

ICS 0

CCS 点击此处添加 CCS 号

DB 51

四川省地方标准

DB XX/T XXXX—XXXX

抗生素环境耐药风险调查技术规范

Technical specification for investigation of environmental resistance risk of antibiotics

(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX – XX – XX 发布

XXXX – XX – XX 实施

四川省生态环境厅
四川省市场监督管理局 发布

目 次

前言 II

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 调查基本原则 3

5 工作程序 3

6 环境信息详查 4

7 样品采集和分析测试 5

8 质量保证与控制 6

9 成果集成 7

附录 A （资料性） 抗生素类化学物质 8

附录 B （资料性） 现场踏勘内容和方法 10

附录 C （资料性） 各调查对象布点原则 11

附录 D （规范性） 采样数量和采样频次 12

附录 E （资料性） 现场采样记录表 14

附录 F （资料性） 样品交接记录表 16

附录 G （资料性） 最小选择性浓度（MSC）的测定方法 17

附录 H （资料性） 定量 PCR 测定基因丰度 19

附录 I （资料性） 常见抗生素种类对应的抗生素抗性基因种类 20

参考文献 21

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。

本文件由四川省生态环境厅提出、归口、解释并组织实施。

本文件起草单位：四川省固体废物与化学品管理中心、中国测试技术研究院、四川省细菌耐药监测中心、四川省农业生态资源保护中心、成都大学

本文件主要起草人：

抗生素环境耐药风险调查技术规范

1 范围

本文件规定了抗生素环境耐药风险调查的原则、程序、内容和技术要求。

本文件适用于四川省抗生素环境耐药风险调查工作,为开展抗生素环境危害评估和风险管控提供基础数据、信息和方法。

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 4789.28 | 食品安全国家标准 食品微生物检验 培养基和试剂的质量要求 |
| GB/T 5750.2 | 生活饮用水标准检验方法 第2部分:水样的采集与保存 |
| GB/T 5750.12 | 生活饮用水标准检验方法 第12部分:微生物指标 |
| GB 19489 | 实验室生物安全通用要求 |
| GB/T 27405 | 实验室质量控制规范 食品微生物检测 |
| GB/T 27417 | 合格评定 化学分析方法确认和验证指南 |
| GB/T 30989 | 高通量基因测序技术规程 |
| GB/T 35537 | 高通量基因测序结果评价要求 |
| GB/T 37875 | 核酸提取纯化试剂盒质量评价技术规范 |
| GB/T 40226 | 环境微生物宏基因组检测 高通量测序法 |
| GB/T 40974 | 核酸样本质量评价方法 |
| GB/T 43429 | 人感染病原微生物与样本保藏通用要求 |
| HJ 91.1 | 污水监测技术规范 |
| HJ 91.2 | 地表水环境质量监测技术规范 |
| HJ 164 | 地下水环境监测技术规范 |
| HJ/T 166 | 土壤环境监测技术规范 |
| HJ 168 | 环境监测分析方法标准制订技术导则 |
| HJ 493 | 水质 样品的保存和管理技术规定 |
| HJ 494 | 水质 采样技术指导 |
| HJ 630 | 环境监测质量管理技术导则 |
| HJ 964 | 环境影响评价技术导则土壤环境(试行) |
| WS/T 639 | 抗菌药物敏感性试验的技术要求 |

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

抗生素 antibiotic

由某些微生物产生的或者人工合成的类似物,对某些其他微生物具有抑制或杀灭作用的一类化学物质。

3.2

抗生素残留 antibiotic residues

抗生素在生产、流通、使用等过程中,通过废水、废渣等途径进入水体、土壤等自然环境,并在环境中持续存在或积累的抗生素类化学残留物。

3.3

抗生素耐药性 antibiotic resistance

微生物固有或外源获得的,能够使其在抗生素达到杀菌或抑菌浓度时仍能存活或繁殖的特性。

3.4

抗微生物药物敏感性试验 antimicrobial susceptibility test

微生物对抗生素等抗微生物药物的体外敏感性,以指导临床合理选用药物的微生物学试验,简称药敏试验。

3.5

最低抑菌浓度 minimal inhibitory concentration, MIC

在采用稀释法测定药物敏感性的试验中,能抑制微生物生长的最低抗生素浓度,简称MIC。

3.6

最小选择性浓度 minimum selective concentration, MSC

抗生素暴露导致抗生素耐药性提高的浓度阈值,高于该数值时具有耐药性的细菌被选择性富集,简称MSC。

3.7

抗生素抗性基因 antibiotic resistance genes, ARGs

在水体、土壤等环境中,微生物在抗生素选择压力作用下,通过基因突变或从外界获得耐药质粒,引起微生物产生抗生素耐药性,使现有抗生素的敏感性降低。

3.8

环境耐药 environmental resistance

在一定的抗生素浓度下,导致环境微生物产生抗生素耐药性,即表示该环境存在耐药性。

3.9

环境耐药特征 environmental resistance characteristics

环境微生物对抗生素产生环境耐药的表征,包含环境微生物在不同抗生素浓度下的生长变化等情况。

3.10

环境耐药风险 environmental resistance risk

在具有环境耐药的环境中,由于环境抗生素暴露造成的出现抗生素耐药性、抗生素抗性基因传播速率提升或传播范围增大等危害。

3.11

抗生素环境排放源 environmental emission source of antibiotic

向环境中排放抗生素的设备、装置、场所等。

3.12

风险汇集区 pollution concentration area

由于人类活动或自然过程,抗生素在该区域内相对集中、累积或滞留,存在环境耐药风险的区域。

4 调查基本原则

4.1 科学性原则

基于科学的调查方法和技术手段，对抗生素环境排放状况、环境残留状况、环境微生物耐药状况等开展系统调查，保障调查结果的真实性、准确性、时效性。

4.2 代表性原则

在选择调查区域、采样点位、采样时间、采样方法等方面，应确保获取的数据和信息能够真实、准确反映目标区域抗生素环境残留状况和环境耐药特征，减少偏差和误差，提高调查结果的可靠性和适用性。

