

团 体 标 准

T/LCAA XX—XXXX

养殖环境复合污染物生态风险评估技术指南

Technical guidelines for ecological risk assessment of composite pollutants in
livestock environment

点击此处添加与国际标准一致性程度的标识

（征求意见稿）

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施



北京低碳农业协会 发布

目 次

前 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 2

5 评估启动 3

6 养殖环境复合污染物暴露水平表征 4

7 养殖环境毒害物质生物效应表征 5

8 养殖环境毒害物质风险水平表征 6

9 养殖环境毒害物质关键致毒物识别 7

10 不确定性分析 8

11 报告编制 8

附 录 A 9

附 录 B 15

参考文献 19

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。

本文件由北京低碳农业协会提出并归口。

本文件起草单位：中国农业科学院农业环境与可持续发展研究所、吉林大学、北京林业大学、北京交通大学。

本文件主要起草人：李红娜、王朝阳、杨珍珍、张旭、田云龙、董双石、张立秋、高鹏、蔡伟伟、姚宏。

养殖环境复合污染物生态风险评估技术指南

1 范围

本文件规定了养殖环境中抗生素、重金属、激素、农药残留和消毒副产物等毒害物质的复合污染生态风险评估的范围、评估原则、评估程序、评估内容、评估方法和具体要求。

本文件适用于指导养殖环境中抗生素、重金属、激素、农药残留和消毒副产物等毒害物质的复合污染物生态风险评估，涵盖土壤、水体和空气等环境介质中的污染物浓度、分布特征及其毒性效应的评估。

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。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 3838 地表水环境质量标准

GB 15618 土壤环境质量 农用地土壤污染风险管控标准

HJ 2.1 环境影响评价技术导则

HJ 91.1 污水监测技术规范

HJ 91.2 地表水环境监测技术规范

HJ 630 环境监测质量管理技术导则

HJ/T 166 土壤环境监测技术规范

NY/T 3957 畜禽粪便监测技术规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

养殖环境 aquaculture environment

从事规模化畜禽、水产养殖活动的区域及其排放物可能影响的周边环境，主要包括养殖场区、养殖塘、以及受其排放物影响的土壤、水体和沉积物等环境介质。

3.2

复合污染 combined pollution

两种或两种以上不同种类的污染物（本标准中指抗生素、重金属、激素、农药残留和消毒副产物等）在同一环境介质中共存，并可能对生态系统产生联合效应的污染现象。

3.3

生态风险评估 ecological risk assessment

评估由外界压力因素（如污染物）对非人类生物及其所处生态系统可能产生的不利影响及其发生概率的过程。

3.4

污染物相互作用 pollutant interaction

不同污染物在环境介质中相互作用的过程，可能表现为加和、拮抗或协同效应。

3.5

定性风险评估 qualitative risk assessment

通过非数值化的方法（如分类、分级、描述性分析）评估污染物对生态系统的潜在危害，侧重于污染物特性（如毒性、持久性、生物累积性）；暴露场景（如废弃物施用频率、受体敏感性）；风险等级划分（如高/中/低风险）。

3.6

定量风险评估 quantitative risk assessment

基于数值化计算的风险评估方法，通过数学模型、统计分析和实验数据，量化污染物对生态系统或人体健康的潜在危害。

4 评估原则和程序

4.1 评估原则

4.1.1 科学性

评估应基于现有的科学数据和技术手段，结合环境管理需求、评估目的及数据的可得性和有效性，科学合理地制定评估目标和评估方案。评估过程应确保系统性和完整性，评估结论应客观、可靠，能够准确反映复合污染的生态风险特征。

4.1.2 透明性

评估过程必须保持透明，所有的假设、评估方法和分析不确定性应公开说明。评估过程的每个环节和决策依据应有明确记录，评估报告应清晰、易懂，能够让相关方了解评估的背景、方法、数据来源以及结论的可靠性。

4.1.3 时效性

评估应基于最新的科学证据和技术方法进行，结合区域的生态特点和污染物的特性，对生态风险进行实时评估，并根据新的研究成果和环境变化及时更新评估结果，确保评估的时效性和准确性。

