



移动扫码阅读

陈露童, 樊晨晨, 江琛, 等. 海藻酸钠/壳聚糖@生物炭微球固定 SP-1 强化苯酚生物修复 [J]. 能源环境保护, 2025, 39(5): 114-124.

CHEN Lutong, FAN Chenchen, JIANG Chen, et al. Bioremediation of Phenol by SP-1 Immobilized with Sodium Alginate/Chitosan@Biochar Microspheres[J]. Energy Environmental Protection, 2025, 39(5): 114-124.

海藻酸钠/壳聚糖@生物炭微球固定 SP-1 强化苯酚生物修复

陈露童, 樊晨晨, 江琛, 侯冬梅*, 邹建平*

(南昌航空大学江西省持久性污染物预防控制与资源再利用重点实验室, 江西南昌 330063)

摘要: 微生物固定化技术具有耐高毒性、稳定性强以及污染物去除率高等优点。针对高浓度苯酚废水抑制微生物活性的问题, 采用包埋-交联复合固定法制备海藻酸钠/壳聚糖@生物炭(SA/CS@BC)复合微球固定深海苯酚降解菌群 SP-1。通过单因素实验优化微球组分配比(SA 浓度 1.0%~5.0%、CS 浓度 0.25%~1.25%、CaCl₂ 浓度 1.0%~5.0%、BC 浓度 0.25%~1.25%), 系统对比游离菌群、SA/CS 微球及 SA/CS@BC 微球在 200~1 200 mg/L 苯酚浓度下的降解性能, 并利用扫描电镜(SEM)、傅里叶变换红外光谱(FTIR)、比表面积分析(BET)、液相色谱-质谱(LC-MS)及总有机碳(TOC)测定等手段解析降解机制。结果表明, 在最佳配比(3.0% SA、0.75% CS、4.0% CaCl₂、1.00% BC)下, SA/CS@BC 微球对 1 200 mg/L 苯酚的降解率高达 94.6%, 较游离菌群(28.7%)提升 3.3 倍; 生物炭(BC)的添加使微球比表面积从 4.936 m²/g(SA/CS)显著增至 32.829 m²/g, SEM 观察证实微生物大量定植于 BC 孔隙结构内, FTIR 分析显示微球表面含氧官能团(—OH、—COOH、C—O—C)的丰度增加且特征吸收峰发生偏移(—OH 由 3 420 cm⁻¹ 移至 3 335 cm⁻¹), 表明氢键作用增强, 进而促进污染物吸附与生物降解过程; 苯酚代谢路径经 LC-MS 验证为羟基化生成邻苯二酚, 经邻位开环裂解为黏糠酸, 再氧化为琥珀酸进入三羧酸循环, 最终矿化为 CO₂ 和 H₂O, TOC 去除率达 93.9%, 无机碳/总碳(IC/TC)比值从初始 5.8% 升至 68.5%; 微球重复使用 5 次后, 苯酚降解率仍保持 90.5%。该 SA/CS@BC 复合微球通过生物炭的快速吸附与海藻酸钠/壳聚糖凝胶的缓释功能形成协同机制, 有效缓解高浓度苯酚的瞬时毒性冲击, 为含酚废水的高效生物处理提供了稳定可靠的技术方案。

关键词: 苯酚降解; 微生物固定化; 海藻酸钠; 壳聚糖; 生物炭

中图分类号: X703

文献标识码: A

文章编号: 2097-4183(2025)05-0114-11

Bioremediation of Phenol by SP-1 Immobilized with Sodium Alginate/Chitosan@Biochar Microspheres

CHEN Lutong, FAN Chenchen, JIANG Chen, HOU Dongmei*, ZOU Jianping*

(Key Laboratory of Jiangxi Province for Persistent Pollutants Prevention Control and Resource Reuse, Nanchang Hangkong University, Nanchang 330063, China)

Abstract: Immobilized microbial technology offers advantages such as strong resistance to toxicity,

收稿日期: 2025-03-20

修回日期: 2025-05-30

接受日期: 2025-06-06

DOI: 10.20078/j.eep.20250701

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目(52200097); 国家重点研发计划资助项目(2022YFD1700802)

第一作者: 陈露童(2000—), 女, 江西樟树人, 硕士研究生, 主要研究方向为水污染处理。E-mail: lutong_chan@126.com

*通讯作者: 侯冬梅(1984—), 女, 山西太原人, 副教授, 主要研究方向为重金属及有机污染物生物处理。E-mail: hou_dong_mei@126.com

邹建平(1978—), 男, 江西新干人, 教授, 主要研究方向为水污染控制及治理技术。E-mail: zjp_112@126.com

improved stability, and superior degradation performance. This study developed an innovative embedding-crosslinking co-immobilization strategy using sodium alginate (SA), chitosan (CS), and biochar (BC) to construct SA/CS@BC composite microspheres for encapsulating the deep-sea phenol-degrading bacterial consortium SP-1. Key parameters were optimized through single-factor experiments: SA concentration (1.0%, 2.0%, 3.0%, 4.0%, 5.0%), CS concentration (0.25%, 0.5%, 0.75%, 1.0%, 1.25%), CaCl_2 crosslinker concentration (1.0%, 2.0%, 3.0%, 4.0%, 5.0%), and BC dosage (0.25%, 0.5%, 0.75%, 1.0%, 1.25%). Following degradation screening at 800 mg/L phenol, the performances of free bacteria, SA/CS microspheres, and SA/CS@BC microspheres were comparatively analyzed at phenol concentrations of 200, 400, 600, 800, 1 000, and 1 200 mg/L. The underlying mechanisms were investigated using SEM for microstructural morphology, FTIR for functional group analysis, the BET method for specific surface area measurement, LC-MS for metabolic intermediate identification, TOC analysis for mineralization quantification, and 5-cycle reuse tests for operational stability assessment. The optimized SA/CS@BC microspheres at 3.0% SA, 0.75% CS, 4.0% CaCl_2 , and 1.00% BC achieved a 94.6% degradation rate at 1 200 mg/L phenol, which was 3.3-fold higher than that of free bacteria and 76.2% higher than that of SA/CS microspheres. At 1 000 mg/L, SA/CS@BC maintained 95.2% efficiency, significantly exceeding that of SA/CS microspheres and free bacteria. BC incorporation increased the specific surface area from 4.936 m^2/g to 32.829 m^2/g ; SEM confirmed the dense colonization of SP-1 within the BC porous architecture, whereas SA/CS microspheres exhibited a compact structure with sparse microbial loading. FTIR spectra revealed intensified absorption peaks at 3 335 cm^{-1} ($-\text{OH}$), 1 590 cm^{-1} ($-\text{COOH}$), and 1 004 cm^{-1} ($\text{C}-\text{O}-\text{C}$) for SA/CS@BC, with blue shifts compared to SA/CS (3 420 cm^{-1} , 1 622 cm^{-1} , 1 024 cm^{-1}), indicating enhanced hydrogen-bonding networks. Elevated functional group abundance and strengthened hydrogen bonds jointly promoted phenol adsorption. LC-MS detected key intermediates including catechol, muconic acid, and succinic acid. Phenol was first hydroxylated to catechol, followed by ortho-cleavage of catechol to form muconic acid, which was further oxidized to succinic acid entering the tricarboxylic acid cycle, and ultimately mineralized to CO_2 and H_2O . TOC analysis demonstrated 93.9% removal after 9 days treatment at 1 200 mg/L phenol, with the IC/TC ratio increasing from 5.8% to 68.5%, verifying complete mineralization to CO_2 and H_2O . SA/CS@BC microspheres retained 90.5% degradation efficiency after 5 reuse cycles at 1 200 mg/L phenol. This work demonstrates that SA/CS@BC microspheres enhance phenol degradation: the SA/CS hydrogel shields microbes from acute phenol toxicity; BC rapidly concentrates phenol, while SA/CS gel controls the gradual release to maintain sub-inhibitory concentrations. BC's pores increase microbial loading density, and surface oxygen groups facilitate microbe-pollutant interactions. This technology provides an efficient, stable, and engineerable solution for bioaugmentation of high-concentration phenol-laden wastewater.

