

文章编号: 1674-5566(2018)03-0460-08

DOI:10.12024/jsou.20171210006

## 基于国际公约要求的压载水生物检测技术

刘 亮<sup>1,2</sup>, 吴惠仙<sup>1,2</sup>, 袁 林<sup>1,2</sup>, 王 琼<sup>1,2</sup>, 薛俊增<sup>1,2</sup>

(1. 上海海洋大学 海洋生态与环境学院, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 港航生态安全研究中心, 上海 201306)

**摘 要:**《国际船舶压载水和沉积物控制与管理公约》D-2 排放标准对排放压载水中 10~50  $\mu\text{m}$  生物、大于等于 50  $\mu\text{m}$  生物、大肠埃希氏菌、肠道球菌和霍乱弧菌的活体数量提出了具体的要求。目前各国已重视并针对压载水处理做了大量研究,但如何对压载水中活体生物开展有效检测,尤其是快速检测尚存在问题。介绍了目前国际上使用的几种主要检测方法,如显微镜观察法、流式细胞技术、微流控芯片技术、分子生物学技术、MPN 法、平板法等,以及几种方法的原理、使用特点和在压载水快速检测中的限制性。基于快速、准确、样品消耗量小、自动程度高的特点,流式细胞术法是目前最适合发展用于港口压载水生物快速检测的方法。公约未对排放压载水中孢囊的数量有详细规定,相应的研究也很少,但孢囊对压载水排放地生态系统潜在破坏性更大,因此建议加强对孢囊方面的研究。

**关键词:** 压载水; 检测; 生物技术

**中图分类号:** Q 89; S 917 **文献标志码:** A

压载水是指在船舶航行过程中,为保证船舶纵横、横倾、吃水、稳定或应力而在船上加装的水及其中的悬浮物<sup>[1]</sup>。每年约有亿吨压载水携带水生生物跟随船舶穿梭世界各地。每天压载水中携带的生物可达到 7 000 种<sup>[2]</sup>,对压载水排放地的生物多样性、经济和人类健康造成巨大威胁。压载水也被视为海洋四大危害之一<sup>[3]</sup>。2004 年,国际海事组织(IMO)公布了《国际船舶压载水和沉积物控制与管理公约》,旨在控制与管理船舶压载水和沉积物排放,减少有害水生生物对经济、生态环境以及人类健康带来的威胁。2017 年 09 月 08 日,公约正式生效。

公约包括 22 条款、一个规则附则,以及方便公约履行的 14 条指南。其中,附则 D-2 部分为压载水性能标准,其详细规定了排放压载水中活体生物数量<sup>[4]</sup>:即最小尺寸大于或等于 50  $\mu\text{m}$  可存活生物小于 10 个/ $\text{m}^3$ ,最小尺寸小于 50  $\mu\text{m}$  但大于等于 10  $\mu\text{m}$  的可存活生物小于 10 cells/mL,霍乱弧菌(O1 和 O139 群)小于 1CFU/100mL,大肠

埃希氏菌小于 250 CFU/100mL,肠道球菌小于 100 CFU/100mL。目前各国已开始重视并针对压载水处理做了大量的研究,但如何对压载水中活体生物开展有效检测尤其是快速检测尚存在不少问题,公约也未对检测技术进行明确规定。本文介绍了目前用于压载水生物检测的方法及其使用特点,并对压载水中生物快速检测提出了一些建议。

### 1 10~50 $\mu\text{m}$ 生物检测技术

#### 1.1 基于光学特性的检测方法

##### 1.1.1 显微镜观察法

显微镜观察法是一种传统的浮游植物检测分析方法。直接将定量样品加入到样品计数框内,或者沉淀过滤到滤膜上<sup>[5]</sup>,然后置于显微镜下观察,通过细胞完整程度、色素含量和色素降解情况等形态学特征判断生物活性<sup>[6]</sup>,或者添加鲁哥氏液或甲醛固定,方便观察。利用该方法可以观察生物形态,分辨生物种类和数量,是目前

收稿日期: 2017-12-30 修回日期: 2018-04-01

基金项目: 上海市科委科研项目(17DZ1202905);上海市科委研发平台专项(16DZ2293800);上海市自然科学基金(15ZR1420900);海洋工程装备检测试验技术国家工程实验室[沪发改高技(2016)99号]

作者简介: 刘 亮(1989—),男,实验师,研究方向为船舶压载水生态学。E-mail: lliu@shou.edu.cn

通信作者: 薛俊增, E-mail: jzxue@shou.edu.cn

广泛用于压载水研究的基础方法<sup>[7-10]</sup>,也是一种衡量其他方法准确性的依据<sup>[11]</sup>。

然而,受限于显微镜分辨率,通过细胞形态特征有时并不能准确的辨别细胞活性,因此,可以利用染色物质对细胞进行染色,辅助检测员对活体细胞进行鉴定。目前一般用于压载水中 10 ~ 50  $\mu\text{m}$  生物的染色物质有中性红染料、Sytox 染料、荧光素二乙酸酯(FDA)和 5 - 氯甲基荧光素二醋酸酯(CMFDA)等。

