

# DB4403

深 圳 市 地 方 标 准

DB4403/T XXX—XXXX

## 入出境船舶压载水中生物指示菌检测规程

Biological Bacterial Examination Rules for Ballast Water of Entry-Exit  
Ships

(送审稿)

2020-XX-XX 发布

2020-XX-XX 实施

深圳市市场监督管理局

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 检验项目..... 2

5 要求..... 2

6 样本采集..... 2

7 检验程序..... 3

8 检验方法..... 3

9 结果报告..... 5

10 结果判定及处置..... 5

附录 A（资料性附录）大肠杆菌检验方法原理及试剂配制..... 6

## 前 言

本标准按照GB/T 1.1-2009给出的规则起草。

本文件规定了入出境船舶压载水中生物指示菌的检验项目、要求、样本采集、检验程序、检验方法、结果报告、结果判定和处置。

本文件适用于对入出境船舶压载水实施生物指示菌卫生监测。

本标准引用了美国试验与材料学会（ASTM）《ASTM D 5392：用两步膜滤法分离和计数水中大肠杆菌的标准试验方法（2014年重新核准）》（Standard Test Method for Isolation and Enumeration of Escherichia Coli in Water by the Two-Step Membrane Filter Procedure），摘录和翻译了原文中关于大肠杆菌检验方法原理和试剂配制内容，作为资料性附录A，供标准使用人参考。

本标准由中华人民共和国深圳海关提出和归口。

本标准起草单位：由深圳市检验检疫科学研究院、深圳海关、深圳市罗湖区疾病预防控制中心、珠海市疾病预防控制中心。

本标准主要起草人：谢昭聪、卓菲、郑文丽、龙冬玲、路强、古华、杨贵清、冯重、胡蒙、李云璐。

本标准是首次发布。

# 入出境船舶压载水中生物指示菌检测规程

## 1 范围

本文件规定了入出境船舶压载水中生物指示菌的检验项目、要求、样本采集、检验程序、检验方法、结果报告、结果判定和处置。

本文件适用于对入出境船舶压载水实施生物指示菌卫生监测。

## 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用必不可少。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改版）适用于本文件。

GB 4789.38 食品微生物学检验 大肠埃希氏菌计数

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

GB17378.4 海洋监测规范 第4部分：海水分析

SN/T 1239 国境口岸霍乱检验规程

SN/T 1343 入出境船舶压舱水消毒规程

SN/T 1933.2 食品和水中的肠球菌检验方法 第2部分：滤膜法

SN/T 3564 国际航行船舶压舱水样本采集规程

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

国际海事组织 2004 国际船舶压载水和沉积物控制与管理公约

## 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

**生物指示菌** *Indicator bacteria*

又称指标菌，是在船舶压载水常规卫生监测中，用以指示船舶压载水卫生状况及安全性的指示性微生物，主要包括大肠杆菌、肠球菌、含有霍乱肠毒素的霍乱弧菌。

### 3.3

**大肠杆菌** *Escherichia coli*

又称大肠埃希氏菌，是广泛存在于人和温血动物的肠道中，需氧及兼性厌氧，能够在 44.5℃

生长，IMViC（靛基质、甲基红、VP 实验、柠檬酸盐）生化试验++--或+---的革兰氏阴性无芽孢杆菌。

### 3.4

#### 肠球菌 *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。

### 3.5

#### O1 群霍乱弧菌 *O 1 serogroup Vibrio cholerae*

菌体抗原由 3 种抗原因子 A、B、C 组成，又可分为 3 种血清型：稻叶型、小川型和彦岛型。根据生物表型差异，O 1 群霍乱弧菌可再分为 2 个生物型，即古典生物型和 El Tor 生物型。

### 3.6

#### O139 群霍乱弧菌 *O 139 serogroup Vibrio cholerae*

其临床表现及传播方式上与 O 1 群霍乱弧菌完全相同，但不能被 O 1 群霍乱弧菌诊断血清所凝集，抗 O 1 群的抗血清对 O 139 群菌株无保护性免疫。

### 3.7

#### 霍乱肠毒素 *cholera enterotoxin*

是致泻毒素中最为强烈的毒素之一，作用于肠细胞膜表面上的受体，导致肠粘膜细胞分泌功能大为亢进，使大量体液和电解质进入肠腔而发生剧烈吐泻。

## 4 检验项目

入出境船舶压载水中生物指示菌检验的项目包括：

- 大肠杆菌计数；
- 肠球菌计数；
- O 1 群霍乱弧菌及其肠毒素；
- O 139 群霍乱弧菌及其肠毒素。

## 5 要求

5.1 检验项目列项大肠杆菌计数、肠球菌计数、O 1 群霍乱弧菌及其肠毒素、O 139 群霍乱弧菌及其肠毒素的检验应符合 GB 19489 中 BSL-2 的规定。