Keywords: Phenol degradation; Microbial immobilization; Sodium alginate; Chitosan; Biochar

0 引 言

苯酚($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$)作为典型芳香族有机物,当存在于环境中时,具有高生态毒性及生物蓄积性,因此被列为优先控制污染物^[1]。工业废水(如焦化、石化废水)中苯酚浓度通常维持在 20 ~1 200 mg/L

之间^[2-3]。传统物理化学处理法存在高能耗、二次污染风险等问题。微生物降解技术因其环境友好和经济可行性已成为环境修复领域的研究热点。近年来,科研人员从环境中成功分离鉴定了多种具有苯酚代谢功能的功能菌株,例如 *Candida tropicalis* PHB5、*Bacillus thuringiensis* 等^[4]。然而

这些苯酚降解菌种多为单一的纯菌,普遍存在环境耐受阈值低、底物利用范围狭窄及功能稳定性差等缺陷。例如, DAS 等^[5]报道苯酚降解菌 *diatom* BD11ITG 对 50 mg/L 和 250 mg/L 苯酚的降解效率仅为 39.8% 和 24.0%。相比之下,从极端生境下筛选获得的微生物菌种通常具有独特的生理生化性质,在环境治理领域具有更为广泛的应用潜力。深海微生物通常具备嗜盐、嗜压、低营养、趋化性、强有机转化能力等特性,是宝贵的耐受菌种资源。MIRAE 等^[6]从西北太平洋深海分离的 *Limnobacter* 菌株 SAORIC-580T 可降解 3.0~3.5 mol/L 的苯酚。另有研究显示^[7],由深海菌株 *Pseudomonas* 和 *Bacillus subtilis* 构建的混菌体系可耐受 1 000 mg/L 苯酚,且降解率高达 90.4%,较 CHEN 研究的单菌体系(70.1% 和 60.3%)提升约 1.5 倍^[8]。

传统生物反应器在处理高浓度含酚废水时,常常面临功能菌种流失、耐受性差以及菌种失活的问题。针对此类问题,研究人员通过固定化技术将微生物包埋于载体内,既能防止菌种流失,又可保护微生物菌体免受外界毒害,维持菌体活性^[9-11]。海藻酸钠(SA)是微生物固定化常用的载体,其独特的水凝胶三维网络结构为物质传递提供了有效通道,且表面丰富的羟基(—OH)可增强亲水性以促进微生物附着^[12]。然而 SA 存在机械强度低、热稳定性差等缺陷,需通过与其他材料复合或交联进行优化^[13]。壳聚糖(CS)因成膜性和高机械强度,可在一定程度上弥补 SA 稳定性差的缺陷^[14]。此外,生物炭(BC)独特的孔隙结构不仅可为微生物的负载提供更大的接触面积,其刚性的骨架结构也可进一步改善固定化微球的机械性能。LI 等^[15]通过添加 BC 使 SA 微球抗压强度从 0.5 N 提升至 1.2 N^[16-19]。有研究表明,BC 上还存在苯酚降解中间产物邻苯二甲酸的特征峰^[20],意味着 BC 不仅可以作为苯酚的吸附位点,也是苯酚生物降解的催化位点。

因此,本研究通过多次富集、驯化从深海底泥中筛选具有苯酚降解能力的功能菌群,然后利用 SA、CS 及 BC 负载该功能菌群,探究不同包埋体系的处理效果及最佳制备工艺。最后,基于 SEM、FTIR 等表征手段初步探明固定化微球内部形貌特征及协同降解机制。本研究将为高浓度含酚废水的生物处理提供一定的理论指导及实践意义。

1 材料与方法

1.1 微生物的富集培养

本研究使用的苯酚降解菌群 SP-1 由课题组前期从深海底泥富集培养获得。

(1)底泥预处理:采集深海沉积物样品经无菌磷酸盐缓冲溶液冲洗 3 次后,采用转速 8 000 r/min 离心 10 min 以去除杂质,获得底泥菌悬液。

(2)苯酚降解菌群富集:将 5 mL 底泥菌悬液接种至含 200 mg/L 苯酚的 2216E 液体培养基中(成分:蛋白胨 5.000 g/L、酵母粉 1.000 g/L、柠檬酸铁 0.100 g/L、NaCl 19.450 g/L、MgCl₂ 5.980 g/L、Na₂SO₄ 3.240 g/L、CaCl₂ 1.800 g/L、KCl 0.550 g/L、Na₂CO₃ 0.160 g/L、KBr 0.080 g/L、SrCl₂ 0.034 g/L、H₃BO₃ 0.022 g/L、Na₂SiO₃ 0.040 g/L、NaF 0.002 g/L、NH₄NO₃ 0.002 g/L、Na₂HPO₄ 0.008 g/L),于超净工作台中操作。初始 pH 为 7.6 ± 0.2。恒温摇床 30 °C、150 r/min 振荡培养至菌群对数生长期,筛选出苯酚降解微生物,命名为 SP-1 并保存于 -4 °C 冷藏。

1.2 菌群降解苯酚性能探究

将对数期的菌群 SP-1(OD₆₀₀ 为 1.0, OD₆₀₀ 为菌液的生长密度,反映其浓度和生长期)接种至含有不同浓度苯酚(200、400、600、800、1 000、1 200 mg/L)的 2216E 培养基内,初始 pH 为 7.6 ± 0.2。在 30 °C、150 r/min 恒温摇床中振荡培养 9 d,每 24 h 测定培养基中苯酚的残留浓度和菌种的生长量,以明确菌群对苯酚的最大耐受浓度。

1.3 固定化微球的制备

(1)生物炭制备

生物炭原材料为南昌本地青竹。将竹子洗净后自然风干,研磨至过 200 目筛,在管式炉 600 °C 氮气氛围下热解制备。所得生物炭经去离子水清洗 3 次,置于 60 °C 烘箱干燥后保存备用。

