

自然(非灭菌)环境白腐真菌降解活性 艳红染料

高大文^{①②*} 文湘华^① 钱 易^①

(^① 清华大学环境科学与工程系, 环境模拟与污染控制国家重点实验室, 北京 100084;

^② 东北林业大学森林资源与环境学院, 哈尔滨 150040)

摘要 采用碳氮摩尔比分别为 56/2.2 和 28/44 的液体培养基, 进行了白腐真菌在非灭菌环境条件下对活性艳红染料的脱色实验. 结果显示, 在非灭菌环境下, 限氮液体培养基(C/N 摩尔比为 56/2.2)中的白腐真菌对活性艳红具有很高的脱色率, 脱色率最高达到 92%; 而限碳液体培养基(C/N 摩尔比为 28/44)很容易感染葡萄球菌等细菌, 从而使脱色反应停止. 而且, 感染细菌的体系 pH 变化很大, 脱色第 4 天时, pH 已升高到 9.31, 造成这一结果的主要原因是限碳反应体系发生了染菌现象. 因此, 初步确定在非灭菌环境中, 限氮液体培养基可在一定程度上抑制细菌生长, 而限碳液体培养基很容易感染细菌.

关键词 白腐真菌 黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*) 非灭菌条件 脱色 染料

20 世纪 80 年代《Science》首次报道了白腐真菌 *Phanerochaete chrysosporium* 能向胞外分泌降解木质素的酶, 使降解木质素研究取得了重大进展^[1]. 这一发现同时也引起环境界的广泛关注, 随后科研人员对白腐真菌生物学特性、降解规律、生化原理、酶学、分子生物学、工业化生产以及环境工程实际应用等方面进行了大量研究.

白腐真菌的降解活动只发生在次级代谢阶段, 当白腐真菌被引入废水中后, 由于生物具有的应激性将对营养限制(一些主要营养物质如氮、碳等缺乏时)作出应答反应, 从而形成一套酶系统^[2]. 这套酶系统主要包括产生 H₂O₂ 的氧化酶、需 H₂O₂ 的过氧化酶以及漆酶(Laccase)、还原酶、甲基化酶和蛋白酶等. 产生 H₂O₂ 的氧化酶主要有细胞内葡萄糖氧化酶和细胞外乙二醛氧化酶, 它们在分子氧参与下氧化底物而形成 H₂O₂, 从而激活过氧化酶, 启动酶的催化循

环. 需 H₂O₂ 的过氧化酶主要有木质素过氧化酶(Lignin peroxidase, LiP)和锰过氧化酶(Manganese peroxidase, MnP), 这些酶均在细胞内合成, 分泌到细胞外, 以 H₂O₂ 为最初氧化底物. 上述酶共同组成白腐真菌降解系统主体.

另外, 白腐真菌有别于其他细菌系统, 它在降解污染物时有其独特的优势^[2]: (1) 白腐真菌降解酶的诱导与降解底物的有无及多少无关; (2) 白腐真菌在细胞外对底物进行降解; (3) 白腐真菌对底物降解的广谱性; (4) 白腐真菌通过自由基过程实现对底物的降解; (5) 白腐真菌可在固、液两种体系对底物进行降解.

近年来, 许多研究表明在废水处理中白腐真菌(White rot fungi)是很有发展前景的微生物, 其中研究和讨论得最多的是黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*). 白腐真菌的胞外酶(包括木质素过氧化酶 LiPs、锰过氧化酶 MnPs 和漆酶 Lac)被认为

收稿日期: 2005-12-05; 接受日期: 2006-06-10

国家自然科学基金(批准号: 50478010)和中国博士后科学研究基金(批准号: 20040350022)资助项目

* 联系人, E-mail: gaodw@nefu.edu.cn

是降解木质素和其他难降解物质的特殊酶系. 这些酶具有非特异性、无需底物诱导等独特性能, 对许多有机污染物和不同类型的人工合成染料(如偶氮、三苯甲烷、酞菁染料)具有广谱的降解能力^[3-7]. 采用 *Phanerochaete chrysosporium* 对一些偶氮染料进行脱色, 已经发现了非常有意义的矿化(20%~48%)现象^[8].

