

不同浓度猪、奶牛粪水中温厌氧发酵沼液中 DOM 的光谱特征

娄梦函^{1,2}, 靳红梅^{2,3,4*}, 梁 栋^{2,3}, 朱燕云^{2,3}, 朱 宁^{2,3,4}, 李丹阳^{2,3}

1. 南京农业大学资源与环境科学学院, 江苏 南京 210095
2. 江苏省农业科学院农业资源与环境研究所, 江苏 南京 210014
3. 农业农村部种养结合重点实验室, 江苏 南京 210014
4. 江苏省有机固体废物资源化协同创新中心, 江苏 南京 210095

摘 要 养殖粪水中物质的组成变化决定其潜在的环境效应, 溶解性有机质(DOM)是养殖粪水的重要组成部分。研究对总固体浓度(TS)分别为4%和8%的猪、奶牛粪水进行批次中温厌氧发酵试验, 分析了猪粪和奶牛粪沼液中DOM的含量变化, 并结合三维荧光光谱(3DEEM)和平行因子分析法(PARAFAC), 解析沼液DOM的荧光光谱特性及组分变化特征。结果表明, 中温厌氧发酵结束后, 沼液中DOM含量均极显著($p < 0.001$)降低。沼液DOM主要包含类酪氨酸、类富里酸、类色氨酸和类胡敏酸4种荧光组分, 其中类胡敏酸的相对含量均显著($p < 0.05$)增加, 但类富里酸的相对含量仅在TS为8%的处理中增加, 而在TS为4%的处理中降低。沼液DOM的腐殖化指数均极显著($p < 0.01$)增加, 但猪粪沼液DOM的腐殖化程度明显高于奶牛粪沼液。研究结果为畜禽粪便沼液农田利用的潜在环境效应评价提供理论支撑。

关键词 猪、奶牛粪水; 中温厌氧发酵; 溶解性有机质; 三维荧光光谱; 平行因子分析

中图分类号: X502 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2022)01-0141-06

引 言

我国畜禽养殖场粪污产生量高达38亿t/年^[1], 其中粪水(主要由动物尿液、冲洗水、损失的饮用水及少量固体粪便等组成)占比超过80%, 是畜禽养殖污染防治的重点^[2]。厌氧发酵技术是畜禽养殖场粪水处理的重要手段, 在规模化生猪和奶牛养殖场中应用十分普遍^[3]。沼液是厌氧发酵后的主要残留物, 年产生量超过4亿t。沼液中溶解性有机质(DOM)含量丰富, 它是一类分子量分布范围广泛、组成和结构复杂的非均质有机混合物, 含多种官能团, 具有络合、离子交换吸附和氧化还原能力。同时, DOM在土壤等环境介质中移动较快、生物有效性大, 影响重金属和有机物的迁移转化及生物有效性等环境行为^[4-6]。因此, 明确畜禽粪便沼液中DOM的含量及结构变化对其后续还田利用的环境效应具有重要意义。

三维荧光光谱(3DEEM)是表征DOM荧光特性的方法^[7]。平行因子分析法(PARAFAC)常与3DEEM技术联用, 实现复杂的DOM混合体系的组分分解, 进而明确DOM

各成分的相对含量和比例。近年来, 利用该技术表征养殖废水及其沼液中DOM荧光特性的研究不断增多。邵一奇等^[8]发现猪场废水残留沼液中DOM的芳香化程度提高, 可生化性降低, 类腐殖质物质增加, DOM有明显的生物源特征; 李有康等^[9]研究发现畜禽粪污发酵后的沼液往往残留大量腐殖质, 说明的腐殖酸作为高分子聚合物难以被生物降解的特性。有报道利用3DEEM-PARAFAC分析了猪场废水DOM组成特征, 发现类腐殖质组分所占比例与腐殖化指数呈显著正相关。

