

团 体 标 准

T/CI XXX—2024

船舶压载水管理系统生物灭活有效性检测规程

Code for testing the effectiveness of biological inactivation in ship
ballast water management systems

(征求意见稿)

2024-X-X 发布

2024-X-X 实施

中国国际科技促进会 发布

中国国际科技促进会(CIAPST)是1988年经中华人民共和国国务院科技领导小组批准而成立的全国性社会团体。制定团体标准、开展标准国际化和推动团体标准实施,是中国国际科技促进会的工作内容之一。任何团体和个人,均可提出制、修订中国国际科技促进会团体标准的建议并参与有关工作。

中国国际科技促进会标准按《中国国际科技促进会标准化管理办法》进行制定和管理。

中国国际科技促进会征求意见稿经向社会公开征求意见,并得到参加审定会议的80%以上的专家、成员的投票赞同,方可作为中国国际科技促进会标准予以发布。

在本标准实施过程中,如发现需要修改或补充之处,请将意见和有关资料寄给中国国际科技促进会标准化工作委员会,以便修订时参考。

任何团体和个人,均可对本标准征求意见稿提出意见和建议,牵头起草单位联系方式:
ecsi_chen@163.com

中国国际科技促进会

地址:北京市海淀区中关村东路89号恒兴大厦13F

邮政编码:100190

电话:010-62652520 传真:010-62652520

网址: <http://www.ciapst.org>

目 次

前 言	III
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	2
4 船舶压载水管理系统生物灭活性能检测采样规程	6
5 L型和S型存活生物指示性检测规程	10
6 L型存活生物详细检测规程	12
7 菌落总数检测规程	19
8 耐热大肠杆菌检测规程	22
9 大肠埃希氏菌检测规程	25
10 肠球菌检测规程	27
11 有毒霍乱弧菌检测规程	30
附录 A	34
附录 B	42
附录 C	44
附录 D	47
附录 E	53

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。

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专利的责任。

本文件由江苏科技大学提出。

本文件由中国国际科技促进会归口。

本文件起草单位：江苏科技大学、南京海关动植物与食品检测中心、交通运输部水运科学研究院、江苏现代造船技术有限公司、无锡蓝天电子股份有限公司、汉盛（上海）海洋装备技术股份有限公司、CCS 青岛中心、国科联盟（北京）国际信息科学研究院。

本文件主要起草人：邓祥元、田雯、封振、李涛、王宇、文嘉鹏、陈宁、田玉军、高霆、陈冠宇、王卓远、杨鹏、陈代芬、田立群、王林兴、顾国彪、曹晓琨、赵芳萱。

本文件为首次发布。

船舶压载水管理系统生物灭活有效性检测规程

1 范围

本文件规定了船舶压载水管理系统生物灭活性能的采样规程、L型和S型存活生物指示性检测规程和详细检测方法、菌落总数检测规程、耐热大肠杆菌检测规程、大肠埃希氏菌检测规程、肠球菌检测规程和有毒霍乱弧菌检测规程。本文件适用于船舶压载水管理系统生物灭活性能的检测与评估。

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 5750.12-2023 生活饮用水标准检验方法微生物指标

GB 19489-2008 实验室 生物安全通用要求

GB 4789.38-2012 食品微生物学检验 大肠埃希氏菌计数

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检测方法

GB/T 12763 海洋调查规范第6部分：海洋生物调查

ASTM D5392-2014 用两步膜滤法分离和计数水中大肠杆菌的标准试验方法

JT/T 1393-2021 船舶压载水指示性分析取样与检测要求

SN/T 1239-2015 国境口岸霍乱检验规程

HJ 1215-2021 水质浮游植物的测定 滤膜显微镜计数法

国际海事组织 2004《国际船舶压载水和沉积物管理与控制公约》（以下简称压载水公约）

国际海事组织 BWM.2/Circ.70《船舶压载水管理系统调试测试指南》

国际海事组织 MEPC.173(58)《G2导则船舶压载水取样导则》

国际海事组织 MEPC74/INF.18《在船舶压载水中指示性检测有毒有害海洋生物可用设备总结》

美国国家卫生基金会认证 EPA/600/R-10/146《压载水处理技术验证通用协议》

ISO 6222-1999 水质 可培养微生物的计数方法 营养琼脂介质中接种法进行群落计数法

ISO 9308-1-2014 水质—大肠埃希氏菌和大肠菌群计数——第一部分 低细菌背景区系水的膜过滤法

ISO 7899-2-2000 水质—肠球菌的检测和计数 第2部分：膜过滤法

ISO 8199-1988 水质—微生物培养计数通用指南

ISO 5667-3-2012 水质—取样—第三部分：水样的处理与保存

3 术语和定义

SN/T 1239 界定的术语和定义适用于本文件，下列术语和定义适用于本标准。

3.1

船舶压载水 Ballast water

为保持船舶具有一定吃水深度或调整船体平衡，以便保证船舶航行安全平稳，而需泵入舱内、在装货时再自舱内排出的水体。

3.2

压载水管理系统 Ballast water management system

用于清除、杀死压载水中的生物或(在排放前)使其失去活性的预制、商用处理系统。供应商压载水处理产品的整体将用于实现供应商对处理效果或运行性能的主张，并以集成的方式包括所有组件。

3.3

处理水 Treated ballast water

压载水管理系统处理后排出的水。

3.4

环境水 Ambient water

在测试时提供给处理系统的水。环境水须在特定的生物密度范围和水质参数内，用于评定处理设备全面运行条件下的效能。

3.5

等动力取样 Isokinetic sample collection

从取样口收集样品的水流速度与主压载管中的速度相对等的取样方式。

3.6

存活生物 Viable organisms

存活生物为有机体和活着的所有生命阶段，本标准中仅指浮游生物。

3.6.1 L型存活生物

是指最小尺寸 $\geq 50 \mu\text{m}$ 的浮游动物。

3.6.2 S型存活生物

是指最小尺寸 $< 50 \mu\text{m}$ 且 $\geq 10 \mu\text{m}$ 的浮游生物。

3.7

浮游生物 Plankton

悬浮于水中，体型微小，无运动能力或游动能力很弱，不能主动做长距离运动，只能被动地“随波逐流”，主要包括浮游植物与浮游动物。

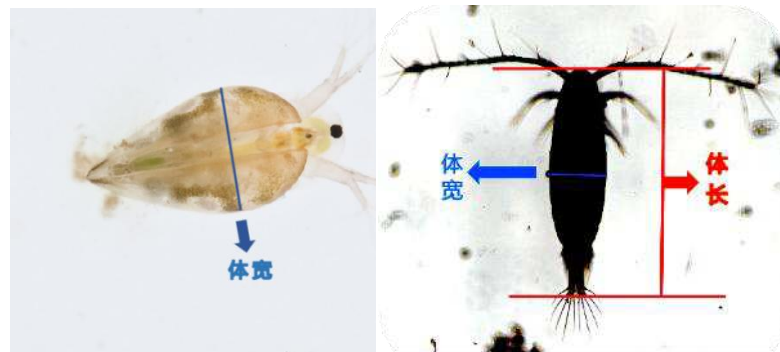
3.8

最小尺寸 Minimum size

基于《压载水公约》的描述，特指浮游生物的体长、体宽和体高中最小的尺寸，浮游生物的身体长度、宽度和高度则是通过测量最大的部分来确定的。

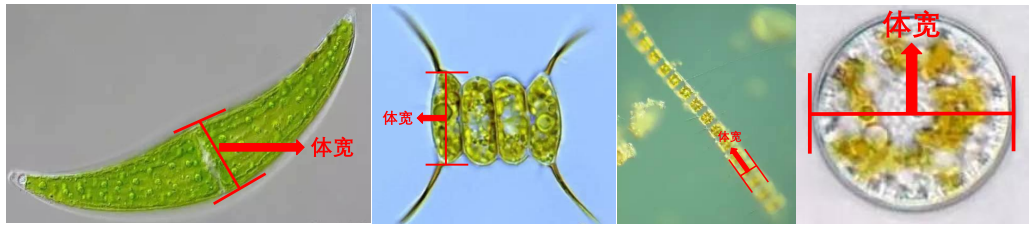
L型存活生物的最小尺寸：浮游动物的刚毛、刺、触须等不包括在内，L型存活生物的最小尺寸为生物的体宽部分如下图所示。

