

· 环境生物技术 ·

白腐真菌对酸性橙 7 的脱色降解

游梦思, 赵振, 陈敏*, 耿艺帆

浙江工商大学食品与生物工程学院, 浙江 杭州 310018

游梦思, 赵振, 陈敏, 耿艺帆. 白腐真菌对酸性橙 7 的脱色降解[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3436-3450.

YOU Mengsi, ZHAO Zhen, CHEN Min, GENG Yifan. Decolorization and biodegradation of acid orange 7 by white-rot fungi[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3436-3450.

摘要: 偶氮染料广泛应用于纺织、造纸和包装等行业, 因其具有三致性、结构稳定且难降解, 已成为染料废水处理的研究热点之一。本研究以白腐真菌作为脱色菌株, 考察了不同白腐真菌对偶氮类染料酸性橙 7 (acid orange 7, AO7) 的脱色降解, 探讨了 AO7 染料的浓度、pH、温度以及脱色时间对染料脱色率的影响, 同时应用紫外-可见光谱吸收法、红外光谱吸收法、高效液相色谱法和气相色谱-质谱法对 AO7 的降解产物进行分析, 并对其产物进行植物毒性实验, 以推断 AO7 可能的降解途径及其降解产物的毒性。结果表明: 在 pH 4.5、28 °C 条件下, 刺芹侧耳(*Pleurotus eryngii*) 和杂色云芝(*Trametes versicolor*) 的混合菌丝脱色降解 100 mg/L AO7, 24 h 脱色率可达 93.46%。推测 AO7 可能的生物降解途径: AO7 偶氮键断裂生成对氨基苯磺酸和 1-氨基-2-萘酚; 接着对氨基苯磺酸脱去磺酸基, 生成对苯二酚; 同时 1-氨基-2-萘酚开环生成邻苯二甲酸和对羟基苯甲醛, 之后进一步降解生成苯甲酸; 最后对苯二酚和苯甲酸继续氧化成其他小分子中间体、H₂O 和 CO₂。植物毒性实验表明, *P. eryngii* 和 *T. versicolor* 混合菌丝对 AO7 脱毒效果较好。以上研究为探究白腐真菌在工业废水中降解偶氮类染料的应用奠定基础。

关键词: 白腐真菌; 酸性橙 7; 生物降解路径; 植物毒性

资助项目: 浙江省科技厅专项项目基金(2014C33027); 浙江省重中之重一级学科(2017SIAR201); 校企合作研发项目(2021330101001368)

This work was supported by the Special Project Foundation of Zhejiang Provincial Department of Science and Technology (2014C33027), the Zhejiang Top Priority First Level Discipline (2017SIAR201), and the Cooperative Research and Development Project of College and Institution (2021330101001368).

*Corresponding author. E-mail: chenmin@zjgsu.edu.cn

Received: 2022-12-06; Accepted: 2023-05-04

Decolorization and biodegradation of acid orange 7 by white-rot fungi

YOU Mengsi, ZHAO Zhen, CHEN Min*, GENG Yifan

College of Food Science and Biotechnology Engineering, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310018, Zhejiang, China

Abstract: Azo dyes are widely used in textile, paper and packing industries, and have become one of the research hot spots in dye wastewater treatment because of their carcinogenicity, teratogenic mutagenicity, stable structure and degradation difficulty. In this study, the biodecolorization of acid orange 7 (AO7), an azo dye, by different white rot fungi was investigated, and the effect of different conditions on the decolorization rate of the dye was analyzed. At the same time, the degradation liquor was analyzed and the phytotoxicity experiment was performed to deduce the possible degradation pathway of AO7 and assess the toxicity of its degradation products. The results showed that the decolorization rate reached 93.46% in 24 h at pH 4.5, 28 °C by *Pleurotus eryngii* and *Trametes versicolor* when AO7 concentration was 100 mg/L. The biodegradation pathway of AO7 was initiated by the cleavage of the azo bond of AO7, generating p-aminobenzenesulfonic acid and 1-amino-2-naphthol. Subsequently, the sulfonic acid group of p-aminobenzene sulfonic acid was removed to generate hydroquinone. Moreover, the 1-amino-2-naphthol was de-ringed to generate phthalic acid and p-hydroxybenzaldehyde, and then further degraded into benzoic acid. Finally, hydroquinone and benzoic acid may be further oxidized into other small molecules, carbon dioxide and water. Phytotoxicity experiment showed that the toxicity of AO7 could be reduced by *P. eryngii* and *T. versicolor*.

Keywords: white-rot fungi; acid orange 7; biodegradation pathway; phytotoxicity

偶氮染料是一类含有一个或多个偶氮基(-N=N-)的合成染料, 它种类多且广泛应用于纺织、造纸、包装、皮革、化妆品和医药等行业^[1-2]。含偶氮染料的废水若直接排放到环境水体中不仅会影响水体的色度, 破坏水生生态系统, 而且会对人体健康造成危害, 甚至能引起致癌、致畸、致突变作用^[3]; 所以探索有效的方法从水体中移除偶氮染料至关重要, 已引起了世界各国的广泛关注。

目前已有许多物理化学方法用于工业废水中偶氮染料的去除, 如凝集-絮凝^[4]、物理吸附^[5]、高级氧化技术^[6]和光催化降解^[7]等。尽管这些方法取得了较好的脱色效果, 但它们自身

均具有局限性, 如成本高、产生大量污泥造成二次污染和效率低等^[1,8], 所以无法大规模使用。生物法因环境友好、高效和低成本等优点近年来被广泛应用于偶氮染料脱色降解的研究^[9-10]。Kalyani 等^[11]利用从纺织工业废物处理场土壤中分离出的新型假单胞(*Pseudomonas* sp.) SUK1 对偶氮染料活性红 2 脱色, 在 300–1 000 mg/L 浓度范围内, 24 h 脱色率可超过 90%; Baena-Baldiris 等^[12]利用从哥伦比亚一矿区分离得到的一株弗兰科尼巴氏杆菌对 100 mg/L 偶氮染料甲基橙和丽春红脱色 120 h 后, 脱色率达 95%以上。虽然细菌对偶氮染料有较好的脱色效果, 但其对偶氮染料降解不彻底, 常伴有

强毒性物质芳香胺类化合物的产生, 废水难以直接排入环境^[13-14]。白腐真菌是一类能引起木质素白色腐烂的丝状真菌的集合^[15], 大多数是担子菌和子囊菌。因其具有对环境中的各种复杂化合物如烷烃类、多环芳烃、酚类等化合物进行降解的能力, 它已成为环境工程应用开发的宝贵资源。目前采用白腐真菌处理印染废水已成为新的研究热点, 它们通过生长过程中分泌的木质素降解酶系对偶氮染料进行生物降解, 在酶的作用下染料分子发生氧化降解反应, 进而对染料分子起到脱毒作用, 在适宜的条件下还可以实现对染料的完全矿化^[16-17]。Iark 等^[18]考察了奥德曼丝菌(*Oudemansiella canarii*)产生的漆酶对偶氮染料刚果红的脱色能力, 结果表明在酶浓度为 5 U/L, 染料浓度 50 mg/L、脱色 24 h 脱色率为 80%, 且脱色 24 h 降解液毒性降低了 92.5%。司静等^[19]利用绒毛栓孔菌(*Trametes pubescens*)对 80 mg/L 刚果红进行脱色降解研究, 脱色 7 d, 脱色率达 80.52%; 植物毒性实验结果表明, 绒毛栓孔菌对染料有较好的脱毒作用。

AO7 是一种典型的单偶氮阴离子染料, 由于其色泽鲜艳、着色较稳定、廉价等优势, 被广泛用于各种丝织品的染色。近年来, 已建立了多种物理化学法进行 AO7 脱色^[20-22], 而有关 AO7 的生物脱色降解及其降解机制的研究鲜有报道。因此, 本文探究了不同条件下白腐真菌对偶氮染料 AO7 的脱色及其降解机理, 这将为应用生物法处理偶氮类染料废水奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌种

刺芹侧耳(*Pleurotus eryngii*_{C0007}, *P. eryngii*_{C0007})、杂色云芝(*Trametes versicolor*_{gs027}, *T. versicolor*_{gs027})、黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*_{gs044},

