

中华人民共和国国家环境保护标准

HJ 775-2015

水质 蛔虫卵的测定 沉淀集卵法

Water quality Ascarid ova determination Nature sedimentation method

(发布稿)

本电子版为发布稿。请以中国环境科学出版社出版的正式标准文本为准。

2015-12-04 发布

2016-01-01 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.....	4
10 质量保证和质量控制.....	4
11 废物处理.....	4
12 注意事项.....	4
附录 A（资料性附录）硝酸钠水中溶解度、离心机离心力及转速计算公式.....	5
附录 B（资料性附录）蛔虫卵的鉴定.....	6
附录 C（资料性附录）蛔虫卵配制样品的制备.....	8

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，规范水中蛔虫卵的测定方法，制定本标准。

本标准规定了地表水和废水中蛔虫卵测定的沉淀集卵法。

本标准首次发布。

本标准的附录 A～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。

本标准环境保护部 2015 年 12 月 4 日批准。

本标准自 2016 年 1 月 1 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。

当取样体积为 10 L 时，本方法的检出限为 5 个/10 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/T 91 地表水和污水监测技术规范

3 方法原理

沉淀集卵法主要通过样品浓缩、杂质分离、镜检计数等环节对水中蛔虫卵进行测定。用 60 目筛网过滤去除样品中较大的杂质，利用蛔虫卵比重大于水和易于沉淀的特性过夜沉淀浓缩水样，用虹吸的方法弃去上清液，用表面活性剂吐温 80 作为残液及沉淀转移时的清洗剂，进一步离心浓缩转移的剩余物，收集到的浓缩物用乙酸-乙酸钠缓冲液混匀，控制溶液 pH 值，获得最佳亲水-亲脂平衡，加入乙酸乙酯吸收水中的脂肪类杂质，使蛔虫卵更易下沉。再次离心浓缩样品并弃去上部脂肪杂质层及缓冲液层，获得的含卵沉淀层用饱和硝酸钠溶液混匀，于计数框中静置漂浮后镜检，即可测得水样中蛔虫卵的数量。

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，实验用水为新制备的蒸馏水或去离子水。

4.1 乙酸乙酯 (C₄H₈O₂)。

4.2 乙酸-乙酸钠缓冲液：pH=4.5。

称取 15.0 g 三水合乙酸钠 (CH₃COONa·3H₂O)，溶于约 800 ml 实验用水中，加入 3.6 ml 乙酸 (CH₃COOH) 调节 pH 值至 4.5，用实验用水定容至 1000 ml。此溶液保质期为 30 d。

4.3 吐温 80 溶液：φ (C₂₄H₄₄O₆) = 1 %。

移取 1 ml 吐温 80 (Tween 80)，用实验用水稀释定容至 1000 ml，临用现配。

4.4 饱和硝酸钠 (NaNO₃) 溶液。

称取略多于实验环境温度对应溶解度的硝酸钠 (NaNO₃)，充分溶解于 100 g 实验用水中，用滤纸滤去残渣，临用现配。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 显微镜：物镜 4×、10×倍，目镜 10×倍。
- 5.2 冰箱：0℃~4℃。
- 5.3 水平转子离心机：带 50 ml 螺口尖底离心管，离心力 1000 g 以上。
- 5.4 漩涡混匀器。
- 5.5 筛网：60 目， $\varnothing 250 \mu\text{m}$ 。
- 5.6 不锈钢开口直壁容器：10 L。
- 5.7 开口直壁量筒：1000 ml。
- 5.8 虹吸管。
- 5.9 洗瓶。
- 5.10 螺口尖底离心管：50 ml。
- 5.11 一次性巴氏滴管：3 ml、10 ml。
- 5.12 微量移液器：1000 μl 。
- 5.13 定量计数框：1 ml（网格）、5 ml（S 型）定量计数框。

