

团 体 标 准

T/PSC 1.6—2022

船舶压载水检测方法 第 6 部分：生物毒性

Determination for ballast water of ships—Part 6 :Biological toxicity assay

2022 - 01 - 01 发布

2022 - 07 - 01 实施

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	2
7 样品检测	2
8 数据记录计算与处理	3
9 毒性水平评价	4
10 质量控制	4
附录 A （资料性） 压载水生物毒性样品信息及预处理记录	5
附录 B （资料性） 参比毒物生物毒性检测记录	6
附录 C （资料性） 生物毒性检测结果记录	7
附录 D （规范性） 压载水样品生物毒性风险等级分级	8
参 考 文 献	9

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6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；
- 船舶压载水检测方法 第5部分：霍乱弧菌。

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：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、何彦龙、王腾、邓邦平、季晓、葛春盈。

船舶压载水检测方法

第6部分：生物毒性

1 范围

本文件规定了船舶压载水生物急性毒性的检测方法。

本文件适用于船舶压载水生物急性毒性的检测。

红色、棕色或黑色的水样，在不经稀释的情况下发光抑制率不小于80%时，该水样不适用于本文件。

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 14914.2 海洋观测规范 第2部分：海滨观测

GB 17378.4 海洋监测规范 第4部分：海水分析

HJ 506 水质 溶解氧的测定 电化学探头法

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

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

抑制率 inhibition rate

水样在一定的时间和条件下与发光细菌接触后，发光细菌的发光量所降低的百分比，用*I*表示。

3.2

半数抑制浓度 half inhibition concentration

水样在一定的时间和条件下与发光细菌接触后，发光细菌的发光量减少50%的浓度。

注：参比毒物或化合物浓度以mg/L为单位来表征，环境水样以样品液的百分浓度为单位来表征。

4 方法原理

水样在一定的时间和条件下与发光细菌费歇尔弧菌接触后，发光细菌的发光强度变化与水样中毒性组分总浓度呈负相关关系，通过生物发光光度计测定水样与发光细菌接触15min后的发光抑制率来表征水样的急性毒性水平。

5 试剂和材料

5.1 小支费歇尔弧菌冻干粉，市售。

5.2 稀释液（Diluent），2%氯化钠无毒溶液，市售。

5.3 七水硫酸锌（ZnSO₄·7H₂O），置于干燥器中24h以上。

5.4 氯化钠（NaCl）。

- 5.5 氢氧化钠溶液 (1 mol/L)，将 40 g 氢氧化钠粉末用水定容到 1 L 的容量瓶中。
- 5.6 盐酸溶液 (1 mol/L)，将 86 mL 浓度为 36% 的浓盐酸用蒸馏水定容到 1 L 的容量瓶中。
- 5.7 硫酸锌贮备液 (0.16 g/L)。准确称取 0.016 g 七水硫酸锌 ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (5.3) 于 50 mL 烧杯中，用少量稀释液 (5.2) 溶解后，全量转入 100 mL 容量瓶中，用稀释液 (5.2) 定容至标线，混匀，冷藏保存。
- 5.8 硫酸锌使用液。移取 1 mL 硫酸锌贮备溶液 (5.7)，用稀释液 (5.2) 定容至 10 mL 比色管，配制浓度为 16 mg/L 硫酸锌使用液；再移取 5 mL 浓度为 16 mg/L 的硫酸锌使用液，用稀释液定容至 10 mL 比色管，配制浓度为 8 mg/L 的硫酸锌使用液；以此类推，逐级稀释配制成浓度为 4 mg/L、2 mg/L、1 mg/L 的硫酸锌使用液。

6 仪器和设备

- 6.1 生物毒性快速检测仪。
- 6.2 测试管，玻璃，内径约 11.5 mm，高度约 50 mm，可标记为以下三种：
a) 复苏管；
b) 样品管；
c) 反应管。
- 6.3 pH 计，精确到 0.01。
- 6.4 盐度计，精确到 0.001。
- 6.5 浊度计，精确到 0.1 NTU。
- 6.6 溶解氧测量仪，精确到 0.1 mg/L。
- 6.7 移液器，精确到 100 μL 、1 mL。
- 6.8 电子天平，精确到 0.001g。
- 6.9 离心机。
- 6.10 聚四氟乙烯取样瓶，带盖。
- 6.11 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。

