

氧化还原类酶活性在农业废弃物静态高温堆腐过程中变化的研究

谷 洁, 李生秀, 秦清军, 李鸣雷, 高 华

(西北农林科技大学资源环境学院, 杨凌 712100)

摘 要: 以鸡粪和麦秸为原料, 在静态通气条件下, 研究了堆腐过程堆体温度及氧化还原酶活性变化。结果表明, 添加微生物菌剂后, 堆体不同部位温度均高于 CK (不加微生物菌剂) 处理, 且升温阶段持续时间较短。微生物菌剂处理堆料 50℃ 以上的持续时间为 14~20 d, CK 处理 50℃ 以上的持续时间 7.5~10 d; 添加微生物菌剂处理的过氧化氢酶活性在第 1~26 d 均大于 CK 处理; 堆料中添加菌剂处理在堆腐中期的脱氢酶活性大于 CK 处理; 添加菌剂处理在堆肥的第 5~28 d, 多酚氧化酶活性大于 CK 处理的活性; 说明微生物菌剂可促进有机物的降解及其降解产物的转化。添加菌剂处理在堆腐 30 d 后 E_4/E_6 (为胡敏酸在 465 nm 与 665 nm 波长下吸光值的比值) 比值为 1.57~1.68, CK 处理为 2.16~2.41, 表明添加菌剂能促进腐殖质的缩合和芳构化。

关键词: 农业废弃物; 温度; 氧化还原酶活性; E_4/E_6 值

中图分类号: X71

文献标识码: A

文章编号: 1002-6819(2006)02-0138-04

谷 洁, 李生秀, 秦清军, 等. 氧化还原类酶活性在农业废弃物静态高温堆腐过程中变化的研究[J]. 农业工程学报, 2006, 22(2): 138-141.

Gu Jie, Li Shengxiu, Qin Qingjun, et al. Changes of oxidization and reduction enzymes of agricultural waste materials during composting at high temperature and static state[J]. Transactions of the CSAE, 2006, 22(2): 138-141. (in Chinese with English abstract)

0 引 言

随着畜牧业集约化规模化生产不断扩大, 未经处理的大量畜禽粪便对养殖区域环境造成了严重污染^[1]。另一方面, 畜禽粪便中含有作物生长所需的养分和有机质, 是一种重要的肥料资源。畜禽粪便含水量高, 散发恶臭气味, 含有病原生物是制约其直接利用的主要问题^[2]。进行畜禽粪便无害处理, 减容增效, 最大限度满足环境的可接受性及经济上的可行性是肥料资源化利用的发展方向。

有机物料堆腐的研究已有很长历史, 但过去的工作都是在人工翻堆和未添加复合微生物菌剂的条件下进行的, 所得结果仅适于这类情况。人工翻堆固然可以加速腐熟过程, 但费工费时, 会使大量有机物质损耗, 也难以满足有机肥大规模生产的要求, 而且人工翻堆还会造成生物气溶胶(细菌、真菌、放线菌、节肢动物、原生动物以及微生物代谢过程中的一些产物, 如酶、内毒素、真菌毒素等)在空气中扩散并影响人体健康^[3]。因而静态堆腐并添加外源复合微生物菌剂堆肥已成为研究和应用的热点。目前人们对堆腐的研究主要集中在条件的控制(如温度、氧气、C/N 比、pH 值等)^[4-6]和工艺参数的选择方面^[7,8], 而对堆腐过程酶活性变化涉及不多。由于堆腐过程是在微生物及其分泌的酶作用下进行的^[9], 研究

酶活性的变化可以进一步推断腐解进程和机理。氧化还原酶是参与堆腐过程生物化学反应的一类重要酶, 研究氧化还原酶活性的变化, 可以推断堆腐过程腐殖质化进程和强度。胡敏酸 E_4/E_6 值(E_4 、 E_6 分别为胡敏酸在 465 nm 和 665 nm 波长下吸光值)是分析胡敏酸结构的重要参数^[10], 分析 E_4/E_6 值的变化可推断腐殖质的缩合度和芳构化程度。本文从这一方面出发, 研究了过氧化氢酶、多酚氧化酶、脱氢活性变化, 温度变化, 以及 E_4/E_6 值的变化。

