

生物表面活性剂在农业废物好氧堆肥中的应用

戴芳, 曾光明*, 袁兴中, 吴小红, 时进钢

(湖南大学环境科学与工程系, 长沙 410082)

摘要: 以稻草秸秆和麸皮为堆肥原料, 本实验室制取的鼠李糖脂为促进剂, 进行了控温条件下堆肥一次发酵的实验研究. 堆肥采用好氧静态堆肥技术, 含水率控制在 60% ~ 70%, 通气量采用时间控制方式, 发酵周期 18d. 实验分析了堆肥过程中有机质、pH 值、水溶性有机碳、微生物种群密度、半纤维素酶活、羧甲基纤维素酶活、半纤维素和纤维素含量等指标随时间的变化特征. 实验结果表明, 堆肥过程中, 实验组的有机质降解率比对照样高 13.4%, 水溶性有机碳的平均含量提高了 2.2g/kg, 同时半纤维素和纤维素的降解率分别增加了 5.7%、10.7%. 研究表明, 添加鼠李糖脂能够改善堆肥处理的微环境, 增强聚合物的水合程度, 促进有机质降解, 从而加快堆肥进程, 提高堆肥产品品质.

关键词: 好氧堆肥; 农业废物; 生物表面活性剂; 鼠李糖脂

中图分类号: X712 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2005)04-0181-05

Application of Biosurfactant in Composting of Agricultural Waste

DAI Fang, ZENG Guang-ming, YUAN Xing-zhong, WU Xiao-hong, SHI Jin-gang

(Department of Environmental Science and Engineering, Hunan University, Changsha 410082, China)

Abstract: The biosurfactant of rhamnolipid (Rh) obtained from *Pseudomonas aeruginosa* was used in co-composting of rice straw and wheat bran, the efficiency of the promoter was studied under temperature control during the first stage of composting. Composting was done in an aerobic static bed of composting during which moisture content of mixture materials was controlled between 60% ~ 70%, and the control of aeration adopted the timer by turns of 0.18 m³/h for 20 minutes and pause for 40 minutes. Changes were studied including pH, organic matter, dissolved organic carbon (DOC), the biomass of microorganism, hemicellulase activity, carboxymethyl cellulose enzyme (CMCase) activity, hemi-cellulose and cellulose contents. The experimental results show that the degradation rate of organic matter is 13.4% higher than that of the control, and the average of DOC is improved by 2.2g/kg. The degradation contents of hemi-cellulose and cellulose are increased by 5.7%, 10.7% compared with the control. This indicate that the addition of Rh can improve microenvironment, strengthen polymers hydration, accelerate the co-composting process and improve the quality of composting production.

Key words: composting; agricultural waste; biosurfactants; rhamnolipid

堆肥作为一种有效的有机废物资源化技术正在引起人们越来越多的关注. 有机固体废物, 尤其是农业秸秆、城市绿化废物含有 60% 以上的木质纤维素^[1]. 由于纤维素不易降解的特性导致难以被充分利用或被大多数微生物直接作为碳源物质而转化利用, 阻碍了堆肥技术在处理农业废弃物领域的发展. 大量研究表明: 添加化学表面活性剂吐温能够促进纤维素类物质的生物降解^[2,3]. 目前, 一类新型表面活性剂引起了大家的关注, 它是微生物在代谢过程中生成的自我调节微环境的表面活性物质, 如糖脂、多糖脂、脂肽、脂蛋白、磷脂以及中性类脂衍生物等. 它们除具有降低表面张力、稳定乳化液等与化学表面活性剂相同的作用外, 还具有化学表面活性剂所不具备的无毒、可生物降解等优点^[4]. 生物表面活性剂的这些特性使之在农业、化工、食品、石油开采、环保等众多领域得到广泛的应用^[5,6]. 其中人们已对生物表面活性剂促进大分子有机污染物如多环芳

烃、石油等的降解机理进行了深入地研究, 并已有大量成功的工程实例^[7~11]. 而在堆肥中引入生物表面活性剂以促进难降解物质如纤维素类物质的降解, 国内外都还未有这方面的研究. 同时, 生物表面活性剂在体系中不是优先降解对象, 不存在被微生物过早降解的危险^[12], 但由于其最终仍可以被微生物降解, 因此引入了生物表面活性剂的堆肥不需要后续处理, 产物还田不存在安全隐患. 本研究以富含难降解纤维素类的稻草秸秆和麸皮为堆肥原料, 添加以糖脂形式存在的生物表面活性剂——鼠李糖脂, 进行了堆肥模拟试验, 为生物表面活性剂应用于农业废弃物堆肥提供技术基础.