4.1.4 合理性

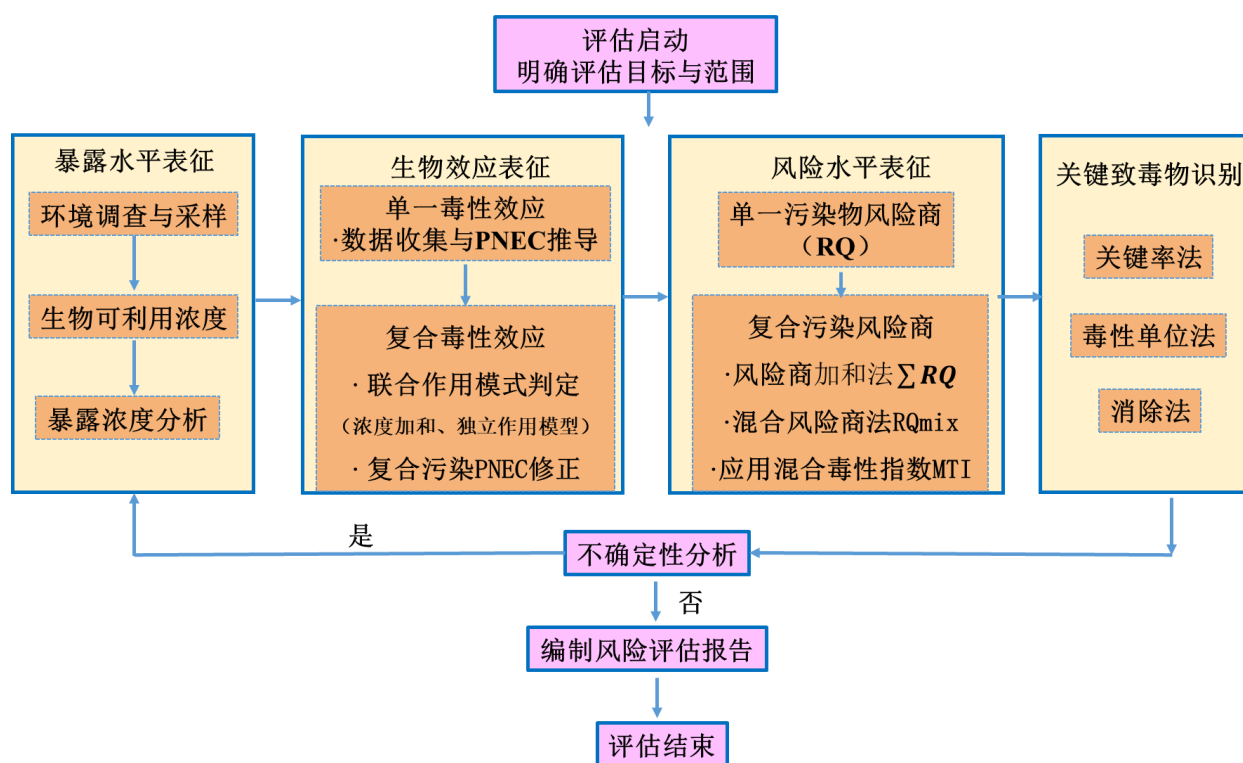
评估过程应依托普遍接受的科学原理、技术手段和数据，使用合适的模型和方法。评估结果应符合常识，具有实际可操作性，并充分考虑生态系统的复杂性和污染物间相互作用的多样性。

4.2 评估程序

养殖环境中毒害物质的复合污染生态风险评估程序主要包括以下几个步骤：

- a)、评估启动：明确评估目标和范围。
- b)、暴露水平表征：调查与分析环境中抗生素、重金属、激素、农药残留和消毒副产物等毒害物质的浓度、分布与生物可利用性。
- c)、生物效应表征：获取并分析抗生素和重金属的单一及复合毒性数据，推导 PNEC。
- d)、风险水平表征：采用风险商法等模型计算风险值，评价风险水平。
- e)、关键致毒物识别：分析各污染物对总风险的贡献率，识别关键致毒物。
- f)、不确定性分析：分析评估过程中各环节存在的不确定性及其对评估结果的影响。
- g)、报告编制：编制完整的风险评估报告。

评估程序流程图见下图。



5 评估启动

明确评估的需求、目标、边界（地理范围、环境介质、目标污染物清单）和评估受体（如土壤中的蚯蚓、水生环境中的藻类、溞类、鱼类等）。

5.1 确定评估目标

评估应基于最新的科学证据和技术方法进行，结合区域的生态特点和污染物的特性，对生态风险进行实时评估。

在开展养殖环境复合污染物生态风险评估前，评估人员应与管理方及相关利益方充分沟通，明确评

估目的和所需支持的环境管理需求。根据研究的重点，确定评估的具体目标，包括关键污染物的识别和污染风险的量化。

5.2 确定评估对象和范围

通过收集文献资料、现场调研及与管理方的沟通，明确评估的研究对象和范围，包括：

a)、评估对象：结合评估目标，选择生态系统的关键组成部分（如生物个体、种群或群落）作为评估对象，设定反映复合污染风险的评估终点和测试终点；

b)、时间范围：综合分析关键污染物的危害特性、暴露周期和生态系统的动态特征，确定评估的时间范围；

c)、空间范围：结合研究区域内污染物的分布特征、环境行为以及生物的暴露模式，确定评估的地理范围。

注：确定“评估对象和范围”中关于时间范围、空间范围、评估对象（生态系统关键组成部分）的界定原则，参考标准 HJ 2.1 环境影响评价技术导则总纲。

5.3 确定评估类型

依据评估目标，考虑时间和资源限制、研究精度需求及数据可获得性，选择适宜的评估方法。评估类型可以包括定性或定量风险评估，评估结果通常通过风险分级（高、中、低）进行描述。

