

添加木质素降解菌对堆肥中酶活性的影响

张晓倩, 许修宏*, 王 晶, 刘 佳

(东北农业大学资源与环境学院, 哈尔滨 150030)

摘 要:以奶牛粪便和稻草为堆腐材料,采用静态好氧堆肥的方式研究接种木质素降解菌对堆肥过程中的温度、pH 等理化性质以及木质素降解酶活性动态变化的特征,从生物酶学角度考察人工接入外源菌剂对堆肥的影响。结果表明,接菌后的堆肥处理较 CK 早 2 d 进入高温期,并且维持时间多于 CK 12 d。发酵前 8 d pH 值的上升幅度大且高于 CK,而且接种处理比对照的 C/N 提前 5 d 达到 20:1,提早达到腐熟指标,加快堆肥腐熟化进程。堆肥中酶活分析结果表明,加入菌剂后, β -葡萄糖苷水解酶在堆置第 6 d 达到第一个峰值 14.7 μmol ,较 CK 早 6 d;羧甲基纤维素钠酶在第 12 d 达到峰值 3 270 U,同比 CK 高出 1 220 U;漆酶酶活峰值高达 93.5 U,而 CK 峰值只有 82.8 U;锰过氧化物酶进入高温期后酶活最高为 75.25 U,CK 最高为 54.8 U。由此可见,加入微生物菌剂后可使相关酶活性提高并提高堆体温度,加快堆肥腐熟,加速堆料中各种有机质的降解,提高微生物对底物的利用,从而提高好氧堆肥的效率。

关键词:堆肥;木质素;微生物菌剂;酶活性

中图分类号:S141.4 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2012)04-0843-05

Effect of Inoculating Lignin Degradation Strains on Enzymic Activities in Composting

ZHANG Xiao-qian, XU Xiu-hong*, WANG Jing, LIU Jia

(College of Resources and Environment, Northeast Agriculture University, Haerbin 150030, China)

Abstract: Composting is the process under which substrate is decomposed and converted into stable and environment-friendly organic matter, therefore it is a common technology for disposing of agricultural waste at present. Agricultural waste contains large quantities of lignocellulose, which mainly consists of lignin that is difficult to be biodegraded due to its complex component and structure and leads to the insufficient transformation of humus and low quality of compost. In this sense, how to accelerate the decomposition and humification of lignin is critical to the sufficient maturity and the quality of compost. Cow dung and straw were compost under static aerobic condition and lignin degrading strains were inoculated in the pile. Changes in temperature, pH and lignin-degrading enzymes activity during composting were investigated in order to assess the influence of the inoculation on composting from the perspective of biological enzyme. The result indicated that: the inoculated compost was characterized by reaching high temperature phase 2 days earlier and keeping this period for 12 days longer than the control. In the first 8 days, pH value rose more rapidly and was higher and faster than control and C/N ratio reached 20:1 5 days earlier than control, indicating maturity of the compost. The results of enzymatic activities analyse in composting showed that after adding inoculant, β -glucosidase enzymes reached the first peak activity 14.7 μmol on the sixth day, 6 days earlier than the control and also 12.3 μmol higher than it was at the peak; Sodium carboxymethyl cellulose enzyme reached its peak (3 270 U) on the twelfth day, 1 220 U higher than control; The peak activity for laccase enzyme was 93.5 U, and the peak of CK was only 82.8 U; And the manganese peroxidase enzyme activity was 75.25 U in the high temperature period, however, the highest activity of the control was only 54.8 U. Thus it could be deduced that inoculating exogenous microbes could raise the enzyme activity involved, increase the temperature, accelerate the decomposition, improve the utilization of microbial substrate, and thereby enhance the composting efficiency.

