

剩余污泥腐植酸的提取和对作物幼苗建成的影响

乔升, 闫敏, 蒙秋霞, 张家星, 罗渊, 杨治平

引用本文:

乔升, 闫敏, 蒙秋霞, 张家星, 罗渊, 杨治平. 剩余污泥腐植酸的提取和对作物幼苗建成的影响[J]. 农业环境科学学报, 2024, 43(2): 426–433.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11654/jaes.2023-0855>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

AQDS和腐植酸对微生物介导铁还原过程的影响

牛丹妮, 弓晓峰, 李远航, 孙玉恒, 舒瑶, 曾慧卿

农业环境科学学报. 2021, 40(12): 2733–2741 <https://doi.org/10.11654/jaes.2021-0502>

褐煤基材料对石灰性土壤铅镉生物有效性的影响

丁满, 杨秋云, 化党领, 宋晓燕, 暴秀丽, 王代长, 刘世亮

农业环境科学学报. 2017, 36(4): 678–685 <https://doi.org/10.11654/jaes.2016-1319>

C/M值对腐植酸-高岭土复合体形成机制及吸附特性影响

彭流月, 何江涛, 王菲

农业环境科学学报. 2018, 37(9): 1994–2004 <https://doi.org/10.11654/jaes.2018-0028>

水稻土及其提取腐植酸组分对邻苯二甲酸二丁酯(DBP)的吸附解吸研究

王晓丹, 向垒, 陈晓红, 陈学斌, 莫测辉, 蔡全英

农业环境科学学报. 2017, 36(6): 1111–1117 <https://doi.org/10.11654/jaes.2017-0224>

苯并[a]芘对毛霉EPS特征的影响

唐蕊, 邵红, 贾春云, 张作金, 陈祥

农业环境科学学报. 2019, 38(4): 765–772 <https://doi.org/10.11654/jaes.2018-0852>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

乔升, 闫敏, 蒙秋霞, 等. 剩余污泥腐植酸的提取和对作物幼苗建成的影响[J]. 农业环境科学学报, 2024, 43(2): 426–433.

QIAO S, YAN M, MENG Q X, et al. Extraction of humic acid from excess sludge and its effects on crop seedling establishment[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2024, 43(2): 426–433.



开放科学 OSID

剩余污泥腐植酸的提取和对作物幼苗建成的影响

乔升^{1,2}, 闫敏^{1,2}, 蒙秋霞^{1,2}, 张家星^{1,2}, 罗渊^{1,2*}, 杨治平^{1,2}

(1. 山西农业大学资源环境学院, 太原 030031; 2. 土壤环境与养分资源山西省重点实验室, 太原 030031)

摘要:为解决IHSS(国际腐植酸协会)推荐法提取剩余污泥腐植酸参数不明确和剩余污泥腐植酸提取研究中缺乏其毒性效应评价等问题,利用响应曲面法得到剩余污泥腐植酸提取的最佳条件,并分析了腐植酸理化特性及其对作物幼苗建成的影响。结果表明,腐植酸提取的最佳条件:碱浓度为 $0.19\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$,碱泥比($\text{mL}:\text{g}$)为11.6,振荡时间为3.8 h,提取量为 $96.1\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。相较于推荐法的腐植酸提取量增加了118%。提取所得腐植酸的元素分析显示,O/C为0.84,H/C为0.14,C/N为4.43;傅里叶变换红外光谱和凝胶渗透色谱分析显示,剩余污泥腐植酸存在羧基、醇羟基和酚羟基等含氧官能团,重均分子量为8 856 Da。此外,在 $500\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 施用条件下,该腐植酸对大白菜和萝卜种子发芽率和子叶光合色素含量均无显著影响,而对大白菜种子胚根伸长具有显著促进作用。综上,通过优化提取条件可显著提高腐植酸提取量,剩余污泥腐植酸腐殖化程度与芳香化程度均较高,分子量较小,生物活性较强,且低浓度下对作物早期生长无不良影响。

关键词:剩余污泥腐植酸;提取条件;幼苗建成;种子发芽;子叶光合色素

中图分类号:X703;S634.1;S631.1 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2024)02-0426-08 doi:10.11654/jaes.2023-0855

Extraction of humic acid from excess sludge and its effects on crop seedling establishment

QIAO Sheng^{1,2}, YAN Min^{1,2}, MENG Qiuxia^{1,2}, ZHANG Jiaxing^{1,2}, LUO Yuan^{1,2*}, YANG Zhiping^{1,2}

(1. College of Resources and Environment, Shanxi Agricultural University, Taiyuan 030031, China; 2. Shanxi Provincial Key Laboratory of Soil Environment and Nutrient Resources, Taiyuan 030031, China)

Abstract: The aim of our study is to solve the problems of unclear parameters of the humic acid extracted from excess sludge using the International Humic Substances Society (IHSS) recommended method and lack of evaluation of the toxic effects of the humic acid. The optimum conditions for the extraction of humic acid from excess sludge were obtained using the response surface methodology, and the physicochemical properties of the humic acid and its effect on crop seedling establishment were analyzed. Results showed that the optimum conditions for humic acid extraction were as follows: alkali concentration of $0.19\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, alkali sludge ratio ($\text{mL}:\text{g}$) of 11.6, shaking time of 3.8 h, and extraction amount of $96.1\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$. Compared with the IHSS recommended method, the amount of the humic acid extracted by this method increased by 118%. Elemental analysis of humic acid showed that the O/C ratio was 0.84, the H/C ratio was 0.14, and the C/N ratio was 4.43. Fourier transform infrared spectroscopy and gel permeation chromatography analyses showed that there were oxygen-containing functional groups such as carboxyl, alcohol hydroxyl, and phenolic hydroxyl groups, and the weight-average molecular weight was 8 856 Da. In addition, the application of humic acid at $500\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ did not significantly affected the germination rate and the

收稿日期:2023-10-19 录用日期:2023-11-25

作者简介:乔升(1999—),男,山西闻喜人,硕士研究生,研究方向为有机固体废弃物资源化利用。E-mail:sxwxqs@163.com

*通信作者:罗渊 E-mail:luoyuansxau@163.com

基金项目:山西省科技重大专项计划揭榜挂帅项目(202201140601028-6);山西省“1331工程”项目(20211331-15);山西农业大学校企合作项目(2023HX004,2023HX006)

Project supported: The Open Bidding Programs of Science and Technology Major Special Plan of Shanxi Province (202201140601028-6); The “1331 Engineering” Project of Shanxi Province (20211331-15); The School-enterprise Cooperation Project of Shanxi Agricultural University (2023HX004, 2023HX006)

photosynthetic pigment content of cotyledons of Chinese cabbage and radish seeds, but significantly affected radicle elongation in Chinese cabbage seeds. The extraction amount of humic acid can be significantly increased by optimizing the extraction conditions. Humic acid has high degrees of humification and aromatization, small molecular weight, strong biological activity, and no adverse effect on early growth stage of crops at low concentrations.

