

团体标准

T/CI XXX—2024

船舶压载水管理系统生物灭活有效性检测规程

Code for testing the effectiveness of biological inactivation in ship
ballast water management systems

(征求意见稿)

2024-X-X 发布

2024-X-X 实施

中国国际科技促进会 发布

中国国际科技促进会(CIAPST)是1988年经中华人民共和国国务院科技领导小组批准而成立的全国性社会团体。制定团体标准、开展标准国际化和推动团体标准实施,是中国国际科技促进会的工作内容之一。任何团体和个人,均可提出制、修订中国国际科技促进会团体标准的建议并参与有关工作。

中国国际科技促进会标准按《中国国际科技促进会标准化管理办法》进行制定和管理。

中国国际科技促进会征求意见稿经向社会公开征求意见,并得到参加审定会议的80%以上的专家、成员的投票赞同,方可作为中国国际科技促进会标准予以发布。

在本标准实施过程中,如发现需要修改或补充之处,请将意见和有关资料寄给中国国际科技促进会标准化工作委员会,以便修订时参考。

任何团体和个人,均可对本标准征求意见稿提出意见和建议,牵头起草单位联系方式:
ecsi_chen@163.com

中国国际科技促进会

地址:北京市海淀区中关村东路89号恒兴大厦13F

邮政编码:100190

电话:010-62652520 传真:010-62652520

网址: <http://www.ciapst.org>

目 次

前 言 III

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 2

4 船舶压载水管理系统生物灭活性能检测采样规程 6

5 L 型和 S 型存活生物指示性检测规程 10

6 L 型存活生物详细检测规程 12

7 菌落总数检测规程 19

8 耐热大肠杆菌检测规程 22

9 大肠埃希氏菌检测规程 25

10 肠球菌检测规程 27

11 有毒霍乱弧菌检测规程 30

附录 A 34

附录 B 42

附录 C 44

附录 D 47

附录 E 53

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。

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专利的责任。

本文件由江苏科技大学提出。

本文件由中国国际科技促进会归口。

本文件起草单位：江苏科技大学、南京海关动植物与食品检测中心、交通运输部水运科学研究院、江苏现代造船技术有限公司、无锡蓝天电子股份有限公司、汉盛（上海）海洋装备技术股份有限公司、CCS 青岛中心、国科联盟（北京）国际信息科学研究院。

本文件主要起草人：邓祥元、田雯、封振、李涛、王宇、文嘉鹏、陈宁、田玉军、高霆、陈冠宇、王卓远、杨鹏、陈代芬、田立群、王林兴、顾国彪、曹晓琨、赵芳萱。

本文件为首次发布。

船舶压载水管理系统生物灭活有效性检测规程

1 范围

本文件规定了船舶压载水管理系统生物灭活性能的采样规程、L型和S型存活生物指示性检测规程和详细检测方法、菌落总数检测规程、耐热大肠杆菌检测规程、大肠埃希氏菌检测规程、肠球菌检测规程和有毒霍乱弧菌检测规程。本文件适用于船舶压载水管理系统生物灭活性能的检测与评估。

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 5750.12-2023 生活饮用水标准检验方法微生物指标

GB 19489-2008 实验室 生物安全通用要求

GB 4789.38-2012 食品微生物学检验 大肠埃希氏菌计数

GB 17378.7 海洋监测规范第7部分：近海污染生态调查和生物监测检测方法

GB/T 12763 海洋调查规范第6部分：海洋生物调查

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

JT/T 1393-2021 船舶压载水指示性分析取样与检测要求

SN/T 1239-2015 国境口岸霍乱检验规程

HJ 1215-2021 水质浮游植物的测定 滤膜显微镜计数法

国际海事组织 2004《国际船舶压载水和沉积物管理与控制公约》（以下简称压载水公约）

国际海事组织 BWM.2/Circ.70《船舶压载水管理系统调试测试指南》

国际海事组织 MEPC.173(58)《G2导则船舶压载水取样导则》

国际海事组织 MEPC74/INF.18《在船舶压载水中指示性检测有毒有害海洋生物可用设备总结》

美国国家卫生基金会认证 EPA/600/R-10/146《压载水处理技术验证通用协议》

ISO 6222-1999 水质 可培养微生物的计数方法 营养琼脂介质中接种法进行群落计数法

ISO 9308-1-2014 水质—大肠埃希氏菌和大肠菌群计数——第一部分 低细菌背景区系水的膜过滤法

ISO 7899-2-2000 水质—肠球菌的检测和计数 第2部分：膜过滤法

ISO 8199-1988 水质—微生物培养计数通用指南

ISO 5667-3-2012 水质—取样—第三部分：水样的处理与保存

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

压载水管理系统 Ballast water management system

用于清除、杀死压载水中的生物或(在排放前)使其失去活性的预制、商用处理系统。供应商压载水处理产品的整体将用于实现供应商对处理效果或运行性能的主张，并以集成的方式包括所有组件。

3.3

处理水 Treated ballast water

压载水管理系统处理后排出的水。

3.4

环境水 Ambient water

在测试时提供给处理系统的水。环境水须在特定的生物密度范围和水质参数内，用于评定处理设备全面运行条件下的效能。

3.5

等动力取样 Isokinetic sample collection

从取样口收集样品的水流速度与主压载管中的速度相对等的取样方式。

3.6

存活生物 Viable organisms

存活生物为有机体和活着的所有生命阶段，本标准中仅指浮游生物。

3.6.1 L型存活生物

是指最小尺寸 $\geq 50\ \mu\text{m}$ 的浮游动物。

3.6.2 S型存活生物

是指最小尺寸 $< 50\ \mu\text{m}$ 且 $\geq 10\ \mu\text{m}$ 的浮游生物。

3.7

浮游生物 Plankton

悬浮于水中，体型微小，无运动能力或游动能力很弱，不能主动做长距离运动，只能被动地“随波逐流”，主要包括浮游植物与浮游动物。

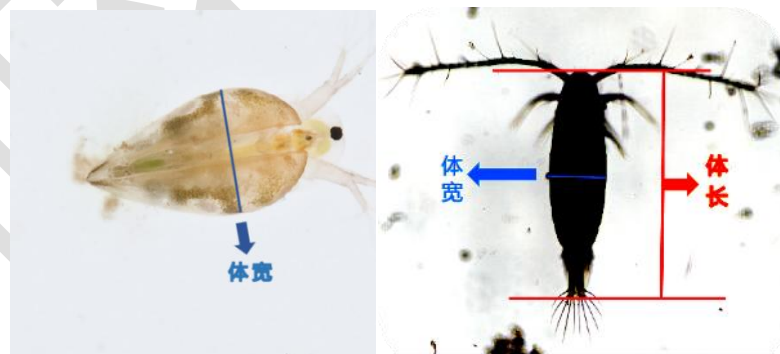
3.8

最小尺寸 Minimum size

基于《压载水公约》的描述，特指浮游生物的体长、体宽和体高中最小的尺寸，浮游生物的身体长度、宽度和高度则是通过测量最大的部分来确定的。

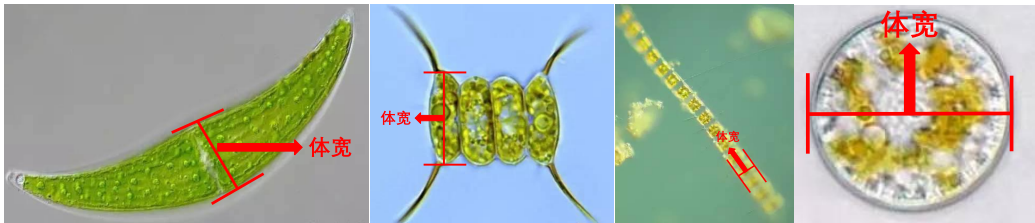
L型存活生物的最小尺寸：浮游动物的刚毛、刺、触须等不包括在内，L型存活生物的最小尺寸为生物的体宽部分如下图所示。

图1 L型浮游生物最小尺寸的测定（需画平行线显示体长）



S型存活生物的最小尺寸：以单个细胞或单个体的体宽为最小尺寸，如下图所示。

图 2 S 型浮游生物的最小尺寸示意图



3.9

脉冲-振幅-调制Pulse-Amplitude-Modulation (PAM) 叶绿素荧光检测法

通过发射一系列微弱的光，脉冲诱导藻类细胞内叶绿素发出荧光 (F_0) 而不进行光合作用，之后以快速强光脉冲关闭所有光合细胞的电子门暂时抑制光合作用，从而使叶绿素荧光达到最大 (F_m)，可变荧光 $F_v = F_m - F_0$ ，根据 F_m 和 F_0 可以计算出光合系统 PSII 的最大量子产量 $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$ ，它反映了浮游植物的潜在最大光合能力，即藻类的生理状态。基于这种方法可用来指示性检测最小尺寸 $\geq 10\ \mu\text{m}$ 且 $< 50\ \mu\text{m}$ (S 型) 浮游植物的活体数量。

3.10

活性荧光检测法 Active fluorescence

是将一定波长的光照射到活的藻类细胞上后得到的活细胞中的叶绿素荧光信号，基于这种方法可用来指示性检测最小尺寸 $\geq 10\ \mu\text{m}$ 且 $< 50\ \mu\text{m}$ (S 型) 浮游植物的数量。

3.11

三磷酸腺苷Adenosine triphosphate (ATP) 荧光检测法

在荧光素酶 E (luciferase) 和 Mg^{2+} 的作用下，荧光素 LH2 (luciferin) 与 ATP 发生腺苷酰化被活化，活化后的荧光素 LH2 与荧光素酶 E 相结合，形成了荧光素—AMP 复合体，并放出焦磷酸 (PPi)。该复合体被分子氧氧化，形成激发态复合物 $\text{P}^*-\text{E} \cdot \text{AMP}$ ，放出 CO_2 ，当该复合物从激发态回到基态时发射光，并最终形成氧化虫荧光素 P 和 AMP，其强度与生物密度正相关，基于这种方法可用来指示性检测最小尺寸 $\geq 50\ \mu\text{m}$ (L 型) 浮游生物，最小尺寸 $\geq 10\ \mu\text{m}$ 且 $< 50\ \mu\text{m}$ (S 型) 浮游生物的数量。

3.12

运动和荧光轨迹Motility and fluorescence assay (MFA) 检测法

根据浮游动物运动轨迹成像后进行智能计数，结合浮游植物自发荧光进行检测，基于这种方法来示性检测最小尺寸 $\geq 50\text{ }\mu\text{m}$ （L型）存活生物，最小尺寸 $\geq 10\text{ }\mu\text{m}$ 且 $< 50\text{ }\mu\text{m}$ （S型）存活生物的数量。

3.13

指示性微生物 Indicator bacteria

用以指示船舶压载水卫生状况及安全性的指示性微生物，主要包括菌落总数、耐热大肠菌群、大肠埃希氏菌、肠球菌和有毒霍乱弧菌（01 和 0139）。

3.14

菌落总数 Aerobic plate count

压载水样品经过处理，在一定条件下（如培养基、培养温度和培养时间等）培养后，所得每 mL 检样中形成的菌落总数。

3.15

耐热大肠菌群 Fecal coliforms

是指在 44.5°C 下培养 24~48 h 能发酵乳糖、产酸产气的需氧和兼性厌氧革兰氏阴性无芽胞杆菌。

3.16

大肠埃希氏菌 Escherichia coli

又称大肠杆菌，是广泛存在于人和温血动物的肠道中，需氧及兼性厌氧， 44.5°C 生长，IMViC（靛基质、甲基红、VP 实验、柠檬酸盐）生化试验+++或++-的革兰氏阴性杆菌。

