

竹炭强化*Rhodococcus biphenylivorans* XYH-1 反硝化性能研究

刘皓月*, 郑锋振#

浙江树人学院, 生物与环境工程学院, 浙江 杭州

收稿日期: 2025年4月6日; 录用日期: 2025年5月12日; 发布日期: 2025年5月20日

摘要

本研究通过实验探讨竹炭在不同环境条件下对菌株*Rhodococcus biphenylivorans* XYH-1的强化效果, 分别考察了竹炭投加量、细菌接种量、碳氮比、初始pH、温度等因素对硝酸盐降解效率的影响, 得出了以下结论: 竹炭-XYH-1复合体系降解硝酸盐的最优条件是: 竹炭投加量15 g, 细菌接种量1%, 碳氮比20:1, 初始pH=7, 温度35℃。在此最佳条件下, 竹炭-XYH-1复合体系降解硝酸盐的效率达到了80.5%。竹炭能够强化菌株XYH-1反硝化性能。将竹炭应用于硝酸盐降解体系, 结果表明, 负载竹炭的菌株XYH-1对硝酸盐的降解率达到80.5%, 而未负载竹炭的菌株XYH-1对硝酸盐的降解率仅为64.7%, 负载竹炭后菌株对硝酸盐的降解率可提高15.8%, 说明竹炭可以强化菌株XYH-1的硝酸盐降解能力。

关键词

Rhodococcus biphenylivorans XYH-1, 竹炭, 反硝化, 硝酸盐

Enhancing the Denitrification Performance of *Rhodococcus biphenylivorans* XYH-1 through Bamboo Biochar

Haoyue Liu*, Fengzhen Zheng#

College of Biology and Environmental Engineering, Zhejiang Shuren University, Hangzhou Zhejiang

Received: Apr. 6th, 2025; accepted: May 12th, 2025; published: May 20th, 2025

*第一作者。

#通讯作者。

文章引用: 刘皓月, 郑锋振. 竹炭强化 *Rhodococcus biphenylivorans* XYH-1 反硝化性能研究[J]. 自然科学, 2025, 13(3): 573-585. DOI: 10.12677/ojns.2025.133061

Abstract

This study experimentally investigated the enhancing effects of bamboo biochar on the denitrification performance of *Rhodococcus biphenylivorans* XYH-1 under varying environmental conditions. Key factors including bamboo biochar dosage, bacterial inoculation amount, C/N ratio, initial pH, and temperature were systematically evaluated for their impacts on nitrate degradation efficiency. The following conclusions were drawn: The optimal conditions for nitrate degradation in the bamboo biochar-XYH-1 composite system were determined as follows: bamboo biochar dosage of 15 g, bacterial inoculation amount of 1%, C/N ratio of 20:1, initial pH of 7, and temperature of 35°C. Under these optimized conditions, the nitrate degradation efficiency reached 80.5%. Bamboo biochar significantly enhanced the denitrification capability of strain XYH-1. Experimental results demonstrated that the nitrate degradation rate of bamboo biochar-loaded XYH-1 reached 80.5%, compared to 64.7% for the non-biochar group, indicating a 15.8% improvement. This confirms the critical role of bamboo biochar in boosting the nitrate removal capacity of strain XYH-1.

Keywords

Rhodococcus biphenylivorans XYH-1, Bamboo Biochar, Denitrification, Nitrate

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

氮元素在生产生活中有着重要的意义,在未超出环境容量的情况下,氮循环就会有条不紊地运转。但是随着全球人口剧增和工业化进程的推进,人类在生活生产过程中不断向水体排放含氮化合物,氮元素在人类的影响下逐渐超出环境容量[1]。根据中国生态环境公报显示[2],2023年我国开展营养状态监测的205个重要湖泊(水库)中,仍有27.3%的湖泊(水库)处于富营养状态。超出环境容量的含氮化合物进入水体后,会引起水体富营养化[3],导致水体中的藻类和浮游植物大量繁殖,消耗水体中的溶解氧,严重将使得水体发臭,鱼虾贝类死亡,破坏水体生态环境。水源水处于富营养化状态,将会给饮用水厂净水环节带来挑战,饮用水水质将受到影响,引发饮用水安全问题。含氮化合物包括无机氮(氨氮、硝酸盐氮、亚硝酸盐氮)和有机氮(有机碱、尿素、蛋白质)。硝酸盐氮主要来源于生活污水及工业废水的不合理排放、垃圾渗滤液渗漏、含氮农药大量使用等。硝酸盐氮不但影响水生生态环境,还会威胁人体健康[4]。硝酸盐经消化道进入人体后,在还原性环境中可被转化为亚硝酸盐,通过与血红蛋白结合形成不可逆的高铁血红蛋白,造成血液携氧功能障碍[5][6]。流行病学研究表明,长期暴露于硝酸盐污染水体,会显著提升甲状腺癌变风险及消化道恶性肿瘤发生概率,并且会干扰人体对维生素A的吸收,继而引发皮肤角质化及夜盲症等继发性病变[7]。因此,如何有效去除水体中的硝酸盐成为了水处理领域的重要研究课题。

相较于吸附、离子交换及反渗透等脱氮技术,生物反硝化因其低能耗(运行成本低和环境友好特性),已成为最具工程应用潜力的硝酸盐去除方法[8]。该过程通过反硝化菌的系列酶促反应($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$),实现氮素的气态脱除[9]。根据电子供体差异,反硝化可分为异养型(有机碳源供能)与自养型($\text{H}_2/\text{S}/\text{Fe}^{2+}$ 供能)两类代谢途径[10][11]。其中异养反硝化因菌群增殖速率快、脱氮效率高,在工程实践中占据主导地位。然而,其效能受限于水体C/N比,常需外源补充碳源以维持电子传递链功能,解