然而, 对于不同原料、不同浓度条件下, 厌氧发酵前后沼液DOM含量及结构变化的3DEEM研究甚少。本研究对不同发酵浓度(TS为4%和8%)的猪、奶牛粪水进行中温批次厌氧发酵试验, 进而利用3DEEM-PARAFAC技术深入分析沼液中DOM的含量及组成变化。研究旨在为畜禽粪便沼液农田利用的潜在环境效应评价提供理论支撑。

1 实验部分

1.1 试验材料

收稿日期: 2020-12-28, 修订日期: 2021-04-06

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(21577052), 江苏省现代农业重点及面上项目(BE2017363)资助

作者简介: 娄梦函, 女, 1997年生, 南京农业大学资源与环境科学学院硕士研究生 e-mail: 2250537099@qq.com

* 通讯作者 e-mail: hmjin@jaas.ac.cn

试验所需原料主要为猪、奶牛粪水(包括尿液及冲洗废水)和活性污泥。其中,粪水分别取自本研究团队长期定位监测的规模化生猪养殖场和奶牛养殖场的粪水收集池,活性污泥取自监测猪场的沼气发酵罐排出的污泥。试验原料基本理化性质详见表 1。活性污泥需在实验室中温[(35±1)℃]驯化至甲烷含量高于 55%后使用。

表 1 发酵原料的基本理化性质

Table 1 Basic characteristics of the raw materials

指标	猪粪水	奶牛粪水	接种污泥
pH	7.5±0.1	8.8±0.1	8.2±0.1
TS/%	32.7±0.3	15.4±0.7	3.5±0.3
VS/%	71.2±2.6	66.8±1.2	53.1±0.5
TOC/(g·kg ⁻¹ DW)	371.3±3.7	383.7±19.6	321.1±7.6
TN/(g·kg ⁻¹ DW)	25.5±0.1	13.1±0.4	23.4±0.3
C/N 比	14.6	29.3	13.7

注:平均值±标准误($n=3$); TS, VS, TOC 和 TN 分别表示总固体、挥发性固体、总有机碳和总氮; DW 表示干重。下同

Note: Mean±standard errors ($n=3$); TS, VS, TOC and TN represent the total solid, volatile solid, total organic carbon and total nitrogen, respectively; DW represents the dry weight. The same below.

1.2 试验设计

厌氧发酵试验在 180 mL 血清瓶中进行。设置 4 个处理组(表 2),分别为 TS 为 4%和 8%的猪、奶牛粪水,并接种 30%(W/W)的驯化活性污泥;同时设置仅加入接种污泥和蒸馏水的对照组。每个处理设置 3 个重复($n=3$)。装料后立即通入高纯 N₂ 吹扫 5 min,以确保瓶内厌氧环境,然后密封。将密封的血清瓶放置于恒温水浴锅[(35±1)℃]中进行厌氧发酵试验。每天定时手动摇匀物料两次,随后测定日产气量,并取样分析 CH₄ 含量。当各个处理的日产气量低于累积产气量的 1%时,反应终止。整个发酵试验共计 34 d。

表 2 试验处理中发酵原料的配比

Table 2 The raw material ratios in the experimental treatments

处理代码	原料类型	TS/%	质量/g		
			原料	污泥	蒸馏水
PM1	猪粪水	4.0	15.4	37.8	72.8
PM2	猪粪水	8.0	30.8	37.8	57.4
DM1	奶牛粪水	4.0	32.8	37.8	55.4
DM2	奶牛粪水	8.0	65.6	37.8	22.6

1.3 取样

试验结束后,称量沼液质量,并充分混匀后取样。所得沼液样品在 9 000 r·min⁻¹下离心 10 min,上清液经 0.45 μm 滤膜过滤后得到 DOM 溶液。

1.4 方法

日产气量采用排水法测定,甲烷含量采用气相色谱仪(GC9890B,南京仁华色谱科技应用开发中心)测定。DOM 浓度采用 TOC 仪(MultiN/C3100 TOC/TN,德国耶拿分析