Keywords: excess sludge humic acid; extraction condition; seedling establishment; seed germination; cotyledon photosynthetic pigment

随着我国城镇化的快速发展,生活污水处理规模不断扩大,导致大量剩余污泥产生。据统计,截止到2020年,我国每年产生的剩余污泥量已超过6 000万 m^3 ^[1]。2021年6月国家发展改革委与其他部门联合编制了《“十四五”城镇污水及资源化利用发展规划》,该规划提出到2025年,城镇污泥资源化利用水平进一步提升,要求在实现稳定化和无害化的前提下,稳步推进污泥资源化利用。

剩余污泥富集了大量有机物,以腐植酸为例,其含量一般占污泥有机物含量的10%~20%,具有良好的资源属性^[2-3]。腐植酸含有羧基、酚羟基、羰基和甲氧基等含氧官能团,生物活性较强,具有促进植物根系生长以及促进植物吸收养分等作用,在农业领域应用颇广^[4-5]。目前,国内外对剩余污泥腐植酸的提取多采用国际腐植酸协会(IHSS)推荐法^[6],但此法仅适用于土壤腐植酸的提取。由于不同来源腐植酸的结构、组成以及元素含量不同^[7],因此,亟待对其提取条件进行优化。

由于污泥成分复杂,含有重金属等有害物质,所以也具有一定的“污染”属性^[8]。但已有的剩余污泥提取腐植酸研究中缺乏对其毒性效应的综合评价^[9-11]。幼苗建成(seedling establishment)是指从种子发芽开始,幼苗依赖种子贮藏物质进行异养生长,当其子叶获得光合能力,进行自养生长时完成的早期生长阶段^[12]。通常,利用种子发芽试验可快速评价某一物质的植物毒性^[13],但只反映了其对植物地下部生长的影响。然而,在种子发芽的基础上,通过观察和分析幼苗建成后子叶的转绿情况,可较为全面地评价某一物质对植物地上部生长的影响,即通过幼苗建成试验可较为全面地评价物质的毒性效应。目前,幼苗建成试验在评价抗生素植物毒性^[14]、稀土元素对植物早期生长的影响^[15]和畜禽粪便堆肥产品腐熟度^[16]方面得到应用。因此,利用幼苗建成试验可较为快速且全面地评价剩余污泥腐植酸对植物早期生长的影响,为其安全利用提供数据支撑。

本研究综合考虑提取条件中各因素对腐植酸提取量的影响,参考IHSS推荐法并利用Box-Behnken

法设计试验,确定剩余污泥腐植酸的最佳提取条件。此外,对提取所得腐植酸进行了理化特性研究,利用植物毒性测试中常用作物大白菜和萝卜^[17]的幼苗建成试验,以种子相对发芽率、胚根相对长度和子叶相对光合色素含量为评价指标,对其生物效应进行了快速且全面的评价。本研究可为剩余污泥腐植酸的提取和应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 剩余污泥来源与性质

本研究使用的剩余污泥样品采集于山西省太原市某污水处理厂,于4℃条件下保存待用。剩余污泥含水率为 $80.5\%\pm 0.2\%$,pH为 7.7 ± 0.1 ,总固体(TS)为 $(195\pm 2)\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,可溶性化学需氧量(SCOD)为 $(4\,689\pm 13)\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,总化学需氧量(TCOD)为 $(67\,678\pm 1\,142)\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,挥发性固体(VS)为 $50.9\%\pm 0.3\%$,总腐植酸含量为 $17.0\%\pm 0.7\%$ 。

1.2 试验方法

1.2.1 响应曲面试验设计

剩余污泥经表面活性剂联合超声波预处理后进行腐植酸提取试验^[18]。参考IHSS推荐法^[6],将预处理后的剩余污泥中加入 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl溶液并振荡反应1h,离心去除上清液,得到沉淀。然后加入NaOH溶液振荡离心后去除沉淀,得到上清液并测定腐植酸含量^[9]。再根据Box-Behnken设计原理^[19]以及参照提取试验结果确定的条件范围,选择碱浓度(X_1)、碱泥比(X_2)与振荡时间(X_3)为剩余污泥腐植酸提取量的3个显著影响因子,以腐植酸提取量为响应值,采用三因子三水平的响应曲面法进行优化试验。通过分析多变量二元回归方程确定腐植酸提取优化的最佳参数。试验参数设计见表1。

表1 响应曲面优化试验参数设计

Table 1 Response surface optimization test parameter design			
参数 Parameter	碱浓度/($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	碱泥比($\text{mL}\cdot\text{g}$)	振荡时间/h
-1	0.15	10	3
0	0.20	12	4
1	0.25	14	5

1.2.2 利用作物早期生长试验对剩余污泥腐植酸植物毒性进行评价

根据前期预试验结果,试验共设置 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $1\,000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 腐植酸溶液处理,去离子水为对照(未添加腐植酸),每个处理均设3个重复。分别取大白菜种子30颗和萝卜种子20颗,置于垫有一张定性滤纸的方形培养皿($10 \text{ cm} \times 10 \text{ cm}$)中,加入去离子水或腐植酸溶液4 mL后置于培养箱中,于 25°C 条件下黑暗培养24 h,培养后计算种子相对发芽率。然后每个培养皿保留一半数量大小相近的种子,分别补加2 mL去离子水或腐植酸溶液后继续于 25°C 条件下黑暗培养24 h,培养后计算种子胚根相对根长。黑暗培养完成后补加2 mL去离子水或腐植酸溶液,设置光照强度为 $6\,000 \text{ lx}$,光照培养12 h,培养后测定子叶相对光合色素含量^[20]。

