

· 监测技术 ·

中药板蓝根废水生物毒性测定的影响因素研究

匡颖^{1,2}, 王俊娟^{1,2}, 陈翠柏^{1,2}, 张焕祯^{1,2}

(1. 中国地质大学(北京), 北京 100083; 2. 水资源与环境北京市重点实验室, 北京 100083)

摘要:采用发光细菌法测定中药板蓝根废水的生物毒性,通过试验考察温度、暴露时间和pH值等对细菌相对发光度的影响。结果表明:在中性条件下,当温度为20℃时相对发光度最大,当温度为15℃和25℃时相对发光度较稳定,不易受环境因素影响;当暴露时间为15min时,相对发光度较低,20min时相对发光度不稳定,30min~35min时,相对发光度达到峰值并保持稳定。中药板蓝根废水生物毒性的适宜测定条件为pH值6~7.5,温度25℃,暴露时间30min,快速测定时可调整为15min。

关键词:生物毒性;发光细菌法;影响因素;中药板蓝根废水

中图分类号:X835 文献标志码:B 文章编号:1006-2009(2023)06-0049-04

Study on Influencing Factors of Biotoxicity Determination of Pharmaceutical Wastewater from Radix Isatidis

KUANG Ying^{1,2}, WANG Jun-juan^{1,2}, CHEN Cui-bai^{1,2}, ZHANG Huan-zhen^{1,2}

(1. China University of Geosciences, Beijing 100083, China; 2. Beijing Key Laboratory of Water Resource & Environment, Beijing 100083, China)

Abstract: The biotoxicity of pharmaceutical wastewater was determined by luminescent bacteria test method. The effects of temperature, exposure time and pH value on the relative luminosity of bacteria were tested through experiments. The results showed that under neutral conditions, the relative luminosity reached the maximum at 20℃, and was relatively stable at 15℃ and 25℃, which was not easily affected by environmental factors. The relative luminosity was low at 15min of exposure time, unstable at 20min, reached its peak and remained stable at 30min~35min. The appropriate conditions for biotoxicity determination were pH value of 6~7.5, temperature of 25℃, exposure time of 30min and rapid determination time of 15min.

Key words: Biotoxicity; Luminescent bacteria test method; Influencing factor; Pharmaceutical wastewater from radix isatidis

中药材加工过程中会排放高浓度、含毒性物质的废水^[1-4],《中药类制药工业水污染物排放标准》(GB 21906—2008)和《化学合成类制药工业水污染物排放标准》(GB 21904—2008)中均规定了急性毒性的控制标准。发光细菌法是水质急性毒性检测的标准方法^[5],能够简便、灵敏、快速地检测环境污染物的生物毒性,且对大多数的有毒污染物均有响应^[6-7],刘锐等^[8]、Elad等^[9]的研究表明该方法能够简单、有效地测定制药废水、印染废水的生物毒性级别。然而,有关中药废水的生物毒性检测的报道较少,尤其在测定时,存在发光度

不稳定、易受环境条件影响等问题^[10-11]。

今针对中药材加工废水的水质特征,结合明亮发光杆菌(*Photobacterium phosphorem*)自身生长和发光条件,以板蓝根废水为例,研究温度、暴露时间和pH值等对生物毒性检测的影响,探索中药板蓝根废水生物毒性检测的适宜条件,以为废水中生物毒性的快速检测提供依据^[12-13]。

收稿日期:2022-10-19;修订日期:2023-10-20

基金项目:国家自然科学基金资助面上项目(28932019023)

作者简介:匡颖(1971—),女,甘肃兰州人,副教授,博士,从事环境工程专业的教学与研究工作。

1 试验

1.1 主要仪器与试剂

LumiFox 2000 型便携式发光细菌毒性检测仪, 深圳市丹耐克斯分析仪器有限公司; KP-10Z 型便携式 pH/ORP 计, 日本笠原理化工工业株式会社。