中性红是一种碱性活体染料,活细胞能够大量吸收中性红并向液泡中分泌。当中性红进入到液泡中后便解离出阳离子,与液泡酸性环境发生反应,使液泡呈现出樱桃红色,但死亡细胞中,中性红则会与原质体和细胞核结合,而使原质体与细胞核染色,整个细胞呈现红色。利用此原理可以将压载水中生物进行染色,从而对活体生物进行筛选<sup>[12]</sup>。但染色状态受中性红浓度以及染色时间的影响较大,并且中性红具有一定的毒性,浓度过高甚至影响细胞活性<sup>[13]</sup>。

STEPHAN<sup>[14]</sup>曾利用 Sytox 染料对压载水中 10 ~ 50  $\mu\text{m}$  生物开展活体细胞检测,Sytox 染料只能够将死亡细胞染色,并利用差减法对活体细胞进行计数,其做法首先是直接对样品进行染色,记录死亡细胞个数,然后处理样品将所有细胞杀死,再次染色记录死亡细胞个数,两者相减即为样品中活体细胞个数。此种方法较为繁琐,并且不能区分无繁殖能力的“活细胞”。

FDA 能够自由穿越完整细胞质膜,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,因而积累在有活力的细胞中,在激光照射下,产生绿色荧光,无活力细胞不能分解 FDA,因此无荧光产生<sup>[15-16]</sup>。CMFDA 可以通过被动运输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,其可发出绿色荧光。目前利用 FDA 和 CMFDA 可对压载水中浮游生物进行共同染色,其在荧光显微镜下观察,能够轻易分辨生物死活。并且可以配合福尔马林、戊二醛等固定剂使用,可以保证样品中生物不会运动。该方法优点在于使用的染色剂剂量小,成本较低,染色时间短(20 min),美国环境保护署(EPA)建议使用此种方法对排放压载水中 10 ~ 50  $\mu\text{m}$  生物开展检测<sup>[17]</sup>。但利用此种方法

时,在荧光模式下并不能很好的对生物种类进行鉴定,需要额外花费时间去鉴定生物种类。并且挪威 NIVA 研究中心<sup>[18]</sup>曾有报告指出,有些活体细胞因为细胞壁的存在,或者含有的脂类酶极少,不能保证 CMFDA 和 FDA 顺利进入细胞内部,从而有可能导致正常的活体细胞被误判为死细胞。使用紫外线(UV)照射技术的船舶压载水管理系统(BWMS),利用紫外射线损坏细胞内 DNA 等大分子物质,但脂类酶等小分子物质有可能仍然存在,有学者就指出,此种细胞虽然具有活性,但其已经丧失再繁殖能力,其在生态学角度来看,已经可以判定死亡<sup>[19]</sup>,但在使用 CMFDA 和 FDA 染色时,其仍有可能发出荧光,从而导致实际已经死亡的细胞被认为活细胞。STEINBERG<sup>[20]</sup>发现如海洋原甲藻(*Prorocentrum mican*)、角多甲藻(*Peridinium bipes*)、锥状斯克里普藻(*Scrippsiella trochoidea*)以及鳍藻属(*Dinophysis* sp.)等非自养型生物,其细胞死亡后也能够检测到荧光。所以,在评估使用 UV 技术的 BWMS 时,应避免使用该种方法。

显微镜观察法往往前期处理时间较长,冯道伦<sup>[21]</sup>曾经对滤膜法进行改进,利用真空泵将样品中实验藻类杜氏盐藻和赤潮异湾藻快速过滤到滤膜上,大大缩短了样品准备时间,配合显微镜自动成像系统,可以快速的进行计数,并且具有较高的准确性,但由于不同的生物具有不同的抗变形能力,如何确定合适的真空泵压力,保证不同生物种类都能够留存在滤膜上,需要开展进一步实验。

公约根据生物个体的最小尺寸对排放压载水中生物进行了详细的分类,因此要求检测员在对压载水中生物进行种类鉴定时,还要能够准确的判断其生物大小,需要具有非常专业的分类知识和丰富的检测经验。在利用显微镜观察样品时,一般是凭借目镜中测量微尺去测量细胞大小,费时费力,并且在显微镜视野中细胞并不一定能够呈现出其最小尺寸部分,导致无法利用测量微尺去测量细胞大小,并且样品中泥沙、碎屑等物质也会不可避免的遮挡细胞,对于检测员来说是一个很大的考验,只能凭借经验去判断,无疑增加了结果的不确定性。样品在计数框或滤膜中如果不能均匀分布,也会对结果产生影响<sup>[22]</sup>。人为因素往往具有一定的主观偏见性,即

使经验丰富的检测员,也会不可避免的产生误差,在严格的公约排放标准下,产生的误差对排放压载水性能评估影响较大。因此,该方法在压载水检测应用中对样品和人员素质均具有较高的要求,有一定的限制性。