(2)微球制备

水凝胶微球的制备采用复合固定交联法制备,制备流程如图 1 所示。

① SA/CS 微球

将 2% SA 加热至 25 °C 溶解后加入 0.5% CS(溶于 1% 乙酸),超声处理至完全溶解。将 SP-1 菌液按照体积比 1 : 1 加入 SA 和 CS 的混合溶液中,搅拌至均匀分散后,使用 5 mL 注射器将该溶液逐滴滴入 5% CaCl₂ 溶液中,交联固化 20 min 并用去离子水冲洗 3 次,获得 SA/CS 微球^[21]。

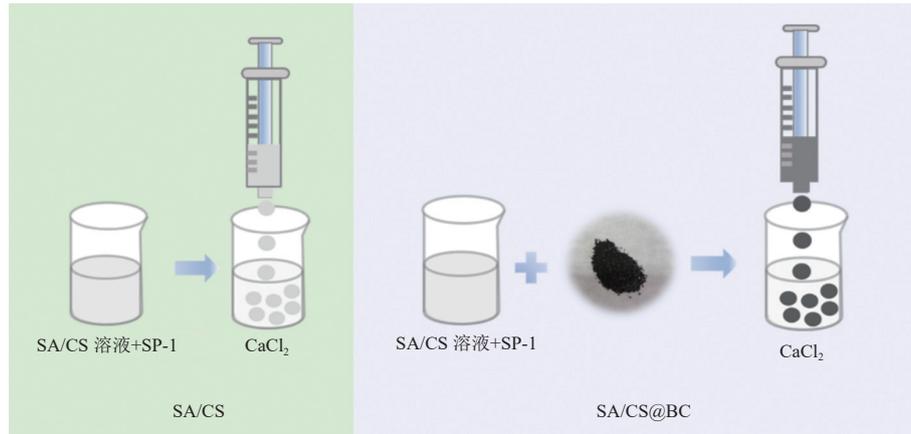


图 1 SA/CS 微球和 SA/CS@BC 微球制备示意图

Fig. 1 Preparation of SA/CS and SA/CS@BC microspheres

② SA/CS@BC 微球

在 SA/CS 混合溶液中加入 0.5% BC, 磁力搅拌至均匀分散, 后续步骤与 SA/CS 微球制备一致。

1.4 固定化微球的性能验证与优化

(1) 游离菌群与微球降解苯酚性能对比

分别将 40 颗 SA/CS 和 40 颗 SA/CS@BC 微球投入含有不同初始浓度苯酚 (200、400、600、800、1 000、1 200 mg/L) 的模拟废水中, 与游离菌群对照组同步进行降解实验, 监测苯酚浓度变化。

(2) 微球的工艺参数优化及重复性测定

采用单因素实验方法探究 SA 浓度、CS 浓度、CaCl₂ 浓度、BC 浓度对 SA/CS@BC 物理性能及降解能力的影响。其他条件不变的情况下, 依次调整 SA 浓度 (1.0%、2.0%、3.0%、4.0%、5.0%)、CS 浓度 (0.25%、0.50%、0.75%、1.00%、1.25%)、CaCl₂ 浓度 (1.0%、2.0%、3.0%、4.0%、5.0%) 以及 BC 浓度 (0.25%、0.50%、0.75%、1.00%、1.25%) 以确定微球制备的最佳工艺参数。将不同组分微球投入含 800 mg/L 苯酚的培养基中振荡培养 9 d, 通过紫外分光光度法测定降解效率。将最佳工艺参数制备的 SA/CS@BC 微球投入含 1 200 mg/L 苯酚的模拟废水中, 每周结束后取出微球, 无菌水冲洗 3 次后转移至新鲜废水中, 循环实验共进行 5 次。

1.5 分析方法

利用酶标分析仪测定菌液在 OD₆₀₀ 处的吸光度, 以评估菌液浓度。采用 4-氨基安替比林法^[22], 并使用紫外-可见分光光度计 (UV) 在 510 nm 波长处测量吸光度值测定溶液中苯酚的浓度。利用总有机碳分析仪测定总有机碳 (TOC)、再通过酸化-红外法^[23] 测定总无机碳 (IC), 最后计算总碳 (TC)

的含量。苯酚降解中间产物的测定使用液相色谱-质谱仪 (LC-MS) (岛津 30A), 每隔 24 h 取样分析。使用 SEM 观察微球的微观结构及其特征。采用 BET 氮气吸附-脱附法 (Micromeritics ASAP 2460) 测定不同微球组分的比表面积。最后, 采用 FTIR 确定微球中的化学键和官能团。

所有实验数据均通过 3 次独立重复实验获取。采用 Shapiro-Wilk 检验验证数据正态性 ($p > 0.05$), 并通过 Levene 检验确认方差齐性 ($p > 0.10$), 以满足单因素方差分析 (ANOVA) 的前提条件。

2 结果与讨论

2.1 功能菌的获得及其苯酚降解性能初探

本研究通过多次富集与连续驯化, 从某深海底泥样品中筛选出具有降解苯酚能力的功能菌群 (SP-1)。当对菌群进行驯化时, 将培养基内苯酚的浓度分别设置为 200、400、600、800、1 000、1 200 mg/L, 以探明该功能菌对苯酚的最佳耐受能力。如图 2(a) 所示, 当苯酚浓度为 600 mg/L 及以下时, 菌浓的 OD₆₀₀ 值最高可达 1.3, 且苯酚的降解率均超过 93.4%。当苯酚浓度增加到 800 mg/L 时, OD₆₀₀ 值下降至 1.1, 降解率下降至 80.5%。进一步提升苯酚浓度至 1 000 mg/L 和 1 200 mg/L 时, OD₆₀₀ 值分别降至 0.8 和 0.3, 降解率仅为 52.8% 和 28.7%。上述结果表明, SP-1 菌群对苯酚的最大耐受浓度为 800 mg/L。值得注意的是, 在高浓度苯酚条件下 (图 2(b)), 在微生物降解过程中的苯酚浓度 (C/C_0) 变化情况说明 SP-1 菌群相较于以往报道的单菌停滞期较短, 24 h 后菌群便可进入对数生长期, 在该阶段苯酚降解速率为 0.9 mg/(L·h), 较单一菌株 *Pseudomonas plecoglossicida*

(0.5 mg/(L·h))^[5] 提升了 80%, 说明深海混合菌群 SP-1 具有更强的环境适应能力及更高的苯酚降解效率。尽管如此, 当该菌群在应对更高浓度的苯酚时(1 000 mg/L), 仍存在一定的局限性。为更好

