



中华人民共和国国家标准

GB/T 12763.6—2007
代替 GB/T 12763.6—1991

海洋调查规范 第6部分：海洋生物调查

Specifications for oceanographic survey—
Part 6: Marine biological survey

2007-08-13 发布

2008-02-01 实施



中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

目 次

前言	VII
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 一般规定	3
4.1 技术设计	3
4.2 调查要求	3
4.3 调查和分析仪器设备	4
4.4 采样	4
4.5 样品分析	5
4.6 资料整理及报告编写	5
5 叶绿素、初级生产力和新生产力的测定	6
5.1 技术要求和测定要素	6
5.2 海水浮游植物色素测定	6
5.3 海洋初级生产力(¹⁴ C示踪法)测定	10
5.4 叶绿素 a 和初级生产力的粒度分级测定	11
5.5 海洋新生产力(¹⁵ N示踪法)测定	12
5.6 资料整理	14
6 微生物调查	18
6.1 技术要求和调查要素	18
6.2 采样	19
6.3 样品分析	19
6.4 资料整理	29
7 微型、微型和小型浮游生物调查	30
7.1 技术要求和调查要素	30
7.2 采样	30
7.3 样品分析	32
7.4 资料整理	33
8 大、中型浮游生物调查	34
8.1 技术要求和调查要素	34
8.2 采样	35
8.3 样品分析	36
8.4 资料整理	37
9 鱼类浮游生物调查	38
9.1 技术要求和调查要素	38
9.2 采样	38
9.3 样品分析	40

9.4	资料整理	40
10	大型底栖生物调查	41
10.1	技术要求和调查要素	41
10.2	采样	41
10.3	样品分析	43
10.4	资料整理	44
11	小型底栖生物调查	44
11.1	技术要求和调查要素	44
11.2	采样	45
11.3	样品分析	46
11.4	资料整理	48
12	潮间带生物调查	48
12.1	技术要求和调查要素	48
12.2	采样	49
12.3	样品分析	51
12.4	资料整理	51
13	污损生物调查	52
13.1	技术要求和调查要素	52
13.2	采样	52
13.3	样品分析	54
13.4	资料整理	55
14	游泳动物调查	56
14.1	技术要求和调查要素	56
14.2	采样	57
14.3	样品分析	58
14.4	资料整理	61
附录 A (规范性附录)	微生物最可能数(MPN)计数及其检索表	63
附录 B (规范性附录)	浮游生物样品编号、生物量测定、计数和鱼类浮游生物网具	66
附录 C (规范性附录)	大型底栖生物固定液配制、样品编号和海底照相与录像	71
附录 D (规范性附录)	小型底栖生物样品分离、计算和几种仪器设备图	73
附录 E (规范性附录)	潮间带生物调查中潮位测量法和几种设备图	79
附录 F (规范性附录)	游泳动物性腺成熟度、摄食强度、含脂量及拖网网型	83
附录 G (资料性附录)	渔业资源声学调查与评估(选做)	89
附录 H (资料性附录)	海洋生物调查采样和分析记录表格式	98
	参考文献	158
图 B.1	双鼓网图	69
图 B.2	北太平洋网图	70
图 D.1	小型底栖生物分样器结构府面观和侧面观示意图	76
图 D.2	砂质样品封闭淘洗装置示意图	76
图 D.3	海冰法分选小型生物示意图	77

图 D.4	不同体型桡足类的转换系数	77
图 D.5	携带配套的水下呼吸器(SCUBA)等装置的潜水员示意图	78
图 E.1	潮汐水位曲线图解法曲线	80
图 E.2	直接测量法曲线	80
图 E.3a)	覆盖面积计数框	80
图 E.3b)	岩石定量采样框	80
图 E.4	滩涂定量采样框	81
图 E.5	漩涡分选装置	81
图 E.6	过筛器	82
图 F.1	双船底层有翼单囊 A 型拖网网图	86
图 F.2	双船底层有翼单囊 B 型拖网网图	87
图 F.3	单船有翼单囊拖网网图	88
图 G.1	调查专用底层拖网网图	95
图 G.2	调查专用变水层拖网网图	96
图 G.3	声学仪器校正标准目标的悬挂示意图	97
表 1	采水层次	3
表 2	HPLC 梯度洗脱程序	10
表 3	微微型、微型和小型浮游生物垂直分段采样水层	30
表 4	微型和小型浮游生物网具的规格及适用对象	31
表 5	大中型浮游生物垂直分段采样水层	34
表 6	大中型浮游生物网具的规格及适用对象	35
表 7	鱼类浮游生物网具的规格及适用对象	39
表 8	试板种类、规格及数量	53
表 A.1	最可能数(MPN)计数法(15 管)菌数检索表	63
表 B.1	双鼓网构造与规格	69
表 B.2	北太平洋网构造与规格	70
表 D.1	小型底栖生物的换算系数表	74
表 F.1	双船底层有翼单囊 B 型拖网网具第 7 段~第 24 段编结规格	87
表 G.1	鱼类目标强度与体长关系参考值	94
表 H.1	叶绿素采样记录表	98
表 H.2	叶绿素(萃取荧光法)测定记录表	99
表 H.3	叶绿素(分光光度法)测定记录表	100
表 H.4	叶绿素(高效液相色谱法)测定记录表	101
表 H.5	初级生产力采样、过滤、测定记录表	102
表 H.6	新生产力采样、过滤、测定记录表	103
表 H.7	微生物现场采样记录表	104
表 H.8	海洋水体病毒、细菌数量直接计数记录表	105
表 H.9	细菌菌体大小测定记录表	106
表 H.10	水样、泥样微生物培养计数和菌株分离记录表	107
表 H.11	水样细菌生产力记录表	108

表 H. 12	水样细菌异养活性测定记录表	109
表 H. 13	样品细菌最可能数(MPN)记录表	110
表 H. 14	浮游生物海上采样记录表	111
表 H. 15	浮游生物垂直分层拖网采样记录表	112
表 H. 16	浮游生物样品登记表	113
表 H. 17	微微型光合浮游生物细胞数量记录表	114
表 H. 18	微型和小型浮游生物标本个数计数记录表	115
表 H. 19	采水浮游生物标本个数计数记录表	116
表 H. 20	浮游植物(孢囊)细胞记录表	117
表 H. 21	浮游动物体积分数测定记录表	118
表 H. 22	浮游动物湿重生物量测定记录表	119
表 H. 23	浮游动物干重生物量测定记录表	120
表 H. 24	浮游动物个体计数记录表	121
表 H. 25	夜光藻个体计数记录表	122
表 H. 26	鱼类浮游生物海上采集记录表	123
表 H. 27	鱼类浮游生物标本登记表	124
表 H. 28	鱼类浮游生物计数记录表	125
表 H. 29	鱼类浮游生物数量统计表	126
表 H. 30	大型底栖生物海上采样记录表	127
表 H. 31	大型底栖生物定量分析记录表	128
表 H. 32	大型底栖生物定性分析记录表	129
表 H. 33	大型底栖生物定量分析种类分布记录表	130
表 H. 34	大型底栖生物定性分析种类分布记录表	131
表 H. 35	小型底栖生物海上采样记录表	132
表 H. 36	小型底栖生物定量分析记录表 1	133
表 H. 37	小型底栖生物定量分析记录表 2	134
表 H. 38	小型底栖生物定性分析记录表	135
表 H. 39	潮间带生物野外采集记录表	136
表 H. 40	潮间带生物定量分析记录表	137
表 H. 41	潮间带生物定性分析记录表	138
表 H. 42	潮间带生物种类分布表	139
表 H. 43	潮间带生物主要种类垂直分布表	140
表 H. 44	潮间带生物统计表	141
表 H. 45	微型污损生物记录表	142
表 H. 46	船舶污损生物记录表	143
表 H. 47	浮标污损生物记录表	144
表 H. 48	码头、桩柱污损生物记录表	145
表 H. 49	污损生物分析记录表	146
表 H. 50	污损生物种类记录表	147
表 H. 51	游泳动物拖网卡片	148
表 H. 52	鱼类生物学测定记录表	149

表 H. 53	虾类生物学测定记录表	150
表 H. 54	蟹类生物学测定记录表	151
表 H. 55	头足类生物学测定记录表	152
表 H. 56	游泳动物数量统计表	153
表 H. 57	鱼类体长测定统计表	154
表 H. 58	鱼类体重测定统计表	155
表 H. 59	鱼类怀卵量记录表	156
表 H. 60	声学调查观测记录表	157

前 言

GB/T 12763《海洋调查规范》分为 11 个部分：

- 第 1 部分：总则；
- 第 2 部分：海洋水文观测；
- 第 3 部分：海洋气象观测；
- 第 4 部分：海洋化学要素调查；
- 第 5 部分：海洋声、光要素调查；
- 第 6 部分：海洋生物调查；
- 第 7 部分：海洋调查资料交换；
- 第 8 部分：海洋地质地球物理调查；
- 第 9 部分：海洋生态调查指南；
- 第 10 部分：海底地形地貌调查；
- 第 11 部分：海洋工程地质调查。