收稿日期: 2004-07-15; 修订日期: 2004-09-27

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863) 项目 (2001 AA644020; 2003 AA644010); 国家自然科学基金资助项目 (70171055; 50179011)

作者简介: 戴芳 (1980 ~), 女, 硕士研究生, 主要从事固体废物污染控制与资源化研究.

* 通讯联系人

1 试验材料与方法

1.1 鼠李糖脂的制取

1.1.1 菌种

铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* (CCTCC AB93066)由本实验室保存.

1.1.2 培养基和培养条件

(1)种子发酵培养基 牛肉膏 3.0g/L,蛋白胨 5.0g/L, NaCl 5.0g/L, pH 值 7.

(2)发酵培养基 葡萄糖 18.0g/L, Na₂HPO₄·12H₂O 1.5g/L, KH₂PO₄ 1.5g/L, MgSO₄·7H₂O 0.1g/L, FeSO₄·7H₂O 0.01g/L, NaNO₃ 2.0g/L, pH 值 6.5.

1.1.3 培养过程

将种子发酵液在 37℃下培养 24h,转速为 200 r/min.在无菌操作条件下,以 5%的接种量接种铜绿假单胞菌种子培养液于含 100 mL 培养基的 1 000 mL 锥形瓶中,置于旋转式摇床中培养 48h,温度为 37℃,转速为 200r/min.

1.1.4 鼠李糖脂的分离和提纯

将发酵液调 pH 为 8.0 后,置于离心机中 10 000 r/min 离心 10 min 除菌体,上清液用 36% HCl 调 pH 至 2.0,出现絮状沉淀,4℃静置过夜,在 10 000r/min 离心机上低温(4℃)离心 10 min,收集沉淀,冷冻干燥,得鼠李糖脂粗品.进一步提纯用氯仿/甲醇=65/15(体积比)进行萃取.萃取下层液用旋转真空蒸发仪减压蒸发去溶剂,即得纯棕黄色鼠李糖脂.

1.1.5 生物表面活性剂的定性检测

(1)表面张力测定 将鼠李糖脂配制成 0.3%的水溶液,采用环法测定其表面张力值为 33.5 mN/m.仪器为承德试验机设备厂的 JY W-200 A 自动界面张力仪.

(2)薄层色谱法(TLC)定性分析 将得到的纯鼠李糖脂溶于少量水中后进行薄层层析.展开剂:CHCl₃:CH₃OH:己酸=32.5:7.5:1(体积比),显色剂的组分为:3g 苯酚和 5 mL 浓硫酸溶于 95 mL 乙醇中.糖脂显现出棕黄色斑点.

1.2 堆肥试验原料

选择稻草秸秆和麸皮作为试验原料(表 1).稻草秸秆采用微型植物粉碎机破碎到粒径约 15 mm 左右,这是由于本实验主要研究引入表面活性剂后对介质颗粒间隙微环境的改善作用,因此采用较小的介质颗粒粒径可使得颗粒具有较大的比表面积,有

利于表面活性剂发挥作用.按照质量比为 5:4 的比例将稻草秸秆和麸皮混匀,同时添加树皮作为填充剂,以改善堆体的孔隙度.

表 1 试验材料性质

Table 1 Properties of experimental materials			
项目	稻草秸秆	麸皮	初始物料
有机质/ %	64.8	70.6	67.8
粒径/ mm	<15	<10	<15
灰分/ %	35.2	29.4	32.2
含水率/ %	0	0	67.4
C/ %	41.0	44.7	42.4
N/ %	0.7	2.3	1.4
C/ N	58.6	19.4	30.3

1.3 实验条件设计

1 号实验组在上堆时利用 0.3%的鼠李糖脂水溶液调节堆料初始含水率为 60%~70%,并混合搅拌使之充分混匀,运行过程中采用蒸馏水调节湿度;2 号对照样在整个堆制过程中均采用蒸馏水控制含水率为 60%~70%.2 组堆肥先在室温下堆制 2d 后,依靠外源供热控制堆体温度保持在 50℃,供氧量为 0.18 m³/h.时控开关:开 20 min,停 40 min.每 4d 取样分析堆肥参数的变化,全部运行时间 18 d.