1 材料与方法

1.1 堆肥材料

本试验所用农业废弃物为鸡粪和小麦秸秆, 其养分含量见表 1。

表 1 鸡粪和小麦秸秆养分含量(烘干样)

Table 1 Nutrient contents in the chicken excrement and wheat straw (Oven-dried base)

试验材料	有机碳 /g · kg ⁻¹	粗有机物 /g · kg ⁻¹	全氮 /g · kg ⁻¹	C/N	全磷 /g · kg ⁻¹	全钾 /g · kg ⁻¹
鸡粪	311.6	496.1	27.1	14.36	21.2	19.2
小麦秸秆	396.1	817.4	6.3	62.9	1.86	12.4

1.2 试验方法

试验于 2004 年 7 月 20 至 9 月 1 日在西北农林科技大学资源环境学院网室进行。首先将麦秸切成 3~5 cm 小段, 与鸡粪(含水率 72.3%)混合, 调节鸡粪与麦秸的混合比例为 0.56~0.63:1, 使混合物中 C/N 比为 30~35:1^[10]。此后加水, 使堆料水分含量在 55%~65% 范围之内^[10]。试验设添加腐解复合菌剂和不加菌剂的对照(CK)两处理。将以上处理的混合有机物质分

收稿日期: 2005-04-14 修订日期 2005-08-25

基金项目: 科技部“农转资金项目”(02EFN216101195, 03EFN21100230); 陕西省“农业科技攻关项目”(2003K02-G13-01)

作者简介: 谷 洁(1963-), 男, 汉族, 陕西周至人, 副教授, 博士研究生, 主要从事农业废弃物资源化利用研究。杨凌 西北农林科技大学资源环境学院, 712100。Email: gujoyer@sina.com.cn

别装入堆肥装置中(图1)。堆料不同部位插有测温探头,与自动记录仪连接,能测量和记录堆腐过程中有机物料的温度变化。定期从堆肥装置中部采集样品,混匀,用于测定氧化还原酶活性、 E_4/E_6 值。堆料腐熟后停止

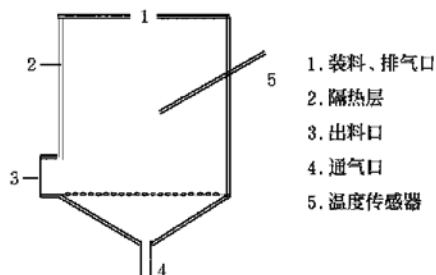


图1 堆肥发酵装置图

Fig. 1 Diagram of composting device

采样。

1.3 堆腐装置

堆腐装置由两个高 1.0 m, 内径 0.6 m, 外径 0.7 m 的圆柱形发酵罐(反应器)组成。发酵罐由双层不锈钢构成外壳, 层间有 0.5 cm 厚的保温材料; 底部为带有小孔的不锈钢圆板, 堆肥材料混匀置于其上。空气从罐底部进入, 通过圆板的透气小孔进入罐内, 穿过堆肥物料后从上部排出。

1.4 测定项目与方法

温度用 ZDR-11 型温度记录仪, 装置堆料时安放传感器探头于固定位置, 自动记录温度动态变化。酶活性测定方法参照关松荫著作中的方法^[11], 过氧化氢酶测定是在样品中加入过氧化氢后培养 20 min, 用高锰酸钾滴定, 活性单位以 $0.001N$ 高锰酸钾 $\cdot g^{-1} \cdot (20 \text{ min})^{-1}$ 表示。脱氢酶测定是在样品中加入氢的受体三苯基四唑氯化物后培养 24 h, 测定脱氢酶作用下生成红色甲月替量, 活性用 $\mu L H^+ \cdot g^{-1} \cdot (24 \text{ h})^{-1}$ 表示。多酚氧化酶测定是在样品中加入邻苯三酚后培养, 使邻苯三酚在多酚氧化酶作用下氧化成紫色没食子素, 测定没食子素含量以表征多酚氧化酶活性, 单位为 mg 没食子素 $\cdot g^{-1} \cdot (2 \text{ h})^{-1}$ 。胡敏酸 E_4/E_6 值是测定堆料分别在 465 nm 和 665 nm 波长下吸光值的比值。堆腐物料中有机碳用重铬酸钾法, 全氮用凯氏消煮蒸馏法, 全磷用钒钼黄比色法, 全钾用火焰光度计法。

