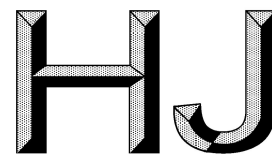


附件 2



中华人民共和国国家环境保护标准

HJ□□□-201□

水质 蛔虫卵的测定 沉淀集卵法

Water quality Ascarid ova determination Nature sedimentation method

(征求意见稿)

201□-□□-□□发布

201□-□□-□□实施

环 境 保 护 部 发 布

目 次

前 言.....	II
1 适用范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 方法原理.....	1
4 试剂和材料.....	1
5 仪器和设备.....	1
6 样品.....	2
7 分析步骤.....	2
8 结果计算与表示.....	3
9 精密度和准确度.....	3
10 质量保证和质量控制.....	3
11 废物处理.....	3
12 注意事项.....	3
附录 A.....	4
附录 B.....	5
附录 C.....	6

前 言

为贯彻《中华人民共和国环境保护法》和《中华人民共和国水污染防治法》，保护环境，保障人体健康，规范水质蛔虫卵的测定方法，制定本标准。

本标准规定了测定地表水和废水中蛔虫卵的沉淀集卵方法。

本标准首次发布。

本标准的附录 A、附录 B、附录 C 为资料性附录。

本标准由环境保护部科技标准司组织制订。

本标准主要起草单位：常州市环境监测中心。

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、浙江省环境监测中心、苏州市环境监测中心、徐州市环境监测中心站和泰州市环境监测中心站。

本标准由环保部 2010 年 00 月 00 日批准。

本标准自 2010 年 00 月 00 日起实施。

本标准由环境保护部解释。

水质 蛔虫卵的测定 沉淀集卵法

1 适用范围

本标准规定了测定水中蛔虫卵的沉淀集卵法。

本标准适用于地表水和废水中蛔虫卵的测定。

本方法检出限为 0.43 个/L。

2 规范性引用文件

本标准内容引用了下列文件或其中的条款。凡是不注明日期的引用文件，其有效版本适用于本标准。

HJ/T91 地表水和污水监测技术规范

3 方法原理

过滤去除水样中较大杂质后，利用蛔虫卵比重大于水、易于沉淀的特性，加入乙酸-乙酸钠缓冲液控制溶液 pH 值，获得最佳亲水-亲脂平衡。乙酸乙酯吸收水中的脂肪类杂质，使蛔虫卵更易下沉。再加入表面活性剂吐温 80，通过离心沉淀蛔虫卵，达到集卵的目的。最后将收集的虫卵通过饱和硝酸钠溶液漂浮后镜检，测定其数量。

4 试剂和材料

除非另有说明，分析时均使用符合国家标准分析纯化学试剂和蒸馏水（或去离子水）。

4.1 乙酸乙酯（ $C_4H_8O_2$ ），化学纯。

4.2 乙酸-乙酸钠缓冲液（pH=4.5）。

将 15g 三水合乙酸钠（ $CH_3COONa \cdot 3H_2O$ ），溶于适量的蒸馏水或去离子水中，添加去离子水或蒸馏水至 800ml 左右，加入 3.6ml 乙酸（ CH_3COOH ），调节 pH 值至 4.5，最后加蒸馏水或去离子水定容至 1000mL，此溶液保质期为 30d。

4.3 吐温 80 溶液： $\rho(C_{24}H_{44}O_6) = 1\%$ 。

1ml 吐温 80（Tween 80），溶于适量的蒸馏水或去离子水中，稀释至 1000mL，现配。

4.4 饱和硝酸钠（ $NaNO_3$ ）溶液

称取略多于室温下溶解度的硝酸钠（ $NaNO_3$ ）溶于 100g 蒸馏水或去离子水中，充分溶解后过滤，滤去残渣，现配。硝酸钠在不同温度下的溶解度见附录 A。

5 仪器和设备

除非另有说明，分析时均使用符合国家标准 A 级玻璃量器。

5.1 冰箱：0-4℃。

5.2 筛网：60 目。

5.3 不锈钢开口直壁容器：10L。

- 5.4 开口直壁量筒：1000ml。
- 5.5 螺口尖底离心管：50ml。
- 5.6 离心机：带 50ml 螺口尖底离心管，离心力 1000g 以上。
- 5.7 一次性巴士滴管：3ml。
- 5.8 漩涡混匀器。
- 5.9 显微镜：物镜 4×、10×倍，目镜 10×倍。
- 5.10 定量计数框：1ml（网格）、5ml（S 型）定量计数框。

