

汤宜昆,蔡喜运.血链球菌驱动的  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML/ $\text{H}_2\text{O}_2$  体系构建及其去除水中 4-氯酚[J].湖南科技大学学报(自然科学版), 2024,39(2):109-117.doi:10.13582/j.cnki.1672-9102.2024.02.014

TANG Y K, CAI X Y. Development of *Streptococcus sanguis*-driven  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML/ $\text{H}_2\text{O}_2$  Systems to Remove 4-chlorophenol in Water[J]. Journal of Hunan University of Science and Technology (Natural Science Edition), 2024,39(2):109-117.doi:10.13582/j.cnki.1672-9102.2024.02.014

# 血链球菌驱动的 $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML/ $\text{H}_2\text{O}_2$ 体系构建及其去除水中 4-氯酚

汤宜昆,蔡喜运\*

(大连理工大学 环境学院,辽宁 大连 116024)

**摘要:**  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML 因能活化  $\text{H}_2\text{O}_2$  氧化多种有机污染物受到广泛关注,但在投加  $\text{H}_2\text{O}_2$  的过程中存在过度损耗的问题,并且在  $\text{H}_2\text{O}_2$  的运输、处理和储存中存在潜在危险.本研究利用血链球菌产生  $\text{H}_2\text{O}_2$  的特性,通过原位生成  $\text{H}_2\text{O}_2$  替代预制  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,构建血链球菌驱动的  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML/ $\text{H}_2\text{O}_2$  体系,降解水中 4-氯酚,并探究相关影响因素对 4-氯酚降解效果的影响.结果表明:在血链球菌驱动的  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML/ $\text{H}_2\text{O}_2$  降解体系中,4-氯酚的降解速率常数与温度和细胞密度呈正相关,去除率随着  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML 浓度和 pH 值的增加先升高后降低.该体系可以实现 4-氯酚的高效降解,在环境温度为 25 °C, pH 值为 8,  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML 浓度为 2  $\mu\text{mol/L}$ ,血链球菌  $\text{OD}_{600}$  为 0.4 的条件下,10 mg/L 的 4-氯酚在 3 h 内的去除率可达到 96.9%.

**关键词:** 血链球菌;过氧化氢;原位合成; $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML;4-氯酚

中图分类号:X703

文献标志码:A

文章编号:1672-9102(2024)02-0109-09

## Development of *Streptococcus sanguis*-driven $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML/ $\text{H}_2\text{O}_2$ Systems to Remove 4-chlorophenol in Water

TANG Yikun, CAI Xiyun

(School of Environmental Science and Technology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

**Abstract:**  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML has received growing attentions due to an efficient activator of  $\text{H}_2\text{O}_2$  to oxidize varieties of organic pollutants. There are many concerns about excessive losses and potential hazard of  $\text{H}_2\text{O}_2$  in the transportation, handling and storage. This study aims to construct microbial-driven  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML/ $\text{H}_2\text{O}_2$  systems by using *Streptococcus sanguis* with feature of generating  $\text{H}_2\text{O}_2$  and investigate effects of related parameters on the removal of 4-chlorophenol. Results show that in the *S. sanguis*-driven  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML/ $\text{H}_2\text{O}_2$  systems, the degradation rate constants of 4-chlorophenol are positively correlated with temperature and cell density, whereas the removal of 4-chlorophenol is initially increased and subsequently decreased with increasing  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML concentrations and pH. High removal of 96.9% is achieved for 4-chlorophenol in water within 3 h under the optimized conditions, including reaction temperature of 25 °C, pH 8,  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML of 2  $\mu\text{mol/L}$  and  $\text{OD}_{600}$  of 0.4.

**Keywords:** *Streptococcus sanguis*; hydrogen peroxide; in situ synthesis;  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML; 4-chlorophenol

收稿日期:2021-05-27

基金项目:国家重点研发计划土壤专项课题资助项目(2019YFC1803803)

\*通信作者,E-mail: xiyuncaid@dlut.edu.cn

金属类酶催化剂四酰胺基六甲基苯基环铁( $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML)由C, H, N, O和 $\text{Fe}^{\text{III}}$ 组成,具有类过氧化物酶活性,是一种能够通过活化环境浓度水平的 $\text{H}_2\text{O}_2$ 产生具有高活性和选择性的高价态铁活性物种( $\text{Fe}^{\text{V/IV}}$ ),并以此氧化降解有机污染物的绿色高效的催化剂<sup>[1-2]</sup>。 $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML/ $\text{H}_2\text{O}_2$ 体系在适宜的条件下能矿化水体中的雌激素<sup>[3]</sup>、偶氮染料<sup>[4]</sup>、有机磷农药<sup>[5]</sup>、TNT<sup>[6]</sup>、氟喹诺酮类抗生素<sup>[7]</sup>和氯酚<sup>[8]</sup>等污染物。 $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML的用量通常远低于其他高级氧化体系氧化剂的用量。GUPTA等<sup>[8]</sup>的研究表明: $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML在催化剂与底物质量分数比为1:715和1:2000时,几分钟内可催化矿化降解超过99%的2,4,6-三氯酚和五氯酚(5 mmol/L)。

$\text{H}_2\text{O}_2$ 作为常用的氧化剂<sup>[9-10]</sup>,由于其利用效率低,在运输、处理和储存的过程中存在潜在风险<sup>[11-12]</sup>,因此,替代预制 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的原位生成方法受到学者的广泛关注<sup>[13]</sup>。相关研究表明微生物可以通过有氧代谢生成 $\text{H}_2\text{O}_2$ <sup>[14]</sup>,如嗜酸乳杆菌<sup>[15]</sup>、链球菌属<sup>[16]</sup>、奥奈达希瓦氏菌<sup>[17]</sup>和东方栓孔菌<sup>[18]</sup>。SEKAR等<sup>[19-20]</sup>利用奥奈达希瓦氏菌在好氧条件下产生 $\text{H}_2\text{O}_2$ ,在厌氧条件下还原 $\text{Fe}^{\text{III}}$ 的特点,构建生物芬顿反应体系,通过厌氧好氧周期的交替培养,在60 h内完全降解10 mmol/L的1,4-二恶烷,在30 h内完全降解10  $\mu\text{mol/L}$ 的蒽。