2 结果与讨论

2.1 堆肥过程中温度变化

温度影响微生物活动能力, 因而是影响微生物腐解有机物料的重要因素。在一定温度范围内, 温度每升高 $10^\circ C$, 有机体的生化反应速率提高一倍^[12]。温度升高到一定程度并维持一定时间, 可以杀灭病原生物, 达到无害化处理的要求。

有机物料堆腐过程中的温度变化, 研究者划分标准不一。有的划分为 4 个阶段^[13-15]: 发热阶段(由常温升到 $50^\circ C$); 高温阶段($50^\circ C \sim 70^\circ C$); 降温阶段($< 50^\circ C$); 后熟保肥阶段(堆内温度稍大于外界气温); 有的划

分^[16-18]为 3 个阶段, 即升温过程, 持续高温过程, 降温过程。这两种划分法基本无差异, 不同之处是前者由降温阶段中划分出后熟保肥阶段, 以便在此阶段减少通气, 保存养分。

本试验表明(图2), 发酵罐底部有进气口, 热量容易散失, 距离堆体底部 40 cm 处温度一直较低; 堆体中上部(60~80 cm)温度一直较高。加入微生物菌剂处理的堆体物料从环境温度上升到 $50^\circ C$, 离堆体底部 40 cm、60 cm 处所用时间分别为 8 h 和 7 h, 升温速率分别为 $2.28^\circ C/h$ 和 $2.42^\circ C/h$, 大于 $50^\circ C$ 高温持续时间分别分 14 d 和 20 d。CK 处理的堆体物料从环境温度上升到 $50^\circ C$, 离堆体底部 40 cm、60 cm 处所用时间分别为 38 h 和 27 h, 升温速率分别为 $0.48^\circ C/h$ 和 $0.67^\circ C/h$, 大于 $50^\circ C$ 高温持续时间分别为 7.5 d 和 10 d。根据中国《粪便无害化卫生标准(GB7959-87)》规定, 堆肥温度在 $50 \sim 55^\circ C$ 以上持续 5~7 d 就可杀灭病原生物的标准, 两种处理的堆体不同部位温度均达到这一标准。加入微生物菌剂处理升温较快, 高温持续时间较长。

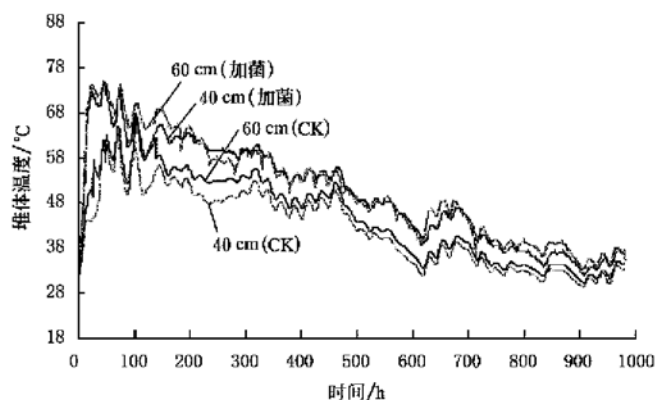


图2 堆体不同部位温度的变化

Fig. 2 Temperature changes in composting profile during composting

2.2 堆腐过程氧化还原类酶活性的变化

在微生物分泌的胞外酶的作用下把矿质化分解过程产生的部分产物合成为复杂的腐殖质的过程即腐殖质化过程, 这一生物化学合成过程中, 氧化还原酶起着重要作用, 其活性的大小直接决定堆腐进程和强度。

1) 过氧化氢酶活性的变化

微生物分泌的过氧化氢酶与生物氧化反应密切相关, 其活性大小反映堆肥中有机质转化的强度^[19]。由图3看出, 在堆腐过程中加入微生物菌剂处理的过氧化氢酶活性在第 1~24 d 高于 CK 处理, 堆肥进入高温期该酶活性显著降低, 可能与高温引起的微生物种类和数量显著减少有关。在堆肥后期(24~34 d)过氧化氢酶活性保持较稳定, 其活性范围在 1840~1860 mL 0.001N 高锰酸钾之间。

