

ICS

Z



中华人民共和国国家标准

GB 18466-2005

医疗机构水污染物排放标准

Discharge standard of water pollutants

for medical organization

(发布稿)

2005—07 — 27 发布

2006—01—01 实施

国家环境保护总局
国家质量监督检验检疫总局

发布

目 录

前 言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 技术内容	1
4.1 污水排放要求	1
4.2 废气排放要求	4
4.3 污泥控制与处置	4
5 处理工艺与消毒要求	4
6 取样与监测	5
6.1 污水取样与监测	5
6.2 大气取样与监测	7
6.3 污泥取样与监测	7
7 标准的实施与监督	7
附录 A	8
附录 B	15
附录 C	19
附录 D	21
附录 E	23
附录 F	25

前 言

为贯彻《中华人民共和国环境保护法》、《中华人民共和国水污染防治法》、《中华人民共和国海洋环境保护法》、《中华人民共和国大气污染防治法》、《中华人民共和国传染病防治法》，加强对医疗机构污水、污水处理站废气、污泥排放的控制和管理，预防和控制传染病的发生和流行，保障人体健康，维护良好的生态环境，制定本标准。

本标准规定了医疗机构污水及污水处理站产生的废气和污泥的污染物控制项目及其排放限值、处理工艺与消毒要求、取样与监测和标准的实施与监督等。

本标准自实施之日起，代替 GB8978-1996《污水综合排放标准》中有关医疗机构水污染物排放标准部分，并取代 GB18466-2001《医疗机构污水排放要求》。新、扩、改医疗机构自本标准实施之日起按本标准实施管理，现有医疗机构在 2007 年 12 月 31 日前达到本标准的要求。

本标准的附录 A、附录 B、附录 C、附录 D、附录 E 和附录 F 为规范性附录。

本标准首次发布。

本标准由国家环境保护总局科技标准司提出并归口。

本标准委托北京市环境保护科学研究所和中国疾病预防控制中心起草。

本标准由国家环境保护总局 2005 年 07 月 27 日批准。

本标准由国家环境保护总局负责解释。

医疗机构水污染物排放标准

1 范围

本标准规定了医疗机构污水、污水处理站产生的废气、污泥的污染物控制项目及其排放和控制限值、处理工艺和消毒要求、取样与监测和标准的实施与监督。

本标准适用于医疗机构污水、污水处理站产生污泥及废气排放的控制，医疗机构建设项目的环评评价、环境保护设施设计、竣工验收及验收后的排放管理。当医疗机构的办公区、非医疗生活区等污水与病区污水合流收集时，其综合污水排放均执行本标准。建有分流污水收集系统的医疗机构，其非病区生活区污水排放执行 GB8978 的相关规定。

2 规范性引用文件

下列标准和本标准表 5、表 6 所列分析方法标准及规范所含条文在本标准中被引用即构成为本标准的条文，与本标准同效。当上述标准和规范被修订时，应使用其最新版本。

GB8978 污水综合排放标准

GB3838 地表水环境质量标准

GB3097 海水水质标准

GB16297 大气污染物综合排放标准

HJ/T55 大气污染物无组织排放监测技术导则

HJ/T91 地表水和污水检测技术规范

3 术语和定义

本标准采用下列定义。

3.1 医疗机构 medical organization

指从事疾病诊断、治疗活动的医院、卫生院、疗养院、门诊部、诊所、卫生急救站等。

3.2 医疗机构污水 medical organization wastewater

指医疗机构门诊、病房、手术室、各类检验室、病理解剖室、放射室、洗衣房、太平间等处排出的诊疗、生活及粪便污水。当医疗机构其他污水与上述污水混合排出时一律视为医疗机构污水。

3.3 污泥 sludge

指医疗机构污水处理过程中产生的栅渣、沉淀污泥和化粪池污泥。

3.4 废气 waste gas

指医疗机构污水处理过程中产生的有害气体。

4 技术内容

4.1 污水排放要求

4.1.1 传染病和结核病医疗机构污水排放执行表 1 的规定。

4.1.2 县级及县级以上或 20 张床位及以上的综合医疗机构和其他医疗机构污水排放执行表 2

的规定。直接或间接排入地表水体和海域的污水执行排放标准，排入终端已建有正常运行城镇二级污水处理厂的下水道的污水，执行预处理标准。

4.1.3 县级以下或 20 张床位以下的综合医疗机构和其他所有医疗机构污水经消毒处理后方可排放。

4.1.4 禁止向 GB3838I、II 类水域和 III 类水域的饮用水保护区和游泳区，GB3097 一、二类海域直接排放医疗机构污水。

4.1.5 带传染病房的综合医疗机构，应将传染病房污水与非传染病房污水分开。传染病房的污水、粪便经过消毒后方可与其他污水合并处理。

4.1.6 采用含氯消毒剂进行消毒的医疗机构污水，若直接排入地表水体和海域，应进行脱氯处理，使总余氯小于 0.5mg/L。

表 1 传染病、结核病医疗机构水污染物排放限值（日均值）

序号	控制项目	标准值
1	粪大肠菌群数 (MPN/L)	100
2	肠道致病菌	不得检出
3	肠道病毒	不得检出
4	结核杆菌	不得检出
5	PH	6-9
6	化学需氧量 (COD) 浓度 (mg/L)	60
	最高允许排放负荷 (g/床位)	60
7	生化需氧量 (BOD) 浓度 (mg/L)	20
	最高允许排放负荷 (g/床位)	20
8	悬浮物 (SS) 浓度 (mg/L)	20
	最高允许排放负荷 (g/床位)	20
9	氨氮 (mg/L)	15
10	动植物油 (mg/L)	5
11	石油类 (mg/L)	5
12	阴离子表面活性剂 (mg/L)	5
13	色度 (稀释倍数)	30
14	挥发酚 (mg/L)	0.5
15	总氰化物 (mg/L)	0.5
16	总汞 (mg/L)	0.05
17	总镉 (mg/L)	0.1
18	总铬 (mg/L)	1.5
19	六价铬 (mg/L)	0.5
20	总砷 (mg/L)	0.5

21	总铅 (mg/L)	1.0
22	总银 (mg/L)	0.5
23	总 α (Bq/L)	1
24	总 β (Bq/L)	10
25	总余氯 ¹⁾²⁾ (mg/L) (直接排入水体的要求)	0.5
注：1) 采用含氯消毒剂消毒的工艺控制要求为：消毒接触池的接触时间 \geq 1.5h， 接触池出口总余氯 6.5-10 mg/L。 2) 采用其他消毒剂对总余氯不作要求。		

表 2 综合医疗机构和其他医疗机构水污染物排放限值（日均值）

序号	控制项目	排放标准	预处理标准
1	粪大肠菌群数 (MPN/L)	500	5000
2	肠道致病菌	不得检出	-
3	肠道病毒	不得检出	-
4	pH	6-9	6-9
5	化学需氧量 (COD) 浓度 (mg/L)	60	250
	最高允许排放负荷 (g/床位)	60	250
6	生化需氧量 (BOD) 浓度 (mg/L)	20	100
	最高允许排放负荷 (g/床位)	20	100
7	悬浮物 (SS) 浓度 (mg/L)	20	60
	最高允许排放负荷 (g/床位)	20	60
8	氨氮 (mg/L)	15	-
9	动植物油 (mg/L)	5	20
10	石油类 (mg/L)	5	20
11	阴离子表面活性剂 (mg/L)	5	10
12	色度 (稀释倍数)	30	-
13	挥发酚 (mg/L)	0.5	1.0
14	总氰化物 (mg/L)	0.5	0.5
15	总汞 (mg/L)	0.05	0.05
16	总镉 (mg/L)	0.1	0.1
17	总铬 (mg/L)	1.5	1.5
18	六价铬 (mg/L)	0.5	0.5

