底时改用慢速下降。

2) 提升:方法大致同曙光采泥器,只是在采泥器提升上来后,须停放在一个预先准备好的框架上,再打开两个颚瓣,使泥样落在框架下面的白铁盘中。

6.2.3.1.3 “大洋-50”型采泥器操作

大洋采泥器的投放和提升与曙光采泥器相同。

6.2.3.1.4 淘洗及分离标本

将采到的沉积物样品移入漩涡分选器筒体中,打开分流器的阀门进水,利用水流通过漩涡 发生器搅动样品,浮选出比重轻的生物,比重大的生物连同余渣沉底。分流器的进水不宜太大,以免较大颗粒的沉积物搅起溢出筒体上方出水口。从出水口溢出的水体和生物流到套筛,将截留在筛网内的动物按体形大小及软硬程度分别拣入盛有海水的器皿中,然后按类别或软硬分别装瓶,并注意勿使小动物遗漏。必须仔细拣出余渣中比重较大的动物。难挑拣的生物连同余渣带回实验室,在解剖镜下挑拣。采泥标本一律用 5%甲醛溶液固定保存。

6.2.3.2 拖网取样

6.2.3.2.1 网具的选择 根据调查海区各站深度与沉积物状况选择适宜网具。较硬的沉积物用阿拖网或三角形拖网;岩石或砾石较多以及海藻丛生的区域,使用双刃拖网。深海作业,一般使用大型阿拖网,

在港湾中可使用小型拖网(网口宽 0.7～1m)。

6.2.3.2.2 投网 拖网应在每一测站各调查项目完成后进行。调查船以低速离站开航,航向稳定后投网。开动绞车将网具吊于舷外,理顺网衣和网架,然后慢速下降。放出绳长一般为水深的三倍左右,近岸浅海可更长些。在 100m 深工作时,因钢丝绳重量大,绳长不宜超过水深的 2 倍。拖网的航速控制在 2kn 左右,船速大于 4kn 时,可采取间歇开车,利用船体的滑行速度拖网。

拖网过程中,应有专人监视网具的工作情况,并根据钢丝绳的倾角和弛张程度或张力表来判断网具是否着底并正常运行。遇有异常,应立即停车、放绳或起网。拖网时间是从放绳完毕,网着底始至起网止。

6.2.3.2.3 起网 应先减低船速,然后起网。当网升至近水面时,应以慢速使网具离开水面,网尾部接近船舷时停车。转动吊杆方向(吊杆不能转动时用铁钩等将网具拉入舷内),慢慢将网放下,使网袋后部落在备好的铁盘内。解开网袋,将捕获物倾入盘中。网袋内如有泥砂,则移入 2mm 套筛冲洗,并将挂夹在网目上的生物挑拣干净。

6.2.3.3 标本处理和保存

6.2.3.3.1 处理 自网中取出标本后,按类群或大小、软硬分别装瓶,避免标本损坏。标本量大时,可取其中部分称重和计算各类群或各种类个体,换算成标本总数量。保留一定数量个体数(大、中、小个体),作为生物学等测定,余者经称重后处理掉。称重和计数结果填入表 15 中。

发现具典型生态意义的标本,及时拍照且进行有关生物学的观察及测量。需培养和麻醉的生物,用海水冲洗干净,并尽量减少刺激、损伤。标本按类群分离完毕,按个体大小分装于不同规格的标本瓶或铁皮箱。放入铁皮箱中的标本,用纱布包好附上竹签。装入容器的标本量不得超过体积的 2/3。

6.2.3.3.2 固定、保存 标本在野外固定时,除海绵动物用 85%酒精外,其余各类均可先用 5%甲醛溶液(加适量硼砂或六胺)。较大鱼类应用针筒将固定液注入体腔,海胆等大型棘皮动物,需在其围口膜处刺一小孔,使固定液渗入。

标本带回实验室,应及时分离,并按需要更换固定液,一般而言,藻类、海草、鱼类仍用 5%甲醛溶液固定保存,其余各类改换 70%酒精(加入 5%甘油)固定、保存。若标本不能及时分离,亦应更换一次固定液。

6.2.3.4 污染物测定的生物样品

按照 GB 17378.6 的规定尽快送检。

6.2.3.5 采样记录和登记

6.2.3.5.1 填写采样记录表 每站取样时,按表 15 的各项填写。表中采泥和拖网标本数是指每站所取得的各类群生物的装瓶数和包数。记事栏记录该站工作的情况。

6.2.3.5.2 标签 每号标本瓶中须放标签(见式样)。标签在填写采样记录表时一并写好。放在铁皮箱中的大个体生物,应另加一个竹签。竹签上应有站号、标本编号和日期等。标签、记录表和标本三者应相符,切勿误投,以免混淆。

站号 ..... 海区 .....
标本号 ..... 深度 ..... m
底质 ..... 采泥器 ..... m^2
日期 ..... 年 ..... 月 ..... 日
种名

采泥标签

站号 ..... 海区 .....
标本号 ..... 深度 ..... m
底质 ..... 网型 .....
日期 ..... 年 ..... 月 ..... 日
种名

拖网标签

6.2.3.5.3 标本编号

1) 采泥标本编号:*MjAK*。

M——调查船代号;

j——取样站位序号，(j=1,2,3……)；

A——采泥标本符号；

K——采泥标本序号，(K=1,2,3……)；

2) 拖网标本编号：$MjBi$。

M——同上；

j——同上；

B——拖网标本；

i——拖网标本序号，(i=1,2,3……)。

6.2.4 标本归类和采集工具保养

6.2.4.1 标本归类 标本处理、分离、投放标签及固定完毕后，按各大类群分别装箱。海上难分离的样品，带回实验室处理。

6.2.4.2 工具保养 每航次工作结束，对所用工具进行清理和保养。网具、采泥器、漩涡分选器及其他用具(套筛、铁盘、搪瓷盘、剪刀、镊子等)均用淡水冲洗，晾干，关键部位用纱布揩干涂上黄油。损坏和丢失的器材及时维修、补充。

6.3 室内标本处理

6.3.1 标本核对

检查全部标本编号、数量等与海上记录表的内容是否相符。遇有不符，应及时查找。

6.3.2 标本鉴定

无论按标本编号或站号顺序鉴定标本，对主要种应尽可能鉴定到种，并按表 17 各项生物学数据计算、测定和填写。

6.3.3 标本编号

鉴定的种类按顺序在采泥或拖网标本序号(k 或 i)后另起一个新序号(如 k-1,k-2…)，有多少种类就编多少号。同时将种名写在新标签上。

6.3.4 标本分析

6.3.4.1 称重

将标本放于吸水纸上吸去表面水分，去除管栖动物的管子、寄居蟹的寄居外壳、体表伪装物和其他附着物，用感量 0.01g 扭力天平称取湿重。若要称量干重，应将标本用淡水或蒸馏水冲洗，吸去表面水分，置 70～100℃烘箱中至恒重(用 0.0001 天平称量)。必要时，可分壳肉称量和称取灰份重。称重结果填于表 16 中。群体生物(如：苔藓虫、珊瑚等)和定性标本不称重。

6.3.4.2 计数

对易断的纽虫、环节动物只计头部。软体动物死壳不计数。标本量大时，可取部分称重计数换算，数据填入表 17 或表 18。

6.3.4.3 测量

1) 主要种体长、体宽和体高的测量，按各类群规定的测量法进行。

2) 对典型意义的指示种，有条件时可用电镜扫描测量生长线、计算生长率。

6.4 资料整理与保存

6.4.1 数据计算和表示

6.4.1.1 数据计算

6.4.1.1.1 生物密度和生物量的换算

将所有站位的实测生物个体数和生物量数据按其采样面积换算成个/m^2 和 g/m^2，分别表示生物密度和生物量。

6.4.1.1.2 生物密度和生物量统计

将各站位各类群生物密度填入表 19 中，并对各栏数据进行累加，求得整个海区的平均值。

将各站位各类群生物量填入表 20 中，并对各栏数据进行累加，求得整个海区的平均值。

6.4.1.1.3 各生物类群的组成百分比

根据表 19 和表 20 汇总的数据，计算各类群的生物密度和生物量在各站位和整个海区的组成百分比。

6.4.1.2 数据表示法

6.4.1.2.1 生物密度分布图根据表 19 的数据，按不同的量级(小于 5、10、25、50、100、250、大于 500)分别填入海图上的相应站位，然后以内插法绘出等值线图，或用不同大小的圆圈表示不同量级的密度分布。

6.4.1.2.2 生物量分布图将表 20 中的数据(按总生物量或各类群)分别填在海图上相应的站位，用内插法绘制等值线。一般按小于 1、5、10、25、50、100、250、500、1000g 等量级取线。

6.4.1.2.3 各类群生物密度和生物量组成百分比图 按各类群生物所占密度或生物量百分数比例绘制成圆形图。不同类群可以不同线条或图案装饰，使之更直观。也可用直方图或其他表示法。

6.4.1.2.4 种类分布图 取主要种的有关数据绘制分布图。这些种类可分别以不同符号表示，每张图可画一至数个种。

6.4.1.2.5 根据表 17 和表 18 的数据按种归类整理并填写表 21 和表 22。

6.4.2 资料保存

除按传统的资料归档方法保存资料外，有条件时可输入电子计算机，用磁盘贮存。

表 15　大型底栖生物海上采集记录表

第　　页

站号_____编号_____船名_____海区_____站位:纬度_____经度_____

沉积物_____底温_____℃　底盐_____　水深_____m　放绳长度_____m

采泥器_____m^2　采泥次数_____次　样品厚度_____　网型_____　网宽_____　拖网距离_____m

采泥时间_____年_____月_____日_____时_____分　拖网时间_____月_____日_____时_____分

至_____时_____分　计_____分

采泥标本总数：	拖网标本总数：

优　势、主　要　种　类　记　录

次　序	种　　名	总个数 个	总重量 g	取回个数 个	附　　注
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					

记事：

采集者_____　填表者_____　校对者_____

表 16　主要种的各种生物学参数

序　号	种　　名	个数（个）	生物量 g	干湿重 g		平均大小	性　别	年龄	生长率
				湿	干				
1									
2									
3									
4									
5									
6									
7									
8									
9									
10									
11									
12									
13									
14									
15									
16									
17									
18									
19									
20									

制表者_____　　校对者_____

表 17　大型底栖生物定量采集记录表

第　　页

站号_____　编号_____　时间_____年_____月_____日_____时_____分

船名_____　海区_____　水深_____m　沉积物_____　底温_____℃

底盐_____　采泥器_____m^2　取样次数_____次

样品厚度_____cm　站位:纬度_____　经度_____

次序	类群	种　　名	个数	密　度 个/m^2	重　量 g	生物量 g/m^2	附注
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							
11							
12							
13							
14							
15							
16							
17							
18							
19							
20							

采集者_____　称重者_____　计算者_____　校对者_____

表 18　大型底栖生物定性采集记录表

第　　页

站号_____　编号_____　时间_____年_____月_____日_____时_____分至
_____时_____分_____计_____分　船名_____　海区_____　水深_____m
沉积物_____　底温_____℃　底盐_____　网型_____　网宽_____m
拖网距离_____m　_____站位：纬度_____　经度_____

次　序	种　　名	数量(个)	附　　注
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			
18			
19			
20			

采集者_____　填表者_____　校对者_____

表 19　大型底栖生物密度统计表

海区_____　调查船_____　调查日期_____年_____月_____日　　第____页

站号	编号	采集日期	总密度	海绵		腔肠		蛆虫		星虫、桥虫		多毛类		腕足		软体		甲壳		棘皮		脊索		鱼类		其他		附注
			个/m^2	个/m^2	%	个/m^2	%	个/m^2	%	个/m^2	%	个/m^2	%	个/m^2	%	个/m^2	%	个/m^2	%	个/m^2	%	个/m^2	%	个/m^2	%	个/m^2	%	
总计(个/m^2)																												
平均值(个/m^2)																												

制表者_____　　计算者_____　　校对者_____

表 20　大型底栖生物生物量统计表

海区_____　调查船_____　调查日期_____年_____月_____日　　第____页

站号	编号	采集日期	总生物量	海绵		腔肠		蛆虫		星虫、桥虫		多毛类		腕足		软体		甲壳		棘皮		脊索		鱼类		其他		附注
			g/m²	g/m²	%	g/m²	%	g/m²	%	g/m²	%	g/m²	%	g/m²	%	g/m²	%	g/m²	%	g/m²	%	g/m²	%	g/m²	%	g/m²	%	
总计(g/m²)																												
平均值(g/m²)																												

制表者_____　　计算者_____　　校对者_____

表 21　大型底栖生物采集种类分布表

科　名_____种名_____　　（第_____页）

站　号	标　本　号	采集日期	分布密度 个/m^2	生物量 g/m^2	深　度 m	底　温 ℃	底　盐	沉积物	附　注

标本鉴定者_____　制表者_____　校对者_____

表 22　大型底栖生物定性采集种类分布表

科　名_____种名_____　　（第_____页）

站　号	标　本　号	采集日期（年、月、日）	数　量 个	深　度 m	底　温 ℃	底　盐	沉积物	附　注

标本鉴定者_____　制表者_____　校对者_____

7 潮间带生物生态调查

7.1 调查内容和方法

7.1.1 调查内容

7.1.1.1 生物调查

7.1.1.1.1 不同生境动、植物的种类、数量(栖息密度、生物量或现存量)及其水平和垂直分布的调查。

7.1.1.1.2 污染生态效应调查,例如:污染指示生物的出现或消失;主要种类的增减、异常、死亡;种群动态;丰度、多样性、生长率、生殖力的改变;各生物类群比例关系的变化以及群落结构的演替等等。

