



(21) 申请号 202110968294.7

(22) 申请日 2021.08.23

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 113686839 A

(43) 申请公布日 2021.11.23

(73) 专利权人 大连民族大学

地址 116600 辽宁省大连市经济技术开发区辽河西路18号

(72) 发明人 董玉瑛 焦健 陈玉婷 高君

(74) 专利代理机构 大连智高专利事务所(特殊

普通合伙) 21235

专利代理师 毕进

(51) Int. Cl.

G01N 21/76 (2006.01)

G01N 21/78 (2006.01)

G01N 21/31 (2006.01)

G01N 33/18 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 101551336 A, 2009.10.07

CN 103014116 A, 2013.04.03

CN 108375610 A, 2018.08.07

CN 108872330 A, 2018.11.23

US 6673563 B1, 2004.01.06

US 7214505 B1, 2007.05.08

李成辉等. 污水处理厂中有机磷酸酯的研究进展.《生态毒理学报》.2019,第14卷(第6期), 32-46.

姜丹等. 有机磷酸酯对青海弧菌Q67毒性的构效关系.《生态毒理学报》.2014,第9卷(第1期), 71-80.

Maria Vila-Costa等. Microbial consumption of organophosphate esters in seawater under phosphorus limited conditions.《Scientific Reports》.2019, 233.

审查员 余甜雨

权利要求书2页 说明书7页 附图2页

(54) 发明名称

一种同步评价污水好氧工艺中有机磷酸酯去除及其毒性消减的方法

(57) 摘要

本发明属于化学品环境风险评价技术领域,公开了一种同步评价污水好氧工艺中有机磷酸酯去除及其毒性消减的方法。方法基于发现污水厂好氧污泥脱氢酶与有机磷酸酯作用存在Hormesis效应,包括海洋发光菌培养、污染物急性毒性测试、污水处理厂污泥稳定度测定、评价污水处理工艺中污染物的毒性消减效果。通过剂量-效应关系和联合毒性混合毒物分析,挖掘二者之间相互关系。建立同步评价有机磷酸酯去除和毒性消减双反馈机制,有利推进和实现污水处理工艺的智能调控。

1. 一种同步评价污水好氧工艺中有机磷酸酯去除及其毒性消减的方法,其特征在于,方法基于发现污水厂好氧污泥脱氢酶与有机磷酸酯作用存在Hormesis效应,具体步骤如下:

- (1) 海洋发光菌菌种培养;
 - (1a) 培养基的制备;
 - (1b) 菌种培养;
- (2) 对污染物进行急性毒性测试;
 - (2a) 预实验;
 - (2b) 急性毒性测定,绘制剂量-效应曲线;
- (3) 污水处理厂污泥稳定度测定;
 - (3a) 脱氢酶活性测定;
 - (3b) 污泥耗氧速率测定;

(4) 评价污水处理工艺中污染物的毒性消减效果:根据步骤(2a)所得的适宜浓度范围内均分为7~10组实验浓度,下一步取适量污泥置于锥形瓶内,加入污染物样品,选定步骤(3)耗氧速率相邻半小时变化率在5%之内、脱氢酶活性度变化率在20%之内的最长时间作为曝气时间,静置,取上清液进行发光菌实验,然后分析评价实验结果;

所述步骤(1a)具体步骤为:

培养液的制备:酵母浸出汁0.5~1g,胰蛋白胨0.5~1g,NaCl为2~3g, KH_2PO_4 为0.1g, Na_2HPO_4 0.5g,甘油0.3g,加蒸馏水定容至100ml,pH值调整至 7 ± 0.5 ,经15磅高压蒸汽灭菌20min后备用;

固体培养基的制备:所述培养液中加1.5%的琼脂粉,溶解,pH值调整至 7 ± 0.5 ,经15磅高压蒸汽灭菌2h,后制成斜面培养基备用;

所述步骤(1b)具体步骤为:

发光菌冻干粉剂的复苏:在发光菌的冻干粉制剂中加入1ml已灭过菌、被保存在冰箱中的3%NaCl溶液,充分混匀,室温下放置2min即复苏发光;

斜面菌种的培养:发光菌复苏后,在无菌操作条件下,立即用接种棒转接至试管斜面,20℃下恒温培养24h,然后再转接第二代,20℃下恒温培养24h后于4℃保存;

