



中华人民共和国国家标准

GB 7959—2012
代替 GB 7959—1987

粪便无害化卫生要求

Hygienic requirements for harmless disposal of night soil

2012-11-20 发布

2013-05-01 实施



中华人民共和国卫生部
中国国家标准化管理委员会 发布

目 次

前言	I
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 粪便处理的卫生要求	2
5 监督监测	3
6 监测检验方法	4
附录 A (规范性附录) 高温堆肥温度测定方法	5
附录 B (规范性附录) 粪便水分含量测定法	6
附录 C (规范性附录) 沙门氏菌属检测法	8
附录 D (规范性附录) 堆肥、粪稀中粪大肠菌群检测法	13
附录 E (规范性附录) 蛔虫卵检查法	17
附录 F (规范性附录) 粪稀钩虫卵检查法	20
附录 G (规范性附录) 粪稀中血吸虫卵检查法	21
附录 H (规范性附录) 蠕虫卵死活鉴别方法	23
附录 I (规范性附录) 蚊、蝇的密度监测方法	34

前 言

本标准的全部技术内容为强制性。

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 GB 7959—1987《粪便无害化卫生标准》。

本标准与 GB 7959—1987 相比主要变化如下：

- 依据 GB/T 1.1—2009《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写规则》调整了结构，对标准中的文字部分作了全面修改；
- 补充了术语和定义，如粪便无害化处理、粪大肠菌值等；
- 按好氧、厌氧与兼性厌氧发酵、密闭贮存、粪尿分集干式粪便处理和固液分离絮凝-脱水处理方法的类别，分别提出了卫生要求；
- 本标准所指粪便无害化，涉及减少、去除或杀灭粪便中的肠道致病菌、寄生虫卵等生物性致病因子，强调农业资源化利用与土地处理是粪便深度处理的组成部分；
- 明确了进行粪便处理运行监管部门和卫生监督检测部门的责任；
- 修改并增加了与本标准配套监测检验方法的部分内容。

本标准由中华人民共和国卫生部提出并归口。

本标准负责起草单位：中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所。

本标准参加起草单位：四川省疾病预防控制中心、河南省疾病预防控制中心、重庆市疾病预防控制中心。

本标准主要起草人：王俊起、王友斌、潘力军、张本界、田洪春、孙凤英、韩克勤、汪新丽、谢红、潘顺昌。

粪便无害化卫生要求

1 范围

本标准规定了粪便无害化卫生要求限值和粪便处理卫生质量的监测检验方法。

本标准适用于城乡户厕、粪便处理厂(场)和小型粪便无害化处理设施处理效果的监督检测和卫生学评价。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB 18918 城镇污水处理厂污染物排放标准
CJJ/T 30 城市粪便处理厂运行、维护及其安全技术规程
CJJ 64 粪便处理厂设计规范
消毒技术规范 卫生部

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

粪便 excreta, night soil

人体排泄的粪和尿,统称为粪便。

3.2

粪便无害化处理 harmless disposal of night soil

减少、去除或杀灭粪便中的肠道致病菌、寄生虫卵等病原体,能控制蚊蝇孳生、防止恶臭扩散,并使其处理产物达到土地处理与农业资源化利用的处理技术。

3.3

好氧发酵 aerobic fermentation

高温堆肥 thermophilic composting

采用人工与机械堆积的方式,在有氧条件下,经微生物作用,使粪便和生活垃圾等有机物,温度达到50℃及以上并能维持一定时间的处理方法。

3.4

厌氧消化 anaerobic fermentation

粪便有机物在厌氧条件下,依专性厌氧菌使粪便中的有机物降解并产生沼气的处理方法,其处理设施包括高温、中温和常温沼气消化处理池。

3.5

兼性厌氧发酵 facultative anaerobic fermentation

依兼性厌氧菌使粪便中的有机物降解的处理方法,其处理设施包括三格化粪池、双瓮化粪池。

3.6

粪大肠菌值 values of fecal coliforms

检出一个粪大肠菌菌落形成单位的最小样本量,系评价粪便无害化效果的重要卫生指标,菌值越大表明处理效果越好。

3.7

消毒 disinfection

减少、去除或杀灭粪便中的病原微生物使达到无传播危害的处理技术。

4 粪便处理的卫生要求

- 4.1 城乡采用的粪便处理技术,应遵循卫生安全、资源利用和保护生态环境的原则。
- 4.2 对粪便必须进行无害化处理,严禁未经无害化处理的粪便用于农业施肥和直接排放。
- 4.3 粪便处理厂设计应符合 CJJ 64 的规定。采用固液分离-絮凝脱水处理法处理粪便时,产生的上清液应与污水处理厂污水合并处理,污泥须采用高温堆肥等方法处理。处理后最终的排放出水,其总氮、总磷等富营养物质含量应符合 GB 18918 要求。
- 4.4 应有效地控制蚊、蝇孳生。使堆肥堆体、贮粪池与厕所周边无存活的蛆、蛹和新羽化的成蝇。
- 4.5 清掏出的贮粪池粪渣、粪皮,沼气池沉渣、各类处理设施的污泥,应经高温堆肥无害化处理合格后方可用作农业施肥。
- 4.6 肠道传染病发生时,应对粪便、贮粪池及粪便可能污染的场所、容器等进行消毒,消毒方法与消毒剂应用应参照《消毒技术规范》的要求执行。
- 4.7 经各种方法处理后的粪便产物应符合表 1~表 4 的卫生要求。

表 1 好氧发酵(高温堆肥)的卫生要求

编号	项 目	卫生要求	
1	温度与持续时间	人工	堆温 $\geq 50\text{ }^{\circ}\text{C}$,至少持续 10 d 堆温 $\geq 60\text{ }^{\circ}\text{C}$,至少持续 5 d
		机械	堆温 $\geq 50\text{ }^{\circ}\text{C}$,至少持续 2 d
2	蛔虫卵死亡率	$\geq 95\%$	
3	粪大肠菌值	$\geq 10^{-2}$	
4	沙门氏菌	不得检出	

表 2 厌氧与兼性厌氧消化的卫生要求

编号	项 目	卫生要求	
1	消化温度与时间	户用型	常温厌氧消化 $\geq 30\text{ d}$ 兼性厌氧发酵 $\geq 30\text{ d}$
		工程型	常温厌氧消化 $\geq 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ $\geq 20\text{ d}$
			中温厌氧消化 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ $\geq 15\text{ d}$ 高温厌氧消化 $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ $\geq 8\text{ d}$
2	蛔虫卵	常温、中温厌氧消化 沉降率 $\geq 95\%$ 高温厌氧消化 死亡率 $\geq 95\%$	

表 2 (续)

编号	项 目	卫 生 要 求
3	血吸虫卵和钩虫卵 ^a	不得检出活卵
4	粪大肠菌值	中温、常温厌氧消化 $\geq 10^{-4}$ 高温厌氧消化 $\geq 10^{-2}$ 兼性厌氧发酵 $\geq 10^{-4}$
5	沙门氏菌	不得检出

^a 在非血吸虫病和钩虫病流行区,血吸虫卵和钩虫卵指标免检。

表 3 密封贮存处理的卫生要求

编号	项 目	卫 生 要 求
1	密封贮存时间	不少于 12 个月
2	蛔虫卵死亡率	$\geq 95\%$
3	血吸虫卵和钩虫卵	不得检出活卵
4	粪大肠菌值	$\geq 10^{-4}$
5	沙门氏菌	不得检出

表 4 脱水干燥、粪尿分集处理粪便的卫生要求

编号	项 目	卫 生 要 求	
1	贮存时间	尿	及时应用; 疾病流行时,不少于 10 d ^a
		粪	草木灰混合 2 个月; 细沙混合 6 个月; 煤灰、黄土混合 12 个月
2	蛔虫卵	死亡率 $\geq 95\%$	
3	血吸虫卵和钩虫卵	不得检出活卵	
4	粪大肠菌值	$\geq 10^{-2}$	
5	沙门氏菌	不得检出	
6	pH	草木灰、粪混合后 $> \text{pH } 9$	
7	水分	50% 以下	