1.4 堆肥过程中的参数测定

(1)含水率、pH 值和有机质含量的测定 含水率采用鲜样 105℃烘干 24h 恒重法;pH 值采用 pH 计测试水溶液(质量浓度 10%);有机质采用风干样测定,马弗炉 550℃灼烧 10h 恒重法.

(2)水溶性有机碳的测定^[13] 采用 TOC 测定仪(TOC Analyzer,德国)测定堆肥浸提液中的有机碳.

(3)微生物种群密度的测定 采用 10 倍稀释平板培养计数法.其中细菌、真菌和放线菌分别采用肉膏蛋白琼脂培养基、马丁氏培养基和高氏 1 号培养基,培养时间分别为 2d 5d 5d.

(4)羧甲基纤维素酶活和半纤维素酶活的测定^[14] 以羧甲基纤维素钠和木聚糖为底物,采用 DNS 法进行测定.定义产生 1 mg/h 葡萄糖(木糖)的酶量作为 1 个酶活力单位.

(5)半纤维素和纤维素含量的测定^[15] 堆肥中半纤维素和纤维素含量的测定采用 Van soest 中性洗涤剂法.

2 结果与讨论

2.1 堆肥过程中有机质含量的变化

堆肥物料中的有机质依靠好氧微生物逐步将其

分解为简单的无机物,并释放出生物所需的能量,同时还有一部分被转化为营养物质,用于微生物的细胞合成.本次实验中,1 号和 2 号堆体有机质的降解趋势类似(图 1):在一次发酵初期有机质降解迅速,在后期降解趋势变缓,这说明随着时间的推移,易降解有机物质逐渐减少,降解速度变慢.同时,1 号和 2 号物料有机质含量从最初的 68.8%,经一次发酵完成时分别下降为 42.4%、51.5%,有机质的降解率分别为 37.5%、24.1%.这说明稻草和麸皮联合堆肥时,添加鼠李糖脂能够促进混合物料能量的可利用性.

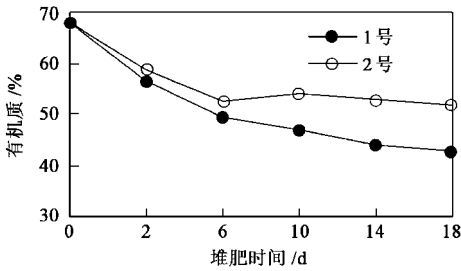


图 1 堆肥过程中有机质的变化

Fig.1 Changes in organic matter of piles in composting process

2.2 堆肥过程中 pH 值的变化

研究表明,微生物保持降解活力 pH 值的适宜条件为 5.5 ~ 8.5.而在堆肥过程中 $pH \geq 7.0$ 比 $pH \leq 6.0$ 时微生物有更大的降解能力,在 $pH \geq 9.0$ 时,底物的降解速率降低.因此结合两者考虑,发现富含纤维素和蛋白质的物料堆肥的最佳 pH 值为 8.0 左右^[16].本次试验的物料中麸皮富含蛋白质,稻草秸秆富含纤维素,在堆制初期(0 ~ 6d)堆料中有机氮分解产生了较多的氨氮,使得 pH 值在 2d 内迅速从初始的 6.2 左右升高到 8.2 左右,并在第 6d 达到峰值 9.0 左右.在堆制后期(7 ~ 18d),随着易降解有机物的减少,微生物分解速率趋缓,pH 值有所回落并稳定在 8.2 左右.从堆肥中 pH 值的变化可以看出(图 2),各处理的 pH 值趋势类似且没有明显的差别.这说明物料的组成是影响堆体 pH 值变化的关键因素,添加表面活性剂对堆体 pH 值的变化几乎没有影响,仍可以保持堆体环境 pH 值在大部分时间处于最佳值,有利于物料的快速降解与稳定.