尽管大多数研究的目标是评价白腐真菌氧化废水中污染物的能力, 但是, 目前对白腐真菌的研究绝大多数是在无菌操作下完成的, 即无论是反应器、培养基还是载体, 甚至含有染料的废水都是先经过灭菌后再投到反应器中的, 而且整个降解过程也是严格控制在无菌条件下运行. 而在非灭菌运行方式下(实际工程环境)使用白腐真菌的研究却很少见报道. 虽然在灭菌环境中白腐真菌对染料有较高的脱色效果, 并且脱色效果不随时间而降低. 但是在非灭菌环境, 细菌污染却很容易发生, 一旦发生将引起脱色效率的急剧下降^[9]. 因此, 如果在实际含染料废水处理中应用白腐真菌, 必须解决的问题就是反应体系染菌. 如果对实际工程中的反应器、培养液、载体以及废水都进行灭菌处理并保证处理过程不染菌, 显然将大大增加处理工艺的运行成本, 并且在实际工程中也是行不通的. 因此, 如何解决白腐真菌降解含染料废水过程中的染菌问题是该工艺能否应用到实际工程中的瓶颈. 不解决染菌问题, 该工艺则很难在实际工程中使用, 将会严重制约该项技术的发展.

白腐真菌的染菌问题已经引起国外科学家的重视, 并在最近几年刚刚开始了一些研究工作^[10,11]. 1999年 Leidig 等^[10]用聚乙烯醇包埋法保护了白腐真菌 *Trametes versicolor* 和细胞外产生的过氧化物酶免受细菌攻击, 达到对染料 Poly R-478 的连续生物氧化. 经过 65 d 的试验, 被细菌污染的聚乙烯醇小球仅在最外层到 50 μm 深度的区域存在污染, 扫描电镜观察到细菌并未深入聚乙烯醇小球内部. 2003年 Libra 等^[11]应用白腐真菌 *Trametes versicolor* 研究了非灭菌环境降解活性染料的控制策略. 实验结果显示, 在悬浮培养实验中, 培养液 pH 值降低到 3 以下都没有抑制细菌生长, 相反白腐真菌在此 pH 值时已停止生长和产酶; 单独使用粗酶液可以将白腐真菌生长和处理废水两个过程分开, 从而间接减小细菌对白腐真菌的影响. 但是实验发现, 在非灭菌环境使用酶液时酶活急剧降低, 最终影响对染料的脱色效果; 而采用

氮限制培养基获得了较好的抑菌效果. 另外, 采用谷物作为白腐真菌生长的唯一底物同时又作为载体的实验也获得了较好的抑菌效果, 并且对染料的脱色率依赖于接种带有白腐真菌的载体的量.

本文根据白腐真菌在次生代谢阶段产生降解活性染料的胞外木质素降解酶这一特点, 参考国外文献, 选择了限碳和限氮两种液体培养基进行非灭菌环境白腐真菌降解染料实验, 目的在于考察不同碳氮比液体培养基在抵御杂菌侵入上的差别, 初步建立有效抑制杂菌生长的液体培养基, 为最终提出非灭菌环境下白腐真菌降解染料废水的控制策略奠定基础.

1 实验方案设计

选择目前普遍采用的限氮(C/N 摩尔比为 56/2.2)和限碳(C/N 摩尔比 28/44)培养基, 并在培养基中加入约 4.3 g 的钢网(30 目)作为载体, 以固定 *Phanerochaete chrysosporium*. 在以上两种碳氮比液体培养基下进行实验, 选择灭菌培养 4 d, 非灭菌脱色 8 d, 即培养 4 d 后, 向液体培养基中添加活性艳红 K-2BP 染料 2 mL/瓶, 使体系染料终浓度为 20 mg/L. 并结合显微镜和扫描电镜观察不同碳氮比培养基中 *Phanerochaete chrysosporium* 及其他细菌和真菌的生长情况.

