

团 体 标 准

T/PSC 1.5—2022

船舶压载水检测方法 第 5 部分：霍乱弧菌

Ballast water detection method for ships—— Part 5: *Vibrio cholerae*

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 样品处理方法	3
8 菌株鉴定	3
9 毒力基因检测	4
10 检测结果报告	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。

本部分为T/PSC 1—2021《船舶压载水检测方法》的第5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；
- 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；
- 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。

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、薛俊增、王腾、袁林、徐超群、何勇。

船舶压载水检测方法

第5部分：霍乱弧菌

警告：霍乱弧菌为致病微生物，应在相应级别的生物安全实验室中检测，操作时应按照要求佩戴生物防护用品，注意实验废弃物的生物消毒。

1 范围

本文件规定了分离培养法检测船舶压载水中霍乱弧菌的方法原理、试剂和材料、仪器和设备、样品处理、菌株鉴定、毒力基因检测和检测结果报告。

本文件适用于应用分离培养法检测船舶压载水中的霍乱弧菌。

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。

WS 289-2008 霍乱诊断标准

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.42：2015 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

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 方法原理

使用碱性蛋白胨水对样本中霍乱弧菌进行选择性地增菌，再利用硫代硫酸盐柠檬酸盐胆盐蔗糖琼脂培养基（TCBS）和弧菌显色培养基分离纯化霍乱弧菌，进而进行生化鉴定。最后通过分子生物学方法检测霍乱毒素基因。

5 试剂

5.1 改良营养琼脂培养基

按下列成分混匀后，调至pH值为7.0~7.4，121℃高压蒸汽灭菌20min。也可用市场上销售的可替代产品。具体成分如下：

- 牛肉浸膏，5 g；
- 蛋白胨，3 g；
- 氯化钠，10 g；
- 琼脂，15 g；
- 蒸馏水，1000 mL。

5.2 碱性蛋白胨水（APW）

按下列成分加热搅拌至溶解，调至pH值为8.4~8.8，121℃高压蒸汽灭菌20min。也可用市场上销售的可替代产品。具体成分如下：

- 蛋白胨，10 g；
- 氯化钠，10 g；

——蒸馏水，1000 mL。

5.3 硫代硫酸盐柠檬酸盐胆盐蔗糖琼脂培养基(TCBS)

将下列成分混合加热煮沸，调至pH值为8.6~8.8，不要高压灭菌。也可用市场上销售的可替代产品。具体成分如下：

——酵母浸粉，5 g；
——蛋白胨，10 g；
——硫代硫酸钠，10 g；
——柠檬酸钠，10 g；
——牛胆盐，8 g；
——蔗糖，20 g；
——氯化钠，10 g；
——柠檬酸铁，1 g；
——麝香草酚蓝，0.04 g；
——溴麝香草酚蓝，0.04 g；
——琼脂，18 g；
——蒸馏水，1000 mL。

5.4 弧菌显色培养基

将各下列成分混合加热煮沸，调至pH值为6.7~7.1，不要高压灭菌。也可用市场上销售的可替代产品。具体成分如下：

——蛋白胨和酵母粉，8.0 g；
——盐类，51.4 g；
——色素，0.3 g；
——琼脂，11 g；
——蒸馏水，1000 mL。

5.5 磷酸缓冲溶液(PBS)

按以下比例配置，摇匀后121℃高压蒸汽灭菌20min，放凉备用。具体配置比例如下：

——磷酸二氢钠(NaH_2PO_4)，6.9 g；
——氢氧化钠(NaOH) (0.1 mol/L)，3 mL；
——水，补足至，50 mL。

6 仪器及设备

- 6.1 恒温培养箱：能够恒温至30℃~37℃。
- 6.2 高压蒸汽灭菌器：能够加热至121℃。
- 6.3 抽滤泵。
- 6.4 离心机：转速不大于30000 r/min。
- 6.5 二级生物安全柜。
- 6.6 无菌过滤膜（直径47 mm，孔径0.22 μm）。
- 6.7 滤膜专用镊子。
- 6.8 三角瓶：150 mL。
- 6.9 接种环。
- 6.10 无菌培养皿。

6.11 移液管、样品瓶、三角瓶和离心管等玻璃器皿和采样器具应按无菌操作要求包扎，于 121 °C 高压蒸汽灭菌 20min，烘干，备用。如容器不能经受高压灭菌，应在高于 70 °C 的流动热水或流动蒸汽中处理至少 5min。灭菌后的采样瓶，两周内未使用，应重新灭菌。

