

《固体废物 蛔虫卵死亡率的测定 漂浮集卵法（征求意见稿）》
编制说明

《固体废物 蛔虫卵死亡率的测定 漂浮集卵法》

标准编制组

二〇二五年四月

项目名称：固体废物 蛔虫卵死亡率的测定 漂浮集卵法

项目统一编号：1130

承担单位：江苏省常州环境监测中心

编制组主要成员：张小琼、沈伟、徐东炯、潘晨、吴旦、

沈丽娟、周崴、黄文婷、李金、张皓

生态环境部南京环境科学研究所技术管理负责人：张圣虎、鲁磊磊

环境标准研究所技术管理负责人：雷晶

生态环境监测司项目负责人：仇鹏

目 录

1	项目背景.....	1
1.1	任务来源.....	1
1.2	工作过程.....	1
2	标准制订的必要性分析.....	3
2.1	蛔虫卵的环境危害.....	3
2.2	相关生态环境标准和生态环境管理工作的需要.....	4
3	国内外相关分析方法研究.....	5
3.1	主要国家、地区及国际组织相关分析方法研究.....	5
3.2	国内相关分析方法研究.....	7
3.3	文献资料研究.....	12
4	标准制订的基本原则和技术路线.....	13
4.1	标准制订的基本原则.....	13
4.2	标准制订的技术路线.....	14
5	方法研究报告.....	15
5.1	方法研究的目标.....	15
5.2	方法原理.....	15
5.3	试剂和材料.....	16
5.4	仪器和设备.....	18
5.5	样品.....	19
5.6	分析步骤.....	21
5.7	结果计算与表示.....	33
5.8	质量保证和质量控制.....	34
5.9	注意事项.....	34
5.10	实验室内各类样品的验证结果.....	35
6	方法比对.....	36
6.1	方法比对方案.....	36
6.2	方法比对过程及结论.....	37
7	方法验证.....	38
7.1	方法验证方案.....	38
7.2	方法验证过程.....	39
8	与开题报告的差异说明.....	40
8.1	方法性能方面.....	40
8.2	操作步骤方面.....	41
9	标准征求意见稿技术审查情况.....	41

9.1 标准征求意见稿技术审查工作的情况	41
9.2 标准征求意见稿技术审查修改说明	42
10 参考文献	43
方法验证报告	46
1 原始测试数据	47
1.1 实验室基本情况	47
1.2 方法精密度测试数据	49
2 方法精密度汇总	56
3 方法验证结论	58

《固体废物 蛔虫卵死亡率的测定 漂浮集卵法（征求意见稿）》编制说明

1 项目背景

1.1 任务来源

2009年3月16日，原环境保护部发布了《关于开展2009年度国家环境保护标准制修订项目工作的通知》（环办函〔2009〕221号），下达了《固体废物 蛔虫卵的测定 沉淀集卵法》标准制订计划，项目统一编号：1130。

本标准制修订承担单位为常州市环境监测中心站（2018年6月已更名为江苏省常州环境监测中心）。

1.2 工作过程

1.2.1 成立标准编制组，查询国内外相关标准和文献资料，研究建立标准方法，开展方法试验

2009年5月~12月，江苏省常州环境监测中心接到此项标准制订任务后，立即成立标准编制组，专门承担此项标准的制订工作。根据原环境保护部对国家环境保护标准制修订项目的相关要求，标准编制组开展了国内外相关标准、文献等的资料收集、整理，邀请专家就标准编制的重点、难点进行研讨，确定了方法的技术路线及主要研究内容。2010年1月~10月开展方法试验，编写《固体废物 蛔虫卵的测定 沉淀集卵法》的方法草案和开题论证报告。

1.2.2 召开开题论证会

2010年11月，由原环境保护部科技标准司组织专家召开开题论证会并通过论证，明确了技术路线、标准编写的内容和方法验证方案，专家提出的具体修改意见和建议：（1）按照《环境监测分析方法标准制修订技术导则》（HJ 168-2010）和《国家环境污染物监测方法标准制修订工作暂行要求》（环科函〔2009〕10号）的要求开展实验、验证和标准草案的编制工作；（2）注意与相关质量标准、排放标准等相关环保标准的衔接；（3）建议制作蛔虫卵标样，并通过实验室比对确认加标回收率的限制，加强标准的质控；（4）标准的主要控制指标为蛔虫卵死亡率，而实际样品蛔虫卵含量可能差异很大，对于低含量样品，蛔虫卵死亡率的测定误差可能会很大，可以通过增加采样量的办法加以解决，但对于确实很“干净”的样品，不可能无限制增加采样量，因此，建议确定一个蛔虫卵最低检出限值，低于最低限值则等同于蛔虫卵死亡率达标。

1.2.3 开展沉淀集卵法方法试验

2010年12月~2012年6月，根据开题论证意见，标准编制组按照《国家环境保护标准制修订工作管理办法》（国家环境保护总局2006年第41号）、《环境监测分析方法标准制修订技术导则》（HJ 168-2010）和《国家环境污染物监测方法标准制修订工作暂行要求》

（环科函〔2009〕10号）的要求开展相关试验。准备实验室方法验证工作，着手编写《固体废物 蛔虫卵的测定 沉淀集卵法》标准征求意见稿及方法验证方案。2012年9月~12月，组织了6家有资质的实验室进行方法验证，并收回所有的验证报告，随后进行了数据的汇总和整理分析工作，编制方法验证报告。2013年1月，着手编写《固体废物 蛔虫卵的测定 沉淀集卵法》的标准征求意见稿及编制说明。2014年12月完成标准文本征求意见稿及编制说明初稿。

1.2.4 召开专家研讨会，修改技术路线，开展漂浮集卵法方法试验

分别于2015年3月、2021年9月组织召开专家研讨会，对本标准编制过程中的系列问题进行研究讨论，形成如下意见：（1）将开题时确定的“沉淀法”改为“漂浮法”，同时建议将本标准名称改为《固体废物 蛔虫卵的测定 漂浮集卵法》；（2）根据生态环境部管理职责范围和相关法律法规管理需求确定标准的适用范围；（3）尽量选择多种有代表性的固体废物样品；（4）根据方法的技术特点，确定是否给出检出限；（5）通过实验进一步确认是否需要镜检前培养或给出镜检前培养的条件。2015年4月~2016年4月，对“漂浮集卵法”进行相关文献检索，实验室内方法筛选、验证；2016年5月~12月，组织了6家有资质的实验室进行“漂浮法”验证，并进行数据整理和验证报告编写。2017年1月-2020年10月，补充实验，修改标准文本和编制说明。2020年11月~2021年6月，梳理标准存在的问题，同时根据新执行的《环境监测分析方法标准制订技术导则》（HJ 168-2020）要求调整实验室试验研究，并同步修改标准文本及编制说明。根据2021年9月专家咨询会意见，进一步补充试验研究，补充实验室间方法验证，完善标准文本及编制说明。

1.2.5 召开专家研讨会，建议标准更名为《固体废物 蛔虫卵死亡率的测定 漂浮集卵法》，并补充实验内容

2023年10月召开专家研讨会，形成4条修改意见：（1）建议标准名称改为《固体废物 蛔虫卵死亡率的测定 漂浮集卵法》；（2）参照现有的蛔虫卵测定国家及行业标准，不给出检出限；（3）标准中应明确检测蛔虫卵种类，附录中补充各类蛔虫卵形态识别图；（4）补充实验室内染色镜检和培养镜检的精密度结果。2023年11月~12月，根据专家研讨会意见，补充实验室内染色和培养精密度结果，同时联系生态环境、农业农村部门及相关高校、科研院所等，获取不同种类蛔虫标本，补充各类蛔虫卵形态识别图，完善标准文本及编制说明。2024年8月，提交标准文本征求意见稿及编制说明，提请征求意见稿技术审查。

1.2.6 通过征求意见稿技术审查会，标准更名为《固体废物 蛔虫卵死亡率的测定 漂浮集卵法》

2024年11月召开征求意见稿技术审查会，标准通过审查。并形成4条修改意见：（1）标准名称修改为《固体废物 蛔虫卵死亡率的测定 漂浮集卵法》；（2）编制说明中进一步补充完善样品运输条件、离心设备的离心力、精密度控制值的确定、废物处置的依据；（3）标准文本中补充对其他病原体防护的内容，进一步细化样品采集步骤，完善试样制备、漂浮集卵操作过程、结果表示、废弃物的处置和附录A的文字表述；（4）按照《环境监测分析

方法标准制订技术导则》(HJ 168-2020)和《环境保护标准编制出版技术指南》(HJ 565-2010)对标准文本和编制说明进行编辑性修改。

会后,标准编制组根据征求意见稿技术审查会意见,进一步修改完善了标准征求意见稿编制说明。

2 标准制订的必要性分析

2.1 蛔虫卵的环境危害

(1) 蛔虫(卵)的生物学特性

蛔虫为线虫动物门线虫纲蛔目(*Ascarida*)的常见大型寄生虫,雌雄异体。有3片唇,1个背唇,2个亚腹侧唇。无口囊和咽。食道简单,肌质柱状无后食道球。雄虫尾部通常向腹面弯曲,有较多的乳突。交合刺简单、等长。雌虫阴门位于体中部稍前。重要的有蛔属(*Ascaris*)、副蛔属(*Parascaris*)、新蛔属(*Neoascaris*)、弓蛔属(*Toxascaris*)、弓首属(*Toxocara*)和禽蛔属(*Ascaridia*)^[1]。

蛔虫卵分受精卵和非受精卵两种。前者为宽椭圆形,(因与胆汁接触而)呈黄色,表面有一层波浪状的蛋白质膜,内有球形卵细胞,两极有新月状空隙;后者为长椭圆形,内有一团大小不等的粗大折光颗粒。只有受精卵才能卵裂、发育^[2]。在21℃~30℃、潮湿、氧气充足、荫蔽的泥土中约10d左右发育成杆状蚴。脱一次皮变成具有感染性幼虫的感染性虫卵,此时如被吞食,卵壳被消化,幼虫在肠内逸出。然后穿过肠壁,进入淋巴结和肠系膜静脉,经肝、右心、肺,穿过毛细血管到达肺泡,再经气管、喉头的会厌、口腔、食道、胃,回到小肠,整个过程约25d~29d,脱3次皮,再经1月余就发育为成虫。

蛔虫卵对外界理、化等不良因素的抵抗力强,在荫蔽的土壤中或蔬菜上,一般可活数月甚至一年,在5℃~10℃土壤中可生存2年,在干燥环境中(22℃)生存2周~3周,在粪坑中存活半年至一年,对寒冷及化学药物有很大抵抗力,不易被杀死。食用醋、酱油或腌菜、泡菜的盐水,均不能将蛔虫卵杀死。蛔虫卵在缺氧环境中仍可以保持存活,在污水缺氧的环境下可生存相当长的时间。蛔虫卵对一些化学药品具有抵抗力,主要是由于卵壳蛔甑层的保护作用,如在50%的漂白粉液里经5h~10h才死亡,10%的福尔马林、硫酸、盐酸、硝酸或磷酸溶液均不能影响虫卵内幼虫的发育,但在70℃热水或直射阳光下很快死亡,而对于能溶解或透过蛔甑层的有机溶剂或气体,如氯仿、乙醚、乙醇和苯等有机溶剂,以及氰化氢、氨、溴甲烷和一氧化碳等气体则很敏感,卵细胞或幼虫皆可被杀死。

(2) 蛔虫(卵)的环境危害

蛔虫是世界性分布种类,是人体、畜禽等最常见的寄生虫^[3],蛔虫病在我国以前流行相当广泛,目前也有部分地区高发。蛔虫卵在外界环境中无需中间宿主而直接发育为感染期卵,且蛔虫产卵量大,雌虫每日可产10万~20万个虫卵,产卵盛期每日可产卵100万~200万枚,一生可排卵2000万枚。虫卵随终末宿主粪便排出体外,在粪便或土壤中发育为感染性虫卵。

固体废物未经无害化处理即用来施肥,使土壤中含有蛔虫卵污染农作物,导致人及畜禽感染。人受感染后,可出现不同程度的发热、咳嗽、食欲不振或善饥、脐周阵发性疼痛、营

营养不良、失眠、磨牙等症状，有时还可引起严重的并发症。如蛔虫扭集成团可形成蛔虫性肠梗阻，钻入胆道形成胆道蛔虫病，进入阑尾造成阑尾蛔虫病和肠穿等，如有大量蛔虫的幼虫经过肺部，可以引起病人发热、咳嗽，肺部透视有阴影，称为过敏性肺炎。蛔虫的幼虫如果误入歧途，进入眼部，可能引起失明；进入脑部，可能引起癫痫。对人体危害很大。

常见的动物蛔虫病^[4]有猪、马、牛、鸡、猫、犬等蛔虫病，羊很少发病。蛔虫病主要危害幼年动物，常引起发育不良，生长停滞，严重时可导致死亡。不同种的蛔虫各有其固定的宿主（专有宿主），一般不互相交叉感染，进入非固有性宿主体内的感染性蛔虫卵，也不能发育为成虫。

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。

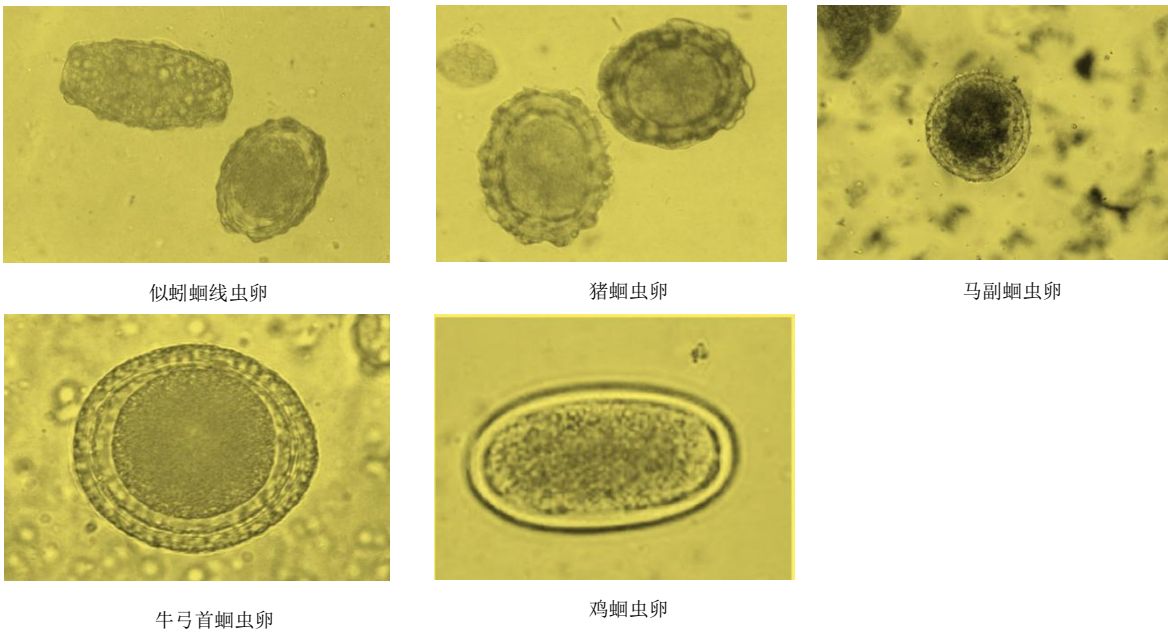


图 1 常见蛔虫卵形态参考图（显微镜下 10×20 ）

2.2 相关生态环境标准和生态环境管理工作的需要

在现有的生态环境管理标准中，对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可能存在的蛔虫卵危害进行了限制，并对蛔虫卵死亡率给出了限值。《畜禽养殖业污染物排放标准》（GB 18596-2001）规定畜禽养殖业废渣无害化环境标准蛔虫卵指标为死亡率 $\geq 95\%$ ^[5]，《医疗机构水污染物排放标准》（GB 18466-2005）中医疗机构污泥控制标准蛔虫卵指标为死亡率 $> 95\%$ ^[6]，《城镇污水处理厂污染物排放标准》（GB 18918-2002）

规定蛔虫卵死亡率 $>95\%$ ^[7]。

表 1 生态环境质量标准与污染物排放（控制）标准的固体废物中蛔虫卵监测要求

标准类型	标准名称	监测方法	限值
相关生态环境管理标准	畜禽养殖业污染物排放标准 (GB 18596-2001)	参照 GB 7959-1987《粪便无害化卫生标准》 ^[8] 附录 B “堆肥蛔虫卵检查法”（现为 GB 7959-2012《粪便无害化卫生要求》）附录 E.1 “堆肥蛔虫卵的检查”）	死亡率 $\geq 95\%$
	《医疗机构水污染物排放标准》（GB 18466-2005）	附录 D “医疗机构污泥中蛔虫卵的检验方法”	死亡率 $>95\%$
	《城镇污水处理厂污染物排放标准》（GB 18918-2002）	参照 GB 7959-1987《粪便无害化卫生标准》附录 B “堆肥蛔虫卵检查法”（现为 GB 7959-2012《粪便无害化卫生要求》）附录 E.1 “堆肥蛔虫卵的检查”	死亡率 $>95\%$

此外，其他行业也有相关管理标准，农业方面包括《农用污泥污染物控制标准》（GB 4284-2018）规定了蛔虫卵死亡率 $\geq 95\%$ ^[9]，《农业部关于加快推进农业清洁生产的意见》（农科教发〔2011〕11 号）文件中明确“严禁直接把城镇垃圾、污泥直接用作肥料”，《畜禽粪便还田技术规范》（GB/T 25246-2010）则规定死亡率为 95%~100%^[10]，《畜禽粪便监测技术规范》（GB/T 25169-2022）中对于蛔虫卵死亡率的要求 $\geq 95\%$ ^[11]；城建方面包括《粪便无害化卫生要求》（GB 7959-2012）中规定经各种方法处理后的粪便产物其蛔虫卵死亡率均要 $\geq 95\%$ 。

固体废物中蛔虫卵死亡率是我国生态环境保护评价固体废物状况、控制固体废物病原体污染的重要指标，特别是与农业生产和农村生活相关性大，建立固体废物中蛔虫卵死亡率检测的标准方法，是保护农村生态环境、加快美丽乡村建设的需要，也是高质量建设生态环境监测预警体系的需要。

3 国内外相关分析方法研究

3.1 主要国家、地区及国际组织相关分析方法研究

（1）国外标准分析方法的特点及应用情况

蛔虫卵检测的常规方法主要有沉淀法和漂浮法两类。目前，国外关于固体废物蛔虫卵检测的方法标准主要有美国环境保护署（EPA）在 1992 年发布、2003 年修订的《Control of Pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge》（EPA-625-R-92-013）^[12]，将蛔虫卵列入了针对水和污泥中病原体监测的主要污染物之一，并建立了相关分析方法——即 Test Method for Detecting, Enumerating, and Determining the Viability of *Ascaris* Ova in Sludge。