摇瓶菌液的培养:将上述制得的发光菌第二代斜面菌种转接到含有50ml培养液的150ml锥形瓶中,接种量不超过一接种环,于20℃振荡培养至对数生长期备用;工作菌液的制备:吸取一定量培养好的摇瓶菌液于3%NaCl溶液中,充分搅拌,稀释程度以控制空白组发光强度在150-350mV为宜,其中空白组由2ml的3%NaCl溶液和0.1ml的工作菌液组成;

所述步骤(2a)具体步骤为:选取污染物样品进行预试验,设置7~10个浓度梯度,在15min时观察样品对海洋发光细菌的相对抑制率,并根据预实验结果确定毒性实验的适宜浓度范围,该适宜浓度范围可使相对抑制率涵盖正值和负值,预实验设置三组平行,以保证正式实验浓度范围测定的准确性;

所述步骤(2b)具体步骤为:由预实验(2a)已经确定的浓度范围,用3%NaCl溶液配置污染物样品,将样品的每个浓度梯度加入2mL到比色管中,实验的空白组设置为2mL 3%的NaCl溶液,接下来每分钟加入0.5mL的工作液于比色管内并加塞充分晃匀,移除比色管塞暴露于室内,第一组比色管暴露15min后,测定其发光强度,样品每个的浓度设置3组平行,以

此减少实验误差,新污染样品对发光菌的相对抑制率,其表达式为:

$$\text{相对抑制率} = \frac{\text{对照发光强度} - \text{相对发光强度}}{\text{对照发光强度}} \times 100\%$$

计算相对抑制率后,计算出污染物的单一毒性范围,并绘制剂量效应曲线;

所述步骤(3a)具体步骤为:配置 $1\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的2,3,5-氯化三苯基四氮唑溶液,即TTC溶液,从 $1\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的TTC溶液中分别吸取1、2、3、4、5、6、7mL溶液置于50mL容量瓶中定容,各瓶中TTC的浓度分别为20、40、60、80、100、120、140 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;取具塞离心管,分别加入2mLTris-HCl缓冲溶液,2mL蒸馏水和1mLTTC溶液,对照管中加入2mLTris-HCl缓冲溶液和3mL蒸馏水;最后各管中加入1mL质量比为10%的硫化钠溶液,混合后置于暗处20min,使TTC全部还原,生成红色三苯基甲臜,即TF;然后于各管中分别加入5mL丙酮,37℃恒温振荡10min,再在4000rpm下离心10min,最后于485nm波长下测定其吸光度;以吸光度值和TTC浓度数据绘制出标准曲线;将活性污泥样本分别与不同浓度梯度污染物溶液各50ml等体积混合;达到暴露时间后,将浓度 $2.74 \sim 3.1\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的待测活性污泥液放入锥形瓶中,加入数粒玻璃珠剧烈摇动将污泥打碎;取50mL活性污泥液于4000rpm离心5min,弃去上清液,再用去离子水补充至原体积,悬浮、洗涤、离心、弃上清液,反复3次,最后用去离子水补至原体积并用迷你混匀器混匀至污泥达到均质;同时另取一支50mL比色管,加入10%Na₂S溶液0.5mL,pH值7.6的Tris-HCl缓冲液7.5mL,加入去离子水至50mL,作为空白对照;取具塞离心管,分别加入Na₂S溶液0.5mL,Tris-HCl缓冲液2.0mL,污泥悬浮液2mL,0.4%TTC液0.5mL,对照组加入0.5mL去离子水,盖紧盖子并摇匀,即刻放入37℃水浴中培养10min,分别加入0.5mL甲醛终止反应;再向各管分别加入5mL丙酮,混匀溶液,于37℃水浴中保温10min;在4000rpm离心5min,将溶液于485nm测定吸光度,并在标准曲线上查出相应的TTC浓度;

所述步骤(3b)具体步骤为:活性污泥暴露时间分别选择30min和180min,测定好氧微生物呼吸速率,在相同条件下,测定试验系统中加入不同浓度污染物后活性污泥的呼吸速率,耗氧速率使用密闭间歇曝气法测定,测定之前将待测污泥曝气保持溶解氧浓度不低于 $2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,待达到暴露时间后,将溶氧仪探头插入三角瓶中,采用具孔橡胶塞密封,使用磁力搅拌器使污泥保持完全混合状态,待仪器示数稳定后,每隔30s记录一次溶解氧读数,连续读数10min或至溶解氧浓度降低至 $2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以下,绘制溶解氧-时间曲线,得到的直线斜率即为污泥耗氧速率。

