

河南省地方标准

DB 41/T XXXX—XXXX

水库水生生物调查技术规范

点击此处添加标准名称的英文译名

(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

目 次

前 言	II
1 范围	3
2 规范性引用文件	3
3 术语和定义	3
4 工作流程	4
5 点位布设	4
6 调查频次和时间	5
7 调查器具与试剂	5
8 浮游植物调查	5
9 浮游动物调查	6
10 浮游微生物调查	7
11 着生藻类调查	8
12 鱼类调查	8
13 大型底栖无脊椎动物调查	9
14 水生维管植物调查	9
15 质量控制	10
附录 A （资料性） 水生生物调查所需试剂及配制	11
附录 B （资料性） 水生生物调查所需器具和耗材	12
附录 C （资料性） 硅藻样品鉴定前预处理方法	14
参 考 文 献	15

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020 《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由河南省水利厅提出。

本文件由河南省水利标准化技术委员会归口。

本文件起草单位：河南师范大学、河南省水文水资源局、新乡水文水资源勘测局。

本文件主要起草人：高云霓、付铭韬、李永丽、冯卫、张春芳、王宇、韩枫、张洋、许凯、徐明立、吴庆申、穆小玲、左惠玲、张颖、邹可可、樊洪波、张文龙、孙佳伟、董静、张曼、张景晓、宋东莹、李玫、高肖飞、李学军。

水库水生生物调查技术规范

1 范围

本文件规定了水库水生生物调查工作流程、点位布设、浮游生物、微生物、着生藻类、鱼类、大型底栖无脊椎动物、水生维管植物等各类水生生物的调查方法、质量保证和控制等内容。

本文件适用于各类型水库水生生物调查。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

- HJ 710.7—2014 生物多样性观测技术导则 内陆水域鱼类
- HJ 710.8—2014 生物多样性观测技术导则 淡水底栖大型无脊椎动物
- HJ 710.12—2016 生物多样性观测技术导则 水生维管植物
- HJ 1216—2021 水质 浮游植物的测定 0.1 mL计数框-显微镜计数法
- HJ 1296—2023 水生态监测技术指南 湖泊和水库水生生物监测与评价（试行）

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

水库

用坝、堤、水闸、堰等工程，于山谷、河道或低洼地区形成的具有拦洪蓄水、发电、灌溉等功能的水利工程建筑物。

3.2

水生生物

生活在水体中的各类生物总称，包括浮游生物、着生藻类、底栖动物、水生维管植物、微生物、鱼类等

3.3

贫营养水库

根据地表水环境质量标准，所有水质参数评价级别在I级~II级，或综合营养状态指数TLI低于30的水库。

3.4

脱氧核糖核酸（DNA）

脱氧核糖核酸，视生物细胞内含有的四种生物大分子之一核酸的一种。DNA携带有合成RNA和蛋白质所必须的遗传信息，是生物体发育和正常运作必不可少的生物大分子。

3.5

分类操作单元（OTU）

在系统发生学或群体遗传学研究中设定的特定标志，可鉴别生物分类单元（品系、种、属等）。一般把碱基序列相似度不小于 97% 的 OUT 定义为一个物种。

4 工作流程

4.1 技术准备

- 4.1.1 查阅收集行政区划、土地利用、功能、气候、地质、地貌、水文、水质、生态等历史背景资料。
- 4.1.2 确定调查目标、范围、水生生物调查类群、调查位点、工作进度安排等，编制调查工作方案。
- 4.1.3 准备好调查所需器具耗材，做好人员培训。

4.2 样品采集

- 4.2.1 分类采集各类生物样品，优先采集定量样品，及时做好样品标签，标签信息应包括生物类群、类别、采样时间、采样量、采样方法等，并注意防水防油防脱落。
- 4.2.2 现场固定各类生物样品，拧紧样品瓶盖，储存运输过程避免长时间高温暴晒。
- 4.2.3 现场记录每个调查位点生境信息，包括位点经纬度、气象、水文、水质、底质等，库岸带位点还包括岸带土壤、植被覆盖和种类组成、坡度、水位等。
- 4.2.4 做好采样安全防护和后勤保障。

4.3 室内分析

- 4.3.1 做好各类生物样品浓缩、混匀等前处理，再进行样品分类鉴定和定量分析，做好数据记录。
- 4.3.2 整理分析各类生物样品定性定量数据。
- 4.3.3 通过固定等方法做好样品长期保存。
- 4.3.4 提前培训相关操作人员，使其具备分类鉴定能力和资质，确保分析结果准确可靠。