4.3 可行性原则

综合考虑调查时间、方法、人员等因素，结合当前科技发展和专业技术水平，保证调查工作的切实可行。

5 工作程序

抗生素环境耐药风险调查的工作分为：环境信息详查、布点调查与分析测试、成果集成三个环节，其工作程序图见图1。

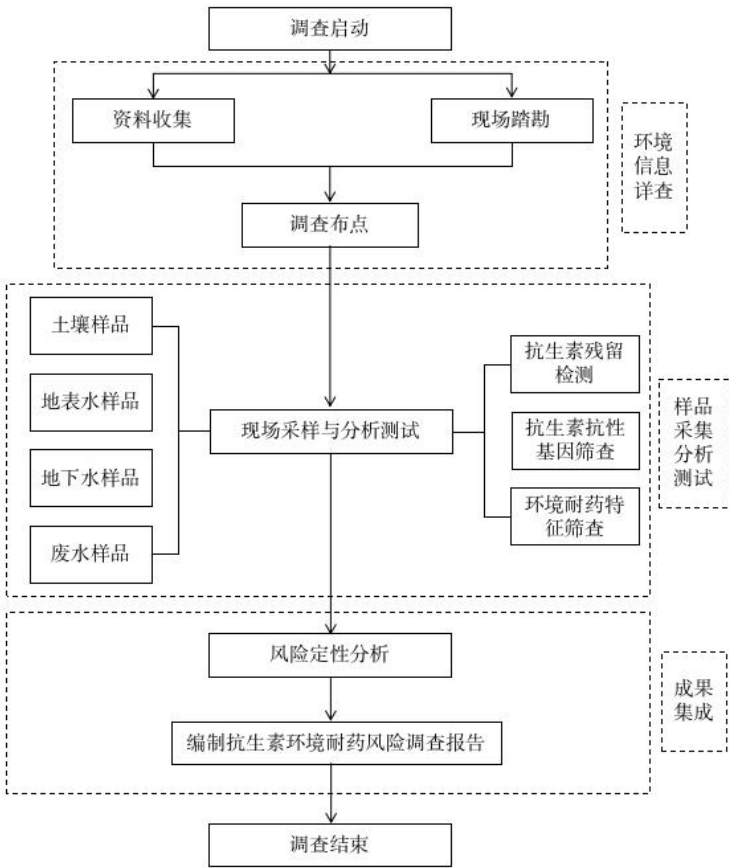


图1 抗生素环境耐药风险调查工作程序图

6 环境信息详查

6.1 调查对象

6.1.1 抗生素环境排放源

抗菌药物生产企业的废水和废渣收集、暂存、处理等设施，养殖企业、畜禽粪污综合处理企业的废水、沼液、废渣收集、暂存、处理等设施，以上企业所在园区或工业集中区的污水处理厂、城市生活污水处理厂。

6.1.2 风险汇集区

抗生素环境排放源产生含抗生素废水的受纳水体，如地表水或地下水饮用水水源地等；抗生素环境排放源产生含有抗生素废水、沼液、沼渣等的还田区域土壤等；抗生素排放源产生的废弃发酵产物或畜禽粪污堆存处直线最近农用地区域。

6.2 资料收集

6.2.1 自然条件资料：调查对象的地理位置、行政区划、地形地貌、地质条件、水文水系、气候气象等资料。

6.2.2 环境资料：调查对象所在地水资源开发利用状况、土地利用资料、敏感点分布，环境监测数据、环境影响评价报告、建设项目环境竣工验收报告、地勘报告、饮用水水源保护区规划等资料。重点关注抗生素环境排放源所在企业的建设规模及总平面布置、生产规模及抗生素使用、畜禽粪污接收、生产工艺流程及产排污、污染治理设施及污染物处理等情况（含污染物排放时间、方式、去向、频率等）；风险汇集区的位置及其周边情况。

6.3 现场踏勘

结合资料收集情况，重点针对抗生素环境排放源和风险汇集区的环境概况、采样条件等开展现场踏勘。饮用水水源地的抗生素调查种类应覆盖附录 A 表 A.1 中的全部抗生素；根据现场踏勘情况，抗生素环境排放源及其他风险汇集区的抗生素调查种类在附录 A 表 A.1 中选择确定。具体踏勘内容和方法可参考附录 B。

6.4 调查布点

6.4.1 布点位置

地表水、地下水、废水和土壤的调查点位设置原则和方法按照 HJ 91.1、HJ 91.2、HJ 164、HJ/T166 和 HJ 964 相关规定，结合初步调查结果，进行优化。

- a) 地表水点位设置：地表水饮用水水源地应设置在取水口和自来水厂配水井。
- b) 地下水点位设置：地下水饮用水水源地应设置在取水口和自来水厂配水井。
- c) 废水点位设置：对于直接排放的企业，在企业的总排口设置监测点位；对于间接排放的企业或园区时，在企业或园区污水集中处理设施收集池、曝气池、总排放口设置监测点位；抗生素生产企业还应在抗生素生产车间外的废水收集池（若有）设置监测点位；生活污水处理厂在处理设施收集池、曝气池、总排放口设置监测点位；养殖企业或其下游畜禽粪污综合处理企业（有机肥厂）在沼液（废水）收集池设置监测点位；水产养殖企业在厂区废水总排口设置监测点位。

- d) 土壤点位设置：在生物发酵类抗生素原料药生产企业废弃发酵产物（如：菌丝渣）堆存点周边设置监测点位；在养殖企业或其下游畜禽粪污综合处理企业（有机肥厂）沼液、粪便污水混合物等还田区域设置监测点位。

6.4.2 布点原则

各调查对象布点数量设置参见附录 C，具体数量可结合现场调查情况适当调整。

6.4.3 采样数量和采样频次

用于抗生素环境残留检测的采样数量要求应符合附录 D.1.1，用于环境耐药特征筛查和抗生素抗性基因筛查的采样数量要求应符合附录 D.1.2，各类样品的采样频次要求应符合附录 D.2。