一种同步评价污水好氧工艺中有机磷酸酯去除及其毒性消减的方法

技术领域

[0001] 本发明属于化学品环境风险评价技术领域,具体涉及一种将剂量—效应关系曲线拓展用于评价污染物去除和毒性消减效果的方法。

背景技术

[0002] 有机磷酸酯(Organophosphate esters, OPEs)是具有代表性的新污染物,具有良好的阻燃性能、价格低廉且易于制得等特性,已被广泛应用于建材、纺织、化工以及电子、家用产品等领域。研究表明OPEs普遍存在于水、土壤、空气等不同环境介质,并具有潜在的神经毒性、致癌性和内分泌干扰作用,即使是低浓度的暴露,亦可能对环境质量和生态系统稳定性造成不利影响。污水处理厂是以生物工艺为主体处理单元,其核心在于让微生物保持较好的生化代谢水平,最后实现对不同污染物的生物降解。而有机磷酸酯的存在会对污泥微生物的生理生化过程产生胁迫,进而影响生物降解过程与出水水质。现有的污水处理厂都是通过监测COD、BOD、TOC、氮磷等综合指标来反映水质变化,但是其并不能满足对有机磷酸酯的优先控制和管理需求。无法得知有机磷酸酯去除水平和降解产物,毒性是否发生变化。因此,现有的污水处理厂监测指标有局限性。为了满足国家对水环境质量更高的要求 and 体制达标,我们需要从反向来监测哪些物质或敏感指标发生变化和扰动。

[0003] 剂量效应关系常被作为急性毒性测量的基础,根据毒性数据来评价污染物的毒性作用。生态毒理学中污染物的剂量—效应曲线大多呈现出倒S形,用以描述污染物的急性毒性以及表征环境影响和生态风险。在不同的浓度区域范围内,剂量效应关系影响的幅度有所差异。

发明内容

[0004] 为了克服现有技术的不足,本发明提供一种同步评价污水好氧工艺中有机磷酸酯去除及其毒性消减的方法,通过剂量—效应关系和联合毒性混合毒物分析,挖掘二者之间相互关系。建立同步评价有机磷酸酯去除和毒性消减双反馈机制,有利推进和实现污水处理工艺的智能化调控。

[0005] 本发明的上述目的是通过以下技术方案实现的:一种同步评价污水好氧工艺中有机磷酸酯去除及其毒性消减的方法,方法基于发现污水厂好氧污泥脱氢酶与有机磷酸酯作用存在Hormesis效应,具体步骤如下:

[0006] 1.海洋发光菌培养;

[0007] 2.对污染物进行急性毒性测试;

[0008] 3.污水处理厂污泥稳定度测定;

[0009] 4.评价污水处理工艺中污染物的毒性消减效果。

[0010] 所述步骤1具体包括以下步骤:

[0011] (1a)培养基的制备

[0012] 培养液:酵母浸出汁0.5~1g,胰蛋白胨0.5~1g,NaCl为2~3g, KH_2PO_4 为0.1g, Na_2HPO_4 0.5g,甘油0.3g,加蒸馏水定容至100ml,pH值调整至 7 ± 0.5 ,经15磅高压蒸汽灭菌20min后备用。固体培养基:所述培养液中加1.5%的琼脂粉,溶解,pH值调整至 7 ± 0.5 ,经15磅高压蒸汽灭菌2h,后制成斜面培养基备用。

[0013] (1b) 菌种培养

[0014] 发光菌冻干粉剂的复苏:在发光菌的冻干粉制剂中加入1ml已灭过菌、被保存在冰箱中的3%NaCl溶液,充分混匀,室温下放置2min即复苏发光。斜面菌种的培养:发光菌复苏后,在无菌操作条件下,立即用接种棒转接至试管斜面,20℃下恒温培养24h,然后再转接第二代,20℃下恒温培养24h后于4℃保存。

[0015] 摇瓶菌液的培养:将上面制得的发光菌第二代斜面菌种转接到含有50ml培养液的150ml锥形瓶中,接种量不超过一接种环,于20℃振荡培养至对数生长期备用。工作菌液的制备:吸取一定量培养好的摇瓶菌液于3%NaCl溶液中,充分搅拌,稀释程度以控制空白组发光强度在150-350mV为宜,其中空白组由2ml的3%NaCl溶液和0.1ml的工作菌液组成。

[0016] 所述步骤2具体包括以下步骤:

[0017] (2a) 预实验

[0018] 选取污染物样品进行预试验,设置7~10个浓度梯度。在15min时观察样品对海洋发光细菌的相对抑制率,并根据预实验结果确定毒性实验的适宜浓度范围,该适宜浓度范围可使相对抑制率涵盖正值和负值。预实验设置三组平行,以保证正式实验浓度范围测定的准确性。