2 材料与方法

2.1 菌种

采用的白腐真菌菌种是由本实验室保存的 *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F-1767(ATCC24725).

2.2 染料

实验中所选染料为活性艳红 K-2BP, 属于偶氮染料. 其结构式如图 1 所示.

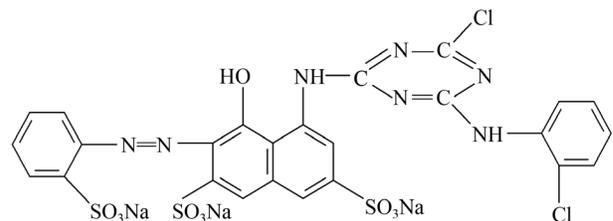


图1 活性艳红结构式

2.3 培养基

固体培养基: 采用 PDA 培养基, 即马铃薯浸出液 200 g/L, 葡萄糖 20 g/L, 琼脂 20 g/L.

液体培养基: 白腐真菌生长培养基参照 Tien 和 Kirk 的 *Phanerochaete chrysosporium* 基本培养基配制^[12], 成分如下: KH_2PO_4 2.0 g/L, MgSO_4 0.5 g/L, CaCl_2 0.1 g/L, 20 mmol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 4.4), MgSO_4 0.21 g/L, MnSO_4 35 mg/L, NaCl 70 mg/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 7 mg/L, CoCl_2 7 mg/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 7 mg/L, CuSO_4 7 mg/L, $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.7 mg/L, H_3BO_3 0.7 mg/L, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.7 mg/L, 次氨基三乙酸盐 0.105 g/L, 1.5 mmol/L 藜芦醇。

为获得限碳和限氮液体培养基, 对 Tien 和 Kirk 培养基进行了部分调整. 在限碳液体培养基中葡萄糖和酒石酸氨浓度分别为 5.5 和 4.06 g/L, 而限氮液体培养基是在前期研究的基础上, 经对液体培养基碳氮比优化获得的具有最佳产过氧化物酶量的限氮培养基^[13], 其葡萄糖和酒石酸氨浓度分别为 11 和 0.203 g/L, 使得到的两种类型液体培养基的碳氮摩尔比为 28/44 和 56/2.2. 接种前无菌过滤加入 VB_1 溶液, 使其浓度为 1 mg/L.

2.4 培养条件

将斜面上的菌种接种到 PDA 培养基平板上于 32°C 下培养 5~7 d, 用接种针剥取适量孢子入无菌水中制成孢子悬浊液, 等量接入含 100 mL 液体培养基的一系列 250 mL 锥形瓶中, 每瓶中相当于接入 1×10^5 孢子/mL. 然后放入温度为 37°C 的恒温摇床中, 在空气条件下培养, 转速设为 160 r/min. 培养过程中每天定时取样, 对于所要考察的每种情况同时进行 3 组平行实验, 实验结果取其平均数值.

2.5 分析方法

主要仪器和试剂: 可见光分光光度计(UV-1200V, SHIMADZU), 可见紫外光分光光度计(UV-2401PC, SHIMADZU);

藜芦醇、2,2'-连氮-二(3-乙基苯并噻唑-6 磺酸)(简称 ABTS)和次氨基三乙酸盐均为 Fluka 公司产品, 其余药品均为分析纯试剂.

粗酶液制备: 样品经离心(9000 r/min, 10 min)得到上层清液, 用于酶活测定.

酶活测定: 木质素过氧化物酶(LiP)采用 Tien 和 Kirk(1998)方法^[14], 定义每 1 min 氧化 1 μmol 藜芦醇成藜芦醛所需的酶量为 1 个酶活力单位.