试验菌种采用仪器配套的明亮发光杆菌 502 小种(冻干粉), 深圳市丹耐克斯分析仪器有限公司。

1.2 试验方法

取 500 μL 复苏稀释液水合发光细菌冻干粉, 适宜温度下复苏 10 min。将适量样品与 100 μL 渗透压调节液混合, 配制成 1 000 μL 待测样品溶液, 加入 50 μL 水合后的试剂, 待完全反应后测定细菌发光度。试验控制水温为 10 $^{\circ}\text{C}$ ~ 30 $^{\circ}\text{C}$, pH 值为 5.0 ~ 8.0, 暴露时间为 5 min ~ 45 min, 考察不同因素对相对发光度的影响。在制药过程中会产生大量的悬浮物和沉淀物, 可能会使检测结果存在偏差, 故在试验前将废水过滤。

1.3 样品制备与采集

试验用板蓝根废水为实验室配制, 按照制药加工工艺模拟产生。适宜条件研究采用某中药厂加工废水, 样品采集参考《水质 急性毒性的测定 发光细菌法》(GB/T 15441—1995)。

2 结果与讨论

2.1 温度对中药板蓝根废水生物毒性测定的影响

细菌发光依赖于相关细胞的酶促反应, 而温度能够很明显地对细胞的酶促反应产生影响, 故温度是影响微生物生长和发光的最重要的环境因素之一。《水质 急性毒性的测定 发光细菌法》(GB/T 15441—1995) 中要求用发光细菌检测废水生物毒性时, 室温为 20 $^{\circ}\text{C}$ ~ 25 $^{\circ}\text{C}$ 。朱兰兰^[14] 在研究中发现, 当试验温度低于 25 $^{\circ}\text{C}$ 时, 温度越高对海洋细菌(*P. leiognathi* YL) 生长和发光的促进作用越强; 当试验温度高于 30 $^{\circ}\text{C}$ 时, 高温对其生长和发光有抑制作用。不同 pH 值条件下, 相对发光度随温度的变化情况见图 1(a)(b)(c)(d)。由图 1 可见, 中性条件下不同暴露时间的细菌发光度随温度的变化趋势基本一致, 在 10 $^{\circ}\text{C}$ ~ 20 $^{\circ}\text{C}$ 之间, 相对发光度快速上升, 20 $^{\circ}\text{C}$ ~ 25 $^{\circ}\text{C}$ 之间相对发光度快速下降, 25 $^{\circ}\text{C}$ ~ 30 $^{\circ}\text{C}$ 之间, 相对发光度缓慢下降, 其中个别略有波动。虽然 20 $^{\circ}\text{C}$ 时相对发光度达到最大值, 但不同暴露时间下的发光度差异较大, 表明 20 $^{\circ}\text{C}$ 时细菌发光度不稳定, 暴露时间对相对发

光度影响较大。15 $^{\circ}\text{C}$ 时不同暴露时间的相对发光度差异较小, 25 $^{\circ}\text{C}$ 时不同暴露时间的相对发光度差异也比较小, 表明该温度下的细菌发光较稳定。研究表明, 20 $^{\circ}\text{C}$ 时细菌相对发光度最高却不稳定, 易受暴露时间影响; 15 $^{\circ}\text{C}$ 和 25 $^{\circ}\text{C}$ 时细菌发光情况较为稳定。朱波等^[12] 也推荐废水的生物毒性可在 25 $^{\circ}\text{C}$ 时进行检测。