1.3 分析方法

含水率、挥发性固体 VS、总固体 TS 采用重量法测定^[21-22],可溶性化学需氧量 SCOD 和总化学需氧量 TCOD 采用快速消解分光光度法(HJ/T 399—2007)测定,pH 利用 pH 仪测定(CJ/T 221—2005),总腐植酸含量采用 GB/T 11957—2001 测定。

称取约 1 mg 干燥的腐植酸置于元素分析仪(Uni-cube,德国 Elementar 公司)中测定分析 C、H、O、N 元素的含量,并根据含量分析 O/C、H/C 和 C/N 原子比;傅里叶变换红外光谱测定由傅里叶变换红外光谱仪(Nicolet iS5,美国 Thermo 公司)测定,测定之前去除样品水分,取 2 mg 干燥样品与 200 mg KBr 混合,压成薄片后进行分析,扫描范围为 $4\,000 \sim 400 \text{ cm}^{-1}$,分辨率为 1 cm^{-1} ;凝胶渗透色谱由凝胶渗透色谱仪(1525,美国 Waters 公司)测定,分析条件为色谱柱 BioSep-SEC-S2000($5 \mu\text{m}$ 硅胶载体, $300 \text{ mm} \times 7.8 \text{ mm}$)及同系列的保护柱($30 \text{ mm} \times 7.8 \text{ mm}$),色谱柱温度为 40°C ,流动相为四氢呋喃,流速为 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

1.4 数据处理与分析

利用 Excel 软件对数据进行处理,结果以平均值 $\pm$ 标准差的形式表示。采用 SPSS 19.0 软件对试验数据进行单因素方差分析,利用 LSD 法比较结果之间的差异,显著性设为 $P < 0.05$ 。采用 Origin 2021 软件制图。

2 结果与讨论

2.1 剩余污泥腐植酸提取响应优化结果

2.1.1 剩余污泥腐植酸提取响应曲面试验的设计与结果

表2为响应曲面试验的设计与结果,对表中的数

据进行多元二次回归方程的拟合,得到回归模型的方程为 $Y = 94.8 - 5.1X_1 - 4.5X_2 - 6.7X_3 + 2.5X_1X_2 - 2.1X_1X_3 + 1.3X_2X_3 - 21.4X_1^2 - 13.8X_2^2 - 18.9X_3^2$ 。回归模型的 $R^2 = 0.982\,9$,说明该回归模型相关性良好。 $\text{Adj } R^2 = 0.961\,0$, $\text{Pred } R^2 = 0.795\,9$,二者之差小于0.2,因此,该回归模型的准确度和精确度较高^[23]。

表2 响应曲面试验的设计与结果

Table 2 Design and result of response surface test

序号 Number	碱浓度 Alkali concentration/ ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	碱泥比 Alkali sludge ratio/($\text{mL} : \text{g}$)	振荡时间 Shaking time/h	实测值 Measured value/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	预测值 Predicted value/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
1	0.15	12	5	54.7	55.1
2	0.20	14	5	51.7	52.3
3	0.15	12	3	60.4	64.2
4	0.25	14	4	49.4	52.6
5	0.25	10	4	55.5	56.5
6	0.25	12	3	58.6	58.2
7	0.20	14	3	65.8	63.0
8	0.20	12	4	94.5	94.8
9	0.20	10	5	55.8	58.6
10	0.20	12	4	95.1	94.8
11	0.20	10	3	75.2	74.6
12	0.20	12	4	98.7	94.8
13	0.20	12	4	94.2	94.8
14	0.15	14	4	58.8	57.8
15	0.25	12	5	44.6	40.8
16	0.20	12	4	91.5	94.8
17	0.15	10	4	74.8	71.6

响应曲面试验的方差分析见表3。回归模型的 F 值为 44.76, P 值 $< 0.000\,1$,说明模型拟合良好。而方差分析结果中, P 值和 F 值反映了各因子对响应值的影响程度, F 值越大, P 值越小,各因子对响应值的影响越显著^[24]。因此各因子均与腐植酸提取量之间存在极显著的线性关系,提取条件的影响程度为振荡时间 ($P = 0.001\,4$) $>$ 碱浓度 ($P = 0.005\,9$) $>$ 碱泥比 ($P = 0.011\,2$)。

2.1.2 响应曲面试验最佳条件

利用回归模型得到的剩余污泥腐植酸提取最优条件:碱浓度为 $0.19 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、碱泥比($\text{mL} : \text{g}$)为 11.6、振荡时间为 3.8 h,预测得到的最大腐植酸提取量为 $96.1 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。进行验证试验后发现回归模型的预测值偏差小于 5%,说明回归模型拟合度较好^[25]。根据表2可知,当振荡时间一定时,腐植酸提取量随着碱浓度和碱泥比的提升出现先增加后减小的趋势。当碱泥比一定时,腐植酸提取量也出现先增加后减小的

表3 响应曲面试验的方差分析
Table 3 Variance analysis for response surface tests

方差来源 Source of variance	平方和 Square	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F值	P值
模型 Model	5 465.81	9	607.31	44.76	<0.000 1
X_1	206.04	1	206.04	15.19	0.005 9
X_2	158.42	1	158.42	11.68	0.011 2
X_3	353.78	1	353.78	26.08	0.001 4
X_1X_2	24.50	1	24.50	1.81	0.220 9
X_1X_3	17.22	1	17.22	1.27	0.297 0
X_2X_3	7.02	1	7.02	0.52	0.495 2
X_1^2	1 921.50	1	1 921.50	141.63	<0.000 1
X_2^2	803.31	1	803.31	59.21	0.000 1
X_3^2	1 498.08	1	1 498.08	110.42	<0.000 1
残差	94.97	7	13.57		
失拟项	68.33	3	22.78	3.42	0.132 9
纯误差	26.64	4	6.66		
总和	5 560.78	16			

趋势。当碱浓度一定时,在一定范围内,振荡时间和碱泥比不断增加,腐植酸提取量也出现先增加后减小的趋势。这可能是由于随着时间的延长,腐植酸不断地溶解至溶液中,当达到溶解饱和时,会被重新吸附至剩余污泥表面^[25]。也有研究者认为,随着碱泥比和碱浓度的提升,溶解至液相中的腐植酸进一步分解为小分子的水溶性提取物和二氧化碳^[26]。