*P. chrysosporium*_{gs044}), 均由本实验室选育保藏, 出发菌株购自广东省微生物研究所菌种保藏中心。

1.1.2 培养基

液体种子培养基(g/L): 葡萄糖 20, 麦芽糖 10, MgSO₄·7H₂O 0.5, KH₂PO₄ 4, 浓缩酵母浸出粉 2, 胰蛋白胨 2。

固体种子培养基: 在液体培养基基础上添加 20 g/L 琼脂即得。

液体发酵培养基(g/L): 葡萄糖 10, 麦芽糖 10, MgSO₄·7H₂O 0.5, KH₂PO₄ 4, 浓缩酵母浸出粉 2, 胰蛋白胨 2。

1.1.3 染料

酸性橙 7 (AO7)购自国药集团化学试剂有限公司, 相对分子量为 350.32 Da。

1.2 方 法

1.2.1 脱色实验

将 3 株供试菌株接种平板, 28 °C 培养 5 d。取大小一致的菌块分别接入 100 mL 液体种子培养基, 在 28 °C、150 r/min 条件下培养 3-5 d。将培养好的种子培养液按 10%的接种量分别接入发酵培养基中, 28 °C、150 r/min 条件下培养 6 d, 无菌条件下过滤收集菌丝。在 250 mL 锥形瓶中加入 100 mL 乙酸钠-乙酸缓冲液和 20 g 菌丝体(湿重), 之后按照实验设定添加染料, 150 r/min 条件下进行染料脱色实验。分别研究不同白腐真菌及组合、染料的不同浓度(50、100、150、200 mg/L)、脱色温度(23、28、33、38 °C)、体系 pH (3、3.5、4.0、4.5、5.0) 和脱色时间对脱色率的影响。

1.2.2 脱色率及木质素降解酶的酶活测定

(1) 脱色率。用分光光度法测定并计算某一脱色时间脱色体系中剩余染料浓度 a_1 (a 为原染料浓度), 则染料脱色率 η 按式(1)计算^[23]:

$$\eta = (a - a_1) / a \times 100\% \quad (1)$$

(2) 木质素降解酶的酶活。降解液经 4 °C、10 000 r/min 离心 5 min 后取上清用于木质素降

解酶酶活的测定^[24], 3 mL 体系中含有 0.3 mL 2,2-联氨基双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二氨盐 [2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate), ABTS-(NH₄)₂] (5 mmol/L), 1.5 mL 乙酸-乙酸钠缓冲液(0.1 mol/L, pH 5)和 1.2 mL 经一定比例稀释后的降解液, 在室温下反应 3 min, 测其反应前后在 436 nm 下吸光度值的变化。酶活的定义为 1 min 催化 1 μmol 底物所需的酶量为一个酶活单位 U。按式(2)计算

$$\text{酶活} = 10^6 \times (V_{\text{总}}/V_{\text{酶}}) \times (\Delta A/\Delta t) / \varepsilon \quad (2)$$

式中: $V_{\text{总}}$ 为反应体系体积; $V_{\text{酶}}$ 为加入酶的体积; ΔA 为吸光度值变化量; Δt 为反应时间; ε 为摩尔吸光系数。

1.2.3 紫外-可见吸收光谱分析

取 100 mg/L AO7 溶液和 6、24 h 的降解液上清, 用 UV-3200 pc Spectrophotometer 在 200–600 nm 范围内分别对其进行紫外-可见全波长扫描。

1.2.4 傅里叶红外光谱分析

取 100 mg/L AO7 原溶液及其 24 h 的降解液, 12 000 r/min 离心 2 min 后取其上清, 经 0.45 μm 孔径膜过滤, 滤液冻干成粉末, 溴化钾压片, 用傅里叶红外光谱仪(NICOLET-380)进行红外吸收光谱检测, 波长为 4 000–400 cm⁻¹^[25]。

1.2.5 高效液相色谱分析

取 100 mg/L AO7 原溶液及其 24 h 和 48 h 的降解液, 经 0.22 μm 膜过滤后进行高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)分析。HPLC 条件: Phenomenex Gemini C18 色谱柱(5 μm, 150 mm×4.6 mm), 紫外检测器, 流动相为甲醇与 33 mmol/L pH 7.0 的磷酸盐缓冲液(1:1), 检测波长为 254 nm, 柱流速为 1 mL/min, 进样量为 20 μL, 柱温为 30 °C^[26]。

1.2.6 气相色谱-质谱分析

取 48 h 的降解液上清 20 mL, 用相同体积的二氯甲烷萃取 3 次, 将 3 次萃取液合并。合并

后的萃取液先通过无水硫酸钠充分干燥, 再经氮吹仪吹干, 然后用正己烷溶解, 最后经 0.22 μm 有机膜过滤后用 7890A-5975C 气相色谱-质谱联用仪进行气相色谱质谱联用(gas chromatograph-mass spectrometer, GC-MS)分析。GC-MS 条件: DB-5MS 气相色谱柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm), 进样口温度 250 °C, 进样体积 1 μL, 柱流速 1 mL/min, 采用不分流模式, 柱温 40 °C 保持 2 min, 然后以 12 °C/min 上升至 100 °C, 再以 5 °C/min 上升至 200 °C, 最后以 20 °C/min 上升至 270 °C 并保持 10 min, 选用电子轰击(electron impact, EI)离子源, 离子源温度为 230 °C, 四级杆温度为 150 °C, 电子倍增器电压(electronic multiplier voltage, EMVolts)为 1 953 eV, 质量数扫描范围为 50–550 amu^[27]。

1.2.7 植物毒性实验

用二氯甲烷对 48 h 降解液上清进行萃取, 萃取液经旋蒸至结晶, 加蒸馏水溶解, 使其浓度达 100 mg/L 开展植物毒性实验, 同时以蒸馏水和 100 mg/L 的 AO7 原溶液作为对照进行植物毒性实验。选择小麦种子作为研究材料, 先将小麦种子在蒸馏水中浸泡 8–10 h, 待种子吸水饱和, 从其中选取膨胀的 90 粒, 每 30 粒种子为一组, 分为 3 组, 每组种子的总重量相同。将每组种子均匀置于 3 个铺有育苗纸的培养皿上, 每个培养皿 10 粒种子, 然后每天分别给 3 组种子喷洒 48 h 降解液上清, AO7 原溶液和蒸馏水 3–5 次, 每次 1 mL, 置于室温条件下萌发。并于 4 d 后检测种子的萌发率(%)、胚根长度(cm)、胚芽长度(cm)和种子鲜重(g)^[23]。

2 结果与分析

2.1 脱色实验

2.1.1 不同白腐真菌对 AO7 脱色率的影响

由于不同白腐真菌所分泌的木质素降解酶

有所不同,且不同的木质素降解酶对同一种底物的降解能力有所区别^[28],因此在AO7浓度为50 mg/L, 28 °C、pH 4.0条件下考察不同白腐真菌(刺芹侧耳、杂色云芝、黄孢原毛平革菌及以1:1混合得到混菌菌丝组合)对AO7的脱色能力,结果见图1。图1表明脱色24 h,混菌脱色能力强于单菌脱色,这可能是由于不同白腐真菌主要产的木质素降解酶不同,而不同的酶之间存在一定的协同作用^[15]。混菌脱色组中,*P. eryngii* & *T. versicolor*脱色率最高,达93.15%,与其他5组有显著差异,故选取*P. eryngii* & *T. versicolor*进行下一步AO7脱色条件优化。

2.1.2 染料浓度对脱色率的影响

在pH 4、28 °C条件下,在0.5、6、12、24、36、48 h取样,考察不同浓度AO7对混合菌丝脱色的影响,结果如图2所示。图2表明,脱色12 h时,体系脱色率随AO7浓度升高呈下降趋势,50 mg/L条件下脱色率达84.07%,而250 mg/L条件下仅为66.33%。当脱色24 h时,低浓度的

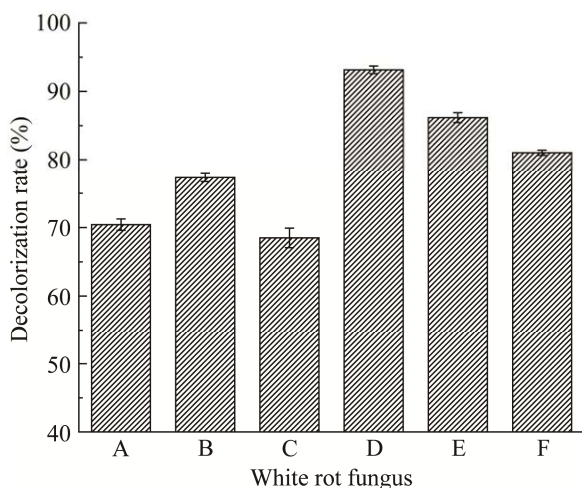


图1 不同白腐真菌对AO7脱色率的影响

Figure 1 Effect of different white rot fungi and their combination on decolorization rate of AO7. A: *P. eryngii*. B: *T. versicolor*. C: *P. chrysosporium*. D: *P. eryngii* & *T. versicolor*. E: *P. eryngii* & *P. chrysosporium*. F: *T. versicolor* & *P. chrysosporium*.