其中第 9 部分、第 10 部分和第 11 部分对应于 GB/T 12763—1991 是新增部分。

本部分为 GB/T 12763 的第 6 部分，并代替 GB/T 12763.6—1991《海洋调查规范 海洋生物调查》。

本部分与 GB/T 12763.6—1991 相比主要变化如下：

- 调整了本部分的总体框架，增加了“12 潮间带生物调查”、规范性附录“潮间带生物调查中潮位测量法和几种设备图”(见附录 E)和资料性附录“渔业资源声学调查与评估”(见附录 G)；将 1991 年版的规范性附录“海水中叶绿素 a、b、c 的(分光光度法)测定”移至修改后的“5 叶绿素、初级生产力和新生产力的测定”中(1991 年版的附录 A；本版的 5.2.2)；将原版的“第四篇浮游生物调查”修改后细分为“7 微微型、微型和小型浮游生物调查”、“8 大、中型浮游生物调查”和“9 鱼类浮游生物调查”三章，其中“7 微微型、微型和小型浮游生物调查”为新增的调查项目；
- 在“2 规范性引用文件”中，增加了 GB 17378.7 海洋监测规范第 7 部分：近海污染生态调查和生物监测；
- 在“3 术语和定义”中，增加和修改了有关术语(1991 年版的 3.4 和 3.7；本版的 3.2、3.3、3.4、3.5、3.8、3.9、3.10 和 3.11)；同时每个术语都增补了对应的英语名称；
- 在“4 一般规定”中，调查项目和主要仪器设备两条分别增补了新的测项和新的仪器设备(1991 年版的 5.1 和 6；本版的 4.2.1 和 4.3)；在本版的“表 1 采水层次”中增加了 200 m 以深的采水层次(见 4.2.4.1)；进一步规定了调查次数，细化了调查季度的时间(1991 年版的 5.5.2；本版的 4.2.5)；修改和扩展了实验室的使用范围(1991 年版的 6.2.1，本版的 4.3.2)；根据本次修订后的《海洋调查规范 第 1 部分：总则》GB/T 12763.1—2007 的规定，航次报告和调查成果报告由原来的技术负责人编写修订为分别由首席科学家和项目负责人主持编写(1991 年版的 9.2.1 和 9.2.2，本版的 4.6.1.4 和 4.6.1.5)等；
- 在“5 叶绿素、初级生产力和新生产力测定”中，增加了“高效液相色谱(HPLC)法”、“叶绿素 a 和初级生产力的粒度分级测定”和“海洋新生产力(¹⁵N 示踪法)测定”(见 5.2.3、5.4 和 5.5)；
- 在“6 微生物调查”中，增加了“SYBR Green I 直接计数法”、“DAPI 直接计数法”、“细菌体积测定”、“³H-亮氨酸示踪法”测定细菌生产量、“生态呼吸率测定”、“细菌比生长率、倍增时间和

- 世代时间的计算”和“微生物分类鉴定”(见 6.3.4.1.1.1、6.3.4.1.1.3、6.3.4.1.1.4、6.3.4.2.1.2、6.3.4.2.2.2、6.3.4.3 和 6.3.5);
- “7 微型、微型和小型浮游生物调查”为新增的章;
- 在“8 大、中型浮游生物调查”中,增加了网具类型,修改了连续观测频率、样品处理、样品编号和制图取值标准(1991年版的 20.1.2、19.6、20.3.4、21.1 和 22.6;本版的 8.2.1.1、8.1.1.3、8.2.3.2、8.3.1 和 8.4.4);
- 在“9 鱼类浮游生物调查”中,修改了采集网具和丰度计算公式(1991年版的 20.1.2 和 22.4;本版的 9.2.1.1 和 9.4.1);
- 在“10 大型底栖生物调查”中,增加了“深拖光学系统和深海底栖生物拖网”和“大型底栖生物海底照相、录像与潜水采样”(见 10.2.1.2.5 和附录 C.4);
- 在“11 小型底栖生物调查”中,增加了“潜水取样”、“潮间带采芯样”、“硅溶胶 Ludox—TM 离心漂浮法”和群落结构与生物多样性多元统计分析(见 11.2.1.6 和 11.2.2.2、11.2.2.1、11.3.4 和附录 D.4);修改了采样设备(1991年版的 28.1;本版的 11.2.1);
- “12 潮间带生物调查”为新增的章;
- 在“13 污损生物调查”中,修改了技术要求内容(1991年版的 31;本版的 13.1.1),增加了调查要素和水泥试板用于海岸港工建设的污损生物调查(13.1.2 和 13.2.1.1.1c));
- 在“14 游泳动物调查”中,将“性腺成熟系数”和“摄食饱满系数”纳入“资料整理”(1991年版的 37.3.1.5 和 37.3.1.6;本版的 14.4.2.4 和 14.4.2.5)。修改和增加了一些重要渔获物的性腺成熟度和鱼类含脂量的划分标准(见本版的附录 F.1.2、附录 F.1.3、附录 F.1.4、附录 F.1.6、附录 F.1.7、附录 F.1.8 和附录 F.3);修改了游泳生物拖网网型(1991年版的附录 F7;本版的附录 F.4);
- 修改和增加了资料性附录“海洋生物调查、分析记录表格式”(1991年版的附录 G;本版的附录 H)。
- 本部分应与 GB/T 12763.1 和 GB/T 12763.7 配套使用。

本部分的附录 A、附录 B、附录 C、附录 D、附录 E 和附录 F 为规范性附录,附录 G 和附录 H 为资料性附录。

本部分由国家海洋局提出。

本部分由国家海洋标准计量中心归口。

本部分由国家海洋局第三海洋研究所负责修订,国家海洋局第一海洋研究所、国家海洋局第二海洋研究所、中国海洋大学、中国水产科学研究院东海水产研究所、中国水产科学研究院黄海水产研究所等参加修订。

本部分的主要起草和修订人:张玉生、杨清良、陈瑞祥、朱明远、叶德赞、宁修仁、林景宏、戴燕玉、江锦祥、张志南、李荣冠、黄宗国、郑成兴、郑元甲、赵宪勇、吕瑞华、陆斗定、史君贤、蔡昱明、林茂和周红。

本部分所代替标准的发布情况为:

——GB/T 12763.6—1991。

海洋调查规范

第 6 部分：海洋生物调查

1 范围

GB/T 12763 的本部分规定了海洋生物调查的一般规定、技术要求和调查(测定)要素、采样、样品分析及资料整理的基本要求和办法。

本部分适用于海洋环境基本要素调查中的海洋生物调查。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过 GB/T 12763 的本部分的引用而成为本部分的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本部分,然而,鼓励根据本部分达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本部分。

GB/T 14014 蚕丝、合成纤维筛网

GB/T 12763.1 海洋调查规范 第 1 部分:总则

GB/T 12763.7 海洋调查规范 第 7 部分:海洋调查资料处理

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

3 术语和定义

GB/T 15919 确立的以及下列术语和定义适用于 GB/T 12763 的本部分。

3.1

叶绿素 chlorophyll

自养植物细胞中一类很重要的色素,是植物进行光合作用时吸收和传递光能的主要物质。叶绿素 a(Chl a)是其中的主要色素。

3.2

初级生产力 primary productivity

自养生物通过光合作用生产有机物的能力。通常以单位时间(年或天)内单位面积(或体积)中所产生的有机物(一般以有机碳表示)的质量计算,相当于该时间内相同面积(或体积)中的初级生产量。

[GB/T 15919—1995, 定义 2.210]

3.3

碳同化数 carbon assimilation number

指植物光合色素的光合作用效率。在 CO₂ 与光照度充足的条件下,单位质量叶绿素与每小时所同化的碳量之比[常用“碳(毫克)/叶绿素(毫克)/小时”表示]。

[GB/T 15919—1995, 定义 2.217]

3.4

新生产力 new productivity

在真光层中再循环的氮为再生氮,由真光层之外提供的氮为新生氮。由再生氮源支持的那部分初级生产力称为再生生产力,由新生氮源支持的那部分初级生产力称为新生产力。

3.5

微生物 microbe

一群个体微小、结构简单、生理类型多样的单细胞或多细胞的低等生物,包括属于原核生物类的细菌、放线菌、支原体、立克次体、衣原体和蓝细菌,属于真核生物类的真菌(酵母菌和霉菌)、原生动物和显微藻类,以及属于非细胞生物类的病毒、类病毒和朊病毒。

3.6

细菌异养生长速率 bacterial heterotrophic growth rate

异养细菌利用有机物进行生长繁殖的速率。

3.7

细菌异养活性 bacterial heterotrophic activity

异养细菌进行生理代谢活动的的能力。

3.8

细菌生产力 bacterial productivity

单位时间内、单位水体所产生的细菌生物量。

3.9

浮游生物 plankton

缺乏发达的运动器官,没有或仅有微弱的运动能力,悬浮在水层中,常随水流移动的生物。包括浮游植物和浮游动物两大类。

[GB/T 15919—1995, 定义 2.126]

依个体的大小浮游生物可分为以下几种类型:粒径小于 $2\ \mu\text{m}$ 的称微微型浮游生物(picoplankton);粒径为 $2\ \mu\text{m}\sim 20\ \mu\text{m}$ 的称微型浮游生物(nanoplankton);粒径为 $20\ \mu\text{m}\sim 200\ \mu\text{m}$ 的称小型浮游生物(microp plankton 或 netplankton);粒径为 $200\ \mu\text{m}\sim 2\ 000\ \mu\text{m}$ 的称中型浮游生物(mesoplankton);粒径为 $2\ 000\ \mu\text{m}\sim 20\ \text{mm}$ 的称大型浮游生物(macrop plankton);粒径大于 $20\ \text{mm}$ 的称巨型浮游生物(megaplankton)。