2.3 堆肥过程中水溶性有机碳的变化

堆肥中的水溶性有机碳是能够被微生物直接用来合成自身生命体的重要组成部分,有机物料中起始有效态碳、氮物质及分解过程中产生的碳强烈地影响着整个分解过程.如图 3 所示,各处理中水溶性

碳的含量基本表现为堆制初期(0 ~ 6d)上升,升幅依次为:1 号升 25.7%、2 号升 24.8%;堆制后期(7 ~ 18d),1 号和 2 号先下降后呈现略微上升或持平的趋势,降幅分别 3.5%、9.6%;水溶性碳的平均含量是:1 号 21.1 g/kg、2 号 18.9 g/kg.可见,加入表面活性剂,可提高堆制初期水溶性碳的含量,这可能是由于表面活性剂能够降低固/液相界面表面张力,从而促进了有机物质的水合性.随着培养时间的延长,微生物对易利用的碳源需求越来越多,导致其含量的下降.但 1 号水溶性碳的含量依然较高,估计是堆料中果胶、半纤维素等中等难降解的物质及部分纤维素分解得较多,部分转化为水溶性碳水化合物.这说明鼠李糖脂能够增强有机化合物的水合程度,使得水解时水分供应充足,同时可增加酶作用的表面,从而有利于微生物的转化利用.

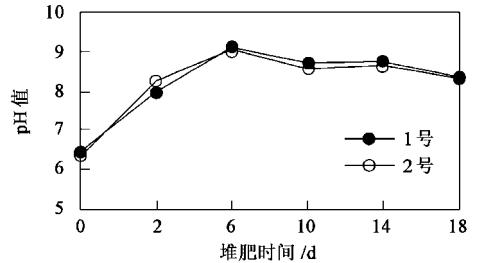


图 2 堆肥过程中 pH 值的变化

Fig.2 Changes of pH value of piles in composting process

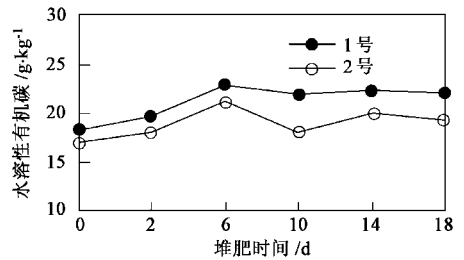


图 3 堆肥过程中水溶性碳的变化

Fig.3 Changes of DOC of piles in composting process

2.4 堆肥过程中微生物种群动力学

在好氧堆肥的各阶段,微生物的种群结构演替非常迅速,每个阶段都有数目巨大的多个微生物群体存在,包括细菌、真菌和放线菌.本试验的目的之一在于研究添加生物表面活性剂对好氧堆肥中微生物的影响,因此对堆肥中的广泛微生物区系变化规律进行了研究.试验中分别对样品中细菌、真菌和放线菌进行培养计数,得到堆肥过程中微生物的种群密度动态消长.图 4 显示,1 号堆体在堆肥不同时

期,细菌的种群密度均在 $10^{10} \sim 10^8$ CFU/g 左右,始终为优势菌种,其原因可能是由于细菌通常是单细胞的菌体,体积小,比表面积较大,使得物质能快速进入细胞.其次是放线菌,种群密度从第 2d 的 6.3×10^9 CFU/g 降到第 18d 的 1.6×10^6 CFU/g;数量最低的为真菌,种群密度从第 2d 的 5.0×10^9 CFU/g 降到第 18d 的 1.0×10^6 CFU/g.这可能是由于真菌对高温、碱性环境的容忍能力较弱.同时研究结果表明,在添加了鼠李糖脂的堆体中,堆料中各种微生物的密度在整个发酵过程中略高于对照样同期的种群密度.这说明,在堆肥中添加鼠李糖脂对细菌、真菌和放线菌均无抑制作用,甚至还能够略微提高堆肥中微生物的生物量.

