

DOI: 10.11830/ISSN.1000-5013.202203052



ABTS 强化 HRP/H₂O₂ 体系 降解吲哚的效能与机制

黄亦欣, 邹景, 林金彬, 马红芳, 陈秀峰, 杨浩宇

(华侨大学 土木工程学院, 福建 厦门 361021)

摘要: 针对辣根过氧化物酶催化过氧化氢(HRP/H₂O₂)体系存在对污染物降解速度慢的问题,采用 2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸(ABTS)作为电子转移体,强化 HRP/H₂O₂ 体系降解吲哚,对不同 pH 值、ABTS 浓度和常见共存水体成分的吲哚降解效能进行研究.通过高效液相色谱-四级杆-飞行时间质谱仪及发光细菌毒性实验,考察吲哚的降解产物及毒性变化.结果表明:在 pH 值为 5.0~11.0 的范围内,ABTS 可显著强化 HRP/H₂O₂ 体系降解吲哚,且强化效能随 ABTS 浓度的增加而增加;常见共存水体成分对吲哚的降解均无显著影响;检测到 5 种吲哚降解产物,其生物毒性相较于吲哚有所下降.

关键词: 辣根过氧化物酶; ABTS; 过氧化氢; ABTS 自由基; 吲哚

中图分类号: X 703.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-5013(2022)06-0753-10

Efficiency and Mechanism of ABTS Enhanced HRP/H₂O₂ System for Indole Degradation

HUANG Yixin, ZOU Jing, LIN Jinbin,
MA Hongfang, CHEN Xiufeng, YANG Haoyu

(College of Civil Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China)

Abstract: Aiming at the problem of slow degradation rate of pollutants in horseradish peroxidase catalyzed hydrogen peroxide (HRP/H₂O₂) system, 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS) was used as electron shuttle to enhance the degradation of indole in HRP/H₂O₂ system. The degradation efficiency of indole in different pH values, ABTS concentrations and common coexisting water components were investigated. The degradation products and toxicity changes of indole were investigated by high performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight mass spectrometry and luminescent bacteria toxicity test. The results showed that ABTS could significantly enhance the degradation of indole in HRP/H₂O₂ system in the pH range of 5.0-11.0, and the enhancement efficiency increased with the increase of ABTS concentration. The common coexisting water components had no significant effect on the degradation of indole. Five indole degradation products were detected, and their biological toxicity decreased compared with indole.

Keywords: horseradish peroxidase; ABTS; hydrogen peroxide; ABTS radicals; indole

收稿日期: 2022-03-22

通信作者: 邹景(1986-),男,副教授,博士,主要从事高级氧化水处理新技术与理论的研究. E-mail: zoujing@hqu.edu.cn.

基金项目: 国家级大学生创新创业训练计划项目(202110385031);福建省厦门市青年创新基金资助项目(3502Z20206007);华侨大学中青年教师科研提升资助计划项目(ZQN-YX506)

吡啶是一种典型的氮杂环芳烃化合物,广泛地存在于焦化、印染、医药、农药等工业废水中^[1-2]. 由于吡啶具有累积性及生物毒性,废水中的吡啶一旦进入环境中,就会在生物体内积累,对生物体的细胞造成不可逆的损害,进而产生致畸、致癌和致突变等不良作用^[3-7]. 此外,由于吡啶的化学结构稳定,很难被微生物高效降解去除. 臭氧、高铁酸盐等化学氧化法和纳米材料吸附法已被运用于吡啶的去除中^[4,7-9],但存在药剂材料投入成本高、操作复杂、易产生二次污染等问题.

近年来,酶催化氧化法作为一种常见的高级氧化技术,已运用于废水中苯酚、雌激素等酚类及苯胺类有机污染物的降解,但对污染物降解的效率较低^[10-19]. 由于能够产生具有更高氧化活性的中间体来高效地降解污染物,加入有机小分子作为电子转移体的酶介导体系逐渐成为研究热点. 现有研究表明,1-羟基苯并三氮唑(HBT)、丁香醛(SA)等多种电子转移体可有效地强化漆酶/ O_2 体系降解污染物,并拓宽该体系可降解的污染物种类^[20-21]. 然而,漆酶价格昂贵,且漆酶/ O_2 体系仅在 pH 值为酸性的条件下对污染物具有良好的去除效能. 由于在 pH 值为中性的条件下对酚类及苯胺类有机污染物具有较高的降解效能,辣根过氧化物酶催化过氧化氢(HRP/ H_2O_2)体系受到了水处理研究者的广泛关注^[1,10,15,17]. 据报道,氯丙嗪和 HBT 可作为电子转移体强化 HRP/ H_2O_2 体系降解污染物,但这些加入的电子转移体会随着污染物的降解而不断分解^[22-23]. 因此,有必要探寻其他高效、稳定的电子转移体来强化 HRP/ H_2O_2 体系降解污染物.

作为一种常用的还原剂,2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸(ABTS)可通过单电子转移反应生成具有较高氧化活性的 ABTS 自由基($ABTS^{\cdot+}$). 作为电子转移体,ABTS 已运用于强化高铁酸盐^[24]、高锰酸盐^[25-26] 及漆酶/ O_2 体系^[16,27-28] 的有机污染物降解中. 同时,课题组在前期的研究中发现,HRP/ H_2O_2 体系可迅速氧化 ABTS 生成 $ABTS^{\cdot+}$ ^[29]. 因此,ABTS 作为电子转移体强化 HRP/ H_2O_2 体系降解吡啶在理论上是可行的,但目前尚未有相关报道. 基于此,本文以 ABTS 为电子转移体,强化 HRP/ H_2O_2 体系降解吡啶.

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

辣根过氧化物酶(HRP,4 166.7 nkat · mg^{-1})、2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸(ABTS,质量分数为 98%)、吡啶(AR 级)及腐殖酸(上海市上海阿拉丁试剂有限公司);过氧化氢(H_2O_2 ,质量分数为 30.0%)、磷酸氢二钠(Na_2HPO_4 ,AR 级)、磷酸二氢钠(NaH_2PO_4 ,AR 级)、硼酸钠($Na_2B_4O_7$,AR 级)、硼酸(H_3BO_3 ,AR 级)、氢氧化钠(NaOH,AR 级)、高氯酸($HClO_4$,AR 级)、碳酸氢钠($NaHCO_3$,AR 级)、氯化钠(NaCl,AR 级)、硫酸钠(Na_2SO_4 ,AR 级)、硝酸钠($NaNO_3$,AR 级)及硫代硫酸钠($Na_2S_2O_3$,AR 级)(上海市上海国药集团);色谱级乙腈和甲醇(液相色谱分析中使用,德国默克公司).

