

2 株苯胺降解菌的分离鉴定及其降解特性研究

任随周, 郭俊, 曾国驱, 岑英华, 孙国萍*

(广东省微生物研究所 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广州 510070)

摘要: 从处理印染废水的活性污泥中分离得到 2 株苯胺降解菌, 从菌落、细胞形态、生理生化及 16S rRNA 基因扩增测序等方面对 2 株菌进行了鉴定, 并比较分析 2 株菌在好氧与缺氧条件下的苯胺降解、偶氮染料脱色及苯胺脱氨氧化酶基因 *tdnQ* 和黄素还原酶基因(*fre*) 的携带情况。结果表明, 2 株菌属于 *Pseudomonas* 属和 *Shewanella* 属, 分别命名为 *Pseudomonas* sp. AN30 和 *Shewanella* sp. DN425。AN30 菌株在振荡好氧条件下 72h 内对 250mg/L 苯胺的降解率为 96.1%, DN425 菌株的降解率为 13.8%; 在静置缺氧条件下 AN30 菌株的苯胺降解率为 39.6%, DN425 菌株的降解率仅为 8.6%。DN425 菌株在静置缺氧条件下 4h 内可将初始浓度为 50 mg/L 的偶氮染料酸性大红彻底脱色, 而 AN30 菌株对酸性大红不具有脱色能力。以总 DNA 为模板, 分别用 *tdnQ* 基因和 *fre* 基因特异性引物进行扩增, 2 株菌均能扩增出大小分别为 380bp 和 630bp 左右的目标条带, 显示 2 菌株均携带有苯胺脱氨氧化酶基因和黄素还原酶基因。

关键词: 苯胺降解菌; 脱色; 苯胺脱氨氧化酶基因; 黄素还原酶基因

中图分类号: Q 172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2006)12-2525-06

Isolation and Characterization of Two Aniline-Degrading Strains and Compare of Functional Genes

REN Su-zhou, GUO Jun, ZENG Guo-qu, CEN Ying-hua, SUN Guo-ping

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070, China)

Abstract: Two aniline-degrading bacterial strains, AN30 and DN425, were isolated from activated sludge of textile-printing wastewater treatment plant and identified as *Pseudomonas* sp. and *Shewanella* sp., respectively. Under shaking condition, 250 mg/L aniline was removed 96.1% and 13.8% within 72h by strains AN30 and DN425, respectively. Under static condition, their degrading rates were 39.6% and 8.6%, respectively. Under static condition, the decolorizing rate of strain DN425 reached 96% for azo dye Great Red GR in 4h, exhibiting a remarkable color removal capability. However, strain AN30 was not capable of decolorizing Great Red GR. With two sets of specific primers for *tdnQ* gene and *fre* gene, the two genes were detected by PCR amplification. The results indicated the two strains possess both *tdnQ* gene and *fre* gene.

Key words: aniline-degrading strain; decolorization; *tdnQ* gene; *fre* gene

苯胺是农药、医药和塑料工业的重要原料, 广泛存在于制药、橡胶及其他许多化工厂的废水中。苯胺与血红蛋白结合成高铁血红蛋白, 使之与氧结合能力下降导致动物中毒, 是一种对人类构成严重危害的物质。微生物对苯胺的转化与降解是从环境中去除苯胺的主要途径。目前, 国内外研究者对苯胺的微生物降解已开展了大量研究工作。在苯胺降解菌的分离方面, 国内外已分离到一些在好氧或厌氧条件下降解苯胺的细菌, 主要有 *Pseudomonas*, *Comamonas*, *Acinetobacter*, *Rhodococcus*, *Frateruria*, *Moraxella*, *Nocardia* 等^[1]。最近, 关于苯胺降解基因克隆和苯胺双加氧酶基因序列分析的研究工作也有文献报道^[2, 3]。印染工业是现代工业中对环境造成严重污染的产业之一, 在用生物法对印染废水进行脱色处理时, 印染废水中的偶氮类染料及其前体物会被微生物降解生成较高浓度的苯

胺^[4, 5], 因此在处理印染废水时, 不仅要考虑印染废水的脱色, 也有必要进一步分析脱色后形成的芳香胺类的降解, 而这一点在印染废水生物处理过程中却常常被忽略^[6]。因此, 在应用分离到的功能微生物对印染废水进行生物强化处理之前, 有必要对其脱色功能和苯胺降解功能综合起来进行研究。

本研究对筛选得到的 2 株苯胺降解菌 AN30 和 DN425 进行了鉴定, 研究了 2 株菌对苯胺的降解能力和对偶氮染料酸性大红的脱色能力, 并进一步检测了 2 株菌苯胺脱氨氧化酶基因 *tdnQ* 和黄素还原

收稿日期: 2005-12-01; 修订日期: 2006-03-06

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863)项目(2003AA214040); 广东省自然科学基金团队项目(015017); 广东省科技攻关重大项目(2004A30404002); 广东省自然科学基金项目(032319); 广东省科技攻关项目(2002C31605)

作者简介: 任随周(1974~), 男, 博士, 主要研究方向为环境微生物, E-mail: rensz@163.com

* 通讯联系人, E-mail: ebiotech@gdas.ac.cn

酶基因 fre 的携带情况,为将来利用苯胺降解菌进行苯胺环境污染物修复及进一步的遗传学研究奠定基础.