血链球菌是最早定居于牙面的口腔常驻有益共生菌之一<sup>[21]</sup>,依赖于spxB基因编码的丙酮酸氧化酶催化丙酮酸盐、无机磷酸盐和氧分子,生成 $\text{H}_2\text{O}_2$ 、 $\text{CO}_2$ 和乙酰磷酸盐,可通过产生 $\text{H}_2\text{O}_2$ 拮抗导致牙周病和龋齿的可疑致病菌<sup>[22-24]</sup>。血链球菌的spxB基因高度保守说明其具有稳定的产生 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的能力<sup>[22]</sup>。

本研究选择具有“三致”效应的4-氯酚作为目标污染物,利用血链球菌代谢产生 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的生物特性,构建血链球菌驱动的 $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML/ $\text{H}_2\text{O}_2$ 降解体系,考察细胞密度、pH值、温度和 $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML浓度等参数对4-氯酚降解效果的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验试剂与仪器

菌种:血链球菌 GDMCC1.1558,购自广东微生物菌种保藏中心。

试剂:氯化钠、磷酸二氢钾、硫酸铵、二水磷酸氢二钠、氯化钾、辣根过氧化氢酶、N-N二乙基对苯二胺和4-氯酚购自阿拉丁试剂(上海)有限公司;甘氨酸购自北京索莱宝科技有限公司;BHI培养基、琼脂粉购自青岛海博生物技术有限公司;乙腈(色谱纯)购自美国天地有限公司; $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML为实验室自制。

仪器:Hitachi L2000 HPLC 高效液相色谱仪(日立,日本)、U-2900型紫外可见分光光度计(日立,日本)、BJ-2CD 双人单面净化工作台(上海博迅医疗生物仪器股份有限公司)、LDZX-30KBS型高压灭菌锅(上海申安医疗器械厂)、SPH-2102C 立式双层恒温摇床(上海世平实验设备有限公司)和H2050R台式高速冷冻离心机(北京世纪科信科学仪器有限公司)。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 温度和pH值对血链球菌 $\text{H}_2\text{O}_2$ 初始产生速率的影响

设置pH值为6~9、温度为25℃和pH值为8、温度为15~30℃的试验条件,分别考察pH值和温度对 $\text{H}_2\text{O}_2$ 初始产生速率的影响。在设置的试验条件下,血链球菌培养0, 20, 40, 60 min后取菌液,过0.22  $\mu\text{m}$ 水系滤膜,测量滤液中 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的浓度。通过 $\text{H}_2\text{O}_2$ 浓度随时间增加的线性回归分析来确定 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的初始产生速率,采用稀释平板计数法来计算生物量。所有试验组均设置3个平行试验。

#### 1.2.2 血链球菌驱动的 $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML/ $\text{H}_2\text{O}_2$ 体系降解4-氯酚的影响因素

本研究依次开展pH值、温度、细胞密度( $\text{OD}_{600}$ )和 $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML浓度等参数对4-氯酚降解效果的影响。试验条件:(1)温度为25℃, $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML浓度为1  $\mu\text{mol/L}$ , $\text{OD}_{600}$ 为0.4,pH值为6~9,考察pH值的变化对血链球菌驱动的 $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML/ $\text{H}_2\text{O}_2$ 体系中4-氯酚降解效果的影响;(2)pH值为8, $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML浓度为1  $\mu\text{mol/L}$ , $\text{OD}_{600}$ 为0.4,温度为15~30℃,考察温度对血链球菌驱动的 $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML/ $\text{H}_2\text{O}_2$ 体系中4-氯酚降解效果的影响;(3)温度为25℃,pH值为8, $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML浓度为1  $\mu\text{mol/L}$ , $\text{OD}_{600}$ 为0.05~0.80,考察细胞密

度对血链球菌驱动的 $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML/ $\text{H}_2\text{O}_2$ 体系中4-氯酚降解效果的影响;(4) pH值为8,  $\text{OD}_{600}$ 为0.4, 温度为25℃,  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML浓度为0.5~10.0  $\mu\text{mol/L}$ , 考察 $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML浓度对血链球菌驱动的 $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML/ $\text{H}_2\text{O}_2$ 体系中4-氯酚降解效果的影响. 反应液配置在50 mL的离心试管中, 4-氯酚的初始质量浓度为10 mg/L, 放置于摇床中振荡(转速均为200 r/min), 在设置的试验条件下, 每0.5 h取样过0.22  $\mu\text{m}$ 水系滤膜至液相小瓶, 用高效液相色谱仪测定4-氯酚的浓度. 所有试验组均设置3个平行试验.

### 1.2.3 外加 $\text{H}_2\text{O}_2$ 驱动的 $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML/ $\text{H}_2\text{O}_2$ 体系降解4-氯酚的影响因素

本研究依次开展pH值、温度、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 浓度和 $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML浓度等参数对4-氯酚降解效果的影响. 设置试验条件:(1)温度为25℃,  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML浓度为1  $\mu\text{mol/L}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ 浓度为100  $\mu\text{mol/L}$ , pH值为6~9, 考察pH值的变化对外加 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的 $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML/ $\text{H}_2\text{O}_2$ 体系中4-氯酚降解效果的影响;(2)温度为25℃, pH值为8,  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML浓度为1  $\mu\text{mol/L}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ 浓度为50~1 000  $\mu\text{mol/L}$ , 考察 $\text{H}_2\text{O}_2$ 浓度对外加 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的 $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML/ $\text{H}_2\text{O}_2$ 体系中4-氯酚降解效果的影响;(3) pH值为8,  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML浓度为1  $\mu\text{mol/L}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ 浓度为100  $\mu\text{mol/L}$ , 温度为15~30℃, 考察温度对外加 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的 $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML/ $\text{H}_2\text{O}_2$ 体系中4-氯酚降解效果的影响;(4) pH值为8,  $\text{H}_2\text{O}_2$ 浓度为100  $\mu\text{mol/L}$ , 温度为25℃,  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML浓度为0.5~10.0  $\mu\text{mol/L}$ , 考察 $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML浓度对外加 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的 $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML/ $\text{H}_2\text{O}_2$ 体系中4-氯酚降解效果的影响. 反应液配置在50 mL的离心试管中, 4-氯酚的初始质量浓度为10 mg/L, 放置于摇床中振荡(转速均为200 r/min), 在设置的试验条件下, 反应10, 20, 30, 60, 120 min取样过0.22  $\mu\text{m}$ 水系滤膜至液相小瓶, 利用高效液相色谱仪测定4-氯酚的质量浓度. 所有试验组均设置3个平行试验.

