ICS 07.060
CCS A45

HY

中 华 人 民 共 和 国 海 洋 行 业 标准

HY/T XXXXX. 2—XXXX

极地海冰生物检测样品的预处理方法

Pretreatment method of polar sea ice samples for biological analysis

点击此处添加与国际标准一致性程度的标识

（报批稿）

（本稿完成日期：2020 年 12 月 1 日）

XXXX－XX－XX 发布　　XXXX－XX－XX 实施

中 华 人 民 共 和 国 自 然 资 源 部　发 布

目　　次

前言 II
1 范围 1
2 规范性引用文件 1
3 术语和定义 1
4 试剂或材料 2
5 实验室环境及设备工具 2
6 海冰采集前准备 3
7 海冰采集 3
8 海冰分样 4
9 海冰融化 4
10 融化样预处理 4
11 样品保存 5
附　录　A （规范性） 极地海冰生物分析样品预处理流程图 6
附　录　B （规范性） 极地海冰生物分析样品预处理记录表 7
参考文献 10

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。

本文件由中华人民共和国自然资源部提出。

本文件由全国海洋标准化技术委员会（SAC/TC 283）归口。

本文件负责起草单位：中国极地研究中心。

本文件主要起草人：何剑锋、蓝木盛、曹叔楠、罗光富、张芳、高源。

极地海冰生物检测样品的预处理方法

1 范围

本文件规定了用于生物检测的极地海冰样品的现场采集、预处理和保存方法。

本文件适用于在极地海域冰站上实施的海冰生物调查作业。在其他海域进行海冰生物调查作业可进行参考。

2 规范性引用文件

本文件没有规范性引用文件。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

极地 polar region

南纬 60 ℃以南、北纬 66°34′（北极圈）以北的区域。

3.2

海冰 sea ice

由淡水冰晶、卤水、气泡和生物等组成的混合体。

3.3

浮冰 pack ice

南大洋和北冰洋中随风和海流漂移的海冰。

3.4

冰站 ice camp

极地考察过程中选定的作为主要作业平台的浮冰。

3.5

冰芯 sea ice core

利用手动或动力钻具钻取的圆柱状海冰样品。

3.6

海冰生物 sea ice organisms

生活于海冰内部的生物。

3.7

冰藻 sea ice algae

依附于海冰生存的藻类。

3.8

小型冰藻 sea ice micro-algae

个体粒径介于 20 μm~50 μm 之间的冰藻。

3.9

微型冰藻 sea ice nano-algae

个体粒径介于 2 μm~20 μm 之间的冰藻。

3.10

微微型冰藻 sea ice pico-algae

个体粒径介于 0.2 μm~2 μm 之间的冰藻。

3.11

中小型动物 meiofauna

个体粒径介于50 μm～2000 μm动物的统称。

3.12

海冰细菌 sea ice bacteria

依附于海冰生存的原核生物。

4 试剂或材料

4.1 试剂

除非另有说明，在分析中仅使用确认为分析纯的试剂。

4.1.1 超纯水：电阻率不小于 18 MΩ·cm（25℃）。

4.1.2 纯水：电阻率不小于 0.1 MΩ·cm（25℃）。

4.1.3 液氮。

4.1.4 稀盐酸（0.5 mol/L）：1 体积的质量分数为 37%的浓盐酸与 23 体积的超纯水混合。

4.1.5 甲醛溶液（40%）。

4.1.6 戊二醛溶液（25%）：将体积分数为 50%的戊二醛与超纯水按体积比 1：1 混合。