锰过氧化物酶(MnP)采用 Paszczyński 方法^[15], 定

义每 1 min 氧化 1 μmol Mn^{2+} 为 Mn^{3+} 所需的酶量为 1 个酶活力单位.

脱色率计算: 首先采用可见光分光光度计测出目标染料活性艳红 K-2BP 的最大吸收波长位于 533 nm 处, 然后对已加入活性艳红的锥形瓶每隔一定时间取样, 离心后测定不同时间在此波长处的吸光度值. 设不接菌的活性艳红-培养液的吸光度为 A_0 , 接入白腐真菌后不同时间取样测得的吸光度为 A_t , 则脱色率 (%) = $[(A_0 - A_t)/A_0] \times 100\%$.

3 结果与讨论

3.1 应用限碳和限氮培养基在非灭菌环境对活性艳红的脱色情况

白腐真菌纯培养 4 d 后, 在非灭菌环境加入事先配好的未经灭菌处理的活性艳红 K-2BP 溶液, 使反应体系染料浓度达到 20 mg/L. 之所以选择纯培养 4 d 后投加染料, 是因为尽量在过氧化物酶酶活出现高峰前投加染料. 因为过氧化物酶酶活出现高峰后很快消失, 如果在酶活出现高峰后投加染料, 那么系统降解染料的效率将大大降低^[13]. 刚加入活性艳红 K-2BP 时, 限碳培养基(C/N 摩尔比为 28/44)的脱色率要高于限氮培养基(C/N 摩尔比为 56/2.2), 其投加染料 1 h 后的脱色率为 14%, 而限氮培养基仅为 8%(图 2). 这主要是因为限碳培养基培养的白腐真菌有木质素过氧化物酶(LiP)产生, 而限氮培养基培养的白腐真菌只有锰过氧化物酶(MnP)产生, 如图 3 所示, 而 LiP 比 MnP 具有更强的脱色能力^[16]. 图 3 还显示 LiP