化学溶液的配制用水均为超纯水(电阻率为 $18.2\ m\Omega \cdot cm$);两种实际水体水样分别取自福建省厦门市集美区某校园湖的湖水和某市政生活污水厂的二沉池出水. 实际水体的主要水质指标,如表 1 所示. 表 1 中: $\rho(TOC)$, $\rho(Cl^-)$, $\rho(SO_4^{2-})$, $\rho(NO_3^-)$ 分别为总有机碳(TOC), Cl^- , SO_4^{2-} 和 NO_3^- 的质量浓度; Cl^- , SO_4^{2-} 和 NO_3^- 的质量浓度均由 930 Compact IC 型离子色谱仪(瑞士万通公司)检测.

1.2 实验步骤

吡啶降解实验在 $(25 \pm 2)\ ^\circ C$ 下恒温水浴,并用磁力搅拌器搅拌. 首先,将 11 mL 的超纯水、5 mL 的磷酸缓冲母液($50\ mmol \cdot L^{-1}$,pH 值分别为 5.0,7.0)或硼酸缓冲母液($50\ mmol \cdot L^{-1}$,pH 值分别为 9.0,11.0)、1.5 mL 的 ABTS 母液($0.5\ mmol \cdot L^{-1}$)、0.5 mL 的吡啶母液($0.3\ mmol \cdot L^{-1}$)及 5 mL 的 H_2O_2 母液($2.5\ mmol \cdot L^{-1}$)依次加入 25 mL 的玻璃锥形瓶中. 然后,再加入 2 mL 的 HRP 母液($1\ 667\ nkat \cdot L^{-1}$),启动反应. 模拟废水中的吡啶浓度为 $6\ \mu mol \cdot L^{-1}$. 间隔一定的时间,从锥形瓶中取出 500

表 1 实际水体的主要水质指标

Tab. 1 Major water quality parameters of actual waters					
水体	pH 值	$\rho(TOC)/$ $mg \cdot L^{-1}$	$\rho(Cl^-)/$ $mg \cdot L^{-1}$	$\rho(SO_4^{2-})/$ $mg \cdot L^{-1}$	$\rho(NO_3^-)/$ $mg \cdot L^{-1}$
湖水	7.94	4.71	95.39	49.12	7.31
二沉池出水	7.42	23.69	—	218.85	10.22

μL 反应液转移至含有过量 Na₂S₂O₃ 的液相色谱小瓶, 并通过高效液相色谱仪测定吲哚浓度。

1.3 分析方法

吲哚浓度通过 Agilent 1220 型高效液相色谱仪(HPLC, 德国 Agilent 公司)进行测定, HPLC 色谱柱型号为 Agilent TC-C18(2)(4.6 mm×150.0 mm(内径×长度), 5.0 μm(粒径)), 流动相由含体积分数为 0.1% 乙酸的水相和色谱级乙腈构成, 二者体积比为 20 : 80, 流速为 1.0 mL · min⁻¹, 测定波长为 270 nm, 进样量为 50 μL。

采用 TU-1901 型紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)分别在 340, 732 nm 处测定吸光度, 再根据朗伯-比尔定律换算为 ABTS 和 ABTS^{·+} 的浓度。

吲哚的中间降解产物通过 Agilent 1290-6545 型高效液相色谱-四级杆-飞行时间质谱仪(LC/Q-TOF/MS, 德国 Agilent 公司)负离子模式进行分析。液相色谱柱为 C18 柱(3.0 mm×50.0 mm(内径×长度), 1.8 μm(粒径)), 流动相由色谱级甲醇(A 相)和超纯水(B 相)构成, 流速为 0.2 mL · min⁻¹。采用梯度洗脱模式, A 相比率在 10 min 内从 10% 提高到 90%。吲哚降解过程中的生物毒性变化采用荧光发光菌法进行监测, 详细步骤参考文献[30]。

2 实验结果与讨论

2.1 ABTS 强化 HRP/H₂O₂ 体系降解吲哚的效能

ABTS 加入前后 HRP/H₂O₂ 体系对吲哚的降解效能, 如图 1 所示。图 1 中: HRP 的酶活力为 133.3 nkat · mL⁻¹; ABTS 浓度为 30 μmol · L⁻¹; H₂O₂ 浓度为 500 μmol · L⁻¹; 吲哚浓度为 6 μmol · L⁻¹; 反应温度为 (25 ± 2) °C; 实验至少重复两次, 点和误差棒分别表示重复实验结果的平均值和相对标准偏差; *t* 为反应时间; δ 为吲哚浓度剩余率, $\delta = c_t / c_0$, *c*₀ 为吲哚的初始浓度, *c_t* 为当前时刻的吲哚浓度。

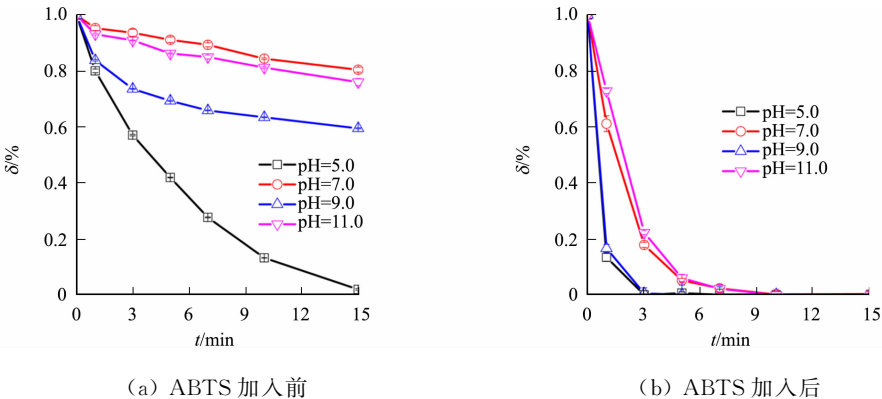


图 1 ABTS 加入前后 HRP/H₂O₂ 体系对吲哚的降解效能

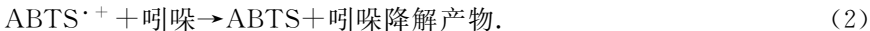
Fig. 1 Degradation efficiency of indole in HRP/H₂O₂ system before and after ABTS joining

由图 1 可知: ABTS 加入前, 在 pH 值为 5.0~11.0 的范围内, HRP/H₂O₂ 体系降解吲哚的速度缓慢; 当 pH 值为 7.0 时, HRP/H₂O₂ 体系在 15 min 内仅降解了约 20% 的吲哚; ABTS 加入后, 在 pH 值为 5.0~11.0 的范围内, 可显著提升 HRP/H₂O₂ 体系中吲哚的降解效能。