2023 年，更新为 EPA-600-R-22-194 《Pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge》附录 H 方法，与《Control of Pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge》（2003 年 7 月，EPA-625-R-92-013）所用方法一致。该检测方法可用于污泥、堆肥和废水中的致病性蛔虫卵的检测。样品用混合有表面活性剂的缓冲液进行处理后的混合物过筛以除去大颗粒。过筛固体通过离心沉淀，上层清液慢慢倒出。沉淀物用硫酸镁（比重 1.20）进行密度梯度离心。样品通过浮选后产生了一层包含有蛔虫和其他寄生虫卵的物质，然后用高目筛进行第二次筛选。产生的浓缩物在 26 ℃ 下培养，直到大部分蛔虫卵都孵出活虫。然后在显微镜下观察混合物，用 Sedgwick-Rafter 计数框对蛔虫卵进行计数。EPA 方法是目前国际上较为主流的方法，法国等欧盟国家均引用、修改 EPA 的方法。固体废物蛔虫卵检测国际的主流方法是漂浮法，EPA 方法及法国、挪威、德国、奥地利、匈牙利等国的方法均是漂浮法。

世界卫生组织（WHO）在 2004 年发布的《Integrated guide to: Sanitary Parasitology》^[13] 中，第 7 章节“Methods for detection and enumeration of helminth eggs in wastewater and sludge”中详细介绍了污泥中蛔虫卵的检测方法。该方法先将污泥样品清洗过筛，再用甲醛—乙醚溶液、甲醛盐溶液来分层去除油脂类杂质的影响，最后用饱和硫酸锌溶液进行漂浮集卵并显微镜观察。该方法相较于 EPA 的方法更为简便易操作。

1996 年 WHO 发布了《Analysis of Wastewater for Use in Agriculture - A Laboratory Manual of Parasitological and Bacteriological Techniques》^[14]，其蛔虫卵检测方法（The modified Bailenger method）针对水和废水样品，属沉淀类方法。该方法将样品沉淀、吸取并弃去上清液后，沉淀转入离心管中离心，离心沉淀用乙酰乙酸缓冲液进行再悬浮，并加入乙酰乙酯或乙醚吸附杂质，再次离心沉淀，样品分为三层，最下层的沉淀包含有蛔虫卵，将其用硫酸锌溶液进行再悬浮后用计数框镜检计数。

因此，针对杂质多的固体废物样品，检测方法的关键是蛔虫卵与固体杂质的分离，漂浮法成为主流方法。对于杂质较少的水样来说，沉淀法就较为适宜。

表 2 国外相关方法标准比较

方法	EPA	法国、挪威、德国、奥地利、匈牙利等国方法	WHO
应用领域	环保/污泥、堆肥和废水	环保、农业/污泥、土壤、堆肥	农业、环保/废水
原理	漂浮	漂浮	沉淀/漂浮
优点	适用范围广	适用范围较广	操作简单方便
缺点	步骤繁琐	效率较低	回收率较低

（2）与本方法标准的关系

本标准制定的任务原本要求进行沉淀集卵法研究，但在后续实际样品的检测中发现用沉淀法回收率会过低并且杂质过多不利于镜检，经课题专家讨论后改用漂浮集卵法。更改后的漂浮法主要借鉴了 WHO 漂浮集卵法的分步过筛方法，相较于 EPA 方法，WHO 的更为方便操作且效果也较好。

3.2 国内相关分析方法研究

(1) 国内分析方法的特点及应用情况

我国现行生态环境标准中采用的固体废物蛔虫卵测定方法有《医疗机构水污染物排放标准》（GB 18466-2005）附录 D “医疗机构污泥中蛔虫卵的检验方法”，以及生态环境管理标准《畜禽养殖业污染物排放标准》(GB 18596-2001)、《城镇污水处理厂污染物排放标准》（GB 18918-2002）指定的固体废物蛔虫卵测定方法——《粪便无害化卫生要求》（GB 7959-2012）附录 E.1.1 “饱和硝酸钠漂浮法”及附录 H “蠕虫卵死活鉴别方法”。其他部门固体类物质中蛔虫卵检测方法还有《泡菜等植物源性食品中寄生虫卵的分离及鉴定规程》（SN/T 1908-2007）^[15]、《肥料中蛔虫卵死亡率的测定》（GB/T 19524.2-2004）^[16]等，非标准方法中有《卫生研究》（1990 年第 19 卷第 4 期）杂志中的《土壤中蛔虫卵检验标准方法》^[17]等。此外，已废止的《城镇垃圾农用控制标准》（GB 8172-1987）中指定的蛔虫卵检测方法“城镇垃圾农用监测分析方法”只是油印本，很难进行方法溯源查询。以上方法均属于漂浮法。沉淀法仅见于《粪便无害化卫生标准》（GB 7959-2012）附录 E.1.2 “沉淀法”，其中规定“当粪便样品、不具备滤膜滤器设备或多含大量腐烂蔬叶等纤维的堆肥样品时选用”。因此，我国固体类物质中蛔虫卵检测方法是以漂浮法为主。而水质蛔虫卵测定则采用沉淀法——《水质 蛔虫卵的测定 沉淀集卵法》（HJ 775-2015）。

(2) 与本方法标准的关系

本标准方法制定过程中主要参考了《粪便无害化卫生要求》（GB 7959-2012）附录E.1.1 “饱和硝酸钠漂浮法”及附录H “蠕虫卵死活鉴别方法”，借鉴了分离、水洗沉淀、漂浮、镜检、培养等步骤。样品过筛步骤参考了WHO《Integrated guide to: Sanitary Parasitology》中 7.1.1 Technique for the enumeration of parasitic helminth eggs from sewage sludge 中 “1. Sieve 250 ml of liquid sludge through a 710 and 212 μm mesh sieve together with 250 ml of water.” 并对关键检测条件进行实验优化筛选，与相关方法的比较见表3和图2。

《固体废物 蛔虫卵死亡率的测定 漂浮集卵法》技术方法来源如下：

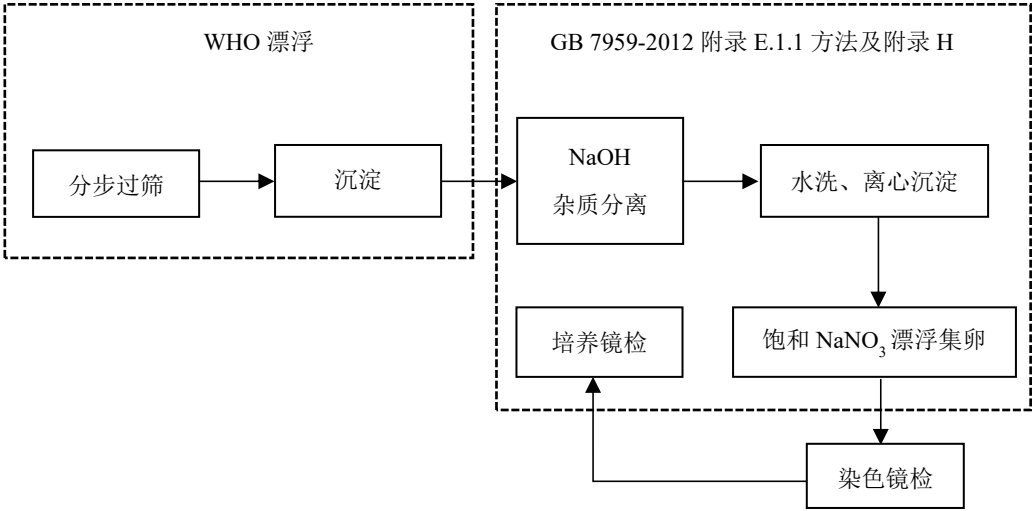


图 2 漂浮集卵法技术方法来源

表 3 国内外相关方法标准与本标准的关系

指标	肥料中蛔虫卵死亡率的测定 (GB/T 19524.2-2004)	粪便无害化卫生要求 (GB 7959-2012)	《医疗机构水污染物排放标准》 (GB 18466-2005) 附录 D	EPA 方法	WHO 方法	本标准方法
适用范围	肥料	粪便、堆肥	污泥	废水、污泥	污泥	畜禽养殖业固体废物、医疗机构及城镇污水处理厂污泥
原理	漂浮	漂浮	漂浮	漂浮	漂浮	漂浮
前处理	颗粒较大的样品先行研磨	压碎样品中较大的土颗粒	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	称取约 300 g 样品 (干重) 放入装有 500 ml 水的烧杯中，4 °C ~ 10 °C 过夜，后充分混合	液体污泥量取 250 ml；干燥样品量取 50 g 与 250 ml 的水混合。	称取 100 g 置于烧杯中，倒入 500 ml 蒸馏水混合制成混悬液。
过滤	无	样品孔径 3 mm 的铜筛和孔径 2 mm 的铜筛过筛，备检不少于 100 g	无	无	710 μm 和 212 μm 孔筛过筛	710 μm 和 212 μm 孔筛过筛
沉淀	无	无	无	将混匀的样品倒入 1000 ml 烧杯中，用洗瓶将样品充分洗入其中，添加 1% 的 7X 到终体积为 900 ml。	离心：过筛后的液体以 717 g 的离心力离心 20 sec，在 717 g 离心 20 sec，然后去除上清液，保留残渣。	将滤液静置 4 h 至分层，必要时可过夜。虹吸弃去上层。沉淀混匀后分装至若干个离心管中，1500 g 离心力离心 5 min，弃上清液，保留沉淀。
杂质分离	5 g~10 g 样品加 50 g/L 氢氧化钠溶液充分振荡；离心沉淀。	10 g 筛样放入 50 ml 离心管，加入 50 g/L 氢氧化钠溶液，充分振荡；离心沉淀。	100 g 污泥样品和 50 ml 5% 氢氧化钠溶液，分别注入三角烧杯内，振荡 30 min，然后静置 30 min 离心沉淀。	沉淀：上述样品 4 °C ~ 10 °C 下沉淀 4 h 或者过夜加 1% 的 7X；沉淀后，转移加水振荡；加 1% 7X 至 900 ml，4 °C ~ 10 °C 下沉淀 2 h，沉淀过 20 目或者 50 目筛，	悬浮：用 100 ml 甲醛盐溶液 (100 ml 甲醛 + 9 g/L NaCl)，冲洗装入 500 ml 的锥形瓶中，加入 50 ml 乙醚，摇匀静置 10 min。以 728 g 的离心力离心 2 min，丢弃顶部	向每个离心管沉淀中加氢氧化钠溶液 25 ml~30 ml，及玻璃珠 10 粒~20 粒，以 200 r/min~300 r/min 振荡 1.5 h~2 h，静置 30 min 后，1500 g 离心力离心 5 min，弃上层杂质和液

				置于漏斗中，加 1%7X 溶液至终体积为 900 ml 并在 4~10℃下沉淀 2 h，去上清后沉淀转至 50 ml 锥形离心管中。 离心：充分清洗烧杯洗液收集至离心管，用水将每个离心管的体积添加至 50 ml；离心 10 min，去上清。	的三层，留下每个离心管中的残渣。 用水清洗残渣 3 次，用于去除影响悬浮的乙醚。	体，避免沉淀丢失。加入蒸馏水至终体积约 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。
集卵	沉淀中加入饱和硝酸钠溶液并搅拌，后离心。用金属丝圈转移表层液膜至半杯蒸馏水的烧杯中，将烧杯中混合悬液，通过覆以微孔火棉胶滤膜的高尔特曼氏漏斗抽滤。	加入饱和硝酸钠溶液，清洗搅拌玻棒并收集至管中，后离心。 虫卵收集： 捞取法、黏贴法 将捞取法收集的虫卵通过直径 35 mm 微孔火棉胶滤膜（孔径 0.65 μm~0.80 μm）抽滤。	饱和硝酸钠溶液或饱和氯化钠溶液，搅匀，离心； 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，离心，吸去上清液。	添加 10 ml~15 ml 的硫酸镁溶液离心 5~10 min；上清液过筛，水清洗，收集洗液至烧杯，将悬液移至 15 ml 离心管中，并将清洗烧杯的水也收集至离心管中，一般一个烧杯转移一个离心管；离心 3 min，弃去上清；如果一个样需要多个离心管，须将沉淀转移至一个离心管中，加满水后再次离心；吸出沉淀上层清液。	漂浮：用少量饱和硫酸锌溶液悬浮残渣，并转移到 4 个 15 ml 带平底盖子的离心管中，填满离心管的空余部分，直至离心管顶部有轻微的凸液面，小心拧紧盖子。以 683 g 的离心力离心 1 min。	用少量饱和硝酸钠溶液混匀沉淀后，继续加饱和硝酸钠溶液至 50 ml，拧紧离心管盖，1500 g 离心力离心 5 min 后，用一次性巴氏滴管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。合并沉淀，2500 g 离心力离心 10 min，小心弃去上清液，避免沉淀丢失。
染色镜检	无	无	无	无	无	在沉淀中加入 2 倍体积的次氯酸钠溶液振荡混匀 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。反复清洗几次至溶液 pH 值为中性。加入沉淀等体积的蒸馏水, 混匀后加入 2、3 滴染色液, 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 染色后样品注入定量计数框内, 于生物显微镜下镜检。
培养镜检	滤膜置于载玻片上, 低倍镜下对整张滤膜进行观察和计数, 将含有蛔虫卵的滤膜平铺在皿中滤纸上, 可加入甲醛溶液或甲醛生理盐水, 28 °C~30 °C 培养 10 d~15 d, 置于载玻片上, 显微镜计数。	滤膜平铺在皿中滤纸上, 可加入甲醛溶液或甲醛生理盐水, 24 °C~26 °C 恒温箱培养一个月, 置于载玻片上, 显微镜计数。	加入 2 ml~3 ml 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 °C~26 °C 恒温箱, 培养 20 d, 显微镜下计数。	0.1 N 硫酸溶液中再悬浮, 倒入聚乙烯瓶中。在孵化小瓶之前, 用记号笔标记出液面高度。孵化小瓶, 同时在对照组的小瓶中加入混有 4 ml 0.1 N 硫酸的蛔虫卵, 一起在 26 °C 孵化 3 周~4 周。每天观察小瓶中的液面, 加水至初始液面以补偿蒸发。18 d 后, 每 2 d~3 d, 悬浮、倒置后取等小分的对照组的样品。当绝大多数对照组的蛔虫卵孵化成胚胎时, 镜检样品。 Sedwick-Rafter cell 计数。	4 ml 0.1 N 硫酸溶液中再悬浮, 倒入聚乙烯瓶中, 26 °C 孵化 3 周~4 周。 Sedwick-Rafter cell 计数。	向沉淀加入 4 ml 硫酸溶液混匀后, 倒入培养瓶中, 并用记号笔标记出液面高度, 放至培养箱中 26 °C 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 培养后样品注入定量计数框内镜检, 于生物显微镜下镜检。

3.3 文献资料研究

(1) 文献资料中对相关分析方法研究情况

迄今,国内外各种方法在固体废物中对蛔虫卵的检出率都相对偏低。世界卫生组织(WHO)《Integrated guide to: Sanitary Parasitology》中,第7章节“Methods for detection and enumeration of helminth eggs in wastewater and sludge”中污泥中蛔虫卵检测方法回收率只有20%。我国食品进出口行业商检制定了相关的蛔虫卵检测的行业标准——《泡菜等植物源性食品中寄生虫卵的分离及鉴定规程》(SN/T 1908-2007),建立包括洗脱、过滤、离心、漂浮、镜检等程序的虫卵检验标准方法。该标准中并未对回收率有质控要求的规定,但标准起草人吴绍强^[18]按照其建立的方法检测,取泡菜样品200 g,在其中掺入2000个猪蛔虫(*Ascaris suum*)卵,过滤、沉淀并漂浮后,检测蛔虫卵的数目,蛔虫卵的回收率为35.4%。食品行业中蛔虫卵检测方法回收率也有其他相关报道,胡风庆^[19]等模拟阳性辣白菜样品进行了猪蛔虫卵的回收率实验,建立包括洗脱、过滤、离心、漂浮、镜检等程序的虫卵检验标准方法,泡菜样品中猪蛔虫卵的检出率为32.6%。南昌大学寄生虫教研室的崔晓明和周宪明^[20]曾向干净的土壤样品中添加不同数量(4个/5 g~400个/5 g)的蛔虫卵通过漂浮法对蛔虫卵的检出率进行测定,结果显示各浓度组蛔虫卵的平均检出率范围在5.5%~22.7%。中国疾控中心的钱颖骏^[21]曾用4种不同的漂浮法对土壤中蛔虫卵分离效果进行比较研究,结果显示硫酸锌溶液漂浮法、饱和硝酸钠溶液漂浮法、饱和柠檬酸三钠溶液漂浮法及饱和盐水漂浮法的总蛔虫卵检出率依次为6.29%、25.49%、7.77%和0.19%($F=223.41$, $P<0.01$),说明4种漂浮法均能分离出土壤中的蛔虫卵,以饱和硝酸钠溶液漂浮法的效果最佳,且操作简便,适合大批量土壤样本的蛔虫卵分离检查。英国的Ajala MO^[22]曾用不同种漂浮试剂对不同土质中的蛔虫卵进行检出率测定,结果显示,虫卵检出率以沙土最高,沙粘土次之,粘土最低,此外,检出过程中最大检出率也仅为25.04%。

为快速准确鉴定蛔虫卵的死活,周炳福^[23]等试用了10余种染液,美蓝、伊红、硼砂(以下简称“M.E.B染色液”)染色效果最好,他们用加热煮沸后死亡的人、猪蛔虫卵进行染色,卵内容物染成蓝色的人蛔虫卵98.87%,猪蛔虫99.75%。未处理的人、猪及沼气池中分离的蛔虫卵,不着色的人蛔虫卵98.90%,猪蛔虫卵99.25%,沼气池水98.32%,沼气池水培养法对照组占93.87%。并比较了不同染色时间,直接染3 min~5 min和在小试管中染30 min,效果相同,且染液在室温放置一年半,对染色无影响。镜下观察死活分明,极易辨认,操作方法简单,不需特殊设备,适用于垃圾、堆肥中的蛔虫卵死活测定。杜振峰^[24]等采用“美兰、伊红、硼砂染色法”对不同温度处理的蛔虫卵进行了染色法和培养法检测结果的比对,60℃ 30 min两种方法死卵率有差异,70℃ 30 min染色法死卵率99.02%,培养法死卵率100%。张秀华^[25]用亚甲基蓝对活蛔虫卵、100℃ 5 min水浴失活蛔虫卵染色,培养法作为对照组。丰平^[26]等采用蛋清甘油涂片,使用苏木素-伊红染色法(hematoxylin-eosin staining,简称HE染色法)和茜素红对蛔虫卵标本染色,并发现与马蛔虫卵不同,其他蛔虫卵在酒精和热蜡中更易收缩变形,马蛔虫卵染色技术方法不能用于其他蛔虫卵。李根茂^[27]等改用凡士林封片法,HE染色、伊红复染,染色的虫卵在乙醇中发生收缩和变性,无法脱水封胶。谢醒民^[28]等对人、猪蛔虫不同发育时期卵进行100℃水浴2 min、70℃ 1 h、10%来苏溶液

