

# 附件 4：《出入境船舶压载水中生物指示菌检测规程》 编制说明

## 一、任务来源

本任务来源于深圳市市场和质量监督管理委员会2018年《深圳市市场和质量监督管理委员会关于下达2018年第三批深圳市地方标准计划项目任务的通知》（深市质〔2018〕721号）下达给深圳海关深圳市检验检疫科学研究院、深圳市罗湖区疾病预防控制中心的地方标准制订任务。项目名称为《出入境船舶压载水中生物指示菌检测规程》，计划编号为2019-44。我院接受编制任务后，在调研、收集、试验及参考有关标准的基础上，结合可行性和应用实际，约束限制了项目范围，编制了本文件。

## 二、立项背景和意义

一是生物入侵风险越来越严重。随着全球经济贸易的快速发展和“一带一路”战略的深入推进，远洋船舶已经成为最主要的货物运输工具。深圳港的海运航线遍布世界，出入境集装箱吞吐量位居世界第三。随之，船舶压载水的排放量和船舶压载水携带致病菌的风险也增加。全球环保基金组织已将压载水传播有害物种列为海洋四大危害之一。近年来由于部分船舶违规排放，使深圳海域面临严重的生物多样性威胁和卫生检疫风险，给深圳地区的生态环境日益造成威胁。

二是《国际船舶压载水和沉积物管理与控制公约》的要求。基于该公约第D-2条的有关规定，压载水执行标准对有毒霍乱弧菌（01和0139）、大肠杆菌及肠球菌等进行了规定，且压载水中指示微生物的排放不应超过下述的规定浓度：产毒霍乱弧菌（01和0139）少于1CFU/100mL；肠球菌少于250CFU/100mL；大肠杆菌少于100CFU/100mL。该规定将于2009年1月正式生效。

三是未明确相应的检验方法标准。目前，压载水多数为海水，压载水中大肠杆菌、肠球菌及有毒霍乱弧菌（01和0139）等微生物学项目的检测方法多数引用食品、生活饮用水的检测方法标准，所引用的检测方法标准较少应用于以海水为基质的检测样品，而且有些与《国际船舶压载水和沉积物管理与控制公约》第D-2条执行标准中要求的结果报告格式不一致，有些检测方法过于陈旧，有必要通过

比对试验或确证实验，改进现有检测方法标准。

四是对外设置技术性贸易壁垒、维护国家经济安全的需要。当今，国际贸易中以技术性贸易措施为主的贸易战愈演愈烈，检验检疫标准化在保国安民，对外设置技术性贸易壁垒，维护国家经济安全方面承担着重要角色。以保护环境、保护人类健康为由，利用卫生检疫、动植物检疫等技术标准、卫生安全法规等，譬如规定入境船舶压载水生物指示菌标准及规范高灵敏度检测方法，并采取控制措施，可以间接地限制商品及其运载工具进境，维护国家经济安全。

在此背景下，本项目通过建立深圳市“入出境船舶压载水生物指示菌检测规程”的技术性指导文件，明确船舶压载水生物指示菌检测的项目、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，适用于对入出境船舶压载水实施生物指示菌卫生监测。以符合《国际船舶压载水和沉积物管理与控制公约》的有关要求，有利于依法加强对船舶压载水的监管，防止生物入侵及减低卫生检疫风险，保护海洋生态安全，为深圳市打造生态文明的城市名片，提升中国深圳的城市竞争力，服务“一带一路”贸易便利化，具有重要意义。

### 三、与国内外相关标准、文献的关系

#### 1、国际标准

与本标准相关的国际标准主要有：

（1）《国际船舶压载水和沉积物管理与控制公约》，其中第D-2条，压载水执行标准对有毒霍乱菌（01和0139）、大肠杆菌和肠球菌等生物指示菌进行了要求，但未有对压载水的生物指示菌检测的样品采集、预处理、保存运送及检测方法进行具体规定。此项标准作为本标准结果判定方面的引用文件。

（2）《ASTM D 5392: Standard Test Method for Isolation and Enumeration of Escherichia Coli in Water by the Two-Step Membrane Filter Procedure 1》，即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）》，建立检测大肠杆菌的方法，作为本标准大肠杆菌检测方法的参照标准。