5.2 检验人员应经过专业技术和实验室生物安全培训，具备相应的资质，能够理解并正确实施检验。

5.3 采样设备和用品应满足检验项目和方法的要求，保证在无菌状态下使用。

## 6 样本采集

### 6.1 现场样本采集

不同场所的现场样本采集方法参见SN/T 3564。

### 6.2 采样量

每个项目采样量不少于300 mL，每个项目取样100 mL进行检验，同时，做平行样检验。

### 6.3 样品预处理

样品采集完毕后，按照检验项目的要求进行必要的预处理。

#### 6.3.1 大肠杆菌、肠球菌检验样品的预处理

##### 6.3.1.1 污染程度低的水可以直接进行检验。

6.3.1.2 污染严重的水，可吸取 25 mL 样品，加入 225 mL 稀释液，充分混匀，制成 1:10 样品稀释液，根据样品污染程度及检验需要，进一步制成 10 倍递增的样品稀释液。

#### 6.3.2 霍乱弧菌检验样品的预处理

6.3.2.1 用灭菌容器采集水样，检验水样的盐度，盐度的检验按 GB17378.4 的有关规定执行。如果盐度低于 2%，取 100 mL 的水样，以 1 mol/L 氢氧化钠调至 pH 8.4~pH 9.2。如果盐度高于 2%，则需将盐度稀释至 2%以下，可以将 100 mL 的水样分为 2 份，每份 50 mL，分别加入 50 mL 的无菌纯水，以 1 mol/L 氢氧化钠调至 pH 8.4~pH 9.2。

6.3.2.2 在经 pH 调节后或盐度稀释及经 pH 调节后的 100 mL 水样中，加入或补足 10 倍浓缩碱性蛋白胨水至 10 mL，为抑制杂菌可再加入 1%亚碲酸钾 0.06 mL~0.1 mL 和 1 000 U/mL 青霉素 0.22 mL 进行第一次增菌。

### 6.4 样品保存、运送

#### 6.4.1 大肠杆菌、肠球菌检验样品的保存、运送

水样收集后应尽快检验。在运送到实验室期间，水样品在 1℃~4℃的温度下冷藏。水样收集和开始检验之间不要超过 4 h。

#### 6.4.2 霍乱弧菌检验样品的保存、运送

6.4.2.1 采集的水样宜在 3 h 内送到实验室。不能在 3h 内送检的，可在采集样本后将 10 mL10 倍浓缩碱性蛋白胨水加入 100 mL 样本中混匀。