## 1.3 分析方法

### 1.3.1 4-氯酚以及 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的测量方法

采用Hitachi L2000 HPLC高效液相色谱仪测定4-氯酚的质量浓度. 色谱柱为Agilent ZORBAX Extend-C18 (250 mm×4.6 mm×5  $\mu\text{m}$ ), 柱温为25℃, 二极管阵列检测器的检测波长为230 nm, 流动相体积比为50:50的乙腈/超纯水, 流速为0.8 mL/min.

根据DPD/POD分光光度法<sup>[25-26]</sup>, 采用U-2900型紫外可见分光光度计测量 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的浓度. 方法检出限为0.065  $\mu\text{mol/L}$ .

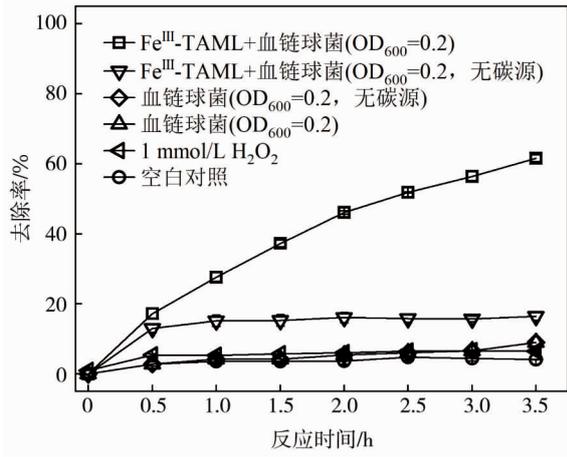
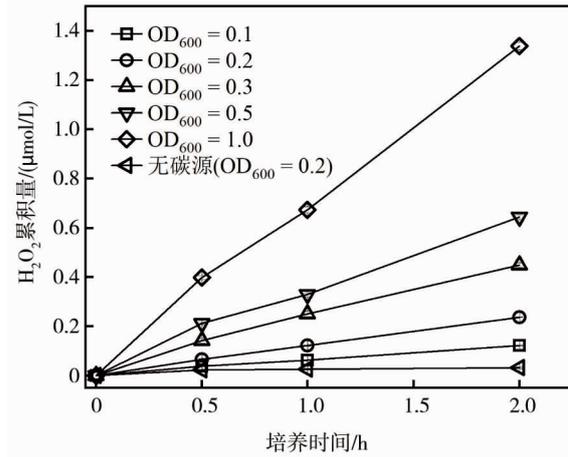
### 1.3.2 数据分析方法

试验数据采用SPSS 23.0进行统计分析, Origin 2020b进行制图分析. 降解动力学数据采用一级动力学模型拟合.

## 2 结果与讨论

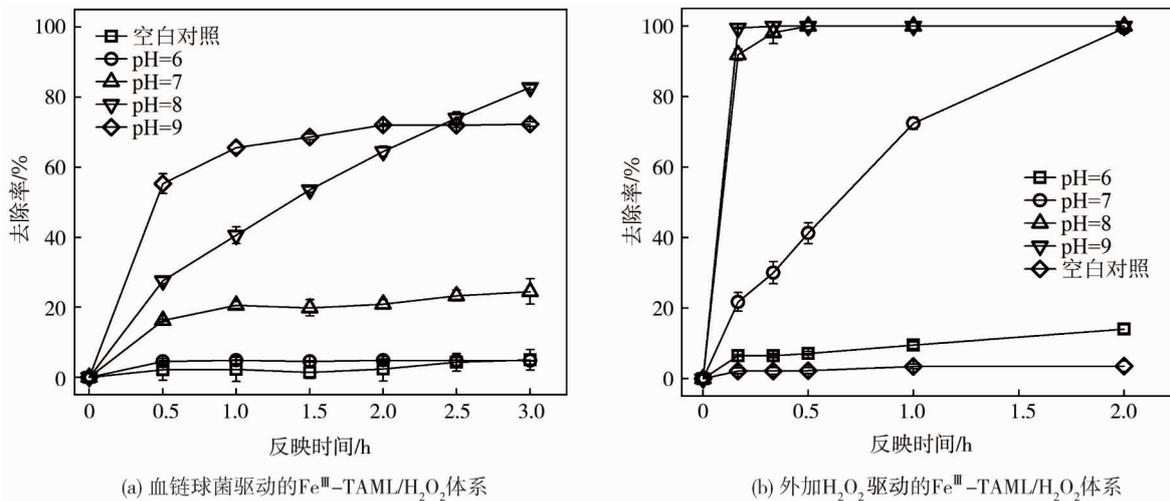
### 2.1 血链球菌产生 $\text{H}_2\text{O}_2$ 构建生物驱动的 $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML/ $\text{H}_2\text{O}_2$ 降解体系