[0019] (2b) 急性毒性测定

[0020] 由预实验(2a)已经确定的浓度范围,用3%NaCl溶液配置污染物样品,将样品的每个浓度梯度加入2mL到比色管中,实验的空白组设置为2mL 3%的NaCl溶液,接下来每分钟加入0.5mL的工作液于比色管内并加塞充分晃匀,移除比色管塞暴露于室内,第一组比色管暴露15min后,测其定发光强度,样品每个的浓度设置3组平行,以此减少实验误差。新污染样品对发光菌的相对抑制率,其表达式为(式2.1):

$$\text{相对抑制率} = \frac{\text{对照发光强度} - \text{相对发光强度}}{\text{对照发光强度}} \times 100\% \quad (2.1)$$

[0021] 计算相对抑制率后,计算出污染物的单一毒性范围。并绘制剂量-效应曲线。

[0022] 所述步骤3具体包括以下步骤:

[0023] (3a) 脱氢酶活性测定

[0024] 配置 $1\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)溶液,从 $1\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的TTC溶液中分别吸取1、2、3、4、5、6、7mL溶液置于50mL容量瓶中定容,各瓶中TTC的浓度分别为20、40、60、80、100、120、140 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。取具塞离心管,分别加入2mLTris-HCl缓冲溶液,2mL蒸馏水和1mLTTC溶液,对照管中加入2mLTris-HCl缓冲溶液和3mL蒸馏水。最后各管中加入1mL质量比为10%的硫化钠溶液,混合后置于暗处20min,使TTC全部还原,生成红色三苯基甲臜(TF)。然后于各管中分别加入5mL丙酮,37℃恒温振荡10min,再在4000rpm下离心10min,最后于485nm波长下测定其吸光度。以吸光度值和TTC浓度数据绘制出标准曲线。将活性污泥样本分别与不同浓度梯度污染物溶液各50ml等体积混合。达到暴露时间后,将浓度 $2.74 \sim 3.1\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的待测活性污泥液放入锥形瓶中,加入数粒玻璃珠剧烈摇动将污泥打碎。取50mL

活性污泥液于4000rpm离心5min,弃去上清液,再用去离子水补充至原体积,悬浮、洗涤、离心、弃上清液,反复3次,最后用去离子水补至原体积并用迷你混匀器混匀至污泥达到均质。同时另取一支50mL比色管,加入10%Na₂S溶液0.5mL,Tris-HCl缓冲液(pH值7.6)7.5mL,加入去离子水至50mL,作为空白对照。取具塞离心管,分别加入Na₂S溶液0.5mL,Tris-HCl缓冲液2.0mL,污泥悬浮液2mL,0.4%TTC液0.5mL,对照组加入0.5mL去离子水,盖紧盖子并摇匀,即刻放入37℃水浴中培养10min,分别加入0.5mL甲醛终止反应。再向各管分别加入5mL丙酮,混匀溶液,于37℃水浴中保温10min。在4000rpm离心5min,将溶液于485nm测定吸光度,并在标准曲线上查出相应的TTC浓度。

[0025] (3b) 污泥耗氧速率的测定

[0026] 活性污泥暴露时间分别选择30min和180min,测定好氧微生物呼吸速率,在相同条件下,测定试验系统中加入不同浓度污染物后活性污泥的呼吸速率。耗氧速率使用密闭间歇曝气法测定,测定之前将待测污泥曝气至溶解氧浓度达8mg·L⁻¹,待达到暴露时间后,将溶氧仪探头插入三角瓶中,采用具孔橡胶塞密封,使用磁力搅拌器使污泥保持完全混合状态,待仪器示数稳定后,每隔30s记录一次溶解氧读数,连续读数10min或至溶解氧浓度降低至2mg·L⁻¹以下,绘制溶解氧-时间曲线,得到的直线斜率即为污泥耗氧速率。

[0027] 所述步骤(4)具体步骤如下:根据步骤(2a)所得的适宜浓度范围内均分为7~10组实验浓度,下一步取适量污泥置于锥形瓶内,加入污染物样品,选定步骤(3)耗氧速率相邻半小时变化率在5%之内、脱氢酶活性度变化率在20%之内的最长时间作为曝气时间,静置,取上清液进行发光菌实验,然后分析评价实验结果。