4.1.7 鲁格试剂：将 100 g 碘化钾溶于 1 L 超纯水中，加入 50 g 碘使其溶解，再加入 100 mL 冰醋酸，转移至棕色玻璃瓶中常温避光保存。

4.1.8 过滤海水：使用 0.2 μm 孔径的聚碳酸酯膜对采集的极地海水进行过滤，收集经过滤的海水并 4℃低温避光保存备用。

4.2 材料

4.2.1 尼龙滤膜：直径 47 mm、孔径 20 μm。

4.2.2 聚碳酸酯膜：直径 47 mm、孔径 2 μm 和 0.2 μm。

4.2.3 GF/F 滤膜：直径 47 mm、孔径 0.7 μm 。

4.2.4 尼龙材质筛绢：孔径 50 μm 和 20 μm。

4.2.5 冻存管：容量为 15 mL、5 mL 和 2 mL。

5 实验室环境及设备工具

5.1 实验室环境

5.1.1 实验室内的温度、湿度等环境参数应符合仪器设备使用的规定。

5.1.2 外界或内部的污染以及热、光等干扰水平应对样品处理无显著影响。

5.1.3 应保持实验室洁净、整齐、有序，室温恒定。

5.2 设备

5.2.1 抽滤装置：由单头或多头滤器（直径 50 mm）、抽滤瓶、真空泵（含负压表）等组成。
5.2.2 低温冷藏室。
5.2.3 超低温冰箱：最低温度≤ -80℃。
5.2.4 通风橱：排风量≥1000 m^3/h。
5.2.5 马弗炉。

5.3 工具

5.3.1 冰芯钻系统：由切割头、钻管、延长杆、钻机等部分组成；钻管直径不小于 9 cm、长不小于 100 cm，延长杆长 100 cm、配置不少于 2 根。
5.3.2 冰芯盛管：PVC 材质的圆柱形空心管沿管口内径对半切割而成，单根长度与冰芯钻钻管等长（不小于 100 cm），内径略大于钻管（若钻管直径为 9 cm，则套管直径建议为 10 cm），并在外壁标注长度标尺，配置不少于 6 个。
5.3.3 冰锯：不锈钢材质手工锯，锯路宽 1 mm，锯齿齿长不小于 5 mm，锯齿齿距不小于 5 mm。
5.3.4 不锈钢铲。
5.3.5 量筒：10 mL、100 mL、500 mL、1L 和 2 L。
5.3.6 烧杯：1L。
5.3.7 透明玻璃瓶：250 mL。
5.3.8 棕色玻璃瓶：500 mL。
5.3.9 冰芯容器：聚四氟乙烯材质，不透光，容积大于 2 L，开口不小于 10 cm。
5.3.10 运输箱：密封、不透光。
5.3.11 温度计：温度下限-20℃，准确度 0.1℃。
5.3.12 麻花钻：由钻头、钻杆、钻机等部分组成；钻杆 3 根、直径 5 cm、长度 100 cm。
5.3.13 量冰尺：3 m，准确度 1 mm。

6 海冰采集前准备

6.1 根据极地海冰生物分析样品预处理流程图（见附录 A 图 A.1），熟悉海冰采集和样品预处理方法。

6.2 将 GF/F 滤膜（见 4.2.3）用锡箔纸包好，置于马弗炉（见 5.2.5）中 450℃灼烧不少于 4 h，取出放入干燥器中保存待用。

6.3 分别使用淡水、纯水（见 4.1.2）、超纯水（见 4.1.1）对冰芯钻切割头和钻管（见 5.3.1）内外表面、冰芯盛管（见 5.3.2）冰锯（见 5.3.3）、不锈钢铲（见 5.3.4）、量筒（见 5.3.5）、烧杯（5.3.6）、玻璃瓶（见 5.3.7 和 5.3.8）进行冲洗，晾干后备用。冰芯容器（见 5.3.9）应事先用稀盐酸（见 4.1.4）浸泡 24 h，然后用超纯水（见 4.1.1）洗涤 3 次，在阴暗的环境下晾干备用。

7 海冰采集

冰芯样品用冰芯钻（见 5.3.1）按下列步骤采集。

a) 宜选择平均厚度≥1 m 以上、平整作业面直径≥100 m 的开阔海冰作为冰站，以便于考察船舶停靠、物资搬运和现场人员登冰采集海冰样品。然后在冰面选取较平整和开阔的位置作为采样点。
b) 用温度计（见 5.3.11）测定采样现场气温，然后用麻花钻（见 5.3.12）钻穿海冰，将量冰尺（见

