

团 体 标 准

T/CSES 22—2021

水环境化学污染物复合污染生态风险评估 技术指南

Technical guidelines for ecological risk assessment of chemical combined
pollution in aquatic environment

2021-07-15 发布

2021-07-15 实施

目 次

前言	II
引言	III
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 评估原则和程序	3
5 评估启动	4
6 复合污染暴露水平表征	4
7 复合污染生物效应表征	5
8 复合污染风险水平表征	7
9 关键致毒物识别	8
10 不确定性分析	8
11 报告编制	9
附录 A (资料性) 原位被动采样 - 生物暴露联用评估方法	10
附录 B (资料性) 沉积物毒性鉴别评估方法	14
附录 C (资料性) 效应导向分析方法	20
附录 D (资料性) 证据权重法评估复合污染生态风险案例	24
参考文献	26

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由暨南大学和中国环境科学研究院提出。

本文件由中国环境科学学会归口。

本文件起草单位：暨南大学、中国环境科学研究院。

本文件主要起草人：游静、李慧珍、鲍恋君、裴媛媛、佟宇俊、刘佩佩、符志友、冯承莲。

引 言

随着我国人口增长和经济快速发展，多种传统及新兴化学品被使用并进入水环境，呈现典型的复合污染特征，亟需开展水环境化学污染物复合污染生态风险评估，识别关键致毒污染物。为贯彻《中华人民共和国环境保护法》、《中华人民共和国水污染防治法》和《水污染防治行动计划》，保障水生态健康，指导和规范水环境化学污染物复合污染生态风险评估工作，制定本文件。

水环境化学污染物复合污染生态风险评估技术指南

1 范围

本文件规定了水环境化学污染物复合污染生态风险评估的范围、一般性原则、评估程序、评估内容、评估方法和要求。

本文件适用于指导地表水水体和沉积物的复合污染生态风险评估。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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/T 29763 化学品 稀有鮎鲫急性毒性实验

HJ 536 水质 氨氮的测定 水杨酸分光光度法

HJ 831 淡水水生生物水质基准制定技术指南

EPA/600/R-07/080 沉积物毒性鉴别评估：I、II、III阶段的指导文件(Sediment Toxicity Identification Evaluation (TIE): Phases I, II, and III Guidance Document)

EPA/600/R-99/064 使用淡水无脊椎动物测量沉积物中污染物的毒性和生物累积的方法—第二版 (Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-Associated Contaminants With Freshwater Invertebrates—Second Edition)

EUR 20418 EN/2 风险评估技术指导文件第二部分 (Technical Guidance Document on Risk Assessment Part II)

OECD ENV/JM/MONO(2012)37 用于暴露评估的现有模型和工具的说明 (Descriptions of Existing Models and Tools Used for Exposure Assessment)

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

复合污染 combined pollution

多种类污染物在水环境介质中共存的污染现象。

3.2

水生态风险评估 aquatic ecological risk assessment

评估发生不良水生态效应可能性的程序，即在生态系统受一个或多个化学污染物影响后，对不良生态效应出现的概率予以评估。

注：本文件中“生态风险评估”是指狭义的生态风险评估，即仅考虑化学污染物对水生生物的影响。

3.3

生物累积 bioaccumulation

生物通过吸收、吸附、吞食等作用，从水环境中蓄积污染物的过程。

3.4

生物有效性 bioavailability

环境污染物质可进入生物体并被生物累积的部分。

3.5

原位生物暴露 in situ bioassay

将健康水生生物放置于野外水环境中进行现场暴露，探究水污染对生物的不良效应以及污染物在生物体内的累积量。

3.6

毒性终点 toxicological endpoint

化学污染物对水生生物产生的毒性效应的类型和方式。

3.7

毒性鉴别评估 toxicity identification evaluation; TIE

通过物理/化学处理改变水或沉积物样品中不同类型污染物的毒性潜力，结合生物测试和化学分析手段，识别样品中关键致毒物的技术。

3.8

效应导向分析 effect directed analysis; EDA

通过对水环境样品的有机萃取液反复进行分离与生物毒性测试，确定致毒组分，再利用化学分析识别关键致毒有机污染物的技术。

3.9

毒性单位 toxic unit; TU

复合污染环境样品中某污染物的环境浓度与其毒性阈值的比值。

3.10

环境暴露浓度 environmental exposure concentration; EEC

复合污染环境样品中某化学污染物的环境暴露浓度。

3.11

毒性阈值 threshold of toxicological concern; TTC

水环境中污染物暴露对水生生物产生不良效应的浓度（如半数致死浓度、预测无效应浓度）。

3.12

生物有效毒性单位 bioavailable toxic unit

复合污染环境样品中某污染物的生物有效浓度与其生物有效毒性阈值的比值。

4 评估原则和程序

4.1 评估原则

4.1.1 科学性

基于现有数据资料和科学手段，根据环境管理需求、评估目的、数据可及性和有效性，科学合理地制定评估目标和评估方案，开展评估分析，确保评估过程的系统性、完整性和评估结论的客观性。

4.1.2 透明性

评估过程中保持开放沟通，对整个评估过程进行系统记录，撰写清晰、完整、易于理解。应特别对评估目标、假设和分析不确定性及其处理方法进行描述与阐释。

4.1.3 时效性

基于可获得的最新科学证据，结合区域特征进行生态风险评估，并随着新的科学认识和科学证据的出现，对评估结果进行更新。

4.1.4 合理性

评估中使用普遍接受的科学知识、最新科学证据，在判断中使用常识，评估结果应合理。

4.2 评估程序

水环境化学污染物复合污染生态风险评估程序主要包括复合污染风险水平表征与关键致毒物识别两个步骤，评估程序见图1。

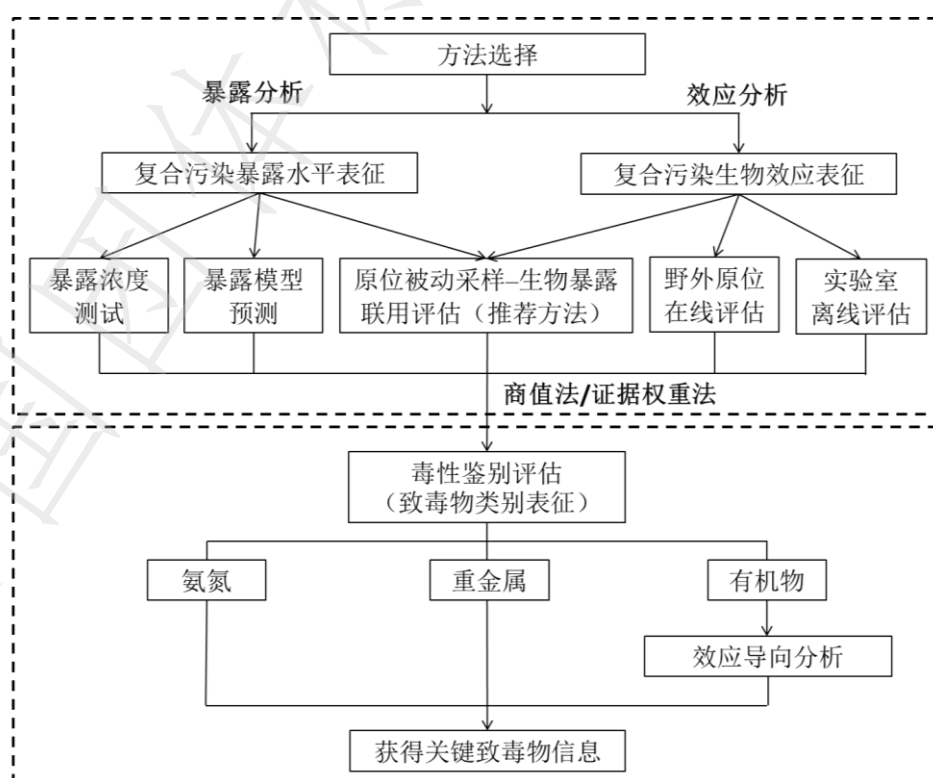


图1 水环境化学污染物复合污染生态风险评估程序

5 评估启动

5.1 确定评估目标

开展生态风险评估前，风险评估者应与风险管理者及其他相关方充分沟通，明确评估所要支撑的环境管理需求或需要解决的环境问题，确定评估目标。

5.2 确定评估对象和范围

通过与风险管理者及其他相关方的沟通、文献资料收集和分析、现场调研等，明确评估受试体系及范围，包括：

- a) 评估对象。根据评估目标，在生态系统或其组成部分（生物个体、种群或群落）选择评估对象，设定相应的能表征复合污染风险的评估终点和测试终点；
- b) 时间范围。综合分析评估对象的危害特征、暴露发生时间、受试生物生命阶段、暴露持续周期等，确定评估的时间范围；
- c) 空间范围。综合分析研究区域的水环境特征、复合污染物的环境行为、评估对象的暴露特征等，确定评估的空间范围。