7 样品处理方法

7.1 样品采集

7.1.1 按照 IMO MEPC.300(72):2018 与 IMO BWM.2/Circ.42:2015 的相关规定进行样品采集。采样结束后，水样应 10 °C~15 °C 运输，24h 内完成检测。

7.1.2 在采样现场测定并记录水样盐度。盐度的测定按 GB/T 17378.4 中要求执行。

7.2 样品处理

样品处理步骤如下：

- 以无菌操作抽滤水样 100 mL，将水样中细菌收集于过滤膜（6.6）上；
- 取一份集菌滤膜用于分离培养检测，另一份集菌滤膜可以储存在 -20 °C 用于复查。

7.3 培养

培养步骤如下：

- 在 50 mL 离心管中加入 12 mL 磷酸盐缓冲液（5.5），放入一份集菌过滤膜，涡旋 5min；
- 将离心管中所有液体转移至含有 50 mL 碱性蛋白胨水（5.2）的三角瓶（6.8）中，置于 30 °C~35 °C 下进行增菌培养 16h；

警示——富集细菌的三角瓶在培养中或培养后不应被干扰或搅动，防止细菌迁移到液体-空气界面。

- 使用无菌接种环（6.9）挑取三角瓶的增菌液微需氧层表面培养物，在 TCBS（5.3）上划线分离，将 TCBS（5.3）置于 30 °C~35 °C 下培养 16h~24h；
- 使用无菌接种环（6.9）从 TCBS 上挑选具有典型特征的可疑霍乱弧菌菌落（菌落特征见表 1），在弧菌显色培养基（5.4）上划线分离，将弧菌显色培养基（5.4）置于 30 °C~35 °C 下培养 16h~24h；
- 传代弧菌显色培养基上分离的具有典型特征的可疑霍乱弧菌菌落（菌落特征见表 1），从每个平板上挑取 5 个或以上可疑菌落（少于 5 个全部挑取），使用无菌接种环（6.9）接种于改良营养琼脂培养基（5.1）上，在 37 °C 下培养 18h~24h 后进行菌株鉴定。

表 1 霍乱弧菌在 TCBS 琼脂和弧菌显色培养基上的菌落特征

选择性琼脂平板	霍乱弧菌菌落特征
TCBS 琼脂	菌落生长呈半透明、光滑、扁平、黄色，有黑色中心的菌落，表面光滑，湿润，稍凸起，边缘整齐
弧菌显色培养基	青绿色菌落

警示——实验中使用过的实验材料，在温度 121 °C、压力 103.4 kPa 下灭菌 60 min 后放入生物危害袋中密封。

8 菌株鉴定

8.1.1 菌株初筛

菌株初筛包括玻片凝集试验、氯化钠试验、氧化酶试验，试验方法见 WS 289-2008。

8.1.2 菌株复核

经初筛阳性或可疑阳性的菌株，在发出初步鉴定报告的同时，应尽快送当地疾病预防控制中心进行复核鉴定。复核结果符合 01 群或 0139 群霍乱弧菌的菌株，按菌株管理的要求进行保存与上送；如复核结果出现疑问，应尽快将菌株上送省级或省级以上疾病预防控制中心（参比实验室）进行确认分析。菌株

的复核鉴定应以纯培养物为基础，至少应包括以下项目：血清凝集试验与血清分型、革兰染色、黏丝试验、氧化酶试验、动力试验。

9 毒力基因检测

如鉴定结果为霍乱弧菌，应使用增菌液（7.3b）进行霍乱毒素基因（ctxAB）基因的检测。试验方法见WS 289-2008。

10 检测结果报告

10.1.1 如初筛阴性，应直接报告为霍乱弧菌未检出。

10.1.2 如初筛阳性，应根据省级或省级以上疾病预防控制中心确认的结果进行报告。

参 考 文 献

- [1] SN/T 1022: 2010 进口食品中霍乱弧菌检验方法
 - [2] IMO 2004 International Convention for the Control and Management of Ships' Ballast Water and Sediments
 - [3] EPA EPA/600/R-10/146: 2010 Environment Technology Verification Program Document Generic Protocol for the Verification of Ballast Water Treatment Technologies
-