决反硝化中电子供给不足的问题[12]。

近年来,生物强化技术被广泛应用于提高反硝化效率,生物强化技术是通过投加具有特定功能的微生物、营养物或基质类似物,达到提高去除能力和去除目标污染物的目的[13][14]。其核心机制在于:筛选优势菌株,通过适应性驯化与遗传改良增强其代谢通量,进而规模化扩增制备高密度菌剂并导入处理系统,使目标污染物(如硝酸盐)作为主要电子受体参与能量代谢[15]。目前,在废水脱氮领域,该技术通过耦合功能材料(如生物炭)实现协同增效。生物炭凭借其高比表面积与表面氧化还原活性位点(如醌基、羰基),可吸附富集硝酸盐、稳定菌群微环境并介导种间电子传递,使反硝化速率提升[16][17]。而竹炭作为生物炭的一种,因其独特的多孔结构和较高的比表面积,在水处理中的应用逐渐受到关注。孙新元等[18]采用竹炭吸附水中的微污染水源水中 COD_{Mn} 、 UV_{254} 、 UV_{410} ,结果表明,粒径越小,竹炭的吸附效果越好,竹炭用量为 100 mg、吸附时间为 1 h 时,竹炭对各指标去除率最高;李松等[19]研究了竹炭对硝酸盐的吸附特性,结果表明在竹炭粒径为 0.06~0.15 mm,投加量为 0.30 g/mL,吸附温度为 30℃,pH 值为 6 时,硝酸盐的去除率可达到 59.1%。竹炭不仅能够有效吸附水体中的硝酸盐,还能为反硝化微生物提供良好的生长环境,从而提高硝酸盐的去除效率[20]。周珊等[21]利用竹炭固定假单胞菌处理苯酚,结果表明 pH = 6.6 时,浓度为 200 mg/L 的苯酚可被 200 g 改性竹炭净化,反应体系最高的降解效率可达到 82.2%。周汇等[22]利用竹炭和氨氮降解菌处理初始质量浓度为 200 mg/L 的氨氮水样,该降解体系同时发生硝化-反硝化作用,当 $p = 8.0$ 、水力停留时间为 48 h、溶解氧质量浓度为 1 mg/L 时,氨氮去除率最高可达到 70%。此外,竹炭的应用还能够减少反硝化过程中温室气体如 N_2O 的排放,进一步提升其在环境保护中的价值[23][24]。总之,竹炭强化微生物技术结合了物理吸附和生物降解的优点,特别适于水中氨氮、酚类、有机物等特定污染物的处理。

因此,本研究将针对生物脱氮技术中普遍存在的功能菌环境适应性差、脱氮效率低等瓶颈问题,创新性地构建竹炭-兼性好氧反硝化细菌复合脱氮体系,考察不同环境因素对竹炭强化兼性好氧红球菌 *Rhodococcus biphenylivorans* XYH-1 硝酸盐降解体系的影响,为废水的高效脱硝提供新思路,拓展竹炭在环境微生物工程中的应用维度,推动水处理技术向“碳减排-能效优化”方向发展。

2. 实验与方法

2.1. 药品与试剂

硝酸钠(分析纯)与盐酸(分析纯)购自海凌峰化学试剂有限公司,丁二酸钠(分析纯)与氯化钠(分析纯)购自上海麦克林生化科技股份有限公司,十二水和磷酸氢二钠(分析纯)购自湖州化学试剂有限公司,七水合硫酸镁(分析纯)、磷酸二氢钾(化学纯)、氢氧化钠(分析纯)均购自国药集团化学试剂有限公司,琼脂糖(分析纯)购自浙江卡尔生物技术有限公司,蛋白胨(分析纯)购自北京奥博星生物技术有限责任公司,酵母浸粉(分析纯)购自南京全隆生物技术有限公司。

2.2. 实验设备及仪器

紫外可见分光光度计(UV-800)购自上海元析仪器有限公司,双层空气浴摇床(TS-300DC)购自北京易得诚天地科技有限公司,立式高压蒸汽灭菌器(LDZM-60L)购自上海申安医疗器械厂,扫描电子显微镜(JSM-6510LV)购自日立科技有限公司,高速冷冻离心机(Neo15R)购自上海力申科学仪器有限公司,便携式 pH 计(SX-620)购自上海三信仪表厂,精密电子天平(AE224C)购自上海舜宇恒平科学仪器有限公司,生化培养箱(MSH-1)购自上海牧朗仪器制造有限公司。

2.3. 检测方法

硝酸盐检测方法为:水质硝酸盐氮的测定紫外分光光度法(试行)(HJ/T346-2007)。主要原理为:利用

硝酸根离子在 220 nm 波长处的吸收而定量测定硝酸盐氮。溶解的有机物在 220 nm 处也会有吸收, 而硝酸根离子在 275 nm 没有吸收。因此, 在 275 nm 处作另一次测量, 以校正硝酸盐。

2.4. 菌株接种与培养

从浙江省杭州市七格污水处理厂的废水中富集、分离筛选得到高效反硝化菌株——好氧红球菌 (*Rhodococcus biphenylivorans*) XYH-1, 保藏于中国典型培养物保藏中心, 地址: 中国, 武汉, 武汉大学, 邮政编码: 430072, 保藏编号: CCTCC M 2022458。

(1) 活化培养: 将 XYH-1 富集培养后涂布于灭菌后的固体 DM 培养基中, 于 30℃ 恒温培养箱进行培养。将固体培养基中的细菌接种到 LB 液体培养基中, 30℃, 160 r/min 条件下培养 12 小时后, 离心收获细胞, 并用无菌水洗涤, 重复 3 次。最后用无菌水稀释, 将细胞悬液的吸光度(OD_{600})调至 1.0。上述 DM 固体培养基的浓度组成为: 丁二酸钠 2.36 g/L, $NaNO_3$ 0.61 g/L, KH_2PO_4 1.5 g/L, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 7.715 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 g/L, 微量元素 2 mL/L, 琼脂 20g/L, pH = 7.0。

(2) 种子培养: 从固体 DM 培养基上挑取菌落接种至 100 mL 的 LB 液体培养基中, 30℃, 160 r/min 条件下培养 12 小时, 至对数生长期, 获得种子液。上述 LB 液体培养基的浓度组成为: NaCl 10 g/L, 蛋白胨 10 g/L, 酵母粉 5 g/L, pH = 7.0。

(3) DM 液体培养基培养: 将 XYH-1 经 LB 培养获得的含菌悬液以 1% 的比例接种至 DM 液体选择培养基中, 以 NO_3^- -N 为唯一氮源, 30℃, 160 r/min 条件下培养, 定时 5 h 取样并将样品离心, 取上清液检验 NO_3^- -N 的变化。上述 DM 液体培养基的浓度组成为: 丁二酸钠 2.36 g/L, $NaNO_3$ 0.61 g/L, KH_2PO_4 1.5 g/L, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 7.715 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 g/L, 微量元素 2 mL/L, pH = 7.0。其中, 丁二酸钠、 $NaNO_3$ 及 pH 为实验变量。

培养基中微量元素的组成为: EDTA 5 g/L, $CaCl_2$ 5.5 g/L, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.25 g/L, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 g/L, $ZnSO_4$ 0.43 g/L, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.24 g/L, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.99 g/L, H_3BO_4 0.014 g/L。