4.4 报告编写

水库水生生物调查报告一般包括前言，水库概况，调查方法，各类生物种类组成、密度、多样性分布，质量控制等，并针对调查目标，结合水库功能和生境信息等，总结水库水生生物现状与问题，指导水库水生态健康评价和管理。

5 点位布设

5.1 布设原则

5.1.1 代表性原则

监测点位应具有空间代表性，覆盖典型生境。若调查目的是全面摸底，则监测点位应覆盖整个水库各个区域。若调查目的是评估特定干扰的影响，则重点考虑受影响或可能受影响区域。

5.1.2 一致性原则

生物调查点位尽可能与水文测量、水质监测、沉积物监测、生境调查相一致，尽可能获取监测点位的全面信息，用于解释观测到的生态环境质量状况。

5.1.3 延续性原则

尽可能沿用历史观测点位，保持调查数据的连续性和可比性。

5.1.4 可行性原则

调查点位应具备可达性和可实施性，在确保调查人员与设备安全的前提下，以最少的人力、物力、时间达到调查目的。

5.2 布设方法

5.2.1 平原型水库一般应在入库河流混合处、库心、坝前设置采样垂线或点位，根据水库形态、水文、水质等因素的差异和调查目的不同，可在库湾中心区、主要入库河流、水库上下游 5 km~10 km 设置点位。

5.2.2 河道型或峡谷型水库一般应在水库上游、中游和下游（坝前）中心区布设采样垂线，当水库水面宽度大于 10 km，采样垂线（点）不得少于左、中、右 3 条（个），其他可按照 5.2.1 执行。

5.2.3 分层采集浮游植物、浮游动物和微生物样品，可根据水深在采样垂线上增设垂直点位。一般要求水库水深小于 5 m 或混合均匀的水体，在水面下 0.5 m 处布设 1 个采样点；水深为 5 m~10 m 时，分别在水面下 0.5 m 处和透光层底部各布设 1 个采样点（透光层深度以 3 倍透明度计），进行分层采样或取混合样；水深大于 10 m 时，分别在水面下 0.5 m 处、1/2 透光层处及透光层底部各布设 1 个采样点，进行分层采样或取混合样。

6 调查频次和时间

6.1 设置原则

根据调查目的，结合水库水文、水质、气象、功能、生态等因素的变化，以最少的监测频次和最佳监测时间，确保获取具有时间代表性的样品。

6.2 设置方法

6.2.1 调查频次可根据调查目的设置多年一次、一年一次、一年多次，一次性调查时间一般应设置在平水期。

6.2.2 浮游植物、浮游动物和微生物可根据调查目的，按月、季节和径流量年内变化周期（如平水期、丰水期和枯水期）调查。

6.2.3 鱼类宜在每年的春季繁殖和秋季成熟期调查。

6.2.4 底栖动物宜按季节调查，也可按径流量年内变化周期调查。

6.2.5 水生维管植物宜在每年的冬春季和夏秋季调查。

6.2.6 调查频次和时间一经确定，应保持长期不变，以利于年际间调查数据的对比。

7 调查器具与试剂

各类水生生物样品采集和室内分析所需试剂见附录 A，所需器具耗材见附录 B。

8 浮游植物调查

8.1 样品采集与固定

8.1.1 定量样品

用采水器采集水面下 0.5 m 深处水样至定量采样瓶中，一般应采集 1 L 水样，贫营养水库应增至 2 L。定量样品采集时，水样不应装满，应留出添加固定液的空间，以便摇匀。

分层样品采集应按照由浅入深的顺序进行，记录分层采样深度，其他采样要求参照 HJ 1296—2023 附录 A 执行。

8.1.2 定性样品

使用 25 号浮游生物网（孔径 64 μm ）采集定性样品。关闭浮游生物网底端出水活塞开关，在水面表层 0.5 m 深处匀速拖网，拖网轨迹应呈“ ∞ ”往复 10 次~20 次，待网中收集足够多的浮游植物，将浮游生物网提出水面，网内水通过网孔自然滤出后，将底端出口移入定性采样瓶口，打开底部活塞开关收集定性样品。关闭活塞，将浮游生物网除网口外部分竖直放入采样区域水面后，提出水面滤水后再次收集样品至样品瓶，一般应重复 2 次，确保收集的浮游植物全部转移至定性样品瓶中。

对于深水型水库，应根据调查目的选择在透光层进行垂直采样，采用自下而上拖网的采集方式，将 25 号浮游生物网从透光层底部缓慢提升至表层，拖网次数应为 10 次~20 次，采集透光层各水层混合水样，其他步骤同表层样品采集要求。