5.3 确定评估类型

根据评估目标，考虑评估精度和时限要求、人员和经费投入、数据可及性，选择合适的评估方法。评估结果通常用数值表示风险的大小，并用高、中、低等描述性术语进行风险分级。

5.4 确定评估质控要求

充分调研研究区域水污染情况，明确暴露和效应分析、风险表征、污染物识别各过程的评估内容、研究方法和技术路线，制定质量控制和质量保证措施，形成评估方案。

5.5 确定评估方案

充分征求风险管理者及其他相关方的意见，确定评估方案。

6 复合污染暴露水平表征

6.1 工作内容

定性或定量分析复合污染暴露量，考虑暴露频率和周期等，获取评估对象（生物个体、种群或群落）经不同途径暴露于水环境复合污染物的暴露量。

6.2 工作程序

暴露分析首先根据研究区域水环境复合污染特征，以检出率高、潜在危害大等为原则，选择具有代表性的目标污染物。通过场景分析建立暴露模型预测暴露浓度，或采集环境样品测定暴露浓度。

在暴露模型预测中，基于暴露场景的条件和假设，结合前期调研中所选目标污染物的排放情况和环境行为，构建暴露模型，预测环境暴露浓度。根据评估目标，可进一步结合生物累积、生物放大、毒代动力学等模型，预测生物体内污染物浓度，提高暴露分析的精度。

在暴露浓度测试中，采集研究区域水和/或沉积物样品，测定目标污染物的环境浓度；也可采集生物样品，或开展考虑生物有效性的原位生物暴露分析，测定受试生物体内浓度。

6.3 技术要求

6.3.1 确定暴露场景

根据评估目标，通过场景分析和现场调查，确定研究区域水环境中目标污染物对水生态系统或其部分的暴露场景，包括污染来源、污染物的排放情况、暴露途径、暴露周期、暴露频率等条件和假设。暴露场景假设应具有合理性，暴露场景应包括最不利场景假设。

6.3.2 获取预测暴露浓度

基于研究区域水环境的暴露场景分析结果，根据评估目标，基于污染物排放、迁移、转化规律及相应的条件假设，选择合适的数学模型，构建暴露预测模型，获得预测环境暴露浓度，一般包括：

- a) 对于已有预测环境浓度（Predicted environmental concentration, PEC）或预测无效应浓度（Predicted no effect concentration, PNEC）等数据的化学物质，可直接获取其预测毒性单位；对于无 PEC 或 PNEC 的化学物质，可基于环境中的实测数据和模型计算进行推导，具体可参考 EUR 20418 EN/2；
- b) 获取环境实测浓度数据，可结合生物富集因子（Bioconcentration factor, BCF）或生物-沉积物累积因子（Biota-sediment accumulation factor, BSAF）等参数，推算环境介质其他相中污染物的浓度；
- c) 考虑污染物的生物有效性，可结合生物累积等模型，估算生物体内浓度，或可结合平衡分配理论，通过被动采样器上污染物浓度与生物体内积累量之间关系描述污染物的生物有效性；
- d) 其他已有的暴露评估中的模型工具可参考 OECD ENV/JM/MONO(2012)37。

6.3.3 获取实测暴露浓度

为更准确定性和定量获取研究区域污染物对受体的暴露量，可直接测试分析水环境样品（水、颗粒物、沉积物等环境介质样品，以及水生生物样品），检测其中目标污染物的浓度。不同介质中目标污染物的分析测试应按相关标准和技术规范的要求进行。污染物的环境暴露浓度一般可通过对环境介质的耗竭式萃取方法获取，或者采用被动采样等考虑生物有效性的仿生萃取技术确定；而污染物的生物体内浓度可通过萃取生物组织的方式确定。

6.3.4 结果表达

暴露评估的结果表达应包括：

- a) 暴露场景、暴露模型、分析测试方法的具体描述；
- b) 定性暴露评估，应说明暴露等级划分的标准和分级结果；
- c) 定量暴露评估，应根据区域分布特征设计采样布点，暴露量通常采用不同位点浓度的平均值和范围来表示；
- d) 暴露的结果表达可以为环境暴露浓度，也可以为生物体内浓度；
- e) 暴露分析中的局限性和不确定性需要明确说明。

7 复合污染生物效应表征

7.1 工作内容

在多类污染物共存的复合污染条件下，根据研究区域水污染特征，确定污染物暴露与受体（水生态系统或其组成部分）的生物效应之间的剂量-效应关系。

7.2 工作程序

7.2.1 获取不良效应信息

生物毒性表征首先根据研究区域水环境的生物分布特征以及前期调研目标污染物在不同环境介质中的分布特征，选择研究区域生态系统具有代表性的受体（可以为某类或几类代表性生物个体、种群、群落或者整个生态系统）。根据目标受体情况，选择合适的不良效应测试终点和测试方法，对环境样品进行毒性测试，或对所研究生态系统或其组成部分开展生物调查，获取研究区域水环境化学污染物的不良效应信息。

7.2.2 分析目标污染物的剂量-效应关系

检索国内外政府部门或国际组织发布的资料、国内外文献所报导的目标污染物对所选受体的剂量-效应关系函数，以及其他毒性参数，用于效应分析。若数据已发表且适用，可直接引用；若尚未正式发表或适用性不强，则需要与风险管理者及其他利益相关人员积极交流沟通，确定是否继续开展该目标污染物的效应分析。若无需继续，则终止其剂量-效应关系分析；若需继续，则选择合适的测试终点和测试方法，通过毒性测试获取剂量-效应数据。

对剂量-效应分析数据进行质量评价，若可以构建良好的“S”型剂量-效应曲线，则考虑建立剂量-效应模型，获得毒性阈值等参数；若不满足构建剂量-效应分析的要求，则应补充实验和/或调查数据。结合不同类型污染物的剂量-效应关系，建立复合污染毒性评估模型，预测复合污染物对受体的不良效应。

推荐使用可同时定量暴露和效应的原位被动采样-生物暴露联用评估方法（见附录A），建立原位剂量-效应关系。

7.3 技术要求

7.3.1 数据需求与评估

效应分析中所需的毒性数据包括生物调查数据、生物个体毒性测试数据、离体生物测试实验数据（如细胞毒性测试）、计算毒理学预测毒性数据等，优先使用生物调查数据和生物个体毒性测试数据。剂量-效应关系的测试数据应符合HJ 831规定的的数据要求。

在收集和使用文献发表的剂量-效应关系函数和毒性参数时，应详细了解测试受体情况、毒性测试条件、假设、模型方法、不确定性等信息，并核实效应分析结论的时效性、可靠性和适用性，必要时开展专家论证。

7.3.2 效应测试方法与模型

根据研究目标，选择测试受体、确定测试效应终点，开展效应测试。为确保效应分析的有效性，测试中应采用合适的平行样及对照组。

当采用离体生物测试结果进行剂量-效应分析时，通常需要结合离体-活体效应外推模型将其调整为受试活体生物等效量。对于不同生物体之间效应的差异，也可通过种间差异评估模型进行估算。

长期低剂量暴露具有更好的环境相关性，但是慢性毒性数据相对较少。在提出合理假设条件下，可建立相应模型，从急性毒性数据推导出慢性低剂量暴露下的效应分析数据信息。

7.3.3 结果表达

效应分析的结果表达应包括：

- a) 描述复合污染条件下测试受体、毒性终点及其确定依据；
- b) 描述目标污染物与受体生物效应之间的剂量-效应关系的测试方法和模型假设；
- c) 描述复合污染条件下，不同类型污染物引起的不良效应推导模型的假设；

d) 描述效应分析存在的局限和不确定性。

8 复合污染风险水平表征

8.1 工作内容

基于以上复合污染暴露水平表征与生物效应表征的数据信息，结合商值法或/和证据权重法对暴露和效应分析结果进行定性定量的综合评估，判断研究区域水环境采样位点的复合污染生态风险大小。

8.2 工作程序

暴露分析可获取污染物的暴露量，效应分析可根据选取的测试终点（如存活率、生物标志物等指标）获取毒性数据，复合污染风险水平表征结合二者综合评估，具体表征流程如下：

- a) 通过暴露浓度和毒性阈值计算毒性单位，利用商值法进行风险初级评估；
- b) 将生物效应转化成无量纲的数值（如生物存活数量转换成存活率、生物标志物响应转换成综合生物标志物响应指数），进行效应评估；
- c) 通过专家讨论，对暴露和效应等多证据链的权重进行赋值，计算各证据链的权重总分，综合评估水生态风险。

8.3 技术要求

8.3.1 数据收集

从研究对象、研究类型、暴露情景、剂量水平、效应终点等方面确定文献收集的标准，筛选用于风险评估的文献，并详细记录文献筛选的过程。

- a) 优先采用国内外政府部门或国际组织发布的文件资料中目标污染物的毒性数据；
- b) 优先采用国内外广泛认可的毒性数据库中的毒性阈值数据；
- c) 优先采用国内外标准测试方法以及行业技术标准获取的数据；
- d) 优先采用经同行评审的文献数据，对于未经同行评审的文献数据，经质量评价认可后方可采用。