课题组之前的研究^[29]表明, HRP 可快速地催化 H₂O₂ 氧化 ABTS, 生成 ABTS^{·+}。同时, 文献[16]的研究表明, ABTS^{·+} 具有较强的氧化活性, 可快速地氧化降解吲哚。因此, 可推测 HRP/H₂O₂ 体系中加入的 ABTS 被氧化生成 ABTS^{·+}, 反应式为



进而促进吲哚的降解, 反应式为



前期报道发现, ABTS^{·+} 的氧化活性随着反应溶液 pH 值的升高而提高^[31], 这与 HRP/H₂O₂/ABTS 体系在 pH 值为 9.0 时对吲哚的降解效能远高于 pH 值为 7.0 时的实验结果吻合(图 1(b))。然而, 该体系在 pH 值为 11.0 时对吲哚的降解效能远远低于 pH 值为 9.0 时, 这可能是因为 pH 值为 11.0 时, 有相当比例的 H₂O₂ 电离为具有较强还原能力的 HO₂⁻ (H₂O₂ 的解离系数为 11.62^[32-33]), 进

而与吡啶竞争消耗大量 $\text{ABTS}^{\cdot+}$, 导致 $\text{HRP}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{ABTS}$ 体系对吡啶的降解效能降低. 此外, 文献 [34] 的研究表明, 离子形态的吡啶比分子形态的吡啶更易被氧化降解, 故 $\text{HRP}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{ABTS}$ 体系在 pH 值为 5.0 时对吡啶的降解效能反而高于 pH 值为 7.0 时, 这主要归因于离子形态的吡啶在 pH 值为 5.0 时的比例更高, 以及 $\text{HRP}/\text{H}_2\text{O}_2$ 体系在 pH 值为 5.0 时对吡啶的降解具有更好的协同作用.

2.2 ABTS 的强化作用机制

2.2.1 $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 的生成及其对吡啶降解的作用 节 2.1 的分析认为, 加入 ABTS 后, $\text{HRP}/\text{H}_2\text{O}_2$ 体系吡啶降解效能的显著提高归因于体系中 $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 的生成. 文献 [29, 35-36] 的研究表明, ABTS 被氧化后生成的 $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 在可见光谱区有显著吸收, 且在 415, 650, 732, 820 nm 等 4 个波长处有特征吸收峰. 因此, 为了验证 $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 的生成, 对 $\text{HRP}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{ABTS}$ 体系反应溶液进行可见光谱扫描.

各体系的可见光谱图, 如图 2 所示. 图 2 中: HRP 的酶活力为 $133.3 \text{ nkat} \cdot \text{mL}^{-1}$; ABTS 浓度为 $0 \sim 30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (分别取 0, 5, 10, 20, $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 下同); H_2O_2 浓度为 $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 吡啶浓度为 $6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 初始 pH 值为 7.0 ± 0.1 , 反应温度为 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$; D 为吸光度; λ 为波长. 由图 2 可知: $\text{HRP}/\text{H}_2\text{O}_2$ 体系反应溶液在可见光谱区没有明显的吸收; ABTS 的可见光谱也仅在 340 nm 波长处有特征吸收峰, 在 $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 的 4 个特征波长均没有明显的吸收 (与文献 [37] 的研究结果一致); 加入 ABTS 后, 出现了 $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 的 4 个特征吸收峰, 表明确实有 $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 生成; 随 ABTS 浓度的提高, 检测到的 4 个 $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 特征吸收峰峰高也成比例提高, 进一步证实了体系中 $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 的存在.

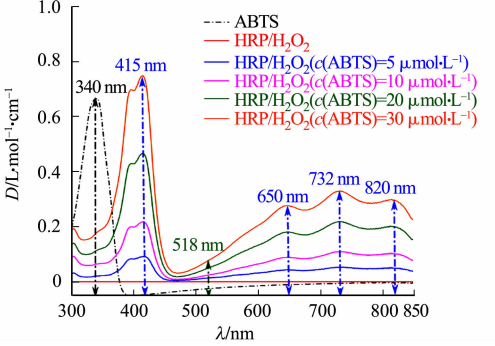


图 2 各体系的可见光光谱图
Fig. 2 Visible light spectrum of each system

需要注意的是, 当存在过量 H_2O_2 时, $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 可能会被进一步氧化生成在 518 nm 处有特征吸收峰的 ABTS^{2+} [38], 但可见光光谱图在 518 nm 处没有特征吸收峰, 进而排除 $\text{HRP}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{ABTS}$ 体系中 ABTS^{2+} 的生成.

$\text{ABTS}^{\cdot+}$ 是由 HRP 催化 H_2O_2 氧化 ABTS 产生的, 其生成量受 ABTS 浓度影响较为显著. 为了探究 $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 在 $\text{HRP}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{ABTS}$ 体系中对吡啶降解的作用, 进一步考察不同 ABTS 浓度下吡啶的降解效能及其与 $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 生成量之间的关系. ABTS 浓度对 $\text{HRP}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{ABTS}$ 体系的影响, 如图 3 所示. 图 3 中: HRP 的酶活力为 $133.3 \text{ nkat} \cdot \text{mL}^{-1}$; ABTS 浓度为 $0 \sim 30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; H_2O_2 浓度为 $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 吡啶浓度为 $6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 初始 pH 值为 7.0 ± 0.1 ; 反应温度为 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$; k_{obs} 为表观速率常数; $c(\text{ABTS})$, $c(\text{ABTS}^{\cdot+})$ 分别为 ABTS, $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 的浓度.