浸泡 1 d 或 7 d 等方法处死后, 采用固绿染色, 99.5%~100%被染成绿色, 对照培养 100%丧失生活力; 新鲜的人、猪蛔虫卵则 99.5%~100%不被着色, 对照培养平均 94.76%具有生活力, 可用于堆肥、土壤、污水等环境中蛔虫卵的死活鉴别。国外早期, Keller^[29]采用台盼蓝、Ogata^[30]采用苏丹 III、Arene^[31]采用亚甲基蓝-硼砂尝试对蛔虫卵进行染色后的死活鉴别; 后期, Hindiye^[32]开始使用结晶紫进行染色鉴定蛔虫卵的死活。

(2) 与本方法标准的关系

寄生虫卵的回收率均较低, 即使采用昂贵的仪器设备、先进的实验方法通常也只能接近理化类物质的回收率下限。由于生物体独特的生理构造和特性, 其回收率不可能超过 100% (理化类回收率可以在 80%~120%之间), 进一步缩小了生物类样品的回收率范围。

寄生虫卵回收率低 (相对化学物质) 是一个普遍现象, 这是由生物体自身性质决定的。在实验方法的选择上, 化学物质可以通过物质间的转化, 将难检测的物质转化为容易检测的, 如显色等手段。由于生物体的特殊性, 通常在检测时不能破坏其结构组成或需保留生物活性, 这些要求限制了检测方法的选择。一些新发展起来的生化方法及分子生物学方法目前已被应用于寄生虫卵的检测当中, 但相关研究还较少, 可用于实际工作稳定的应用方法也不多。

“十四五”期间, 对进一步提升监测与技术支持的及时性、前瞻性、精准性提出了更高的要求。传统标准中采用的直接镜检法不能对监测对象进行定量测定, 对人员鉴别能力要求高, 培养法虽然方法简单、结果准确可靠, 但耗时过长, 一般为 3 周~4 周, 不利于及时侦测环境状况, 染色法是对经典方法的有利改进和补充。本标准方法采用 M.E.B 染色法对样品进行死活鉴别, 操作简单、易于分辨、不需要特殊设备, 对可疑结果可继续采用培养法以进一步确认。

4 标准制订的基本原则和技术路线

4.1 标准制订的基本原则

本标准依据《国家生态环境标准制修订工作规则》(国环法规〔2020〕4 号)和《环境监测分析方法标准制订技术导则》(HJ 168-2020)的要求, 以国内外标准文献为基础而编制。本标准的编制原则是既参考国外最新的方法技术, 又考虑国内现有监测机构的监测能力和我国的实际经济技术条件, 确保方法标准的科学性、先进性、可行性和可操作性。在标准制订过程中主要满足以下条件。

(1) 本方法蛔虫卵死亡率的精密度满足相关生态环境管理标准和环保工作的要求; 本方法规定了固体废物中蛔虫卵死亡率的测定方法, 适用于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测定。

(2) 方法准确可靠, 满足环境监测方法标准特性指标的要求。

(3) 方法具有普遍适用性, 易于推广使用。本方法所涉及的材料和工具均易购买, 成本低, 操作步骤简单易行。对于具有一定生物鉴别能力的测试人员, 本方法易于使用。

4.2 标准制订的技术路线

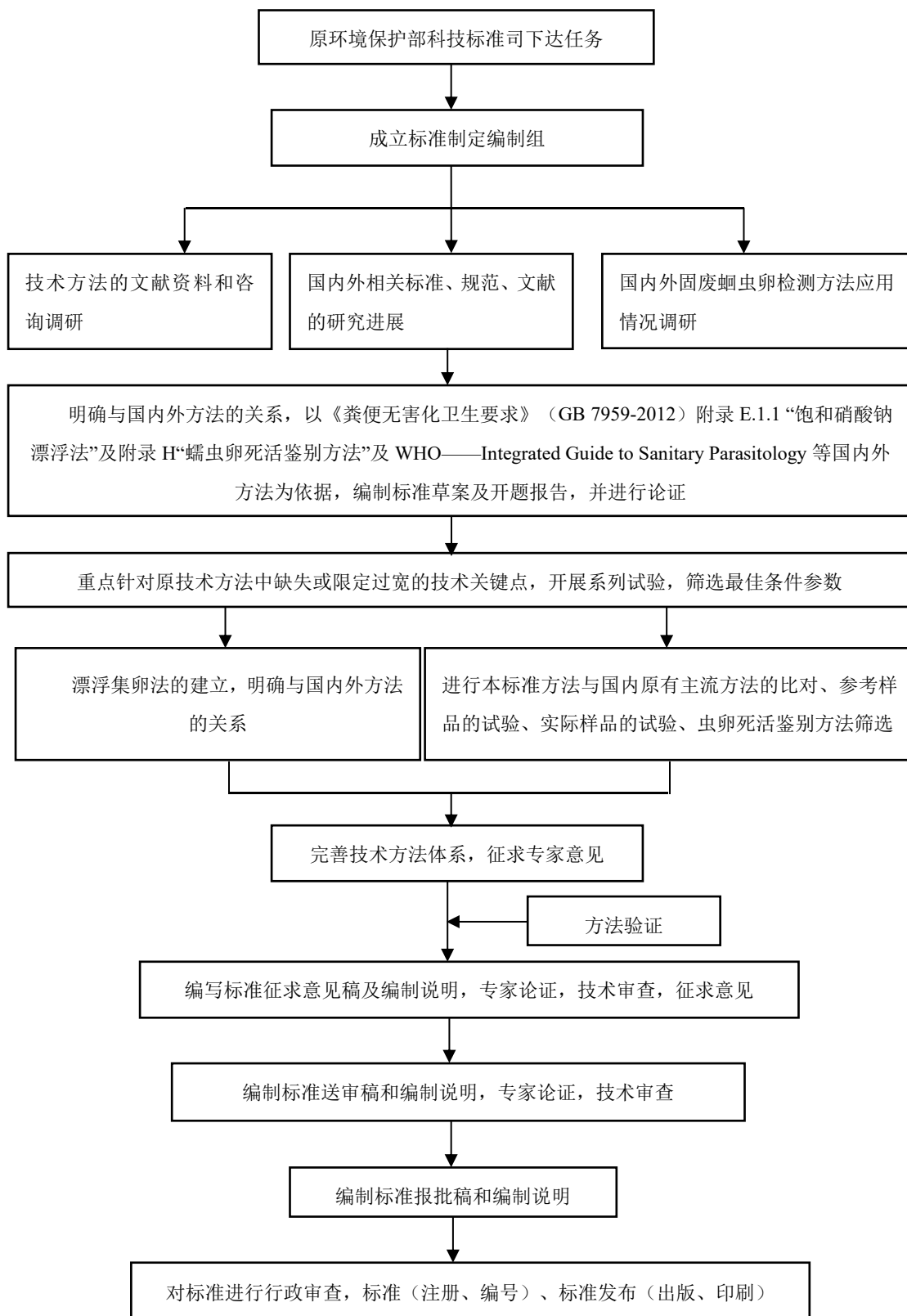


图 3 标准制订技术路线图

本标准制定的技术路线，以《粪便无害化卫生要求》（GB 7959-2012）附录 E.1.1 “饱和硝酸钠漂浮法”及附录 H “蠕虫卵死活鉴别方法”为主要技术体系，重点参照 WHO “Integrated Guide to Sanitary Parasitology”方法。同时，针对原技术体系中存在的关键技术环节开展系列试验，对技术方法进行补充和完善，最后通过实际样品实验室内及实验室间的比对，确认所制定的方法准确可靠，实现固体废物中蛔虫卵死亡率检测的规范化和标准化，为本方法标准在环境管理中的应用奠定基础。编制组编制标准方法的技术路线分为：开题、实验研究、方法验证、征求意见、审查和发布等五个阶段（见图 3）。

5 方法研究报告

5.1 方法研究的目标

（1）本方法标准适用的环境要素、被测目标物

根据开题论证及研讨会专家讨论意见，同时结合目前有关固体废物蛔虫卵管理的实际情况，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。适用于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测定。

（2）本方法测定指标为蛔虫卵死亡率的依据和理由

所有环境管理标准对固体废物中蛔虫卵环境危害的控制主要是通过控制其死亡率来实现的，因此对应于环境管理标准，本方法标准测定的指标为蛔虫卵死亡率。

一般而言，环境管理通过设置污染物限值，去除、降低其对环境的危害，控制环境风险，水质管理中对蛔虫卵的控制指标就是浓度限值。然而，蛔虫是 r-对策生物，在宿主粪便中产生的虫卵数量极大，雌蛔虫一昼夜排出的虫卵多达 100 万~200 万枚，一生可排卵 2000 万枚，导致受粪便污染的固体废物中，蛔虫卵的数量也极多。因蛔虫卵比重较大，易于在水中沉降，便于分离去除，而由于固体废物的特性，蛔虫卵极难从中分离去除，因此，其环境危害控制主流措施是杀死虫卵，控制指标是死亡率 $>（或\geq）95\%$ 。

（3）本方法标准拟达到的技术要求

数量、浓度限值类管理标准，其相应监测技术方法的检出限、测定下限应与管理限值匹配，满足管理需求。而蛔虫卵死亡率是基于一定数量蛔虫卵中死活虫卵数计算而得，方法的检出限、测定下限对最终结果无实质影响。另外，本方法标准无标准物质可用，无法在固体废物的检测中设置检出限。

畜禽养殖业固体废物实验室内蛔虫卵死亡率相对标准偏差范围为 2.4%~8.1%；实验室间的死亡率相对标准偏差为 4.0%；死亡率重复性限为 12%，再现性限为 15%。污水处理厂污泥实验室内蛔虫卵死亡率相对标准偏差范围为 0.76%~4.8%；实验室间的死亡率相对标准偏差为 1.4%；死亡率重复性限为 8.2%，再现性限为 8.7%。医疗机构污泥实验室内蛔虫卵死亡率相对标准偏差范围为 0%；实验室间的死亡率相对标准偏差为 0%；死亡率重复性限为 0%，再现性限为 0%。本标准方法的蛔虫卵死亡率精密度较好，可支持相应指标的检测。

5.2 方法原理

蛔虫为线虫动物门线虫纲蛔目寄生虫，雌雄异体，单个雌虫每日可产 10 万~20 万个虫

卵，产卵盛期每日可产卵 100 万~200 万枚，一生可排卵 2000 万枚。蛔虫卵可感染人及畜禽，包括似蚓蛔线虫 (*Ascaris lumbricoides*)、猪蛔虫 (*Ascaris suum*)、牛弓首蛔虫 (*Neoascaris 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*) 等的卵。

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。

5.3 试剂和材料

除非另有说明，分析时均使用符合国家标准的分析纯试剂，实验用水为蒸馏水。

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

5.3.2 氢氧化钠 (NaOH)。

5.3.3 硝酸钠 (NaNO_3)。

5.3.4 次氯酸钠 (NaClO)。

5.3.5 亚甲基蓝 ($\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{S}$)。

别名美蓝。

5.3.6 硼砂 ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$)。

5.3.7 伊红 ($\text{C}_{20}\text{H}_6\text{Br}_4\text{Na}_2\text{O}_5$)。

5.3.8 硫酸 (H_2SO_4)： $\rho = 1.84 \text{ g/ml}$ ， $w \in [95.0\%, 98.0\%]$ 。

5.3.9 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 (5.3.1) 溶解于 95 g 水中。临用现配。

用于去除样品中的余氯。参考《医疗机构水污染物排放标准》(GB 18466-2005)“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。”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。数据参考《水质 粪大肠菌群的测定 多管发酵法》(HJ 347.3-2018)“注：15.7 mg 硫代硫酸钠可去除样品中 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。”

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

称取 50 g 氢氧化钠 (5.3.2) 溶于少量水中，稀释至 1 L。

氢氧化钠为碱性溶液，用其可去除样品中的脂类物质，使蛔虫卵从黏附的固体废物中分离开来。参考《医疗机构水污染物排放标准》(GB 18466-2005)“将 100 g 污泥样品和 50 ml 5% 氢氧化钠溶液，分别注入三角烧杯内，置于振荡器上”。《肥料中蛔虫卵死亡率的测定》(GB/T 19524.2-2004)“称取 5.0 g~10.0 g 样品（颗粒较大的样品应先进行研磨），放于容量为 50 ml 离心管中，注入氢氧化钠溶液 25 ml~30 ml”。《粪便无害化卫生要求》(GB

7959-2012) “分离虫卵：取过筛样 10 g，放入 50 ml 清洁离心管中，加入 35 ml~40 ml 氢氧化钠溶液（50 g/L）至刻度线”。

5.3.11 饱和硝酸钠溶液。

向 100 ml 水中逐步加入硝酸钠（5.3.3），不断搅拌，直至硝酸钠不再溶解为止，静置后过滤。临用现配。

利用饱和硝酸钠溶液密度比蛔虫卵大，将其漂浮后收集。参考《肥料中蛔虫卵死亡率的测定》（GB/T 19524.2-2004）“饱和硝酸钠溶液(密度 1.38-1.40)”；《粪便无害化卫生要求》（GB 7959-2012）“用饱和硝酸钠溶液将蛔虫卵漂浮，收集漂浮的蛔虫卵镜检”；《医疗机构水污染物排放标准》（GB 18466-2005）D4.2.3 漂浮中“离心管内注入饱和硝酸钠溶液或饱和氯化钠溶液，搅匀”。硝酸钠在不同温度下的溶解度详见表 4。

表 4 硝酸钠水中溶解度

温度（℃）	溶解度（g）
0	73
10	80
20	87
30	95
40	103

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

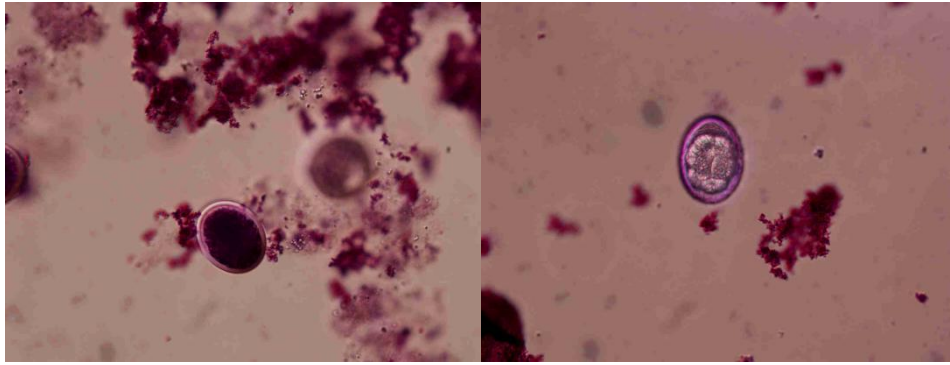
称取 30 g 次氯酸钠（5.3.4）溶解于 70 g 水中。临用现配。

溶解蛔虫卵蛋白膜，有助于染色剂着色。Reimers^[33]研究发现次氯酸钠盐以及其他氧化剂如高氯酸等，可用于去除虫卵外壳。

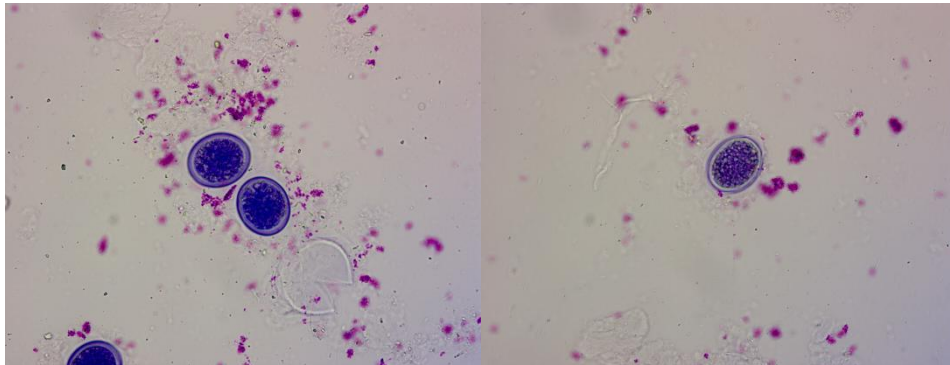
5.3.13 染色液。

将 0.2 g 亚甲基蓝（5.3.5）加入 100 ml 蒸馏水中煮沸 10 min，加入硼砂（5.3.6）0.5 g，再煮沸 10 min，冷却后加入伊红（5.3.7）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。

亚甲基蓝、伊红、硼砂染色液溶于水呈碱性。活虫卵可以还原碱性染料，降低着色力，不易被染色。死虫卵不能还原碱性染料，容易着色。蛔虫卵外层蛋白质膜容易被染色，染色前需脱去蛋白质膜。保存时间参考周炳福等^[23]，“M.E.B.染液可在室温放置一年半，对染色无影响。”对样品染色效果进行保存时间与染色效果实验。结果见图 4。



染色液新制时染色效果



染色液常温避光保存 1 年后染色效果

图 4 染色液保存时间与染色效果实验

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

取 2.72 ml 硫酸 (5.3.8), 缓慢倒入少量水中, 稀释至 1 L。

用于蛔虫卵培养过程中脱去蛔虫卵蛋白质膜, 有助于蛔虫卵的发育孵化和抑制杂菌生长。参考 EPA 的 “Control of Pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge” 的附录 “Appendix I Test Method for Detecting, Enumerating, and Determining the Viability of Ascaris Ova in Sludge” 中提到 “Resuspend the solids in 4 ml 0.1 N H_2SO_4 and pour into a 20 ml polyethylene scintillation vial or equivalent with loose caps.” 用 4 ml 0.1 N H_2SO_4 重悬沉淀, 倒入一个 20 ml 带盖的聚乙烯瓶或类似瓶子内。以及在 WHO: “Integrated Guide To Sanitary Parasitology” 的 “8.5 Analytical Method for Viable Helminth Ova in Sludge” 中 “Resuspend the pellet in 4 ml 0.1 N H_2SO_4 and pour into Nalgene tubes with loose caps.” 用 4 ml 0.1 N H_2SO_4 重悬沉淀, 倒入一个带盖 Nalgene 瓶内。