5.4 确定评估质控要求

结合研究区域内污染物的分布特征，明确评估流程中各环节的质量控制措施。包括数据采集的可靠性、模型构建的准确性、实验设计的可重复性等，确保评估过程的科学性和评估结论的可信度。

5.5 确定评估方案

结合前述步骤的结果，制定最终的评估方案，并与管理方及相关方讨论确定。评估方案应包含详细的技术路线、研究内容和时间安排，并明确所需资源和预期结果，为后续实施提供明确的指导框架。

6 养殖环境复合污染物暴露水平表征

6.1 环境调查与采样分析

6.1.1 采样方案设计

根据养殖场的布局、排污路径、地形水文条件，采用科学方法（如网格法、判断布点法）布设采样点，采集具有代表性的土壤、水体和沉积物样品。

注：参考标准 HJ/T 166 土壤环境监测技术规范，HJ 91.1 污水监测技术规范，HJ 91.2 地表水环境监测技术规范，NY/T 3957 畜禽粪便监测技术规范。

6.1.2 分析指标

至少包括以下指标中的两种：

重金属：镉（Cd）、铅（Pb）、铬（Cr）、砷（As）、汞（Hg）、铜（Cu）、锌（Zn）等。

抗生素：至少包括磺胺类、四环素类、氟喹诺酮类、大环内酯类等常用兽用抗生素的代表性物质（如磺胺甲恶唑、土霉素、恩诺沙星、金霉素等）。

激素：雌二醇、双酚 A 等。

农药：有机氯类、有机磷类、氨基甲酸酯类农药等。

消毒副产物：氯仿、溴仿、卤乙酸、四氯化碳等。

具体清单可根据区域使用特点调整。

注：参考标准 GB 15618 土壤环境质量 农用地土壤污染风险管控标准，GB 3838 地表水环境质量标准。

6.1.3 分析方法

重金属分析按相应的国家环境监测标准方法执行。抗生素、激素、农药及消毒副产物等分析宜采用高效液相色谱-串联质谱（HPLC-MS/MS）等方法，方法检出限和回收率需满足要求。

6.2 生物可利用浓度分析

鼓励采用相关技术（如梯度扩散薄膜技术（DGT）、仿生提取等）分析重金属和抗生素、激素、农药及消毒副产物等的生物可利用态浓度，以更准确地表征实际暴露水平。

6.3 暴露浓度分析

基于监测数据，采用统计学方法（如平均值、最大值、百分位数）分析各污染物的测量环境浓度（MEC），或利用模型预测暴露浓度（PEC）。

注：参考 HJ 630 环境监测质量管理技术导则。

7 养殖环境毒害物质生物效应表征

7.1 单一毒性效应

7.1.1 毒性数据收集

收集评估目标污染物对评估受体的急性和慢性毒性数据（如半数效应浓度（EC₅₀）、半数致死浓度（LC₅₀）、无观察效应浓度（NOEC）），数据来源应包括权威数据库、公开发表的文献等。

7.1.2 PNEC推导

采用评估因子法或物种敏感度分布法（SSD）推导单一污染物的预测无效应浓度（PNEC）。

评估因子法：根据可获得的毒性数据量和物种多样性，选择适当的评估因子（AF）（如从急性数据推导慢性PNEC，AF通常为1000）。

物种敏感度分布法（SSD）：当有足够数量的（通常≥5）物种的慢性毒性数据时，宜采用SSD法拟合分布曲线，取保护95%物种的浓度（HC₅）（除以一个适当的因子（通常为1~5）作为PNEC。

7.2 复合毒性效应

7.2.1 联合作用模式判定

可采用以下模型初步判定抗生素与重金属的联合作用模式：

浓度加和模型（Concentration Addition, CA）：CA模型认为混合物中各组分作用机制相同，其整体毒性等于各组分按自身毒性强度加权后的浓度之和。该模型适用于作用机制相同的污染物。

独立作用模型（Independent Action, IA）：IA模型认为，混合物中各组分作用机制不同且相互独立，其整体效应由各组分单独效应的概率联合计算得出。IA模型适用于作用机制独立的污染物。

可通过比较模型预测效应与实测效应，判定是相加、拮抗或协同。

7.2.2 复合污染PNEC修正

在数据充分的情况下，可基于复合毒性试验结果直接推导复合体系的 $PNEC_{mix}$ 。更可行的方法是，采用基于CA或IA模型的“虚拟稀释”概念，计算混合物的总风险商（RQ），或使用毒性单位法（Toxic Unit Approach, TU法）和混合RQ法（见第8章）。