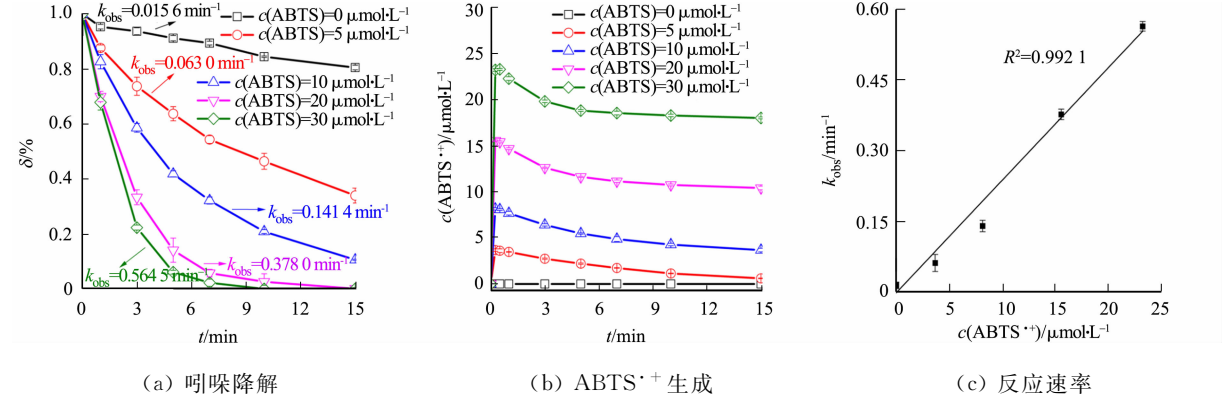


图 3 ABTS 浓度对 $\text{HRP}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{ABTS}$ 体系的影响
Fig. 3 Effects of ABTS concentration in $\text{HRP}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{ABTS}$ system

由图 3(a), (b) 可知: 吡啶的降解效能随着 ABTS 浓度的增加而不断提高; 加入 $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 ABTS 后, $\text{HRP}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{ABTS}$ 体系对吡啶降解的表观速率常数高达 0.5645 min^{-1} , 相比 $\text{HRP}/\text{H}_2\text{O}_2$ 体系 (0.0156 min^{-1}) 提高了 36.2 倍; 随着 ABTS 浓度的增加, $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 的生成浓度也成比例提高. 在

不同 ABTS 浓度下,对 HRP/H₂O₂/ABTS 体系中吲哚降解的表现速率常数与 ABTS^{•+} 生成浓度($t=15\text{ s}$ 时)进行线性拟合,发现两者之间具有良好的线性相关性($R^2>0.99$).由此可知,HRP/H₂O₂/ABTS 体系中生成的 ABTS^{•+} 对吲哚降解起主要作用.

2.2.2 ABTS 的电子转移体作用 据报道,氯丙嗪和 HBT 等有机小分子可作为电子转移体强化水中有机污染物的降解.然而,氯丙嗪和 HBT 在强化有机污染物降解的过程中,其本身也会随污染物的降解而不断消耗,并不是完美的电子转移体^[22-23].同时,ABTS 作为电子转移体在强化高铁酸盐、高锰酸盐降解污染物的过程中也存在分解^[24,26].因此,进一步对 HRP/H₂O₂/ABTS 体系降解吲哚过程中成分的浓度变化进行监测,结果如图 4 所示.图 4 中:HRP 酶活力为 $133.3\text{ nkat}\cdot\text{mL}^{-1}$;ABTS 浓度为 $30\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$;H₂O₂ 浓度为 $500\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$;吲哚浓度为 $6\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$;初始 pH 值为 7.0 ± 0.1 ;反应温度为 $(25\pm2)\text{ }^\circ\text{C}$;c 为浓度.由图 4 及相关分析可知:大部分 ABTS 先迅速通过单电子转移反应转变为 ABTS^{•+};然后,随着反应的进行,生成的 ABTS^{•+} 被吲哚及吲哚降解中间产物还原回 ABTS,导致 ABTS 稳态浓度缓慢上升,而 ABTS^{•+} 稳态浓度及两者的叠加浓度均缓慢下降;随着吲哚的降解,ABTS 和 ABTS^{•+} 的叠加浓度在 15 min 内由 $30\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 下降至 $25\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 左右,即 ABTS 的消耗比例约为 17%;ABTS 的少量消耗可能是由于生成的 ABTS^{•+} 被氧化剂进一步氧化破坏所致^[24,26].因此,在 HRP/H₂O₂/ABTS 体系降解吲哚的过程中,尽管 ABTS 起到了电子转移体的作用,但依然称不上“完美”的电子转移体.

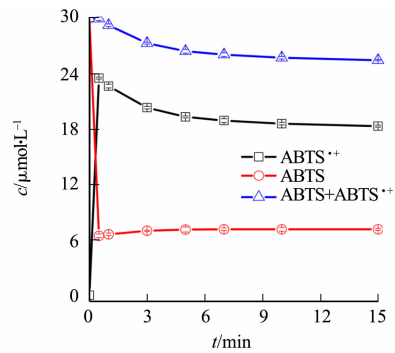


图 4 HRP/H₂O₂/ABTS 体系降解吲哚过程中成分的浓度变化

Fig. 4 Concentration changes of components during degradation of indole in HRP/H₂O₂/ABTS system

2.2.3 ABTS 强化吲哚降解的作用机制 由上述分析可知,ABTS^{•+} 是 HRP/H₂O₂/ABTS 体系降解吲哚的主要活性物质,并且强化剂 ABTS 在体系中可作为电子转移体循环作用于吲哚的降解.文献[10,39]的研究表明,HRP 催化 H₂O₂ 可生成具有氧化性的中间体化合物.因此,推测 ABTS 强化 HRP/H₂O₂ 体系降解吲哚的反应机制为:首先,HRP 被 H₂O₂ 氧化,生成氧化性中间体;然后,氧化性中间体通过单电子转移的方式氧化 ABTS,生成具有较强氧化活性的 ABTS^{•+} (式(1));随后,生成的 ABTS^{•+} 快速氧化降解吲哚,且其自身被还原回 ABTS (式(2)),即 ABTS 在 HRP/H₂O₂/ABTS 体系降解吲哚过程中主要起电子转移体的作用.

HRP/H₂O₂/ABTS 体系降解吲哚的反应机制图,如图 5 所示.

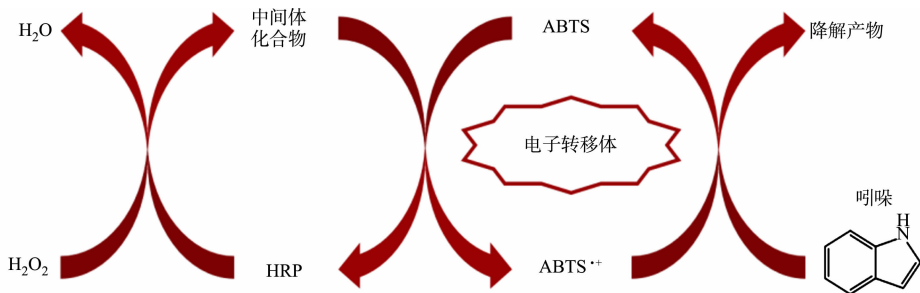


图 5 HRP/H₂O₂/ABTS 体系降解吲哚的反应机制图

Fig. 5 Reaction mechanism diagram of degradation of indole in HRP/H₂O₂/ABTS system

2.3 水质背景的影响

实际水体中存在的无机阴离子及天然有机物质往往对有机污染物的氧化降解效能具有显著影响^[14,40,41].考察 SO_4^{2-} , Cl^- , NO_3^- , HCO_3^- 等常见无机阴离子,以及腐殖酸对 HRP/H₂O₂/ABTS 体系中吲哚降解效能的影响,如图 6 所示.图 6 中:HRP 的酶活力为 $133.3\text{ nkat}\cdot\text{mL}^{-1}$;ABTS 浓度为 $30\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$;H₂O₂ 浓度为 $500\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$;吲哚初始浓度为 $6\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$;无机阴离子浓度均为 10

$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 初始 pH 值为 7.0 ± 0.1 , 反应温度为 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$; $c(\text{吡啶})$ 为吡啶浓度; $\rho(\text{腐殖酸})$ 为腐殖酸质量浓度.

