



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 and 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。

GB18918 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

CJJ64 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 CJJ64 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 GB18918 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≥50 ℃,至少持续10 d 堆温≥60 ℃,至少持续5d
		机械	堆温≥50 ℃,至少持续2 d
2	蛔虫卵死亡率	≥95%	
3	粪大肠菌值	≥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	≥30 d
			兼性厌氧发酵	≥30 d
		工程型	常温厌氧消化	≥10 ℃ ≥20 d
			中温厌氧消化	35 ℃ ≥15 d
			高温厌氧消化	55 ℃ ≥8 d
2	蛔虫卵	常温、中温厌氧消化	沉降率	≥95%
		高温厌氧消化	死亡率	≥95%

表2(续)

编号	项 目	卫 生 要 求
3	血吸虫卵和钩虫卵 “	不得检出活卵
4	粪大肠菌值	中温、常温厌氧消化 $\geq 10^{-1}$ 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
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	$\geq 95\%$
31	血吸虫卵和钩虫卵	不得检出活卵
4	粪大肠菌值	$\geq 10^{-+}$
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*
		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	
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/T30 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10g，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)

$$w_{湿} = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_3} \times 100\% \dots\dots\dots(B.1)$$

式中：

w...——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)

$$w_p = \frac{m_1 - m_2}{m_2 - m_0} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (B. ?)$$

式中：

- w_p —— 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，是肠道传染性疾病流行时，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)℃、(44±0.5)℃、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	1000 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℃,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(Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O)	18 g
磷酸二氢钾(KH ₂ PO ₄)	3 g
蒸馏水	1000 mL

制法：将上述成分溶解于蒸馏水中，调节 pH7.2，分装到内有玻璃珠的锥形瓶中，每瓶100 mL, 121 ℃, 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	1000 mL

制法：将上述成分溶于蒸馏水中，121℃, 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	1000 mL

制法：将上述成分溶于蒸馏水中，121℃, 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	1000 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℃。将以上三液合并，补充蒸馏水至1000 mL, 调至pH7.5, 加入5 mL 孔雀石绿溶液(5 g/L), 摇匀。冷却至50℃~55℃, 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	5 g
胆盐(三号)	3.5 g
琼脂	17 g
蒸馏水	1000 mL

制法：将牛肉膏、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℃, 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	1000 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 pH7.0，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[(NH_4) ₂ SO ₄ ·FeSO ₄ ·6H ₂ 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	1000 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 pH7.4。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℃, 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[$\phi(\text{C}_2 \text{H}_5 \text{OH})=95\%$]	20 mL
草酸铵[(NH_4) ₂ C ₂ 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[g(C₂H₅OH)=95%]

C.3.3.1.4 沙黄复染液

沙黄	0.25 g
乙醇[g(C ₂ H ₅ 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~24h 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)℃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)℃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 H₂ S 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 H₂ S 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 H₂ S 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℃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)℃、(44±0.5)℃、高压蒸汽灭菌器、显微镜、冰箱4℃、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	1000 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℃,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	1000 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℃, 20 min 高压蒸汽灭菌。即成基础培养基，储存于冰箱4℃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℃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	1000 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1000 mL，校正pH 为7.2~7.4，分装于锥形瓶内，121℃, 15 min 灭菌备用。用前融化琼脂并加入乳糖，混匀冷至50℃~55℃，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	1000 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℃, 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1:1000稀释液，按同法依次稀释，制成1:10000、1:100000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、1:1000、1:10000 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、1mL、0.1 mL 和0.01 mL, 粪便污泥接种量为1g、0.1g、0.01g 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、1mL、0.1mL 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。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/758142045017006102>