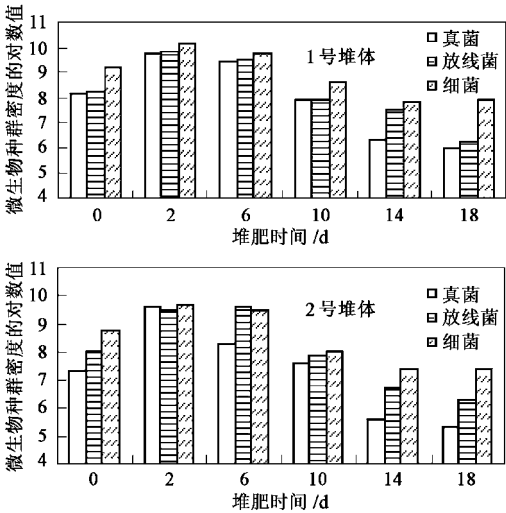


图 4 堆肥过程中微生物种群变化趋势

Fig. 4 Biomass of microorganisms of piles in composting process

2.5 堆肥过程中纤维素类含量及酶活变化

农业堆肥物料中有机材料主要是木质纤维素,其是影响好氧堆肥进程的一个重要制约因素.在堆肥中添加鼠李糖脂的主要目的是增加有机化合物与液相之间的接触,提高这些中等难降解有机组分的溶解速度,以及促进纤维素酶系统中酶向外分泌,提高微生物对底物的利用,从而提高好氧堆肥的效率.

本次试验各处理中,半纤维素和纤维素含量的变化如表 2 所示.由表 2 可看出,2 组堆肥中物料的纤维素和半纤维素含量都有明显的变化.其中,添加鼠李糖脂的 1 号处理变化更为明显,其纤维素和半纤维素含量分别由最初的 26.9 %、15.8 %降低到 18d 后的 16.0 %、6.2 %;2 号处理结果为纤维素和半纤维素含量分别降低到 18d 后的 17.6 %、7.9 %.相对于对照,添加鼠李糖脂的处理中,纤维素和半纤

维素的降解率分别增加了 5.7 %、10.7 %.结果表明,在堆肥过程中添加鼠李糖脂并保证适宜的温度条件,可以有效地加快纤维素类物质的降解,达到降低堆肥中纤维素类物质含量的目的.

表 2 堆肥过程中纤维素类物质含量的变化/ %

Table 2 Changes of cellulose and hemi-cellulose contents

物质	1 号堆体		2 号堆体	
	初始物	终产物	初始物	终产物
半纤维素	15.8	6.2	15.8	7.9
纤维素	26.9	16.0	26.9	17.6

此外,从与成分变化相应的酶系变化可以看出(图 5、图 6),各处理中半纤维素酶在堆肥初期(0 ~ 6d)无明显的差异,但在堆制后期(7 ~ 18d)出现明显的差异,1 号酶活一直维持在 70.0 U/g 左右,2 号酶活从 76.6 U/g 下降到 40.5 U/g.这可能是由于鼠李糖脂在改善细胞膜的通透率时,减少了酶在膜上的吸附量,从而提高了胞外酶的产量.同时,由于鼠李糖脂需要一定的作用时间,使得酶活高峰出现在堆肥后期.各处理中羧甲基纤维素酶活在整个堆肥中均无明显差异:在堆制初期(0 ~ 6d)都表现为快速上升,在 7 ~ 18d 明显下降.这说明,添加鼠李糖脂并非能改善微生物所有分泌物的胞外释放状况,其主要还是由酶物质本身的分子量、结构等物理化学性质决定.

