

中华人民共和国国家生态环境标准

HJ □□□□—202□

固体废物 蛔虫卵死亡率的测定 漂浮集卵法

Solid waste—Determination of mortality of ascarid ova

—Floation method

（征求意见稿）

202□-□□-□□发布

202□-□□-□□实施

生态环境部 发布

目 次

前 言	ii
1 适用范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 方法原理	1
5 试剂和材料	1
6 仪器和设备	2
7 样品	3
8 分析步骤	3
9 结果计算与表示	4
10 精密度	5
11 质量保证和质量控制	5
12 废物处置	5
附录 A（资料性附录） 蛔虫卵形态及死活鉴别	6

前 言

为贯彻《中华人民共和国环境保护法》《中华人民共和国固体废物污染环境防治法》，防治生态环境污染，改善生态环境质量，规范固体废物中蛔虫卵死亡率的测定方法，制定本标准。

本标准规定了测定畜禽养殖业固体废物、医疗机构及城镇污水处理厂污泥等固体废物中蛔虫卵死亡率的漂浮集卵法。

本标准的附录A为资料性附录。

本标准为首次发布。

本标准由生态环境部生态环境监测司、法规与标准司组织制订。

本标准主要起草单位：江苏省常州环境监测中心。

本标准验证单位：上海市环境监测中心、江苏省环境监测中心、浙江省生态环境监测中心、江苏省苏州环境监测中心、江苏省泰州环境监测中心和江苏省淮安环境监测中心。

本标准生态环境部202□年□□月□□日批准。

本标准自202□年□□月□□日起实施。

本标准由生态环境部解释。

固体废物 蛔虫卵死亡率的测定 漂浮集卵法

警告：实验样品中活蛔虫卵及医疗机构样品中病原微生物等具有潜在的感染性，实验过程中应采取必要的生物安全措施防止实验室环境及其他样品受到污染。操作时应按要求佩戴防护器具，避免人员感染。

1 适用范围

本标准规定了测定固体废物中蛔虫卵死亡率的漂浮集卵法。

本标准适用于畜禽养殖业固体废物、医疗机构和城镇污水处理厂污泥等固体废物中蛔虫卵死亡率的测定。

2 规范性引用文件

本标准引用了下列文件或其中的条款。凡是注明日期的引用标准，仅注日期的版本适用于本标准。凡是未注日期的引用标准，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本标准。其他文件被新文件废止、修改、修订的，新文件适用于本标准。

HJ/T 20 工业固体废物采样制样技术规范

HJ 298 危险废物鉴别技术规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

蛔虫卵 *ascariid ova*

蛔虫卵为线虫动物门线虫纲蛔目寄生虫的卵，可感染人及畜禽。常见蛔虫包括似蚓蛔线虫（*Ascaris lumbricoides*）、猪蛔虫（*Ascaris suum*）、牛弓首蛔虫（*Toxocara vitulorum*）、马副蛔虫（*Parascaris equorum*）、鸡蛔虫（*Ascaridia galli*）、犬弓首蛔虫（*Toxocara canis*）、猫弓首蛔虫（*Toxocara cati*）等。

4 方法原理

用氢氧化钠溶液处理样品，使蛔虫卵与黏附的脂类等杂质分离，用饱和硝酸钠溶液漂浮蛔虫卵。收集漂浮的虫卵染色（培养）后，进行死活鉴定、计数，计算蛔虫卵死亡率。

5 试剂和材料

除非另有说明，分析时均使用符合国家标准和分析纯试剂，实验用水为蒸馏水。

5.1 硫代硫酸钠（ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ）。

- 5.2 氢氧化钠 (NaOH)。
- 5.3 硝酸钠 (NaNO_3)。
- 5.4 次氯酸钠 (NaClO)。
- 5.5 亚甲基蓝 ($\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{S}$)。
- 5.6 硼砂 ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$)。
- 5.7 伊红 ($\text{C}_{20}\text{H}_6\text{Br}_4\text{Na}_2\text{O}_5$)。
- 5.8 硫酸 (H_2SO_4): $\rho=1.84\text{ g/ml}$, $w\in[95.0\%, 98.0\%]$ 。
- 5.9 硫代硫酸钠溶液: $w(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)=5\%$ 。