仪器有限公司)测定,各处理的 DOM 含量均为扣除对照组后得到的数据。3DEEM 特征采用荧光光谱仪(FS5,天美科学仪器有限公司)测量,为避免浓度差异对荧光强度结果的影响,首先将提取的 DOM 溶液的总有机碳(TOC)浓度统一稀释至(10±0.1)mg·L⁻¹。激发波长(Ex)为 230~500 nm,步长为 2 nm;发射波长(Em)为 250~600 nm,步长为 1 nm。扫描速度为 1 200 nm·min⁻¹。所有样品均在室温下测定,采用超纯水为空白进行背景扣除以消除拉曼散射峰。

1.5 数据处理

沼液中 DOM 质量(以干重计)的计算公式为

$$M = c \times m_0 \times TS \quad (1)$$

式(1)中, M 为 DOM 的质量,mg; c 为 DOM 的浓度,mg·g⁻¹; m_0 为物料总质量,g; TS 为总固体含量,%。

腐殖化指数(humification Index, HIX)的计算公式为

$$HIX = \frac{\int (Em_{435\sim 480}) dEx}{\int (Em_{300\sim 345}) dEx} \quad (2)$$

式(2)中, $\int (Em_{435\sim 480}) dEx$ 为 Ex 在 254 nm,Em 在 435~480 nm 处荧光强度值的积分; $\int (Em_{300\sim 345}) dEx$ 为 Ex 在 254 nm,Em 在 300~345 nm 时荧光强度值的积分^[7]。

原料及沼液 DOM 荧光组分的定量分析采用 MATLAB 2016R v. 和 DOMFluor 工具箱,实现 DOM 组分的 PARAFAC 模型建立和验证。利用残差分析与半分法确定最优组分数并检验 PARAFAC 模型的准确性,最终确定荧光组分的荧光峰位置和强度,每个成分的荧光强度用 F_{max} (RU,拉曼单位)表示^[10],用以表征各成分相对浓度的估计值。

各指标在不同处理间的差异采用单因素方差分析(one-way ANOVA),多重比较采用最小显著性差异(LSD)法, $\alpha=0.05$;同一处理在发酵前后各指标的差异性分析采用独立样本 T 检验法。统计分析软件为 SPSS 26.0 v.,图形绘制软件为 Origin 2018 v.。

2 结果与讨论

2.1 产气特征

猪、奶牛粪水中温厌氧发酵过程中日产气量、甲烷含量变化分别如图 1(a,b)所示。总体看来,各处理组的日产气量在发酵初期逐渐升高,并在发酵后期不断下降。猪、奶牛粪水在中温厌氧发酵过程中,甲烷含量在试验前期缓慢上升,分别在第 12 d 和第 4 d 达到峰值,后期分别稳定在 61%和 54%左右。发酵累积产气量达 238.0~484.8 mL·g⁻¹ VS,这与团队前期利用相同原料进行中温厌氧发酵的研究结果基本一致^[11]。产气结果说明,该厌氧发酵试验运行正常,所得沼液具有代表性。

2.2 沼液中 DOM 含量的变化

猪、奶牛粪水中温厌氧发酵前后 DOM 的含量变化如图 2 所示。产气结束后各试验组的 DOM 含量下降,在 PM1, PM2, DM1 和 DM2 处理中降幅分别为 84.55%, 73.47%, 71.78%和 61.44%,降幅均达到极显著($p<0.001$)水平。分析认为随着厌氧发酵反应的进行,原料中的 DOM 不断被微