[0028] 本发明与现有技术相比的有益效果是:1.将Hormesis和剂量效应关系结合起来,形成一种低剂量激活,高剂量抑制的拟剂量效应关系,观察在不同剂量污染物对其产生的作用变化规律,基于系统稳定性和处理效果稳定性,依靠模式生物引入到实际复杂工程当中,实现对有机磷酸酯的可测可评可防;2.通过剂量-效应关系评价污染物的急性毒性,将其应用到实际监测工作当中,来实现同步评价对污染物去除水平和毒性消减的效果。通过拓展剂量效应关系的应用域来实现满足同步评价这种需求的新方法。对于实现智慧水务系统的控制智能化、信息多维化、管理精确化具有重要意义。

附图说明

[0029] 图1是Hormesis剂量效应关系模型示意图;

[0030] 图2是TBEP对海洋发光菌的剂量效应曲线;

[0031] 图3是不同曝气时间对好氧活性污泥耗氧速率与脱氢酶活性变化率的影响;

[0032] 图4是经好氧生化处理过程的TBEP对发光菌的抑制情况。

具体实施方式

[0033] 下面通过具体实施例详述本发明,但不限制本发明的保护范围。如无特殊说明,本发明所采用的实验方法均为常规方法,所用实验器材、材料、试剂等均可从商业途径获得。

[0034] 实施例1

[0035] 通过选用模式生物海洋发光菌对污染物进行毒性实验,测定污染物对发光菌的剂量效应关系,发现低剂量污染物暴露条件下会诱导发光菌发光强度增强,这也符合

Hormesis效应。Hormesis效应是指毒物或污染物对生物体的剂量—效应关系表现为在低剂量时产生刺激效应,而在高剂量时产生抑制作用的特殊现象。图1为Hormesis剂量效应关系模型示意图,包含了诱导激活区(a)、缓慢抑制区(b)、快速抑制区(c)。诱导激活区a特征为浓度低毒性低,如果落在这个区域范围内表明暴露的污染物浓度残留低,呈现的毒性低。大量研究表明,Hormesis效应具有普遍性,它在不同的生物模型、测试终点以及化合物类别下都普遍存在。其范围几乎涵盖了包括重金属化合物、氰化物、多环芳烃、多氯联苯、有机砷化物以及农药和一些抗生素在内的大量有毒污染物。

[0036] 一种同步评价污水好氧工艺中有机磷酸酯去除及其毒性消减的方法,步骤如下:

[0037] 1. 海洋发光菌培养;

[0038] 2. 对污染物进行急性毒性测试;

[0039] 3. 污水处理厂污泥稳定度测定;

[0040] 4. 评价污水处理工艺中污染物的毒性消减效果。

[0041] 所述步骤1具体包括以下步骤:

[0042] (1a) 培养基的制备

[0043] 培养液:酵母浸出汁0.5~1g,胰蛋白胨0.5~1g,NaCl为2~3g, KH_2PO_4 为0.1g, Na_2HPO_4 0.5g,甘油0.3g,加蒸馏水定容至100ml,pH值调整至 7 ± 0.5 ,经15磅高压蒸汽灭菌20min后备用。固体培养基:所述培养液中加1.5%的琼脂粉,溶解,pH值调整至 7 ± 0.5 ,经15磅高压蒸汽灭菌2h,后制成斜面培养基备用。

[0044] (1b) 菌种培养

[0045] 发光菌冻干粉剂的复苏:在发光菌的冻干粉剂中加入1ml已灭过菌、被保存在冰箱中的3%NaCl溶液,充分混匀,室温下放置2min即复苏发光。斜面菌种的培养:发光菌复苏后,在无菌操作条件下,立即用接种棒转接至试管斜面,20℃下恒温培养24h,然后再转接第二代,20℃下恒温培养24h后于4℃保存。

[0046] 摇瓶菌液的培养:将上面制得的发光菌第二代斜面菌种转接到含有50ml培养液的150ml锥形瓶中,接种量不超过一接种环,于20℃振荡培养至对数生长期备用。工作菌液的制备:吸取一定量培养好的摇瓶菌液于3%NaCl溶液中,充分搅拌,稀释程度以控制空白组发光强度在150-350mV为宜,其中空白组由2ml的3%NaCl溶液和0.1ml的工作菌液组成。

[0047] 所述步骤2具体包括以下步骤:

[0048] (2a) 预实验

[0049] 选取污染物样品进行预试验,设置7~10个浓度梯度。在15min时观察样品对海洋发光细菌的相对抑制率,并根据预实验结果确定毒性实验的适宜浓度范围,该适宜浓度范围可使相对抑制率涵盖正值和负值。预实验设置三组平行,以保证正式实验浓度范围测定的准确性。

