

中药废水主要成分厌氧生物降解途径研究

施悦^{1,2}, 任南琪², 章育铭², 肖荣新³

(1. 哈尔滨工程大学动力与能源工程学院, 哈尔滨 150001; 2. 哈尔滨工业大学市政环境工程学院, 哈尔滨 150090; 3. 大庆市环境监测中心站, 大庆 163316)

摘要:通过小试研究, 利用气-质联机(GC-MS)对黄芩甙的厌氧生物降解曲线和途径进行了探讨, 对黄芩甙的降解数据进行趋势化模拟和线性回归分析, 得到了相应的降解动力学方程. 黄芩甙可能的降解途径为“脱糖→脱苯→开环→饱和化→拆链”, 降解时间需 47 h 以上, 厌氧分解的主要产物是小分子氧化物, 如醇、醛、酸、酯、烯烃以及还原态饱和烷烃. 结果表明, 黄芩甙降解的限速步骤在水解酸化阶段, 适宜采用两相厌氧消化技术和较长的停留时间进行处理.

关键词:中药废水; 厌氧生物降解; 降解途径; 黄芩甙

中图分类号: X787 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2007)11-2515-05

Anaerobic Biodegradation Pathway of the Main Ingredient of Traditional Chinese Medicine Wastewater

SHI Yue^{1,2}, REN Nan-qi², ZHANG Yu-ming², XIAO Rong-xin³

(1. College of Power & Energy Engineering, Harbin Engineering University, Harbin 150001, China; 2. School of Municipal & Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China; 3. Daqing Environmental Monitoring Center Station, Daqing 163316, China)

Abstract: A laboratory-scale experiment was done. And the baicalin anaerobic biodegradation curve and pathway were discussed by analyzing the results of GC-MS. After analogue of status's trend and analysis of its regression, the biodegradation kinetic equation of baicalin was obtained. And the possible biodegradation pathway was “desugar → debentures → open benzene ring → saturating → disconnect links”. It took at least 47 h to biodegrade baicalin. The main products of anaerobic biodegradation were micro-molecule oxide, such as alcohols, aldehydes, acids, esters, olefin, and hydrocarbon of methane series. This result demonstrated that the rate-limiting steps of bacalin biodegradation were the hydrolyzing and acidification phase. It was suitable to use two-phase anaerobic process and long HRT to biodegrade baicalin.

Key words: traditional Chinese medicine wastewater; anaerobic biodegradation; biodegradation pathway; bacalin

有关有机污染物降解菌分离与降解特性的表征, 以及典型有机污染物厌氧生物转化与降解的研究一直是国内外的热点研究领域^[1, 2]. 但是, 关于难降解有机污染物的研究主要集中在治理方法和技术上, 有待从降解机理和途径角度进行深入研究和探讨. 目前中药生产企业排放的生产废水, 成分复杂、浓度高, 多数厂家都未经处理直接排放. 中药废水生物处理技术的研究大多关注在 COD 低于 5 000 mg/L、可生化性良好的易处理废水上, 研究水平也只停留在工程技术水平上, 没有针对其具体成分对降解途径和机理进行深入的研究^[3~10].

前期研究表明, 哈中药二厂废水中含有机物质 40 余种, 结合化学检测和有机物成分结构分析, 综合认定废水中主要成分有: 乙醇(约占废水总 COD 的 50% 左右)、黄芩甙(约占废水总 COD 的 10% 左右)、烃类(主要是长链饱和烃)和不饱和芳香族有机物等. 其中黄芩甙具有高 COD、低生物降解性的特点, 而且它还是一种发泡剂, 经过曝气甚至流动都会

产生泡沫, 曾在好氧曝气池单独运行时产生大量泡沫, 严重影响污泥沉降性和出水水质. 生产性试验中发现两相厌氧工艺可以有效降解该物质, 经过厌氧发酵, 它的影响几乎消失, 但代谢途径还不清楚. 所以本研究以降解黄芩甙为目标, 对厌氧微生物降解该物质的途径进行初步探讨.