3.17

肠球菌 Intestinal 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。

3.18

有毒霍乱弧菌 Toxicogenic Vibrio cholerae

革兰氏阴性菌，菌体短小呈逗点状，有单鞭毛、菌毛，部分有荚膜，共分为 139 个血清群，其中 01 群和 0139 群可引起霍乱。

4 船舶压载水管理系统生物灭活性能检测采样规程

4.1 取样信息收集

样品采集前应与船方或压载水设备生产商充分了解压载水管理系统型号与安装信息,如设备主管道是否有专用取样口,取样口的位置、直径大小及类型,设备操作限制参数等,相关信息见附录 A-1/A-2/A-3。

4.2 取样方案制定

根据船舶和设备基本信息,制定测试方案,其内容至少包括:检测时间、登轮地点、试航线路、试航时间、返回停靠的港口、测试舱位(标明处理舱及对照舱)、压载水处理设备类型及安装位置、检测项目、取样方式、检测方法、计划参与取样和检测的人员等,并填写附录 A-1/A-2/A-3/A-4 相关信息。

4.3 取样设备性能要求

4.3.1 主要取样器具组成

压载水取样设备应包括管路连接单元、过滤与计量单元、样品收集单元。

4.3.2 主要取样器具要求

取样管路阀门建议使用隔膜阀,避免因调节流速而造成生物死亡,管路连接单元包含取样探头与连接软管;过滤与计量单元包含过滤装置与流速流量监控装置,流量计需定期计量和期间核查。

4.3.3 滤网要求

取样设备应根据需要能对最小尺寸 $\geq 50\ \mu\text{m}$ 存活生物(L型)样品进行收集,取样设备中所有接触或接近压载管路的部件应具备防腐蚀性,过滤装置滤网或滤膜孔径对角线直径应达到 $50\ \mu\text{m}$,网孔孔径需定期进行计量和期间核查,每次取样后滤网和管路需清洗干净,并进行紫外灭菌 $20\ \text{min}$ 。

4.4 主要取样耗材

4.4.1 样品袋: 5 L

4.4.2 水样瓶: 1000 mL

4.4.3 无菌取水袋: 500 mL

4.4.4 棕色玻璃瓶: 250 mL

4.4.5 盐度计 精度 1‰

4.4.6 温度计 精度 0.1℃

4.4.7 潜水泵

4.5 登轮取样前准备工作

4.5.1 应与代理人员或船方人员或设备商调试工程师沟通，了解船舶运行情况，压载水压载与卸载情况，压载水处理系统运行情况，确保船上设备及安全防护措施运作正常，按照要求填写附录 A-1/A-2/A-3 船舶信息，压载水信息，压载水设备信息。

4.5.2 加强与码头经营部门的联系，在作业现场发出安全指令后方可登轮进入作业现场。

4.5.3 取样作业人数至少 2 人，取样人员应按要求穿戴好防护装备，穿戴整齐后方可进入作业现场，如：安全绳、救生圈、防坠器、安全帽、护目镜、劳保手套、听力护具、防护鞋、登轮服。

4.5.4 进入特殊区域取样时，宜参考相关国际公约的要求。

4.6 样品采集

取样人员在排放点附近的排放管上进行压载水取样。遇不能从排放管取样的情况下，可采用通过测深管、人孔和排水口等方式进行取样。

4.6.1 压载水管理系统主管路取样

4.6.1.1 处理水取样时需与船方或设备调试工程师确认处理水舱位以及处理时间是否已经达到设备技术指标要求，检查设备处理日志，如压载水管理系统出现常见错误类别需进行现场应急处理，类别及处理方式详见附录 B；

4.6.1.2 取样人员需拍摄设备铭牌、流量计初始数值，阶段性取样体积以及取样后总体积数值以备电子存档，或使用执法记录仪开展取样监督工作；

4.6.1.3 压载水主管路取样等动力取样要求

在压载水完全发展成湍流的状态下，在排放管内取样，压载水管理系统主管路取样示意图如图 3 所示。

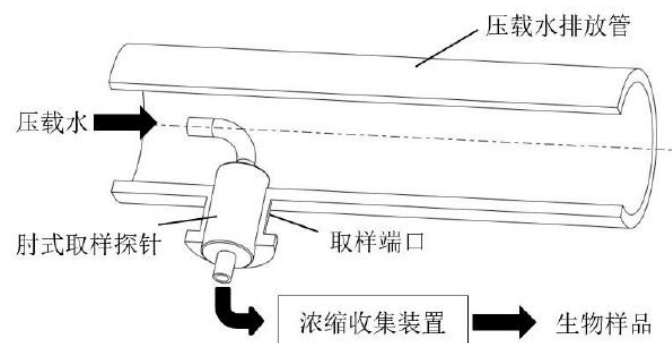


图 3 压载水管理系统主管路取样示意图

取样流速应满足国际海事组织 MEPC, 173 (58) G2 导则船舶压载水取样导则要求的等动力取样, 计算公式如下式所示, 取样平均流速不应超过 50 L/min。

$$Q_{iso} = Q_m \times \left(\frac{D_{iso}}{D_m} \right)^2$$

Q_{iso} 为取样流量, Q_m 为压载水主管路排放流量, D_{iso} 为取样管直径, D_m 为压载水主管道排放管直径。因此, 每次取样时, 取样工程师应提前获悉压载水设备主管道直径, 经过现场换算, 携带合适尺寸的取样设备管路, 并通过隔膜阀调整合适的取样流速, 以达到等动力取样要求。

4.6.1.4 压载水处理系统主管道出水口附近搭建取样设备, 可根据不同尺寸压载水处理系统取样口, 采用不同规格垫片与法兰连接排水口与取样设备通水管路或采用同等方式连接设备通水管路。

4.6.1.5 启动船舶压载水处理设备, 检查其运行情况, 通过取样管路上隔膜阀将流量调节至合适流速运行 3-5 min, 清洗排放管路。

4.6.1.6 待流量计归零后, 拍照取证, 打开压载水处理系统采样口阀门, 正式取样, 在取样过程中, 阶段性从取样管路中取具有代表性的 $\geq 10 \mu\text{m}$ 和 $< 50 \mu\text{m}$ (S 型) 生物样品 5-10 L, 微生物样品 500 mL, 理化指标样品 250 mL, 至少分 3 次取完 S 型生物样品及微生物样品。

4.6.1.7 当处理水取样达到 1000 L 后, 关闭设备等动力采样口阀门, 并拍照流量计取证; 如处理水取不到 1000 L, 则需在附录 A 取样表格中进行情况说明。

4.6.1.8 环境水取样可通过调换舱室在对照舱通过设备主管路排放口进行取样, 需更换取样滤网, 如随航取样, 则可通过舷边使用隔膜泵进行富集取样。

4.6.1.9 环境水取样过程参考处理水, 需更换滤网, 取样体积达到 100 L 后, 关闭设备等动力采样口阀门, 并拍照流量计取证。

4.6.2 人孔取样

4.6.2.1 适用对象

(1) 此方法适用于未安装压载水管理系统或系统出现故障, 在压载水顶边舱和边舱满载或较高水位时的样品采集;

(2) 压载水舱人孔中取样仅用于压载水在舱内或之前进行了压载水处理的情况;

(3) 若压载水处理中的任何过程是在压载水排放期间进行的, 不应在压载水舱人孔中取样;

(4) 尽可能靠近排放管路的排放点进行取样。

4.6.2.2 采集程序

(1) 由船方人员负责确认并打开位于甲板上的人孔盖；

(2) 人孔附近搭建取样装备，使用潜水泵连接取样装备，潜水泵放入人孔后，泵的吸入管应降低到不同深度采集不同水深样品，取样流程参考 4.6.1。

4.6.3 测深孔/空气管中取样

4.6.3.1 适用对象

(1) 此方法适用于未安装压载水管理系统或系统出现故障，压载水顶边舱和边舱样品采集，自测量管处采集方法也适用于压载水底边舱和底舱的样品采集；

(2) 确保压载水在测深管/空气管内外充分混合；

(3) 船舶记录簿记录置换了压载水时，应谨慎使用测深管/空气管取样；

(4) 非多孔测深管在置换过压载水的情况下，管中的压载水可能会没有受到置换的影响，导致无法满足代表性取样的要求。

4.6.3.2 采集程序

(1) 由船方人员打开测量管/空气管上盖，用测量尺测定水深和水面高度；

(2) 使用合适的潜水泵从测深空/空气管中抽取压载水样品；如液面在操作部位以下 10 m 深及以下，不适合用负压泵；

(3) 测深孔/空气管附近搭建取样装备，使用潜水泵连接取样装备，潜水泵放入人孔后，泵的吸入管应降低到不同深度采集不同水深样品，取样流程参考 4.6.1。

4.6.4 排水口取样

4.6.4.1 适用对象

此方法适用于压载水顶边舱有手动排水口且便于采样时的样品采集，自测量管处采集方法也适用于压载水底边舱和底舱的样品采集。

4.6.4.2 采集程序

(1) 由船方人员打开压载水舱顶边舱手动排水阀门，排水 3-5 min。

(2) 用采样桶自甲板上坠下或自岸上送至排水口处下方接水。

4.7 样品保存、运送

4.7.1 样品封存

采集样品直接注入样品瓶，根据检测项目需求进行必要现场预处理，贴标签，封口，样品标签需包括：船舶名称、IMO 号、样品类别、取样方式、取样日期、取样体积、检测项目等要素。

4.7.2 样品现场检测

现场可利用盐度计、温度计等指示性检测设备对样品的温度、盐度进行检测，相关结果填入附录 A-5。

4.7.3 样品运输

将样品封放入取样包中，并由取样人员快递或专车于 24 h 内低温（ $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ）送达实验室开展检测，除有毒霍乱弧菌与理化样品以外，其他样品需存放在保温箱或车载冰箱中。

5 L 型和 S 型存活生物指示性检测规程

5.1 检测方法

指示性方法可选择附录 C 中的方法或根据实际的需要选择其他合适的方法。

5.2 指示性检测设备要求

指示性检测设备宜具备出厂检测报告，设备使用说明书，设备精度与误差分析报告，历史检测数据报告，详细检测数据偏离分析报告，第三方产品检测报告。

5.3 S 型存活生物指示性检测

5.3.1 PAM 分析法

基于 PAM 分析方法，对压载水中 $\geq 10\ \mu\text{m}$ 且 $< 50\ \mu\text{m}$ (S 型) 浮游植物进行指示性检测分析，至少检测 3 次及以上，检测设备或推荐方法参见附录 C。

5.3.2 活性荧光检测法

基于活性荧光检测法，对压载水中 $\geq 10\ \mu\text{m}$ 且 $< 50\ \mu\text{m}$ (S 型) 浮游植物进行指示性检测分析，至少检测 3 次及以上，检测设备或推荐方法参见附录 C。

5.4 L 型和 S 型存活生物指示性检测

5.4.1 ATP 分析法

基于 ATP 分析方法，对压载水中 L 型和 S 型存活生物进行指示性检测分析，L 型生物检测量不少于 500 mL，S 型生物检测量不少于 200 mL，至少检测 3 次及以上，方法标准参见附录 C。

