**《水体浮游动物在线监测仪》编制说明**

# 1．项目背景

## 1.1 任务来源

本标准是根据工业和信息化部行业标准制修订计划（工信厅科[2016]110号文）计划编号：2016--0661T--JB；项目名称：“水体浮游动物在线监测仪”进行制定。主要起草单位：吉林市光大分析技术有限责任公司。

计划应完成时间：2020年。

## 1.2 工作过程

### 1.2.1 成立标准编制组

为了保证标准的适用性、实用性和可操作性，组建了以生产、科研与用户为一体的标准起草小组。

主要参加单位：吉林市光大分析技术有限责任公司、吉林省计量科学研究院、中科院长春应用化学研究所、上海市供水协会。

起草工作小组成员的职责分工和所做的工作范围：承学东任起草小组组长，主持全面指挥与组织协调工作。刘哲为本标准主要执笔人，负责本标准的起草和编写。王鸿昌、由丽负责进行现场的情况调研、关键技术的试验研究与技术论证工作。王鉴、负责进行资料信息收集及反馈意见和建议的归纳整理工作。

### 1.2.2 准备阶段

2018年初，在《水体浮游动物在线监测仪企业标准》起草初期，查阅了国内外的相关标准（包括行业标准和企业标准），结合国内外现有浮游动物在线监测仪的实际研发情况，对仪表各项功能和技术指标进行了分析，并在企业及行业内广泛征求意见，包括市场调查、研发、生产、质量检验和用户等。

### 1.2.3 起草阶段

a）对标准中涉及的关键技术要素，进行了专题理论研究与专项技术论证工作；

b）计划在所起草的标准中进行针对性解决，以保证标准起草编制的适用性、实用性和可操作性；

c）对规范国产在浮游动物在线监测仪的产品质量与科技创新方面进行了专项实验研究与产品开发实践工作。

d）2020年5月完成了《征求意见稿》初稿工作。

# 2．标准制定的必要性分析

## 2.1 浮游动物监测的环境影响

水资源的保护不但需要长期的维护，还需要定期的监测。通常，检测水质的指标包括水的ph值，含氧量，氮磷等元素，这类检测方法在国际上比较成熟，可以通过单一指标的结果来判断水质，然而并不能反映水的综合指标。淡水浮游动物作为水生态系统的初级消费者，其不仅可以消耗水中的浮游藻类，还是鱼类食物的重要来源，在水生态系统中起着至关重要的作用，因此浮游动物的数量可以直接反映该水域的生态系统的健康状况。

## 2.2国内外相关方法研究

基于中小尺度中环境因子对浮游动物种群(群落)产生的影响，针对浮游动物的研究集中于其在中、小尺度的分布及物理因子观测。国际上通常采用Bango网采集浮游动物；我国用浮游动物网(浮游动物大型网、中型网)采集海洋浮游动物，采用水平拖网和垂直拖网（其中的垂直分层拖网可研究浮游动物在水体中的垂直分布状况）的方式研究浮游动物的生物量和丰度。但上述国内外采集方式不能同时获得如压力、温度、盐度、光和氧等环境因子。我国的浮游动物研究亟需配备相应的采集或观测工具。

浮游动物连续采集器(CPR: Continuous plankton recorder)于1936年和1939年提出，它的原理是水流从一个管道流入, 水流中的颗粒过滤到一长卷筛绢上，筛绢转动，将浮游动物包裹在筛绢和另外一个长带(不是筛绢)之间，形成三明治状，一起卷入盛有甲醛的盒子中。尽管后续改进增加了探测深度、温度和流速的探头，直到1966年以前, 它只能用于浮游动物水平拖曳的高速采集。1966年，Longhurst 等将CPR作为浮游动物网的底管, 连接浮游动物网。具体做法是CPR与浮游动物网的后端(相当于底管的位置)连接，水流通过导管进入CPR内部，按一定方向分流, 浮游动物被过滤到筛绢上，此时机械装置将两层筛绢卷入储藏箱中，并用甲醛固定。通过这种方式，浮游动物被收集到两层筛绢的中间。值得注意的是，CPR后部的开口较大，可有效减缓水流。CPR水流入口为圆形，可用于水平拖网、斜拖网和垂直拖网，拖网距离达1 000 m；可连续拖网约1 h，筛绢每30 s前进一档，每次拖网可以产生100～150个样品。由于CPR的采样标准、操作方式常年来保持一致，在样品的分析研究中提供了一个稳定的标准，但这种方式存在交叉污染的可能性。