19	总砷 (mg/L)	0.5	0.5
20	总铅 (mg/L)	1.0	1.0
21	总银 (mg/L)	0.5	0.5
22	总 α (Bq/L)	1	1
23	总 β (Bq/L)	10	10
24	总余氯 ^{1) 2)} (mg/L)	0.5	-

注：1) 采用含氯消毒剂消毒的工艺控制要求为：
一级标准：消毒接触池接触时间 \geq 1h，接触池出口总余氯 3-10 mg/L。
二级标准：消毒接触池接触时间 \geq 1h，接触池出口总余氯 2-8 mg/L。
2) 采用其他消毒剂对总余氯不作要求。

4.2 废气排放要求

4.2.1 污水处理站排出的废气应进行除臭除味处理，保证污水处理站周边空气中污染物达到表 3 要求。

4.2.2 传染病和结核病医疗机构应对污水处理站排出的废气进行消毒处理。

表 3 污水处理站周边大气污染物最高允许浓度

序号	控制项目	标准值
1	氨 (mg/m ³)	1.0
2	硫化氢 (mg/m ³)	0.03
3	臭气浓度 (无量纲)	10
4	氯气 (mg/m ³)	0.1
5	甲烷 (指处理站内最高体积百分数 %)	1%

4.3 污泥控制与处置

4.3.1 栅渣、化粪池和污水处理站污泥属危险废物，应按危险废物进行处理和处置。

4.3.2 污泥清淘前应进行监测，达到表 4 要求。

表 4 医疗机构污泥控制标准

医疗机构类别	粪大肠菌群数 (MPN/g)	肠道致病菌	肠道病毒	结核杆菌	蛔虫卵死亡率 (%)
传染病医疗机构	\leq 100	不得检出	不得检出	-	$>$ 95
结核病医疗机构	\leq 100	-	-	不得检出	$>$ 95
综合医疗机构和其它医疗机构	\leq 100	-	-	-	$>$ 95

5 处理工艺与消毒要求

5.1 医疗机构病区和非病区的污水，传染病区和非传染病区的污水应分流，不得将固体传染性废物、各种化学废液弃置和倾倒入下水道。

5.2 传染病医疗机构和综合医疗机构的传染病房应设专用化粪池，收集经消毒处理后的粪便排泄物等传染性废物。

5.3 化粪池应按最高日排水量设计，停留时间为 24-36h。清掏周期为 180-360d。

5.4 医疗机构的各种特殊排水应单独收集并进行处理后，再排入医院污水处理系统。

5.4.1 低放射性废水应经衰变池处理。

5.4.2 洗相室废液应回收银，并对废液进行处理。

5.4.3 口腔科含汞废水应进行除汞处理。

5.4.4 检验室废水应根据使用化学品的性质单独收集，单独处理。

5.4.5 含油废水应设置隔油池处理。

5.5 传染病医疗机构和结核病医疗机构污水处理宜采用二级处理+消毒工艺或深度处理+消毒工艺。

5.6 综合医疗机构污水排放执行排放标准时，宜采用二级处理+消毒工艺或深度处理+消毒工艺；执行预处理标准时宜采用一级处理或一级强化处理+消毒工艺。

5.7 消毒剂应根据技术经济分析选用，通常使用的有：二氧化氯、次氯酸钠、液氯、紫外线和臭氧等。采用含氯消毒剂时按表 1、表 2 要求设计。

5.7.1 采用紫外线消毒，污水悬浮物浓度应小于 10 mg/L，照射剂量 30-40mJ/cm²，照射接触时间应大于 10s 或由试验确定。

5.7.2 采用臭氧消毒，污水悬浮物浓度应小于 20 mg/L，臭氧用量应大于 10mg/L，接触时间应大于 12min 或由试验确定。

6 取样与监测

6.1 污水取样与监测

6.1.1 应按规定设置科室处理设施排出口和单位污水外排口，并设置排放口标志。

6.1.2 表 1 第 16-22 项，表 2 第 15-21 项在科室处理设施排出口取样，总 α 、总 β 在衰变池出口取样监测。其它污染物的采样点一律设在排污单位的外排口。

6.1.2 医疗机构污水外排口处应设污水计量装置，并宜设污水比例采样器和在线监测设备。

6.1.3 监测频率

6.1.3.1 粪大肠菌群数每月监测不得少于 1 次。采用含氯消毒剂消毒时，接触池出口总余氯每日监测不得少于 2 次（采用间歇式消毒处理的，每次排放前监测）。

6.1.3.2 肠道致病菌主要监测沙门氏菌、志贺氏菌。沙门氏菌的监测，每季度不少于 1 次；志贺氏菌的监测，每年不少于 2 次。其他致病菌和肠道病毒按 6.1.3.3 规定进行监测。结核病医疗机构根据需要监测结核杆菌。

6.1.3.3 收治了传染病病人的医院应加强对肠道致病菌和肠道病毒的监测。同时收治的感染上同一种肠道致病菌或肠道病毒的甲类传染病病人数超过 5 人、或乙类传染病病人数超过 10 人、或丙类传染病病人数超过 20 人时，应及时监测该种传染病病原体。

6.1.3.4 理化指标监测频率：pH 每日监测不少于 2 次，COD 和 SS 每周监测 1 次，其他污染物每季度监测不少于 1 次。

6.1.3.5 采样频率：每 4 小时采样 1 次，一日至少采样 3 次，测定结果以日均值计。

6.1.4 监督性监测按 HJ/T91 执行。

6.1.5 监测分析方法按表 5 和附录。

6.1.6 污染物单位排放负荷计算见附录 F。

表 5 水污染物监测分析方法

序号	控制项目	测定方法	测定下限 (mg/L)	方法来源
1	粪大肠菌群数	多管发酵法		附录 A
2	沙门氏菌			附录 B
3	志贺氏菌			附录 C
4	结核杆菌			附录 E
5	总余氯	N,N-二乙基-1,4-苯二胺分光光度法 N,N-二乙基-1,4-苯二胺滴定法		GB11898 GB11897
6	化学需氧量(COD)	重铬酸盐法	30	GB11914
7	生化需氧量(BOD)	稀释与接种法	2	GB7488
8	悬浮物(SS)	重量法		GB11901
9	氨氮	蒸馏和滴定法 比色法	0.2 0.05	GB7478 GB7479
10	动植物油	红外光度法	0.1	GB/T16488
11	石油类	红外光度法	0.1	GB/T16488
12	阴离子表面活性剂	亚甲蓝分光光度法	0.05	GB7494
13	色度	稀释倍数法		GB11903
14	pH 值	玻璃电极法		GB6920
15	总汞	冷吸收分光光度法 双硫腺分光光度法	0.0001 0.002	GB7468 GB7469
16	挥发酚	蒸馏后 4-氨基安替比林分光光度法 硝酸银滴定法	0.002 0.25	GB7490 GB7486
17	总氰化物	异烟酸-吡啶啉酮比色法 吡啶-巴比妥酸比色法	0.004 0.002	GB7486 GB7486
18	总镉	原子吸收分光光度法（螯合萃取法） 双硫腺分光光度法	0.001 0.001	GB7475 GB7471
19	总铬	高锰酸钾氧化—二苯碳酰二肼分光光度法	0.004	GB7466
20	六价铬	二苯碳酰二肼分光光度法	0.004	GB7467
21	总砷	二乙基二硫代氨基甲酸银分光光度法	0.007	GB7485
22	总铅	原子吸收分光光度法（螯合萃取法） 双硫腺分光光度法	0.01 0.01	GB7475 GB7470
23	总银	火焰原子吸收分光光度法 镉试剂 2B 分光光度法	0.03 0.01	GB119079 GB11908
24	总α	厚源法	0.05Bq/L	EJ/T1075
25	总β	蒸发法		EJ/T900