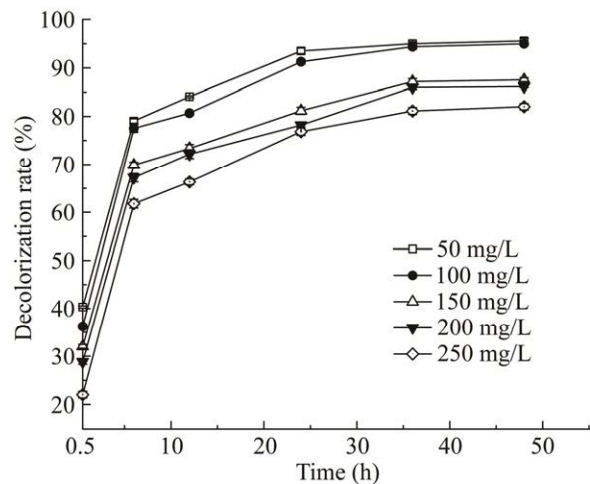


图2 AO7浓度对体系脱色率的影响

Figure 2 Effect of AO7 concentrations on decolorization rate.

50、100 mg/L两组体系脱色率分别为93.49%、91.27%,显著高于其他高浓度组(150、200、250 mg/L)。这一结果与Chen等^[29]利用白腐真菌降解苯胺蓝初始染料浓度考察结果一致。结合实际染料废水的复杂性与后续染料降解产物分析,选择100 mg/L AO7进行后续脱色条件的考察。

2.1.3 体系pH对脱色率的影响

含偶氮染料的工业废水组分多,成分复杂,pH呈现多样性。所以,在28 °C和已确定脱色浓度(100 mg/L)基础上,研究pH对*P. eryngii*-C6007和*T. versicolor*-gs027脱色体系的影响,结果见图3。从图3A可知,在0.5 h时,随pH的上升,体系脱色率下降,pH 3.0体系的脱色率达45.68%。分析可能是因为前期主要以吸附为主,而AO7属于阴离子染料带负电荷,而在低pH条件下体系中含有大量H⁺,两者之间存在静电吸附作用导致^[30]。24 h时,各体系的脱色率显著提高;比较各pH体系的脱色情况,发现在pH 4.0、4.5条件下,体系中AO7的脱色率相对较高,达到91.51%和93.44%。pH 4.5时,48 h脱色率高达

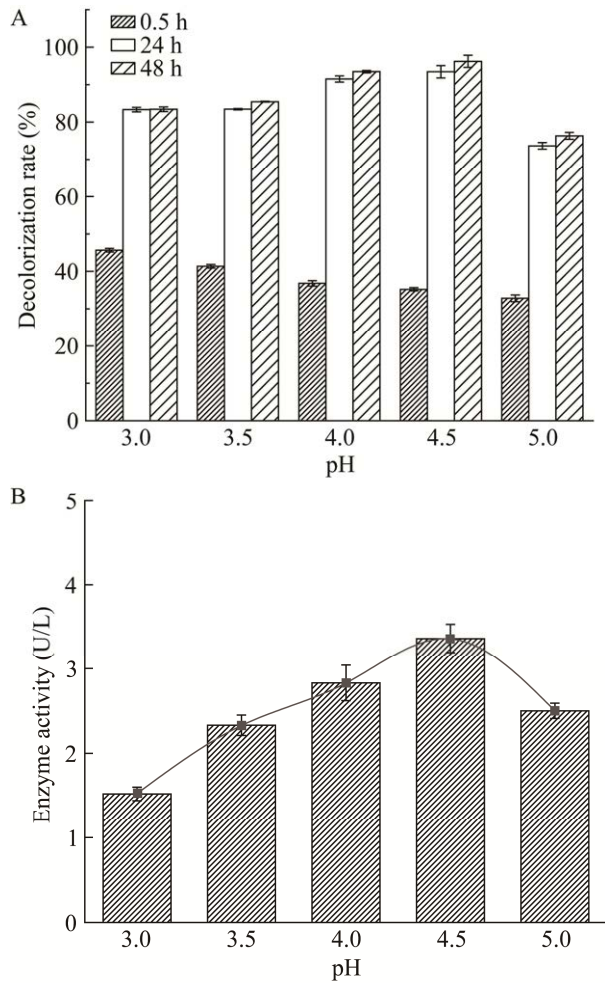


图3 pH对AO7脱色的影响

Figure 3 Effect of pH on AO7 decolorization. A: Effect of pH on decolorization rate of AO7. B: Effect of pH on enzymatic activity of lignin degrading enzymes.

96.23%。而当体系 pH 大于 4.5 时,其脱色率呈下降趋势。这一变化趋势与 24 h 降解液中木质素降解酶的酶活变化趋势(图 3B)基本一致,原因是木质素降解酶是氧化还原酶类,降解体系的 pH 会影响电子从底物传递至酶蛋白,进而影响酶活力;此外,不同 pH 下木质素降解酶与染料分子之间的相互作用也不同,它们都会影响染料的降解效率^[31]。综上,选取 pH 4.5 进行后续脱色条件优化。

2.1.4 温度对脱色率的影响

在染料浓度为 100 mg/L,脱色 pH 为 4.5 的条件下,脱色 24 h 取样。考察了温度对混合菌丝体对 AO7 的脱色影响,结果如图 4 所示。在脱色 24 h 后,在 23、28、33、38 °C 下脱色率分别为 90.07%、93.67%、88.83%和 81.92%。在设定温度的范围内,随着温度的升高,体系的脱色率先增加后减小,当脱色温度为 28 °C 时,*P. eryngii*_{C0007} 和 *T. versicolor*_{gs027} 的混合菌丝对 AO7 的脱色效果最好。这与已有报道^[15]中白腐真菌及其分泌木质素降解酶的最适温度范围为 25–30 °C 相吻合,故后续脱色研究选择 28 °C。

2.1.5 脱色时间对脱色率的影响

为研究时间对脱色率的影响,在已优化脱色条件(pH 4.5、28 °C)下,定时取样,测定 100 mg/L AO7 脱色体系不同时间点的脱色率。结果(图 5)表明,*P. eryngii*_{C0007} 和 *T. versicolor*_{gs027} 的混合菌丝对 AO7 脱色降解,0.5 h 的脱色率为 35.97%,此后脱色率显著提高,12 h 体系脱色率达 87.8%,24 h 体系脱色率达 93.46%;此后体系脱色率略有升高,36 h 和 48 h 的脱色率达 96.67%、96.82%无显著差异。

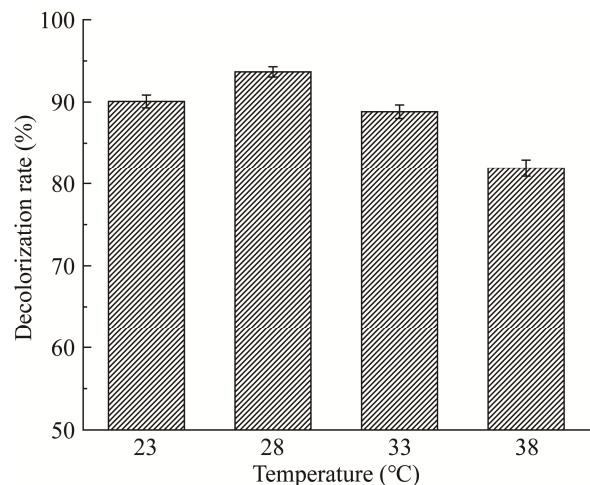


图4 温度对体系脱色率的影响

Figure 4 Effect of temperature on decolorization rate.

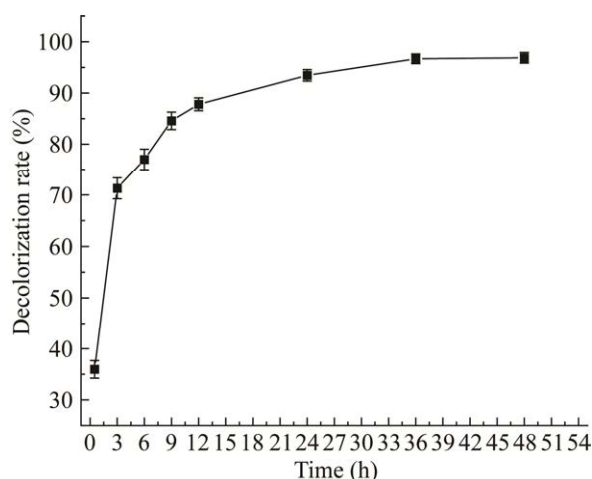


图5 时间对脱色率的影响

Figure 5 Effect of time on decolorization rate.