图1 L型浮游生物最小尺寸的测定（需画平行线显示体长）



S型存活生物的最小尺寸：以单个细胞或单个体的体宽为最小尺寸，如下图所示。

图 2 S 型浮游生物的最小尺寸示意图



3.9

脉冲-振幅-调制Pulse-Amplitude-Modulation (PAM) 叶绿素荧光检测法

通过发射一系列微弱的光，脉冲诱导藻类细胞内叶绿素发出荧光 (F_0) 而不进行光合作用，之后以快速强光脉冲关闭所有光合细胞的电子门暂时抑制光合作用，从而使叶绿素荧光达到最大 (F_m)，可变荧光 $F_v = F_m - F_0$ ，根据 F_m 和 F_0 可以计算出光合系统 PSII 的最大量子产量 $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$ ，它反映了浮游植物的潜在最大光合能力，即藻类的生理状态。基于这种方法可用来指示性检测最小尺寸 $\geq 10 \mu\text{m}$ 且 $< 50 \mu\text{m}$ (S 型) 浮游植物的活体数量。

3.10

活性荧光检测法 Active fluorescence

是将一定波长的光照射到活的藻类细胞上后得到的活细胞中的叶绿素荧光信号，基于这种方法可用来指示性检测最小尺寸 $\geq 10 \mu\text{m}$ 且 $< 50 \mu\text{m}$ (S 型) 浮游植物的数量。

3.11

三磷酸腺苷Adenosine triphosphate (ATP) 荧光检测法

在荧光素酶 E (luciferase) 和 Mg^{2+} 的作用下，荧光素 LH2 (luciferin) 与 ATP 发生腺苷酰化被活化，活化后的荧光素 LH2 与荧光素酶 E 相结合，形成了荧光素-AMP 复合体，并放出焦磷酸 (PPi)。该复合体被分子氧氧化，形成激发态复合物 $\text{P}^*-\text{E} \cdot \text{AMP}$ ，放出 CO_2 ，当该复合物从激发态回到基态时发射光，并最终形成氧化虫荧光素 P 和 AMP，其强度与生物密度正相关，基于这种方法可用来指示性检测最小尺寸 $\geq 50 \mu\text{m}$ (L 型) 浮游生物，最小尺寸 $\geq 10 \mu\text{m}$ 且 $< 50 \mu\text{m}$ (S 型) 浮游生物的数量。

3.12

运动和荧光轨迹Motility and fluorescence assay (MFA) 检测法

根据浮游动物运动轨迹成像后进行智能计数，结合浮游植物自发荧光进行检测，基于这种方法来示性检测最小尺寸 $\geq 50\ \mu\text{m}$ （L型）存活生物，最小尺寸 $\geq 10\ \mu\text{m}$ 且 $< 50\ \mu\text{m}$ （S型）存活生物的数量。

3.13

指示性微生物 Indicator bacteria

用以指示船舶压载水卫生状况及安全性的指示性微生物，主要包括菌落总数、耐热大肠菌群、大肠埃希氏菌、肠球菌和有毒霍乱弧菌（01和0139）。

3.14

菌落总数 Aerobic plate count

压载水样品经过处理，在一定条件下（如培养基、培养温度和培养时间等）培养后，所得每 mL 检样中形成的菌落总数。

3.15

耐热大肠菌群 Fecal coliforms

是指在 $44.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下培养 24~48 h 能发酵乳糖、产酸产气的需氧和兼性厌氧革兰氏阴性无芽胞杆菌。

3.16

大肠埃希氏菌 Escherichia coli

又称大肠杆菌，是广泛存在于人和温血动物的肠道中，需氧及兼性厌氧， $44.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 生长，IMViC（靛基质、甲基红、VP 实验、柠檬酸盐）生化试验+++或+---的革兰氏阴性杆菌。

3.17

肠球菌 Intestinal enterococci

一类革兰氏阳性球菌，兼性厌氧，无芽胞和荚膜，可分解胆汁七叶苷，是评估食品、水、食品加工设备、食品生产环境等卫生状况的指标菌之一。

3.18

有毒霍乱弧菌 Toxicogenic Vibrio cholerae

革兰氏阴性菌，菌体短小呈逗点状，有单鞭毛、菌毛，部分有荚膜，共分为 139 个血清群，其中 01 群和 0139 群可引起霍乱。

4 船舶压载水管理系统生物灭活性能检测采样规程

4.1 取样信息收集

样品采集前应与船方或压载水设备生产商充分了解压载水管理系统型号与安装信息,如设备主管道是否有专用取样口,取样口的位置、直径大小及类型,设备操作限制参数等,相关信息见附录 A-1/A-2/A-3。

4.2 取样方案制定

根据船舶和设备基本信息,制定测试方案,其内容至少包括:检测时间、登轮地点、试航线路、试航时间、返回停靠的港口、测试舱位(标明处理舱及对照舱)、压载水处理设备类型及安装位置、检测项目、取样方式、检测方法、计划参与取样和检测的人员等,并填写附录 A-1/A-2/A-3/A-4 相关信息。

4.3 取样设备性能要求

4.3.1 主要取样器具组成

压载水取样设备应包括管路连接单元、过滤与计量单元、样品收集单元。

4.3.2 主要取样器具要求

取样管路阀门建议使用隔膜阀,避免因调节流速而造成生物死亡,管路连接单元包含取样探头与连接软管;过滤与计量单元包含过滤装置与流速流量监控装置,流量计需定期计量和期间核查。

4.3.3 滤网要求

取样设备应根据需要能对最小尺寸 $\geq 50\ \mu\text{m}$ 存活生物(L型)样品进行收集,取样设备中所有接触或接近压载管路的部件应具备防腐蚀性,过滤装置滤网或滤膜孔径对角线直径应达到 $50\ \mu\text{m}$,网孔孔径需定期进行计量和期间核查,每次取样后滤网和管路需清洗干净,并进行紫外灭菌 20 min。

4.4 主要取样耗材

4.4.1 样品袋: 5 L

4.4.2 水样瓶: 1000 mL

4.4.3 无菌取水袋: 500 mL

4.4.4 棕色玻璃瓶: 250 mL

4.4.5 盐度计 精度 1‰

4.4.6 温度计 精度 0.1℃

4.4.7 潜水泵

4.5 登轮取样前准备工作

4.5.1 应与代理人员或船方人员或设备商调试工程师沟通，了解船舶运行情况，压载水压载与卸载情况，压载水处理系统运行情况，确保船上设备及安全防护措施运作正常，按照要求填写附录 A-1/A-2/A-3 船舶信息，压载水信息，压载水设备信息。

4.5.2 加强与码头经营部门的联系，在作业现场发出安全指令后方可登轮进入作业现场。

4.5.3 取样作业人数至少 2 人，取样人员应按要求穿戴好防护装备，穿戴整齐后方可进入作业现场，如：安全绳、救生圈、防坠器、安全帽、护目镜、劳保手套、听力护具、防护鞋、登轮服。

4.5.4 进入特殊区域取样时，宜参考相关国际公约的要求。

4.6 样品采集

取样人员在排放点附近的排放管上进行压载水取样。遇不能从排放管取样的情况下，可采用通过测深管、人孔和排水口等方式进行取样。

4.6.1 压载水管理系统主管路取样

4.6.1.1 处理水取样时需与船方或设备调试工程师确认处理水舱位以及处理时间是否已经达到设备技术指标要求，检查设备处理日志，如压载水管理系统出现常见错误类别需进行现场应急处理，类别及处理方式详见附录 B；