生物降解转化, 以 CH_4 和 CO_2 等气体形式排出发酵体系。此外, 厌氧发酵结束后, 沼液中干物质含量的降低也导致了这一变化。

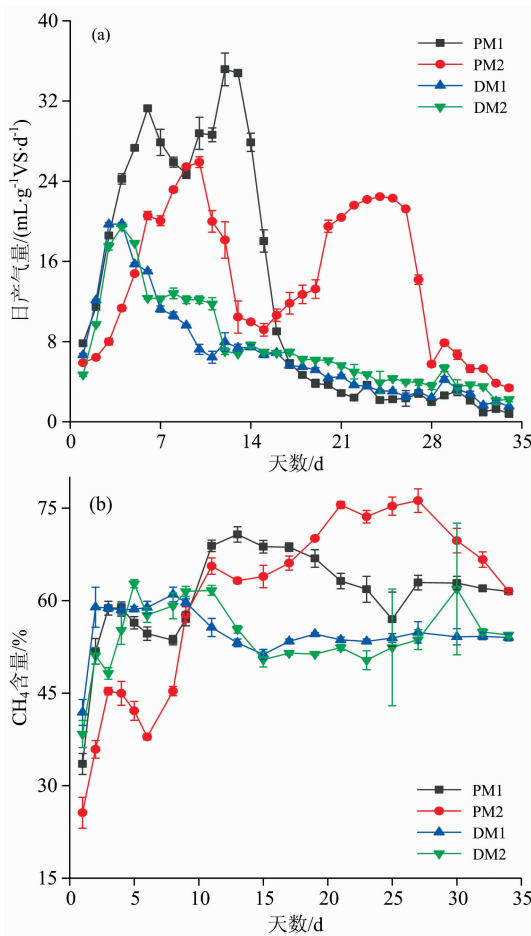


图 1 猪、奶牛粪水发酵过程中日产气量(a)和甲烷含量(b)的变化特征

注: 平均值±标准误差($n=3$)

Fig. 1 Changes of gas productivity (a) and methane concentration (b) during the anaerobic digestion of pig and dairy manure slurries

Note: mean±standard errors ($n=3$)

2.3 沼液中 DOM 荧光强度变化特征

根据 E_x 和 E_m 波长的不同, 可将 3DEEM 图划为 5 个区域^[12], 分别代表类胡敏酸、可溶性微生物副产物、类富里酸、类色氨酸和类酪氨酸, 详见表 3。

不同浓度的猪、奶牛粪水发酵前后的 3DEEM 如图 3 所示, 其差异反映了 DOM 在发酵前后的演变。各试验组沼液中, 3DEEM 的最高荧光强度始终出现在区域 B, 说明微生物副产物是原料和沼液的主要组成部分, 此外还含有胡敏酸、富里酸和少量蛋白质类物质。但沼液中区域 B 的荧光强度均有不同程度的下降趋势, 这主要是由于原料中含量较多的可溶性微生物副产物等易降解物质, 在发酵过程中被微生物利用并降解转化, 因此发酵结束后荧光强度明显降解。不同发酵浓度的沼液中 DOM 各组分亦有所差异, 主要表现在:

PM2[图 3(b)]和 DM2[图 3(d)]试验组沼液中, 区域 C 的荧光强度呈现明显的上升趋势, 说明厌氧发酵过程中有部分类富里酸物质生成; 而 PM1[图 3(a)]和 DM1[图 3(c)]处理组沼液中, 荧光区域 C 的荧光强度变化不明显。各处理组沼液中区域 D、E 的荧光强度差异不明显, 说明类色氨酸和类酪氨酸对不同发酵原料和发酵浓度的响应不敏感。

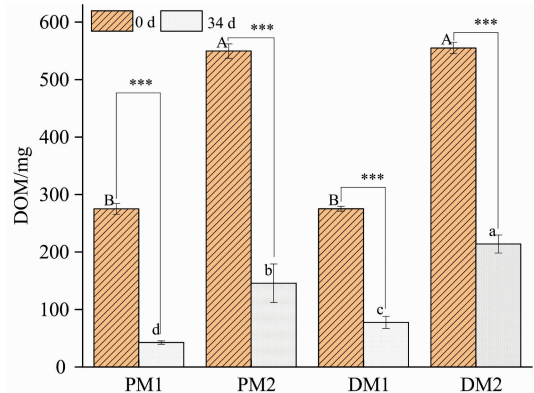


图 2 猪、奶牛粪水发酵前后 DOM 含量变化特征

注: 不同大、小写字母分别表示处理中原料和沼液的差异显著 ($p < 0.05$); * * * 表示同一处理发酵前后差异显著 ($p < 0.001$), 下同。