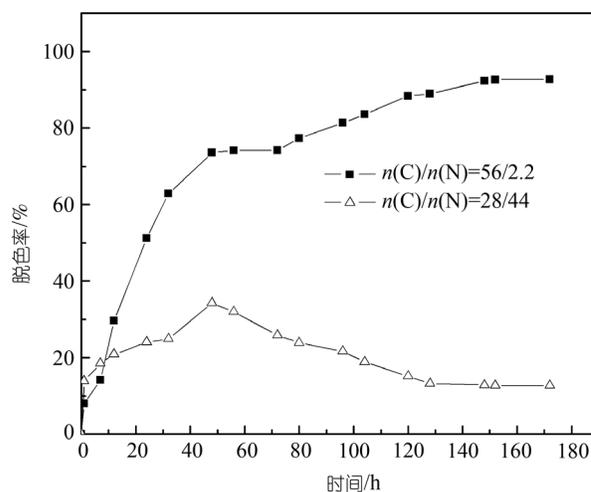


图 2 非灭菌环境不同 C/N 摩尔比培养基中的白腐真菌对染料的脱色情况

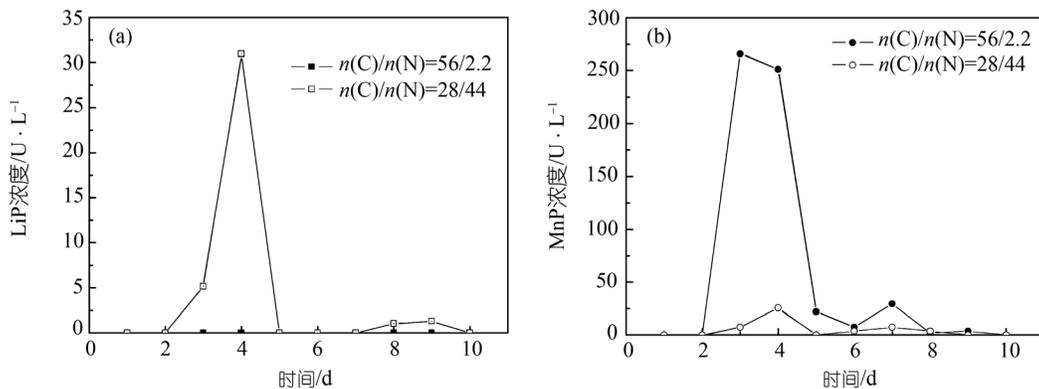


图3 非灭菌环境不同 C/N 摩尔比培养基中的白腐真菌分泌过氧化物酶情况
(a) LiP; (b) MnP

在第4天出现高峰后,随后很快消失.因此,在染料加入后的第1个小时,限碳体系比限氮体系的脱色率高.然而,继续实施非灭菌操作(取样、培养均是在敞开体系进行,即所有操作均不在无菌操作台上进行),两种培养基下的白腐真菌对活性艳红 K-2BP 的脱色效果发生了逆转.加入活性艳红 K-2BP 24 h 后,采用限氮培养基的反应体系的脱色率上升到 51%,而采用限碳培养基的反应体系溶液开始变混浊,样品经高速离心分离后,测定得到该反应体系的脱色率仅为 24%,不到限氮培养基的一半;脱色 48 h 后,限氮培养基反应体系的脱色率达到 74%,而限碳培养基的脱色率仅比脱色 24 h 时提高了 10%,为 34%.随后的实验发现,48 h 的脱色率是限碳培养基的最高脱色率,即脱色率不再增长;而限氮培养基反应体系对活性染料的脱色率却仍随着脱色时间的延长而增长,至 148 h 时达到脱色高峰,脱色率达到 92%.从培养基变混浊和气味变化上,初步判断限碳培养基反应体系感染了杂菌.关于限碳培养基所染杂菌类型将在 3.3 节中进行详细论述.另外,实验中发现的另一个有趣的现象是,在反应体系感染杂菌之前,采用限碳培养基进行活性艳红 K-2BP 的脱色效果要优于采用限氮培养基.造成这一结果的主要原因是白腐真菌在两种营养物质限制条件下产生的酶不同,而不同的木质素降解酶对活性艳红 K-2BP 的脱色效率也是不一样的.

由此可以得出,培养基为限氮(C/N 摩尔比为 56/2.2)时,白腐真菌对活性艳红 K-2BP 的脱色效果不受杂菌影响,脱色效果较好,反应体系具有较强的抗杂菌污染能力;培养基为限碳(C/N 摩尔比为 28/44)

时,白腐真菌对活性艳红 K-2BP 的脱色效果受杂菌影响较大,通过试验观察到脱色反应在非灭菌环境运行 2 d 时就已经停止,而反应溶液仍显示出很深的颜色,反应体系的抗杂菌污染能力较弱.

3.2 非灭菌环境限碳和限氮液体培养基 pH 值的变化情况

白腐真菌同其他微生物一样有一定的酸碱适应范围,低于或高于这一范围,将对白腐真菌的生长、产酶以及脱色都不利.研究发现白腐真菌 *Phanerochaete chrysosporium* 在 pH 值为 3~5 时对染料废水具有最大的脱色能力^[17].

为了考察非灭菌环境限碳和限氮液体培养基中白腐真菌对活性艳红 K-2BP 脱色时 pH 值的变化情况以及体系感染杂菌后是否会影响体系的 pH,从加入活性艳红 K-2BP 时,就对这两种脱色反应体系的 pH 值进行了检测,结果如图 4 所示.