2.2 剩余污泥腐植酸表征

2.2.1 元素分析

为了分析腐植酸元素组成与结构,对其进行了元素分析,结果见表4。剩余污泥腐植酸主要由C、H、O和N元素组成,其中C含量为37.74%,H含量为5.26%,O含量为31.80%,N含量为8.51%,C含量最多,H含量最少。本研究所得剩余污泥腐植酸与表4中其他研究所得腐植酸的元素含量相差较小。腐植酸样品的O/C原子比可鉴别羧基等含氧官能团的含量^[27]。本研究腐植酸的O/C为0.84,高于张静静^[9]、李有康等^[11]和刘超超等^[27]研究中剩余污泥腐植酸的O/C,与其他剩余污泥腐植酸的O/C类似,说明本研究腐植酸存在较多的含氧官能团。H/C原子比是比较样品腐殖质芳香度的有效定性参数^[28]。本研究腐植酸的H/C为0.14,接近其他剩余污泥腐植酸的H/C,由此可见,本研究腐植酸可能含有较多数量的芳香基团,芳香化程度较高。C/N可揭示腐植酸的腐殖化程度^[30]。本研究剩余污泥腐植酸的C/N最低,为4.43,证明其腐殖化程度较高,形成络合物的稳定性也较

表4 腐植酸元素分析
Table 4 Elemental analysis of humic acid

元素含量Element content/%				原子比Atomic ratio			来源
C	H	O	N	O/C	H/C	C/N	Source
37.74	5.26	31.80	8.51	0.84	0.14	4.43	本研究
55.73	8.29	28.02	6.57	0.50	0.15	8.48	[9]
57.20	8.50	24.50	7.40	0.43	0.15	7.73	[11]
56.27	7.79	24.54	9.64	0.44	0.14	5.84	[27]
41.10	6.39	40.06	8.31	0.97	0.16	4.95	[28]
41.80	6.24	33.52	7.49	0.80	0.15	5.58	[29]
45.12	6.53	40.73	6.75	0.90	0.14	6.68	[30]

高^[31-32]。这可能是由于有机物在本研究剩余污泥的来源中占比较高,并且二级处理工艺中的微生物活性高,分解了剩余污泥中的有机质,释放出大量的小分子有机化合物,包括了腐植酸前体物质,从而促进了剩余污泥腐植酸的腐殖化^[33]。

2.2.2 红外谱图分析

腐植酸作用效果受其官能团种类的影响,其可促进植物生长过程中对养分的吸收,也可调控作物生长环境^[5]。为了确定剩余污泥腐植酸的结构和官能团信息,本研究进行了傅里叶变换红外光谱分析。剩余污泥腐植酸的傅里叶变换红外光谱见图1。如图所示,在4 000~400 cm⁻¹波数范围内,出现了8个腐植酸特征吸收峰。在3 371 cm⁻¹波数附近的峰代表酚羟基和醇羟基—OH的振动^[29];2 927 cm⁻¹波数附近的峰归因于脂肪烷烃结构中—CH的伸缩振动^[11];2 361 cm⁻¹波数出现较小的峰,这是羧基的—OH和—H伸缩振动导致的^[34];1 657 cm⁻¹波数出现的峰也是羧基的特征峰,这是羧基中的C=O伸缩振动引起的^[35];1 541 cm⁻¹波数附近的峰通常被认为是芳香共轭双键引起的^[36];1 232 cm⁻¹波数附近的峰则归因于酚、醚或醇的

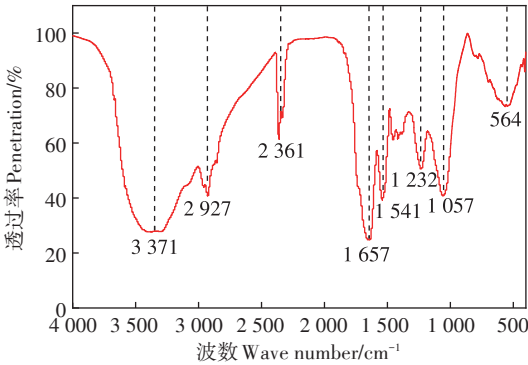


图1 剩余污泥腐植酸的傅里叶变换红外光谱图
Figure 1 Fourier transform infrared spectrum of humic acid in excess sludge

C—O 伸缩和—OH 的变形振动^[37]; 1 057 cm^{-1} 和 564 cm^{-1} 波数附近的峰归因于脂肪醇、醚、硫醇基的伸缩振动以及磺基、硫醇基等含硫化合物的伸缩振动^[38-39]。以上结果说明, 剩余污泥腐植酸存在较多含氧官能团, 生物活性较高。

2.2.3 凝胶渗透色谱分析

腐植酸相对分子质量越小, 其生物活性越强^[40]。为了确定剩余污泥腐植酸的相对分子质量, 判断其生物活性, 本研究利用凝胶渗透色谱法对其进行了分析, 剩余污泥腐植酸的相对分子质量分布如图2所示。由图2可知, 剩余污泥腐植酸的 $\lg M_w$ 主要分布在 3.0~4.5 之间, 与之对应的相对分子质量分布在 1~32 kDa 之间。剩余污泥腐植酸的 M_w (重均分子量) 为 9 kDa, M_n (数均分子量) 为 4 kDa, 相较于张静静^[9] 研究中剩余污泥腐植酸的相对分子质量 ($M_w=27$ kDa, $M_n=25$ kDa) 和李有康等^[11] 研究中剩余污泥腐植酸的相对分子质量 (30~50 kDa) 以及堆肥腐植酸^[41] 的相对分子质量 ($M_w=14\sim17$ kDa) 和森林土壤腐植酸^[42] 的相对分子质量 ($M_w=42$ kDa), 本研究中腐植酸的相对分子质量较小, 具有较强的生物活性。