Keywords: compost; lignin; microbial inoculant; enzymatic activities

收稿日期:2011-09-26

基金项目:科技部十一科技支撑项目(2008BAD95B06-02-04);科技部十一科技支撑项目(2008BADA1B01);林业公益性行业科研专项(201104048);哈尔滨市科技攻关计划项目(2007AA6CN105)

作者简介:张晓倩(1986—),女,黑龙江哈尔滨人,在读硕士,研究方向为农业微生物学。E-mail:zhangxiaqian0313@163.com

* 通讯作者:许修宏 E-mail:howard2857@hotmail.com

堆肥处理是目前世界上较为普遍采用的处理有机固体废弃物以及畜禽粪便的有效方法之一。人工将自然界中分解木质纤维素的微生物接入粪便进行堆肥,不仅能够解决环境污染问题,还能够变废为宝,将废弃物降解成绿色肥料或土壤调节剂施入田中,起到改良土壤和增加肥效的作用^[1-2]。一些研究表明,在人工条件下,通过接种可增加堆层中微生物数量,调节堆肥菌群结构,提高微生物活性^[3-5]。因此,堆肥菌剂的研发一直备受关注^[6-7]。国内外微生物接种剂的发展趋势可分为两类:一类是在发酵过程中添加纤维素分解菌,以便促进有机质分解,缩短发酵时间;另一类是接种固氮微生物、解磷和解钾菌,有利于堆肥过程中养分的保存^[8]。

堆肥生物化学过程的本质是微生物产生的各种生物酶通过发酵对较难降解的纤维素、木质素类等大分子物质进行分解并转化、合成腐殖质和产生植物生长生理活性物质的过程,整个过程属于酶促反应^[9],其酶活性反映了堆肥中微生物数量、活动强度变化及堆肥进程变化^[10-11]。因此,研究堆肥化过程中各种生物酶活性的变化对于了解堆肥腐熟程度有着非常重要的价值。本文通过接种木质素降解菌研究牛粪堆肥过程中的理化性质和酶活性变化特征,比较接种外源微生物对堆肥的影响,并为今后堆肥化过程和微生物菌剂的应用提供参考依据和理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

采用新鲜奶牛粪便和稻草为原料进行好氧堆肥。堆肥原料基本性质见表 1,其中牛粪取于哈尔滨市完达山奶牛场,稻草取于哈尔滨市香坊农场,用前切成 3 cm 左右小段。

表 1 堆肥原料基本性质

Table 1 Physico-chemical properties of raw materials used in composting

堆肥原料	含水率/%	有机质/%	总氮/%	碳氮比
牛粪	15.73	51	1.34	22.30
稻草	10.19	69	0.69	56.37

1.2 菌种来源

木质素降解菌复合菌剂分别为黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*,购自武汉大学菌种保藏中心)和变色栓菌(*Thametes versicolor*,分离自堆肥样品)。

1.3 堆肥方法

堆肥试验于 2011 年 2 月 25 日至 3 月 28 日在东

北农业大学资源与环境学院堆肥发酵室内进行。采用室内好氧堆肥,自然通风,实行人工翻堆通气。设置堆体高约 1.2 m,直径为 1.5 m,呈圆锥型料堆。调节堆料初始含水率为 65%左右,C/N 为 30,堆制时间为 1 个月左右,分别于第 6、10、18、22 d 进行 4 次人工翻堆以保证供氧充足并促使堆内外材料腐熟一致。堆体无覆盖,顶部削平。每日定时测量各堆体各层温度,取平均值作为堆体温度。定时进行人工翻堆以保证供氧并促使堆内外材料腐熟一致。

在堆肥初期,将扩大培养后的各菌种按所选堆体的配比接入各堆料中,接种量分别为 0.5%,简称堆 I,以不接菌种即自然堆肥为对照,简称堆肥 CK。在发酵过程中,定时从堆体的上、中、下层分别采集样品,混合均匀后待测。

1.4 堆肥样品分析测定

温度利用温度传感器测量;按样品:水=1:9 的比例称取新鲜堆肥样品,振荡 1 h 后静止 30 min 再过滤,利用其滤液测定 pH;总有机碳含量测定采用重铬酸钾容量法-外加热法;全氮测定采用凯氏定氮法。