### 1.1.2 流式细胞技术

流式细胞技术(Flow cytometry, FCM)是20世纪70年代发展起来的一种新型细胞检测技术,是利用流式细胞仪,使细胞在流动室内处于快速流动状态,通过鞘液流技术,使细胞逐个通过激光光束,测量其产生的散射光和荧光强度,从而对细胞进行分析,其可以快速分析上万细胞并进行分类计数,同时测量细胞形态等特征。还可以通过荧光染色法结合,对细胞活性进行判定<sup>[23]</sup>,基于此流式细胞技术可应用于对压载水中活体生物进行快速检测。此种方法具有精度高、准确性好、速度快的优点,自动程度高,对检测员的经验要求不高,能够快速的对样品中生物进行定量分析<sup>[24]</sup>。流式细胞仪用于分析的样品体积小,当样品中细胞浓度低于 $10^3$ 个/mL时,细胞就不容易被检测到<sup>[25]</sup>。对于含有较高浓度生物的水样,其具有更好的检测效果<sup>[26]</sup>。而公约D-2排放标准要求的排放压载水中活体生物密度较低,在一定程度上限制了流式细胞仪在检测排放压载水方面的应用。并且流式细胞仪仪器体积大,不方便携带,价格也十分昂贵。其利用荧光染料判断生物活性时,荧光染料的缺点依然存在。这些都成为限制流式细胞术在压载水检测中应用的因素。但随着科技的发展,流式细胞术仍在压载水生物检测方面具有广泛的发展前景。

将流式细胞技术与显微镜成像技术结合,并配合使用图像分析软件,形成一种新型细胞检测技术——流式细胞摄像系统(Flow Cytometer And Microscope, Flow CAM)。Flow CAM可以对样品中细胞等颗粒物进行捕捉拍摄,并在线显示拍摄到的任何颗粒物的清晰数字图像。除了具备传统流式细胞技术的特点之外,当建立起有效的生物图谱数据库之后,还可以实现对细胞的自动分类识别。但是由于未使用鞘液流技术,有时也不能很好对样品流进行聚焦,虽然进行拍照,但不能对其进行有效判别<sup>[27]</sup>。

### 1.1.3 微流控芯片技术

微流控芯片技术是在微纳米通道内,利用光

学检测或电化学技术对样品中藻类叶绿素荧光开展检测,是一种新兴起的应用于细胞检测与研究的技术<sup>[28]</sup>。徐永奕<sup>[29]</sup>提出利用微流控芯片技术对压载水中浮游植物开展现场快速检测,其具有成本低、体积小、操作简便等优点,对于实现压载水的现场快速检测具有一定意义。但利用此种方法检测的样品体积以 $\mu\text{L}$ 计,其检出限约为1000个/mL左右,显然不满足于D-2排放标准中活体生物不超过10个/mL的要求。

### 1.2 分子生物学技术

目前,国内外学者尝试利用分子生物学技术,对压载水中 $10 \sim 50 \mu\text{m}$ 生物开展鉴定。SCHOLIN<sup>[30]</sup>对亚历山大藻进行基因标记鉴定和RNA基因片段序列分析,并且发现在有毒亚历山大藻中存在独特的A基因和B基因,从而发展出利用RELP技术对亚历山大藻进行快速鉴定的技术。STEHOUWER<sup>[24]</sup>曾利用16sRNA测定压载水中 $10 \sim 50 \mu\text{m}$ 生物,其首先用镜检法对样品测定,发现疑似产毒拟菱形藻(*Pseudo-nitzschia spp.*)的存在,而后利用分子生物学法,精确的对生物种类进行判定。但分子生物学技术也存在一些不足,其不能对生物进行定量检测,需要的压载水样品量较大,并且基因提取时间长。利用分子生物学技术可以鉴定的生物种类有限,而有些船舶压载水来源地很杂,同一个压载水舱中有可能混杂多个不同压载地的水,用分子生物学技术就会存在很大的不确定性,因此分子生物学技术更加适用于特定藻类的研究,如有毒藻类的鉴定。

### 1.3 SDS-MPN (Serial Dilution Culture-most Probable Number) 法

SDS-MPN方法是一种采用数学理论推算,用置信区间来估算生物浓度的方法,最早是1915年McCrary用于细菌浓度的估算,该方法是将样品做一系列稀释后,接种到适宜的培养液中培养,在有藻类生长的最后三个稀释度的管数,查找最大可能数表(MPN表),从而估算活性细胞的最大可能数量<sup>[31]</sup>。中国国家海洋局第一海洋研究所就曾利用MPN法针对南通海景船舶压载水管理系统股份有限公司Seascope®-BWMS压载水管理系统实船试验排放水中 $10 \sim 50 \mu\text{m}$ 生物开展了相关的研究检测。该方法被JOHN<sup>[32]</sup>认为是一种非常有效的检测被BWMS(尤其是利用UV技