5.4.2 MFA 分析法

基于 MFA 分析方法，对压载水中 L 型和 S 型存活生物进行指示性检测分析，L 型生物检测量不少于 600 mL，S 型生物检测量不少于 200 mL，检测 1 次，方法标准参见附录 C。

5.5 指示性检测结果判定

《国际船舶压载水与沉积物控制与管理公约》D-2 标准参见附录 E。

5.5.1 PAM 分析法

基于 PAM 分析法对 S 型生物的检测，结果为 PASS 或者 FAIL，检测 3 次，以 2 次同样结果为最终记录，如 2 次及以上为 PASS，则判定 S 型生物符合《国际船舶压载水与沉积物控制与管理公约》D-2 标准，如 2 次及以上为 FAIL，需开展显微镜详细检测，如果详细检测依然超标，则判定 S 型生物不符合《国际船舶压载水与沉积物控制与管理公约》D-2 标准，D-2 排放标准参见附录 E。

5.5.2 活性荧光检测法

基于活性荧光检测法对 S 型生物的检测，检测结果为 Risk Fail 或者 Risk High 或者 Risk Low，检测 3 次，以 2 次同样结果为最终记录，如 2 次及以上为 Risk Fail 或者 Risk High，需开展显微镜详细检测，如果详细检测依然超标，则判定 S 型生物不符合《国际船舶压载水与沉积物控制与管理公约》D-2 标准，D-2 排放标准参见附录 E。

5.5.3 ATP 分析法

基于 ATP 分析法，对压载水中 L 型和 S 型存活生物进行指示性检测分析，检测结果为 Most Likely Compliant 或者 Signal Close to Limit 或者 Most Likely not Compliant，样品检测 3 次，以 3 次平均结果为最终记录，如结果为 Signal Close to Limit 或者 Most Likely not Compliant，则需开展显微镜详细检测，如果详细检测依然超标，则判定 L 型和 S 型存活生物不符合《国际船舶压载水与沉积物控制与管理公约》D-2 标准；如 3 次平均结果为 Most Likely Compliant，则判定 L 型和 S 型存活生物符合《国际船舶压载水与沉积物控制与管理公约》D-2 标准，排放标准参见附录 E。

5.5.4 MFA 分析法

基于 MFA 分析法对压载水中 L 型和 S 型存活生物进行指示性检测分析，检测结果为 Very Low Risk 或者 Low Risk 或者 High Risk，检测 1 次，Low Risk 或者 High Risk，则需开展显微镜详细检测，如果详细检测依然超标，则判定 L 型和 S 型存活生物不符合《国际船舶压载水与沉积物控制与管理公约》D-2 标准；如检测过 Very Low Risk，则判定 L 型和 S 型存活生物符合《压载水公约》D-2 标准，排放标准参见附录 E。

5.5.5 复验

因船舶压载水中存活生物可能随着时间的推移进行不断繁殖、再生或死亡，因此其数量一直是动态变化的，压载水样品不接受复验。

5.6 结果记录

原始检测记录应包括样品编号、样品名称、检测日期和时间、检测方法、仪器设备、检测结果、检测人、复核日期、复核人等内容，指示性检测结果均需保留电子图片存档，以备复查溯源。

5.7 质量控制

定期每季度进行阳性及阴性对照试验。将培养的浮游生物制成 100–200 cells/mL 的悬浮液，镜检后对指示性检测设备按照操作程序进行阳性试验。阴性对照则使用纯净水进行，如阴性对照或阳性对照试验结果不符合要求，则应查明原因后重新调试设备。6 L 型与 S 型存活生物显微镜详细检测规程

6 L 型存活生物详细检测规程

6.1 检测原理

直接观察法：通过显微镜观察 L 型生物，当生物体的某部分被严重破坏时，该生物体被判定为不可存活；对于形态完整但是不动的浮游动物，可以观察器官活动（如心跳）判断其存活/死亡；如不能观察器官活动，则可用解剖针轻轻戳动，看其是否有反应，如无反应则判断为死亡，记录活体数量的方法。

差减法：通过显微镜观察 L 型生物，当生物体的某部分被严重破坏时，该生物体被判定为不可存活；对于形态完整但是不动的浮游动物，可以观察器官活动（如心跳）判断其存活/死亡；如不能观察器官活动，则可用解剖针轻轻戳动，看其是否有反应，如无反应则判断为死亡。差减法为先计数死亡个体，再使用滴管加几滴鲁哥氏试剂到计数框内，将样品固定，再计数全体死亡个体数，两个计数相减的数量为活体数量的个数。

6.1.1 主要设备、器具

- (1) 倒置显微镜或体视显微镜（物镜 4×、10×、20×、40×；目镜 1×）
- (2) 浮游动物计数框 (80 mm×100 mm, 22 mL)
- (3) 计数器
- (4) 电动加样管：量程 20 mL
- (5) 烧杯

6.1.2 主要试剂及其配置

6.1.2.1 试剂

碘化钾（KI，分析纯），碘（I₂，分析纯）

6.1.2.2 配置

鲁哥氏试剂：6 g 碘化钾（KI）溶于少量水中（10 mL-20 mL），待其完全溶解后，加入 4 g 碘（I₂）充分摇动，待碘完全溶解后定容到 100 mL。

6.1.3 L 型存活生物活体计数

6.1.3.1 准备工作

L 型存活生物样品送达实验室后，用量筒计量样品瓶中压载水浓缩后的体积（V₁），每次取 20 mL 样品作为一个子样品，根据表 1 数量水平选择不同的检测方法，根据样品应在取样后 24 h 内开展检测工作。

6.1.3.2 样品初筛

可先观察一个浮游生物计数框的活体生物数量，预估 L 型活体生物的数量，如活体生物个体低于 2 个则为低数量水平，2-20 个为中数量水平，超过 20 个则为高数量水平，低数量水平推荐计数片数为 10 片，中数量水平为 5 片，高数量水平则为 3 片，如表 1 所示：

表 1 L 型存活生物推荐计数片数及方法

水平	推荐计数片数	推荐计数方法
高数量水平（>100 inds./m ³ ）	3 片	差减法/直接观察法
中数量水平（10 inds./m ³ -100inds./m ³ ）	5 片	差减法/直接观察法
低数量水平（<10 inds./m ³ ）	10 片	差减法/直接观察法

6.1.3.3 样品检测

（1）直接观察法

- A. 将瓶中样品轻轻上下颠倒若干次摇匀；
- B. 迅速用电动定量加样管取 20 mL 样品注入浮游动物计数框内，在倒置或体视显微镜下计数存活的数量（n_{LI}），检测浮游动物计数框移动方式如图 4 所示；

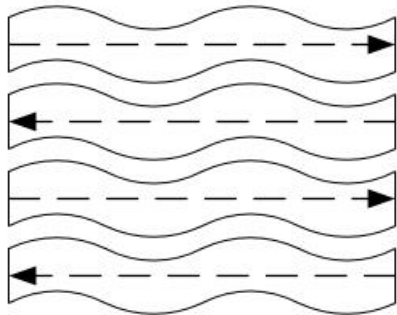


图 4 浮游动物计数框在显微镜视野下的移动方式示意图

C. 当生物体的某部分被严重破坏时，该生物体被判定为不存活；对于形态完整但是不动的浮游动物，可以观察器官活动（如心跳）判断其存活/死亡；如不能观察器官活动，则可用解剖针轻轻戳动，看其是否有反应，如无反应则判断为死亡；

D. 每个样品平均单片存活生物个体数按如下计算公式来计算。

计算公式：单片存活生物个数平均数为 $NL=(NL1+NL2+NL3+...NLm)/m$ ；

N_L 为平均单片 L 型存活生物个体数，单位为 inds./片； N_{L1} ， N_{L2} ， N_{L3} ， N_{Lm} 为第 1 片，第 2 片，第 3 片，.... 第 m 片上 L 型存活生物个体数，单位为 inds.； m 为计数片数；单片体积数为 20 mL。

(2) 差减法

A. 将瓶中样品轻轻上下颠倒若干次摇匀；

B. 用电动加样管取 20 mL 瓶中样品注入浮游动物计数框内，在倒置或体视显微镜下计数已死亡的 L 型生物 ($N_d(Dead)$)，检测存活生物框转动如图 4 所示；

C. 当生物体的某部分被严重破坏时，该生物体被判定为不存活；对于形态完整但是不动的浮游动物，可以观察器官活动（如有心跳）判断存活；如不能观察器官活动，则可用浮游动物解剖针轻轻戳动，看其是否有反应，如无反应则判断为死亡；

D. 先计数死亡个体 N_d ，再使用滴管加几滴鲁哥氏试剂到计数框内，将样品固定，再按照如下计算公式，计数全体 $N_t(Total)$ 个体数；

计算公式：单片存活生物个体数 $NL=N_t(Total)-N_d(Dead)$ ；

单片存活生物平均个数 NL ，参考计算公式 2：

单片存活生物个数平均数为 $NL=(NL1+NL2+NL3+...NLm)/m$ ；

N_L 为平均单片L型存活生物个体数，单位为 inds./片； N_{L1} ， N_{L2} ， N_{L3} ， N_{Lm} 为第1片，第2片，第3片，....第 m 片上L型存活生物个体数，单位为 inds.； m 为计数片数；单片体积数为 20 mL。

注：第三片计算结果和前两片的平均数之差如不大于其均数的 $\pm 20\%$ ，其均数视为有效结果，否则必须再测一片，直至三片数值与前两片平均数之差不超过平均数的 20%为止，即可视为有效平均计数结果。

6.1.3.4 计算

每 m^3 压载水样品中 L 型存活生物个体数量 D_L 可参考如下公式计算：

计算公式：

$$DL \text{ (inds./ m}^3\text{)} = (NL \times V_1) / (V_2 \times V_3)$$

式中： N_L 为每个样品平均单片存活生物个体数 (inds./片)； V_1 为浓缩样体积 (mL)； V_2 为计数体积 (20 mL)； V_3 为采样量 (m^3)。

6.2 S型存活生物详细检测规程

6.2.1 检测原理

双荧光染色法 (CMFDA/FDA)，其中 FDA 是荧光素二乙酸酯，英文全称是 Fluorescein Diacetate，CMFDA 是 5-氯甲酸荧光素酯是 FDA 的氯甲基衍生物，英文全称 5-chloromethylfluorescein diacetate，这两种是可自由透过活细胞膜对细胞进行示踪的荧光染料。具细胞膜渗透性，无色，不具有荧光发光性。当通过被动运输穿透细胞膜进入活细胞后，CMFDA 中的亲脂性基团可被胞浆内非特异性酯酶水解，生成 5-氯甲基荧光素 (5-chloromethylfluorescein)；5-氯甲基荧光素可发出绿色荧光，因带电荷而不能自由穿透细胞膜，并利用自身氯甲基与细胞内蛋白和多肽中的谷胱甘肽在谷胱甘肽巯基转移酶作用下生成加合物，能完好地保留在胞内。经 CMFDA/FDA 标记的细胞，在 465 nm-495 nm 波段下可激发稳定的荧光，稳定标记的时间可达数天 (至少 3 d)，可用于 S 型细胞的活体计数。

6.2.2 主要设备、器具

- (1) 正置或倒置荧光显微镜 (可激发 465 nm-495 nm 波段)
- (2) 浮游植物计数框 (50 mm×20 mm×1 mm, 1 mL)
- (3) 计数器
- (4) 移液枪：量程 1 mL，10 μ L
- (5) 烧杯：500 mL