7.1.1.1.3 主要种类体内污染物质的测定。

7.1.1.2 环境调查

7.1.1.2.1 环境基本特征 包括港湾形态、潮汐类型、滩涂阔狭、沉积物类型、污染源分布及位置等。

7.1.1.2.2 水文气象要素 除记录天气(晴、阴、雨)、气温、水温、底温、风向、风速外,应着重观测潮流(流向和流速)、水色、浪冲击度等。

7.1.1.2.3 水化要素 盐度、溶解氧(DO)、化学需氧量(COD)、pH 值等,并依调查区污染源性质和调查目的,选测有关项目。

7.1.1.2.4 沉积物要素粒度、有机质、硫化物、氧化还原电位等,并依调查区污染性质和调查目的,选测有关项目。

7.1.2 调查方法

7.1.2.1 调查地点的选择

7.1.2.1.1 选点时首先应了解有关地点的历史、现状和未来若干时期的可能变化(如:建厂、围垦和其他海岸工程建设)。

7.1.2.1.2 选点应根据调查目的,结合污染源分布状况,考虑污染可能影响的范围而确定。

7.1.2.1.3 调查区内可能有岩岸、沙滩、泥沙滩、泥滩等多种海岸类型,选点应力求包括有不同类型,若有困难,为保证资料的可比性,所选的点的沉积物、类型应力求一致。

7.1.2.1.4 应在远离污染源的地方,选一生态特征大体相似的清洁区(非污染区)作为对照点。

7.1.2.2 潮间带的划分

调查地点选定后,应依据当地的潮汐水位参数或岸滩生物的垂直分布,将潮间带划分为若干区(带)、层(亚带),划分方法如下:

7.1.2.2.1 潮汐水位参数划分法

——半日潮类型

高潮区(带):最高高潮线至小潮高潮线之间的地带;

中潮区(带):小潮高潮线至小潮低潮线之间的地带;

低潮区(带):小潮低潮线至最低低潮线之间的地带。

——日潮类型

高潮区(带):回归潮高潮线至分点潮高潮线之间的地带;

中潮区(带):分点潮高潮线至分点潮低潮线之间的地带;

低潮区(带):分点潮低潮线至回归潮低潮线之间的地带。

——混合潮类型

高潮区(带):高高潮线至低高潮线之间的地带;

中潮区(带):低高潮线至高低潮线之间的地带;

低潮区(带):高低潮线至低低潮线之间的地带。

7.1.2.2.2 生物 垂直分布带划分法

根据生物群落在潮间带的垂直分布来划分,由于生物群落可随纬度高低、沉积物类型、外海内湾、盐

度梯度、向浪背浪、背阴向阳等复杂环境因素的不同而改变，因此，要提供一个统一模式是困难的。一般而言，岩石岸大体分为：滨螺带；藤壶—牡蛎带；藻类带。泥沙滩可有：绿螂—沙蚕—招潮蟹滩（或南方的盐碱植物带）；蟹类—螺类滩；蛤类滩。各地在调查时可根据各区、层的群落优势种给于更确切的命名。

7.1.2.3 断面和取样站布设

7.1.2.3.1 断面布设

1）调查地点选定后，对该地生境要有宏观概念，选取不被或少被人为破坏、具代表性的地段布设调查断面。

2）每一调查地点，通常要设主、辅两条断面，若生境无大差异，可只设一固定断面。

3）断面位置应有陆上标志，走向应与海岸垂直。

7.1.2.3.2 取样站布设

1）依据潮带划分，各潮区（带）均应布有取样站位，通常高潮区（带）布设 2 站、中潮区（带）布设 3 站、低潮区（带）布设 1～2 站则可。

2）岩石岸布站应密切结合生物带的垂直分布；软相滩涂除考虑生物的垂直分布外，应特别注意潮区（带）的交替、沉积物、类型的变化和镶嵌。

3）各站间距离视岩岸坡度、滩涂阔狭酌定。确定站位后，最好设有固定标志，以便今后调查找到原位。为防标志物遗失，尚需按站序测量、记录各站间距离。

4）岩沼和滩涂水洼地，是一种特殊生境，在污染调查中具有重要意义，应另布站取样。

7.1.2.3.3 取样站所属潮区（带）的测量、计算

取样站所属潮区（带）的确定是通过测量、计算该站位所处的潮高基准面上高度而得知的，目的在于分析各种类垂直分布中心和范围。测量、计算方法如下：

1）潮汐水位曲线图解法

该法是记录调查断面各站被潮水淹没或露出时间，把它标于从调查地点附近验潮站抄录的当日每时实测潮位绘制的曲线图 22 上，则知其潮高基准面上高度，如：站 1 于 8 时 15 分淹没，其高度是 1.95m；又如：站 2 于 14 时 07 分露出，其高度应是 3.5m。

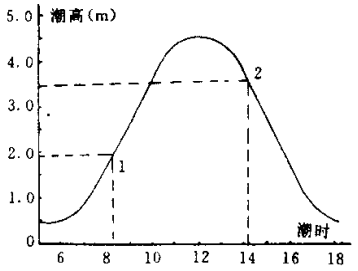


图 22 潮汐水位曲线图解法

此外，根据各站淹没或露出时间，还可应用“等腰梯形图卡”法（见潮汐表后介绍），求得各站的潮高基准面上高度。

2）直接测量法

本法较适于坡度大、范围狭的岸滩，无须等待潮水淹没或退离，就可测得其潮高基准面上高度。方法如图 23 所示，由当日最低潮位逐站向上测量。设：站 1 是当日最低潮位（可从验潮站查得其潮高基准面上高度，设为 0.6m），若测站 2 高度，则只需在站 1、2 分别立标杆甲、乙，并于两标杆间拉一绳索，使之与海面平行或同时垂直两标杆，记下两标杆高度，经简单计算，便知其潮高基准面上高度。例如：标杆甲、乙高度分别为 2.1m 和 0.8m，则站 2 高度为 1.9m（0.6+2.1−0.8）。依次同样可测量上面各站。

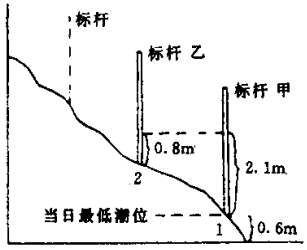


图 23 直接测量法

若调查地点远离验潮站，可依本法实际测得数据，与两侧验潮站观测的潮时和潮差作比较，用内插法求得各站的高度。须注意的是，当风浪较大时，此法误差较大，应慎用。

3）水准仪测量法

本法精度高，在已有大地高程测量的地方，只需在欲测的潮间带附近找得水准点（埋设的水准标石），依站序向下测量。若无大地测量作依据。则应从当日最低潮位（其潮高基准面上高度可由验潮站查得）逐站向上测量。具体方法请参照《国家水准测量规范》。

7.1.2.4 调查时间

7.1.2.4.1 潮间带采样受潮汐限制，为获得低潮区（带）样品，须在大潮期间进行。若断面或站数较多而工作量较大时，可安排大潮期间调查各断面的低潮区（带），小潮期间再进行高、中潮区（带）的调查。

7.1.2.4.2 基础（背景）调查，应按生物季节（春——3 至 5 月、夏——6 至 8 月、秋——9 至 11 月、冬——12 至 2 月），一年最少调查 4 次。

7.1.2.4.3 监测性调查，可根据各地实情选择若干固定月份定期进行（如枯水期、丰水期等）。但为了资料比较，所选月份应力求与基础调查月份一致，并注意尽可能避开当地主要生物种类的繁殖期。

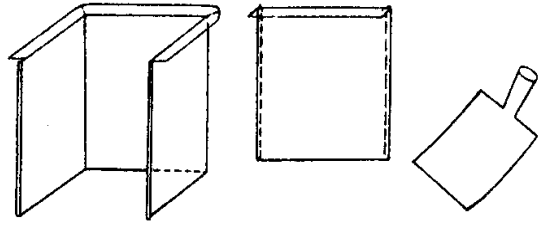
7.1.2.4.4 若属应急调查（偶发污染事故、赤潮等），则应进行跟踪观测，并酌情对事故后所造成的影响作若干次必要的调查。

7.2 野外调查

7.2.1 采样工具和其他配备

7.2.1.1 采样器和定量框

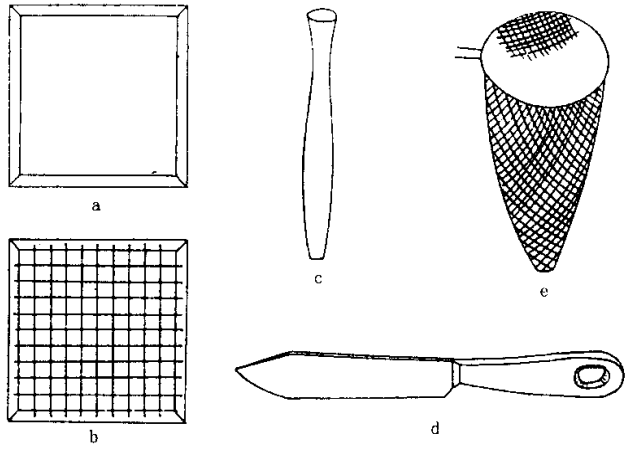
7.2.1.1.1 泥、沙等软相沉积物的生物取样，用滩涂定量采样器（如图 24）。其结构包括框架和挡板两部分，均用 1.5～2.0mm 厚的不锈钢板弯制而成。规格 cm：25×25×30。配套工具是平头铁锹。



a—框架（25cm×25cm×30cm） b—挡板（25cm×30cm） c—平头铁锹

图 24 滩涂定量采样器

7.2.1.1.2 岩岸生物取样用 25cm×25cm 的定量框。若在高生物量区取样，可考虑用 10cm×10cm 定量框。计算覆盖面积，则用相应的计数框（图 25 之 a、b）。其框架可用镀锌铁皮或 3mm 厚的塑料板制成。配套工具有小铁铲（或木工凿子）、刮刀和捞网（图 25c～e）。



a—定量框；b—计算框；c—小铁铲；d—刮刀；e—捞网

图 25 岩石岸取样工具

7.2.1.2 漩涡分选装置和过筛器

7.2.1.2.1 漩涡分选装置

该装置参见图 21。用于潮间带滩涂调查的生物样品淘洗时，必须配备有 3～5kW 的简易汽油抽水泵作动力。

7.2.1.2.2 过筛器

当无漩涡分选装置时，或遇某些不宜用该装置淘洗的样品，可用过筛器(图 26)。筛网孔目 1.0mm。

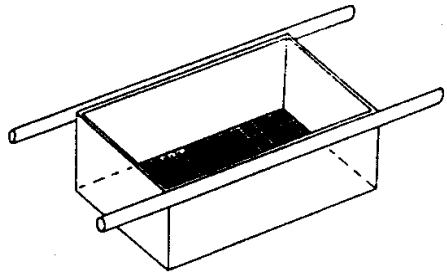


图 26 过筛器

7.2.1.3 其他配备

野外调查应配备的其他工具、器材、药品等列于表 24 中。

7.2.2 生物样品采集

7.2.2.1 定量取样

7.2.2.1.1 滩涂定量取样用定量采样器，样方数每站通常取 8 个(合计 0.5m²)。若滩面沉积物、类型较一致、生物分布较均匀，可考虑取 4 个样方。样方位置的确定切忌人为，可用标志绳索(每隔 5 或 10m 有一标志)于站位两侧水平拉直，各样方位置要求严格取在标志绳索所标位置，无论该位置上生物多寡，均不要移位。取样时，先将取样器挡板插入框架凹槽，用臂力或脚力将其插入滩涂内；继而观察记录框内表面可见的生物及数量；然后，用铁锹清除挡板外侧的泥沙再拔去挡板，以便铲取框内样品。铲取样品时，若发现底层仍有生物存在，应将取样器再往下压，直至采不到生物为止。若需分层取样，可视沉积物分层情况确定。

7.2.2.1.2 岩石岸取样一般用25cm×25cm的定量框，每站取2个样方。若生物栖息密度很高，且分布较均匀，可考虑采用10cm×10cm的定量框。确定样方位置应在宏观观察基础上选取能代表该水平高度上生物分布特点的位置。取样时，应先将框内的易碎生物（如：牡蛎、藤壶等）加以计数，并观察记录优势种的覆盖面积。然后再用小铁铲、凿子或刮刀将框内所有生物刮取干净。

7.2.2.1.3 对某些栖息密度很低的底栖生物（如：海星、海胆、海仙人掌等）或营穴居、跑动很快的种类（沙蟹、招潮蟹、弹涂鱼等），可采用25、50或100m^{2}的大面积计数（个数或洞穴数），并采集其中的部分个体，求平均个体重，再换算成单位面积（m^2）的数和量。

7.2.2.2 定性采集

为全面反映各断面的种类组成和分布，在每站定量取样的同时，应尽可能将该站附近出现的动植物种类收集齐全，以作分析时参考，但定性样品务必与定量样品分装，切勿混淆。

7.2.2.3 供分析体内污染物质的生物样品采集

采集供分析生物体内污染物质累积情况的生物种类，应按以下基本原则选择：

1）固定生活在一定区域、个体大小和数量适于分析测定的经济种和优势种；

2）力求在各断面、全年均能采到的种类；

3）对污染物质有较强忍受能力和较高富集能力的种类；

4）为保护水产养殖业和人体健康，对附近养殖品种也应采样分析。

7.2.3 水质和沉积物样品采集

7.2.3.1 水样采集

一般应在各断面调查的同时，于高平潮和低停潮时各采一次水样。河口区可考虑在两次采水期间内增加一次。岩沼和滩涂水洼内积水应另行采样。必要时，酌情对生物定量取样站穴内积水或沉积物间隙水采样分析。

7.2.3.2 沉积物取样

应与生物定量取样同步进行，取样站数依滩涂沉积物变化酌情而定。遇表、底层沉积类型有明显差异时，最好应分层取样，并记录其层、色、嗅味。其样品编号必须与该站生物定量样品编号一致。

7.2.3.3 采样工具及注意事项

水质和沉积物的采样工具、容器、采样量、处理、贮运，应严格按测定项目的具体要求，见GB 17378.3～GB 17378.5。

7.2.4 生物样品的淘洗与预处理

7.2.4.1 生物样品的淘洗

7.2.4.1.1 漩涡分选装置淘洗法

本法最好在小船上，随着潮水上涨或退落进行操作，以减少样品搬运困难。若无船只而考虑直接在滩涂上进行淘洗，分选装置和抽水泵应附设防沉底板，并须考虑水源的充分供给。分选操作步骤如下：