Fig. 2 Changes of DOM content in the raw and digested pig and dairy manure slurries

Note: Different capital and small letters indicate the significant ($p < 0.05$) differences between the treatments in raw and digested materials, respectively; * * * indicate significant ($p < 0.001$) differences between the raw and digested materials. The same below.

表 3 EEM 的荧光峰划分及归属

Table 3 Fluorescence peak division and attribution of EEM in the raw and digested manure slurries

归属	标号	E_x/nm	E_m/nm
类胡敏酸	A	250~400	380~500
可溶性微生物副产物	B	250~400	280~380
类富里酸	C	220~250	380~450
类色氨酸	D	220~250	330~380
类酪氨酸	E	220~250	280~330

2.4 沼液中 DOM 各组分含量变化特征

2.4.1 荧光组分解析

由于单个峰位置对物理化学条件的变化较为敏感, 因此仅依据 EEM 光谱来评估 DOM 的成分可能会出现偏差。PARAFAC 法可以降低一些荧光峰重叠, 提高对荧光数据分析的准确性, 进一步表征 DOM 不同组分的含量变化^[13]。

对本研究中沼液的 3DEEM 进行 PARAFAC 分析, 共解析出 4 个荧光组分[图 4(a)], 即: C1(主峰 $E_x/E_m=275/300$ nm、次峰 $E_x/E_m=225/300$ nm) 归属为类酪氨酸物质^[14]; C2($E_x/E_m=275/430$ nm) 归属为类富里酸组分; C3(主峰 $E_x/E_m=275/350$ nm、次峰 $E_x/E_m=225/350$ nm) 归属为类色氨酸组分; C4($E_x/E_m=225/450$ nm) 归属为类胡敏酸组分^[7]。其中, C1 和 C3 为可溶性微生物副产物组分, 它们主要由微生物活动产生, 属于游离态或蛋白质类的结合态氨基

酸；C2 和 C4 为类腐殖质组分，芳香族结构较丰富、分子量较大、分子结构较复杂，难被微生物降解^[7]。

2.4.2 荧光组分的相对含量

原料及沼液中 DOM 的 PARAFAC 荧光组分的 F_{max} 变化如图 4(b) 所示。与原料相比，沼液 DOM 中可溶性微生物副产物(C1、C3)的相对含量均呈显著($p < 0.05$)下降，PM1, PM2, DM1, DM2 中 C1 和 C3 的相对含量分别下降了 98.01%, 38.11%, 58.94% 和 60.27%。PM1 和 DM1 处理中沼液的 DOM 中类富里酸组分(C2)的降幅分别为 12.63% 和 13.93%，而 PM2 和 DM2 处理中沼液的 C2 组分却提高了 113.71% 和 2.00%。分析认为由于 PM1 和 DM1 处理中发酵

原料浓度低，反应底物不足，微生物分解和腐化程度不高，故富里酸的产生量降低；而 PM2 和 DM2 处理中发酵原料充足，微生物分解和腐化程度高，故富里酸产生量增加。PM1, PM2, DM1 和 DM2 处理中沼液的类胡敏酸组分(C4)的相对含量分别增加 33.43%, 194.07%, 30.39% 和 62.24%。说明，厌氧微生物可将易利用的有机物分解成小分子单体，通过聚合作用向更稳定的胡敏酸、富里酸转化，腐殖化程度提高^[15]。与其他处理相比，只有 PM2 处理中沼液的 4 个组分总量高于发酵原料，这主要是 C2 和 C4 组分明显增加所导致，同时也说明高发酵浓度的猪粪沼液中腐殖化程度更高。