术)处理后的压载水水中存活生物的方法。FIRST<sup>[33]</sup>曾指出,细胞经过UV处理后,虽然外观完整并且能够正常的代谢特征,但已经失去再生能力。如果利用显微镜观察法或流式细胞技术,仍有可能被认为活体细胞,但此种细胞对压载水排放地已经不具备产生危害的能力,在生态学意义上可以被定义为死亡细胞。并且生物在自然环境中后会发生光复活现象,有可能导致压载水性能被高估而被允许排放,对生态环境带来潜在威胁。利用MPN方法可以避免上述情况发生。但MPN方法同样具有一定的不足,有学者曾指出,它仅能统计在实验室培养条件下生长出的细胞,当压载水中生物进入到自然环境中,并不一定能够存活,并且有些生物种类并不一定能够在实验室条件下培养<sup>[34]</sup>。

## 2 大于等于 50 $\mu\text{m}$ 生物检测技术

当前主流的检测压载水中 $\geq 50 \mu\text{m}$ 生物方法,仍是以传统方法显微镜观察法为主<sup>[35]</sup>。由于活体生物会不停游动,容易造成漏检或重复计数<sup>[36]</sup>,EPA<sup>[17]</sup>建议在检测压载水 $\geq 50 \mu\text{m}$ 生物生物时,可以使用差减法,首先对样品中死亡生物个体进行计数,然后将样品进行处理,保证样品中生物全部被杀死,再次对样品中生物总个数进行计数,那么利用公式“活体生物个数 = 所有生物个体数 - 死亡个体数”即可算出样品活体生物个数。 $\geq 50 \mu\text{m}$ 生物同样可以使用流式细胞仪进行分析<sup>[37]</sup>。

## 3 小于 10 $\mu\text{m}$ 生物检测技术

### 3.1 细菌总数

虽然公约未对排放压载水中细菌总数数量进行详细的规定,但对于开展BWMS的性能评估时,细菌总数是一个不可或缺的重要参考依据。

#### 3.1.1 平板法

平板计数法是一种传统的计数方法,该方法是将待测样品稀释成不同浓度稀释液后,涂布到固体培养基上,单一细胞经过培养后形成一个肉眼可见的菌落,通过计算菌落总数,经过换算后,即可得知样品中细菌总数。是一种广泛应用在船舶压载水中微生物检测的方法<sup>[9,17]</sup>。但自然环境中微生物种类和数量多种多样,如一些厌氧菌、有特殊营养要求的细菌,并不一定能够在现

有条件下繁殖生长,平板计数法的结果并不能代表实际中所有的细菌总数<sup>[38-39]</sup>,并且平板计数法操作繁琐,需要较长时间的准备和收尾工作,因此这种方法在检测压载水中细菌总数时具有一定局限性。

#### 3.1.2 3M 生物测试片

3M 细菌总数测试片多用于食品检测,其含有适合细菌繁殖的培养基、冷水可溶凝胶和显色剂,具有快速、方便、灵敏度高以及特异性强的特点<sup>[40-41]</sup>。王海军<sup>[42]</sup>为了探索快速便捷的船舶压载水微生物指标的检测方法,利用3M生物测试片对船舶压载水样品进行检测,结果发现其适用于压载水中细菌总数的测定,其具有操作简单,菌落清晰等特点,相比较于传统平板计数法,更易于辨认和计数,但费用相对会比较昂贵。

### 3.2 大肠埃希氏菌

#### 3.2.1 MPN 法

MPN法是将样品进行一系列不同浓度稀释后,接种到含有培养基试管中培养,根据不同浓度系列下,培养出大肠埃希氏菌的试管个数,对照MPN表,估算出样品中大肠埃希氏菌浓度,是一种广泛应用于船舶压载水大肠埃希氏菌检测的方法<sup>[9,17]</sup>。

#### 3.2.2 滤膜法

滤膜法是将一定体积(一般为100 mL)的样品经过抽滤方式截留到0.45  $\mu\text{m}$ 微孔滤膜上,然后将滤膜放置在M-TEC培养基上进行培养,根据过滤的样品体积和生长出的典型大肠埃希氏菌菌落个数,换算出样品中大肠埃希氏菌浓度。EPA<sup>[17]</sup>推荐使用此种方法检测压载水中大肠埃希氏菌浓度。

#### 3.2.3 3M 大肠菌群测试片

王海军<sup>[42]</sup>曾利用3M大肠埃希氏菌测试片测定压载水中大肠埃希氏菌,并利用MPN法对结果进行验证,结果发现3M测试片虽然操作简单,检测时间短,但存在一定的漏检率,并不适用于压载水中大肠埃希氏菌的测定。

### 3.3 肠道球菌

目前主流的用于肠道球菌检测的方法是使用滤膜法进行检测,方法同大肠杆菌,培养基更换为适合肠道球菌生长的培养基<sup>[17]</sup>。

### 3.4 霍乱弧菌(O1群和O139群)

常规的霍乱弧菌检测方法是

碱性蛋白胨水中,经过增菌培养后,挑取菌膜下表层接种到选择性培养基(TCBS培养基)上进行培养。挑选疑似菌落,利用 O1 群和 O139 群单克隆抗体开展玻片凝集实验,实现对霍乱弧菌的筛选检测<sup>[43]</sup>。EPA 推荐的霍乱弧菌检测方法中,使用异硫氰酸荧光素标记的单克隆抗体,可以直接在荧光显微镜下对霍乱弧菌进行检测<sup>[17,44]</sup>。