#### 2、国内标准

与本标准相关的国内标准主要有：

（1）《入出境船舶卫生监督规程》SN/T 1244-2016、《入出境船舶卫生监

督评定标准》SN/T 1258-2003等标准，未对压载水中生物指示菌的限量标准和检测方法要求进行规定；

（2）《入出境船舶压舱水卫生监测规程》SN/T 1757-2006：未对压载水中生物指示菌的大肠杆菌限量标准和检测方法要求进行规定，也未对霍乱弧菌的检测方法要求进行规定；

（3）《入出境船舶压舱水微生物学检测规程》SN/T 1875-2007：缺少肠球菌和大肠杆菌等重要指标的检测项目及方法内容；

（4）《生活饮用水检测方法标准 滤膜法》GB/T 5750.12-2006：该标准适用于生活饮用水及其水源的大肠杆菌的检测，但是，该标准没有明确适用于以海水为基质的船舶压载水中大肠杆菌的检测，有待进一步比对或改进；

（5）其他国内现有针对大肠杆菌的检测方法标准多数引用食品、饮料等检测方法标准，缺乏针对以海水为基质的压载水中大肠杆菌相应适合的检测标准方法；有些结果报告格式为：CFU/mL（g），而《国际船舶压载水和沉积物管理与控制公约》第D-2条，执行标准中大肠杆菌的限量单位结果报告格式为：CFU/100mL，两者的结果报告格式不同，不利于执行标准的判断。

（6）以下标准作为本标准的引用标准：

GB 17378.4-2007《海洋监测规范 第4部分：海水分析》

SN/T 1933.2-2007《食品和水中肠球菌检验方法 第2部分：滤膜法》作为本标准肠球菌检测方法的参照标准；

SN/T 1239-2015《国境口岸霍乱检验规程》作为本标准霍乱弧菌检测方法的参照标准；

SN/T 3564-2013《国际航行船舶压舱水样本采集规程》作为本标准样本采集的参照标准；

SN/T 1343-2003《入出境船舶压舱水消毒规程》作为本标准对压载水进行卫生处理的参照标准。

#### **四、主要编制过程**

本文件具体编制过程如下：

1、2017年07月12日，成立了标准编制小组，并召开了第一次标准制定讨论会，研究深圳口岸入出境船舶压载水中生物指示菌检测规程。

2、2017年07月—2017年12月，标准编制小组召开了3次标准制定讨论会，就标准的技术路线、设计原则进行了反复研讨和开展现场实验，讨论确立标准的技术要点、标准框架，草拟标准草案，并进行了任务分工。

调查了船舶压载水的水质基质情况。通过现场采样检测、船舶登轮检疫、查阅科技文献资料等，确认船舶压载水的水质基质包括海水、淡水、半海水，绝大多数为海水，且压载水海水的盐度都是33‰左右。

3、2018年01月—2018年12月，标准编制小组针对不同船舶压载水水质基质，进行检测方法确证实验，再次召开标准制定讨论会，针对编制过程中遇到的问题进行讨论和处理，形成标准草案（初稿一）。

4、2019年01月—2019年08月，查阅科技文献资料，对标准草案（初稿一）进行修改和完善，形成标准征求意见稿（初稿二）。

5、2019年09月—2019年12月，标准编制小组征求原深圳检验检疫系统专家意见，召开第5次标准制定讨论会，对相关意见进行讨论和修改，形成标准草案（征求意见稿）；

6、2020年01月—2020年05月，征求专家意见，并进行修改和完善，形成标准送审稿。

7、2020年05月—2020年06月，编撰送审资料并送审。

## **五、主要技术指标的依据**

本标准按照GB/T 1.1-2009给出的规则起草，

(1)依据国际海事组织《国际船舶压载水和沉积物管理与控制公约》，规定了大肠杆菌、肠球菌和有毒霍乱菌（01和0139）等指示生物的标准限量。

(2)引用标准《入出境船舶压载水消毒规程》SN/T 1343，作为本标准对压载水进行处置的卫生处理要求方面的依据。

(3)引用标准《实验室 生物安全通用要求》GB 19489，对生物安全进行规定，确保操作安全。

(4)引用标准《国际航行船舶压舱水样本采集规程》SN/T 3564对采样进行规定；

(5)根据标准《食品微生物学检验 大肠埃希氏菌计数》GB 4789.38-2012，完善大肠杆菌的定义和结果确认的判定标准，定义大肠杆菌是一类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,在引用标准中增加了甲基红实验、VP实验以及大肠杆菌的吲哚实验可以为阴性的判定标准。