2.2 紫外-可见吸收光谱分析

取 AO7 溶液(浓度 100 mg/L)、6 h 的降解液(脱色率 72.87%)、24 h 的降解液(脱色率 94.18%)进行紫外-可见全波长扫描,结果见图 6。AO7 在可见光区(400–600 nm)存在 1 个肩峰和 1 个吸收峰,分别在 430 nm 和 485 nm 处,这 2 个特征吸收峰是由 AO7 的 2 个同分异构体偶氮结构和脘式结构的 $n-\pi^*$ 跃迁引起^[32],代表染料的发色基团($-N=N-$)。在紫外光区 230 nm 和 310 nm 处 2 个特征吸收峰则分别代表 AO7 的苯环和萘环结构^[33-34]。随着染料的脱色降解, AO7 的 2 个特征峰(430 nm 和 485 nm)强度不断减弱,说明白腐真菌在降解过程中破坏了其发色基团。同时,代表苯环(230 nm)和萘环(310 nm)的吸收峰强度也不断下降,说明染料分子中苯环和萘环的共轭体系遭到破坏。脱色 24 h 时,降解液中 AO7、苯环和萘环的特征吸收峰已完全消失,表明体系中 AO7 被降解较彻底。

2.3 傅里叶红外光谱分析

为考察 AO7 生物降解效果与其分子结构变化之间的关系,分别对 AO7 溶液和降解 24 h 后的上清液进行红外光谱分析,结果如图 7 所示。由图可知, AO7 和其 24 h 降解液的红外光

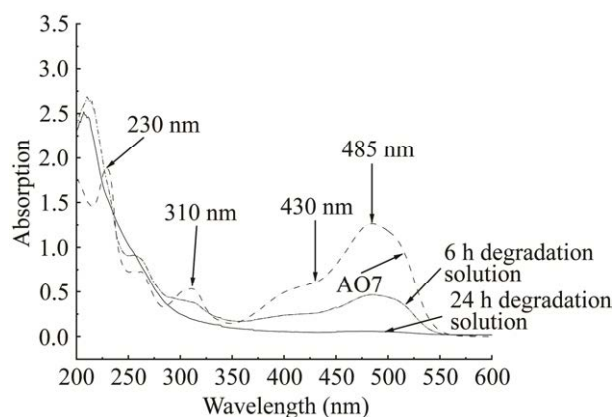


图6 降解前后 AO7 的紫外-可见吸收光谱

Figure 6 UV-Vis absorption spectra of AO7 before and after degradation.

谱图在指纹区($1500-500\text{ cm}^{-1}$)存在较大差异。对于 AO7 而言, 1620 cm^{-1} 处代表 C=N 双键的伸缩振动, 1597 cm^{-1} 处代表 C=C 双键的伸缩振动, 1507 cm^{-1} 处代表 N-H 键的弯曲振动, 1452 cm^{-1} 处代表 N=N 双键的伸缩振动, 1400 cm^{-1} 处代表磺酸基团 S=O 的伸缩振动, 1256 cm^{-1} 处代表 AO7 脘式结构中 C-N 键的伸缩振动, 1123 cm^{-1} 、 1037 cm^{-1} 处代表了苯环和 SO_3^{2-} 的协同振动, 1007 cm^{-1} 处代表苯环的轴向振动。而对于 AO7 的降解液,其 1452 cm^{-1} 和 1400 cm^{-1} 处的峰消失,表明 AO7 分子中偶氮键和磺酸基被破坏,同时,在 1643 cm^{-1} 、 1414 cm^{-1} 、 651.85 cm^{-1} 等波数产生了新的振动,它们分别代表了 C=O 双键的伸缩振动、O-H 键的弯曲振动和 N-H 的面外弯曲振动,因此推断 AO7 分子结构被破坏后生成的降解产物中可能含有官能团 C=O、-OH、-NH、-NH₂。此外,降解产物中 1620 、 1597 、 1507 、 1123 、 1037 cm^{-1} 等处峰消失或减弱,进一步说明 AO7 分子中 C=N、C=C、N-H、苯环和 SO_3^{2-} 基团被破坏。 900 cm^{-1} 以下吸收峰是芳香化合物的特征峰,吸收峰越少,代表芳香化合物因降解发生断裂^[35],而 759 、 698 、 597 cm^{-1} 和 569 cm^{-1} 处吸收峰均消失,表明芳香环断裂。

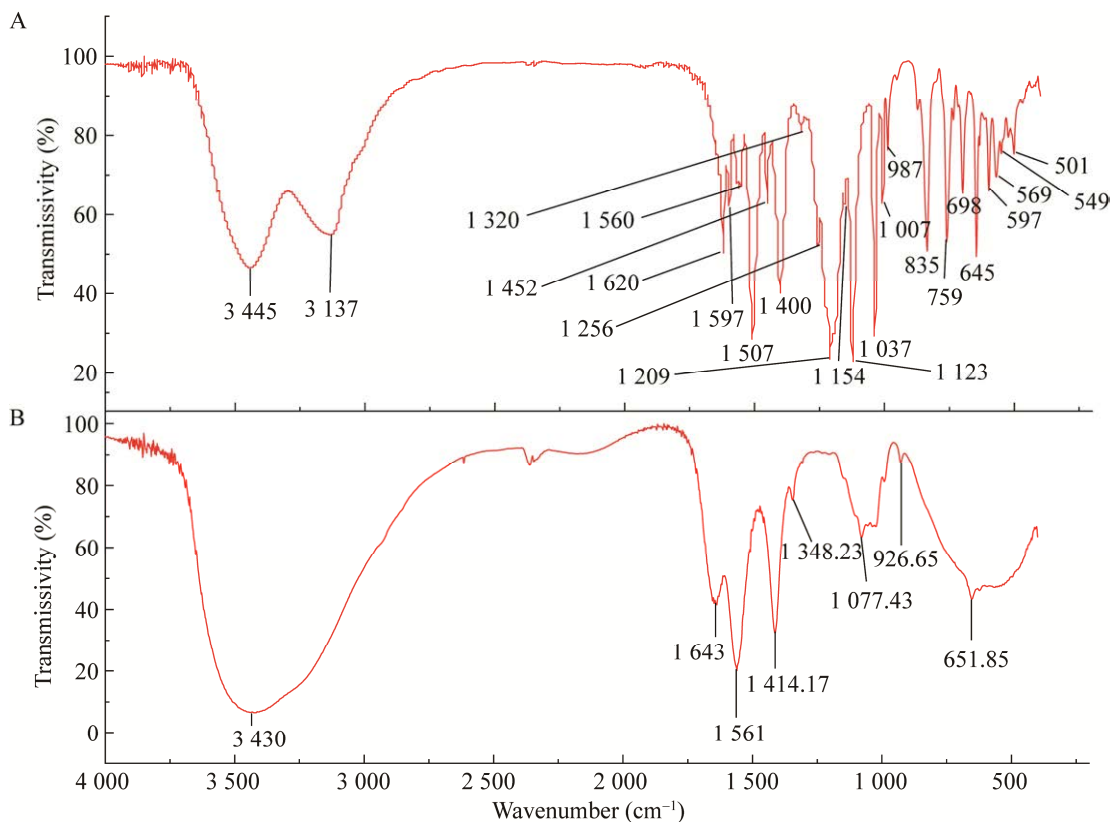


图 7 降解前后 AO7 的红外光谱

Figure 7 Infrared spectra of AO7 before and after degradation. A: AO7. B: 24 h degradation.