由图 4 可以看出,在灭菌培养前 4 d,无论是限氮还是限碳培养条件,体系 pH 均较稳定,始终维持在 4~5 之间.但当在非灭菌环境投加染料后,限碳培养基(C/N 摩尔比为 28/44)的 pH 值开始持续上升,到第 8 天时(脱色第 4 天)达到 pH 9.31 左右,随后 pH 值上升幅度变小,到第 10 天时(脱色第 6 天)基本维持在 9 左右.而限氮培养基(C/N 摩尔比为 56/2.2)的 pH 值在整个 6 d 的脱色过程中基本没有变化,始终保持在 4.5 左右,与纯灭菌环境培养相似.由此说明,限碳培养基反应体系对活性艳红的脱色到第 2 天时基本停止是与该体系 pH 值的变化有关,从另一个侧面也说明反应体系 pH 的上升影响了白腐真菌的生长、产酶

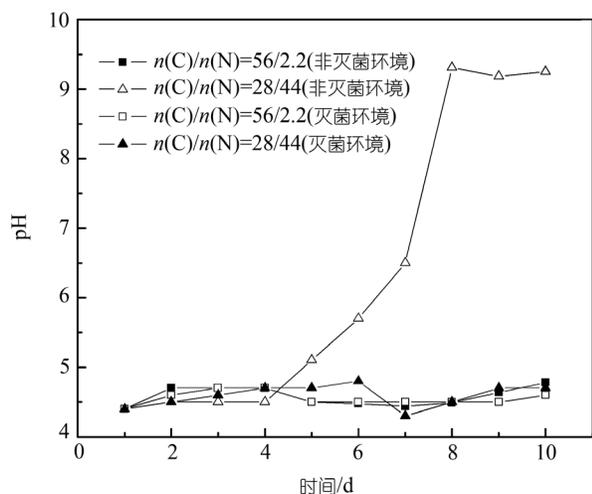


图 4 不同 C/N 摩尔比培养基的 pH 值在灭菌和非灭菌条件下随脱色时间的变化情况

和脱色. 而造成 pH 值上升的原因可能是非灭菌条件下细菌的侵入. 因为绝大多数细菌生长适宜的 pH 值范围偏中性, 因此, 一旦反应体系感染细菌, 细菌在繁殖过程中也会分泌一些物质来调节反应体系的 pH 值使其有利于细菌生长, 从而导致反应体系 pH 值的上升. 结合图 2 进一步证明, 正是限碳培养基的染菌, 使得体系 pH 持续增加, 最终超过白腐真菌正常生长的 pH 范围, 造成其分泌木质素降解酶的下降, 进而可能引起白腐真菌的死亡, 导致脱色率下降. 图 4 还标明了灭菌条件下限氮和限碳培养基的 pH 值随脱色时间的变化情况, 由图可以看出, 在灭菌条件下, 无论培养基采用氮限制还是碳限制, 白腐真菌对活性艳红脱色过程中的 pH 值始终维持在 4.5 左右. 因此,

可以得出当脱色反应体系没有细菌侵入时, 白腐真菌是反应体系的主要菌种, 为了维持自身的生长和代谢活动, 它会分泌一些酸性物质来保持其生存环境的 pH 值在最佳范围内.