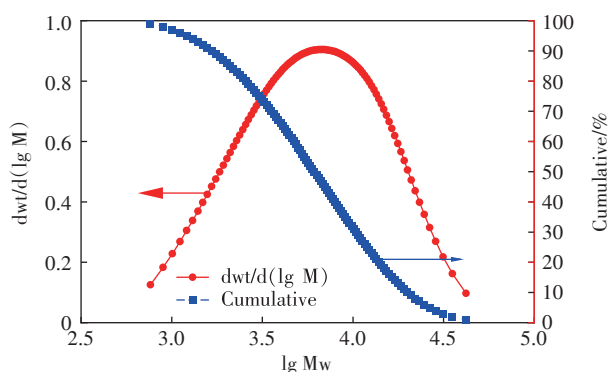


图2 剩余污泥腐植酸的相对分子质量分布

Figure 2 Relative molecular weight distribution of humic acid in excess sludge

2.3 剩余污泥腐植酸的植物毒性评价

2.3.1 种子发芽

不同浓度腐植酸溶液对大白菜、萝卜种子发芽率的影响如表5所示。由表5可知, 不同浓度下大白菜种子发芽率分别为 96.7%、90.0% 和 84.4%。与 0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 相比, 500 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 腐植酸处理的大白菜种子发芽情况并无显著性差异 ($P>0.05$), 而 1 000 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 腐植酸处理的大白菜种子的发芽情况却存在显著性差异 ($P<0.05$)。这可能是因为水分是种子发芽的先决条件^[43], 当腐植酸溶液浓度较低时, 在种子本身的抗逆性作用下, 抑制水分吸收的效果不明显, 而当腐植酸

溶液浓度提高后, 其电导率也随之上升, 盐浓度的增加抑制了种子对水分的吸收。在此情况下, 种子本身的代谢反应难以抵抗高浓度溶液的影响, 导致发芽率降低。而三个处理的萝卜种子发芽情况均无显著性差异 ($P>0.05$), 发芽率分别为 90.0%、90.0% 和 80.0%。这可能是由于萝卜的种皮较厚, 可阻碍高浓度腐植酸溶液对其产生的负面影响, 亦或者是萝卜种子本身的抗逆性较强, 可削弱高浓度腐植酸溶液对其产生的影响^[44-45]。

表5 不同浓度腐植酸溶液对作物种子发芽率的影响

Table 5 Effects of different concentrations of humic acid on seed germination percentage of crops

腐植酸浓度 Humic acid concentration/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	大白菜种子发芽率/% Chinese cabbage seed germination rate	萝卜种子发芽率 Radish seed germination rate/%
0	96.7 $\pm$ 0.0a	90.0 $\pm$ 5.0a
500	90.0 $\pm$ 6.7ab	90.0 $\pm$ 5.0a
1 000	84.4 $\pm$ 6.9b	80.0 $\pm$ 8.7a

注: 同列不同小写字母表示处理间差异显著 ($P<0.05$)。

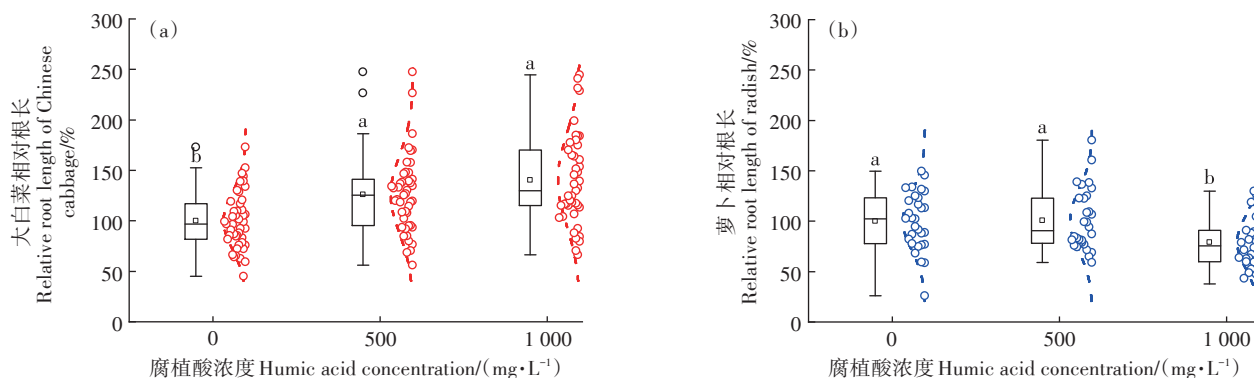
Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant differences between treatments ($P<0.05$).

2.3.2 种子胚根伸长

观察不同浓度腐植酸溶液条件下作物种子根长的发育情况, 可进一步评估其植物毒性。图3为不同浓度腐植酸溶液对大白菜、萝卜种子根长的影响, 由图3(a)可知, 500 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 与 1 000 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 腐植酸溶液对大白菜的根长发育有良好的促进作用, 相对根长分别为 126.1% 和 140.6%。这是因为适量的腐植酸能够提高植物 ATP 酶的活性, 从而刺激种子胚根伸长^[7]。此外, 凝胶渗透色谱分析显示, 本研究腐植酸分子量较小, 而小分子量腐植酸对促进作物根系生长有重要作用^[46], 故对大白菜种子胚根伸长具有一定促进作用。而从图3(b)可知, 当腐植酸溶液浓度大于 1 000 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 其对萝卜的根长生长具有抑制作用 ($P<0.05$), 相对根长从 100.7% 降低至 79.2%。这可能是由于萝卜种子颗粒较大并且腐植酸溶液浓度过大时, 培养皿中的水分不足以供给萝卜种子的需求, 而小颗粒的大白菜种子在培养皿中能够进一步生长^[47]。

2.3.3 作物子叶光合色素

光合色素是作物进行光合作用的物质基础。通过测定作物子叶光合色素的含量可评估腐植酸溶液对作物的胁迫作用^[48]。图4(a)与图4(b)分别为不同浓度腐植酸溶液对大白菜、萝卜子叶光合色素含量的影响。由图4可知, 与 0 相比, 500 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 1 000 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 腐植酸溶液对大白菜光合色素含量的影响无显著性



不同小写字母代表各处理间在 $P<0.05$ 水平差异显著。下同。

Different lowercase letters represent significant differences between treatments at $P<0.05$ level. The same below.