5.3.15 玻璃珠: 直径为 1 mm~5 mm。

使用玻璃珠将试样打散和混合均匀, 使氢氧化钠与试样充分接触, 从而提高脂类物质去除的效率。

5.4 仪器和设备

5.4.1 采样瓶: 带盖玻璃或塑料广口瓶, 1 L。

样品采集用。

5.4.2 筛网：孔径 710 μm 、212 μm 。

用于去除样品中一些较大杂质，减少样品中杂质的量。

5.4.3 量杯：玻璃材质，1 L。

用于样品的沉淀浓缩。

5.4.4 离心机：最大离心力 2500 g 以上。

用于样品离心浓缩。

5.4.5 水平振荡仪或其他性能相当的设备。

用于样品的充分混匀，其他能达到样品混匀目的的实验设备也可以采用。

5.4.6 恒温培养箱：26 $^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 。

用于蛔虫卵培养孵化。

5.4.7 生物显微镜：物镜 4 $\times$ 、10 $\times$ 、40 $\times$ ，目镜 5 $\times$ 或 10 $\times$ 。

用于蛔虫卵数量镜检及虫卵死活鉴定。

5.4.8 培养瓶：具聚乙烯盖的玻璃瓶，20 ml。

用于蛔虫卵的孵化培养。

5.4.9 定量计数框：50 mm $\times$ 20 mm $\times$ 1 mm，底部均分 40 正方格，1 ml。

用于蛔虫卵定量计数。

5.4.10 离心管：塑料材质，尖底，螺旋盖，50 ml。

用于样品的沉淀浓缩和蛔虫卵的漂浮收集。对于样品少的，尖底的利于沉淀的浓缩，更易于用吸管吸取上层液。螺旋盖可防止离心过程中样品液的泄露。

5.4.11 一次性巴氏滴管：3 ml、10 ml。

用于实验过程中废液的吸取及漂浮集卵步骤中浮膜的吸取。

5.4.12 生物实验室常用仪器和设备。

5.5 样品

5.5.1 样品采集与保存

样品的采集与保存按照 HJ/T 20^[34]和 HJ 298^[35]的相关规定执行。取 200 g $\sim$ 300 g 样品放入采样瓶（5.4.1）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 $^{\circ}\text{C}\sim$ 10 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏并在 48 h 内检测。

样品的采集根据固废的定义、分类以及配套标准的要求，严格按照《工业固体废物采样制样技术规范》（HJ/T 20）、《危险废物鉴别技术规范》（HJ 298）采集有代表性的固体废物样品。本标准样品类型涉及了畜禽养殖业固体废物、医疗机构和城镇污水处理厂污泥三类。考虑到实际样品中可能存在较大的夹杂物，如腐烂的布条、草梗、小石块等，而最终实验分析需要 100 g 样品，因此本标准相应增加取样量至 200 g $\sim$ 300 g。《粪便无害化卫生要求》（GB 7959-2012）中备检样品量不少于 100 g，用于实验分析样品 10 g；《医疗机构水污染物排放标准》（GB 18466-2005）中附录 D 中用于实验分析样品量为 100 g；《肥料中蛔虫卵死亡率的测定》（GB/T 19524.2-2004）中采用的样品量为 5.0 g $\sim$ 10.0 g。考虑到样品的代表性和不均一性，本标准实验方法采用 200 g $\sim$ 300 g 备检样品量，100 g 的实验样品量。含氯样品的保存主要参考《医疗机构水污染物排放标准》（GB 18466-2005）中“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”。

蛔虫卵样品采集后运输条件，其**最高**耐受温度参考 WHO：“In general, temperatures above 60°C are rapidly lethal to eggs.”一般来说，60 °C 以上的温度对虫卵来说是迅速致命的。“The infective larvae of Ascaris suum develop in the egg between temperatures 16±1 °C and 34±1 °C.”猪蛔虫的感染幼虫在 16±1 °C 至 34±1 °C 的温度下在卵中发育。“Different embryonation temperatures ranging between 17°C and 32°C have been published by a number of researchers as the optimum temperature at which rapid and uniform development of Ascaris eggs is accomplished.”许多研究人员已经发表了不同的胚胎温度，范围在 17 °C 到 32 °C 之间，作为蛔虫卵快速均匀发育的最佳温度。蛔虫卵**最低**耐受温度参考 WHO：“Low temperatures (8.9 °C to 15.6 °C) inhibit complete development of the cells inside the eggs; once eggs were moved to room temperature the development to the motile embryo was accomplished (Seamster, 1950).”低温（8.9 °C~15.6 °C）能够完全抑制虫卵内细胞的发育，一旦虫卵恢复至室温即开始发育。“It is common practice to store eggs in a refrigerator at temperatures ranging from 7 °C or 8 °C upward, during which time they remain viable but uncleaved; it seems quite likely that such eggs may not be completely dormant and might undergo physiological changes.”实践中虫卵的保存通常在 7 °C~8 °C 冰箱里，能保留活性而不死亡。但这类虫卵可能不会完全休眠，依然会发生生理变化。蛔虫卵的发育要求有适宜的温度、湿度和氧气。综合各类可能影响蛔虫卵活性的因素及虫卵孵化至感染期时间通常为 20 d~30 d，样品采集后可常温保存运输，但应尽快运输至实验室进行检测。

样品保存温度主要参考《医疗机构水污染物排放标准》（GB 18466-2005）中规定样品在 4 °C~10 °C 冰箱内保存。另外，EPA: Appendix I Test Method for Detecting, Enumerating, and Determining the Viability of Ascaris Ova in Sludge 中“6.1 Freezing of samples will interfere with the buoyant density of Ascaris ova and decrease the recovery of ova.”6.1 样品的冷冻会干扰蛔虫卵的浮力密度，并降低卵的回收率。“10.3 Store the samples in the laboratory refrigerated at 2 to 5EC. Do not freeze the samples during transport or storage.”10.3 样品在实验室保存温度为 2 °C~5 °C。在运输或储存过程中都不要冷冻样品。WHO：“Integrated Guide To Sanitary Parasitology”方法中“Samples not analyzed promptly are stored at 0 °C to 4 °C.”建议样品保存温度为 0 °C~4 °C。《粪便无害化卫生要求》（GB 7959-2012），《肥料中蛔虫卵死亡率的测定》（GB/T 19524.2-2004）则未规定保存温度。本标准实验方法规定置于 4 °C~10 °C 冷藏保存。

样品保存时间参考《畜禽粪便监测技术规范》（GB/T 25169-2022）中“9 试样的制备和保存”中关于“蛔虫卵死亡率”检测项目样品的有效期为“24 h”，本标准规定保藏时间不要超过 48 h。

5.5.2 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。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。

实际采集到的样品状态主要是液态污泥、较为干燥的松散固态样品以及脱水后干结为较大硬块的固态样品。较为干燥的松散样品可用蒸馏水制成混悬液，干结较大的硬块样品需要先在搪瓷盘中夹碎，然后选取粉末或碎块进行称量后，再用蒸馏水制成混悬液，液体污泥可直接量取。含水量极高、固体物质微量的样品，建议按《水质 蛔虫卵的测定 沉淀集卵法》（HJ 775-2015）进行样品检测。各标准中对试样制备的描述见表 5。

表 5 标准技术方法中试样的制备

标准技术方法	试样制备
WHO 方法	液体污泥：将 250 ml 的液体污泥与 250 ml 的水一起通过 710 μm 和 212 μm 网筛。 干燥污泥：用 250 ml 水浸泡 50 g 干燥污泥样品，再用 250 ml 水过筛。
EPA 方法	液体样品：测量 1000 ml 或更多（估计含有至少 50 g 干固体）的液体样品。 干燥或厚重样品：称重约 300 g（估计干重），将其放入约 500 ml 的水中，在 4 $^{\circ}\text{C}$ ~ 10 $^{\circ}\text{C}$ 下浸泡一夜。
《粪便无害化卫生要求》（GB 7959-2012）	堆肥：将样品倒于瓷盘内，压碎该样品中较大的土颗粒，先后用孔径 3 mm 的铜筛和孔径 2 mm 的铜筛过筛。 粪稀：取出料口粪稀，样品量可达 5000 ml，分别用 250 μm 铜筛过滤于量杯中。
《肥料中蛔虫卵死亡率的测定》（GB/T 19524.2-2004）	称取 5.0 g~10.0 g 样品（颗粒较大的样品应先进行研磨）
《医疗机构水污染物排放标准》（GB 18466-2005）中附录 D	将 100 g 污泥样品和 50 ml 5%氢氧化钠溶液，分别注入三角烧杯内
本标准方法	称取 100 g 样品置于烧杯中，倒入 500 ml 蒸馏水混合制成混悬液。 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。

5.6 分析步骤

5.6.1 过滤

将制备好的试样（5.5.2）依次通过 710 μm 孔径和 212 μm 孔径筛网（5.5.2）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（5.4.3）中。过滤时可用玻璃棒轻轻摩擦筛网加快样品过筛。

部分技术方法采用筛网过滤来减少后续步骤中杂质含量。采用过滤步骤的技术方法，均为两步过滤，即通过不同孔径的筛网逐级滤去大小不同的杂质，有效降低后续实验中杂质的含量。不同方法试样前处理中过滤步骤具体见表 6。《粪便无害化卫生要求》（GB 7959-2012）“E.1.1.3.2 样品预处理步骤”中堆肥样品是直接过筛，过筛前未加蒸馏水制成混悬液，因

此采用的两级筛网孔径均较大，筛除的杂质为 2 mm 粒径以上的粗颗粒，筛分后试样的量较多。“E.2 粪稀蛔虫卵的检查”中对含水量较高的粪稀样品，则用 250 μm 铜筛过滤于量杯中。WHO 方法和 EPA 方法中统一将样品制备成混悬液，故采用的两级筛网规格近似，孔径比均较大，筛除的各粒径杂质较多。本标准方法采用的实验前处理主要参考了 WHO 方法。

表 6 标准技术方法中试样的过滤

标准技术方法	筛网孔径	筛网孔径比
WHO 方法	710 μm 网筛和 212 μm 网筛	3.35
EPA 方法	20 目（850 μm ）或 50 目（300 μm ）筛	2.83
《粪便无害化卫生要求》（GB 7959-2012）	堆肥：3 mm 和 2 mm 铜筛 粪稀：250 μm 铜筛	1.50
《肥料中蛔虫卵死亡率的测定》（GB/T 19524.2-2004）	无	/
《医疗机构水污染物排放标准》（GB 18466-2005）中附录 D	无	/
本标准方法	710 μm 网筛和 212 μm 网筛	3.35

5.6.2 沉淀

将滤液（5.6.1）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（5.4.10）中，少量蒸馏水清洗量杯内壁，洗液一同并入，置于离心机（5.4.4）上以 1500 g 离心力离心 5 min，弃上清液。

样品沉淀时间主要参考 EPA：“Control of Pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge”的附录“Appendix I Test Method for Detecting, Enumerating, and Determining the Viability of Ascaris Ova in Sludge”中“12.4 Allow sample to settle four hours or over night at 4 - 10EC”。4 $^{\circ}\text{C}$ ~ 10 $^{\circ}\text{C}$ 下允许样品沉淀 4 h 或过夜。根据 WHO：“2.1 The modified Baileger method”中“Note (2): sedimentation times: Stokes’ law can be used to calculate the settling rates of nematode eggs in water. At 20 $^{\circ}\text{C}$ the settling rates of the three most commonly found eggs are: Ascaris lumbricoides 20 mm/min。”寄生虫卵在水中的沉降是可以计算的。在 20 $^{\circ}\text{C}$ 下最常见的三种寄生虫卵沉降速率：蛔虫卵 20 mm/min。根据提供的蛔虫卵沉降速率计算沉降 1 m 高约需 50 min，4 h 足够蛔虫卵充分沉降，一些特殊样品可延长沉降时间（过夜）。

离心机的离心力及离心时间的选择参考 EPA 方法中样品沉淀离心阶段“12.11 Centrifuge for 10 minutes at 1000 X G. Vacuum aspirate supernatant from each tube down to just above the level of sediment.” 12.11 在 1000 g 下离心 10 min，从每根管中抽吸上清液至沉淀物表层。及在漂浮集卵阶段“12.13 Add additional MgSO_4 solution (specific gravity 1.20) to each tube to bring volume to 50 ml. Centrifuge for five to ten minutes at 800 to 1000 X g.” 12.13 在每个试管中加入额外的 MgSO_4 溶液（比重为 1.20），使体积达到 50 ml。在 800 g 至 1000 g 下离心 5 min 至 10 min。国内各蛔虫卵标准方法对离心机的规定均为转速 2000 r/min ~ 2500 r/min 的

转速离心。具体比较见表 7。

表 7 标准技术方法中离心力（转速）的选择

标准技术方法	氢氧化钠溶液加入量
WHO 方法	样品沉淀：717 g，20 sec 杂质分离：728 g，2 min 漂浮集卵：638 g，1 min
EPA 方法	杂质分离：1000 g，10 min 漂浮集卵：800 g～1000 g，5 min～10 min
《粪便无害化卫生要求》（GB 7959-2012）	杂质分离：2000 r/min～2500 r/min，3 min～5 min 漂浮：2000 r/min～2500 r/min，3 min～5 min
《肥料中蛔虫卵死亡率的测定》（GB/T 19524.2-2004）	杂质分离：2000 r/min～2500 r/min，3 min～5 min 漂浮：2000 r/min～2500 r/min，3 min～5 min
《医疗机构水污染物排放标准》（GB 18466-2005）中附录 D	水洗：2000 r/min～2500 r/min，5 min 漂浮：2000 r/min～2500 r/min，5 min 沉淀集卵：5000 r/min，5 min
本标准方法	样品沉淀：1500 g，5 min 杂质分离：1500 g，5 min 漂浮集卵：2500 g，10 min

离心力由公式（1）计算：

$$RCF = \frac{r \cdot (rpm)^2}{k} \quad (1)$$

式中：RCF ——相对离心力，g；

r ——离心机半径（离心管中心至离心机轴的距离），cm；

rpm ——离心机转速，r/min；

k ——89456。

对市场上离心机转速及离心力进行调查，可离 50 ml 离心管的离心机多为大型低速离心机。其最大转速通常在 4000 r/min 左右，最大离心力一般在 2000 g～2700 g 间。为保证蛔虫卵能较好地杂质中沉淀分离出来，根据本方法中样品的实验量，参考以上各标准技术方法，样品沉淀、杂质分离步骤离心力选择 1500 g，离心时间选择 5 min。漂浮集卵步骤中为确保蛔虫卵能充分沉淀，离心力选择 2500 g，离心时间为 10 min。

5.6.3 杂质分离

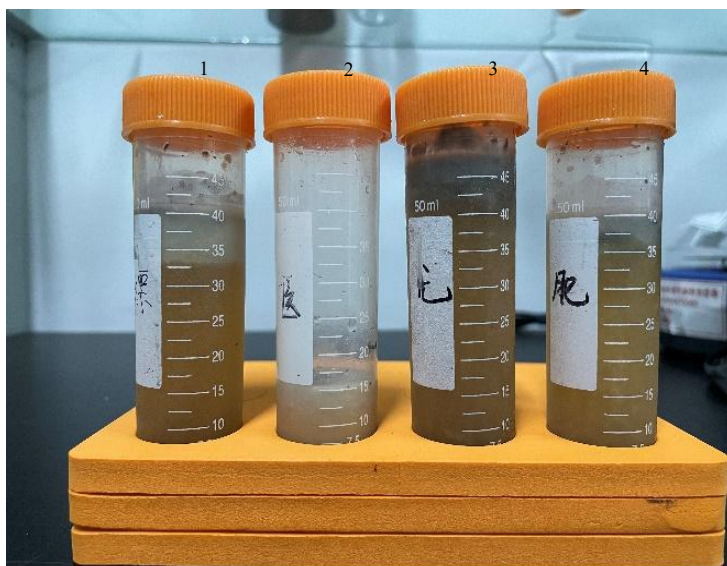
向每个离心管沉淀(5.6.2)中加入氢氧化钠溶液(5.3.10)25 ml～30 ml，及玻璃珠(5.3.15) 10 粒～20 粒，旋紧管盖，于水平振荡仪（5.4.5）上以 200 r/min～300 r/min 振荡 1.5 h～2 h，静置 30 min。1500 g 离心力离心 5 min，弃上层杂质和液体，避免沉淀丢失。加入蒸馏水至终体积 50 ml，充分振荡混匀后，1500 g 离心力离心 5 min，弃上清液保留沉淀，重复本步骤至上清液接近透明。

本步骤参考了《粪便无害化卫生要求》（GB 7959-2012）、《医疗机构水污染物排放标

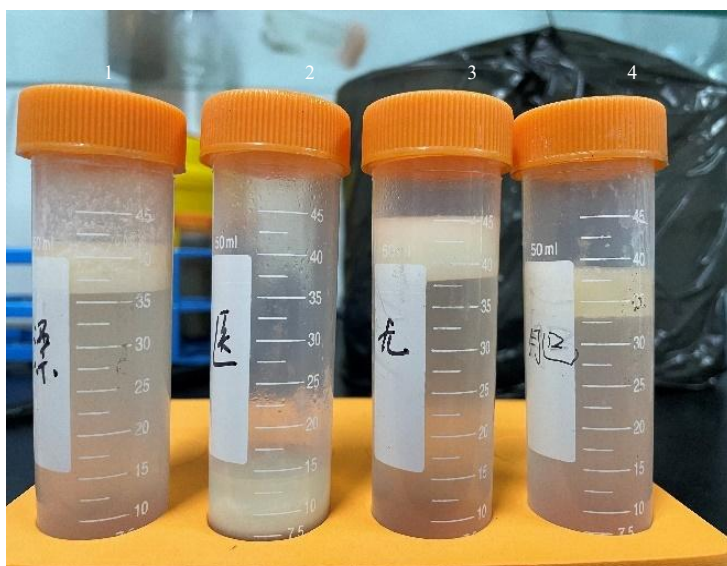
准》（GB 18466-2005）中附录 D 以及《肥料中蛔虫卵死亡率的测定》（GB/T 19524.2-2004），方法间的差异见表 8。氢氧化钠有助于去除样品中的脂类杂质，进一步缩小沉淀体积及对虫卵的黏附。其中《医疗机构水污染物排放标准》（GB 18466-2005）中附录 D 使用的氢氧化钠溶液最少（100 g 样品仅加入 50 ml 5%氢氧化钠溶液），不足以去除所有脂类杂质。本研究对四种方法采用了模拟粪便成分的自制样品和 1:1 水油混合物两种样品进行了比较试验，去除的油脂类杂质并无显著差异。本方法采取连续振荡 1.5 h~2 h 后静置 30 min，在不降低去除杂质效果的基础上，可减少工作量。静置后，反复清洗可去除可溶解的杂质及残留的氢氧化钠溶液，恢复溶液至中性。4 种方法的实验结果比较见图 5。