(6)依据标准《食品微生物学检验 大肠埃希氏菌计数》GB 4789.38-2012,在附录A中,增加在大肠杆菌检测确认实验中使用了的培养基如:营养琼脂、甲基红、胰蛋白酶大豆肉汤、西蒙氏柠檬酸盐琼脂、胰蛋白胍肉汤和EC肉汤等相关配方。

本文件主要特点如下:

1、本文件的文字表述做到简要和细致相结合,力求达到直观明了、易于操作、方便使用的目的。

2、首次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,适用于对入出境船舶压载水实施生物指示菌卫生监测。

3、本文件的创新点在于:

**一是**明确规定了船舶压载水生物指示菌的检验规程,针对性强;

**二是**完善操作步骤,使之兼具科学性和可操作性;

(1)依据国际海事组织《国际船舶压载水和沉积物管理与控制公约》及相关标准,规定了压载水生物指示菌的标准限量、检验操作过程生物安全要求及处置的卫生处理要求,确保生态安全。

(2)对压载水样品的采集、保存、制备及处理注意事项进行规定:

调查了船舶压载水的水质基质情况,确认船舶压载水的水质基质包括海水、淡水、半海水,多数为海水,且压载水海水的盐度多是33‰左右。在霍乱弧菌检测中,在引用标准基础上,增加在水样采集中对水样检测盐度以及对盐度高于20‰水样进行稀释处理,水样检验量450 mL调整为100 mL,并调整了检验结果报告格式与压载水生物指示菌的标准限量一致。

(3)完善大肠杆菌的定义和结果确认的判定标准。在附录A中,增加在大肠杆菌检测确认实验中培养基的相关配方。

**三是**通过确证实验,证实检测方法符合压载水检测使用要求。

3、本文件的文字表述做到简要和细致相结合，力求达到直观明了、易于操作、方便使用的目的。

## 五、 征求意见处理情况

本文件发出《征求意见表》18份，反馈《征求意见表》16份，其中有建议或意见的《征求意见表》15份。

共汇总和处理意见 36条，其中采纳18条，部分采纳2条，不采纳 16条。

主要分歧条款的处理：

### （一）不采纳意见

1、厦门国际旅行卫生保健中心提出：建议标准的英文标题中的“ship”更改为“vessel”。

不采纳理由：国际船舶压载水和沉积物控制和管理公约常见习惯翻译为“ship”。

2、深圳市疾病预防控制中心提出：“1、范围”要求改为检验范围。

不采纳理由：符合管理类标准格式。

3、江阴海关提出：规范性引用文件中，本标准不涉及压载水消毒处理，因此不需要引用SN/T1343出入境船舶压载水消毒规程。

不采纳理由：结果判定和处置中涉及卫生处理。

4、广州仲恺农业工程学院提出：GB 4789.38应写明发布时间。

不采纳理由：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。

5、蒙自海关综合技术中心提出：在3术语和定义中3.7的“霍乱肠毒素”是否调整为“霍乱弧菌肠毒素基因”更适合，请斟酌。理由是根据9.3.2结果报告中内容为霍乱弧菌肠毒素基因检验。

不采纳理由：“霍乱肠毒素”包含了“霍乱弧菌肠毒素基因”。

6、厦门国际旅行卫生保健中心提出：标准已有霍乱弧菌等相关定义，此处没必要引用，建议删除3术语和定义中的“SN/T 1239界定的术语和定义适用于本文件”。

不采纳理由：本文件的定义更为详细。

7、江阴海关提出：第4条检测项目中，因前文参考资料有《国际航行压载水和沉积物控制与管理公约》，因此是否考虑检测项目中参考加入公约中要求的D-2检测标准中指标微生物的相关要求。