在单独加入血链球菌或1 mmol/L  $\text{H}_2\text{O}_2$ 的条件下, 相较于空白对照, 4-氯酚在3.5 h的去除率分别增加2.53%和2.46%, 表明血链球菌和 $\text{H}_2\text{O}_2$ 单独处理对4-氯酚的降解几乎没有作用(图1). 然而, 在血链球菌驱动的 $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML体系中, 4-氯酚发生明显降解. 在无外加碳源的条件下, 4-氯酚在0.5 h内降解12.9%, 后续没有发生明显降解. 在加碳源的条件下, 4-氯酚发生持续降解, 在3.5 h内降解61.6%, 一级降解速率常数为0.294  $\text{h}^{-1}$ . 血链球菌培养体系中 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的累积量如图2所示. 由图2可知: 在无外加碳源的条件下,  $\text{H}_2\text{O}_2$ 的累积量在0.5 h达到0.023 mmol/L, 后续没有明显增加; 然而, 在加碳源的条件下,  $\text{H}_2\text{O}_2$ 的累积量随着细胞密度的增加而增加, 血链球菌产生的 $\text{H}_2\text{O}_2$ 在2 h的累积量与细胞密度呈线性正相关( $R^2 = 0.995$ ,  $P < 0.001$ ). 这是因为血链球菌可以将摄入碳源的14%转化为胞内多糖, 而在无碳源的条件下只能消耗细胞内储存的多糖合成 $\text{H}_2\text{O}_2$ <sup>[27-28]</sup>, 无法持续产生 $\text{H}_2\text{O}_2$ . 因此, 在补给碳源的条件下, 血链球菌能够持续生成 $\text{H}_2\text{O}_2$ , 与无机盐体系中的 $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML构成生物驱动的 $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML/ $\text{H}_2\text{O}_2$ 降解体系, 可降解去除水中的4-氯酚.

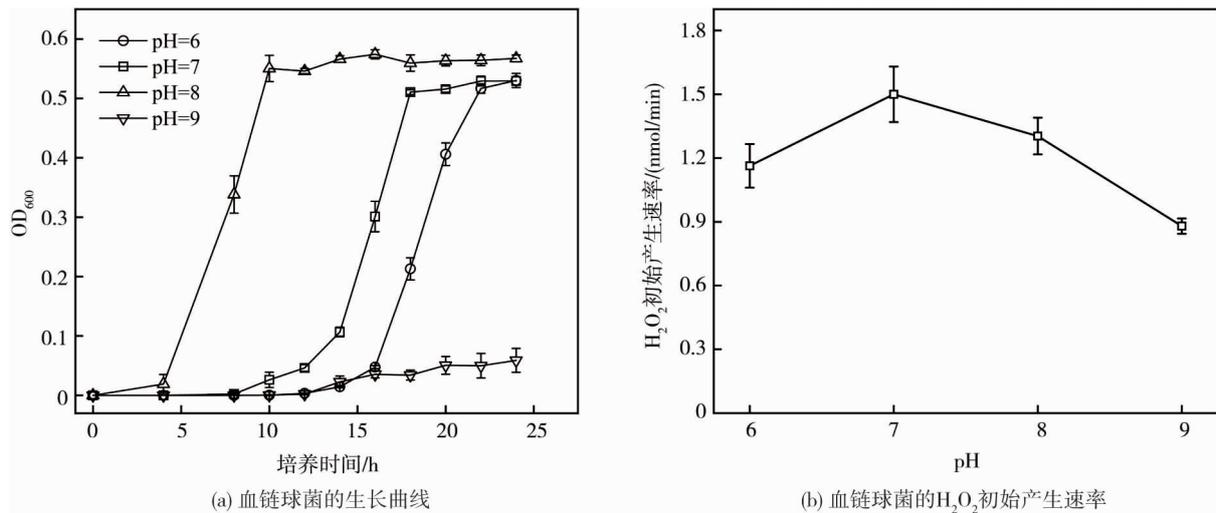
图1 血链球菌驱动的Fe<sup>III</sup>-TAML/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>降解体系筛选图2 血链球菌培养体系中H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的累积量

## 2.2 pH值对Fe<sup>III</sup>-TAML/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>体系降解活性的影响

pH值对Fe<sup>III</sup>-TAML/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>体系降解活性的影响如图3所示.在血链球菌驱动的Fe<sup>III</sup>-TAML/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>降解体系中(图3a),随着pH值的增加,4-氯酚在3 h内的去除率先增加后降低.4-氯酚在pH值为6的条件下不发生降解.在pH值为7和9时,4-氯酚在0.5~1.0 h内降解的速度较快,随后没有明显变化,3 h的去除率分别为24.5%和72.3%.当pH值为8时,4-氯酚的去除率随着时间的增加而增加,3 h的去除率为82.8%.不同的是,在外加H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>驱动的Fe<sup>III</sup>-TAML/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>降解体系中(图3b),4-氯酚在pH值为6,7,8,9的条件下,去除率随着pH值的增加而增加.当pH值为6时,4-氯酚在2 h的去速率为14.1%.当pH值为7,8,9时,4-氯酚均能在2 h内被完全降解,其一级降解速率常数随着pH值的升高而增加.这是因为Fe<sup>III</sup>-TAML催化剂在中性或酸性条件下的反应活性低,在碱性条件下的活性会随着pH值的升高而增加<sup>[29]</sup>.

图3 pH值对Fe<sup>III</sup>-TAML/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>体系降解4-氯酚的影响