8.3.2 商值法

风险表征通常采用商值法，结合环境暴露浓度进行初级评估，计算目标污染物的毒性单位，对生态风险进行定量评估，见公式（1）。一般采用高风险（ $TU > 10$ ）、中风险（ $0.1 < TU \leq 10$ ）、低风险（ $TU \leq 0.1$ ），对风险进行分级。

$$TU = \frac{EEC}{TTC} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

- TU —— 毒性单位；
 EEC —— 环境暴露浓度；
 TTC —— 毒性阈值。

若采用生物有效浓度（ EEC_b ）和生物有效毒性阈值（ TTC_b ），可计算生物有效毒性单位（Bioavailable toxic unit, TU_b ），见公式（2）。

$$TU_b = \frac{EEC_b}{TTC_b} \dots\dots\dots (2)$$

不同污染物的联合毒性效应，以浓度加和的形式进行计算，见公式（3）。

$$\sum TU = \sum_{i=1}^n TU_i \dots\dots\dots (3)$$

8.3.3 证据权重法

8.3.3.1 赋值法

赋值法对不同证据链赋予合适的权重，对证据链的定量化可显著降低风险评估的复杂性，结果简单明了，利于有关部门的管理与应用，提供综合评估的结果。

8.3.3.2 最佳专业判断法

最佳专业判断法综合专业人员的判断与理解，针对研究区域水环境污染特征，进行定性评估；可结合定量化的赋值法获得具有较强可操作性、透明性、重现性、一致性的评估结果。利用证据权重法综合评估水环境复合污染生态风险案例可参照附录D。

8.4 结果表达

基于商值法或/和证据权重法的评估结果，对不同区域进行复合污染风险分级，识别高风险区域。

9 关键致毒物识别

9.1 工作内容

基于复合污染生态风险评估结果，在高风险区域开展毒性识别工作，获得关键致毒物信息。

9.2 工作程序

关键致毒物识别通常通过毒性鉴别评估（见附录B）或/和效应导向分析（见附录C）进行，其主要步骤如下：

- a) 采集高风险区域环境样品，开展毒性鉴别评估工作，有效识别主要致毒污染物种类。对于关键致毒物是氨氮或重金属的样品，进一步分析其中的氨氮或重金属浓度；
- b) 对于关键致毒物是有机污染物的样品，进一步开展效应导向分析，在筛查目标化合物的基础上，可开展非目标化合物筛查的工作，确定关键致毒有机污染物。

9.3 技术要求

9.3.1 生物有效性

在关键致毒物识别的工作中，考虑环境样品中不同类型污染物的生物有效性，能够有效降低误判致毒物的可能性。

9.3.2 关键致毒物分析

对于关键致毒重金属的定量分析，通常采用电感耦合等离子体-质谱联用技术进行；对于关键致毒有机污染物的定量分析，通常采用气相色谱-质谱或/和液相色谱-质谱联用技术进行（见附录B）。有机污染物的筛查包括对目标化合物、数据库中可疑化合物和非目标未知物的筛查（见附录C）。

10 不确定性分析

不确定性的来源包括定性描述研究问题、暴露表征、效应表征、风险表征和关键致毒物识别过程中的不确定性：

- a) 暴露表征：采样位点的代表性、污染物的生物有效性差异、样品分析测试的质量控制与质量保证等；
- b) 效应表征：受试物种的代表性、生物敏感性差异、毒性数据推算方法的合理性等；
- c) 风险表征：毒性数据筛选的代表性、证据权重赋值的合理性等；
- d) 关键致毒物识别：毒性终点的代表性、致毒物筛查方法的全面性等。

不确定性的定量分析可通过蒙特卡罗法（Monte Carlo）等方法进行。

11 报告编制

报告由评估方案（包括评估目的、评估范围、评估内容、评估方法、工作程序、质量控制等）、复合污染暴露水平表征、复合污染生物效应表征、复合污染风险表征、关键致毒物识别、不确定性分析组成。复合污染暴露水平表征、复合污染生物效应表征、复合污染风险表征等应满足结果表达的基本要求。

附 录 A
(资料性)
原位被动采样-生物暴露联用评估方法

A.1 原位被动采样-生物暴露联用装置

A.1.1 简介

原位被动采样-生物暴露联用装置将被动采样器和生物暴露装置进行联用，通过该装置不但可以获得水体和沉积物中污染物的浓度水平，估算污染物的生物体内浓度，还可以同步获得受试生物在原位暴露下的毒性效应，结合暴露和效应信息有效构建水环境化学污染物复合污染生态风险评估技术体系。

A.1.2 技术原理

A.1.2.1 被动采样器的技术原理

污染物主要以自由溶解态的形式进入生物体，通过体内迁移到达作用靶位，产生毒性效应。自由溶解态的污染物被认为是生物有效部分。因此，环境介质中的生物有效浓度并非总浓度，却决定了污染物对生物体的毒性效应。被动采样技术是利用目标物在环境介质与吸附相之间的逸度差，基于分子扩散或渗透原理将目标物富集在吸附相上，从而获得在上层水体或沉积物孔隙水中自由溶解态有机污染物的浓度，由此评估水环境中有机污染物的暴露风险。本文件涉及三种不同的被动采样装置，包括开放式水体被动采样器、多段式沉积物孔隙水被动采样器及沉积物-水界面通量被动采样器。

A.1.2.2 原位生物暴露装置的技术原理

原位生物暴露装置设计的基本要求是将受试生物限制在研究位点，但又不影响其正常活动，而且需要满足受试生物和暴露环境介质的充分接触。在此要求下，原位生物暴露装置一般设计为网筐状，所用材质要求无毒无害、物理化学性质稳定，可以耐受目标区域环境参数的波动。对于受试生物来说，由于活动范围被限制在暴露装置内，溶解氧和营养物质的获取需要依赖暴露装置内外的水流交换，网筐孔径大小的选择需防止生物逃逸，同时需避免藻类等导致的生物淤积。对于开展慢性暴露但无法获取足够营养物质的受试生物，需加装食物投喂装置，避免因营养不足对生物造成不良效应。

A.1.2.3 装置设计说明

原位被动采样-生物暴露联用装置包括以下五个部分：

- a) 开放式水体被动采样器；
- b) 多段式沉积物孔隙水被动采样器；
- c) 沉积物-水界面通量被动采样器；
- d) 水生生物暴露装置；
- e) 底表和底栖生物暴露装置。

示意图见图A.1。

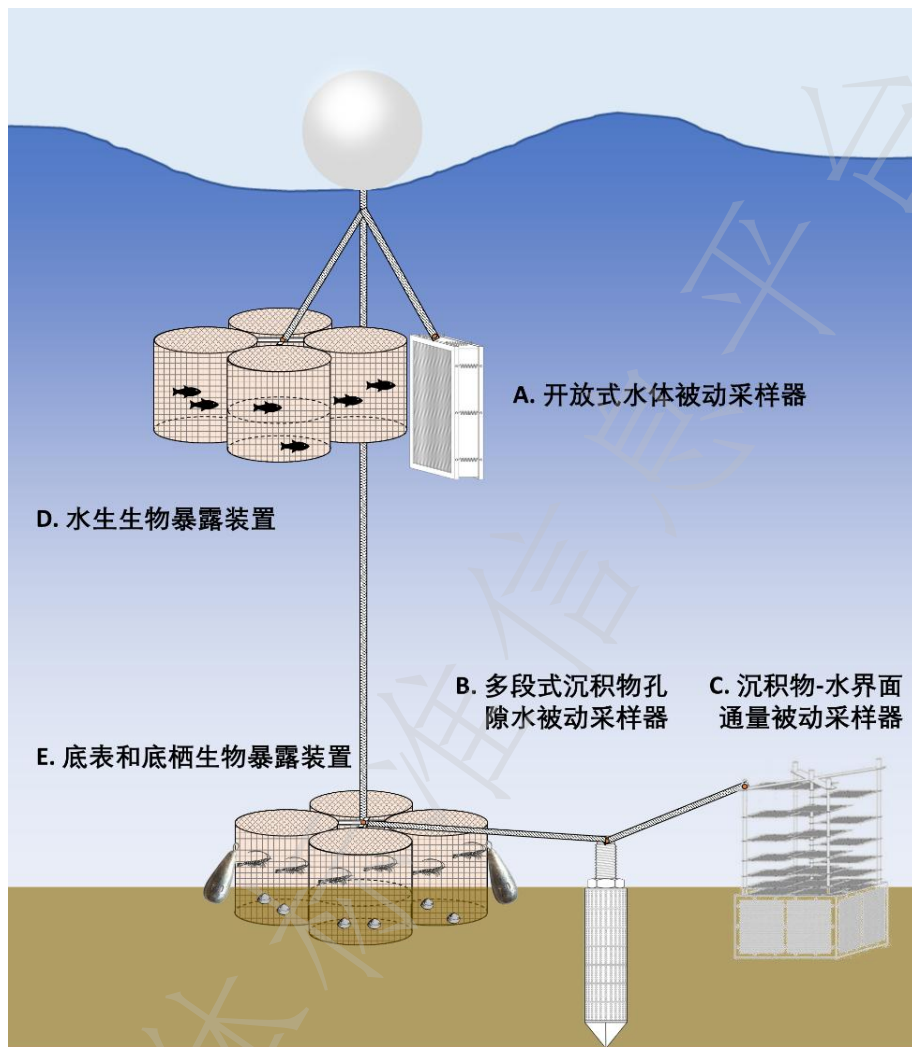


图 A.1 原位被动采样 - 生物暴露联用装置示意图

A.2 受试生物选择和驯养

A.2.1 选择

根据以下三个原则来选择适合我国水环境的原位暴露受试生物：

- 本土生物。原位生物暴露使用本土生物，更具有区域代表性和适用性；
- 毒理学研究充分。通过文献搜索可获得充分的毒性数据，也较容易实现实验室驯养；
- 生物体型和耐受性。为避免生物淤积影响暴露结果，需选择合适体型的生物，建议选择 1 cm~10 cm 体长范围的生物。同时，对水质要求过高的生物不适合野外实验。