1.5 酶活性测定方法

β -葡萄糖苷水解酶(β -glucosidase enzymes)测定采用固相酶活法^[12-14];羧甲基纤维素酶(CMCase)测定采用 3,5-二硝基水杨酸比色法(简称 DNS 法)^[15-16];漆酶(Lac)测定采用 ABTS 法^[17];锰过氧化物酶(MnP)测定方法参见文献^[18]。

2 结果与讨论

2.1 堆肥中复合菌剂对温度变化的影响

温度在一定程度上可以直观地反映堆肥的进程与腐熟度,同时也影响了堆肥中微生物的数量和生物活性,因此它是控制堆肥过程的一个重要参考指标。如图 1 所示,堆体的温度变化经历了快速升温、持续高温、降温和腐熟稳定 4 个阶段。堆肥初始,堆体温度都很低,第 2 d 堆肥中微生物开始分解并利用堆料中的有机质进行增殖,同时释放大量的热,堆体温度迅速升高,其中,加菌处理升温较快,而且最高温度也高于自然堆肥,可见,接种菌剂不但提高了堆肥初始阶段微生物的数量,而且缩短了堆肥进入高温期的时间,可加速堆肥进程;添加菌剂的堆体比 CK 提前 2 d 达到高温期(高于 55℃),而且高温期温度持续在 60℃以上的时间达 20 d(多于 CK 处理 12 d),说明加入外源菌剂的堆体中微生物数量增多,活动剧烈,由此产生的热量持续时间久,可以更有效地杀死堆肥中的

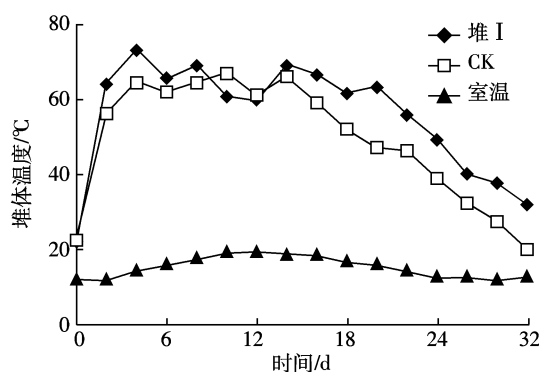


图 1 堆肥过程中温度变化趋势

Figure 1 Trend temperature of changes

寄生虫及病原微生物,更有利于堆肥的腐熟化,达到无害目的。分别在第 6、10、18、22 d 进行 4 次人工翻堆后,两堆体温度有所上升。第 22 d 后,堆体温度不断下降,表明堆肥到了降温期,基本进入腐熟阶段,有机质消耗殆尽,微生物数量不断减少,代谢活动减弱。

2.2 堆肥中复合菌剂对 pH 值变化的影响

pH 值是一项能对细菌环境做出估价的参数。在堆肥的生物降解和发酵过程中,pH 随时间和温度的变化而变化,因此 pH 也是揭示堆肥分解过程的一个极好标志。适宜的 pH 可加快微生物的生长繁殖,提高有机物的降解速率,有效地发挥微生物作用,同时影响酶参与的生化反应速度。此外,pH 也会影响氮的损失,因为在 pH7.0 时,氮以氢氧化氨的形式逸入大气。但在一般情况下,堆肥本身有足够的缓冲能力,使 pH 值稳定在可以保证好氧分解的酸碱度水平。

由图 2 可知,不同堆肥处理的 pH 值均在 7.4~8.8 之间,可满足好氧堆肥对 pH 的要求。两堆体的 pH 均呈现先上升后下降的趋势,不同的是 CK 在第 12 d 出现最大值 8.66,而加入菌剂的堆 I 在第 8 d 就达到其最大值 8.75,这可能由于氨是堆肥过程中产生的主要含氮化合物,堆肥中氨态氮含量会随着温度升高而增