8 养殖环境毒害物质风险水平表征

8.1 RQ法

8.1.1 单一污染物 RQ

$$PNEC = \frac{\text{毒性终点值 (如 } EC_{50}、NOEC)}{AF} \dots\dots\dots (A.1)$$

式中：

EC_{50} ——半数效应浓度；

$NOEC$ ——无观察效应浓度；

AF ——评估因子，至少3个营养级的急性毒性数据（1000），慢性毒性数据（ $NOEC$ ）（10-100），多物种野外数据（1-10）。

采用公式（A.2）计算单一污染物的RQ：

$$RQ_i = \frac{MEC_i}{PNEC_i} \dots\dots\dots (A.2)$$

式中：

RQ_i ——污染物i的风险商；

MEC_i ——污染物i的测量环境浓度；

$PNEC_i$ ——污染物i的预测无效应浓度。

风险等级： $RQ < 0.1$ ，低风险； $0.1 \leq RQ < 1$ ，中风险； $RQ \geq 1$ ，高风险。

8.1.2 复合污染 RQ

基于IA模型的方法：

RQ加和法：假设混合物中各组分的作用相互独立，互不影响，风险是简单的算术加和。该方法计算所有目标污染物RQ的总和。

$$\sum RQ = \sum_{i=1}^n RQ_i \dots\dots\dots (A.3)$$

风险等级： $\sum RQ < 0.1$ ，低风险； $0.1 \leq \sum RQ < 1$ ，中风险； $\sum RQ \geq 1$ ，高风险。

基于CA模型的方法：

混合RQ法：假设混合物中各组分具有相同的作用模式和毒性机制，它们像同一个物质一样起作用，风险是基于毒性单位的加和。该方法计算复合物的RQ。

$$RQ_{mix} = \sum_{i=1}^n \frac{MEC_i}{PNEC_i} \quad \dots\dots\dots (A.4)$$

风险等级： $RQ < 0.1$ ，低风险； $0.1 \leq RQ < 1$ ，中风险； $RQ \geq 1$ ，高风险。

应用混合毒性指数（MTI）：

$$MTI = \sum (RQ_i \times W_i) \quad \dots\dots\dots (A.5)$$

式中：

RQ_i ——单一污染物的风险商值；

W_i ——毒性权重因子， W_i 通过PNEC倒数归一化、标准限值比例或专家评分法确定，高毒性污染物（如Cd、Hg）权重更高，用于量化复合污染中各物质的相对危害。

分级标准： $MTI \leq -0.5$ （强拮抗，风险可忽略）、 $-0.5 < MTI \leq -0.2$ （弱拮抗，低风险）、 $-0.2 < MTI \leq 0.2$ （加和效应，中等风险）、 $0.2 < MTI \leq 0.5$ （弱协同，高风险）、 $MTI > 0.5$ （强协同，极高风险），并对应差异化管控措施（从常规监测到禁止释放）。

TU法：

$$\sum TU = \sum_{i=1}^n \frac{c_i}{EC_{50i}} \quad \dots\dots\dots (A.6)$$

式中：

TU——毒性单位；

c_i ——污染物i的实测环境浓度；

EC_{50i} ——污染物i的半数效应浓度。

分级标准： $\sum TU < 0.3$ 为可忽略风险（无显著效应）； $0.3 \leq \sum TU < 1$ 为低风险（亚致死效应）； $\sum TU = 1$ 对应中等风险（ EC_{50} 效应水平）； $1 < \sum TU < 10$ 为高风险（显著毒性）； $\sum TU \geq 10$ 则为极高风险（剧毒效应）。该模型适用于作用机制相同的污染物（如多种重金属），能快速提供保守的风险评估结果，但需注意高浓度时可能低估实际毒性，必要时应结合生物测试验证。典型应用包括养殖废水中同类重金属的联合毒性筛查，并根据 $\sum TU$ 值采取从常规监测到禁止释放的分级管控措施。

IA模型：

$$E_{total} = 1 - \prod_{i=1}^n (1 - E_i) \quad \dots\dots\dots (A.7)$$

式中：

E_i ——第i种污染物在测试浓度下的独立效应值（ $0 \leq E_i \leq 1$ ），当 E_i 采用死亡率时，公式退化为经典概率模型。

分级标准：混合效应值 $E_{total} < 0.3$ 为可忽略风险（无显著影响）； $0.3 \leq E_{total} < 0.5$ 为低风险（轻微效应）； $E_{total} = 0.5$ 对应中等风险（半数效应水平）； $0.5 < E_{total} < 0.7$ 为高风险（显著毒性）； $E_{total} \geq 0.7$ 则为极高风险（强烈毒性效应）。该模型适用于作用机制不同且相互独立的污染物（如有机污染物+重金属），能更精准反映多途径毒性作用的叠加效果，但需通过实验获取各污染物的单独效应数据（ E_i ）。

9 养殖环境毒害物质关键致毒物识别

9.1 养殖环境毒害物质关键致毒物识别

9.1 贡献率法

计算各污染物的RQ占ΣRQ的比例，贡献率最大的污染物可识别为关键致毒物。

$$\text{贡献率} = \frac{RQ_i}{\sum RQ} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (A.8)$$