2.5. 竹炭的扫描电镜

本课题采用浙江江山绿意竹炭有限公司的竹炭进行研究, 该竹炭经土窑高温烧制而成。本研究中, 将竹炭与 XYH-1 结合进行硝酸盐降解实验。图 1 为竹炭的扫描电镜图。

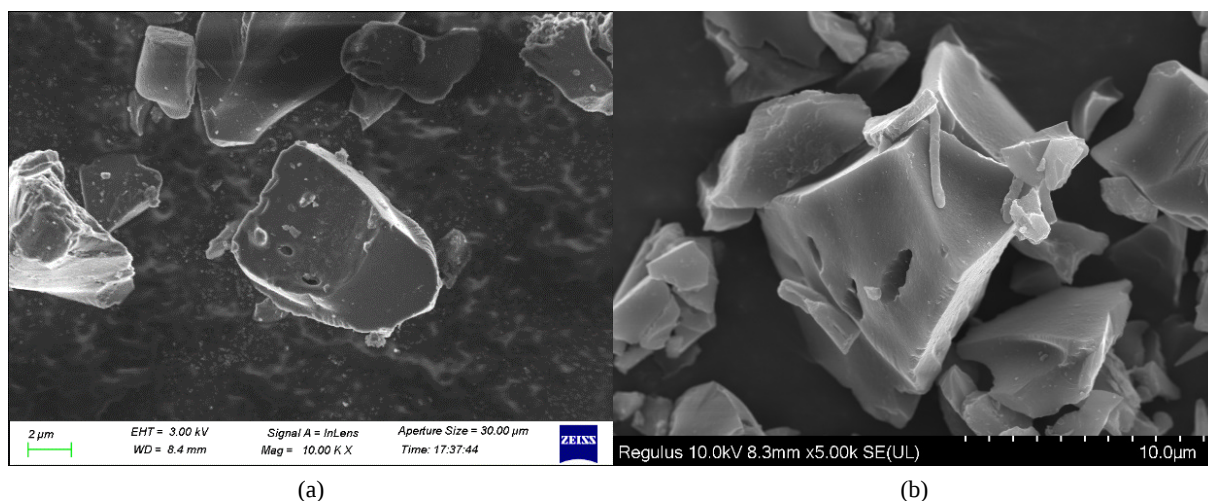


Figure 1. Electron microscope image of bamboo biochar (a) and XYH-1 combined with bamboo biochar (b)
图 1. 竹炭(a)和 XYH-1 结合竹炭(b)的电镜图

3. 结果与讨论

3.1. 不同竹炭投加量对硝酸盐降解效率的影响

采用灭菌 DM 液体培养基构建模拟硝酸盐废水体系, 初始硝酸盐浓度为 100 mg/L (以 N 计), 丁二酸钠浓度为 700 mg/L (以 C 计), 保持碳氮比为 7:1。以 1% 接种量将处于对数生长期的 XYH-1 菌液接种至新鲜的 DM 液体培养基中, 梯度投加 5、10、15、20、25 g/L 竹炭, 采用 0.1 mol/L NaOH 或 HCl 溶液将体系初始 pH 调节至 7.0, 在 30℃、160 rpm/min 条件下培养 25 h, 采用紫外双波长分光光度法(220 nm 和 275 nm)测定硝酸盐浓度, 考察竹炭投加量对菌株 XYH-1 降解硝酸盐效率的影响。反应体系的硝酸盐剩余浓度如图 2 所示。

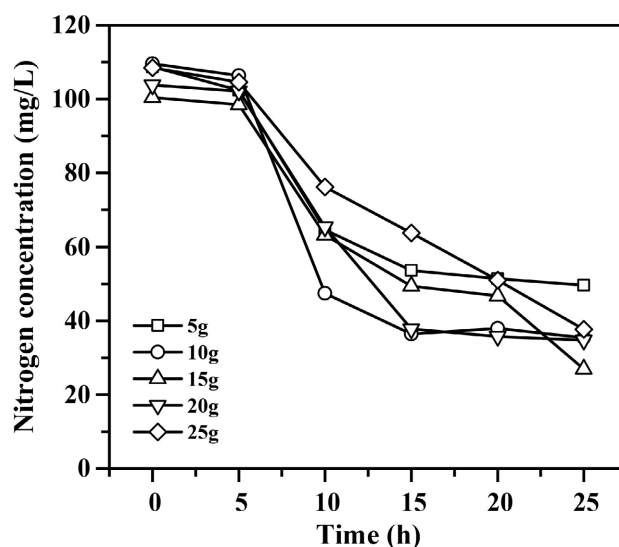


Figure 2. The effect of bamboo biochar dosage on the degradation efficiency of nitrate
图 2. 竹炭投加量对硝酸盐降解效率的影响

从图 2 可以看出, 随着反应时间的增加, 硝酸盐浓度逐渐降低, 反应进行到 15 h, 投炭量为 5、10、20 g 的反应体系硝酸盐浓度趋于平稳。反应进行到 25 h, 细菌 XYH-1 对硝酸盐的降解率分别为 54.4%、67.7%、73.2%、66.6%、65.3%, 其中竹炭投加量为 15 g 时降解效率最高, 为 73.2%。此外, 添加 10 g 改性竹炭的降解体系在 10 h 处率先达到最大降解率, 但随着反应的进行, 添加 15 g 改性竹炭的降解体系最终呈现最大降解率, 说明适量的竹炭投加能加速菌株 XYH-1 对硝酸盐的降解。如果竹炭投加量过低, 将难以起到强化细菌反硝化性能的作用, 且对硝酸盐的吸附量较小。但是如果竹炭含量过高, 则会在一定程度上抑制硝酸盐降解体系, 这一方面可能是由于过量竹炭在液相中易形成致密堆积层, 其内部微孔与介孔被邻近颗粒阻塞[25], 导致有效比表面积下降, 削弱硝酸盐吸附容量; 一方面可能是由于竹炭本身呈现碱性(pH=8.5~9.2), 在过量投加时会显著提升体系 pH (从 7.0 升至 8.3), 超出反硝化菌 XYH-1 的最适 pH 范围, 从而降低硝酸盐降解能力[26]。

3.2. 不同 XYH-1 细菌接种量对硝酸盐降解效率的影响

保持碳氮比为 7:1, 竹炭投加量为 15 g, pH = 7, 分别以 0.5%、1%、3%、5%、7% 细菌接种量将生长对数期的 XYH-1 菌液接种至新鲜 DM 液体培养基中, 在 30℃、160 rpm/min 条件下培养 25 h, 考察细菌接种量对硝酸盐降解效率的影响, 实验结果如图 3 所示。