(6) 离心管：1.5 mL

6.2.3 主要试剂及其配置

6.2.3.1 试剂

荧光素二乙酸酯（FDA），5-氯甲酸荧光素酯（CMFDA），二甲基亚砷（DMSO）

6.2.3.2 CMTDA 的配制

- (1) 将 50 μg 的 CMTDA，加入 430 μL 的二甲基亚砷（DMSO）并涡旋混匀，配制成浓度为 250 μM 的 CMTDA 存储液，避光；
- (2) 通过移液枪，将存储液等分成 100 μL 每份，保存在 1.5 mL 的离心管中；
- (3) 每管贴上标签，注明复溶日期和浓度，-20℃，避光保存；
- (4) 每次用完后仍需重新-20℃，避光保存。

6.2.3.3 FDA 的配制

- (1) 取 100 mg 的 FDA 溶于 4.8 mL 的 DMSO 中，配制成浓度为 50 mM 的 FDA 准备液；
- (2) 取 10 μL 的 50 mM FDA 准备液，溶于 990 μL 的二甲基亚砷 DMSO 中，制成浓度为 500 μM 的 FDA 储存液；
- (3) 通过移液枪，将存储液等分成 100 μL 每份，保存在 1.5 mL 的离心管中；每管贴上标签，注明复溶日期和浓度，-20℃避光保存。
- (4) 每次用完后仍需重新保存在-20℃避光保存。

6.2.4 S 型存活生物计数

6.2.4.1 准备工作

S 型存活生物样品送达实验室后，采用 CMTDA 和 FDA 双荧光染料进行染色，并使用 1 mL 浮游植物计数框在荧光显微镜激发光 465-495 nm 下进行染色细胞计数，样品应在取样后 24 h 内开展检测工作。

预估样品密度水平，选择生物分布较为平均的视野进行计数，视野中计数 10 个格子，如活体细胞总数小于 10，则为低密度水平；如计数 10-100 个活体细胞总数，则为中密度水平，大于 100 个活体细胞的为高密度水平，参考表 2 开展推荐计数条数计算。

表 2 S 型存活生物推荐浮游植物框计数方法

S 型存活样品预估密度水平	推荐计数条数
高密度水平 (>10 ³ cells/mL)	3 条法计数 (2、5、8 条)

中密度水平（ 10^2 cells/mL- 10^3 cells/mL）	5 条法计数（2、4、6、8、10 条）
低密度水平（ $<10^2$ cells/mL）	全片计数

6.2.4.2 检测

（1）将水袋中 S 型生物样品轻轻颠倒，再倒入 500 mL 烧杯中，用 1000 μ L 移液枪吸取 S 型尺寸样品 980 μ L 于 1.5 mL EP 管中，分别再加入 10 μ L 的 500 μ M 的 FDA 工作液和 10 μ L 250 μ M 的 CMFDA 工作液，使 FDA 的终浓度为 5 μ M，CMFDA 的终浓度为 2.5 μ M，避光染色 10 min；

（2）将染色后样品轻轻摇匀，用移液枪将样品加入 1 mL 计数框内，在激发波长为 465 nm-495 nm 的荧光显微镜下，4 倍或 10 倍物镜下分别计数被 FDA 和 CMFDA 着色的 S 型尺寸活体细胞数，被染色的生物体、运动的生物体或被染色同时运动的生物体都被视为存活生物，并用显微镜软件测量存活生物细胞的最小尺寸，如图 5 所示；

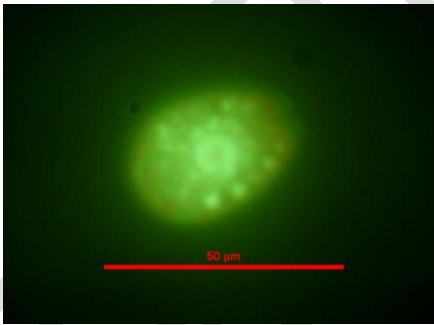


图 5 双荧光染色后显微镜视野下活体细胞示例图

（3）染色后样品应在 20 min 内检测完毕，以防荧光信号减弱；参考 HJ 1215 水质浮游植物的测定滤膜显微镜计数法，检测时注意视野范围内细胞参照图 5 Whipple 视野计数约定规则，即：视野中处于下边界及右边界线的细胞计入总数，处于上边界及左边界线的细胞不计入总数，如图 6 所示。若出现丝状体等较大个体显著穿过两个或多个格子的边界时，应在低倍镜下单独计数，再计入总数；

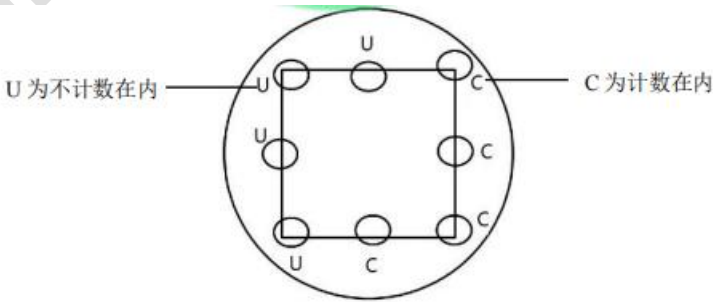


图 6 Whipple 视野计数约定规则示意图

(4) 若单个视野中生物体过多,参考表 2 计数方法,可采用长条计数法,选取两相邻刻度从计数框左边一直计数到计数框右边称为一个长条。如样品细胞数为高密度水平,则计数 3 条,即第 2、5、8 条,单片细胞密度为 3 条计数数量除以计数条数;若样品细胞数为中密度水平,则计数五条,即第 2、4、6、8、10,单片细胞密度为 5 条计数数量除以计数条数;若生物体密度为低密度水平,则应全片计数,破损细胞不计数。计数时宜缓慢移动显微镜载物台,如图 7 所示,一般检测片数为 3 片。

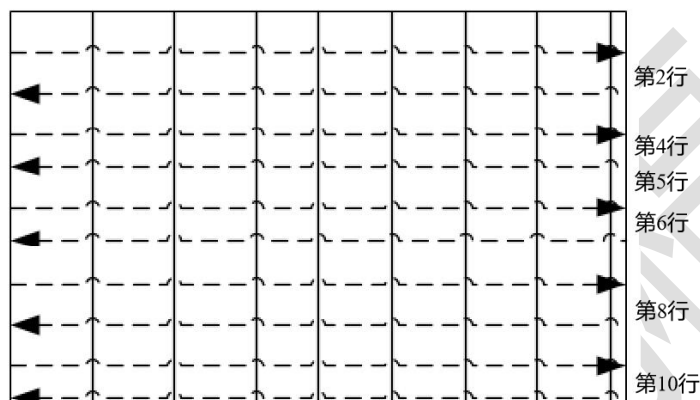


图 7 显微镜视野在浮游植物框下移动示意图

(5) 对于 S 型存活生物每 mL 细胞密度 D_s , 参考如下计算公式:

$$\text{计算公式: } D_s = (N_{s1} + N_{s2} + N_{s3}) / 3$$

式中: N_{s1} 为第 1 片计数细胞密度 (cells/mL); N_{s2} 为第 2 片计数细胞密度 (cells/mL); N_{s3} 为第 3 片计数细胞密度 (cells/mL)。

注: 第三片计算结果和前两片的平均数之差如不大于其均数的 $\pm 20\%$, 其均数视为有效结果, 否则必须再测一片, 直至三片数值与前两片平均数之差不超过均数的 20% 为止, 即可视为有效平均计数结果。

6.3 原始记录

原始检测记录应包括样品编号、样品名称、检测日期和时间、检测方法、仪器设备、检测结果、检测人、复核日期、复核人等内容, 如样品检测不合格, 则需对存活生物保存至少 10 张带标尺图片, 保存的照片应带有系统自带的标尺和日期, 以供溯源。

6.4 结果报告

数量/细胞计数 ≤ 10 个时, 以实际数量报告; 数量/细胞计数 > 10 个且 ≤ 100 个时, 以整数报告; 如 $>$ 于 100 个时, 将第 3 位数字采用“四舍五入”原则修约后, 取前 2 位数字, 后面用 0 代替位数, 也可用 10 的指数形式来表示, 按“四舍五入”原则修约后, 采用两位有效数字。

6.5 结果判定

- 6.5.1 最小尺寸 $\geq 50\text{ }\mu\text{m}$ （L型）存活生物结果不符合附录 E D-2 排放标准，则判定该压载水不合格，按照相应法律、法规、部门规章等进行处置。
- 6.5.2 最小尺寸 $< 50\text{ }\mu\text{m}$ 且 $\geq 10\text{ }\mu\text{m}$ （S型）存活生物结果不符合附录 E D-2 排放标准，则判定为该压载水不合格，按照相应法律、法规、部门规章等进行处置。
- 6.5.3 《国际船舶压载水与沉积物控制与管理公约》D-2 标准参见附录 E。

6.6 复验

因存活生物样品 24 h 内检验完毕，因此当实验室检测结果中的某一项检验结果不符合检验依据的要求时，样品不接受复验。

7 菌落总数检测规程

7.1 检验原理

将待测样品原液或经适当稀释之后，其中的微生物充分分散成单个细胞，取一定量的稀释液涂布到平板上，经过指定的温度和时间培养，由每个单细胞生长繁殖而形成肉眼可见的菌落，即一个单菌落应代表原样品中的一个单细胞；统计菌落数，根据其稀释倍数和取样接种量即可换算出样品中的菌落总数。

7.2 设备和材料

电子天平、抽滤装置、 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 无菌滤膜、镊子、量筒、恒温培养箱、接种针、接种环、酒精灯、培养皿等。

7.3 培养基和试剂

7.3.1 营养琼脂培养基（g/L）

组分	质量
蛋白胨	10.0 g
牛肉膏	3.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0-20.0 g

将上述成分或商品化粉末，用 1000 mL 去离子蒸馏水重悬，搅拌均匀，经 121℃ 高压蒸汽灭菌 20 min，冷却至 45-50° C 倒入无菌培养皿中。培养基最终 pH 值应为 7.2±0.2，在 4℃ 避光条件下保存，两周有效。

7.3.2 无菌水：取适量实验用水，经 121℃ 高压蒸汽灭菌 20 min，备用。

7.3.3 10%Na₂S₂O₃：称取 15.7 g 硫代硫酸钠，定容 100 mL 水中，灭菌。

7.4 检验程序

7.4.1 水样前处理

若电解原理的压载水处理设备产生的样品，则水样含有活性氯成分，需在收到样品后根据样品体积加入 10%浓度 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液，以除去活性氯对细菌的抑制作用（每 125 mL 容积加入 0.1 mL 的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液，若 500 mL 水样则加入 0.4 mL 的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液），在 24 h 以内处理采集样品。

7.4.2 梯度稀释

使用无菌容器进行稀释，设置 2-3 个梯度，每个梯度 2-3 个平行。根据不同类别水样压载地点，样品稀释度可以参考表 3，梯度稀释可使用 50 mL 原液加入 450 mL 无菌水中。

表 3 样品稀释度参考表

样品类型	样品状态	1	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
公海水	处理前	▲	▲	▲	
	处理后	▲	▲	▲	
港口水	处理前		▲	▲	▲
	处理后		▲	▲	▲

7.4.3 接种

以无菌操作方式用 1 mL 灭菌移液枪吸取充分混匀的样品或稀释样品 1 mL，注入灭菌平皿中，倾注 15-20 mL 冷却到 44-47℃的营养琼脂培养基，并立即旋摇平皿，使样品或稀释样品与培养基充分混匀，每个样品或稀释样品倾注 2 个平皿。