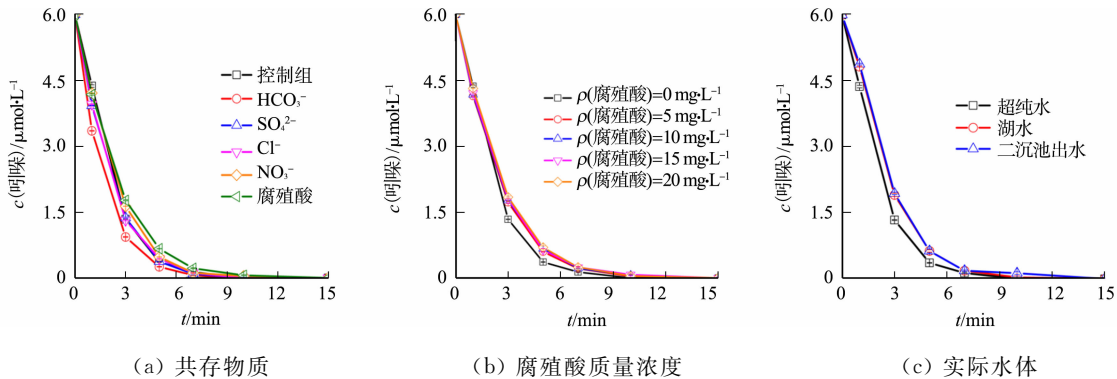


图 6 水质背景对吡啶降解的影响

Fig. 6 Effects of water constituents on degradation of indole

由图 6(a)可知: SO_4^{2-} , Cl^- 和 NO_3^- 的加入均未对吡啶的降解效能产生显著影响, HCO_3^- 的加入促进了吡啶的降解, 而腐殖酸呈现出微弱的抑制作用. 这些现象表明, HRP/ H_2O_2 /ABTS 体系对水中常见无机阴离子和天然有机物质具有良好的抗干扰能力. 需要注意的是, HCO_3^- 是碱性物质, 它的加入将反应溶液的 pH 值由 7.0 提高至 8.2.

当 pH 值为 7.0~9.0 时, pH 值的提高有利于 HRP/ H_2O_2 /ABTS 体系中吡啶的降解(图 1). 因此, HCO_3^- 对吡啶降解的促进作用可归因于反应溶液 pH 值的提高. 文献[14]的研究表明, 腐殖酸会与有机污染物竞争消耗 $\text{ABTS}^{\cdot+}$, 故腐殖酸对吡啶降解的微弱抑制可归因于其对 $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 的淬灭作用.

由图 6(b)可知: 当腐殖酸质量浓度从 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 提高至 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, HRP/ H_2O_2 /ABTS 体系对吡啶的降解效能没有显著影响, 说明 HRP/ H_2O_2 /ABTS 体系对较高质量浓度的腐殖酸具有良好的抗干扰性能, 可以运用于较高浓度腐殖酸水体中吡啶的降解.

由图 6(c)可知: HRP/ H_2O_2 /ABTS 体系可在 10 min 内将超纯水、湖水及二沉池出水中外加的 $6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 吡啶降解完全, 呈现出高效的降解效能. 这些现象表明, HRP/ H_2O_2 /ABTS 体系应用于吡啶的降解时对实际水体具有良好的抗干扰性能; 湖水和二沉池出水水质背景对吡啶降解有微弱抑制作用, 主要是因为实际水体中存在的天然有机物会与吡啶竞争部分 $\text{ABTS}^{\cdot+}$.

2.4 吡啶降解路径及生物毒性分析

2.4.1 吡啶降解的产物和路径 采用 LC/Q-TOF/MS 对 HRP/ H_2O_2 /ABTS 体系中吡啶的可能降解产物进行检测分析, 结果如表 2 所示. 表 2 中: t_R 为保留时间; RSD 为相对标准偏差. 除吡啶本身外, 还检测出了 5 种吡啶降解产物.

表 2 吡啶降解产物的信息

Tab. 2 Information of indole degradation products

降解产物	化学式	t_R/min	理论质荷比	实验质荷比	$\text{RSD}/\times 10^{-6}$
吡啶	$\text{C}_8\text{H}_7\text{N}$	9.16	116.050 6	116.050 4	1.7
DP_2	$\text{C}_8\text{H}_7\text{NO}_2$	5.40	148.040 4	148.040 5	0.7
DP_3	$\text{C}_8\text{H}_7\text{NO}_2$	5.40	148.040 4	148.040 5	0.7
DP_4	$\text{C}_7\text{H}_7\text{NO}$	2.67	120.045 5	120.045 5	0
DP_6	$\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$	9.65	261.067 0	261.066 9	0.4
DP_7	$\text{C}_8\text{H}_5\text{NO}_2$	6.00	146.024 8	146.024 9	0.7

基于产物检测结果, 推测出两种吡啶降解的路径, 如图 7 所示. 图 7 中: DP_1^* 和 DP_5^* 表示未检测到. 由图 7 可得以下两种吡啶降解的可能路径.

1) 路径 I. $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 先攻击吡啶含氮杂环上的邻位碳和间位碳, 进而羟基化产生 2-羟基吡啶(DP_1^*)和 3-羟基吡啶(DP_5^*), DP_1^* 和 DP_5^* 进一步羟基化, 产生 2,3-二羟基吡啶(DP_2); 随后, $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 攻击 DP_2 含氮杂环上的 $\text{C}=\text{C}$ 双键, 造成含氮杂环断裂, 产生 N -(2-醛基苯基)甲酰胺(DP_3); 最后, DP_3 上的醛基被进一步攻击, 从而导致 N -甲酰苯胺(DP_4)的生成. 路径 I 与之前报道的高铁酸盐降解吡啶

的路径相同^[4].