表 8 标准杂质分离的差异比较

标准	氢氧化钠溶液加入量	振荡分离步骤
《粪便无害化卫生要求》 （GB 7959-2012）	过筛样 10 g 放入 50 ml 清洁离心管中，35 ml~40 ml 氢氧化钠溶液，另加玻璃珠约 10 粒。	振荡 10 min~15 min，转速 200 r/min- 300 r/min，静置 15 min~30 min 后，再行振荡，如此重复 3 次~4 次。
《肥料中蛔虫卵死亡率的测定》（GB/T 19524.2-2004）	称取 5.0 g~10.0 g 样品放于容量为 50 ml 离心管中，氢氧化钠溶液 25 ml~30 ml，另加玻璃珠约 10 粒。	静置 30 min 后，以 200 r/min~300 r/min 频率振荡 10 min~15 min，用玻璃棒将离心管中的样品充分搅匀，再次用橡皮塞塞紧管口，静置 15 min~30 min 后，振荡 10 min~15 min。
《医疗机构水污染物排放标准》（GB 18466-2005）中附录 D	100 g 污泥样品和 50 ml 5%氢氧化钠溶液，分别注入三角烧杯。	以 200 次/ min~300 次/ min 速度振荡 30 min，然后静置 30 min。
本标准方法	每个离心管的沉淀中加氢氧化钠溶液 25 ml~30 ml，及玻璃珠 10 粒~20 粒。	200 r/min~300 r/min 振荡频率振摇 1.5 h~2 h，静置 30 min。



模拟粪便成分的自制样品分离效果



1: 1 水油混合物分离效果

1——本标准方法；2——《医疗机构水污染排放标准》（GB 18466-2005）；3——《粪便无害化卫生要求》（GB 7959-2012）；4——《肥料中蛔虫卵死亡率的测定》（GB/T 19524.2-2004）

图 5 2 种样品 4 种方法氢氧化钠溶液的处理效果示意图

5.6.4 漂浮集卵

用少量饱和硝酸钠溶液（5.3.11）混匀沉淀（5.6.3），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（5.6.11）吸接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（5.6.10）中，向新离心管中加入 10 倍浮膜液体体积的蒸馏水，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。

Ajala MO^[21]研究发现，饱和硫酸锌溶液比重 1.16，饱和硝酸钠溶液比重 1.30，饱和硝酸钠溶液的比重更有利于蛔虫卵的上浮。在浓度为 500 个卵/25 g 沙土中，饱和硝酸钠和硫酸锌的蛔虫卵最大检出率分别为 25.04%和 13.80%。几种常用漂浮液及蠕虫卵的比重^[36]见表 9，其中未受精蛔虫卵比重 1.210~1.230，受精蛔虫卵比重 1.110~1.130。漂浮液中饱和硝酸钠溶液比重最大，为 1.358~1.365。

表 9 几种漂浮液和蠕虫卵比重

类别	名称	比重
漂浮液	饱和硝酸钠溶液	1.358~1.365
	饱和硫酸锌溶液	1.180
	饱和氯化钠溶液	1.175~1.200
蠕虫卵	华支睾吸虫卵	1.170~1.190
	日本血吸虫卵	1.200
	鞭虫卵	1.150
	姜片吸虫卵	1.190
	钩虫卵	1.055~1.080
	蛲虫卵	1.105~1.115
	未受精蛔虫卵	1.210~1.230
	受精蛔虫卵	1.110~1.130

5.6.5 镜检

5.6.5.1 染色后镜检

在沉淀（5.6.4）中加入 2 倍沉淀体积的次氯酸钠溶液（5.3.9），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（5.3.13）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（5.4.9）内，于生物显微镜（5.4.7）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。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。若染色后镜检蛔虫卵死亡率<95%，则需从“5.5.2 试样的制备”至“5.6.4 漂浮集卵”重新制备试样，进行“5.6.5.4 培养后镜检”。

次氯酸钠可溶解蛔虫卵蛋白质膜，有助于染色剂着色。次氯酸钠的选择参考了《粪便无害化卫生要求》（GB 7959-2012）“在载玻片上滴 1~2 滴‘30%安替福尼’液代替清水，蛔虫卵外面的蛋白质壳很快被溶解掉”，《医疗机构水污染物排放标准》（GB 18466-2005）中附录 D “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”。

比较了文献中提到的 5 种常用蛔虫卵染色液——苏丹Ⅲ红、亚甲基蓝、结晶紫、固绿和

M.E.B 染色液的染色效果。苏丹Ⅲ红易溶于苯，溶于氯仿、冰乙酸、乙醚、乙醇、丙酮、石油醚、不挥发油、热甘油和挥发油，不溶于水，主要用于标本切片染色。亚甲基蓝是一种吩噻嗪盐，为深绿色青铜光泽结晶或粉末，可溶于水和乙醇，不溶于醚类，在空气中较稳定，其水溶液呈碱性。结晶紫为氯化四甲基副玫瑰苯胺、氯化五甲基副玫瑰苯胺与氯化六甲基副玫瑰苯胺的混合物。根据染色实验结果，苏丹Ⅲ红在水性介质中，几乎无法使虫卵染上色。苏亚甲基蓝和结晶紫染色后颜色较深，不利于蛔虫卵内部结构观察。固绿是一种酸性染料，染含有浆质的纤维素细胞组织的染色剂，在染细胞和植物组织上应用极广，但对蛔虫卵染色颜色较浅，与背景反差小。M.E.B 染色液的染色效果相对更好，染色后的虫卵与镜检视野中其他杂质的反差更大，如图 6、图 7 所示：

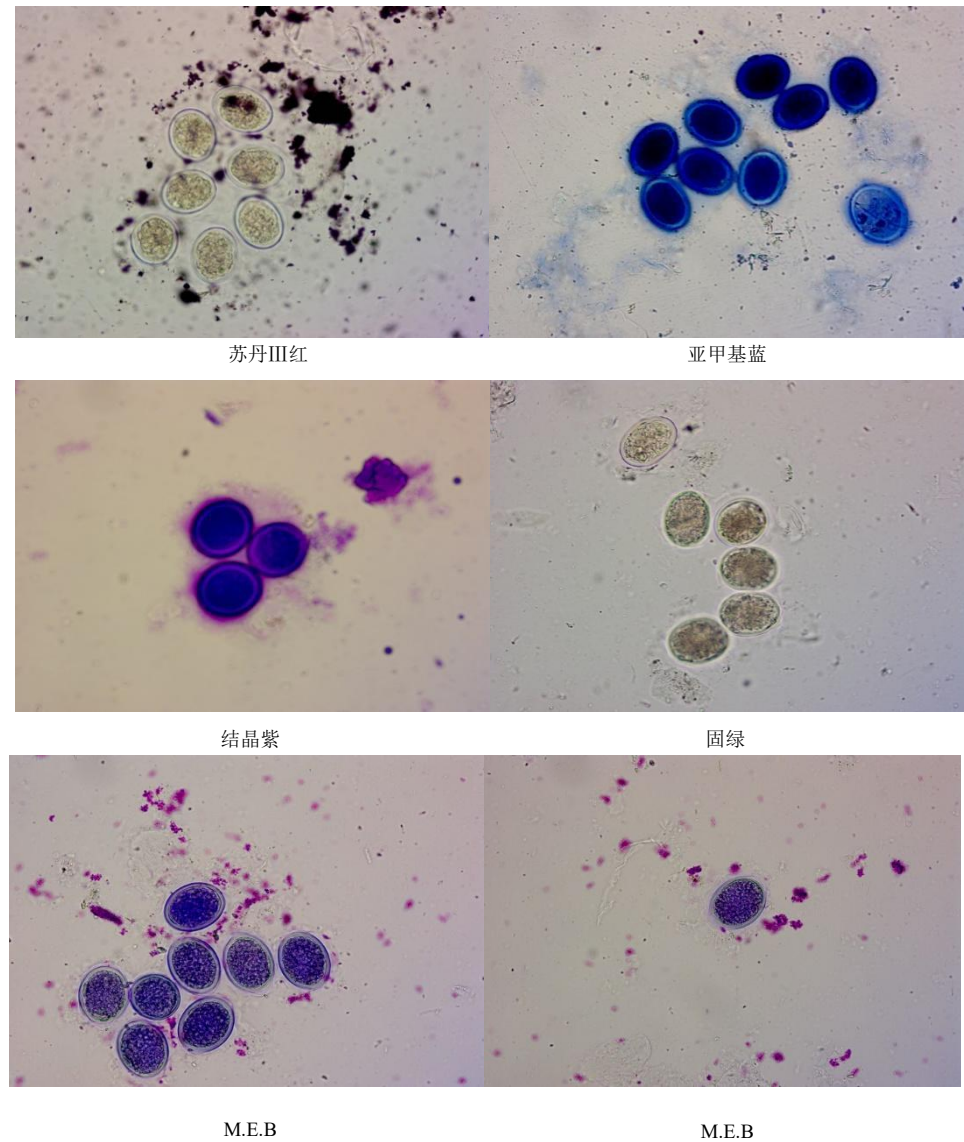


图 6 5 种染色液对脱膜蛔虫卵的染色效果示意图

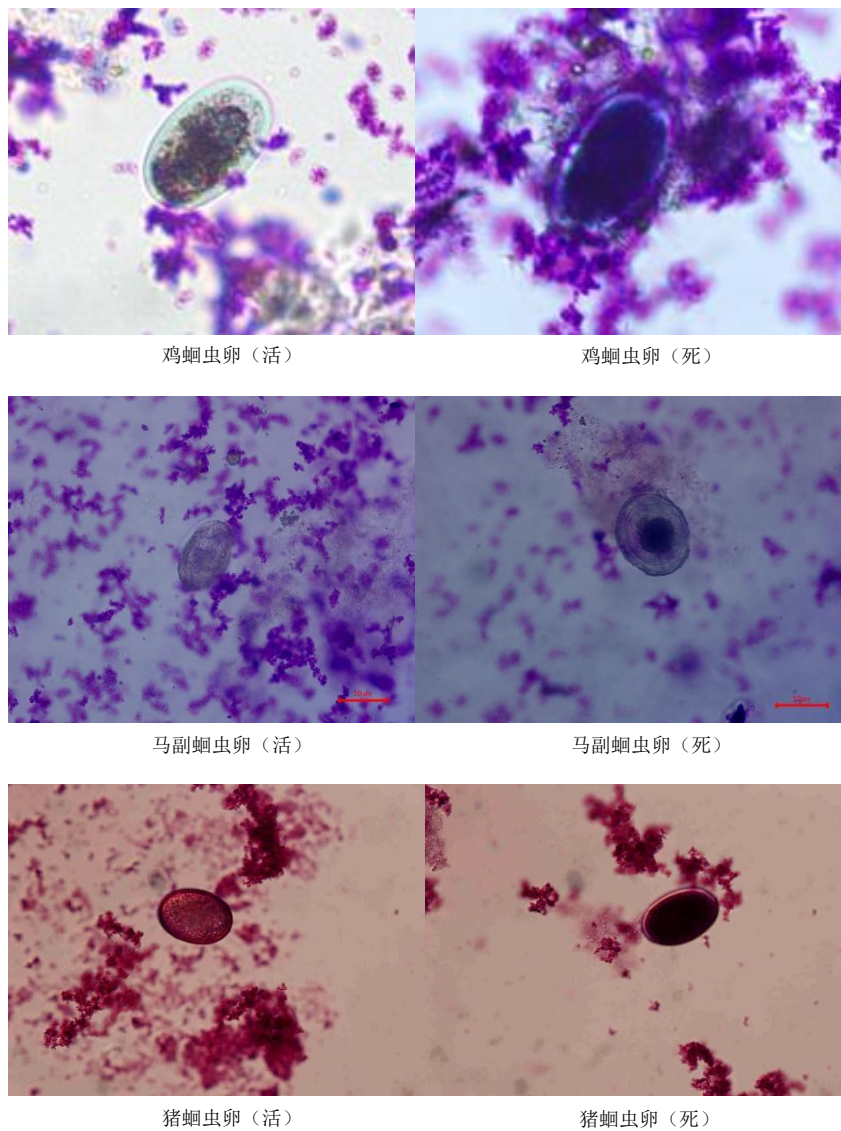


图 7 蛔虫卵（活、死）染色效果示意图

5.6.5.2 蛔虫卵参考图片

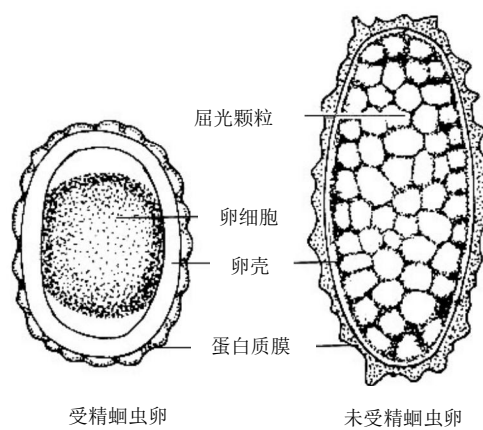
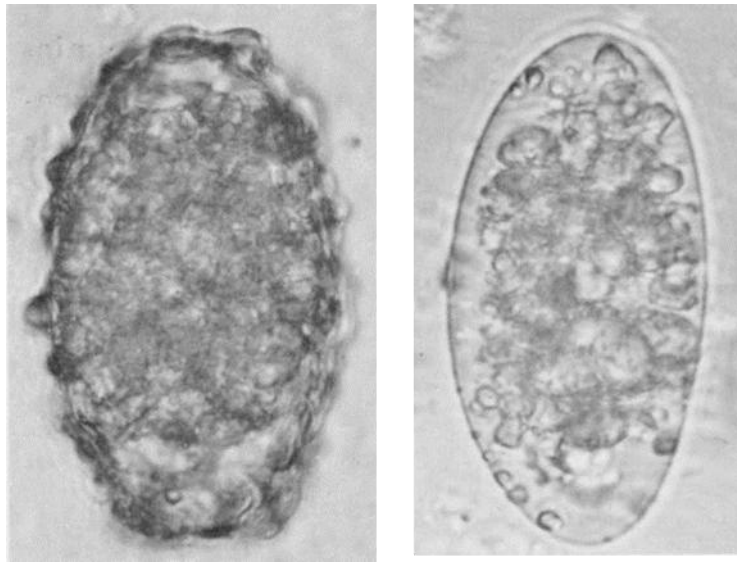
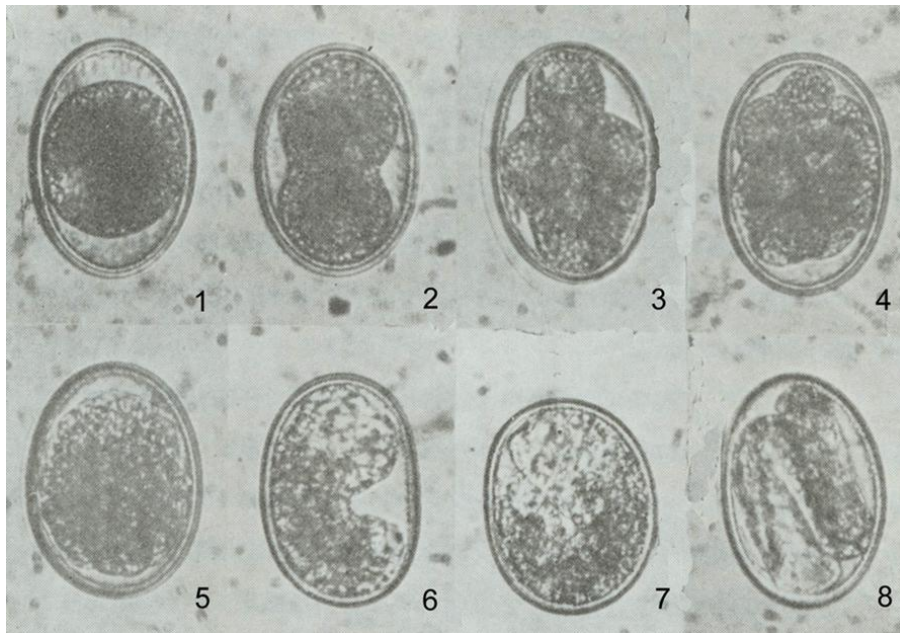


图 8 蛔虫卵模式图



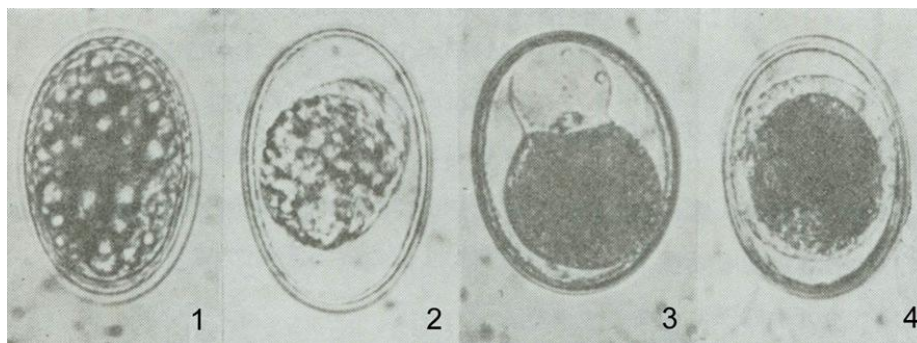
1——未受精蛔虫卵外包锯齿状突起的蛋白膜 2——脱蛋白膜的未受精蛔虫卵

图 9 未受精蛔虫卵参考图



1——单细胞期活受精蛔虫卵；2——二细胞期活受精蛔虫卵；3——四细胞期活受精蛔虫卵；4——多细胞期活受精蛔虫卵；5——桑椹期卵（卵胚一端透明有光泽）；6——蝌蚪期卵（卵胚的一部分凹陷）；7——仔虫期卵（可见幼虫呈8字状运动）；8——不均等发育，卵内一部分发育为仔虫期，一部分为蝌蚪期

图 10 活蛔虫卵参考图



1——卵细胞颗粒化；2——卵细胞萎缩；3——卵细胞空泡化；4——卵细胞质的周边部透明化

图 11 死蛔虫卵参考图

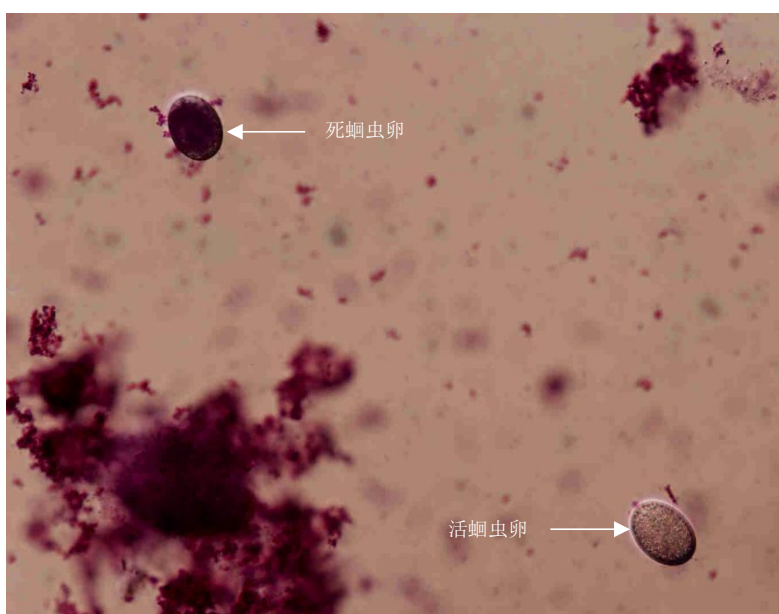


图 12 染色后蛔虫卵参考图（显微镜下 10×20 ）

5. 6. 5. 3 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。

死受精蛔虫卵（变性卵）的形态：卵细胞移向一端，致使卵壳两端呈现有大小不等的半月形空隙；卵内脂肪变性，形成空泡，很像未受精卵，高温堆肥样品中卵内的空泡尤为显著；卵细胞颗粒减少或消失；卵细胞质浑浊，呈黑色或棕黑色；卵细胞向不定部位呈球状收缩；卵壳的一侧或两侧，一端或两端向内凹陷或破裂；只有蛋白质壳，而缺内容物。