浮游动物电子记数器是根据库尔特计数器的原理设计的。小孔的两边各放一个电极，海水作为电解质，当颗粒(浮游动物)通过小孔时，颗粒会造成电极之间电阻的变化，用电极电流强度改变次数表示浮游动物的数量。由于电流强度的改变和颗粒的体积呈正比，浮游动物的大小可以由电流改变绝对值推算。浮游动物电子计数器工作原理如下：为防堵塞仪器，过滤网具滤出较大的颗粒，前部有一个收集浮游动物的网，浮游动物样品随水流通过感应装置，当水流通过一根塑料管输入到采集网中，浮游动物被收集起来，这种方式可用来校正电子计数器计数种类。

在浮游动物电子记数器作业过程中, 仪器给出的是以下信息:(1)因为已知两个电极之间的距离, 测定浮游动物经过两个电极的时间，可得出浮游动物通过的速度；(2)测定浮游动物通过一个电极的时间，这样可求出浮游动物的体长即为。需注意的是在测量长度时, 浮游动物的长轴要和水流的方向一致。浮游动物电子计数器对采集网具的要求是在长时间内有最好的过滤功能而网具不堵塞，要有足够大的水流使得动物能够流过感应装置。使用过程中为了保证收集网具不堵塞，网具需做来回的摆动，要求摆动频率5Hz，振幅2 cm，网具摆动所需的动力来自拖体上的叶轮。这种摆动对桡足类几乎没有什么损害, 但对25 %的磷虾幼体有不同程度的损伤。浮游动物电子计数器的优点是可以和CTD、荧光计等仪器安装在同一个拖体上, 在记数浮游动物的同时, 获得现场的环境因子，该计数器对尺寸估计的误差为15%～20%，可以连续工作6h，从而获得浮游动物的空间分布。

OPC是浮游动物光学计数器(Optical Plankton Counter)的简称，是基于粒径谱理论，以ESD值为检测参数而开发出的一种集浮游生物技术与测量为一体的检测设备，是一种可以在较大空间尺度上对水体中浮游动物进行测量和计数的仪器。光学仪器记数现场的浮游动物的探测原理是:正方形的光源(波长640nm)和柱形的镜头发出一束平行的光柱(截面为2 cm×2cm正方形), 在光柱的另一端(距离可调, 例如22 cm)有一聚光镜头将光线聚焦到光电二极管上, 产生直流电压信号。当浮游动物从光柱穿过时, 信号终端会产生负脉冲。这个脉冲可以分离, 脉冲的数目用来记数浮游动物的丰度, 脉冲的高度反演为浮游动物的尺寸。如果光源发出的光是稳定的,，接受器上接收的光强会随着水体透光性不同而变化, 输出脉冲的高度会受到水体透光性的干扰。为了消除这一干扰, 一个反馈线路调整光源的光强, 保持接收器上光强不变(这时如果测定光源的光强就能测出水体的透光性)。光学记数法测得的是浮游动物投影的面积, 而不是体积, 从这一点讲, 光学记数法对尺寸的反演不如电子记数法理想。浮游动物在光柱中的体位是随机的, 对于同一动物, 仪器测得的最大面积可以是最小面积的3倍。浮游动物的投影面积是最大投影面积与动物和光束之间的角度的函数, 例如, 当动物与光束的角度为45°时, 投影面积是最大投影面积的70 %。对同一种浮游动物测量的结果偏向于较大的面积, 这一点类似电子记数器的结果。

为了有效解决测量水体的颗粒重合和测量精度等问题，Herman进一步改进了OPC，采用激光作为激发电源，光束调整为1mm厚，7cm高，进水口尺寸变为7\*7cm，即为广泛使用的激光OPC（LOPC）。LOPC不仅增设了流速换算单元，可在最高达8m/s的水体中工作，还可更准确地判断连续个体分割挡光，可准确计数地颗粒浓度大大提高，很多以前OPC无法测量的个体也能测量了。目前LOPC具有适应不同环境需要的型号，已在多个海洋研究领域被广泛使用，并被引入多个海洋观测实验平台。