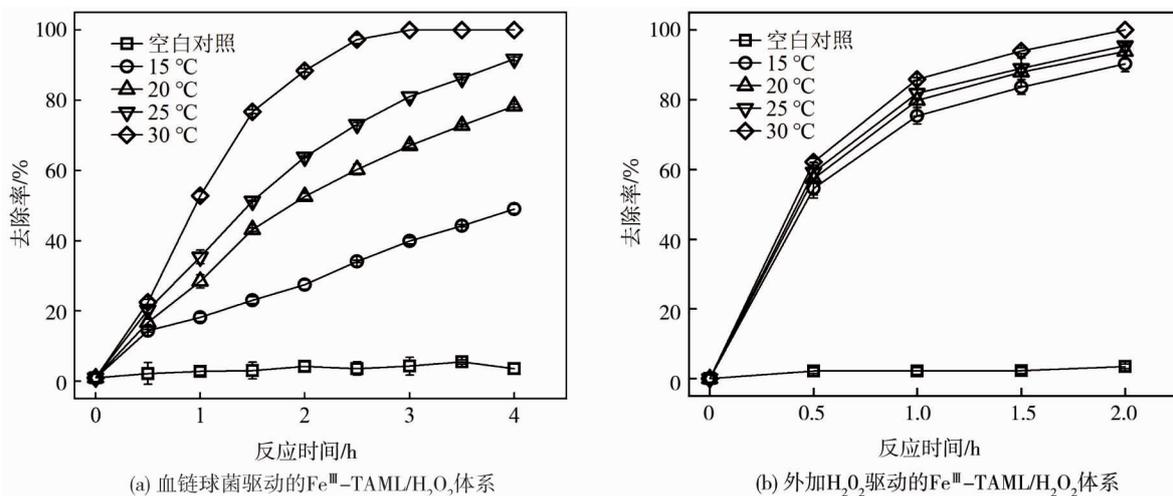
pH值对血链球菌生长和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>初始产生速率的影响如图4所示.血链球菌的生长曲线(图4a)显示,在pH值为6,7,8的条件下,血链球菌分别在22, 18, 10 h达到稳定期,然而在pH值为9的条件下,血链球菌不生长.在pH值为6,7,8,9的条件下,每10<sup>7</sup>个血链球菌每分钟分别能产生1.16, 1.50, 1.35, 0.880 nmol的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(图4b).以上结果表明:血链球菌在中性到弱碱性(pH值为7~8)条件下的生长速度快,产生H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的活性高.结合文献[30],推测血链球菌中H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的初始产生速率与其在不同pH值条件下的生长速度有关.

图 4 pH 值对血链球菌生长和  $\text{H}_2\text{O}_2$  初始产生速率的影响

GUPTA 等<sup>[8]</sup>的研究表明: $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML 在催化剂与底物质量分数比为 1 : 715 和 1 : 2 000 时,几分钟内可催化矿化降解超过 99% 的 2,4,6-三氯酚和五氯酚 (5 mmol/L)。因此,基于血链球菌产生  $\text{H}_2\text{O}_2$  活性和  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML 催化活性的 pH 依赖性,讨论 pH 值对血链球菌驱动的  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML/ $\text{H}_2\text{O}_2$  体系降解活性的影响。4-氯酚在 pH 值为 6 的条件下基本上不降解,主要是因为无机盐体系中的  $\text{H}^+$  诱导  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML 脱铁导致催化剂失活<sup>[31]</sup>。4-氯酚在 pH 值为 7 的条件下反应 1 h 时的去除率为 20.6%,后续没有发生明显降解,主要是由于血链球菌在进行有氧呼吸产生  $\text{H}_2\text{O}_2$  的同时产生乳酸<sup>[23]</sup>,反应体系的 pH 值在 0.5 h 后降至 6.53,催化剂逐渐失活。4-氯酚在 pH 值为 9 的条件下反应 1 h 时的去除率为 65.6%,后续没有发生明显降解,主要是由于虽然  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML 的反应活性在碱性条件下较高,但血链球菌在 pH 值为 9 的条件下难以生存,产生  $\text{H}_2\text{O}_2$  的活性降低,无法累积  $\text{H}_2\text{O}_2$ 。相比之下,4-氯酚在 pH 值为 8 的条件下可持续降解且去除率最高。因为该条件适宜血链球菌的生存, $\text{H}_2\text{O}_2$  的初始产生速率较高,同时, $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML 也具有较高的降解活性。

### 2.3 温度对 $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML/ $\text{H}_2\text{O}_2$ 体系降解活性的影响

温度对  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML/ $\text{H}_2\text{O}_2$  体系降解活性的影响如图 5 所示。4-氯酚在血链球菌驱动的  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML/ $\text{H}_2\text{O}_2$  体系中可以发生快速降解(图 5a),在温度为 15~30  $^{\circ}\text{C}$  的条件下,4-氯酚的降解速率常数随着温度的升高而增加,从 0.17  $\text{h}^{-1}$  增加到 0.90  $\text{h}^{-1}$ 。4-氯酚的降解速率常数与温度的关系符合 Arrhenius 方程,活化能( $E_a$ )为 77.4 kJ/mol。在外加  $\text{H}_2\text{O}_2$  驱动的  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML/ $\text{H}_2\text{O}_2$  体系中(图 5b),4-氯酚的降解显著加快,随着温度的升高,降解速率常数从 1.39  $\text{h}^{-1}$  缓慢增加到 1.95  $\text{h}^{-1}$ ,活化能( $E_a$ )显著降低到 15.7 kJ/mol。以上结果表明:血链球菌驱动的  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML/ $\text{H}_2\text{O}_2$  体系具有较高的反应活性,且主要与血链球菌的生物活性有关。

图 5 温度对  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML/ $\text{H}_2\text{O}_2$  体系降解 4-氯酚的影响

4-氯酚的降解速率常数及  $\text{H}_2\text{O}_2$  初始产生速率与温度的关系如图 6 所示.在温度为 15~30 °C 的条件下, $\text{H}_2\text{O}_2$  的初始产生速率随着温度的升高而增加,两者呈现正相关( $R^2=0.957, P=0.043$ ).4-氯酚的降解速率常数与  $\text{H}_2\text{O}_2$  初始产生速率也呈现显著正相关( $R^2=0.963, P=0.037$ ).温度是影响微生物生长繁殖最重要的因素之一,血链球菌在 10~45 °C 的环境下生长,在 20~30 °C 产生  $\text{H}_2\text{O}_2$  的活性较高.以上结果表明:试验条件下,通过温度影响血链球菌产生  $\text{H}_2\text{O}_2$  的活性,进而影响血链球菌驱动的  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML/ $\text{H}_2\text{O}_2$  体系中 4-氯酚的降解活性.