6 样品

按 HJ/T 91 中对一般污染物采样的要求，用 10 L 以上容积的塑料桶采样。采样前需用样品荡洗塑料桶，采集样品量应 $\geq 10 \text{ L}$ ，常温下运回实验室，立即进行过滤（7.1）和沉淀（7.2）。

7 分析步骤

7.1 过滤

充分摇匀样品，转入不锈钢开口直壁容器（5.6）至 10 L 刻度。如样品中含有草梗、纸渣等较大杂质，需将样品用筛网（5.5）过滤，并用吐温 80 溶液（4.3）清洗筛网（5.5）及杂质，洗液并入过滤后的 10 L 样品中。

7.2 沉淀

上述样品（7.1）在 15℃~25℃室温下静置过夜沉淀 12 h~24 h，用虹吸管（5.8）小心吸取并弃去上清液，避免扰动，保留 1 L 含沉淀物的样品，转入 1000 ml 开口直壁量筒（5.7），分别用 50 ml 吐温 80 溶液（4.3）彻底清洗不锈钢开口直壁容器 3 次，洗液并入开口直壁量筒（5.7）。在 15℃~25℃室温下再次静置过夜沉淀 12 h~24 h，用虹吸管（5.8）吸取并弃去上清液，避免扰动，保留 90 ml~100 ml 含沉淀物的样品。

注 1：若样品中蛔虫卵浓度在 10 倍检出限以上（ >50 个/10 L），采样时，可只采总量不小于 1 L 的样品，取 1 L 水样直接进行第二步的量筒沉淀浓缩。当样品中含有草梗、纸渣等较大杂质，同样应先将样品用筛网（5.5）过滤，并用吐温 80 溶液（4.3）清洗筛网及杂质，洗液并入 1 L 样品中沉淀。

7.3 离心

沉淀浓缩后的样品（7.2）小心转移至 3 个螺口尖底离心管（5.10），分别用 15 ml 吐温 80 溶液（4.3）彻底清洗开口直壁量筒 3 次，洗液均匀并入 3 个螺口尖底离心管。以 1000 g 的离心力（离心机转速计算见附录 A）离心 15 min，用巴氏滴管（5.11）小心吸取并弃去上清液，少量留之，避免带出沉淀。

用少量吐温 80 溶液（4.3）将 3 个离心管中的沉淀进行悬浮，将沉淀量少的 2 个离心管中的悬浮液并入沉淀量最多的一个离心管中；分别用 3 ml~5 ml 吐温 80 溶液彻底清洗被转移悬

浮液的 2 个离心管，每支清洗 3 次，确保没有沉淀被丢弃，洗液并入沉淀量最多的离心管。以 1000 g 的离心力离心 15 min，用巴氏滴管（5.11）小心吸取并弃去上清液，少量留之，避免带出沉淀。

7.4 脂类杂质分离去除

用与离心后沉淀（7.3）等体积的乙酸-乙酸钠缓冲液（4.2）对沉淀进行悬浮（即：离心后沉淀体积为 2 ml，加入 2 ml 缓冲液）。如果离心后沉淀体积不足 2 ml，加入缓冲液至 4 ml。以确保用乙酸乙酯（4.1）浸提后，沉淀上方有足够体积的缓冲液，便于脂类杂质层完全倾出，且避免蛔虫卵沉淀层的丢失。

加入 2 倍离心后沉淀（7.3）体积的乙酸乙酯（4.1），用涡旋混匀器（5.4）完全混合。以 1000 g 的离心力离心 15 min，样品被分为清晰的三层。所有的非脂肪物质、重碎片，包括蛔虫卵、幼虫和原生动植物在底层；中间层是缓冲液层；脂肪和其他脂溶性物质在上方形成黑而厚的一层。