基于国内外现有的浮游动物计数仪器来看，浮游动物计数器多用于海洋测量，且主要用于大中型浮游动物计数。但从数量上淡水浮游动物中微型和小型占有绝大多数，现有仪器的计数不能包含微小浮游动物的测量，且不适合浮游动物的连续计数。

# 3 .标准制定的基本原则

本标准依据HJ 565-2010《环境保护标准编制出版技术指南》和HJ 168 —2010《环境监测 分析方法标准制修订技术导则》要求，以国内外最新的标准方法和相关文献研究成果为编制基础。同时考虑到国内现有监测机构的技术水平、管理水平、经济条件等实际情况，确保所编制标准能够在全国范围内推广应用。

# 4.方法研究报告

## 4.1 标准编制原则

本标准的编制需符合国家产业政策与发展原则，本着先进性、科学性、合理性和可操作性的编制原则以及标准的目标、统一性、协调性、适用性、一致性和规范性要求进行本标准的起草制定工作。

本标准在起草过程中，主要依据以下标准进行编制：

GB/T 191-2008包装储运图示标志

GB 4793.1-2007 测量、控制和实验室用电气设备的安全要求第1部分：通用要求

GB/T 11606-2007 分析仪器环境试验方法

GB/T 13384-2008 机电产品包装通用技术条件

GB/T 13966-2013 分析仪器术语

GB/T 18268.1-2010 测量、控制和实验室用的电设备电磁兼容性要求

GB/T 34065-2017 分析仪器的安全要求

GB/T 25480-2010 仪器仪表运输、贮存基本环境条件及试验方法

JJF 1033-2016 计量标准考核规范

SC/T 9402-2010 淡水浮游生物调查技术规范.

## 4.2 标准的主要内容及论据

### 4.2.1 标准的主要内容

本标准规定了水体浮游动物在线监测仪的技术要求、性能指标及检测方法。适用于地表水水体浮游动物在线监测仪的生产、应用选型和性能检验。基本检测浮游动物的直径范围为10~600μm，配备采样器和自清洁系统，能够实现在线连续监测的要求。

主要内容如下：

1）仪器组成：明确仪器的各个组成部分及功能。

2）基本要求：对水体浮游动物在线监测仪的外观、基本功能、测量范围、安全要求、使用环境等不直接体现监测系统使用性能却对使用性能有影响的内容进行规范。

3）性能要求：对水体浮游动物在线监测仪的计量准确性及仪器的基本功能等主要技术指标以及绝缘电阻、漏电保护等安全性能进行规范。

4）性能指标及检测方法：明确水体浮游动物在线监测仪的主要技术指标和安全性能指标的检验方法。

5）工作条件：规定仪器必须满足的工作电压与频率、温度等条件。

6）操作说明书：明确规定说明书必须包含的内容。

### 4.2.2 水体浮游动物在线监测方法的原理

本标准的基本原理为：电子显微镜连接采样装置，利用蠕动泵将水样输送至采样装置内，此时便可获取到清晰浮游生物背景图片，再次间隔一段时间拍下另外一张图片为对比图片。将两张图片输入计算机做图像识别处理。由于图像受到水层变化的图像叠加影响，所以图像首先应当进行灰度化、滤波等预处理操作，再将预处理的图片再利用图像分割，边缘检测等算法提取目标轮廓，并通过孔洞填充算法对图片中的物体进行标记。从图像中可观测的物体总共包含浮游动物、浮游植物和杂质三类，选用背景差法能有效识别水体中的浮游动物类。识别过程中以拍摄的第一张图为背景图像，然后把第二序列图像当前帧和背景图像相减，进行背景消去。若所得到的像素数大于某一阈值，则判定被监视场景中有运动物体，从而得到运动目标，计算图像中的目标数量即浮游动物的数量。

图像分割就是利用灰度、色彩、纹理、几何形状等信息从复杂图像场景中分离出感兴趣目标物的方法，针对本项目，即提取出感兴趣的浮游生物目标。本项目中，因为所采集的浮游生物图像中，多数图像拍摄时浮游生物目标正处于游动状态当中，浮游生物活体本身的运动会使图像产生运动模糊，所以去噪处理后采用Unsharp算子增强目标与背景之间的对比度，同时弱化由于浮游生物运动所产生的拖影，以得到更加清晰锐利的轮廓。其次采用最大类间方差法（OSTU算法）计算出最优全局灰度阈值，并且根据该阈值将锐化过的图像转换为二值图像，再利用图像处理技术中的基于区域生长的连通区域检测的方法填充内部孔洞，且消除了小面积的生物碎片以及干扰，其可以分为以下步骤：