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) 用洁净的聚四氟乙烯瓶 (6.10) 取样，上端不得留有空气间隙，盖上瓶盖；
- b) 水样取完后，常温条件下应在 24h 内测试完毕；
- c) 如 24h 内不能完成测试，水样可在 2 $^{\circ}\text{C}$ ~6 $^{\circ}\text{C}$ 下避光贮存，并于 48h 内完成测试；
- d) 如 48h 内不能完成测试，水样可在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 下避光贮存，并于两周内完成测试，测定前化冻，恒温至室温后测定。

7.3 样品预处理

7.3.1.1 pH 值调节

水样 pH 值范围宜为 6.0~8.5。如水样 pH 值小于 6.0，加氢氧化钠溶液 (5.5)，调节 pH 值约为 6.0~6.5。如水样 pH 值大于 8.5，加盐酸溶液 (5.6)，调节 pH 值约为 8.0~8.5。

加入到水样中用于调节 pH 值的氢氧化钠溶液或盐酸溶液的体积应不大于样品总体积的 5%。

水样 pH 值测量方法按 GB 17378.4 中要求执行。

7.3.1.2 盐度调节

水样盐度范围宜为20~40。盐度小于20的水样，加氯化钠（5.4）调节盐度至 22 ± 2 。盐度测定方法按GB/T 14914.2中要求执行。

7.3.1.3 浊度调节

水样浊度宜不大于10 NTU。如水样浊度大于10 NTU，应离心或过滤。水样离心、过滤和浊度测量方法按GB 17378.4中要求执行。

7.3.1.4 溶解氧调节

水样检测前摇匀或曝气15min，使水样的溶解氧含量大于3 mg/L。水样溶解氧测定方法按HJ 506要求执行。

7.3.1.5 压载水生物毒性样品信息及预处理记录表见附录A。

7.4 水样生物毒性检测

水样生物毒性检测步骤如下：

- 根据水样数量，准备相应数量的测试管（6.2），置于生物毒性快速检测仪上（6.1），包括温度控制在 $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的复苏管（6.2.a）、温度控制在 $15\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的样品管（6.2.b）和反应管（6.2.c）；
- 反应管数量是样品管数量的2倍，以作平行测定；
- 取2 mL 稀释液（5.2）和2 mL 水样分别加入样品管，在生物毒性快速检测仪（6.1）预冷10min，稀释液（5.2）作为对照样；
- 从 $-18\text{ }^{\circ}\text{C} \sim -20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的冷冻环境中取出小支费歇尔弧菌冻干粉（5.1），用预冷的0.5 mL 稀释液（5.2）混匀，快速转移至7.4 a)的复苏管中；
- 从经7.4 d)处理的复苏管中分别取100 μL 溶液加入反应管（7.4 a)），按照对照样、水样的顺序加入。静置15min后检测初始发光强度，检测结果记入表C.1，其中对照样初始发光强度记作 I_{c0} ，水样初始发光强度记作 I_{T0} ；
- 快速从7.4 c)的样品管中分别取900 μL 对照样和待测水样，加入上述7.4 e)反应管，充分混匀后静置15min，检测发光强度，检测结果记入表C.1。此时，对照样发光强度记作 I_{ct} ，水样发光强度记作 I_{Tt} 。