1 材料与方法

1.1 试验装置和运行条件

1.1.1 实验装置

实验装置如图 1 所示. 将污泥和试验底物装入锥形瓶, 加盖胶塞(胶塞上装有排气管和取样口). 整个装置放入恒温振荡器中, 温度设置为 $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

收稿日期: 2006-11-20; 修订日期: 2007-02-12

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863)项目(2002AA601310); 黑龙江省科技攻关计划重点项目(GA01C201-01); 哈尔滨工程大学校基金项目(002030260731); 黑龙江省博士后基金项目(01105306); 中国博士后科学基金项目(20060400243)

作者简介: 施悦(1977~), 女, 博士, 副研究员, 主要研究方向为工业废水厌氧生物处理及能源利用技术, E-mail: realshiyue@sohu.com

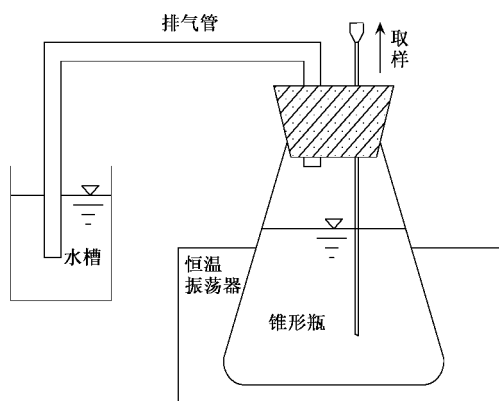


图 1 静态试验装置

Fig.1 Schematic diagram of batch tester

1.1.2 底物和种泥

试验底物为黄芩甙标准品,它的质量分数在 95% 以上.试验用厌氧絮状活性污泥(每瓶加入 50 mL, VSS = 27.04 g/L)取自连续流处理中药废水的两相厌氧反应器中的产酸相反应器.

1.1.3 操作条件

(1)确定最佳底物浓度试验 分别取不同质量的黄芩甙,投加到相同浓度的污泥中,配成不同底物浓度的反应液.然后在厌氧条件下培养,测定各反应液在不同时间段的黄芩甙含量,确定出最佳的反应底物浓度及其生物降解曲线.具体步骤如下:①取出产酸污泥,过滤筛去杂质,测定其污泥浓度;②取 3 个 150 mL 锥形瓶并标号,向反应瓶中分别加入不同质量的黄芩甙,依次加入相同体积的产酸污泥,并定容最终体积为 150 mL;③向每个反应瓶中通入 5 min N_2 ,然后用胶塞密封,以确保厌氧环境.将各反应瓶置于恒温振荡器中(设定温度为 33℃),用排水法保证气密性;④记录开始时间,每隔 3~4 h 测定反应瓶的黄芩甙含量并绘制曲线,根据曲线确定最佳底物浓度,以及该条件下的停滞期、代谢旺盛期等重要参数.

(2)代谢途径试验 最佳底物浓度条件下,测定各时间段产酸菌的代谢产物(色-质联机),推测其分解黄芩甙可能的代谢途径.具体步骤:①按照试验步骤(1)确定的条件将产酸菌与污泥混合成 10 个平行样;②配制 1 瓶空白样品:污泥浓度与其它样品相同,准备 0 时刻取出;③通入 N_2 ,密封,放入恒温振荡器中反应.从试验开始每隔 3 h 取出一个样品作以下测定:a.离心使固液分离后,取上清液待测(密封并置入冰箱);b.萃取:每个样品取 50 mL 溶液,加

入 5 mL 四氯化碳,振荡 5 min,静置分层后取出下部溶液;重复操作 1 遍;将得到的四氯化碳溶液加入 5 g 无水硫酸钠待测;c.将样品进行气-质联机分析;d.将气-质联机数据进行比对与整理,推测黄芩甙的代谢途径.