（1）填充内部孔洞：从待处理图像中找到一个背景点（白点），以该点为种子点以其灰度值255 对背景区域进行区域生长从而得到一个单一连通区域, 区域内的点作标记, 同时统计该 区域的面积, 考虑到孔洞面积小于最大个体面积, 因此设立阈值将该背景区域填充为目标。对所有未标记过的背景点做如上处理就消除了内部孔洞；

（2）去除噪声和碎片：从待处理图像中找到一个目标点（黑点），以该点为种子点以其灰度值0对目标区域进行区域生长从而得到一个单一连通区域, 区域内的点作标记, 同时统计该区域的面积, 考虑到噪声碎片面积小于最小个体面积area, 因此设立阈值将该目标区域填充为背景。对所有未标记过的目标点做如上处理就消除了小面积的生物碎片以及干扰。

然后利用基于开运算的形态滤波方法消除目标之间的粘连和目标边界的毛刺，最后采用canny算子进行边缘提取，提取出目标轮廓，通过设置目标轮廓内部及外部灰度值即可实现目标分割。得到目标的边缘之后，需要通过二值边缘图像连接部分的标记操作以确定目标的数目，对每个目标进行标号。图像分割效果图如下：

(a)二值化的灰度图像 （b）形态学平滑后的图像

（c）边缘检测结果图像 （d）最终分割图像

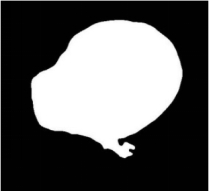


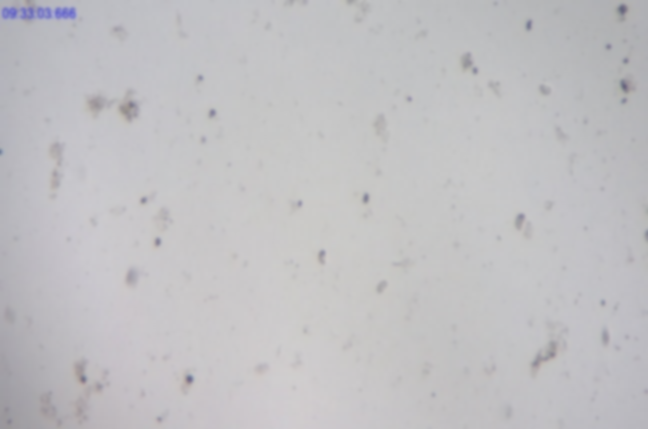
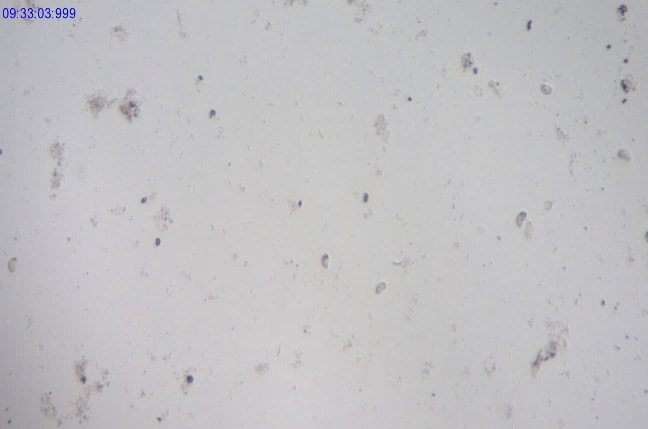
图4-1边缘检测结果图像

浮游动物位置在图像中固定不变，且在相邻两帧图像中只有浮游动物的位置会发生变化，所以可以应用背景差法来区分浮游动物。背景差法首先选取背景中的一幅或几幅图像的平均作为背景图像，然后把以后的序列图像当前帧和背景图像相减，进行背景消去。若所得到的像素数大于某一阈值，则判定被监视场景中有运动物体，从而得到运动目标。其公式如下：