4.6.1.2 取样人员需拍摄设备铭牌、流量计初始数值，阶段性取样体积以及取样后总体积数值以备电子存档，或使用执法记录仪开展取样监督工作；

4.6.1.3 压载水主管路取样等动力取样要求

在压载水完全发展成湍流的状态下，在排放管内取样，压载水管理系统主管路取样示意图如图 3 所示。

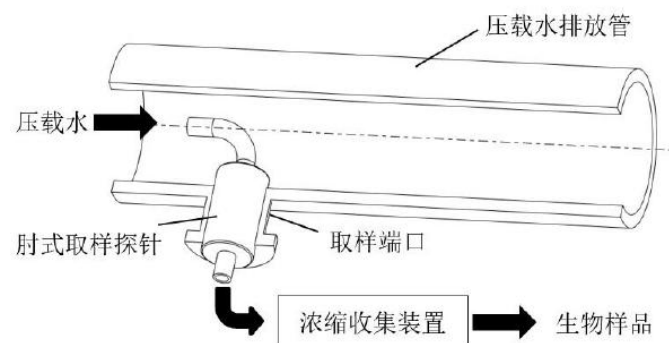


图3 压载水管理系统主管路取样示意图

取样流速应满足国际海事组织MEPC, 173(58) G2 导则船舶压载水取样导则要求的等动力取样，计算公式如下式所示，取样平均流速不应超过 50 L/min。

$$Q_{iso} = Q_m \times \left(\frac{D_{iso}}{D_m} \right)^2$$

Q_{iso} 为取样流量， Q_m 为压载水主管路排放流量， D_{iso} 为取样管直径， D_m 为压载水主管道排放管直径。因此，每次取样时，取样工程师应提前获悉压载水设备主管道直径，经过现场换算，携带合适尺寸的取样设备管路，并通过隔膜阀调整合适的取样流速，以达到等动力取样要求。

4.6.1.4 压载水处理系统主管道出水口附近搭建取样设备，可根据不同尺寸压载水处理系统取样口，采用不同规格垫片与法兰连接排水口与取样设备通水管路或采用同等方式连接设备通水管路。

4.6.1.5 启动船舶压载水处理设备，检查其运行情况，通过取样管路上隔膜阀将流量调节至合适流速运行 3-5 min，清洗排放管路。

4.6.1.6 待流量计归零后，拍照取证，打开压载水处理系统采样口阀门，正式取样，在取样过程中，阶段性从取样管路中取具有代表性的 $\geq 10 \mu\text{m}$ 和 $< 50 \mu\text{m}$ (S型)生物样品 5-10 L，微生物样品 500 mL，理化指标样品 250 mL，至少分 3 次取完 S 型生物样品及微生物样品。

4.6.1.7 当处理水取样达到 1000 L 后，关闭设备等动力采样口阀门，并拍照流量计取证；如处理水取不到 1000 L，则需在附录 A 取样表格中进行情况说明。

4.6.1.8 环境水取样可通过调换舱室在对照舱通过设备主管路排放口进行取样，需更换取样滤网，如随航取样，则可通过舷边使用隔膜泵进行富集取样。

4.6.1.9 环境水取样过程参考处理水，需更换滤网，取样体积达到 100 L 后，关闭设备等动力采样口阀门，并拍照流量计取证。

4.6.2 人孔取样

4.6.2.1 适用对象

(1) 此方法适用于未安装压载水管理系统或系统出现故障，在压载水顶边舱和边舱满载或较高水位时的样品采集；

(2) 压载水舱人孔中取样仅用于压载水在舱内或之前进行了压载水处理的情况；

(3) 若压载水处理中的任何过程是在压载水排放期间进行的，不应在压载水舱人孔中取样；

(4) 尽可能靠近排放管路的排放点进行取样。

4.6.2.2 采集程序

(1) 由船方人员负责确认并打开位于甲板上的人孔盖；

(2) 人孔附近搭建取样装备，使用潜水泵连接取样装备，潜水泵放入人孔后，泵的吸入管应降低到不同深度采集不同水深样品，取样流程参考 4.6.1。

4.6.3 测深孔/空气管中取样

4.6.3.1 适用对象

(1) 此方法适用于未安装压载水管理系统或系统出现故障，压载水顶边舱和边舱样品采集，自测量管处采集方法也适用于压载水底边舱和底舱的样品采集；

(2) 确保压载水在测深管/空气管内外充分混合；

(3) 船舶记录簿记录置换了压载水时，应谨慎使用测深管/空气管取样；

(4) 非多孔测深管在置换过压载水的情况下，管中的压载水可能会没有受到置换的影响，导致无法满足代表性取样的要求。

4.6.3.2 采集程序

(1) 由船方人员打开测量管/空气管上盖，用测量尺测定水深和水面高度；

(2) 使用合适的潜水泵从测深空/空气管中抽取压载水样品；如液面在操作部位以下 10 m 深及以下，不适合用负压泵；

(3) 测深孔/空气管附近搭建取样装备，使用潜水泵连接取样装备，潜水泵放入人孔后，泵的吸入管应降低到不同深度采集不同水深样品，取样流程参考 4.6.1。

4.6.4 排水口取样

4.6.4.1 适用对象

此方法适用于压载水顶边舱有手动排水口且便于采样时的样品采集，自测量管处采集方法也适用于压载水底边舱和底舱的样品采集。

4.6.4.2 采集程序

(1) 由船方人员打开压载水舱顶边舱手动排水阀门，排水 3-5 min。

(2) 用采样桶自甲板上坠下或自岸上送至排水口处下方接水。

4.7 样品保存、运送

4.7.1 样品封存

采集样品直接注入样品瓶，根据检测项目需求进行必要现场预处理，贴标签，封口，样品标签需包括：船舶名称、IMO 号、样品类别、取样方式、取样日期、取样体积、检测项目等要素。

4.7.2 样品现场检测

现场可利用盐度计、温度计等指示性检测设备对样品的温度、盐度进行检测，相关结果填入附录 A-5。

4.7.3 样品运输

将样品封存放入取样包中，并由取样人员快递或专车于 24 h 内低温（ $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ）送达实验室开展检测，除有毒霍乱弧菌与理化样品以外，其他样品需存放在保温箱或车载冰箱中。

5 L 型和 S 型存活生物指示性检测规程

5.1 检测方法

指示性方法可选择附录 C 中的方法或根据实际的需要选择其他合适的方法。

5.2 指示性检测设备要求

指示性检测设备宜具备出厂检测报告，设备使用说明书，设备精度与误差分析报告，历史检测数据报告，详细检测数据偏离分析报告，第三方产品检测报告。

5.3 S 型存活生物指示性检测

5.3.1 PAM 分析法

基于 PAM 分析方法，对压载水中 $\geq 10 \mu\text{m}$ 且 $< 50 \mu\text{m}$ (S 型) 浮游植物进行指示性检测分析，至少检测 3 次及以上，检测设备或推荐方法参见附录 C。

5.3.2 活性荧光检测法

基于活性荧光检测法，对压载水中 $\geq 10 \mu\text{m}$ 且 $< 50 \mu\text{m}$ (S 型) 浮游植物进行指示性检测分析，至少检测 3 次及以上，检测设备或推荐方法参见附录 C。

5.4 L 型和 S 型存活生物指示性检测

5.4.1 ATP 分析法

基于 ATP 分析方法，对压载水中 L 型和 S 型存活生物进行指示性检测分析，L 型生物检测量不少于 500 mL，S 型生物检测量不少于 200 mL，至少检测 3 次及以上，方法标准参见附录 C。

5.4.2 MFA 分析法

基于 MFA 分析方法，对压载水中 L 型和 S 型存活生物进行指示性检测分析，L 型生物检测量不少于 600 mL，S 型生物检测量不少于 200 mL，检测 1 次，方法标准参见附录 C。

5.5 指示性检测结果判定

《国际船舶压载水与沉积物控制与管理公约》D-2 标准参见附录 E。

5.5.1 PAM 分析法

基于 PAM 分析法对 S 型生物的检测，结果为 PASS 或者 FAIL，检测 3 次，以 2 次同样结果为最终记录，如 2 次及以上为 PASS，则判定 S 型生物符合《国际船舶压载水与沉积物控制与管理公约》D-2 标准，如 2 次及以上为 FAIL，需开展显微镜详细检测，如果详细检测依然超标，则判定 S 型生物不符合《国际船舶压载水与沉积物控制与管理公约》D-2 标准，D-2 排放标准参见附录 E。