7.5 参比毒物生物毒性检测

用硫酸锌作为参比毒物评估发光细菌复苏后的相对敏感性和可靠性。取2 mL 硫酸锌使用液，按7.4规定的方法进行毒性检测，检测结果记入表B.1。

参比毒物的毒性检测应不少于一个月一次。启用新批次发光细菌，均应进行参比毒物的毒性检测。

8 数据记录计算与处理

8.1.1 发光抑制率计算

使用加入水样后反应15min时的发光细菌的发光抑制率 H 进行毒性水平评价，按式（1）计算：

$$H = 1 - I_{Tt} / (f \cdot I_{T0}) \times 100\% \quad (1)$$

式中：

I_{T0} ——测试样品的初始发光强度；

I_{Tt} ——测试样品反应15min后的发光强度；

f ——反应15min校正因子，按式（2）计算：

$$f = I_{ct} / I_{c0} \quad (2)$$

式中：

I_{c0} ——对照样品的初始发光强度；

I_{ct} ——对照样品在反应15min时的发光强度。

8.1.2 半数抑制浓度计算

8.1.2.1 发光强度削减值可用 γ 量度，各个反应管中待测样品的 γ 值按式 (3) 计算：

$$\gamma = (f \cdot I_{T0}) / I_{Tt} - 1 \quad (3)$$

$$\ln \gamma = b \ln C + \ln \alpha \quad (4)$$

式中：

C ——样品浓度，单位为毫克每升 (mg/L)；

$\ln \alpha$ ——回归直线的截距；

b ——回归直线的斜率；

$\ln \gamma$ ——对应浓度下的毒性响应。

8.1.2.2 方程的显著性水平取 0.05。

8.1.2.3 概率 (P) 小于 0.05 时，测试有效。

8.1.2.4 发光量损失 50%，即 $\gamma=1$ 时，半数抑制浓度 (IC_{50}) Q 值按式 (5) 计算：

$$Q = e^{\frac{\ln \alpha}{b}} \quad (5)$$

式中：

Q ——半数抑制浓度 (IC_{50})。

9 毒性水平评价

9.1.1 样品毒性水平表征方法采用检测结果中的 15min 发光抑制率 H 进行评价。

9.1.2 根据水样 H 值大小对船舶压载水进行生物毒性分级，分级方法见表 D.1。

10 质量控制

发光细菌生物毒性检测的质量控制要求如下：

- 发光细菌除初始发光强度满足生物发光光度计要求外，对照样的反应 15min 校正因子 f 为 0.6~1.8，否则更换发光细菌；
- 样品 3 次重复测定结果的变异系数小于 15%；
- 反应 15min 后，参比毒物 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 的 IC_{50} 范围为 0.6 mg/L~6 mg/L。

附 录 B
(资料性)
参比毒物生物毒性检测记录

参比毒物生物毒性检测记录表B.1:

表B.1 参比毒物生物毒性检测记录表

采样时间_____检测时间_____ 第_____页 共_____页

测试样品		测量值		校正因子 f	f 均值	
		初始发光强度 I_{C_0}	15min发光强度 I_{C_t}			
空白对照						
参比毒物浓度 (mg/L)	测试序号	测试值		γ	$H(\%)$	$H(\%)$ 均值
		I_{T_0}	I_{T_t}			
	1					
	2					
	3					
	4					
	5					
	6					
	7					
	8					
	9					
	10					
IC_{50} : _____mg/L 使用仪器: 费歇尔弧菌菌株批次:						

检测:

校对:

审核:

附录 C
(资料性)
生物毒性检测结果记录

压载水生物毒性检测结果记录见表C.1:

表C.1 压载水生物毒性(发光细菌法)检测结果记录表

采样时间_____检测时间_____ 第_____页 共_____页

测试样品		测量值				校正因子 f	f 均值
		初始发光强度 I_{C0}		15min发光强度 I_{Ct}			
空白对照							
样品编号	站号	稀释倍数	测试序号	测试值		$H(\%)$	$H(\%)$ 均值
				I_{T0}	I_{Tt}		
			1				
			2				
			3				
			4				
			5				
			6				
			7				
			8				
			9				
			10				
			11				
			12				
			13				
			14				
			15				
			16				
			17				
			18				
使用仪器: 费歇尔弧菌菌株批次:							

检测: 校对: 审核:

附录 D
(规范性)
压载水样品生物毒性风险等级分级

压载水样品生物毒性风险等级分级见表D.1:

表D.1 压载水样品生物毒性风险等级分级表

毒性等级	H	毒性风险等级
I	$H < 30\%$	低度毒性风险
II	$30\% \leq H < 80\%$	中度毒性风险
III	$H \geq 80\%$	高度毒性风险

参 考 文 献

- [1] 海环字[2015]29号 污水生物毒性监测技术规程发光细菌急性毒性测试-费歇尔弧菌法（试行）
- [2] ISO 11348-3:2007 Water quality-Determination of inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) —Part 3: Method using freeze-dried bacteria
-

全国团体标准信息平台