基于以上原则，同时参考GB/T 29763选择稀有鮎鲫 (*Gobiocypris rarus*) 作为栖息在上层水体的受试物种，参考HJ 831，选择日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*) 和河蚬 (*Corbicula fluminea*) 分别作为栖息在水-沉积物界面和表层沉积物的受试物种。

A.2.2 生物驯养

开展暴露前，三种生物在实验室中驯养至少一周，驯养条件为：恒温 $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，光照比为16 h 光照：8 h 黑暗，每天使用曝气24 h 以上的脱氯自来水换水，稀有鮎鲫、日本沼虾和河蚬分别喂食未污染的摇蚊幼虫、颗粒鱼食和绿藻，喂食频率每天一次。驯养过程中需保证生物状态良好，同批生物死亡率 $<5\%$ 。

A.3 野外实验

A.3.1 选择研究位点

本装置适用于我国地表水。所选研究位点尽量满足如下条件：水深2 m左右，水温范围为 $15\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。此外，原位生物暴露需有参照位点，以排除受试生物受到运输、投放过程和其他野外环境因素的干扰。参照位点一般选择较为洁净的河流上游或湖泊，要求参照位点的生物存活率在80%以上。

A.3.2 投放

A.3.2.1 将原位被动采样-生物暴露联用装置带至研究位点现场。将采样器的吸附相（低密度聚乙烯膜）装配到含玻璃纤维膜保护层的采样器上，同时留取一份吸附相作为过程空白，正常装配但不经过野外暴露直接带回实验室，以检验投放过程是否受污染。按照图 A.1 用软绳串联装置各组成部分。测定研究位点水深，按需准备软绳，用于捆系浮球与暴露装置，为防止采样期间水位上升导致暴露装置位置发生变化，绳长应多预留 2 m。开放式水体被动采样器（A）与水生生物暴露装置（D）位于水面以下 0.5 m 左右的位置。

A.3.2.2 将在实验室驯养的受试水生生物带至现场，运输过程需避免大幅度振动对生物的影响，留取部分生物作为运输空白，不在野外投放直接带回实验室，以检验运输过程对生物活性的影响。在研究位点现场测量水质参数，包括温度、流速、pH 值、溶解氧、电导率和氨氮等。

A.3.2.3 在现场随机挑选受试生物，小心放入生物暴露装置，盖好装置顶盖。将两个下端带弯头的伸缩杆分别与多段式沉积物孔隙水被动采样器（B）和沉积物-水界面通量被动采样器（C）连接，两人分别持绳索与伸缩杆将串联好的整套采样装置缓慢放入水中，待 B、C 和 E 沉底后，由伸缩杆向下施力，缓慢插入沉积物中，直至多段式沉积物孔隙水被动采样器（B）顶部单元和沉积物-水界面通量被动采样器（C）底部单元恰好进入沉积物，如图 A.1。此过程需借助水下摄像头完成。轻轻水平移动伸缩杆，将弯头从采样器顶端的对孔中移出。用下端带圆环的伸缩杆将底表和底栖生物暴露装置（E）压入沉积物中，确保底栖生物与表层沉积物充分接触。

A.3.3 回收

结束暴露后，从水环境中取回被动采样器，冲洗去除外部的附着颗粒物，拆开采样器，取出其中的吸附相，放入纯水中，清洗去除表面的藻类附着物，用滤纸去除吸附相表面水分，将其浸泡于有机溶剂中萃取。10天原位生物暴露结束后，取回原位生物暴露装置，冲洗去除外部附着物，小心取出受试生物，统计每个暴露室中生物存活率。将存活的生物转移至曝气自来水中，清洗受试生物，河蚬需清肠8 h，确保摄食沉积物颗粒排出体外。生物样品置于液氮中保存，运输回实验室后于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

A.3.4 实验室分析

A.3.4.1 对被动采样器的吸附相和受试生物样品进行化学分析，测定目标污染物浓度，可分别获得污染物的生物有效浓度和生物体内浓度。

A. 3. 4. 2 根据所选生物毒性终点，如组织病理、酶活性、特异蛋白表达、DNA 损伤、基因表达等，对受试生物样品进行分析，再结合现场测定的死亡率结果，获得生物效应信息。

A. 4 质量保证和质量控制

A. 4. 1 原位生物暴露中参照位点的生物存活率在 80%以上。

A. 4. 2 化学分析中每处理 10~20 个样品需同时分析一组质量控制样品，包括溶剂空白、基质空白、基质加标及其平行样，并在所有样品中加入回收率指示物以评估分析结果的准确度及精密度，要求基质加标中目标化合物及所有样品中回收率指示物的回收率在 50%~150%之间。

仪器分析中每间隔 10 个样品测试一次已知浓度的标样以检验仪器的稳定性，确保每个化合物的浓度偏差在 20%以内。

附 录 B
(资料性)
沉积物毒性鉴别评估方法

B.1 沉积物毒性鉴别评估程序

沉积物毒性鉴别评估程序包括毒性初筛、毒性表征、毒性鉴别和毒性确认，具体见图B.1。

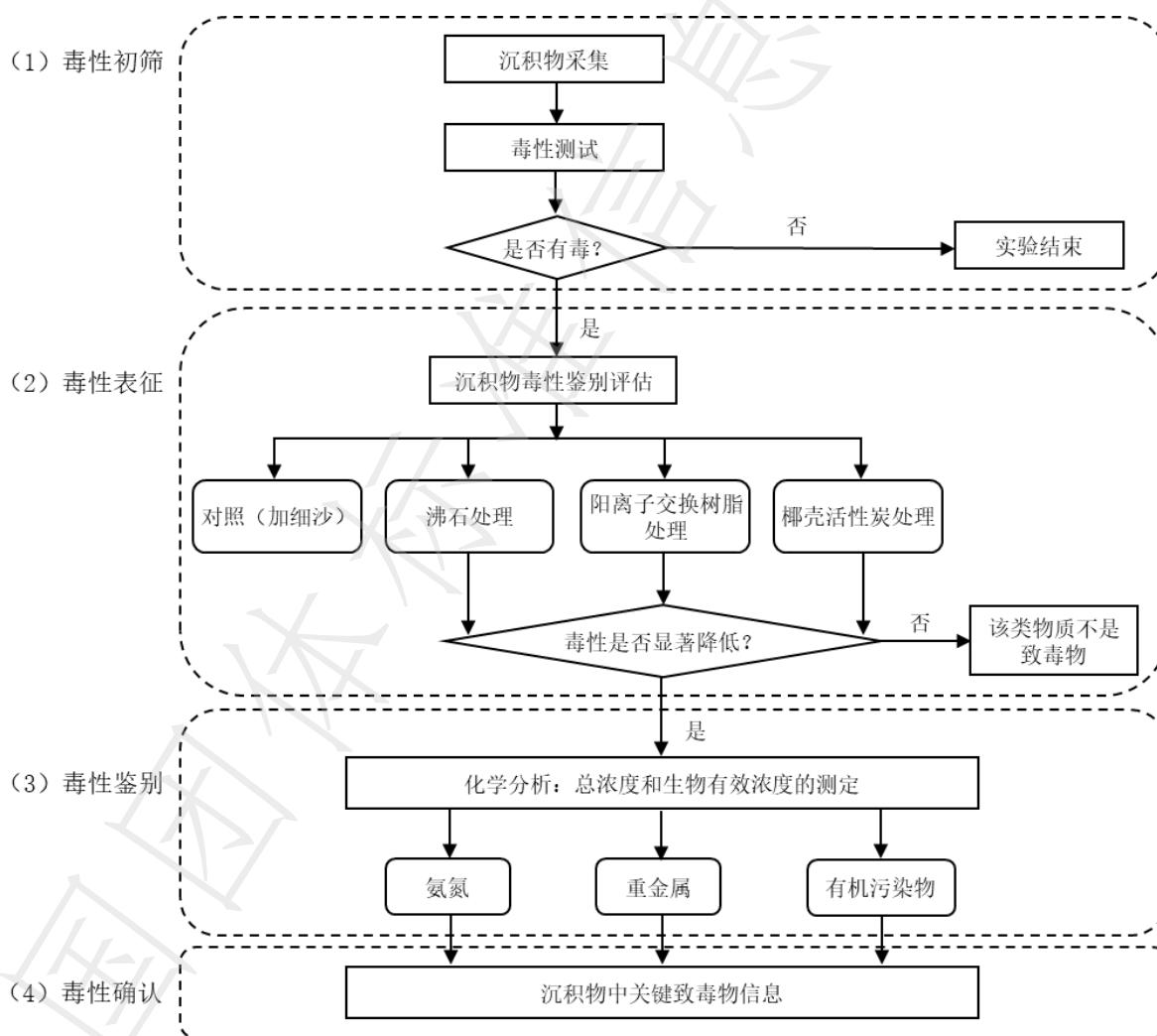


图 B.1 沉积物毒性鉴别评估程序

B.2 毒性初筛

B.2.1 选择研究位点

利用沉积物毒性测试对沉积物进行筛查，对模式生物表现出毒性的沉积物进一步开展毒性鉴别评估。根据沉积物污染特征，选择合适的淡水生物及毒性终点。参照EPA/600/R-99/064，选用伸展摇蚊幼虫（*Chironomus dilutus*）作为模式生物进行10天毒性实验，以致死率作为毒性终点进行毒性评估。