6.4.2.2 因霍乱弧菌对低温敏感，用于霍乱弧菌检验的样本应置于室温运送和保存。实验室收到样本后必须当天增菌后分离。

6.4.2.3 如样本还需用于其他病原体检验，可依据其他病原体检验样本的保存运送方式，可在 8℃以下保存运送。

## 7 检验程序

压载水中生物指示菌检验流程图见图 1。

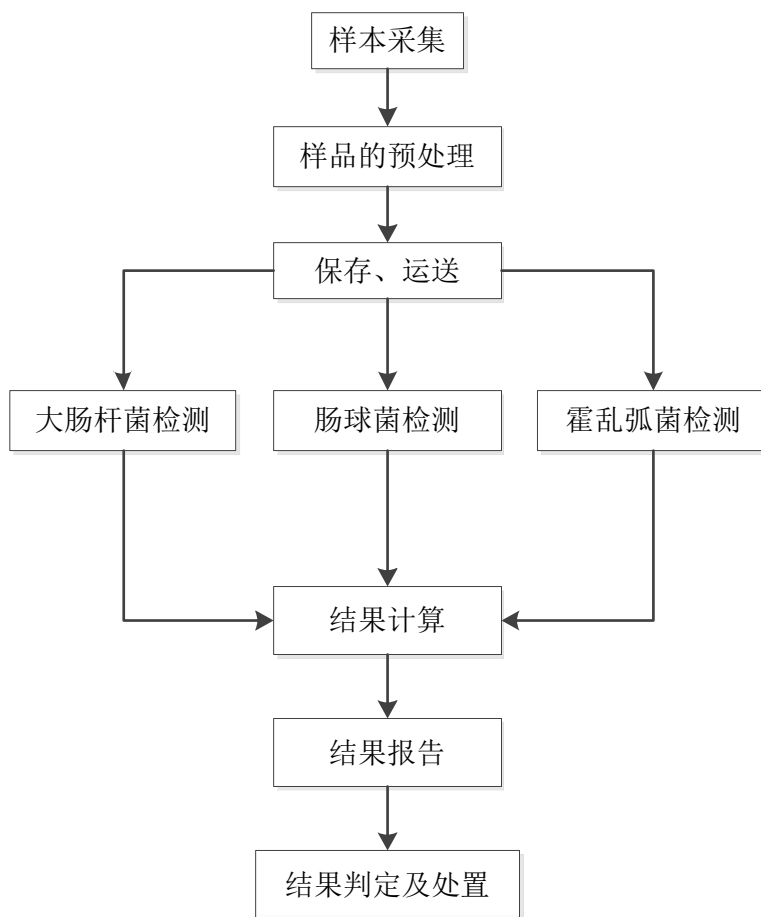


图 1 压载水中生物指示菌的检验程序示意图

## 8 检验方法

### 8.1 大肠杆菌的检验

大肠杆菌的检验方法按 ASTM D 5392-2014 的有关规定执行，其中，大肠杆菌的确证方法参照 GB 4789.38 的有关规定执行。大肠杆菌检验方法原理、试剂配制见附录 A。

### 8.2 肠球菌的检验

按 SN/T 1933.2 的有关规定执行。

### 8.3 霍乱弧菌的检验

按 SN/T 1239 的有关规定执行。每个项目取样 100 mL 进行检验，同时，做平行样检验。

## 9 结果报告

9.1 大肠杆菌结果报告格式： CFU / 100 mL。

9.2 肠球菌结果报告格式： CFU / 100 mL。

9.3 霍乱弧菌结果报告格式

9.3.1 未检出霍乱弧菌的结果报告



未检出 O 1 群和 O 139 群霍乱弧菌时，按如下方式报告：

——按检验所取样本的量，报告为“100 mL 水样中未检出 O 1 群和 O 139 群霍乱弧菌”。

### 9.3.2 检出霍乱弧菌的结果报告

9.3.2.1 检出 O 1 群和 O 139 群霍乱弧菌时，按如下方式报告：

——按检验所取样本的量，报告为“100 mL 水样中检出 O 1 群或 O 139 群霍乱弧菌”。

9.3.2.2 O 1 群霍乱弧菌进一步用小川型和稻叶型单价血清试验后，按如下方式报告：

——按检验所取样本的量，报告为“100 mL 水样中检出 O 1 群霍乱弧菌小川血清型或 O 1 群霍乱弧菌稻叶血清型或 O 1 群霍乱弧菌彦岛血清型”。

9.3.2.3 如进行了分子生物学检验，再报告分子生物学检验结果，报告方式为：“检出霍乱弧菌”或“未检出霍乱弧菌”+“检验的毒素基因或基因名称”+“片段”+“(扩增的片段大小)”。如所用检验方法中列出了扩增的片段大小，报告中要注明片段大小；如所用检验方法中未列出检验的片段大小(如荧光 PCR 方法)，则报告中不需注明片段大小。报告方式举例如下：

——“检出霍乱弧菌肠毒素 ctxA 基因片段(302 bp)”或“未检出霍乱弧菌 O 1 群基因片段 (192 bp)”；

——“检出霍乱弧菌 O 139 群基因片段”或“未检出霍乱弧菌中心调节蛋白 toxR 基因片段”。

## 10 结果判定及处置

10.1 船舶压载水生物指示菌执行标准如下：

——大肠杆菌 < 250 CFU / 100 mL；

——肠球菌 < 100 CFU / 100 mL；

——产肠毒素 O 1 群霍乱弧菌 < 1 CFU / 100 mL。

——产肠毒素 O 139 群霍乱弧菌 < 1 CFU / 100 mL。

10.2 按国际船舶压载水和沉积物控制与管理公约执行标准的规定，船舶压载水生物指示菌超过上述标准含量，必须经过卫生处理合格后，才允许排放。卫生处理要求按 SN/T 1343 的规定执行。