不采纳理由：本文件已经规定了公约中要求的D-2检测标准中指标微生物的检验方法、结果判定和处置。

8、舟山国际旅行卫生保健中心提出：因为压载水中可能有大量的其他弧菌干扰检测，与单纯的水质和食品中霍乱弧菌的预处理不同。本标准的特殊性主要体现在预处理。而如何通过预处理减少其他竞争性弧菌的增值，需要细化。

不采纳理由：所引用的规范性引用文件检测方法SN/T 1239 国境口岸霍乱检验规程 适用于压载水中霍乱弧菌的检测。

9、中国检验检疫科学研究院综合检测中心提出：6.4条款样品保存、运送，建议放在6.3条款前，逻辑上会更通顺。如果样品预处理步骤是需要在采样后再现场完成的，建议放入6.4条款中，算是样品保存的要求。

不采纳理由：大肠杆菌的检测不需要在采样后在现场完成，为保持格式的一致，故不宜修改。

10、江阴海关提出：样品预处理中，污染程度低的可以直接进行检验，污染严重的水，如何区分污染程度，建议给出响应的指标或者不要提及。

不采纳理由：压载水污染程度的判定可以通过外观、来源、储存条件等资料综合判断。

11、舟山国际旅行卫生保健中心提出：6.3.2是否参考了《霍乱防治手册》（第五版）的内容，建议参考《霍乱防治手册》（第六版）的相关内容。6.3.2.2中仅进行第一次增菌，建议应增加第二次增菌内容。

不采纳理由：8.3 霍乱弧菌的检测按SN/T 1239的有关规定执行。已经包含第二次增菌。

12、江阴海关提出：海水中检测微生物有专用培养基，采用的淡水稀释，对检测的效果可能影响很大，方法最好进一步确认。

不采纳理由：淡水稀释的目的是减低盐度，提高检出率，曾经验证过。

13、中国检验检疫科学研究院综合检测中心提出：8.1条款大肠杆菌的检测方法参照ASTM国际方法进行，是该方法对此类样品检测有更大的优势吗？如果没有的话，建议参照相关国家标准检测，更容易操作。

不采纳理由：相关国标检测多数适应于食品和生活饮用水检测，且报告格式不符合限量标准格式要求。

14、江阴海关提出：检验方法 大肠杆菌的检测ASTM检测方法和GB4789.38的标准方法不同，需要进一步确定。

不采纳理由：在大肠杆菌纯菌株的鉴定中，GB4789.38的鉴定项目内容已经涵盖了ASTM检测方法的鉴定项目内容。

15、深圳市计量质量检测研究院提出：压载水国际管理公约中有毒霍乱弧菌 $<1$  CFU/100mL是定量指标。建议对有毒霍乱弧菌判定结果描述进行修改或采用定量检测方法。

不采纳理由：标准限量对方法的检出限要求较高，即为100mL水样中产肠毒素霍乱弧菌不得检出，本程序检测样品量为100mL，可以视为定量方法。

16、深圳市大鹏新区公共卫管理服务中心提出：附录A.1中“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，”建议细化为“随后将滤膜帖于选择性培养基mTEC上，滤膜与琼脂应完全贴紧，两者间不得留有气泡。于36℃的温度中培养4h~5h，使受伤或应激的细菌复苏，然后置于44.5℃的温度中培养 $24 \pm 2$ h。”。

不采纳理由：原有标准的描述已经清晰明确，使受伤或应激的细菌复苏的培养温度为2h。

## （二）部分采纳意见

1、深圳市大鹏新区公共卫管理服务中心提出：条款3.3中“44.5℃生长”建议修改为“能够在44.5℃生长，且发酵乳糖产酸产气”。

部分采纳理由：采纳“能够在44.5℃生长”。不采纳“且发酵乳糖产酸产气”，因为原有标准方法的鉴定实验不需要此步骤。

2、深圳市计量质量检测研究院提出：建议增加“有毒霍乱弧菌”的术语与定义，界定本规程中提到的01和0139霍乱弧菌。



部分采纳理由：只将文中“有毒霍乱弧菌”更改为“产肠毒素霍乱弧菌”；而本文已经定义了01和0139霍乱弧菌。