6 样品

按 HJ/T91 的一般要求，采集总量不小于 10L 的水样，带回实验室。水样若不能立即进行检验，应置于冰箱中在 0-4℃ 下保存，保存时间不超过 48h。

7 分析步骤

7.1 水样充分摇匀后，倒入不锈钢开口直壁容器内至 10L 刻度，进行水样沉淀。如水样中含有草梗、纸渣等较大杂质，则应先将水样用 60 目筛网过滤，并用吐温 80 溶液清洗筛网及杂质并将洗液并入 10L 沉淀的水样中。

7.2 水样过夜沉淀后，用虹吸管小心吸取上清液，弃去，留 1L 水样，避免水样的扰动。残留的沉淀及水样转置于 1000ml 量筒内进行第二次沉淀。用吐温 80 溶液彻底清洗容器，并将洗液并入量筒内。过夜沉淀后，同上步，用虹吸管吸取并弃去上清液，留 90-100ml 水样，避免水样的扰动。根据体积，沉淀、水样及吐温 80 洗液小心转移至多个离心管，以 1000g 的离心力离心 15min。离心机转速计算见附录 A。

7.3 弃去上清液。将多个离心中的所有沉淀转移至一个离心管中，用吐温 80 溶液彻底清洗离心管且并入洗液，以确保没有沉淀被丢弃，以 1000g 的离心力离心 15min。

7.4 弃去上清液。用等体积的 pH=4.5 的乙酸-乙酸钠缓冲液对沉淀进行再悬浮（即：如沉淀体积为 2ml，加 2ml 缓冲液）。如果沉淀体积不足 2ml，加缓冲液至 4ml，以确保在用乙酸乙酯浸提之后，沉淀上方有足够体积的缓冲液，避免倒出乙酸乙酯层时蛔虫卵沉淀层的丢失。

7.5 加入两倍体积的乙酸乙酯（在上面的例子中即 4ml），用漩涡混匀器完全混合溶液。

7.6 以 1000g 的离心力离心 15min。样品将被分为清晰的三层。所有的非脂肪物质、重碎片，包括蛔虫卵、幼虫和原生动物在底层。中间是缓冲液层，脂肪和其他脂溶性物质因乙酸乙酯，在上方形成黑而厚的一层。

7.7 记下含卵的下层沉淀体积，将沉淀上方的液体平稳地倒出。如有必要，可用细针在离心管壁四周对上层的脂肪层进行松动。

7.8 用 5 倍体积的饱和硝酸钠溶液（即：如沉淀体积为 1ml，加 5ml 饱和 NaNO_3 溶液）对沉淀进行再悬浮。

7.9 将悬浮液加入定量计数框，在显微镜下计数，直至镜检完全部悬浮液。镜检时：需保持环境的稳定，无震动和风扰；人员在使用显微镜观察时，应尽量保持计数框的缓移；计数时，应自上而下“U”型逐列计数。镜检鉴定方法见附录 B。