含有活幼虫卵的形态：虫体的前后部没有颗粒，中部颗粒清晰而有金属光泽，有立体感；

镜检时注视或轻压，可见有轻微蠕动，强压后，有时可挤出幼虫。

含有死幼虫卵的形态：幼虫体内几乎充满颗粒，且模糊不清，无金属光泽，缺乏立体感；镜检时注视之，久久不见蠕动，稍稍加热或轻压，不会蠕动，强压时，虽能挤出幼虫，但也不改变其原来的卷曲状态。

以上所列是死活蛔虫卵的一般形态，在镜检中有时会遇到外形发生变化的畸形活卵和各种形态的未受精卵以及容易误认为寄生虫卵的异物，因此需注重经验的积累。

5.6.5.4 培养后镜检

向沉淀（5.6.4）中加入 4 ml 硫酸溶液（5.3.14）混匀后，倒入培养瓶（5.4.8）中，并用记号笔标记出液面高度，放至培养箱（5.4.6）中 26 ℃ 孵化 30 d。期间每天目测观察瓶中的液面，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（5.4.9）内，于生物显微镜（5.4.7）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）。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。蛔虫卵形态及死活鉴别参见图 13。

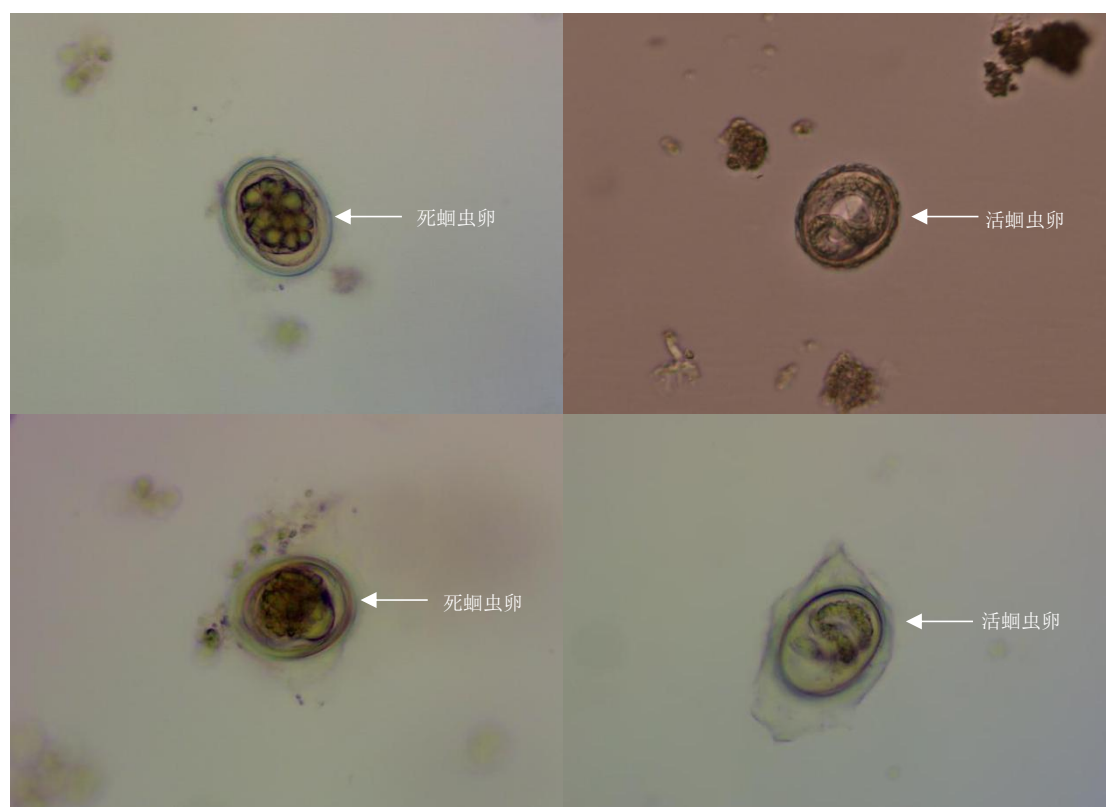


图 13 培养后死、活蛔虫卵鉴别参考图（显微镜下 10×20）

蛔虫卵培养温度和时间参考了《粪便无害化卫生要求》（GB 7959-2012）“把平皿放在 24 ℃～26 ℃ 的恒温箱中培养一个月”。其他标准方法中如《医疗机构水污染物排放标准》（GB 18466-2005）中附录 D “转移至试管或直接置于 24 ℃～26 ℃ 恒温箱，培养 20 d”，

《肥料中蛔虫卵死亡率的测定》（GB/T19524.2-2004）“在 28 ℃～30 ℃条件下培养，培养 10 d～15 d”。WHO: Integrated Guide to Sanitary Parasitology 的 8.5 Analytical Method for Viable Helminth Ova in Sludge 中 “Incubate the tubes at 26℃ for three to four weeks.” 在 26 ℃条件下培养 3 周～4 周。考虑本标准在培养步骤前已经设置了较为快速的染色步骤，达到了监测方法标准“快速”的要求，培养步骤主要针对具有潜在风险的样品，以进一步精确其死亡率，同时考虑自然界利于蛔虫卵孵化温度为 21 ℃～30 ℃，为使实验中所有活蛔虫卵能得到充分时间孵化，本标准设定培养温度为 26 ℃，培养时间为 30 d。

蛔虫卵培养液的选择主要参考 WHO: Integrated Guide to Sanitary Parasitology 的 8.5 Analytical Method for Viable Helminth Ova in Sludge 中 “Resuspend the pellet in 4 ml 0.1 N H₂SO₄ and pour into Nalgene tubes with loose caps”，用 4 ml 0.1 N H₂SO₄ 重悬沉淀并倒入带盖尼龙管中。EPA: Appendix I Test Method for Detecting, Enumerating, and Determining the Viability of Ascaris Ova in Sludge 中 “12.21 Resuspend the solids in 4 ml 0.1 N H₂SO₄ and pour into a 20-mL polyethylene scintillation vial or equivalent with loose caps”，用 4 ml 0.1 N H₂SO₄ 重悬沉淀并倒入 20 ml 带盖聚乙烯离心管中。

《粪便无害化卫生要求》（GB 7959-2012）的“滤膜培养法”采用的是 2%～3%甲醛溶液或甲醛生理盐水；《肥料中蛔虫卵死亡率的测定》（GB/T 19524.2-2004）中采用的是蒸馏水或甲醛溶液；《医疗机构水污染物排放标准》（GB 18466-2005）中附录 D 采用的是生理盐水或自来水和几滴 3%福尔马林溶液。

Oksanen^[37]等发现，使用 0.1 N H₂SO₄ 或自来水作为蛔虫卵胚胎形成的培养基，使其在 25 ℃～30 ℃下孵化 21 d～30 d，两者孵化率及培养后的感染率也是相等的，而在 1%的福尔马林溶液中，卵的发育稍微慢一些。彭国华^[38]等对 3 种人蛔虫卵培养方法进行了研究，结果见表 10。且发现使用 2%福尔马林培养液的易于结块，可能与甲醛的固定作用有关，过于密集对虫卵发育有一定抑制作用，发育率偏低。0.05 mol/L H₂SO₄ 溶液可使所有虫卵脱去蛋白质膜，省去用 NaClO 处理去除蛋白质膜这一步骤，而且培养时间 21 天，相较原法室温培养三个月比，缩短了培养时间，发育率也高。0.1 mol/L HCl 溶液虽然能脱去蛋白质膜，但发育不稳定，中期阶段发育缓慢。0.04 mol/L HCl 溶液需添加青霉素和链霉素，才能起到抑制作用。

表 10 30℃ 20 d 三种培养方法的蛔虫发育结果

培养液	0.05 mol/L H ₂ SO ₄	0.04 mol/L HCl	2%甲醛+生理盐水
孵化率	91.5%	92%	81%

本研究对蛔虫卵经典方法中采用的 4 种培养液——0.05 mol/L H₂SO₄ 溶液、0.04 mol/L HCl 溶液、生理盐水、2%甲醛+生理盐水的培养效果进行了培养 30 d 的比较试验，结果是 0.05 mol/L H₂SO₄ 溶液培养更优，操作简便，虫卵发育稳定，孵化率高（88%），镜检中培养液较为清亮，虫卵易于辨别。其他几种培养液且因为无法有效抑制样品中杂菌生长，培养液浑浊发白，导致镜检中透光率下降，观察视野模糊，增加了镜检判断困难。甲醛培养液中存在虫卵黏连结块等情况，致使蛔虫卵发育缓慢，观察到内有活虫的虫卵数偏低。

5.6.6 染色后镜检和培养后镜检结果比较

目前,收集到蛔虫卵镜检方法主要有 M.E.B 染色镜检和直接培养后镜检两种。杜振峰^[23]等进行了染色法和培养法的结果比较:虫卵在 60℃ 灭活两种鉴别方法之间有极显著的差异,蛔虫卵死亡率染色法为 0.3%,培养法为 100%;70℃ 30 min 处理虫卵,蛔虫卵死亡率染色法为 99.02%,培养法为 100%,但经统计学处理后两者亦有显著差别。考虑到虫卵 60℃ 灭活立刻染色镜检,可能存在低温灭活状态下蛔虫卵内还原染色剂的酶类和相关机制还未完全停止,造成两种方法结果差异较大。60℃ 灭活后放置 1 周后可更好模拟堆肥处理,本研究对 100℃ 和 60℃ 灭活后放置 1 周后的蛔虫卵进行了染色法和培养法的比较,结果见表 11、表 12:

表 11 100℃处理 30 min 后放置 1 周鉴别结果

组别	检测数(个)	死卵数(个)	死亡率(%)
染色法	2467	2402	97.4
培养法	2213	2213	100

表 12 60℃处理 30 min 后放置 1 周鉴别结果

组别	检测数(个)	死卵数(个)	死亡率(%)
染色法	1588	1502	94.6
培养法	1774	1774	100

从表 10、表 11 的结果也可得出两种方法的鉴别结果有显著差异。但染色法不会高估蛔虫卵的死亡率,两种处理鉴别结果死卵率均小于培养法,不会低估蛔虫卵危害而提高环境风险。考虑到蛔虫卵死亡率实验需要培养的周期较长,通常为 3 周~4 周,对及时有效监测环境危害有不足之处。本标准方法采用先染色镜检,若染色后镜检蛔虫卵死亡率<95%,则进一步培养后镜检确认。既保证了监测的及时性,又能在死亡率低于管理标准、存在潜在环境风险时,可通过培养法进行进一步确认。

5.7 结果计算与表示

5.7.1 结果计算

固体废物样品中蛔虫卵死亡率按式(2)计算:

$$A = \frac{m}{m+n} \times 100 \tag{2}$$

式中: A——蛔虫卵死亡率, %;

 m——死蛔虫卵数, 个;

 n——活蛔虫卵数, 个。

计算公式中的符号使用,主要参考了《医疗机构水污染物排放标准》(GB 18466-2005)中附录 D“医疗机构污泥中蛔虫卵的检验方法”。

5.7.2 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。

5.8 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%。

WHO: “8.5 Analytical Method for Viable Helminth Ova in Sludge” 中规定 “The current established precision criterion is 0.5702.” WHO: “8.5 污泥中虫卵活性的分析方法” 中 “目前建立的精度标准为 0.5702”。综合文献及各类样品的相对偏差，将本方法质量保证和质量控制定为每 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%。6 家实验室间验证实际样品相对偏差为 0%~11.1%。因未能采集到死亡率低的实际样品，编制组采用 6 组模拟固体废物（设定 60%死亡率，800 个蛔虫卵/样品），6 个平行/组来计算精密度，6 组样品最大相对偏差范围为 7.2%~18.9%。具体见表 13。

表 13 低死亡率模拟样品蛔虫卵死亡率最大相对偏差结果

	组内最大相对偏差
1	15.5%
2	18.9%
3	16.9%
4	16.3%
5	7.2%
6	12.3%

5.9 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。

医疗机构污泥根据表 14 相关管理标准的规定，定义为危险废物。实验样品中活蛔虫卵也具有潜在的感染性，操作时应采取必要的生物安全措施。实验结束后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，避免感染性物质扩散。

表 14 医疗机构污泥分类

标准	规定	处置
《医院污水处理技术指南》（环发〔2003〕197 号） ^[39]	污泥根据国家环境保护总局危险废物分类，属于危险废物的范畴	必须按医疗废物处理要求进行集中（焚烧）处置。
《医疗机构水污染物排放标准》（GB 18466-2005）	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置。
《医院污水处理工程技术规范》（HJ 2029-2013） ^[40]	医院污泥应按危险废物处理处置要求	由具有危险废物处理处置资质的单位进行集中处

		置。”
《国家危险废物名录》(2025 年版) [41]	医疗机构水处理站产生污泥属于 HW49 类其他废物“环境治理”中 772-006-49 废物——“采用物理、化学、物理化学或生物方法处理或处置毒性或感染性危险废物过程中产生的废水处理污泥、残渣(液)”	/

人员防护措施参考《医院污水处理技术指南》(环发〔2003〕197 号)11.3.4、《医院污水处理工程技术规范》(HJ 2029-2013)10.12“传染病医院(含带传染病房综合医院)位于室内的污水处理系统必须设有强制通风设备,并为工作人员配备全套工作服、手套、面罩和护目镜和防毒面具。”因此规定实验室采样、分析人员在处理样品时,需佩戴防护器具,防止受到健康损害。

5.10 实验室内各类样品的验证结果

根据标准适用范围要求,选取了畜禽养殖业固体废物、医疗机构及城镇污水处理厂污泥中具有代表性的实际样品进行蛔虫卵死亡率测定,结果见表 15、16。

畜禽养殖业固体废物样品:常州奔牛某养猪场(BN 猪)、常州夏溪某养猪场(XX 猪)、常州礼嘉某养猪场(LJ 猪)、常州天宁某养牛场(HM 牛)、金坛某奶牛养殖场(JT 牛);

城镇污水处理厂污泥样品:常州钟楼某污水处理厂(QT 污泥)、常州新北某污水处理厂(CB 污泥);

医疗机构污泥样品:常州某医院污泥(DY 污泥)。

表 15 实际样品测试数据汇总表-数量 (单位: 个/100g)

	BN 猪	XX 猪	LJ 猪	HM 牛	JT 牛	QT 污泥	CB 污泥	DY 污泥
1	816	0	479	194	33	91	92	17
2	750	0	354	335	24	85	154	19
3	888	0	579	265	19	81	185	10
4	916	0	484	232	28	53	81	13
5	867	0	623	149	45	66	213	18
6	664	0	374	302	40	58	126	15
$\bar{x}$	815.2	——	482.2	246.2	31.5	72.3	141.8	15.3
S_i	85.9	——	97.8	62.9	9.0	14.1	47.5	3.39
RSD_i	10.5	——	20.3	25.5	28.4	19.6	33.5	22.1

表 16 实际样品测试数据汇总表-死亡率 (单位: %)

	BN 猪	XX 猪	LJ 猪	HM 牛	JT 牛	QT 污泥	CB 污泥
1	96.0	——	76.6	90.7	100	100	100
2	92.3	——	81.4	93.4	100	100	100
3	95.9	——	80.0	88.3	100	100	97.8

4	100	——	79.1	87.9	100	100	100
5	94.9	——	85.2	89.3	100	100	94.8
6	97.9	——	84.5	91.7	100	100	100
$\bar{x}$	96.2	——	81.1	90.2	100	100	98.8
S_i	2.4	——	3.0	1.9	0	0	1.9
RSD_i	2.5	——	3.7	2.2	0	0	2.0

补充了3种实际样品——常州新北某养殖场固体废物（XH 固体废物）、常州新北某污水处理厂污泥（CB 污泥）、常州某医院污泥（ET 污泥）的染色和培养镜检死亡率的结果。结果见表17。

表17 实际样品染色和培养测试数据汇总表-死亡率（单位：%）

	XH 固体废物		CB 污泥		ET 污泥	
	染色	培养	染色	培养	染色	培养
1	72.7	78.6	96.6	100	100	100
2	76.9	72.7	100	100	100	100
3	75.0	88.2	100	100	100	100
4	66.7	80.0	92.6	100	100	100
5	71.4	81.8	100	100	100	100
6	87.5	91.7	100	100	100	100
$\bar{x}$	75.0	82.2	98.2	100	100	100
S_i	6.4	6.2	2.8	0	0	0
RSD_i	8.6	7.6	2.9	0	0	0

6 方法比对

6.1 方法比对方案

6.1.1 选取的比对方法情况

因本标准方法适用范围中畜禽养殖业固体废物和城镇污水处理厂污泥所执行的排放标准《畜禽养殖业污染物排放标准》（GB 18596-2001）、《城镇污水处理厂污染物排放标准》（GB 18918-2002）中对蛔虫卵的检测，技术方法均采用的《粪便无害化卫生要求》（GB 7959-1987，现已更新为 GB 7959-2012）附录方法。另有农业部门《畜禽粪便还田技术规范》（GB/T 25246-2010）、住房城乡建设部门《农用污泥污染物控制标准》（GB 4284-2018）等相关管理标准监测方法也采用该法。该方法适用范围较广，各部门管理标准采用该技术方法较多，因此选用其作为本标准方法的比对方法。

6.1.2 开展方法比对的实际样品基本情况

方法比对使用的实际样品选择常州市新北某污水处理厂污泥作为分析对象。

6.2 方法比对过程及结论

6.2.1 方法比对试验数据

本研究制定的检测方法与《粪便无害化卫生要求》（GB 7959-2012）附录方法间的比较，比对数据结果见表 18、表 19。

表 18 研究的标准方法与国内原方法的比较-数量 （单位：个/100 g）

样本数量	本标准方法测定值	粪便无害化方法测定值	配对差值 d
1	168	100	68
2	176	130	46
3	193	180	13
4	208	210	-2
5	227	220	7
6	289	250	39
7	303	300	3