图3 不同浓度腐植酸溶液对作物胚根根长的影响

Figure 3 Effects of humic acid solution at different concentrations on radicle length of crops

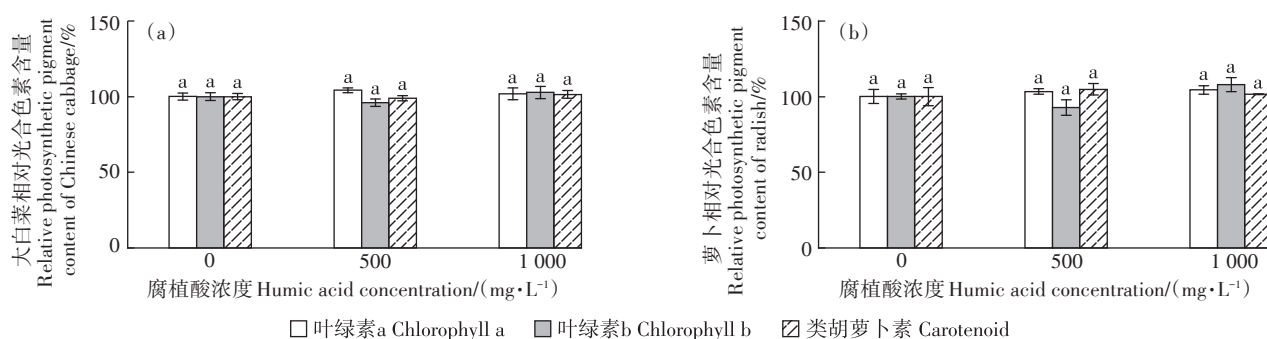


图4 不同浓度腐植酸溶液对作物子叶光合色素含量的影响

Figure 4 Effects of humic acid solution at different concentrations on photosynthetic pigment content of cotyledons of crops

差异,相对叶绿素a含量分别为104.2%和101.9%,相对叶绿素b含量分别为96.0%和102.7%,相对类胡萝卜素含量为99.0%和101.4%。萝卜子叶也有相同的影响,相对叶绿素a含量分别为103.3%和104.5%,相对叶绿素b含量分别为93.0%和108.0%,相对类胡萝卜素含量为104.9%和101.6%。叶绿体是植物幼苗进行光合作用的场所。作为重要的细胞器之一,虽然它被细胞壁与细胞膜层层保护,但是在重金属^[49]和盐分^[50]等非生物胁迫下,叶绿体结构会遭到破坏,影响光合色素的合成。而刘彩娟等^[51]则发现干旱胁迫下,黄腐酸可维持叶绿体的超微结构,增加叶绿素含量。本研究中不同浓度腐植酸对大白菜和萝卜子叶光合色素含量均无显著影响,这可能是由于腐植酸中的营养元素会促进子叶生长,可抵消高浓度腐植酸对其产生的不利影响^[17]。

3 结论

(1)通过响应曲面法优化了腐植酸的提取条件,提取量相较于国际腐植酸协会推荐法增加了118%;在种子发芽试验的基础上,通过幼苗建成试验全面评

价了腐植酸对植物早期生长的影响。

(2)腐植酸提取的最佳条件为碱浓度 $0.19 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、碱泥比($\text{mL}:\text{g}$)11.6、振荡时间3.8 h。预测得到的最大腐植酸提取量为 $96.1 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。3个因子对腐植酸提取量的影响程度为振荡时间>碱浓度>碱泥比。

(3)剩余污泥腐植酸的O/C为0.84,H/C为0.14,C/N为4.43,芳香化程度与腐殖化程度较高,含有丰富的含氧官能团,且相对分子质量较小,具有较高的生物活性。

(4)剩余污泥腐植酸在低浓度时会促进大白菜种子胚根伸长,而在高浓度时对大白菜种子发芽以及萝卜种子胚根伸长有一定抑制作用。腐植酸对大白菜和萝卜子叶光合色素含量均无显著影响。

参考文献:

- [1] 戴晓虎. 我国污泥处理处置现状及发展趋势[J]. 科学, 2020, 72(6): 30-34. DAI X H. Current situation and development trend of sludge treatment and disposal in China[J]. Science, 2020, 72(6): 30-34.
- [2] WEI L L, LI J J, XUE M, et al. Adsorption behaviors of Cu^{2+} , Zn^{2+} and Cd^{2+} onto proteins, humic acid and polysaccharides extracted from