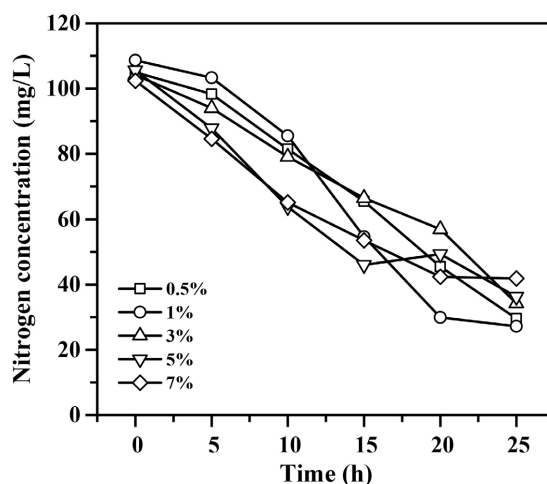


Figure 3. The effect of inoculation amount on the degradation efficiency of nitrate
图 3. 细菌接种量对硝酸盐降解效率的影响

从图 3 可以看出, 反应至 25 h 时, 不同接种量条件下硝酸盐的降解效率分别为 71.8%、75.0%、67.1%、65.7% 和 59.1%, 随着接种量的不断增加, 降解率呈现先增加后降低的趋势, 当接种量为 1% 时, 可达到最大降解效率 75.0%。当接种量超过 1% 时, 体系硝酸盐去除效率呈现显著下降趋势, 这主要归因于高密度菌剂引发的底物限制效应与代谢副产物抑制双重作用机制。过高的初始菌体浓度导致碳源(丁二酸钠)与关键微量元素(如 Fe^{2+}) 的快速耗竭, 造成菌群比生长速率下降; 接种过量菌体分泌的有机酸等代谢副产物(如乙酸、丙酸)导致体系 pH 偏移, 抑制硝酸盐还原酶活性, 硝酸盐降解效率降低[27]。综合考虑控制接种量为 1%。

3.3. 不同碳氮比对硝酸盐降解效率的影响

保持初始硝酸盐浓度为 100 mg/L, 竹炭投加量为 15 g, 接种量为 1%, pH=7, 分别 7:1、10:1、15:1、20:1、25:1 的碳氮比加入碳源, 在 30℃、160 rpm/min 条件下培养 25 h, 考察不同碳氮比对硝酸盐降解效率的影响, 实验结果如图 4 所示。

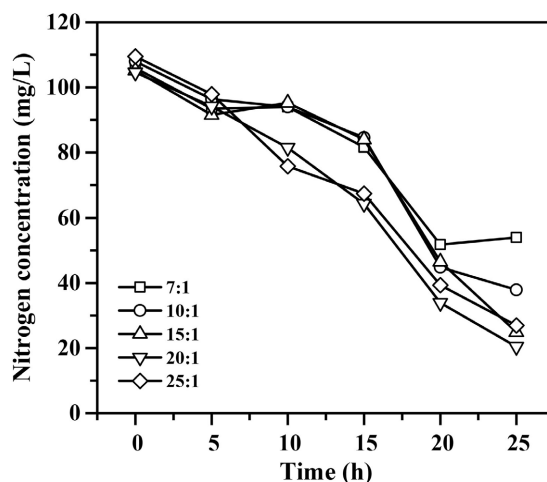


Figure 4. The effect of carbon-to-nitrogen ratio on the degradation efficiency of nitrate
图 4. 碳氮比对硝酸盐降解效率的影响

从图4可以看出,反应至25 h时,不同碳氮比条件下硝酸盐的降解效率分别为49.1%、65.0%、76.3%、80.5%和75.4%,随着碳氮比的不断增加,降解率呈现先增加后降低的趋势,当碳氮比为20:1时,可达到最大降解效率80.5%。碳氮比增加,细菌生长所需的碳源不断增加,细菌生长速度加快,硝酸盐降解速率随之加快。但是当碳氮比增加到一定程度,细菌的过量生长导致微量元素耗竭,并且其自身过多的代谢副产物也会影响细菌生长,最终导致硝酸盐降解速率下降。综合考虑控制碳氮比为20:1。

3.4. 不同初始 pH 对硝酸盐降解效率的影响

保持初始硝酸盐浓度为100 mg/L,碳氮比为20:1,竹炭投加量为15 g,接种量为1%,分别调节pH为5、6、7、8、9,在30℃、160 rpm/min条件下培养25 h,考察反应体系中不同初始pH对硝酸盐降解效率的影响,实验结果如图5所示。

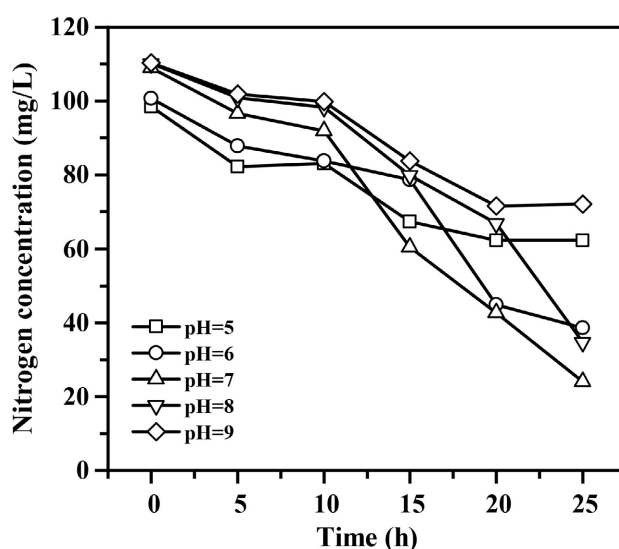


Figure 5. The effect of pH on the degradation efficiency of nitrate
图5. 初始pH对硝酸盐降解效率的影响

根据5可以看出,反应25 h时,pH在5、6、7、8、9条件下菌株XYH-1对硝酸盐的降解效率分别为36.7%、61.6%、78.0%、68.6%、34.6%。低pH会极大地抑制菌株XYH-1降解硝酸盐的性能,随着pH的增加降解率逐渐增加,在pH=7时达到最大降解率78.0%,原因是在此pH范围内,菌株XYH-1的酶活性可以达到较高的水平。之后随着pH的增加降解率逐渐降低,至pH=9时,降解效率仅有34.6%,这是由于细菌对pH十分敏感,pH值可间接影响胞外聚合物,从而影响降解效率[28]。因此,过酸或过碱的环境都会影响细菌对硝酸盐的降解性能。由此可见pH会极大地影响细菌的生长代谢能力,过高或过低都不利于菌株XYH-1降解硝酸盐,所以应将培养基的pH控制在合理的范围内。此外,值得注意的是,由于竹炭浸出液呈弱碱性,其投加可使体系pH向上偏移,因此实际上菌株XYH-1降解硝酸盐的最适pH可能略高于7。综上,尽管竹炭的pH缓冲能力可部分缓解环境波动,但体系pH需严格控制在6.8~7.5范围内以确保XYH-1菌株的最优代谢活性,以实现高效稳定的脱氮性能。