7 样品采集和分析测试

7.1 调查检测指标

7.1.1 抗生素残留检测

对地表水、地下水、废水、土壤样品中的抗生素残留浓度分析测试。

7.1.2 抗生素抗性基因筛查

选用高通量测序技术对地表水、地下水、废水、土壤样品中环境微生物的抗生素抗性基因进行筛查分析，识别附录A表A.1中相关抗生素种类的对应抗生素抗性基因，分析其种类、丰度和分布情况。

7.1.3 环境耐药特征筛查

在地表水、地下水、废水、土壤样品中分离大肠埃希氏菌和肠球菌作为指示菌，开展抗微生物药物敏感性试验，分析细菌药物敏感性得到MIC值；开展微宇宙试验，分离待测样品中微生物群落，加入适量营养和抗生素进行培养，测定培养前后抗生素抗性基因的丰度，计算引起抗生素抗性基因丰度提高的抗生素浓度，得到该样品微生物的MSC值。

7.2 样品采集

7.2.1 器具要求

按照GB/T 5750.2、HJ 164、HJ/T 166、HJ 493、HJ 494、HJ 964等标准的相关规定，配备符合要求的采样设备、容器、包装材料和辅助材料等，使用前应按要求清洗设备与容器。

7.2.2 采样要求

- a) 按照《检验检测机构资质认定生态环境监测机构评审补充要求》要求，现场应至少有 2 名采样人员在场；采样人员需具有环境、土壤等相关专业知识，熟悉采样流程，掌握土壤和水质采样的技术要求和相关设备的操作方法。
- b) 用于环境抗生素残留检测的样品采集按照 HJ 91.1、HJ 91.2、HJ 164、HJ/T 166、HJ 964 执行。
- c) 用于抗生素抗性基因和环境耐药特征筛查的水体样品采集，应根据水体不同的浊度，使用无菌器材采集 4L~200L 不等的水样。采集好的水样需通过滤膜进行过滤，可选择不同孔径大小的滤膜，如 20 μ m、3 μ m、0.8 μ m、0.4 μ m、0.2 μ m、0.1 μ m 等孔径滤膜。样品过滤后的滤膜放置于对应的无菌容器中。用于环境耐药特征筛查的，应立即置于存于 4℃或 4℃以下环境（如冰盒）。

用于抗生素抗性基因筛查的，应置于干冰或-80℃保存。若不能即刻转移，可暂存于 4℃或 4℃以下环境（如冰盒），120 分钟内转移至干冰-80℃保存。

- d) 用于抗生素抗性基因和环境耐药特征筛查的土壤样品采集，应按照 HJ/T 166、HJ 964 规定采集样品，做好标记，装入灭菌封口聚乙烯袋或其他无菌容器。采集样品后，用于环境耐药特征筛查的样品应立即置于存于 4℃或 4℃以下环境。用于抗生素抗性基因筛查的样品应置于干冰或-80℃保存。若不能即刻转移，可暂存于 4℃或 4℃以下环境，120 分钟内转移至干冰或-80℃保存。
- e) 现场样品采集后应及时采取加冷藏、避光、密封、防震等保护措施，保证样品在保存、运输过程中性状稳定，填写采样记录表（参见附录 E 表 E.1 和表 E.2），现场张贴样品标签标识。采集的样品原则上 24 小时内应送往实验室处理（标准另有规定的除外）。样品交接时，应对样品的时效性、完整性和保存条件进行检查，交接的每一步都按要求填写样品交接记录表（参见附录 F 表 F.1），避免样品错乱或遗失。

7.3 分析测试

- a) 用于抗生素环境残留检测所采集的样品应单独测试。用于环境耐药特征、抗生素抗性基因筛查筛查所采集的样品可混合后测试混合样，样品混合比例应符合附录 D.1.2 要求。
- b) 抗生素环境残留检测方法宜按照 HJ 1399、HJ 1398、NY/T 3787 等标准进行分析。对于无相关分析标准的，或现有方法标准无法满足检测要求的，参考 HJ 168 建立作业指导书，验证通过后方可执行。
- c) 采用高通量测序技术进行抗生素抗性基因筛查，样品中微生物种类和对应抗生素抗性基因的丰度的检测方法宜按照 GB/T 40226 中规定的试验步骤进行。
- d) 抗微生物药物敏感性试验方法宜按照 WS/T 639 中规定的方法进行。
- e) 微宇宙试验方法宜按照本文件附录 G 执行。

8 质量保证与控制

8.1 调查数据采集质量控制

审核搜集的各类资料信息、现场踏勘照片、人员访谈资料、环境监测数据以及编写的环境信息详查总结报告，初步评判是否足以支撑四川省抗生素环境耐药风险调查工作；审核样品采集过程中的采样位置、采样数量等是否符合本文件实验室质量控制要求。

8.2 实验室质量控制

8.2.1 抗生素残留检测质量控制

- a) 样品采集、保存、运输的质量控制，宜按照 HJ 91.1、HJ 91.2、HJ 164、HJ/T 166、HJ 493、HJ 494、HJ 964 以及本文件 7.3 部分的规定执行。
- b) 实验室分析的质量控制宜按照 GB/T 27417、HJ 168、HJ 630 以及相关检测标准或作业指导书中的质量控制要求执行。

8.2.2 环境耐药特征和抗生素抗性基因筛查质量控制

- a) 按照 GB/T 5750.2、HJ 164、HJ/T 166、HJ 494 以及本文件 7.3 部分的规定，科学采集、保存、运输土壤和水质样品。

- b) 按照 GB 4789.28、GB/T 5750.12、GB 19489、GB/T 27405、GB/T 30989、GB/T 35537、GB/T 37875、GB/T 40974 以及本文件附录 G 的质量控制要求开展细菌分离、纯化、抗微生物药物敏感性试验、微宇宙试验以及抗生素抗性基因筛查。
- c) 为保证环境耐药特征数据可追溯性及抗性基因数据复核需求，所有地表水、地下水、废水、土壤样品分离所得的指示菌，宜按照 GB/T 43429 对菌株信息及样本进行收录和保藏。