1）将该装置牢靠固定在小船（或滩涂）上，用消防水管连结装置和抽水泵。

2）启动抽水泵，待装置的筒体内约注有1/2海水时，调节分流器水压使涡流适中，并及时倒入待淘洗样品。

3）约经10min涡动，大多数体轻、柔软的生物则可以从出水口分选流出，截留于套筛（收集器）上。此时，可先取出该套筛并换上另一套筛，同时调节分流器加大水压，经3～5min，一些个体较重的生物也可分选出来。

4）当进出筒体的水色一致时，即可打开装置的分流阀、关闭进水阀，并取一网筛或搪瓷盘置于筒体下，打开排渣阀排出余渣。

5）认真将各套筛截留的和余渣中存留的生物挑拣干净。

6）按上述步骤分选其他样品。

7.2.4.1.2 过筛器淘洗法

本法需用人力操作，费力费时，但当条件不具备用漩涡分选装置时，仍是可靠方法。为了方便淘洗和减少样品搬运，断面应力求布设于近水源处。

7.2.4.2 生物样品的预处理

7.2.4.2.1 采得的所有定量和定性标本，需经洗净，最好能按种分开装瓶（或用封口塑料袋装）。若容器不足，应按食性及个体软硬分装，以防标本损坏。

7.2.4.2.2 潍涂定量调查，若因时间关系，不能将余渣中的标本拣取干净，可只拣出特殊标本后把余渣另行装瓶（袋），回实验室在双筒解剖镜下仔细挑拣。

7.2.4.2.3 谨防不同站或同一站的定量和定性标本混杂，务必按站在定量或定性标本装瓶（袋）后，立即用铅笔写好相应标签，分别投入各瓶（袋）中，标签式样如下：

项目编号_____ 地点_____
断面_____ 潮区_____ 站号_____
样方号_____ 标本号_____
沉积物_____ 取样面积_____ m^2
日 期_____年_____月_____日
种 名

定量标签

项目编号_____ 地点_____
断面_____ 潮区_____ 站号_____
标本号_____ 沉积物_____
日 期_____年_____月_____日
种 名

定性标签

7.2.4.2.4 按序加入5%中性甲醛固定液（方法见6.2.3.3.2条）。余渣固定时，可依固定液水样量，按1 000mL加入1g虎红（$C_{20}H_6Cl_2I_4O_5$）的量染色，便于室内标本挑拣。

7.2.4.2.5 为方便标本鉴定，对一些受刺激易引起收缩或自切的种类（如：腔肠动物、纽形动物），宜先用水合氯醛或乌来糖少许进行麻醉后再行固定；某些多毛类（如沙蚕科、吻沙蚕科），可先用淡水麻醉，然后用镊子轻夹头部使吻伸出，再加固定液；藻类标本除用5%中性甲醛溶液固定的外，最好能带回一些完整的新鲜藻体，制作腊叶标本，以保持原色和长久保存。制作方法见《中国经济海藻志》附录。

7.2.4.2.6 供分析测定体内污染物质的生物样品，切勿用甲醛溶液固定。而应洗净进行冰冻保鲜。各份样品用纱布或封口塑料袋包装，放入写明采集地点、时间、断面、潮区（带）的竹制或塑料标签。回实验室应及时送检。

7.2.5 野外记录

野外记录要有专人负责，认真填写“潮间带生物野外采集记录表”（表24）；绘制站位分布图；记录环境基本特征、生物分布、生物异常等现象；负责填写标签。

各断面的生物带以及出现的污染迹象、生物异常、死亡、群落演替等现象，应用录相机或照相机拍录下来。

野外记录是第一手资料，应用铅笔（或碳素墨水）填记，字迹须清晰，禁止涂改，记后应妥善收存，严防受潮或丢失。

7.3 室内标本整理、鉴定和保存

7.3.1 标本整理

7.3.1.1 核对

1）按调查地点、断面、站序，将定量和定性标本分开。

2）依野外记录，核对各站取得的标本瓶（袋）数，发现不符，应及时查找。

7.3.1.2 分离、登记

7.3.1.2.1 标本分离须按站进行，必要时可按样方分离，以免不同站（或不同样方）的标本混入。若有余渣带回，切勿遗忘将其中标本拣出归入。

7.3.1.2.2 分离的标本经初步鉴定，以种为单位分装，并及时加入固定液。除海绵、苔藓虫等含钙质动物用5%中性甲醛溶液固定外，其余仍用75%酒精保存。

7.3.1.2.3 按分类系统依次排列、编号，用绘图墨水写好标签，标签上填写的除标本号和种名因分离可能改变外，其余各项均应与野外投放的标签一致。待墨汁干后，分投各标本瓶中。

7.3.1.2.4 按新编序号分别将定量和定性标本登记于表25的“潮间带生物定量采集记录表”和表27的“潮间带生物定性采集记录表”中。

7.3.1.3 称重、计算

7.3.1.3.1 定量标本须固定3d以上方可称重，若标本分离时已有3d以上的固定时间，称重可与标本分离、登记同时进行。

7.3.1.3.2 称重时，标本应先置吸水纸上吸干体表固定液。称重软体和甲壳动物保留其外壳(必要时，对某些经济种或优势种可分别称其壳和肉重)。大型管栖多毛类的栖息管子、寄居蟹的栖息外壳以及其他生物体上的伪装物、附着物，称重时应予剔除。

7.3.1.3.3 称重采用感量为0.01g的药物天平、扭力天平、小戥或电子秤。在称重前或后还需计算各种生物的个体数(岩岸采集的易碎生物个体数由野外记录查得。群体仅用重量表示)。

7.3.1.3.4 将称重、计数结果填入表25各相应栏目，并注明是湿重(甲醛湿重或酒精湿重)、干重(烘或晒)。必要时可考虑称取灰分重。

7.3.1.3.5 依据取样面积，将表25中各种数据换算为单位面积的栖息密度(个/m^2)和生物量(g/m^2)。

7.3.2 标本鉴定

7.3.2.1 优势种和主要类群的种类应力求鉴定到种，疑难者可请有关专家鉴定或先进行必要的特征描述，暂以SP_1、SP_2、SP_3……表示，容后再行分析、鉴定。

7.3.2.2 鉴定时若再发现一瓶中有两种以上生物，应将其分出另编新号，注明标本原出处，并及时更改标签和表格中有关数据。

7.3.2.3 种类鉴定结果若与原标签初定种名不符，亦应立即更换标签和更改表中有误种名。

7.3.3 标本保存

经鉴定、登记后的标本，应按调查项目编号归类，妥善保存，以备检查和进一步研究。且须建立制度，定期检查、添加或更换固定液，以防标本干涸和霉变。

7.4 资料整理

7.4.1 种类名录

根据表25“潮间带生物定量采集记录表”和表26“潮间带生物定性采集记录表”，将每次采得的所有种类按分类系统依次列出，各种名后标明中名(或俗名)、采集时间、地点、断面、站号及分布潮区(带)。

7.4.2 种类组成表

根据各种名录，以断面或取样站为统计单位，计算各生物类群的种数和比率，填入表27“潮间带生物种类组成表”中，表内类群名称可依各地实情增减。岩石岸的统计，藻类按蓝藻、红藻、褐藻、绿藻等门类单独列表。

7.4.3 种类定量分布表

为便于分析各种类时空分布特点，可依据表25记录，以种为单位，将其在各断面、各站位、各不同季节的栖息密度和生物量汇总登记于表28“潮间带生物定量种类分布表”中。

7.4.4 几点说明

7.4.4.1 资料整理方法繁多，随着计算机应用逐渐普遍，各种数据处理、运用更为多样，可根据需要，依上述表格提供的基本素材作进一步加工。

7.4.4.2 若调查研究包括生长率、生殖力、性比例、干湿比、灰分重等指标时，所需表格请自行设计。

7.4.4.3 水质、沉积物、生物体内污染物质分析测定的资料整理，分别见GB 17378.4～17378.5。

7.4.4.4 资料评述方法，见本标准附录A。

表 23　潮间带生物生态调查器材、药品一览表

序号	品名	规　格	数量	序号	品名	规　格	数量
1	定量采样器	25cm×25cm×30cm	1～2 个	23	铁锤	羊角锤和乳子锤	各 1 把
2	铁锹	平头，20cm×15cm	2 把	24	钢丝钳	(8 寸) 264mm	1 把
3	定量框	25cm×25cm 和 10cm×10cm	各 2 个	25	剪刀	解剖剪和普通剪	各 1 把
4	计数框	25cm×25cm 和 10cm×10cm	各 2 个	26	镊子	钝头和尖头	各若干
5	小铁铲(凿)	口宽 2～3cm	2 把	27	搪瓷碗	白色	若干
6	刮刀		2 把	28	标本瓶(广口)	60、125、250、500mL	各若干
7	捞网	网目 1mm	2 个	29	标管(指形)	90mm×30mm 和 90mm×25mm	各若干
8	漩涡分选装置	见附图 21，附 3～5 kW 简易汽油抽水泵	1～2 套	30	塑料食品袋	大、中、小	各若干
9	过筛器	网目 1mm	2 个	31	纱布	普通	若干
10	验潮标杆	每 10～20cm 有一标志	1 套	32	棉纱绳	直径 2mm	若干
11	皮卷尺	15～20cm	1 盘	33	橡皮圈		若干
12	指南针	附水平仪(普通)	1 架	34	量筒	100、1000mL	各 1 个
13	照相机	135 型	1 架	35	麻醉剂	水合氯醛和乌来糖	若干
14	水色计	22 色	1 盒	36	固定剂	5%甲醛	若干
15	望远镜	普通	1 架	37	染色剂	虎红($C_{20}H_6Cl_2I_4O_5$)	若干
16	标志绳索	聚乙烯，长 50m (每 5m 有一标志)	1 条	38	标签	定量、定性及竹制标签	各若干
17	塑料桶	手提，大	8～10 个	39	记录表	野外采集记录表	若干
18	采集桶	镀锌铁皮制，背带式	2 个	40	工作日记		每人 1 本
19	解剖盘	搪瓷，21cm×27cm	4 个	41	铅笔	HB	若干
20	网筛	网目 1mm	2 个	42	小刀		2 把
21	标本箱	木制	若干	43	手电筒		2 把
22	冰罐	广口	2～3 个				

表 24 潮间带生物野外采集记录表

第 页

项目编号_____，地点_____，断面_____，站号_____，
样方号_____，潮带_____，站距_____ m，沉积物_____，
取样面积_____ m^2，样品厚度_____ cm，气温_____ ℃，水温_____ ℃，底温_____ ℃，
气象_____，露出时间_____，淹没时间_____，日期_____年_____月_____日

定量标本瓶数：	定性标本瓶数：		
主要种类或类群	个数	覆盖面积 m^2	生态特征

记事：

采集者_____ 记录者_____ 校对者_____

表 25　潮间带生物定量采集记录表

第　　页

项目编号_____，地点_____，断面_____，站号_____，
样方号_____，潮带_____，沉积物_____，取样面积_____ m^2
样方层次厚度_____ cm，采样日期_____年_____月_____日

次序	种　　名	数量	密度	生物量		备　　注
		个	个/m^2	g	g/m^2	
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						
13						
14						
15						
16						
17						
18						
19						
20						
合　　计						

称重者_____　填表者_____　校对者_____

表 26 潮间带生物定性采集记录表

第 页

项目编号_____，地点_____，断面_____，站号_____，
潮 带_____，沉积物_____，采集日期_____年_____月_____日

次序	种 名	俗 名	数 量（个）	备 注
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
11				
12				
13				
14				
15				
16				
17				
18				
19				
20				

鉴定者_____ 填表者_____ 校对者_____

表 27　潮间带主要生物类群种类组成统计表

地点_____，断面_____，时间_____年_____月_____日　　第　　页

站号	总种数	藻　类		腔　肠		多毛类		软　体		甲　壳		棘　皮		其　他		备　注
		种数	%	种数	%	种数	%	种数	%	种数	%	种数	%	种数	%	
合　计																

统计者_____　填表者_____　校对者_____

表 28 潮间带生物定量种类分布表

科名： 种名： 第 页

地点	断面	站号	潮带	标本号	采集日期	密度		湿重		干重		沉积物	备 注
						个	个/m^2	g	g/m^2	g	g/m^2		

鉴定者_____ 填表者_____ 校对者_____

8 叶绿素 *a* 的测定

8.1 荧光分光光度法

8.1.1 方法原理

以丙酮溶液提取浮游植物色素进行荧光测定，据提取液酸化前后的荧光值，可分别计算叶绿素 *a* 及脱镁色素的含量。

8.1.2 试剂配制

除非另作说明，所用试剂均为分析纯，水为蒸馏水或等效纯水。

8.1.2.1 丙酮溶液：9+1。

量取 900mL 丙酮(CH_3COCH_3)于 1 000mL 的量筒中，加水至标线。保存在棕色试剂瓶中。

8.1.2.2 碳酸镁悬浮液：10g/L。

称取 1g 碳酸镁($MgCO_3$)，加水至 100mL，搅匀，盛试剂瓶中待用，用时需再摇匀。

8.1.2.3 盐酸溶液：5+95。

在搅拌下，将 5mL 盐酸(HCl，ρ=1.18g/mL)缓慢地加到 95mL 水中，混匀，保存于滴瓶中。

8.1.2.4 硅胶

8.1.3 仪器设备

——荧光计；

——冰箱；

——离心机：4 000r/min；

——电动吸引器；

——过滤装置；

——玻璃纤维滤膜(Whatman GF/C，ϕ25mm)或 0.45μm 的纤维素酯微孔滤膜；

——离心管：具塞，10mL，若干；

——干燥器：1 个；

——棕色试剂瓶：100、1 000mL 各 1 个；

——量筒：100、200、1 000mL 各 1 个；

——定量加液器：10mL，1 个；

——滴瓶：100mL，1 个；

——镊子：2 把；

——一般实验室常用设备。

8.1.4 分析步骤

8.1.4.1 样品制备

量取一定体积海水(通常大洋水 250～500mL，近岸或港湾水 50～250mL)，加 2mL 碳酸镁悬浮液(8.1.2.2)，混匀，用滤膜(8.1.3)过滤，过滤负压不得超过 50kPa。