地拓宽该功能菌的适用范围, 本研究拟采用固定化技术进一步提升微生物菌群在高浓度苯酚环境下的耐受能力及苯酚降解效率。

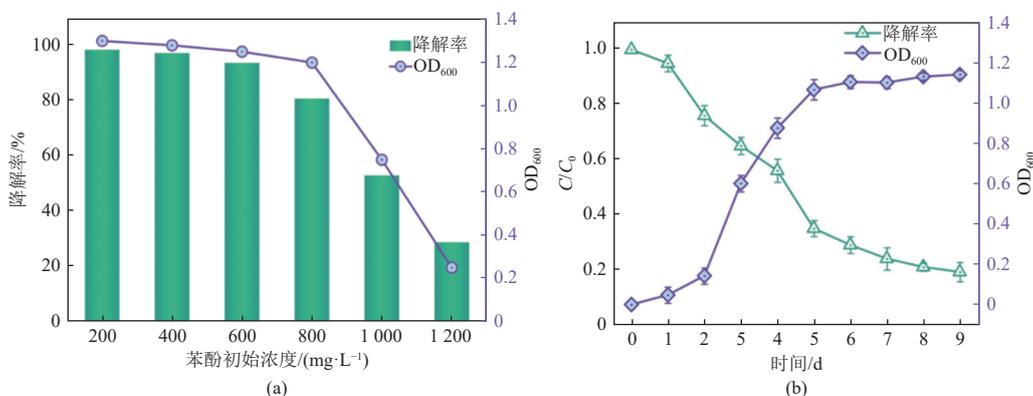


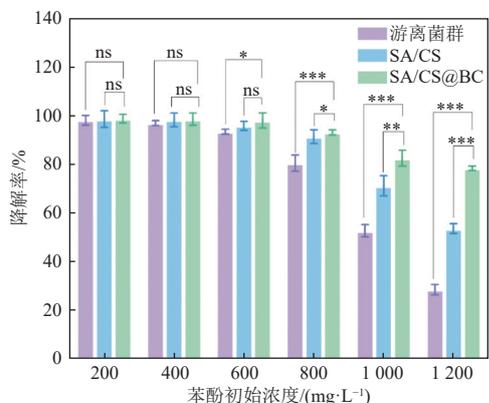
图 2 (a)不同苯酚初始浓度 SP-1 耐受性能, (b)苯酚降解过程中 SP-1 的生长和降解

Fig. 2 (a) Tolerance of SP-1 consortium under different initial phenol concentrations. (b) Growth and degradation curves of SP-1 during phenol degradation

2.2 游离菌群与固定化微球降解性能比较分析

本研究分别制备了 SA/CS 及 SA/CS@BC 2 种固定化微球。2 种微球对苯酚模拟废水的处理效果如图 3 所示。当苯酚浓度为 ≤600 mg/L 时, 游离菌群和固定化微球对苯酚的降解效率差别较小, 均在 90.0% 以上。当苯酚浓度提升至 800 mg/L 时, 固定化微球和游离菌群的差异便清晰可见, SA/CS 和 SA/CS@BC 微球降解率仍可维持在 90.0% 以上, 但游离菌群已下降至 80.5%。当苯酚浓度增至 1 000 mg/L 时, 游离菌群和 SA/CS 微球的降解率分别下降至 52.8% 和 71.2%, 但 SA/CS@BC 微球仍可维持在 82.5%。苯酚浓度为 1 200 mg/L

时, 游离菌群和 SA/CS 微球的降解率仅为 28.7% 和 53.7%, 但 SA/CS@BC 微球仍可达到 78.4% 的降解率。经对比分析可知, 微生物固定化技术可显著提升功能菌群对高浓度苯酚的降解能力, SA/CS@BC 复合微球效果更佳。如前所述, 高浓度苯酚(≥800 mg/L)会明显抑制微生物菌群的关键酶活性, 导致降解效率下降, 微球包埋可以为微生物提供庇护, 使其免受外界恶劣环境的毒害, 从而提升菌种的污染物降解能力。本研究发现仅用壳聚糖和海藻酸钠包埋的微球(SA/CS)虽然可以在一定条件下提升菌群降解效率, 但在应对高浓度苯酚时其降解效率难以维持较高水平, 这可能是由于未添加 BC 的 SA/CS 微球结构较为紧密, 限制了污染物与微生物之间的传质效率^[24]。



注: ns: $p > 0.05$, *: $0.01 < p < 0.05$, **: $0.001 < p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, 下同。

图 3 游离 SP-1 菌群与固定化微球降解苯酚的性能比较
Fig. 3 Comparison of phenol degradation performance between free SP-1 and immobilized microspheres

BC 具有独特的多孔结构, 且比表面积大、吸附位点多, 可为微生物提供均匀的负载环境, 有利于污染物向微球内部扩散传输, 从而提高传质效率。DONG 等^[25] 研究证实, 通过向微球中投加生物炭可以进一步增加微生物的附着面积, 促进微生物在微球内部的定植, 进而有效提高体系的污染物降解效率。另有研究表明, 苯酚降解过程中产生的一些酸性中间体^[26](苯酚酸、苯酚酮)会导致体系微环境酸化, 进而影响菌种的活性, 这也可能是游离菌群和 SA/CS 在高苯酚浓度下降解效率显著降低的原因。BC 表面富含碱性基团(—COO—, —O—, —OH)^[27], 这些官能团可有效中和酸性代谢产物的不良影响, 维持微球内部 pH 稳定, 保障

微生物代谢活性的稳定。此外,有研究表明^[28],BC的吸附特性与SA/CS的缓释特性形成协同效应。即在降解过程中,首先借助生物炭的吸附特性实现苯酚的快速吸附,随后SA/CS所形成的交联结构会使得苯酚在微球内部缓慢解吸,从而在微球内部为功能微生物创造一个持续缓慢释放低浓度苯酚的环境,更加有利于菌种对污染物的降解,这种“吸附-降解”循环机制不仅有效缓解了高浓度苯酚对菌种的瞬时毒性冲击,也为高浓度苯酚的生物降解提供了保障。综上,本研究后续采用SA/CS@BC微球作进一步研究。

2.3 固定化微球表征分析

如图4(a)和(b)所示,SA/CS@BC为均匀的黑色球形颗粒,直径约4.65 mm。由图4(c)可知,青竹经高温煅烧所获得的BC主要呈中空管状结构,为典型的多孔结构。这些孔隙使得BC具有较大的比表面积,为菌体负载及降解过程中污染物的吸附奠定了物理基础^[29]。图4(d)为投加生物炭后制备的SA/CS@BC微球,其局部放大图显示大量微生物菌体负载于生物炭孔隙中,表明SP-1菌群已成功负载于微球中。对不同组分进行氮气

吸附-脱附测试(图4(e)),发现SA/CS微球的比表面积仅为4.936 m²/g,表明其致密结构限制了污染物扩散,而BC的高比表面积为38.075 m²/g,与SEM图像展现的多孔特性一致。最终复合微球SA/CS@BC的比表面积为32.829 m²/g,说明BC的部分孔隙被SA/CS基质填充,但仍保留了传质通道。BC的高比表面积可快速富集污染物至微球内部。这种孔隙特性有效缓解高浓度苯酚对菌种的瞬时毒性冲击。FTIR光谱(图4(f))进一步揭示,BC、SA/CS和SA/CS@BC微球表面均含有一OH、—COOH以及C—O—C,分别对应3 420、1 622及1 024 cm⁻¹处特征吸收峰^[30]。由于BC表面富含—OH、—COOH及C—O—C,相较于SA/CS微球,复合后的SA/CS@BC微球吸收峰的强度明显增强,且特征峰的伸缩振动均向低波段偏移,分别移至3 335、1 590和1 004 cm⁻¹。吸收峰向低波段偏移主要归因于微球内部氢键作用的增强^[31-32]。HAN和ZHANG等^[33-34]的研究均表明,微球内部氢键作用的增强不仅能改善水凝胶的机械强度与拉伸性,维持微球结构完整性,还可提升污染物吸附容量并促进其降解。表征分析表明,微生物已