9 成果集成

9.1 风险定性分析

根据抗生素残留检测、抗生素抗性基因筛查情况，结合MIC、MSC测试结果，按照表1进行环境耐药风险定性分析。以每个调查对象为分析单元进行风险定性分析。

表 1 环境耐药风险定性分析

| 情形 | 分析依据 | 分析结果 |
|----|---------------------------------------|------------|
| 1 | 抗生素残留检测的最高浓度高于MIC | 存在一定环境耐药风险 |
| 2 | 抗生素残留检测出的最高浓度介于MSC至MIC之间，检出对应抗生素抗性基因 | 存在一定环境耐药风险 |
| 3 | 抗生素残留检测出的最高浓度介于MSC至MIC之间，未检出对应抗生素抗性基因 | 环境耐药风险较低 |
| 4 | 抗生素残留浓度低于MSC | 环境耐药风险较低 |

9.2 报告编制

- a) 调查对象基本情况，包含区域概况等；
- b) 调查内容，包含抗生素种类选取、调查布点情况等；
- c) 结果与分析，包含质量控制和质量保证措施等；
- d) 风险定性分析；
- e) 调查结论与建议。

附 录 A
(资料性)
抗生素类化学物质

表 A.1 抗生素种类

| 序号 | 抗生素大类 | 抗生素名称 | CAS 号 |
|----|--------|---------|-------------|
| 1 | 磺胺类 | 磺胺间甲氧嘧啶 | 1220-83-3 |
| | | 磺胺二甲嘧啶 | 57-68-1 |
| | | 磺胺嘧啶 | 68-35-9 |
| | | 磺胺甲嘧啶 | 127-79-7 |
| | | 甲氧苄啶 | 738-70-5 |
| | | 磺胺甲噻唑 | 144-82-1 |
| | | 磺胺甲氧嗪 | 80-35-3 |
| | | 磺胺甲恶唑 | 723-46-6 |
| | | 磺胺喹喔啉 | 59-40-5 |
| | | 磺胺异恶唑 | 127-69-5 |
| | | 甲氧苄啶 | 738-70-5 |
| 2 | 四环素类 | 多西环素 | 564-25-0 |
| | | 金霉素 | 57-62-5 |
| | | 土霉素 | 79-57-2 |
| | | 四环素 | 60-54-8 |
| 3 | 氟喹诺酮类 | 恩诺沙星 | 93106-60-6 |
| | | 氟甲喹 | 42835-25-6 |
| | | 环丙沙星 | 85721-33-1 |
| | | 诺氟沙星 | 70458-96-7 |
| | | 氧氟沙星 | 82419-36-1 |
| | | 依诺沙星 | 74011-58-8 |
| 4 | 大环内酯类 | 罗红霉素 | 80214-83-1 |
| | | 替米考星 | 108050-54-0 |
| | | 泰乐菌素 | 1401-69-0 |
| | | 阿奇霉素 | 83905-01-5 |
| | | 红霉素 | 114-07-8 |
| | | 泰利霉素 | 191114-48-4 |
| 5 | β-内酰胺类 | 阿莫西林 | 26787-78-0 |

| | | | |
|----|--------|---|-------------|
| | | 青霉素 G | 61-33-6 |
| | | 头孢噻肟 | 63527-52-6 |
| | | 头孢曲松 | 73384-59-5 |
| | | 头孢拉定 | 38821-53-3 |
| | | 头孢克肟 | 79350-37-1 |
| | | 青霉素 V | 87-08-1 |
| | | 头孢氨苄 | 15686-71-2 |
| | | 氨苄西林 | 69-53-4 |
| | | 头孢噻吩 | 80370-57-6 |
| | | 头孢西丁 | 35607-66-0 |
| | | 头孢他啶 | 72558-82-8 |
| | | 美罗培南 | 96036-03-2 |
| 6 | 酰胺醇类 | 氟苯尼考 | 73231-34-2 |
| | | 氯霉素 | 56-75-7 |
| 7 | 林可胺类 | 克林霉素 | 18323-44-9 |
| | | 林可霉素 | 154-21-2 |
| 8 | 糖肽类 | 万古霉素 | 1404-90-6 |
| | | 替考拉宁 | 61036-62-2 |
| 9 | 多肽类 | 多粘菌素 B | 1404-26-8 |
| | | 粘菌素 | 1066-17-7 |
| 10 | 氨基糖苷类 | 庆大霉素 | 1403-66-3 |
| | | 安普霉素 | 37321-09-8 |
| | | 大观霉素 | 1695-77-8 |
| 11 | 截短侧耳素类 | 泰妙菌素 | 55297-95-5 |
| 12 | 恶唑烷酮类 | 利奈唑胺 | 165800-03-3 |
| 13 | 其他类 | 炔丙醇 | 107-19-7 |
| | | 非那西丁 | 62-44-2 |
| | | 4-甲基-2-硫尿嘧啶 | 56-04-2 |
| | | 5,5-二苯基乙内酰脲(苯妥英) | 57-41-0 |
| | | (±)-顺-1-乙酰基-4-[4-[2-(2,4-二氯苯基)-2-(1H-咪唑-1-甲基)-1,3-二氧戊-4-环基]甲氧基]苯基]哌嗪(酮康唑) | 65277-42-1 |
| | | 5-氟-2,4(1H,3H)-嘧啶二酮 | 51-21-8 |
| | | 乙酰甲喹 | 13297-17-1 |

附录 B

（资料性）

现场踏勘内容和方法

B.1 现场踏勘的范围

企业以规划用地红线及其周边 1 km 范围为调查边界；饮用水水源地以一、二级保护区和准保护区为调查边界。

B.2 现场踏勘的内容和方法

现场踏勘的工作内容包括但不限于：调查对象环境概况调查、涉及抗生素种类识别、采样条件调查等。现场踏勘过程中可采用拍照、录像、现场笔记等方式初步判断抗生素排放及迁移状况。