将上层和中间层液体平稳倾出弃去，记录底层沉淀体积。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。

7.5 镜检

加入 5 倍底层沉淀（7.4）体积的饱和硝酸钠溶液（4.4），对分离去除脂类杂质后的含卵底层沉淀进行悬浮。该悬浮液可置于 0 °C~4 °C 冰箱（5.2）冷藏保存，备检，于 1 周内检测完毕，检测时需将其静置至室温。充分摇匀悬浮液，将其转入定量计数框（5.13），静置 5 min，在显微镜下计数，直至全部悬浮液镜检完成。分别用 1 ml 饱和硝酸钠溶液（4.4）充分洗涤镜检完的离心管 3 次，将洗液转入定量计数框（5.13），按以上步骤镜检。所有检测到的蛔虫卵全部计数。

镜检时，需保持环境条件的稳定，无震动和风扰，缓移计数框，自上而下“U”型逐列计数。蛔虫卵鉴定方法见附录 B。

7.6 空白对照试验

取 10 L 同批次实验用水，按以上采样及分析步骤进行全程序空白样品的测定。

8 结果计算与表示

8.1 结果计算

统计全部计数的蛔虫卵数，按公式（1）计算并报告 10 L 水样中蛔虫卵数：

$$C = \frac{N}{Q} \quad (1)$$

式中：

C——水样中蛔虫卵浓度（个/10 L）

N——检测到的所有蛔虫卵数（个）

Q——实际水样体积（10 L）

8.2 结果表示

水质中蛔虫卵的测定，实验最终结果取整表示，以“个 /10 L”为单位。

9 精密度

6家实验室分别对实际样品和低浓度（20个/10L）、中浓度（40个/10L）、高浓度（80个/10L）自配样品的蛔虫卵进行测定，实验室内相对标准偏差范围分别为：6.5%~18.9%，10.1%~22.0%，12.8%~23.8%，8.9%~17.4%；实验室间相对标准偏差分别为5.8%、5.5%、4.9%、4.8%；重复性限（个/10L）为244、3、7、11；再现性限（个/10L）为260、3、7、11。

10 质量保证和质量控制

每批次样品至少做1个全程序空白试验，并取10%的样品进行平行样测定。全程序空白试验不得检出蛔虫卵，平行样间的相对偏差不得超过30%。

11 废物处理

实验中虹吸液煮沸10 min后可按普通废弃物处理，含乙酸乙酯的废弃液应集中保管，委托有资质的单位进行处理。

12 注意事项

实验用过的器具均需进行高温灭活，置于水中煮沸10 min后方可再次使用。

实验操作人员要注意自身防护，试验时要穿戴工作服、乳胶手套及口罩等，同时还要避免含蛔虫卵的样品污染实验室环境。

附录 A
(资料性附录)

硝酸钠水中溶解度、离心机离心力及转速计算公式

A.1 硝酸钠在水中的溶解度

表 A.1 硝酸钠水中溶解度

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

离心力按公式 (A.1) 进行计算。

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

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 (转/分)

k —— 89456

A.3 离心力转换为转速公式

离心机转速按公式 (A.2) 进行换算。

$$\text{rpm} = \sqrt{\frac{k \cdot RCF}{r}} \quad (\text{A.2})$$

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 $45\ \mu\text{m}\sim 75\ \mu\text{m}\times 35\ \mu\text{m}\sim 50\ \mu\text{m}$ 。卵壳很厚，自外向内分为三层：受精膜、壳质层和蛔甑层，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，其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。

B.1.2 未受精蛔虫卵

虫卵呈长椭圆形或不规则形，大小为 $88\ \mu\text{m}\sim 94\ \mu\text{m}\times 39\ \mu\text{m}\sim 44\ \mu\text{m}$ ，卵壳与蛋白质膜均较受精蛔虫卵薄，淡黄色，无蛔甑层，卵壳内含有许多大小不一的屈光颗粒。