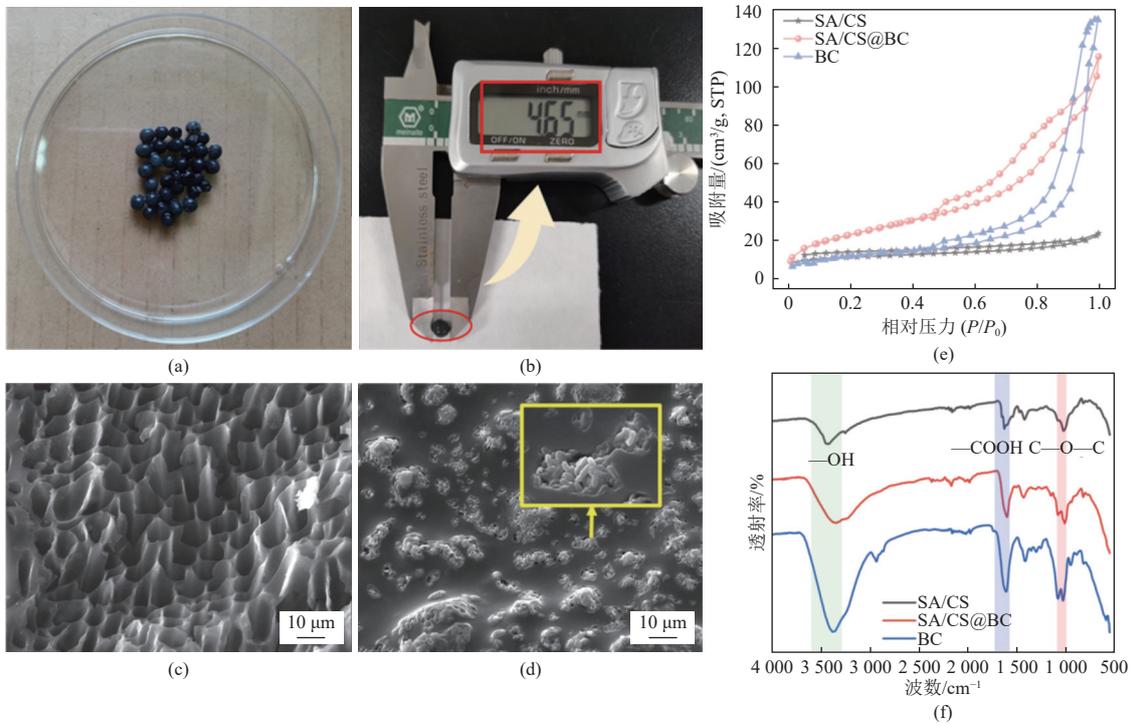


图4 (a)SA/CS@BC实物图, (b)SA/CS@BC粒径图, (c)BC表面SEM图, (d)SA/CS@BC微球SEM图, (e)不同组分氮吸附-脱附等温线, (f)不同组分FTIR光谱图

Fig. 4 (a) Macrograph of SA/CS@BC microspheres. (b) Size distribution of SA/CS@BC microspheres. (c) SEM image of BC. (d) SEM image of microbial immobilization inside SA/CS@BC microspheres. (e) N₂ adsorption-desorption isotherms of different components. (f) FTIR spectra of different components

成功负载于微球内部,且微球独特的物理特性可进一步提升体系对苯酚的降解效率。

2.4 微球制备条件优化

2.4.1 单因素实验

为提升固定化微球的处理性能,本研究通过单因素实验探究关键组分(SA、CS、CaCl₂、BC)对 SA/CS@BC 物理性能与降解能力的影响,实验结果如图 5 所示。图 5(a)表明,当 SA 的浓度由

1.0% 增至 3.0% 时,苯酚的降解率呈明显上升趋势,依次为 62.2%、72.6%、90.7%。此后即使继续增加 SA 的浓度,降解率无显著提升。SA 的含量直接影响微球的机械强度,随着 SA 浓度增加,微球外壁增厚,交联网络更加紧密,机械强度与成球效果得到显著改善。然而,SA 浓度过高会导致制备液黏度剧增,造成微球成型困难。综合考虑降解效率与可操作性,最终选定 SA 浓度为 3.0%。

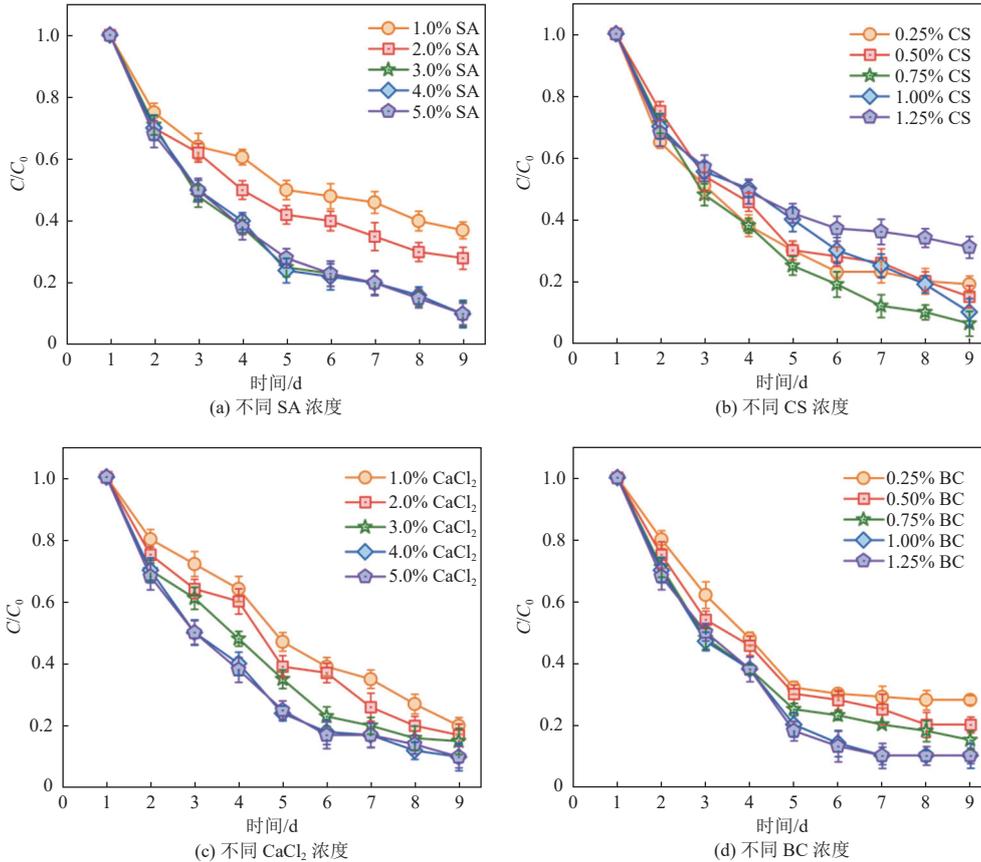


图 5 不同浓度微球组分下苯酚降解率

Fig. 5 Effects of microsphere component concentrations on phenol degradation efficiency