^a 按卫生行政部门的要求执行。

5 监督监测

- 5.1 粪便处理厂应按照 CJJ/T 30 的规定进行日常运行监测。
- 5.2 相关部门应定期进行粪便处理效果的监督监测和卫生学评价。

6 监测检验方法

- 6.1 高温堆肥温度测定方法见附录 A。
- 6.2 粪便水分含量测定法见附录 B。
- 6.3 沙门氏菌检测法见附录 C。
- 6.4 堆肥、粪稀中粪大肠菌群检验法见附录 D。
- 6.5 蛔虫卵检查法见附录 E。
- 6.6 粪稀钩虫卵检查法见附录 F。
- 6.7 粪稀中血吸虫卵检查法见附录 G。
- 6.8 蠕虫卵死活鉴别方法见附录 H。
- 6.9 蚊、蝇的密度监测方法见附录 I。



附 录 A
(规范性附录)
高温堆肥温度测定方法

A.1 适用范围

适用于高温堆肥堆体内温度的测定。

A.2 温度要求

堆体好氧发酵过程中,保持 50 ℃ 以上的温度,是评定粪便无害化效果的重要指标。

A.3 仪器

选择金属套筒温度计或热敏数显测温装置。

A.4 测定方法

A.4.1 测点:堆体的上、中、下三层,各层测量堆体距表面 10 cm 与中心部位两个测点。

A.4.2 待温度恒定后,读数记录。

A.4.3 在堆积周期内应每天测试各测试点温度。

附录 B
(规范性附录)
粪便水分含量测定法

B.1 适用范围

适用于脱水干燥、干式贮存粪便水分含量的测定。

B.2 温度要求

粪便样品在(105±2)℃烘至恒重时的失重,即为粪便样品所含水分的质量。

B.3 仪器、设备

- B.3.1 金属铲。
- B.3.2 土壤筛:孔径 1 mm。
- B.3.3 铝盒:小型的直径(D)约 50 mm,高约 20 mm。
- B.3.4 天平:感量为 0.001 g。
- B.3.5 电热恒温烘箱。
- B.3.6 干燥器:内盛变色硅胶或无水氯化钙。

B.4 试样的选取和制备

用金属铲在贮粪池取有代表性的粪样,刮去上部浮物,将金属铲至所需深度处,取粪便样品约 10 g,迅速装入已知准确称量的铝盒内,盖紧并将铝盒外表擦拭干净,待测定。应做平行样。

B.5 测定步骤

将盛有粪便的两份平行样品铝盒分别在分析天平上称量,准确至 0.01 g。揭开盒盖,放在盒底下,置于已预热至(105±2)℃的烘烤箱中烘烤 12 h。取出后立即盖紧,在干燥器中冷却至室温(约需 30 min),再称重。样品在烘箱内应干燥至恒重(烘烤规定时间后一次称量),使两次称量差值不超过试样质量的 3%。

B.6 测定结果的计算

B.6.1 计算公式:

湿重计算方法见公式(B.1)

$$w_{\text{湿}} = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (B.1)$$

式中:

$w_{\text{湿}}$ ——湿重,%;

m_0 —— 烘干空铝盒质量,单位为克(g);
 m_1 —— 烘干前铝盒及土样质量,单位为克(g);
 m_2 —— 烘干后铝盒及土样质量,单位为克(g)。
 干重计算方法见公式(B. 2)

$$w_{\text{干}} = \frac{m_1 - m_2}{m_2 - m_0} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (\text{B. 2})$$

式中:

$w_{\text{干}}$ —— 干重,%;
 m_0 —— 烘干空铝盒质量,单位为克(g);
 m_1 —— 烘干前铝盒及土样质量,单位为克(g);
 m_2 —— 烘干后铝盒及土样质量,单位为克(g)。

B. 6.2 平行测定的结果用算术平均值表示,保留小数点后一位。

附 录 C
(规范性附录)
沙门氏菌属检测法

C.1 适用范围

适用于未经处理或无害化处理后粪便、粪液和堆肥中的沙门氏菌测定。

C.2 检测指标

沙门氏菌属是人类和动物常见的一组肠道致病菌,是肠道传染性疾病预防时,评价粪便无害化处理效果的主要指标。

C.3 设备和材料

C.3.1 设备

天平、乳钵或均质器、恒温培养箱(36 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 、(44 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$ 、水浴箱、显微镜、冰箱、高压蒸汽灭菌器、pH计或精密pH试纸、平皿、刻度吸管、试管、玻片、接种环(针)、采样瓶、锥形瓶。

C.3.2 培养基和试剂

C.3.2.1 样品稀释液

氯化钠	8.5 g
蒸馏水	1 000 mL

制法:将上述成分溶解于蒸馏水中,分装到加玻璃珠的锥形瓶内,每瓶 90 mL,121 $^{\circ}\text{C}$,20 min 高压蒸汽灭菌。

C.3.2.2 双倍料缓冲蛋白胨水(BP)

蛋白胨	20 g
氯化钠	10 g
磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	18 g
磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	3 g
蒸馏水	1 000 mL

制法:将上述成分溶解于蒸馏水中,调节 pH 7.2,分装到内有玻璃珠的锥形瓶中,每瓶 100 mL,121 $^{\circ}\text{C}$,15 min 高压蒸汽灭菌。

C.3.2.3 氯化镁孔雀绿增菌液(MM)

C.3.2.3.1 甲液

胰蛋白胨	5 g
氯化钠	8 g

磷酸二氢钾	1.6 g
蒸馏水	1 000 mL

制法:将上述成分溶于蒸馏水中,121 °C,15 min 高压蒸汽灭菌,为甲液。

C.3.2.3.2 乙液

氯化镁	40 g
蒸馏水	1 000 mL

制法:将上述成分溶于蒸馏水中,121 °C,15 min 高压蒸汽灭菌,为乙液。

C.3.2.3.3 丙液

孔雀石绿溶液(4 g/L)

制法:取甲液 90 mL,乙液 9 mL 和丙液 2.7 mL,以无菌操作混合即成氯化镁孔雀石绿增菌液(MM),分装无菌试管,每管 9 mL。

C.3.2.4 亚硫酸铋琼脂(BS)

蛋白胨	10 g
牛肉膏	5 g
葡萄糖	5 g
硫酸亚铁($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.3 g
磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	4 g
孔雀石绿	0.025 g
柠檬酸铋铵 $[\text{Bi}(\text{NH}_4)_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2\text{H}_2\text{O}]$	2 g
亚硫酸钠(Na_2SO_3)	6 g
琼脂	18 g~20 g
蒸馏水	1 000 mL

制法:将上述前 5 种成分溶解于 300 mL 蒸馏水中,将柠檬酸铋铵和亚硫酸钠另用 50 mL 蒸馏水溶解。将琼脂于 600 mL 蒸馏水中煮沸溶解,冷却至 80 °C。将以上三液合并,补充蒸馏水至 1 000 mL,调至 pH 7.5,加入 5 mL 孔雀石绿溶液(5 g/L),摇匀。冷却至 50 °C~55 °C,倾注平皿备用,平板呈淡绿色。

注:此培养基不需高压灭菌,制备过程不宜过分加热,以免降低其选择性,应在临用前 1 d 制备,贮存于室温暗处,超过 48 h 不宜使用。

C.3.2.5 SS 琼脂

C.3.2.5.1 基础培养基

牛肉膏	5 g
胨胨	5 g
胆盐(三号)	3.5 g
琼脂	17 g
蒸馏水	1 000 mL

制法:将牛肉膏、胨胨和胆盐溶解于 400 mL 蒸馏水中,将琼脂加入于 600 mL 蒸馏水中,煮沸使其溶解,再将两液混合,121 °C,15 min 高压蒸汽灭菌,备用。

C.3.2.5.2 完全培养基

基础培养基	1 000 mL
乳糖	10 g
柠檬酸钠($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	8.5 g
硫代硫酸钠($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	8.5 g
柠檬酸铁溶液($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (100 g/L)	10 mL
中性红溶液(10 g/L)	2.5 mL
孔雀石绿溶液(1 g/L)	0.33 mL

制法:加热溶化基础培养基,按比例加入上述染料以外的各成分,充分混匀,调至 pH 7.0,加入中性红和孔雀石绿溶液,混匀后倾注平板。

注:制好的培养基宜当日使用,或保存于冰箱内于 48 h 内使用。孔雀石绿溶液配好后应在 10 d 以内使用。

C.3.2.6 三糖铁琼脂(TSI)

蛋白胨	20 g
牛肉膏	5 g
乳糖	10 g
蔗糖	10 g
葡萄糖	1 g
氯化钠	5 g
硫酸亚铁铵 $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot \text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$	0.2 g
硫代硫酸钠($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.2 g
琼脂	12 g
酚红	0.025 g
蒸馏水	1 000 mL