7.4.4 培养

待平皿内的营养琼脂培养基冷却凝固后，翻转平皿，使底面向上（避免因表面水分凝结而影响细菌均匀生长），其中一组在 $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 条件下，恒温培养箱内培养 44 ± 4 h，另一组是 $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 培养 68 ± 4 h 后观察结果。

7.4.5 空白对照

用无菌水做实验室空白测定，培养后平皿上不得有菌落生长，否则，该次样品测定结果无效，应查明原因后重新测定。

7.5 计数

7.5.1 计数规则

作平皿菌落计数时，可用眼睛直接观察，必要时使用放大镜检查，以防遗漏。在记下各平皿的菌落数后，应求出不同稀释度的平均菌落数，供下一步计算时应用。平皿上有较大片状菌落超过平皿一半时，该平皿不参加计数。片状菌落不到平皿的一半，而其余一半菌落分布又很均匀时，将此分布均匀的菌落计数。

片状菌落不到平皿的一半，而其余一半菌落分布又很均匀时，将此分布均匀的菌落计数，并乘以 2 代表全皿菌落总数。

外观（形态或颜色）相似，距离相近却不相触的菌落，只要它们之间的距离不小于最小菌落的直径，予以计数。紧密接触而外观相异的菌落，予以计数。

若未能及时观察，可 $5 \pm 3^\circ\text{C}$ 温度保存，48 h 内计数。

7.5.2 不同稀释度的选择及报告方式

（1）首先选择平均菌落数在 30-399 之间者进行计算，若只有一个稀释度的平均菌落数符合此范围时，则将该菌落乘以稀释倍数报告之（见表 4 中实例 1）。

（2）若有两个稀释度，其生长的菌落数均在 30-300 之间，则视二者之比值来决定，若其比值小于 2 应报告两者的平均数（如表 4 中实例 2）。若大于 2 则报告其中稀释度较小的菌落总数（如表 4 中实例 3）。若等于 2 亦报告其中稀释度较小的菌落数（见表 4 中实例 4）。

（3）若所有稀释度的平均菌落数均大于 300，则应以按稀释度最低的平均菌落数乘以稀释倍数报告之（见表 4 中实例 5）。

（4）若所有稀释度的平均菌落数均小于 30，则应以按稀释度最低的平均菌落数乘以稀释倍数报告之（见表 4 中实例 6）。

（5）若所有稀释度的平均菌落数均不在 30-300 之间，则应以最接近 30 或 300 的平均菌落乘以稀释倍数报告之（见表 4 中实例 7）。

（6）若所有稀释度的平板上均无菌落生长，则以未检出报告之。

（7）如果所有平板上都有菌落密布，不要用“多不可计”报告，而应在稀释度最大的平板上，任意数其中 2 个平板 1 cm^2 中的菌落数，除 2 求出每 cm^2 内平均菌落数，乘以皿底面积 63.6 cm^2 ，再乘以其稀释倍数作报告。

（8）菌落计数的报告菌落数在 100 以内时按实有数报告，大于 100 时，采用两位有效数字，在两位有效数字后面的数值，以四舍五入方法计算，为了缩短数字后面的零数也可用 10 的指数来表示（见表 4 报告方式栏）。

表 4 稀释度选择及菌落总数报告方式

实 例	不同稀释度的平均菌落数			两个稀释度 菌落数之比	菌 落 总 数 / (CFU/mL)	报告方式 (CFU/mL)
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³			
1	1365	164	20	——	16400	16000 或 1.6×10 ⁴
2	2760	295	46	1.6	37750	38000 或 3.8×10 ⁴
3	2890	271	60	2.2	27100	27000 或 2.7×10 ⁴
4	150	30	8	2	1500	1500 或 1.5×10 ³
5	多不可计	1650	513	——	51300	51000 或 5.1×10 ⁴
6	27	11	5	——	270	270 或 2.7×10 ²
7	多不可计	305	12		30200	31000 或 3.1×10 ⁴

8 耐热大肠杆菌检测规程

8.1 检测原理

耐热大肠杆菌 Thermotolerant coliforms 又称粪大肠菌群 (Fecal Coliforms)，44.5℃ 培养 24 h，能在 mTEC 择性培养基上生长，并形成黄色菌落的肠杆菌科细菌。

8.2 设备和耗材

电子天平、抽滤装置、0.45 μm 无菌滤膜、镊子、量筒、恒温培养箱、接种针、接种环、酒精灯等。

8.3 培养基和试剂配置

(1) mTEC 培养基 (g/L)

组分	含量
乳糖	10.0 g
氯化钠	7.5 g
月示蛋白胨	5.0 g
磷酸氢二钾	3.3 g
酵母提取物	3.0 g
X-Gluc	0.5 g
SDS	0.2 g

脱氧胆酸钠	0.1 g
琼脂	15.0 g

将上述成分或商业化产品粉末称取 45.6 g，用 1L 去离子蒸馏水重悬，搅拌均匀，121℃ C 灭菌 15 min，冷却至 50℃ C 左右倒入无菌培养皿中。培养基最终 pH 值应为 7.3±0.2，在 4℃避光条件下保存。

(2) EC 培养基 (g/L)

组分	含量
胰蛋白胨	20.0 g
3 号胆盐	1.5 g
乳糖	5.0 g
磷酸氢二钾	4.0 g
磷酸二氢钾	1.5 g
氯化钠	5.0 g

将上述成分或商业化产品粉末称取 37.1 g，用 1 L 去离子蒸馏水重悬，搅拌均匀，加热煮沸至完全溶解，定量分装，115℃ C 灭菌 20 min。培养基最终 pH 值应为 7.3±0.2℃，在 4℃避光条件下保存。

(3) 10%Na₂S₂O₃: 称取 15.7 g 硫代硫酸钠，定容至 100 mL 水中，灭菌。

8.4 检验程序

8.4.1 水样前处理

无菌采样袋，样品储存瓶，5±3℃温度保存，若电解原理的压载水处理设备产生的样品，则水样含有活性氯成分，需在收到样品后根据样品体积加入 10%浓度 Na₂S₂O₃ 溶液，以除去活性氯对细菌的抑制作用(每 125 mL 容积加入 0.1 mL 的 Na₂S₂O₃ 溶液，若 500 mL 水样则加入 0.4 mL 的 Na₂S₂O₃ 溶液)，在 24 h 以内处理采集样品。

8.4.2 梯度稀释

使用无菌容器进行稀释，设置 2-3 个梯度，每个梯度 2-3 个平行。根据不同类别水样压载地点，样品稀释度可以参考 7.4.2 表 3，梯度稀释可使用 50 mL 原液加入 450 mL 无菌水中。

8.4.3 水样抽滤

用灭菌镊子以无菌操作夹取无菌滤膜贴放在已灭菌的过滤装置上，固定好过滤装置，将样品充分混匀后抽滤。样品过滤完成后，再抽气约 5 s，关上开关。

8.4.4 培养

用灭菌镊子夹取滤膜移放在 mTEC 培养基，滤膜截留细菌面向上，滤膜应与培养基完全贴紧，两者间不得留有气泡，然后将培养皿倒置，放入 35 ± 0.5 °C 恒温箱内培养 2 h，复苏菌种， 44.5 ± 0.2 °C 培养 22 h。注意保湿，防止滤膜和介质的脱水。

8.4.5 确证实验

典型可疑菌落为黄色，对可疑菌落转种 EC 培养基， 44.5 °C 培养 24 ± 2 h，如产气则证实为耐热大肠菌群。

8.5 对照试验

8.5.1 空白对照

每次试验都要用无菌水做实验室空白测定，培养后的培养基上不得有任何菌落生长。否则，该次样品测定结果无效，应查明原因后重新测定。

8.5.2 阳性及阴性对照

定期进行阳性及阴性对照试验，阳性菌株应呈现阳性反应，阴性菌株应呈现阴性反应，否则，该次样品测定结果无效，应查明原因后重新测定。

8.6 计数

对确证为耐热大肠杆菌菌落的滤膜进行计数，生长有 20–60 个耐热大肠杆菌菌落数为计数合适范围，如未在该范围，则以最接近该范围的数值为宜。

计数被证实的耐热大肠杆菌菌落数，水中耐热大肠菌群数系以 100 mL 水样中耐热大肠菌群菌落形成单位（CFU）表示，见下式。

$$\text{耐热大肠杆菌菌落 (CFU/100mL)} = \frac{\text{所计得的耐热大肠杆菌菌落数} \times 100}{\text{过滤的水样体积 (mL)}}$$

8.7 结果报告

细胞计数大于或等于 100 个时，将第 3 位数字采用“四舍五入”原则修约后，取前 2 位数字，后面用 0 代替位数，也可用 10 的指数形式来表示，按“四舍五入”原则修约后，采用两位有效数字。

8.8 结果判定

8.8.1 符合附录 E D-2 排放标准，如超过 250 CFU/100 mL 则判定为不合格，按照相应法律、法规、部门规章等进行处置。

8.8.2 如样品检测不合格，则需对平板进行拍照留存，以供溯源。

8.8.3 因微生物活体样品 24 h 内检验完毕，因此当实验室检测结果中的不符合检验依据的要求时，样品不接受复验。如需复验，则需再次对压载水管理系统处理后样品进行取样重新抽取代表性样本进行全项检验，也可重新抽取代表性样本对上次不合格项目单独进行检验。

9 大肠埃希氏菌检测规程

9.1 检测原理

大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) 俗称大肠杆菌，是一群能发酵乳糖、产酸产气、需氧和兼性厌氧的革兰氏阴性无芽胞杆菌。该菌主要来源于人、畜粪便，故以此作为船舶压载水处理后排放标准之一，推断压载水中有没有污染肠道致病菌的可能。大肠埃希氏菌培养原理通过 CCA 大肠菌群显色培养基中含有三种显色剂，用于检测 β -半乳糖苷酶和 β -葡萄糖醛酸酶，其中 IPTG 用于增强显色反应。大肠杆菌为 β -半乳糖苷酶和 β -葡萄糖醛酸酶双阳性，菌落呈深蓝至紫色。

9.2 设备和材料

电子天平、抽滤装置、0.45 μm 无菌滤膜、镊子、量筒、恒温培养箱、接种针、接种环、酒精灯、培养皿等。

9.3 培养基和试剂

(1) 称取 46 g 商业化 CCA 大肠菌群显色培养基：培养基粉末，加蒸馏水定容至 1000 mL，混匀，加热溶解并不停搅拌，煮沸不要超过 1 min。最终 pH 为 6.8 ± 0.2 ，在无菌操作下铺板备用。制作好的平板在 4℃ 避光条件下保存，两周有效。

(2) 10% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ：称取 15.7 g 硫代硫酸钠，定容至 100 mL 水中，灭菌。

9.4 检验程序

9.4.1 水样前处理

无菌采样袋，样品储存瓶， $5 \pm 3^\circ\text{C}$ 温度保存，若电解原理的压载水处理设备产生的样品，则水样含有活性氯成分，需在收到样品后根据样品体积加入 10% 浓度 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液，以除去活性氯对细菌的抑制作用（每 125 mL 容积加入 0.1 mL 的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液，若 500 mL 水样则加入 0.4 mL 的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液），在 24 h 以内处理采集样品。