注 1：若水样中蛔虫卵浓度在 10 倍检出限以上（>4.3 个/L），可不进行 10L 水样的沉淀，直接取 1L 水样进行 7.2 节的沉淀浓缩。

8 结果计算与表示

检测到的蛔虫卵全部计数。

$$\text{蛔虫卵浓度} = \frac{\text{检测到的所有蛔虫卵数 (个)}}{\text{实验水样体积 (L)}}$$

结果的单位为个/L。

9 精密度和准确度

9.1 精密度

6家实验室分别对实际样品、低浓度(2个/L)、中浓度(4个/L)、高浓度(8个/L)自制参考样品的蛔虫卵(参考样品制备方法见附录C)进行了测定,实验室内的相对标准偏差范围分别为:6.46%~18.88%,10.06%~21.96%,12.79%~23.77%,8.86%~17.38%;实验室间的相对标准偏差分别为5.78%、5.45%、4.93%、4.83%;重复性限为24.38、0.29、0.74、1.11;再现性限为25.97、0.29、0.70、1.11。

9.2 准确度

6家实验室对蛔虫卵自制参考样品(8个/L)进行测定,实验室内相对误差的范围是-56.04%~-60.83%,相对误差的最终值为-58.19%±4.04%。

10 质量保证和质量控制

每批样品做全程序空白样测定并取10%的样品进行平行样测定。全程序空白样不得检出蛔虫卵,平行样间的相对偏差不得超过30%。

11 废物处理

实验用过的器具均需进行高温灭活,置于水中煮沸10min后方可再次使用。

实验的虹吸液煮沸10min后可按普通废弃物处理,含乙酸乙酯的废弃液按危险废物处置。

12 注意事项

实验操作人员要注意自身防护,避免蛔虫卵的污染。

附录 A
(资料性附录)

A.1 硝酸钠在水中的溶解度

硝酸钠在水中的溶解度

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

A.2 离心力计算公式

$$RCF = r(\text{rpm})^2 / k$$

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(转/分)

k ——89456

A.3 离心力转换为转速公式

$$\text{rpm} = \sqrt{(kRCF/r)}$$

附录 B
(资料性附录)
蛔虫卵的鉴定

B.1 蛔虫卵的形态特征

B.1.1 受精蛔虫卵

虫卵呈短椭圆形，大小为 $45\sim 75\mu\text{m}\times 35\sim 50\mu\text{m}$ ，卵壳很厚，通常表面有一层波浪式的蛋白质膜，从粪便排出的虫卵常被胆汁染成黄色或棕褐色，内含有一个未分裂的受精卵细胞，与卵壳之间形成半月形间隙。

B.1.2 未受精蛔虫卵

虫卵呈长椭圆形或不规则形，大小为 $88\sim 94\mu\text{m}\times 39\sim 44\mu\text{m}$ ，卵壳较薄，淡黄色，内含有许多大小不一的屈光颗粒。

B.1.3 感染期虫卵

卵内含有一条卷曲的幼虫。

自人体排出的蛔虫卵，有受精卵和未受精卵两种。受精蛔虫卵呈宽卵圆形，大小约为 $45\sim 75\mu\text{m}\times 35\sim 50\mu\text{m}$ ，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的细胞，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，在肠道内被胆汁染成棕黄色。未受精蛔虫卵多呈长椭圆形，大小约为 $88\sim 94\mu\text{m}\times 39\sim 44\mu\text{m}$ ，壳质层与蛋白质膜均较受精蛔虫卵薄，无蛔貳层，卵壳内含许多大小不等的折光性颗粒。若蛔虫卵的蛋白质膜脱落，卵壳则呈无色透明，应注意与其他线虫卵的鉴别。