5.3.13）伸入钻孔中测定海冰厚度。

c) 用不锈钢铲（见 5.3.4）铲除采样点及周围的表面积雪。

d) 使用冰芯钻（见 5.3.1）垂直钻取冰芯；应弃用最初采集的 2 支冰芯，确保避免来自于存储和运输冰芯钻过程中可能的污染。

e) 冰芯钻取次数应视海冰厚度而定：

1) 在海冰厚度小于 1 m 时，宜一次性钻取完整冰芯；

2) 在海冰厚度大于 1 m 时，需分次钻取冰芯：第一次钻取长度小于 90 cm 的冰芯，将冰芯样品转入预先准备好的冰芯盛管（见 5.3.2）中临时存放。随后接入延长杆继续钻取剩余冰芯，直至获取完整冰芯；

f) 钻取的冰芯应保证其连续性和完整性。

g) 在同一站点重复钻取不少于 6 支冰芯。对同一站点的样品，钻孔间距不超过 0.5 m。

8 海冰分样

冰芯样品按下列步骤在冰站现场分样。

a) 取 1 支冰芯平放于冰面，从冰表到冰底用冰锯（见 5.3.3）沿平行于冰表方向按 20 cm 一段切割冰芯。其中冰芯底部末段保留 5 cm，次末段如果长于 10 cm 则按单独一段处理，次末段如果小于 10 cm 则并入上一段，同时做好样品编号等相应记录。每段冰芯切割结束后应及时清理冰锯，以避免后续样品被污染。

b) 如果遇到冰芯断节，应先判断断节形成原因：

1） 如果断节为天然原因（如冰下融洞）造成，则应将断节上部（断节处至冰表）和断节下部（断节处至冰底）视为两段冰芯，按照 8 a）步骤分别处理，并做好记录；

2） 如果断节为钻取冰芯时受外力作用造成，则应将其视为一段冰芯，按照 8 a）步骤处理；

c) 冰芯切割好后，应将各段冰芯样品分开储存于冰芯容器（见 5.3.9）内，同时记录分段和容器序号等信息，记录格式见附录 B 表 B.1。

d) 取第 2 支冰芯进行分样，操作步骤重复 8 a）至 c）。

e) 另取 1 支冰芯，仅取末段 5 cm，与第 1 支冰芯末段合并，用于叶绿素浓度分析。

f) 另取 3 支冰芯，均仅取末段 5 cm，与第 2 支冰芯末段合并，用于生物类群分析的。

g) 用运输箱（见 5.3.10）将分割后的冰芯样品运回实验室，立即进行海冰融化。

9 海冰融化

根据分析目标的不同，对海冰采取不同的融化方法：

a) 海冰叶绿素浓度分析：将装有分段冰芯样品的容器放置于实验室内避光融化；

b) 海冰生物类群分析：向装有分段冰芯样品的容器中按比例（每 20 cm 冰芯加入 1 L）加入过滤海水（见 4.1.8），然后将样品转移至 4℃低温冷藏室（见 5.2.2）内避光等渗融化。

10 融化样预处理

密切关注冰芯融化情况，待冰芯完全融化后，立即按下列步骤进行预处理。

a) 叶绿素融化样：首先根据样品体积选择量程合适的量筒（见 5.3.5）量取叶绿素融化样的体积，然后使用 GF/F 滤膜（见 4.2.3）进行过滤，或使用尼龙滤膜（见 4.2.1）、2 μm 聚碳酸酯滤膜（见 4.2.2）和 GF/F 滤膜（4.2.3）进行分级过滤，样品还剩约 5 mL 时用超纯水（见 4.1.1）清洗滤