2) 脱氢酶活性变化

脱氢酶属于氧化酶, 其变化可以反应堆肥过程的物质氧化程度。从图4可以看出, 在堆料开始升温阶段, 两种处理脱氢酶活性随温度升高而下降; 添加菌剂处理堆

腐 24 h, 温度升至 63℃, 脱氢酶活性降至 $4.12 \mu\text{L H}^+ \cdot \text{g}^{-1} \cdot (24 \text{ h})^{-1}$ 。CK 处理由于温度上升慢, 脱氢酶活性降低较慢, 在 48 h 时脱氢酶活性降至 $5.09 \mu\text{L H}^+ \cdot \text{g}^{-1} \cdot (24 \text{ h})^{-1}$ 。在开始升温阶段内温度上升迅速, 低温微生物不适应较高温度, 活动能力降低, 分泌的脱氢酶量减少^[20]。随温度平缓下降, 高温微生物活动旺盛, 大量分泌脱氢酶, 脱氢酶活性升高, 添加菌剂处理的脱氢酶活性达到高峰 $25.66 \mu\text{L H}^+ \cdot \text{g}^{-1} \cdot (24 \text{ h})^{-1}$, 之后脱氢酶有下降趋势; CK 处理的高峰值为 $21.62 \mu\text{L H}^+ \cdot \text{g}^{-1} \cdot (24 \text{ h})^{-1}$ 。脱氢酶活性在堆腐中期较高, 反映了堆腐过程的氧化反应主要在堆腐中期进行。添加菌剂处理的脱氢酶活性在堆腐中期高于 CK 处理, 说明加入菌剂对堆肥的物质分解具有促进作用。

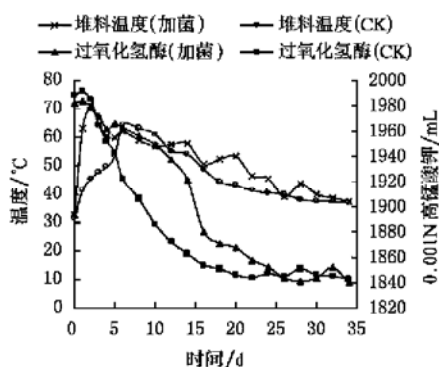


图 3 堆肥过程过氧化氢酶活性变化

Fig. 3 Changes of enzyme of H_2O_2 during composting

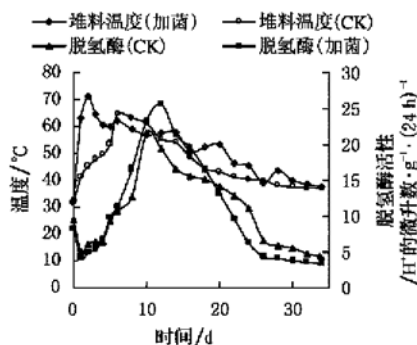


图 4 堆肥过程脱氢酶活性变化

Fig. 4 Changes of dehydrogenase activity during composting

3) 多酚氧化酶变化

木质素是农业废弃物中含量较高而又不易分解的一种物质。多酚氧化酶不仅能催化木质素降解, 还能使木质素氧化后的产物醌与氨基酸缩合生成胡敏酸^[21, 22]。从图 5 可以看出, 加入菌剂的在堆腐 0~3 d 内, 堆料温度上升, 多酚氧化酶活性增加, 第 3 d 达到 $3.11 \text{ mg 没食子素} \cdot \text{g}^{-1} \cdot (2 \text{ h})^{-1}$ 。CK 处理多酚氧化酶活性随温度上升而缓慢增加, 但其活性值低于加入微生物菌剂处理。加入菌剂的多酚氧化酶活性和温度变化有密切联系, 从堆腐第 5 d 到第 28 d, 两者的变化方向相反, 呈极显著负相关 ($r = -0.710$; $a = 0.05$ 时,