此外,鱼类浮游生物(ichthyoplankton)即为鱼卵和仔稚鱼。

3.10

底栖生物 benthos

栖息在水域基底表面或底内的生物。在海洋中,这类生物自潮间带至水深大于万米以上的超深渊带(深海沟底部)都有分布,是海洋生物中种类最多的一个生态类型,包括了大多数海洋动物门类,大型和微型定生海藻类和海洋种子植物。

[GB/T 15919—1995, 定义 2.150]

依个体的大小,凡被孔径为 $0.5\ \text{mm}$ 套筛网目所截留的生物,称为大型底栖生物(macrobenthos)。凡能通过孔径为 $0.5\ \text{mm}$ 套筛网目,而被孔径为 $0.042\ \text{mm}$ 所截留的生物,称为小型底栖生物(meio-benthos)。

3.11

潮间带生物 intertidal benthos

生活在潮间带底表的植物和底表与底内的动物。

3.12

污损生物 fouling organism

生长在船底、浮标、平台和海中一切其他设施表面或内部的生物。这类生物一般是有害的。

[GB/T 15919—1995, 定义 2.281]

3.13

游泳动物 nekton

具有发达的运动器官,在水层中能克服水流阻力自由游动的动物。如鱼类、大型虾、蟹类、头足类及海洋哺乳动物等。

[GB/T 15919—1995, 定义 2.146]

4 一般规定

4.1 技术设计

根据调查任务进行技术设计,其内容包括调查断面、站位、项目、内容(含要素)、方法、时间、次数、专业配置、人员素质、船只、器材设备、预期成果等和调查计划编制。应特别注重海上采样和室内分析的技术要求和措施保障。调查计划编制的要求见 GB/T 12763.1 中的相关章节。

4.2 调查要求

4.2.1 调查项目

海洋生物调查项目包括:叶绿素、初级生产力和新生产力,微生物,微微型、微型和小型浮游生物,大、中型浮游生物,鱼类浮游生物,大型底栖生物,小型底栖生物,潮间带生物,污损生物和游泳动物。必要时,应包括渔业资源声学调查与评估。

4.2.2 辅助参数

海洋生物调查时,应视需要确定与其有关的辅助参数,并同步进行观测。

4.2.3 调查方式

海洋生物调查方式包括:大面观测、断面观测和连续观测。

4.2.4 采样方法、采样种类

4.2.4.1 采水样

适用于叶绿素浓度、初级生产力和新生产力,微生物,微微型、微型和小型浮游生物等调查项目的水样采集。应按规定水层采样(见表 1)。

表 1 采水层次

单位为米

测站水深范围	标准层次	底层与相邻标准层的最小距离
<15	表层、5、10、底层	2
15~50	表层、5、10、30、底层	2
50~100	表层、5、10、30、50、75、底层	5
100~200	表层、5、10、30、50、75、100、150、底层	10
>200	表层、5、10、30、50、75、100、150、200	

注 1: 表层指海面下 0.5 m 深度以内的水层。
 注 2: 水深小于 50 m 时,底层为离底 2 m 的水层。
 注 3: 水深在 50~200 m 时,底层为离底 5 m 的水层。
 注 4: 可根据调查的特殊需要,酌情增加 200 m 以深的采水层次。
 注 5: 条件许可时,应充分考虑跃层和采集叶绿素次表层最大值所处的水层。

4.2.4.2 拖网采样

适用于大、中型浮游生物、鱼类浮游生物、大型底栖生物、游泳动物调查和渔业资源声学调查与评估等项目的采样。

4.2.4.3 底质采样

适用于微生物、潮间带生物和大、小型底栖生物调查项目的采样。

4.2.4.4 挂板和水面或水中设施上采样

适用于污损生物调查的采样。

4.2.5 调查时间、调查次数和季节划分

调查时间和调查次数应根据调查水域环境条件和调查目的确定。

a) 河口、港湾、沿岸海区和边缘海(marginal seas)调查

——受气象、流系的季节性影响显著的边缘海应每季度调查一次；受气候、水文的季节性影响明显且物质来源复杂的河口、港湾和沿岸海区，通常应每月（至少每季度）调查一次（潮间带生物每年调查2次~4次）；如有特殊需要可酌情调整调查次数。若进行逐季或逐月调查，各季或各月调查的时间间隔应基本相等。进行河口、港湾调查时，应充分考虑潮汐的影响；

——一般以3月~5月为春季，6月~8月为夏季，9月~11月为秋季，12月~翌年2月为冬季，并分别以5月、8月、11月和2月代表春季、夏季、秋季和冬季。但热带海域应根据具体的海洋环境条件和调查目的酌情调整调查时间和调查次数。

b) 大洋和极地海域调查

应根据调查目的，选择调查时间，确定调查次数。

4.2.6 定位

按 GB/T 12763.1 的有关规定进行。

4.2.7 出海准备

海上所需物品，均应计算实用量和备用量；安装仪器设备，存放工具器皿，以安全方便为原则。

4.3 调查和分析仪器设备

4.3.1 主要仪器设备

调查和分析的主要仪器设备有采水器、网口流量计、各种网具及配件、底质采样器、漩涡分选装置、(水下)照相与摄影设备、探鱼仪(回声探测-积分系统)；生物分类鉴定、计数、测定和称量的器械(如光学显微镜、倒置显微镜、落射荧光显微镜、分析天平等)；离心、干燥、冷藏和烘干的设备；分光光度计、荧光计、液闪计数器、质谱仪和高效液相色谱仪(HPLC)等仪器。

仪器设备、标准物质和试剂配备按 GB/T 12763.1 和本部分的有关规定进行。

4.3.2 调查船实验室

4.3.2.1 一般实验室

一般实验室应适用于叶绿素、浮游生物、底栖生物、潮间带生物、污损生物和游泳动物等样品处理和分析。

4.3.2.2 放射性实验室

放射性实验室应适用于初级生产力、新生产力和微生物样品应用 ^{14}C 、 ^{15}N 和 ^3H 进行的分析测定，要求具有通风和放射性防护设施。放射性实验室与接触 ^{14}C 、 ^{15}N 和 ^3H 的仪器设备都应具有明显标志，并定期检测放射性强度。

4.3.2.3 微生物实验室

微生物实验室应适用于微生物样品的处理，并应具备无菌操作设施。

4.3.3 调查船其他设施

a) 绞缆机，钢丝绳，起网吊杆，双拖网或单拖网(含网板)及探鱼仪等，均需适应大型底栖生物和游泳动物拖网的要求；

b) 动力绞车、钢丝绳、吊杆、海(淡)水源、工作电源、甲板工作空间和场所等条件，均需满足海洋生物各调查项目的采样要求。

4.4 采样

4.4.1 采样要求

4.4.1.1 采样位置

海洋生物调查现场采样时，应避免调查船的排污口。

4.4.1.2 采水样

使用调查项目规定的采水器采水,入水前应检查采水器的球盖是否打开,出水嘴是否关闭,准确放至预定水层,严守停滞时间。按要求取样、处理。

4.4.1.3 拖网采样

使用专业规定的网具采样,严格起、落网速度,准确判断网具到达预定水层。拖网时注意工作状态是否正常,遇异常情况应立即采取有效措施。起网后认真冲洗网具,收集样品,特别是粘附在网衣和网底管套筛绢上的生物样品严禁标本挟带。

4.4.1.4 采泥样

使用调查项目规定的采样器采样,严守操作程序,注意采样器的工作状态。按要求取样和处理。发现异常应重新采样。

4.4.1.5 挂板和水中设施上采样

按项目要求制板,正确选定挂板地点、挂板方式和采样设施。严格执行采样时间、取板程序和样品处理方法。

4.4.2 记录

各调查项目应按 GB/T 12763.1 和本部分的有关规定记录。样品采集、分析、鉴定和测定记录表的格式规定见本部分附录 H。

遇异常现象或新发现,除记录外还应现场拍照或录像。

4.4.3 采样工具、设备的要求

应满足 GB/T 12763.1 和本部分的有关规定。

4.5 样品分析

4.5.1 样品处理

各调查项目采得的样品应按 GB/T 12763.1 和本部分有关规定的具体要求处理。

4.5.2 样品测定

需要测定的样品,应按本部分相应调查项目的要求进行。

4.5.3 鉴定、计数

主要生物种类,一般应鉴定到种,并按本部分相应专业的要求计数。

4.5.4 样品保存

分析、测量、鉴定后的样品,可依资料分析、应用程度和学术价值高低,确定全部或部分保留。保留样品应按各专业的要求保管。

4.6 资料整理及报告编写

4.6.1 资料整理

4.6.1.1 计算、统计

鉴定、计数及测定结果按本部分各调查要素所规定的公式和格式进行计算、统计。

4.6.1.2 填写报表

按 GB/T 12763.1 和本部分的有关规定,并参考 GB/T 12763.7 的有关要求,填写各类报表。

4.6.1.3 绘制图表

有关数据资料形成后,根据本部分各调查要素的要求绘制各式图表。

4.6.1.4 编写航次报告

每航次海上调查完成后,首席科学家应按 GB/T 12763.1 有关规定主持编写航次报告。

4.6.1.5 编写调查报告

调查任务完成后,项目负责人应按 GB/T 12763.1 的有关规定和本部分各项目的调查结果主持编写调查成果报告。

4.6.2 资料归档、验收及成果鉴定

按 GB/T 12763.1 有关规定进行资料归档、验收和成果鉴定。

5 叶绿素、初级生产力和新生产力的测定

5.1 技术要求和测定要素

5.1.1 技术要求

5.1.1.1 叶绿素 a 测定

5.1.1.1.1 采样层次

见 4.2.4.1 表 1;条件许可时,应加采跃层上、跃层中、跃层下三层。

5.1.1.1.2 精密度

叶绿素 a 浓度在 0.5 mg/m^3 水平时,重复样品的相对误差为 $\pm 10\%$ 。

5.1.1.2 初级生产力测定

5.1.1.2.1 采样层次

按光学深度,在光强为表层的 100%、50%、30%、10%、5%和 1%的深度上采水样,特殊情况可视要求而定。

5.1.1.2.2 测定范围

测定范围为 $0.05 \text{ mg}/(\text{m}^3 \cdot \text{h}) \sim 100 \text{ mg}/(\text{m}^3 \cdot \text{h})$ 。