5.5.2 活性荧光检测法

基于活性荧光检测法对 S 型生物的检测，检测结果为 Risk Fail 或者 Risk High 或者 Risk Low，检测 3 次，以 2 次同样结果为最终记录，如 2 次及以上为 Risk Fail 或者 Risk High，需开展显微镜详细检测，如果详细检测依然超标，则判定 S 型生物不符合《国际船舶压载水与沉积物控制与管理公约》D-2 标准，D-2 排放标准参见附录 E。

5.5.3 ATP 分析法

基于 ATP 分析法，对压载水中 L 型和 S 型存活生物进行指示性检测分析，检测结果为 Most Likely Compliant 或者 Signal Close to Limit 或者 Most Likely not Compliant，样品检测 3 次，以 3 次平均结果为最终记录，如结果为 Signal Close to Limit 或者 Most Likely not Compliant，则需开展显微镜详细检测，如果详细检测依然超标，则判定 L 型和 S 型存活生物不符合《国际船舶压载水与沉积物控制与管理公约》D-2 标准；如 3 次平均结果为 Most Likely Compliant，则判定 L 型和 S 型存活生物符合《国际船舶压载水与沉积物控制与管理公约》D-2 标准，排放标准参见附录 E。

5.5.4 MFA 分析法

基于 MFA 分析法对压载水中 L 型和 S 型存活生物进行指示性检测分析，检测结果为 Very Low Risk 或者 Low Risk 或者 High Risk，检测 1 次，Low Risk 或者 High Risk，则需开展显微镜详细检测，如果详细检测依然超标，则判定 L 型和 S 型存活生物不符合《国际船舶压载水与沉积物控制与管理公约》D-2 标准；如检测过 Very Low Risk，则判定 L 型和 S 型存活生物符合《压载水公约》D-2 标准，排放标准参见附录 E。

5.5.5 复验

因船舶压载水中存活生物可能随着时间的推移进行不断繁殖、再生或死亡，因此其数量一直是动态变化的，压载水样品不接受复验。

5.6 结果记录

原始检测记录应包括样品编号、样品名称、检测日期和时间、检测方法、仪器设备、检测结果、检测人、复核日期、复核人等内容，指示性检测结果均需保留电子图片存档，以备复查溯源。

5.7 质量控制

定期每季度进行阳性及阴性对照试验。将培养的浮游生物制成 100–200 cells/mL 的悬浮液，镜检后对指示性检测设备按照操作程序进行阳性试验。阴性对照则使用纯净水进行，如阴性对照或阳性对照试验结果不符合要求，则应查明原因后重新调试设备。6 L 型与 S 型存活生物显微镜详细检测规程

6 L 型存活生物详细检测规程

6.1 检测原理

直接观察法：通过显微镜观察 L 型生物，当生物体的某部分被严重破坏时，该生物体被判定为不可存活；对于形态完整但是不动的浮游动物，可以观察器官活动（如心跳）判断其存活/死亡；如不能观察器官活动，则可用解剖针轻轻戳动，看其是否有反应，如无反应则判断为死亡，记录活体数量的方法。

差减法：通过显微镜观察 L 型生物，当生物体的某部分被严重破坏时，该生物体被判定为不可存活；对于形态完整但是不动的浮游动物，可以观察器官活动（如心跳）判断其存活/死亡；如不能观察器官活动，则可用解剖针轻轻戳动，看其是否有反应，如无反应则判断为死亡。差减法为先计数死亡个体，再使用滴管加几滴鲁哥氏试剂到计数框内，将样品固定，再计数全体死亡个体数，两个计数相减的数量为活体数量的个数。

6.1.1 主要设备、器具

- (1) 倒置显微镜或体视显微镜（物镜 4×、10×、20×、40×；目镜 1×）
- (2) 浮游动物计数框 (80 mm×100 mm, 22 mL)
- (3) 计数器
- (4) 电动加样管：量程 20 mL
- (5) 烧杯

6.1.2 主要试剂及其配置

6.1.2.1 试剂

碘化钾 (KI, 分析纯), 碘 (I_2 , 分析纯)

6.1.2.2 配置

鲁哥氏试剂: 6 g 碘化钾 (KI) 溶于少量水中 (10 mL-20 mL), 待其完全溶解后, 加入 4 g 碘 (I_2) 充分摇动, 待碘完全溶解后定容到 100 mL。

6.1.3 L 型存活生物活体计数

6.1.3.1 准备工作

L 型存活生物样品送达实验室后, 用量筒计量样品瓶中压载水浓缩后的体积 (V_1), 每次取 20 mL 样品作为一个子样品, 根据表 1 数量水平选择不同的检测方法, 根据样品应在取样后 24 h 内开展检测工作。

6.1.3.2 样品初筛

可先观察一个浮游生物计数框的活体生物数量, 预估 L 型活体生物的数量, 如活体生物个体低于 2 个则为低数量水平, 2-20 个为中数量水平, 超过 20 个则为高数量水平, 低数量水平推荐计数片数为 10 片, 中数量水平为 5 片, 高数量水平则为 3 片, 如表 1 所示:

表 1 L 型存活生物推荐计数片数及方法

水平	推荐计数片数	推荐计数方法
高数量水平 ($>100 \text{ inds. /m}^3$)	3 片	差减法/直接观察法
中数量水平 (10 inds. /m^3 - 100 inds. /m^3)	5 片	差减法/直接观察法
低数量水平 ($<10 \text{ inds. /m}^3$)	10 片	差减法/直接观察法

6.1.3.3 样品检测

(1) 直接观察法

A. 将瓶中样品轻轻上下颠倒若干次摇匀;

B. 迅速用电动定量加样管取 20 mL 样品注入浮游动物计数框内, 在倒置或体视显微镜下计数存活的数量 (n_{Li}), 检测浮游动物计数框移动方式如图 4 所示;

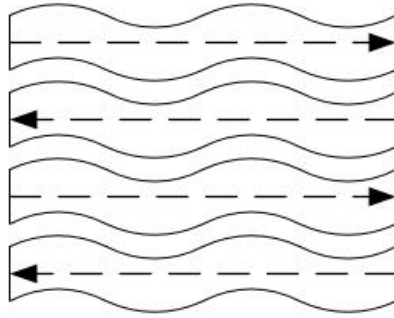


图4 浮游动物计数框在显微镜视野下的移动方式示意图

C. 当生物体的某部分被严重破坏时，该生物体被判定为不存活；对于形态完整但是不动的浮游动物，可以观察器官活动（如心跳）判断其存活/死亡；如不能观察器官活动，则可用解剖针轻轻戳动，看其是否有反应，如无反应则判断为死亡；

D. 每个样品平均单片存活生物个体数按如下计算公式来计算。

计算公式：单片存活生物个数平均数为 $NL = (NL_1 + NL_2 + NL_3 + \dots + NL_m) / m$ ；

N_L 为平均单片L型存活生物个体数，单位为 inds./片； N_{L1} ， N_{L2} ， N_{L3} ， N_{Lm} 为第1片，第2片，第3片，……第 m 片上L型存活生物个体数，单位为 inds.； m 为计数片数；单片体积数为 20 mL。

(2) 差减法

A. 将瓶中样品轻轻上下颠倒若干次摇匀；

B. 用电动加样管取 20 mL 瓶中样品注入浮游动物计数框内，在倒置或体视显微镜下计数已死亡的L型生物 ($N_d(\text{Dead})$)，检测存活生物框转动如图4所示；

C. 当生物体的某部分被严重破坏时，该生物体被判定为不存活；对于形态完整但是不动的浮游动物，可以观察器官活动（如有心跳）判断存活；如不能观察器官活动，则可用浮游动物解剖针轻轻戳动，看其是否有反应，如无反应则判断为死亡；

D. 先计数死亡个体 N_d ，再使用滴管加几滴鲁哥氏试剂到计数框内，将样品固定，再按照如下计算公式，计数全体 $N_t(\text{Total})$ 个体数；

计算公式：单片存活生物个体数 $NL = N_t(\text{Total}) - N_d(\text{Dead})$ ；

单片存活生物平均个数 NL ，参考计算公式 2；

单片存活生物个数平均数为 $NL = (NL_1 + NL_2 + NL_3 + \dots + NL_m) / m$ ；

N_i 为平均单片L型存活生物个体数，单位为 inds./片； N_{L1} ， N_{L2} ， N_{L3} ， N_{Lm} 为第1片，第2片，第3片，....第 m 片上L型存活生物个体数，单位为 inds.； m 为计数片数；单片体积数为 20 mL。