$r = 0.532$; $a = 0.01$ 时, $r = 0.661$); CK 处理的多酚氧化酶活性和温度变化也有密切联系, 从堆腐第 8 d 到第 34 d, 两者的变化呈极显著负相关 ($r = -0.970$; $a = 0.05$ 时, $r = 0.532$; $a = 0.01$ 时, $r = 0.661$)。多酚氧化酶在堆肥中后期的活性比堆肥前期高, 可能与堆肥过程中木质素在中后期分解以及胡敏酸在中后期合成有关^[15]。在堆肥的第 5 d 至第 28 d, 加入菌剂处理的多酚氧化酶活性始终高于 CK 处理的活性, 可以更好的促进木质素的降解及其产物的转化。

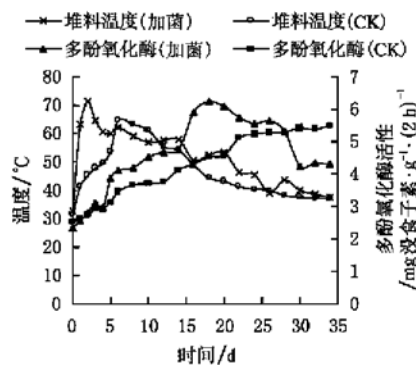


图 5 多酚氧化酶活性的变化

Fig. 5 Changes of polyphenol oxidase activity during composting

2.3 堆腐过程 E_4/E_6 值的变化

E_4/E_6 值通常作为胡敏酸缩合度和芳构化程度的重要指标, E_4/E_6 比值愈低, 表明腐殖质的缩合度和芳构化程度愈高, 分子量愈大^[16]。图 6 为堆腐不同阶段 E_4/E_6 比值的变化。结果表明, 堆腐前期, E_4/E_6 比值随温度的上升而增高。加入菌剂处理在堆腐第 3 d E_4/E_6 比值达到最高值为 3.41, CK 处理在堆腐第 4 d E_4/E_6 比值达到最高值为 4.12, 随着堆腐的进行, E_4/E_6 比值呈下降趋势, 加入菌剂处理在堆腐 30 d 之后 E_4/E_6 比值在 1.57~1.68 之间, CK 处理 E_4/E_6 比值在 2.16~2.41 之间。说明加入菌剂能促进腐殖质的缩合和芳构化。

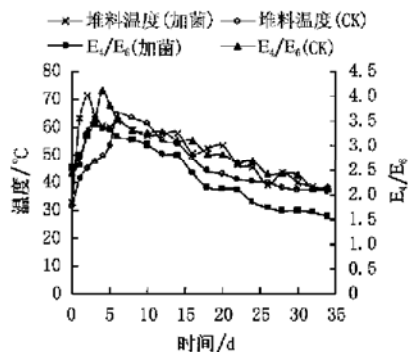


图 6 E_4/E_6 值变化曲线

Fig. 6 Changes of E_4/E_6 values

3 结 论

1) 农业废弃物堆肥腐解过程中添加微生物菌剂

后,堆体不同部位温度均高于CK处理,且升温阶段持续时间较短,堆料50℃上持续时间可达14~20 d,CK处理的持续时间7.5~10 d。

2) 添加微生物菌剂处理的过氧化氢酶活性在1~26 d均高于CK处理;添加菌剂处理在堆腐中期的脱氢酶活性高于CK处理,说明添加菌剂对堆肥的物质分解具有促进作用。在堆肥的第5~28 d,加入菌剂处理的多酚氧化酶活性高于CK处理的活性,表明微生物菌剂可促进木质素的降解及其降解产物的转化。

3) 添加菌剂处理在堆腐30 d之后,堆料 E_4/E_6 比值在1.57~1.68之间,CK处理 E_4/E_6 比值在2.16~2.41之间,添加菌剂后 E_4/E_6 比值较低,说明添加菌剂能促进腐殖质的缩合和芳构化。

[参 考 文 献]