9.4.2 梯度稀释

使用无菌容器进行稀释，设置 2-3 个梯度，每个梯度 2-3 个平行。根据不同类别水样压载地点，样品稀释度可以参考 7.4.2 表 3，梯度稀释可使用 50 mL 原液加入 450 mL 无菌水中。

9.4.3 水样抽滤

用灭菌镊子以无菌操作夹取无菌滤膜贴放在已灭菌的过滤装置上，固定好过滤装置，将样品充分混匀后抽滤。样品过滤完成后，再抽气约 5 s，关上开关。

9.4.4 培养

用灭菌镊子夹取滤膜边缘部分，移在 CCA 培养基上，滤膜截留细菌面向上，滤膜应与培养基完全贴紧，两者间不得留有气泡，然后将平皿倒置，放入 $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ 恒温箱内培养 $21\pm 3\text{ h}$ 。

滤膜上蓝黑色至紫色菌落为大肠埃希氏 *E. coli* 阳性菌落。

9.5 对照试验

9.5.1 空白对照

每次试验都要用无菌水做实验室空白测定，培养后的培养基上不得有任何菌落生长。否则，该次样品测定结果无效，应查明原因后重新测定。

9.5.2 阳性及阴性对照

定期进行阳性及阴性对照试验，阳性菌株应呈现阳性反应，阴性菌株应呈现阴性反应，否则，该次样品测定结果无效，应查明原因后重新测定。

9.6 计数

对确证为大肠埃希氏菌落的滤膜进行计数，生长有 20-60 个大肠埃希氏菌落菌落数为计数合适范围，如未在该范围，则以最接近该范围的数值为宜。

计数被证实的大肠埃希氏菌落数，水中耐热大肠菌群数系以 100 mL 水样中耐热大肠菌群菌落形成单位（CFU）表示，见下式。

$$\text{大肠埃希氏菌菌落 (CFU/100mL)} = \frac{\text{所计得的大肠埃希氏菌菌落数} \times 100}{\text{过滤的水样体积 (mL)}}$$

9.7 检测报告

细胞计数大于或等于 100 个时，将第 3 位数字采用“四舍五入”原则修约后，取前 2 位数字，后面用 0 代替位数，也可用 10 的指数形式来表示，按“四舍五入”原则修约后，采用两位有效数字。

9.8 结果判定

9.8.1 符合附录 E D-2 排放标准，如超过 100 CFU/100 mL 则判定为不合格，按照相应法律、法规、部门规章等进行处置。

9.8.2 如样品检测不合格，则需对平板进行拍照留存，以供溯源。

9.8.3 因微生物活体样品 24 h 内检验完毕，因此当实验室检测结果中的不符合检验依据的要求时，样品不接受复验。如需复验，则需再次对压载水管理系统处理后样品进行取样重新抽取代表性样本进行全项检验，也可重新抽取代表性样本对上次不合格项目单独进行检验。

10 肠球菌检测规程

10.1 检验原理

肠球菌 *Intestinal Enterococci* 是一类革兰氏阳性球菌，碱性厌氧，无芽孢和荚膜，可分解胆汁七叶苷，是压载水排放是否达标的指示菌之一。本标准使用 SBM 培养基含有叠氮化钠和的固体选择性培养基上，典型的菌落形态是凸起的，菌落的中心或整体呈红色、栗色或粉红色。2,3,5-三苯基氯化四氮唑是一种无色染料，可被肠球菌还原红色甲瓚，叠氮化钠主要抑制革兰氏阴性细菌的生长发育。再使用 BAAA 胆汁七叶苷叠氮琼脂为培养基，其中牛胆汁可以抑制大部分革兰氏阳性菌的生长，肠球菌水解七叶苷与柠檬酸铁铵中铁离子反应形成黑色的 6,7-二羟基香豆素，菌落成棕褐色至黑色。

10.2 设备和耗材

电子天平、抽滤装置、0.45 μm 无菌滤膜、镊子、量筒、恒温培养箱、接种针、接种环、酒精灯、培养皿等。

10.3 培养基和试剂配置

(1) SBM 培养基 (g/L)

组分	含量
胰蛋白胨	17.0 g
酵母提取物	5.0 g
葡萄糖	2.0 g
磷酸氢二钾	4.0 g
叠氮钠	0.4 g
氯化四唑	0.1 g
琼脂	13.5 g

将上述成分或商品化粉末用 1000 mL 去离子蒸馏水重悬，搅拌均匀，加热至沸腾，使培养基完全溶解，避免过度加热，冷却至 45-50° C 倒入无菌培养皿中。培养基最终 pH 值应为 7.2±0.2，在 4℃ 避光条件下保存，两周有效。

(2) BAAA 培养基成分 (g/L)

组分	含量
胰蛋白胨	17.0 g
牛肉浸粉	3.0 g
酵母浸粉	5.0 g
牛胆粉	10.0 g
氯化钠	5.0 g
柠檬酸钠	1.0 g
七叶苷	1.0 g
柠檬酸铁铵	0.5 g
叠氮化钠	0.25 g
琼脂	13.5g

将上述成分或商品化粉末加热溶解于 1000 mL 蒸馏水中，103.43 kPa（121 °C）高压灭菌 15 min，冷至 46±1℃ 到平板，培养基最终 pH 值应为 7.1±0.2，在 4℃ 避光条件下保存，两周有效。

(3) 10% Na₂S₂O₃: 10% Na₂S₂O₃: 称取 15.7 g 硫代硫酸钠，定容至 100 mL 水中，灭菌。

10.4 检验程序

10.4.1 水样前处理

无菌采样袋，样品储存瓶，5±3℃ 温度保存，若电解原理的压载水处理设备产生的样品，则水样含有活性氯成分，需在收到样品后根据样品体积加入 10% 浓度 Na₂S₂O₃ 溶液，以除去活性氯对细菌的抑制作用 (每 125 mL 容积加入 0.1 mL 的 Na₂S₂O₃ 溶液，若 500 mL 水样则加入 0.4 mL 的 Na₂S₂O₃ 溶液)，在 24 h 以内处理采集样品。

10.4.2 梯度稀释

使用无菌容器进行稀释，设置 2-3 个梯度，每个梯度 2-3 个平行。根据不同类别水样压载地点，样品稀释度可以参考 7.4.2 表 3，梯度稀释可使用 50 mL 原液加入 450 mL 无菌水中。

10.4.3 水样抽滤

用灭菌镊子以无菌操作夹取无菌滤膜贴放在已灭菌的过滤装置上，固定好过滤装置，将样品充分混匀后抽滤。样品过滤完成后，再抽气约 5 s，关上开关。

10.4.4 培养

滤膜小心移至 SBM 培养基上，然后将平皿倒置，放入 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 恒温箱内培养 44 ± 4 h。注意保湿，防止滤膜和介质的脱水。

10.4.5 确证实验

典型可疑菌落为凸起的，中心或整个呈现红色、栗色至粉红色。如有，在无菌条件下将膜转移至 BAAA 培养基上， $44 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 恒温培养箱下培养 4 h 后立即观察，典型阳性菌落呈现棕褐色至黑色。

10.5 对照试验

10.5.1 空白对照

每次试验都要用无菌水做实验室空白测定，培养后的培养基上不得有任何菌落生长。否则，该次样品测定结果无效，应查明原因后重新测定。

10.5.2 阳性及阴性对照

定期进行阳性及阴性对照试验，阳性菌株应呈现阳性反应，阴性菌株应呈现阴性反应，否则，该次样品测定结果无效，应查明原因后重新测定。

10.6 计数

对确证为肠球菌菌落的滤膜进行计数，生长有 20-60 个肠球菌为计数合适范围，如未在该范围，则以最接近该范围的数值为宜；

根据所使用的样品量，按照下式，计算每 100 mL 样品中肠球菌菌落数。

$$\text{肠球菌菌落 (CFU/100 mL)} = \frac{\text{所计得肠球菌菌落数} \times 100}{\text{过滤的水样体积 (mL)}}$$

10.7 检测报告

细胞计数大于或等于 100 个时，将第 3 位数字采用“四舍五入”原则修约后，取前 2 位数字，后面用 0 代替位数，也可用 10 的指数形式来表示，按“四舍五入”原则修约后，采用两位有效数字。

10.8 结果判定

10.8.1 符合附录 E D-2 排放标准，如超过 100CFU/100mL 则判定为不合格，按照相应法律、法规、部门规章等进行处置。

10.8.2 如样品检测不合格，则需对平板进行拍照留存，以供溯源。

10.8.3 因微生物活体样品 24 h 内检验完毕，因此当实验室检测结果中的不符合检验依据的要求时，样品不接受复验。如需复验，则需再次对压载水管理系统处理后样品进行取样重新抽取代表性样本进行全项检验，也可重新抽取代表性样本对上次不合格项目单独进行检验。

11 有毒霍乱弧菌检测规程

11.1 检验要求

本标准作业程序指 01 群和 0139 群霍乱弧菌引起的急性肠道传染病，是发病急、传播快、波及面广、可水传的甲类传染病，需在生物安全二级 BSL-2 实验室开展检测工作。

11.2 设备和耗材

电子天平、镊子、量筒、恒温培养箱、接种针、接种环、酒精灯、培养皿等。

11.3 培养基和试剂配置

(1) 2×APW 培养基 (g/L)

组分	含量
蛋白胨	20.0 g
氯化钠	20.0 g

将上述成分或商品化粉末 40.0 g，溶于 1000 mL 去离子蒸馏水，分装成 100 mL，121℃ 高压灭菌 15 min，培养基最终 pH 值应为 8.6±0.2。在 4℃ 避光条件下保存，两周有效。

(2) TCBS 培养基成分 (g/L)

组分	含量
细菌蛋白胨	10.0 g
酵母提取物	5.0 g
蔗糖	20.0 g
硫代硫酸钠	10.0 g
胆酸钠	3.0 g
柠檬酸钠	10.0 g
牛胆汁	5.0 g
柠檬酸铁	1.0 g

溴麝香草酚蓝	0.04 g
百里酚蓝	0.04 g
琼脂	15.0 g

将上述成分或商品化粉末加入 1000 mL 的蒸馏水，浸泡 10 min，加热煮沸至完全溶解，冷却至 55℃ 倒入无菌培养皿中。在 4℃ 避光条件下保存，两周有效，勿高压灭菌。

(3) 碱性琼脂培养基 (g/L)

组分	含量
蛋白胨	20.0 g
牛肉膏粉	5.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0 g

将上述成分或商品化粉末加入 1000 mL 的蒸馏水，浸泡 10 min，微波炉加热煮沸至完全溶解，冷却至 55℃ 倒入无菌培养皿中。在 4℃ 避光条件下保存，两周有效，勿高压灭菌。

(4) 10% Na₂S₂O₃: 称取 15.7 g 硫代硫酸钠，定容至 100 mL 水中，灭菌。

11.4 检验程序

11.4.1 水样前处理

无菌采样袋，样品储存瓶，5±3℃ 温度保存，若电解原理的压载水处理设备产生的样品，则水样含有活性氯成分，需在收到样品后根据样品体积加入 10% 浓度 Na₂S₂O₃ 溶液，以除去活性氯对细菌的抑制作用 (每 125 mL 容积加入 0.1 mL 的 Na₂S₂O₃ 溶液，若 500 mL 水样则加入 0.4 mL 的 Na₂S₂O₃ 溶液)，在 24 h 以内处理采集样品。