CS 是影响微球稳定性的另一个重要因素。如图 5(b)所示,当 CS 浓度从 0.25% 增至 0.75% 时,苯酚降解率由 83.1% 升至 91.7%,随后提升 CS 浓度(1.25%)苯酚降解率不升反降(69.4%)。CS 浓度过低时(≤0.5%),微球虽能维持基本结构,但其机械强度明显不足,易在降解过程中破裂而导致菌群流失;但 CS 浓度过高(>0.75%)会使微球内部结构过度致密,传质效率下降,从而抑制微生物的代谢活性^[35]。本研究结果与 LIU 等^[36]研究一致,CS 浓度过高时会导致底物分子无法扩散到微球内部,从而使苯酚降解效率急速下降。因此,在满足微球稳定性与传质效率平衡的前提

下,本研究选择微球制备的 CS 最佳浓度为 0.75%。

CaCl₂ 作为交联剂对凝胶结构的致密性起到关键作用。通过改变 CaCl₂ 的投加比例,本研究发现(图 5(c))苯酚降解率会随着 CaCl₂ 投加量的增加而逐渐提升,当 CaCl₂ 投加比例为 4.0% 时,苯酚降解率最高为 90.3%。因此,选取 SA/CS@BC 微球制备的 CaCl₂ 投加量为 4.0%。

BC 是 SA/CS@BC 复合微球制备过程中的重要组分,BC 含量直接影响了内部微生物的负载量及污染物的降解效率。如图 5(d)所示,增加 BC 投加比例可显著提升污染物的降解率,当 BC 投加量为 1.0% 时,苯酚降解率最高(90.1%),此后继

续提高 BC 比例, 苯酚降解率未出现明显提升。本研究结果与 WANG 等^[37] 研究一致, WANG 等研究认为 BC 添加量对固定化微球的降解性能存在明显的剂量效应, 即控制 BC 的添加量在 1.00%~1.25% 时, 微球对污染物的降解效率可达到 96.3% 以上; 但 BC 浓度超过 1.50% 后, 苯酚降解率则出现断崖式下降(11.45%)。BC 作为固定化的重要载体, 其高比表面积和丰富的孔隙结构有利于微生物的负载, 同时其表面丰富的含氧官能团可进一步提升胞外电子传递效率, 从而促进微生物的代谢活性。然而, BC 含量过高则会导致 SA/CS 凝胶孔隙的堵塞, 从而阻碍微生物与溶解氧和营养物质的接触, 导致菌群代谢活性下降, 进而直接影响污染物的降解效率^[38]。因此, 本研究中 BC 的最佳投加量为 1.0%。综上, SA/CS@BC 微球制备的最佳配比为 3.0% SA、0.75% CS、4.0% CaCl₂ 和 1.00% BC。

2.4.2 SA/CS@BC 微球性能分析

将优化参数配比后的 SA/CS@BC 微球再次投加于含有不同浓度苯酚的模拟废水中, 探究微

球对含酚废水的处理能力, 其结果如图 6(a) 所示。如前所述, 对于低浓度苯酚(≤ 600 mg/L), SA/CS@BC 微球的降解效果与游离菌群和 SA/CS 微球相比虽有些许提升, 但并无太大差异。SA/CS@BC 微球的优势主要体现在其对高浓度含酚(≥ 1000 mg/L)废水的处理能力, 对 1200 mg/L 苯酚的降解率高达 94.6%, 高出 SA/CS 微球 12.7% 以上, 是游离菌群的 3.3 倍。为了更准确地评估 SA/CS@BC 微球对苯酚的降解效果, 本研究对 1200 mg/L 苯酚模拟废水中 TOC、TC 和 IC 动态演变进行定量追踪, 其结果如图 6(b) 所示。体系中 IC 占比相对较低, 故处理过程中 IC 虽呈下降趋势, 但其变化并不明显。TOC 和 TC 的变化趋势较为一致, 从处理第 3 天开始急速下降, 第 7 天趋于平缓。值得注意的是, SA/CS@BC 微球对 TOC 的去除率达 93.9%, 且 IC/TC 比值从初始的 5.8% 提升至 68.5%, 说明 SA/CS@BC 微球可将苯酚高效转化为 CO₂ 和 H₂O, 从而实现污染物的深度矿化。

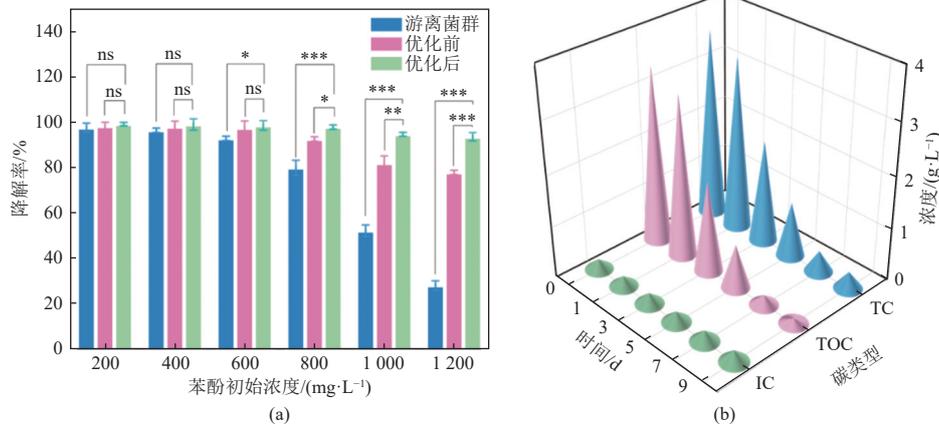


图 6 (a) SA/CS@BC 条件优化前后苯酚降解图, (b) 苯酚降解过程中碳含量的变化

Fig. 6 (a) Phenol removal efficiency of SA/CS@BC microspheres before and after optimization. (b) Dynamic changes of carbon content during phenol degradation

2.5 微球重复使用性能分析

固定化微球循环使用可降低驯化成本并减少微生物的流失, 对实际应用的经济性至关重要。为评估 SA/CS@BC 微球的循环性能, 将其投入含 1200 mg/L 苯酚的模拟废水中进行连续 5 次循环实验。实验结果如图 7 所示, 5 次循环后, SA/CS@BC 复合水凝胶微球对苯酚的降解性能并未出现明显下降, 苯酚降解率仍维持在较高水平(90.5%)。循环过程中降解效率出现略微下降的原因可能是微球多次使用过程中所造成的物理损耗。该结果再

次证明 SA/CS@BC 微球具有较高的苯酚降解性能和循环使用性能。固定化载体的制备不仅为功能微生物应对恶劣环境提供了屏障, 还增强了污染物在系统内部的传质效率, 从而提升了高浓度苯酚的生物降解率。这为工业废水处理领域中高效、稳定且可持续的污染治理技术发展提供了有力支撑, 具有重要的理论与实践价值, 在绿色化学与循环经济理念的践行进程中展现出独特的优势与广阔的应用前景。