5.1.1.2.3 精密度

初级生产力测定的精密度,当初级生产力在 $30 \text{ mg}/(\text{m}^3 \cdot \text{h})$ 水平时,重复样品的相对误差为 $\pm 10\%$ 。(培养 3h,加强度为 185 kBq 的放射性 ^{14}C)。

5.1.1.3 新生产力测定

条件允许或有特殊需要时,应进行新生产力测定,其技术要求为:

- 培养瓶及采样器皿须酸洗以除去或尽量减少金属沾污;从采样到培养之间的时间间隔要尽量短,这期间要尽量避免阳光直射以减少光休克效应;在样品处理、过滤及同位素分析中,应避免外源氮的污染;
- 当采用气体质谱时,无法测得 $^{15}\text{NH}_4\text{-N}$ 的 ^{15}N 的丰度和浓度,应注意由 $^{15}\text{NH}_4\text{-N}$ 再生同位素稀释效应导致的负误差。在无其他选择时可缩短培养时间至 2 h;
- 实验过程中颗粒有机氮的增加会导致氮的吸收速率的低估;如果水体的生物量和生产率很高,可缩短培养时间以减少上述误差。

5.1.2 测定要素

测定要素为叶绿素、初级生产力和新生产力。

5.2 海水浮游植物色素测定

5.2.1 萃取荧光法(叶绿素 a)

5.2.1.1 方法原理

叶绿素 a 的丙酮萃取液受蓝光激发产生红色荧光,过滤一定体积海水所得的浮游植物用 90%丙酮提取其色素,使用荧光计测定提取液酸化前后的荧光值,计算出海水中叶绿素 a 的浓度。

5.2.1.2 主要仪器设备

- 荧光计:激发光波长 450 nm,发射光波长 685 nm;
- 抽滤装置:包括滤器、支架、抽滤瓶和真空泵;
- 玻璃纤维滤膜:其截留效率相当于 $0.65 \mu\text{m}$ 孔径的聚碳酸酯微孔滤膜;
- 冰箱。

5.2.1.3 试剂

体积分数为 90%的丙酮、体积分数为 10%的盐酸、碳酸镁溶液 $\rho(\text{MgCO}_3) = 10 \text{ g}/\text{dm}^3$ 。

5.2.1.4 测定步骤

5.2.1.4.1 荧光计校准

5.2.1.4.1.1 校准频率

至少每半年一次。

5.2.1.4.1.2 标准叶绿素 a 溶液($\rho=1 \text{ mg/dm}^3$)制备

过滤一定量的生长良好、处于指数生长前期的培养硅藻,用 90% 丙酮提取其叶绿素 a,或者用 90% 丙酮溶解一定量的市售叶绿素 a 结晶,浓度大约为 $\rho=1 \text{ mg/dm}^3$ 。

5.2.1.4.1.3 标准叶绿素 a 溶液浓度标定

使用分光光度计正确测定标准叶绿素 a 溶液的浓度。

5.2.1.4.1.4 叶绿素 a 标准工作溶液配制

用上述标准叶绿素 a 溶液配制浓度不同的标准工作溶液,供各量程档校准用。

5.2.1.4.1.5 换算系数 F_d 的测定

上述不同浓度的标准工作溶液,在不同量程档上进行酸化前后荧光值的测定。各量程档的换算系数 F_d 的计算公式:

$$F_d = \frac{\rho(\text{Chl a})}{R_1 - R_2} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

F_d ——量程档“d”的换算系数,单位为毫克每立方米(mg/m^3);

$\rho(\text{Chl a})$ ——叶绿素 a 的标准工作溶液的浓度,单位为毫克每立方米(mg/m^3);

R_1 ——酸化前的荧光值;

R_2 ——酸化后的荧光值。

5.2.1.4.2 水样测定

5.2.1.4.2.1 采样

按 4.2.4.1 表 1 规定的深度采水样,并记录于表 H.1。

5.2.1.4.2.2 过滤

采样后,应尽快过滤。过滤海水的体积视调查海区而定,富营养海区一般可过滤 $50 \text{ cm}^3 \sim 100 \text{ cm}^3$; 中营养海区过滤 $200 \text{ cm}^3 \sim 500 \text{ cm}^3$; 寡营养海区可过滤 $500 \text{ cm}^3 \sim 1\,000 \text{ cm}^3$ 。过滤时抽气负压应小于 50 kPa ,记录于表 H.1。

5.2.1.4.2.3 滤膜保存

过滤后的滤膜应在 1 h 内提取,若无条件提取测量,可将滤膜对折,用铝箔包好,存放于低温冰箱 (-20°C),保存期可为 60 d 或放入液氮中保存期可为一年。

5.2.1.4.2.4 提取

将载有浮游植物的滤膜放入加有 10 cm^3 体积分数为 90% 丙酮的提取瓶内,盖紧,摇荡,立即放于低温 (0°C) 冰箱内,提取 12 h~24 h。

5.2.1.4.2.5 荧光测定

测定步骤如下:

- 取出样品放在室温、黑暗处约 0.5 h,使样品温度与室温一致;
- 每批样品测定前后,以体积分数为 90% 丙酮作对比液,测出各量程档的空白荧光值 F_{01} 和 F_{02} ;
- 将提取瓶内上清液倒入测定池中,选择适当量程档,测定样品的荧光值 R_b ;
- 加 1 滴体积分数为 10% 盐酸于测定池中,30 s 后测定其荧光值 R_a ;
- 将结果记录于表 H.2。

5.2.2 分光光度法(包括叶绿素 a、b 和 c)

5.2.2.1 方法原理

叶绿素 a、b、c 的丙酮萃取液在红光波段各有一吸收峰。一定体积海水中的浮游植物经滤膜滤出,

用90%丙酮提取其叶绿素,应用分光光度计测定,根据三色分光光度法方程,计算海水中叶绿素a、b、c的浓度。

5.2.2.2 试剂

碳酸镁溶液: $\rho(\text{MgCO}_3)=10\text{ mg/dm}^3$;体积分数为90%的丙酮。

5.2.2.3 主要仪器设备

主要仪器设备有以下几种:

- a) 分光光度计:波长必须准确,波带宽度 $\leq 2\text{ nm}$,消光值可读至0.001;
- b) 抽滤装置:见5.2.1.2 b);
- c) 滤膜:截留效率相当于 $0.65\text{ }\mu\text{m}$ 孔径的聚碳酸酯核孔滤膜或玻璃纤维滤膜、纤维素酯微孔滤膜或其他滤膜;
- d) 贮样干燥器、研磨器、离心机、具塞离心管和冰箱。

5.2.2.4 测定步骤

5.2.2.4.1 采样

见5.2.1.4.2.1。

5.2.2.4.2 过滤

采样后应尽快过滤。将滤膜置于滤器上,加 5 cm^3 碳酸镁溶液,接着过滤海水样,过滤时负压应小于 50 kPa 。过滤海水体积视调查水域而定,近岸水取 $0.5\text{ dm}^3\sim 2\text{ dm}^3$,外海水取 $5\text{ dm}^3\sim 10\text{ dm}^3$ 。

5.2.2.4.3 保存

过滤后的样品应立即研磨提取。若条件不允许,可将滤膜对折两次,置于贮样干燥器内低温($< -20^\circ\text{C}$)黑暗保存,期限最长两个月。

5.2.2.4.4 研磨

将载有浮游植物的滤膜放入研磨器,加 2 cm^3 或 3 cm^3 体积分数为90%的丙酮,研磨,后将样品移入具塞离心管中,研磨器用体积分数为90%丙酮洗涤2次或3次,洗涤液一并倒入离心管中,但总体积不能超过 10 cm^3 。

5.2.2.4.5 提取

将具塞离心管置于低温黑暗处提取30 min。

5.2.2.4.6 离心

提取液于 $4\,000\text{ r/min}$ 条件下离心10 min,上清液倒入刻度试管中,并定容为 10 cm^3 或 15 cm^3 。

5.2.2.4.7 测定

将提取液注入光程为 $1\text{ cm}\sim 10\text{ cm}$ 的比色槽中,以体积分数为90%丙酮作空白对照,用分光光度计测定波长为 750 nm 、 664 nm 、 647 nm 、 630 nm 处的溶液消光值。测定结果记录于表H.3。