配对差值的算术平均值 $\bar{d} = 24.9$ 个/100 g，标准差 $d_s = 26.4$ 。

表 19 研究的标准方法与国内原方法的比较-死亡率 （单位：%）

样本数量	本标准方法测定值	粪便无害化方法测定值	配对差值 d
1	94.6	91	3.7
2	97.2	100	-2.8
3	91.7	89	2.8
4	94.7	95	-0.5
5	92.5	95	-2.9
6	90.3	88	2.3
7	96.0	93	3.2

配对差值的算术平均值 $\bar{d} = 0.8\%$ ，标准差 $d_s = 0.029$ 。

6.2.2 方法比对结论

结果表明实际样品中蛔虫卵数量，标准方法与原方法间结果有显著差异（ $t=2.496 > t_{0.05}=2.447$ ， $p < 0.05$ ），标准方法比原方法对实际样品中蛔虫卵数量的检出更高。

实际样品蛔虫卵死亡率，标准方法与原方法间结果无显著差异（ $t=0.754 < t_{0.05}=2.447$ ， $p > 0.05$ ），实际样品蛔虫卵死亡率标准方法与原方法相当。

6.2.3 结论原因分析，对标准实施的建议

本标准方法在国内原有方法的基础上，在样品前处理及镜检方法上进行了改进，相对《粪便无害化卫生要求》（GB 7959-2012）附录方法，蛔虫卵死亡率无明显差异，但数量检出率更高。因此本标准方法可以用作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测定。

7 方法验证

7.1 方法验证方案

7.1.1 验证实验室和验证人员

共有 6 家单位参加了方法验证工作，分别为：（1）浙江省生态环境监测中心，（2）上海市环境监测中心，（3）江苏省苏州环境监测中心，（4）江苏省泰州环境监测中心，（5）江苏省环境监测中心，（6）江苏省淮安环境监测中心。验证单位及参与验证人员相关信息见表 20。

由于样品保存时间较短，且具有一定的风险，运输方式受限，同时，验证时间处于新冠肺炎疫情防控期间，故验证实验室按就近原则进行选择。

表 20 方法验证单位及验证人员相关信息

姓名	职称/职务	从事相关分析工作年限	所在单位
于海燕	研究员级高级工程师	29	浙江省生态环境监测中心
周胜利	高级工程师	12	浙江省生态环境监测中心
顾卿	高级工程师	14	浙江省生态环境监测中心
汤琳	研究员级高级工程师	21	上海市环境监测中心
朱刚	工程师	33	上海市环境监测中心
龚海燕	高级工程师	15	上海市环境监测中心
孙艳	工程师	13	江苏省苏州环境监测中心
刘孟宇	工程师	12	江苏省苏州环境监测中心
李继影	研究员级高级工程师	17	江苏省苏州环境监测中心
朱宇芳	高级工程师	27	江苏省泰州环境监测中心
卜伟	高级工程师	23	江苏省泰州环境监测中心
孙海涛	高级工程师	11	江苏省泰州环境监测中心
厉以强	研究员级高级工程师	36	江苏省环境监测中心
李旭文	研究员级高级工程师	34	江苏省环境监测中心
牛志春	研究员级高级工程师	19	江苏省环境监测中心
丁长春	研究员级高级工程师	26	江苏省淮安环境监测中心
杨广利	高级工程师	34	江苏省淮安环境监测中心
杨子毅	高级工程师	13	江苏省淮安环境监测中心

7.1.2 验证方案

按照《环境监测分析方法标准制订技术导则》（HJ 168-2020）的规定，组织 6 家以上有资质的实验室进行验证。因无蛔虫卵标准样品，验证工作主要内容是方法精密度的验证试验。

精密度的验证：标准编制组将 3 种实际样品（常州礼嘉某养猪场固体废物、常州新北某

污水处理厂污泥、常州某医院污泥污泥，各 1000 g）分配到各验证实验室，各验证实验室依照标准方法草案进行蛔虫卵死亡率的检测，各样品重复测定 6 次，分别计算样品的平均值、标准偏差、相对标准偏差。

7.2 方法验证过程

7.2.1 验证过程

（1）首先，通过筛选确定有资质和相关能力的方法验证单位，在方法验证前，编制组通过各种交流形式让参加验证的操作人员都熟悉本标准的方法原理、操作步骤及流程。验证过程中使用的仪器、设备、试剂等应符合方法的要求。

（2）编制组根据实验时间验证的要求准备验证样品等，确定验证时间。

（3）《方法验证报告》见附件一。

7.2.2 验证结论

方法精密度

6 家验证单位对漂浮集卵法的精密度进行验证，将 3 个实际样品分配到各验证实验室，各验证实验室依照标准方法进行蛔虫卵的数量和死亡率和检测，各样品重复测定 6 次，分别计算样品的平均值、标准偏差、相对标准偏差。结果见下表。

表 21 实际样品蛔虫卵精密度测试数据汇总表-数量

实验室号	畜禽养殖业固体废物			污水处理厂污泥			医疗机构污泥		
	$\bar{x}_i$ (个/100 g)	S_i (个/100 g)	RSD_i (%)	$\bar{x}_i$ (个/100 g)	S_i (个/100 g)	RSD_i (%)	$\bar{x}_i$ (个/100 g)	S_i (个/100 g)	RSD_i (%)
1	432	99.6	23.0	27.2	4.84	17.8	4.17	1.57	37.7
2	229	71.8	31.4	16.3	6.92	42.4	3.50	0.96	27.4
3	149	26.7	17.9	20.2	5.24	26.0	4.17	1.34	32.2
4	281	73.7	26.2	22.3	3.64	16.3	6.83	1.57	23.0
5	236	51.9	22.0	31.5	7.09	22.5	5.67	1.60	28.2
6	333	82.9	24.9	29.3	10.5	35.6	3.83	0.69	17.9
$\bar{x}$ (个/100 g)	277			24.5			4.69		
S' (个/100 g)	89.1			5.32			1.17		
RSD' (%)	32.2			21.7			25.0		
重复性限 r (个/100 g)	201			18.8			3.74		

再现性限R (个/100 g)	329	23.7	4.96
--------------------	-----	------	------

表 22 实际样品蛔虫卵精密度测试数据汇总表-死亡率

实验室号	畜禽养殖业固体废物			污水处理厂污泥			医疗机构污泥		
	$\bar{x}_i$ (%)	S_i (%)	RSD_i (%)	$\bar{x}_i$ (%)	S_i (%)	RSD_i (%)	$\bar{x}_i$ (%)	S_i (%)	RSD_i (%)
1	81.4	4.4	5.5	99.0	2.2	2.2	100	0	0
2	77.1	6.3	8.1	99.4	1.3	1.3	100	0	0
3	86.9	2.1	2.4	96.1	4.6	4.8	100	0	0
4	84.4	3.1	3.7	97.1	3.3	3.4	100	0	0
5	86.1	2.4	2.7	96.7	3.5	3.6	100	0	0
6	81.2	5.6	6.9	99.7	0.76	0.76	100	0	0
$\bar{x}$ (%)	83			98			100		
S' (%)	3.3			1.4			0		
RSD' (%)	4.0			1.4			0		
重复性限 r (%)	12			8.2			0		
再现性限 R (%)	15			8.7			0		

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%。

8 与开题报告的差异说明

8.1 方法性能方面

开题报告中标准名称为《固体废物 蛔虫卵的测定 沉淀集卵法》，但开题报告中所依据的方法《医疗机构水污染物排放标准》（GB 18466-2005），《粪便无害化卫生要求》（GB 7959-2012），以及借鉴的 WHO 蛔虫卵检测的方法原理均为漂浮集卵法，后依据 2015 年 3 月及 2021 年 9 月专家研讨会的意见和建议，并在 2024 年 11 月标准征求意见稿技术审查会上确定修改标准名称为《固体废物 蛔虫卵死亡率的测定 漂浮集卵法》，并将本标准的方

法原理改为漂浮集卵法。

开题报告中适用范围为“本标准方法适用于排放到环境中的固体废物，以及利用于环境中的城乡垃圾、粪便、供农田施用的各种腐熟的城镇生活垃圾和城镇垃圾堆肥工厂的产品、医疗机构及城镇污水处理厂污泥、畜禽养殖业废渣等固体废物中蛔虫卵的测定。”但随着管理标准的不断修订，以及各类污染物分管职能部门分工的明确，原适用范围中的“城乡垃圾及粪便”现已无执行中的环境管理标准。同时，根据《粪便无害化卫生要求》（GB 7959-2012）“附录 E 蛔虫卵检查法”E.1 堆肥蛔虫卵的检查中“E.1.3.2 样品预处理：多含大量腐烂蔬叶、瓜果皮和草梗等纤维和堆肥样品，采用沉淀法。”及 E.1.2 沉淀法规定的适用范围“粪便样品、不具备滤膜滤器设备及多含大量腐烂蔬叶等纤维的堆肥样品，采用沉淀法检测其蛔虫卵数”，因此，本标准方法适用范围调整为“适用于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测定”。

8.2 操作步骤方面

开题报告中的“酸醚法沉淀”步骤改为“氢氧化钠溶液去除杂质”。开题报告方法中的“酸醚法沉淀”更适用于杂质较少的水质蛔虫卵沉淀法的测定。目前，大部分固体废物蛔虫卵检测方法，均采用氢氧化钠溶液分离去除样品中的杂质，试剂效果好，且更易获取。

开题报告中“蛔虫卵培养后镜检和直接镜检”中镜检方法有“清水直接涂片镜检”和“甘油厚涂片镜检”两种。这两种方法通常用于定性检出蛔虫卵，均较难定量检测蛔虫卵的数量。本标准镜检采用 1 ml 定量计数框，底部均分 40 正方格，更有利于蛔虫卵计数，不容易漏检及重复计数。本标准方法改为染色后镜检，同时兼顾直接镜检观察蛔虫卵形态特征，更有利于对蛔虫卵死活的鉴别，若检测到的蛔虫卵死亡率 $<95\%$ ，则进一步进行培养后镜检，确保了实验结果的准确性。

9 标准征求意见稿技术审查情况

9.1 标准征求意见稿技术审查工作的情况

2024 年 11 月 22 日，生态环境部生态环境监测司组织召开了线上征求意见稿技术审查会，标准编制组提交了标准征求意见稿和编制说明。专家组经听取了标准编制单位所做的标准征求意见稿及编制说明的内容介绍，经质询、讨论，形成以下审查意见：

- （1）标准主编单位提供的材料齐全、内容较完整；
- （2）标准主编单位对国内外方法标准及文献进行了充分调研；
- （3）标准定位准确，技术路线合理可行，方法验证内容完善。

专家组通过该标准的征求意见稿技术审查。建议按照以下意见修改完善后，提请公开征求意见：

- （1）标准名称修改为《固体废物 蛔虫卵死亡率的测定 漂浮集卵法》；
- （2）编制说明中进一步补充完善样品运输条件、离心设备的离心力、精密度控制值的确定、废物处置的依据；
- （3）标准文本中补充对其他病原体防护的内容，进一步细化样品采集步骤，完善试样制备、漂浮集卵操作过程、结果表示、废弃物的处置和附录 A 的文字表述；

(4) 按照《环境监测分析方法标准制订技术导则》(HJ 168-2020)和《环境保护标准编制出版技术指南》(HJ 565-2010)对标准文本和编制说明进行编辑性修改。

9.2 标准征求意见稿技术审查修改说明

2024 年 11 月~2024 年 2 月，标准编制组按照与会专家提出的具体修改意见和建议，补充完善，具体见表 23：

表 23 标准征求意见稿技术审查修改说明对照表

标准征求意见稿技术审查修改意见	编制组修改情况说明	修改情况说明具体章节
(1) 标准名称修改为《固体废物 蛔虫卵死亡率的测定 漂浮集卵法》	按照修改意见将标准名称修改为《固体废物 蛔虫卵死亡率的测定 漂浮集卵法》	详见《固体废物 蛔虫卵死亡率的测定 漂浮集卵法》(征求意见稿)编制说明和文本
(2) 编制说明中进一步补充完善样品运输条件、离心设备的离心力、精密度控制值的确定、废物处置的依据	已补充完善样品运输条件的依据，增加了保存活性的最高、最低耐受温度，发育条件，样品保存温度，样品保存时间等	详见《固体废物 蛔虫卵死亡率的测定 漂浮集卵法》(征求意见稿)编制说明“5.5.1 样品采集与保存”
	已补充离心设备的离心力，增加了离心机的离心力、离心时间的选择及离心力计算公式等	详见《固体废物 蛔虫卵死亡率的测定 漂浮集卵法》(征求意见稿)编制说明“5.6.2 沉淀”
	已补充精密度控制值的确定，增加了实验数据等依据	详见《固体废物 蛔虫卵死亡率的测定 漂浮集卵法》(征求意见稿)编制说明“5.8 质量保证和质量控制”
	已补充废物处置的依据，增加了医疗机构污泥相关管理标准的规定，人员防护措施的内容	详见《固体废物 蛔虫卵死亡率的测定 漂浮集卵法》(征求意见稿)编制说明“5.9 注意事项”
(3) 标准文本中补充对其他病原体防护的内容，进一步细化样品采集步骤，完善试样制备、漂浮集卵操作过程、结果表示、废弃物的处置和附录A 的文字表述	已补充对其他病原体防护的内容，增加了医疗机构样品中病原微生物、生物安全措施等内容	详见《固体废物 蛔虫卵死亡率的测定 漂浮集卵法》(征求意见稿)“警告”
	已细化样品采集步骤，增加了含水量大的液态污泥及氯消毒污泥的采样描述	详见《固体废物 蛔虫卵死亡率的测定 漂浮集卵法》(征求意见稿)“7.1 样品采集和保存”
	已完善试样制备，增加液态污泥制备	详见《固体废物 蛔虫卵死亡率的测定 漂浮集卵法》(征求意见稿)“7.2 试样的制备”
	已完善漂浮集卵操作过程，修改浮膜吸取等处表述文字	详见《固体废物 蛔虫卵死亡率的测定 漂浮集卵法》(征求意见稿)“8.4 漂浮集卵”
	已完善结果表示，增加未检出的结果表示	详见《固体废物 蛔虫卵死亡率的测定 漂浮集卵法》(征求意见稿)“9 结果计算与表示”
	已完善废弃物的处置，增加了对实验台面、仪器设备的消毒	详见《固体废物 蛔虫卵死亡率的测定 漂浮集卵法》(征求意见稿)“12 注意事项”

	要求	
	根据专家意见,完善附录A 的文字表述,删除A1部分内容	详见《固体废物 蛔虫卵死亡率的测定 漂 浮集卵法》(征求意见稿)“附录 A”

10 参考文献

- [1] 李影林. 中华医学检验全书[M]. 第1版. 北京:人民卫生出版社,1996.
- [2] 全国人体重要寄生虫病现状调查办公室. 全国人体重要寄生虫病现状调查报告[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2005,23 (增刊):332-334.
- [3] 詹希美 主编. 人体寄生虫学(第五版)[M]. 北京:人民卫生出版社,2001.
- [4] 孔繁瑶 主编. 家畜寄生虫学(第二版) [M].北京:中国农业大学出版社,1997.
- [5] 国家环境保护总局,国家质量监督检验检疫总局 发布.《畜禽养殖业污染物排放标准》(GB 18596-2001) [S].2001.
- [6] 国家环境保护总局,国家质量监督检验检疫总局 发布.《医疗机构水污染物排放标准》(GB 18466-2005) [S].2005.
- [7] 国家环境保护总局,国家质量监督检验检疫总局 发布.《城镇污水处理厂污染物排放标准》(GB 18918-2002) [S].2002.
- [8] 国家卫生部 发布.《粪便无害化卫生要求》(GB7959-2012) [S].2012.
- [9] 国家市场监督管理总局 发布.《农用污泥污染物控制标准》(GB4284-2018) [S].2018.
- [10] 国家质量监督检验检疫总局 发布.《畜禽粪便还田技术规范》(GB/T 25246-2010) [S].2010.
- [11] 国家市场监督管理总局,国家标准化管理委员会 发布.《畜禽粪便监测技术规范》(GB/T 25169-2022) [S].2022.
- [12] Published by EPA. Environmental Regulations and Technology, Control of Pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge[S].2003.
- [13] Published by WHO. Integrated guide to: Sanitary Parasitology [S].2004.
- [14] Published by WHO. 《Analysis of Wastewater for Use in Agriculture - A Laboratory Manual of Parasi-tological and Bacteriological Techniques》[M].1996
- [15] 国家质量监督检验检疫总局 发布.《泡菜等植物源性食品中寄生虫卵的分离及鉴定规程》(SN/T 1908-2007) [S].2007.
- [16] 国家质量监督检验检疫总局 发布.《肥料中蛔虫卵死亡率的测定》(GB/T 19524.2-2004) [S].2004.
- [17] 全国卫生标准技术委员会环境卫生标准分委会提出.《土壤中蛔虫卵检验标准方法》(报批稿) [J]. 卫生研究,1990, 19(4):45-48.
- [18] 吴绍强, 林祥梅, 葛建军.泡菜等产品中寄生虫卵的检验方法研究[J]. 食品工业科技, 2006, 27(10):173-177.
- [19] 胡风庆, 赵小慧, 王旭.出口辣白菜中蛔虫卵检出新方法.辽宁大学学报(自然科学版) [J]. 2011, 3.