3.3 非灭菌环境限碳和限氮液体培养基的染菌情况

为了准确评价限碳和限氮两种培养体系在非灭菌环境降解染料时的染杂菌情况, 对非灭菌脱色 6 d 后的液体培养基进行了扫描电镜观察, 结果如图 5 和图 6 所示. 从图 5 可以看出, 限碳液体培养基感染的杂菌主要为葡萄球菌, 而且数量很多. 因此, 可以得出, 正是这些葡萄球菌争夺了培养基中的营养物质, 并分泌碱性物质使体系 pH 升高, 造成白腐真菌因缺乏营养底物和处于不利于产木质素降解酶的 pH 环境而使其活性降低, 最终影响对染料的降解. 实验中还发现, 尽管限氮液体培养基脱色 6 d 后反应溶液较澄清, 但该体系也感染了杂菌(见图 6). 从图 6 可以看出, 限氮条件液体培养基感染的杂菌与限碳条件有较大不同, 从杂菌的类型上看, 该培养条件主要感染酵母真菌, 此外, 还有少量杆菌. 因为酵母菌的适宜 pH 范围较广, 从 pH 2.2 到 pH 8.0, 它都能很容易生存和繁殖, 因此, 在感染了酵母菌的体系, pH 波动很小(见图 4). 这样, 从白腐真菌产酶对体系 pH 要求来说, 感染酵母菌的体系对白腐真菌后续降解活性染料影响很小; 但从营养物消耗来说, 感染了酵母菌的体系不利于白腐真菌生长和进一步产酶. 这一结果在后续的实验当中也得到了验证. 因此, 为了使限氮条件液体培养基在非灭菌环境有持久的抑制杂菌生长的

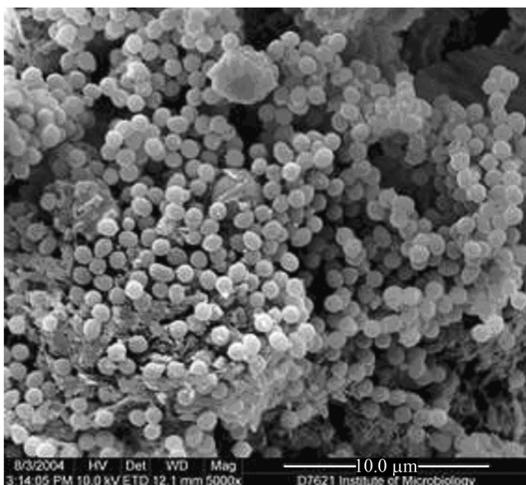


图 5 限碳液体培养基非灭菌脱色 6 d 后体系的染菌情况

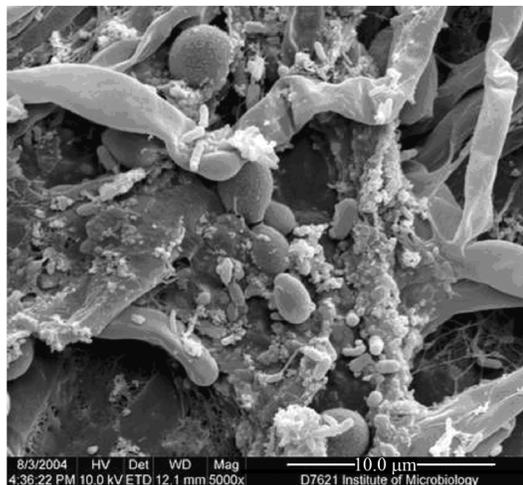


图 6 限氮液体培养基非灭菌脱色 6 d 后体系的染菌情况

能力, 必须找到合适的控制方法避免或降低体系感染酵母菌。另外, 从培养基溶液外观和显微镜观察发现, 在染菌程度上限氮条件低于限碳条件, 而且, 在染菌时间上限氮条件要晚于限碳条件。因此, 可以初步确定, 限氮条件液体培养基相比限碳条件液体培养基更有利于抑制杂菌。

4 结论

(1) 在非灭菌条件下, 初步确定限氮液体培养基(C/N 摩尔比为 56/2.2)容易抑制细菌生长, 使该培养基下的白腐真菌在非灭菌环境对活性艳红仍具有很高的脱色率, 脱色率最高达到 90%以上; 而限碳液体培养基(C/N 摩尔比为 28/44)很容易感染细菌, 从而使脱色反应停止。

(2) 在非灭菌条件下, 限氮液体培养基培养出的白腐真菌在对活性艳红脱色过程中, 能够始终维持反应体系的 pH 值在 4.5 左右, 使白腐真菌的生长、产酶以及脱色均处在最佳的 pH 范围; 而碳限制液体培养基培养出的白腐真菌在对活性艳红脱色过程中, 由于染菌使得反应体系的 pH 值发生了很大变化, pH 值最高达到 9.31, 该 pH 值已严重影响了白腐真菌的生长、产酶和脱色能力。