5.2.2.5 消光值选择

作浊度校正的 750 nm 处消光值不超过每厘米光程0.005, 664 nm 处消光值最好在 $0.1\sim 0.8$ 之间。

5.2.3 高效液相色谱(HPLC)法

5.2.3.1 方法原理

浮游植物所含各种光合色素经提取后,在一定溶剂系统中,可经高效液相色谱柱进行分离,再由检测器检测并获得色谱图。根据与标准色素比较保留时间及色谱图可鉴别色素种类,根据色谱峰的面积可计算含量。

5.2.3.2 主要仪器设备

- a) 高效液相色谱仪:包括溶剂流动相系统、高压泵、进样器、色谱柱、检测器、计算机等;
- b) 抽滤装置、玻璃纤维滤膜、液氮罐、超声波粉碎器和离心机等。

5.2.3.3 试剂

丙酮、水、甲醇、乙腈和乙酸乙酯(均为色谱纯);醋酸铵;BHT(2,6-二叔丁基对甲酚)、角黄素。

5.2.3.4 测定步骤

5.2.3.4.1 采样

同 5.2.1.4.2.1。

5.2.3.4.2 过滤

采样后,应尽快过滤,视海水中浮游植物数量,过滤 $0.5\text{ dm}^3 \sim 4\text{ dm}^3$ 海水(贫营养海区 $3\text{ dm}^3 \sim 4\text{ dm}^3$,中等营养海区 $1\text{ dm}^3 \sim 2\text{ dm}^3$,富营养海区 $0.5\text{ dm}^3 \sim 1\text{ dm}^3$),过滤时使用孔径为 $0.65\text{ }\mu\text{m}$ 、直径为 25 mm 的玻璃纤维滤膜,抽滤负压不超过 50 kPa ,并注意避光。

5.2.3.4.3 保存

过滤后,如不能立即提取,滤膜应保存在液氮罐中。在放入液氮或超低温冷冻之前,冷冻保存(-20°C)不能超过 20 h 。滤膜可用预先标记好的铝箔包裹保存。

5.2.3.4.4 萃取

将滤膜从液氮中取出,解冻约 1 min ,放入玻璃离心管中,加入 3 cm^3 90% 丙酮,再加入 50 mm^3 角黄素作内标准物(角黄素亦可预先加在提取溶剂丙酮中)。用体积分数为 90% 丙酮提取一张玻璃纤维滤膜作空白样。混合物用超声波粉碎(50 W , 30 s),然后在 0°C 条件下提取 24 h 。分析前将提取物混匀后离心去除细胞残屑,并用载有聚四氟乙烯滤膜(直径 13 mm ,孔径 $0.2\text{ }\mu\text{m}$)的注射式滤器过滤。

5.2.3.4.5 高效液相色谱测定

5.2.3.4.5.1 HPLC 系统准备

- 高压进样阀(带有 200 mm^3 样品环);
- C-18 保护柱($50\text{ mm} \times 4.6\text{ mm}$);
- 反相 C-18 色谱分析柱($250\text{ mm} \times 4.6\text{ mm}$);
- 紫外-可见吸收检测器(测定波长为 436 nm 和 450 nm);
- 配有数据处理系统软件的计算机;
- HPLC 溶剂:
 - 溶剂 A: 甲醇: 0.5 mol 醋酸铵($80:20$), 0.01% BHT;
 - 溶剂 B: 乙腈: 水($87.5:12.5$), 0.01% BHT;
 - 溶剂 C: 乙酸乙酯。

以上溶剂均用色谱纯,使用前以 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤。

5.2.3.4.5.2 操作步骤

- 用溶剂 A 建立并平衡 HPLC 系统 1 h ,流量为 $1\text{ cm}^3/\text{min}$;
- 根据所测样品的浓度范围,每种色素准备至少 5 个浓度的工作标准液,并以该标准液校正 HPLC 系统;
- 取每种工作标准液 1 000 mm^3 ,以 300 mm^3 蒸馏水稀释,混匀并平衡 5 min ,润洗样品注射器两次,进样 500 mm^3 (样品环体积的 2.5 倍);
- 色素样品和空白样的准备及进样方法同标准液。注意进样时应避免有气泡,样品间的进样间隔应保持均匀。预先混有蒸馏水或其他溶剂的样品不能滞留在自动进样器中,以免疏水性的色素从溶液中析出;
- 进样后通过梯度洗脱程序(见表 2)对叶绿素和类胡萝卜素进行最佳分离,分析过程中通过氮气或在线脱气机对流动相溶液进行脱气;
- 根据比较色素样品与标准的色谱峰的保留时间来鉴定样品的色素种类,收集各洗脱峰可进一步进行分光确定;
- 填写表 H.4。

5.2.4 以上三种方法以萃取荧光法优先

5.3 海洋初级生产力(^{14}C 示踪法)测定

5.3.1 方法原理

一定数量的放射性碳酸氢盐 $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ 或碳酸盐 $^{14}\text{CO}_3^{2-}$ 加入到已知二氧化碳总浓度的海水样品中, 经一段时间培养, 测定浮游植物细胞内有机 ^{14}C 的量, 即可计算浮游植物通过光合作用合成有机碳的量。

5.3.2 主要仪器设备

- a) 水下光量子仪、水下照度计或透明度盘;
- b) 样品培养箱或培养瓶罩: 用中性衰光材料, 将光衰减为 100%, 50%, 30%, 10%, 5% 和 1%;
- c) 抽滤装置: 见 5.2.1.2 b);
- d) 滤膜: 孔径为 $0.65\ \mu\text{m}$ 的纤维素酯微孔滤膜;
- e) 液体闪烁计数仪、通风橱和振荡器。

5.3.3 试剂

- a) 过滤海水
用调查海区的海水, 经玻璃纤维或纤维素酯微孔滤膜过滤, 盛于干净的试剂瓶中备用。
- b) ^{14}C 工作溶液
用过滤海水稀释 ^{14}C 贮备液, 使放射性强度约为 $1\ 850\ \text{kBq}/\text{cm}^3$, 或视要求而定。
- c) 闪烁液
- d) 测总计数闪烁液
每 $10\ \text{cm}^3$ 闪烁液中加 $0.2\ \text{cm}^3$ 的苯乙胺。
- e) $0.1\ \text{mol}/\text{dm}^3$ 盐酸。

表 2 HPLC 梯度洗脱程序

时间/ min	流量/ ($\text{cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$)	A%	B%	C%	状态
A. 分析步骤					
0.0	1.0	100	0	0	进样
2.0	1.0	0	100	0	梯度洗脱
2.6	1.0	0	90	10	梯度洗脱
13.6	1.0	0	65	35	梯度洗脱
18.0	1.0	0	31	69	梯度洗脱
23.0	1.0	0	31	69	保持
25.0	1.0	0	100	0	梯度洗脱
26.0	1.0	100	0	0	梯度洗脱
34.0	1.0	100	0	0	保持
B. 结束步骤					
0	1.0	100	0	0	分析完成
3.0	1.0	0	100	0	梯度洗脱
6.0	1.0	0	0	100	梯度洗脱
16.0	1.0	0	0	100	冲洗
17.0	1.0	0	0	100	结束

5.3.4 测定步骤

5.3.4.1 淬灭校正方程的确定

用一系列(一般不少于6个)¹⁴C 淬灭标准瓶,在液闪计数仪上测定。用直线回归法得出比求效率的方程。

5.3.4.2 采样深度的确定

使用水下光量子仪或照度计,测定水柱中不同深度的光辐射强度,或者用透明度盘测定海水的透明度,确定采样的光学深度。

5.3.4.3 水样测定

5.3.4.3.1 采样

按预定深度采样,并记录于表 H.5。采样时应使用不透光和没有铜制部件的采水器,水样避免阳光直接照射。

5.3.4.3.2 水样分装

采样后,尽快在弱光下,将水样经孔径为 200 μm 左右的筛绢过滤,分装至培养瓶。培养瓶必须清洗干净,并经体积分数为 2% 的稀盐酸浸泡 24 h 以上。每层样品应包括两个白瓶和一个黑瓶,第一层和第四层样品还应各分装一个零时间培养瓶(或根据现场调查情况选定),零时间培养瓶中水样体积必须准确。剩余水样按 5.2.1 的规定,测定各层次水样的叶绿素 a 浓度。

5.3.4.3.3 加¹⁴C 工作液

取相同体积的¹⁴C 工作溶液加至每个培养瓶。所加数量视样品中浮游植物多少和培养时间而定。一般在水深小于 200 m 海区,培养 24 h,加 37 kBq~370 kBq,水深大于 200 m 海区加 370 kBq~740 kBq。

5.3.4.3.4 取总计数样

用微量吸液器从每一零时间培养瓶中吸取一定体积水样两份,分别移入 2 个总计数闪烁瓶中,加 20 cm³ 闪烁液,盖紧,混匀,供作放射性活度测定。

5.3.4.3.5 培养

将已加有¹⁴C 的培养瓶(零时间培养瓶除外),放入各相应的培养箱内,或罩上各相应的培养罩,再放入透明的培养箱内。记下开始培养时间,培养箱应置于阳光不受遮蔽处,并用流动的表层海水保持培养期间的温度恒定,培养时间一般在 2 h~24 h 之间,并尽量接近当地中午时间。