称取 5 g 硫代硫酸钠 (5.1) 溶解于 95 g 水中。临用现配。

- 5.10 氢氧化钠溶液: $\rho(\text{NaOH})=50\text{ g/L}$ 。

称取 50 g 氢氧化钠 (5.2) 溶于少量水中, 稀释至 1 L。

- 5.11 饱和硝酸钠溶液。

向 100 ml 水中逐步加入硝酸钠 (5.3), 不断搅拌, 直至硝酸钠不再溶解为止, 静置后过滤。临用现配。

- 5.12 次氯酸钠溶液: $w(\text{NaClO})=30\%$ 。

称取 30 g 次氯酸钠 (5.4) 溶解于 70 g 水中。临用现配。

- 5.13 染色液。

将 0.2 g 亚甲基蓝 (5.5) 加入 100 ml 蒸馏水中煮沸 10 min, 加入硼砂 (5.6) 0.5 g, 再煮沸 10 min, 冷却后加入伊红 (5.7) 0.1 g, 待完全溶解后过滤备用, pH 值为 10~11, 常温避光保存, 保存期为 1 年。

- 5.14 硫酸溶液: $c(\text{H}_2\text{SO}_4)=0.05\text{ mol/L}$ 。

取 2.72 ml 硫酸 (5.8), 缓慢倒入少量水中, 稀释至 1 L。

- 5.15 玻璃珠: 直径为 1 mm~5 mm。

6 仪器和设备

- 6.1 采样瓶: 带盖玻璃或塑料广口瓶, 1 L。
- 6.2 筛网: 孔径 710 μm 、212 μm 。
- 6.3 量杯: 玻璃材质, 1 L。
- 6.4 离心机: 最大离心力 2500 g 以上。
- 6.5 水平振荡仪或其他性能相当的设备。
- 6.6 恒温培养箱: 26 $^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 。
- 6.7 生物显微镜: 物镜 4 $\times$ 、10 $\times$ 、40 $\times$, 目镜 5 $\times$ 或 10 $\times$ 。
- 6.8 培养瓶: 具聚乙烯盖的玻璃瓶, 20 ml。
- 6.9 定量计数框: 50 mm $\times$ 20 mm $\times$ 1 mm, 底部均分 40 正方格, 1 ml。
- 6.10 离心管: 塑料材质, 锥形, 螺旋盖, 50 ml。
- 6.11 一次性巴氏滴管: 3 ml、10 ml。
- 6.12 生物实验室常用仪器和设备。

7 样品

7.1 样品采集和保存

样品采集和保存按照 HJ/T 20、HJ 298 的相关规定执行。取 200 g~300 g 样品放入采样瓶（6.1）中立即送实验室检测，含水量大的液态污泥可适当增加采样量。实验室接样后，不能立即开展检测的，将样品于 4℃~10℃ 冷藏并在 48 h 内检测。

注：若样品为经过氯消毒的污泥，在现场取样后立即加入 5% 硫代硫酸钠溶液（5.9），充分混匀，以中和活性氯。15.7 mg 硫代硫酸钠可保证去除样品中 1.5 mg 活性氯，硫代硫酸钠用量可根据样品实际活性氯量调整。

7.2 试样的制备

去掉样品中布条、草梗、小石块等较大的夹杂物。称取 100 g 置于烧杯中，倒入 500 ml 蒸馏水混合制成混悬液。

注：样品干结的，可先将其倒入搪瓷盘中，用镊子将硬块夹碎；样品含水量较高的，试样制备时可适当增加取样量，少加或不加蒸馏水。

8 分析步骤

8.1 过滤

将制备好的试样（7.2）依次通过 710 μm 孔径和 212 μm 孔径筛网（6.2）过滤，并用不少于 250 ml 蒸馏水冲洗烧杯及筛网，滤液收集于量杯（6.3）中。过滤时可用玻璃棒轻轻摩擦筛网加快样品过筛。

8.2 沉淀

将滤液（8.1）静置 4 h 至分层，必要时可过夜。虹吸弃去上层清液，保留沉淀体积不大于 200 ml，虹吸时勿扰动底部沉淀。将沉淀混匀后分装至若干个离心管（6.10）中，少量蒸馏水清洗量杯内壁，洗液一同并入，置于离心机（6.4）上，以 1500 g 离心力离心 5 min，弃上清液。

8.3 杂质分离

向每个离心管沉淀（8.2）中加入氢氧化钠溶液（5.10）25 ml~30 ml，及玻璃珠（5.15）10 粒~20 粒，旋紧管盖，于水平振荡仪（6.5）上以 200 r/min~300 r/min 振荡 1.5 h~2 h，静置 30 min。1500 g 离心力离心 5 min，弃上层杂质和液体，避免沉淀丢失。加入蒸馏水至终体积 50 ml，充分振荡混匀后，1500 g 离心力离心 5 min，弃上清液保留沉淀，重复本步骤至上清液接近透明。