B.2.2 具体步骤

B.2.2.1 沉积物样品电动搅拌3 h充分混匀后，分装到400 mL烧杯内，每个烧杯中加入60 g湿沉积物和250 mL中度硬水（80 L中度硬水含4.92 g七水合硫酸镁，5.06 g二水合硫酸钙，7.68 g碳酸氢钠，4.0 g氯化钙，0.32 g氯化钾，曝气24 h以上；建议试剂纯度为分析纯及以上），静置过夜，次日换水后，向每个烧杯中加入10只3龄摇蚊幼虫。

B.2.2.2 毒性测试在流动换水系统中进行，温度设置为 $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，光照比为16 h光照：8 h黑暗，每日换水2次（每次换水约150 mL），喂食1次（1 mL 6 g/L鱼食），监测溶解氧、温度、电导率、pH值等水质参数，在实验开始和结束时各测试一次氨氮含量。

B.3 毒性表征

B.3.1 方法概述

参照EPA/600/R-07/080，利用不同处理方式改变沉积物中某类污染物的毒性，由此推断沉积物中引起毒性的主要污染物类别。重点关注的污染物类别包括有机物、重金属和氨氮，其对应的沉积物处理方式分别为加入椰壳活性炭、阳离子交换树脂和沸石等添加剂。添加剂的主要预处理步骤包括粉碎、过筛和清洗，其中活性炭材料还需脱气处理。对处理前后的沉积物进行生物毒性测试，通过对比受试生物毒性变化，确定致毒物类别。例如，沉积物加入活性炭处理后，毒性显著降低，说明有机物是主要致毒物之一；若毒性未降低，说明有机物不是主要致毒物。

B.3.2 实验材料预处理

B.3.2.1 椰壳活性炭预处理步骤如下：

- a) 粉碎：取适量椰壳活性炭，用小型粉碎机充分粉碎；
- b) 过筛：将粉碎后的粉末活性炭过筛，取80目~325目之间的部分；
- c) 清洗：称取一定量的已过筛活性炭，用4倍体积的纯水超声清洗3次；
- d) 脱气：将已清洗的活性炭转移至1 L锥形瓶中，加入其干重质量60%的纯水，超声10 min将其混匀，然后用真空泵抽气10 min后密封（瓶内负压约为0.7个大气压），于4 °C避光静置24 h方可使用；
- e) 储存：将上述处理的活性炭置于4 °C避光保存。使用前加入纯水超声10 min，去除纯水后使用。

B.3.2.2 阳离子交换树脂为D401大孔苯乙烯螯合型树脂，含水量为45%~55%，官能团为 $-\text{N}(\text{CH}_2\text{COONa})_2$ ，选择性吸附金属离子。其预处理步骤如下：

- a) 风干：将阳离子交换树脂置于通风橱内风干约24 h；
- b) 粉碎：将风干后的树脂用小型粉碎机充分粉碎；
- c) 过筛：将粉碎后的树脂过筛，取80目~325目之间的部分；
- d) 清洗：先用4倍体积的乙醇溶液（75%）浸泡10 h，去除乙醇溶液，并用4倍体积的纯水超声清洗3次，每次10 min；其次用4倍体积盐酸溶液（1 mol/L）浸泡2 h，去除盐酸溶液，并用

4 倍体积纯水超声清洗 3 次，每次 10 min；再用 4 倍体积的氢氧化钠溶液（1 mol/L）浸泡 2 h，去除氢氧化钠溶液，并用 4 倍体积纯水超声清洗 3 次，每次 10 min，最后用 1 mol/L 的盐酸溶液将 pH 值调至 7~8；

- e) 储存：将上述处理的阳离子交换树脂置于 4 °C 避光保存，使用前加入纯水超声 10 min，去除纯水后风干 24 h 即可。

B.3.2.3 沸石的预处理步骤如下：

- a) 粉碎：将沸石用小型粉碎机充分粉碎；
- b) 过筛：将粉碎后的沸石过筛，取 80 目~325 目之间的部分；
- c) 清洗：将已过筛的沸石用 4 倍体积的纯水超声清洗 3 次，每次 10 min；
- d) 储存：将已清洗的沸石置于 4 °C 避光保存，使用前超声 10 min 并去除纯水即可。

B.3.3 毒性测试

B.3.3.1 选用摇蚊幼虫作为模式生物，以致死率作为毒性终点进行测试。三种添加剂（椰壳活性炭、阳离子交换树脂和沸石）按预定的方法处理后进行沉积物毒性测试。具体操作为：沉积物样品充分搅拌 3 h 后分装到 400 mL 烧杯，每个烧杯含 60 g 湿沉积物，然后每处理组分别加入质量分数为 10% 的添加剂，并充分搅拌 5 min，最后缓慢加入中度硬水，加水时尽量避免扰动沉积物。平衡 24 h 后，每个烧杯中加入 10 只 3 龄摇蚊幼虫。对于每处理组，还应设置一个过程空白组（向对照组沉积物中加入洁净细沙及质量分数相当的各种添加剂）和一个稀释空白组（向沉积物样品中加入质量分数相当的洁净细沙）。同时进行处理和未处理组沉积物的生物毒性测试。

B.3.3.2 椰壳活性炭和阳离子交换树脂处理组测试为 10 天毒性测试，测试过程中每天换水两次（每次约 150 mL），喂食一次（1 mL 6 g/L 鱼食），监测上层水溶解氧、温度、电导率、pH 值等水质参数，在实验开始和结束时各测试一次氨氮含量。沸石处理组毒性测试为 4 天静态实验，每天监测上层水温度、pH 值、电导率、溶解氧和氨氮。整个实验过程中温度恒定为 23 °C ± 1 °C，光照比为 16 h 光照：8 h 黑暗。

B.4 毒性鉴别

B.4.1 沉积物中污染物的浓度测定

B.4.1.1 沉积物中有机污染物的浓度测定

对沉积物中常规检测的有机污染物进行定量，如多环芳烃（Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs）、多氯联苯（Polychlorinated biphenyls, PCBs）、多溴二苯醚（Polybrominated diphenylethers, PBDEs）、有机氯农药（Organochlorine pesticides, OCPs）、有机磷农药（Organophosphate pesticides, OPs）、拟除虫菊酯农药（Pyrethroids）等，具体步骤如下：

- a) 萃取。向 250 mL 萃取瓶中加入 5 g 沉积物、2 g 活化铜粉、一定量回收率指示物和 100 mL 萃取溶剂（正己烷和丙酮混合溶剂，1:1, V:V），超声微波萃取 6 min，其中超声功率和微波功率分别设为 50 W 和 100 W。萃取完成后，过滤萃取液，再次加入 50 mL 萃取溶剂，重复上述萃取步骤。合并萃取液，氮吹浓缩并置换溶剂为 1 mL 正己烷；
- b) 净化。有机氯、有机磷和拟除虫菊酯农药使用石墨化碳黑/伯仲胺（Graphitized carbon black/primary-secondary amine, GCB/PSA）固相萃取柱净化。小柱从下往上依次装入 600 mg PSA、300 mg GCB 和 500 mg 无水硫酸钠，并用 6 mL 正己烷活化。将样品溶液（约 1 mL）转移至小柱，用正己烷清洗浓缩管 3 次，并将清洗液转移至小柱。用 10 mL 正己烷和二氯甲烷混合

溶剂(1:1, V:V)洗脱,收集洗脱液,氮吹浓缩并置换溶剂为0.5 mL正己烷,加入内标后测定目标农药的浓度。用于测定多环芳烃的样品使用硅胶/氧化铝层析柱净化。层析柱(直径1 cm)从下往上依次填充6 cm中性氧化铝,12 cm中性硅胶和1 cm无水硫酸钠。将样品溶液(约1 mL)转移至层析柱,用正己烷清洗浓缩管3次,并将清洗液转移至层析柱;用70 mL正己烷和二氯甲烷的混合溶剂(7:3, V:V)洗脱,收集洗脱液,氮吹浓缩并置换溶剂为1 mL正己烷,加入内标后测定多环芳烃的浓度。进一步将样品使用浓硫酸净化后用于测定多氯联苯和多溴二苯醚的浓度。具体操作为加入1 mL浓硫酸至样品中,振荡5 min,离心后取上清液,并用正己烷清洗试管3次,氮吹浓缩并置换溶剂为100 μ L正己烷,加入内标后测定多氯联苯和多溴二苯醚的浓度;