8.1.4.2 样品的提取

将带有样品的滤膜放入具塞离心管，加入丙酮溶液(8.1.2.1)10mL，摇荡，放置冰箱贮存室中 14～24h，提取叶绿素 *a*。若滤得的样品不能及时提取，应将该滤膜抽干、对折，再套上一张滤纸，置于含硅胶的干燥器内，贮存在低于 1℃冰箱中。

8.1.4.3 样品的离心

离心速度：3 000～4 000r/min。

离心时间：10 min。

8.1.4.4 样品测定

荧光计激发波长为 436nm，发射波长 670nm。

1）零点调节：用丙酮溶液(8.1.2.1)调节，使荧光计指针指零。

2）将提取的上层提取液注入测定池。

3）选择相应量程，测定样品的荧光值 R_b。

4）加 2 滴盐酸溶液(8.1.2.3)至测定池，摇匀，经 30 s 后再测其荧光值 R_a。

8.1.4.5 仪器校正

8.1.4.5.1 用标准叶绿素 *a* 校正。

8.1.4.5.2 用分光光度计校正：取一定体积正处于指数生长期的单细胞藻类培养液，依上述方法提取其叶绿素 *a*，用下节分光光度法测定、计算该提取液的叶绿素 *a* 浓度。将它稀释至荧光计可测范围的浓度(ρ_{chl-a})，用荧光计最低灵敏度量程测定此稀释液酸化前后的荧光值，依式(7)、(8)计算该量程的换算因子和酸化因子：

$$F_D=\frac{\rho_{chl-a}}{R_b} \quad \cdots\cdots (7)$$

和

$$R=\frac{R_b}{R_a} \quad \cdots\cdots (8)$$

式中：F_D——测定量程的换算因子；

ρ_{chl-a}——叶绿素 *a* 稀释液的浓度，μg/mL；

R——酸化因子；

R_b——酸化前测定的荧光值；

R_a——酸化后测定的荧光值。

按此法依次稀释原提取液，在荧光计其他量程上分别测定，即可得到各量程换算因子(F_D)。

仪器校正应定期进行。

8.1.5 记录与计算

将测得数据填于表 29 中，依式(9)分别计算叶绿素 *a* 和脱镁色素的浓度：

$$\rho_1=F_D\frac{R}{R-1}(R_b-R_a)\frac{v}{V} \quad 和$$

$$\rho_2=F_D\frac{R}{R-1}(R\cdot R_a-R_b)\frac{v}{V} \quad \cdots\cdots (9)$$

式中：ρ_1——样品中叶绿素 *a* 的浓度，μg/L；

ρ_2——样品中脱镁色素浓度，μg/L；

F_D——测定时所用量程的换算因子；

R——纯叶绿素 *a* 的酸化因子(随仪器而异)；

R_b——样品酸化前的荧光值；

R_a——样品酸化后的荧光值；

v——样品丙酮提取液的体积，mL；

V——海水样品的实用体积，L。

8.2 分光光度法

8.2.1 方法原理

以丙酮溶液提取浮游植物色素，依次在 664、647、630nm 下测定吸光度，按 Jeffrey-Humphrey 的方程式计算，可分别得出叶绿素 *a*、*b*、*c* 的含量。

8.2.2 试剂配制

8.2.2.1 丙酮溶液：9+1

配制方法同荧光分光光度法(8.1.2.1)。

8.2.2.2 碳酸镁悬浮液：10g/L

配制方法同荧光分光光度法(8.1.2.2)。

8.2.2.3 硅胶。

8.2.3 仪器设备

——分光光度计:波带宽度应小于 3nm,吸光值可读到 0.001 单位。附 3～10cm 测定池。

——玻璃纤维滤膜(Whatman GF/C,ϕ47mm)或 0.45μm 的纤维素酯微孔滤膜。

——离心管:具塞,10 或 15mL,若干。

——所需其他设备类同荧光光度法。

8.2.4 测定步骤

8.2.4.1 样品制备

量取 2～5 L 海水样品,加入 3mL 碳酸镁悬浮液(8.2.2.2),混匀,用滤膜(8.2.3)过滤,过滤负压不得超过 50kPa。

8.2.4.2 样品的提取

将带有样品的滤膜放入具塞离心管,加丙酮溶液(8.2.2.1)10mL,摇荡,放置冰箱贮存室中 14～24 h,提取叶绿素 a。若滤得样品不能及时提取,应将该滤膜抽干、对折,再套上一张滤张,置于含硅胶的干燥器内,贮存在低于 1℃的冰箱中。

8.2.4.3 样品离心

离心速度:3 000～4 000r/min。

离心时间:10min。

8.2.4.4 样品测定

小心将离心的上清液注入测定池。用丙酮溶液(8.2.2.1)作参比,分别在 750、664、647、630nm 波长处测定吸光值。其中,750nm 处的测定,用以校正提取液的浊度,当测定池 1cm 光程的吸光值超过 0.005 时,提取液应重新离心。

8.2.5 记录与计算

将测得数据填入表 30 中,分别把在波长 664、647、630nm 上测得的吸光值减去 750nm 下的吸光值,得到校正后的吸光值 E_{664}、E_{647}、E_{630}。再按式(10)、式(11)、式(12)计算叶绿素 a、b、c 含量。

$$\rho_{chl-a}=(11.85E_{664}-1.54E_{647}-0.08E_{630})\times\frac{v}{V\cdot L} \quad \cdots\cdots (10)$$

$$\rho_{chl-b}=(21.03E_{647}-5.43E_{664}-2.66E_{630})\times\frac{v}{V\cdot L} \quad \cdots\cdots (11)$$

$$\rho_{chl-c}=(24.52E_{630}-1.67E_{664}-7.60E_{647})\times\frac{v}{V\cdot L} \quad \cdots\cdots (12)$$

式中:ρ_{chl-a}——样品中叶绿素 a 含量,μg/L;

ρ_{chl-b}——样品中叶绿素 b 含量,μg/L;

ρ_{chl-c}——样品中叶绿素 c 含量,μg/L;

v——样品提取液体积,mL;

V——海水样品实际用量,L;

L——测定池光程,cm。

表 29　叶绿素 *a* 荧光分光光度法测定记录表

海区_____　　第_____页调查船_____

采样日期_____年_____月_____日至_____日　　分析日期_____年_____月_____日至_____日

序号	站号	水深 m	采样时间	瓶号	取样体积 L	提取液体积 mL	量程	光读数		叶绿素 *a* μg/L	脱镁色素 μg/L	备注
								R_b	R_a			
1												
2												
3												
4												
5												
6												
7												校准 ρ_{chl-a}
8												R_b
9												R_a
10												R_b
11												R
12												F_D
13												
14												
15												
16												
17												
18												

分析者_____　计算者_____　校对者_____

表 30　叶绿素 a、b、c 分光光度测定记录表

海区_____　调查船_____　深度(m)_____　纬度_____　经度_____第_____页

采样日期_____年_____月_____日至_____日　分析日期_____年_____月_____日至_____日

序号	站号	水深 m	采样时间	瓶号	取样体积 L	滤膜号	离心管号	提取液体积 mL	各波长(nm)时的吸光值				结果，μg/L			备注
									750	664	647	630	a	b	c	
1																
2																
3																
4																
5																
6																
7																
8																
9																
10																
11																
12																
13																
14																
15																
16																
17																
18																
19																
20																

附：测定池_____cm。　采样者_____分析者_____　计算者_____　校对者_____

9　粪大肠菌群检测

9.1　发酵法

9.1.1　方法原理

大肠菌群系一群在 37℃或 44℃生长时能使乳糖发酵、在 24h 内产酸产气的需氧及兼性厌氧的革兰

氏阴性无芽孢杆菌。大肠菌群数系指每升水样中所含有的"大肠菌群"的数目。一般在37℃培养生长的称为"总大肠菌群",在44℃培养生长的称为"粪大肠菌群"。海水检验采用44℃培养法,以检出粪大肠菌群。

发酵法系通过初发酵及复发酵二个步骤,以证实海水水样中是否存在粪大肠菌群并测定其数目。

9.1.2 试剂及培养基配制

9.1.2.1 试剂配制

1) 溴甲酚紫乙醇溶液:称取1.6g的溴甲酚紫[$C_6H_4SO_2OC(C_6H_2CH_3OHBr)_2$]溶于2～3mL乙醇($C_2H_5OH$)中,然后用蒸馏水定容到100mL。

2) 碳酸钠溶液:称取10.6g碳酸钠(Na_2CO_3)溶于蒸馏水,并定容到100mL。

9.1.2.2 培养基的配制

9.1.2.2.1 乳糖蛋白胨培养液:

1) 成分:

——蛋白胨	10.0g
——牛肉膏	3.0g
——乳　糖	5.0g
——氯化钠	5.0g
——溴甲酚紫乙醇溶液(9.1.2.1-1)	1mL
——蒸馏水	1 000mL

2) 制法:

将规定量的蛋白胨、牛肉膏、乳糖及氯化钠(NaCl)加热溶解于1 000mL蒸馏水中,用碳酸钠(9.1.2.1-2)溶液调节pH为7.2～7.4。

加入1mL溴甲酚紫乙醇溶液(9.1.2.1-1),混匀,分装于置有倒管的试管内(10mL左右)。置高压蒸气灭菌器中,于115℃(68.95kPa)灭菌20min。

根据需要,可按上述配方将蒸馏水由1000mL减为333mL,制成浓缩三倍的乳糖蛋白胨培养液备用。

9.1.2.2.2 EC培养基

1) 成分:

——胰蛋白胨或胨胨	20.0g
——乳糖	5.0g
——胆盐混合物或3号胆盐	1.5g
——磷酸氢二钾($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$)	4.0g
——磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	1.5g
——氯化钠(NaCl)	5.0g
——蒸馏水	1 000mL

2) 制法:

将上述成分加热溶解,分装于内装倒管的试管中。灭菌后pH值应为6.9。此培养基用前不宜置冰箱,以防检测时出现假阳性。

9.1.3 仪器设备

——恒温培养箱:37℃±1℃及44℃±0.5℃;

——干热灭菌箱;

——高压蒸气灭菌器;

——接种环;

——吸量管:1,10mL;

——试管：15mm×150mm，18mm×180mm；

——发酵倒管：5mm×30mm；

——纱布及棉花（塞试管用）；

——脱脂棉或白绒布：过滤培养基用；

——锥形瓶：500mL；

——采水样瓶：500mL 广口瓶；

——接种箱：（折叠式）。

9.1.4 样品采集

9.1.4.1 采样瓶

用于细菌检查的采样瓶，宜用可耐灭菌处理的广口玻璃瓶或无毒的塑料瓶。灭菌前，把具有玻璃瓶塞的采样瓶用铝箔或厚的牛皮纸包裹，瓶顶和瓶颈都要裹好，瓶颈系一长绳，在 121℃经 15min 高压灭菌。有的塑料瓶用蒸气灭菌会扭曲变形，可用低温的氯化乙烯气体灭菌。

9.1.4.2 水样采集

采样开瓶塞时，要连同铝箔或牛皮纸一起拿开，以免沾污，手执长绳的末端，将采样瓶投入选定点的海水内，采集水下约 10cm 处水样（若需分层采样则采用击开式或颠倒式采水器）。采好的水样需盖紧瓶塞、编好瓶号，按表 32 所列项目记录。水样在瓶内要留下足够的空间（至少 2.5cm 高）以备在检验前摇荡混匀。该法适用于沿岸水域的采集。

当使用调查船进行采样时，则需用采水器（击开式、复背式或 Niskin 采水器）采样，其步骤：

9.1.4.2.1 按预先选定的采样水层，挂好选定的采水器，以 1m/s 的速度下放采水器。测量钢丝绳的倾斜角，以便校正采水深度。采水器开启后，应停留一定时间，使水样注满容器。

9.1.4.2.2 采到样品后，迅速把水样转移至无菌瓶中，水样量必须满足进行两个平行试验之用，发酵法的水样不少于 100mL。滤膜法的水样不少于 300mL。

9.1.4.3 采泥样

用小型底栖生物柱状采泥器或弹簧采泥器采集泥样，采泥器出水后，在预先选定的泥层中用无菌刮板取一定量的样品置于灭菌容器中。

9.1.4.4 样品保存和储藏

采得的水样、泥样应立即送检，时间不超过 2h，否则，应将样品置于冰瓶或冰箱中，但也不得超过 24h，否则将影响检验结果。

9.1.5 检验步骤

9.1.5.1 初发酵试验

9.1.5.1.1 以无菌操作方法，等量吸取 10mL 经充分摇匀的水样，分别加入 5 支各盛有 5mL 已灭菌的三倍浓缩乳糖蛋白胨培养液的试管中（内有倒管）。

9.1.5.1.2 等量吸取 1mL 水样，分别加入 5 支盛有约 10mL 已灭菌的普通浓度乳糖蛋白胨培养液的试管中（内有倒管）。

9.1.5.1.3 吸取 1mL 水样注入盛有 9mL 已灭菌清洁海水的试管中，摇匀。另换一吸量管等量吸取此种稀释水样 1mL，分别加入 5 支盛有 10mL 已灭菌的普通浓度乳糖蛋白胨培养液的试管中（内有倒管）。

9.1.5.1.4 将上述 15 支试管充分混匀后，置于 44℃恒温箱中培养 24h。

9.1.5.2 复发酵试验

经培养 24h 后，将产酸（培养液变成黄色）产气（倒管上端积有气泡）及只产酸的发酵管，用一无菌环（3mm 直径）或木压舌板转接入 EC 培养液中，摇匀后置 44℃±0.5℃恒温箱中培养 24h±2h。在此期间内所得的产气阳性管即证实有粪大肠菌群存在。