5.3.4.3.6 零时间样品的过滤

培养开始后,立即过滤两个零时间样品,所得载有浮游植物的滤膜,放入闪烁瓶,在通风橱中,加入 1 cm³ 0.1 mol/dm³ 盐酸,15 min 后加盖。或在通风橱中以浓盐酸蒸气熏滤膜 15 min,放入闪烁瓶。

5.3.4.3.7 过滤

样品培养后,过滤水样步骤见 5.3.4.3.6。

5.3.4.3.8 放射性活度测定

向装有带浮游植物的滤膜的闪烁瓶加入 10 cm³ 闪烁液,在振荡器上缓慢振荡至少 20 min 后,把闪烁瓶置于液体闪烁计数仪内使样品暗适应 12 h 后测定,并记录于表 H.5。

5.3.4.4 水样二氧化碳总浓度测定

测定海水样品的盐度,计算海水中二氧化碳总浓度:

$$\rho(\text{C}) = (0.067S - 0.05) \times 12\,000 \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中:

$\rho(\text{C})$ ——海水中二氧化碳的总浓度(以 C 计),单位为毫克每立方米(mg/m³);

S——海水实用盐度(无量纲)。

5.4 叶绿素 a 和初级生产力的粒度分级测定

5.4.1 叶绿素 a

5.4.1.1 方法原理

通过不同孔径的滤膜可以把不同粒径的浮游植物分别截留下来,从而达到对不同粒度的浮游植物

进行分级测量的目的。粒级划分按国际通用标准,一般分为 $20\ \mu\text{m}\sim 200\ \mu\text{m}$ (小型)、 $2\ \mu\text{m}\sim 20\ \mu\text{m}$ (微型)和 $<2\ \mu\text{m}$ (微微型)三个粒级。分级后测量方法原理同 5.2.1.1。

5.4.1.2 主要仪器设备

- a) 荧光计:同 5.2.1.2 a);
- b) 抽滤装置:同 5.2.1.2 b);
- c) 滤膜: $200\ \mu\text{m}$ 筛绢(用以除去较大型浮游生物); $20\ \mu\text{m}$ 筛绢、 $2\ \mu\text{m}$ 核孔滤膜、 $0.65\ \mu\text{m}$ 玻璃纤维滤膜;
- d) 冰箱。

5.4.1.3 试剂

同 5.2.1.3。

5.4.1.4 测定步骤

5.4.1.4.1 荧光计校准

同 5.2.1.4.1。

5.4.1.4.2 水样测定

5.4.1.4.2.1 过滤

采样后,先经 $200\ \mu\text{m}$ 筛绢过滤一遍,然后将充分混合均匀的水样一式两份,一份直接用玻璃纤维滤膜过滤;另一份则依次通过 $20\ \mu\text{m}$ 筛绢(在无抽滤负压条件下)、 $2\ \mu\text{m}$ 核孔滤膜和 $0.65\ \mu\text{m}$ 玻璃纤维滤膜三种规格滤膜过滤,分别记为 Micro⁻(或 Net⁻)、Nano⁻ 和 Pico⁻。

5.4.1.4.2.2 样品保存和提取

分别同 5.2.1.4.2.3 和 5.2.1.4.2.4。

5.4.1.4.2.3 荧光测定

同 5.2.1.4.2.5。

5.4.2 初级生产力

5.4.2.1 方法原理

同 5.4.1.1 和 5.3.1。

5.4.2.2 主要仪器设备

- a) 水下光量子仪、水下照度计或透明度盘;
- b) 样品培养箱或培养瓶罩:同 5.3.2b);
- c) 抽滤装置:同 5.3.2c);
- d) 滤膜: $20\ \mu\text{m}$ 筛绢、 $2\ \mu\text{m}$ 核孔滤膜、 $0.65\ \mu\text{m}$ 的微孔玻璃纤维滤膜;
- e) 液体闪烁计数仪、通风橱和振荡器。

5.4.2.3 试剂

同 5.3.3。

5.4.2.4 测定步骤

除过滤时将每层培养的两个白瓶(平行样)中的一个直接用 $0.65\ \mu\text{m}$ 的微孔玻璃纤维滤膜,而另一个则依次用 $20\ \mu\text{m}$ 筛绢、 $2\ \mu\text{m}$ 的核孔滤膜、 $0.65\ \mu\text{m}$ 的微孔滤膜分级过滤外,其余步骤同 5.3.4。

5.5 海洋新生产力(¹⁵N 示踪法)测定

5.5.1 方法原理

海洋真光层(即光合作用层)生态系统中的氮营养盐可根据其来源划分为内源(如 $\text{NH}_4\text{-N}$ 、Urea-N)和外源(如 $\text{NO}_3\text{-N}$ 、 $\text{N}_2\text{-N}$)两部分,由外源氮构成的初级生产力为新生产力,内源氮构成的初级生产力为再生生产力。因此通过¹⁵N 同位素标记外源氮和内源氮,并测定它们的吸收率即可测算新生产力和再生生产力。由于 $\text{NO}_3\text{-N}$ 和 $\text{NH}_4\text{-N}$ 分别是最主要的外源氮和内源氮,通常只测 $\text{NO}_3\text{-N}$ 和 $\text{NH}_4\text{-N}$ 的吸收率。(注意新生产力概念在近海的局限性:当有 $\text{NH}_4\text{-N}$ 等还原态氮来自系统外部时,由该法测

得的新生产力有负误差)。

5.5.2 主要仪器设备

质谱仪、消解设备——常规消煮炉。

5.5.3 试剂

- 示踪剂:丰度为 95%~99%原子的 $K^{15}NO_3$ 、 $^{15}NH_4Cl$ 或 $(^{15}NH_4)_2SO_4$;
- 氧化剂:AR 级浓 H_2SO_4 ;
- 增温剂:AR 级 K_2SO_4 ;
- 催化剂:AR 级 $CuSO_4$, Se;
- 加速剂:按 $K_2SO_4 : CuSO_4 : Se = 200 : 20 : 1$ 比例配成;
- 扩散剂:AR 级 $NaOH(10 \text{ mol/dm}^3)$;
- 吸收剂:GR 级 $HCl(0.6 \text{ mol/dm}^3)$ 。

5.5.4 现场实验

5.5.4.1 采样与培养

- 采样方法、水层深度与“ ^{14}C 法测定初级生产力”相一致。若考虑大型浮游动物的干扰,可将现场水样用 $200 \mu\text{m}$ 筛绢过滤以除之;
- 实验采用酸洗的聚碳酸酯(polycarbonate)瓶。酸洗可采用无金属硝酸清洗法,使用该方法应非常小心,需多次的蒸馏水冲洗,确保无滞留的 NO_3-N 污染。为避免氮污染,也可用稀盐酸来代替硝酸。
- 取 $500 \text{ cm}^3 \sim 1\,000 \text{ cm}^3$ 海水用于现场培养实验(在条件允许的情况下培养体积尽量大一些以减少误差)。如果采取甲板流水控温模拟现场培养,应用不同透光率的遮光物来模拟各采样深度的现场光强度。对于深层样品,特别是温跃层内或温跃层下方水样的培养,另外采用控温处理是必要的。

5.5.4.2 示踪添加剂

$^{15}NO_3-N$ 和 $^{15}NH_4-N$ 的添加量应不多于所测现场氮浓度的 10%,对于现场氮浓度低于检测限的情况,视营养盐分析方法的检测下限添加。

5.5.4.3 培养时间

培养时间一般为 4 h。实验最少一天进行两次,白天一次,夜里一次。因为浮游植物氮吸收并非完全依赖于光,且浮游细菌也能利用一部分 NH_4-N 和 NO_3-N 。

5.5.4.4 样品过滤与保存

培育完毕后,水样在负压 $< 0.03 \text{ MPa}$ 条件下过滤到经 $450^\circ\text{C} \sim 500^\circ\text{C}$ 下灼烧 5 h~6 h 的玻璃纤维滤膜上,并用过滤海水清洗滤膜,除去滤膜孔隙中滞留的溶解态 ^{15}N 。待海水刚刚滤完时立即停止负压,小心取下滤膜立即进行干燥或于 -20°C 下密闭贮存。

5.5.5 同位素分析

5.5.5.1 离子质谱法

样品经以下步骤处理:

- 消解:采用 Kjeldahl 法消解膜样品,将有机氮转化为 NH_4^+ 态氮;
- NH_4^+ 的扩散吸收:将消解液定容,取适量于小型 Conway 皿之外槽,将盛有 $300 \text{ mm}^3 \sim 400 \text{ mm}^3$ 的吸收剂的小表面皿置于 Conway 皿之中心。在消解液中加入 $8 \text{ cm}^3 \sim 10 \text{ cm}^3$ 扩散剂,混匀后在 40°C 下扩散吸收 12 h;
- ^{15}N 丰度测定:经扩散吸收提纯的样品,再经低温风干浓缩至 $15 \text{ mm}^3 \sim 25 \text{ mm}^3$,取 $1 \text{ mm}^3 \sim 2 \text{ mm}^3$ 于样品靶上,低温风干后进样测定 ^{15}N 丰度;
- 实验水样中的 $^{15}NH_4-N$ 丰度,可直接经扩散吸收后测定, NH_4-N 浓度、颗粒有机氮(PON)浓度可由同位素稀释法同时测得。