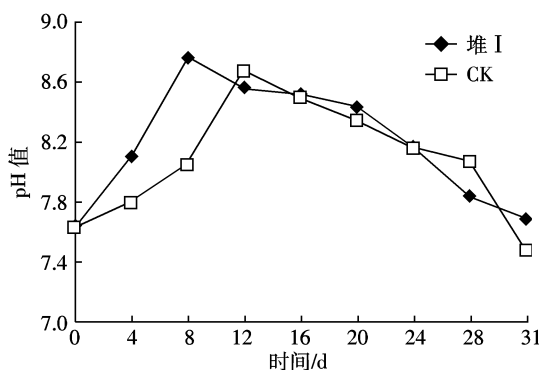


图 2 堆肥过程中 pH 变化趋势

Figure 2 Trend pH of changes

加,加入外源菌剂后,更加促进微生物分解含氮有机物而产生更多的氨,因而 pH 值上升幅度明显高于对照处理。随着堆体温度下降,有机质分解速率下降,蛋白质等含氮物质减少,氨类物质减少,pH 也随之减小,堆肥结束时 pH 分别为 7.69 和 7.46。

2.3 堆肥中复合菌剂对 C/N 变化的影响

在畜禽粪便的堆肥化处理中,通常用 C/N 来反映堆肥材料的营养平衡状况,它也是堆肥腐熟度评价的重要指标之一,实践证明当 C/N 为 (25~35):1 时发酵过程最快。有机物被微生物分解速度随 C/N 而变,若 C/N 过低,微生物繁殖会因能量不足而受抑制;若 C/N 过高,导致 N 不足,有机物分解代谢的速度减慢。通常,微生物体的 C/N 约为 20,当堆肥物料的 C/N 高于 20 时,微生物分解就相对较慢,C/N 小于 20 时可认为堆肥已经达到腐熟。

由表 2 可看出,随着堆肥发酵的进行,两个处理的 C/N 均呈现逐渐下降的趋势,加入菌剂的堆 I 下降的幅度及速率都要快于不加菌的对照处理,堆 I 的 C/N 在第 25 d 降低到 20 以下,而 CK 的 C/N 在第 30 d 才接近于 20,堆 I 早于 CK 4~5 d 达到腐熟要求,可初步判定已达到腐熟指标,也说明了人工加入菌剂后可加快堆肥腐熟的进程。

表 2 堆肥碳氮比变化

Table 2 Changes of C/N in composting

堆制时间/d	0	5	10	15	20	25	30
堆 I	30.1	27.3	24.1	23.5	22.2	19.4	18.7
CK	29.7	28.2	25.7	25.1	23.4	22.1	20.6

2.4 堆肥过程中酶活的动态变化

堆肥中一切生物化学过程都是在微生物及其分泌的体外酶的参与下进行的,其中的酶主要来源于微生物的新陈代谢,因此酶活性大小是堆肥微生物活动强度变化的重要参数。

2.4.1 β -葡萄糖苷水解酶活性变化

β -葡萄糖苷水解酶是微生物降解纤维素反应中的限速酶^[9],它与内切葡聚糖酶和外切葡聚糖酶共同组成能将纤维素降解为葡萄糖单糖的纤维素酶,其酶活性变化如图 3 所示。堆肥初 β -葡萄糖苷水解酶活性为 3.2 μmol ,略比 CK 高。从第 3 d 进入堆肥高温期,其酶活性逐渐增加,在第 6 d 时接种堆肥出现第一次酶活高峰值,高出 CK 12.3 μmol ,这是由于堆肥初期添加了木质纤维素分解复合菌,使其微生物数量和种类都高于自然堆肥。第二次翻堆后,堆体含氧量

及堆料松弛度的变化会影响微生物的代谢活动,因而酶活性出现波动。在高温期中期, β -葡萄糖苷水解酶活性下降,分析原因可能是在第三次翻堆前有部分反应不完全的物料易被微生物再次降解生成葡萄糖,而大量的葡萄糖则会抑制 β -葡萄糖苷水解酶的生物合成。整个堆肥过程 CK 的变化并不大,加入菌剂的堆体比 CK 提前 12 d 达到酶活峰值。由此看出,接种外源微生物可更好地降解木质纤维素。