B.2.1 环境概况调查

- a) 抗生素环境排放源所在企业的地理位置信息，观察和记录周边 1km 范围内地表水体、集中式饮用水源保护区或取水口、农用地（种植作物情况，种植类型，是否有果园）等环境敏感点信息。
- b) 重点流域周边河流水系分布，市（州）段流域饮用水水源地取水口位置，抗菌药物生产企业、养殖企业、畜禽粪污综合处理企业（有机肥厂）和县级以上生活污水处理厂排污口信息等情况。
- c) 饮用水水源地周边河流水系、地形地貌、保护区划分；地下水饮用水水源地增加区域水文地质、地下水开采与利用、周边环境调查；饮用水水源地自来水厂取水量、取水方式、供水区域范围等。

B.2.2 抗生素环境排放源识别

- a) 抗菌药物生产企业产品、规模、原辅材料等信息、生产工艺、产排污情况、固危废处置情况等。
- b) 规模养殖企业生产规模、养殖方式，兽药的种类、使用量及使用频率，企业产排污情况，禽粪污还田量、还田次数、还田距离等情况。
- c) 城市生活污水处理厂服务范围、进水水量、处理规模、工艺流程、处理效率等，废水日排放量、排放方式、排放去向、污泥处置情况等。
- d) 饮用水水源地与重点流域（市（州）段）范围内县城以上污水处理厂、垃圾厂以及工业园区等污染源分布、排污口情况、污染物排放，自来水厂取水位置、生产规模、处理和净化工艺、原辅料使用情况、污染治理，国省控断面水质。

B.2.3 采样条件调查

- a) 抗生素环境排放源所在企业周边水体情况、废水进出口、排放入河情况、农灌渠、雨水管网排口情况等，还田区域土壤分布、周边农用地分布及种植情况等。
- b) 饮用水水源地地表水或地下水取水口采样条件、自来水厂配水井情况及其采样条件等。
- c) 其他需要现场核实的情况。

附 录 C
(资料性)
各调查对象布点原则

C.1 饮用水水源地

在饮用水水源地取水口、收集池（若有）和自来水厂配水井等分别设置水样采样点位。若取水口对应多个自来水厂，则每个自来水厂配水井应分别设置地表水采样点位。

C.2 抗菌药物生产企业

选取企业或所在园区废水处理设施收集池、曝气池、总排口等分别设置废水采样点位；若上述选定的布点位置现场不具备采样条件，应根据现有废水处理工艺和排放情况合理布点。

生物发酵类抗生素原料药生产企业还需在废弃发酵产物（如：菌丝渣）堆存点周边设置土壤采样点位，位置应尽可能接近抗生素环境排放源。

C.3 养殖企业或其下游畜禽粪污综合处理企业（有机肥厂）

选取沼液（废水）收集池设置废水采样点位；沼液、粪便污水混合物等还田区域设置土壤采样点位；水产养殖企业在厂区废水总排口设置废水采样点位。

C.4 生活污水处理厂

选取污水处理设施收集池、曝气池、总排口等位置分别设置废水采样点位。

附 录 D
(规范性)
采样数量和采样频次

D.1 采样数量

D.1.1 抗生素残留检测样品

D.1.1.1 饮用水水源地

取水口：在自来水厂总取水口至少采集1个地表水或地下水水样（若1个自来水厂对应多个取水口的，则至少采集1个混合水样，每个取水口所采集水样体积在混合水样体积中占比应基本一致）。

收集池（应急池）：若自来水厂取水口连接有收集池（应急池），则在收集池（应急池）取水处采集1个水样（若有可能有多个取水处），则至少采集1个混合水样，每个取水处所采集水样体积在混合水样体积中占比应基本一致）。

配水井：采集1个水样（若有多处配水井，则至少采集1个混合水样，每个配水井所采集水样体积在混合水样体积中占比应基本一致）。若取水口对应多个自来水厂，则对应的所有自来水厂应各采集1个配水井水样（若某个自来水厂有多处配水井，则至少采集1个混合水样，每个配水井所采集水样体积在混合水样体积中占比应基本一致）。

D.1.1.2 抗菌药物生产企业

a) 废水样品

优先选取企业废水处理设施采样。若企业生产废水不外排，用于企业内部使用（内部循环或企业内部绿化等情形），则将污水处理设施总排水口水样变更为企业或园区雨水管网总排水口、园区污水处理设施总排水口的混合水样。

收集池：布点位于细格栅（或类似工艺）前，包括所有粗格栅、提升泵房、配水池（收集池）采1个混合水样（其中配水池（收集池）占混合水样体积不低于50%）。

曝气池：在企业所有曝气池布点，采集1个混合水样（若有多处曝气池，每个曝气池所采集水样体积在混合水样体积中占比应基本一致）。

总排水口：污水处理设施的总排水口（含排入的溢流池），采集1个处理后的稳定排放时的废水样品。

b) 土壤样品

选取至少1处与企业废弃发酵产物（如：菌丝渣）堆存处直线距离最近的农用地区域采集至少1个土壤样品为1个待测土样。

D.1.1.3 养殖企业或其下游畜禽粪污综合处理企业（有机肥厂）

沼液（废水）收集池：布点位于猪场沼液收集池、鸭场粪污收集池等，采集1个水样或粪便污水混合物（若有多处收集池，则至少采集1个混合水样，每个收集池所采集水样体积在混合水样体积中占比应基本一致）作为待测水样。若鸡场等未设置沼液（废水）收集池，不具备采样条件时，则采集与鸡粪堆存处直线距离最近的农用地区域采集至少1个土壤样品为1个待测土样。

还田区域：选取至少1处与养殖企业直线距离最近的该企业产生的沼液、沼渣、粪便污水混合物（含鸡粪）等还田区域（尽量选取还田量较大的区域），每个区域各采集至少1个土壤样品为1个待测土样。

废水总排水口：选择水产养殖企业的废水总排水口采集至少1个水样。

畜禽粪污综合处理企业（有机肥厂）：在与畜禽粪污堆存处直线距离最近的农用地区域采集至少1个土壤样品为1个待测土样。若有废水产生则按照D.1.1.2采样方式采集废水样品。