依据阳性管数查对表 31，即可得每 100mL 水样中粪大肠菌群的最近似值（MPN），此数值再乘以 10，即求得每升水样中粪大肠菌群数。

若海水水样污染较严重，接种后15管全部产酸产气时，可将接种量减少为十分之一，即1mL的5管，0.1mL(1+9稀释的1mL)5管，0.01mL(1+99稀释的1mL)的5管。此时，由表31查得的每100mL水样中的大肠菌群数的最近似值应乘以100，即得一升水样中的粪大肠菌群数。

表31 大肠菌群检数表

(接种5份10mL水样、5份1mL水样、5份0.1mL水样时，各种不同阳性及阴性情况下100mL水样中大肠菌群数的最近似值和95%可信限值)

出现阳性份数			每100mL水样中大肠菌群数的最近似值	95%可信限值		出现阳性份数			每100mL水样中大肠菌群数的最近似值	95%可信限值	
5个10mL管	5个1mL管	5个0.1mL管		下限	上限	5个10mL管	5个1mL管	5个0.1mL管		下限	上限
0	0	0	<2			4	2	1	26	9	78
0	0	1	2	<0.5	7	4	3	0	27	9	80
0	1	0	2	<0.5	7	4	3	1	33	11	93
0	2	0	4	<0.5	11	4	4	0	34	12	93
1	0	0	2	<0.5	7	5	0	0	23	7	70
1	0	1	4	<0.5	11	5	0	1	31	11	89
1	1	0	4	<0.5	11	5	0	2	43	15	110
1	1	1	6	<0.5	15	5	1	0	33	11	93
1	2	0	6	<0.5	15	5	1	1	46	16	120
2	0	0	5	<0.5	13	5	1	2	63	21	150
2	0	1	7	1	17	5	2	0	49	17	130
2	1	0	7	1	17	5	2	1	70	23	170
2	1	1	9	2	21	5	2	2	94	28	220
2	2	0	9	2	21	5	3	0	79	25	190
2	3	0	12	3	28	5	3	1	110	31	250
3	0	0	8	1	19	5	3	2	140	37	340
3	0	1	11	2	25	5	3	3	180	44	500
3	1	0	11	2	25	5	4	0	130	35	300
3	1	1	14	4	34	5	4	1	170	43	490
3	2	0	14	4	34	5	4	2	220	57	700
3	2	1	17	5	46	5	4	3	280	90	850
3	3	0	17	5	46	5	4	4	350	120	1 000
4	0	0	13	3	31	5	5	0	240	68	750
4	0	1	17	5	46	5	5	1	350	120	1 000
4	1	0	17	5	46	5	5	2	540	180	1 400
4	1	1	21	7	63	5	5	3	920	300	3 200
4	1	2	26	9	78	5	5	4	1 600	640	5 800
4	2	0	22	7	67	5	5	5	≥2 400		

9.1.6 记录

将水样检验所得的结果列入表32中。

9.1.7 注意事项

9.1.7.1 进行大肠菌群的检验，必须按照无菌操作的要求进行工作，同时应作平行样品测定。

9.1.7.2 上述发酵法也适用于检测近岸海域沉积物中的粪大肠菌群。即以定量的沉积物经适当稀释并充分混匀后，吸取一定量水样代替，其他检验步骤与测水样相同。

9.2 滤膜法

9.2.1 方法原理

将水样注入已灭菌的放有微孔滤膜的滤器中，经过抽滤，细菌即被截留在滤膜上，然后将滤膜贴于

合适的培养基上进行培养。计数与鉴定滤膜上生长的大肠菌群菌落，换算出每升水样中含有的大肠菌群数。

9.2.2 M-TEC 培养基配制

9.2.2.1 成分

——蛋白胨 5g
——乳糖 10g
——酵母浸膏 3.0g
——氯化钠(NaCl) 7.5g
——磷酸氢二钾($K_2HPO \cdot 3H_2O$) 3.3g
——磷酸二氢钾(KH_2PO_4) 1.0g
——十二烷基磺酸钠[$CH_3(CH_2)_{10}CH_2SO_3Na$] 0.2g
——去氧胆酸钠($C_{24}H_{39}O_4Na$) 0.1g
——溴甲酚紫[$C_6H_4SO_2OC(C_6H_2CH_3OHBr)_2$] 0.08g
——溴酚红($C_{19}H_{12}Br_2O_4S$) 0.08g
——琼脂 15.0g
——蒸馏水 100mL

9.2.2.2 制法

按上述成分的规定量置于 1 000mL 蒸馏水中，加热溶解，用碳酸钠溶液(9.1.2.1-b)调 pH 为 7.4，分装于小烧瓶内，每瓶 100mL，于 115℃灭菌 15min，贮于冰箱中备用。

9.2.3 仪器设备

——滤膜过滤器；
——硝化纤维滤膜：孔径为 0.45μm；
——真空泵或其他抽气设备；
——无齿镊子；
——抽滤瓶；
——培养皿：6cm 或 9cm；
——其他有关仪器设备见(9.1.3)。

9.2.4 样品采集

采样瓶、采样方法及样品保存同(9.1.4)。

9.2.5 检验步骤

9.2.5.1 准备工作

9.2.5.1.1 滤膜灭菌：将滤膜放入烧杯中，加入蒸馏水，置于沸水浴中煮沸灭菌三次，每次 15min。前两次煮沸后需要换水并洗涤 2～3 次以除去膜内残余溶剂。

9.2.5.1.2 滤器灭菌：用点燃的酒精棉球火焰灭菌，也可用 121℃高压蒸气灭菌 20min。

9.2.5.2 过滤水样

9.2.5.2.1 用无菌镊子夹取灭菌滤膜边缘(粗糙面向上)，贴放在已灭菌的滤床上，稳妥地固定好滤器，连接好抽气系统。

9.2.5.2.2 于滤器内先加入约 10mL 已灭菌的清洁海水，然后再用已灭菌吸量管吸取一定量的(一般为 1mL 左右，随海水水样污染程度而异)充分混匀的待检水样，加入滤器中。

9.2.5.2.3 在负压 50kPa 下进行抽滤，快滤完前应再加入灭菌清洁海水少许以冲洗滤器内壁，使水样内细菌全部集聚于滤膜上。

9.2.5.2.4 水样滤完后，再抽滤约 5s 即停止抽气，取下滤器，用灭菌镊子夹取滤膜边缘部分，移放在 M-TEC 培养基上，滤膜截留细菌面向上，滤膜应与培养基面完全紧贴，两者间不得留有气泡，然后将平

板倒置，放入37℃恒温箱内培养0.5h，再移至44℃恒温箱内培养18～24h。

9.2.5.3 观察及报告结果

9.2.5.3.1 在M-TEC培养基上，粪大肠菌群菌落呈黄色，计数滤膜上此类菌落的数目。

9.2.5.3.2 对某些不典型或疑难的菌落，可取其一部分进行涂片、革兰氏染色、镜检。另一部分接种于EC培养液内(管内有倒管)，经44℃培养24h后观察是否产气，以决定此类可疑菌落是否为粪大肠菌群细菌。

9.2.5.3.3 根据过滤的海水水样量及滤膜上的粪大肠菌群数，计算出每升海水中的粪大肠菌群数。

9.2.6 记录

将水样检验所得的结果记入表33中。

9.2.7 注意事项

9.2.7.1 如海水水样混浊，过滤的水量又较多时，滤膜易被堵塞而影响检验，应用"发酵法"检验为宜。

9.2.7.2 水样过滤前，应将水样充分摇匀，使附着于颗粒、杂质上的细菌分散，以利于正确的检测。

9.2.7.3 滤膜上所生的菌数一般以不超过50个为宜，如菌落数过多则不易分散生长，影响菌落准确计数，遇此情况应将过滤水样量减少，或同一水样作几个不同稀释度，再行过滤，以选择其中合适的一个滤膜进行计数。同时须作平行样品测定。

9.2.7.4 采用新滤膜前，应对滤膜进行鉴定，即将已知的大肠埃希氏菌置于水样中用此种滤膜过滤，此时在滤液中应不得检出大肠埃希氏菌。

表32 粪大肠菌群记录表(发酵法)

海区_____船名_____航次_____采样器类型_____采样单位_____采样者_____

水样号	站号	站位		最大水深m	水层m	潮汐m	气温℃	采样时间 年 月 日 时 分	水温℃	盐度	pH值	接种水样量mL	初发酵试管					复发酵试管					分样粪大肠菌群数个/100mL	结论(平均粪大肠菌群数个/100mL
		纬度(°)	经度(°)										1	2	3	4	5	1	2	3	4	5		

水样收到时间_____检验开始时间_____检验完成时间_____检验发出时间_____

检验单位_____检验者_____校对者_____

表 33　粪大肠菌群记录表(滤膜法)

海区_____船名_____航次_____采样器类型_____采样单位_____采样者_____

水样号	站号	站位		最大水深 m	水层 m	潮汐 m	气温 ℃	采样时间 年 月 日 时 分	水温 ℃	盐度	pH 值	过滤水样量 mL	滤膜用培养基	培养温度 ℃	培养时间 d	滤膜上典型粪大肠菌群菌落(个)	结论	
		纬度(°)	经度(°)														分样粪大肠菌群数 个/100mL	平均粪大肠菌群数 个/100mL

水样收到时间_____检验开始时间_____检验完成时间_____检验发出时间_____

检验单位_____检验者_____校对者_____

10　细菌总数测定

10.1　平板计数法

10.1.1　方法原理

平板计数法是根据单一的细菌在平板培养基上,经若干时间培养,可形成一个肉眼可见的子细胞群(菌落)(亦即一个菌落代表一个细胞),通过计算菌落数而得知细菌数的。计数关键是必须尽可能将样品中的细菌分散成单个细胞,并制成均匀的不同浓度稀释液,将一定量的稀释液均匀地接种到盛有固体培养基的培养皿上(以下简称平皿)。

10.1.2　试剂和培养基的配制

10.1.2.1　试剂配制

10.1.2.1.1　氢氧化钠溶液:160g/L。

称取氢氧化钠(NaOH)160g,溶于 1 000mL 的蒸馏水中。

10.1.2.1.2　吐温溶液:1+2000

量取 1mL 吐温 80,溶于 2 000mL 蒸馏水中。

10.1.2.2　培养基配制

10.1.2.2.1　2216E 培养基的成分

——蛋白胨　5g
——酵母膏　1g
——磷酸高铁　0.1g
——琼脂　20g
——陈海水　1 000mL

10.1.2.2.2　制备

将上述成分加热溶解，用氢氧化钠溶液(10.1.2.1.1)调节pH为7.6。分装于锥形瓶中，置高压蒸气灭菌器中，在121℃(约105kPa)下灭菌20min，尔后，将此培养基分别倒入经灭菌的各平皿中，每平皿约15mL，待其冷却凝固，置冰箱内保存备用。

10.1.3　仪器设备

——恒温培养箱：25℃；
——干热灭菌箱；
——高压蒸气灭菌器；
——培养皿：直径9cm；
——吸量管：1mL；
——试管 mm：12×150；
——纱布和棉花：塞试管用；
——采水样瓶：250mL广口瓶；
——玻璃刮棒：接种用；
——锥形烧瓶；
——牛皮纸；
——线绳；
——电炉：2 000W；
——精密pH试纸；
——超净工作台；
——一般实验室常用仪器设备。

10.1.4　样品采集(同9.1.4)。

10.1.5　测定步骤

10.1.5.1　依水样量，按100mL水样加1mL吐温溶液(10.1.2.1.2)，充分摇匀，使样品中的细菌细胞分散成单一细胞。

10.1.5.2　以无菌操作法吸取1mL水样注入盛有9mL灭菌陈海水的试管内混匀，并依同法依次连续稀释至所需要的稀释度(倍数)。稀释度依水样含菌量而定，以每平皿的菌落数在30～300个之间为宜。每种稀释度需有3个平行样。

10.1.5.3　取稀释好的水样0.1mL，滴入制好的平皿上，用灭菌玻璃刮棒将菌液涂抹均匀，平放于超净工作台上20～30min，使菌液渗入培养基。

10.1.5.4　将此平皿置25℃恒温箱内培养7d，取出计数菌落。

10.1.5.5　菌落计数法：

10.1.5.5.1　当平皿上出现较大片菌苔时，则不应计数。

10.1.5.5.2　选择菌落数在30～300个之间的平皿，以平均菌落数乘其稀释倍数，即为该水样的细菌数。

10.1.5.5.3　若有两种稀释度的平均菌落数均在30～300个之间，则应按两者菌落数之比值决定，比值小于2，取两者的平均数，若大于2，取其较少的菌落数。

10.1.5.5.4　若所有稀释度中各不同稀释度的平均菌落数均大于300，则以稀释度最高的(浓度最低)

平均菌落数乘其稀释倍数。

10.1.5.5.5 若所有稀释度中各不同稀释度的平均菌落数均小于30，则用稀释度最低的(浓度最高)平均菌落数乘其稀释倍数。

10.1.5.5.6 若所有稀释度都没有长出菌落，同时也没检出抑制物，则报告小于1乘其最低稀释倍数。如：最低稀释度(倍数)为1：100，则报告其群落数小于100。

10.1.6 记录与计算

将计数结果填于表34中。

10.1.7 注意事项

10.1.7.1 细菌学检验必须严格遵照无菌操作。

10.1.7.2 采得样品应及时送检，时间不得超过2h，否则，水样应放置冰瓶保存，但保存时间也不应超过6h。

10.1.7.3 平板应预先制作好，否则存留于平板上的水分会影响检验结果。

10.2 荧光显微镜直接计数法

10.2.1 方法原理

样品中的细菌经吖啶橙染色，用预先经伊拉克黑染色的微孔滤膜过滤，截留在滤膜上(黑色背景)。在荧光显微镜下观察，可见细菌发荧光绿，由此可直接计数。一般而言，样品中的细菌量在10^3～10^8个/mL时，用此法效果较好，准确性高。

10.2.2 试剂配制和处理

10.2.2.1 伊拉克黑染色液：2g/L

称取1g伊拉克黑(Irgalan black)溶于500mL含1%醋酸(CH_3COOH)的无菌无颗粒的溶液中，该液可长期保存于冰箱中，用前需经0.2μm滤膜过滤。