- sludge EPS: sorption properties and mechanisms[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 291: 121868.
- [3] CAO D Q, TIAN F, WANG X, et al. Recovery of polymeric substances from excess sludge: surfactant-enhanced ultrasonic extraction and properties analysis[J]. *Chemosphere*, 2021, 283: 131181.
- [4] CANELLAS P L, OLIVARES L F, CANELLAS A O N, et al. Humic acids increase the maize seedlings exudation yield[J]. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 2019, 6(1): 1–14.
- [5] MARIANA M, MARINA M B, IARA D C S, et al. Effects of humic acids from landfill leachate on plants: an integrated approach using chemical, biochemical and cytogenetic analysis[J]. *Chemosphere*, 2017, 184: 309–317.
- [6] ROGER S. Organic matter characterization[M]. Wisconsin: Soil Science Society of America Press, 1996: 1018–1020.
- [7] ABDELGHANI T, AURORE R, JACQUELINE D, et al. Comprehensive comparison of the chemical and structural characterization of landfill leachate and leonardite humic fractions[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2016, 408(7): 191728.
- [8] 李思敏, 张义竞, 唐锋兵, 等. 生物炭对污泥-菌渣堆肥腐殖化与重金属钝化的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2022, 41(7): 1565–1574. LI S M, ZHANG Y J, TANG F B, et al. Effects of biochar on humification and heavy metal passivation of sludge-fungus residue compost[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2022, 41(7): 1565–1574.
- [9] 张静静. 城市污泥中腐植酸的提取工艺及其性能研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2016: 12–27. ZHANG J J. Study on the extraction and properties of humic acid from municipal sludge[D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2016: 12–27.
- [10] CHENG G, NIU Z Y, ZHANG C X, et al. Extraction of humic acid from lignite by KOH-hydrothermal method[J]. *Applied Sciences*, 2019, 9(7): 1356.
- [11] 李有康, 李欢, 李忱忱. 污泥中腐植酸的含量及其特征分析[J]. *环境工程*, 2013, 31(增刊1): 22–24. LI Y K, LI H, LI C C. Contents and characteristic of humic and fulvic acids from sewage sludge[J]. *Environmental Engineering*, 2013, 31(Suppl1): 22–24.
- [12] GOMMERS C M M, ELENA M. Seedling establishment: a dimmer switch-regulated process between dark and light signaling[J]. *Plant Physiology*, 2018, 176(2): 1061–1064.
- [13] LUO Y, LIANG J, ZENG G M, et al. Seed germination test for toxicity evaluation of compost: its roles, problems and prospects[J]. *Waste Management*, 2018, 71: 109–114.
- [14] LUO Y, LIANG J, ZENG G M. Sensitivity difference between skotomorphogenesis and photomorphogenesis of plants to antibiotics: a call for research[J]. *Chemosphere*, 2020, 242: 125261.
- [15] 刘腊梅, 王象, 赫鼎, 等. 低剂量镧对植物暗形态建成的影响[J]. *中国稀土学报*, 2022, 40(1): 144–152. LIU L M, WANG X, HE D, et al. Effects of low-dose lanthanum on skotomorphogenesis of plants[J]. *Chinese Journal of Rare Earth*, 2022, 40(1): 144–152.
- [16] LIU Y, LI J H, CHENG H Y, et al. Seedling establishment test for the comprehensive evaluation of compost phytotoxicity[J]. *Sustainability*, 2022, 14(19): 11920.
- [17] 罗渊, 袁京, 李国学, 等. 种子发芽试验在低碳氮比堆肥腐熟度评价方面的适用性[J]. *农业环境科学学报*, 2016, 35(1): 179–185. LUO Y, YUAN J, LI G X, et al. Applicability of seed germination test in the evaluation of low C/N compost maturity[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2016, 35(1): 179–185.
- [18] 罗渊, 乔升, 闫敏, 等. 不同预处理方式对剩余污泥破解率的影响[J/OL]. *北京工业大学学报*: 1–11[2023–11–10]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2286.T.20231103.1409.002.html>. LUO Y, QIAO S, YAN M, et al. Effect of different pretreatment methods on disruption rate of excess sludge[J/OL]. *Journal of Beijing University of Technology*: 1–11[2023–11–10]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2286.T.20231103.1409.002.html>.
- [19] FERREIRA S L C, BRUNS R E, FERREIRA H S, et al. Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2007, 597(2): 179–186.
- [20] LICHTENTHALER H K, WELLBURN A R. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents[J]. *Biochemical Society Transactions*, 1983, 11(5): 591–592.
- [21] RAO B Q, SU J G, XU S J, et al. Thermal and non-thermal mechanism of microwave irradiation on moisture content reduction of municipal sludge[J]. *Water Research*, 2022, 226: 119231.
- [22] ANTONIO F, MARCO C D, FRANCESCO C, et al. Improving organic matter and nutrients removal and minimizing sludge production in landfill leachate pre-treatment by Fenton process through a comprehensive response surface methodology approach[J]. *Journal of Environmental Management*, 2023, 340: 117950.
- [23] 张千, 吉芳英, 徐璇. 响应曲面法在反硝化生物滤池运行参数优化中的应用[J]. *环境科学研究*, 2015, 28(7): 1138–1144. ZHANG Q, JI F Y, XU X. Optimization of denitrification biofilter process using response surface methodology[J]. *Research of Environmental Sciences*, 2015, 28(7): 1138–1144.
- [24] 徐慧敏, 秦卫华, 何国富, 等. 超声联合热碱技术促进剩余污泥破解的参数优化[J]. *中国环境科学*, 2017, 37(9): 3431–3436. XU H M, QIN W H, HE G F, et al. Optimization of combined ultrasonic and thermo-chemical pretreatment of waste activated sludge for enhanced disintegration[J]. *China Environmental Science*, 2017, 37(9): 3431–3436.
- [25] 刘云颖, 马力通, 海波. 基于响应曲面法模拟优化褐煤腐植酸碱提工艺条件[J]. *煤炭转化*, 2017, 40(5): 63–68. LIU Y Y, MA L T, HAI B. Simulation-optimization of alkali extraction process of humic acids from lignite using response surface methodology[J]. *Coal Conversion*, 2017, 40(5): 63–68.
- [26] 叶沙沙. 酒厂污泥中黄腐酸的提取工艺及其在蔬菜种植的应用研究[D]. 贵阳: 贵州民族大学, 2021: 20–21. YE S S. Study on extraction of fulvic acid from distillery sludge and its application in vegetable planting[D]. Guiyang: Guizhou Minzu University, 2021: 20–21.
- [27] 刘超超, 韩芸, 卓杨, 等. 城市污水厂剩余污泥中腐殖酸化学组成与结构特征[J]. *环境化学*, 2017, 36(8): 1735–1743. LIU C C, HAN Y, ZHUO Y, et al. Chemical composition and structural characteristics of humic acid extracted from excess sludge in municipal wastewater treatment plants[J]. *Environmental Chemistry*, 2017, 36(8): 1735–1743.
- [28] 李昕飞, 李颖, 梁艳萍, 等. 污泥源腐殖酸基储能材料电化学性能的研究[J]. *现代化工*, 2021, 41(11): 91–95. LI X F, LI Y, LIANG Y P, et al. Electrochemical performance of sludge-sourced humic acid-based energy storage materials[J]. *Modern Chemical Industry*, 2021, 41(11): 91–95.
- [29] 龙良俊, 王里奥, 余纯丽, 等. 改性污泥腐殖酸的表征及其对 Cu^{2+}