3.5. 不同反应温度对硝酸盐降解效率的影响

保持初始硝酸盐浓度为100 mg/L,碳氮比为20:1,pH=7,竹炭投加量为15 g,接种量为1%,控制温度分别为20℃、30℃、35℃、40℃、50℃,在160 rpm/min条件下培养25 h,实验结果如图6所示。

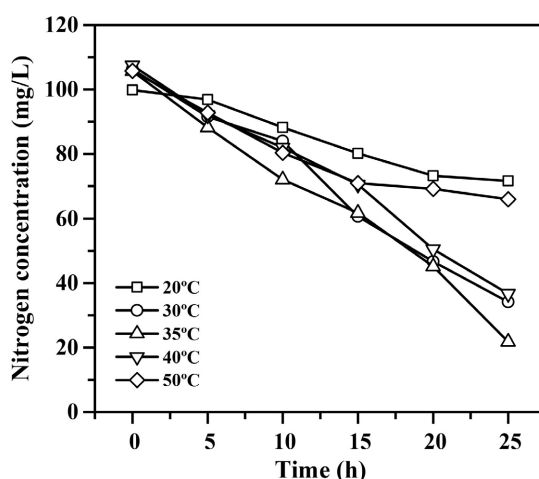


Figure 6. The effect of reaction temperature on the degradation efficiency of nitrate
图 6. 反应温度对硝酸盐降解效率的影响

根据图 6 可以看出, 25 h 时, 不同反应温度下硝酸盐的降解效率分别为 28.2%、67.9%、79.4%、65.9% 和 37.6%。其中反应温度 20°C 和 50°C 时, 硝酸盐降解效率明显较差, 反应温度为 35°C 时, 硝酸盐降解效率最佳, 达到 79.4%, 表明该温度为菌株 XYH-1 的最适反应温度。这一现象与反硝化酶的温度 - 活性响应特性密切相关: 当温度从 20°C 升至 35°C 时, 微生物体内的酶活性提高, 催化效率随之增加, 而 50°C 时酶因热变性失活, 其机制可能与高温导致的酶活性中心结构域氢键网络破坏有关[29] [30]。考虑到成本、操作难易度等多方面因素, 本研究最终确定竹炭-XYH-1 菌株复合体系在 35°C 下运行, 可以兼顾脱氮效率与工程经济性。

3.6. 单一体系与复合体系降解硝酸盐效率对比

在竹炭强化菌株 XYH-1 降解硝酸盐的实验中, 细菌降解硝酸盐的最优条件是: 竹炭投加量 15 g, pH = 7, 温度 35°C, 碳氮比 20:1, 接种量 1%。在此最佳条件下, 分别对比细菌、竹炭、竹炭 - 细菌复合体系对硝酸盐降解效率的影响, 实验结果如图 7 所示。

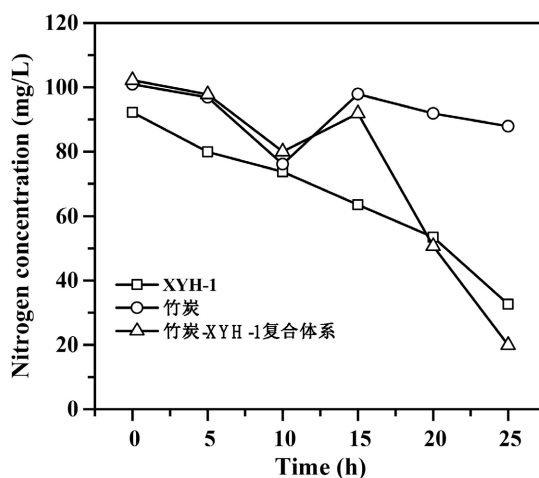


Figure 7. Comparison of nitrate degradation efficiency between a single system and a composite system
图 7. 单一体系与复合体系降解硝酸盐效率对比

从图 7 可以看出, 随着反应的进行, 仅接种菌株 XYH-1 的单一体系对硝酸盐的降解效率逐渐增加, 而仅投加竹炭的单一体系随着反应的进行硝酸盐浓度先降低后增加再降低, 硝酸盐浓度分别为: 101 mg/L、97 mg/L、76 mg/L、98 mg/L、92 mg/L、87 mg/L。这是由于竹炭吸附硝酸盐过程中存在着吸附后又解析的情况, 这一现象在竹炭-XYH-1 复合降解体系中也有所体现, 竹炭-XYH-1 复合降解体系在反应进行的 10~15 h, 硝酸盐浓度升高, 之后又逐渐降低。反应进行至 25 h, 菌株 XYH-1 单一体系硝酸盐降解率达到了 64.7%, 投加竹炭的单一体系硝酸盐降解率达到了 13.0%, 而竹炭-XYH-1 复合体系硝酸盐降解率达到了 80.5%, 负载竹炭后菌株 XYH-1 对硝酸盐的降解率可提高 15.8%, 说明竹炭可以强化菌株 XYH-1 的硝酸盐降解性能。

3.7. 响应曲面实验(BBC)优化菌株 XYH-1 的硝酸盐降解条件

为了更准确地找出显著的影响因子, 本文根据单因素实验结果, 选取三个对实验结果影响较大的因素作为优化对象进行 Box-Behnken 实验, 利用 Design expert 8.06 响应面软件对硝酸盐含量与碳氮比、pH、温度的关系进行分析。Box-Behnken 因素水平编码如表 1 所示、响应面结果如表 2 所示、回归分析如表 3 所示。得到的二次多项回归方程模型为: 硝酸盐含量 $Y = -280.0125 + 1.5865A + 73.9800B + 7.6585C + 0.0200AB - 0.0170AC + 0.3400BC - 0.0183A^2 - 6.3325B^2 - 0.1463C^2$ 。