分层采集定性样品时，用 25 号浮游生物网过滤特定水层样品，其他步骤同表层样品采集要求。

8.1.3 样品固定

样品采集后应立即加入鲁哥氏液（见附录 A）固定，用量为水样体积的 1.0%~1.5%，加入固定剂后迅速混匀，若样品颜色较浅，应向样品中补充适量鲁哥氏液，直到样品颜色为黄褐色。样品保存过程中应每周检查鲁哥氏液氧化程度，及时补充鲁哥氏液。

镜检活体样品不加鲁哥氏液固定，活体样品在 4 $^{\circ}\text{C}$ ~10 $^{\circ}\text{C}$ 避光条件下可保存 36 h。

8.2 室内分析

8.2.1 预处理

适宜直接在光学显微镜下计数的浮游植物密度为 10⁷ cell/L~10⁸ cell/L，从水库采集回来的定量样品应根据实际情况浓缩或稀释。样品浓缩或稀释步骤按照 HJ 1216—2021 中 8.3.1.2 要求执行。

8.2.2 鉴定与计数

将常规藻类样品装片置于 10 \times 40 倍显微镜下观察鉴定至属或种，推荐采用的鉴定参考资料见附录 A。

硅藻封片样品置于 10 \times 100 倍油镜下观察，样品尽量鉴定至属以下，对于光学显微镜下难以鉴定的种类，通过扫描电子显微镜鉴定。

扫描电子显微镜观察标本准备方法如下：在铜制样品台上贴上导电胶，在胶上贴上圆形盖玻片，滴上 5-10 μL 处理后标本，自然干燥。标本干燥后，在真空条件下喷金 3 min，即可观察鉴定。

其他分析过程参照 HJ 1216—2021 要求执行。

9 浮游动物调查

9.1 样品采集与固定

9.1.1 原生动物和轮虫

原生动物和轮虫定量和定性样品的采集和固定按照 8.1 要求执行。

9.1.2 枝角类和桡足类

9.1.2.1 定量样品

采用 5 L~10 L 采水器采集 10 L~50 L 水样，视水体浮游动物密度确定采样量。水样经 25 号浮游生物网过滤浓缩，将浓缩样品装入 100 mL 采样瓶，按照 8.1.2 要求清洗浮游生物网内侧 2 次~3 次，将冲洗浓缩液收集至同一采样瓶中。

分层样品采集应按照由浅入深的顺序进行，记录分层采样深度，其他采样要求参照 HJ 1296—2023 附录 A 执行。

9.1.2.2 定性样品

在定量样品采集结束后采集定性样品，使用 13 号浮游生物网（孔径为 112 μm ）采集枝角类和桡足类定性样品，方法同 8.1.2。

9.1.2.3 样品固定

样品采集后应立即加入甲醛溶液（见附录 A）固定，用量为水样体积的 5.0%，加入固定剂后迅速混匀。

镜检活体样品不固定，活体样品在 4°C~10°C 避光条件下可保存 24 h。

9.2 室内分析

浮游动物室内分析方法参照 HJ 1296—2023 附录 B 执行。

10 浮游微生物调查

10.1 样品采集

用有机玻璃采水器采集 2 L 以上水样，若环境中营养水平高，微生物丰富，可适当减少水样体积。用 0.22 μm 的微孔滤膜抽滤，滤膜立即放入冷冻管中密封，置于干冰或液氮中保存并尽快运输到实验室 -80 °C 冰箱保存备用。

10.2 DNA 提取

按照 DNA 提取试剂盒操作，提取滤膜上微生物样品 DNA，置于 -20 °C 保存备用。提供浓度大于 10 ng/ μL ，总量大于 500 ng 的基因组 DNA，OD 260/280 比值介于 1.8~2.0 之间，OD 260/230 比值大于 2.0，DNA 纯度较差或降解严重会影响后续的扩增实验。DNA 完整性要求有单一且清晰明亮的主带，无大量弥散状降解。送样时采用干冰保存运输；若是距离较远，应采用干冰加冰袋，存放于冰盒中。

10.3 PCR 扩增

使用 16S rRNA 通用引物对提取的微生物 DNA 进行 PCR 扩增，4°C 保存扩增产物，2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物的特异性，超微量紫外分光光度计检测纯化后的 PCR 产物质量和浓度。

10.4 测序

对 PCR 扩增产物进行第二代高通量测序，测序后对原始数据进行剪切和过滤，滤除杂质数据，然后过滤重叠部分的数据连接成片段，基于 97% 序列相似度，将这些片段聚集成 OTU 物种稀释液，以获