1.2 分析项目和方法

1.2.1 黄芩甙的测定

(1)标准曲线的绘制 本方法依据《中国药典》标准 WS3-183(Z-033)-98(Z)^[11].对照品溶液的制备:精密称取在 105℃ 干燥至恒重的黄芩甙标准品 10 mg 置于 50 mL 容量瓶中,加 50% 乙醇约 40 mL,置水上加热溶解,放冷至室温,加 50% 乙醇至刻度.精密吸取 10 mL 置 100 mL 容量瓶中,加 50% 乙醇至刻度,摇匀即可(每 mL 中含无水黄芩甙 20 μ g).标准曲线的绘制:精密量取对照品溶液 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL,分别置于 10 mL 容量瓶中,加 50% 乙醇至刻度.以 50% 乙醇为空白,按照分光光度法^[11],在 276 nm 波长测定吸光度(752N 分光光度仪).以浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线(图 2).

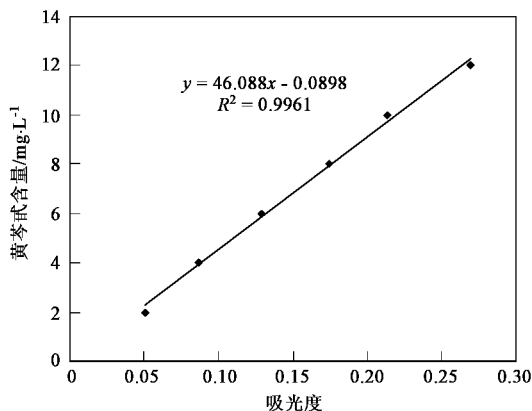


图 2 黄芩甙测定标准曲线

Fig.2 Standard curve of baicalin detection

(2)黄芩甙含量的测定 用移液管取 2 mL 待测溶液,置入 100 mL 容量瓶里,加入 50 mL 无水乙醇,然后用蒸馏水定容 100 mL.再精密量取 1.0~5.0 mL (该体积根据溶液中黄芩甙的浓度而变化)置入 10 mL 比色管里,用 50% 乙醇溶液定容 10 mL.稀释后黄芩甙的含量在 2~12 mg/L.测定吸光度,根据标准曲线公式求出原溶液中的黄芩甙含量.

1.2.2 代谢产物的测定

为分析黄芩甙物质代谢的组成成分,利用美国 Agilent 公司生产的气-质联用机(GC-MS),型号 GC-6890N/MS-5973N,对水样进行测定,对照标准图

谱,可得出水样中含有的有机物质的分子式及其结构.

具体方法是通过比较 CCl_4 萃取溶液(空白 1)、黄芩甙标准品与污泥混合后的空白萃取样品(0 h, 空白 2)以及加入黄芩甙标准品一段时间后(3、9、28、47 h)的混合液萃取样品的色谱图,确定各样品测定中的有效离子流峰值;然后再经过分析比对将 2 个空白样品中所检测到的物质去除,最后根据质谱图碎片整理以及相似性几率具体确定厌氧菌沿时分解黄芩甙产物的具体结构信息.

2 结果与分析

2.1 黄芩甙降解曲线

取产酸相反应器中的厌氧絮状活性污泥 50 mL ($\text{VSS} = 27.04 \text{ g/L}$)置入 150 mL 的锥形瓶,分别加入不同质量的黄芩甙后定容,配成底物浓度分别为 500、1 000、1 500 mg/L 反应液.在厌氧条件下培养,测定各反应液在不同时间段的黄芩甙含量,选取该污泥浓度下的最适反应液浓度,为进行下一步的代谢途径试验作铺垫.

通过试验结果的对比、优选,将最适浓度确定为 1 500 mg/L.从不同时间段取出样品,测定黄芩甙代谢时间曲线(图 3).对前 30 h 的累积去除率进行趋势化模拟以及回归处理(图 4),得到降解动力学方程为:

$$y = 2.0998x + 1.2765$$
$$(R^2 = 0.9921)$$

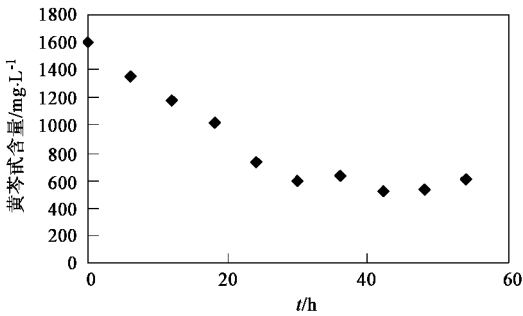


图 3 黄芩甙生物降解曲线

Fig.3 Biodegradation curve of baicalin with time

2.2 黄芩甙沿时代谢途径初探

黄芩甙的代谢产物结构鉴定是揭示该物质代谢机理、反应途径的重要手段.一般情况下复杂化合物经过代谢转化后,形成分子量更小的化合物.试验以色-质联机同步检测厌氧产酸发酵各个时期消化液

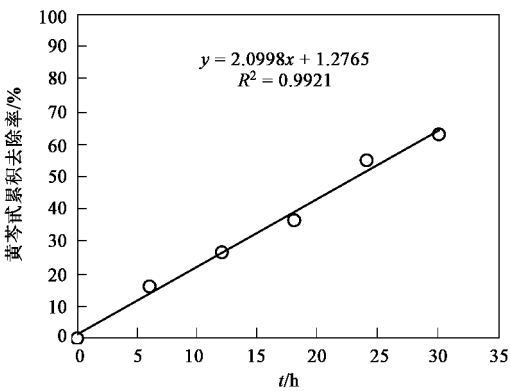


图 4 黄芩甙累积代谢曲线

Fig.4 Cumulate metabolic curve of baicalin

的主要产物,具体检测物及分析情况如下:①3 h 消化液中含有较多苯系物,特点是 1~2 个苯环,带不饱和、饱和支链.据 3 h 检测到物质的质谱图推测产酸菌群对黄芩甙的降解步骤首先是脱糖,然后将甙元中的苯环脱下,并进行了简单的基团修饰和改造;②9 h 消化液中主要分解产物为苯系物、长链不饱和醇、酯、醛以及长链饱和烃.据 9 h 检测到的部分物质的质谱图推测产酸菌群对黄芩甙的进一步降解是将 2 个苯环中的 1 个环打开;③28 h 消化液中含有的物质比较复杂,兼具前 3 h 和 9 h 取样的特点,并含有较多饱和苯系物和饱和烃.据 28 h 检测到的部分物质的质谱图推测产酸菌群对黄芩甙进一步的降解是将苯环和其所带的侧链进行饱和化,然后再直接拆环变成各种长链的饱和烃;④47 h 消化液中主要含有短链饱和烃,不饱和酸、酯、醇、醛等,苯系物已经很少.据 47 h 检测到的部分物质的质谱图推测此阶段完成的是将糖元开环、苯开环以及将饱和烃继续拆分为短链酸、酯、醇等小分子物质.

根据具体的试验结果,认为黄芩甙在厌氧微生物作用下,分解可能经历的过程为:“脱糖→脱苯→开环→饱和化→拆链”(见图 5).试验进行到 47 h 以后就很少检测到芳香族化合物,说明此时大部分苯环已经打开.逐步被饱和化后进一步拆分为小分子饱和、不饱和酸、醇等物.厌氧反应后期主要得到的是小分子氧化态物质,如醇、醛、酸、酯、烯烃及还原态饱和烷烃.