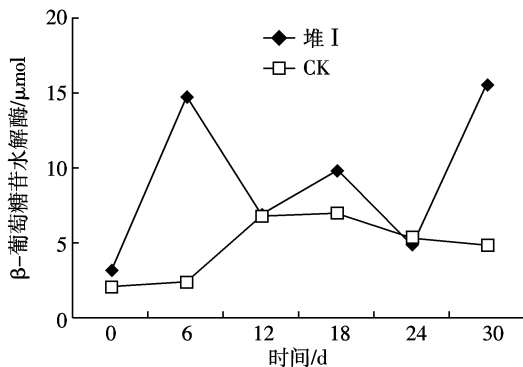


图 3 堆肥过程中 β -葡萄糖苷水解酶活性变化

Figure 3 Change of β -glucosidase enzyme during composting

2.4.2 羧甲基纤维素钠酶(CMCase)活性变化

羧甲基纤维素是一种可溶性的纤维素衍生物,它不能进入细胞,其主要代表了外切葡聚糖苷酶和内切酶的活力总和,在研究和实际生产中应用比较普遍。从图 4 可以看出,该混合菌剂产羧甲基纤维素钠酶,其酶活性在整个培养过程中呈明显的阶段性,在培养的第 12 d 出现第一个峰值 3 270 U,之后有所下降,在第 24 d 酶活性达到堆肥最大值 3 410 U,其各个阶段的酶活性均高于不添加任何菌剂的 CK 处理,从而可以看出人工接种外源微生物可以加速纤维素的分解。

2.4.3 漆酶(Lac)活性变化

漆酶在白腐菌降解木质纤维素过程中起着非常重要的作用,研究它们在稻草基质上酶活的大小及变化规律,对评价及筛选出具有降解木质纤维素物质优势的菌株是至关重要的。白腐菌漆酶更主要的作用在于对木质素的降解,已经证实漆酶在木质素降解中起氧化、脱甲基、解聚等作用。从图 5 可以看出漆酶活性变化,在堆置初始阶段漆酶活性较低并有下降趋势,因为堆料中本身存在较易降解的小分子有机质,使得其先于木质纤维素此类降解难的大分子物质被微生物所降解利用。在第 2 次翻堆后,趋势有所变化,在高温期其酶活不断上升,在第 24 d 时达到峰值 93.5 U,其后降温期时酶活性又下降,说明堆肥后期有机质转化速度降低。