8.4 漂浮集卵

用少量饱和硝酸钠溶液（5.11）混匀沉淀（8.3），继续加饱和硝酸钠溶液至 50 ml，拧紧

管盖，1500 g 离心力离心 5 min 后，用一次性巴氏滴管（6.11）吸取管中液体表面的浮膜，粘附管壁的浮膜可用少量饱和硝酸钠溶液冲洗，全部吸取干净并转移至新离心管（6.10）中。向新离心管中加入 10 倍浮膜液体积的蒸馏水，充分混匀，1500 g 离心力离心 5 min，小心弃去上清液，避免沉淀丢失。所有沉淀合并至其中一个离心管中，少量蒸馏水清洗其余离心管，洗液一同并入，2500 g 离心力离心 10 min，小心弃去上清液，避免沉淀丢失。

8.5 镜检

8.5.1 染色后镜检

在沉淀（8.4）中加入 2 倍沉淀体积的次氯酸钠溶液（5.9），振荡混匀 3 min~5 min，以脱去蛔虫卵蛋白质膜。加入蒸馏水至终体积 50 ml，2500 g 离心力离心 10 min，弃上清液，反复清洗至溶液 pH 值为中性。加入沉淀等体积的蒸馏水，混匀后滴入 2、3 滴染色液（5.13）染色 30 min，用 2500 g 离心力离心 10 min，弃去上清液。继续水洗、离心 2、3 次，加入 5 倍沉淀体积的蒸馏水，混匀并吸取 1 ml 沉淀悬浮液注入定量计数框（6.9）内，于生物显微镜（6.7）下镜检。镜检计数框内全部样品，并统计死、活虫卵数。

染色后，活虫卵内含物不着色，死虫卵内含物染成蓝紫色。蛔虫卵形态及死活鉴别参见附录 A。若染色后镜检蛔虫卵死亡率<95%，则需从“7.2 试样的制备”至“8.4 漂浮集卵”重新制备试样，进行“8.5.2 培养后镜检”。

注：脱蛋白质膜后，应洗净次氯酸钠，否则影响碱性染料的着色效果。

8.5.2 培养后镜检

向沉淀（8.4）中加入 4 ml 硫酸溶液（5.14）混匀后，倒入培养瓶（6.8）中，并用标记出液面高度，放至培养箱（6.6）中 26 ℃孵化 30 d。期间每天目测观察培养瓶中的液面，加水至初始液面以补偿蒸发。孵化 30 d 后，混匀并吸取 1 ml 培养后悬浮液注入定量计数框（6.9）内，于生物显微镜（6.7）下镜检。镜检计数框内全部样品，并统计死、活虫卵数。

培养后，凡含有幼虫的判为活卵，其他状态虫卵都判为死卵（未受精卵不统计）。蛔虫卵形态及死活鉴别参见附录 A。

9 结果计算与表示

9.1 结果计算

固体废物样品中蛔虫卵死亡率按式（1）计算：

$$A = \frac{m}{m+n} \times 100 \quad (1)$$

式中：A——蛔虫卵死亡率，%；

m——死蛔虫卵数，个；

n——活蛔虫卵数，个。

9.2 结果表示

测定结果最多保留 3 位有效数字，以“%”表示。若未镜检到蛔虫卵，则报告未检出。

10 精密度

6 家实验室分别对蛔虫卵平均死亡率为 83%、98%、100%的畜禽养殖业固体废物、污水处理厂污泥、医疗机构污泥的统一实际样品重复测定 6 次：

实验室内相对标准偏差分别为：2.4%~8.1%，0.76%~4.8%，0%；

实验室间相对标准偏差分别为：4.0%，1.4%，0%；

重复性限分别为：12%，8.2%，0%；再现性限分别为：15%，8.7%，0%。

11 质量保证和质量控制

每 20 个样品或每批次（少于 20 个/批）应分析 1 个平行样，平行样测定结果相对偏差不超过 20%。

12 注意事项

为避免人员感染，实验结束后应立即对使用过的实验台面、仪器设备进行消毒；使用过的器具置于水中煮沸 10 min 清洗后方可再次使用。

附 录 A
(资料性附录)
蛔虫卵形态及死活鉴别

A.1 蛔虫卵形态鉴别要点

受精蛔虫卵的形态：呈宽椭圆形。卵壳自外向内分为三层：受精膜、壳质层和蛔貳层，壳质层较厚，另两层极薄，在普通显微镜下难以分清。卵壳内有一个大而圆未分裂的受精卵细胞，与卵壳间常见有新月形空隙。卵壳外有一层由虫体子宫分泌形成的蛋白质膜，表面凹凸不平呈波浪状。随粪便排出的虫卵常被胆汁染成黄色或棕褐色。