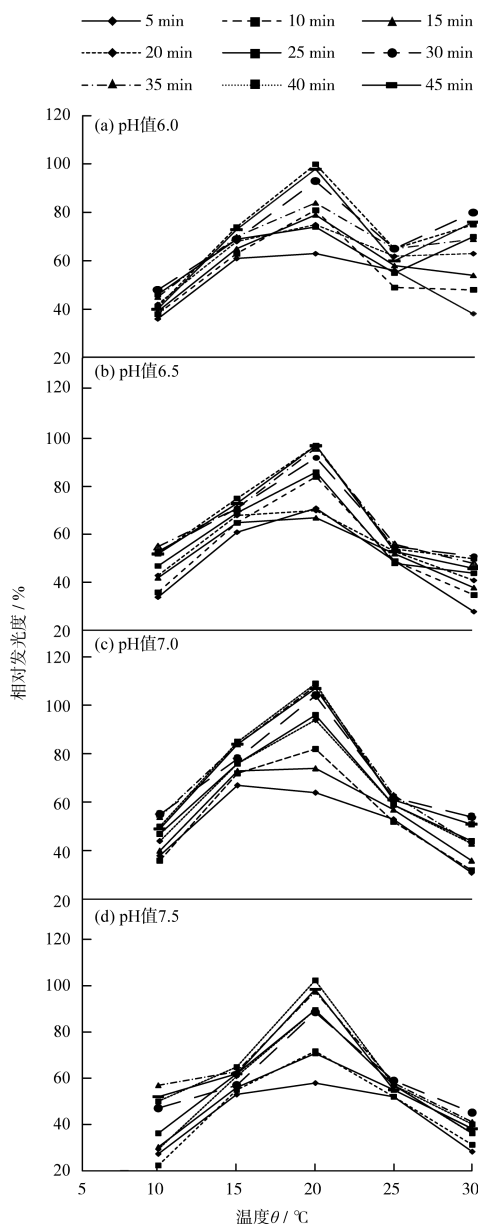


图 1 不同温度下的相对发光度

Fig. 1 Relative luminosity at different temperatures

2.2 暴露时间对中药板蓝根废水生物毒性测定的影响

有研究认为发光细菌暴露在废水中时, 其相对

发光度会随着暴露时间的延长而迅速降低^[15]。中性条件下,温度为 15 ℃ 和 25 ℃ 时,不同暴露时间检测中药板蓝根废水的相对发光度见图 2 (a) (b)。由图 2 可见,15 ℃ 时细菌相对发光度随时间延长而平缓增长,15 min 时相对发光度虽不高但相对平稳,30 min 后相对发光度达到峰值且趋于稳定;25 ℃ 时细菌相对发光度波动较大,15 min 时相对发光度不够稳定,30 min 后相对发光度达到峰值且趋于稳定。结果表明,15 ℃ 和 25 ℃ 时,中药板蓝根废水中细菌的相对发光度基本在 30 min 后达到峰值,且在 35 min 之后相对发光度有下降的趋势,30 min ~ 35 min 内细菌相对发光度比较稳定。在发光细菌法检测废水生物毒性试验中,为保证发光细菌与废水充分反应,一般控制暴露时间为 15 min^[5]。马珂等^[6]比较了不同方法测定制药废水的生物毒性,也认为发光细菌法宜在较长的操作时间内完成。15 ℃ 时快速检测可采用暴露时间 15 min^[16],且应在 5 min 内快速完成检测。

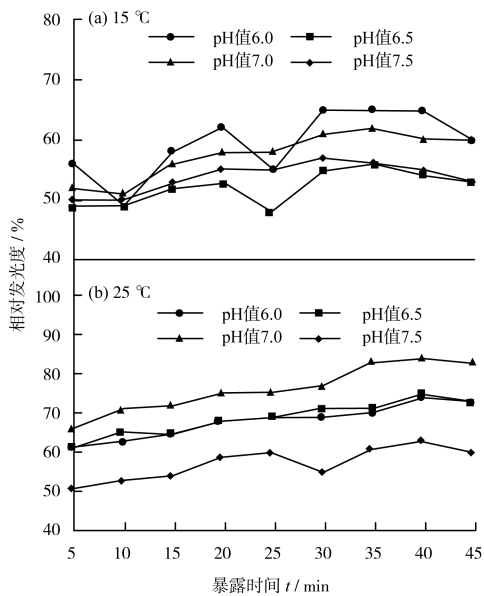


图 2 不同暴露时间下的相对发光度

Fig. 2 Relative luminosity at different exposure times

2.3 pH 值对中药板蓝根废水生物毒性测定的影响

不同 pH 值下检测中药板蓝根废水的相对发光度见图 3(a) (b)。

由图 3(a)可见,当暴露时间为 30 min,温度为 25 ℃,pH 值为 5 时,相对发光度只有 26%;pH 值

为 5.5 时,相对发光度为 41%;而当 pH 值为 6 时,相对发光度跃升为 65%;当 pH 值分别为 6.5、7 和 7.5 时,相对发光度分别为 55%、61% 和 57%;当 pH 值为 8 时,相对发光度降为 22%。由图 3(b)可见,15 ℃ 时,也出现了相似的变化。当 pH 值分别为 5、5.5、6、6.5 时,相对发光度从 35%、49% 跃升为 70%、71%;当 pH 值分别为 7、7.5 和 8 时,相对发光度从 77%、55% 降至 22%。