- c) 仪器分析。利用气相色谱/质谱联用仪(Gas chromatography mass spectrometry, GC/MS)定量目标化合物,其中多环芳烃、多氯联苯和有机氯农药采用电子轰击式电离和选择性离子监测模式。离子源、四级杆和接口温度分别为230 $^{\circ}$ C、150 $^{\circ}$ C和260 $^{\circ}$ C。色谱柱为DB-5MS(30 m柱长 \times 0.25 mm内径 \times 0.25 μ m膜厚),载气为高纯氦气,流速为1.2 mL/min。进样口的温度为280 $^{\circ}$ C,压力为250 kPa,不分流方式进样,进样量为1 μ L。多环芳烃测定的柱温升温程序如下:初始柱温设为60 $^{\circ}$ C,以10 $^{\circ}$ C/min的速率升至200 $^{\circ}$ C,再以2 $^{\circ}$ C/min的速率升至214 $^{\circ}$ C,以5 $^{\circ}$ C/min的速率升至255 $^{\circ}$ C,最后以20 $^{\circ}$ C/min的速率升至290 $^{\circ}$ C,并保持15 min。多氯联苯测定的柱温升温程序如下:初始柱温设为110 $^{\circ}$ C,保持1 min,以10 $^{\circ}$ C/min的速率升至230 $^{\circ}$ C,保持1 min,再以2 $^{\circ}$ C/min的速率升至260 $^{\circ}$ C,又以30 $^{\circ}$ C/min的速率升至300 $^{\circ}$ C,并保持5 min。有机氯测定的柱温升温程序如下:初始柱温设为80 $^{\circ}$ C,保持1 min,以20 $^{\circ}$ C/min的速率升至240 $^{\circ}$ C,保持6 min,再以10 $^{\circ}$ C/min的速率升至280 $^{\circ}$ C,保持5 min。有机磷、拟除虫菊酯及多溴二苯醚使用负化学电离和选择性离子监测模式。离子源和接口温度分别设置为250 $^{\circ}$ C和280 $^{\circ}$ C。色谱柱为DB-5HT(15 m柱长 \times 0.25 mm内径 \times 0.1 μ m膜厚),载气为高纯氦气(流速设定为1.5 mL/min),反应气为甲烷。有机磷和拟除虫菊酯农药测定的柱温升温程序如下:初始柱温为60 $^{\circ}$ C,保持1 min,以10 $^{\circ}$ C/min的速率升至200 $^{\circ}$ C,保持1 min,再以3 $^{\circ}$ C/min的速率升至220 $^{\circ}$ C,保持8 min,最后以50 $^{\circ}$ C/min的速率升至300 $^{\circ}$ C,保持3 min。采用程序升温进样模式,进样口的初始温度设定为60 $^{\circ}$ C,保持0.1 min,以300 $^{\circ}$ C/min的速率升至280 $^{\circ}$ C,保持5 min,进样量为1 μ L。多溴二苯醚测定的柱温升温程序如下:初始柱温设为110 $^{\circ}$ C,保持2 min,以10 $^{\circ}$ C/min的速率升至250 $^{\circ}$ C,并保持1 min,再以20 $^{\circ}$ C/min速率升至300 $^{\circ}$ C,并保持10 min。采用脉冲不分流进样,进样口的温度为290 $^{\circ}$ C,进样口压力200 kPa,进样量1 μ L。

B.4.1.2 沉积物中重金属的浓度测定

沉积物经微波消解后,利用电感耦合等离子体质谱(Inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS)分析测定其中重金属(如Cd、Cr、Cu、Ni、Pb和Zn)浓度。称取0.2 g干沉积物样品,置于聚四氟乙烯消解罐中,加入9 mL浓硝酸和3 mL氢氟酸进行微波消解。压力控制的微波消解程序如下:5 kg/cm²压力保持70 s,10 kg/cm²压力保持90 s,15 kg/cm²压力保持90 s,20 kg/cm²压力保持120 s,25 kg/cm²压力保持900 s。消解液在110 $^{\circ}$ C下蒸干,加入2 mL浓硝酸,转移并用纯水定容至40 mL,离心后取上清液2.5 mL,稀释至10 mL待测定。ICP-MS以氩气为载气,流速设为1 L/min;RF功率、S/C温度和四级杆分析腔压力分别设为1550 W、2 $^{\circ}$ C和 1×10^{-4} Pa。用外标法定量,标准曲线范围设为1 ng/mL~100 ng/mL。

B.4.1.3 沉积物中氨氮的浓度测定

为避免氨氮挥发，沉积物样品运回实验室一天内测定氨氮浓度，具体操作如下：沉积物样品搅拌均匀后，取300 g于离心管中，在4000 rpm转速下离心30 min得到孔隙水，过滤并稀释至合适浓度后，按HJ 536测定氨氮浓度。

B.4.2 沉积物中污染物的生物有效浓度测定

B.4.2.1 有机污染物的生物有效浓度测定

推荐使用Tenax仿生萃取测定沉积物中有机污染物的生物有效浓度，具体方法如下：取2 g干沉积物于50 mL的螺口试管中，加入0.1 g活化铜粉、5 mg 叠氮化钠、0.5 g Tenax树脂和45 mL中度硬水，在20 rpm下萃取24 h后，回收Tenax树脂，并用5 mL丙酮萃取1次，5 mL正己烷和丙酮混合溶剂（1:1，V/V）萃取2次，合并萃取液，氮吹浓缩并置换溶剂为1 mL正己烷，加入内标后进行仪器分析，具体净化与仪器分析方法同B.4.1.1。

B.4.2.2 沉积物中重金属的生物有效浓度测定

沉积物中重金属的生物有效浓度采用分步萃取方法（Community Bureau of Reference, BCR）进行测定，包括以下5个步骤：

- a) 称取1 g干沉积物至50 mL离心管中，加入40 mL 0.11 mol/L冰醋酸，在23 °C下振荡16 h，结束后在3000 g转速下离心20 min，收集上清液，4 °C避光储存；
- b) 向离心管中加入20 mL纯水，振荡15 min后在3000 g转速下离心20 min，清洗完成后去除上清液。向离心管中加入40 mL 0.5 mol/L盐酸羟胺溶液，剧烈摇动以使底部沉积物悬浮，然后在23 °C下振荡16 h，结束后在3000 g转速下离心20 min，收集上清液，4 °C避光储存；
- c) 向离心管中加入20 mL纯水，振荡15 min后在3000 g转速下离心20 min，清洗完成后去除上清液。向离心管中缓慢加入10 mL质量分数为30%的双氧水，拧松管盖，在室温下消解1 h，不时摇动，并在85 °C ±2 °C下消解1 h，不时摇动，将体积浓缩至3 mL。再次缓慢加入10 mL双氧水，在85 °C ±2 °C下消解1 h，不时摇动，将体积浓缩至1 mL。再向离心管中加入50 mL 1.0 mol/L醋酸铵溶液，在23 °C下振荡16 h，结束后在3000 g转速下离心20 min，收集上清液，4 °C避光储存；
- d) 向离心管中加入20 mL纯水，振荡15 min后在3000 g转速下离心20 min，清洗完成后去除上清液。将离心管中残渣态样品在105 °C烘干4 h，称取0.2 g样品于聚四氟乙烯消解罐中，加入9 mL浓硝酸和3 mL氢氟酸进行消解，消解方法同B.4.1.2；
- e) 各步收集的上清液及经消解的残渣态样品中重金属的仪器分析方法同B.4.1.2。

B.4.3 毒性单位计算

根据上述所测得的污染物浓度和生物有效浓度，按照8.3.2公式（1）和（2）计算毒性单位（TU）。根据沉积物中各污染物的TU，筛选主要致毒物，污染物的TU越大，毒性贡献越大。可考虑污染物的生物有效性，使用生物有效TU确定主要致毒物。

B.5 毒性确认

对毒性表征和毒性鉴定的结果进行再确认及解释说明，结合污染物的剂量-效应关系，可采用相关性分析、加标沉积物毒性测试、质量平衡等方法进行毒性确认。

B.6 质量保证和质量控制

- B. 6.1 在沉积物生物毒性测试中，空白对照组的存活率在 80% 以上。
- B. 6.2 化学分析中每处理 10~20 个样品需同时分析一组质量控制样品，包括溶剂空白、基质空白、基质加标及其平行样，并在所有样品中加入回收率指示物以评估分析结果的准确度及精密度，要求基质加标中目标化合物及所有样品中回收率指示物的回收率在 50%~150% 之间。
- B. 6.3 仪器分析中每间隔 10 个样品测试一次已知浓度的标样以检验仪器的稳定性，确保每个化合物的浓度偏差在 20% 以内。

附录 C (资料性) 效应导向分析方法

C.1 效应导向分析方法程序

效应导向分析 (Effect directed analysis, EDA) 方法程序主要包括污染物的萃取、毒性测试、组分分离、致毒污染物识别和毒性确认, 见图C.1。