Table 1. Coding table of factor levels

表 1. 因素水平编码表

因素	水平		
	-1	0	1
碳氮比	10:1	15:1	20:1
pH 值	6	7	8
温度/°C	30	35	40

Table 2. Response surface result table

表 2. 响应面结果表

序号	碳氮比	pH	温度	硝酸盐含量(mg/L)
1	-1	-1	0	105.4
2	1	-1	0	111.1
3	-1	1	0	100.2
4	1	1	0	106.3
5	-1	0	-1	107.8
6	1	0	-1	114.4
7	-1	0	1	103.3
8	1	0	1	108.2
9	0	-1	-1	108.6
10	0	1	-1	100.3
11	0	-1	1	101.4
12	0	1	1	99.9
13	0	0	0	112.4
14	0	0	0	112.6
15	0	0	0	112.9
16	0	0	0	111.1
17	0	0	0	113.7

Table 3. Regression analysis table
表 3. 回归分析表

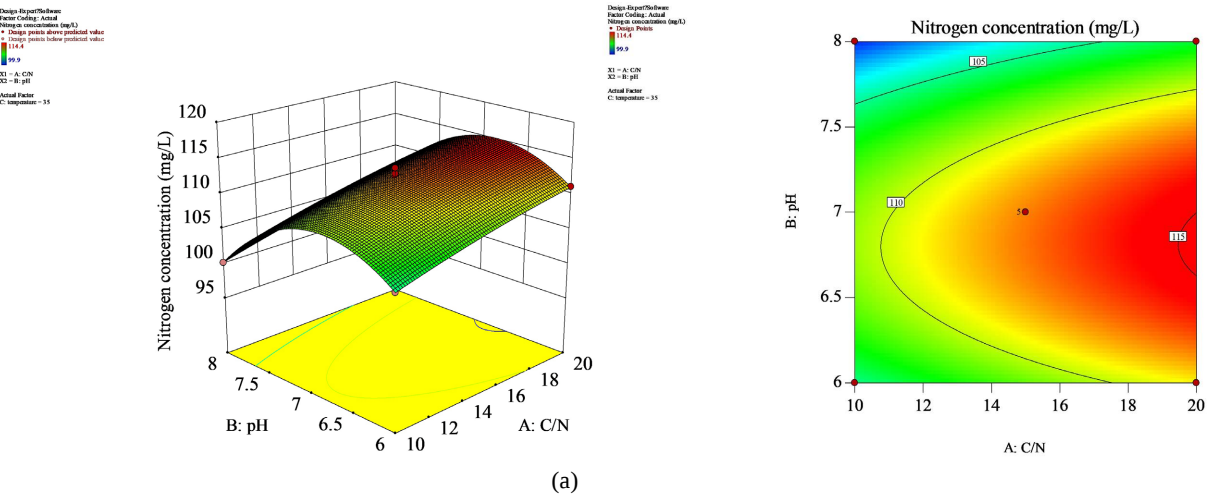
来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	411.4811	9	45.7201	66.8213	0.0000	**
A 碳氮比	67.8613	1	67.8613	99.1813	0.0000	**
B pH	49.0050	1	49.0050	71.6223	0.0001	**
C 温度	41.8613	1	41.8613	61.1815	0.0001	**
AB	0.0400	1	0.0400	0.0585	0.8159	
AC	0.7225	1	0.7225	1.0560	0.3383	
BC	11.5600	1	11.5600	16.8953	0.0045	**
A^2	0.8813	1	0.8813	1.2880	0.2938	
B^2	168.8444	1	168.8444	246.7713	0.0000	**
C^2	56.3255	1	56.3255	82.3214	0.0000	**
残差	4.7895	7	0.6842			
失拟性	1.2175	3	0.4058	0.4545	0.7285	
误差	3.5720	4	0.8930			
总和	416.2706	16				

$R^2 = 0.988$; $RA_{dj}^2 = 0.974$ 。

由表 1 回归分析的结果可知，模型 p 值 < 0.0001 ，失拟项 p 值 $= 0.7285 > 0.05$ 模型不显著，失拟项不显著，两者满足条件，说明具有统计学意义，模型能较好的解释硝酸盐含量与自变量碳氮比、pH、温度的关系。相关系数 $R^2 = 0.988$ ，表明所得模型的拟合性好；校正系数 $RA_{dj}^2 = 0.974$ ，说明硝酸盐含量的变化有 97.4% 的概率是因素碳氮比、pH、温度引起的。综上所述，可以用该模型来预测碳氮比、pH、温度对硝酸盐含量的影响。一次项 A、B、C、交互项 BC 及二次项 B²、C² 的 p 值均小于 0.001，说明它们对硝酸盐含量的影响极显著；其他项 p 值大于 0.05，说明对硝酸盐含量无显著影响。

F 值大小决定因素主次，F 值越大，其对应因素对硝酸盐含量影响越重要。从回归分析表可知，三个因素的 F 值大小为 $A > B > C$ ，即说明因素主次为碳氮比 $>$ pH $>$ 温度。

通过进一步研究确定最优环境条件，本文利用 Design expert 8.06 响应面软件对实验结果进行可视化展示，图 8 是实验结果输入软件后得到的 3D 曲面图与等高线图。