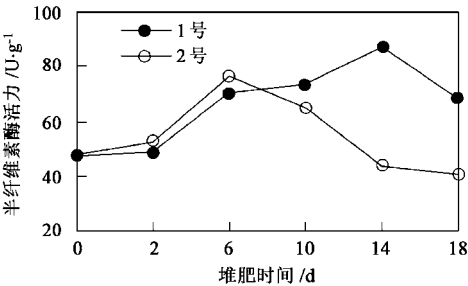


图 5 堆肥过程中半纤维素酶活的变化

Fig. 5 Changes of xylanase activity of piles in composting process

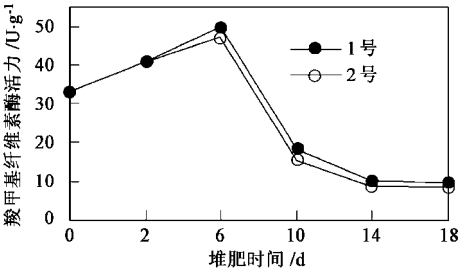


图 6 堆肥过程中羧甲基纤维素酶活的变化

Fig. 6 Changes of CMCase activity of piles in composting process

此外,结合纤维素类物质含量以及相关酶系的数值变化可以看出,好氧堆肥中纤维素类物质的降解与纤维素类酶活力的高低有一定的正相关性.这可能是由于鼠李糖脂能够降低水的粘度,增加水的流动性,从而能使水通过生物表面微小孔隙侵入到细胞内部,进一步扩大微小孔隙的直径,这样微生物正常分泌的纤维素酶类,可通过被扩大的孔隙,有效地接触到植物细胞,促进细胞壁以及细胞内容物的降解.

3 结论与建议

稻草秸秆-麸皮联合高温好氧堆肥过程中,在发酵初始阶段添加 0.3% 的鼠李糖脂水溶液,不会对堆体中的细菌、真菌和放线菌产生毒害作用,甚至还能够略微提高堆肥中微生物的生物量.同时,堆体的有机质和纤维素类物质减少十分明显,以及半纤维素酶活在堆肥后期有显著提高.这说明添加鼠李糖脂能够明显改良微生物与介质的相互作用,加速反应进程,缩短堆肥周期.研究堆肥中鼠李糖脂的代谢产物是下一阶段应着重进行的工作.

参考文献:

- [1] Tengerdy R P, Szakacs G. Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation[J]. Biochemical Engineering Journal, 2003, 13(3): 169 ~ 179.
- [2] 罗宇煊, 张家耀, 龚利萍, 等. 正交实验选择嗜碱细菌降解木质素的最优综合培养条件[J]. 环境科学, 2001, 22(5): 95 ~ 98.
- [3] 张德强, 黄镇亚, 张志毅. 绿色木霉纤维素酶 AS3.3032 液体发酵的研究[J]. 北京林业大学学报, 2001, 23(2): 57 ~ 60.
- [4] Kosaric N. Biosurfactants: production, properties, applications [M]. New York: Marcel Dekker, 1993. 66 ~ 97.
- [5] Swaranjit S C, Randhir S M. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules[J]. Current Opinion in Microbiology, 2004, 7: 262 ~ 266.
- [6] Pooja S, Swaranjit S C. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences[J]. TRENDS in Biotechnology, 2004, 22(3): 142 ~ 146.
- [7] Cameotra S S, Makkar R S. Synthesis of Biosurfactants in extreme conditions[J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1998, 50(5): 520 ~ 529.
- [8] 华兆哲, 陈坚, 伦世仪. 石油烷烃降解与生物表面活性剂生产的相关性研究及进展[J]. 石油化工, 1998, 27(12): 925 ~ 929.
- [9] Rahman K S M, Rahman T J, Kourkoutas Y, et al. Enhanced bioremediation of *n*-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients[J]. Bioresource Technol., 2003, 90: 159 ~ 168.
- [10] Johnsen A R, Karlson U. Evaluation of bacterial strategies to promote the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2004, 63: 452 ~ 459.
- [11] Harvey S, Elashi I, Valdes J J, et al. Enhanced removal of Exxon Valdez spilled oil from Alaskan gravel by a microbial surfactant[J]. Biotechnol., 1990, 8: 228 ~ 230.
- [12] Ishigami Y. Biosurfactants face increasing interest[J]. Inform., 1993, 4: 1156 ~ 1163.
- [13] 周立祥, 沈其荣, 张雪英. 城市污泥强制通风堆肥过程中的生物学和化学变化特征[J]. 应用生态学报, 2002, 13(4): 467 ~ 470.
- [14] Rajaram S, Varma A. Production and characterization of xylinase from *Bacillus thermoalkalophilus* grown on agricultural wastes[J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1990, 34: 141 ~ 144.
- [15] 王玉万, 徐文玉. 木质纤维素基质发酵物中半纤维素和纤维素和木素的定量分析[J]. 微生物学通报, 1987, 13(2): 82 ~ 84.
- [16] 张相峰, 王洪涛, 周辉宇. 花卉秸秆和牛粪联合堆肥的中试研究[J]. 环境科学学报, 2003, 23(3): 360 ~ 364.