未受精蛔虫卵的形态：呈长椭圆形或不规则形。壳质层与蛋白质膜均较受精蛔虫卵薄，无蛔貳层，卵壳内含有许多大小不一的屈光颗粒。虫卵常呈淡黄色。

A.2 蛔虫卵模式图

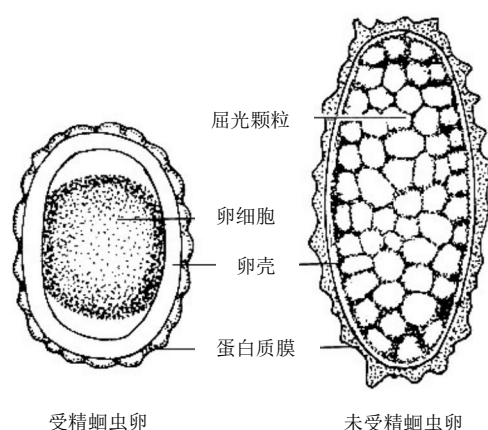


图 A.1 蛔虫卵模式图

A.3 常见蛔虫卵参考图片

似蚓蛔线虫卵为宽椭圆形，大小为 $45\mu\text{m}\sim 75\mu\text{m}\times 35\mu\text{m}\sim 50\mu\text{m}$ ，棕黄色，表层蛋白质膜凹凸不平。

猪蛔虫卵为短椭圆形，大小为 $50\mu\text{m}\sim 75\mu\text{m}\times 40\mu\text{m}\sim 50\mu\text{m}$ ，黄褐色，壳厚，表层蛋白质膜凹凸不平。

马副蛔虫卵为近于圆形，大小为 $90\mu\text{m}\sim 100\mu\text{m}$ ，黄色或黄褐色，表层蛋白质膜凹凸不平。

牛弓首蛔虫卵为近于圆形，大小为 $70\mu\text{m}\sim 80\mu\text{m}\times 60\mu\text{m}\sim 66\mu\text{m}$ ，壳厚，外层为蜂窝状。

鸡蛔虫卵为椭圆形，大小为 $70\mu\text{m}\sim 90\mu\text{m}\times 47\mu\text{m}\sim 51\mu\text{m}$ ，壳厚而光滑，深灰色。