11.4.2 增菌培养

将 100 mL 原水样品加入至 2 倍 APW 碱性蛋白胨水培养液，36±1℃ 增菌 18-24h，也可选择二次增菌，第一次 6-8h，第二次 18h。

11.4.3 分离

用接种环挑取增菌液表面生长物一环划线接种于一弱选择性培养基碱性琼脂，以及一强选择性培养基，本操作流程选用 TCBS 培养基，36±1℃ 培养 24 h。TCBS 培养基上霍乱弧菌菌落呈黄色发亮、菌落大、表面光滑湿润、稍凸起、边缘整齐半透明，中心不透明。

11.4.4 鉴定

应挑取至少 5 个（少于 5 个则全部挑取）可疑菌落至非选择性培养基（碱性琼脂平板）进行纯化培养（ $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，18-24 h）。

11.4.4.1 玻片凝集实验

从分离纯化培养基上挑取可疑菌落与 O1 群霍乱弧菌特异性诊断血清及 O139 群霍乱弧菌特异性诊断血清作玻片凝集试验。如可疑菌落在血清中很快（一般 $<10\text{ s}$ ）出现肉眼可见的明显凝集，而在生理盐水中不凝聚着判定为阳性，如在 1 min 仍无明显的凝集颗粒，判定为霍乱弧菌阴性。每份样本至少应挑选 5 个以上菌落逐个进行玻片凝集检查，必要时，取培养皿涂布划线或划线部位菌落边缘部分菌苔再做玻片凝集，均为阴性时可报告未检出 O1 群和 O139 群霍乱弧菌。与 O139 群霍乱弧菌特异性诊断血清凝集者初步鉴定为 O139 群霍乱弧菌，与 O1 群霍乱弧菌特异性诊断血清凝集者初步鉴定为 O1 群霍乱弧菌。推荐使用 O1 群和 O139 群霍乱弧菌两价诊断血清，检出阳性时再用单价血清进一步鉴定。

11.4.4.2 形态学检查

取纯菌进行革兰氏染色，霍乱弧菌为革兰氏阴性短小稍弯曲杆菌，无芽孢。

11.4.4.3 动力检查

（1）半固体法

以接种针挑取分离培养纯菌落在半固体琼脂上穿刺， $35-37^{\circ}\text{C}$ 培养 8-10 h，如沿穿刺线扩散生长并使培养基变浑浊，为动力阳性。霍乱弧菌动力为阳性。

（2）悬滴法

用悬滴法制片，在高倍显微镜或暗视野显微镜下观察，如有穿梭状或流星状运动的短小弧形杆菌，则为动力阳性。霍乱弧菌动力为阳性。

11.4.4.4 生化鉴定

（1）氧化酶试验

以接种环挑取一环新鲜营养琼脂培养物至灭菌白色滤纸上，滴加氧化酶试剂一滴，如在 1-2 min 内出现粉红色至紫色至黑紫色，则为氧化酶试验阳性，霍乱弧菌氧化酶试验为阳性。

（2）黏丝试验

在洁净玻片或平皿上加一大滴 0.5% 去氧胆酸钠水溶液，用接种环挑取一环新鲜营养琼脂培养物，放在试剂旁研磨，再与试剂混合制成浓厚的悬液。在不断地研磨下，霍乱弧菌悬

液能在 1 min 内由混变清并变得很黏稠，用接种环挑取时，可拉出细丝。黏丝试验阴性菌呈均匀悬液状，与蒸馏水对照相同。

(3) 系统生化试验

API20E 生化鉴定试剂盒，参考说明书，进行生化反应鉴定。利用全自动微生物生化鉴定系统（VITEK），从纯化平板上挑取可疑菌落，参照说明书进行鉴定。

11.4.5 结果判定

与 01 群霍乱弧菌特异性诊断血清或 0139 群霍乱弧菌特异性诊断血清凝集，而在生理盐水中无自凝现象，氧化酶试验阳性，黏丝试验阳性，动力阳性，形态学检查为革兰氏阴性短小稍弯曲杆菌，无芽孢。可判断为检出 01 群或 0139 群霍乱弧菌。

符合附录 E 压载水公约 D-2 排放标准，如有有毒霍乱弧菌检出则判定船舶压舱水为不合格，按照相应法律、法规、部门规章等进行处置。

11.5 阳性结果的处置

(1) 对首发分离菌株，应送上一级或有确认能力的实验室或指定实验室做进一步复核鉴定，复核鉴定按第 7 部分鉴定流程执行。

(2) 检出的霍乱弧菌菌株由专人负责保管及详细记录。

(3) 对阳性样品处理需满足 BSL-2 实验室的样品处理要求。

11.6 实验室安全操作

实验室生物安全按 GB19489 规定。

11.7 结果报告

未检出霍乱弧菌的报告时，按检测所需样本的量，报告为“100 mL 样品中未出 01 群和 0139 群霍乱弧菌”；检出霍乱弧菌的报告时，按检测所需样本的量，报告为“100 mL 样品中检出 01 群和 0139 群霍乱弧菌”。

11.8 结果判定

11.8.1 符合附录 E D-2 排放标准，如检出有毒霍乱则判定压舱水为不合格，按照相应法律、法规、部门规章等进行处置。

11.8.2 如样品检测不合格，则需对平板和验证结果进行拍照留存，以供溯源。

11.8.3 因微生物活体样品 24 h 内检验完毕，因此当实验室检测结果中的不符合检验依据的要求时，样品不接受复验。如需复验，则需再次对压载水管理系统处理后样品进行取样重新抽取代表性样本进行全项检验，也可重新抽取代表性样本对上次不合格项目单独进行检验。

附录 A

压载水取样与指示性样品分析表

附录 A-1 船舶信息表 Vessel Information

船舶信息 Vessel Information	
船舶名称: Vessel Name:	
船东: Owner:	
挂旗国: Flag:	
建造日期: Date of Construction:	
上一个港口与国家: Last Port and Country:	
下一个港口与国家: Next Port and Country:	
船型: Type:	
载重吨: GT:	
到达日期: Arrival Date:	
IMO 号: IMO Number:	
呼号: Call Sign:	
代理商:	

Agent:	
到达港口: Arrival Port:	
IOPP 更新调查日期: IOPP renewal survey date:	

附录 A-2 压载水信息表 Ballast Water Information

压载水信息 Ballast Water Information	
是否有压载水管理计划? Ballast Water Management Plan on board?	
是否已经开始实施计划? Has this been implemented?	
指定单位: Specify Units:	
压载水总量: Total Ballast Water on board:	
压载水舱容: Total Ballast Water capacity:	
船上的压载舱数量: Total number of tanks on board:	
装载压载水的舱室: Number of tanks in ballast:	
压载水管理类型（处理或置换）： Type of BW management undertaken (treatment or exchange):	
其他额外的压载水管理方式？ （冲洗，延迟排放）？ Any additionnal BWM conducted? (flushing, delayed uptake outside port...)	

已置换压载舱号: Number of tanks exchanged:	
未置换压载水舱号: Number of tanks not exchanged:	
压载定位: Uptake location:	
压载日期: Uptake date:	
盐度类别（淡水，淡咸水，海水）: Salinity type (fresh, brackish, marine):	

附录 A-3 压载水处理系统 Ballast Water Treatment System

压载水处理系统 Ballast Water Treatment System	
压载水处理系统名称: Model name:	
压载水处理型式（电解，紫外或其他）: Type (electrolysis, UV...):	
压载水处理系统型式认可部门/机构: Type Approved by (classification /authority):	
安装日期: Date of installation:	
压载水处理系统安装/调试存在的问题? Ship report difficulty with BWTS operation/maintenance?	
压载水处理系统是否有运行问题? BWTS Issues?	
压载水处理系统是否使用（是/否）: BWTS utilized? (yes/no)	
压载水处理系统常规使用情况（处理循环数）: Duration BWTS in regular use (treatment cycles):	

压载水处理系统传感器上次校准时间（月份）： Time since last calibration of BWTS sensor (months):	
是否在压载水处理系统在工作过程中取样？ BWTS in working condition during sampling?	
样品采集过程中是否发生压载水处理系统报警？ BWTS alarm occurred during sample collection?	
压载水处理系统最新的维护日期？ BWTS maintenance up to date?	
压载水的保存时间（天）： Age of ballast water (days):	

附录 A-4 压载水取样 Ballast Water Sampling

压载水取样 Ballast Water Sampling	
取样日期： Sampling Date:	
取样地理信息（国家，港口）： Sampling Location (country, port):	
检察官姓名： Name of inspector:	
取样舱室/点： Identification of sampling tank/point:	
取样口类别： Type of sampling access point:	
取样端口位置（机舱，压载水处理排放口，测量孔或其他）： Location of sampling access point (engine room, BWTS output, sounding pipe...):	
取样方式：舱内取样或在线取样： Type of sampling: In-tank or in-line:	
取样压载舱描述：	

Description of tanks sampled:	
取样时间:	
Sampling duration:	
水样体积:	
Water volume sampled:	
取样过程中从压载舱排放体积总量 (m ³):	
Total volume of water discharged from sampled tanks during sampling (m ³):	
取样探针情况:	
Sample probe information:	
-安装 (永久性或半永久性):	
-Installation (permanent or semi-permanent):	
-来源 (由船方提供或取样队提供):	
- Source (provide by the ship or sampling team):	
-取样探头直径 (cm):	
- Diameter of sample probe (cm):	
-主管路直径 (cm)	
-压载水主管路直径 (cm)	
-Diameter of main ballast line (cm):	
-取样口形状 (L-形, 直形):	
-Shape (L-shaped, straight...):	
- 方向 (例如: 水流方向):	
- Orientation (e.g into the flow of water):	
-位置 (例如压载水主线中心):	
- Position (e.g center of main ballast line):	
- 是否有阀门 (是/否):	
- Valve present (Y/N):	
-阀门形状 (球阀、隔膜阀):	
-Valve type (ball, diaphragm...):	

- 阀门位置（距离如 T 型阀门 cm）： - Location (distance to closet up and downstream feature such as elbow, T, valve...) (cm):	
等动力取样（取样探头尺寸，流速，位置是否正确）： Isokinetic sample collection (probe size, flow rates, location correct) ? yes or no	
是否有收集样品的装备（是/否）？ Was a device used to collect sample (Y/N):	
如果有，样品收集装备是： If yes , Sampling equipment used:	
- 存活生物网（网垂长度，网口尺寸，网目尺寸） - Net (depth of vertical net haul, net opening size, mesh size):	
- 泵（采样深度，流速）： - Pumps (sampling depth, flow rate):	
- 瓶（采样深度，容量）： - Bottle (sampling depth, capacity...):	
- 其他采样设备： - Other sampling techniques:	
- 提供设备的公司名称： - Device by compagny XYZ:	
压载水主管路流速（m ³ /h）： Flow rate in the main ballast line (m ³ /h):	
测量方法（例如磁力流量计）： How measured (e.g., magnetic flowmeter):	
取样口流速（L/min）： Flow rate in the sample probe (L/min):	
测量方法（例如磁力流量计）： How measured (e.g., magnetic flowmeter):	

压载水来源地（经纬度/港口）（如有）： Origin of water sampled (lat/lon/port) if appropriate:	
样品收集数量： Number of samples collected:	
样品富集体积（L or m³）： Volumes of samples collected (L or m³):	
样品保护剂（如有）： Preservative (if used):	
运输条件（冷藏、暗室）： Transport to laboratory (cooling container, dark storage...):	
是否有取样协议（是/否） 参考文件： Sampling protocol? (Y/N) reference:	