9.2 TU法

计算各污染物的ΣTU，TU最大者通常为关键致毒物。

9.3 消除法

通过比较消除某一污染物前后总风险商的变化幅度，变化幅度最大的污染物即为关键致毒物。

10 不确定性分析

应分析评估过程中各环节可能存在的不确定性来源及其对评估结果的影响，主要包括：

- a)、暴露表征不确定性：采样代表性、分析测试误差、时空变异、生物可利用度估算等。
 - b)、效应表征不确定性：毒性数据外推（从实验室到野外、从单一物种到群落）、评估因子选择、复合效应模型选择等。
 - c)、参数不确定性：模型输入参数的不确定性。
- 可采用定性描述或定量方法（如蒙特卡洛模拟）进行不确定性分析。

11 报告编制

风险评估报告应结构清晰、数据翔实、结论明确。报告内容至少应包括：

- a)、项目背景与评估目标；
- b)、评估范围与边界；
- c)、评估方法与技术路线；
- d)、数据来源与分析结果（暴露与效应）；
- e)、风险表征结果与关键致毒物识别；
- f)、不确定性分析；
- g)、风险评估结论与建议；
- h)、参考文献。

附 录 A

(规范性或资料性)

养殖环境毒害物质鉴别评估方法

A.1 养殖环境中毒害物质鉴别评估程序

养殖环境中毒害物质的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，具体流程如下。

a)、毒性初筛

采集养殖废弃物样品，进行毒性测试，判断样品是否具有毒性。若无毒性，终止实验；若具有毒性，则进入毒性表征阶段。

b)、毒性表征

通过不同的物理、化学和生物处理手段（如沸石处理、阳离子交换树脂处理或颗粒活性炭处理）对样品进行表征，识别主要的毒性来源。判断处理后毒性是否显著降低，若毒性降低，则进入毒性鉴别阶段；否则，判定该类物质不是主要致毒物质。

c)、毒性鉴别

采用化学分析方法，结合毒性效应和生物有效性测定，明确毒性物质的具体成分，包括重金属和有机污染物等。

d)、毒性确认

根据毒性鉴别结果，综合评估并确认主要的关键致毒物质信息，为后续的风险评估和污染控制提供依据。

A.2 毒性初筛

A.2.1 选择研究位点

利用养殖废弃物毒性测试对废弃物进行筛查，对表现出毒性的样品进一步开展毒性鉴别评估。根据废弃物污染特征，选择合适的模式生物（如蚯蚓或微生物）及毒性终点。参考 EPA 指南，可选择蚯蚓为模式生物，进行 14 天毒性实验，以生长抑制率或死亡率作为毒性终点。

A.2.2 具体步骤

A.2.2.1 样品预处理

a)、将养殖废弃物样品进行充分混匀，按一定比例分装到培养容器中；

b)、每个容器中加入 60 g 湿废弃物样品，并混入 250 mL 中性土壤作为介质；

c)、样品混合后，静置过夜，用于毒性测试。

A. 2. 2. 2 毒性测试

a)、在恒温培养箱中开展实验，温度控制在 $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，湿度保持在 60%~80%；

b)、向每个容器中加入模式生物（如 10 只蚯蚓或微生物菌群）；

c)、实验周期为 14 天，期间定期监测生物的存活情况、体重变化及行为反应；

d)、实验开始和结束时分别采集样品，检测关键污染物（如氨氮、重金属）的含量，以及水分、pH、溶解氧等参数。

A. 2. 2. 3 数据记录与分析

a)、记录模式生物的死亡数量、生长抑制率或其他毒性反应指标；

b)、根据结果判断样品是否具有毒性。无毒性的样品实验结束，有毒性的样品进入毒性表征阶段。

A. 3 毒性表征

A. 3. 1 方法概述

参考 EPA/600/R-07/080，通过添加不同处理剂改变废弃物中某类污染物的毒性，从而推断引起毒性的主要污染物类别。重点关注的污染物包括抗生素、激素、农药、消毒副产物、重金属等，其处理方式分别为加入活性炭、阳离子交换树脂和沸石等材料。对处理前后的样品进行生物毒性测试，通过对比毒性变化，确定致毒物类别。

A. 3. 2 实验材料预处理

A. 3. 2. 1 活性炭预处理

a)、粉碎：将椰壳活性炭粉碎至 80 目~325 目；

b)、清洗：用纯水超声清洗 3 次，去除杂质；

c)、脱气：用真空泵脱气处理，避光保存于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

A. 3. 2. 2 阳离子交换树脂预处理

a)、风干：将树脂风干 24 小时；

b)、清洗：依次使用乙醇溶液、盐酸溶液及纯水超声清洗，调整 pH 值至 7~8；

c)、储存：将处理后的树脂置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光保存，使用前用纯水激活。

A. 3. 2. 3 沸石预处理

- a)、粉碎：将沸石粉碎至 80 目~325 目；
- b)、清洗：用纯水超声清洗 3 次；
- c)、储存：处理后的沸石置于 4 °C保存，使用前再次超声处理。