10.2.2.2 吖啶橙染色液：1g/L

称取1g吖啶橙染色剂，溶解于1 000mL水中，经0.2μm的微孔滤膜过滤，以除去染料中不溶颗粒和细菌。该染色液可于冰箱中(5℃)保留数周。但每次使用时应检查该染色液是否染菌。若有染菌，应重新过滤方可使用。

10.2.2.3 无菌冲洗水

用蒸馏水经0.20μm微孔滤膜过滤而成。

10.2.2.4 甲醛(HCHO)溶液：40%

经0.20μm滤膜过滤待用。用于固定海水样品，按水样量的3%～5%加入。

10.2.3 仪器设备

——荧光显微镜(具有配套荧光装置的显微镜)；

——过滤器：内径25mm，容积15mL，玻璃制；

——微孔滤膜：孔径0.2μm，直径25mm；

——移液管：1、5mL(自动移液管)；

——一般实验室常用仪器设备。

10.2.4 样品采集(同9.1.4)

装样瓶必须清洗干净、无菌，取样量10mL以上。装样后立即用无菌注射器加入甲醛溶液固定(加入量见10.2.2.4)，混匀置冰瓶中保存。若现场立即分析，可不必加甲醛溶液固定。样品在2周内分析完毕。

10.2.5 测定步骤

10.2.5.1 取0.20μm微孔滤膜数片，于伊拉克黑染色液(10.2.2.1)中浸泡4h以上，用时取出用无菌冲洗水(10.2.2.3)漂洗数次。滤膜光面朝上，平贴于滤器底部，使滤膜上下不留气泡。然后，在水平台面上安好滤器，用夹子夹紧，使滤器处于水平状态。

10.2.5.2 摇匀样品，用移液管吸取一定量水样注入滤器内(注意勿使移液管触及滤膜)，同时加入 2～4 滴(约 0.2mL)吖啶橙染色液(10.2.2.2)，混匀，经染色 3min(秒表计时)，即在负压 50kPa 下滤去染色液。之后，用无菌冲洗水(10.2.2.3)沿滤器筒壁冲洗数次，再将滤液抽干。

10.2.5.3 卸下滤器，用镊子轻轻掀起滤膜，移至洁净载玻片上，于滤膜上滴浸油 1 滴，盖上盖玻片，移置荧光显微镜油镜下观察计数，按一般显微镜观察方法操作，至少随机计算 20 个视野的细菌数，每视野的细菌数一般以 30～50 个为宜。

10.2.6 记录与计算

10.2.6.1 将每视野细菌数登记于表 35 中，并求平均数($\bar{x}$)。

10.2.6.2 依式(13)计算样品中的细菌含量(个/mL)：

$$E=\bar{x}\frac{S_1}{S_2}\frac{1}{V} \quad \cdots\cdots (13)$$

式中：E——样品中细菌的含量，个/mL；

$\bar{x}$——各计数视野细菌总数的平均值，个；

S_1——滤膜面积，mm^2；

S_2——显微镜油镜视野的面积，mm^2；

V——过滤水样的体积，mL。

10.2.7 注意事项

10.2.7.1 检测过程，应按一般细菌学检验的无菌操作进行。

10.2.7.2 每次检测前应作空白对照。

10.2.7.3 各种染色液和冲洗用水，需经过滤，不得含有颗粒和细菌。

10.2.7.4 若样品于野外加入甲醛固定，换算时的水样体积应作必要修正。如：10mL 水样，加入 0.5mL 甲醛，则计算公式中的过滤水样体积应除以 10.5。

表 34 细菌平板计数记录表

海区		站号		水深 m		采样时间	
水温 ℃		潮汐 m		盐度		pH	
样品号	水层 m	稀释度	菌落数	平均值	细菌数 个/mL		

采样者_____分析者_____计算者_____校对者_____

表 35　荧光显微镜直接计数海洋细菌总数记录表

第　　页

海区	站号	站位经度：　　纬度：	水深 m	调查船
采样器型号		采样时间：　　年　　月　　日　　时　　分		测定时间：　　年　　月　　日

样品号 No	水温 ℃	水层 m	样品量 L	稀释度	计数记录					平均值	细菌数，个/mL

采样者_____分析者_____计算者_____校对者_____

11　生物毒性试验

11.1　实验设施及仪器设备

11.1.1　供水系统

由潜水泵、输水管道、砂滤设备、贮水池等构成。材料应无毒和耐海水腐蚀。

11.1.2　生物培养设备

——贮养池或大型玻璃水箱；

——玻璃缸或试验水槽：依受试生物个体大小选用合适容器；

——充气增氧机；

——仪器设备；

——筛绢：40、100、200、300 目；

——过滤器：包括抽滤设备；

——微孔滤膜：0.45μm，直径与滤器内径相等；

——计数框：1mL；

——冰箱；

——一般实验室常用仪器设备。

11.2 受试生物

11.2.1 受试生物的选择

11.2.1.1 栖息于非污染区、生长良好、健康无病的个体；

11.2.1.2 对污染反应较敏感的种类；

11.2.1.3 应是地理分布较广、数量较大，全年在某一实际海区容易采到的、并对其生活习性清楚，易在实验室条件下培养的种类；

11.2.1.4 受试生物宜来源于同一地点、同一种群，力求个体大小基本一致；

11.2.1.5 为适应更新式试验和提高试验的敏感度，建议选用受试生物的早期发育阶段（受精卵、幼虫或幼体）。

11.2.1.5.1 贝类：

褶牡蛎（*Ostrea plicatula*）——胚胎期或幼虫期。

太平洋牡蛎（*Ostrea gigas*）——胚胎期和幼虫期。

缢蛏（*Sinonovacula constricta*）——胚胎期、幼虫期和稚贝期。

菲律宾蛤仔（*Ruditapes philippinarum*）——胚胎期、幼虫期和稚贝期。

海湾扇贝（*Argopecten irradians*）——胚胎期、幼虫期。

泥螺（*Bullacta exarata*）——受精卵及幼虫期。

11.2.1.5.2 甲壳类：

长毛对虾（*Penaeus penicillatus*）——受精卵及无节幼体。

中国对虾（*Penaeus chinensis*）——受精卵及无节幼体。

桡足类、端足类。

11.2.1.5.3 棘皮动物：

海胆（*Echinoidea*）——胚胎期及幼体期。

11.2.1.5.4 多毛类沙蚕（如：*Neries sp.*）——幼体。

上述所列受试生物种类供参考，各地可根据试验目的和当地海况选择适宜的受试生物。

11.2.2 受试生物的采集

11.2.2.1 定居性或活动能力很小的种类，可直接用铲、耙采集，选取无损伤、大小相近的个体。

11.2.2.2 活动性强的种类（如：鱼、虾）和浮游桡足类，需用曳网、浮游生物网采捕，谨防弄伤。

11.2.2.3 若试验材料选用受精卵、幼虫或幼体而需进行室内人工催产培养的，亲体应选体壮、性腺成熟者。

11.2.2.4 采得的受试生物在运输过程中，应保证其存活条件（如：温度、供氧等），避免碰撞致伤，尽快带回实验室。

11.2.3 受试生物的贮养

11.2.3.1 贮养池（或水箱）事先应清洗干净，进行消毒灭菌，然后由供水系统提供无受污染的清洁海水。

11.2.3.2 小心洗净、剔除受试生物体表的沙泥和附着物，再用清洁海水冲洗，以防将病菌带入池中。

11.2.3.3 将受试生物轻放入池，控制池中的水温、盐度、pH 等，使其大体接近于采集的自然海区。并给予适当充气。

11.2.3.4 根据受试生物食性，适当投饵，经常换水和清除粪便、残饵，以防水质恶化。

11.2.3.5 受试生物需经一星期以上驯养才能用于实验，若驯养期间内有 10%以上个体死亡，则该批

生物不能用于试验，应全部弃去，另采新的受试生物。并检查死亡原因。

11.2.3.6 用受精卵、幼虫、幼体作试验，必须取性腺成熟个体，经人工催产、培养。部分受试生物的催产及幼虫培养条件见附录 B。同一系列的试验材料应力求来自同一亲体，并应选择生长发育正常者。

11.3 污染水样采集和致毒试验液的配制

11.3.1 污染水样采集及处理

11.3.1.1 采样应用无毒容器，水样必须装满，以免运输过程剧烈摇荡而改变某些水质特性。采集的水样量，需按实验设计和次数备足。同一系列试验，应用同时同地采的污水。

11.3.1.2 采水时应记录采样时间、地点，现场测量水温，并观察记录污染的表观现象。

11.3.1.3 采回的水样最好立即用于试验，若需放置，应低温保存。水样应进行化学分析，测定其盐度、pH、水温、溶解氧(DO)、化学耗氧量(COD)、营养盐及主要污染物含量，为配制致毒试液提供参考。

11.3.2 致毒试液的配制

11.3.2.1 毒性试验的浓度范围的确定一般需做预试验，预试验可用较大浓度间隔按等比级数配制污水稀释液，如：按污水体积比配制出如下浓度组：0.01%、0.1%、1.0%、10%、100%。

11.3.2.2 正式试验可根据预试验所提供的浓度范围(引起少数生物死亡的浓度为下限，引起 90%以上死亡的为上限)，按相等的浓度对数间隔安排 5 个以上的试验浓度组。

11.3.2.3 配制不同浓度的致毒试液时，应先将污水轻轻摇匀，再按需要量取一定体积用清洁海水稀释。注意调节其盐度(用海盐或除氯自来水)，使与受试生物的适盐范围(或驯养时的盐度)基本一致。

11.3.2.4 若要试验某特定污染物的毒性效应，可人工配制该种污染物的储备液，然后，参照化学分析测得的污水中该污染物的含量，酌情按上述方法，用洁净海水配制试液。石油类污染物，可单独试验水溶性组分或用少量低毒性的分散剂制备乳浊液后再行配制。

11.4 试验步骤

11.4.1 备好若干洗净的试验容器(成体按每克体重 1L 的用水量选用玻璃缸或水槽；受精卵和幼体用 0.5～1L 左右的烧杯)，并按对照组和各不同浓度组分别编号。

11.4.2 将上述配好的致毒试液，按浓度顺序分别倒入各相应的试验容器中，对照组可依试验目的，加入洁净的海水或受纳水体的海水。

11.4.3 按从低浓度至高浓度顺序，移入受试生物。若受试生物是成体，每组放入 10 个以上；若受试生物属受精卵，密度约 20 000～30 000 个/L；若为贝类幼虫，密度 10 000～15 000 个/L；甲壳类无节幼体 200～500 只/L 左右。受试生物移入试液前，需经必要检查，受精卵、幼小个体应在解剖镜下观察，去除死亡和异常个体。

11.4.4 记录试验起始时间，检查时间是 2、4、6、8、10、12、16、20、24、32、40、48、60、72、96h，发现死亡个体，应及时拣出，统计记录 24、48、72、96h 各时间内的死亡或异常的总个体数。受精卵和微小个体可用显微镜或解剖镜观察。

11.4.5 试验期间，每隔 24h 更换一次试液，注意勿改变各组试液浓度。换新试液时，微小个体和受精卵可用孔径小于受试个体的筛绢滤出，再放回相应的新试液中。

11.4.6 试验结束，为统计各组个体差异，应及时测量各组个体大小(不宜试验前测量，以免损伤)。微小个体可进行显微测量若干数量，以比较各组生长发育受抑制情况。必要时，还可取水样和受试生物样分析，比较试验前后污染物质在水体和生物体内的变化。

11.4.7 每一试验应有两个平行试验，并按上述步骤和条件，重复试验两次以上。

11.5 记录与计算

11.5.1 按各致毒时间，把观察到的受试生物死亡或异常的个体数填入表 36 中。

11.5.2 依表 36 数据，计算死亡百分率。由死亡百分率，在表 37 中查出对应的概率单位填入表 38 中。并依试液浓度算出其浓度对数一并填入表 38 相应栏目。

11.5.3 半致死浓度(LC_{50})的求法

11.5.3.1 概率单位法

求算某一试验时间的半致死浓度(LC_{50}),可依表 38 中该试验时间的一组数据,以死亡率的概率单位为纵坐标,试液浓度的对数为横坐标,在对数坐标纸上标出各数据点,拟合各数据点(应尽量照顾概率单位 5 附近的点)绘出一直线,在直线上查出概率单位为 5(死亡率 50%)的点所对应的浓度对数值($\lg LC_{50}$),其反对数即为 LC_{50}。

由此法得出的 $\lg LC_{50}$ 的 95%可置信限为:$\lg LC_{50} \pm 1.96 \times \frac{2S}{\sqrt{2N}}$ …… (14)

式中:S——表示标准差。亦即相当于直线斜率的倒数。数值等于概率单位 6 和 4 之差除其相应的浓度对数值之差;

N——死亡率在 16%~84%(概率单位 4 和 6)范围内的各组受试生物总数。

由此算出的 $\lg LC_{50}$ 的 95%可置信限,其反对数即为 LC_{50} 的 95%可置信限。

11.5.3.2 平均致死量法(又称寇氏法)

该法计算 LC_{50} 较简便,但必须具备如下条件:各试验组的受试生物个数一样;各试验组的浓度应按等比级数分组(相邻两组的浓度对数值之差相等);试验浓度组不得少于 5 组;最低试验浓度和最高试验浓度的死亡率应分别等于(或接近)0 和 100%。其计算如式(15):

$$\lg LC_{50} = X_m - d(\Sigma p_i - 0.5) \quad \cdots\cdots (15)$$

式中:X_m——最高试验浓度的对数值;

d——相邻两组浓度的对数值之差;

Σp_i——各组死亡率的总和。

由上式计算出的 $\lg LC_{50}$,其反对数即为 LC_{50}。

由此法求得的 $\lg LC_{50}$ 的 95%可置信限为:

$$\lg LC_{50} \pm 1.96 \times d\sqrt{\frac{\Sigma p_i - \Sigma p_i^2}{n}} \quad \cdots\cdots (16)$$