附录 A-5 压载水指示性分析 Ballast Water Indicative analyses

压载水分析 Ballast Water Analysis BWM. 2/Circ42/Rev1	
评估标准（D1/D2）： Standard assessed (D1/D2):	
分析日期： Analysis Date:	
分析目的（港口国督查，自测，调试测试）： Purpose (PSC, self-monitoring, commissioning...):	
分析型式： Type of analysis:	指示性 Indicative
分析方法： Method:	
设备生产商： Manufacturer:	
试剂盒：	

kit:	
存活生物分类: Organisms Sizes class:	
分析由（实验室，船上）完成: Analysis completed by (Laboratory, onboard...):	
样本编号: Sample identification code:	
样本重复数: Number of replicate:	
子样本数量: Number of sub-samples analyzed:	
存活生物指标分析结果 1: Analysis results 1:	
存活生物指标分析结果 2: Analysis results 2:	
存活生物指标分析结果 3: Analysis results 3:	
存活生物指标结果汇总: Results summary:	
盐度: Sanity:	
温度: Temperature:	

附录 B

船舶压载水系统运行中警报类别

设备类别	错误类别	原因与影响	操作限制
电解设备	电解流量计报警 Electromagnetic flowmeter alarm	流量不稳定，导致中和过程中用量不稳定，从而导致试验结果不合格	停止取样直到流速稳定
	总余氯报警 TRO alarm	压载水中总余氯浓度过高	停止取样
	盐度报警 Salinometer alarm	盐度太低，电解设备无法启动	停止取样
	计量泵报警 Metering pump alarm	无法精准投药	停止取样
	差压变送器报警 Differential pressure transmitter alarm	水质太脏导致滤网堵塞，破坏过滤系统	停止压水
紫外设备	差压变送器报警 Differential pressure transmitter alarm	水质太脏导致滤网堵塞，破坏过滤系统，杂质过多导致紫外线穿透率不足	停止压水
	温度计报警 Temperature sensor alarm	过高水温影响紫外灯管，从而影响紫外线透射率或者水流动性能差	停止取样
	传感器报警 Proximity sensor alarm	过滤器堵塞或紫外线灯管导致清洗部件移位	停止取样
	紫外线强度传感器报警 Ultraviolet intensity sensor alarm	紫外灯管损坏或结垢	停止取样
投药设备	电解流量计报警 Electromagnetic	流量不稳定，导致中和过程中用量不稳定，从而导致试验结果不合格	停止取样直到流速稳定

	flowmeter alarm		
	计量泵报警 Metering pump alarm	无法精准投药	停止取样
	差压变送器报警 Differential pressure transmitter alarm	水质太脏导致滤网堵塞，破坏过滤系统	停止压水
惰 性 气 体 设备	差压变送器报警 Differential pressure transmitter alarm	水质太脏导致滤网堵塞，破坏过滤系统，杂质过多导致系统	停止压水
	压力传感器报警 Pressure sensor alarm	压力过小会导致海水中氧气去除不够，从而导致杀菌效果降低	停止压水

附录 C

(资料性)

基于国际海事组织海洋环境保护分会 74 次会议 18 号通函

船舶压载水指示性检测设备汇总表

技术生产商 Technology Manufacture	产品品牌 Product Brand name	在线或便携 In-line or Portable	测试原理 Measurement principle	D-2 生物检测尺寸 D-2 standard organism size class(es) detected			最小检测 体积 Minimum sample analysis volume	检测时 间 Time to obtain results	是否需要耗材 Consumables and/or reagents required (Yes/No)
				≥50 μm	≥10 and<5 0 μm	Indic ator micro bes			
Ballast Water Monitoring A/S	Bw monitor	I	活性荧光散射法 Active Fluorescence Light scattering		√		瞬时流量 Flow through	<3 s	无耗材 No

Bbe Moldaenke GmbH	10cells	P	活性荧光法 Active Fluorescence		√		1-50 mL	<1 min	有耗材 Yes
Chelsea Technologies Group	FastBallast	P ¹	单翻转活性荧光法 Single Turnover Active Fluorescence		√		20 mL	<10 min	无耗材 No
Euro Tech(Far East)Ltd.	Ballast Water Checker	P	活性荧光法 Active Fluorescence		√		无说明 Not indicated	无说明 Not indicated	无耗材 No
Hach	Bw680	P	活性荧光法 Active Fluorescence		√		2 mL	<3 min	无耗材 No
LuminUltra Technologies	B-QUA	P	三磷酸腺苷 ATP	√	√	√ ⁵	1L, 200 mL-1L, 100 mL	40 min	有耗材 Yes

MicroWISE	Ballast WISE	P	运动轨迹及活性荧光 法 MFA	√	√		1. 2L, 150 mL	22-12 min	无耗材 No
Oceantech Co., Ltd.	P. Counter	P	荧光图像处理 Fluorescence&Image Processing		√		1 滴到 500 毫升 1drop-500 mL	<1 min	无耗材 No
Satake	Ballast Eye	P ³	FDA 染色脉冲法 Pulse Counting FDA	√	√		100 mL 5 mL	16 min	有耗材 Yes
SixSenso Technologies	Integrated Ballast Testing	P ³	细胞计数法 Cytometry		√	√	250 mL, Flow through	<1 hour 2-4 hour	有耗材 Yes
Turner Designs	Ballast-Ch eck 2	P	活性荧光法 Fluorescence Active Fluorescence		√		3 mL	<1 min	无耗材 No

附录 D
(资料性)

IMO 压载水公约 42 号通函 D-2 标准详细检测方法
BWM. 2/Circ. 42/Rev. 2

检测项目 Indicator	检测方法 General approach	标准方法 Standard method	国际海事组织引用 IMO citation	备注 Notes	验证研究的置信水平和检出限 Level of confidence or detection limit and citation for validation studies
大于 50µm 存活生物和大于 10µm 且小于 50µm 存活生物	体视显微镜观察法计数。 也可以通过英冠染色和运动轨迹共同使用	没有国际标准,可参考美国环保署 ETV5.1 程序	BLG 15/5/5 and BLG 15/5/6 BLG 15/INF. 6	费用昂贵且耗时, 需要专业有素的人员从事(可以参考 OECD 测试指南中《水蚤的固定和繁殖实验》作为标准方法) Can be expensive and time-consuming, needs	有待研究 To be determined.

Viablenorganisms ≥ 50 μm and ≥10 and<50	Visual counts or stereomicroscopy examination. May be used with vital stains in conjunction with fluorescence+movement	No international standard for ballast water analysis ant this time,but see US EPA ETV Protocal.v. 5. 1		trained personnel. (Note that OECD Test Guideline for Testin of Chemicals 202, ” Daphnia sp.Acute immobilization test and reproduction test” could be used as bais for standard methodology.)	
大于 10μm 且 小于 50μm 存 活生物 Viablenorganisms ≥ 10 and<50	显微镜观察法 Visual counts with use of vital stains	没有国际标准供参 考 No international standard for ballast water analysis at this time.	BLG 15/5/10(method) BLG 15/5/5 and BLG 15/5/6(approach) MEPC 58/INF.10	需要专业的知识来验证，染色 需要注意技巧。 Requires specific knowledge to operate them. It should be noted that there maybe limitations using vital stains with certain technologies.	有待研究 To be determined. Steinberg et.al.,2011

大于 10µm 且 小于 50µm 存 活生物 Viable organisms ≥ 10 and<50	流式细胞仪（基于叶绿素 A 和计算机识别） Flow cytometers(based on chlorophyll a and vital stains)	没有国际标准可参 考 No international standard for ballast water analysis at this time.	BLG 15/5/5and BLG 15/5/6	价格昂贵并需要专业的技能来 操作，当压载水 Expensive and require specific knowledge to operate them. It should be noted that there may be limitation using vital stains with certain technologies.	有待验证 To be determined.
大于 50µm 存 活生物和大于 10µm 且 小 于 50µm 存活生物 Viable organisms ≥ 50 µm and	流式细胞仪（基于叶绿素 A 和计算机识别） Flow cameras (based on chlorophyll a and vital stains)	没有国际标准可供 参考 No international standard for ballast water analysis at this time.	BLG 15/5/5and BLG 15/5/6	价格昂贵并需要专业的技能来 操作，当压载水管理系统被污 染了可能会影响检测结果 Expensive and require specific knowledge to operate them.	有待验证 To be determined.

≥10 and<50				It should be noted that there may be limitations using vital stains with certain ballast water management systems.	
大于 50μm 存活生物和大于 10μm 且 小于 50μm 存活生物 Viable organisms ≥ 50 μm and ≥ 10 and<50	再生性培养法 Culture methods for recovery, regrowth and maturation	没有国际标准可供参考 No international standard for ballast water analysis at this Time.	BLG 15/5/5and BLG 15/5/6	密度表示为 2 周培养时间后可培养的自养生物和通过荧光显微镜测定的运动异养生物的总和 Densities are expressed as the sum of cultivable autotrophs after a 2-week incubation time and motile heterotrophs as detemined by epifluorescence microscopy.	科伦验证实验（2019） Validation available in Cullen(2019)

肠球菌 Enterococci	培养法 Culture methods	ISO 7899-1or ISO7899-2	BLG 15/5/5and BLG 15/5/6	需要专业的知识来操作，至少 需要 44h 培养时间 参考 EPA9239D 标准方法 Requires specific knowledge to conduct them. At least 44-h incubation time. EPA Standard Method 9239D	有待验证 To be determined
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	培养法 Culture methods	ISO 9308-3 OR ISO 9308-1	BLG 15/5/5and BLG 15/5/6	需要有专业的知识操作，至少 需要 24h 培养时间 参考 EPA9213D 标准方法 Requires specific knowledge to conduct them. At least24-h incubation time. EPA Standard Method 9213D	有待验证 To be determined

有毒霍乱弧菌 <i>Vibrio cholera</i> (01and0139)	培养法或者分子生物学方法或者荧光定量法 Culture and molecular biological or fluorescence methods	ISO/TS 21872-1/13/	BLG 15/5/5and BLG 15/5/6	需要有专业的知识操作，培养时间 24-48h 参考 EPA 检测方法(半定量法) 需要在特定的实验室开展工作 Requires specific knowledge to conduct them. 24-48h incubation time. US EPA ETV Fykse et al.2012(semi-quantitative pass/fail-test) Samples should only be cultred in a specialized laboratory.	有待验证 To be determined
---	---	-----------------------	--------------------------	--	--------------------------

附录 E
(规范性)

《国际船舶压载水与沉积物管理公约》D-2 排放标准生物指标

生物指标 Indicator Item	D-2 标准 D-2 Standard
$\geq 50\ \mu\text{m}$ 可存活生物 Viable organisms $\geq 50\ \mu\text{m}$	$< 10\ \text{inds./m}^3$
$\geq 10\ \mu\text{m}$ 且 $< 50\ \mu\text{m}$ 可存活生物 Viable organisms $\geq 10\ \mu\text{m}$ and $< 50\ \mu\text{m}$	$< 10\ \text{cells/mL}$
大肠埃希氏菌 <i>Escherichia coli</i>	$< 250\ \text{cfu/100 mL}$
肠球菌 Intestinal <i>Enterococci</i>	$< 100\ \text{cfu/100 mL}$
有毒霍乱弧菌 (01 和 0139) Toxicogenic <i>Vibrio cholerae</i> (01 and 0139)	$< 1\ \text{cfu/100 mL}$