附 录 A  
(资料性附录)  
大肠杆菌检验方法原理及试剂配制

## A.1 方法原理

用一定数量水样或水样稀释液通过滤膜，细菌被截留在滤膜上。随后将滤膜帖于选择性培养基 mTEC 上，于 36℃ 的温度中培养，使受伤或应激的细菌复苏，然后置于 44.5℃ 的温度中培养，将滤膜转移到饱和尿素基质溶液的滤垫上，放置室温对所有黄色或黄褐色的菌落进行计数。

## A.2 试剂配制

### A.2.1 稀释液

#### A.2.1.1 成分

- a) 磷酸二氢钠 ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ): 0.58 g;
- b) 磷酸氢二钠 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ): 2.50 g;
- d) 氯化钠: 8.50 g;
- c) 蒸馏水: 1 000 mL。

#### A.2.1.2 制法

将上述各成分加热搅拌溶解，最终 pH 值为 7.4。适当的量分装到用于稀释的带盖的瓶、试管或用作冲洗液的容器，每瓶 225 mL 或 90 mL，每支试管 9 mL，121 °C 高压灭菌 15 min。

### A.2.2 mTEC琼脂

#### A.2.2.1 成分

- a) 蛋白胨: 5.0 g;
- b) 酵母提取物: 3.0 g;
- c) 乳糖: 10.0 g;
- d) 氯化钠: 7.5 g;
- e) 磷酸氢二钾: 3.3 g;
- f) 磷酸二氢钾: 1.0 g;
- g) 十二烷基硫酸钠(月桂醇硫酸钠): 0.2 g;
- h) 去氧胆酸钠: 0.1 g;
- i) 溴甲酚紫: 0.08 g;
- j) 溴酚红: 0.08 g;
- k) 琼脂: 15.0 g。

#### A.2.2.2 制法

称取上述成分 45.26 g 培养基加入到盛有 1 000 mL 蒸馏水的烧瓶中并加热至沸腾，直至

成分溶解。在 121 °C 高压灭菌 15 min，冷却后倒入 47 mm 直径培养皿（4 mL/皿）。培养基的 pH 值为 7.3。

### A. 2. 3 饱和尿素基质溶液

#### A. 2. 3. 1 成分

- a) 尿素：2.01 g；
- b) 酚红：0.01 g；
- c) 蒸馏水：1 000 mL。

#### A. 2. 3. 2 制法

将上述各成分溶解，并将溶液的 pH 值调整到 4.5 至 5.2。在此 pH 范围内底物是稻草黄色。

### A. 2. 4 氧化酶试剂（1 g/1 00 mL）

#### A. 2. 4. 1 成分

- a) N，N，N'，N' -四甲基对苯二胺盐酸盐：1.0 g；
- b) 蒸馏水：1 00 mL。

#### A. 2. 4. 2 制法

在水中溶解 1.0 g N，N，N'，N' -四甲基对苯二胺盐酸盐，稀释至 100 mL。

### A. 2. 5 吲哚试剂

#### A. 2. 5. 1 成分

- a) 对二甲基氨基苯甲醛：10.0 g；
- b) 戊或异戊酒精：150 mL。

#### A. 2. 5. 2 制法

在 150 mL 的戊或异戊酒精中溶解 10 g 对二甲基氨基苯甲醛。然后慢慢加 50 mL 浓盐酸。

### A. 2. 6 胰蛋白大豆肉汤（TSB）

#### A. 2. 6. 1 成分

- a) 胰蛋白胨：17.0 g；
- b) 大豆蛋白胨：3.0 g；
- c) 葡萄糖：2.5 g；
- d) 氯化钠：5.0 g；
- e) 磷酸氢二钾：2.5 g；
- f) 蒸馏水：1 000 mL。