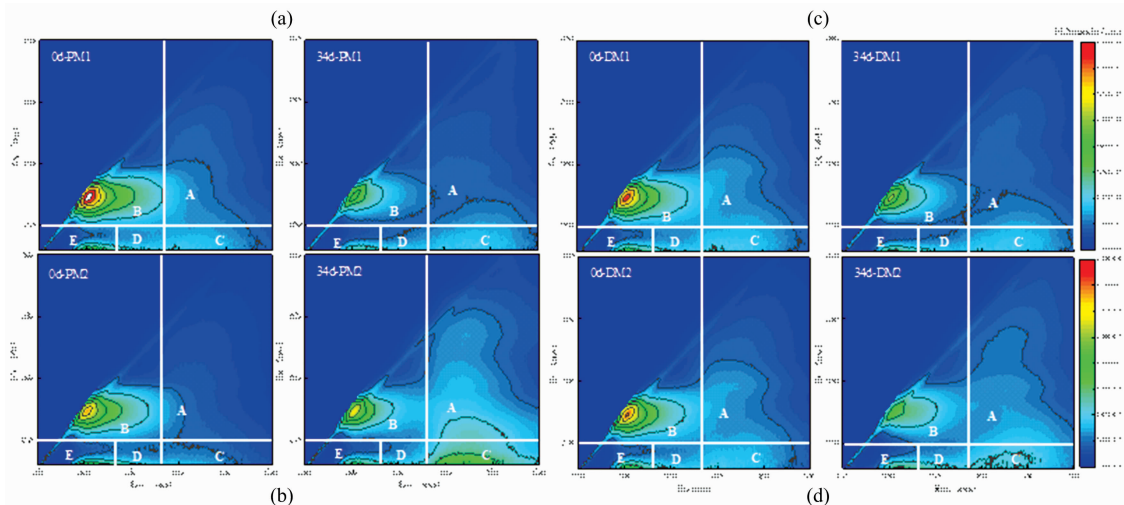


图 3 猪、奶牛粪水 (a) PM1; (b) PM2; (c) DM1; (d): DM2 发酵前后 DOM 三维荧光光谱图变化特征
Fig. 3 3DEEM changes of DOM in the raw and digested pig of (a) PM1; (b) PM2; (c) DM1; (d): DM2