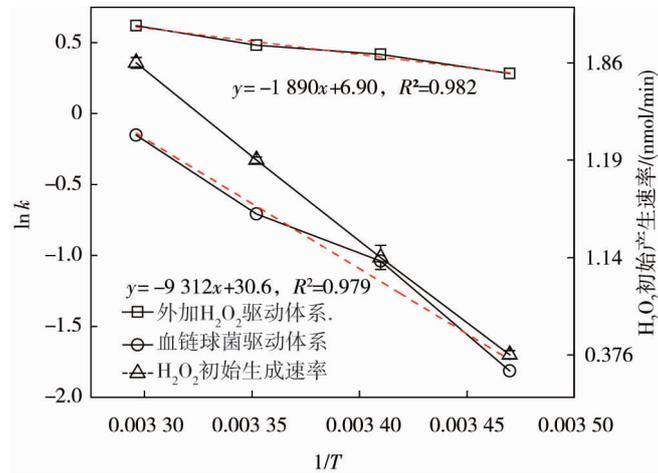


图 6 4-氯酚降解速率常数及  $\text{H}_2\text{O}_2$  初始产生速率与温度的关系

#### 2.4 细胞密度对 $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML/ $\text{H}_2\text{O}_2$ 体系降解活性的影响

细胞密度和  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度对  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML/ $\text{H}_2\text{O}_2$  体系降解 4-氯酚的影响如图 7 所示.在血链球菌驱动的  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML/ $\text{H}_2\text{O}_2$  体系中(图 7a),在 pH 值为 8 的条件下,4-氯酚的降解速率随着细胞密度的增加而增加,降解速率常数从  $0.116 \text{ h}^{-1}$  ( $\text{OD}_{600}=0.05$ ) 增加到  $0.718 \text{ h}^{-1}$  ( $\text{OD}_{600}=0.8$ ),4-氯酚的降解速率常数与细胞密度呈线性正相关( $R^2=0.911, P<0.001$ ).与此类似,在外加  $\text{H}_2\text{O}_2$  驱动的  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML/ $\text{H}_2\text{O}_2$  体系中(图 7b),4-氯酚在 pH 值为 8 的条件下,降解速率随着  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度的增加而增加,降解速率常数从  $0.844 \text{ h}^{-1}$  ( $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度为  $50 \mu\text{mol/L}$ ) 增加到  $31.800 \text{ h}^{-1}$  ( $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度为  $1 \text{ mmol/L}$ ).4-氯酚的降解速率常数与  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度呈线性正相关( $R^2=0.994, P<0.001$ ).由于血链球菌的  $\text{H}_2\text{O}_2$  产量与血链球菌的细胞密度呈正相关(图 2),进一步表明血链球菌驱动的  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML/ $\text{H}_2\text{O}_2$  体系对 4-氯酚的降解效果主要与血链球菌的  $\text{H}_2\text{O}_2$  产量相关.

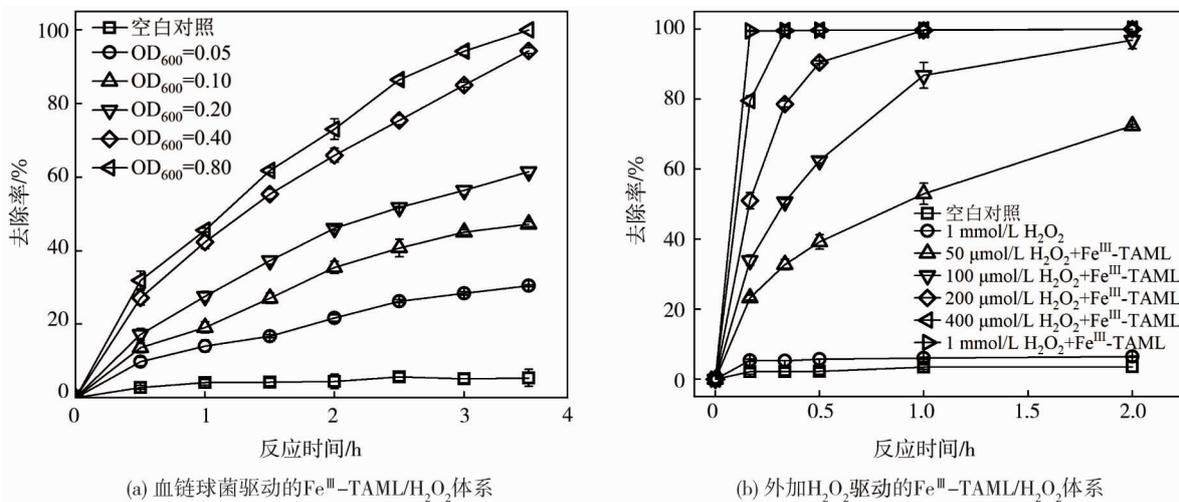


图 7 细胞密度和  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度对  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML/ $\text{H}_2\text{O}_2$  体系降解 4-氯酚的影响

## 2.5 $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML 浓度对 $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML/ $\text{H}_2\text{O}_2$ 体系降解活性的影响

$\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML 浓度对  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML/ $\text{H}_2\text{O}_2$  体系降解 4-氯酚的影响如图 8 所示.在血链球菌驱动的  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML/ $\text{H}_2\text{O}_2$  降解体系中(图 8a),在  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML 浓度为 0.5~2.0  $\mu\text{mol/L}$  时,随着  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML 浓度的增加,4-氯酚的降解速率常数从 0.258  $\text{h}^{-1}$  增加到 0.803  $\text{h}^{-1}$ .当  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML 浓度进一步增加到 5  $\mu\text{mol/L}$  和 10  $\mu\text{mol/L}$  时,4-氯酚的去除率反而降低,与  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML 浓度为 2  $\mu\text{mol/L}$  时相比,4-氯酚在 3 h 的去除率分别降低 12.8% 和 23.2%.不同的是,在外加  $\text{H}_2\text{O}_2$  驱动的  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML/ $\text{H}_2\text{O}_2$  降解体系中(图 8b),在  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML 浓度为 0.5~2.0  $\mu\text{mol/L}$  时,随着  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML 浓度的增加,4-氯酚的降解速率常数从 0.603  $\text{h}^{-1}$  增加到 3.125  $\text{h}^{-1}$ .当  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML 浓度进一步增加到 5  $\mu\text{mol/L}$  和 10  $\mu\text{mol/L}$  时,4-氯酚在 0.5 h 内完全去除.