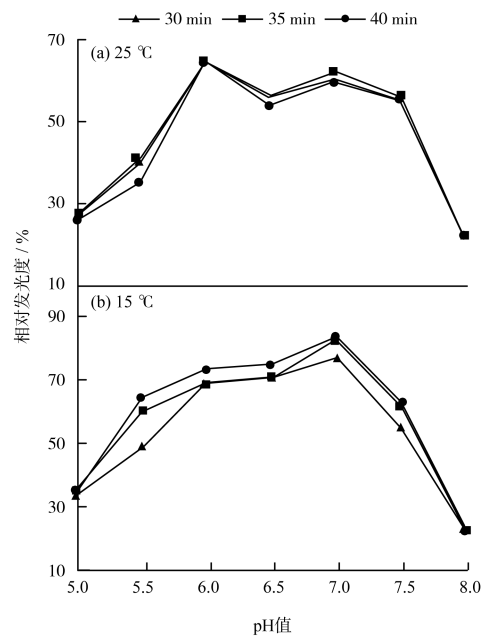


图 3 不同 pH 值下的相对发光度

Fig. 3 Relative luminosity at different pH values

虽然中药板蓝根废水一般为中性,但是在提取环节的酸沉和氨沉过程中会产生酸性和碱性废水。目前研究人员在进行发光细菌的生物毒性试验时,大多将 pH 值调至 7.0^[5],已有学者研究表明废水发光细菌生物毒性检测的最适合 pH 值范围为 6 ~ 8,也有研究认为发光细菌的相对发光度在一定的 pH 值范围内变化并不显著^[17]。图 3 的数据表明,当温度为 25 ℃ 时,pH 值在 6 ~ 7.5 之间相对发光度基本保持稳定;当温度为 15 ℃ 时,pH 值在 6 ~ 7 之间的相对发光度较为稳定。这表明发光细菌对 pH 值的适应性较好,Ye 等^[15]也认为发光细菌测定时的 pH 值范围比较宽松。

2.4 中药板蓝根废水生物毒性测定的适宜条件研究

根据上述影响因素的研究,发光细菌法检测中

药加工废水生物毒性的适宜条件是 pH 值为 6 ~ 7.5, 温度为 25 ℃, 暴露时间为 30 min。以某中药厂的板蓝根加工废水为试验对象, 对照生物毒性测试仪所建议试验条件: pH 值为 6 ~ 8, 温度为 20 ℃ 左右, 暴露时间为 15 min。统计两种检测条件下试

验结果的相对标准偏差(见表 1), 验证上文检测方法的适宜性。结果表明, 适宜条件下的试验结果与参考条件下的试验结果基本一致, 适宜条件下测定结果的 RSD 较低, 是适宜于中药加工废水的发光细菌生物毒性检测方法。

表 1 表 1 不同测试条件下的试验结果
Table 1 Test results under different conditions

中药板蓝根废水	适宜条件				参考条件			
	平均相对 发光度/%	参比氯化汞质量 浓度 $\rho/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	标准偏差 SD/%	RSD/%	平均相对 发光度/%	参比氯化汞质量浓 度 $\rho/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	标准偏差 SD/%	RSD/%
药材洗涤废水	82	0.05	2.09	2.5	77	0.07	3.06	4.0
投料提取废水	18	0.21	1.53	8.5	19	0.21	2.65	13.9
一次醇沉废水	0	0.26	0	0	1	0.25	0	0
二次醇沉废水	26	0.19	1.00	3.8	33	0.20	17.62	53.4
水沉废水	2	0.25	0	0	3	0.25	1.00	33.3
氨沉废水	2	0.25	0	0	8	0.24	0.58	7.3
过滤脱碳废水	23	0.20	2.09	9.0	26	0.19	1.15	4.4
提取车间总排口废水	0	0.26	0	0	3	0.25	0.58	19.3