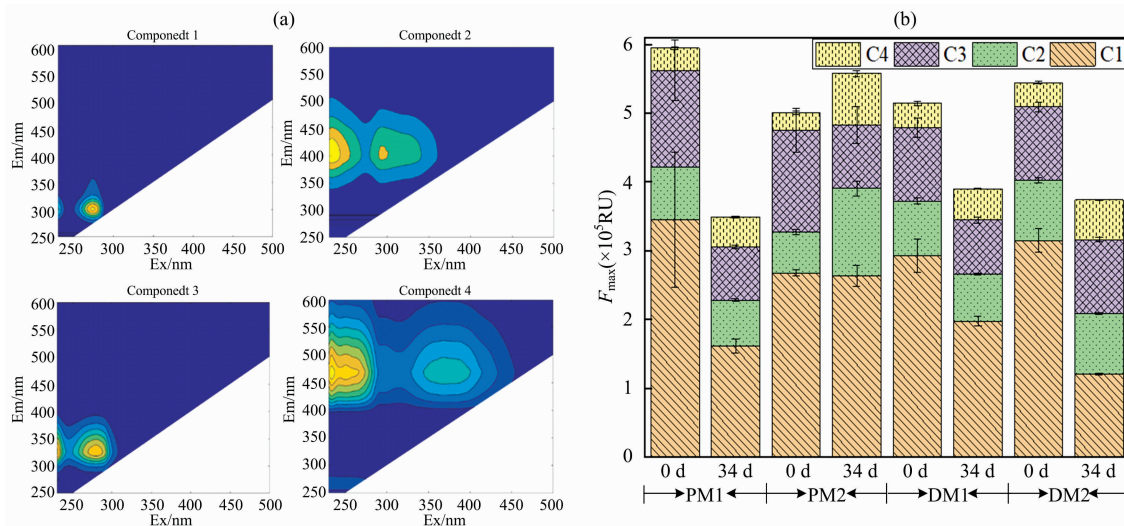


图 4 猪、奶牛粪水发酵前后 DOM 的 PARAFAC 荧光组分 (a) 及 F_{max} (b) 变化特征

Fig. 4 PARAFAC fluorescence components (a) and F_{max} (b) of DOM in the raw and digested pig and dairy manure slurries

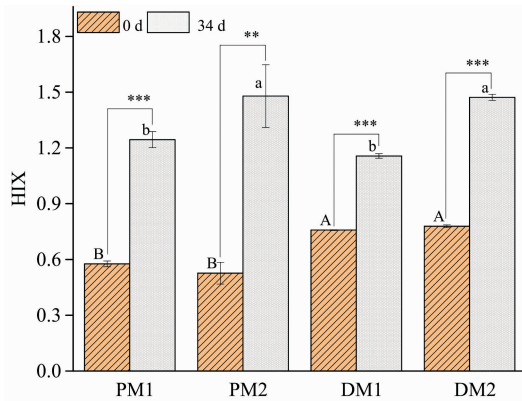


图 5 猪、奶牛粪水发酵前后 DOM 腐殖化指数变化特征

注: ** 和 *** 表示同一处理发酵前后差异显著 ($p < 0.01$, $p < 0.001$)

Fig. 5 Changes of DOM humification index in the raw and digested pig and dairy manure slurries

Note: ** and *** indicate significant ($p < 0.01$, $p < 0.001$) differences between the raw and digested pig and dairy manure slurries, respectively

2.4.3 腐殖化指数

通常情况下, HIX(腐殖化指数)与物料的芳香化程度密切相关。PM1, PM2, DM1 和 DM2 处理中沼液 DOM 的 HIX 均极显著 ($p < 0.001$) 提高(图 5), 增幅分别为 115.99%, 180.77%, 52.53% 和 89.01%。这说明猪、奶牛粪沼液中 DOM 的芳香化程度明显提高。沼液中 DOM 腐殖化程度的增加对于沼液还田后土壤质量的提升及污染物的钝化/降解可能产生积极效应^[8]。

3 结 论

猪、奶牛粪水经中温厌氧发酵后, 沼液中 DOM 的含量极显著 ($p < 0.001$) 下降。沼液的 DOM 主要由可溶性微生物副产物、类富里酸、类胡敏酸和少量类蛋白组分构成。沼液 DOM 中类胡敏酸的相对含量均显著增加 ($p < 0.05$), 而类富里酸的相对含量仅在 TS 为 8% 的处理中增加。沼液中 DOM 的腐殖化指数均极显著 ($p < 0.01$) 增加, 而猪粪沼液 DOM 的腐殖化程度明显高于奶牛粪沼液。