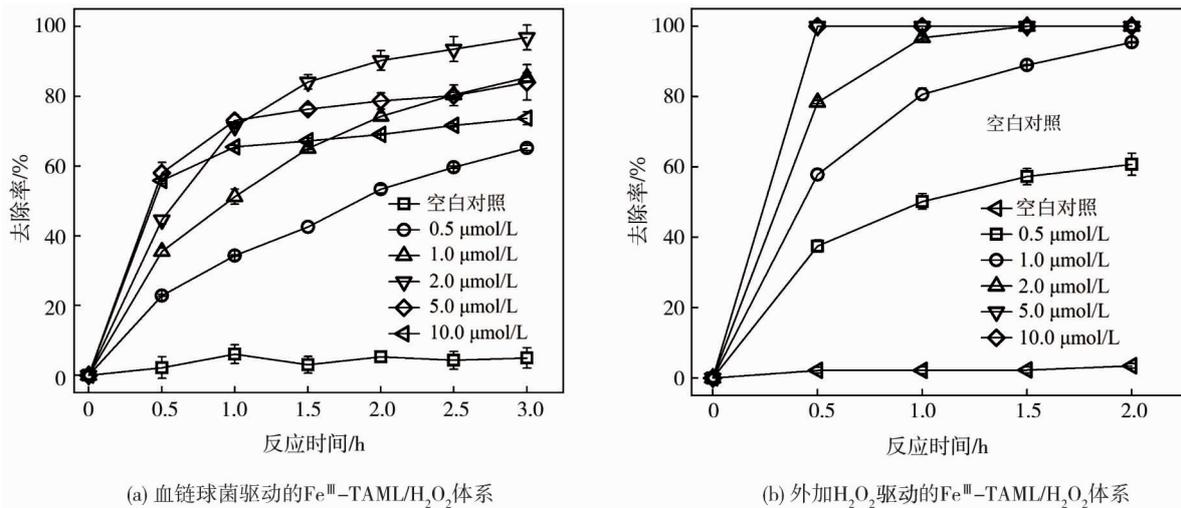


图 8  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML 浓度对  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML/ $\text{H}_2\text{O}_2$  体系降解 4-氯酚的影响

$\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML 是一种低毒无害的环境友好型催化剂.GUPTA 等<sup>[8]</sup>根据发光细菌测试,得到  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML 的 LONEC 值(显示无细菌死亡的激活剂的最高观察浓度)大于 30  $\text{mg/L}$ .TRUONG 等<sup>[32]</sup>使用斑马鱼胚胎来评估  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML 的发育毒性,发现即使暴露在 250  $\mu\text{mol/L}$  的  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML 中,斑马鱼胚胎也没有出现显著的死亡和畸形.本试验设置的  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML 浓度为 0.5~10.0  $\mu\text{mol/L}$ ,远远低于上述的毒性剂量水平,对血链球菌没有毒害效应.然而, $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML 浓度为 5  $\mu\text{mol/L}$  和 10  $\mu\text{mol/L}$  时,4-氯酚在 0.5 h 的去除率分别为 58.0% 和 55.9%,降解效率高,但在 3 h 的去除率低于  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML 浓度为 2  $\mu\text{mol/L}$  时的去除率.可能是因为高浓度的  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML 进入血链球菌细胞内,在细胞内消耗  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,减少了  $\text{H}_2\text{O}_2$  的释放,降低 4-氯酚的有效降解.因此,在  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML 浓度为低剂量水平(0.5~2.0  $\mu\text{mol/L}$ )时,血链球菌驱动的  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML/ $\text{H}_2\text{O}_2$  体系可以实现 4-氯酚持续有效地降解.

综上,通过考察 pH 值、温度、细胞密度和  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML 浓度对 4-氯酚降解效果的影响,发现在环境温度为 25  $^{\circ}\text{C}$ ,pH 值为 8, $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML 浓度为 2  $\mu\text{mol/L}$ ,血链球菌  $\text{OD}_{600}$  为 0.4 的条件下,4-氯酚在 3 h 内的去除率可达到 96.9%,初步证实血链球菌驱动的  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML/ $\text{H}_2\text{O}_2$  体系在此优化条件下可以实现 4-氯酚的高效降解.

## 3 结论

1) 构建的血链球菌驱动的  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML/ $\text{H}_2\text{O}_2$  降解体系对 4-氯酚的降解效果随着温度和细胞密度的增加而增加,随着  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML 浓度和 pH 值的增加呈现先增加后降低的趋势.

2) 血链球菌驱动的  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TAML/ $\text{H}_2\text{O}_2$  体系在低浓度的催化剂用量(2.0  $\mu\text{mol/L}$ )的条件下,利用微生物原位产生的  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,在优化条件下可降解去除水中约 97% 的 4-氯酚,并能减少对外源  $\text{H}_2\text{O}_2$  的依赖.