得代表生物多样性的OTUs，并提取其代表性序列，提取物种的分类信息，包括界、门、纲、目、科、属、种等，即可展示待识别物种信息和相对丰度信息。

11 着生藻类调查

11.1 样品采集

11.1.1 天然基质法

根据现场情况选择易刮取和测量的天然基质，如粗砾石、鹅卵石及树木残干等，从其表面刮取一定面积的样品。将采集的基质放置于漏斗中，用牙刷刷取基质表面 5 cm×5 cm 的面积，用蒸馏水或纯净水冲洗牙刷，使用样品瓶收集冲洗混合物。若样点内无硬基质，则使用注射器或吸管吸取 25 cm² 的松散基质，如细砂、淤泥及黏土等，收集至样品瓶中。也可将培养皿压入松散基质中，并在其下方滑动，将采集到的松散基质从培养皿中取出，收集至样品瓶中。将采集到的样品混合在样品瓶中，加入蒸馏水或纯净水至样品瓶 2/3 处，避光保存。

11.1.2 人工基质法

采用人工基质挂片方法，将挂片悬挂于水柱中 为避免丢失，每个样点至少放置 2 块人工基质，要求尽量将人工基质隐藏，避开航道，至少放置 14 d 后按照天然基质法采集回样品。

11.2 样品的固定与保存

按5 %体积比加入鲁哥氏液，鉴定完后长期保存则按 3 % 体积比加入甲醛溶液。

11.3 室内分析

11.3.1 预处理

非硅藻样品按照HJ 1216—2021 执行

硅藻种类的形态学鉴别主要依据其纹饰和壳体形状，鉴定之前，参照附录 C 对样品进行预处理，去除硅藻细胞中原生质 仅保留主要带花纹和纹饰的硅质外壳。

11.3.2 鉴定与计数

常规藻类样品和硅藻样品的鉴定和计数按照8.2.2要求执行。

12 鱼类调查

12.1 样品采集和测量

在近岸采用地笼等采捕鱼类，在离岸采用抛网等网捕鱼类，地笼放置时间一般应不少于12h。鱼类样本用水洗净后，置于解剖盘中，矫正体形，撑开鳍条，现场用相机拍照，进行种类鉴定，并参照HJ 710.7—2014逐尾进行各项生物学指标的测量和记录。

12.2 样品处理和保存

将鱼类体表冲洗干净，进行编号、登记和记录，并系好布标签，直接放入装有95%乙醇溶液中浸泡，一天后更换75%乙醇即可长期保存。对个体大的鱼需向腹部注射乙醇，隔天更换乙醇一次，若隔天乙醇颜色变黄仍需更换，直到不变黄为止。

13 大型底栖无脊椎动物调查

13.1 样品采集

近岸可涉水区使用 D 型网直边紧贴库底，逆水流方向移动一定距离，使生物从底质上分离，随水流冲刷进入网内，根据生物密度大小确定合适采样面积。

离岸不可涉水区使用抓斗式采泥器至少采集 3 次，采样厚度一般为 10 cm~20 cm，采泥器规格一般为 1/16 m²或 1/12 m²，记录采样面积，深水区应借助机械绞盘。

13.2 样品筛选和分拣

将每次采集到的样品倒入长柄 D 型网中，在水中摇荡筛选，初步洗去样品中的污泥。洗涤过程保持网口朝上，防止网内生物损失。将 D 型网提出水面后，用手抓住网底，将底栖动物样品转移至大号封口袋中，并用水洗 D 型网内 3 次，确保筛选出的底栖动物全部转移。

筛选出的样品冷藏保存，应在 24 h 内完成分拣，即将封口袋中的样品倒入 40 目网筛中，将筛底置于水盆清水中轻轻摇荡，洗去样品中剩余污泥，挑出其中的杂物和植物枝条叶片等，将筛网上全部样品倒入白瓷盘中，加入少量清水，用圆头镊或眼科镊、解剖针、吸管，挑拣出每个样品中各类底栖无脊椎动物，放入 100 mL 样品瓶中，用 75% 乙醇溶液固定，软体动物等则放入封口袋中。

13.3 种类鉴定和计数

样品原则上应鉴定到尽可能低的分类单元，其中昆虫纲（摇蚊除外）、甲壳纲、蛭纲、多毛纲等应尽可能鉴定到科，寡毛纲、昆虫纲摇蚊科幼虫应尽可能鉴定到属，腹足纲、双壳纲应尽可能鉴定到种。鉴定过程中保留分类特征鉴定的照片凭证及标本。