References

- [1] TAO Xiu-ping, DONG Hong-min(陶秀萍, 董红敏). China Agricultural Science and Technology Review(中国农业科技导报), 2017, 19(1): 37.
- [2] ZHU Zhi-ping, DONG Hong-min, WEI Sha, et al(朱志平, 董红敏, 魏莎, 等). Journal of Agricultural Environmental Sciences(农业环境科学学报), 2020, 39(4): 743.
- [3] JIN Hong-mei, CHANG Zhi-zhou, YE Xiao-mei, et al(靳红梅, 常志州, 叶小梅, 等). Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering(农业工程学报), 2011, 27(1): 291.
- [4] CHEN Xu, HAN Xiao-zeng, YAN Jun, et al(陈旭, 韩晓增, 严君, 等). Soil Bulletin(土壤通报), 2019, 50(03): 732.
- [5] Wei Z M, Wang X Q, Zhao X Y, et al. International Biodeterioration & Biodegradation, 2016, 113: 187.
- [6] Qin X Q, Yao B, Jin L, et al. Aquatic Geochemistry, 2020, 26(1): 71.
- [7] Yan L L, Liu Q P, Liu C, et al. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2019, 184: 109616.
- [8] SHAO Yi-qi, WANG Dian-zhan, YAN Cheng, et al(邵一奇, 王电站, 颜成, 等). Journal of Nanjing Agricultural University(南京农业大学学报), 2019, 42(4): 713.
- [9] LI You-kang, LI Huan, LI Chen-chen(李有康, 李欢, 李忱忱). Environmental Engineering(环境工程), 2013, 31(S1): 22.
- [10] Guo X J, He X S, Zhang H, et al. Microchemical Journal, 2012, 102: 115.
- [11] XU Cai-yun, JIN Hong-mei, CHANG Zhi-zhou, et al(许彩云, 靳红梅, 常志州, 等). Acta Agricultural Environmental Sciences(农业环境科学学报), 2016, 35(6): 1167.
- [12] Wang K, Li X K, He C, et al. Bioresource Technology, 2014, 168: 222.
- [13] LI Yun, WEI Hong-jie, WANG Kan, et al(李昫, 魏鸿杰, 王侃, 等). Environmental Science(环境科学), 2019, 40(4): 1751.
- [14] Liu J, Chen X F, Li D R N, et al. Journal of Soils and Sediments, 2020, 20(7): 2761.
- [15] HAO Xiao-di, ZHOU Peng, CAO Ya-li(郝晓地, 周鹏, 曹亚莉). Journal of Environmental Engineering(环境工程学报), 2017, 11(1): 1.

Fluorescence Spectra Characteristics of Dissolved Organic Matter in Mesophilic Anaerobic Digestion of Pig and Dairy Manure Slurries

LOU Meng-han^{1, 2}, JIN Hong-mei^{2, 3, 4*}, LIANG Dong^{2, 3}, ZHU Yan-yun^{2, 3}, ZHU Ning^{2, 3, 4}, LI Dan-yang^{2, 3}

1. College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

2. Institute of Agricultural Resources and Environment, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China

3. Key Laboratory of Crop and Livestock Integrated Farming, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Nanjing 210014, China

4. Jiangsu Collaborative Innovation Center for Solid Organic Waste Resource Utilization, Nanjing 210095, China

Abstract The potential environmental effects of fecal water are determined by the composition changes of substances. Dissolved organic matter (DOM) is an important component of fecal water. In this study, the content of DOM in pig and dairy manure slurries was analyzed by batch mesophilic anaerobic fermentation with a total solid concentration (TS) of 4% and 8%, respectively. DOM's fluorescence spectrum characteristics and component variation characteristics in raw and digested slurries were analyzed by three-dimensional fluorescence spectroscopy (3DEEM) and parallel factor analysis (PARAFAC). After mesophilic anaerobic fermentation, the results showed that DOM content in slurries decreased significantly ($p < 0.001$). DOM of manure slurries mainly contained four fluorescent components: tyrosine like, fulvic acid like, tryptophan like and humic acid like. The relative content of humic acid increased significantly ($p < 0.05$), but the relative content of fulvic acid increased only in the treatment of TS=8% but decreased in TS=4%. The humification index of DOM in digested slurries increased significantly ($p < 0.01$), but the humification degree of DOM in pig manure slurries was significantly higher than that in dairy manure slurries. The results can provide theoretical support for evaluating potential environmental effects of livestock manure slurries utilization in farmland.

Keywords Pig and dairy manure slurries; Mesophilic anaerobic digestion; Dissolved organic matter; Three-dimensional fluorescence; Parallel factor analysis

(Received Dec. 28, 2020; accepted Apr. 6, 2021)

* Corresponding author