实时荧光定量 PCR 技术(Realtime Fluorescence Quantitative PCR)也被用来检测压载水中霍乱弧菌。荧光定量 PCR 技术是指在常规 PCR 基础上加入荧光标记探针或相应的荧光染料,实现定量功能。FYSKE<sup>[45]</sup>曾利用荧光探针 PCR 技术快速的检测到压载水中霍乱弧菌的存在,该方法具有特异性强、灵敏度和准确度高、操作简单等特点,并且对霍乱弧菌检出限为 1CFU/100 mL,完全有能力检测 D-2 标准要求的排水,虽然前期仪器投入较大,也不失为一种可以利用的方法。

以上介绍的 <10 μm 生物都利用到了传统的分离培养法,耗费时间较长,并且需要在无菌环境中开展检测,具有一定的限制性。流式细胞仪法同样适用于压载水中细菌的检测,JOACHIMSTHAL<sup>[23,46]</sup>用流式细胞仪测定新加坡港压载水中细菌总数、大肠埃希氏菌、霍乱弧菌和肠道球菌,测量结果与传统方法标准误差仅为 5%。

#### 4 展望

各种方法均存在自身的优势与缺陷,如何将几种方法结合使用,充分利用各种方法的优点,也是研究的一大趋势,这样才能更好的帮助缔约国对压载水公约进行履约。MIA<sup>[27]</sup>曾利用流式细胞术、流式细胞影响术、显微镜镜检法以及膜过滤法等四种方法对压载水中 10~50 μm 生物开展检测,对比结果证明不同方法得到的检测结果之间的差异足以影响到排放压载水是否达到排放标准,因此,IMO 应尽快建立一个国际公认的压载水排放生物检测标准,以避免引起不必要的国际纠纷。

公约规定“在执行本公约条款时应尽力避免使船舶受到不当的滞留或延误”“如果在执行本公约条款时船舶受到不当滞留或延误,该船有权要求对其受到的任何损失或损害予以赔偿”。目

前,虽然针对压载水中生物的检测方法多种多样,但大多是由传统检测方法发展而来,而由于船舶在港时间存在不确定性,往往时间较短,传统方法显然不满足于船舶压载水的快速检测的要求。执法部门在执法时,为不耽误船舶船期,需要能够快速判断船舶排放压载水中生物是否满足 D-2 排放标准,这就要求包括我国在内的缔约国亟需快速、准确、高效的压载水生物检测技术支撑。而目前压载水研究工作主要集中在压载水中生物生态特征的研究,关于压载水生物的快速检测研究并不多。公约并没有对排放压载水中生物的种类有明确的要求,只针对数量做了详细规定,流式细胞术法是目前最适合发展用于压载水生物快速检测的方法,也是目前唯一一种能够同时检测 D-2 标准中要求的所有生物的方法。其快速、准确、样品消耗量小的特点能够保证执法部门能够快速的判断到港船舶压载水是否可以直接排放,自动程度高的特点降低了人为检测所带来的主观误差,也能让执法人员经过培训后快速掌握使用方法。针对此方法的研究方向应该进一步提升其检测低浓度样品的能力以及设备便携化。同时,配合 MPN 法,对压载水进行后续跟踪。建立世界上主要压载地水生生物库,执法部门可以通过船舶压载水日志,有针对性的开展压载水生物检测,可以有效提高检测效率,方便采取相应的应急措施。同时,建立本国压载水外来生物库,为执法部门等提供数据储备与支撑,将更加有利于压载水入侵风险评估以及生态环境损坏赔偿机制的建立。

另外不容忽视的一点,压载水中存在的生物孢囊的快速鉴定方法也是压载水有效控制的迫切需要。HALLEGRAEFF<sup>[47]</sup>曾对进入澳大利亚港口的 343 艘船舶中的底泥中孢囊进行培养,其中 20 种孢囊被成功培养,甚至存在有毒种孢囊。当前对压载水中孢囊的研究仍然很少。虽然 D-2 标准并没有对排放水中孢囊的密度有详细的规定,但孢囊对于外界极端环境具有很强的适应能力,其相比较于浮游期细胞更能适应于压载水环境<sup>[48]</sup>,更难被 BWMS 处理,对压载水排放地的生态系统潜在破坏性更大。所以也应该同时加强对孢囊的形态鉴定等方面的研究<sup>[49]</sup>。