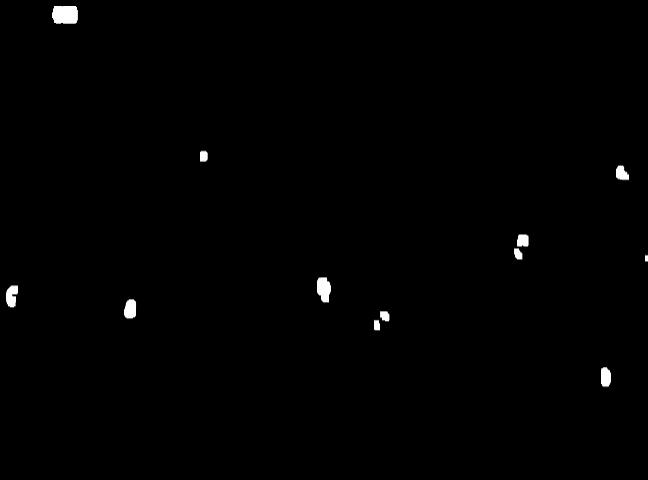
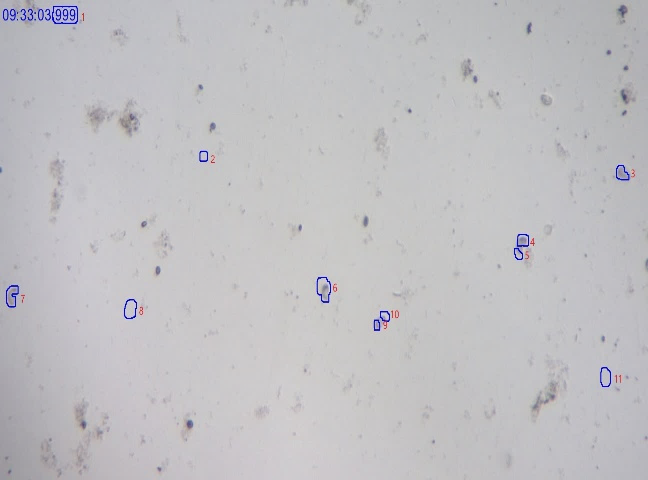
（4-1）

（4-2）

式4-1中，是背景帧差图，是背景的亮度分量，表示帧数，表示阈值。针对本项目，以前一帧图像作为背景图像，以当前帧为输入图像对两幅图像做差来筛选浮游动物。背景差分法图像处理结果如图4-2所示：



(a)背景图像 （b）背景图像



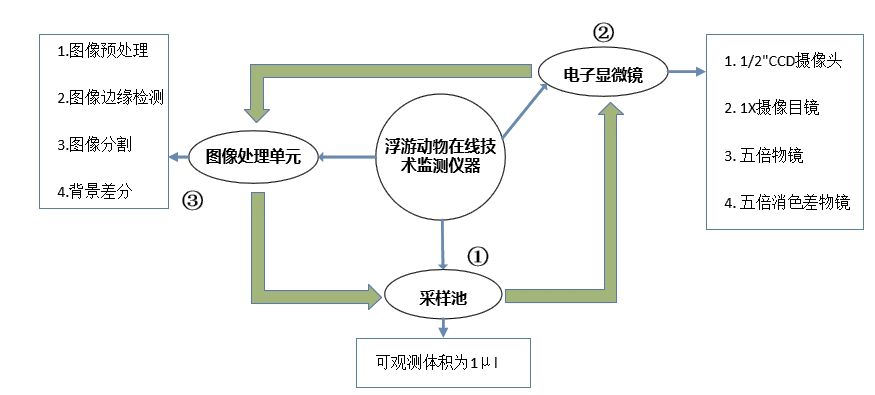
(a)背景差分结果标记图像 （b）背景差分结果灰度标记图

图4-2背景差分处理后的浮游动物标记图

经背景差分法处理之后，算法自动排除杂质等非动态物，筛选出移动点标记为浮游动物，达到区分浮游动物的目的。

### 4.2.3 监测系统的组成结构

浮游动物计数系统必须是由电子显微镜、采样池、图像处理单元和清洁装置（可选）构成的。电子显微镜配置1/2"CCD摄像头，1X摄像目镜，5倍变焦物镜，5倍消色差物镜。采样池设计为通路带透明玻璃窗的薄池结构，使用连接件和显微镜物镜连接。采样池的作用是固定水层防止流动。调节透明窗体和薄池距离可实现对单次采样水体体积的调节。图像处理单元连接显微镜数据接口，用于实现图像数据的采集预处理、图像边缘提取、图像分割和背景差分计数功能。

