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% CaCl,、1.0% 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 CO,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: X52 文献标识码: A

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 has advantages such as strong toxicity resistance, higher 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%),

CaCl₂ 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 performance of free bacteria, SA/CS microspheres, and SA/CS@BC microspheres was comparatively analyzed at phenol concentrations of 200, 400, 600, 800, 1 000, and 1 200 mg/L. The mechanisms were investigated via 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% CaCl2, and 1.0% BC achieved 94.6% degradation 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 m²/g to 32.829 m²/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 (-OH), 1 590 cm⁻¹ (-COOH), and 1 004 cm⁻¹ (C-O-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 CO₂ and H₂O. 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 CO₂ and H₂O. SA/CS@BC microspheres retained 90.5% degradation efficiency after 5 reuse cycles at 1 200 mg/L phenol. This work establishes 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 highconcentration phenol-laden wastewater. This research presents an innovative immobilization technique for the biological treatment of high phenol wastewater, demonstrating high degradation efficiency and stable operational reliability.

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

0 引 言

苯酚(C₆H₅OH)作为典型芳香族有机污染物, 因其高生态毒性及生物蓄积性被列为优先控制污 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 JDB1 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 BD1IITG 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 可将苯酚的降解浓度提升 至 3.0~3.5 mol/L。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,8000 r/min,10 min 离心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。恒温播 床 30 ℃、150 r/min 振荡培养至对数期,筛选出苯 酚降解微生物,命名为 SP-1 并保存于-4 ℃ 冰箱。

1.2 菌群降解苯酚性能探究

将处于对数期的菌群 SP-1(OD₆₀₀=1.0)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。恒温摇床 30 ℃、150 r/min 振荡培养 9 d, 每 24 h 监测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)材料制备

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 ℃ 氮气氛围下热解制备。所得生物炭经过去离子水 清洗 3 次,置于 60 ℃ 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 加热溶解至温度为 25 ℃ 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 的比例加入 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]。

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。



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) 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、CG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%, 0.5%, 0.75%, 1.0%, 1.25%)、CaCl2浓度(1.0%, 2.0%, 3.0%, 4.0%, 5.0%)以及 BC浓度(0.25%, 0.5%, 0.75%, 1.0%, 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9d, 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1200 mg/L 苯酚的模拟废水中,每周期结束后取出微球,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*>0.1), 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 底泥样品中筛洗出具有降解苯酚能力的功能菌群 (SP-1)。当对菌群进行初始苯酚浓度的驯化时, 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1200 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)), SP-1 菌群相较于以往报道的单菌停滞期较短, 24h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⁻¹),较单一菌株 Pseudomonas *plecoglossicida*(0.5 mg/(L·h⁻¹))^[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 及更快的苯酚降解效率。尽管如此,当该菌群在 应对更高浓度的苯酚时(1000 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。

2.2 游离菌群与固定化微球降解性能比较分析

本研究分别制备了海藻酸钠/壳聚糖(SA/CS) 及海藻酸钠/壳聚糖/生物炭(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不大,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1000 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 微球的仍可达到 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



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

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,这种致 密结构限制了污染物与微生物之间的传质效率^[24]。

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降 解效率。另有研究表明,苯酚降解过程中产生一 些酸性中间体[26](苯酚酸、苯酚酮)会导致体系微 环境酸化,进而影响菌种的降解效率,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,随后由于 SA/CS 所形成交 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。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 38.075 3 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 的孔隙部分被 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。这种孔隙特性通过"吸附-缓释"机制使 得苯酚稳定地向微球内部扩散,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--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 波端偏移,分别移至3335、1590和1004 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。



图 4 (a)SA/CS@BC 相机图, (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

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,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%。





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 含量过低时(≤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 过高(>0.75%)则会使微球 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,从而使微球降解效率急速下降。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 最佳投加量为 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 CaCl, 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,其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投加比例,苯酚降解率表出现明显提升。本研究结果与WANG等研究一致,该研究认为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1.5%后,苯酚降解率则出现断崖式下降(11.45%)^[37]。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 的最佳添 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 1.0% 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,再次探 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于高浓度含 酚(≥1000 mg/L)废水的处理能力,其对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所占比例相对较低,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。





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 1 200 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 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 环过程中微球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保护性屏障, 还增强了污染物在系统内部的传输效率,从而提 升了高浓度苯酚的生物降解率。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。

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 2 天(第 1、3、5、7、9 天)取样,经萃取浓缩后通过液相色 谱-质谱(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(C₆H₆O₂)、黏糠酸 (C₆H₆O₄)、黏糠酸内酯(C₆H₈O₄)、琥珀酸(C₄H₆O₄)。 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 CO₂ 和 H₂O。





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% CaCl₂、1.0% BC。优化后, SA/CS@BC 微球对 1 200 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、 一COOH、C一O一C)进一步强化了微球对苯酚的 降解效果。中间代谢产物监测可知,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%, 污染物深度矿化为 CO₂和 H₂O。 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):

- 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 BD1IITG-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 profundi* sp. nov., a phenol-degrading bacterium[J]. Frontiers in Marine Science, 2024, 11: 1449548.
- 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 microcapsules 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.

10

- [33] HAN Zilong, WANG Peng, LU Yuchen, et al. A versatile hydrogel network-repairing strategy achieved by the covalentlike hydrogen bond interaction[J]. Science Advances, 2022, 8(8): eabl5066.
- [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; 2021/9761625.
- [35] PAWŁOWSKIŁ, MANIAS, BANACH KOPEĆA, 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.