2.4 HPLC 分析

为了更深入研究 AO7 降解后生成的产物, 对其 24、48 h 的降解液进行了 HPLC 检测, 结果如图 8 所示。图 8A 和图 8B 分别为 AO7 和对氨基苯磺酸标品图谱, AO7 和对氨基苯磺酸的保留时间分别为 11.60 min 和 1.78 min。由图 8C 可知 24 h 的降解液中 AO7 的色谱峰基本消失, 同时保留时间为 1.57、1.78 min 和 4.02 min 出现了 3 个色谱峰, 由此说明 AO7 被 *P. eyngii*-C₆₀₀₇ 和 *T. versicolor*-G_{s027} 的混合菌丝降解后, 其分子结构发生了破坏, 生成了新的物质。保留时间 1.78 min 的色谱峰和对氨基苯磺酸标品的色谱峰在保留时间上一致, 由此可推断 24 h 的降解液中有对氨基苯磺酸; 据 Eustace 等文献推断保留时间 4.02 min 的色谱峰为 1-氨基-2-萘酚, 这

2 个产物的出现必然是 AO7 中偶氮键断裂的结果^[36-38]。图 8D 表明 48 h 降解液中 AO7 的色谱峰完全消失, 与 24 h 降解液相比, 1.78 min 和 4.02 min 的色谱峰大大减弱, 1.57 min 左右的峰面积略微增加, 说明随着时间的推移, 体系中对氨基苯磺酸和 1-氨基-2-萘酚进一步发生降解。

2.5 GC-MS 分析

对 AO7 的 48 h 降解液进行 GC-MS 检测, 与 GS/MS NIST Library 进行比对, 确定产生了 3 种降解产物, 它们分别为苯甲酸、邻苯二甲酸和对羟基苯甲醛(图 9)。

2.6 植物毒性实验

通常情况下, 染料经过生物降解后毒性会大大降低甚至被完全去除, 但是偶尔也会出现

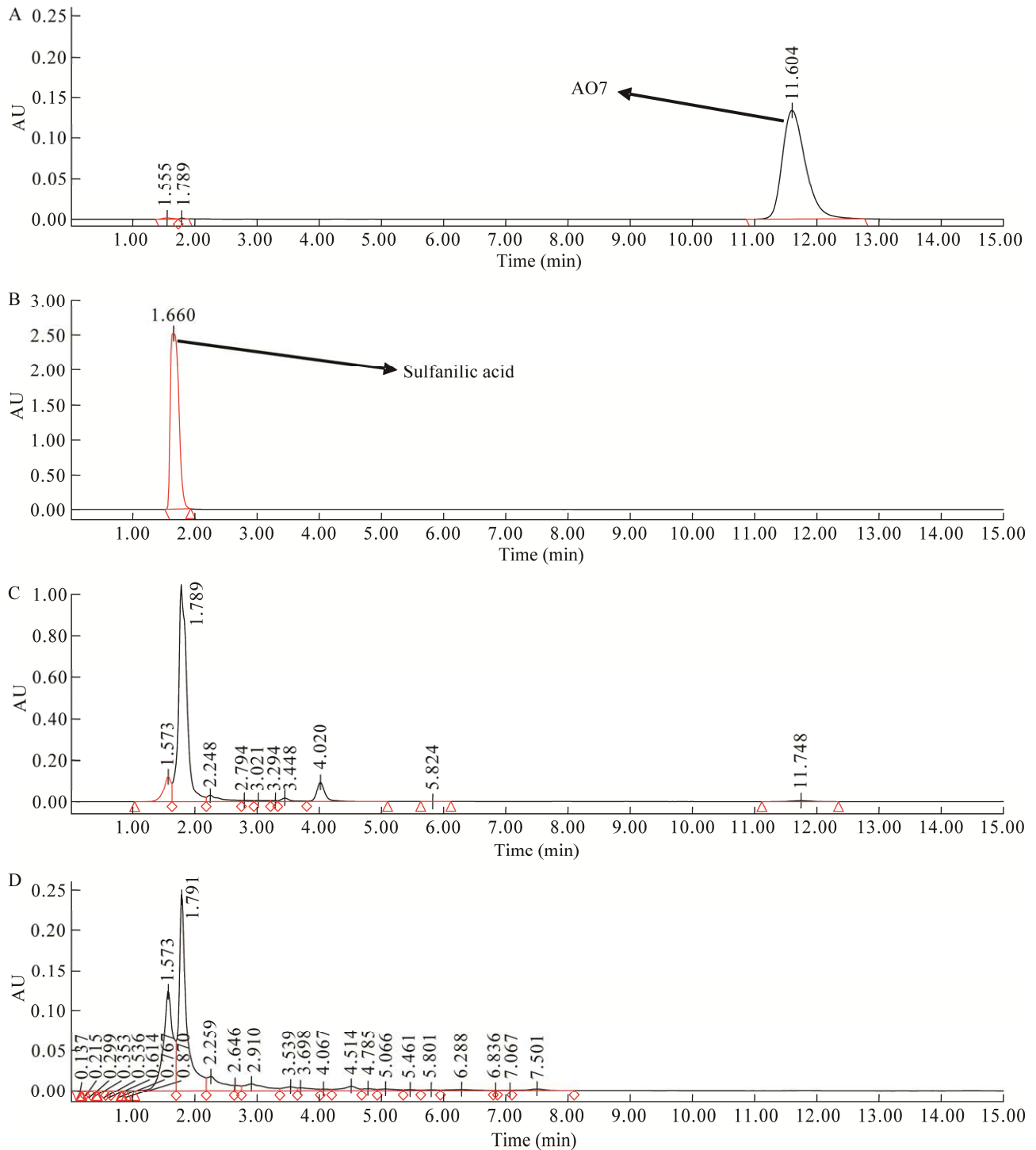


图 8 AO7 及其降解产物的 HPLC 图谱

Figure 8 HPLC of acid orange 7 and its degradation products. A: AO7. B: Sulfanilic acid. C: 24 h degradation sample. D: 48 h degradation sample.

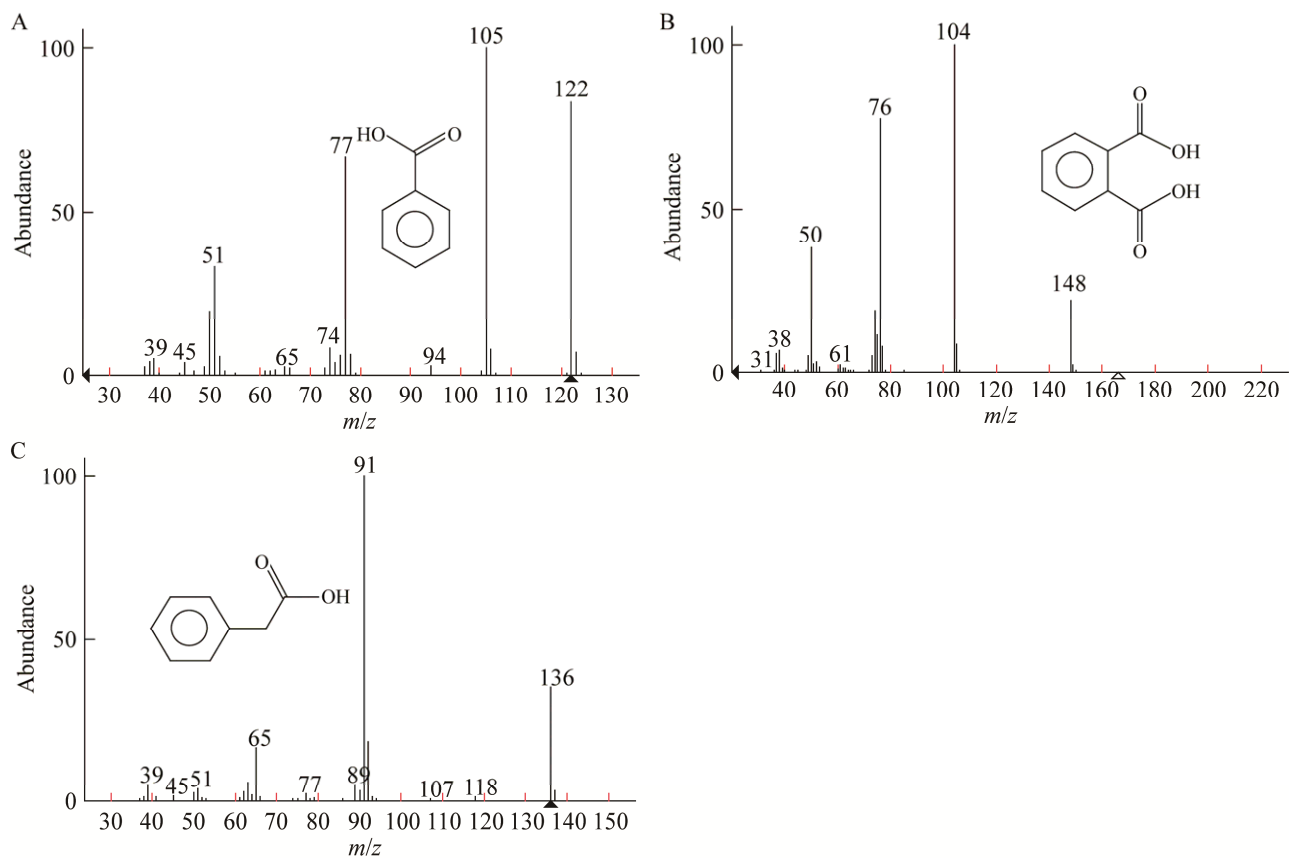


图 9 AO7 降解产物的质谱图

Figure 9 Mass spectrum of AO7 degradation products. A: Benzoic acid. B: Phthalic acid. C: p-hydroxybenzaldehyde.