A. 3. 3 生物毒性测试

- a)、将预处理的废弃物分别加入处理剂（活性炭、树脂、沸石）；
- b)、按前述毒性初筛的方法进行毒性测试；
- c)、对比处理前后的毒性变化，若毒性降低，则推断该污染物类别为致毒物；若毒性无明显变化，则排除该污染物类别。

A. 3. 3 毒性测试

A. 3. 3. 1 测试准备

选用蚯蚓（*Eisenia fetida*）作为模式生物，以生长抑制率和死亡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）按预定的处理方法制备后进行毒性测试。具体操作为：

- a)、将预处理后的养殖废弃物样品充分搅拌 3 小时，分装至培养容器（每个容器中加入 60 g 湿废弃物样品）；
- b)、各处理组分别加入质量分数为 10% 的添加剂，并充分混匀后静置 24 小时；
- c)、每个容器中缓慢加入适量去离子水，将废弃物保持在适宜湿度（60%-80%），避免扰动样品；
- d)、在平衡完成后，每个容器中放入 10 只健康的蚯蚓。

对每种处理组均设置两个对照组：

- 过程空白组：向对照样品中加入相同质量分数的洁净细沙；
- 稀释空白组：向废弃物样品中加入相同质量分数的洁净细沙。

同时对未经处理的样品进行毒性测试作为基准对照。

A. 3. 3. 2 测试条件 and 操作

- a)、椰壳活性炭和阳离子交换树脂处理组：
 - 测试为 14 天周期毒性实验；
 - 实验期间每天保持湿度，测量水分、pH 值、氨氮浓度等参数；
 - 每 3 天补充一次饲料（3 g 干燥牛粪/容器）；
 - 记录蚯蚓的体重变化和死亡数量。

b)、沸石处理组:

- 测试为 7 天静态毒性实验;
- 每日监测容器内湿度、pH 值和氨氮含量;
- 每 3 天补充饲料, 并检查样品均匀性。

c)、实验条件:

- 实验期间保持室温恒定在 $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, 湿度为 60%-80%;
- 光照条件为 16 小时光照与 8 小时黑暗交替。

A. 3. 3. 3 数据记录与结果分析

a)、每日记录蚯蚓的生长状况、死亡率和其他行为变化;

b)、对添加剂处理组与对照组进行结果比较, 分析处理后废弃物毒性的变化;

c)、若毒性显著降低, 则表明该处理剂可有效去除致毒物; 若毒性无明显变化, 则排除该污染物类别作为主要致毒物。

通过以上实验, 获得废弃物样品在不同添加剂处理下的毒性变化数据, 为后续的毒性鉴别和致毒物分析提供基础数据支持。

A. 4 毒性鉴别

A. 4. 1 养殖环境中污染物的浓度测定

A. 4. 1. 1 有机污染物的浓度测定

针对养殖环境中的抗生素、激素、农药、消毒副产物等有机污染物, 进行定量分析, 具体步骤如下:

a)、萃取: 称取 5 g 混匀的废弃物样品, 加入 2 g 活化铜粉和 100 mL 萃取溶剂 (正己烷和丙酮, 1:1, v/v), 超声处理 10 分钟。过滤并重复萃取一次, 合并萃取液后, 用氮吹浓缩至 1 mL;

b)、净化: 利用石墨化碳黑/伯仲胺 (GCB/PSA) 或硅胶层析柱进行净化;

c)、仪器分析: 使用气相色谱-质谱联用仪 (GC-MS) 对目标化合物进行定量分析, 参考相关标准操作柱温升温程序。

A. 4. 1. 2 重金属的浓度测定

采用电感耦合等离子体质谱 (ICP-MS) 测定环境中重金属 (如 Cd、Cr、Cu、Pb、Zn) 浓度。

a)、样品处理: 称取 0.2 g 干废弃物样品, 加入 9 mL 浓硝酸和 3 mL 氢氟酸, 微波消解后蒸干;

b)、样品稀释: 用纯水定容至 40 mL, 离心取上清液稀释至 10 mL;

c)、仪器测定：通过 ICP-MS 测定目标重金属浓度。

A. 4. 2 养殖环境中污染物的生物有效浓度测定

A. 4. 2. 1 有机污染物的生物有效浓度测定

推荐使用 Tenax 仿生萃取法，模拟实际环境中污染物的生物有效性。

a)、样品制备：称取 2 g 废弃物，加入 0.5 g Tenax 树脂和 45 mL 中度硬水，振荡萃取 24 小时；

b)、样品回收：收集 Tenax 树脂，利用溶剂萃取有机污染物；

c)、浓缩与测定：将萃取液浓缩后通过 GC-MS 测定。

A. 4. 2. 2 重金属的生物有效浓度测定

采用 BCR 分步萃取法，分别测定废弃物中不同形态重金属的生物有效浓度：

a)、酸可提取态：精确称取1.0 g样品于50 mL离心管中，加入40 mL 0.11 mol/L冰醋酸溶液，在室温下以220 rpm振荡16小时，离心分离后收集上清液。