6.2 大气取样与监测

6.2.1 污水处理站大气监测点的布置方法与采样方法按 GB16297 中附录 C 和 HJ/T55 的有关规定执行。

6.2.2 采样频率，每 2h 采样一次，共采集 4 次，取其最大测定值。每季度监测一次。

6.2.3 监测分析方法按表 6。

表 6 大气污染物监测分析方法

序号	控制项目	测定方法	方法来源
1	氨	次氯酸钠-水杨酸分光光度法	GB/T14679
2	硫化氢	气相色谱法	GB/T14678
3	臭气浓度（无量纲）	三点比较式臭袋法	GB/T14675
4	氯气	甲基橙分光光度法	HJ/T30
5	甲烷	气相色谱法	CJ/3037

6.3 污泥取样与监测

6.3.1 取样方法，采用多点取样，样品应有代表性，样品重量不小于 1kg。清掏前监测。

6.3.2 监测分析方法见附录 A、附录 B、附录 C、附录 D 和附录 E。

7 标准的实施与监督

7.1 本标准由县级以上人民政府环境保护行政主管部门负责监督实施。

7.2 省、自治区、直辖市人民政府对执行本标准不能达到本地区环境功能要求时，可以根据总量控制要求和环境影响评价结果制定严于本标准的地方污染物排放标准。

附录 A

(规范性附录)

医疗机构污水和污泥中粪大肠菌群的检验方法

A1 仪器和设备

A1.1 高压蒸汽灭菌器。

A1.2 干燥灭菌箱。

A1.3 培养箱：37℃。

A1.4 恒温水浴箱。

A1.5 电炉。

A1.6 天平。

A1.7 灭菌平皿。

A1.8 灭菌刻度吸管。

A1.9 酒精灯

A2 培养基和试剂

A2.1 乳糖胆盐培养液

A2.1.1 成分

蛋白胨	20g
猪胆盐（或牛、羊胆盐）	5g
乳糖	5g
0.4%溴甲酚紫水溶液	2.5mL
蒸馏水	1000mL

A2.1.2 制法

将蛋白胨、猪胆盐及乳糖溶解于 1000mL 蒸馏水中，调整 pH 到 7.4，加入指示剂，充分混匀，分装于内有倒管的试管中。115℃下灭菌 20min。贮存于冷暗处备用。

A2.2 三倍浓度乳糖胆盐培养液

A2.2.1 成分

蛋白胨	60g
猪胆盐（或牛、羊胆盐）	15g
乳糖	15g
0.4%溴甲酚紫水溶液	7.5mL
蒸馏水	1000mL

A2.2.2 制法

制法同附录 A2.1.2。

A2.3 伊红美兰培养基（EMB 培养基）

A2.3.1 成分

蛋白胨	10g
乳糖	10g
磷酸氢二钾	2g
琼脂	20g
2%伊红水溶液	20mL
0.5%美蓝水溶液	13mL

蒸馏水 1000mL

A2.3.2 制法

将琼脂加到 900mL 蒸馏水中，加热溶解，然后加入磷酸氢二钾和蛋白胨，混匀使溶解，再加入蒸馏水补足至 1000mL，调整 pH 至 7.2~7.4。趁热用脱脂棉和砂布过滤，再加入乳糖，混匀，定量分装于烧瓶内，115℃ 灭菌 20min。作为储备培养基贮存于冷暗处备用。

临用时，加热融化储备培养基，待冷至 60℃ 左右，根据烧瓶内培养基的容量，加入一定量的已灭菌的 2% 伊红水溶液和 0.5% 美蓝水溶液，充分摇匀（防止产生气泡）。倾注平皿备用。

A2.4 乳糖蛋白胨培养液

A2.4.1 成分

蛋白胨	10g
牛肉膏	3g
乳糖	5g
氯化钠	5g
1.6% 溴甲酚紫乙醇溶液	1mL
蒸馏水	1000mL

A2.4.2 制法

将蛋白胨、牛肉膏、乳糖及氯化钠加热溶解于 1000mL 蒸馏水中，调整 pH 到 7.2~7.4，加入 1.6% 溴甲酚紫乙醇溶液 1mL，充分混匀，分装于内有倒管的试管中。115℃ 下灭菌 20min。贮存于冷暗处备用。

A2.5 革兰氏染色液

A2.5.1 结晶紫染色液

结晶紫	1g
95% 乙醇溶液	20mL
1% 草酸铵水溶液	1000mL

将结晶紫溶于乙醇中，然后与草酸铵水溶液混合。

A2.5.2 革兰氏碘液

碘	1g
碘化钾	2g
蒸馏水	300mL

将碘与碘化钾混合，加入蒸馏水少许，充分摇匀，待完全溶解，再加入蒸馏水至 300mL。

A2.5.3 脱色液

95% 乙醇。

A2.5.4 沙黄复染液

沙黄	1g
95% 乙醇	2g
蒸馏水	90mL

将沙黄溶于 95% 乙醇中，然后用蒸馏水稀释。

A2.6 染色法

染色的基本步骤为：1) 涂片：在载玻片上滴加一滴生理盐水，用灭菌的接种环取菌落少许，与生理盐水混匀，涂布成薄膜；2) 干燥：在室温中使自然干燥；3) 固定：将涂片迅速通过火焰 2~3 次，以载玻片反面接触皮肤，热而不烫为度；4) 染色：滴加结晶紫染色液，染色 1min，水洗；5) 媒染：滴加革兰氏碘液，作用 1min，水洗；6) 脱色：滴加 95% 乙醇脱色，约 30s，水洗；7) 复染：滴加复染液，复染 1min，水洗。

革兰氏阳性菌染色后呈紫色，革兰氏阴性菌染色后呈红色。

注：亦可用 1: 10 稀释的石炭酸复红染色液作复染剂，复染时间为 10s。

A3 检验程序

检验程序见图 A.

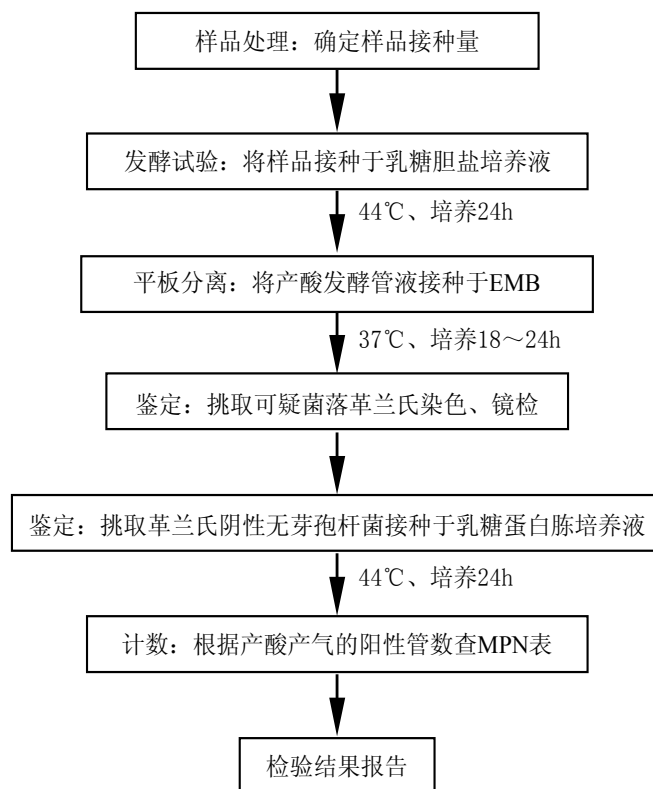


图 A 污水、污泥中粪大肠菌群检验程序

A4 操作步骤

A4.1 样品准备

A4.1.1 污水

污水样品应至少取 200mL，使用前应充分混匀。

根据预计的污水样品中粪大肠菌群数确定污水样品接种量。粪大肠菌群数量相对较少的接种量一般为 10mL、1mL、0.1mL。粪大肠菌群数较多时接种量为 1mL、0.1mL、0.01mL 或 0.1mL、0.01mL、0.001mL 等。

接种量少于 1mL 时，水样应制成稀释样品后供发酵试验使用。接种量为 0.1mL、0.01mL 时，取稀释比分别为 1:10、1:100。其它接种量的稀释比依此类推。