染料的降解产物比其本身毒性更强的现象^[39]。为了评估 *P. eryngii*-C₀₀₀₇ 和 *T. versicolor*-gs₀₂₇ 的混合菌丝体降解 AO7 后形成的降解产物的毒性, 按照 2.2.7 的方法, 以小麦种子为考察对象开展植物毒性实验, 结果见表 1。由表 1 可知, 分别用蒸馏水、AO7 溶液(100 mg/L)及其降解液处理后的小麦种子, 发芽率均为 100%, 无差异。48 h 降解液和蒸馏水喷洒过的小麦种子的胚芽长度差异不显著, 而经 AO7 溶液喷洒过的小麦种子胚芽的长度与另两种条件下处理后的结果差异显著; 同时 48 h 降解液处理的小麦种子组根长和鲜重虽与蒸馏水处理的种子结果差异显著, 但较 AO7 溶液处理的小麦种子组有显著改善。基于此, 可以表明 100 mg/L 的 AO7 溶液

对小麦种子具有较大的毒性, 而 *P. eryngii*-C₀₀₀₇ 和 *T. versicolor*-gs₀₂₇ 的混合菌丝对 AO7 有较好的脱毒效果。

表 1 AO7 及其降解液对小麦种子的影响

Table 1 Effects of AO7 and its degradation products on plant seeds

Parameters	<i>Triticum aestivum</i>		
	Water	Treated dye	AO7
Germination (%)	100	100	100
Plumule (cm)	5.01±0.18 ^a	4.94±0.19 ^a	3.19±0.23 ^c
Radicle (cm)	5.77±0.21 ^a	5.28±0.16 ^b	1.91±0.28 ^c
Fresh weight (g)	0.32±0.02 ^a	0.26±0.02 ^b	0.14±0.01 ^c

The same letter indicates that the difference is not significant ($P>0.05$), and the different letters indicate significant difference ($P\leq 0.05$).

3 讨论

近年来,有关生物降解染料在废水处理方面应用和机制的研究日益受到重视。随着对白腐真菌的深入研究,它们及其分泌的木质素降解酶在含偶氮染料的样品中降解脱色的研究也日趋增加。影响白腐真菌脱色降解偶氮染料的因素有很多,如白腐真菌种类、温度、pH和染料浓度等。Legerská等^[40]利用*T. versicolor*分泌的漆酶对偶氮染料橙2和酸性橙6的脱色能力进行评估,结果发现在pH 3.0、22 °C及染料浓度40 mg/L的条件下脱色5 d,脱色率分别为72.8%和45.3%。Spadaro等^[41]利用*P. chrysosporium*对偶氮染料分散橙3、分散黄3和溶剂黄14进行脱色降解,结果显示共培养23 d后染料矿化率为23.1%–48.1%。司静等^[19]采用绒毛栓孔菌对80 mg/L刚果红脱色7 d,脱色率达80.52%。上述研究表明,单一白腐真菌对偶氮染料有一定的生物降解能力,但脱色时间长、脱色率不高。考虑到不同的白腐真菌分泌的木质素降解酶组成不同,本文进行了单一白腐真菌和混合白腐真菌对50 mg/L AO7脱色的考察,结果表明混菌脱色能力强于单菌脱色,其中*P. eryngii* & *T. versicolor*对AO7脱色效果最好,24 h脱色率达93.15%。

AO7的脱色多以物理化学法处理为主,如You等^[42]采用焦磷酸盐激活过氧单硫酸盐的方式对AO7脱色,20 mg/L AO7在2 h的脱色率可达84%;Xu等^[43]在压电化学的基础上耦合氧化锌纳米棒,用于降解AO7,结果表明在AO7初浓度为5 μmol/L,50 min脱色率达80%。近几年,生物法也逐渐用于AO7的脱色处理,如Alam等^[44]发现通过固定化白腐真菌*Trametes hirsuta* D5可以实现多种偶氮染料的高效降解,但在对100 mg/L AO7脱色120 h后,脱色率仅

有30%。Liu等^[45]从废水处理系统中分离得到一株黄杆菌进行AO7的脱色考察,结果显示,在pH 7.0、30 °C、AO7浓度为20 mg/L条件下脱色2 d,脱色率为60.45%。本文以*P. eryngii* & *T. versicolor*为脱色菌株,研究了AO7浓度、体系pH和温度对AO7脱色的影响,结果表明在28 °C、pH 4.5的条件下脱色降解100 mg/L AO7,24 h脱色率可达93%以上,与上述文献相比具有脱色率高、时间短等优点。

白腐真菌脱色降解染料主要依赖于其分泌的木质素降解酶,由于该类酶的宽底物特性,所以它们能够氧化酚类和非酚类物质以及各种芳烃类污染物。它们的氧化过程主要为该类酶催化断裂C–C键、C–O键、O–O键、烷基-芳基,接着通过脱甲基和甲氧基以及苯甲基、苯甲醇、苜醇的氧化实现染料的初步降解。然后在该类酶作用下形成各种自由基,如苯氧基自由基、氨基自由基、芳基阳离子自由基、含硫自由基和烷基自由基等,在这些自由基作用下可发生一系列非酶促的链式反应,实现底物的彻底降解^[17]。

本文在已优化的脱色条件下采用紫外-可见光谱、红外光谱、HPLC和GS-MS检测进行了*P. eryngii*-C0007和*T. versicolor*-gs027混合菌丝对AO7脱色机理的初步研究,发现AO7降解过程中有对氨基苯磺酸、苯甲酸、邻苯二甲酸和对羟基苯甲醛的生成。结合Ong等^[34]、Long等^[36]、Ali等^[46-47]的报道,根据木质素降解酶系的催化原理及检测分析结果,推测出*P. eryngii*-C0007和*T. versicolor*-gs027的混合菌丝降解AO7的可能路径(图10):首先AO7分子中偶氮键断裂,产生对氨基苯磺酸和1-氨基-2-萘酚,该结果与红外光谱、HPLC及Ong等^[34]报道的结果相吻合。接着对氨基苯磺酸进一步脱磺酸基生成对苯二酚,这一过程与Ali等^[46-47]

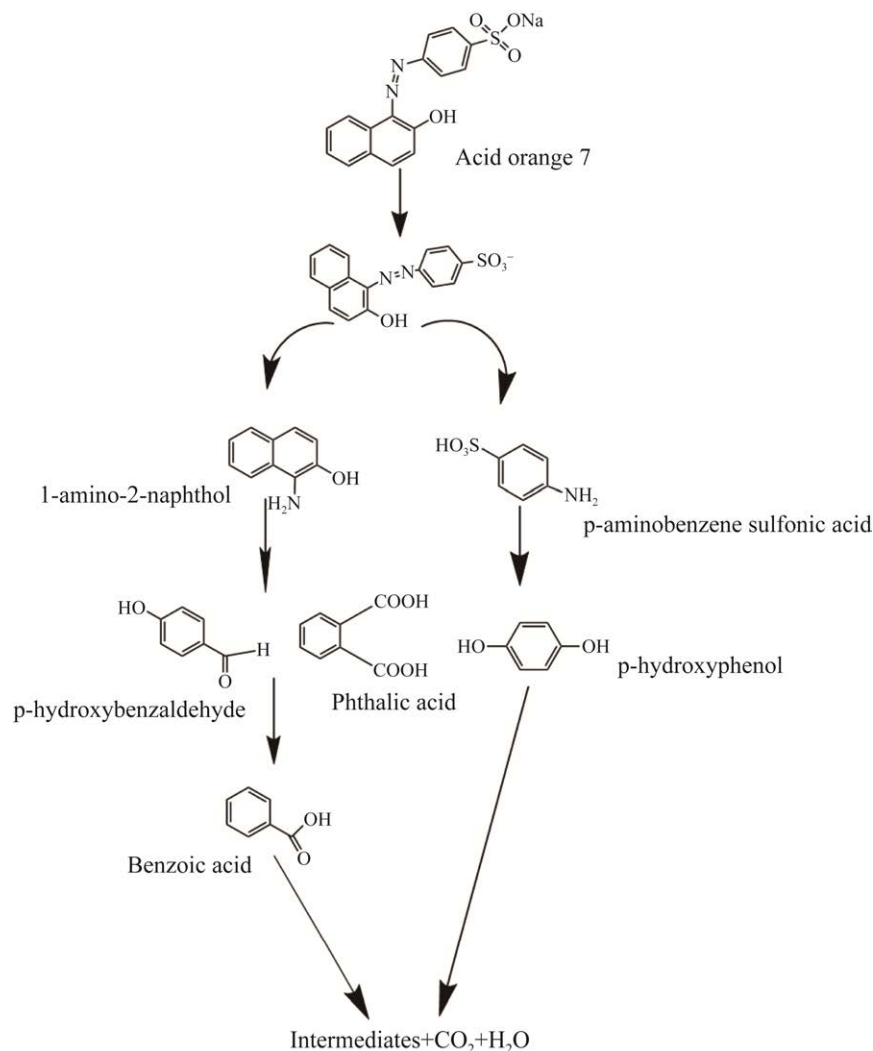


图 10 刺芹侧耳和杂色云芝对 AO7 降解路径推断

Figure 10 Proposed pathway of AO7 degradation by *Pleurotus eryngii*-C₀₀₀₇ & *Trametes versicolor*-gs027.