3 讨论

根据黄芩甙可能的降解途径和其长达 47 h 大分子变小分子的降解时间,认定其降解的限速阶段在水解、酸化阶段.利用两相分离的厌氧消化技术,

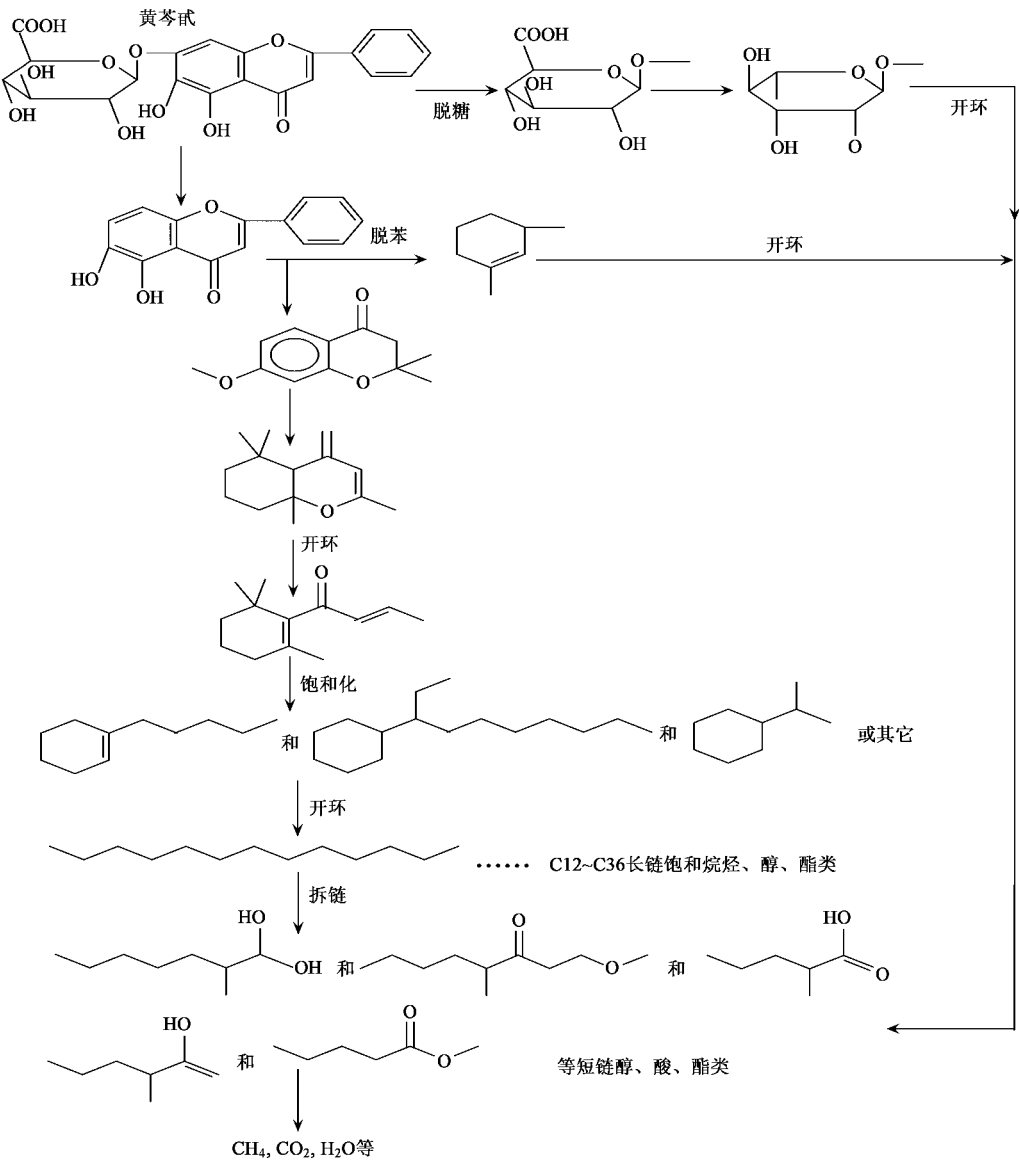


图 5 黄芩甙可能的降解途径
Fig.5 Possible biodegradation pathway of baicalin

可以消除那些带有苯环、侧链及难降解的中间产物对产甲烷菌的影响，因此含有该污染物的中药废水适宜用两相厌氧工艺处理，同时应采用较长的停留时间彻底分解黄芩甙，消除其对好氧系统的影响。

研究中药废水的厌氧生物降解途径在以下两方面有较大突破：①中药废水的处理以其复杂的成分和难以为人认知的降解途径为难点，此领域至今研究较少；②复杂工业废水的厌氧生物降解途径也是研究的热点与难点，该方面的创新也较大。