2) 路径 II. 吲哚先羟基化产生 3-羟基吲哚 (DP₅^{*}); DP₅^{*} 随后氧化二聚成靛蓝 (DP₆), DP₂ 再分解为靛红 (DP₇). 路径 II 与之前报道的加氧酶降解吲哚的路径相似^[42].

需要注意的是, DP₁^{*} 和 DP₅^{*} 没有被实际检测到, 这可能是因为这两者在吲哚降解过程中被快速转化为其他降解产物.

2.4.2 生物毒性分析 为了评估 HRP/H₂O₂/ABTS 体系降解吲哚过程中的生物毒性变化, 采用 BioFix[®] Lumi 荧光发光菌进行生物急性毒性分析. HRP/H₂O₂/ABTS 体系降解吲哚过程中的生物毒性变化, 如图 8 所示. 图 8 中: HRP 酶活力为 133.3 nkat · mL⁻¹; ABTS 浓度为 30 μmol · L⁻¹; H₂O₂ 浓度为 500 μmol · L⁻¹; 吲哚浓度为 6 μmol · L⁻¹; 初始 pH 值为 7.0 ± 0.1; 反应温度为 (25 ± 2) °C; η 为相对发光度. 由图 8 可知: 随着吲哚的降解, 荧光发光菌的相对发光度不断提高, 从 104% 提高到接近 120%. 该现象表明, 绝大部分的吲哚降解产物生物毒性低于吲哚本身, 即采用 HRP/H₂O₂/ABTS 体系降解吲哚可有效改善吲哚的生物急性毒性.

此外, 由于吲哚对绿藻表现出显著的毒性^[31], 采用 ECOSAR 软件进一步模拟评估 HRP/H₂O₂/ABTS 体系降解吲哚过程中对绿藻急性毒性及慢性毒性的变化, 确定吲哚及其降解产物的危险等级.

吲哚及其降解产物对绿藻的急性毒性和慢性毒性, 如表 3 所示. 表 3 中: EC₅₀ 定义为 96 h 的半最大效应质量浓度, 是指引起 50% 最大效应的质量浓度; ρ_{ChV} 为最大无可见不利影响质量浓度和最低可见不利影响质量浓度的几何平均值. 根据 HJ-T 154—2004 《新化学物质危害评估导则》, 将危险等级分为极高 (EC₅₀/ρ_{ChV} ≤ 1 mg · L⁻¹)、高 (1 mg · L⁻¹ < EC₅₀/ρ_{ChV} ≤ 10 mg · L⁻¹)、中 (10 mg · L⁻¹ < EC₅₀/ρ_{ChV} ≤ 100 mg · L⁻¹)、低 (EC₅₀/ρ_{ChV} > 100 mg · L⁻¹).

由表 3 可知: 吲哚对绿藻具有很强的急性毒性及慢性毒性, 但其降解产物对绿藻的毒性均显著低于吲哚, 且其中降解产物 DP₇ 的毒性达到低危险等级, 这个结果进一步说明了 HRP/H₂O₂/ABTS 体系降解吲哚可以显著改善吲哚的毒性.

表 3 吲哚及其降解产物对绿藻的急性毒性和慢性毒性

Tab. 3 Acute toxicity and chronic toxicity of indole and its degradation products to green algae

降解产物	急性毒性		慢性毒性	
	EC ₅₀ /mg · L ⁻¹	危险等级分级	ρ _{ChV} /mg · L ⁻¹	危险等级分级
吲哚	0.54	极高	0.250	极高
DP ₂	3.53	高	0.461	极高
DP ₃	26.30	中	5.560	高
DP ₄	14.20	中	6.190	高
DP ₆	13.10	中	6.730	高
DP ₇	602.00	低	115.000	低

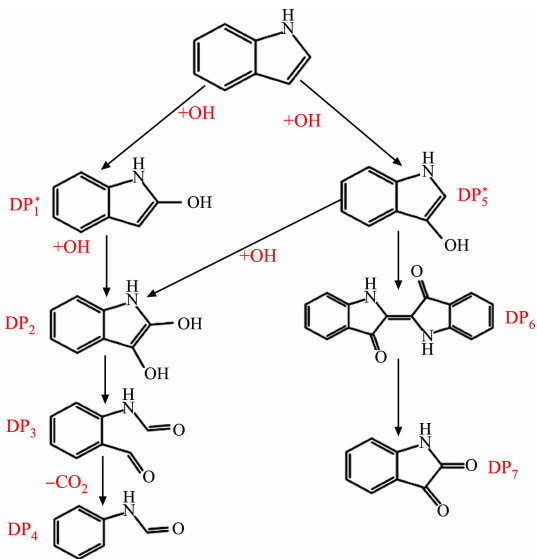


图 7 HRP/H₂O₂/ABTS 体系降解吲哚的途径
Fig. 7 Pathways of degradation of indole in HRP/H₂O₂/ABTS system

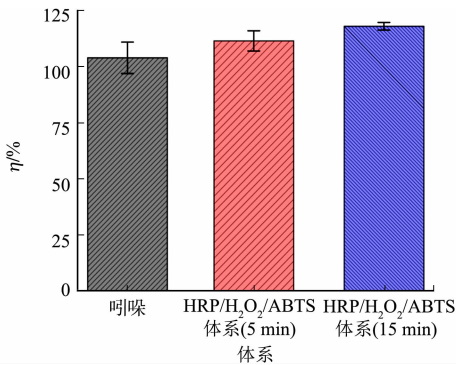


图 8 HRP/H₂O₂/ABTS 体系降解吲哚过程中的生物毒性变化

Fig. 8 Biological toxicity changes in process of degradation of indole in HRP/H₂O₂/ABTS system

3 结论

ABTS 的加入显著强化了 HRP/H₂O₂ 体系在 pH 值为 5.0~11.0 范围内对 6 μmol·L⁻¹ 吲哚的降解效能,且其强化效能随着 ABTS 浓度的增加而提高.当 pH 值为 7.0 时,30 μmol·L⁻¹ ABTS 的加入可将 HRP/H₂O₂ 体系中 6 μmol·L⁻¹ 吲哚降解的表观速率常数提高 36.2 倍. HRP 催化 H₂O₂ 氧化 ABTS 生成的具有较高氧化活性的 ABTS^{·+} 对吲哚降解起到主要作用,并且 ABTS^{·+} 生成浓度与吲哚降解的表观速率常数具有良好的线性关系($R^2 > 0.99$).

