

# 团 体 标 准

T/PSC 1.7—2022

## 船舶压载水检测方法 第 7 部分：细菌总数

Determination for ballast water of ships—Part 7 :Total amount of bacteria

2022 - 01 - 01 发布

2022 - 07 - 01 实施

中国太平洋学会 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 方法原理 .....	1
5 试剂和材料 .....	1
6 仪器和设备 .....	1
7 样品检测 .....	2
8 数据记录计算与处理 .....	2
9 质量控制 .....	3
附录 A (资料性) 压载水细菌总数结果记录表 .....	4
参考文献 .....	5

## 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。

本文件是T/PSC 1—2021《船舶压载水检测方法》的第7部分。T/PSC 1—2021已经发布了以下部分：

- 船舶压载水检测方法 第1部分：大于等于 50  $\mu\text{m}$  活体生物；
- 船舶压载水检测方法 第2部分：大于等于 10  $\mu\text{m}$  且小于 50  $\mu\text{m}$  活体生物；
- 船舶压载水检测方法 第3部分：大肠埃希氏菌；
- 船舶压载水检测方法 第4部分：肠道球菌；
- 船舶压载水检测方法 第5部分：霍乱弧菌；
- 船舶压载水检测方法 第6部分：生物毒性。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利，本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本文件由中国太平洋学会东海环境分会提出。

本文件由中国太平洋学会归口。

本文件起草单位：国家海洋局东海环境监测中心、上海海洋大学、国家海洋局东海标准计量中心。

本文件主要起草人：袁一鸣、张昊飞、龚婉卿、何彦龙、季晓、何勇、陈琼。

# 船舶压载水检测方法

## 第7部分：细菌总数

### 1 范围

本文件规定了荧光显微镜计数法检测船舶压载水中细菌总数的方法原理、试剂和材料、仪器和设备、样品检测、数据计算和记录、质量控制。

本文件适用于荧光显微镜计数法检测船舶压载水中细菌总数。

### 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。

GB/T 12763.6 海洋调查规范 第6部分：海洋生物调查

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

IMO MEPC.300(72)：2018 压载水管理系统认可规则（Code for approval of ballast water management systems (BWMS CODE)）

IMO BWM.2/Circ.42/Rev.2：2020 关于根据BMW公约和指南（G2）试验使用压载水取样和分析指南（Guidance on ballast water sampling and analysis for trial use in accordance with the BWM Convention and Guidelines (G2)）

### 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

#### 3.1

**细菌总数 Total amount of bacteria**

用荧光显微镜直接计数法能检测到的每毫升水样中的细菌数量。

### 4 方法原理

压载水中的细菌经DAPI染色，用黑色核孔滤膜过滤后截留在滤膜上，在荧光显微镜下观察，可见细菌发荧光。

### 5 试剂和材料

除非另有说明，本方法所用水为经 0.2  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤水或高压灭菌的纯水。

5.1 甲醛溶液，37%~40%，分析纯。

5.2 DAPI 染色液（市售）：10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，-20 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。

### 6 仪器和设备

6.1 荧光显微镜：有蓝光道。

6.2 砂芯微量抽滤装置。

6.3 黑色核孔滤膜，聚碳酸酯材质，直径 25 mm，孔径 0.2  $\mu\text{m}$ 。

6.4 移液器，1 mL、5 mL。

- 6.5 一次性滤头：过滤孔径为 0.2  $\mu\text{m}$ 。
- 6.6 载玻片。
- 6.7 盖玻片。
- 6.8 无荧光镜油。
- 6.9 棕色玻璃瓶，经高压灭菌处理。

## 7 样品检测

### 7.1 样品采集

根据IMO MEPC.300(72):2018和IMO BWM.2/Circ.42:2015的要求进行样品采集。

### 7.2 样品取样

样品取样步骤如下：

- a) 使用锡箔纸包裹的棕色玻璃瓶（6.9）取 50 mL 以上水样；
- b) 按水样量 3%~5%加入甲醛溶液（5.1），固定样品；
- c) 取好的水样盖紧瓶塞，瓶内留下不少于 25 mm 高的空间，在检验前摇荡混匀；
- d) 样品取样按 GB 17378.7 规定进行。

### 7.3 水样细菌总数检测

#### 7.3.1 滤器装配

滤器装配步骤如下：

- a) 用水清洗滤器（6.2）；
- b) 将黑色核孔滤膜（6.3）光滑面朝上放在衬垫上，再装配好滤筒（6.2）。

#### 7.3.2 加样

加样步骤如下：

- a) 用移液器（6.4）加入 1 mL 水样在滤筒内；
- b) 把样品抽滤至黑色核孔滤膜（7.3.1 b）湿润，并释放至真空。

#### 7.3.3 染色

染色步骤如下：

- a) 用移液器加入 1 mL 浓度为 10  $\mu\text{g/mL}$  的 DAPI 染色液（5.2），套上 0.2  $\mu\text{m}$  一次性滤头（6.5），沿滤筒壁从上往下加入被样品润湿的滤膜（7.3.2 b）；
- b) 待上述滤膜染色 5min~10min 后抽滤至干，制成染色滤膜。

#### 7.3.4 制片

制片步骤如下：

- a) 在载玻片（6.6）上加一滴无荧光镜油（6.8）；
- b) 将染色滤膜载菌一面朝上贴在载玻片（6.6）上；
- c) 在盖玻片（6.7）上加一滴无荧光镜油（6.8），有油一面朝下压在染色滤膜，滤膜上下两面均不能有气泡。

#### 7.3.5 计数

在荧光显微镜蓝光道、油镜条件下观察上述制片，随机取 10 个视野，记录具有细菌形态亮色的细菌数。不同测定日期测定时，应加测不加样品的空白制片，空白制片的每个视野不应出现细菌。

## 8 数据记录计算与处理

## 8.1 样品含菌数计算

样品含菌数按式(1)计算:

$$E = \frac{\bar{X}S}{S_f(1-V_1)V_2} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- $E$ ——样品含菌数, 单位为个/mL;
- $\bar{X}$ ——各视野平均菌数, 单位为个;
- $S$ ——滤膜实际过滤面积, 单位为 $\text{mm}^2$ ;
- $S_f$ ——显微镜视野面积, 单位为 $\text{mm}^2$ ;
- $V_1$ ——加入甲醛占固定样品总体积的比例;
- $V_2$ ——过滤样品量, 单位为mL。

## 8.2 结果记录

填写表A.1记录样品含菌数计算结果, 见附录A。

## 9 质量控制

质量保证和控制应如下执行:

- c) 细菌学检验应严格遵照无菌操作;
- d) 应对样品进行2次以上重复测定, 减少误差;
- e) 条件允许, 可由1~2名检测人员对同一样品进行检测验证, 减少误差。



参 考 文 献

- [1] GB 5750-2006 生活饮用水标准检验方法  
[2] ISO 4833-1:2013 Microbiology of the food chain—Horizontal method for the enumeration of microorganisms—Part 1: Colony count at 30 degrees C by the pour plate technique
- 

中国太平洋学会发布