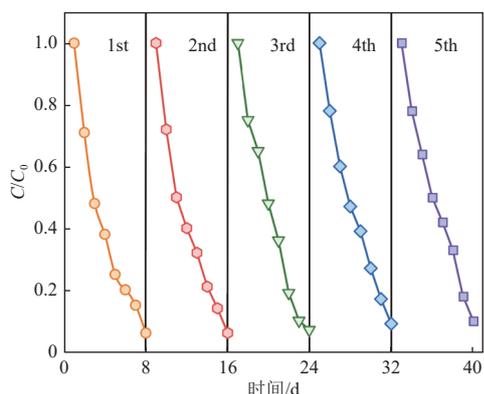


图7 微球的重复使用性能

Fig. 7 Reusability of SA/CS@BC microspheres

2.6 苯酚降解代谢产物及其降解路径分析

本研究在降解过程的不同阶段每隔1天(第1、3、5、7、9天)取样,经萃取浓缩后通过LC-MS检测中间产物,以明确该反应体系中苯酚的降解路径。整个反应过程共检测到4种关键中间产物:邻苯二酚($C_6H_6O_2$)、黏糠酸($C_6H_6O_4$)、黏糠酸内酯($C_6H_8O_4$)和琥珀酸($C_4H_6O_4$)。结合前期研究可知,SA/CS@BC主要通过邻苯二酚1,2双加氧酶途径实现苯酚的高效降解^[39],其降解路径如图8所示。苯酚首先经羟基化生成邻苯二酚,随后邻苯二酚经正交裂解途径进行环裂解,邻位开环成黏糠酸;黏糠酸被环化形成黏糠酸内酯,进一步降解形成琥珀酸;最后琥珀酸进入三羧酸循环并被彻底矿化为 CO_2 和 H_2O 。

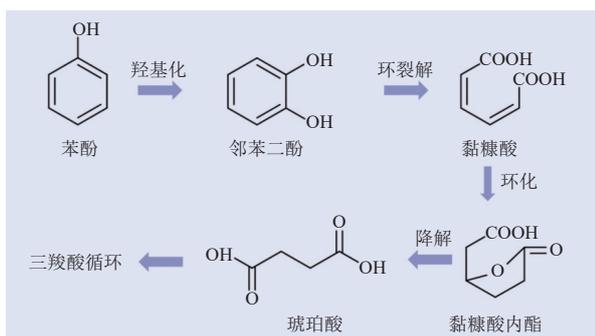


图8 苯酚降解路径

Fig. 8 Proposed pathway of phenol degradation

3 结论

本研究通过包埋-交联复合固定法制备了SA/CS和SA/CS@BC 2种水凝胶微球,用于研究固定化微生物对苯酚的降解效能差异。实验结果表明,SA/CS@BC微球的处理性能更佳,其最佳配比条件为3.0% SA、0.75% CS、4.0% $CaCl_2$ 、1.00%

BC。在该配比下制备的SA/CS@BC微球对1200 mg/L苯酚的降解率高达94.6%,是游离菌群的3.3倍。循环实验表明,SA/CS@BC在重复使用5次后仍维持90.5%的降解率,展现出优异的降解性能和循环利用性。表征分析证明BC多孔结构实现了菌群高效负载,且其表面丰富的含氧官能团($-OH$ 、 $-COOH$ 、 $C-O-C$)进一步强化了微球对苯酚的降解效果。从中间代谢产物的监测结果可知,苯酚主要经由邻苯二酚1,2双加氧酶途径降解,且TOC去除率高达93.9%,可将污染物深度矿化为 CO_2 和 H_2O 。本研究为高浓度含酚废水的治理提供了一种高效、经济且可持续的技术方案。

参考文献 (References):

- [1] VILLEGAS L G C, MASHHADI N, CHEN Miao, et al. A short review of techniques for phenol removal from wastewater[J]. *Current Pollution Reports*, 2016, 2(3): 157-167.
- [2] KURZBAUM E, RAIZNER Y, COHEN O, et al. Encapsulated *Pseudomonas putida* for phenol biodegradation: Use of a structural membrane for construction of a well-organized confined particle[J]. *Water Research*, 2017, 121: 37-45.
- [3] 母显杰, 丁舒心, 许继飞, 等. 耐盐苯酚降解菌 *Staphylococcus* sp. 的分离及降解特性[J]. *环境化学*, 2020, 39(7): 1985-1995.
MU Xianjie, DING Shuxin, XU Jifei, et al. Isolation and biodegradation characteristics of a halophilic phenol-degrading strain *Staphylococcus* sp.[J]. *Environmental Chemistry*, 2020, 39(7): 1985-1995.
- [4] 贺强礼, 关向杰, 黄水娥, 等. 典型酚类废水的微生物处理研究现状及其进展[J]. *环境工程*, 2014, 32(3): 6-9+52.
HE Qiangli, GUAN Xiangjie, HUANG Shuie, et al. Research actualities and development on microbial treatment of typical phenolic wastewater[J]. *Environmental Engineering*, 2014, 32(3): 6-9+52.
- [5] DAS B, MANDAL T K, PATRA S. Biodegradation of phenol by a novel diatom BD11ITG-kinetics and biochemical studies[J]. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 2016, 13(2): 529-542.
- [6] MIRAE K, JAEHO S, SEUNG Y S. Cultivation of deep-sea bacteria from the Northwest Pacific Ocean and characterization of *Limnobacter profundus* sp. nov., a phenol-degrading bacterium[J]. *Frontiers in Marine Science*, 2024, 11: 1449548.
- [7] KANG Dingyu, LIN Hai, LI Qiang, et al. Enhanced oil recovery in a co-culture system of *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis*[J]. *Microorganisms*, 2024, 12(11): 2343.
- [8] CHEN Jianwei, JIA Yangyang, SUN Ying, et al. Global marine microbial diversity and its potential in bioprospecting