## 参考文献:

- [1] IMO. International convention for the control and management of ships' ballast water and sediments [ S ]. London: International Maritime Organization, 2004.
- [2] TAMELANDER J, RIDDERING L, HAAG F, et al. Guidelines for Development of a National Ballast Water Management Strategy[R]. London, IMO, 2010.
- [3] TSOLAKI E, DIAMADOPOULOS E. Technologies for ballast water treatment: a review [ J ]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2010, 85(1): 19-32.
- [4] GOLLASCH S, DAVID M, VOIGT M, et al. Critical review of the IMO international convention on the management of ships' ballast water and sediments [ J ]. Harmful Algae, 2007, 6(4): 585-600.
- [5] FAHNENSTIEL G L, MCCORMICK M J, LANG G A, et al. Taxon-specific growth and loss rates for dominant phytoplankton populations from the northern Gulf of Mexico [ J ]. Marine Ecology Progress Series, 1995, 117: 229-239.
- [6] 杨帆, 李捷, 于淑亭, 等. 船舶压载水浮游生物检测方法研究进展[ J ]. 环境科学与技术, 2017, 40(4): 45-49, 55.
- YANG F, LI J, YU S T, et al. Advances in detection of plankton in ballast water [ J ]. Environmental Science & Technology, 2017, 40(4): 45-49, 55.
- [7] 郑剑宁, 裘炯良, 薛新春. 宁波港入境船舶压舱水中携带浮游生物的调查与分析[ J ]. 中国国境卫生检疫杂志, 2006, 29(6): 358-360.
- ZHENG J N, QIU J L, XUE X C. Study on planktons taken by ballast water of international navigation ships[ J ]. Chinese Frontier Health Quarantine, 2006, 29(6): 358-360.
- [8] 宫恩昊, 王钰婷, 刘艳, 等. 上海港船舶压载水浮游植物组成及生态因子的相关性[ J ]. 海洋湖沼通报, 2015(4): 161-167.
- GONG E H, WANG Y T, LIU Y, et al. Species abundance of phytoplankton in ballast water of Shanghai port and its correlation with ecological factors [ J ]. Transactions of Oceanology and Limnology, 2015(4): 161-167.
- [9] 王爱民, 许炳芬, 陈宗辉, 等. 国际航行船舶压舱水外来有害生物研究[ J ]. 检验检疫科学, 2007, 17(3): 9-11.
- WANG A M, XU B F, CHEN Z H, et al. External harmful living beings in ballast water on cross border vessel [ J ]. Inspection and Quarantine Science, 2007, 17(3): 9-11.
- [10] 李炳乾, 陈长平, 杨清良, 等. 福建外来船舶压舱水中浮游植物种类组成与丰度及其影响因素的初步研究[ J ]. 台湾海峡, 2009, 28(2): 228-237.
- LI B Q, CHEN C P, YANG Q L, et al. Preliminary study on the species composition and abundance of phytoplankton and affecting factors in ballast water of ships from outside Fujian, China[ J ]. Journal of Oceanography in Taiwan Strait, 2009, 28(2): 228-237.
- [11] 钱奎梅, 刘霞, 陈宇炜. 淡水浮游植物计数与定量方法[ J ]. 湖泊科学, 2015, 27(5): 767-775.
- QIAN K M, LIU X, CHEN Y W. A review on methods of cell enumeration and quantification of freshwater phytoplankton[ J ]. Journal of Lake Sciences, 2015, 27(5): 767-775.
- [12] 刘亮, 王琼, 袁林, 等. 光催化与纯紫外工艺对船舶压载水微藻的处理效果比较[ J ]. 生物学杂志, 2014, 31(3): 29-32, 42.
- LIU L, WANG Q, YUAN L, et al. The effectiveness of photocatalytic technology and pure UV technology on microalgae in ballast water[ J ]. Journal of Biology, 2014, 31(3): 29-32, 42.
- [13] 王珂, 梁文艳, 王金丽. 铜绿微囊藻中性红染色研究[ J ]. 环境科学与技术, 2007, 30(10): 20-22.
- WANG K, LIANG W Y, WANG J L. Viability detection of microcystis aeruginosa by staining methods[ J ]. Environmental Science & Technology, 2007, 30(10): 20-22.
- [14] GOLLASCH S, DAVID M. Ballast water sampling and sample analysis for compliance control [ C ]//DAVID M, GOLLASCH S. Global Maritime Transport and Ballast Water Management. Dordrecht: Springer, 2015: 171-223.
- [15] SCHUMACHER T E, EYNARD A, CHINTALA R. Rapid cost-effective analysis of microbial activity in soils using modified fluorescein diacetate method [ J ]. Environmental Science and Pollution Research, 2015, 22(6): 4759-4762.
- [16] CHRISTENSEN P, STENVANG J P, GODFREY W L. A flow cytometric method for rapid determination of sperm concentration and viability in mammalian and avian semen [ J ]. Journal of Andrology, 2004, 25(2): 255-264.
- [17] NSF International. Generic protocol for the verification of ballast water treatment technology [ R ]. EPA/600/R-10/146. Washington: U. S. Environmental Protection Agency, 2010.
- [18] NIVA. CMFDA/FDA staining versus MPN method for detecting live > 10-50  $\mu\text{m}$  organisms in treated ballast water [ EB/OL ]. [ 2016-04-01 ]. <http://mpnballastwaterfacts.com/wp-content/uploads/2015/12/NIVA-Support.pdf>.
- [19] REAVIE E D, CANGELOSI A A, ALLINGER L E. Assessing ballast water treatments: evaluation of viability methods for ambient freshwater microplankton assemblages[ J ]. Journal of Great Lakes Research, 2010, 36(3): 540-547.
- [20] STEINBERG M K, LEMIEUX E J, DRAKE L A. Determining the viability of marine protists using a combination of vital, fluorescent stains [ J ]. Marine Biology, 2011, 158(6): 1431-1437.
- [21] 冯道伦, 苏晓峰, 詹世杰. 船舶压载水中活体生物计数方法的研究——真空抽滤浓缩固定预处理[ J ]. 环境科学与技术, 2011, 34(4): 44-47.
- FENG D L, SU X F, ZHAN S J. Numeration of viable organism in ship's ballast water-concentration and fixation pretreatment by vacuum filtration[ J ]. Environmental Science & Technology, 2011, 34(4): 44-47.