- [1] 黄国锋,吴启堂,孟庆强,等.猪粪堆肥化处理的物质变化及腐熟度评价[J].华南农业大学学报(自然科学版),2002,23(3):1-4.
- [2] 沈中泉,袁家富.商品性有机肥工厂化生产研究动态[J].植物营养与肥科学报,1998,4(2):117-122.
- [3] Millnax P D, Olenchock S A. Bioaerosols associated with composting facilities[J]. Compost Science & Utilization, 1994, 2(4): 6-57.
- [4] S Smars, L Gustafsson, B Beck-Friis, et al. Improvement of the composting time for household waste during an initial low pH phase by mesophilic temperature control [J]. Bioresource Technology, 2002, 84, 237-241.
- [5] Miguel Angel Lopez Zavala, Naoyuki Funamizu, Tetsuo Takakuwa. Modeling of aerobic biodegradation of feces using sawdust as a matrix[J]. Water Research, 2004, 38, 1327-1339.
- [6] 庞金华,程平宏,余廷园.高温堆肥的水气矛盾[J].农业环境保护,1999,18(2):73-75.
- [7] 魏辉,罗永华,郭俊,等.利用畜禽粪便生产生物有机

- 复合肥的发酵工艺研究[J].生物技术,1999,9(5):30-34.
- [8] 吴鸿强.城市垃圾堆肥深度加工的处理工艺及设备[J].环境学报,1998,(3):22-24.
- [9] 杨柳燕,肖琳.环境微生物技术[M].北京:科学出版社,2003:257-265.
- [10] 张福锁,龚元石,李晓林.土壤与植物营养研究新动态(第三卷)[M].北京:中国农业出版社,1995,319-343.
- [11] 关松荫.土壤酶及其研究法[M].北京:农业出版社,1983:260-339.
- [12] 武汉大学、复旦大学生物系微生物学教研室.微生物学[M].北京:高等教育出版社,1987:243-252.
- [13] 陆欣.土壤肥科学[M].北京:中国农业大学出版社,2002:294-297.
- [14] 李阜棣,胡正嘉.微生物学[M].北京:中国农业出版社,2000:288-291.
- [15] 毛知耕.肥料学[M].北京:中国农业出版社,1997:313-317.
- [16] 李国学,张福锁.固体废物堆肥化与有机复混肥生产[M].北京:化学工业出版社,2000:75-79,91-95,38-40,98-121.
- [17] 赵四才,柴晓利.生活垃圾资源化原理与技术[M].北京:化学工业出版社2002.140-184.
- [18] 朴哲,崔宗均,苏宝林.高温堆肥的生物化学变化特点及植物抑制物质的降解规律[J].农业环境保护,2001,20(4):206-209.
- [19] 汪恒英,周守标,常志州,等.接种一株嗜热球杆菌对堆肥腐熟进程的影响[J].江苏农业科学,2004,20(9):78-83.
- [20] 贾士儒.生物反应工程原理[M].北京:科学出版社,2003:34-47.
- [21] 谢春艳,宾宝华,陈兆平,等.多酚氧化酶及其理化功能[J].生物化学学报,1999,34(6):11-13.
- [22] 王宜磊.白腐菌多酚氧化酶研究[J].山东理工大学学报(自然科学版),2003,17(1):100-102.

Changes of oxidization and reduction enzymes of agricultural waste materials during composting at high temperature and static state

Gu Jie, Li Shengxiu, Qin Qingjun, Li Minglei, Gao Hua

(College of Resources and Environment, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China)

Abstract: An experiment was conducted with mixed materials of chicken excrement and wheat straw to study the changes of temperature and oxidization and reduction enzyme during rotting processing in a static state. Results showed that temperatures of different positions of the treatments of adding microorganism fungus were higher than those of CK, and the temperatures rose more quickly than those of CK. The temperature of the materials adding microorganism fungus above 50℃ lasted for 14~20 d, and that of CK was 7.5~10 d. The activity of enzyme of H_2O_2 in the materials adding microorganism fungus was higher than that of CK during 1~26 d, and dehydrogenase activity was higher than that of CK in the middle period of the composting. All of them indicated that the microorganism fungus could promote the decomposition. During 5~28 d the materials of adding microorganism fungus, the polyphenol oxidized activity was higher than that of CK, and the E_4/E_6 values of materials of adding microorganism fungus were 1.57~1.68, and the E_4/E_6 values of CK were 2.16~2.41 after 30 d, which indicated that microorganism fungus could promote processing of humus.

Key words: agricultural waste materials; temperature; activity of oxidization and reduction enzyme; E_4/E_6 value