1:10 稀释样品的制作方法为：吸取 1mL 水样，注入到盛有 9mL 灭菌水的试管中，混匀，制成 1:10 稀释样品。因此，取 1mL 1:10 稀释样品，等于取 0.1mL 污水样品。其它稀释比的稀释样品同法制作。

注 1：若样品为经过氯消毒的污水，应在采样后立即用 5% 硫代硫酸钠溶液充分中和余氯。

A4.1.2 污泥

污泥样品应至少取 200g，使用前应充分混匀。

根据预计的污泥样品中粪大肠菌群数量确定污泥样品接种量。粪大肠菌群数量相对较少的污泥样品接种量一般为 0.1g、0.01g、0.001g。粪大肠菌群数量较多时接种量为 0.01g、0.001g、0.0001g 或 0.001g、0.0001g、0.00001g 等。

污泥样品应制成稀释样品后供发酵试验使用。接种量 0.1g、0.01g、0.001g 的稀释样品制作方法如下：取 20g 污泥样品，加入到三角烧瓶中，加灭菌水使成 200mL，混匀，制成 1:10 稀释样品。吸取 1:10 稀释样品 1mL，注入到盛有 9mL 灭菌水的试管中，混匀，制成 1:100 稀释样品。按同法制成 1:1000 稀释样品。接种 1mL 1:10、1:100、1:1000 稀释样品等于接种 0.1g、0.01g、0.001g 污泥样品。

注 1：若样品为经过氯消毒的污泥，应在采样后立即用 5% 硫代硫酸钠溶液充分中和余氯。

A4.2 发酵试验

将样品接种于装有乳糖胆盐培养液的试管（内有小倒管）中，44℃ 培养 24h。样品接种体积以及管内乳糖胆盐培养液的浓度与体积根据以下条件确定：

样品为污水时，取三个接种量、每个接种量的样品分别接种于 5 个试管内，共需 15 个试管。试管内乳糖胆盐培养液的浓度与体积应根据接种量确定。若接种量为 10mL，吸取 10mL 样品接种于装有 5mL 三倍浓度乳糖胆盐培养液的试管内；若接种量为 1mL 时，吸取 1mL 样品接种于装有 10mL 普通浓度乳糖胆盐培养液的试管内；若接种量少于 1mL 时，吸取 1mL 稀释样品接种于装有 10mL 普通浓度乳糖胆盐培养液的试管内。

样品为污泥时，取三个接种量、每个接种量的稀释样品分别接种于 3 个试管内，共需 9 个试管。9 个试管中，各装有 10mL 乳糖胆盐培养液。各个试管接种稀释样品体积均为 1mL。

A4.3 平板分离

大肠杆菌分解乳糖产酸时培养液变色、产气时小倒管内出现气泡。经 24h 培养后，将产酸的试管内培养液分别划线接种于 EMB 培养基上。置于 37℃ 培养箱中，培养 18~24h。

A4.4 鉴定

挑选可疑粪大肠菌群菌落，进行革兰氏染色和镜检。可疑菌落有：1) 深紫黑色，具有金属光泽的菌落；2) 紫黑色，不带或略带金属光泽的菌落；3) 淡紫红色，中心色较深的菌落。

上述涂片镜检的菌落如为革兰氏阴性无芽孢杆菌，则挑取上述典型菌落 1~3 个接种于盛有 5mL 乳糖蛋白胨培养液倒管和倒管的试管内，置于 44℃ 培养箱中培养 24h。产酸产气试管为粪大肠菌群阳性管。

A5 计数

根据证实有粪大肠菌群存在的阳性管数，查表 A1 或 A2 可得 100mL 污水或 1g 污泥中粪大肠菌群 MPN 值。

由于表 A1 和表 A2 是按一定的三个 10 倍浓度差接种量设计的（污水接种量为 10mL、1mL 和 0.1mL，污泥接种量为 0.1g、0.01g 和 0.001g），当采用其他三个 10 倍浓度差接种量时，需要修正表内 MPN 值，具体方法如下：

表内所列污水（污泥）最大接种量增加 10 倍时表内 MPN 值相应降低 10 倍；污水（污泥）最大接种量减少 10 倍时表内 MPN 值相应增加 10 倍。如污水接种量改为 1mL、0.1mL 和 0.01mL 时，A1 表内 MPN 值相应增加 10 倍。其它三个 10 倍浓度差接种量的 MPN 值相应类推。

由于 A1 表内 MPN 值的单位为每 100mL 污水样品中 MPN 值，而污水以 1L 为报告单位，因此需将查 A1 表得到的 MPN 值乘上 10，换算成 1L 污水样品中的 MPN 值。

表 A1 污水中粪大肠菌群最可能数 (MPN) 检索表
(污水样品接种量为 5 份 10mL 水样, 5 份 1mL 水样和 5 份 0.1mL 水样)

阳性管数				每	阳性管数				每	阳性管数				每
接种	接种	接种	100mL	100mL	接种	接种	接种	100mL	100mL	接种	接种	接种	100mL	100mL
100mL	10mL	0.1mL	水样中		100mL	10mL	0.1mL	水样中		100mL	10mL	0.1mL	水样中	
水样	水样	水样	MPN	水样	水样	水样	MPN	水样	水样	水样	MPN			
0	0	0	0	2	0	0	5	4	0	0	13			
0	0	1	2	2	0	1	7	4	0	1	17			
0	0	2	4	2	0	2	9	4	0	2	21			
0	0	3	5	2	0	3	12	4	0	3	25			
0	0	4	7	2	0	4	14	4	0	4	30			
0	0	5	9	2	0	5	16	4	0	5	36			
0	1	0	2	2	1	0	7	4	1	0	17			
0	1	1	4	2	1	1	9	4	1	1	21			
0	1	2	6	2	1	2	12	4	1	2	26			
0	1	3	7	2	1	3	14	1	1	3	31			
0	1	4	9	2	1	4	17	4	1	4	36			
0	1	5	11	2	1	5	19	4	1	5	42			
0	2	0	4	2	2	0	9	4	2	0	22			
0	2	1	6	2	2	1	12	4	2	1	26			
0	2	2	7	2	2	2	14	4	2	2	32			
0	2	3	9	2	2	3	17	4	2	3	38			
0	2	4	11	2	2	4	19	4	2	4	44			
0	2	5	13	2	2	5	22	4	2	5	50			
0	3	0	6	2	3	0	12	4	3	0	27			
0	3	1	7	2	3	1	14	4	3	1	33			
0	3	2	9	2	3	2	17	4	3	2	39			
0	3	3	11	2	3	3	20	4	3	3	45			
0	3	4	13	2	3	4	22	4	3	4	52			
0	3	5	15	2	3	5	25	4	3	5	59			
0	4	0	8	2	4	0	15	4	4	0	34			
0	4	1	9	2	4	1	17	4	4	1	40			
0	4	2	11	2	4	2	20	4	4	2	47			
0	4	3	13	2	4	3	23	4	4	3	54			
0	4	4	15	2	4	4	25	4	4	4	62			
0	4	5	17	2	4	5	28	4	4	5	69			
0	5	0	9	2	5	0	17	4	5	0	41			
0	5	1	11	2	5	1	20	4	5	1	48			
0	5	2	13	2	5	2	23	4	5	2	56			
0	5	3	15	2	5	3	26	4	5	3	64			
0	5	4	17	2	5	4	29	4	5	4	72			
0	5	5	19	2	5	5	32	4	5	5	81			