1 材料与方法

1.1 活性污泥样品的来源

分离苯胺降解菌的活性污泥样品采自处理印染废水的厌氧折流板反应器(ABR)与序批式活性污泥曝气反应器(SBR).

1.2 苯胺降解菌的筛选及降解率的测定

采得活性污泥样品后,采用梯度稀释的方法进行分离纯化.经反复纯化确证为纯菌的菌种接入 5mL LB 试管中,150 r/min 30℃摇床过夜活化,取活化后的菌液 3mL,8 000 r/min 离心 2min,用无菌生理盐水洗涤菌体 3 次,然后把菌体接入装有 5mL 250 mg/L MSA 培养基^[7]的试管中,以未接菌的 MSA 培养基作为对照,分别置于 150 r/min 30℃摇床振荡培养和 30℃恒温培养箱内静置培养.分别在设定的时间点取样,8 000 r/min 离心 5min 去菌体后采用 N -(1-萘基)乙二胺偶氮分光光度法测定苯胺浓度^[8],计算苯胺降解率.

1.3 苯胺降解菌脱色能力的测定

将分离纯化后的菌种接入 5mL 营养肉汤试管中,150 r/min 30℃摇床过夜活化,取活化后的菌液 0.2mL 接入装有 2mL 染料培养基的小试管中,以未接菌的染料培养基作为对照,分别置于 150 r/min 30℃摇床振荡培养和 30℃恒温培养箱静置培养.分别在设定的时间点取样,8 000 r/min 离心 5min 去菌体后用紫外可见分光光度计(美国 BECKMAN, DU-640)分别在染料酸性大红(C. I. 27290)最大吸收波长处(503nm)测定吸光度值,计算染料的脱色率.染料培养基为 M_9 培养基,在 100mL 的 5 倍 M_9 溶液中补加微量元素母液 0.06mL,酵母膏 0.1g,酸性大红终浓度均为 50 mg/L.

1.4 细菌总 DNA 的提取及 16S rRNA 基因的 PCR 扩增

细菌总 DNA 的抽提参考 Zhou 等的方法^[9].菌株的 16S rRNA 基因扩增采用细菌 16S rRNA 基因通用引物 F27(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 R1522(5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3')^[10].PCR 扩增体系总体积为 100 μ L:超纯水 73.5 μ L,10 $\times$ PCR buffer 10 μ L,10 mmol/L dNTP 2 μ L,F27 引物 2 μ L,R1522 引物 2 μ L,5 U/ Taq 酶 1.0 μ L,总 DNA 稀释 10 倍后取 2 μ L.94℃变性

4min 后进入 PCR 循环,其中,94℃变性 30s,52℃退火 30s,72℃延伸 3min,30 个循环后 72℃延伸 10min,1.0%琼脂糖凝胶电泳,EB 染色后紫外凝胶成像系统分析结果.

1.5 苯胺脱氨氧化酶基因和黄素还原酶基因的 PCR 扩增检测

以 1.4 的方法抽提的总 DNA 为模板,分别用 $tdnQ$ 基因和 fre 基因的特异性引物进行 PCR 扩增,检测 2 菌株中 $tdnQ$ 基因和 fre 基因的携带情况. $tdnQ$ 基因扩增所采用的 2 条引物分别为 $tdnQ$ 1F (5'-TCCCTGCCTGGAGCCCCGAAAC-3')和 $tdnQ$ 1R (5'-TCCCGCGCCGTGAGTGACTG-3'),扩增方法参考 Boon 等的方法^[11],扩增目标片段长度为 384bp. fre 基因扩增的 2 条引物分别为 F (5'-GCGCATATTGACGCCATCTGGGA-3')和 R (5'-GCCAGCCCCGCTTCCGGTTGT-3'),扩增方法参考文献[12]的方法,扩增目标片段长度为 630bp.

1.6 16S rRNA 基因的测序及其数据分析

获得的 16S rRNA 基因扩增产物送 Invitrogen 公司直接测序.测序结果用 BLAST 软件与 GenBank 数据库中的 16S rRNA 基因序列进行同源性比较分析,选取 1 330 bp 左右的长度进行比对 [Clustelx (1.8)],采用邻位连接 (Neighbour Joining, NJ) 法进行系统学分析 (PHYLP, Version3.5).最后根据 2 菌株的 16S rDNA 序列在系统发育树中的地位判定其分类归属.所得序列提交到 GenBank 数据库,菌株 AN30 和 DN425 的 16S rRNA 基因登录号分别为 AY734880 和 AY734879.