研究结果相一致。在羟基自由基的作用下，1-氨基-2-萘酚降解生成邻苯二甲酸和对羟基苯甲醛，之后它们进一步转化为苯甲酸。最后对苯二酚和苯甲酸的苯环被打开，并不断被氧化成其他小分子中间体，再进一步矿化成 H₂O 和 CO₂。

4 结论

P. eryngii-C₀₀₀₇ 和 *T. versicolor*-gs027 的混合菌丝在 28 °C、pH 4.5 的条件下脱色降解 100 mg/L AO7，24 h 脱色率可达 93% 以上，可以实现对

偶氮染料 AO7 的高效降解脱色。

基于紫外-可见光谱法、红外光谱法、HPLC 和 GC-MS 分析表明，*P. eryngii*-C₀₀₀₇ 和 *T. versicolor*-gs027 的混合菌丝依靠自身木质素降解酶系统产生的一系列自由基链反应和催化循环反应首先将 AO7 偶氮键破坏，之后再萘环、苯环断裂降解，最后进一步氧化成其他小分子中间体、H₂O 和 CO₂，由此推测出 *P. eryngii*-C₀₀₀₇ 和 *T. versicolor*-gs027 混合菌丝对 AO7 的可能降解路径。

植物毒性实验表明采用 *P. eryngii*-C₀₀₀₇ 和 *T. versicolor*-gs027 的混合菌丝处理 AO7 的降解液处理的小麦种子与纯净水对照组就发芽率和茎长而言, 无显著性差异; 虽然根长与鲜重增加量较纯净水对照组有显著差异, 但与 AO7 对照组相比有极大改善, 因此判断脱毒效果良好。上述结果说明该混合菌丝对含 AO7 等偶氮染料废水的处理具有广阔的应用前景。

REFERENCES

- [1] TEE HC, LIM PE, SENG CE, MOHD NAWI MA, ADNAN R. Enhancement of azo dye acid orange 7 removal in newly developed horizontal subsurface-flow constructed wetland[J]. *Journal of Environmental Management*, 2015, 147: 349-355.
- [2] SARATALE RG, SARATALE GD, KALYANI DC, CHANG JS, GOVINDWAR SP. Enhanced decolorization and biodegradation of textile azo dye scarlet R by using developed microbial consortium-GR[J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100(9): 2493-2500.
- [3] ZHENG J, GAO Z, HE H, YANG S, SUN C. Efficient degradation of acid orange 7 in aqueous solution by iron ore tailing Fenton-like process[J]. *Chemosphere*, 2016, 150: 40-48.
- [4] ZHENG J, TANG X, ZHANG S, HUANG T, ZHENG H, SUN B. Relationship between the structure of chitosan-based flocculants and their performances in the treatment of model azo dyeing wastewater[J]. *Chemosphere*, 2020, 247: 125920.
- [5] BRINZA L, ELENA MAFTEI A, TASCUS S, BRINZA F, NEAMTU M. Advanced removal of reactive yellow 84 azo dye using functionalised amorphous calcium carbonates as adsorbent[J]. *Scientific Reports*, 2022, 12: 3112.
- [6] 李立, 吴丽颖, 董正玉, 王霁, 张倩, 洪俊明. 高晶度 Mn-Fe LDH 催化剂活化过一硫酸盐降解偶氮染料 RBK5[J]. *环境科学*, 2020, 41(6): 2736-2745.
LI L, WU LY, DONG ZY, WANG J, ZHANG Q, HONG JM. Degradation of RBK5 by high crystallinity Mn-Fe LDH catalyst activating peroxydisulfate[J]. *Environmental Science*, 2020, 41(6): 2736-2745 (in Chinese).
- [7] 阳海, 魏宏庆, 胡乐天, 胡倩, 阳立平, 刘华杰, 易翔, 易兵. 单偶氮染料 AY17 的光催化降解动力学及机制[J]. *环境科学*, 2016, 37(8): 3086-3093.
YANG H, WEI HQ, HU LT, HU Q, YANG LP, LIU HJ, YI X, YI B. Photocatalytic degradation kinetics and mechanism of monoazo dye acid yellow 17 by UV/TiO₂ in aqueous solution[J]. *Environmental Science*, 2016, 37(8): 3086-3093 (in Chinese).
- [8] GARCÍA-MARTÍNEZ Y, BENGUA C, STÜBER F, FORTUNY A, FONT J, FABREGAT A. Biodegradation of acid orange 7 in an anaerobic-aerobic sequential treatment system[J]. *Chemical Engineering & Processing: Process Intensification*, 2015, 94: 99-104.
- [9] SPAGNI A, GRILLI S, CASU S, MATTIOLI D. Treatment of a simulated textile wastewater containing the azo-dye reactive orange 16 in an anaerobic-biofilm anoxic-aerobic membrane bioreactor[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2010, 64(7): 676-681.
- [10] KOLEKAR YM, NEMADE HN, MARKAD VL, ADAV SS, PATOLE MS, KODAM KM. Decolorization and biodegradation of azo dye, reactive blue 59 by aerobic granules[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 104: 818-822.
- [11] KALYANI DC, TELKE AA, DHANVE RS, JADHAV JP. Ecofriendly biodegradation and detoxification of reactive red 2 textile dye by newly isolated *Pseudomonas* sp. SUK1[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 163(2/3): 735-742.
- [12] BAENA-BALDIRIS D, MONTES-ROBLEDOS A, BALDIRIS-AVILA R. *Franconibacter* sp., 1MS: a new strain in decolorization and degradation of azo dyes ponceau S red and methyl orange[J]. *ACS Omega*, 2020, 5(43): 28146-28157.
- [13] DHANVE RS, SHEDBALKAR UU, JADHAV JP. Biodegradation of diazo reactive dye Navy blue HE2R (reactive blue 172) by an isolated *Exiguobacterium* sp. RD3[J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2008, 13(1): 53-60.
- [14] QU Y, SHI SN, MA F, YAN B. Decolorization of reactive dark blue K-R by the synergism of fungus and bacterium using response surface methodology[J]. *Bioresour Technol*, 2010, 101(21): 8016-8023.
- [15] 李慧蓉. 白腐真菌生物学和生物技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
LI HR. *Biology and Biotechnology of White Rot Fungi*[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005 (in Chinese).
- [16] 孙雪娃, 何超, 方泽民, 肖亚中. 云芝 NADPH-细胞