#### A. 2. 1. 2 制法

将上述各成分加热搅拌溶解,最终 pH 值为  $7.3 \pm 0.2$ 。分装,每支试管 5 mL~10 mL, 121℃ 高压灭菌 15~20 min。

#### A. 2. 7 西蒙氏柠檬酸盐琼脂

##### A. 2. 7. 1 成分

- a) 硫酸镁 ( $7H_2O$ ): 0.2 g;
- b) 磷酸二氢铵: 1.0 g;
- c) 磷酸氢二钾: 1.0 g;
- d) 柠檬酸钠 ( $2H_2O$ ): 2.0 g;
- e) 氯化钠: 5 g;
- f) 溴麝香草酚兰: 0.08 g;
- g) 琼脂: 15.0 g。

##### A. 2. 7. 2 制法

称取上述成分 24.2g 加入到盛有 1 000 mL 蒸馏水的烧瓶中并加热至沸腾,直至成分溶解。分装,每支试管 5 mL~7 mL, 在 121℃ 高压灭菌 15~20min 后, 在倾斜的位置冷却凝固。在 25℃ 下, 最终 pH 值为  $6.8 \pm 0.2$ 。

#### A. 2. 8 胰蛋白胨肉汤

##### A. 2. 8. 1 成分

胰胨或胰酪胨: 10.0 g。

##### A. 2. 8. 2 制法

称取上述成分 10.0 g 加入到盛有 1 000 mL 蒸馏水的烧瓶中并加热至沸腾,直至成分溶解。分装,每支试管 5 mL, 在 121℃ 高压灭菌 15min。最终 pH 值为  $6.9 \pm 0.2$ 。

#### A. 2. 9 EC肉汤

##### A. 2. 9. 1 成分

- a) 胰蛋白胨: 2.0 g;
- b) 3 号胆盐(或混合胆盐): 1.5 g;
- c) 乳糖: 5 g;
- d) 磷酸氢二钾: 4.0 g;
- e) 磷酸二氢钾: 1.5 g;
- f) 氯化钠: 5 g。

##### A. 2. 9. 2 制法

称取上述成分 37 g 加入到盛有 1 000 mL 蒸馏水的烧瓶中并加热至沸腾,直至成分溶解。分装有发酵倒管的试管中, 每支试管 5 mL~10 mL, 在 121℃ 高压灭菌 15 min 至 20 min, 最终 pH 为  $6.9 \pm 0.2$ 。

#### A. 2. 10 营养琼脂斜面

#### A. 2. 10. 1 成分

- a) 蛋白胨: 10.0 g;
- b) 氯化钠: 5.0g
- c) 牛肉膏: 3.0 g;
- d) 琼脂: 15 g;
- e) 蒸馏水: 1 000 mL。

#### A. 2. 10. 2 制法

将上述各成分加热煮沸溶解。分装合适试管。121 °C 高压灭菌 15 min，最终 pH 值为 7.3 ±0.1。灭菌后摆成斜面备用。

#### A. 2. 11 缓冲葡萄糖蛋白胨水 [甲基红(MR)和V-P试验用]

##### A. 2. 11. 1 成分

- a) 多胨: 7.0 g;
- b) 葡萄糖: 5.0 g;
- c) 磷酸氢二钾 ( $K_2HPO_4$ ): 5.0 g;
- d) 蒸馏水: 1 000 mL。

##### A. 2. 11. 2 制法

将上述各成分加热煮沸溶解。调节 pH 7.0，分装合适试管，每管 1 mL。121 °C 高压灭菌 15 min，备用。

#### A. 2. 12 甲基红试剂

##### A. 2. 12. 1 成分

- a) 甲基红: 10 mg;
- b) 95%乙醇: 30.0 mL;
- c) 蒸馏水: 20 mL。

##### A. 2. 12. 2 制法

将上述 10 mg 甲基红溶于 30 mL 95%乙醇中，然后加入 20 mL 蒸馏水。

#### A. 2. 13 6% α-萘酚-乙醇溶液 (V-P试验用)

##### A. 2. 13. 1 成分

- α-萘酚: 6.0 g。

##### A. 2. 13. 2 制法

将无水乙醇溶解上述成分，然后定容至 100 mL。

#### A. 2. 14 40%氢氧化钾溶液 (V-P试验用)

A. 2. 14. 1 成分

氢氧化钾：40 g。

A. 2. 14. 2 制法

将蒸馏水溶解上述成分，然后定容至 100 mL。