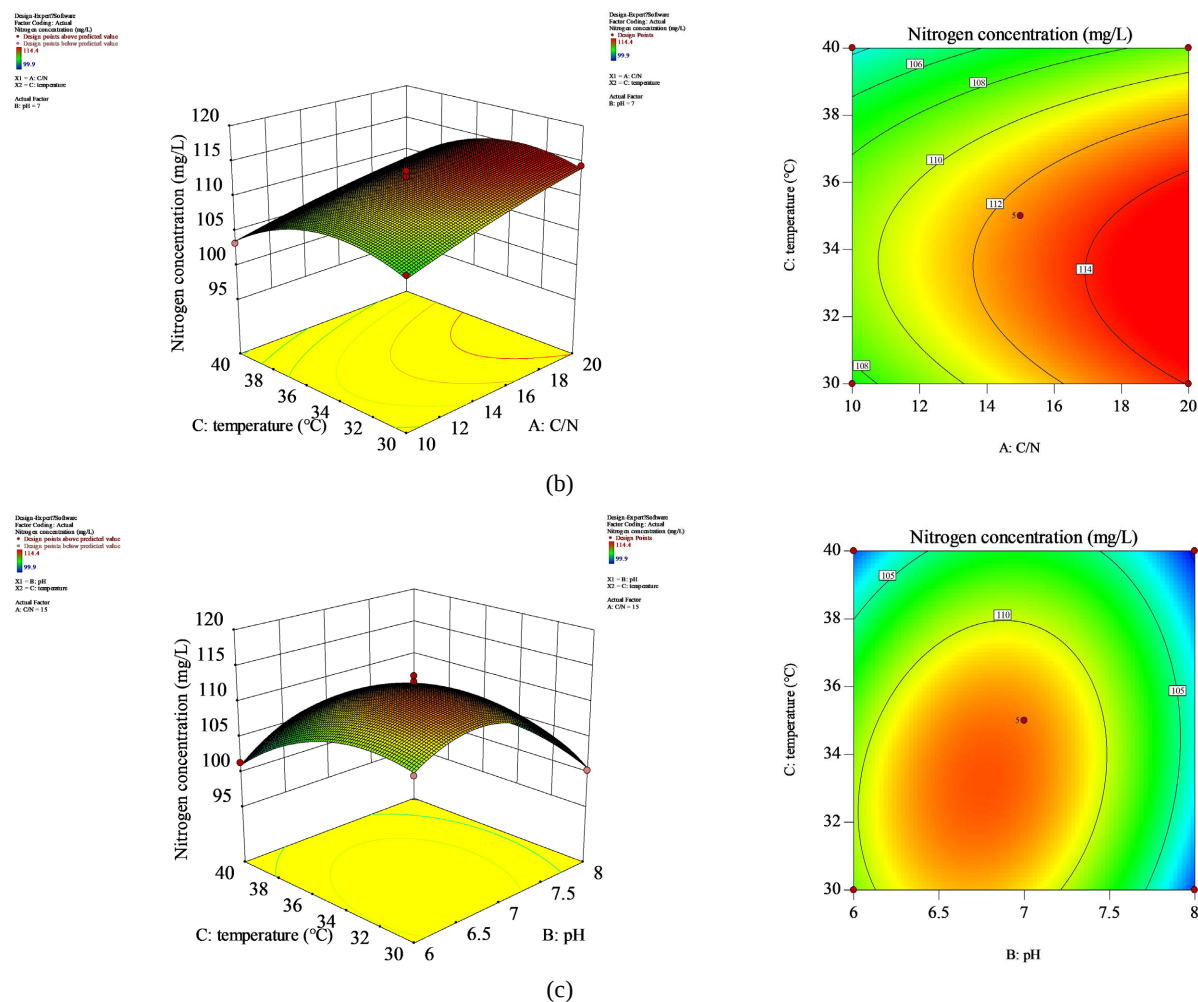


Figure 8. (a) PH and carbon nitrogen ratio; (b) Carbon nitrogen ratio and temperature; (c) Response surface 3D and contour plots of the interaction between temperature and pH on nitrate degradation efficiency

图 8. (a) pH 和碳氮比; (b) 碳氮比和温度; (c) 温度和 pH 对硝酸盐降解效率相互作用的响应曲面 3D 图及等高线图

各因素的交互 3D 响应曲面图及等高线图如上图所示, 总体上, 响应值随着碳氮比、pH、温度的增加而先呈现缓慢上升后下降的趋势, 其中 pH、温度两因素的交互作用下, 其 3D 响应曲面图的坡度最陡, 且对应的等高线图的椭圆度较大, 说明 pH、温度两因素的交互作用响应值的影响最显著, 与回归分析结果一致。

考虑到降解效率和成本问题, 通过软件分析可以得到最佳环境因素为: 温度 32.8℃、pH 6.7、碳氮比 19:1。实验结果与预测结果相近, 说明可以利用此模型预测实际的硝酸盐降解效率。

4. 结论与展望

本研究通过实验探讨竹炭在不同环境条件下对菌株 XYH-1 的强化效果, 分别考察了竹炭投加量、细菌接种量、碳氮比、初始 pH、温度等因素对硝酸盐降解效率的影响, 得出了以下结论: 在竹炭强化菌株 XYH-1 降解硝酸盐的实验中, 竹炭-XYH-1 复合体系降解硝酸盐的最优条件是: 竹炭投加量 15 g, 细菌接种量 1%, 碳氮比 20:1, 初始 pH = 7, 温度 35℃。在此最佳条件下, 竹炭-XYH-1 复合体系降解硝酸盐的效率达到了 80.5%。

竹炭能够强化菌株 XYH-1 反硝化性能。将竹炭应用于硝酸盐降解体系, 结果表明, 负载竹炭的菌株

XYH-1 对硝酸盐的降解率达到 80.5%, 而未负载竹炭的菌株 XYH-1 对硝酸盐的降解率仅为 64.7%, 负载竹炭后菌株对硝酸盐的降解率可提高 15.8%, 说明竹炭可以强化菌株 XYH-1 的硝酸盐降解性能。

通过 Box-Behnken Design (BBD) 响应曲面法优化实验, 分析温度、pH、碳氮比对硝酸盐降解效率的影响。软件分析结果表明在温度 32.8℃、pH 6.7、碳氮比 19:1 条件下, 实验结果与预测结果相近, 因此可以利用此模型预测实际降解效率。

竹炭是良好的水处理材料, 能够吸附去除多种污染物, 与生物协同作用也能够取得较好的去除污染物效果。然而本研究仅局限于现象研究, 对于竹炭强化菌株 XYH-1 去除硝酸盐的机理分析不够深入和透彻, 未来研究中应该向该方面努力。