阳性管数			每 100mL 水样中 MPN	阳性管数			每 100mL 水样中 MPN	阳性管数			每 100mL 水样中 MPN
接种 100mL 水样	接种 10mL 水样	接种 0.1mL 水样		接种 100mL 水样	接种 10mL 水样	接种 0.1mL 水样		接种 100mL 水样	接种 10mL 水样	接种 0.1mL 水样	
1	0	0	2	3	0	0	8	5	0	0	23
1	0	1	4	3	0	1	11	5	0	1	31
1	0	2	6	3	0	2	13	5	0	2	43
1	0	3	8	3	0	3	16	5	0	3	58
1	0	4	10	3	0	4	20	5	0	4	76
1	0	5	12	3	0	5	23	5	0	5	95
1	1	0	4	3	1	0	11	5	1	0	33
1	1	1	6	3	1	1	14	5	1	1	46
1	1	2	8	3	1	2	17	5	1	2	63
1	1	3	10	3	1	3	20	5	1	3	84
1	1	4	12	3	1	4	23	5	1	4	110
1	1	5	14	3	1	5	27	5	1	5	130
1	2	0	6	3	2	0	14	5	2	0	49
1	2	1	8	3	2	1	17	5	2	1	70
1	2	2	10	3	2	2	20	5	2	2	94
1	2	3	12	3	2	3	24	5	2	3	120
1	2	4	15	3	2	4	27	5	2	4	150
1	2	5	17	3	2	5	31	5	2	5	180
1	3	0	8	3	3	0	17	5	3	0	79
1	3	1	10	3	3	1	21	5	3	1	110
1	3	2	12	3	3	2	24	5	3	2	140
1	3	3	15	3	3	3	28	5	3	3	180
1	3	4	17	3	3	4	32	5	3	4	210
1	3	5	19	3	3	5	36	5	3	5	250
1	4	0	11	3	4	0	21	5	4	0	130
1	4	1	13	3	4	1	24	5	4	1	170
1	4	2	15	3	4	2	28	5	4	2	220
1	4	3	17	3	4	3	32	5	4	3	280
1	4	4	19	3	4	4	36	5	4	4	350
1	4	5	22	3	4	5	40	5	4	5	430
1	5	0	13	3	5	0	25	5	5	0	240
1	5	1	15	3	5	1	29	5	5	1	350
1	5	2	17	3	5	2	32	5	5	2	540
1	5	3	19	3	5	3	37	5	5	3	920
1	5	4	22	3	5	4	41	5	5	4	1600
1	5	5	24	3	5	5	45	5	5	5	>1600

表 A2 污泥中粪大肠菌群最可能数 (MPN) 检索表

(污泥样品接种量为 3 份 0.1g 泥样, 3 份 0.01g 泥样和 3 份 0.001g 泥样)

阳性管数			每 1g 泥样 中 MPN	阳性管数			每 1g 泥样 中 MPN	阳性管数			每 1g 泥样 中 MPN
接种 0.1 g 污样 管	接种 0.01 g 污样 管	接种 0.001 g 污样 管		接种 0.1 g 污样 管	接种 0.01 g 污样 管	接种 0.001 g 污样 管		接种 0.1 g 污样 管	接种 0.01 g 污样 管	接种 0.001 g 污样 管	
0	0	0	<3	1	2	0	11	3	0	0	23
0	0	1	3	1	2	1	15	3	0	1	39
0	0	2	6	1	2	2	20	3	0	2	64
0	0	3	9	1	2	3	24	3	0	3	95
0	1	0	3	1	3	0	16	3	1	0	43
0	1	1	6.1	1	3	1	20	3	1	1	75
0	1	2	9.2	1	3	2	24	3	1	2	120
0	1	3	12	1	3	3	29	3	1	3	160
0	2	0	6.2	2	0	0	9.1	3	2	0	93
0	2	1	9.3	2	0	1	14	3	2	1	150
0	2	2	12	2	0	2	20	3	2	2	210
0	2	3	16	2	0	3	26	3	2	3	290
0	3	0	9.4	2	1	0	15	3	3	0	240
0	3	1	13	2	1	1	20	3	3	1	460
0	3	2	16	2	1	2	27	3	3	2	1100
0	3	3	19	2	1	3	34	3	3	3	>1100
1	0	0	3.6	2	2	0	21				
1	0	1	7.2	2	2	1	28				
1	0	2	11	2	2	2	35				
1	0	3	15	2	2	3	42				
1	1	0	7.3	2	3	0	29				
1	1	1	11	2	3	1	36				
1	1	2	15	2	3	2	44				
1	1	3	19	2	3	3	53				

A6 检验结果报告

根据粪大肠菌群 MPN 值, 报告 1L 污水或 1g 污泥样品中粪大肠菌群 MPN 值。

附录 B

(规范性附录)

医疗机构污水和污泥中沙门氏菌的检验

B1 仪器和设备

B1.1 高压蒸汽灭菌器。

B1.2 干燥灭菌箱。

B1.3 培养箱。

B1.4 恒温水浴箱。

B1.5 电炉。

B1.6 天平。

B1.7 灭菌平皿。

B1.8 灭菌刻度吸管。

B1.9 酒精灯。

B2 培养基和试剂

B2.1 亚硒酸盐增菌液(SF 增菌液)

B2.1.1 成分

胰蛋白胨(或多价胨)	10g
磷酸氢二钠(Na_2HPO_3)	16g
磷酸二氢钠(NaH_2PO_3)	2.5g
乳 糖	4g
亚硒酸氢钠	4g
蒸馏水	1000mL

B2.1.2 制法

除亚硒酸氢钠外,将以上各成分放入蒸馏水中,加热溶化。再加入亚硒酸氢钠,待完全溶解后,调整 pH 到 7.0~7.1,分装于三角烧杯内。121℃下灭菌 15min 备用。

B2.2 二倍浓度亚硒酸盐增菌液(二倍浓度 SF 增菌液)

B2.2.1 成分

除蒸馏水改为 500mL 外,其它成分同附录 B2.1.1。

B2.2.2 制法

制法同附录 B2.1.2。

B2.3 SS 培养基

B2.3.1 基础培养基

B2.3.1.1 成分

牛肉膏	5g
示胨	5g
三号胆盐	3.5g
琼脂	17g
蒸馏水	1000mL

B2.3.1.2 制法

将牛肉膏、示胨和胆盐溶解于 400mL 蒸馏水中。将琼脂加到 600mL 蒸馏水中,煮沸使其溶解。再将二者混合,121℃下灭菌 15min,保存备用。

B2.3.2 完成培养基

B2.3.2.1 成分

基础培养基	1000mL
-------	--------

乳糖	10g
柠檬酸钠	8.5g
硫代硫酸钠	8.5g
10%柠檬酸铁溶液	10mL
1%中性红溶液	2.5mL
0.1%煌绿溶液	0.33mL

B2.3.2.2 制法

加热溶化基础培养基，按比例加入除中性红和煌绿溶液以外的各成分，充分混合均匀，调整 pH 到 7.0，加入中性红和煌绿溶液，倾注平板。

注：制好的培养基宜当日使用，或保存于冰箱内于 18h 内使用。煌绿溶液配好后应在 10 天以内使用。

B2.4 亚硫酸铋琼脂培养基（BS 培养基）

B2.4.1 基础培养基

B2.4.1.1 成分

蛋白胨	10g
牛肉膏	5g
氯化钠	5g
琼脂	20g
蒸馏水	1000mL

B2.4.1.2 制法

加热溶解各成分，按每份 100mL 的量分装于 250mL 三角瓶中，121℃ 下灭菌 20min 备用。

B2.4.2 亚硫酸铋贮备液

B2.4.2.1 成分

柠檬酸铋铵	2g
亚硫酸钠	20g
磷酸氯二钠	10g
葡萄糖	10g
蒸馏水	200mL

B2.4.2.2 制法

将柠檬酸铋铵溶解于 50mL 沸水中，同时将亚硫酸钠溶解于 100mL 沸水中，混合两液并煮沸 3min，趁热加入磷酸氯二钠搅拌至溶解。冷却后，加入剩余的 50mL 葡萄糖水溶液，贮存于冰箱中。