B.2 蛔虫卵参考图片

B.2.1 蛔虫卵模式图

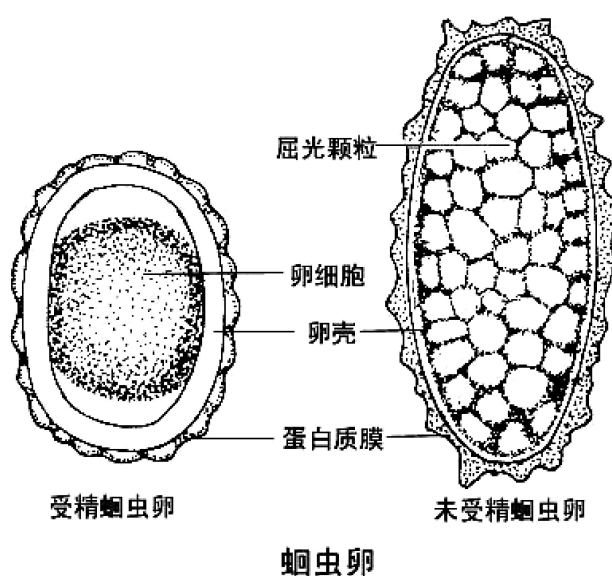
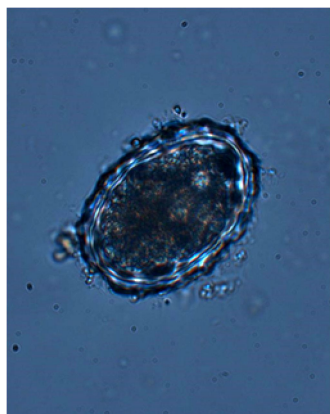
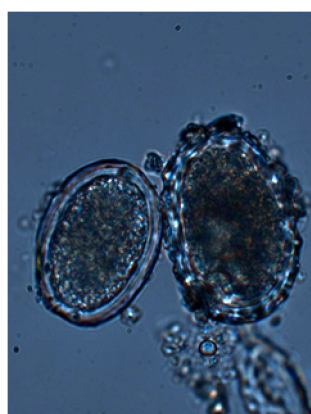


图 3 蛔虫卵模式图

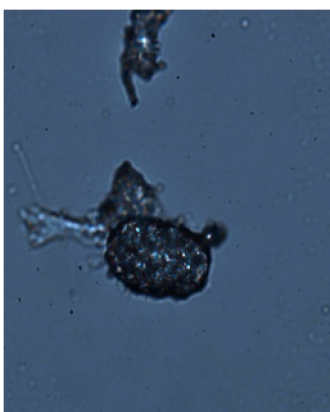
B.2.2 发育各阶段的蛔虫卵



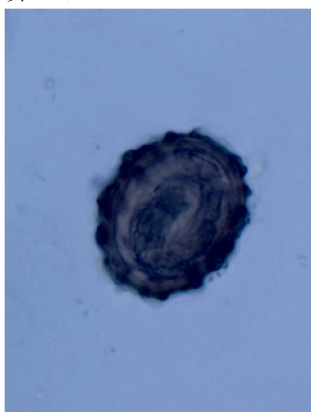
受精蛔虫卵



脱去蛋白质膜的受精蛔虫卵（左）



未受精蛔虫卵



感染期蛔虫卵

附录 C

(资料性附录)

蛔虫卵参考样品的制备

猪蛔虫(*Ascaris suum*)活成虫采集自屠宰场,用蒸馏水洗涤干净后,放置于含 4%甲醛溶液内, 0-4 °C 保存备用,可长期保存。

制备蛔虫卵备用液时,选取 2-3 条蛔虫,用 75%乙醇消毒过的解剖刀,划开虫体,取出肠道,每条蛔虫选取一小段靠近阴门的子宫(2-3mm),解剖后取出内容物。将含组织的蛔虫卵悬浮于含有玻璃珠的 100ml 生理盐水中,涡旋混匀器振荡 3-5min,用 260 目网过筛,此时蛔虫卵呈单个状态存在。滤液加入甲醛至终浓度为 4%, 0-4 °C 保存备用,可保存 1 个月。即制即用时可不添加甲醛。

制备参考样品时,摇匀蛔虫卵备用液,用 1000ul 微量移液器,立即吸取适量的蛔虫卵备用液于 1ml 定量计数框(网格)中,计数后用 250ul 微量移液器向计数框中添加或移出蛔虫卵至所需数量。然后,将计数框中所有的液体用吐温 80 溶液冲洗入参考样品中。最后,显微镜下检测计数框,确保无蛔虫卵残留。