- [J]. *Nature*, 2024, 633(8029): 371–379.
- [9] LI Lingtong, ZHANG Ming, JIANG Wenqin, et al. Study on the efficacy of sodium alginate gel particles immobilized microorganism SBBR for wastewater treatment[J]. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2022, 10(2) : 107134.
- [10] YAMASAKI H, NAGASAWA Y Y, FUKUNAGA K. Preparation of photocrosslinked spherical hydrogels bearing β -cyclodextrin and application in immobilizing microbes to decompose organic pollutants[J]. *Polymer Journal*, 2022, 54(7): 863–873.
- [11] 王娟, 施辰阳, 谢超亚, 等. 生物炭水凝胶固定微生物处理含酚废水 [J]. 浙江师范大学学报(自然科学版), 2021, 44(1): 44–50.
WANG Juan, SHI Chenyang, XIE Chaoya, et al. Study on the treatment of phenolic wastewater by carbonaceous hydrogels immobilized microorganisms[J]. *Journal of Zhejiang Normal University (Natural Sciences)*, 2021, 44(1) : 44–50.
- [12] GONZÁLEZ MORALES E, PEULA RUIZ E, NEWMAN PORTELA A M, et al. Enhancing Se(IV) bioremediation efficiency via immobilization of filamentous fungi and yeasts in eco-friendly alginate bead hydrogels[J]. *Chemosphere*, 2025, 370: 144020.
- [13] DEBNATH P, RAY S K. Synthesis of sodium alginate grafted and silver nanoparticles filled anionic copolymer polyelectrolytes for adsorption and photocatalytic degradation of a cationic dye from water[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2025, 285: 138228.
- [14] VASILIEVA S, LOBAKOVA E, GRIGORIEV T, et al. Bio-inspired materials for nutrient biocapture from wastewater: Microalgal cells immobilized on chitosan-based carriers[J]. *Journal of Water Process Engineering*, 2021, 40: 101774.
- [15] LI Jian, JIA Yinjuan, ZHONG Jiaochan, et al. Use of calcium alginate/biochar microsphere immobilized bacteria *Bacillus* sp. for removal of phenol in water[J]. *Environmental Challenges*, 2022, 9: 100599.
- [16] XIANG Xuezhu, YI Xiaohui, ZHENG Wanbing, et al. Enhanced biodegradation of thiamethoxam with a novel polyvinyl alcohol (PVA) /sodium alginate (SA) /biochar immobilized *Chryseobacterium* sp. H5[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2023, 443: 130247.
- [17] SHI Xiongying, ZHOU Gaoting, LIAO Shuijiao, et al. Immobilization of cadmium by immobilized *Alishewanella* sp. WH16-1 with alginate-lotus seed pods in pot experiments of Cd-contaminated paddy soil[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2018, 357: 431–439.
- [18] WU Ping, WANG Zeyu, BHATNAGAR A, et al. Microorganisms-carbonaceous materials immobilized complexes: Synthesis, adaptability and environmental applications[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 416: 125915.
- [19] ZHANG Peng, SUN Hongwen, REN Chao, et al. Sorption mechanisms of neonicotinoids on biochars and the impact of deashing treatments on biochar structure and neonicotinoids sorption[J]. *Environmental Pollution*, 2018, 234: 812–820.
- [20] ZHAO Ling, XIAO Donglin, LIU Yang, et al. Biochar as simultaneous shelter, adsorbent, pH buffer, and substrate of *Pseudomonas citronellolis* to promote biodegradation of high concentrations of phenol in wastewater[J]. *Water Research*, 2020, 172: 115494.
- [21] YIN Hang, XIONG Qiuqiu, ZHANG Miao, et al. Multi-principles analysis of Cu(II) adsorption in water on magnetic microspheres and modified Chitosan[J]. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2023, 11(6): 111285.
- [22] ROUSTAEI F, BAGHDADI M, MARJANI A, et al. Spectrophotometric determination of phenol impurity in phenoxyethanol and phenol index of drinking water and municipal wastewater effluent after salting-out assisted liquid phase microextraction (SA-LPME) [J]. *Heliyon*, 2024, 10(5): e27143.
- [23] 大连市环境监测中心. 水质 总有机碳的测定 燃烧氧化-非分散红外吸收法: HJ/501—2009[S]. 北京: 环境保护部科技标准司, 2009.
Dalian Environmental Monitoring Center. Water Quality—Determination of Total Organic Carbon—Nondispersive Infrared Absorption Method: HJ/T 501—2001[S]. Beijing: Ministry of Environmental Protection, 2009.
- [24] GLASSMAN P M, MYERSON J W, FERGUSON L T, et al. Targeting drug delivery in the vascular system: Focus on endothelium[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2020, 157: 96–117.
- [25] DONG Jing, XU Lingli, LIU Yuxiang, et al. Biochar enhances microbial degradation of phenol in water: Response surface optimization[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2024, 201: 109145.
- [26] HUANG Leye, JIA Fang, SONG Keji, et al. The mechanism of survival and degradation of phenol by *Acinetobacter pittii* in an extremely acidic environment[J]. *Environmental Research*, 2024, 260: 119596.
- [27] ZHU Hui, AN Qing, SYAFIKA MOHD NASIR A, et al. Emerging applications of biochar: A review on techno-environmental-economic aspects[J]. *Bioresource Technology*, 2023, 388: 129745.
- [28] ATANGANA E, AJIBOYE T O, MAFOLASIRE A A, et al. Adsorption of organic pollutants from wastewater using chitosan-based adsorbents[J]. *Polymers*, 2025, 17(4) : 502.
- [29] WAHI R. Biochar[M]. IMRAN SHAUKAT M. Singapore: Springer Nature Singapore, 2024: 19–36.
- [30] WANG Shuai, REN Zhaohui, LI Helin, et al. Preparation and sustained-release of chitosan-alginate bilayer microcap-

- sules containing aromatic compounds with different functional groups[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 271: 132663.
- [31] SINAWANG G, KOBAYASHI Y, ZHENG Yongtai, et al. Preparation of supramolecular ionic liquid gels based on host-guest interactions and their swelling and ionic conductive properties[J]. *Macromolecules*, 2019, 52(8) : 2932–2938.
- [32] WANG Yanjie, ZHANG Xinning, SONG Yihu, et al. Ultrastiff and tough supramolecular hydrogels with a dense and robust hydrogen bond network[J]. *Chemistry of Materials*, 2019, 31(4): 1430–1440.
- [33] HAN Zilong, WANG Peng, LU Yuchen, et al. A versatile hydrogel network-repairing strategy achieved by the covalent-like hydrogen bond interaction[J]. *Science Advances*, 2022, 8(8): eab15066.
- [34] ZHANG Bing, ZHANG Xu, WAN Kening, et al. Dense hydrogen-bonding network boosts ionic conductive hydrogels with extremely high toughness, rapid self-recovery, and autonomous adhesion for human-motion detection[J]. *Research*, 2021, 2021: 9761625.
- [35] PAWŁOWSKI Ł, MANIA S, BANACH KOPEĆ A, et al. The influence of chitosan's molecular weight, concentration, and dissolution method on the properties of electrophoretically deposited coatings on the Ti₁₃Nb₁₃Zr alloy surface[J]. *Materials Chemistry and Physics*, 2025, 331: 130174.
- [36] LIU Yanwei, ZHOU Ying, HUANG Guoqing, et al. Fabrication of lipase-loaded particles by coacervation with chitosan[J]. *Food Chemistry*, 2022, 385: 132689.
- [37] WANG Kangpeng, HUANG Anping, LUO Xianxin, et al. The dual role of biochar in boosting phenol biodegradation and anti-inhibition performance against hazardous substrate [J]. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2024, 12(5): 113747.
- [38] AN Xuejiao, WANG Yanlin, YU Chenglong, et al. Biochar-bacteria coupling system enhanced the bioremediation of phenol wastewater-based on life cycle assessment and environmental safety analysis[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2024, 480: 136414.
- [39] LI Hao, MENG Fanping, DUAN Weiyan, et al. Biodegradation of phenol in saline or hypersaline environments by bacteria: A review[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 184: 109658.