注：第三片计算结果和前两片的平均数之差如不大于其均数的 $\pm 20\%$ ，其均数视为有效结果，否则必须再测一片，直至三片数值与前两片平均数之差不超过平均数的 20%为止，即可视为有效平均计数结果。

6.1.3.4 计算

每 m^3 压载水样品中 L 型存活生物个体数量 D_L 可参考如下公式计算：

计算公式：

$$DL \text{ (inds./ m}^3\text{)} = (NL \times V_1) / (V_2 \times V_3)$$

式中： N_L 为每个样品平均单片存活生物个体数 (inds./片)； V_1 为浓缩样体积 (mL)； V_2 为计数体积 (20 mL)； V_3 为采样量 (m^3)。

6.2 S型存活生物详细检测规程

6.2.1 检测原理

双荧光染色法 (CMFDA/FDA)，其中 FDA 是荧光素二乙酸酯，英文全称是 Fluorescein Diacetate，CMFDA 是 5-氯甲酸荧光素酯是 FDA 的氯甲基衍生物，英文全称 5-chloromethylfluorescein diacetate，这两种是可自由透过活细胞膜对细胞进行示踪的荧光染料。具细胞膜渗透性，无色，不具有荧光发光性。当通过被动运输穿透细胞膜进入活细胞后，CMFDA 中的亲脂性基团可被胞浆内非特异性酯酶水解，生成 5-氯甲基荧光素 (5-chloromethylfluorescein)；5-氯甲基荧光素可发出绿色荧光，因带电荷而不能自由穿透细胞膜，并利用自身氯甲基与细胞内蛋白和多肽中的谷胱甘肽在谷胱甘肽巯基转移酶作用下生成加合物，能完好地保留在胞内。经 CMFDA/FDA 标记的细胞，在 465 nm-495 nm 波段下可激发稳定的荧光，稳定标记的时间可达数天 (至少 3 d)，可用于 S 型细胞的活体计数。

6.2.2 主要设备、器具

- (1) 正置或倒置荧光显微镜 (可激发 465 nm-495 nm 波段)
- (2) 浮游植物计数框 (50 mm×20 mm×1 mm, 1 mL)
- (3) 计数器
- (4) 移液枪：量程 1 mL, 10 μ L
- (5) 烧杯：500 mL

(6) 离心管：1.5 mL

6.2.3 主要试剂及其配置

6.2.3.1 试剂

荧光素二乙酸酯 (FDA)，5-氯甲酸荧光素酯 (CMFDA)，二甲基亚砜 (DMSO)

6.2.3.2 CMTDA 的配制

(1) 将 50 μg 的 CMTDA，加入 430 μL 的二甲基亚砜 (DMSO) 并涡旋混匀，配制成浓度为 250 μM 的 CMTDA 存储液，避光；

(2) 通过移液枪，将存储液等分成 100 μL 每份，保存在 1.5 mL 的离心管中；

(3) 每管贴上标签，注明复溶日期和浓度， -20°C ，避光保存；

(4) 每次用完后仍需重新 -20°C ，避光保存。

6.2.3.3 FDA 的配制

(1) 取 100 mg 的 FDA 溶于 4.8 mL 的 DMSO 中，配制成浓度为 50 mM 的 FDA 准备液；

(2) 取 10 μL 的 50 mM FDA 准备液，溶于 990 μL 的二甲基亚砜 DMSO 中，制成浓度为 500 μM 的 FDA 储存液；

(3) 通过移液枪，将存储液等分成 100 μL 每份，保存在 1.5 mL 的离心管中；每管贴上标签，注明复溶日期和浓度， -20°C 避光保存。

(4) 每次用完后仍需重新保存在 -20°C 避光保存。

6.2.4 S 型存活生物计数

6.2.4.1 准备工作

S 型存活生物样品送达实验室后，采用 CMTDA 和 FDA 双荧光染料进行染色，并使用 1 mL 浮游植物计数框在荧光显微镜激发光 465-495 nm 下进行染色细胞计数，样品应在取样后 24 h 内开展检测工作。

预估样品密度水平，选择生物分布较为平均的视野进行计数，视野中计数 10 个格子，如活体细胞总数小于 10，则为低密度水平；如计数 10-100 个活体细胞总数，则为中密度水平，大于 100 个活体细胞的为高密度水平，参考表 2 开展推荐计数条数计算。

表 2 S 型存活生物推荐浮游植物框计数方法

S 型存活样品预估密度水平	推荐计数条数
高密度水平 ($>10^3$ cells/mL)	3 条法计数 (2、5、8 条)

中密度水平 (10^2 cells/mL- 10^3 cells/mL)	5 条法计数 (2、4、6、8、10 条)
低密度水平 ($<10^2$ cells/mL)	全片计数

6.2.4.2 检测

(1) 将水袋中 S 型生物样品轻轻颠倒, 再倒入 500 mL 烧杯中, 用 1000 μ L 移液枪吸取 S 型尺寸样品 980 μ L 于 1.5 mL EP 管中, 分别再加入 10 μ L 的 500 μ M 的 FDA 工作液和 10 μ L 250 μ M 的 CMFDA 工作液, 使 FDA 的终浓度为 5 μ M, CMFDA 的终浓度为 2.5 μ M, 避光染色 10 min;

(2) 将染色后样品轻轻摇匀, 用移液枪将样品加入 1 mL 计数框内, 在激发波长为 465 nm-495 nm 的荧光显微镜下, 4 倍或 10 倍物镜下分别计数被 FDA 和 CMFDA 着色的 S 型尺寸活体细胞数, 被染色的生物体、运动的生物体或被染色同时运动的生物体都被视为存活生物, 并用显微镜软件测量存活生物细胞的最小尺寸, 如图 5 所示;

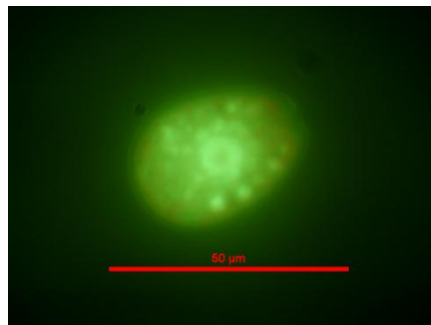


图 5 双荧光染色后显微镜视野下活体细胞示例图

(3) 染色后样品应在 20 min 内检测完毕, 以防荧光信号减弱; 参考 HJ 1215 水质浮游植物的测定滤膜显微镜计数法, 检测时注意视野范围内细胞参照图 5 Whipple 视野计数约定规则, 即: 视野中处于下边界及右边界线的细胞计入总数, 处于上边界及左边界线的细胞不计入总数, 如图 6 所示。若出现丝状体等较大个体显著穿过两个或多个格子的边界时, 应在低倍镜下单独计数, 再计入总数;

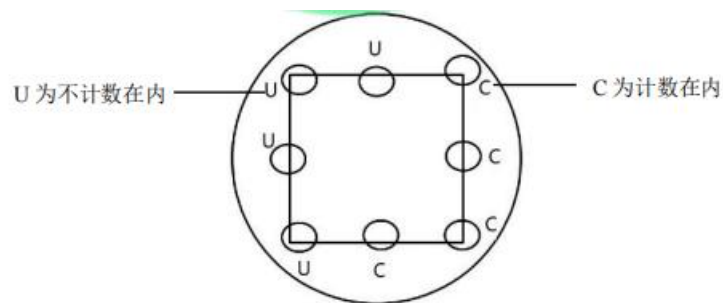


图 6 Whipple 视野计数约定规则示意图

(4) 若单个视野中生物体过多，参考表 2 计数方法，可采用长条计数法，选取两相邻刻度从计数框左边一直计数到计数框右边称为一个长条。如样品细胞数为高密度水平，则计数 3 条，即第 2、5、8 条，单片细胞密度为 3 条计数数量除以计数条数；若样品细胞数为中密度水平，则计数五条，即第 2、4、6、8、10，单片细胞密度为 5 条计数数量除以计数条数；若生物体密度为低密度水平，则应全片计数，破损细胞不计数。计数时宜缓慢移动显微镜载物台，如图 7 所示，一般检测片数为 3 片。