D.1.1.4 生活污水处理厂

收集池：布点位于细格栅（或类似工艺）前，包括所有粗格栅、提升泵房、配水池（收集池）采1个混合水样（其中配水池（收集池）占混合水样体积不低于50%）。

曝气池：在企业所有曝气池布点，采集1个混合水样（若有多个曝气池，每个曝气池所采集水样体积在混合水样体积中占比应基本一致）。

总排口：污水处理设施的总排放口（含排入的溢流池），采集1个处理后的稳定排放时的废水样品。

D.1.2 环境耐药特征筛查、抗生素抗性基因筛查样品

D.1.2.1 饮用水水源地

上述饮用水水源地“抗生素残留检测”所有点位水样的混合样品（其中：取水口、收集池、配水井所取水样在该项混合水样中的体积占比应基本一致）。

D.1.2.2 抗菌药物生产企业

上述抗菌药物生产企业“抗生素残留检测”所有点位水样的混合样品（其中：收集池、曝气池、总排口所取水样在该项混合水样中的体积占比依次约为30%、60%、10%）以及所有待测土样。

D.1.2.3 养殖企业或其下游畜禽粪污综合处理企业（有机肥厂）

上述养殖企业“抗生素残留检测”所有待测水样和待测土样，下游畜禽粪污综合处理企业（有机肥厂）所有待测土样，水样按照D.1.2.2进行采集。

D.1.2.4 生活污水处理厂

上述生活污水处理厂“抗生素残留检测”所有点位水样的混合样品（其中：收集池、曝气池、总排口所取水样在该项混合水样中的体积占比依次约为30%、60%、10%）。

D.2 采样频次

饮用水水源地每个采样点位在丰水、枯水期各采集1次样品，企业及周边环境每个采样点位采集1次样品。可结合实际调整。

附 录 E
(资料性)
现场采样记录表

表 E.1 土壤样品采样记录表

| | | | | | | |
|---|------|--|-----------|------|-----|--|
| 样品编号 | | | 经 度 | | 纬 度 | |
| 采样地点 | | | | | | |
| 采样层次 | | | 采样深度/cm | | | |
| 样品描述 | 土壤颜色 | | 植物根系 | | | |
| | 土壤湿度 | | 其他异物 | | | |
| 监测项目 | | | 保存方式（填序号） | | | |
| 采样日期 | | | | 采样人员 | | |
| 注 1：保存方式：①冷藏；②避光； ③标签完好，采取有效减震措施；④其他保存方式直接注明。 | | | | | | |

表 E. 2 水质样品采样记录表

| | | | | | | | | | | | | | | |
|--|----|------|------|------|---------|----|----|----------|-------|----------|------------|-----------|--|--|
| 水体名称 | | | 断面名称 | | 经 度 | | | | | | 断面周边环境描述 | | | |
| | | | | | 纬 度 | | | | | | | | | |
| 采样日期 | | | 天气状况 | | 水面宽度（m） | | | 约 | | | 断面水质表现 | | | |
| 采样人员 | | | | | 深度（m） | | | 约 | | | | | | |
| 采样位置 | | 采样时间 | 样品编号 | 监测项目 | 样品储存容器 | | | 采样体积（ml） | 前处理方式 | 样品状态感官描述 | 保存剂名称（填序号） | 保存方式（填序号） | | |
| 垂线 | 深度 | | | | 材质 | 颜色 | 容量 | | | | | | | |
| | | 时 分 | | | | | | | | | | | | |
| | | 时 分 | | | | | | | | | | | | |
| | | 时 分 | | | | | | | | | | | | |
| | | 时 分 | | | | | | | | | | | | |
| | | 时 分 | | | | | | | | | | | | |
| <p>注 1：断面周边环境：有无排污口、是否死水区/回水区、有无居民区/工业区/农业区等。</p> <p>注 2：天气状况：晴、雨、雪等。</p> <p>注 3：断面水质表现：水体颜色、气味（嗅）、有无悬浮物或泥沙、水面有无油膜、水体有无藻类等。</p> <p>注 4:前处理方式:①静置 30 min;②静置 60 min;③其他前处理方式直接注明。</p> <p>注 5：样品状态感官描述包括：样品颜色、有无沉淀等。</p> <p>注 6：保存剂名称: ①抗坏血酸;②其他保存剂直接注明。</p> <p>注 7：保存方式：①冷藏；②避光；③标签完好，采取有效减震措施；④其他保存方式直接注明。</p> | | | | | | | | | | | | | | |

附 录 F
(资料性)
样品交接记录表

表 F.1 样品交接记录表

| 序号 | 样品编号 | 样品名称 | 样品类别 | 合规性检查 | | | | |
|-------|------|------|------|--------|------|-------|----------|------------|
| | | | | 样品数量记录 | 运送方式 | 样品时效性 | 运送过程温度控制 | 样品标签是否完好整洁 |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| 送样人： | | | | | | 收样人： | | |
| 联系方式： | | | | | | 联系方式： | | |
| 送样日期： | | | | | | 收样日期： | | |

附录 G
(资料性)
最小选择性浓度 (MSC) 的测定方法

G.1 方法原理

MSC的测定通过微宇宙试验获取，即分离待测样品的微生物群落，加入适量营养和抗生素进行培养，测定培养前后抗生素抗性基因的丰度，计算引起抗生素抗性基因丰度提高的抗生素浓度，即得到该样品中微生物的MSC。

G.2 仪器、试剂和材料

超净工作台、高压灭菌锅、4℃冰箱、电子天平、涡旋混合仪、恒温摇床、隔膜真空泵、微孔滤膜（0.22 μm）、玻璃珠、PBS缓冲液（10 g/L NaCl、0.25 g/L KCl、1.6 g/L Na₂HPO₄、0.3 g/L KH₂PO₄，pH=7.4）、营养液（含葡萄糖、磷酸氢二钠七水物、磷酸二氢钠、七水硫酸镁、氯化钙、氯化钠、氯化铵）、500 mL锥形瓶、2 mL离心管、抗生素溶液、DNA提取试剂盒、移液器（2.5 μL、10 μL、100 μL、200 μL、1 mL）、移液器吸头（10 μL、100 μL、200 μL、1 mL，带滤芯，无核酸酶）。