## 参考文献:

- [1] GHOSH M, SINGH K K, PANDA C, et al. Formation of a room temperature stable Fe(V)(O) complex: reactivity toward unactivated C-H bonds[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2014, 136(27): 9524–9527.
- [2] SU H R, YU C Y, ZHOU Y F, et al. Quantitative structure-activity relationship for the oxidation of aromatic organic contaminants in water by TAML/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>[J]. *Water Research*, 2018, 140: 354–363.
- [3] SHAPPELL N W, VRABEL M A, MADSEN P J, et al. Destruction of estrogens using Fe-TAML/peroxide catalysis[J]. *Environmental Science & Technology*, 2008, 42(4): 1296–1300.
- [4] CHAHBANE N, POPESCU D L, MITCHELL D A, et al. Fe<sup>III</sup>-TAML-catalyzed green oxidative degradation of the azo dye Orange II by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and organic peroxides: products, toxicity, kinetics, and mechanisms[J]. *Green Chemistry*, 2007, 9(1): 49–57.
- [5] CHANDA A, KHETAN S K, BANERJEE D, et al. Total degradation of fenitrothion and other organophosphorus pesticides by catalytic oxidation employing Fe-TAML peroxide activators[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128(37): 12058–12059.
- [6] KUNDU S M, CHANDA A, KHETAN S K, et al. TAML activator/peroxide-catalyzed facile oxidative degradation of the persistent explosives trinitrotoluene and trinitrobenzene in micellar solutions[J]. *Environmental Science & Technology*, 2013, 47(10): 5319–5326.
- [7] XIAN Z Y, LIANG S J, JIN X, et al. Application of Fe<sup>III</sup>-TAML/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system for treatment of fluoroquinolone antibiotics[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2021, 99: 110–118.
- [8] GUPTA S S, STADLER M, NOSER C A, et al. Rapid total destruction of chlorophenols by activated hydrogen peroxide[J]. *Science*, 2002, 296(5566): 326–328.
- [9] ZHANG J Z, ZHENG L H, WANG F, et al. The critical role of furfural alcohol in photocatalytic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production on TiO<sub>2</sub>[J]. *Applied Catalysis B: Environmental*, 2020, 269: 118770.
- [10] WANG J, CHEN Z W, CHEN H, et al. Effect of hydrogen peroxide on *Microcystis aeruginosa*: role of cytochromes P450[J]. *The Science of the Total Environment*, 2018, 626: 211–218.
- [11] SHERIFF T S, COPE S, EKWEGH M. Calmagite dye oxidation using in-situ generated hydrogen peroxide catalysed by manganese(II) ions[J]. *Dalton Transactions*, 2007(44): 5119–5122.
- [12] ASGHAR A, ABDUL RAMAN A A, WAN DAUD W M A. Advanced oxidation processes for in-situ production of hydrogen peroxide/hydroxyl radical for textile wastewater treatment: a review[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2015, 87: 826–838.
- [13] 谢会东,李洁,刘宁.泡沫镍原生过氧化氢类芬顿降解罗丹明 B[J].*环境科学与技术*,2020,43(5):1–5.
- [14] IMLAY J A. Pathways of oxidative damage[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2003, 57: 395–418.
- [15] 王丽莉,陈其御.产 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 乳酸杆菌对大肠杆菌的体外拮抗作用[J].*基础医学与临床*,2006,26(1):88–91.
- [16] BOLM M, JANSEN W T M, SCHNABEL R, et al. Hydrogen peroxide-mediated killing of *Caenorhabditis elegans*: a common feature of different streptococcal species[J]. *Infection and Immunity*, 2004, 72(2): 1192–1194.
- [17] MCKINZI A M, DICHRISTINA T J. Microbially driven Fenton reaction for transformation of pentachlorophenol [J]. *Environmental Science & Technology*, 1999, 33(11): 1886–1891.
- [18] 郑飞,孟歌,安琪,等.白腐真菌东方栓孔菌在两种液体培养基中产漆酶过程的生理学研究[J].*菌物学报*,2017,36(5): 582–597.
- [19] SEKAR R, DICHRISTINA T J. Microbially driven Fenton reaction for degradation of the widespread environmental contaminant 1, 4-dioxane[J]. *Environmental Science & Technology*, 2014, 48(21): 12858–12867.
- [20] SEKAR R, DICHRISTINA T J. Degradation of the recalcitrant oil spill components anthracene and pyrene by a microbially driven Fenton reaction[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2017, 364(21): fnx203.
- [21] RYAN C S, KLEINBERG I. Bacteria in human mouths involved in the production and utilization of hydrogen peroxide[J]. *Archives of Oral Biology*, 1995, 40(8): 753–763.

- [22] ZHU L, XU Y F, FERRETTI J J, et al. Probing oral microbial functionality: expression of *spxB* in plaque samples[J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e86685.
- [23] RAMOS-MONTAÑEZ S, TSUI H C, WAYNE K J, et al. Polymorphism and regulation of the *spxB* (pyruvate oxidase) virulence factor gene by a CBS-HotDog domain protein (SpxR) in serotype 2 *Streptococcus pneumoniae* [J]. *Molecular Microbiology*, 2008, 67(4): 729–746.
- [24] GEISZT M, WITTA J, BAFFI J, et al. Dual oxidases represent novel hydrogen peroxide sources supporting mucosal surface host defense[J]. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2003, 17(11): 1502–1504.
- [25] BADER H, STURZENEGGER V, HOIGN'E J. Photometric method for the determination of low concentrations of hydrogen peroxide by the peroxidase catalyzed oxidation of N, N-diethyl- p-phenylenediamine (DPD) [J]. *Water Research*, 1988, 22(9): 1109–1115.
- [26] 皮运正,王建龙.N,N-二乙基对苯二胺/辣根过氧化物酶法测定过氧化氢浓度时臭氧干扰的消除[J].*分析化学*,2005, 33(10):1516.
- [27] BARNARD J P, STINSON M W. Influence of environmental conditions on hydrogen peroxide formation by *Streptococcus gordonii*[J]. *Infection and Immunity*, 1999, 67(12): 6558–6564.
- [28] MINAH G E, LOESCHE W J. Sucrose metabolism by prominent members of the flora isolated from cariogenic and non-cariogenic dental plaques[J]. *Infection and Immunity*, 1977, 17(1): 55–61.
- [29] WANG C, GAO J, GU C. Rapid destruction of tetrabromobisphenol a by iron(III)-tetraamidomacrocyclic ligand/layered double hydroxide composite/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system[J]. *Environmental Science & Technology*, 2017, 51(1):488–496.
- [30] CHENG X Q, REDANZ S, CULLIN N, et al. Plasticity of the pyruvate node modulates hydrogen peroxide production and acid tolerance in multiple oral streptococci[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(2): e01697–17.
- [31] POLSHIN V, POPESCU D L, FISCHER A, et al. Attaining control by design over the hydrolytic stability of Fe-TAML oxidation catalysts[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130(13): 4497–4506.
- [32] TRUONG L, DENARDO M A, KUNDU S, et al. Zebrafish assays as developmental toxicity indicators in the green design of TAML oxidation catalysts[J]. *Green Chemistry*, 2013, 15(9): 2339–2343.