制法:将上述除琼脂和酚红以外的各成分溶解于蒸馏水中,调至 pH 7.4。加入琼脂,加热煮沸溶化。加入 5 mL 酚红(5 g/L)摇匀,分装试管,115 °C,20 min 高压蒸汽灭菌。放置高层斜面备用。

C.3.3 革兰氏染色

C.3.3.1 革兰氏染液

C.3.3.1.1 结晶紫染液

结晶紫	1 g
乙醇 $[\varphi(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH})=95\%]$	20 mL
草酸铵 $[(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4]$ 溶液(10 g/L)	80 mL

制法:将结晶紫溶解于乙醇中,与草酸铵染液混合。

C.3.3.1.2 革兰氏碘液

碘片	1 g
碘化钾	2 g
蒸馏水	300 mL

制法:在碘化钾中加入少许蒸馏水溶解后,加入碘片充分振摇,再补足蒸馏水至 300 mL。

C.3.3.1.3 脱色剂

乙醇[$\varphi(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH})=95\%$]

C.3.3.1.4 沙黄复染液

沙黄 0.25 g

乙醇[$\varphi(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH})=95\%$] 10 mL

蒸馏水 90 mL

制法:将沙黄溶解于乙醇中,待完全溶解后加入蒸馏水。

C.3.3.2 染色法

将 18 h~24 h 的培养物涂片。

将涂片在火焰上固定,滴加结晶紫染色液,染 1 min,水洗。

滴加革兰氏碘液,作用 1 min,水洗。

滴加脱色剂,摇动玻片,直至无紫色脱落为止,约 30 s,水洗。

滴加复染剂,复染 1 min,水洗,待干,镜检。

C.3.4 沙门氏菌属因子诊断血清

C.4 检验步骤

C.4.1 样品采集、制备

C.4.1.1 样品采集

C.4.1.1.1 粪便样品采集:用无菌铲(勺)采集粪便样品,在 5 个以上的采样点共采取约 500 g,置无菌广口瓶内备检。

C.4.1.1.2 堆肥样品采集:堆肥的表层(距表面 10 cm 以上)和中层断面各采集三点,用无菌镊子拣出样品中石块、木屑、玻璃等块状物,充分混合后取约 500 g。

C.4.1.1.3 粪稀样品采集:用无菌采样器、蠕动泵等,在三格化粪池、双瓮池、沼气池相应部位,采集贮粪池、沼气池内样品,样品量约 500 mL,置无菌广口瓶内备检。

C.4.1.2 样品制备

C.4.1.2.1 固态样品:将样品置于无菌瓷盘内,充分混匀称取 10 g 样品,放入带有玻璃珠的无菌锥形瓶内,加入 90 mL 生理盐水(8.5 g/L),混摇 3 min~5 min,制成混悬液。

C.4.1.2.2 粪稀等样品,取混摇均匀的粪稀 10 g 或粪稀液 10 mL,置于带有玻璃珠的无菌锥形瓶内,加入 90 mL 生理盐水(8.5 g/L),混摇 3 min~5 min,制成混悬液。

C.4.2 前增菌

以无菌操作,取制备的混悬液 10 mL 接种到 90 mL 缓冲蛋白胨水(BP)中,混匀,置(36±1)°C 培养(18±2)h。

C.4.3 选择性增菌

用无菌吸管吸取 1 mL 增菌液加入到 9 mL 氯化镁孔雀绿增菌液(MM)中,置(44±0.5)°C 培养 24 h~48 h。

C.4.4 分离

用接种环分别取选择性增菌液 1 环,划线接种于一个亚硫酸铋琼脂平板(BS)和一个 SS 琼脂平板,于(36±1)℃培养 24 h~48 h,观察各个平板上生长的菌落。沙门氏菌在亚硫酸铋琼脂平板上的菌落特征为,产 H₂S 菌落为棕褐色或灰色至黑色,有时有金属光泽,周围培养基呈棕色或黑色,不产 H₂S 菌株呈灰绿色,周围培养基不变或微变暗;沙门氏菌在 SS 琼脂平板上的菌落特征为,无色半透明;产 H₂S 菌株菌落中心带程度不同的黑色;乳糖阳性菌株为粉红色中心黑色。若各选择性平板上无可疑菌落生长,可直接报告未检出沙门氏菌。

C.4.5 生化试验

自选择性琼脂平板上用接种针直接挑取可疑菌落,分别接种三糖铁琼脂斜面上,尽可能多的选择可疑菌落,少于 5 个菌落的平板,应全部挑取。置(36±1)℃培养 24 h~48 h,观察结果。在三糖铁琼脂上,凡生化反应特征符合斜面为红色、高层变黄,少量或中等程度产气,产或不产 H₂S 者,应继续进行血清学鉴定实验,全部变黄或仍为红色者弃之。

C.4.6 革兰氏染色

取三糖铁琼脂可疑阳性的斜面菌苔,涂片进行革兰氏染色,显微镜下镜检应为革兰氏阴性短杆菌。

C.4.7 血清学鉴定

用沙门氏菌因子血清做玻片凝集试验,同时用生理盐水做对照。

C.5 结果报告

C.5.1 综合上述生化试验和血清学鉴定的结果,符合沙门氏菌属特征的确证检出沙门氏菌,并报告为“检出沙门氏菌”。

C.5.2 各选择性平板上无可疑菌落生长,或检出可疑菌落而生化试验和血清学鉴定不符合者,报告“未检出沙门氏菌”。

附录 D
(规范性附录)
堆肥、粪稀中粪大肠菌群检测法

D.1 适用范围

适用于堆肥、粪稀中粪大肠菌群测定。

D.2 温度要求

粪大肠菌群系指一群需氧和兼性厌氧,在 44.5 °C 生长,发酵乳糖并在 24 h~48 h 内产酸产气的革兰氏阴性无芽孢杆菌。依粪大肠菌值,评价粪便无害化处理效果。

D.3 设备和材料**D.3.1 设备**

恒温培养箱:(36±1)°C、(44±0.5)°C、高压蒸汽灭菌器、显微镜、冰箱 4 °C、接种环、电磁炉、锥形瓶、试管、小倒管、pH 计或精密 pH 试纸、温度计、灭菌吸管(10 mL、1 mL)、灭菌平皿[直径(*d*) 90 mm]、载玻片、接种环。

D.3.2 培养基和试剂**D.3.2.1 乳糖胆盐培养基****D.3.2.1.1 成分:**

a) 蛋白胨	20 g
b) 猪胆盐(或牛、羊胆盐)	5 g
c) 乳糖	10 g
d) 溴甲酚紫水溶液(4 g/L)	2.5 mL
e) 蒸馏水	1 000 mL

D.3.2.1.2 制法:将 a)~c)加入蒸馏水中溶解,调 pH 到 7.2~7.4,加 d),混匀,分装至带有小发酵倒管的试管内,每管 10 mL。115 °C,20 min 灭菌。如需要二倍浓缩培养基,将上述成分 a)~d)的用量加倍,蒸馏水量不变,配制即成。复发酵用乳糖发酵管,减除上述培养基成分中的胆盐即可。

D.3.2.2 品红亚硫酸钠培养基**D.3.2.2.1 成分:**

a) 蛋白胨	10 g
b) 酵母浸膏	5 g
c) 牛肉膏	5 g
d) 磷酸氢二钾(K ₂ HPO ₄)	3.5 g
e) 乳糖	10 g
f) 亚硫酸钠(Na ₂ SO ₃)	5 g

g) 琼脂	15 g~20 g
h) 碱性品红乙醇溶液(50 g/L)	20 mL
i) 蒸馏水	1 000 mL

D.3.2.2.2 制法

D.3.2.2.2.1 将琼脂加入到 500 mL 蒸馏水中,煮沸溶解,于另 500 mL 蒸馏水中加入 a)~d),加热溶解后与已溶解的琼脂混匀,调 pH 为 7.2~7.4,加入乳糖,分装,115 °C,20 min 高压蒸汽灭菌。即成基础培养基,储存于冰箱 4 °C 备用。

D.3.2.2.2.2 将亚硫酸钠用少许无菌蒸馏水溶解,沸水浴中煮沸 10 min,用灭菌吸管滴加上述碱性品红乙醇溶液,至淡粉红色。将此混合液加入上述基础培养基中,充分混匀,倾注灭菌平皿。不能及时使用可置冰箱 4 °C 避光保存备用,但不宜超过两周,如培养基成为深红色,则不能应用。