- [22] HALLEGRAEFF G M, ANDERSON D M, CEMBELLA A D, et al. Manual on harmful marine microalgae[M]. Paris: UNESCO, 2003: 99-129.
- [23] JOACHIMSTHAL E L, IVANOV V, TAY J H, et al. Flow cytometry and conventional enumeration of microorganisms in ships' ballast water and marine samples[J]. Marine Pollution Bulletin, 2003, 46(3): 308-313.
- [24] STEHOUWER P P, LIEBICH V, PEPERZAK L. Flow cytometry, microscopy, and DNA analysis as complementary phytoplankton screening methods in ballast water treatment studies[J]. Journal of Applied Phycology, 2013, 25(4): 1047-1053.
- [25] KEMP P F, SHERR B F, SHERR E B, et al. Handbook of methods in aquatic microbial ecology [M]. Boca Raton: Lewis Publishers, 1993: 175-186.
- [26] MALKASSIAN A, NERINI D, VAN DIJK M A, et al. Functional analysis and classification of phytoplankton based on data from an automated flow cytometer[J]. Cytometry Part A, 2011, 79(4): 263-275.
- [27] STEINBERG M K, FIRST M R, LEMIEUX E J, et al. Comparison of techniques used to count single-celled viable phytoplankton[J]. Journal of Applied Phycology, 2012, 24(4): 751-758.
- [28] YE N N, QIN J H, SHI W W, et al. Cell-based high content screening using an integrated microfluidic device[J]. Lab on A Chip, 2007, 7(12): 1696-1704.
- [29] 徐永奕. 基于微流控芯片的压载水微藻活性检测及分类[D]. 大连: 大连海事大学, 2015: 1-63.
- XU Y Y. The methods of microalgae detection and classification system for ship ballast water based on microfluidic chip[D]. Dalian: Dalian Maritime University, 2015: 1-63.
- [30] SCHOLIN C A, ANDERSON D M. Identification of group- and strain-specific genetic markers for globally distributed *Alexandrium* (Dinophyceae). I. RFLP analysis of SSU rRNA genes[J]. Journal of Phycology, 1994, 30(4): 744-754.
- [31] 吴天灵. 大亚湾海域休眠期浮游植物的萌发及其与赤潮形成之间的关系[D]. 广州: 华南师范大学, 2009: 1-65.
- WU T L. The germination of resting phytoplankton and their relation with harmful algae blooms in daya bay sea area[D]. Guangzhou: South China Normal University, 2009: 1-65.
- [32] CULLEN J J, MACINTYRE H L. On the use of the serial dilution culture method to enumerate viable phytoplankton in natural communities of plankton subjected to ballast water treatment[J]. Journal of Applied Phycology, 2016, 28(1): 279-298.
- [33] FIRST M R, DRAKE L A. Approaches for determining the effects of UV radiation on microorganisms in ballast water [J]. Management of Biological Invasions, 2013, 4(2): 87-99.
- [34] HARRIS A S D, JONES K J, LEWIS J. An assessment of the accuracy and reproducibility of the most probable number (MPN) technique in estimating numbers of nutrient stressed diatoms in sediment samples [J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 1998, 231(1): 21-30.
- [35] 薛俊增, 刘艳, 王金辉, 等. 洋山深水港入境船舶压载水浮游动物种类组成分析[J]. 海洋学报(中文版), 2011, 33(1): 138-145.
- XUE J Z, LIU Y, WANG J H, et al. A biological survey of zooplankton taken from ballast water of the international navigation ships entering the Shanghai Yangshan Deep-water Port in China[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2011, 33(1): 138-145.
- [36] 冯道伦, 许乐平. 船舶压载水中生物取样和检测的几个问题[J]. 环境科学与技术, 2009, 32(3): 87-89.
- FENG D L, XU L P. Several problems concerning sampling and monitoring of organisms in ballast water [J]. Environmental Science & Technology, 2009, 32(3): 87-89.
- [37] LE BOURG B, CORNET-BARTHAUX V, PAGANO M, et al. Flowcam as a tool for studying small (80-1000  $\mu\text{m}$ ) metazooplankton communities [J]. Journal of Plankton Research, 2015, 37(4): 666-670.
- [38] KUSKE C R, BARNS S M, BUSCH J D. Diverse uncultivated bacterial groups from soils of the arid southwestern United States that are present in many geographic regions [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(9): 3614-3621.
- [39] 傅志超. 船舶压载水公约要求下的压载水中微生物的检测分析[J]. 中国水运, 2011, 11(8): 85-87.
- FU Z C. Analysis of microorganism under convention of ship's ballast water[J]. China Water Transport, 2011, 11(8): 85-87.
- [40] GINN R E, PACKARD V S, FOX T L. Enumeration of total bacteria and coliforms in milk by dry rehydratable film methods; collaborative study [J]. Journal-Association of Official Analytical Chemists, 1986, 69(3): 527-531.
- [41] DE CASTILHO N P A, OKAMURA V T, CAMARGO A C, et al. Adequacy of Petrifilm<sup>TM</sup> aerobic count plates supplemented with de man, rogosa & sharpe broth and chlorophenol red for enumeration of lactic acid bacteria in salami[J]. Meat Science, 2015, 110: 253-261.
- [42] 王海军, 李俊成, 汪仁杰, 等. 3M微生物测试片检测入境船舶压舱水卫生学指标的探讨[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2006, 29(s1): 90-92.
- WANG H J, LI J C, WANG R J, et al. A study of the detecting method on the hygienic index of ballast water of entry ship by using 3M bacterial count plate [J]. Chinese Frontier Health Quarantine, 2006, 29(s1): 90-92.
- [43] 中华人民共和国卫生部. WS 289-2008 霍乱诊断标准[S]. 北京: 人民卫生出版社, 2008.
- Ministry of Health of the People's Republic of China. WS 289-2008 Diagnostic criteria for cholera [S]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2008.