图4-3背景差分处理后的浮游动物标记图

### 4.2.4 仪器的检测能力

仪器的检测能力是由显微镜参数和采样池高度决定的。仪器配备电子显微镜配置1/2"CCD摄像头，1X摄像目镜，5倍变焦物镜，5倍消色差物镜。显微镜的可观测视场长度为1mm，宽度0.6mm，可观测水层调整厚度1.7mm，总可观测体积约为或1μl。自动计数时一般采集至少100次，共计数0.1ml以上的容积的浮游动物数量。

仪器的可检测浮游动物的直径范围是10-600μm。10μm的检测下限是由电子显微镜的分辨率和最小浮游动物的尺寸设定的。1/2"CCD摄像头，5倍变焦物镜，5倍消色差物镜的配置下的最小分辨率是3.5μm，而最小的原生浮游动物为10微米左右，因此仪器的检测下限设定为10μm。标准编制组实际测量同等配置的显微镜视场范围是1\*0.6mm，因此仪器的检测下限设定为600μm。

仪器的计数结果使用密度来表示，浮游动物密度估算如公式：

**** （4-3）

式中：A———个视野面枳(mm²)

D——视野的深度(mm)

F——计数的视野数(一般至少10个)

C——计数的生物个数

例如：100次可观测到12个浮游动物，以ind/ml（个/ml）为单位计算，那么1ml水中可观测到约120个，最后得到该水样浮游动物的密度是120 ind./ml。

# 5 .主要试验（或验证）情况

## 5.1实验准备

浮游动物在线监测仪的各项指标验证要比对实验室数据确定，以实验人工数据为确定仪器的检测误差、准确度和稳定性。测试水样来自松花江43.8°N，126.5°E，采集时间为2019年6月。

### 5.1.1实验仪器及工具

0.1ml浮游生物计数框（面积为20mmX20mm,分100格），20-200μl移液枪（上海力辰），蔡司Primo Star显微镜，SPX-150D型生化培养箱（上海福絮），5L玻璃培养皿。

### 5.1.2实验方法

a.根据SC/T 9402-2010 淡水浮游生物调查技术规范中浮游动物的计数实验条件，调节显微镜倍数10×20，被检测水样使用移液枪转移至0.1ml规格的计数框内。

b.显微镜连接电脑，通过图像软件间隔1-5内秒连续拍摄两张图片并保存。

c.人工标记两张图片中变化位置，样本计数两次取其平均值为有效数据。每片计数框大约计算50～100个视野，但视野数可按浮游动物的多少而酌情增减，如平均每个视野不超过1～2个时，要数200个视野以上，如果平均每个视野有5～6个时要数100个视野，如果平均每个视野有十几个时数50个视野就可以了。同一样品的两片计算结果和平均数之差如不大于其均数的±10％，其均数视为有效结果，取两片计数值的平均数即视为计算结果。

注：在浮游动物的计数过程中，常碰到某些个体一部分在视野中，另一部分在视野外，这时可规定出在视野上半圈者计数，出现在下半圈者不计数。如遇重叠情况则视为一个。

## 5.2干扰误差

电子显微镜的焦点位置变化、浮游生物的密度变化和记录视野数量是导致仪器的干扰误差主要因素。实验设定了多种条件，以人工检测结果为标准值，用示值误差的表示方式反映电子显微镜的焦点变化和浮游生物的密度变化对计数结果的影响程度。视野数量的计算则遵循SC/T 9402-2010 淡水浮游生物调查技术规范来读数。

示值误差是测定值的平均值相对于真值的相对误差。按公式5-1计算各次示值误差 Re 。

（5-1）

式中： Re  ——示值误差；

——仪器测量和，ind/ml；

——人工计数和，ind/ml。

### 5.2.1密度对干扰误差的影响

玻璃烧杯内盛5L水样放入生物培养箱内，并打开培养箱内置顶灯，在温度25℃的条件下培养一周。一周内要求每天记录水体的浮游动物密度情况，图5-1为观测一周内浮游动物在玻璃采样片的表面附着对比图。