式中:p_i——某一试验组的死亡率;

d——相邻两组浓度的对数值之差;

n——一组受试生物的个数。

求出 $\lg LC_{50}$ 的 95%可置信限后,其反对数即是 LC_{50} 的 95%可置信限。

11.5.4 半效应浓度的求法

半效应浓度(EC_{50})的求法与 LC_{50} 的求法相同,只需把受试生物的死亡率换成发生异常反应的百分率即可。

11.6 注意事项

11.6.1 试验期间,温度、pH、光照等条件,必须适合受试生物的要求,受精卵和幼体早期发育阶段对环境变化特别敏感,应特别注意控制。重复试验,上述条件应基本一致。

11.6.2 更新式试验,水体应保证足量,以免受试生物因缺氧死亡。若需通气增氧也不宜剧烈曝气(特别是含有挥发性污染物的试验),以免污染物毒性受影响而降低。

11.6.3 试验过程,一旦发现死亡个体,应及时拣出,登记入表 36 以防腐烂影响水质。更换试液时,可依存活的个数,适当减少试液用量。

11.6.4 若发现对照组受试生物的死亡率大于最低浓度试验组,该批试验数据应舍弃。

11.6.5 试验容器应按分析化学要求清洗干净,防止沾污。在同一批试验中,各组容器应固定,以避免倒序使用。

表 36 毒性试验记录表

受试生物种_____试验起止时间_____

试液类型_____

试验组别	试液浓度	受试生物数	各致毒时间生物死亡累计数														
			2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h	16 h	20 h	24 h	32 h	40 h	48 h	60 h	72 h	96 h
备注																	

试验者_____记录者_____校对者_____

表 37 百分率与概率单位换算表

百分率 %	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	/	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33

表 38 毒性试验数据统计换算登记表

受试生物种_____ 试验起止时间_____

试液类型_____

试液浓度	浓度对数	受试生物数	死亡数	死亡率，%	概率单位	备 注

致毒时间： h	LC_{50}(或 EC_{50})：	LC_{50}(或 EC_{50})的 95%置信限：

记录计算者_____ 校对者_____

12 鱼类回避反应实验

12.1 实验装置及仪器设备

12.1.1 回避槽

回避槽有多种形式可选用，如长方型、Y 型、圆型和平行槽等，无论何型均应用无毒材料制成。通常其结构，应能使清水和污水进入槽内形成清水区、污水区和混合区，还应配有自动关闸装置和计时器，以便定时关闸观察鱼在槽内的分布。

12.1.2 供水设备

两只容量大于 50L 具阀门的容器，分别用于盛放待测试液（污染水样或毒物）和清洁海水（或受纳水体海水），容器的出水口与回避槽的进水管相连，由阀门控制进水流量，所有的材料亦应无毒。

12.1.3 海水供水系统及生物贮养设备按(11.1.1)和(11.1.2)的要求配置。

12.1.4 仪器设备

一般实验室常用的仪器设备。

12.2 受试生物

12.2.1 受试生物的选择

一般采用幼鱼或鱼苗，也可选用虾类等游动性动物。

受试生物选择的基本原则要求见(11.2.1.1)～(11.2.1.4)。

12.2.2 受试生物的采集

12.2.2.1 受试生物可从自然海区采集或向养殖场购买；

12.2.2.2 应是健康、无病、无损伤、游动活泼者；

12.2.2.3 采集时避免离水、最好用桶捞取，小心移入运输容器；

12.2.2.4 运输容器应事先清洗干净，灭菌。运输过程中应尽量避碰撞，并注意充气增氧。

12.2.3 驯养

按 11.2.3 条要求。

12.3 污染水样的处理及试液的制备

12.3.1 污染水样的采集及处理

12.3.1.1 污染水样的采集及处理方法按(11.3.1)要求进行。

12.3.1.2 为了解污染水样的毒性，可按前面《生物毒性试验》的方法求出半致死浓度(LC_{50})。

12.3.2 试液的配制

12.3.2.1 用于回避实验的污染水样应于用时现配，用洁净海水逐级稀释，配制成所需浓度的试液。

12.3.2.2 试验浓度范围一般可选取 LC_{50}的 0.05～0.5 倍量并在该浓度范围内按等比级数设计 5 个以上试验组。

12.4 实验步骤

12.4.1 洗净回避槽 12.1.1，注入清洁海水，使槽内水位高度能使受试鱼自由活动，放入 10 尾受试鱼，驯养 0.5～1.0h。

12.4.2 在两个供水容器 12.1.2 中，分别盛放清洁海水和待试试液。

12.4.3 用乳胶管连接回避槽与两供水容器的进出水口，控制适当的相同流量。

12.4.4 先把计时器拨到预定的实验时间(10～20min)，在放海水和试液进入槽内的同时，启动计时器，试验开始。

12.4.5 待到预定的实验时间，自控装置自动使关闭闸板。观察清水区，试液区和混合区内鱼的分布和游动情况，并把鱼在各区内的尾数填入表 39 中。

12.4.6 把受试后的鱼移入清洁海水中暂养 24h，观察其活动和存活情况，以确定是否发生死亡或其他迟发性中毒症状。

12.4.7 每次实验结束，应把回避槽内的水放尽，用清洁海水冲洗数遍后，再进行下一组实验。

12.5 记录计算

由表 40 记录的数据，用式(17)计算回避率(P)：

$$P(\%)=\frac{E-A}{T}\times 100 \quad \cdots\cdots (17)$$

式中：E——清洁海水区鱼的尾数；

A——污水试液区鱼的尾数；

T——两区内鱼的总尾数。

上式表明，当鱼全部进入清洁海水区时，回避率为 100%；全部进入试液区，回避率为−100%；鱼全部集中在混合区，回避率为零。

根据回避率及其相应的效应浓度数据，按(11.5.3)的方法求出半数回避浓度(EC_{50})。

12.6 注意事项

12.6.1 实验装置应设在安静的室内，避免强光、噪声，走动等，以免惊动鱼的正常游动，影响实验结果。

12.6.2 试液和实验用的海水，其水温、盐度应尽量与驯养条件一致，若差别较大，需先行调节。

12.6.3 进入回避槽的清洁海水和试液，应依回避槽的设计要求，控制相同的流量。同批试验不得改变已定流量，试验时间亦应一致。

12.6.4 受试生物应在实验之前 24h 停止投饵，以免影响实验结果。

12.6.5 每批实验都必须用没接触过毒物的鱼，经实验接触过毒物的鱼不宜用作下一次实验。

12.6.6 每个试验浓度最好应有 8～10 次的重复实验。

表 39 鱼类回避反应实验记录表

污染水样采集海区_____采集时间_____实验日期_____

受试生物种类_____采集地点_____平均体长_____cm

污水含量 %	鱼在回避槽内分布尾数			回避率，%	回避现象观察	24h 内的死亡尾数	备注
	清水区	试液区	混合区				

实验者_____记录者_____校对者_____

13 滤食率测定

13.1 实验设施及仪器设备

13.1.1 海水供水系统(同 11.1.1);

13.1.2 贮养池(同 11.1.2);

13.1.3 仪器设备

——试验缸(或水槽):容量 20～50L,用玻璃、有机玻璃或其他无毒材料制成;

——过滤器;

——微孔滤膜:0.45μm;

——卡尺;

——电子颗粒计数器;

——荧光计;

——显微计数法所需的仪器设备(见 5.3.2);

——叶绿素 *a* 测定所需的仪器设备(见 8.1.3);

——一般实验室常用的仪器和设备;

仪器设备的 e～h 项,可依所选择的藻类计数或测定方法加以配备。

13.2 实验生物

13.2.1 受试生物的选择

13.2.1.1 受试生物一般选用双壳类滤食性动物,建议采用如下的生物种:贻贝(*Mytilus spp*、菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippiarum*)、蛤蜊(*Mactra spp*)等。此外其他滤食性动物也可考虑。

13.2.1.2 受试生物选择的基本原则及其他要求见(11.2.1.1～11.2.1.4)。

13.2.2 受试生物的采集与驯养,按(11.2.2)和(11.2.3)要求进行。

13.2.3 饵料单细胞藻

用于滤食实验的饵料单细胞藻应选择非群体性,能在海水中悬浮均匀分布的种类,建议采用如下的种类:湛江叉鞭藻(*Dicrateria Zhanjiangensis*)、三角褐指藻(*Phaeodactylum triconutum*)、牟氏角刺藻(*Chaetoceros calcitrons*)等。

13.3 污染水样的处理及试液的制备(同 11.3)。

13.4 实验步骤

13.4.1 致毒实验

13.4.1.1 根据实验需要准备若干试验缸(或水槽),清洗干净后按对照组和致毒浓度组的顺序编号。

13.4.1.2 在各试验缸中分别加入不同浓度的试液,对照组用清洁海水(或受纳水体海水)。用水量按每个受试生物 1.0L 计。

13.4.1.3 选取滤食活动正常,个体大小基本一致,经驯养过的生物等数量分组移入各试验缸。

13.4.1.4 致毒时间可为 24、48、96h 或更长的时间,每隔 24h 更换一次新试液。

13.4.1.5 致毒期间应注意观察受试生物是否有死亡或其他异常现象,并做记录。

13.4.2 滤食实验

13.4.2.1 预定的致毒时间一到,把各试验缸中的试液倒弃,保留缸内生物,用海水冲洗数遍,换上等量的含藻海水。并另设一未放生物的含藻海水样作对照,以检测海水中藻类在试验时间内的浓度变化。

13.4.2.2 含藻海水应事先配好,使水体中的藻类浓度约为 1×10^4～4×10^4 个/mL,搅拌均匀后再加入各试验缸。

13.4.2.3 换上含藻海水后,各试验缸要立即同时取样,经滤食 1～2h,再同时取样一次,记录下二次取样的时间。按藻类浓度测定法(13.4.3),分析两次藻类浓度的变化。

13.4.2.4 取出的水样应按实验序号记录编号,以免弄乱,应取的水样量及固定方法应按选用的藻类测

定方法进行。

13.4.2.5 滤食实验结束后，用卡尺量取各组受试生物的壳长，计算平均值填入表 39 中。

13.4.3 藻类浓度测定

藻类浓度测定可采用如下方法中的一种：

13.4.3.1 藻类细胞显微计数法。按(5.3.2)要求进行。

13.4.3.2 电子颗粒计数法

取水样 50mL 移入仪器的计数杯中，启动搅拌器，每次进样量 50μL。仪器测定条件：电眼孔器直径 100μm，用过滤海水作电解液。粒径测定范围按藻类的颗粒大小分布而定。每测样应读取二次测值，取其平均值并换算成水样的藻类含量(个/mL)。

13.4.3.3 活体细胞荧光法

用荧光计测定水样中藻类的活体细胞荧光值，仪器的激发波长 436nm，发射波长为 680nm。取 5mL 水样移到测试管中，把测试管放入吸收池，选择适当的测试量程，读取两次测值，取其平均值与标准对照，查出水样的藻类含量(个/mL)。测定时用已知浓度的藻液作标准，以过滤海水作空白。

13.4.3.4 藻类叶绿素 *a* 测定按本标准第 8 章执行

13.5 记录与计算

13.5.1 把藻类浓度测定数据及其他有关实验数据填入表 40。

13.5.2 由表 40 的实验数据，按式(18)计算滤食率(FR)：

$$FR=\frac{V(\ln C_0-\ln C_t)}{Nt} \quad \cdots\cdots (18)$$

式中：V——实验的海水体积，L；

N——受试生物个数；

t——滤食时间，h；

C_0——实验海水的藻类初始浓度，个/L；

C_t——经滤食 t 时间后的藻类浓度，个/L。

上式求出的滤食率(FR)表示每个生物个体每小时滤过的海水体积，L。

该公式只适用于海水中的单细胞藻在滤食期间基本不变的情况，如藻类有明显的增殖，浓度变化大，上式不能适用。

13.5.3 把计算出的滤食率数据填入表 41，比较各试验组的滤食率与对照组的滤食率，计算抑制百分率。把抑制百分率及其他有关数据填入表 41。

13.5.4 根据表 41 的数据，按 11.5.3 介绍的方法，求出滤食率的半抑制浓度(IC_{50})。

13.6 注意事项

13.6.1 受试生物要选用同一来源。每个浓度试验组的生物个数不得少于 10 个。个体大小应尽量一致。

13.6.2 致毒实验的注意事项同 11.6。

13.6.3 每批次实验用藻、实验的海水体积、藻类浓度和滤食时间应尽可能一致。

13.6.4 每批次的实验应有二次以上的重复。

13.6.5 受试生物于实验前 24h 停止投饵。

表 40 滤食实验记录

受试生物种类_____ 实验日期_____

单细胞藻种类_____ 海水温度_____℃

第 页

实验序号	生物个数	平均壳长 cm	实验海水体积 dm^3	实验起止时间 h、min	藻类浓度测定，个/mL		滤食率 L/个·h	备注
					C_0	C_t		

实验者_____记录者_____校对者_____

表 41　污染水样检测记录

水样采集海区_____采集时间_____实验起止日期_____

受试生物种类_____　　第____页

实验序号	生物个数	污水含量 %	致毒时间 h	滤食率 L/个·h	抑制百分率 %	实验现象观察	备　注

实验者_____记录者_____校对者_____

14 赤潮毒素——麻痹性贝毒的检测

14.1 试剂配制

除非另作说明，本法所用试剂均用分析纯，水是蒸馏水或等效纯水。

14.1.1 盐酸溶液(1)：42＋58

量取盐酸(HCl，ρ=1.18g/mL)42mL，加入 58mL 水混匀。

14.1.2 盐酸溶液(2)