器壁。抽滤时负压应小于 30 kPa，在样品刚刚完全通过滤膜时结束抽滤，用镊子小心地取下滤膜，将其对折（有生物样品的一面向里），将滤膜装入 15 mL 冻存管（见 4.2.5）中，记录过滤信息于附录 B 表 B.2。

b) 生物类群融化样：根据分析目标的不同选择不同的处理方式。
   1) 中小型动物分析：使用 50 μm 筛绢（见 4.2.4）过滤全部样品，收集滤液并用量筒（见 5.3.5）量取全部滤液后记录过滤体积；用过滤海水（见 4.1.8）冲洗筛绢（见 4.2.4）背面，将动物样品冲洗至烧杯（见 5.3.6）中；
   2) 小型冰藻镜检分析：将滤液摇匀，用量筒（见 5.3.5）量取 500 mL 转移至棕色玻璃瓶（见 5.3.8）中；
   3) 微微型冰藻和海冰细菌丰度分析：摇匀滤液后，取 5 mL 滤液经 20 μm 筛绢（见 4.2.4）预滤，转入 5 mL 冻存管（见 4.2.5）中；
   4) 微型、微微型海冰生物多样性分析：将剩余滤液经 20 μm 筛绢（见 4.2.4）预滤后，用 0.2 μm 聚碳酸酯膜（见 4.2.2）过滤，操作方法参照 10 a）叶绿素融化样处理，获取滤膜装入 2 mL 冻存管（见 4.2.5）中，将过滤信息记录于附录 B 表 B.3。