图5-1 一周浮游动物玻璃表面附着图

数据记录一周之后对记录数据进行整理并计算示值误差，表5-1所示为一周仪器检测值误差结果：

表5-1示值误差实验数据表

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | 人工（ind/ml） | 仪器（ind/ml） | 误差值 |
| 第一天 | 122 | 109 | -10.7 % |
| 第二天 | 139 | 119 | -14.4 % |
| 第三天 | 156 | 177 | 13.5% |
| 第四天 | 225 | 198 | -12% |
| 第五天 | 266 | 290 | 9% |
| 第六天 | 327 | 353 | 8% |
| 第七天 | 349 | 389 | 11.5% |

记录结果显示不同密度条件下，仪器检测浮游动物的误差值大致在±8%-±15%之间，图像计数法的误差值整体小于电子计数和光学计数法。

### 5.2.1水层定位焦点的影响

显微镜目镜镜头和目镜观测池采用了刚性连接，前仪器的设定的水层厚度为1.7mm。当连接松动导致焦点无法对焦到水层中间位置图像数据为无效数据，此时计数结果为0，所以应当定期检查数据异常，及时调整数据焦点位置为水层中央。

### 5.2.3拍摄延迟时间的影响

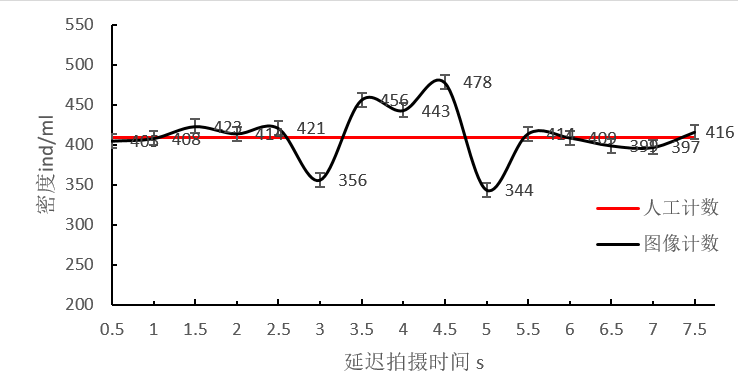
浮游动物总是在运动之中，背景差分法需要根据延迟拍摄背景图和对比图两张图片，拍摄两张图图片的间隔为拍摄延迟图片。实验选取同一时间采样的水样样本，单次人工检测数目作为基准数。仪器单组数据采集100次，对比0.5秒-7.5秒，间隔0.5秒的15组数据。

图5-2不同延迟拍摄时间的误差曲线图

浮游动物计数仪延迟拍摄时间应取0.5s-2.5秒为宜，此时误差小于10%。过长的延迟拍摄时间虽然能减小误差但也同时延长了单次采样时间。

综合各数据分析结果，本标准提出浮游动物在线监测仪的示值误差为15%检测干扰误差。

## 5.3重复性

同一水样条件下的试样仪器结果往往不同，为全面评价仪器误差，需考虑多次测的仪器重复性指标。仪器正常采样100次为一组数据，按公式5-2计算10组测定值的相对标准偏差 Sr，取两次相对标准偏差最大值作为仪器重复性的检测结果。

（5-2）

式中： Sr ——重复性；

x ——10次测量平均值，ind./ml；

xi ——第 i 次测量值，ind./ml；

n——测定次数。

检测结果如表 5-2所示：

表5-2重复性实验数据表

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 第一天 | 第二天 | 第三天 | 第四天 | 第五天 | 第六天 | 第七天 | 平均重复率 |
| 重复率 | 8.3 % | 4.7% | 4.9% | 2.7 % | 7.9 % | 3.1% | 8.6 % | 5.7% |

综合数据分析结果，一周仪器平均重复率为5.7%，单位每天的重复率保持在10%以内，测试本标准提出浮游动物在线监测仪重复性为10%

# 6．标准实施建议

本标准中的浮游动物在线计数检测仪所设定参数针对的是10-500μm级别的微小型浮游动物，但计数方法对中大型浮游动物的在线计数具有借鉴意义，图像方法同样适用于中大型浮游动物的计数。将显微镜更换为微距摄像头，更换大尺寸可调采样池即可以实现中大型浮游动物的计数。

建议本标准的性质为推荐性行业标准。企业可依据本行业标准的规定和要求在企业内部建标或对原标准进行修订，并根据行业标准实施时间要求制定企业整改和其它过渡措施。