取上述盐酸溶液(14.1.1)10mL，用水稀释至 500mL。

14.1.3 氢氧化钠溶液：4g/L

称取 0.8g 氢氧化钠(NaOH)，溶解于 200mL 水中。

14.2 仪器设备

——内切式组织匀浆器；

——离心机；

——冰箱；

——秒表；

——注射器；

——一般实验室常用仪器和设备。

14.3 实验材料

健康无孕的雌性小白鼠，重量每只约 18～22g，数量视实验批次而定。

14.4 贝类样品的采集和试样的制备

14.4.1 贝类样品的采集

14.4.1.1 样品应采于赤潮发生区的水域或滩涂，选择人工养殖品种和野生经济食用种类。

14.4.1.2 采样量应足以提供制取 100g 以上的组织匀浆量。此外，另采集 10 个个体，用 70%酒精溶液或 5%的甲醛溶液固定，以供分析胃内含物。

14.4.1.3 依采集地点和品种，分别将样品置于冰柜中，投入注明采集地点、时间和品种的标签。

14.4.1.4 采得的样品应尽快带回实验室及时处理，否则应放入冰箱保存。

14.4.2 试样的制备

14.4.2.1 打开贝壳，将软组织和体液取出，用剪刀剪碎，取 100g 以上的量置于组织匀浆器中匀浆。

14.4.2.2 称取 100.0g 匀浆，置于 500mL 烧杯中，加入 100mL 盐酸溶液(14.1.2)，充分搅拌。然后，用盐酸溶液(14.1.1)或氢氧化钠溶液(14.1.3)调 pH 为 3～4。

14.4.2.3 将此烧杯置水浴中煮沸 5min，冷却至室温，再调节 pH 为 2～4，后用盐酸溶液(14.1.2)定容至 200mL。

14.4.2.4 若组织样品不足 100g，可按 1g 组织得 2mL 的上述处理样进行制备。

14.4.2.5 将经处理的样品离心，离心速度 3000r/min，离心时间 5min。之后，小心倾取上清液，即是贝毒的抽提液，置冰箱备用。

14.5 检测步骤

14.5.1 空白试验

取 2～3 只小白鼠，在其腹腔处分别注入 1mL 盐酸溶液(14.1.2)，若 1h 内无死亡，即可进行毒性试验。

14.5.2 毒性试验

14.5.2.1 先进行预试验，以判断提取液毒性强弱。取 2～3 只小白鼠，在每只的腹腔内注射提取液 1mL，若小白鼠在 4min 内死亡，可依死亡时间在表 43 中查出相应的鼠单位。

14.5.2.2 按预试验得出的鼠单位数据，用盐酸溶液(14.1.2)稀释提取液，使每毫升稀释液的毒性约含

1.60 个鼠单位，以便把小白鼠的致死时间基本控制在 4～8min 之间。若预试验时，小白鼠死亡时间大于 4min，提取液不必稀释。

14.5.2.3 取 8～10 只小白鼠（每试验组应有的鼠数），于每只腹腔注射 1mL 提取液（或稀释液），注意观察、记录每只死亡时间（精确至秒），死亡判定以最后一次喘息为准。死亡时间力求控制在 4～8min 之间。

14.5.3 胃含物的分析、鉴定

14.5.3.1 将野外固定的贝类样品外壳撬开，用吸管吸水冲洗其软体部分，剖开胃囊，滴入少许清水，稍加搅动，吸出胃含物，按(5.3.2)的浮游植物计数法计数。

14.5.3.2 认真鉴定胃含物中的藻种，确定胃内是否含有海区的赤潮生物，并计算其在饵料中的比例。

14.6 记录与计算

14.6.1 将毒性试验检测结果，按表 41 的要求填写。

14.6.2 样品的毒素含量以 100g 组织含有的鼠单位(Mu)表示。1 个鼠单位(Mu)的定义是 15min 杀死一只 20g 重小白鼠的腹腔注射剂量。

14.6.3 依式(19)计算 100g 贝类软组织的毒素含量：

$$\rho = 200\,DAB \qquad (19)$$

式中：A——每试验组小白鼠平均死亡时间在表 42 中查得的相应鼠单位；

B——每试验组小白鼠平均体重在该表中对应的鼠单位校正系数；

D——抽提液的稀释倍数。

若死亡时间(T)为 240～480s，则 A 与 T 有如下的关系式：

$$\lg A = (145/T) - 0.2 \qquad (20)$$

表 42 小白鼠死亡时间与鼠单位关系表

20g 小白鼠		20g 小白鼠		其他重量的小白鼠	
死亡时间 min：s	鼠单位 Mu	死亡时间 min：s	鼠单位 Mu	小白鼠重量	鼠单位校正系数
1：08	100	5：00	1.92	10	0.50
10	66.2	05	1.89	10.5	0.53
15	38.3	10	1.86	11	0.56
20	26.4	15	1.83	11.5	0.59
25	20.7	20	1.80	12	0.62
30	16.5	30	1.74	12.5	0.65
35	13.9	40	1.69	13	0.675
40	11.9	45	1.67	13.5	0.70
45	10.4	50	1.64	14	0.73
50	9.33	6：00	1.60	14.5	0.76
55	8.42	15	1.54	15	0.785
2：00	7.67	30	1.48	15.5	0.81
05	7.04	45	1.43	16	0.84
10	6.52	7：00	1.39	16.5	0.86
15	6.09	15	1.35	17	0.88
20	5.66	30	1.31	17.5	0.905
25	5.32	45	1.28	18	0.93
30	5.00	8：00	1.25	18.5	0.95
35	4.73	15	1.22	19	0.97
40	4.48	30	1.20	19.5	0.985
45	4.62	45	1.18		

表 42(完)

20g 小白鼠		20g 小白鼠		其他重量的小白鼠	
死亡时间 min：s	鼠单位 Mu	死亡时间 min：s	鼠单位 Mu	小白鼠重量	鼠单位校正系数
50	4.06	9：00	1.16	20	1.000
55	3.88	30	1.13		
3：00	3.70	10：00	1.11	20.5	1.015
05	3.57	30	1.09	21	1.03
10	3.43	11：00	1.075	21.5	1.04
15	3.31	30	1.06	22	1.05
20	3.19	12：00	1.05	22.5	1.06
25	3.08	13	1.03	23	1.07
30	2.98	14	1.015		
35	2.88				
40	2.79	15	1.000		
45	2.71				
50	2.63	16	0.99		
55	2.56	17	0.98		
4：00	2.50	18	0.972		

表 43　贝类赤潮毒素的毒性检测记录表

采样海区_____采样日期_____分析日期_____

赤潮生物种_____

采样地点（站位）	样品种类	稀释倍数 D	毒性实验 测定项目	小白鼠编号 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	平均	每百克组织毒素含量 ρ (Mu)
			小白鼠重量 g												
			死亡时间 min：s												
			小白鼠重量 g												
			死亡时间 min：s												
			小白鼠重量 g												
			死亡时间 min：s												
			小白鼠重量 g												
			死亡时间 min：s												
			小白鼠重量 g												
			死亡时间 min：s												

分析者_____记录者_____校对者_____

附 录 A
（提示的附录）
污染生态调查资料常用评述方法

A1 指标生物

在海洋污染的生物学评价中所谓指标生物，通常是指在污染环境中，能正常生活与繁殖、并随污染程度的发展，其比率趋向增加的生物种。目前，广义而言，应该包括对污染敏感的种类，即环境污染，其数量急剧减少并最终消失的种类。

A2 编组比率

编组比率是指标生物概念的发展，考虑的不是某些生物种，而是生物类群。由于不同生物分类群的抗污能力不同，可根据其在群落组成中比例关系的改变，反映环境污染状况。一般认为：污染环境，多毛类种类比率趋于增加，而棘皮动物、甲壳动物的比率趋向减少。

A3 丰度

是表示群落（或样品）中种类丰富程度的指数。其计算公式有多种，本标准采用马卡列夫（Margalef，1958）的计算式如式（A1）：

$$d=(S-1)/\log_2 N \quad \cdots\cdots (A1)$$

式中：d——表示丰度；

S——样品中的种类总数；

N——样品中的生物总个体数。

一般而言，健康的环境，种类丰度高，污染环境，种类丰度降低。

A4 多样性指数

反映群落种类多样性的数学模式也有许多，本标准采用种类和数量信息函数表示的香农-韦弗（Shannon-Weaver，1963）多样性指数。

$$H'=-\sum_{i=1}^{S} P_i \log_2 P_i \quad \cdots\cdots (A2)$$

式中：H'——种类多样性指数；

S——样品中的种类总数；

P_i——第 i 种的个体数（n_i）或生物量（ω_i）与总个体数（N）或总生物量（W）的比值（$\frac{n_i}{N}$或$\frac{\omega_i}{W}$）。

一般认为，正常环境，该指数值高；环境受污，该指数值降低。

A5 均匀度

该指数是皮诺（Pielou，1966）提出，其式：

$$J=H'/H_{max} \quad \cdots\cdots (A3)$$

式中：J——表示均匀度；

H'——为前式计算的种类多样性指数值；

H_{max}——为 $\log_2 S$，表示多样性指数的最大值，S 为样品中总种类数。

J 值范围为 0～1 之间，J 大时，体现种间个体数分布较均匀；反之，J 值小反映种间个体数分布欠均。由于污染环境的种间个体数分布差别大，亦则 J 是低的。

A6 优势度

优势度与均匀度是相对应的指数，指数值范围也是0～1之间，在污染环境中，个体数的分布可能集中在少数耐污种类上，使其指数值增高，其式是：

$$D_2=(N_1+N_2)/NT \quad \cdots\cdots (A4)$$

式中：D_2——优势度；

N_1——样品中第一优势种的个体数；

N_2——样品中第二优势种的个体数；

NT——样品中的总个体数。

A7 种类相似性指数

本标准采用杰卡德(Jaccard)指数和克齐卡诺基(Czekanowki)指数。其表示式分别为：

$$J_c(\%)=\frac{c}{a+b-c}\times 100 \quad \cdots\cdots (A5)$$

$$C_c(\%)=\frac{2c}{a+b}\times 100 \quad \cdots\cdots (A6)$$

式中：a——样品A的生物种类数(或属数)；

b——样品B的生物种类数(或属数)；

c——样品A和B的共有种数(或属数)。

当A、B两份样品(或两调查地点、或两断面)的种类完全相同时，相似性为100%；反之，若不存在共有种，则相似性为零。

A8 群落相似性分析

不同调查地点或断面的生物群落相似性，用桑德斯(Sanders，1960)提出的公式计算并进行聚类、比较。

$$PSC=100-0.5\Sigma|a'-b'| \quad \cdots\cdots (A7)$$

式中：a'——样品A各生物种的栖息密度与总栖息密度的比值；

b'——样品B各生物种的栖息密度与总栖息密度的比值。

本式也可用生物量或覆盖度的比值进行计算。

样品A和B，除可代表不同地点、不同断面的比较外，为反映时间尺度变化，也可以是表示同一地点(或断面)不同调查时间的比较。

附 录 B

（提示的附录）

几种受试动物的亲体产卵和幼虫阶段的培养条件

受试生物		水温 ℃	饵料密度 万个细胞/mL	光照强度 lx	海水比重	盐度	pH值	个体密度 个/L
缢蛏	亲贝产卵	20～23	/	暗	1.018～1.020	23.4～27.0	8.0～8.1	/
	受精卵	20～23	/	/	1.018～1.020	23.4～27.0	8.0～8.1	3 000
	浮游幼虫	20～23	2.5～5	1000～2500	1.012	15.6	8.0～8.1	1 000
	稚贝	20～23	10～15	1000～2500	1.012	15.6	8.0～8.1	500
褶牡蛎	亲贝产卵	20～25	/	暗	1.018	23.4	8.0～8.1	/
	受精卵	20～25	/	/	1.018	23.4	8.0～8.1	3 000
	浮游幼虫	20～25	2.5～5	1000～2500	1.018	23.4	8.0～8.1	1 000
太平洋牡蛎	亲贝产卵	23～25	/	暗	1.018	23.4	8.0～8.1	/
	受精卵	23～25	/	/	1.018	23.4	8.0～8.1	3 000
	浮游幼虫	23～25	2.5～5	1000～2500	1.018	23.4	8.0～8.1	1 000
菲律宾蛤仔	亲贝产卵	23～26	/	暗	1.020	27.0	8.0～8.1	/
	受精卵	23～26	/	/	1.020	27.0	8.0～8.1	3 000
	浮游幼虫	23～27	2.5～5	2000～3000	1.020	27.0	8.0～8.1	1 000
海湾扇贝	亲贝产卵	20～25	/	暗	1.020	27.0	8.0～8.1	/
	受精卵	20～25	/	/	1.020	27.0	8.0～8.1	3 000
	浮游幼虫	20～25	2.5～5	2000～3000	1.020	27.0	8.0～8.1	1 000
长毛对虾	亲虾产卵	23～25	/	暗	1.018～1.020	23.4～27.0	8.0～8.1	/
	受精卵	23～25	/	/	1.018～1.020	23.4～27.0	8.0～8.1	5 000～10 000
	无节幼体	23～25	/	/	1.018～1.020	23.4～27.0	8.0～8.1	300
中国对虾	亲虾产卵	13～23	/	暗	1.018～1.020	23.4～27.0	8.0～8.1	/
	受精卵	13～23	/	/	1.018～1.020	23.4～27.0	8.0～8.1	5 000～10 000
	无节幼体	20～23	/	/	1.018～1.020	23.4～27.0	8.0～8.1	300
泥螺胚胎		10～30	/	/	1.005～1.010	6.5～13	7.5～8.0	50～100 块

注

1 受试亲体需采自非污染区或养殖区，催产前需洗刷干净。

2 缢蛏、褶牡蛎、太平洋牡蛎、海湾扇贝、菲律宾蛤仔等贝类的催产采用阴干（降温）——升温，加雄性性腺（或5‰氨海水）诱导，催产时雌雄个体最好分开，待产精产卵后进行人工受精，尔后洗去残余精虫，将受精卵移入新鲜过滤海水待用。

3 长毛对虾和中国对虾成熟亲体，最好直接采自自然海区，让其在人工育苗网箱内自然产卵。

4 泥螺胚胎受试材料，可直接采集自然海区的卵群，用镊子和解剖针小心去除其胶质膜，冲洗干净并将其分成小卵块，每一卵块约含 20～30 个胚胎。

5 培养过程中，水体溶解氧应保持在 5mg/L 以上