D.3.2.3 伊红美蓝(EMB)琼脂

D.3.2.3.1 成分

蛋白胨	10 g
乳糖	10 g
磷酸氢二钾(K ₂ HPO ₄)	2 g
琼脂	20 g
伊红溶液(20 g/L)	20 mL
美蓝溶液(5 g/L)	13 mL
蒸馏水	1 000 mL

D.3.2.3.2 制法

将琼脂加到 500 mL 蒸馏水中加热溶解,另取适量蒸馏水加入磷酸氢二钾、蛋白胨,混匀溶解,两液混合,补充蒸馏水至 1 000 mL,校正 pH 为 7.2~7.4,分装于锥形瓶内,121 °C,15 min 灭菌备用。用前融化琼脂并加入乳糖,混匀冷至 50 °C~55 °C,无菌操作加入灭菌的伊红美蓝溶液,摇匀倾注平皿备用。

品红亚硫酸钠培养基与伊红美蓝(EMB)琼脂可任选其中一种。

D.3.2.4 革兰氏染色

同附录 C.4.6。

D.3.2.5 样品稀释液

氯化钠	8.5 g
蒸馏水	1 000 mL

制法:将上述成分溶解于蒸馏水中,分装到加玻璃珠的锥形瓶内,每瓶 90 mL,或按需要分装到试管中,121 °C,20 min 高压蒸汽灭菌。

D.4 操作步骤

D.4.1 样品采集、制备

同附录 C.4.1.1。

D.4.2 样品接种

D.4.2.1 根据样品污染程度决定稀释度,避免样品接种结果均呈阳性或阴性。用无菌吸管吸取1:10样品混悬液1 mL加到含有9 mL灭菌生理盐水的试管中,制成1:100稀释液,由1:100稀释液管中用无菌吸管吸取1 mL加到含有9 mL灭菌生理盐水的试管中,制成1:1 000稀释液,按同法依次稀释,制成1:10 000、1:100 000等梯度稀释液。

D.4.2.2 初发酵试验:分别用1 mL灭菌吸管吸取1:10、1:100、1:1 000、1:10 000等稀释液各1 mL,分别接种于乳糖胆盐发酵管内,置(44±0.5)℃培养箱中培养24 h(接种量为10 mL时,可用与接种量相等的双料乳糖胆盐发酵管)。

D.4.2.3 分离培养:将经培养24 h后,产酸产气或只产酸的发酵管,用接种环分别取发酵液,划线接种于碱性品红亚硫酸钠琼脂或伊红美蓝琼脂平板,置(36±1)℃培养24 h。

D.4.2.4 染色镜检:用接种环挑取所使用培养基上生长的粪大肠菌可疑菌落的一小部分,进行革兰氏染色,镜检。

D.4.2.5 复发酵试验:经革兰氏染色,镜检为革兰氏阴性无芽孢杆菌,挑取该可疑菌落的另一部分接种乳糖发酵管,置(44±0.5)℃培养箱中培养24 h,如产酸产气,即证实有粪大肠菌群存在。

D.5 结果报告

D.5.1 根据证实为粪大肠菌群的阳性发酵管数,查表D.1粪大肠菌值表,报告样品粪大肠菌值/g(或mL)。

D.5.2 由于表D.1是按一定的四个10倍浓度差接种量设计的(粪稀接种量为10 mL、1 mL、0.1 mL和0.01 mL,粪便污泥接种量为1 g、0.1 g、0.01 g和0.001 g),当采用其他四个10倍浓度差接种量时,需要修正表D.1中值,具体方法如下:

D.5.3 表内所列粪稀(粪便污泥)最大接种量增加或减少10倍时,表D.1的粪大肠菌值相应增加或减少10倍。如粪稀接种量改为10 mL、1 mL、0.1 mL和0.01 mL,表D.1的粪大肠菌值相应增加10倍。其他的四个10倍浓度差接种量的粪大肠菌值相应类推。

表 D.1 粪大肠菌值表

样品接种量/g(或 mL)				菌 值
10	1	0.1	0.01	
—	—	—	—	>11.1
—	—	—	+	11.1
—	—	+	—	11.1
—	+	—	—	10.5
—	—	+	+	5.6
—	+	—	+	5.3
—	+	+	—	4.6
+	—	—	—	4.3
—	+	+	+	3.6
+	—	+	+	1.1

表 D.1 (续)

样品接种量/g(或 mL)				菌 值
10	1	0.1	0.01	
+	-	+	-	1.0
+	-	+	+	0.6
+	+	-	-	0.4
+	+	-	+	0.1
+	+	+	-	0.04
+	+	+	+	<0.04

注：-表示阴性发酵管。
+表示阳性发酵管。

附 录 E
(规范性附录)
蛔虫卵检查法

E.1 堆肥蛔虫卵的检查**E.1.1 饱和硝酸钠漂浮法****E.1.1.1 方法原理**

经碱性溶液处理使蛔虫卵从堆肥、粪便样品中分离,用饱和硝酸钠溶液将蛔虫卵漂浮,收集漂浮的蛔虫卵镜检,计数样品中的蛔虫卵个数。

E.1.1.2 设备与试剂

E.1.1.2.1 设备:离心机、电动振荡机、离心管(50 mL)、橡皮塞子、玻璃珠、金属丝圈、光学显微镜、铜筛(3 mm)、铜筛(2 mm)、滤器、漏斗、火棉胶滤膜、抽滤设备、瓷盘、镊子、眼科弯头小镊子

E.1.1.2.2 试剂:氢氧化钠溶液(50 g/L),饱和硝酸钠溶液。福尔马林溶液($\omega(\text{HCHO})=3\%$),盐酸溶液(30 g/L)。

E.1.1.3 检验步骤

E.1.1.3.1 样品采集:(同附录 C.4.1.1)。

E.1.1.3.2 样品预处理: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,收集过筛后的样品。备检样品量不少于 100 g。多含大量腐烂蔬叶、瓜果皮和草梗等纤维的堆肥样品,采用沉淀法。

E.1.1.3.3 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,另加玻璃珠约 10 粒,用适当大小的橡皮塞紧塞管口,置电动振荡机上,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,使蛔虫卵与堆肥分离。

E.1.1.3.4 漂浮虫卵:取下离心管,揭去橡皮塞子,用清水将附着在皮塞上和管口内壁的泥状物冲入管中,2 000 r/min~2 500 r/min 离心 3 min~5 min,倒去氢氧化钠溶液,加清水将沉淀物搅匀后,2 000 r/min~2 500 r/min 离心 3 min~5 min,倒去液体,加水漂洗,直到清洗透明为止。加入饱和硝酸钠溶液(密度 1.38 g/mL~1.40 g/mL),用玻璃棒搅成糊状后,徐徐添加饱和硝酸钠溶液,随加随搅,直加到离管口约 10 mm 处,用一两滴饱和硝酸钠溶液清洗玻棒并收集于管中,2000 r/min~2500 r/min 离心 3 min~5 min。

E.1.1.3.5 虫卵收集:

a) 捞取法:用直径 10 mm 的金属圈,将表层液膜移于盛有半杯清水的小烧杯中,约捞取 30 次后。重复虫卵分离、漂浮操作,适当增加一些饱和硝酸钠溶液,如此反复操作 3 次~4 次,直到液膜涂片未查见虫卵为止。

b) 黏贴法:在饱和硝酸钠溶液满至管口处,覆上 18 mm×18 mm 盖玻片。静置 15 min 后,取下盖玻片置于载玻片上镜检,反复 3 次,直到未查见虫卵为止。

E.1.1.3.6 抽滤:将烧杯中含卵液通过直径 35 mm 微孔火棉胶滤膜(孔径 0.65 μm ~0.80 μm)抽滤。一张滤膜不能滤过全部液体时,可另取滤膜过滤。