在 ABTS 作为电子转移体强化 HRP/H₂O₂ 体系降解吲哚的过程中,有少量 ABTS 被消耗.高浓度的 SO₄²⁻, Cl⁻, NO₃⁻, HCO₃⁻ 等无机阴离子、腐殖酸及实际水体均对 HRP/H₂O₂/ABTS 体系中吲哚的降解效能没有显著的影响.吲哚可以通过羟基化、聚合、含氮杂环裂解等一系列反应途径生成靛红、靛蓝等生物急性毒性更低的降解产物.文中提出的 HRP/H₂O₂/ABTS 体系为吲哚的高效降解提供了一种可供选择的方法.

参考文献:

- [1] LIU Xueping, XUE Ping, JIA Feng, *et al.* A novel approach to efficient degradation of indole using co-immobilized horseradish peroxidase-syringaldehyde as biocatalyst[J]. *Chemosphere*, 2021, 262: 128411. DOI: 10. 1016/j. chemosphere. 2020. 128411.
- [2] ARORA P K, SHARMA A, BAE H. Microbial degradation of indole and its derivatives[J]. *Journal of Chemistry*, 2015, 2015: 1-13. DOI: 10. 1155/2015/129159.
- [3] ZHANG Junzhi, CHEN Yisi, LIAO Yu, *et al.* Studies on the degradation of trace phenol and indole odorants by chlorine and permanganate in drinking water treatment[J]. *Chemosphere*, 2022, 286: 131551. DOI: 10. 1016/j. chemosphere. 2021. 131551.
- [4] LIU Yulei, WANG Lu, HUANG Zhuangsong, *et al.* Oxidation of odor compound indole in aqueous solution with ferate (VI): Kinetics, pathway, and the variation of assimilable organic carbon[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2018, 331: 31-38. DOI: 10. 1016/j. cej. 2017. 07. 171.
- [5] KATAPODIS P, MOUKOULI M, CHRISTAKOPOULOS P. Biodegradation of indole at high concentration by per-solvent fermentation with the thermophilic fungus *sporotrichum thermophile*[J]. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 2007, 60(4): 267-272. DOI: 10. 1016/j. ibiod. 2007. 04. 002.
- [6] HUANG Yi, HOU Xiaolin, LIU Sitong, *et al.* Correspondence analysis of bio-refractory compounds degradation and microbiological community distribution in anaerobic filter for coking wastewater treatment[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2016, 304: 864-872. DOI: 10. 1016/j. cej. 2016. 05. 142.
- [7] ZHU Hao, MA Wencheng, HAN Hongjun, *et al.* Degradation characteristics of two typical N-heterocycles in ozone process: Efficacy, kinetics, pathways, toxicity and its application to real biologically pretreated coal gasification wastewater[J]. *Chemosphere*, 2018, 209: 319-327. DOI: 10. 1016/j. chemosphere. 2018. 06. 067.
- [8] ZUHRA Z, ZHAO Zipeng, QIN Libo, *et al.* In situ formation of a multiporous MOF(Al)@γ-AlOOH composite material: A versatile adsorbent for both N- and S-heterocyclic fuel contaminants with high selectivity[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2019, 360: 1623-1632. DOI: 10. 1016/j. cej. 2018. 10. 205.
- [9] SEP P W, AHMED I, JHUNG S H. Adsorptive removal of nitrogen-containing compounds from a model fuel using a metal-organic framework having a free carboxylic acid group[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2016, 299: 236-243. DOI: 10. 1016/j. cej. 2016. 04. 060.
- [10] NA S Y, LEE Y H. Elimination of trace organic contaminants during enhanced wastewater treatment with horseradish peroxidase/hydrogen peroxide (HRP/H₂O₂) catalytic process[J]. *Catalysis Today*, 2017, 282: 86-94. DOI: 10. 1016/j. cattod. 2016. 03. 049.
- [11] LIU Shanshan, ZHAO Xu, ZENG Yanbin, *et al.* Enhancement of photoelectrocatalytic degradation of diclofenac with persulfate activated by Cu cathode[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2017, 320: 168-177. DOI: 10. 1016/j. cej. 2017. 03. 047.
- [12] LU Junhe, SHAO Juan, LIU Hui, *et al.* Formation of halogenated polyaromatic compounds by laccase catalyzed transformation of halophenols[J]. *Environmental Science and Technology*, 2015, 49(14): 8550-8557. DOI: 10. 1021/

acs.est. 5b02399.