3 结语

中性条件下温度和暴露时间均会影响细菌发光度, 温度为 20 ℃ 时相对发光度最大, 15 ℃ 和 25 ℃ 时相对发光度较稳定, 不易受环境因素影响。暴露时间为 15 min 时, 相对发光度较低; 20 min 时相对发光度不稳定; 30 min ~ 35 min 时, 相对发光度可达到峰值并保持稳定。经试验验证, 发光细菌法检测中药板蓝根加工废水生物毒性的适宜条件是 pH 值为 6 ~ 7.5, 温度为 25 ℃, 暴露时间为 30 min, 快速测定时可采用 15 min。该方法可被进一步应用于中药制药类废水生物毒性的检测, 对其他工业废水生物毒性的快速检测也有一定的参考价值。

[参考文献]

- [1] 赵振辉, 伯绍毅, 章陆陆, 等. 中药生产废水处理工程实例[J]. 工业水处理, 2020, 40(11): 111-113.
- [2] 殷勤, 年跃刚, 周岳溪, 等. 中药制药行业水资源再利用途径及可行性分析[J]. 工业水处理, 2018, 38(11): 6-9.
- [3] 黄伟, 孙蓉. 柴胡皂苷类成分化学与药理和毒理作用研究进展[J]. 中药药理与临床, 2010, 26(3): 71-74.
- [4] 余登喜, 丁杰, 刘先树, 等. 强化混凝预处理削减中药废水的毒性[J]. 环境工程学报, 2016, 10(11): 6133-6138.
- [5] 国家环境保护局, 国家技术监督局. 水质 急性毒性的测定 发光细菌法: GB/T 15441—1995[S]. 北京: 中国标准出版社, 1995.
- [6] 马珂, 秦哲, 赵中庆, 等. 制药残留溶剂对废水生物降解系统

微生物毒性的测定方法比较[J]. 安全与环境学报, 2015, 15(6): 380-386.

- [7] 农永光, 胡刚. 发光细菌法在国内水质监测中的应用[J]. 分析仪器, 2012(1): 79-81.
- [8] 刘锐, 范举红, 穆春芳, 等. 制药废水的可生物降解性与生物毒性研究[J]. 生态毒理学, 2011, 6(5): 485-490.
- [9] ELAD T, ALMOG R, YAGUR-KROLL S, et al. Online monitoring of water toxicity by use of bioluminescent reporter bacterial biochips[J]. Environmental Science & Technology, 2011, 45(19): 8536-8544.
- [10] 吴泳标, 张国霞, 许政英, 等. 发光细菌在水环境生物毒性检测中应用的研究进展[J]. 微生物学通报, 2010, 37(8): 1222-1226.
- [11] 孙齐, 韩严和, 齐蒙蒙. 基于不同生物水平的毒性检测指标研究进展[J]. 环境工程, 2020, 38(9): 63-70.
- [12] 朱波, 吴斌生, 谢思琴. 生物毒性仪的测试原理及环境毒性检测的应用[J]. 北方环境, 2019, 31(11): 156-158.
- [13] 张宇. 环境污染快速检测技术的国内外研究进展[J]. 环境监测管理与技术, 2018, 30(6): 10-14.
- [14] 朱兰兰. 海洋细菌 *P. leiognathi* 的发光性能研究及其在食品安全检测中的应用探索[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2008.
- [15] YE Z F, ZHAO Q L, ZHANG M H, et al. Acute toxicity evaluation of explosive wastewater by bacterial bioluminescence assays using a freshwater luminescent bacterium, *Vibrio qinghaiensis* sp. Nov. [J]. Journal of Hazardous Materials, 2011, 186(2/3): 1351-1354.
- [16] 陈奕, 刘惠, 宋立杰, 等. 生物毒性试验在工业退役场地调查中的应用[J]. 环境监测管理与技术, 2017, 29(2): 59-63.
- [17] 李萍. 发光细菌急性毒性测试方法的完善及其在工业废水水质监督与管理中的应用研究[D]. 上海: 上海师范大学, 2012.