5.5.5.2 气体质谱法

将膜样品直接经 Dumas 法燃烧,将 PON 全部转变为 N₂,测定 N₂ 中¹⁵N 同位素丰度。

5.5.5.3 填写表 H.6。

5.6 资料整理

5.6.1 海水浮游植物色素的测定

5.6.1.1 萃取荧光法(叶绿素 a)的资料整理

5.6.1.1.1 数据计算

5.6.1.1.1.1 计算海水中叶绿素 a 浓度

$$\rho_v(\text{Chl a}) = \frac{F_d \cdot (R_b - R_a) \cdot V_1}{V_2} \dots\dots\dots(3)$$

式中:

- $\rho_v(\text{Chl a})$ ——海水中叶绿素 a 质量浓度,单位为毫克每立方米(mg/m³);
- F_d ——量程档“d”的换算系数,单位为毫克每立方米(mg/m³);
- R_b ——酸化前荧光值;
- R_a ——酸化后荧光值;
- V_1 ——提取液的体积,单位为毫升(cm³);
- V_2 ——过滤海水的体积,单位为毫升(cm³)。

5.6.1.1.1.2 计算水柱叶绿素 a 含量

$$\rho_s(\text{Chl a}) = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{\rho_{vi}(\text{Chl a}) + \rho_{vi+1}(\text{Chl a})}{2} \cdot (D_{i+1} - D_i) \dots\dots\dots(4)$$

式中:

- $\rho_s(\text{Chl a})$ ——水柱叶绿素 a 含量,单位为毫克每平方米(mg/m²);
- $\rho_{vi}(\text{Chl a})$ ——第 i 层叶绿素 a 质量浓度,单位为毫克每立方米(mg/m³);
- D_i ——第 i 层的深度,单位为米(m);
- n ——取样层次数;
- $1 \leq i \leq n-1$ 。

5.6.1.1.1.3 计算水柱叶绿素 a 平均浓度值

$$\rho_v(\text{Chl a}) = \frac{\rho_s(\text{Chl a})}{D} \dots\dots\dots(5)$$

式中:

- $\rho_v(\text{Chl a})$ ——水柱叶绿素 a 平均质量浓度值,单位为毫克每立方米(mg/m³);
- $\rho_s(\text{Chl a})$ ——水柱叶绿素 a 含量,单位为毫克每平方米(mg/m²);
- D ——最大取样深度,单位为米(m)。

5.6.1.1.2 填写表 H.2

5.6.1.1.3 绘制分布图

5.6.1.1.3.1 平面分布图

- a) 各层次分布图
等值线取值标准(单位为 mg/m³):0.10, 0.20, 0.30, 0.50, 0.75, 1.00, 1.50, 2.00, 3.00, 5.00, 10.00;
- b) 含量分布图
等值线取值标准(单位为 mg/m²):1.00, 1.50, 2.00, 3.00, 5.00, 10.00, 20.00, 30.00, 50.00, 100.00, 200.00, 300.00, 500.00。

5.6.1.1.3.2 断面分布图

等值线取值标准(单位为 mg/m³):0.10, 0.20, 0.30, 0.50, 0.75, 1.00, 1.50, 2.00, 3.00,

5.00, 10.00。

上述平面和断面分布图取值标准,可视具体情况增减。

5.6.1.2 分光光度法的资料整理

5.6.1.2.1 数据计算

5.6.1.2.1.1 计算提取液中叶绿素 a、b、c 的质量浓度

$$\rho_n(\text{Chl a}) = 11.85E_{664} - 1.54E_{647} - 0.08E_{630} \quad \dots\dots\dots(6)$$

$$\rho_n(\text{Chl b}) = 21.03E_{647} - 5.43E_{664} - 2.66E_{630} \quad \dots\dots\dots(7)$$

$$\rho_n(\text{Chl c}) = 24.52E_{630} - 1.67E_{664} - 7.60E_{647} \quad \dots\dots\dots(8)$$

式中:

$\rho_n(\text{Chl a})$ ——提取液中叶绿素 a 的质量浓度,单位为微克每立方厘米($\mu\text{g}/\text{cm}^3$);

$\rho_n(\text{Chl b})$ ——提取液中叶绿素 b 的质量浓度,单位为微克每立方厘米($\mu\text{g}/\text{cm}^3$);

$\rho_n(\text{Chl c})$ ——提取液中叶绿素 c 的质量浓度,单位为微克每立方厘米($\mu\text{g}/\text{cm}^3$);

E_{664} ——波长为 664 nm 处 1 cm 光程经浊度校正的消光值;

E_{647} ——波长为 647 nm 处 1 cm 光程经浊度校正的消光值;

E_{630} ——波长为 630 nm 处 1 cm 光程经浊度校正的消光值。

5.6.1.2.1.2 计算海水中叶绿素 a、b、c 的浓度

$$\rho(\text{Chl a}) = \frac{\rho_n(\text{Chl a}) \cdot V_1}{V_2} \quad \dots\dots\dots(9)$$

$$\rho(\text{Chl b}) = \frac{\rho_n(\text{Chl b}) \cdot V_1}{V_2} \quad \dots\dots\dots(10)$$

$$\rho(\text{Chl c}) = \frac{\rho_n(\text{Chl c}) \cdot V_1}{V_2} \quad \dots\dots\dots(11)$$

式中:

$\rho(\text{Chl a})$ ——海水中叶绿素 a 的质量浓度,单位为毫克每立方米(mg/m^3);

$\rho(\text{Chl b})$ ——海水中叶绿素 b 的质量浓度,单位为毫克每立方米(mg/m^3);

$\rho(\text{Chl c})$ ——海水中叶绿素 c 的质量浓度,单位为毫克每立方米(mg/m^3);

$\rho_n(\text{Chl a})$ ——提取液中叶绿素 a 的质量浓度,单位为微克每立方厘米($\mu\text{g}/\text{cm}^3$);

$\rho_n(\text{Chl b})$ ——提取液中叶绿素 b 的质量浓度,单位为微克每立方厘米($\mu\text{g}/\text{cm}^3$);

$\rho_n(\text{Chl c})$ ——提取液中叶绿素 c 的质量浓度,单位为微克每立方厘米($\mu\text{g}/\text{cm}^3$);

V_1 ——提取液的体积,单位为毫升(cm^3);

V_2 ——过滤海水的体积,单位为升(dm^3)。

5.6.1.2.1.3 计算海水中叶绿素总质量浓度

$$\rho(\text{Chl}) = \rho(\text{Chl a}) + \rho(\text{Chl b}) + \rho(\text{Chl c}) \quad \dots\dots\dots(12)$$

式中:

$\rho(\text{Chl})$ ——海水中叶绿素总质量浓度,单位为毫克每立方米(mg/m^3);

$\rho(\text{Chl a})$ ——海水中叶绿素 a 的质量浓度,单位为毫克每立方米(mg/m^3);

$\rho(\text{Chl b})$ ——海水中叶绿素 b 的质量浓度,单位为毫克每立方米(mg/m^3);

$\rho(\text{Chl c})$ ——海水中叶绿素 c 的质量浓度,单位为毫克每立方米(mg/m^3)。

5.6.1.2.2 计算水柱叶绿素 a 含量

见 5.6.1.1.1.2。

5.6.1.2.3 计算水柱叶绿素 a 平均质量浓度

见 5.6.1.1.1.3。

5.6.1.2.4 填写表 H.3

5.6.1.2.5 绘制分布图

见 5.6.1.1.3。

5.6.1.3 高效液相色谱法的资料整理

5.6.1.3.1 色谱图检验

在获取色谱图后应立即进行检验,如果发现问题,应重新进样测定。一般情况下计算机软件会自动对每一个峰进行积分。但应对基线,峰的开始点和结束点进行核对。

5.6.1.3.2 色谱峰鉴别

每一个峰所代表的色素种类通常根据保留时间或色谱图来确定,如果在测试样品前测定了色素组成已知的培养藻类的样品或根据标准色素鉴别工作就较简单。

5.6.1.3.3 色素含量计算

色素含量是根据进样量和峰面积积分来计算的。

a) 计算色素响应系数

对每种色素,做出其吸收峰面积对进样色素质量的关系曲线,该色素的 HPLC 响应系数 $F(\text{area}/10^{-6}\text{g})$ 通过色素峰面积与标准液进样量(μg)的回归斜率计算。

$$F = \frac{A}{M} \dots\dots\dots(13)$$

式中:

F ——色素响应系数;

A ——色素的峰面积;

M ——注射色素标准的质量(色素质量浓度与进样体积的乘积)。

b) 计算色素含量

$$C = \frac{A \cdot V_{\text{ext}} \cdot A_{\text{Blk}}^{\text{Ca}}}{F \cdot V_{\text{inj}} \cdot V_{\text{flt}} \cdot A_{\text{Smp}}^{\text{Ca}}} \dots\dots\dots(14)$$

式中:

C ——色素含量,单位为微克每升($\mu\text{g}/\text{L}$);

A ——样品色素峰面积;

V_{ext} ——提取体积,单位为毫升(mL);

V_{inj} ——注射体积,单位为毫升(mL);

V_{flt} ——样品过滤体积,单位为升(L);

$A_{\text{Blk}}^{\text{Ca}}$ ——丙酮中内标准物的峰面积;

