

团 体 标 准

T/PSC 1.2—2022

船舶压载水检测方法 第 2 部分：大于等于 10 μm 且小于 50 μm 活体生物

Determination for ballast water of ships—Part 2: Viable organisms less than 50 micrometres in minimum diameter and greater than or equal to 10 micrometres in minimum diameter

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	1
6 仪器及设备	2
7 样品检测	2
8 数据记录与计算	2
9 质量保证和控制	3
附录 A (资料性) 压载水中大于等于 10 μm 且小于 50 μm 活体生物检测结果记录	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2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 μm 活体生物。

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：上海海洋大学、国家海洋局东海环境监测中心、国家海洋局东海标准计量中心。

本文件主要起草人：吴惠仙、王琼、龚婉卿、何彦龙、薛俊增、林玲、袁林。

中国太平洋学会

船舶压载水检测方法

第 2 部分：大于等于 10 μm 且小于 50 μm 活体生物

1 范围

本文件规定了用双荧光染色法检测船舶压载水样品中大于等于10 μm 且小于50 μm 的活体生物的仪器设备和试剂、样品检测、数据记录与计算、质量保证和控制。

本文件适用于船舶压载水大于等于10 μm 且小于50 μm 活体生物的检测。

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。

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.42：2020 压载水取样和分析试用指南（G2导则）（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 大于等于 10 μm 且小于 50 μm 活体生物 viable organisms less than 50 micrometres in minimum dimension and greater than or equal to 10 micrometres in minimum dimension

生物体最小尺寸小于50 μm 但大于或等于10 μm 的具有繁殖能力的生物，包括该粒径范围内部分异养生物和浮游植物。

3.2 异养生物 heterotrophic organism

经荧光素二乙酸酯（FDA）与5-氯甲酸荧光素酯（CMFDA）双荧光染色后，在蓝色光激发条件下不发绿色荧光的活体生物。

4 方法原理

染色剂FDA是一种非荧光化合物，能穿越完整细胞质膜，进入细胞原生质体后受酯类酶作用，分解形成荧光素。荧光素不能自由地穿越细胞质膜，积累在有活力的细胞中，在蓝光激光照射下，产生绿色荧光。无活力细胞不能分解FDA，无荧光产生。染色剂CMFDA本身不具有发荧光特性，能穿过细胞膜进入活体细胞内，其中的亲脂性基团被胞浆内非特异性酯酶水解，生成5-氯甲基荧光素，发出绿色荧光。目前利用FDA和CMFDA对压载水中浮游生物进行共同染色，在荧光显微镜下观察生物死活，计算样品中存活的大于等于10 μm 且小于50 μm 生物的数量。

5 试剂

除非另有说明，本方法仅使用去离子水和分析纯试剂。

5.1 5 μM/mL 荧光素二乙酸酯 (FDA)：将 1.25 mg FDA 溶解到 3 mL 的二甲基亚砜中，并混合均匀，常温避光保存。

5.2 2.5 μM/mL 5-氯甲酸荧光素酯 (CMFDA)：将 1 mg CMTDA 溶解到 3 mL 的二甲基亚砜中，并混合均匀，常温避光保存。

5.3 二甲基亚砜：99.7%。

6 仪器及设备

6.1 本方法所用仪器设备均应经过计量检定校准，且在有效期内。

6.2 正置荧光显微镜（型号：OLYMPUS BX53），蓝色激发光，波长范围 450 nm~435 nm，放大倍数 100×。

6.3 涡旋混合器。

6.4 浮游生物计数框，1 mL。

6.5 移液枪，量程 1 mL，10 μL。

6.6 离心管，1 mL。

7 样品检测

7.1 样品采集

7.1.1 据 IMO MEPC.300(72)：2018 的 2.8.6.2 要求和 IMO BWM.2/Circ.42：2020 的 ANNEX 2：5 的要求进行样品采集。送检样本时，应提供样品采样时间、采样体积。样品在采样结束后 6h 内完成分析。