致 谢

本项目为浙江树人学院大学生创新创业训练计划资助项目(JXJ0523105)。

参考文献

- [1] Galloway, J.N., Dentener, F.J., Capone, D.G., Boyer, E.W., Howarth, R.W., Seitzinger, S.P., *et al.* (2004) Nitrogen Cycles: Past, Present, and Future. *Biogeochemistry*, **70**, 153-226. <https://doi.org/10.1007/s10533-004-0370-0>
- [2] 2023 中国生态环境状况公报[R]. 北京: 中华人民共和国生态环境部, 2023.
- [3] Camargo, J.A. and Alonso, Á. (2006) Ecological and Toxicological Effects of Inorganic Nitrogen Pollution in Aquatic Ecosystems: A Global Assessment. *Environment International*, **32**, 831-849. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2006.05.002>
- [4] Maltais-Landry, G., Maranger, R., Brisson, J. and Chazarenc, F. (2009) Nitrogen Transformations and Retention in Planted and Artificially Aerated Constructed Wetlands. *Water Research*, **43**, 535-545. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.10.040>
- [5] Le Moal, M., Gascuel-Oudou, C., Ménesguen, A., Souchon, Y., Étrillard, C., Levain, A., *et al.* (2019) Eutrophication: A New Wine in an Old Bottle? *Science of the Total Environment*, **651**, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.139>
- [6] Wang, B., Xin, M., Wei, Q. and Xie, L. (2018) A Historical Overview of Coastal Eutrophication in the China Seas. *Marine Pollution Bulletin*, **136**, 394-400. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.09.044>
- [7] 张懿文, 罗建中, 陈宇阳. 我国水体中硝酸盐的污染现状及危害[J]. 广东化工, 2015, 42(14): 99-100.
- [8] Chen, X., Yang, L., Chen, F., Song, Q., Feng, C., Liu, X., *et al.* (2022) High Efficient Bio-Denitrification of Nitrate Contaminated Water with Low Ammonium and Sulfate Production by a Sulfur/Pyrite-Based Bioreactor. *Bioresource Technology*, **346**, Article 126669. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126669>
- [9] Graham, D.W., Trippett, C., Dodds, W.K., O'Brien, J.M., Banner, E.B.K., Head, I.M., *et al.* (2010) Correlations between in Situ Denitrification Activity and Nir-Gene Abundances in Pristine and Impacted Prairie Streams. *Environmental Pollution*, **158**, 3225-3229. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.07.010>
- [10] Li, R., Feng, C., Hu, W., Xi, B., Chen, N., Zhao, B., *et al.* (2016) Woodchip-Sulfur Based Heterotrophic and Autotrophic Denitrification (WSHAD) Process for Nitrate Contaminated Water Remediation. *Water Research*, **89**, 171-179. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.11.044>
- [11] Chen, C., Wang, Z., Zhao, M., Yuan, B., Yao, J., Chen, J., *et al.* (2021) A Fungus-Bacterium Co-Culture Synergistically Promoted Nitrogen Removal by Enhancing Enzyme Activity and Electron Transfer. *Science of the Total Environment*, **754**, Article 142109.
- [12] Liu, H., Zeng, W., Li, J., Zhan, M., Fan, Z. and Peng, Y. (2022) Effect of S₂O₃²⁻-S Addition on Anammox Coupling Sulfur Autotrophic Denitrification and Mechanism Analysis Using N and O Dual Isotope Effects. *Water Research*, **218**, Article 118404. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2022.118404>
- [13] Schauer-Gimenez, A.E., Zitomer, D.H., Maki, J.S. and Struble, C.A. (2010) Bioaugmentation for Improved Recovery of Anaerobic Digesters after Toxicant Exposure. *Water Research*, **44**, 3555-3564. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.03.037>
- [14] Ikuma, K. and Gunsch, C.K. (2013) Successful Genetic Bioaugmentation with *Pseudomonas Putida* for Toluene Degradation in Soil Columns. *Environmental Chemistry Letters*, **11**, 365-370. <https://doi.org/10.1007/s10311-013-0416-4>
- [15] Wu, M., Dick, W.A., Li, W., Wang, X., Yang, Q., Wang, T., *et al.* (2016) Bioaugmentation and Biostimulation of

- Hydrocarbon Degradation and the Microbial Community in a Petroleum-Contaminated Soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **107**, 158-164. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.11.019>
- [16] Guo, F., Luo, Y., Nie, W., Xiong, Z., Yang, X., Yan, J., *et al.* (2023) Biochar Boosts Nitrate Removal in Constructed Wetlands for Secondary Effluent Treatment: Linking Nitrate Removal to the Metabolic Pathway of Denitrification and Biochar Properties. *Bioresource Technology*, **379**, Article 129000. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.129000>
- [17] Liu, Y., Liu, S., Yang, Z. and Xiao, L. (2021) Synergetic Effects of Biochars and Denitrifier on Nitrate Removal. *Bioresource Technology*, **335**, Article 125245. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125245>
- [18] 孙新元, 吴光前, 张齐生. 竹炭对微污染水中有机污染物的吸附[J]. 环境科技, 2010, 23(1): 15-18.
- [19] 李松, 曾林慧, 陈英旭. 竹炭对饮用水中硝酸盐的吸附特性及影响因素研究[J]. 净水技术, 2007(4): 65-68.
- [20] Odedishemi Ajibade, F., Wang, H., Guadie, A., Fausat Ajibade, T., Fang, Y., Muhammad Adeel Sharif, H., *et al.* (2021) Total Nitrogen Removal in Biochar Amended Non-Aerated Vertical Flow Constructed Wetlands for Secondary Wastewater Effluent with Low C/N Ratio: Microbial Community Structure and Dissolved Organic Carbon Release Conditions. *Bioresource Technology*, **322**, Article 124430. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124430>
- [21] 周珊, 胡泽友, 喻景权. 竹炭固定化假单胞菌处理含酚废水的研究[J]. 高校化学工程学报, 2008(5): 889-894.
- [22] 周珊, 周汇, 单胜道. 竹炭固定化微生物去除水样中氨氮的研究[J]. 林业科学, 2009, 45(6): 133-138.
- [23] Nordström, A., Hellman, M., Hallin, S. and Herbert, R.B. (2021) Microbial Controls on Net Production of Nitrous Oxide in a Denitrifying Woodchip Bioreactor. *Journal of Environmental Quality*, **50**, 228-240. <https://doi.org/10.1002/jeq2.20181>
- [24] Šereš, M., Mocová, K.A., Moradi, J., Kriška, M., Kočí, V. and Hnátková, T. (2019) The Impact of Woodchip-Gravel Mixture on the Efficiency and Toxicity of Denitrification Bioreactors. *Science of the Total Environment*, **647**, 888-894. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.042>
- [25] Isa, S.S.M., Ramli, M.M., Hambali, N.A.M.A., Kasjoo, S.R., Isa, M.M., Nor, N.I.M., *et al.* (2016) Adsorption Properties and Potential Applications of Bamboo Charcoal: A Review. *MATEC Web of Conferences*, **78**, Article 01097. <https://doi.org/10.1051/mateconf/20167801097>
- [26] Hien, T.T.T., Tsubota, T., Taniguchi, T. and Shinogi, Y. (2020) Enhancing Soil Water Holding Capacity and Provision of a Potassium Source via Optimization of the Pyrolysis of Bamboo Biochar. *Biochar*, **3**, 51-61. <https://doi.org/10.1007/s42773-020-00071-1>
- [27] 任兵. 西玛津降解菌的降解特性及代谢途径研究[D]: [硕士学位论文]. 济南: 山东大学, 2013.
- [28] Cao, F., Bourven, I., Lens, P.N.L., van Hullebusch, E.D., Pechaud, Y. and Guibaud, G. (2016) Hydrophobic Features of EPS Extracted from Anaerobic Granular Sludge: An Investigation Based on DAX-8 Resin Fractionation and Size Exclusion Chromatography. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **101**, 3427-3438. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-8053-z>
- [29] 程旺开. 竹笋壳降解复合菌剂的筛选及降解特性[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(12): 271-274.
- [30] 姚健, 毕文慧, 桂伦, 等. 一个木聚糖降解菌群的分离及木聚糖酶酶学性质分析[J]. 微生物学杂志, 2019, 39(4): 23-28.