- [20] 崔晓明, 周宪民. 大量土壤样本中蛔虫卵的检测方法初探[J]. 江西医学院学报, 1994, 3(34): 20.
- [21] 钱颖骏, 诸廷俊等. 4种漂浮法分离土壤中人蛔虫卵的效果比较[J]. 中国病原生物学杂志, 2008, 3(4): 305-306.
- [22] Ajala MO, The separation results of Ascaris eggs with "Floating in the soil salt"[J]. Helminthol, 1995, 69(1): 1-6.
- [23] 周炳福, 李凤玲等. 美兰、伊红、硼砂染色法鉴别蛔虫卵死活的实验观察[J]. 寄生虫学与寄生虫杂志, 1985, 3(1): 48-49.
- [24] 杜振峰, 王爱华. 蛔虫卵死活鉴别方法比较[J]. 河南预防医学杂志, 1990, 1(1): 76.
- [25] 张秀华. 活与失活的蛔虫卵的鉴别方法[J]. 生物学通报, 1996, 31(4): 41.
- [26] 丰平, 刘珍清. 蛔虫卵生物染色技术研究[J]. 北京针灸骨伤学院学报, 1998, 5(1): 8-11.
- [27] 李根茂, 许文忠等. 猪蛔虫卵生物染色观察[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2004, 22(3): 127--128.
- [28] 谢醒民, 朱静和等. 固绿染色法鉴别蛔虫卵死活的实验观察[J]. 天津医药, 1981, 4: 233-235.
- [29] Keller, P. Sterilization of sewage sludge. I. A review of the literature pertaining to the occurrence and viability of parasitic ova and cysts in sewage with particular reference to *Ascaris lumbricoides*[J]. Journal of the Institute of Sewage Purification, 1951, 1: 92-99.
- [30] Ogata, S. The destruction of *Ascaris* eggs[J]. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 1925, 19: 301-304.
- [31] Arene, F. O. I. *Ascaris suum*: influence of embryonation temperature on the viability of infective larvae[J]. Journal of Thermal Biology, 1986, 11(1): 9-15.
- [32] Hindiyeh, M. Enumeration and Survival Studies on Helminth Eggs in Relation to Treatment of Anaerobic and Aerobic Sludges in Jordan[J]. PhD Thesis, Department of Civil Engineering, Newcastle Upon Tyne University, England. 1995.
- [33] Reimers, R. S., Little, M. D., Englander A. J., et al. Parasites in southern sludges and disinfection by standard sludge treatment [S]. EPA 1981, 600/2-81-160.
- [34] 国家环境保护总局 发布.《工业固体废物采样制样技术规范》(HJ/T 20-1998) [S]. 1998.
- [35] 国家环境保护总局 发布.《危险废物鉴别技术规范》(HJ/T 298-2007) [S]. 2007.
- [36] 江西省寄生虫病防治研究所.《土壤线虫卵检查方法》 [M].
- [37] Oskanen, A., Eriksen, L., Roepstorff, A., Ilsoe, B., Nansen, P. and Lind. P. Embryonation and infectivity of *Ascaris suum* eggs: A comparison of eggs collected from worm uteri with eggs isolated from pig faeces[J]. Acta Vet. Scand., 1990, 31 (4): 393-398.
- [38] 彭国华, 周宪民等. 三种人蛔虫卵培养方法的比较研究[J]. 江西医学检验, 2002, 20(4): 220-246.
- [39] 国家环境保护总局 发布.《医院污水处理技术指南》(环发〔2003〕197号) .2003.
- [40] 环境保护部 发布.《医院污水处理工程技术规范》(HJ 2029-2013) [S]. 2013.
- [41] 生态环境部 发布.《国家危险废物名录(2025年版)》(部令 第36号) .2024.

附件一

方法验证报告

方法名称：固体废物 蛔虫卵死亡率的测定 漂浮集卵法

项目承担单位：江苏省常州环境监测中心

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

项目负责人及职称：张小琼（高级工程师）

通讯地址及电话：常州市天宁区青洋北路 47 号 电话：0519-86908336

报告编写人及职称：沈伟（高级工程师）

报告日期：2024 年 7 月 30 日

1 原始测试数据

1.1 实验室基本情况

参加验证的实验室及人员基本情况、仪器使用情况及试剂使用情况见附表 1-1 至附表 1-3。其中实验室编号 1 为浙江省生态环境监测中心，编号 2 为上海市环境监测中心，编号 3 为江苏省苏州环境监测中心，编号 4 为江苏省泰州环境监测中心，编号 5 为江苏省环境监测中心，编号 6 为江苏省淮安环境监测中心。

附表 1-1 参加验证的人员情况登记表

编号	验证单位	姓名	性别	职称/职务	从事相关分析工作年限
1	浙江省生态环境监测中心	于海燕	女	研究员级高级工程师	29
		周胜利	男	高级工程师	12
		顾卿	男	高级工程师	14
2	上海市环境监测中心	汤琳	女	研究员级高级工程师	21
		朱刚	男	工程师	33
		龚海燕	女	高级工程师	15
3	江苏省苏州环境监测中心	孙艳	女	工程师	13
		刘孟宇	男	工程师	12
		李继影	女	研究员级高级工程师	17
4	江苏省泰州环境监测中心	朱宇芳	女	高级工程师	27
		卜伟	男	高级工程师	23
		孙海涛	男	高级工程师	11
5	江苏省环境监测中心	厉以强	男	研究员级高级工程师	36
		李旭文	男	研究员级高级工程师	34
		牛志春	女	研究员级高级工程师	19
6	江苏省淮安环境监测中心	丁长春	男	研究员级高级工程师	26
		杨广利	男	高级工程师	34
		杨子毅	女	高级工程师	13

附表 1-2 使用仪器情况登记表

名称	生产厂家规格	仪器出厂编号	性能状况（计量/校准状态、量程、灵敏度等）	验证单位
离心机	5804R	5805YP936319	良好	浙江省生态环境监测中心
恒温水浴锅	HH-6	081106	检定合格	浙江省生态环境监测中心
显微镜	DM2500	11888139	良好	浙江省生态环境监测中心
离心机	TDL-5A	847	良好	上海市环境监测中心
恒温水浴锅	HH-S11-6	01007	良好	上海市环境监测中心
体视镜	SV-8	475-73	检定合格	上海市环境监测中心
离心机	Allegra X-12R	ALX10A20	良好	江苏省苏州环境监测中心
恒温水浴锅	HHS11-2-II	4060616	良好	江苏省苏州环境监测中心
显微镜	BX51	8D14448	检定合格	江苏省苏州环境监测中心
离心机	TDL-5A	847	良好	江苏省泰州环境监测中心
恒温水浴锅	601-C	0002536	良好	江苏省泰州环境监测中心
显微镜	XTZ-D	063650	检定合格	江苏省泰州环境监测中心
离心机	LXJ-IIB	23	良好	江苏省环境监测中心
恒温水浴锅	HH-S2	/	良好	江苏省环境监测中心
显微镜	BX50	7F03135	检定合格	江苏省环境监测中心
离心机	北京医用离心机厂 LD5-10	IBL003-91	良好	江苏省淮安环境监测中心
恒温水浴锅	江苏省医疗器械厂 HHS	WS2-133-75	良好	江苏省淮安环境监测中心
显微镜	OLYMPUS-SZX16W 生物解剖仪	6L00970	检定合格	江苏省淮安环境监测中心

附表 1-3 使用试剂及溶剂登记表

名称	生产厂家	验证单位
氢氧化钠	中国医药（集团）上海化学试剂公司	浙江省生态环境监测中心
	上海试剂一厂	上海市环境监测中心
	国药集团化学试剂有限公司	江苏省苏州环境监测中心
	国药集团化学试剂有限公司	江苏省泰州环境监测中心
	国药集团化学试剂有限公司	江苏省环境监测中心
	国药集团化学试剂有限公司	江苏省淮安环境监测中心
硝酸钠	国药集团化学试剂有限公司	浙江省生态环境监测中心
	中国医药（集团）上海化学试剂公司	上海市环境监测中心
	国药集团化学试剂有限公司	江苏省苏州环境监测中心
	国药集团化学试剂有限公司	江苏省泰州环境监测中心
	中国医药（集团）上海化学试剂公司	江苏省环境监测中心
	国药集团化学试剂有限公司	江苏省淮安环境监测中心
次氯酸钠	中国医药（集团）上海化学试剂公司	浙江省生态环境监测中心
	中国医药（集团）上海化学试剂公司	上海市环境监测中心

名称	生产厂家	验证单位
	国药集团化学试剂有限公司	江苏省苏州环境监测中心
	国药集团化学试剂有限公司	江苏省泰州环境监测中心
	国药集团化学试剂有限公司	江苏省环境监测中心
	国药集团化学试剂有限公司	江苏省淮安环境监测中心
亚甲基蓝	国药集团化学试剂有限公司	浙江省生态环境监测中心
	上海源叶生物科技有限公司	江苏省苏州环境监测中心
	国药集团化学试剂有限公司	江苏省泰州环境监测中心
硼砂	国药集团化学试剂有限公司	浙江省生态环境监测中心
	上海源叶生物科技有限公司	江苏省苏州环境监测中心
	国药集团化学试剂有限公司	江苏省泰州环境监测中心
伊红	国药集团化学试剂有限公司	浙江省生态环境监测中心
	上海源叶生物科技有限公司	江苏省苏州环境监测中心
	国药集团化学试剂有限公司	江苏省泰州环境监测中心
M.E.B 染色液	上海广锐生物科技有限公司	上海市环境监测中心
M.E.B 染色液	青岛高科技工业园海博生物技术有限公司	江苏省环境监测中心
M.E.B 染色液	青岛高科技工业园海博生物技术有限公司	江苏省淮安环境监测中心
硫酸	中国医药（集团）上海化学试剂公司	浙江省生态环境监测中心
	上海试剂一厂	上海市环境监测中心
	国药集团化学试剂有限公司	江苏省苏州环境监测中心
	国药集团化学试剂有限公司	江苏省泰州环境监测中心
	中国医药（集团）上海化学试剂公司	江苏省环境监测中心
	国药集团化学试剂有限公司	江苏省淮安环境监测中心

1.2 方法精密度测试数据

标准编制组将 3 个不同死亡率水平的实际样品（样品 A 为常州礼嘉某养猪场固体废物、样品 B 为常州新北某污水处理厂污泥、样品 C 为常州某医院污泥）分配到各验证实验室，各验证实验室依照标准方法草案进行蛔虫卵死亡率的检测，各样品重复测定 6 次，分别计算样品的平均值、标准偏差、相对标准偏差。

附表 1-4 精密度测试数据

验证单位：浙江省生态环境监测中心

测试日期：2022年11月~12月

平行号		实际样品（数量）		
		样品A	样品B	样品C
测定结果 (个/100 g)	1	479	26	4
	2	274	28	2
	3	344	18	5
	4	492	30	7
	5	428	34	3
	6	577	27	4
平均值 $\bar{x}_i$ (个/100 g)		432	27.2	4.17
标准偏差 S_i (个/100 g)		99.6	4.84	1.57
相对标准偏差 RSD_i (%)		23.0	17.8	37.7

附表 1-5 精密度测试数据

验证单位：浙江省生态环境监测中心

测试日期：2022年11月~12月

平行号		实际样品（死亡率）		
		样品A	样品B	样品C
测定结果 (%)	1	72.2	100	100
	2	80.3	100	100
	3	84.0	100	100
	4	82.1	94.1	100
	5	85.5	100	100
	6	84.4	100	100
平均值 $\bar{x}_i$ (%)		81.4	99.0	100
标准偏差 S_i (%)		4.44	2.19	0
相对标准偏差 RSD_i (%)		5.46	2.21	0

附表 1-6 精密度测试数据

验证单位：上海市环境监测中心

测试日期：2022年11月~12月

平行号		实际样品（数量）		
		样品A	样品B	样品C
测定结果 (个/100 g)	1	303	13	3
	2	135	28	5
	3	240	21	2
	4	336	6	4
	5	181	13	3
	6	177	17	4
平均值 $\bar{x}_i$ (个/100 g)		229	16.3	3.50
标准偏差 S_i (个/100 g)		71.8	6.92	0.96
相对标准偏差 RSD_i (%)		31.4	42.4	27.4

附表 1-7 精密度测试数据

验证单位：上海市环境监测中心

测试日期：2022年11月~12月

平行号		实际样品（死亡率）		
		样品A	样品B	样品C
测定结果 (%)	1	71.0	100	100
	2	68.9	100	100
	3	77.5	100	100
	4	86	100	100
	5	84	100	100
	6	75.1	100	100
平均值 $\bar{x}_i$ (%)		77.1	99.4	100
标准偏差 S_i (%)		6.27	1.33	0
相对标准偏差 RSD_i (%)		8.13	1.34	0

附表 1-8 精密度测试数据

验证单位：江苏省苏州环境监测中心

测试日期：2022年11月~12月

平行号		实际样品（数量）		
		样品A	样品B	样品C
测定结果 (个/100 g)	1	173	29	5
	2	154	24	2
	3	186	17	6
	4	103	21	4
	5	137	13	3
	6	143	17	5
平均值 $\bar{x}_i$ (个/100 g)		149	20.2	4.17
标准偏差 S_i (个/100 g)		26.7	5.24	1.34
相对标准偏差 RSD_i (%)		17.9	26.0	32.2

附表 1-9 精密度测试数据

验证单位：江苏省苏州环境监测中心

测试日期：2022年11月~12月

平行号		实际样品（死亡率）		
		样品A	样品B	样品C
测定结果 (%)	1	87.9	96.6	100
	2	89.6	91.7	100
	3	88.2	100	100
	4	83.5	100	100
	5	84.7	100	100
	6	87.4	88.2	100
平均值 $\bar{x}_i$ (%)		86.9	96.1	100
标准偏差 S_i (%)		2.11	4.61	0
相对标准偏差 RSD_i (%)		2.43	4.80	0

附表 1-10 精密度测试数据

验证单位：江苏省泰州环境监测中心

测试日期：2022年11月~12月

平行号		实际样品（数量）		
		样品A	样品B	样品C
测定结果 (个/100 g)	1	363	17	9
	2	248	25	6
	3	197	19	8
	4	395	22	8
	5	213	28	5
	6	270	23	5
平均值 $\bar{x}_i$ (个/100 g)		281	22.3	6.83
标准偏差 S_i (个/100 g)		73.7	3.64	1.57
相对标准偏差 RSD_i (%)		26.2	16.3	23.0

附表 1-11 精密度测试数据

验证单位：江苏省泰州环境监测中心

测试日期：2022年11月~12月

平行号		实际样品（死亡率）		
		样品A	样品B	样品C
测定结果 (%)	1	78.8	100	100
	2	82.7	100	100
	3	84.3	94.7	100
	4	88.4	100	100
	5	85.9	96.4	100
	6	86.7	91.3	100
平均值 $\bar{x}_i$ (%)		84.4	97.1	100
标准偏差 S_i (%)		3.10	3.29	0
相对标准偏差 RSD_i (%)		3.67	3.39	0

附表 1-12 精密度测试数据

验证单位：江苏省环境监测中心

测试日期：2022年11月~12月

平行号		实际样品（数量）		
		样品A	样品B	样品C
测定结果 (个/100 g)	1	196	43	3
	2	239	34	7
	3	182	33	7
	4	342	30	7
	5	238	30	4
	6	216	19	6
平均值 $\bar{x}_i$ (个/100 g)		236	31.5	5.67
标准偏差 S_i (个/100 g)		51.9	7.09	1.60
相对标准偏差 RSD_i (%)		22	22.5	28.2

附表 1-13 精密度测试数据

验证单位：江苏省环境监测中心

测试日期：2022年11月~12月

平行号		实际样品（死亡率）		
		样品A	样品B	样品C
测定结果 (%)	1	83.7	95.3	100
	2	85.8	94.1	100
	3	87.4	90.9	100
	4	82.7	100	100
	5	87	100	100
	6	89.8	100	100
平均值 $\bar{x}_i$ (%)		86.1	96.7	100
标准偏差 S_i (%)		2.36	3.53	0
相对标准偏差 RSD_i (%)		2.74	3.65	0

附表 1-14 精密度测试数据

验证单位：江苏省淮安环境监测中心

测试日期：2022年11月~12月

平行号		实际样品（数量）		
		样品A	样品B	样品C
测定结果 (个/100 g)	1	485	36	4
	2	327	49	4
	3	337	22	4
	4	365	28	3
	5	264	23	5
	6	222	18	3
平均值 $\bar{x}_i$ (个/100 g)		333	29.3	3.83
标准偏差 S_i (个/100 g)		82.9	10.5	0.69
相对标准偏差 RSD_i (%)		24.9	35.6	17.9

附表 1-15 精密度测试数据

验证单位：江苏省淮安环境监测中心

测试日期：2022年11月~12月

平行号		实际样品（死亡率）		
		样品A	样品B	样品C
测定结果 (%)	1	73.6	100	100
	2	81.3	98	100
	3	73.6	100	100
	4	85.8	100	100
	5	87.1	100	100
	6	85.6	100	100
平均值 $\bar{x}_i$ (%)		81.2	99.7	100
标准偏差 S_i (%)		5.64	0.76	0
相对标准偏差 RSD_i (%)		6.94	0.76	0

2 方法精密度汇总

附表 2-1~2-2 是 6 家实验室方法验证结果中蛔虫卵的精密度测试结果的统计分析。

附表 2-1 方法精密度测试数据汇总表-数量

实验室号	样品A			样品B			样品C		
	$\bar{x}_i$ (个/100 g)	S_i (个/100 g)	RSD_i (%)	$\bar{x}_i$ (个/100 g)	S_i (个/100 g)	RSD_i (%)	$\bar{x}_i$ (个/100 g)	S_i (个/100 g)	RSD_i (%)
1	432	99.6	23.0	27.2	4.84	17.8	4.17	1.57	37.7
2	229	71.8	31.4	16.3	6.92	42.4	3.50	0.96	27.4
3	149	26.7	17.9	20.2	5.24	26.0	4.17	1.34	32.2
4	281	73.7	26.2	22.3	3.64	16.3	6.83	1.57	23.0
5	236	51.9	22.0	31.5	7.09	22.5	5.67	1.60	28.2
6	333	82.9	24.9	29.3	10.5	35.6	3.83	0.69	17.9
$\bar{\bar{x}}$ (个/100 g)	277			24.5			4.69		
S' (个/100 g)	89.1			5.32			1.17		
RSD' (%)	32.2			21.7			25.0		
重复性限 r (个/100 g)	201			18.8			3.74		
再现性限 R (个/100 g)	329			23.7			4.96		

附表 2-2 方法精密度测试数据汇总表-死亡率

实验室号	样品A			样品B			样品C		
	$\bar{x}_i$ (%)	S_i (%)	RSD_i (%)	$\bar{x}_i$ (%)	S_i (%)	RSD_i (%)	$\bar{x}_i$ (%)	S_i (%)	RSD_i (%)
1	81.4	4.4	5.5	99.0	2.2	2.2	100	0	0
2	77.1	6.3	8.1	99.4	1.3	1.3	100	0	0
3	86.9	2.1	2.4	96.1	4.6	4.8	100	0	0
4	84.4	3.1	3.7	97.1	3.3	3.4	100	0	0
5	86.1	2.4	2.7	96.7	3.5	3.6	100	0	0
6	81.2	5.6	6.9	99.7	0.76	0.76	100	0	0

实验室号	样品A			样品B			样品C		
	$\bar{x}_i$ (%)	S_i (%)	RSD_i (%)	$\bar{x}_i$ (%)	S_i (%)	RSD_i (%)	$\bar{x}_i$ (%)	S_i (%)	RSD_i (%)
$\bar{x}$ (%)	83			98			100		
S' (%)	3.3			1.4			0		
RSD' (%)	4.0			1.4			0		
重复性限 r (%)	12			8.2			0		
再现性限 R (%)	15			8.7			0		

结论：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%。

3 方法验证结论

6家实验室分别对3种实际样品进行了测定，畜禽养殖业固体废物实验室内蛔虫卵死亡率相对标准偏差范围为2.4%~8.1%；实验室间的死亡率相对标准偏差为4.0%；死亡率重复性限为12%，再现性限为15%。污水处理厂污泥实验室内蛔虫卵死亡率相对标准偏差范围为0.76%~4.8%；实验室间的死亡率相对标准偏差为1.4%；死亡率重复性限为8.2%，再现性限为8.7%。医疗机构污泥实验室内蛔虫卵死亡率相对标准偏差范围为0%；实验室间的死亡率相对标准偏差为0%；死亡率重复性限为0%，再现性限为0%。