b)、可还原态：向步骤一的残渣中加入40 mL 0.5 mol/L盐酸羟胺溶液（用硝酸调节至pH=1.5），同条件下振荡16小时，离心后收集上清液。

c)、可氧化态：向步骤二的残渣中加入10 mL 8.8 mol/L过氧化氢溶液，于85 °C水浴中消解1小时（间歇摇动），蒸至近干。冷却后加入50 mL 1.0 mol/L醋酸铵溶液（用硝酸调节至pH=2.0），振荡16小时，离心后收集上清液。

d)、残渣态：将步骤三的最终残渣进行全量消解（采用王水-氢氟酸微波消解法）。

e)、将上述各步骤收集的所有上清液及消解液用0.45 μm滤膜过滤，并用超纯水定容至50.0 mL。

添加 0.11 mol/L 冰醋酸等萃取剂，振荡萃取；使用电感耦合等离子体质谱仪（ICP-MS）精确测定各溶液中目标重金属（如Cd、Pb、As、Cu、Zn等）的浓度。分析过程中需采用内标法（如加入Rh、In、Bi作为内标元素）以校正基体效应和信号漂移，并绘制标准曲线确保定量准确性。

基于BCR连续提取法，通过计算酸可提取态占比及其绝对浓度是否超过环境风险阈值，来综合判定生物有效性高、环境风险显著的关键重金属污染物。

A. 5 毒性确认

对养殖废弃物毒性表征和毒性鉴别的结果进行再确认与分析解释，以确保结果的准确性和可靠性。毒性确认可采用以下方法：

a)、相关性分析：分析污染物浓度与生物毒性终点（如死亡率、生长抑制率）之间的剂量-效应关系，验证污染物对生物毒性的贡献；

b)、加标毒性测试：在废弃物样品中添加已知浓度的关键污染物，观察其毒性变化，通过对比实验进一步确认致毒物的作用；

c)、质量平衡分析：结合化学分析和生物效应测试数据，评估污染物在样品中分布及其毒性贡献，确保毒性表征与化学测定结果的一致性；

d)、重复实验验证：对部分样品进行重复测试，确保实验结果具有一致性和可重复性。

A. 6 质量保证和质量控制

A. 6.1 生物毒性测试的质量控制

a)、空白对照组的模式生物（如蚯蚓或微生物）存活率应在 80%以上；

b)、测试过程中定期监测环境参数（如温度、pH 值、溶解氧浓度）并确保其在适宜范围内；

c)、设置平行样品，确保毒性测试结果的精密性。

A. 6.2 化学分析的质量控制

a)、每处理 10~20 个样品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；

b)、在所有样品中加入回收率指示物，以评估分析结果的准确性和精密度；

c)、要求基质加标样品中目标污染物的回收率及回收率指示物的回收率在 50%-150%范围内；

d)、确保基质空白样品中无目标污染物或杂质干扰。

A. 6.3 仪器分析的质量控制

a)、每间隔 10 个样品测试一次已知浓度的标准样品，以检测仪器的稳定性；

b)、确保仪器分析中目标化合物浓度的偏差不超过 $\pm 20\%$ ；

c)、在仪器测定中定期校准，并记录校准结果，确保数据的准确性；

d)、进行重复样品的检测，确保分析结果的一致性和重现性。

通过上述毒性确认和质量保证与质量控制措施，能够确保养殖废弃物毒性分析结果的科学性、可靠性和可追溯性，为污染控制和风险管理提供高质量的数据支持。

附 录 B

（规范性或资料性） 养殖环境中毒害物质鉴别评估方法

B.1 效应导向分析方法程序

效应导向分析（Effect Directed Analysis, EDA）方法程序旨在通过系统化的步骤，结合化学分析和生物效应测试，识别环境中主要致毒污染物。其方法程序包括污染物的萃取、毒性测试、组分分离、致毒污染物识别和毒性确认，具体步骤如下所示。

a)、污染物的萃取

从环境或养殖废弃物中采集样品，通过添加适宜的溶剂或仿生萃取技术，将污染物从介质中提取出来，获得含目标污染物的有效提取液，为后续测试提供基础。

b)、毒性测试

对提取液进行初筛毒性测试，结合生物指标（如存活率、生长抑制率等）判断提取液是否具有生物毒性。若提取液无毒性，实验终止；若具有毒性，则进入下一步。

c)、组分分离

对具有毒性的提取液进行组分分离，采用如液-液萃取、层析分离等技术，将复杂混合物分解为多个单一或简单化的化学组分。对分离后的每一组分再次进行毒性测试，判定是否具有毒性。