- [13] LU Junhe, HUANG Qingguo, MAO Liang. Removal of acetaminophen using enzyme-mediated oxidative coupling processes: I. Reaction rates and pathways[J]. Environmental Science and Technology, 2009, 43(18): 7062-7067. DOI: 10.1021/es9002422.
- [14] LU Junhe, SHI Yuanyuan, JI Yuefei, *et al.* Transformation of triclosan by laccase catalyzed oxidation: The influence of humic acid-metal binding process[J]. Environmental Pollution, 2017, 220: 1418-1423. DOI: 10.1016/j.envpol.2016.10.092.
- [15] LIU Shan, HUANG Biyan, ZHENG Guiqin, *et al.* Nanocapsulation of horseradish peroxidase (HRP) enhances enzymatic performance in removing phenolic compounds[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 150: 814-822. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.02.043.
- [16] GU Yaohua, XUE Ping, JIA Feng, *et al.* Co-immobilization of laccase and ABTS onto novel dual-functionalized cellulose beads for highly improved biodegradation of indole[J]. Journal of Hazardous Materials, 2019, 365: 118-124. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2018.10.076.
- [17] HUANG Jia, CHANG Qing, DING Yaobin, *et al.* Catalytic oxidative removal of 2,4-dichlorophenol by simultaneous use of horseradish peroxidase and graphene oxide/Fe₃O₄ as catalyst[J]. Chemical Engineering Journal, 2014, 254: 434-442. DOI: 10.1016/j.cej.2014.05.136.
- [18] 关英红, 孙维敬, 王盼盼. PMS/Fe⁰ 体系中自由基产率比及莠去津降解动力学[J]. 哈尔滨工业大学学报, 2022, 54(2): 50-58. DOI: 10.11918/202102008.
- [19] ALNEYADI A H, RAUF M A, ASHRAF S S. Oxidoreductases for the remediation of organic pollutants in water: a critical review[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2018, 38(7): 971-988. DOI: 10.1080/07388551.2017.1423275.
- [20] 丁惠君, 吴亦潇, 钟家有, 等. 两种介体物质在漆酶降解磺胺类抗生素中的作用[J]. 中国环境科学, 2016, 36(5): 1469-1475. DOI: 10.3969/j.issn.1000-6923.2016.05.028.
- [21] SUDA T, HATA T, KAWAI S, *et al.* Treatment of tetracycline antibiotics by laccase in the presence of 1-hydroxybenzotriazole[J]. Bioresource Technology, 2012, 103(1): 498-501. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.10.041.
- [22] SALADINO R, GUAZZARONI M, CRESTINI C, *et al.* Dye degradation by layer-by-layer immobilised peroxidase/redox mediator systems[J]. ChemCatChem, 2013, 5(6): 1407-1415. DOI: 10.1002/cctc.201200660.
- [23] XIMENES V F, RODRIGUES A P, CABELLO C, *et al.* The co-catalytic effect of chlorpromazine on peroxidase-mediated oxidation of melatonin: Enhanced production of N¹-acetyl-N²-formyl-5-methoxykynuramine[J]. Journal of Pineal Research, 2008, 44(2): 115-120. DOI: 10.1111/j.1600-079X.2007.00497.x.
- [24] DONG Huiyu, QIANG Zhimin, LIAN Junfeng, *et al.* Promoted oxidation of diclofenac with ferrate (Fe(V)): Role of ABTS as the electron shuttle[J]. Journal of Hazardous Materials, 2017, 336: 65-70. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2017.04.056.
- [25] SONG Yang, JIANG Jin, QIN Wen, *et al.* Enhanced transformation of organic pollutants by mild oxidants in the presence of synthetic or natural redox mediators: A review[J]. Water Research, 2021, 189: 116667. DOI: 10.1016/j.watres.2020.116667.
- [26] SONG Yang, JIANG Jin, MA Jun, *et al.* ABTS as an electron shuttle to enhance the oxidation kinetics of substituted phenols by aqueous permanganate[J]. Environmental Science and Technology, 2015, 49(19): 11764-11771. DOI: 10.1021/acs.est.5b03358.
- [27] 王玲, 陈旺生, 吴浩渊, 等. 漆酶/ABTS 介体系统对吡啶的降解研究[J]. 环境科学与技术, 2012, 35(10): 38-41. DOI: 10.3969/j.issn.1003-6504.2012.10.009.
- [28] ASHE B, NGUYEN L N, HAI F I, *et al.* Impacts of redox-mediator type on trace organic contaminants degradation by laccase: Degradation efficiency, laccase stability and effluent toxicity[J]. International Biodeterioration and Biodegradation, 2016, 113: 169-176. DOI: 10.1016/j.ibiod.2016.04.027.
- [29] CAI Huahua, LIU Xin, ZOU Jing, *et al.* Multi-wavelength spectrophotometric determination of hydrogen peroxide in water with peroxidase-catalyzed oxidation of ABTS[J]. Chemosphere, 2018, 193: 833-839. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.11.091.
- [30] CAI Hengyun, ZOU Jing, LIN Jinbin, *et al.* Sodium hydroxide-enhanced acetaminophen elimination in heat/peroxymonosulfate system: Production of singlet oxygen and hydroxyl radical[J]. Chemical Engineering Journal, 2022,

- 429;132438. DOI:10. 1016/j. cej. 2021. 132438.
- [31] HE Hang, WANG Shizong, WANG Jianlong. The performance and pathway of indole degradation by ionizing radiation[J]. Chemosphere, 2022, 287:131983. DOI:10. 1016/j. chemosphere. 2021. 131983.
- [32] SCOTT S L, CHEN W J, BAKAC A, *et al.* Spectroscopic parameters, electrode potentials, acid ionization constants, and electron exchange rates of the 2,2'-azinotfs (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) radicals and ions[J]. The Journal of Physical Chemistry, 1993, 97:6710-6714. DOI:10. 1021/j100127a022.
- [33] WANG Daiyao, ZOU Jing, CAI Huahua, *et al.* Effective degradation of orange G and rhodamine B by alkali-activated hydrogen peroxide: Roles of HO_2^- and O_2^- [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2019, 26(2): 1445-1454. DOI:10. 1007/s11356-018-3710-7.
- [34] 刘淑坡, 王黛瑶, 王梦云, 等. 碱催化过氧化氢氧化法对偶氮染料酸橙 7 的降解性能[J]. 华侨大学学报(自然科学版), 2019, 40(2):201-208. DOI:10. 11830/ISSN. 1000-5013. 201809013.
- [35] FAN Wenjuan, QIAO Junlian, GUAN Xiaohong. Multi-wavelength spectrophotometric determination of Cr(VI) in water with ABTS[J]. Chemosphere, 2017, 171:460-467. DOI:10. 1016/j. chemosphere. 2016. 11. 153.
- [36] WANG Mengyun, WANG Daiyao, QIU Shiyi, *et al.* Multi-wavelength spectrophotometric determination of hydrogen peroxide in water by oxidative coloration of ABTS via Fenton reaction[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2019, 26(26):27063-27072. DOI:10. 1007/s11356-019-05884-7.
- [37] LIN Jinbin, HU Yuye, XIAO Junyang, *et al.* Enhanced diclofenac elimination in Fe(III)/peracetic acid process by promoting Fe(III)/Fe(II) cycle with ABTS as electron shuttle[J]. Chemical Engineering Journal, 2021, 420: 129692. DOI:10. 1016/j. cej. 2021. 129692.
- [38] KADNIKOVA E N, KOSTI N M. Oxidation of ABTS by hydrogen peroxide catalyzed by horseradish peroxidase encapsulated into sol-gel glass: Effects of glass matrix on reactivity[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2002, 18(1):39-48. DOI:10. 1016/S1381-1177(02)00057-7.
- [39] HUANG Qingguo, WEBER W J. Transformation and removal of bisphenol A from aqueous phase via peroxidase-mediated oxidative coupling reactions: Efficacy, products, and pathways[J]. Environmental Science and Technology, 2005, 39(16):6029-6036. DOI:10. 1021/es050036x.
- [40] NIHEMAITI M, MIKLOS D B, HÜBNER U, *et al.* Removal of trace organic chemicals in wastewater effluent by UV/H₂O₂ and UV/PDS[J]. Water Research, 2018, 145:487-497. DOI:10. 1016/j. watres. 2018. 08. 052.
- [41] KWON M, KIM S, YOON Y, *et al.* Comparative evaluation of ibuprofen removal by UV/H₂O₂ and UV/S₂O₈²⁻ processes for wastewater treatment[J]. Chemical Engineering Journal, 2015, 269:379-390. DOI:10. 1016/j. cej. 2015. 01. 125.
- [42] MEYER A, RSTEN M W, SCHMID A, *et al.* Hydroxylation of indole by laboratory-evolved 2-hydroxybiphenyl 3-monooxygenase[J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(37):34161-34167. DOI:10. 1074/jbc. M205621200.

(责任编辑: 钱筠 英文审校: 刘源岗)