B2.4.3 柠檬酸铁煌绿贮备液

B2.4.3.1 成分

柠檬酸铁	2g
煌绿（1%水溶液）	25mL
蒸馏水	200mL

B2.4.3.2 制法

将上述成分溶解于水中，盛于已灭菌的玻璃瓶内，贮存于冰箱。

B2.4.4 完成培养基

B2.4.4.1 成分

基础培养基	100mL
亚硫酸铋贮备液	20mL
柠檬酸铁煌绿贮备液	4.5mL

B2.4.4.2 制法

加热融化基础培养基并冷却至 50℃，同时分别加热亚硫酸铋贮备液和柠檬酸铁煌绿贮备液至 50℃。在无菌操作下将后者加入到前者去，充分混合，无菌倾入已灭菌的培养皿中。

B2.5 三糖铁琼脂培养基（TSI 培养基）

B2.5.1 成分

蛋白胨	20g
牛肉膏	5g
乳糖	10g
蔗糖	10g
葡萄糖	1g
氯化钠	5g
硫酸亚铁铵	0.2g
硫代硫酸钠	0.2g
琼脂	12g
酚红	0.025g
蒸馏水	1000mL

B2.5.2 制法

将除琼脂和酚红以外的各成分溶解于蒸馏水中，调 pH 到 7.4。加入琼脂，加热煮沸，再加入 0.2%酚红水溶液 12.5mL，摇匀。分装试管，装量宜多些，以便得到较高的底层。121℃下灭菌 15min。放置高层斜面备用。

B2.6 沙门氏菌诊断血清

B3 检验程序

检验程序见图 B。

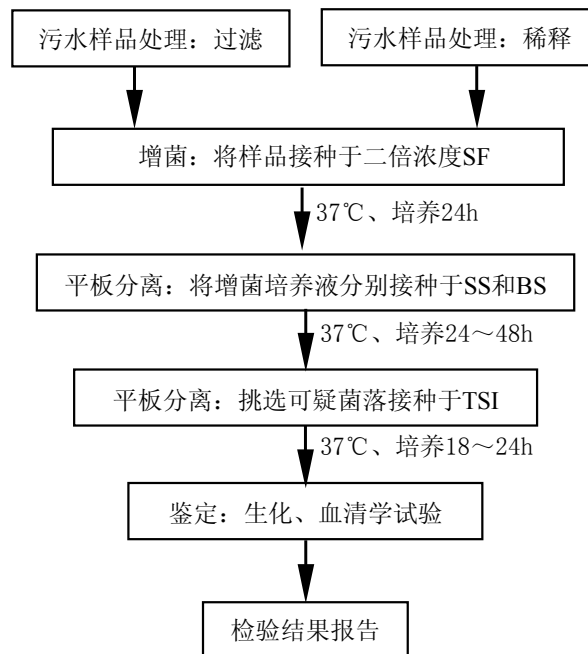


图 B 污水、污泥中沙门氏菌检验程序

B4 操作步骤

B4.1 样品处理和增菌

B4.1.1 污水

取 200mL 污水，用灭菌滤膜进行抽滤。用 100mL 二倍浓度 SF 增菌液把滤膜上截留的杂质洗脱到灭菌三角烧瓶内，充分摇匀，置于 37℃ 恒温培养箱，增菌培养 12~24h。

注：若样品为经过氯消毒的污水，应在采样后立即用 5% 硫代硫酸钠溶液充分中和余氯。

B4.1.2 污泥

用灭菌匙称取污泥 20g，放入灭菌容器内，加入 200mL 灭菌水，充分混匀，制成 1:10 混悬液。吸取上述 1:10 混悬液 100mL，加入到装有 100mL 二倍浓度 SF 增菌液的已灭菌的三角烧瓶内，摇匀，置于 37℃ 恒温培养箱，增菌培养 24h。

注：若样品为经过氯消毒的污泥，应在采样后立即用 5% 硫代硫酸钠溶液充分中和余氯。

B4.2 平板分离

取上述增菌培养液，分别接种于 SS 培养基平板和 BS 培养基平板，置于 37℃ 培养箱中，培养 24~48h。观察各平板上生长的菌落形态。

挑取在 SS 培养基平板上呈无色透明或中间有黑心，直径 1~2mm 的菌落；挑取在 BS 培养基平板上呈黑色的菌落或灰绿色的可疑肠道病原菌菌落。每个平板最少挑取 5 个菌落，接种于 TSI 培养基中，置于 37℃ 培养箱中，培养 18~24h。

B4.3 鉴定

B4.3.1 血清学试验

在 TSI 培养基中，如不发酵乳糖，发酵葡萄糖产酸产气或只产酸不产气，一般产生硫化氢，有动力者，先与沙门氏 A-F 群 O 多价血清作玻璃片凝集，凡与多价 O 血清凝集者，再与 O 因子血清凝集，以确定所属群别，然后用 H 因子血清，确定血清型。双向菌株应证实两相的 H 抗原，有 Vi 抗原的菌型(伤寒和丙型副伤寒沙门氏菌)应用 Vi 因子血清检验。

B4.3.2 生化试验

应进行葡萄糖、甘露醇、麦芽糖、乳糖、蔗糖、靛基质、硫化氢、动力、尿素试验。沙门氏菌属中除伤寒沙门氏菌和鸡沙门氏菌不产气外，通过发酵葡萄糖、产气、均发酵甘露醇和麦芽糖(但猪沙门氏菌、雏沙门氏菌不发酵麦芽糖)，不分解乳糖、蔗糖，尿素酶和靛基质为阴性，通常产生硫化氢。除鸡、雏沙门氏菌和伤寒沙门氏菌的 O 型菌株无动力外，通常均有动力。

如遇多价 O 血清不凝集而一般生化反应符合上述情况时，可加做侧金盏花醇、水杨素和氰化钾试验，沙门氏菌均为阴性。

B5 检验结果报告

根据检验结果，报告一定体积的样品中存在或不存在沙门氏菌。

附录 C

(规范性附录)

医疗机构污水及污泥中志贺氏菌的检验方法

C1 仪器和设备

C1.1 高压蒸汽灭菌器

C1.2 干燥灭菌箱。

C1.3 培养箱。

C1.4 恒温水浴箱。

C1.5 电炉。

C1.6 天平。

C1.7 灭菌平皿。

C1.8 灭菌刻度吸管。

C1.9 酒精灯。

C2 培养基和培养液

C2.1 革兰氏阴性增菌液(GN 增菌液)

C2.1.1 成分

胰蛋白胨(或多价胨)	20g
葡萄糖	1g
甘露醇	2g
枸橼酸钠	5g
去氧胆酸钠	0.5g
磷酸氢二钾	16g
磷酸二氢钾	2.5g
氯化钠	5g
蒸馏水	1000mL

C2.1.2 制法

将以上各成分加入蒸馏水中溶化,调整 pH 至 7.0,煮沸过滤,115℃下灭菌 20min。贮存于冷暗处备用。

C2.2 二倍浓度革兰氏阴性增菌液(二倍浓度 GN 增菌液)

C2.2.1 成分

除蒸馏水改为 500mL 外,其它成分同附录 C2.1.1。

C2.2.2 制法

制法同附录 C2.1.2。

C2.3 SS 培养基

同附录 B2.3。

C2.4 伊红美蓝琼脂培养基(EMB 培养基)

同附录 A2.3。

C2.5 三糖铁琼脂(TSI 培养基)