- 若组分无毒性，实验终止；
- 若组分仍具有毒性，需判断毒性来源是否由单一组分或组分间相互作用引起。复杂组分需进一步分离或处理。

d)、致毒污染物识别

结合目标污染物筛查和非目标化合物鉴定，对毒性组分进行化学分析，明确可能的致毒物质类型和具体化合物。建立污染物与毒性效应的剂量 - 效应关系模型，为致毒物的风险评估提供数据支持。

e)、毒性确认

通过加标实验、相关性分析或质量平衡法验证致毒物质的效应贡献，最终确认关键致毒物质，并获取其毒性作用的明确信息。

B.2 污染物的萃取

推荐使用的萃取方法有仿生萃取法和耗竭式萃取法。

B.3 毒性测试

B.3.1 毒性测试概述

通过选择合适的受试生物和毒性终点，将萃取液或分离组分加入到暴露体系中进行毒性测试。测试目标为判断萃取液或组分是否具有生物效应，以指导后续的组分分离与关键污染物识别。

B.3.2 受试生物和毒性终点

毒性测试根据受试生物类别分为活体生物测试和离体细胞测试：

a)、活体生物毒性测试方法

- 受试生物：选择蚯蚓或其他适宜的模式生物；
- 测试终点：生物存活率、行为变化（如运动减弱）、生长抑制或亚致死毒性终点；
- 实验条件：将萃取液或分离组分溶于二甲基亚砜（DMSO），加标至最大浓度不超过 0.25%；在恒温（ $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ）和湿度（60%-80%）条件下进行实验，光照比为 16 小时光照：8 小时黑暗；
- 操作：设置对照组与加标组，将模式生物置于暴露体系中，观察 14 天，并记录相关毒性终点数据。

b)、离体细胞毒性测试方法

- 测试方法：采用 CCK-8 法，通过检测吸光度计算细胞活性；
- 步骤：
 - 细胞种板：使用稳定传代细胞，将细胞悬液按每孔 2.5×10^5 个至 10^6 个的数量加至 96 孔板中，在 37°C 、5% CO_2 的条件下培养 12 小时以上；
 - 细胞染毒：配制萃取液或组分的加标培养液，将原培养液吸出后，加入加标培养液染毒 12 至 24 小时；
 - 染色与测定：用 PBS 缓冲液清洗细胞 2 次，加入 100 μL 不含胎牛血清的培养液和 10 μL CCK-8 试剂，孵育 1 至 4 小时，在 450 nm 波长测量吸光度，计算细胞活性。

B.3.3 加标方法

- a)、主动加标：直接将萃取液或分离组分加入暴露体系中，适用于水溶性污染物；
- b)、被动加标：针对疏水性污染物，避免容器壁吸附影响浓度，通过 PDMS 膜加载萃取液或组分维持暴露浓度：
 - 步骤：将污染物溶于甲醇后加入 PDMS 膜，在水平摇床（220 rpm）上加载 48 小时，每 2 小时补充纯水。
 - 后处理：用纯水淋洗 PDMS 膜，去除甲醇后放入暴露体系中磁力搅拌 48 小时完成加标。

通过毒性测试，可有效评估萃取液或分离组分的生物效应，为污染物识别与风险评估提供数据支持。

B.4 组分分离方法

组分分离采用色谱分离技术。

B.5 关键致毒物识别方法

通过色谱分析与现有的典型的抗生素谱图（如四环素类、喹诺酮类和磺胺类等）进行对比，识别出关键的抗生素类型。利用 ICP-MS 测试出重金属含量。

B.6 毒性确认方法

通过以下步骤确认关键致毒物的毒性贡献：

a)、相关性分析

分析致毒组分的生物效应与污染物毒性单位（TU）的相关性，筛选显著相关的污染物作为疑似致毒物。

b)、标准品验证

利用疑似致毒物的标准品开展独立毒性测试，量化其毒性贡献，验证其致毒作用。

c)、阻断剂或增效剂验证

在样品中添加疑似致毒物的效应阻断剂或增效剂，观察其对毒性效应的影响。通过对比添加前后的毒性变化，进一步确认该物质的毒性贡献。

上述方法有助于精准识别和验证养殖废弃物中的关键致毒物，为后续风险评估和污染防控提供科学依据。

参考文献

- [1] 杨珍珍, 李红娜. 农业环境中抗生素风险评估的研究进展[J]. 环境科学, 2023, 45(6): 3469-3482
- [2] 李红娜, 吴华山, 耿兵, 朱昌雄. 我国畜禽养殖污染防治瓶颈问题及对策建议[J]. 环境工程技术学报, 2020, 10(2): 167-172
- [3] 安婧, 丁子明, 高程程, 胡芳雨, 魏树和. 畜禽粪便污染的环境风险与资源化处理技术分析[J]. 环境科学, 2023, 44(8): 4000-4012
- [4] 吴浩伟, 孙晓琪, 梁博文, 陈家斌, 周雪飞. 我国畜禽粪便污染现状及处理与资源化利用分析[J]. 农业环境科学学报, 2020, 39(6): 1200-1208
- [5] 吴碧珠. 我国畜禽养殖废弃物资源化利用现状及建议[J]. 福建农业科技, 2020, (12): 20-23
- [6] 李晓东, 王丽丽, 王志伟, 李晓东. 基于文献计量的畜禽养殖废弃物新污染物研究态势分析[J]. 农业环境科学学报, 2021, 40(11): 2351-2360
-