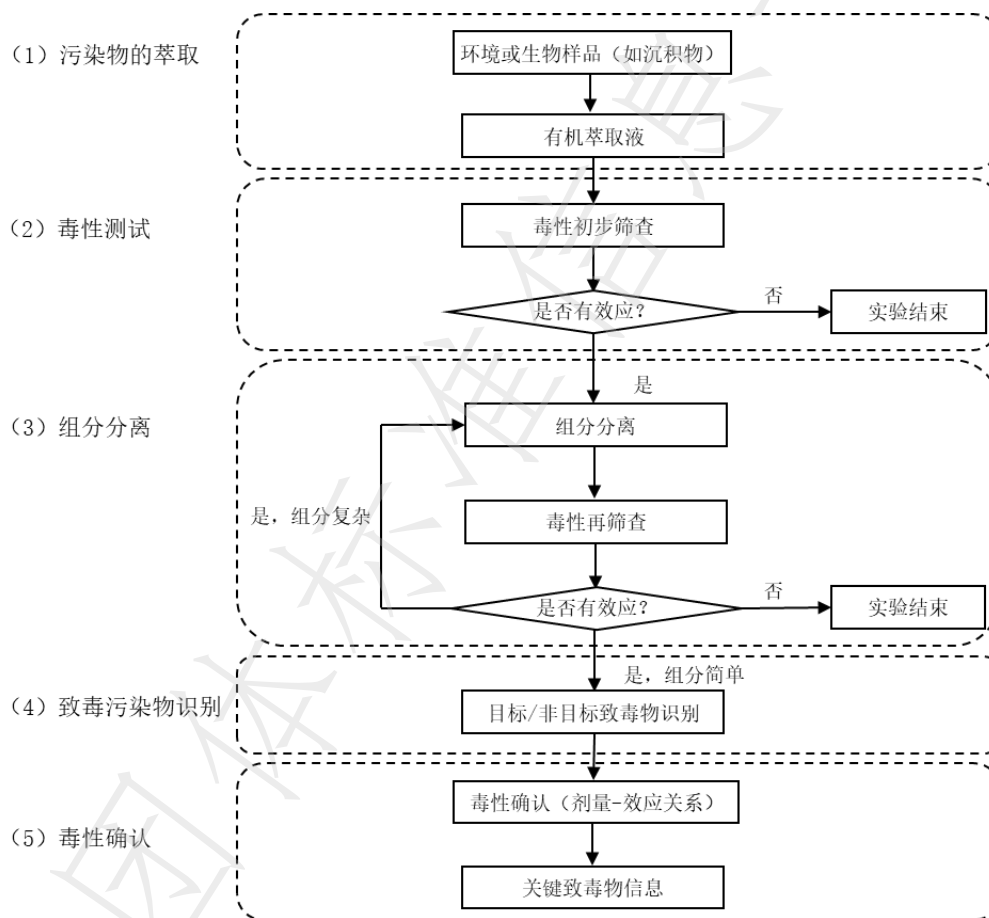


图 C.1 效应导向分析识别沉积物中关键致毒有机物程序

C.2 污染物的萃取

C.2.1 污染物萃取方法概述

萃取研究区域水环境沉积物中有机污染物, 常用的方法包括耗竭式萃取和仿生萃取。耗竭式萃取是用有机溶剂通过超声或者高温高压等方式萃取沉积物中有机污染物。该方法可能会高估一些高毒性但生物有效性低的疏水性污染物的毒性贡献, 导致识别结果出现偏差。为提高识别的准确性, 可采用仿生萃取, 获得沉积物中有机污染物的生物有效部分, 更真实地反映受试生物在沉积物中的暴露情景。

C.2.2 耗竭式萃取方法

常用的沉积物耗竭式萃取方法包括索式抽提、超声微波萃取和加速溶剂萃取等。

- a) 索氏抽提的萃取步骤为：将 5 g 干沉积物和 2 g 活化铜粉加入滤纸筒，置于索氏抽提器内，利用 220 mL 的正己烷和丙酮的混合溶剂（1:1，V:V）在 57 °C 下抽提 48 h 后，氮吹浓缩并置换溶剂为 4 mL 二氯甲烷，其中 3 mL 用于进一步分离，1 mL 置换溶剂为二甲基亚砜（DMSO）用于生物毒性筛查；
- b) 超声微波萃取通过使用超声微波协同萃取仪萃取沉积物中的有机污染物，具体步骤为：将 40 g 干沉积物、2 g 活化铜粉和 100 mL 正己烷和丙酮混合溶剂（1:1，V:V）加入 250 mL 萃取瓶中，在 50 W 超声功率和 100 W 微波功率下萃取 6 min 后过滤收集上层萃取液，再加入 100 mL 正己烷和丙酮混合溶剂（1:1，V:V）重复萃取 1 次。合并萃取液，氮吹浓缩并置换溶剂为 4 mL 二氯甲烷，其中 3 mL 用于进一步分离，1 mL 置换溶剂为二甲基亚砜（DMSO），用于生物毒性筛查；
- c) 加速溶剂萃取的步骤为：将 2 g 干沉积物与 1 g 活化铜粉混合均匀后加入 22 mL 的萃取池中，再加入硅藻土填满萃取池。萃取溶剂为正己烷：丙酮：二氯甲烷（2:2:1，V:V:V）的混合溶剂，萃取压力 1500 psi，温度 100 °C，加热时间 90 s，运行持续 5 min 的静态萃取循环两次，冲洗溶剂体积为萃取池体积的 60%，吹扫时间 60 s。萃取液氮吹浓缩并置换溶剂为 4 mL 二氯甲烷，其中 3 mL 用于进一步分离，1 mL 置换溶剂为二甲基亚砜（DMSO），用于生物毒性筛查。

C.2.3 仿生萃取方法

仿生萃取推荐使用大体积吸附剂萃取法，以XAD树脂作为吸附剂，有效萃取沉积物中快速解吸部分的有机污染物。具体方法如下：将500 g湿沉积物、500 mL中度硬水和20 g XAD树脂（树脂为等量XAD-2与XAD-4的混合物，使用前需用正己烷和丙酮的混合溶剂（1:1，V:V）超声清洗3次，纯水超声清洗3次，于120 °C烘干4 h）加入1 L锥形瓶中。避光条件下，以800 rpm的速度搅拌24 h，回收树脂，用纯水清洗3次后，分别用50 mL丙酮萃取1次、50 mL正己烷和丙酮混合溶剂（1:1，V:V）萃取3次，合并萃取液。置换溶剂为4 mL二氯甲烷，其中3 mL用于进一步分离，1 mL置换溶剂为二甲基亚砜（DMSO），用于生物毒性筛查。

C.3 毒性测试

C.3.1 毒性测试概述

选择合适的受试生物和毒性终点，将萃取液或分离组分加标至暴露体系，开展毒性测试，判断萃取液或分离组分是否有效应，指导后续的组分分离和污染物识别。

C.3.2 受试生物和毒性终点

根据受试生物类别，毒性测试通常可分为活体生物测试和离体细胞测试。前者以生物个体为受体，常用毒性终点包括致死性和行为、生长、生物标志物等亚致死性效应；后者以细胞为受体，常用毒性终点包括细胞增殖、氧化应激、基因损伤、致突变效应等。具体测试方法如下：

- a) 活体生物毒性测试方法。可选择摇蚊幼虫为受试生物、12孔板为测试体系，开展48 h毒性测试。每孔加入10只3龄摇蚊幼虫，4 mL中度硬水及少量细沙。测试采用静态法，温度为23 °C ±1 °C，光照比为16 h光照：8 h黑暗。用于毒性测试的组分溶于二甲基亚砜（DMSO），最大加入体积不超过0.25 %。暴露结束后，记录摇蚊幼虫存活率。在未观测到致死性的情况下，可使用亚致死毒性终点，如综合生物标志物响应指数（Integrated biomarker response, IBR）。IBR综合考虑多种酶活性指标，包括乙酰胆碱酯酶（Acetylcholinesterase, AChE）、过氧化氢

酶 (Catalase, CAT)、脂质过氧化物酶 (Lipid peroxidase, LPO)、羧酸酯酶 (Carboxylesterase, CarE)、细胞色素 (Cytochrome P450, P450) 和谷胱甘肽 S 转移酶 (Glutathione S-transferase, GST) ;

- b) 离体细胞毒性测试方法。细胞毒性测试通常采用 CCK-8 法, 其原理为水溶性四唑盐 WST-8 试剂与活细胞中存在的电子载体 1-Methoxy PMS 结合, 产生与活细胞数量成正比的甲臞量, 通过比色检测获得活细胞数量或细胞活性等参数。具体方法如下:

- 1) 细胞种板: 所选取的细胞应为稳定传代3代以上并处于指数生长期 (S期) 的细胞。种板前, 移出培养液, 使用4 °C 的磷酸缓冲盐溶液 (Phosphate buffer saline, PBS) 清洗1~2遍, 使用 trypsin-EDTA 消化细胞5 min后, 加入新鲜培养液中中止消化并混匀。细胞数量处于 2.5×10^5 个/孔~106个/孔之间。种板时, 将细胞悬液稀释后转移到灭菌离心管中, 以每孔100 μ L 的体积加至96孔板中, 确保每孔细胞数量尽量均匀。种板后, 使用100 μ L 的移液枪对每孔吹扫混匀, 放置于37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养12 h以上;
- 2) 细胞染毒: 量取1 mL培养液于灭菌离心管中, 以培养液0.1%的比例加入萃取液或分离组分, 在螺旋振荡器上混匀, 配制加标培养液。将原孔板中培养液吸出, 加入加标培养液, 于培养箱中放置12 h或24 h;
- 3) 细胞染色: 吸出染毒后的培养液, 使用4 °C 的PBS缓冲液冲洗2次, 每孔加入100 μ L 不含胎牛血清的细胞培养液及10 μ L 的CCK-8试剂。之后, 将孔板放入培养箱中孵育1 h~4 h, 在450 nm处测量吸光度, 计算细胞活性。