同附录 B2.5。

C2.6 志贺氏菌诊断血清

C3 检验程序

检验程序见图 C。

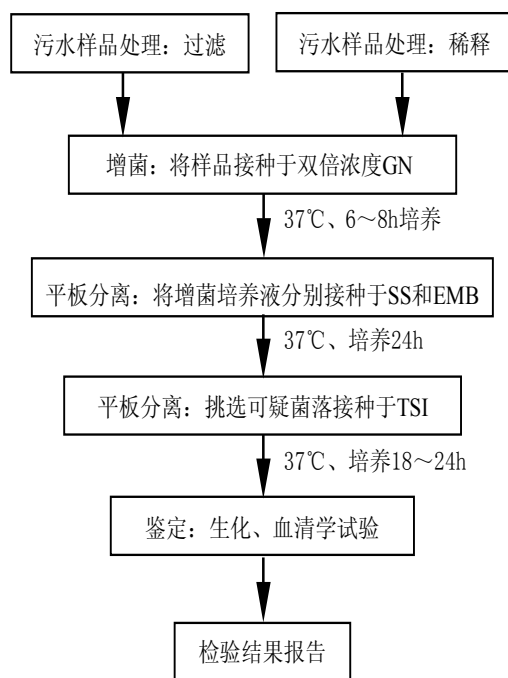


图 C 污水、污泥中志贺氏菌检验程序

C4 操作步骤

C4.1 样品处理和增菌培养

C4.1.1 污水

取 200mL 污水，用灭菌滤膜进行抽滤。用 100mL 二倍浓度 GN 增菌液把滤膜上截留的杂质洗脱到已灭菌的三角烧瓶内，摇匀，置于 37°C 恒温培养箱，增菌培养 6~8h。

注：若样品为经过氯消毒的污水，应在采样后立即用 5% 硫代硫酸钠溶液充分中和余氯。

C4.1.2 污泥

取污泥 30g，放入灭菌容器内，加入 300mL 灭菌水，充分混匀制成 1:10 混悬液。吸取上述 1:10 混悬液 100mL，加入到装有 100mL 二倍浓度 GN 增菌液的已灭菌的三角烧瓶内，搅匀，置于 37°C 恒温培养箱中，增菌培养 6~8h。

注：若样品为经过氯消毒的污泥，应在采样后立即用 5% 硫代硫酸钠溶液充分中和余氯。

C4.2 分离

取上述增菌培养液，分别接种 SS 培养基平板和 EMB 培养基平板，置于 37°C 培养箱中培养 24h。

挑取在 SS 培养基平板和 EMB 培养基平板上呈无色透明，直径 1~1.5mL 的可疑肠道病原菌菌落。每个平板最少挑取 5 个菌落，接种于 TSI 培养基，置于 37°C 培养箱中培养 18~24h。

挑取在 TSI 中，葡萄糖产酸不产气，无动力，不产生硫化氢，上层斜面乳糖不分解的菌株，可做血清学和生化试验。

C4.3 鉴定

C4.3.1 血清学试验

志贺氏菌属分为四个群，先与多价血清作玻璃片凝集试验，如为阳性，再分别与 A、B、C、D 群血清凝集，并进一步与分型血清做玻璃片凝集，最后确定其血清型。

C4.3.2 生化试验

应进行葡萄糖、甘露醇、麦芽糖、乳糖、蔗糖、靛基质、硫化氢、动力、尿素试验。志

贺氏菌属能分解葡萄糖，但不产气(福氏志贺氏菌 6 型有时产生少量气体)，一般不能分解乳糖和蔗糖，宋内氏志贺氏菌对乳糖和蔗糖迟缓发酵产酸。志贺氏菌属均不产生硫化氢，不分解尿素，无动力。对甘露醇、麦芽糖的发酵及靛基质的产生，则因菌株不同而异。

如遇多价血清玻璃片凝集试验为阴性，而生化反应符合上述情况时，可加做肌醇、水杨酸、V-P、鞣酸盐、氰化钾等试验。志贺氏菌属均为阴性反应。

C5 检验结果报告

根据检验结果，报告一定体积的样品中存在或不存在志贺氏菌。

附录 D

(标准的附录)

医疗机构污泥中蛔虫卵的检验方法

D1 仪器和设备

- D1.1 离心机。
- D1.2 金属筛：60 目。
- D1.3 显微镜。
- D1.4 恒温培养箱。
- D1.5 高压蒸汽灭菌器。
- D1.6 冰箱。
- D1.7 振荡器。

D2 培养基和试剂

- D2.1 3%福尔马林溶液或 3%盐酸溶液
- D2.2 饱和硝酸钠溶液（比重 1.38~1.40）或饱和氯化钠溶液
- D2.3 30%次氯酸钠溶液

D3 检验程序

蛔虫卵检验程序见图 D。

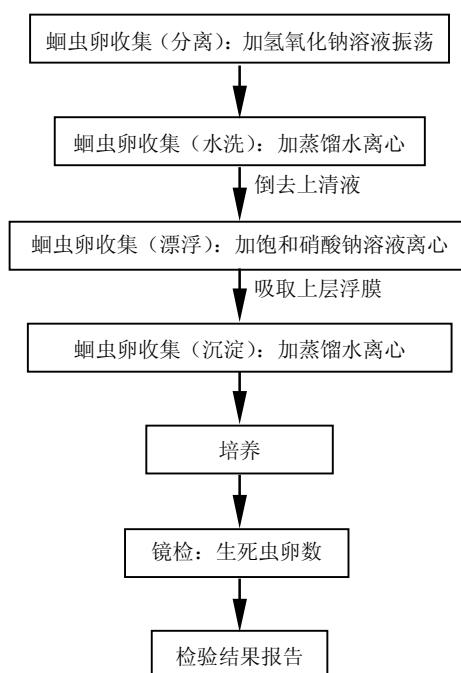


图 D 污泥中蛔虫卵检验程序

D4 操作步骤

D4.1 采样及样品处理

样品采集后应立即送到实验室检验。若不能立即检验时，可在 100g 污泥中加入 5mL3% 福尔马林或 3% 盐酸溶液，在 4~10℃ 冰箱内保存。若样品为经过氯消毒的污泥，应在现场取样后立即用 5% 硫代硫酸钠溶液充分中和余氯。

D4.2 蛔虫卵收集

D4.2.1 分离

将 100g 污泥样品和 50mL5% 氢氧化钠溶液，分别注入三角烧杯内，置于振荡器上，以 200~300 次/min 速度振荡 30min，然后静置 30min，以使蛔虫卵不再粘附在污泥上。

D4.2.2 水洗

将上述样品分装在离心管内，以 2000~2500 转/min 的转速离心 5min。倒去离心管上部的液体，加入容量为沉淀物 10 倍的蒸馏水，混匀，以 2000~2500 转/min 的转速离心 5min，如此反复数次，直至沉淀物上面的液体接近透明。

D4.2.3 漂浮

离心管内注入饱和硝酸钠溶液或饱和氯化钠溶液，搅匀，以 2000~2500 转/min 的转速离心 5min。

注 1：由于蛔虫卵的相对密度小于饱和硝酸钠溶液和饱和氯化钠溶液的相对密度，管内绝大多数的蛔虫卵会浮聚在液面上。

注 2：氯化钠溶液投加量以大于沉淀物量 20 倍为宜。

注 3：根据污泥性状，可以调整离心转速或时间。

D4.2.4 沉淀

反复吸取管中浮膜转移至另一离心管中，加入 10 倍水量的蒸馏水，搅匀，以 5000 转/min 的转速离心 5min，慢慢吸去上清液。

注：由于蛔虫卵比水的相对密度大，蛔虫卵将沉在管底内。

D4.3 培养

在离心管中，加入 2~3mL 无菌的生理盐水或自来水和几滴 3% 福尔马林溶液，摇匀，转移至试管或直接置于 24~26℃ 恒温箱，培养 20 天。培养中，若溶液量少于 2mL 时，应及时补充生理盐水或自来水。

D4.4 镜检

培养后，将样品静置 30min 后吸去试管内上层较浑浊的液体，加入约为沉淀物两倍量的蒸馏水或 30% 次氯酸钠溶液，混匀，在显微镜下计数死活蛔虫卵数。

注 1：活虫卵经过 20 天的培养会逐渐发育到幼虫期，而死虫卵则在同一条件下仍然保持单细胞期或停留于某一发育阶段，故可以区别。

注 2：30% 次氯酸钠溶液能使虫卵最外层蛋白质壳逐渐溶解，便于在显微镜下清晰观察卵内的幼虫。

D5 蛔虫卵死亡率计算

按下式计算蛔虫卵死亡率：

$$A = \frac{m}{m+n} \times 100$$

公式中：A——蛔虫卵死亡率（%）；

m——死亡蛔虫卵数；

n——存活蛔虫卵数

D6 检验结果报告

根据检验结果，报告 100g 污泥中蛔虫卵死亡率。

附录 E

(规范性附录)