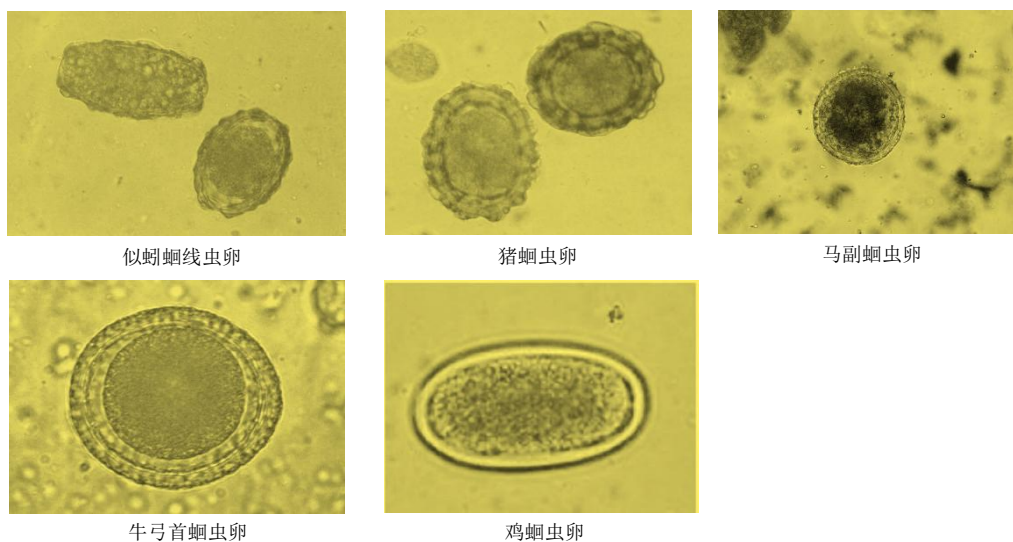


图 A. 2 常见蛔虫卵形态参考图（显微镜下 10×20 ）

A. 4 死、活蛔虫卵染色参考图片

染色后，活虫卵内含物不着色，死虫卵内含物染成蓝紫色。

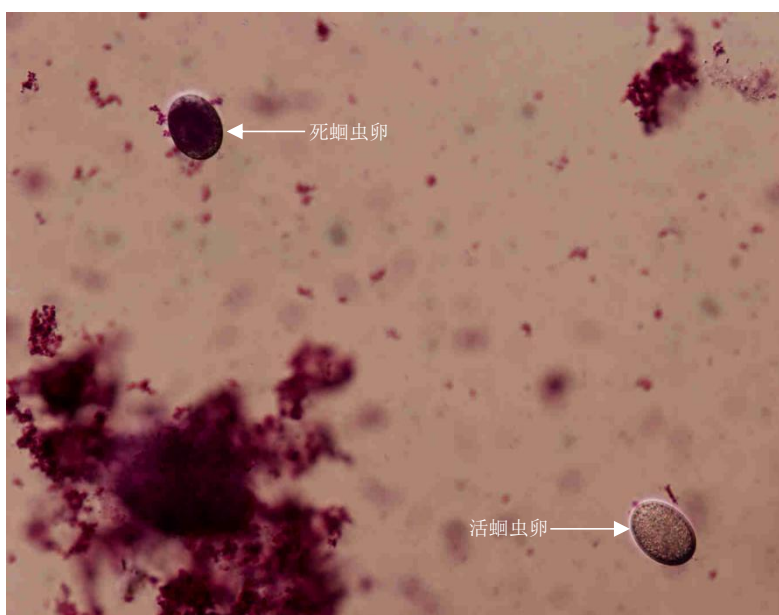


图 A. 3 染色后死、活蛔虫卵鉴别参考图（显微镜下 10×20 ）

A. 5 培养后活蛔虫卵参考图片

培养后，凡含有幼虫的判为活卵，其他状态虫卵都判为死卵。镜检时注视或轻压，可见有虫体轻微蠕动，线性幼虫盘曲在卵壳内。

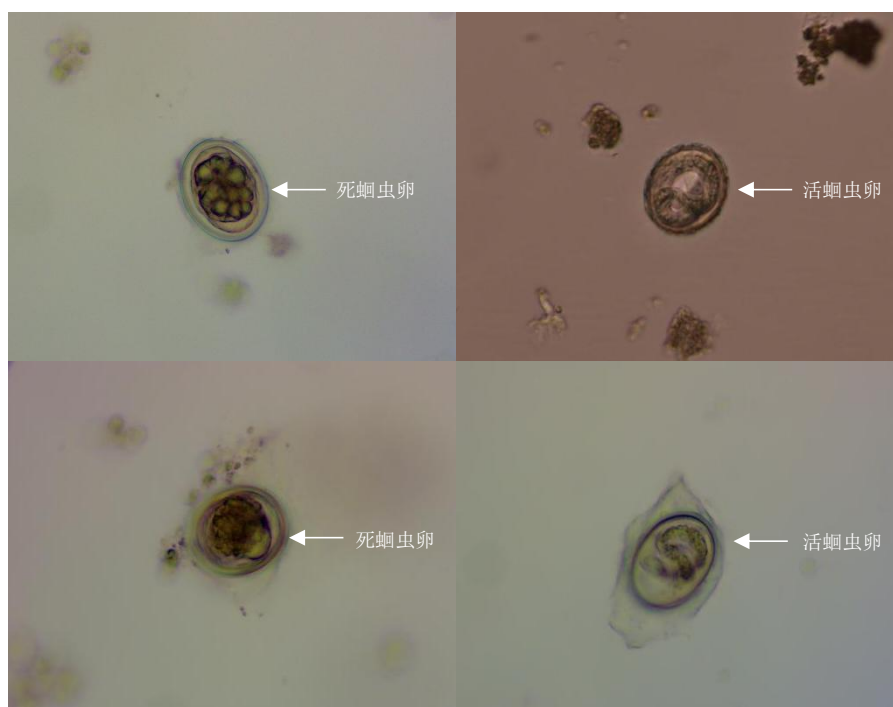


图 A. 4 培养后死、活蛔虫卵鉴别参考图（显微镜下 10×20 ）