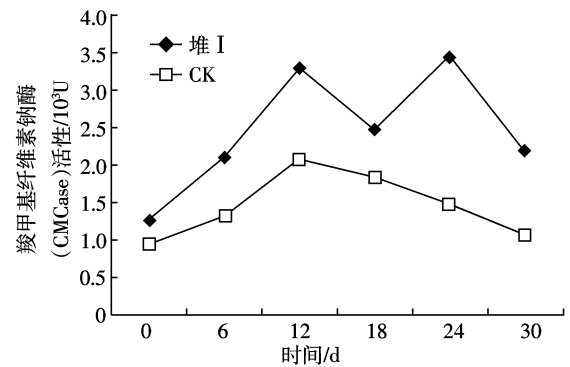


图 4 堆肥过程中羧甲基纤维素钠酶活性变化

Figure 4 Change of CMCase enzyme during composting

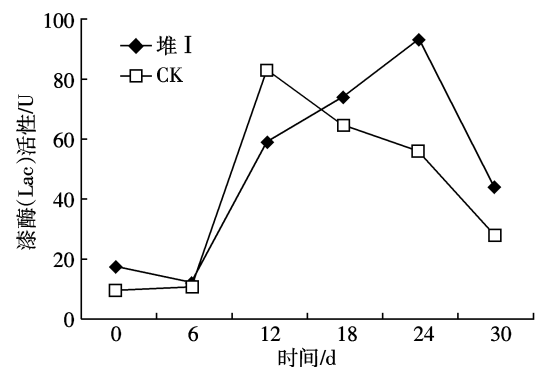


图 5 堆肥过程中漆酶活性变化

Figure 5 Change of laccase enzyme during composting

2.4.4 锰过氧化物酶(MnP)活性变化

锰过氧化物酶与漆酶、木质素过氧化物酶共同组成木质素降解酶系。如图 6 所示,该混合菌剂所产锰过氧化物酶酶活在培养初期至高温期初期不断下降,第 2 次翻堆后有所上升,随着再次翻堆并达到高温期中期,在第 18 d 达到酶活峰值 75.25 U。在高温期后期,添加菌剂堆体中的锰过氧化物酶活性始终高于 CK,说明外加复合菌剂可以更有效地促进木质纤维素的降解。由于锰过氧化物酶的合成具有对氧分压的

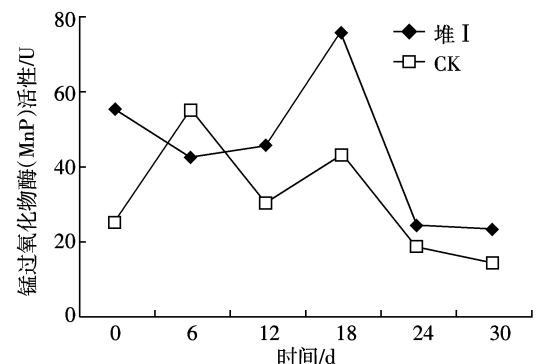


图 6 堆肥过程中锰过氧化物酶活性变化

Figure 6 Change of manganese peroxidase enzyme during composting

要求低、氮源浓度要求范围宽等优势,因而本试验条件更利于锰过氧化物酶的生成。

3 结论

(1)堆肥温度变化分析结果表明:复合微生物菌剂的添加,加快了堆肥温度的升高速度,提高了堆肥所能达到的最高温度,使堆肥高温期提前2 d到达。

(2)人工接入外源菌剂后,pH值的上升幅度大且高于CK,C/N的下降幅度大且快于CK,最先满足堆肥腐熟C/N的标准,说明接种可以加快腐熟速度。

(3)接种处理的 β -葡萄糖苷水解酶、羧甲基纤维素钠酶、漆酶和锰过氧化物酶均不同程度的高于CK,说明接种菌剂可快速启动堆肥发酵,加快木质纤维素的降解及有机质的分解转化,促进堆肥进程,缩短堆肥腐熟时间。

参考文献:

- [1] 李秀金,董仁杰.粪草堆肥特性的试验研究[J].中国农业大学学报,2002,7(2):31-35.
LI Xiu-jin, DONG Ren-jie. Characteristics of cattle manure and rice straw composting[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2002, 7(2):31-35.
- [2] 伍时华,徐雅飞,黄翠姬.降解纤维素菌株的筛选[J].食品科技,2006,8(5):50-51.
WU Shi-hua, XU Ya-fei, HUANG Cui-ji. Study on screening of cellulose degradation strains[J]. *Food Science and Technology*, 2006, 8(5):50-51.
- [3] 黄懿梅,曲东,李国学,等.两种外源微生物对鸡粪高温堆肥的影响[J].农业环境保护,2002,21(3):208-210.
HUANG Yi-mei, QU Dong, LI Guo-xue, et al. Effects of two kinds of inoculating microbes on chicken manure composting[J]. *Agro-Environmental Protection*, 2002, 21(3):208-210.
- [4] 冯宏,李华兴.菌剂对堆肥的作用及其应用[J].生态环境,2004,13(3):439-441.
FENG Hong, LI Hua-xing. The functions of microbial inoculum and its application in composting[J]. *Ecology and Environment*, 2004, 13(3):439-441.
- [5] 殷培杰,孙军德,石星群,等.微生物菌剂在鸡粪有机肥料堆制发酵中的应用[J].微生物学杂志,2004,24(6):43-46.
YIN Pei-jie, SUN Jun-de, SHI Xing-qun, et al. Application of microbial preparation on compost of chicken droppings[J]. *Journal of Microbiology*, 2004, 24(6):43-46.
- [6] Hill J, Nelson E, Tilman D, et al. Environmental, economic and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(30):11206-11210.
- [7] Zeng X, Ma Y, Ma L. Utilization of straw in biomass energy in China[J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2007(11):976-987.
- [8] 李国学,李玉春,李彦富.固体废物堆肥化及堆肥添加剂研究进展[J].农业环境科学学报,2003,22(2):252-256.
LI Guo-xue, LI Yu-chun, LI Yan-fu. Advance on composting of solid-waste and utilization of additives[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2003, 22(2):252-256.
- [9] 李国学,张福锁.固体废弃物堆肥化与有机复混肥生产[M].北京:化工出版社,2000:19-30,91-95.
LI Guo-xue, ZHANG Fu-suo. Composting of solid waste and production of organic compound fertilizer[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2000:19-30,91-95.
- [10] 朴哲,崔宗均,苏宝林.高温堆肥的生物化学变化特征及植物抑制物质的降解规律[J].农业环境保护,2001,20(4):206-209.
PIAO Zhe, CUI Zong-jun, SU Bao-lin. Characterization of biochemistry and degradation of plant-inhibited materials during high temperature composting[J]. *Agro-Environmental Protection*, 2001, 20(4):206-209.
- [11] 沈其荣,王瑞宝,王岩,等.堆肥制作中的生物化学变化特征[J].南京农业大学学报,1997,20(2):51-57.
SHEN Qi-rong, WANG Rui-bao, WANG Yan, et al. Biochemical characteristics of composting[J]. *Journal of Nanjing Agriculture University*, 1997, 20(2):51-57.
- [12] Peláez C, Mejía A, Planas A. Development of a solid phase kinetic assay for determination of enzyme activities during composting[J]. *Process Biochemistry*, 2004, 39:971-975.
- [13] Grimaldi A, Bartowsky E, Jiranek V. A survey of glycosidase activities of commercial wine strains of *Oenococcus oeni*[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, 105:233-244.
- [14] 康纪婷,吴翔,甘炳成,等.纤维素酶活力测定方法[J].河北农业科学,2010,14(4):151-153.
KANG Ji-ting, WU Xiang, GAN Bing-cheng, et al. Determination methods of cellulase activity[J]. *Journal of Hebei Agricultural Sciences*, 2010, 14(4):151-153.
- [15] 刘德海,陈小鸽,杨玉华,等.纤维素酶活力的测定方法[J].中国饲料,2002(17):27-28.
LIU De-hai, CHEN Xiao-ge, YANG Yu-hua, et al. Methods of assaying cellulase enzyme[J]. *China Feed*, 2002(17):27-28.
- [16] 张丽青,吴海龙,姜红霞,等.纤维素降解细菌的筛选及其产酶条件优化[J].环境科学与管理,2007,32(10):110-114.
ZHANG Li-qing, WU Hai-long, JIANG Hong-xia, et al. Screening on bacteria capable of degrading cellulose and optimizing its conditions for cellulase production[J]. *Environmental Science and Management*, 2007, 32(10):110-114.
- [17] 胡平平,付时雨,李光日.贝壳状革耳菌漆酶酶活测定方法分析[J].广州化学,2001,26(4):22-27.
HU Ping-ping, FU Shi-yu, LI Guang-ri. Methods of assaying laccase activity by *Panus conchatus*[J]. *Guangzhou Chemistry*, 2001, 26(4):22-27.
- [18] Pickard M A, Roman R, Tinoco R, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism by white rot fungi and oxidation by *Coriophila gallica* UAMH 8260 Laccase[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(9):3805.
- [19] Alef K, Nannipieri P. Methods in applied soil microbiology and biochemistry: Enzyme activities[M]. London Academic Press, 1995.