[0050] (2b) 急性毒性测定

[0051] 由预实验(2a)已经确定的浓度范围,用3%NaCl溶液配置污染物样品,将样品的每个浓度梯度加入2mL到比色管中,实验的空白组设置为2mL 3%的NaCl溶液,接下来每分钟加入0.5mL的工作液于比色管内并加塞充分混匀,移除比色管塞暴露于室内,第一组比色管暴露15min后,测其定发光强度,样品每个的浓度设置3组平行,以此减少实验误差。新污染物对发光菌的相对抑制率,其表达式为(式2.1):

$$\text{相对抑制率} = \frac{\text{对照发光强度} - \text{相对发光强度}}{\text{对照发光强度}} \times 100\% \quad (2.1)$$

[0052] 计算相对抑制率后,计算出污染物的单一毒性范围。并绘制剂量效应曲线。

[0053] 所述步骤3具体包括以下步骤:

[0054] (3a) 脱氢酶活性测定

[0055] 配置 $1\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)溶液,从 $1\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的TTC溶液中分别吸取1、2、3、4、5、6、7mL溶液置于50mL容量瓶中定容,各瓶中TTC的浓度分别为20、40、60、80、100、120、140 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。取具塞离心管,分别加入2mLTris-HCl缓冲溶液,2mL蒸馏水和1mLTTC溶液,对照管中加入2mLTris-HCl缓冲溶液和3mL蒸馏水。最后各管中加入1mL质量比为10%的硫化钠溶液,混合后置于暗处20min,使TTC全部还原,生成红色三苯基甲臜(TF)。然后于各管中分别加入5mL丙酮,37℃恒温振荡10min,再在4000rpm下离心10min,最后于485nm波长下测定其吸光度。以吸光度值和TTC浓度数据绘制出标准曲线。将活性污泥样本分别与不同浓度梯度污染物溶液各50ml等体积混合。达到暴露时间后,将浓度 $2.74 \sim 3.1\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的待测活性污泥液放入锥形瓶中,加入数粒玻璃珠剧烈摇动将污泥打碎。取50mL活性污泥液于4000rpm离心5min,弃去上清液,再用去离子水补充至原体积,悬浮、洗涤、离心、弃上清液,反复3次,最后用去离子水补至原体积并用迷你混匀器混匀至污泥达到均质。同时另取一支50mL比色管,加入10%Na₂S溶液0.5mL,Tris-HCl缓冲液(pH值7.6)7.5mL,加入去离子水至50mL,作为空白对照。取具塞离心管,分别加入Na₂S溶液0.5mL,Tris-HCl缓冲液2.0mL,污泥悬浮液2mL,0.4%TTC液0.5mL,对照组加入0.5mL去离子水,盖紧盖子并摇匀,即刻放入37℃水浴中培养10min,分别加入0.5mL甲醛终止反应。再向各管分别加入5mL丙酮,混匀溶液,于37℃水浴中保温10min。在4000rpm离心5min,将溶液于485nm测定吸光度,并在标准曲线上查出相应的TTC浓度。

[0056] (3b) 污泥耗氧速率的测定

[0057] 活性污泥暴露时间分别选择30min和180min,测定好氧微生物呼吸速率,在相同条件下,测定试验系统中加入不同浓度污染物后活性污泥的呼吸速率。耗氧速率使用密闭间歇曝气法测定,测定之前将待测污泥曝气至溶解氧浓度达 $8\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,待达到暴露时间后,将溶氧仪探头插入三角瓶中,采用具孔橡胶塞密封,使用磁力搅拌器使污泥保持完全混合状态,待仪器示数稳定后,每隔30s记录一次溶解氧读数,连续读数10min或至溶解氧浓度降低至 $2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以下,绘制溶解氧-时间曲线,得到的直线斜率即为污泥耗氧速率。

[0058] 所述步骤(4)具体步骤如下:根据步骤(2a)所得的适宜浓度范围内均分为7~10组实验浓度,下一步取适量污泥置于锥形瓶内,加入污染物样品,选定步骤(3)耗氧速率相邻半小时变化率在5%之内、脱氢酶活性度变化率在20%之内的最长时间作为曝气时间,静置,取上清液进行发光菌实验,然后分析评价实验结果。