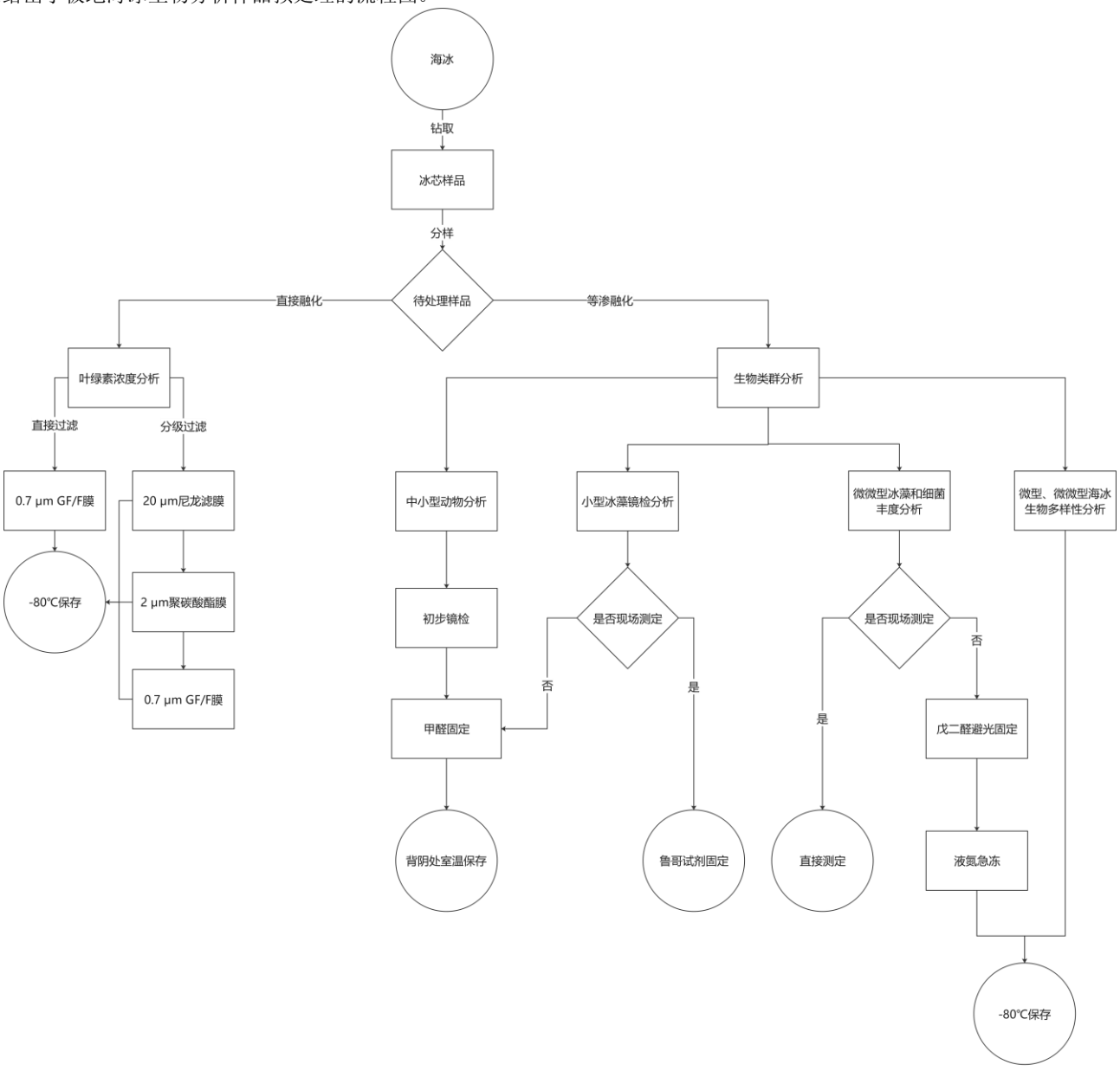
11 样品保存

样品保存方法如下：

a) 叶绿素浓度分析样：将装有滤膜的冻存管置于超低温冰箱内（见 5.2.3）避光保存；
b) 中小型动物分析样：初步镜检后，转入 250 mL 透明玻璃瓶（见 5.3.7）中，加入甲醛溶液（见 4.1.5）至最终浓度为 2%~5%（体积分数），摇匀固定后于背阴处室温保存；
c) 小型冰藻镜检分析样：若进行现场分析，应向样品加入 5 mL~8 mL 鲁格试剂（见 4.1.7）固定；若需长期保存，则需加入甲醛溶液（见 4.1.5）至最终浓度为 1%（体积分数），摇匀固定后于背阴处室温保存；
d) 微微型冰藻和海冰细菌丰度分析样：有条件的应在现场使用流式细胞仪直接测定，若无法现场测定，应在通风橱（见 5.2.4）内向样品中加入戊二醛溶液（见 4.1.6）至最终浓度为 0.5%，避光固定 15 min 后放入液氮（见 4.1.3）中急冻 30 min，然后转入超低温冰箱内（见 5.2.3）保存；
e) 微型、微微型海冰生物多样性分析样：将存有滤膜的冻存管先经液氮（见 4.1.3）急冻 30 min，再转入超低温冰箱内（见 5.2.3）保存。

附 录 A
（规范性）
极地海冰生物分析样品预处理流程图

图A.1给出了极地海冰生物分析样品预处理的流程图。



图A.1 极地海冰生物分析样品预处理流程图

附 录 B
（规范性）
极地海冰生物分析样品预处理记录表

表B.1 给出了极地海冰冰芯样品采集现场记录的格式。

表 B.1 极地海冰冰芯样品采集现场记录表

项目名称_____考察航次 _____ 第____页 共____页
采样日期_____ 执行单位 _____现场执行人_____

站位		气温 ℃		冰厚 cm		时间总计				
开始时间（UTC）		经度				纬度				
结束时间（UTC）		经度				纬度				
冰芯 编号	冰芯分段样品对应的容器编号（冰面为 0） cm									
01	0~20	20~40	40~60	60~80	80~100	100~120	120~140	140~160	160~180	180~200
	200~220	220~240	240~260	260~280	280~300	底				
02	0~20	20~40	40~60	60~80	80~100	100~120	120~140	140~160	160~180	180~200
	200~220	220~240	240~260	260~280	280~300	底				
03	0~20	20~40	40~60	60~80	80~100	100~120	120~140	140~160	160~180	180~200
	200~220	220~240	240~260	260~280	280~300	底				
其他说明：										