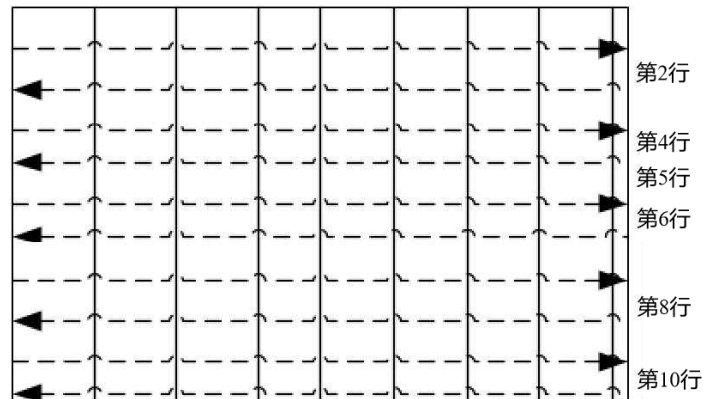


图 7 显微镜视野在浮游植物框下移动示意图

(5) 对于 S 型存活生物每 mL 细胞密度 D_s ，参考如下计算公式：

$$\text{计算公式: } D_s = (N_{s1} + N_{s2} + N_{s3}) / 3$$

式中： N_{s1} 为第 1 片计数细胞密度 (cells/mL)； N_{s2} 为第 2 片计数细胞密度 (cells/mL)； N_{s3} 为第 3 片计数细胞密度 (cells/mL)。

注：第三片计算结果和前两片的平均数之差如不大于其均数的 $\pm 20\%$ ，其均数视为有效结果，否则必须再测一片，直至三片数值与前两片平均数之差不超过均数的 20% 为止，即可视为有效平均计数结果。

6.3 原始记录

原始检测记录应包括样品编号、样品名称、检测日期和时间、检测方法、仪器设备、检测结果、检测人、复核日期、复核人等内容，如样品检测不合格，则需对存活生物保存至少 10 张带标尺图片，保存的照片应带有系统自带的标尺和日期，以供溯源。

6.4 结果报告

数量/细胞计数 ≤ 10 个时，以实际数量报告；数量/细胞计数 > 10 个且 ≤ 100 个时，以整数报告；如 $>$ 于 100 个时，将第 3 位数字采用“四舍五入”原则修约后，取前 2 位数字，后面用 0 代替位数，也可用 10 的指数形式来表示，按“四舍五入”原则修约后，采用两位有效数字。

6.5 结果判定

6.5.1 最小尺寸 $\geq 50 \mu\text{m}$ (L型) 存活生物结果不符合附录 E D-2 排放标准, 则判定该压载水不合格, 按照相应法律、法规、部门规章等进行处置。

6.5.2 最小尺寸 $< 50 \mu\text{m}$ 且 $\geq 10 \mu\text{m}$ (S型) 存活生物结果不符合附录 E D-2 排放标准, 则判定为该压载水不合格, 按照相应法律、法规、部门规章等进行处置。

6.5.3 《国际船舶压载水与沉积物控制与管理公约》D-2 标准参见附录 E。

6.6 复验

因存活生物样品 24 h 内检验完毕, 因此当实验室检测结果中的某一项检验结果不符合检验依据的要求时, 样品不接受复验。

7 菌落总数检测规程

7.1 检验原理

将待测样品原液或经适当稀释之后, 其中的微生物充分分散成单个细胞, 取一定量的稀释液涂布到平板上, 经过指定的温度和时间培养, 由每个单细胞生长繁殖而形成肉眼可见的菌落, 即一个单菌落应代表原样品中的一个单细胞; 统计菌落数, 根据其稀释倍数和取样接种量即可换算出样品中的菌落总数。

7.2 设备和材料

电子天平、抽滤装置、 $0.45 \mu\text{m}$ 无菌滤膜、镊子、量筒、恒温培养箱、接种针、接种环、酒精灯、培养皿等。

7.3 培养基和试剂

7.3.1 营养琼脂培养基 (g/L)

组分	质量
蛋白胨	10.0 g
牛肉膏	3.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0-20.0 g

将上述成分或商品化粉末, 用 1000 mL 去离子蒸馏水重悬, 搅拌均匀, 经 121°C 高压蒸汽灭菌 20 min, 冷却至 $45-50^\circ\text{C}$ 倒入无菌培养皿中。培养基最终 pH 值应为 7.2 ± 0.2 , 在 4°C 避光条件下保存, 两周有效。

7.3.2 无菌水: 取适量实验用水, 经 121°C 高压蒸汽灭菌 20 min, 备用。

7.3.3 10% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$: 称取 15.7 g 硫代硫酸钠, 定容 100 mL 水中, 灭菌。

7.4 检验程序

7.4.1 水样前处理

若电解原理的压载水处理设备产生的样品，则水样含有活性氯成分，需在收到样品后根据样品体积加入 10%浓度 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液，以除去活性氯对细菌的抑制作用（每 125 mL 容积加入 0.1 mL 的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液，若 500 mL 水样则加入 0.4 mL 的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液），在 24 h 以内处理采集样品。

7.4.2 梯度稀释

使用无菌容器进行稀释，设置 2-3 个梯度，每个梯度 2-3 个平行。根据不同类别水样压载地点，样品稀释度可以参考表 3，梯度稀释可使用 50 mL 原液加入 450 mL 无菌水中。

表 3 样品稀释度参考表

样品类型	样品状态	1	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
公海水	处理前	▲	▲	▲	
	处理后	▲	▲	▲	
港口水	处理前		▲	▲	▲
	处理后		▲	▲	▲

7.4.3 接种

以无菌操作方式用 1 mL 灭菌移液枪吸取充分混匀的样品或稀释样品 1 mL，注入灭菌平皿中，倾注 15-20 mL 冷却到 44-47℃ 的营养琼脂培养基，并立即旋摇平皿，使样品或稀释样品与培养基充分混匀，每个样品或稀释样品倾注 2 个平皿。

7.4.4 培养

待平皿内的营养琼脂培养基冷却凝固后，翻转平皿，使底面向上（避免因表面水分凝结而影响细菌均匀生长），其中一组在 $36^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ 条件下，恒温培养箱内培养 44 ± 4 h，另一组是 $22^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ 培养 68 ± 4 h 后观察结果。

7.4.5 空白对照

用无菌水做实验室空白测定，培养后平皿上不得有菌落生长，否则，该次样品测定结果无效，应查明原因后重新测定。

7.5 计数

7.5.1 计数规则

作平皿菌落计数时，可用眼睛直接观察，必要时使用放大镜检查，以防遗漏。在记下各平皿的菌落数后，应求出不同稀释度的平均菌落数，供下一步计算时应用。平皿上有较大片状菌落超过平皿一半时，该平皿不参加计数。片状菌落不到平皿的一半，而其余一半菌落分布又很均匀时，将此分布均匀的菌落计数。

片状菌落不到平皿的一半，而其余一半菌落分布又很均匀时，将此分布均匀的菌落计数，并乘以 2 代表全皿菌落总数。

外观（形态或颜色）相似，距离相近却不相触的菌落，只要它们之间的距离不小于最小菌落的直径，予以计数。紧密接触而外观相异的菌落，予以计数。

若未能及时观察，可 $5 \pm 3^\circ\text{C}$ 温度保存，48 h 内计数。

7.5.2 不同稀释度的选择及报告方式

(1) 首先选择平均菌落数在 30-399 之间者进行计算，若只有一个稀释度的平均菌落数符合此范围时，则将该菌落乘以稀释倍数报告之（见表 4 中实例 1）。

(2) 若有两个稀释度，其生长的菌落数均在 30-300 之间，则视二者之比值来决定，若其比值小于 2 应报告两者的平均数（如表 4 中实例 2）。若大于 2 则报告其中稀释度较小的菌落总数（如表 4 中实例 3）。若等于 2 亦报告其中稀释度较小的菌落数（见表 4 中实例 4）。