(3) 通过扫描电镜观察, 限碳液体培养基主要感染葡萄球菌, 而且感染的量很大; 而限氮液体培养基主要感染的是酵母真菌和极少量的杆菌。通过机理分析得出, 正是限碳和限氮两种条件培养基所染杂菌的不同, 使得白腐真菌在后续对活性染料的降解效果表现出不同的特点。因此, 建议在今后的研究中以限氮液体培养基为非灭菌环境使用白腐真菌降解活性染料的基本培养基, 并在此基础上, 通过调整培养基其他组分开发出有较强抑制酵母菌生长的抑菌培养基。

参 考 文 献

- Tien M, Kirk T K. Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium*, *Science*, 1983, 221: 661—663
- 李慧蓉. 白腐真菌的研究进展. *环境科学进展*, 1996, 4(6): 69—77
- Heinfling A, Bergbauer M, Szewzyk U. Biodegradation of azo and phthalocyanine dyes by *Trametes versicolor* and *Bjerkandera adusta*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1997, 48(2): 261—266
- Borchert M, Libra J A. Decolorization of reactive dyes by the white rot fungus *Trametes versicolor* in sequencing batch reactors. *Biotechnol Bioeng*, 2001, 75(3): 313—321
- Swamy J, Ramsay J A. The evaluation of white rot fungi in the decoloration of textile dyes. *Enzyme Microb Technol*, 1999, 24(3-4): 130—137
- Lorenzo M, Moldes D, Couto S R, Sanroman A. Improving laccase production by employing different lignocellulosic wastes in submerged cultures of *Trametes versicolor*. *Bioresource Technol*, 2002, 82(2): 109—113
- Novotny C, Rawal B, Bhatt M, Patel M, Sasek V, Molitoris H P. Capacity of *Irpex lacteus* and *Pleurotus ostreatus* for decolorization of chemically different dyes. *J Biotechnol*, 2001, 89(2-3): 113—122
- Spadaro J T, Gold M H, Renganathan V. Degradation of azo dyes by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol*, 1992, 58: 2397—2401
- Heinfling A, Martinez M J, Martinez A T, Bergbauer M, Szewzyk U. Transformation of industrial dyes by manganese peroxidases from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a manganese-independent reaction. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64(8): 2788—2793
- Leidig E, Prusse U, Vorlop K D, Winter J. Biotransformation of Poly R-478 by continuous cultures of PVAL-encapsulated *Trametes versicolor* under non-sterile conditions. *Bioprocess Eng*, 1999, 21(1): 5—12
- Libra J A, Borchert M, Banit S. Competition strategies for the decolorization of a textile-reactive dye with the white-rot fungus *Trametes versicolor* under non-sterile conditions. *Biotechnol Bioeng*, 2003, 82(6): 736—744
- Tien M, Kirk T K. Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods Enzymol*, 1988, 161: 238—249
- Gao D W, Wen X H, Qian Y. Effect of nitrogen concentration in culture mediums on growth and enzyme production of *Phanerochaete chrysosporium*. *J Environ Sci*, 2005, 17(2): 190—193
- Tien M, Kirk T K. Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods Enzymol*, 1988, 161: 238—249
- Paszczynski A, Crawford R L, Huynh V B. Manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: purification. *Methods Enzymol*, 1988, 161: 264—270
- 章燕芳, 李华钟, 华兆哲, 陈坚. 木质素过氧化物酶和锰过氧化物酶对染料脱色的性能比较. *环境科学研究*, 2002, 15(5): 17—21
- Mahnaz M A, Khosrow R, Majid S, Mehrdad A. Decolorization of textile wastewater by *Phanerochaete chrysosporium*. *Desalination*, 2001, 141: 331—336