7.1.2 在计数前，样品瓶盖应紧闭，颠倒摇动样品瓶 10 次，以混匀样品。样品摇匀后立即进行计数。

7.2 样品计数

样品计数步骤如下：

- 从混合均匀的待测样品中取出 1 mL，转移至离心管（6.6）中，加入 2.5 μL 浓度为 5 μM/mL 荧光素二乙酸酯 (FDA)（5.1）、3.48 μL 浓度为 2.5 μM/mL 5-氯甲酸荧光素酯 (CMFDA)（5.2），在涡旋混合器上震荡，避光染色 10min 后，摇匀样品；
- 用移液枪（6.5）吸取上述 1 mL 样品至 1 mL 浮游生物计数框（6.4）中；
- 在正置荧光显微镜（6.2）蓝色激发光道下观察，波长范围 450 nm~435 nm，物镜放大倍数 10×，计数大于等于 10 μm 且小于 50 μm 活体生物数量；
- 如样本中大于等于 10 μm 且小于 50 μm 活体生物数量大于等于 1000 个/mL 时，应检测 3 个 1 mL 分样；
- 如样本中大于等于 10 μm 且小于 50 μm 活体生物数量小于 1000 个/mL 时，应检测 6 个 1 mL 分样，记录该尺寸异养生物数量。

8 数据记录与计算

样本中大于等于 10 μm 且小于 50 μm 活体生物数量大于等于 1000 个/mL 时，1 mL 水样中的大于等于 10 μm 且小于 50 μm 活体生物个数按式（1）计算，结果记录参见表 A.1。计算公式如下：

$$C_{avg} = \frac{\sum_{i=1}^n O_i}{n} \dots \dots \dots (1)$$

式中：

C_{avg} ——样品中大于等于 10 μm 且小于 50 μm 活体生物的平均密度，单位为个/mL；

O_i ——1 mL重复分样*i*中发荧光生物的密度，单位为个/mL；

n ——重复样本数， n 记为3。

样本中大于等于10 μm 且小于50 μm 活体生物数量小于1000个/mL时，1 mL水样中的大于等于10 μm 且小于50 μm 活体生物平均个数按式（2）计算。

$$C_{avg} = \frac{\sum_{i=1}^n (O_i + H_i)}{n} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

C_{avg} ——样品中大于等于10 μm 且小于50 μm 活体生物的平均密度，单位为个/mL；

O_i ——1 mL重复分样*i*中发荧光生物的密度，单位为个/mL；

H_i ——1 mL重复分样*i*中异养生物的密度，单位为个/mL；

n ——重复样本数， n 记为6。

9 质量保证和控制

质量保证和控制要求如下：

- a) 应对样品进行2次以上重复测定，减少误差；
- b) 至少应有2名检测人员对同一样品进行检测验证，检测结果相对偏差不超过20%。

附录 A
(资料性)

压载水中大于等于 10 μm 且小于 50 μm 活体生物检测结果记录

压载水中大于等于 10 μm 且小于 50 μm 活体生物双荧光染色法检测结果记录见表 A.1。

表 A.1 压载水中大于等于 10 μm 且小于 50 μm 活体生物双荧光染色法检测结果记录

样品编号	采样时间			检测时间		
采样体积 (L)	分样体积 (mL)			分样个数		
检测结果						
生物个数	分样①	分样②	分样③	分样④	分样⑤	分样⑥
分样个数						
大于等于 10 μm 且小于 50 μm 活体生物个数 (除异养生物)						
异养生物个数						
总计						
平均密度 (个/mL)						

附注:

检测:

校对:

审核:

参 考 文 献

- [1] GB/T 17378.7-1998 海洋监测规范 第七部分 近海污染生态调查和生物监测
- [2] EPA EPA/600/R-10/146: 2010 Environment Technology Verification Program Document Generic Protocol for the Verification of Ballast Water Treatment Technologies
-

中国太平洋学会发布