(3) 若所有稀释度的平均菌落数均大于 300，则应以按稀释度最低的平均菌落数乘以稀释倍数报告之（见表 4 中实例 5）。

(4) 若所有稀释度的平均菌落数均小于 30，则应以按稀释度最低的平均菌落数乘以稀释倍数报告之（见表 4 中实例 6）。

(5) 若所有稀释度的平均菌落数均不在 30-300 之间，则应以最接近 30 或 300 的平均菌落乘以稀释倍数报告之（见表 4 中实例 7）。

(6) 若所有稀释度的平板上均无菌落生长，则以未检出报告之。

(7) 如果所有平板上都有菌落密布，不要用“多不可计”报告，而应在稀释度最大的平板上，任意数其中 2 个平板 1 cm^2 中的菌落数，除 2 求出每 cm^2 内平均菌落数，乘以皿底面积 63.6 cm^2 ，再乘以其稀释倍数作报告。

(8) 菌落计数的报告菌落数在 100 以内时按实有数报告，大于 100 时，采用两位有效数字，在两位有效数字后面的数值，以四舍五入方法计算，为了缩短数字后面的零数也可用 10 的指数来表示（见表 4 报告方式栏）。

表 4 稀释度选择及菌落总数报告方式

实例	不同稀释度的平均菌落数			两个稀释度 菌落数之比	菌落总数 / (CFU/mL)	报告方式 (CFU/mL)
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³			
1	1365	164	20	—	16400	16000 或 1.6×10 ⁴
2	2760	295	46	1.6	37750	38000 或 3.8×10 ⁴
3	2890	271	60	2.2	27100	27000 或 2.7×10 ⁴
4	150	30	8	2	1500	1500 或 1.5×10 ³
5	多不可计	1650	513	—	51300	51000 或 5.1×10 ⁴
6	27	11	5	—	270	270 或 2.7×10 ²
7	多不可计	305	12		30200	31000 或 3.1×10 ⁴

8 耐热大肠杆菌检测规程

8.1 检测原理

耐热大肠杆菌 Thermotolerant coliforms 又称粪大肠菌群 (Fecal Coliforms), 44.5℃ 培养 24 h, 能在 mTEC 选择性培养基上生长, 并形成黄色菌落的肠杆菌科细菌。

8.2 设备和耗材

电子天平、抽滤装置、0.45 μm 无菌滤膜、镊子、量筒、恒温培养箱、接种针、接种环、酒精灯等。

8.3 培养基和试剂配置

(1) mTEC 培养基 (g/L)

组分	含量
乳糖	10.0 g
氯化钠	7.5 g
月示蛋白胨	5.0 g
磷酸氢二钾	3.3 g
酵母提取物	3.0 g
X-Gluc	0.5 g
SDS	0.2 g

脱氧胆酸钠	0.1 g
琼脂	15.0 g

将上述成分或商业化产品粉末称取 45.6 g，用 1L 去离子蒸馏水重悬，搅拌均匀，121° C 灭菌 15 min，冷却至 50° C 左右倒入无菌培养皿中。培养基最终 pH 值应为 7.3±0.2，在 4℃ 避光条件下保存。

(2) EC 培养基 (g/L)

组分	含量
胰蛋白胨	20.0 g
3 号胆盐	1.5 g
乳糖	5.0 g
磷酸氢二钾	4.0 g
磷酸二氢钾	1.5 g
氯化钠	5.0 g

将上述成分或商业化产品粉末称取 37.1 g，用 1 L 去离子蒸馏水重悬，搅拌均匀，加热煮沸至完全溶解，定量分装，115° C 灭菌 20 min。培养基最终 pH 值应为 7.3±0.2℃，在 4℃ 避光条件下保存。

(3) 10%Na₂S₂O₃: 称取 15.7 g 硫代硫酸钠，定容至 100 mL 水中，灭菌。

8.4 检验程序

8.4.1 水样前处理

无菌采样袋，样品储存瓶，5±3℃ 温度保存，若电解原理的压载水处理设备产生的样品，则水样含有活性氯成分，需在收到样品后根据样品体积加入 10% 浓度 Na₂S₂O₃ 溶液，以除去活性氯对细菌的抑制作用(每 125 mL 容积加入 0.1 mL 的 Na₂S₂O₃ 溶液，若 500 mL 水样则加入 0.4 mL 的 Na₂S₂O₃ 溶液)，在 24 h 以内处理采集样品。

8.4.2 梯度稀释

使用无菌容器进行稀释，设置 2-3 个梯度，每个梯度 2-3 个平行。根据不同类别水样压载地点，样品稀释度可以参考 7.4.2 表 3，梯度稀释可使用 50 mL 原液加入 450 mL 无菌水中。

8.4.3 水样抽滤

用灭菌镊子以无菌操作夹取无菌滤膜贴放在已灭菌的过滤装置上，固定好过滤装置，将样品充分混匀后抽滤。样品过滤完成后，再抽气约 5 s，关上开关。

8.4.4 培养

用灭菌镊子夹取滤膜移放在 mTEC 培养基，滤膜截留细菌面向上，滤膜应与培养基完全贴紧，两者间不得留有气泡，然后将培养皿倒置，放入 35 ± 0.5 °C 恒温箱内培养 2 h，复苏菌种， 44.5 ± 0.2 °C 培养 22 h。注意保湿，防止滤膜和介质的脱水。

8.4.5 确证实验

典型可疑菌落为黄色，对可疑菌落转种 EC 培养基， 44.5 °C 培养 24 ± 2 h，如产气则证实为耐热大肠菌群。

8.5 对照试验

8.5.1 空白对照

每次试验都要用无菌水做实验室空白测定，培养后的培养基上不得有任何菌落生长。否则，该次样品测定结果无效，应查明原因后重新测定。

8.5.2 阳性及阴性对照

定期进行阳性及阴性对照试验，阳性菌株应呈现阳性反应，阴性菌株应呈现阴性反应，否则，该次样品测定结果无效，应查明原因后重新测定。

8.6 计数

对确证为耐热大肠杆菌菌落的滤膜进行计数，生长有 20-60 个耐热大肠杆菌菌落数为计数合适范围，如未在该范围，则以最接近该范围的数值为宜。

计数被证实的耐热大肠杆菌菌落数，水中耐热大肠菌群数系以 100 mL 水样中耐热大肠菌群菌落形成单位 (CFU) 表示，见下式。

$$\text{耐热大肠杆菌菌落 (CFU/100mL)} = \frac{\text{所计得的耐热大肠杆菌菌落数} \times 100}{\text{过滤的水样体积 (mL)}}$$

8.7 结果报告

细胞计数大于或等于 100 个时，将第 3 位数字采用“四舍五入”原则修约后，取前 2 位数字，后面用 0 代替位数，也可用 10 的指数形式来表示，按“四舍五入”原则修约后，采用两位有效数字。

8.8 结果判定

8.8.1 符合附录 E D-2 排放标准，如超过 250 CFU/100 mL 则判定为不合格，按照相应法律、法规、部门规章等进行处置。

8.8.2 如样品检测不合格，则需对平板进行拍照留存，以供溯源。

8.8.3 因微生物活体样品 24 h 内检验完毕，因此当实验室检测结果中的不符合检验依据的要求时，样品不接受复验。如需复验，则需再次对压载水管理系统处理后样品进行取样重新抽取代表性样本进行全项检验，也可重新抽取代表性样本对上次不合格项目单独进行检验。