$A_{\text{Smp}}^{\text{Ca}}$ ——样品中内标准物的峰面积。

5.6.1.3.4 填写表 H.4

5.6.2 初级生产力的资料整理

5.6.2.1 数据计算

5.6.2.1.1 计算加入 ^{14}C 的量

$$R = \frac{R_t \cdot V_1 \times 1\,000}{V_2} \dots\dots\dots(15)$$

式中:

R ——加入 ^{14}C 的量,单位为千贝可(kBq);

R_t ——各总计数闪烁瓶测得 ^{14}C 数量的平均值,单位为千贝可(kBq);

V_1 ——培养水样的体积,单位为毫升(mL);

V_2 ——取测总计数水样的体积,单位为毫升(mL)。

5.6.2.1.2 计算海洋初级生产力

$$P_v = \frac{(R_s - R_b) \cdot \rho(C)}{R \cdot T} \quad \dots\dots\dots(16)$$

式中:

P_v ——海洋初级生产力(以 C 计),单位为毫克每立方米小时[$\text{mg}/(\text{m}^3 \cdot \text{h})$];

R ——加入 ^{14}C 的量,单位为千贝可(kBq);

R_s ——白瓶样品中 ^{14}C 的放射性活度的平均值,单位为千贝可(kBq);

R_b ——零时间样品中 ^{14}C 的放射性活度,单位为千贝可(kBq);

$\rho(C)$ ——海水中二氧化碳的总浓度,单位为毫克每立方米(mg/m^3);

T ——培养时间,单位为小时(h)。

5.6.2.1.3 计算碳同化数

$$I = \frac{P_v}{\rho_v(\text{Chl } a)} \quad \dots\dots\dots(17)$$

式中:

I ——碳同化数,单位为每小时(h^{-1});

P_v ——水体初级生产力,单位为毫克每立方米小时[$\text{mg}/(\text{m}^3 \cdot \text{h})$];

$\rho_v(\text{Chl } a)$ ——水体中叶绿素 a 的浓度,单位为毫克每立方米(mg/m^3)。

5.6.2.1.4 计算水柱初级生产力

$$P_s = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{P_{vi} + P_{vi+1}}{2} \cdot (D_{i+1} - D_i) \quad \dots\dots\dots(18)$$

式中:

P_s ——水柱初级生产力,单位为毫克每平方米小时[$\text{mg}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$];

P_{vi} ——第 i 层初级生产力,单位为毫克每立方米小时[$\text{mg}/(\text{m}^3 \cdot \text{h})$];

n ——采样层次数;

D_i ——第 i 层深度,单位为米(m);

$1 \leq i \leq n-1$ 。

5.6.2.2 填写表 H.5

5.6.2.3 绘制分布图

5.6.2.3.1 平面分布图

等值线取值标准[单位为 $\text{mg}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$]: 1.0, 5.0, 10.0, 20.0, 30.0, 50.0, 100.0, 150.0, 200.0。

5.6.2.3.2 断面分布图

等值线取值标准[单位为 $\text{mg}/(\text{m}^3 \cdot \text{h})$]: 0.1, 0.3, 0.5, 1.0, 3.0, 5.0, 10.0, 30.0, 50.0, 100.0。

上述平面和断面分布图等值线取值标准,可视具体情况增减。

5.6.3 叶绿素 a 和初级生产力的粒度分级测定的资料整理

5.6.3.1 叶绿素 a 的粒度分级测定的资料整理

- 分别计算出不同粒级(Micro⁻、Nano⁻和 Pico⁻)浮游植物叶绿素 a 的含量和直接用玻璃纤维滤膜过滤的浮游植物叶绿素 a 的总量计算公式同 5.6.1.1.1.1。
- 水体中叶绿素 a 含量应为三个粒级叶绿素 a 之和:即 $\text{Chl } a = \text{Micro}^- + \text{Nano}^- + \text{Pico}^-$,这一计算结果与直接用玻璃纤维滤膜抽滤的结果应十分接近,若二者相差较大,水体中叶绿素 a 的含量则取二者的平均值。
- 各不同粒级叶绿素 a 所占百分比的计算可根据各粒级叶绿素 a 的含量与各粒级叶绿素 a 之和

的比,即为该粒级叶绿素 a 与叶绿素 a 总量的百分比。

5.6.3.2 初级生产力粒度分级测定的资料整理

5.6.3.2.1 不同光学深度上初级生产力总值的获取

- a) 三种粒级浮游植物的初级生产力之和;
 - b) 直接用 0.65 μm 滤膜抽滤的测量结果;
- a)和 b)所获得量值应该十分接近,若二者差异较大,初级生产力的总值取二者的平均值。

5.6.3.2.2 不同粒级浮游植物的初级生产力占总生产力的百分比

每一种滤膜上的初级生产力的测定值与三种滤膜的测定值之和的比值。即为该粒级浮游植物初级生产力与总生产力的比值。

5.6.4 新生产力的资料整理

5.6.4.1 氮的比吸收率(specific uptake rate)计算

$$V = \frac{(a_p - a_o)}{(a_d - a_o)/t} \dots\dots\dots(19)$$

式中:

- V——比吸收率,单位为每小时(h⁻¹);
- a_o——¹⁵N 的天然丰度 0.366 %原子;
- a_d——介质(培养液)¹⁵N 丰度;
- a_p——PON 的¹⁵N 丰度;
- t——培育时间,单位为小时(h)。

5.6.4.2 氮的吸收率或转运率(transport rate)计算

$$\rho = V \cdot PON \dots\dots\dots(20)$$

式中:

- ρ——吸收率或转运率,单位为微摩尔每升小时或纳摩尔每升小时[μmol/(L·h)或 nmol/(L·h)];
- V——周日氮吸收速率,单位为微摩尔每升小时或纳摩尔每升小时[μmol/(L·h)或 nmol/(L·h)],约等于白天的氮吸收速率与时间的积加上夜里的速率与时间的积;
- PON 以及其他 N(NH₄-N、NO₃-N 等)的浓度单位根据测定精度可为 μmol/(L·h)或 nmol/(L·h)。

5.6.4.3 新生产力的计算

分别测得新生氮源(NO₃⁻-N)和再生氮源(NH₄⁺-N)的比吸收率 V_{新生} 和 V_{再生},V_{新生} 与(V_{新生} + V_{再生})之比即为 f 比,f 比与初级生产力之积即为新生产力,新生产力与初级生产力的单位相同。

5.6.4.4 填写表 H.6

5.6.5 填写报表

按本部分的有关规定填写报表。

6 微生物调查

6.1 技术要求和调查要素

6.1.1 技术要求

6.1.1.1 采样站位和层次

- a) 站位布设应尽量和其他调查项目一致;
- b) 采样水层见 4.2.4.1 表 1,但可去除 5 m 水层;大洋调查可增加 500 m、1 000 m、2 000 m……等水层的采样;
- c) 海洋沉积物中微生物取样层次,大面调查取表层;断面调查时,将岩芯管以 3cm 间隔分层;对

于特殊调查项目,可根据实际需要确定采样层次。

6.1.1.2 无菌操作

- a) 采水器上的采样瓶、袋应预先灭菌;
- b) 实验室内水、泥样分样和分离培养鉴定过程中,均按无菌操作要求进行;
- c) 其他凡属海上调查所需物品,如水样贮存瓶(棕色)、移液管(1 cm³、5 cm³、10 cm³)、培养皿等
均需洗净,包封灭菌、足量备用。

6.1.1.3 样品保存

样品应在采样后 2 h 内处理、分析。若暂放冰箱保存,不得超过 24 h。

6.1.2 调查要素

海洋微生物调查要素为:海洋微生物现存量,即病毒、细菌总数与微生物其他类群(放线菌、酵母、霉菌等)的丰度和海洋微生物的活性,即细菌生产力、微生物异养活性、生态呼吸率的测定。

6.2 采样

6.2.1 主要仪器设备

6.2.1.1 采水器

根据采样深度,选用尼斯金采水器或击开式采水器。

6.2.1.2 采泥器

箱式采样器、多管采样器或弹簧采泥器,见小型底栖生物调查的采样器(见 11.2.1.1)。

6.2.2 采水样

- a) 见 4.4.1.2,并按实际情况选用采水器;
- b) 采水器开启后,应停留片刻,待水样装满;
- c) 按测定项目计算采水量,若同一水层分几次采样,样品应混匀,再按各测定项目要求分装、
处理。

6.2.3 采泥样

用无菌工具从预定层次中取 10 g~20 g 样品,置于无菌容器。

6.3 样品分析

6.3.1 主要仪器设备

6.3.1.1 荧光显微镜

具备蓝光道和紫外光道供观察吖啶橙和 DAPI 染色,配置照相机或高分辨率并适用于弱光场的数码相机。

6.3.1.2 液体闪烁计数仪

具有测定¹⁴C 和³H 的功能。

6.3.1.3 恒温培养箱

控温范围:5℃~50℃。

6.3.1.4 抽滤装置

进口成品滤器组或自行装配 25 mm 和 47 mm 滤器和负压抽滤设备。放射性同位素示踪测试的抽滤设备必须专用,不能与微生物计数混用。

6.3.1.5 移液枪

置备不同功用的移液枪。

6.3.1.6 微生物自动鉴定仪

现有的微生物鉴定仪器主要应用于医学微生物鉴定,有条件的单位选用较适用于环境微生物鉴定的仪器产品。