准确统计每个样品各物种个体数，在标本损坏的情况下，只统计头部，不统计零散的附肢。根据每个样品采样面积，计算每个物种密度（个/m²），再加和计算各位点大型底栖无脊椎动物总密度。

13.4 样品保存

鉴定计数后的大型底栖无脊椎动物样品再加入 5% 甲醛溶液，按点位和采样时间归类放置，每月检查补充固定剂。样品瓶外侧贴上永久性标签，包括水体名称、点位名称、采样日期、采样面积、固定剂等信息。原则上至少保留 4 个月，有条件的实验室可长期保存。

14 水生维管植物调查

水生维管植物一般现场鉴定记录，应鉴定到种，同时按样方统计各种水生植物株数，计算各样方水生植物密度。若需做其他分析，则现场采集植物带回实验室。

根据水生植物生活型和分布特点，采用典型抽样方法，布设样方。一般应从近岸向水体中央等距离布设样方，直至无水生植物区域。根据植物密度设置样方面积，对于密度小于 100 株/m² 的植物稀疏群落用 5 m×5 m 样方，密度大于 100 株/m² 的植物群落采用 1 m×1 m 样方。当水生植物在水库分布广泛时，应参照 HJ 710.12—2016 相关要求布设样方。

挺水植物采集应用镰刀割取样方内的植物基部以上部分，沉水植物、浮叶植物和漂浮植物应用水草采样夹采集。采集时，将水草夹张开，待其沉入水底后关闭上拉，倒出网内植物，冲洗去淤泥，去除枯死的枝叶杂质，洗净装入样品袋中，带回实验室内进行处理。每个监测点位应采集至少 2 个平行样品。

15 质量控制

15.1 样品采集

15.1.1 采样前明确野外采样负责人，制定合理的采样计划，评估采样点位准确性、采样方案可实施性和样品采集效果。

15.1.2 用符合质量要求的统一设备采样，确保采样设备处于良好运行状态，及时清洗所有接触过样品的采样设备，防止采样污染。

15.1.3 合理安排现场监测与样品采集顺序，避免生物类群在采集前受到较大扰动，在定量样品采集完后开展定性样品采集。

15.1.4 准确填写现场采样记录表及样品标签，包括生物类群、样品编号、日期、点位名称、采集方式以及采样人姓名等。如果某个点位某个项目的样品瓶超过 1 个，还应当标明样品的总瓶数及编号。样品记录表包含的信息必须与样品瓶标签一致。

15.1.5 详细记录采样时间、地点、水温、气温、水文、植被等相关生境气候位点信息，并做好照片和视频采集，确保现场数据的完整性。

15.1.6 按照 5%~10% 的比例采集质控平行样。

15.2 样品运输与送检

15.2.1 现场样品运输前和送检过程中根据采样记录或登记表核对清点样品，确保实际样品信息和记录信息的一致性，防止丢失、混淆等，同一任务的样品应保存在相对独立、集中的区域，并放置明显标识。

15.2.2 样品运输中贮存温度不超过采样时温度，避免强光照射及强烈震动，根据生物样品保存要求准备冷藏设备或物质，确保样品无破损、无污染。

15.2.3 实验室应建立送检样品的唯一识别系统，以保证样品不会发生混淆。

15.3 室内鉴定和计数

15.3.1 分析人员应经过系统水生生物监测培训和实践，具备水生生物分类经验和一定资质。

15.3.2 生物样品鉴定应参照生态环境监测部门推荐或者认可的国内外水生生物名录或水生生物数据库资料，命名需要与环境监测部门发布的物种名录或物种多样性数据库名称相吻合，必要时应请专家对命名进行核定。

15.3.3 有疑问或不确定的物种，需要请分类学专家对该物种进行形态学鉴定，并借助分子技术确认。

15.3.4 新种、新纪录种必须留出典型、完好的样品制作永久标本请分类学专家进行形态学鉴定，并借助分子技术确认。

15.3.5 按 5%~10% 比例抽取质控样品，分别由 2 名工作人员重复鉴定和计数，以评估分类和计数的准确性。

15.3.6 详细记录样品信息、方法依据及关键技术参数、物种名录、数量以及结果计算方法等信息，同时对抽检、比对情况以及存疑的物种分类结果予以标记。数据记录表须有记录人、校对签字。

15.4 样品保存及处置

15.4.1 按照要求保存样品，每隔几周定期检查固定液，必要时进行添加。

15.4.2 现场分析剩余样品不保存，实验室分析剩余生物样品至少保留 4 个月以上，有条件的实验室可长期保存。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/037155101104006150>