9 大肠埃希氏菌检测规程

9.1 检测原理

大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) 俗称大肠杆菌，是一群能发酵乳糖、产酸产气、需氧和兼性厌氧的革兰氏阴性无芽胞杆菌。该菌主要来源于人、畜粪便，故以此作为船舶压载水处理后排放标准之一，推断压载水中有没有污染肠道致病菌的可能。大肠埃希氏菌培养原理通过 CCA 大肠菌群显色培养基中含有三种显色剂，用于检测 β -半乳糖苷酶和 β -葡萄糖醛酸酶，其中 IPTG 用于增强显色反应。大肠杆菌为 β -半乳糖苷酶和 β -葡萄糖醛酸酶双阳性，菌落呈深蓝至紫色。

9.2 设备和材料

电子天平、抽滤装置、0.45 μm 无菌滤膜、镊子、量筒、恒温培养箱、接种针、接种环、酒精灯、培养皿等。

9.3 培养基和试剂

(1) 称取 46 g 商业化 CCA 大肠菌群显色培养基：培养基粉末，加蒸馏水定容至 1000 mL，混匀，加热溶解并不停搅拌，煮沸不要超过 1 min。最终 pH 为 6.8 ± 0.2 ，在无菌操作下铺板备用。制作好的平板在 4℃ 避光条件下保存，两周有效。

(2) 10% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ：称取 15.7 g 硫代硫酸钠，定容至 100 mL 水中，灭菌。

9.4 检验程序

9.4.1 水样前处理

无菌采样袋，样品储存瓶， $5 \pm 3^\circ\text{C}$ 温度保存，若电解原理的压载水处理设备产生的样品，则水样含有活性氯成分，需在收到样品后根据样品体积加入 10% 浓度 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液，以除去活性氯对细菌的抑制作用（每 125 mL 容积加入 0.1 mL 的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液，若 500 mL 水样则加入 0.4 mL 的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液），在 24 h 以内处理采集样品。

9.4.2 梯度稀释

使用无菌容器进行稀释，设置 2-3 个梯度，每个梯度 2-3 个平行。根据不同类别水样压载地点，样品稀释度可以参考 7.4.2 表 3，梯度稀释可使用 50 mL 原液加入 450 mL 无菌水中。

9.4.3 水样抽滤

用灭菌镊子以无菌操作夹取无菌滤膜贴放在已灭菌的过滤装置上，固定好过滤装置，将样品充分混匀后抽滤。样品过滤完成后，再抽气约 5 s，关上开关。

9.4.4 培养

用灭菌镊子夹取滤膜边缘部分，移在 CCA 培养基上，滤膜截留细菌面向上，滤膜应与培养基完全贴紧，两者间不得留有气泡，然后将平皿倒置，放入 $36 \pm 2^\circ\text{C}$ 恒温箱内培养 21 ± 3 h。

滤膜上蓝黑色至紫色菌落为大肠埃希氏 *E. coli* 阳性菌落。

9.5 对照试验

9.5.1 空白对照

每次试验都要用无菌水做实验室空白测定，培养后的培养基上不得有任何菌落生长。否则，该次样品测定结果无效，应查明原因后重新测定。

9.5.2 阳性及阴性对照

定期进行阳性及阴性对照试验，阳性菌株应呈现阳性反应，阴性菌株应呈现阴性反应，否则，该次样品测定结果无效，应查明原因后重新测定。

9.6 计数

对确证为大肠埃希氏菌落的滤膜进行计数，生长有 20-60 个大肠埃希氏菌落菌落数为计数合适范围，如未在该范围，则以最接近该范围的数值为宜。

计数被证实的大肠埃希氏菌落落数，水中耐热大肠菌群数系以 100 mL 水样中耐热大肠菌群菌落形成单位 (CFU) 表示，见下式。

$$\text{大肠埃希氏菌菌落 (CFU/100mL)} = \frac{\text{所计得的大肠埃希氏菌菌落数} \times 100}{\text{过滤的水样体积 (mL)}}$$

9.7 检测报告

细胞计数大于或等于 100 个时，将第 3 位数字采用“四舍五入”原则修约后，取前 2 位数字，后面用 0 代替位数，也可用 10 的指数形式来表示，按“四舍五入”原则修约后，采用两位有效数字。

9.8 结果判定

9.8.1 符合附录 E D-2 排放标准，如超过 100 CFU/100 mL 则判定为不合格，按照相应法律、法规、部门规章等进行处置。

9.8.2 如样品检测不合格，则需对平板进行拍照留存，以供溯源。

9.8.3 因微生物活体样品 24 h 内检验完毕，因此当实验室检测结果中的不符合检验依据的要求时，样品不接受复验。如需复验，则需再次对压载水管理系统处理后样品进行取样重新抽取代表性样本进行全项检验，也可重新抽取代表性样本对上次不合格项目单独进行检验。

10 肠球菌检测规程

10.1 检验原理

肠球菌 *Intestinal Enterococci* 是一类革兰氏阳性球菌，碱性厌氧，无芽孢和荚膜，可分解胆汁七叶苷，是压载水排放是否达标的指示菌之一。本标准使用 SBM 培养基含有叠氮化钠和的固体选择性培养基上，典型的菌落形态是凸起的，菌落的中心或整体呈红色、栗色或粉红色。2,3,5-三苯基氯化四氮唑是一种无色染料，可被肠球菌还原红色甲瓚，叠氮化钠主要抑制革兰氏阴性细菌的生长发育。再使用 BAAA 胆汁七叶苷叠氮琼脂为培养基，其中牛胆汁可以抑制大部分革兰氏阳性菌的生长，肠球菌水解七叶苷与柠檬酸铁铵中铁离子反应形成黑色的 6,7-二羟基香豆素，菌落成棕褐色至黑色。

10.2 设备和耗材

电子天平、抽滤装置、0.45 μm 无菌滤膜、镊子、量筒、恒温培养箱、接种针、接种环、酒精灯、培养皿等。

10.3 培养基和试剂配置

(1) SBM 培养基 (g/L)

组分	含量
胰蛋白胨	17.0 g
酵母提取物	5.0 g
葡萄糖	2.0 g
磷酸氢二钾	4.0 g
叠氮钠	0.4 g
氯化四唑	0.1 g
琼脂	13.5 g

将上述成分或商品化粉末用 1000 mL 去离子蒸馏水重悬，搅拌均匀，加热至沸腾，使培养基完全溶解，避免过度加热，冷却至 45-50° C 倒入无菌培养皿中。培养基最终 pH 值应为 7.2±0.2，在 4℃ 避光条件下保存，两周有效。

(2) BAAA 培养基成分 (g/L)

组分	含量
胰蛋白胨	17.0 g
牛肉浸粉	3.0 g
酵母浸粉	5.0 g
牛胆粉	10.0 g
氯化钠	5.0 g
柠檬酸钠	1.0 g
七叶苷	1.0 g
柠檬酸铁铵	0.5 g
叠氮化钠	0.25 g
琼脂	13.5g

将上述成分或商品化粉末加热溶解于 1000 mL 蒸馏水中，103.43 kPa (121 °C) 高压灭菌 15 min，冷至 46±1°C 到平板，培养基最终 pH 值应为 7.1±0.2，在 4℃ 避光条件下保存，两周有效。

(3) 10% Na₂S₂O₃: 10% Na₂S₂O₃: 称取 15.7 g 硫代硫酸钠，定容至 100 mL 水中，灭菌。

10.4 检验程序

10.4.1 水样前处理

无菌采样袋，样品储存瓶，5±3°C 温度保存，若电解原理的压载水处理设备产生的样品，则水样含有活性氯成分，需在收到样品后根据样品体积加入 10% 浓度 Na₂S₂O₃ 溶液，以除去活性氯对细菌的抑制作用 (每 125 mL 容积加入 0.1 mL 的 Na₂S₂O₃ 溶液，若 500 mL 水样则加入 0.4 mL 的 Na₂S₂O₃ 溶液)，在 24 h 以内处理采集样品。

10.4.2 梯度稀释

使用无菌容器进行稀释，设置 2-3 个梯度，每个梯度 2-3 个平行。根据不同类别水样压载地点，样品稀释度可以参考 7.4.2 表 3，梯度稀释可使用 50 mL 原液加入 450 mL 无菌水中。

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/806205241000010144>