E. 1. 1. 3. 7 镜检:用眼科弯头镊子,将滤膜取下,平铺于 40 mm×75 mm 载物玻璃片上,滴加二、三滴 50%甘油溶液进行透明,低倍显微镜下镜检和计数。

E. 1. 1. 4 样品保存

待检堆肥样品,需滴加福尔马林溶液($\omega(\text{HCHO})=3\%$)或盐酸溶液(30 g/L)少许,加盖放置冰箱保存。

E. 1. 1. 5 结果报告方式

计数虫卵数 ≥ 150 个,并计算报告死亡率;检出蛔虫卵数小于 150 个,报告检出蛔虫卵总数与死、活虫卵个数。

E. 1. 2 沉淀法

E. 1. 2. 1 适用条件

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,采用沉淀法检测其蛔虫卵数。

E. 1. 2. 2 设备与试剂

E. 1. 2. 2. 1 设备:剪刀、锥形瓶、量杯(1 000 mL)、刻度量筒、橡胶塞、玻璃珠、光学显微镜、铜筛(3 mm)、铜筛(2 mm)、载玻片。

E. 1. 2. 2. 2 试剂:氢氧化钠溶液(50 g/L),饱和硝酸钠溶液。

E. 1. 2. 3 检验步骤

E. 1. 2. 3. 1 样品采集(同 C. 4. 1. 1)。

E. 1. 2. 3. 2 样品预处理:样品用剪刀剪小,清水浸泡,继将洗液静置沉淀,而后收集 100 mL 沉淀物备检。

E. 1. 2. 3. 3 水洗:量取 50 mL~100 mL 堆肥或粪便的浸出沉淀物,放在 500 mL 锥形瓶中,加入 100 mL~150 mL 氢氧化钠溶液(50 g/L)和三四十粒玻璃珠,塞以橡皮塞。浸泡 30 min 后,振摇 3 min~4 min,将上面的液体,倒入大烧杯中,再加等量清水于锥形瓶中,清洗 3~4 次,直到洗出液透明为止。

E. 1. 2. 3. 4 过滤:将收集的洗液,用 1~2 层纱布过滤于 1 000 mL 量杯中,静置 0.5 h~1 h 后,倒去上层液体,如此,约 30 min 换水一次,直至上层水澄清为止。

E. 1. 2. 3. 5 测定体积:用虹吸管吸去上层液体,将沉淀物倒入刻度量筒中,准确测量沉淀物的容积。

E. 1. 2. 3. 6 镜检:将沉淀物搅拌均匀,用 1 mL 吸管取 0.05 mL 和 0.1 mL 样品于载玻片,盖以盖玻片,在低倍镜下镜检并计数。

E. 1. 2. 4 结果报告

连续观察 3 次,取其平均数,计算 1 mL 沉淀物的虫卵数,最后乘以沉淀总容积数,便是 100 g 原始堆肥样品的虫卵数。样片中虫卵数 ≥ 150 个,应按死亡率报告;样片中虫卵数 ≤ 150 个,分别报告实际虫卵总数与死、活虫卵个数。

E. 2 粪稀蛔虫卵的检查

E. 2. 1 粪稀浓缩法

取出料口粪稀,样品量可达 5 000 mL,分别用 250 μm 铜筛过滤于量杯中,让其自然沉淀 1 h,倒去

上层液体,另换清水搅浑,静置沉淀,反复水洗沉淀,至沉渣上面的水接近澄清后,弃去上清液。将沉渣倒入 100 mL 量筒中,测量沉渣的容积。经充分搅拌后,用 1 mL 玻璃吸管,迅速吸取沉渣 0.1 mL 于载玻片上,盖以盖玻片镜检。

E.2.2 司氏法

E.2.2.1 将定量(质量或容积均可)的稠粪样品,稀释为定量的稀释液,经混合均匀后,从中再吸出一定量的稀释液,在显微镜下,计数其中含有的蛔虫卵。然后按稀释的倍数,计算出该稀释液中的卵数,最后换算成单位重量或容积原样品中含有的蛔虫卵数。

E.2.2.2 用一支 100 mL 硬质玻璃试管,在容水 45 mL 处作一标志或刻度。

E.2.2.3 称取 3 g 搅匀的粪稀样品,装入试管中,注入氢氧化钠溶液 [$c(\text{NaOH})=0.1 \text{ mol/L}$] 的至 45 mL 标志或刻度处,另加十余粒玻璃珠。

E.2.2.4 用橡皮塞子紧塞管口后,极力振摇,使成均匀的混合液为止。如样品中含有粪块,应放置过夜,使有足够的消化时间。

E.2.2.5 在计数前再把它摇匀。摇后速用 1 mL 刻度吸管,吸取混合液 0.15 mL 于大型载物片 (37 mm~75 mm) 上,盖以 22 mm×40 mm 的盖玻片(如缺大载物片,则将吸出的 0.15 mL 混合液分别滴于 2~3 张一般大小的载物片上,盖以 10 mm×18 mm 的盖玻片亦可)。

E.2.2.6 然后在低倍显微镜下数完 0.15 mL 混悬液中所有的蛔虫卵数,将所数得的卵数乘以 100,即为每克粪稀中所含有的蛔虫卵数。

如样品稍稀,不用玻璃试管,改用 100 mL 锥形瓶亦可,在容积 60 mL 处,刻一刻度,取混匀的粪稀样品 4 mL 于此刻度烧瓶中,注入氢氧化钠溶液 [$c(\text{NaOH})=0.1 \text{ mol/L}$],至 60 mL 刻度处,再放入十粒玻璃珠,用橡皮塞紧塞瓶口,极力振摇,直至混合液呈均匀状态为止。然后吸取 0.15 mL 混合液于载玻片上,盖以盖玻片,并在低倍镜下进行蛔虫卵计数,将所得的卵数乘 100,即是每毫升粪稀中所含有的蛔虫卵数。

附 录 F
(规范性附录)
粪稀钩虫卵检查法

F.1 直接检查法

适用于直接粪便中检查虫卵检查(参照附录 E)。

F.2 试管滤纸培养法

适用于通过培养钩虫幼虫的检查。

F.2.1 器材

试管[长 11.5 cm、内径(d)1.5 cm]、试管架、吸管、载玻片、盖玻片(20 mm×20 mm)、小镊子、显微镜、温箱、解剖镜或放大镜、滤纸条(将滤纸条对折用剪刀剪成宽度略大于试管直径,长度略短于试管的长条,通常大小约为 9.0 cm×1.6 cm,滤纸条要用剪刀剪,防止毛边)、竹签、旧报纸、橡皮筋。

F.2.2 检验步骤

F.2.2.1 在培养管上贴上标签并写上受检者的姓名和编号。

F.2.2.2 每管内加入冷开水约 2 mL。

F.2.2.3 将滤纸条沿长轴纵折,以保持挺直。

F.2.2.4 用吸管吸取粪稀或其沉淀物,涂抹于滤纸中段,左右各留 0.5 cm,上端留 1 cm,下端留约 2 cm 空白(面积约为 4 cm×1.3 cm)。

F.2.2.5 滤纸上面垫以吸水性强粗草纸,以便吸去多余的水分。将涂布粪稀或其沉淀物的滤纸插入管中,但不应该接触管底,滤纸条插入管中的深度,以水只接触滤纸而不碰到粪稀或其沉淀物为准。

F.2.2.6 将培养管置于 31 °C 温度中培养 4 d,或置于 26 °C~30 °C 温度中培养 6 d~8 d。以保证所有幼虫都有足够的时间发育到感染期幼虫。

F.2.2.7 分离幼虫:沿管壁加入 45 °C 温水,淹没滤纸上的粪便,1 h 后用镊子取出滤纸条,弃去。将培养管静置 1 h,用吸管吸去上清液,幼虫留于管底 0.5 mL 或更少的水内。

F.2.2.8 用放大镜(4 倍以上)或解剖镜以侧照法检查沉淀物内有无活的幼虫。如有活的幼虫,可先将管底部浸于 50 °C~60 °C 的热水内抑制活动。

F.2.2.9 吸取沉淀物 1~3 滴于载玻片上,将载玻片置于低倍镜下(10×10)检查,为使可折光的幼虫易于观察,检查时要尽量缩小光圈减弱光线,如需详细辨认幼虫,可加上盖玻片,在高倍镜下(40×10)检查,必要时可用目镜测微计测量幼虫。

表 F.1 钩虫、粪类圆线虫、东方毛圆线虫丝状蚴鉴别要点

特征	钩 虫	粪类圆线虫	东方毛圆线虫
蚴体长度	0.5 mm~0.7 mm	0.5 mm	0.75 mm
食道长度	1/5 体长	1/2 体长	1/4 体长
生殖原基	位于蚴体中部	位于蚴体后部	钝圆,有小球状
尾 端	尖细	分叉	—

附录 G
(规范性附录)
粪稀中血吸虫卵检查法

G.1 直接检查法

适用于粪便中血吸虫卵的检测(参照附录 E)。

G.2 尼龙袋集卵孵化法

适用于粪便中血吸虫卵数量较低时与粪稀中血吸虫卵的检测。

G.2.1 仪器

180 μm ~250 μm 尼龙袋、55 μm 尼龙袋、250 mL 锥形瓶、竹筷、尼龙袋支架、止血钳、水管、水桶、脱氯水等。

尼龙袋准备:

- a) 55 μm 锥形尼龙袋:取 55 μm 尼龙绢裁剪成扇形裁片,两边以聚胺酯粘合剂粘合。用 8 号铁丝弯成直径为 8 cm 的带柄圆圈,将尼龙袋的上口缝合到铁丝圆圈上。袋深约 20 cm,下端剪成直径约 1.5 cm 的开口;
- b) 180 μm ~250 μm 尼龙袋:取 180 μm ~250 μm 的尼龙绢裁剪成圆形,以 8 号铁丝弯成直径为 8 cm 的带柄圆圈,将尼龙袋的上口缝合到铁丝圆圈上,袋深约 5 cm。

G.2.2 检验步骤

G.2.2.1 水洗浓集

取混匀的粪稀 100 mL,如果出口很稀可以浓缩后取(取粪液出料口上层粪稀 3 000 mL~4 000 mL,下层粪稀 1 000 mL~2 000 mL,分别用 250 μm 铜筛过滤于 1~2 个 2 000 mL 量杯中,让其自然沉淀)100 mL。置于 250 μm 尼龙袋中,250 μm 尼龙袋置于下口夹有止血钳的 55 μm 尼龙袋口上;淋水冲洗,使粪液直接滤入 55 μm 尼龙袋中;然后移去 250 μm 尼龙袋,继续淋水冲洗 55 μm 锥形尼龙袋内粪渣,并用竹筷在袋外轻轻刮动助滤,直到滤出液变清;将锥形袋的下口置入锥形瓶口上,取下袋底下口的止血钳,将袋内沉渣冲洗入锥形瓶。

G.2.2.2 毛蚴孵化

将盛有粪便沉渣的锥形瓶加脱氯水至离瓶口 1 cm 处,放入孵化室(箱)孵化,最适宜的孵化温度为 26 $^{\circ}\text{C}$ ~30 $^{\circ}\text{C}$ 。

G.2.2.3 毛蚴观察

观察时烧瓶后衬以深色背景,每瓶观察时间不少于 2 min。观察时注意毛蚴与水中原生动物的区别(见表 G.1),必要时用毛细吸管吸出,在显微镜下鉴别。孵化阳性需经两人确认。观察时间随温度高低而不同。气温超出 30 $^{\circ}\text{C}$ 时,0.5 h~1 h 后观察第 1 次,4 h 后观察第 2 次,8 h 后观察第 3 次;气温在 26 $^{\circ}\text{C}$ ~30 $^{\circ}\text{C}$ 时,4 h、8 h 及 12 h 分别观察;气温在 20 $^{\circ}\text{C}$ ~25 $^{\circ}\text{C}$ 时,则可在 8 h 后观察第 1 次,12 h 后观

察第 2 次。

表 G.1 血吸虫毛蚴与水中原生动物的鉴别要点

特 征	血吸虫毛蚴	水中原生动物
形状	针尖大,大小一致稍带长形	大小不一,扁形或圆形
颜色	透明发亮,有折光	灰黄或灰白色,不透明,无折光
游动速度	游动迅速,来回不停匀速前进	游动缓慢,时游时停,游速不匀
游动方向	都为直线的斜向,横向,直向前进	多为曲线,无一定方向
游动方式	碰壁后折回,一般不在中途改变方向,折回后又直线匀速前进	呈间歇式,波浪式,螺旋式,跳板式和摇摆式
游动范围	多在水面下 1 cm~4 cm 处	范围广,水之上,中,下层都有

G.2.2.4 注意事项

G.2.2.4.1 孵化用自来水时,一般要将水过夜脱氯;急用时可在水中加入少量硫代硫酸钠(每 50 L 水中,加入硫代硫酸钠 0.2 g~0.4 g) 除氯 0.5 h 后使用。如用河水或井水,可将水加热至 60 °C 或经过滤,以除去水虫。

G.2.2.4.2 温度是促使虫卵孵化的必要条件,25 °C 左右最适宜。室温在 20 °C 以下或更低时,必须加温。

G.2.2.4.3 一切粪检用具每次用后都必须清洗干净,浸泡入 60 °C~80 °C 热水中杀死虫卵;尼龙袋正反面反复冲洗,浸泡入 80 °C 热水浸泡 2 min~3 min 杀卵,避免交叉污染。

G.2.2.4.4 残余的粪便、粪渣、粪水和沉渣等必须倒入指定的沉淀粪池中贮存或用药物杀卵,以防病原扩散。

G.2.2.4.5 尼龙绢袋使用过久,孔目变形或孔目破损者应及时更换,以免影响效果。

附 录 H
(规范性附录)
蠕虫卵死活鉴别方法

H.1 直接镜检法**H.1.1 适用范围**

适用于粪便样品蛔虫卵生活力试验与无害化效果评价。镜检并依据形态,以鉴别其死活。

H.1.2 形态鉴别要点**H.1.2.1 未受精蛔虫卵的形态:**

多为长椭圆形,有时呈三角形或不规则形,大小平均为 $(80\sim 98)\mu\text{m}\times(40\sim 60)\mu\text{m}$,一般为黄褐色,有时蛋白质壳发育不全,有时完全失去蛋白质壳,卵内经常充满大大小小油滴状的卵黄细胞。

H.1.2.2 受精蛔虫卵的形态:

活的受精蛔虫卵的形态:蛋白质壳为黄褐色,脱去蛋白质壳的为无色透明;平均大小为 $(50\sim 70)\mu\text{m}\times(40\sim 50)\mu\text{m}$;外层卵壳厚,内层壳薄,有屈光性,最外层的蛋白质壳也很厚,呈乳状或花纹状突起;卵内有一个球形的卵细胞,卵壳两端和卵细胞之间,有半月形的空隙,卵内的卵黄颗粒清晰而致密。

H.1.2.3 死受精蛔虫卵(变性卵)的形态:

- a) 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。
- b) 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。
- c) 卵细胞颗粒减少或消失。
- d) 卵细胞质浑浊,呈黑色或棕黑色。
- e) 卵细胞向不定部位呈球状收缩。
- f) 卵壳的一侧或两侧,一端或两端向内凹陷或破裂。
- g) 只有蛋白质壳,而缺内容物。

H.1.2.4 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。

H.1.2.5 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,也不改变其原来的状态。

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异物。

H.2 滤膜培养法**H.2.1 适用范围**

适用于观察粪便样品蛔虫卵发育过程试验与评价粪便无害化技术。

通过饱和硝酸钠溶液离心漂浮后收集在滤膜上的蛔虫卵,经过培养观察其发育、死亡状况并计数。

H. 2.2 操作步骤

H. 2.2.1 在直径 10 cm~12 cm 的玻璃平皿的底部平铺一层厚约 1 cm 的脱脂棉(或微孔塑料),脱脂棉上铺一张直径与平皿等大的普通滤纸。

H. 2.2.2 为防止霉菌和原生动物的繁殖,可加入甲醛溶液($\omega(\text{HCHO})=2\% \sim 3\%$)或甲醛生理盐水,以湿透滤纸和脱脂棉。

H. 2.2.3 把含卵滤膜平铺在皿中滤纸上加盖,并在皿盖上编号。一个平皿可同时放上几张滤膜,互不接触。

H. 2.2.4 把平皿放在 24 °C~26 °C 的恒温箱中培养一个月,培养过程中经常滴加清水或甲醛溶液($\omega(\text{HCHO})=2\% \sim 3\%$),使滤膜保持潮湿状态。

注:堆肥样品中的蛔虫卵,因受温度的影响,死卵的形态变化比较显著,往往培养不到一个月,即能明确判定为死卵,无需继续培养。

H. 2.2.5 培养一个月后自皿中取出滤膜置于载玻片上,滴加甘油溶液(500 g/L),使其透明后,在低倍镜下查找蛔虫卵,然后在高倍镜下,根据形态,鉴定蛔虫卵的死活,并加以计数。镜检时有时会感到视野的亮度和滤膜的透明度不够理想,则可在一张载物片上,滴一滴清水,另用一张盖玻片从滤膜上刮下少许含蛔虫卵滤渣,与水混合搅匀,盖上同一盖玻片进行镜检,或是在载玻片上滴 1~2 小滴“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,内部构造便于观察。凡含有幼虫的,都认为是活卵,其他阶段的或单细胞的,都判为是死卵。

H. 3 图谱

H. 3.1 蛔虫卵

H. 3.1.1 蛔虫卵发育各阶段图谱

图 H. 1 为受精卵,宽椭圆形,最外层为厚而呈乳头状突起的蛋白膜,壳呈棕黄色,卵细胞呈微细颗粒状淡黄色,尚处于单细胞阶段,发育初期。图 H. 2 为受精卵从单细胞发育至两个分裂球期。