国外研究者近年来针对一些难降解污染物高效降解途径的缺乏和现有已知途径的缺陷，提出了应用分子生物学等手段进行降解途径的设计、组装，

新代谢途径的创建，以扩展降解菌利用底物的范围，避免有毒中间产物的形成，提高底物通量及其生物可利用性，增加催化活性的稳定性等^[12~14]，这方面的工作有赖于对降解菌生理生化、遗传学特性的全面认识，是今后生物降解研究的重点与热点。因此，建议以同位素追踪等更高的检测手段对黄芩甙的降解途径进行进一步的深入研究。

4 结论

(1) 测定了废水中主要的难降解污染物-黄芩甙代谢的时间曲线并对前 30 h 的累积去除率进行趋势化模拟以及回归处理，得到降解动力学方程为

$y = 2.0998x + 1.2765 \quad (R^2 = 0.9921)$.

(2) 根据 GC-MS 具体的试验结果, 认为黄芩甙在厌氧微生物作用下分解, 可能经历的过程为: “脱糖→脱苯→开环→饱和化→拆链”. 试验进行到 47 h 以后就很少检测到芳香族化合物, 说明此时大部分苯环已经打开, 逐步被饱和化后进一步拆分为小分子饱和、不饱和和酸、醇等物. 厌氧反应后期主要得到的是小分子氧化态物质, 如醇、醛、酸、酯、烯烃及还原态饱和烷烃.

(3) 根据黄芩甙可能的降解途径, 推测黄芩甙降解的限速阶段应该在水解、酸化阶段, 适宜利用两相分离的厌氧消化技术, 采用较长的停留时间对其进行处理.

参考文献:

[1] Hardman D J. Biotransformation of halogenated compounds [J]. Critical Reviewsin Biotechnol, 1991, **11**(1): 1 ~ 40.

[2] 徐向阳, 任艳红, 黄绚, 等. 典型有机污染物微生物降解及其分子生物学机理的研究进展[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2004, **30**(6): 684 ~ 689.

[3] 袁守军, 郑正, 孙亚兵. 水解酸化-两级接触氧化法处理中药废水[J]. 环境工程, 2004, **22**(4): 22 ~ 23.

[4] 华玉芝, 李福勤, 王冬云. 中药厂废水处理及回用[J]. 中国

给水排水, 2004, **2**(5): 75 ~ 77.

[5] 李金成, 张学洪, 解庆林. 厌氧-好氧法治理中药废水研究[J]. 云南环境科学, 2000, **19**(增刊): 175 ~ 176.

[6] 韩相奎, 崔玉波, 黄卫南. 用 SBR 法处理中药废水[J]. 中国给水排水, 2000, **16**(4): 47 ~ 48.

[7] 宁天禄, 姚重阳, 闫春娥, 等. 应用水解-好氧生物法处理中药废水[J]. 工业水处理, 1998, **18**(6): 35 ~ 37.

[8] 陈志强, 吕炳南. 低压蒸馏法处理高浓度中药废水的研究[J]. 哈尔滨建筑大学学报, 1999, **32**(6): 16 ~ 18.

[9] 吴志超, 顾国维, 何义亮, 等. 高浓度有机废水厌氧膜生物工艺处理的中试研究[J]. 环境科学学报, 2001, **21**(1): 34 ~ 38.

[10] 聂云, 张青, 李伟森. 混凝-SBR 组合工艺处理中药厂废水的研究[J]. 天津化工, 2000, **27**(4): 14 ~ 15.

[11] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中国药典[M]. 北京: 化学工业出版社, 1995. 32.

[12] Timmis K N, Pieper D H. Bacteria Designed for Bioremediation [J]. Trend in Biotechnol, 1999, **17**: 201 ~ 204.

[13] Pieper D H, Martins D, Antos V A P, *et al.* Genomic and Mechanistic Insights into Biodegradation of Organic Pollutants [J]. Current Opinionin Biotechnol, 2004, **15**: 215 ~ 224.

[14] Johan ET van Hylckama Vlieg, Poelarends G J, Janssen D B, *et al.* Detoxification of Reactive Intermediates During Microbial Metabolism of Halogenated Compounds [J]. Current Opinion in Microbiol, 2000, **3**: 257 ~ 262.