B.1.3 感染期蛔虫卵

卵内含有一条卷曲的幼虫。

B.1.4 蛋白质膜脱落的蛔虫卵

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

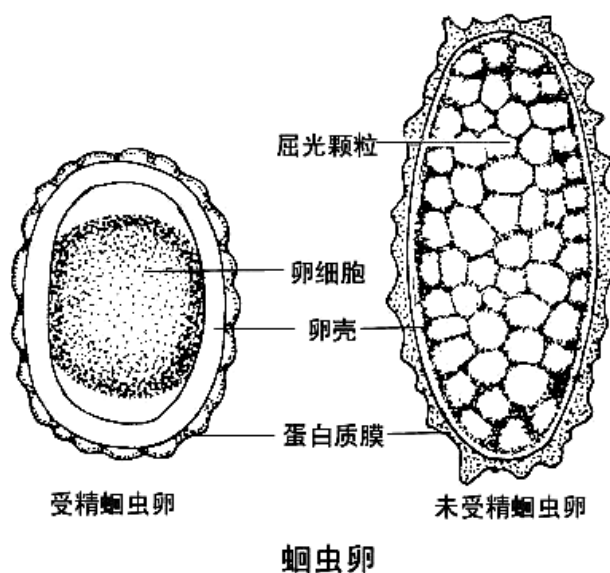
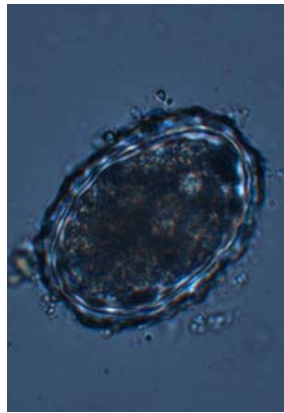
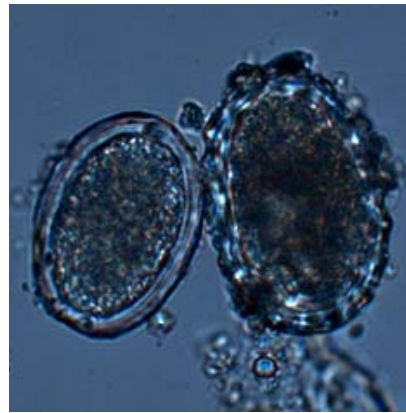


图 B.1 蛔虫卵模式图

B. 2. 2 发育各阶段的蛔虫卵



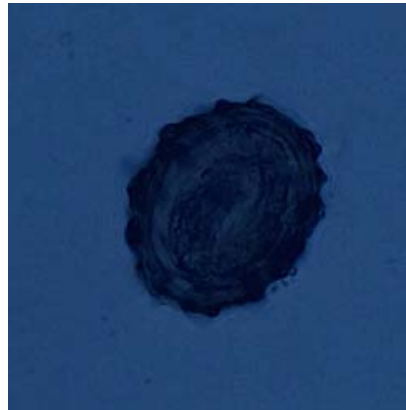
受精蛔虫卵



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

图 B.2 发育各阶段的蛔虫卵

附录 C
(资料性附录)
蛔虫卵配制样品的制备

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 °C~4 °C 保存备用, 可长期保存。

制备蛔虫卵备用液时, 选取 2~3 条雌性蛔虫, 用 75 % 乙醇消毒过的解剖刀, 划开虫体, 每条蛔虫一对子宫选取靠近阴门的一段(2 mm~3 mm), 解剖后, 将含蛔虫卵的内容物及组织碎片放入 50 ml 离心管中, 加入数颗直径 1 mm 玻璃珠及 10 ml 生理盐水, 混匀后于涡旋混匀器振荡 3 min~5 min, 用 260 目网过筛, 取 40 ml 生理盐水分数次冲洗离心管和筛网, 此时获得的滤液中蛔虫卵呈单个状态存在。滤液加入甲醛至终浓度为 4 %, 0 °C~4 °C 保存备用, 可保存 1 个月。即制即用时可不添加甲醛。

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