- 的吸附特性[J]. 中国环境科学, 2017, 37(3): 1016–1023. LONG L J, WANG L A, YU C L, et al. Characterization of modified sludge-based humic acid and its adsorption properties for Cu^{2+} [J]. *China Environmental Science*, 2017, 37(3): 1016–1023.
- [30] 龙良俊. 污泥腐殖酸特性及其改性后对重金属的吸附研究[D]. 重庆: 重庆大学, 2019: 28–29. LONG L J. Characteristics of humic acid from sewage sludge and adsorption of heavy metals after modification[D]. Chongqing: Chongqing University, 2019: 28–29.
- [31] FAZELI S M, FORGHANI A, BOGUTA P, et al. Optimal isotherm model and explanatory characteristics associated with metal ion adsorption on humic acids isolated from forest soils[J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2022, 22(9): 2392–2405.
- [32] YANG T, HODSON E M. The impact of varying abiotic humification conditions and the resultant structural characteristics on the copper complexation ability of synthetic humic-like acids in aquatic environments[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2018, 165: 603–610.
- [33] 常远, 李若琪, 李珺, 等. 好氧堆肥腐殖酸形成机制及促腐调控技术概述[J]. 中国环境科学, 2023, 43(10): 5291–5302. CHANG Y, LI R Q, LI J, et al. Mechanism and regulation method of humic acid formation in composting: a review[J]. *China Environmental Science*, 2023, 43(10): 5291–5302.
- [34] AHMED Z, YUSOFF S M, KAMAL M H N, et al. Spectroscopic and microscopic analysis of humic acid isolated from stabilized leachate HSs fractionation[J]. *Agronomy*, 2023, 13(4): 1160.
- [35] 刘亚子, 高占启. 腐殖质提取与表征研究进展[J]. 环境科技, 2011, 24(增刊1): 76–80. LIU Y Z, GAO Z Q. Progress in research on extraction and characterization of humus[J]. *Environmental Science and Technology*, 2011, 24(Suppl1): 76–80.
- [36] KUSHWAHA A, RANI R, PATRA K J. Adsorption kinetics and molecular interactions of lead[Pb(II)] with natural clay and humic acid[J]. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 2020, 17(3): 1325–1336.
- [37] JIMÉNEZ-GONZÁLEZ A M, ÁLVAREZ M A, CARRAL P, et al. Chemometric assessment of soil organic matter storage and quality from humic acid infrared spectra[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 685: 1160–1168.
- [38] ULZHALGAS N, PERIZAT A, YERKEBULAN R. Extraction and characterization of humic acid based on coal mining waste[J]. *Chemical Engineering & Technology*, 2022, 45(6): 1133–1140.
- [39] CAVOSKI I, D'ORAZIO V, MIANO T. Interactions between rotenone and humic acids by means of FT-IR and fluorescence spectroscopies[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2009, 395(4): 1145–1158.
- [40] HIAHRI M, MCKENN A M, RYAN F, et al. Bioactivity of humic acids extracted from shale ore: molecular characterization and structure-activity relationship with tomato plant yield under nutritional stress[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 660224.
- [41] 陈丹, 程澳, 余旭芳, 等. 不同类型堆肥中腐殖酸与富里酸的光谱特性和分子量分布[J/OL]. 生态与农村环境学报: 1–15[2023–11–12]. <https://doi.org/10.19741/j.issn.1673-4831.2023.0359>. CHEN D, CHENG A, YU X F, et al. Spectral characteristics and molecular weight distribution of humic acid and fulvic acid derived from different compost[J/OL]. *Journal of Ecology and Rural Environment*: 1–15 [2023–11–12]. <https://doi.org/10.19741/j.issn.1673-4831.2023.0359>.
- [42] 郝港利, 邓文博, 刘文娟. 芦芽山阔叶林土壤中腐殖酸和富里酸的提取与表征研究[J]. 山西大学学报(自然科学版), 2023, 46(4): 961–968. HAO G L, DENG W B, LIU W J. Study on isolation and characterization of soil humic acid and fulvic acid in broadleaf forest from Luya Mountain[J]. *Journal of Shanxi University(Natural Science Edition)*, 2023, 46(4): 961–968.
- [43] 宋美芳, 唐德英, 李宜航, 等. 草果种子萌发特性研究[J]. 中国农学通报, 2019, 35(5): 70–74. SONG M F, TANG D Y, LI Y H, et al. The germination characteristics of *Amomum siao-ko* seed[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2019, 35(5): 70–74.
- [44] 马双, 许继飞, 刘宏博, 等. 菌渣中青霉素对蔬菜种子萌发的生态毒性效应[J]. 环境科学研究, 2020, 33(7): 1721–1728. MA S, XU J F, LIU H B, et al. Ecotoxicity of penicillin in mycelial residues on germination of vegetable seeds[J]. *Environmental Science Research*, 2020, 33(7): 1721–1728.
- [45] 冯天朕, 陈苏, 陈影, 等. 微塑料与Cd交互作用对小麦种子发芽的生态毒性研究[J]. 中国环境科学, 2022, 42(4): 1892–1900. FENG T Z, CHEN S, CHEN Y, et al. Study on ecological toxicity of microplastics and cadmium interaction on wheat seed germination[J]. *China Environmental Science*, 2022, 42(4): 1892–1900.
- [46] 冷茂林, 诸葛玉平, 杨全刚, 等. 不同浓度和分子量腐植酸对玉米幼苗根系和抗氧化系统的影响[J]. 山东农业科学, 2023, 55(2): 100–109. LENG M L, ZHUGE Y P, YANG Q G, et al. Effects of humic acid with different concentrations and molecular weights on maize roots and antioxidant system[J]. *Shandong Agricultural Sciences*, 2023, 55(2): 100–109.
- [47] 邓桂荣, 梅承芳, 陈燕玲, 等. 标准化测试种子发芽和根伸长毒性试验的基质应用研究[J]. 生态毒理学报, 2018, 13(4): 191–196. DENG G R, MEI C F, CHEN Y L, et al. Study of substrate application in a standardized toxicity test of seed germination and root elongation[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2018, 13(4): 191–196.
- [48] KRESLAVSKI V D, LOS D A, SCHMITT F J, et al. The impact of the phytochromes on photosynthetic processes[J]. *Biochimica et Biophysica Acta(BBA)-Bioenergetics*, 2018, 1859(5): 400–408.
- [49] 宋阿琳, 李萍, 李兆君, 等. 硅对镉胁迫下白菜光合作用及相关生理特性的影响[J]. 园艺学报, 2011, 38(9): 1675–1684. SONG A L, LI P, LI Z J, et al. Effect of silicon on photosynthesis and its related physiological parameters of *Brassica campestris* L. ssp. *Chinensis* (L.) Makino grown under Cd stress[J]. *Acta Horticultural Sinica*, 2011, 38(9): 1675–1684.
- [50] 许基磊, 汪兴中, 范吉标. 盐胁迫诱导野大豆生理和光合作用的变化[J]. 植物科学学报, 2022, 40(6): 829–838. XU J L, WANG X Z, FAN J B. Changes in physiology and photosynthesis of *Glycine soja* Sieb. et Zucc. induced by salt stress[J]. *Plant Science Journal*, 2022, 40(6): 829–838.
- [51] 刘彩娟, 吕春雨, 艾希珍, 等. 黄腐酸对干旱胁迫下黄瓜光合特性及产量和品质的影响[J]. 应用生态学报, 2022, 33(5): 1300–1310. LIU C J, LÜ C Y, AI X Z, et al. Effects of fulvic acid on photosynthetic characteristics, yield and quality of cucumber under drought stress[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2022, 33(5): 1300–1310.

(责任编辑:叶飞)