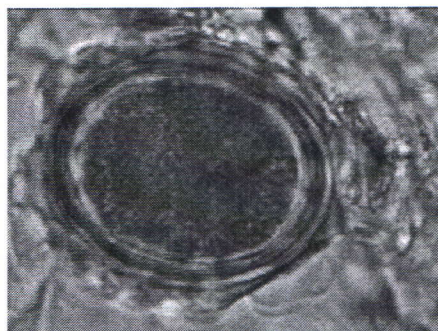


图 H. 1 受精卵 (400 倍)

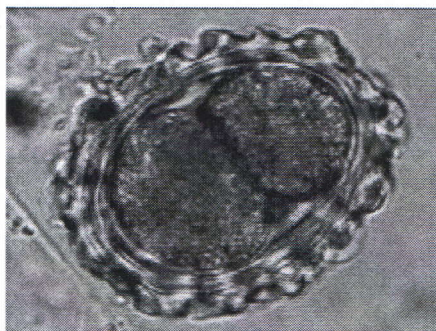


图 H. 2 两个分裂球期(400 倍)

图 H. 3 为受精卵从单细胞发育至四个细胞球期,外层具有显著的蛋白膜。图 H. 4 为受精卵从单细胞发育至多细胞球期,外层具有显著的蛋白膜。

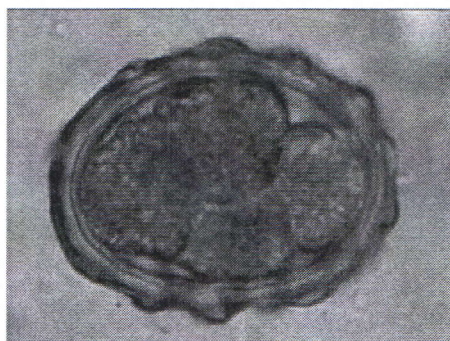


图 H. 3 四个分裂球期 (400 倍)



图 H. 4 多个分裂球期(400 倍)

图 H. 5 为受精卵从单细胞发育至桑葚期。图 H. 6 为受精卵从单细胞发育至原肠胚期,外层具有显著的蛋白膜。

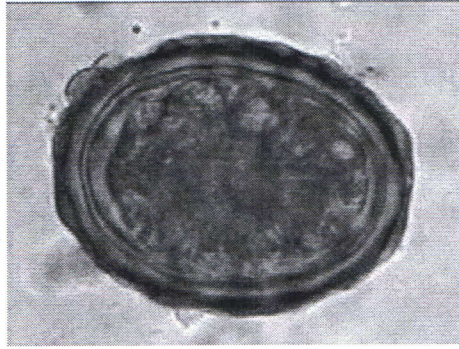


图 H. 5 桑葚期(400 倍)



图 H. 6 肠胚期(400 倍)

图 H. 7 为受精卵从单细胞发育至蝌蚪期。图 H. 8 为受精卵从单细胞发育至幼虫期,具有感染性。



图 H. 7 蝌蚪期(400 倍)



图 H. 8 感染期(400 倍)

H. 3. 1. 2 蛔虫卵死卵图谱

图 H. 9 为未受精卵,长椭圆形,外层蛋白膜有锯齿状突起,卵内含大小不等的屈光性圆形颗粒,比受精卵略长,在形态鉴别上判定为死蛔虫卵。图 H. 10 为死卵,卵黄颗粒变性,卵细胞萎缩,卵细胞靠向一边。



图 H. 9 未受精卵(400 倍)

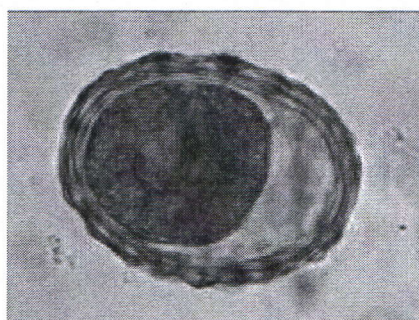


图 H. 10 卵细胞萎缩(400 倍)

图 H. 11 为死卵,卵黄颗粒变性,混浊,颜色为褐色。图 H. 12 为死卵,卵黄颗粒变性,混浊,外层蛋白膜不规则。

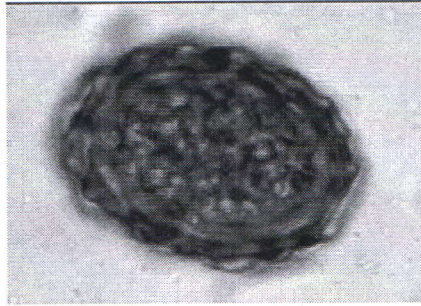


图 H. 11 卵细胞变性(400 倍)

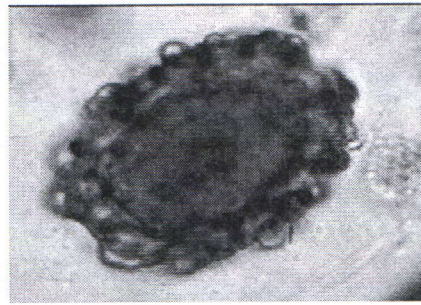


图 H. 12 卵细胞浑浊(400 倍)

图 H. 13 为死卵,卵黄颗粒变性,卵细胞形成空泡。图 H. 14 为死卵,卵黄颗粒变性,卵细胞溶解。

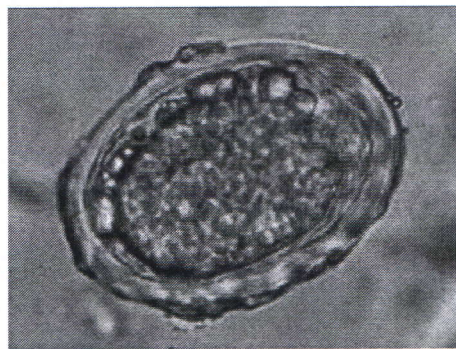


图 H. 13 卵细胞空泡(400 倍)

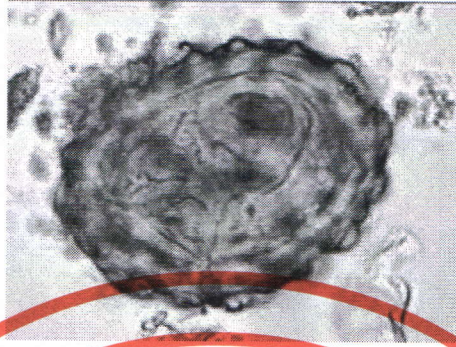


图 H. 14 卵细胞溶解(400 倍)

图 H. 15 为死卵,卵黄颗粒变性,卵细胞翘起。图 H. 16 为死卵,卵黄颗粒变性,卵细胞混浊,颜色变为褐黑色。

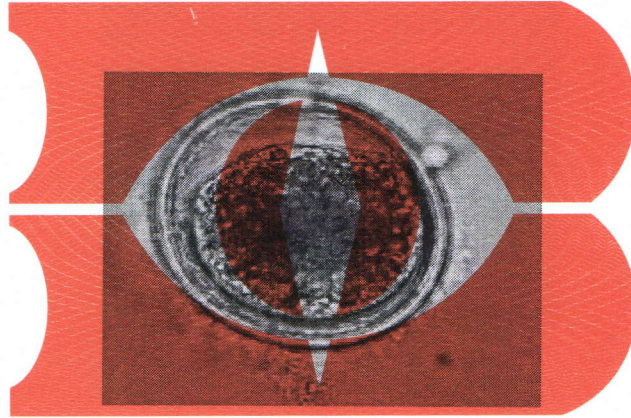


图 H. 15 卵细胞翘起(400 倍)

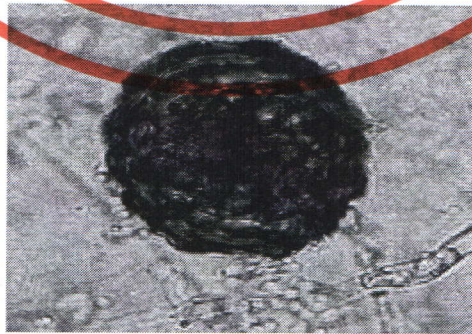


图 H. 16 卵细胞变褐色(400 倍)

H. 3. 2 血吸虫卵死活图谱

图 H. 17 为胚胎期卵,活卵。无卵盖,壳薄,侧突短小。图 H. 18 为成熟期卵,活卵。无卵盖,壳薄,

侧突短小,卵内含成熟毛蚅。



图 H. 17 胚胎期(400 倍)