[0059] 实施例2

[0060] 以位于大连市某污水处理厂好氧工艺段(O池)为对象,以有机磷酸酯中的磷酸三(丁氧基乙基)酯(TBEP)化合物为目标污染物,使用实施例1中的方法。

[0061] 1. 基于TBEP对海洋发光菌的急性毒性分析

[0062] 海洋发光菌经实施例1中步骤(1)复苏培养后,根据实施例1中步骤(2)进行急性毒性测定,结果如下。

[0063] 表1 TBEP对海洋发光菌的急性毒性数据

	浓度/(ug/L)	发光度 (mV)	相对抑制率(%)
	0	776.33	0.00
	5	980.67	-26.32
	10	859.33	-10.69
	15	676.33	12.88
	20	620.00	20.14
[0064]	25	552.00	28.90
	30	410.67	51.40
	35	346.00	56.38
	40	315.33	59.38
	45	254.67	67.20
	50	209.67	72.99
	55	198.67	74.41

[0065] 表1和图2分别是TBEP对海洋发光菌急性毒性数据和剂量-效应曲线,从中发现TBEP对发光菌表现出先激活后抑制,当TBEP的浓度低于10ug/L时,表现出激活作用。这也符合TBEP的Hormesis效应,低浓度激活了海洋发光菌机体受到毒性侵害时的修复机制,导致海洋发光菌活性显著增加。

[0066] 2. 污水处理厂污泥稳定度测定

[0067] 为了模拟真实环境,消除环境基体影响,进行了不同时间下的测定耗氧速率与酶活性的测定实验。实验流程参考实施例1中步骤(3),结果如表2所示,在不同的时间下,好氧活性污泥耗氧速率(OUR)在0-3h内均趋于稳定,而对于脱氢酶活性(DHA)而言,随着时间的增加,在3小时后,脱氢酶的活性变化率为-15.2%,并根据数据作图如图3,耗氧速率脱氢酶活性在0-3h内均趋于稳定,污泥最后选择TBEP曝气3小时。

[0068] 表2不同暴露时间TBEP对污泥好氧速率和脱氢酶活性的影响

	时间 (h)	0	0.5	1	1.5	2	2.5	3
	OUR/mg · L	0.535	0.468	0.3307	0.368	0.298	0.293	0.29
[0069]	好氧速率变化率 (%)	0	-12.5	-38.19	-31.21	-44.30	-45.23	-45.79
	DHA/mg(TF) · g ⁻¹ · h ⁻¹	274.1	276.9	279.7	274.1	276.9	265.8	232.2
	DHA 活性变化率 R(%)	0	1.01	2.03	0	1.01	-3.04	-15.29

[0070] 3. 基于发光菌法应用于评价污水处理工艺对所选择有机磷酸酯TBEP的毒性消减效果

[0071] 实验步骤参考实施例1中步骤(4),根据实施例1中步骤(2)所得的急性毒性测定数据设置浓度梯度和一组对照,并取污泥100mL于150mL锥形瓶内,加入污染物样品,曝气时间根据实施例1中步骤(3)中所测的污泥稳定度决定选择为3小时,静置,取上清液进行发光菌实验。

[0072] 数据结果如下:

[0073] 表3经好氧生化处理过程的TBEP对发光菌的抑制情况

	浓度/(ug/L)	发光度 (mV)	相对抑制率(%)
	0	713.33	0.00
	10	768.33	-7.71
	15	757.33	-6.23
[0074]	20	751.00	-5.28
	25	737.00	-3.31
	30	730.17	-2.36
	35	716.67	-0.46
	40	711.50	0.25

[0075] 表3是经好氧生化处理过程的TBEP对发光菌的抑制情况,作图如图4所示,加入污泥中的TBEP经过生物降解后,对发光菌起到先激活后抑制的作用。在整体看来,在污染物样品浓度区间内对于发光菌起到激活作用,也说明该污水处理工艺对于该种有机磷酸酯的去除率较好。

[0076] 通过Hormesis效应和剂量-效应关系联合形成一种拟剂量效应关系,运用到污水处理厂的复杂工艺中,测定目标污染物对发光菌产生的作用规律。从而评价污染物去除及其毒性消减情况,进而实现对有机磷酸酯的可测可评可防。为国内制定单一产物污染效应的环境基准以及相关生产行业排放标准提供有效依据。

[0077] 以上所述实施方式仅为本发明的优选实施例,而并非本发明可行实施的全部实施例。对于本领域一般技术人员而言,在不背离本发明原理和精神的前提下对其所作出的任何显而易见的改动,都应当被认为包含在本发明的权利要求保护范围之内。