G.3 方法步骤

- a) 水样提取：采集 5 L 水样通过 0.22 μm 滤膜过滤（可根据水样浊度调整取样体积或采用梯级过滤，以防滤膜严重堵塞），将滤膜剪碎后加入至等体积的 PBS 缓冲液中，加入玻璃珠，涡旋振荡 20 min，随后将上清液细菌溶液吸出备用。土壤样品提取：在 2 ml 离心管中加入土壤样品 0.25 g~0.5 g，加入 500 μl~700 μl 缓冲液、100 μl~200 μl 缓冲液和 0.25 g~0.5 g 研磨珠，涡旋振荡 15 min~20 min 至样本混匀或使用组织研磨均质仪混匀，12000 r/min（~13400×g）离心 1 min，转移上清液细菌溶液备用。
- b) 将上述细菌溶液分别加入至一系列 500 mL 灭菌锥形瓶中，加入一定量的人工配制的营养液，使溶液中有有机物、氮和磷等营养成分的浓度与待测水体的营养保持接近，另外分别加入梯度稀释的不同浓度的抗生素溶液（如 0.01 μg/L、0.1 μg/L、1 μg/L、10 μg/L、100 μg/L），室温条件下缓慢震荡运行 5 d，以未加入抗生素的组作为质控对照。
- c) 取 100 mL 运行之前和运行 5 d 之后的样品，采用 DNA 提取试剂盒提取 DNA。
- d) 采用定量 PCR 测定该抗生素的对应抗生素抗性基因（检测类型可参考附录 I）的相对丰度，具体操作方法按照附录 H 的规定。
- e) 根据公式（1）计算选择性系数 S。

$$S = \ln \left(\frac{\sum_{i=0}^n \frac{P_i}{P_{0i}}}{n} \right) \dots\dots\dots (1)$$

式中：
S ——选择性系数；
n ——所监测的抗生素抗性基因的数量；
P_i ——运行5 d后样品中第*i*种抗生素抗性基因的相对丰度；
P_{0i} ——运行前样品中第*i*种抗生素抗性基因的相对丰度。
f) 以抗生素浓度 c 为横坐标，以 S 为纵坐标作图，采用逻辑斯蒂（logistic）模型进行拟合，当 Nagelkerke R²≥0.5 且 S=0 时，对应的抗生素浓度即为 MSC，见图 2。

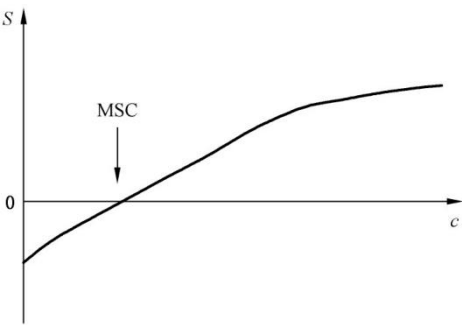


图 2 MSC 拟合示意图

附 录 H

（资料性）

定量 PCR 测定基因丰度

H.1 仪器试剂

荧光定量PCR仪、高速离心机、-20 °C冰箱、涡旋混合仪、制冰机、恒温金属浴、移液器（2.5 μL、10 μL、100 μL、200 μL、1 mL）、移液器吸头（10 μL、100 μL、200 μL、1 mL，带滤芯，无核酸酶）、无菌PCR管或PCR板（无核酸酶）、SYBR GREEN定量PCR试剂、无菌无核酸酶水、抗生素抗性基因标准品、抗生素抗性基因引物、16srDNA标准品、16s rDNA 引物。

H.2 引物设计

通过NCBI查询目标抗生素抗性基因，注意对比基因名称、种属，确保一致；获取基因的基因组DNA序列；进入NCBI的Primer-BLAST界面，输入基因序列号或Fasta格式的序列，确定产物大小及引物退火温度、物种名称等参数，点击“Get primers”，选择相同基因名称序列（不同剪切体），获得合适引物。

H.3 反应液配置

向PCR管或PCR板中加入10 μL定量PCR试剂、各1 μL待测基因的特异性上下游引物、1 μL待测样品的DNA和7 μL无核酸酶水，总体积为20 μL。

H.4 热循环程序

将加入反应液的PCR管或PCR板放置于荧光定量PCR仪，设置热循环程序为95 °C预变性1 min；95 °C 10 s，60 °C 30 s，40个循环。程序结束后，仪器自动显示待测基因CT值。

H.5 标准曲线绘制

参照与上述待测样品相同的步骤进行抗生素抗性基因或16s rDNA标准品的CT值获取，以抗生素抗性基因标准品的初始浓度的对数值为横坐标，对应浓度下的CT值为纵坐标作图，获得抗生素抗性基因或16s rDNA的标准曲线。

H.6 抗生素抗性基因相对丰度计算

将待测样品的CT值代入标准曲线，得到待测样品中抗生素抗性基因或16s rDNA的绝对丰度，以抗生素抗性基因和16s rDNA的绝对丰度的比值作为抗生素抗性基因的相对丰度。