C.3.3 加标方法

进行生物毒性测试时, 传统的主动加标方法将萃取液或分离组分直接加入暴露体系中。该方法适用于水溶性强的化合物, 但对于疏水性化合物, 可能由于容器壁吸附等原因导致其浓度降低, 可采用被动加标方法, 以维持相对恒定的暴露浓度。被动加标的方法如下: 将萃取液或分离组分溶于甲醇, 在其中加入生物医用级聚二甲基硅氧烷膜 (Polydimethylsiloxane, PDMS), 置于水平摇床 (220 rpm), 每隔2 h加入1 mL~2 mL纯水, 至少6次。48 h后取出PDMS膜, 用纯水淋洗3次除去甲醇, 完成加载。将加载污染物的PDMS膜放入暴露体系, 磁力搅拌48 h, 完成被动加标。

C.4 组分分离方法

组分分离通过色谱分离实现, 通常包括凝胶渗透色谱净化、正相色谱分离、反相色谱分离等步骤, 具体如下:

- a) 凝胶渗透色谱净化以 SX3 柱为色谱柱 (20 mm \times 300 mm)、二氯甲烷为流动相, 流速 5 mL/min, 进样体积 0.5 mL, 组分收集时间设为 10.5 min~18.0 min;
- b) 正相色谱分离以氰基柱为色谱柱 (5 μ m 粒径, 10 mm \times 200 mm)、正己烷和二氯甲烷为流动相, 流速 4 mL/min, 梯度洗脱程序设置为 100% 正己烷 (30 min) \rightarrow 40% 正己烷 (5 min), 进样体积 0.3 mL。组分收集时间设为 0 min ~ 35 min, 每分钟收集 1 个组分;
- c) 反相色谱分离以 C18 柱为色谱柱 (10 μ m 粒径, 10 mm \times 150 mm)、水和乙腈为流动相, 流速 4 mL/min, 梯度洗脱程序设置为 70% 乙腈 (25 min) \rightarrow 100% 乙腈 (10 min), 进样体积 0.3 mL。组分收集时间设为 0 min ~ 35 min, 每分钟收集 1 个组分。

C.5 关键致毒物识别方法

致毒组分经GC/MS全扫识别关键致毒物。检索谱库为NIST05，离子源为电子轰击离子源。离子源、四级杆和接口温度分别设置为230 °C、150 °C和150 °C。选用30 m柱长×0.25 mm内径×0.25 μm膜厚的DB-5MS色谱柱，载气为高纯氮气，流速为1.2 mL/min，不分流进样1 μL，进样口温度设置为250 °C，柱温升温程序如下：初始柱温为60 °C，保持1 min，以20 °C/min升至180 °C，保持1 min，再以5 °C/min升至240 °C，保持3 min，最后以10 °C/min升至300 °C，保持6 min。

C.6 毒性确认方法

分析致毒组分的生物效应与其中检出污染物TU的相关性，具有显著相关性的污染物即为疑似致毒物。进一步利用疑似致毒物的标准品开展毒性测试，确定其毒性贡献；也可在样品中添加疑似致毒物的特定效应阻断剂或增效剂，对比添加前后毒性效应的差异，验证其毒性贡献。

附录 D (资料性) 证据权重法评估复合污染生态风险案例

D.1 证据权重法简介

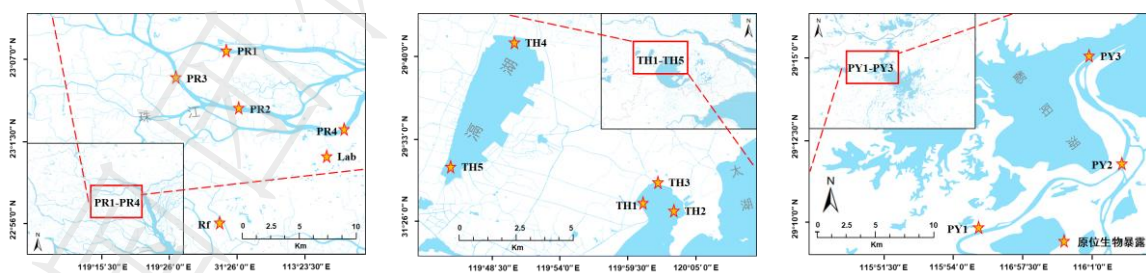
证据权重法被广泛应用于水生态风险评估，通过有效地整合暴露和效应等多证据链，可获得科学全面的评估结果，常用的证据链可通过化学分析、生物毒性测试与生物调查等手段获得。

D.2 权重赋值方法

本案例中选用灰色逼近理想点法对权重进行赋值。该方法将逼近理想点排序方法（TOPSIS）和灰色关联评价法相结合，评价指标与理想点的距离越小、关联度越大，说明水环境质量越好。通过设置两个虚拟比较点，即较好点和较差点，将所有实际研究位点与较好点和较差点同时评估，基于相对接近度对位点进行降序排序，根据与两个比较点的排序位置，可对研究位点进行风险等级评定，分为高、中、低风险。相对接近度的计算可通过Excel VBA（Visual Basic for Application）程序^[1]进行，采用宽松力度权重模式。由于不同证据链对水环境质量的指示程度不同，权重赋值可不同。例如，相对于单个污染物的环境浓度，生物效应更能综合反映复合污染水环境对受试生物的胁迫，且致死性效应比亚致死效应更严重，因此，生物存活率、综合生物标志物响应指数和目标污染物浓度的权重分别赋值为10、5和1。

D.3 证据权重法应用

本案例按附录A所述原位生物暴露方法，使用稀有鮎鲫与河蚬作为模式生物在珠江流域（广州）、太湖流域（常州）与鄱阳湖流域（南昌）开展10天原位生物暴露测试，研究区域如图D.1所示。



注：左、中、右分别为珠江流域（广州）、太湖流域（常州）、鄱阳湖流域（南昌）

图 D.1 研究区域位点布设图

利用上述赋值法，对研究区域各位点进行相对接近度分析，结果如图 D.2 所示，红色代表高风险，黄色代表中风险，绿色代表低风险。可见，珠江流域（广州）的水体与沉积物均表现较高的复合污染生态风险，太湖流域（常州）和鄱阳湖流域（南昌）的部分位点也表现出较高的复合污染风险水平。

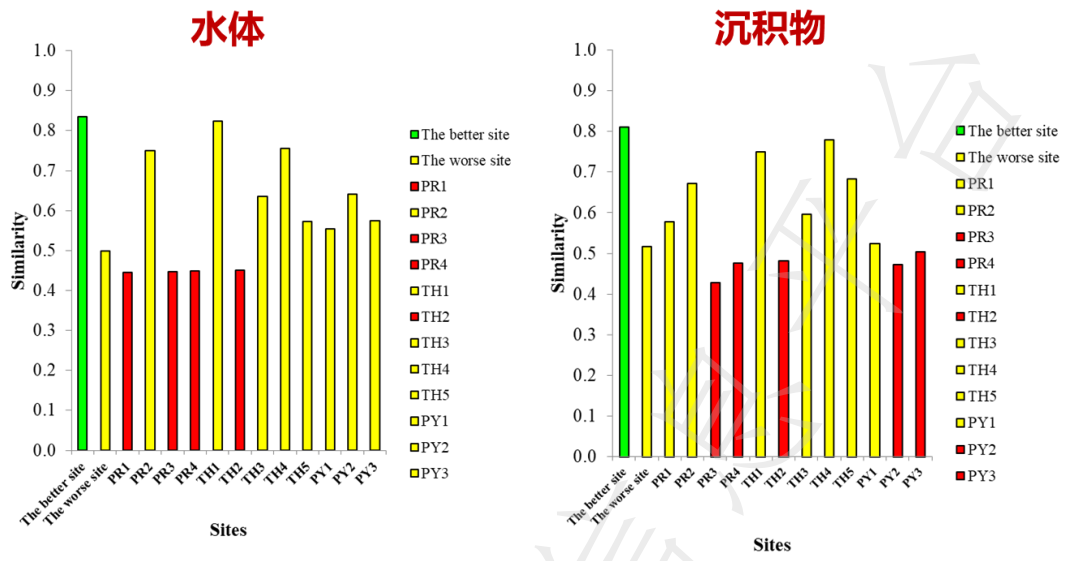


图 D.2 研究区域水体与沉积物证据权重分析结果

参 考 文 献

- [1] Jiang, Y.-X., Liu Y.-S., Ying G.-G., Wang H.-W., Liang Y.-Q., Chen X.-W. A new tool for assessing sediment quality based on the Weight of Evidence approach and grey TOPSIS [J]. Science of the Total Environment, 2015, 537: 369-376.
-