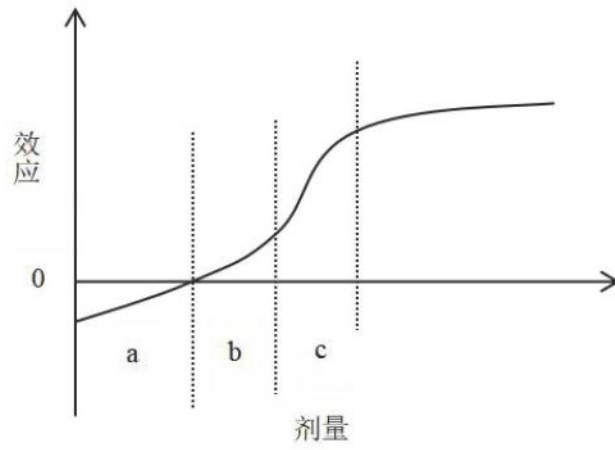


图1

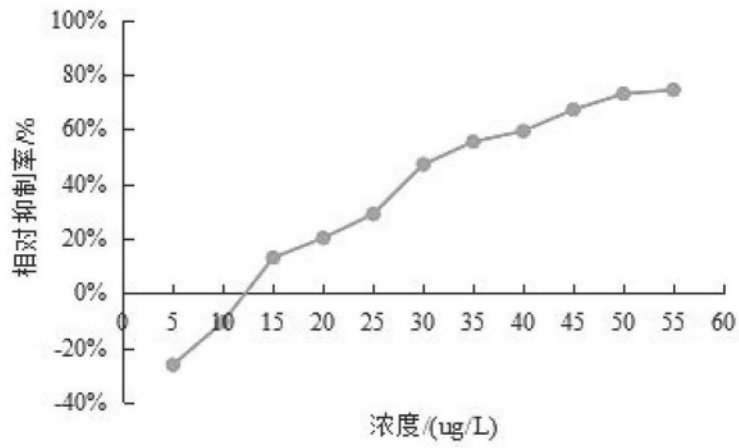


图2

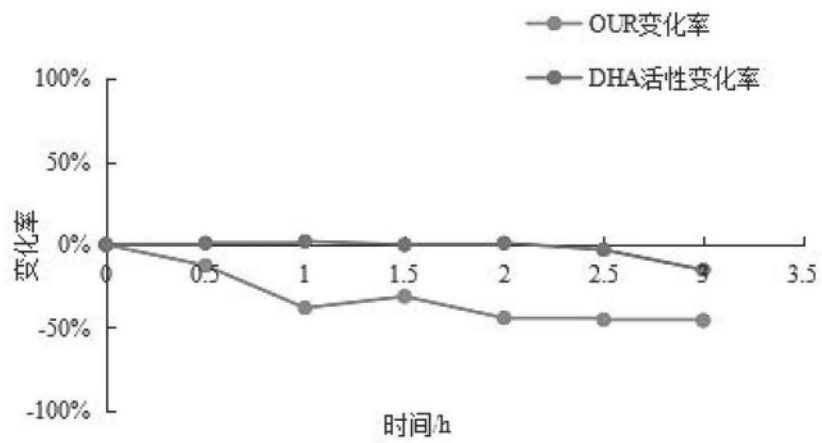


图3

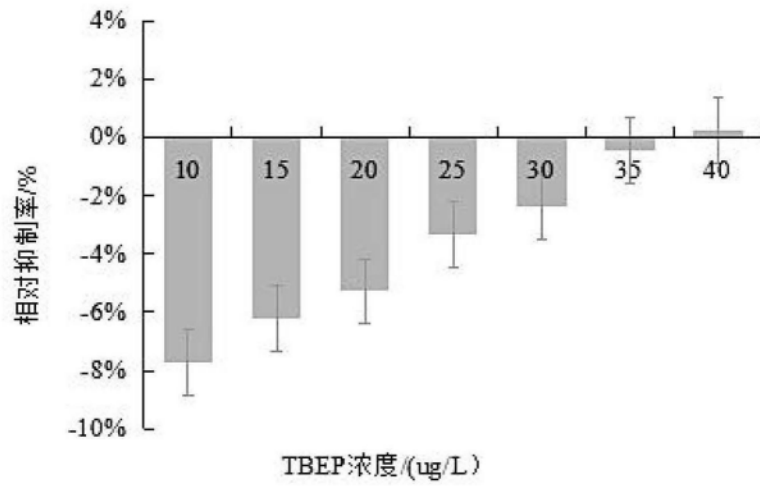


图4