记录者_____校对者_____审核者_____

表B.2 给出了极地海冰叶绿素分析样预处理记录的格式。

表 B.2 极地海冰叶绿素分析样预处理登记表

项目名称_____ 考察航次_____ 站号_____ 第____页 共___页
经纬度_____ 实验日期_____

序号	冰芯容器编号	分段 cm	预处理时间	融后体积 mL	叶绿素		备注
					过滤体积 mL	膜编号	
1		0~20					
2		20~40					
3		40~60					
4		60~80					
5		80~100					
6		100~120					
7		120~140					
8		140~160					
9		160~180					
10		180~200					
11		200~220					
12		220~240					
13		240~260					
14		260~280					
15		280~300					
16		底					
其他说明：							

记录者_____校对者_____审核者_____

表B.3给出了极地海冰生物分析样预处理记录的格式。

表 B.3 极地海冰生物分析样预处理登记表

项目名称_____考察航次_____站号_____经纬度_____采样日期_____实验日期_____ 第____页 共_____页

序号	冰芯容器编号	分段 cm	加入过滤海水体积 mL	预处理时间	融后体积 mL	中小型动物		小型冰藻		微微型冰藻和海冰细菌丰度		微型、微微型海冰生物多样性		备注
						取样体积 mL	样品编号	取样体积 mL	样品编号	取样体积 mL	样品编号	取样体积 mL	样品编号	
1		0~20												
2		20~40												
3		40~60												
4		60~80												
5		80~100												
6		100~120												
7		120~140												
8		140~160												
9		160~180												
10		180~200												
11		200~220												
12		220~240												
13		240~260												
14		260~280												
15		280~300												
16		底												

记录者_____校对者_____审核者_____

参 考 文 献

[1] GB/T 12763.1-2007 海洋调查规范 第 1 部分：总则。

[2] GB/T 12763.6-2007 海洋调查规范 第 6 部分：海洋生物调查。

[3] GB/T 12763.9-2007 海洋调查规范 第 9 部分：海洋生态调查指南。

[4] Mundy, C. J. et al., 2007. Influence of snow cover and algae on the spectral dependence of transmitted irradiance through Arctic landfast first-year sea ice, Journal of Geophysical Research, 112, C03007.

[5] He Jianfeng et al., 2005. Characterization of the summer pack ice biotic community of Canada Basin. Acta Oceanologica Sinica, 24(6), 80–87.

[6] Brinkmeyer, R. et al., 2003. Diversity and Structure of Bacterial Communities in Arctic versus Antarctic Pack Ice. Applied and Environmental Microbiology, 69(11), 6610–6619.

[7] Christian, H. F. et al., 2008. Inter-annual sea-ice dynamics and micro-algal biomass in winter pack ice of Marguerite Bay, Antarctica. Deep-Sea Research Part II, 55(18-19), 2059–2067.

[8] Tamelander, T. et al., 2009. Ice algal assemblages and vertical export of organic matter from sea ice in the Barents Sea and Nansen Basin (Arctic Ocean). Polar Biology, 32(9), 1261–1273.

[9] Druzhkov, N. V. et al., 2001. The sea-ice algal community of seasonal pack ice in the southwestern Kara Sea in late winter. Polar Biology, 24(1), 70–72.

[10] Lange, B A. et al., 2015. Comparing Springtime Ice-Algal Chlorophyll a and Physical Properties of Multi-Year and First-Year Sea Ice from the Lincoln Sea. PLoS ONE, 10(4), e0122418.

[11] Olsen, L. M. et al., 2017. The seeding of ice algal blooms in Arctic pack ice: The multiyear ice seed repository hypothesis. Journal of Geophysical Research: Biogeosciences, 122(7), 1529–1548.