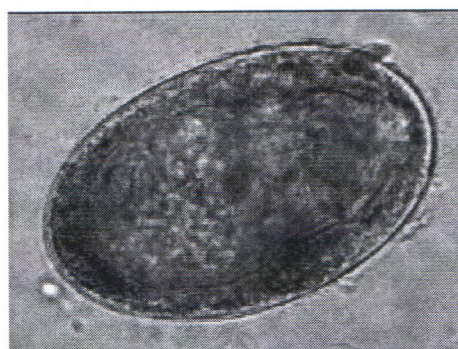


图 H. 18 含成熟毛蚅(400 倍)

图 H. 19 为变性死卵。卵细胞变性,颜色变为黑色,无卵盖,壳薄,侧突短小。图 H. 20 为空壳死卵,内无内容物。

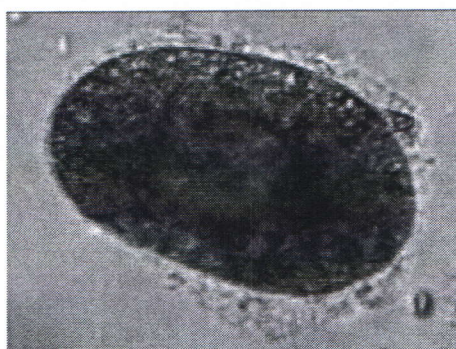


图 H. 19 变性卵(400 倍)

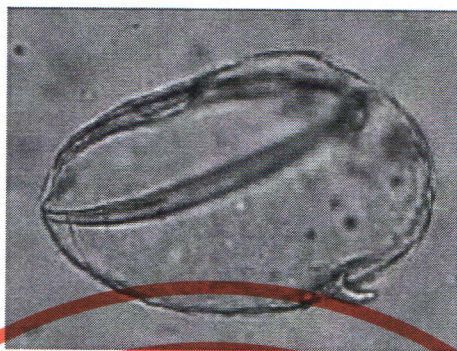


图 H. 20 空壳(400 倍)

H. 3.3 钩虫卵发育的各阶段图谱

图 H. 21 为多细胞球期 钩虫卵发育 8 个以上分裂球期,新鲜卵内含 4~16 个灰色颗粒状细胞,卵壳透明。图 H. 22 为发育至桑葚期,卵壳透明。



图 H. 21 多细胞球期 (400 倍)

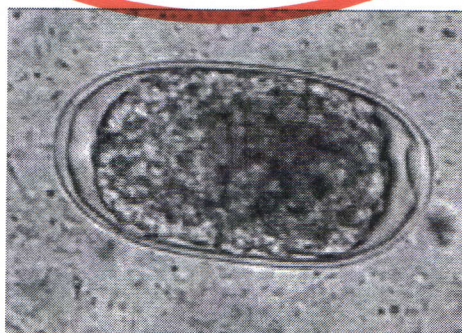


图 H. 22 桑葚期(400 倍)

图 H. 23 为发育至蝌蚪期,卵壳透明。图 H. 24 为发育至感染期,卵内形成 U 形幼虫,卵壳透明。

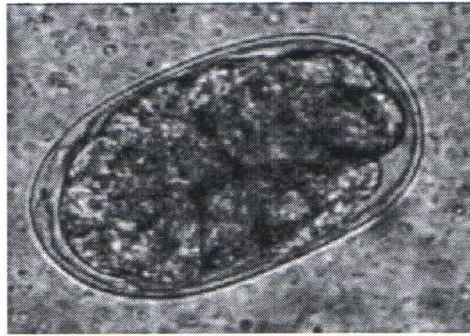


图 H. 23 蝌蚪期(400 倍)

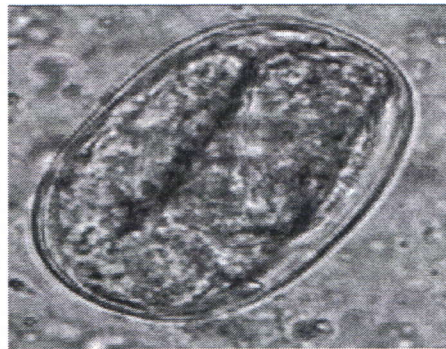


图 H. 24 感染期(400 倍)

H. 3.4 鞭虫卵发育的各阶段图谱

图 H. 25 为发育初期,腰鼓形,两端各有一个无色的塞状突起。图 H. 26 为发育至多细胞期,腰鼓形,两端有无色的塞状突起。

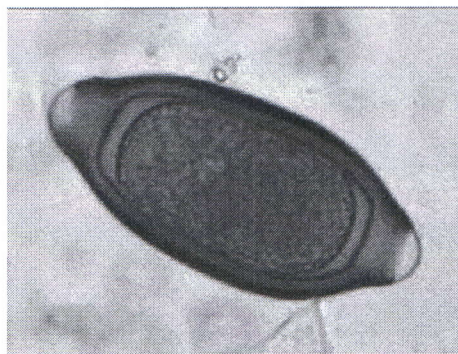


图 H. 25 发育初期(400 倍)



图 H. 26 多细胞期(400 倍)

图 H. 27 为发育至多细胞期,卵细胞颗粒清晰,两端有无色的塞状突起。图 H. 28 为发育至感染期,卵内形成虫形,两端有无色的塞状突起。



图 H. 27 多细胞期(400 倍)



图 H. 28 感染期(400 倍)

附录 I

(规范性附录)

蚊、蝇的密度监测方法

I.1 蚊的密度监测

I.1.1 厕屋内检测法

每个点选 4 个厕所,日落 1 h(或晚上亮灯之后),用电动捕蚊器,室内分别捕蚊 15 min,取下电动吸蚊器带有蚊部分,直接乙醚麻醉致死后,分拣蚊,计算捕蚊数目,填写记录表格。可以用电蚊拍代替电动吸蚊器。注意:捕蚊时间为日落 1 h(或晚上亮灯之后)。

人房、畜圈(牛棚、猪圈等)可以参照执行。

蚊密度(只数)为捕蚊数目总和(只数)。

I.1.2 厕所周围环境检测法

CO₂ 诱蚊灯悬室外,悬挂高度离地面约 1.5 m。灯布好后,于日落时开灯。次日日出时,先取下蚊笼(纱网),在笼上贴标记(日期、采集地点、灯的编号),然后关灯,收灯。将装蚊的蚊笼放入塑料袋内(切勿挤压),用乙醚麻醉后,做好标记,分拣蚊(或放置在通风阴凉且蚂蚁等昆虫爬不到的位置,送给专业人员分拣),填写记录表格,计算密度指数。

挂灯位置要远离二氧化碳源(厨房、火堆等)环境,避开强光源(路灯等夜间长明灯),周边 5 m 内没有大的遮挡物。

蚊密度(只数)为诱蚊灯捕获蚊总数(只数)。

I.1.3 目测法

每个点选 4 个厕所,日落后 1h,在采样场所,借助手电观察墙壁等部位,记录所看到的蚊数,一个场所(12 m²)观察 15 min。

蚊密度(只数)为观察蚊总数(只数)。

I.2 蝇密度监测

I.2.1 粘蝇条(纸)法

每个监测点选 10 个厕所,每个厕所分别悬挂 3 个粘蝇条,总计 30 个粘蝇条,24 h 后查看粘蝇条上的蝇数量,记录粘住蝇总数。

$$D = \frac{T}{t_p} \dots\dots\dots(I.1)$$

式中:

D —— 蝇密度,单位为只;

T —— 粘住蝇的总数,单位为只;

t_p —— 蝇条总数。

I.2.2 目测法

目测每个厕所内蝇数目,3 min 之内计数两遍,以数目较高者数字为准,除以厕所面积即为密度

指数。

观测时间为 10:00~16:00。

$$D = \frac{T}{M} \dots\dots\dots (I.2)$$

式中:

D ——蝇密度,单位为只;

T ——观察到的蝇数,单位为只;

M ——厕所面积,单位为平方米(m^2)。

I.3 蝇蛆密度

I.3.1 单位面积计算法

在蝇蛆孳生地划出 $1 m^2$ 的范围,摊平孳生物,拣出全部蝇蛆,为每平方米蝇蛆数。

I.3.2 捞杓计算法

于稀水粪坑内,用一定大小的长柄捞勺,每捞一杓计数一次,共捞杓 5 次,求平均数,为每杓蝇蛆数。