H.7 质量控制

宜使用标准物质进行质量控制，评估检测结果的准确性。

附 录 I
(资料性)
常见抗生素种类对应的抗生素抗性基因种类

常见抗生素对应的抗性基因种类见表I.1。

表 I.1 常见抗生素种类对应的抗生素抗性基因种类

| 抗生素 | 抗性基因 |
|--------|---|
| 磺胺类 | <i>dfrA1</i> , <i>dfrA12</i> , <i>folA</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>sulA/folP</i> , <i>sulA/folP</i> |
| 四环素类 | <i>tet</i> (32) , <i>tet</i> (34) , <i>tet</i> (35) , <i>tet</i> (36) , <i>tet</i> (37) , <i>tet</i> (38) , <i>tetA</i> , <i>tetB</i> , <i>tetC</i> , <i>tetD</i> , <i>tetE</i> , <i>tetG</i> , <i>tetH</i> , <i>tetJ</i> , <i>tetK</i> , <i>tetL</i> , <i>tetM</i> , <i>tetO</i> , <i>tetPA</i> , <i>tetPB</i> , <i>tetQ</i> , <i>tetR</i> , <i>tetS</i> , <i>tetT</i> , <i>tetU</i> , <i>tetV</i> , <i>tetW</i> , <i>tetX</i> |
| 氟喹诺酮类 | <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> , <i>parC</i> , <i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> , <i>qnrC</i> , <i>qnrS</i> , <i>qnrW</i> |
| 大环内酯类 | <i>ermB</i> , <i>mefA</i> , <i>mphH</i> |
| β-内酰胺类 | <i>acr</i> , <i>bla1</i> , <i>ctx-M</i> , <i>kpc</i> , <i>shv</i> , <i>tem</i> , <i>blaB</i> , <i>ccrA</i> , <i>imp</i> , <i>ndm</i> , <i>vim</i> , <i>act</i> , <i>ampC</i> , <i>cmv</i> , <i>lat</i> , <i>pdc</i> , <i>oxa</i> , <i>blaI</i> , <i>mecI</i> |
| 酰胺醇类 | <i>cmlA</i> , <i>cmxA</i> , <i>floR</i> |
| 林可胺类 | <i>linG</i> , <i>lnuA</i> , <i>lnuB</i> , <i>lnuC</i> , <i>lnuD</i> , <i>lnuE</i> , <i>lnuF</i> , <i>lnuG</i> , <i>lnu</i> , <i>lsa</i> |
| 糖肽类 | <i>vanA</i> , <i>vanB</i> , <i>vanC</i> , <i>vanC1</i> , <i>vanG</i> , <i>vanHB</i> , <i>vanHD</i> , <i>vanRA</i> , <i>vanRB</i> , <i>vanRC</i> , <i>vanRD</i> , <i>vanSA</i> , <i>vanSB</i> , <i>vanSC</i> , <i>vanSE</i> , <i>vanTC</i> , <i>vanTE</i> , <i>vanTG</i> , <i>vanWB</i> , <i>vanWG</i> , <i>vanXA</i> , <i>vanXB</i> , <i>vanXD</i> , <i>vanYB</i> , <i>vanYD</i> |
| 多肽类 | <i>mcr-1</i> , <i>mcr-2</i> , <i>mcr-3</i> , <i>mcr-4</i> , <i>mcr-5</i> , <i>mcr-6</i> , <i>mcr-7</i> , <i>mcr-8</i> , <i>mcr-9</i> , <i>mcr10</i> , <i>arnT</i> , <i>bacA</i> , <i>eptA</i> , <i>pmrF</i> , <i>ugd</i> , <i>yojI</i> |
| 氨基糖苷类 | <i>aac</i> (1) , <i>aac</i> (2') , <i>aac</i> (3) , <i>aac</i> (6') , <i>ant</i> (2'') , <i>ant</i> (3'') , <i>ant</i> (4') , <i>ant</i> (6) , <i>ant</i> (9) , <i>aph</i> (2'') , <i>aph</i> (3'') , <i>aph</i> (3') , <i>aph</i> (4) , <i>aph</i> (6) , <i>aph</i> (7'') , <i>aph</i> (9) |
| 截短侧耳素类 | <i>vgaA</i> , <i>vgaB</i> , <i>vgaC</i> , <i>vgaD</i> , <i>vgaE</i> , <i>lsaA</i> , <i>lsaB</i> , <i>lsaC</i> , <i>lsaD</i> , <i>lsaE</i> |
| 恶唑烷酮类 | <i>cfrA</i> , <i>cfrB</i> , <i>cfrC</i> , <i>cfrD</i> , <i>cfrE</i> , <i>optrA</i> , <i>poxA</i> |
| 其他类 | <i>mdtA</i> , <i>mdtB</i> , <i>mdtC</i> , <i>mdtG</i> , <i>glpT</i> , <i>cyaA</i> , <i>uhpT</i> , <i>fosA3</i> |

参 考 文 献

[1]国家市场监督管理总局、中华人民共和国生态环境部《检验检测机构资质认定生态环境监测机构评审补充要求》（国市监检测〔2018〕245号）

[2]中华人民共和国生态环境部《重点管控新污染物清单（2023年版）》（生态环境部令2022年第28号）

[3]中华人民共和国生态环境部办公厅《关于征求<化学物质环境风险筛查结果（征求意见稿）>》（环办固体函〔2025〕223号）

[4]四川省生态环境厅、重庆市生态环境局《新污染物川渝联合调查工作方案》（川环函〔2023〕830号）

[5]四川省生态环境厅《关于印发新污染物川渝联合调查和化学物质环境风险优先评估工作加密监测布点方案（模版）及作业指导书的通知》（川环函〔2024〕769号）

[6]国家药典委员会. 中华人民共和国药典:2020年版[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2020

[7]HJ 772 生态环境统计技术规范 排放源统计

[8]HJ 1399 水质 17种氟喹诺酮类抗生素的测定 高效液相色谱—三重四极杆质谱法

[9]HJ 1398 水质 18种磺胺类抗生素和甲氧苄氨嘧啶的测定 高效液相色谱—三重四极杆质谱法

[10]NY/T 3787 土壤中四环素类、氟喹诺酮类、磺胺类、大环内酯类和氯霉素类抗生素含量同步检测方法 高效液相色谱法

[11]DB 13/T 5221 土壤中土霉素、金霉素、四环素、多西环素、美他霉素的测定 高效液相色谱—串联质谱法

[12]DB 36/T 1841 土壤3种四环素类抗生素的测定 高效液相色谱—三重四极杆质谱法

[13]DB 37/T 3738 水质 磺胺类、喹诺酮类和大环内酯类抗生素的测定 固相萃取/液相色谱—三重四极杆质谱法

[14]DB 50/T 1363 水质 四环素类抗生素的测定 液相色谱—串联质谱法

[15]DB 50/T 1364 水质 氯霉素类抗生素的测定 液相色谱—串联质谱法

[16]DB 50/T 1365 水质 大环内酯类和林克酰胺类抗生素的测定 液相色谱—串联质谱法

[17]DB 50/T 1366 水质 喹诺酮类抗生素的测定 液相色谱—串联质谱法

[18]DB 50/T 1367 水质 磺胺类抗生素的测定 液相色谱—串联质谱法