医疗机构污水和污泥中结核杆菌的检验方法

E1 仪器和设备

- E1.1 电炉。
- E1.2 恒温水浴箱。
- E1.3 高压蒸汽灭菌器。
- E1.4 滤菌器。
- E1.5 离心机。
- E1.6 恒温培养箱。
- E1.7 乙酸纤维膜：孔径为 0.3~0.7 μm
- E1.8 玻璃漏斗 G2：孔径为 10~15 μm
- E1.9 玻璃漏斗 G4：孔径为 3~4 μm
- E1.10 酒精灯

E2 培养基和试剂：

E2.1 改良罗氏培养基

E2.1.1 成分

磷酸二氢钾	2.4g
硫酸镁	0.24g
枸橼酸镁	0.6g
谷氨酸钠	1.2g
甘油	12mL
淀粉	30g
蒸馏水	600mL
鸡蛋液（包括蛋清和蛋黄）	1000mL
20%孔雀绿	20mL

E2.1.2 制法

将磷酸二氢钾、硫酸镁、枸橼酸钠、谷氨酸钠、甘油及蒸馏水混合于烧杯内，放在沸水浴中加热溶解。加入淀粉继续加热 1h，摇动使其溶解，待冷却至 50℃加鸡蛋液及孔雀绿，溶解，混匀。制成斜面，保持温度 90℃，灭菌 1h。

E2.2 小川氏培养基

E2.2.1 成分

甲液：无水磷酸二氢钾	1g
味精	1g
蒸馏水	100mL
乙液：全蛋液	200mL
甘油	6mL
2%孔雀绿	6mL

E2.2.2 制法

甲、乙两液混合分装试管内。制成斜面，保持温度 90℃灭菌 1 h。

E2.3 pH 为 7.0 的磷酸盐缓冲液(M / 15)

E2.4 10%吐温(Tween)80 水溶液加等量 30%过氧化氢溶液。

E2.5 4%硫酸溶液

E3 检验程序

结核杆菌检验程序见图 E。

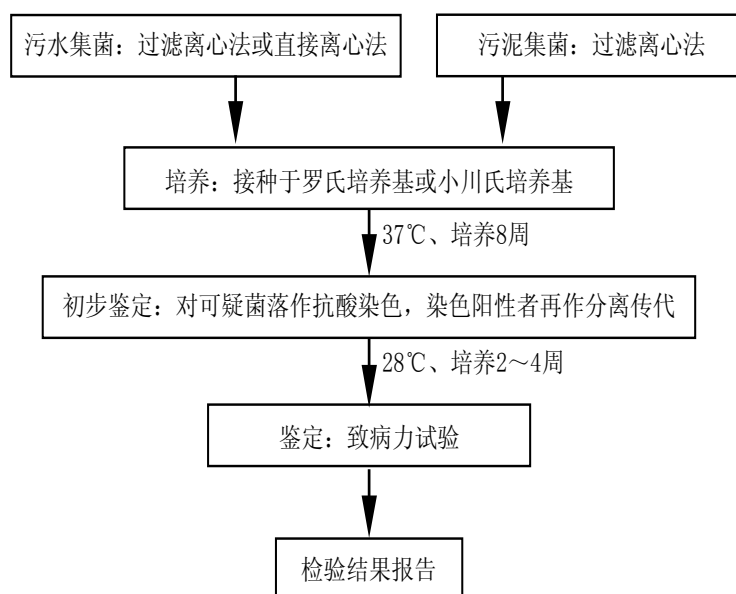


图 E 结核杆菌检验程序

E4 操作步骤

E4.1 集菌

污水集菌可采用过滤离心法或直接离心法, 污泥集菌可采用过滤离心法。

E4.1.1 污水样品

过滤离心法: 用经煮沸消毒的乙酸纤维滤膜(孔径 $0.3\sim 0.7\mu\text{m}$)抽滤, 安装严密后, 取污水样 500mL 抽滤, 根据悬浮物的多少, 一份水样需更换数张滤膜, 将同一份水样滤膜集中于小烧杯内。根据滤膜的多少用 100~200mL 4% 硫酸溶液反复冲洗, 静置 30min 后, 收集洗液于离心管中, 3000 转 / min, 离心 30min, 弃去上清液, 沉淀物中加 1mL 灭菌生理盐水混合均匀后, 供接种用。

直接离心法: 水样 500mL, 分装于 50mL 或 200mL 灭菌离心管中, 3000 转 / min, 离心 30min。同一份水样的沉淀物集中于试管内, 加等量 4% 硫酸处理 30min, 供接种用。如体积过大, 再次离心浓缩后接种。

注: 若样品为经过氯消毒的污水, 应在采样后立即用 5% 硫代硫酸钠溶液充分中和余氯。

E4.1.2 污泥样品

过滤离心法: 取污泥 10g 加 100mL 蒸馏水冲洗过滤(滤纸漏斗), 再经玻璃漏斗 G2(孔径 $10\sim 15\mu\text{m}$)和 G4(孔径 $3\sim 4\mu\text{m}$)抽滤, 最后经滤膜(孔径 $0.45\sim 0.7\mu\text{m}$)抽滤。取下滤膜, 用 4% 硫酸 3mL, 充分振摇冲洗 30min。

注: 若样品为经过氯消毒的污泥, 应在采样后立即用 5% 硫代硫酸钠溶液充分中和余氯。

E4.2 接种

污水的集菌液: 全部接种于改良罗氏培养基或小川氏培养基培养管内斜面上, 每支培养管接种 0.1mL。

污泥的集菌液: 吸取两个 0.1mL, 分别接种于改良罗氏培养基或小川氏培养基培养管内斜面上。

E4.3 培养

已接种的培养基置于 37℃ 培养箱内培养。培养 2 周后开始观察结果, 每周观察 2 次。

一般需要培养 8 周。

分离菌株：在罗氏培养基上呈淡黄色或无色的粗糙型菌落，作抗酸染色，阳性者作分离传代。分离传代菌株如生长速度在两周以上，则需作菌型鉴定；应用耐热触酶试验和传代培养于 28℃ 培养 2~4 周，观察是否生长，用此方法即可进行初步鉴定。

E4.4 致病力试验

耐热触酶反应阴性，28℃ 不生长之菌落为可疑结核杆菌。于小白鼠尾静脉接种 1mg 菌量 (5mg / mL 菌液，每只动物接种 0.2mL)，死亡时观察病变或 8 周后解剖脏器发现典型结核病变者可确认为检出结核杆菌。其耐热触酶试验方法如下：

取菌落 3~5 mg 分散于 0.5mL 磷酸盐缓冲液中，置 68℃ 水浴中 20min 后取出。冷却后加吐温 80h 和过氧化氢溶液混合液 0.5mL。

发生气泡为阳性，30min 不产生气泡者为阴性。人型、牛型结核杆菌，胃分枝杆菌和海鱼分枝杆菌为阴性，其他非典型抗酸菌和非致病抗酸菌为阳性。人型、牛型结核杆菌在 28℃ 培养不生长，胃分枝杆菌和海鱼分枝杆菌 28℃ 培养能生长。

E5 检验结果报告

根据检验结果，报告一定体积的样品中存在或不存在结核杆菌。

附录 F

(规范性附录)

医疗机构污水污染物 (COD、BOD、SS) 单位排放负荷计算方法

F1 水污染物单位排放负荷计算公式：

$$L = C \times Q / N$$

式中：

L---水污染物排放单位负荷 (g/床·d)

C---污染物排放浓度 (mg/L)

Q---日排水量 (m³/ d)

N---床位数 (床)