- [44] GOEL A K, TAMRAKAR A K, KAMBOJ D V, et al. Direct immunofluorescence assay for rapid environmental detection of *Vibrio cholerae* O1 [J]. *Folia Microbiologica*, 2005, 50 (5): 448-452.
- [45] FYKSE E M, NILSEN T, NIELSEN A D, et al. Real-time PCR and NASBA for rapid and sensitive detection of *Vibrio cholerae* in ballast water [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2012, 64(2): 200-206.
- [46] JOACHIMSTHAL E L, IVANOV V, TAY S T L, et al. Bacteriological examination of ballast water in Singapore Harbour by flow cytometry with Fish [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2004, 49(4): 334-343.
- [47] HALLEGRAEFF G M, BOLCH C J. Transport of diatom and dinoflagellate resting spores in ships' ballast water; implications for plankton biogeography and aquaculture [J]. *Journal of Plankton Research*, 1992, 14(8): 1067-1084.
- [48] HALLEGRAEFF G M. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase [J]. *Phycologia*, 1993, 32 (2): 79-99.
- [49] 龙华, 林石明, 梁君荣, 等. 船舶压舱水引入外来藻类的危害及监测 [J]. *植物检疫*, 2005, 19(5): 289-291.
- LONG H, LIN S M, LIANG J R, et al. Harmful effect of introduced exotic algae by ballast water and its detection [J]. *Plant Quarantine*, 2005, 19(5): 289-291.

## Detection technology of organisms in ballast water based on international convention

LIU Liang<sup>1,2</sup>, WU Huixian<sup>1,2</sup>, YUAN Lin<sup>1,2</sup>, WANG Qiong<sup>1,2</sup>, XUE Junzeng<sup>1,2</sup>

(1. *College of Marine Ecology and Environment, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China*; 2. *Centre for Research on the Ecological Security of Ports and Shipping, Shanghai 201306, China*)

**Abstract:** Analysis of viable organisms in discharged ballast water including organisms greater than or equal to 10 micrometres and less than 50 micrometres in minimum dimension, organisms greater than or equal to 50 micrometres in minimum dimension, *Escherichia Coli*, *Intestinal Enterococci* and *Vibrio cholerae* is required in detail by D-2 standard of the International Convention for the Control and Management of Ship's Ballast Water and Sediments. Now a lot of research on ballast water treatment have been done in the world, but some problems still exist in the detection of living organisms, especially in fast detection methods. Several methods including microscopy, flow cytometry, microfluidic chip, molecular biology method, MPN method and plate method are introduced, including their principle, characteristic and limitation in fast detection of ballast water. Based on the characteristics of fast, accuracy, small consumption of sample and high automation, Flow cytometry is the most suitable method for fast detection of ballast water. The convention has no detailed rules on the number of cysts in discharged ballast water, but cysts have worse potential destructiveness to ecosystem, so more research on cyst should be carried out.

**Key words:** ballast water; detection; organisms technology