- 色素 P450 还原酶在大肠杆菌中表达及酶学特性分析[J]. 生物工程学报, 2018, 34(7): 1156-1168.
- SUN XW, HE C, FANG ZM, XIAO YZ. Expression and characterization of NADPH-cytochrome P450 reductase from *Trametes versicolor* in *Escherichia coli*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2018, 34(7): 1156-1168 (in Chinese).
- [17] GOMI N, YOSHIDA S, MATSUMOTO K, OKUDOMI M, KONNO H, HISABORI T, SUGANO Y. Degradation of the synthetic dye amaranth by the fungus *Bjerkandera adusta* Dec 1: inference of the degradation pathway from an analysis of decolorized products[J]. Biodegradation, 2011, 22(6): 1239-1245.
- [18] IARK D, dos REIS BUZZO AJ, GARCIA JAA, CÔRREA VG, HELM CV, CORRÊA RCG, PERALTA RA, de FÁTIMA PERALTA MUNIZ MOREIRA R, BRACHT A, PERALTA RM. Enzymatic degradation and detoxification of azo dye Congo red by a new laccase from *Oudemansiella canarii*[J]. Bioresource Technology, 2019, 289: 121655.
- [19] 司静, 闫志辉, 崔宝凯, 张忠民. 绒毛栓孔菌菌丝体在无营养条件下对偶氮染料刚果红的脱色作用[J]. 微生物学通报, 2014, 41(2): 218-228.
- SI J, YAN ZH, CUI BK, ZHANG ZM. Decolorization of azo dye Congo red by *Trametes pubescens* pellets without addition of nutrition[J]. Microbiology China, 2014, 41(2): 218-228 (in Chinese).
- [20] 王诗生, 赵大唯, 章慧娟, 盛广宏, 刘玲, 刘轶莹, 熊仁颖. 磁性氮掺杂碳材料活化过硫酸盐降解酸性橙 7[J]. 环境科学学报, 2022, 42(5): 237-246.
- WANG SS, ZHAO DW, ZHANG HJ, SHENG GH, LIU L, LIU YY, XIONG RY. Magnetic N-doped carbonaceous materials activated persulfate for degradation of acid orange 7[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2022, 42(5): 237-246 (in Chinese).
- [21] RODRIGUES AS, CIRÍACO L, PACHECO MJ, FERNANDES A, MOGO S, LOPES A. Sunlight-driven AO7 degradation with perovskites (La, Ba) (Fe, Ti)O₃ as heterogeneous photocatalysts[J]. Nanomaterials, 2021, 11(11): 3142.
- [22] NAZARI P, TOOTONCHIAN P, SETAYESH SR. Efficient degradation of AO7 by ceria-delafoosite nanocomposite with non-inert support as a synergistic catalyst in electro-Fenton process[J]. Environmental Pollution, 2019, 252: 749-757.
- [23] 吴茵, 陈敏, 刘洁. 刺芹侧耳对孔雀石绿的脱色降解及其产物分析[J]. 环境科学学报, 2016, 36(8): 2844-2851.
- WU Y, CHEN M, LIU J. Biodecolorization and biodegradation of malachite green by *Pleurotus eryngii* and degradation products analysis[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2016, 36(8): 2844-2851 (in Chinese).
- [24] 陈敏, 郭倩, 姚善涇. 白腐菌 *Pleurotus eryngii*-Co007 产木质素降解酶条件的优化[J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(1): 7-11.
- CHEN M, GUO Q, YAO SJ. Optimization of the conditions for ligninolytic enzymes production from white rot fungi *Pleurotus eryngii*-Co007[J]. Food and Fermentation Industries, 2011, 37(1): 7-11 (in Chinese).
- [25] LIM CK, ARIS A, NEOH CH, LAM CY, ABDUL MAJID Z, IBRAHIM Z. Evaluation of macrocomposite based sequencing batch biofilm reactor (MC-SBBR) for decolorization and biodegradation of azo dye acid orange 7[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2014, 87: 9-17.
- [26] MU Y, RABAEY K, ROZENDAL RA, YUAN ZG, KELLER J. Decolorization of azo dyes in bioelectrochemical systems[J]. Environmental Science & Technology, 2009, 43(13): 5137-5143.
- [27] WU J, ZHANG H, QIU JJ. Degradation of acid orange 7 in aqueous solution by a novel electro/Fe²⁺/peroxydisulfate process[J]. Journal of Hazardous Materials, 2012, 215/216: 138-145.
- [28] CAGIDE C, CASTRO-SOWINSKI S. Technological and biochemical features of lignin-degrading enzymes: a brief review[J]. Environmental Sustainability, 2020, 3(4): 371-389.
- [29] 陈亮, 林永慧, 何兴兵, 谭玲, 唐笑, 胡玉婷. 白腐真菌 XX-3 对苯胺蓝染料的脱色条件优化[J]. 湖北农业科学, 2011, 50(20): 4178-4180, 4184.
- CHEN L, LIN YH, HE XB, TAN L, TANG X, HU YT. Optimization of decolorization of aniline blue dye by white-rot fungus *Bjerkandera fumosa* XX-3[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2011, 50(20): 4178-4180, 4184 (in Chinese).
- [30] PALMIERI G, CENNAMO G, SANNIA G. Remazol brilliant blue R decolourisation by the fungus *Pleurotus ostreatus* and its oxidative enzymatic system[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2005, 36(1): 17-24.
- [31] HADIBARATA T, ADNAN LA, YUSOFF ARM, YUNIARTO A, RUBIYATNO, AHMAD ZUBIR MMF, KHUDHAIR AB, TEH ZC, ABU NASER M. Microbial decolorization of an azo dye reactive black 5 using white-rot fungus *Pleurotus eryngii* F032[J]. Water,

- Air, & Soil Pollution, 2013, 224(6): 1-9.
- [32] 刘士姮, 汪世龙, 孙晓宇, 李文哲, 倪亚明, 王文峰, 王敏, 姚思德. 酸性橙 7 降解的微观反应机理及动力学研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2005, 25(5): 776-779. LIU SH, WANG SL, SUN XY, LI WZ, NI YM, WANG WF, WANG M, YAO SD. Mechanism and kinetics studies on the degradation of acid orange 7[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2005, 25(5): 776-779 (in Chinese).
- [33] ZHU Y, CAO X, CHENG Y, ZHU T. Performances and structures of functional microbial communities in the mono azo dye decolorization and mineralization stages[J]. Chemosphere, 2018, 210: 1051-1060.
- [34] ONG SA, MIN OM, HO LN, WONG YS. Comparative study on photocatalytic degradation of mono azo dye acid orange 7 and methyl orange under solar light irradiation[J]. Water, Air, & Soil Pollution, 2012, 223(8): 5483-5493.
- [35] AYED L, CHAIEB K, CHEREF A, BAKHROUF A. Biodegradation of triphenylmethane dye malachite green by *Sphingomonas paucimobilis*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2009, 25(4): 705-711.
- [36] LONG YH, LI SR, YANG PZ, CHEN X, LIU WH, ZHAN XS, XUE C, LIU DF, HUANG WL. Synthesis of ZIF-67 derived honeycomb porous Co/NC catalyst for AO7 degradation via activation of peroxymonosulfate[J]. Separation and Purification Technology, 2022, 286: 120470.
- [37] SHANG KF, WANG XJ, LI J, WANG H, LU N, JIANG N, WU Y. Synergetic degradation of acid orange 7 (AO7) dye by DBD plasma and persulfate[J]. Chemical Engineering Journal, 2017, 311: 378-384.
- [38] FERNANDO E, KESHAVARZ T, KYAZZE G. Enhanced bio-decolourisation of acid orange 7 by *Shewanella oneidensis* through co-metabolism in a microbial fuel cell[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2012, 72: 1-9.
- [39] KUSVURAN E, GULNAZ O, SAMIL A, YILDIRIM Ö. Decolorization of malachite green, decolorization kinetics and stoichiometry of ozone-malachite green and removal of antibacterial activity with ozonation processes[J]. Journal of Hazardous Materials, 2011, 186(1): 133-143.
- [40] LEGERSKÁ B, CHMELOVÁ D, ONDREJOVIČ M. Decolourization and detoxification of monoazo dyes by laccase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*[J]. Journal of Biotechnology, 2018, 285: 84-90.
- [41] SPADARO JT, GOLD MH, RENGANATHAN V. Degradation of azo dyes by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1992, 58(8): 2397-2401.
- [42] YOU WQ, LI YL, HE DD, ZENG YM, ZHU JW, YOU XF, WANG K, ZHOU GM, PENG GL. Activation of peroxymonosulfate by pyrophosphate for the degradation of AO7 at neutral pH[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2022, 29(31): 47549-47560.
- [43] XU XL, JIA YM, XIAO LB, WU Z. Strong vibration-catalysis of ZnO nanorods for dye wastewater decolorization via piezo-electro-chemical coupling[J]. Chemosphere, 2018, 193: 1143-1148.
- [44] ALAM R, MAHMOOD RA, ISLAM S, ARDIATI FC, SOLIHAT NN, ALAM MB, LEE SANG HAN, YANTO DHY, KIM S. Understanding the biodegradation pathways of azo dyes by immobilized white-rot fungus, *Trametes hirsuta* D7, using UPLC-PDA-FTICR MS supported by *in silico* simulations and toxicity assessment[J]. Chemosphere, 2023, 313: 137505.
- [45] LIU XY, ZHANG J, MAO HC, KONG FY, TENG C, HUANG JG, YU CY, XU XY, TENG S. Degradation of acid orange 7 (AO7) by a bacterium strain *Flavobacterium mizutaii* L-15[J]. Water Science and Technology, 2020, 82(2): 266-272.
- [46] ALI SS, AI-TOHAMY R, SUN J. Performance of *Meyerozyma caribbica* as a novel manganese peroxidase-producing yeast inhabiting wood-feeding termite gut symbionts for azo dye decolorization and detoxification[J]. Science of the Total Environment, 2022, 806: 150665.
- [47] WANG X, XIONG Y, XIE TY, SHARMA VK, TU YT, YANG JN, TIAN SH, HE C. Separation and determination of degradation products of acid orange 7 by capillary electrophoresis/capacitively coupled contactless conductivity detector[J]. Talanta, 2013, 111: 54-61.

(本文责编 陈宏宇)