2 结果与分析

2.1 苯胺降解菌的分离与鉴定

经反复分离纯化,得到 2 株苯胺降解菌,命名为 AN30 和 DN425.进一步对 AN30 和 DN425 进行包括菌落、细胞形态及生理生化等方面的鉴定,同时结合 16S rRNA 基因扩增测序的结果确定 2 菌株的分类归属.

2.1.1 菌落、细胞形态及生理生化方面的鉴定

2 株菌的生理生化特征为:AN30 菌株在 LB 琼脂培养基平皿中划线培养 36h 后,菌落圆形,表面光滑,边缘整齐,淡黄色,微光泽,不透明,中央隆起.电子显微镜观察结果为直短杆状,单端极生鞭毛,大小为 1.25 μ m $\times$ 2.34 μ m;DN425 菌株在 LB 琼脂培养基平皿中划线培养 36h 后,菌落圆形,表面光滑扁平,边缘整齐,无色至淡肉红色,透明.电子显微镜观

察结果为直杆状,单端极生鞭毛,大小为 $1.05\mu\text{m} \times 3.41\mu\text{m}$ 。

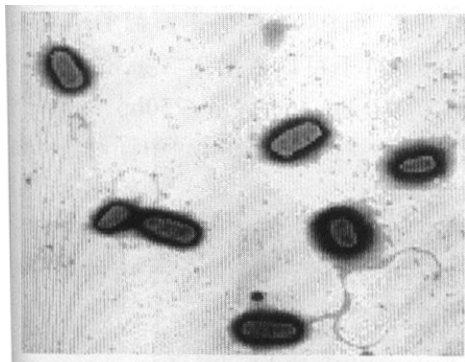


图 1 AN30 菌株的电子扫描电镜照片(15 000×)

Fig. 1 Electron micrograph of strain AN30(15 000×)

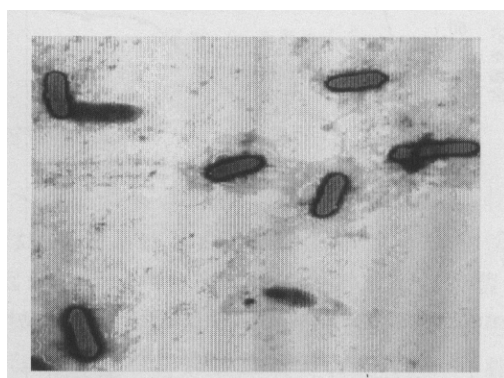


图 2 DN425 菌株的电子扫描电镜照片(15 000×)

Fig. 2 Electron micrograph of strain DN425(15 000×)

对 AN30 菌株的生化指标测定结果为:绿脓菌素阳性,41℃生长,氧化酶阳性,明胶液化阳性,革兰氏染色阴性,硝酸盐产气阳性,不能生长;DN425 菌株的生化指标测定结果为:氧化酶试验阳性,接触酶阳性,淀粉水解试验阴性明胶液化试验阴性,能还原硝酸盐和亚硝酸盐,反硝化试验阴性,葡萄糖氧化型,能产生 H_2S ,能利用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 NH_4NO_3 为唯一氮源生长,不能利用柠檬酸盐生长。根据菌落、细胞形态及生理生化等方面的特性,初步判定为 DN425 菌株和 AN30 菌株,分别属于 *Shewanella* 属和 *Pseudomonas* 属。

2.1.2 16S rDNA 基因扩增测序鉴定

采用 BLAST 将菌株 AN30 和 DN425 的 16S rRNA 基因序列与 GenBank 中已登录的基因序列进行比对,结果发现与菌株 ADN30 和 DN425 的 16S rRNA 基因同源性最高的分别是假单胞菌属的 *Pseudomonas putida* 和希瓦氏菌属的 *Shewanella decolorationis*,其同源性均为 99%。根据 AN30 和

DN425 的 16S rDNA 序列分别与假单胞菌属和希瓦氏菌属包括模式菌株的相关菌种的 16S rDNA 序列做出系统进化树(图 3、4),结果可见,菌株 AN30 和 DN42 分别处于 *Pseudomonas* 和 *Shewanella* 类群之中。

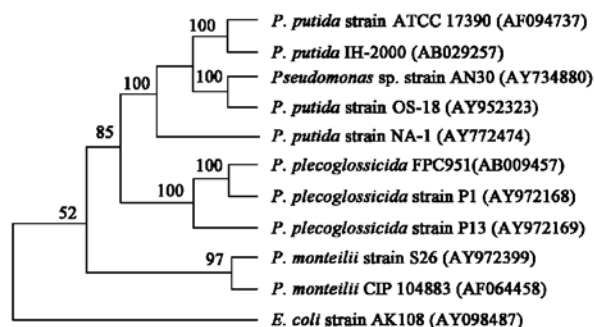


图 3 AN30 菌株的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequence of strain AN30

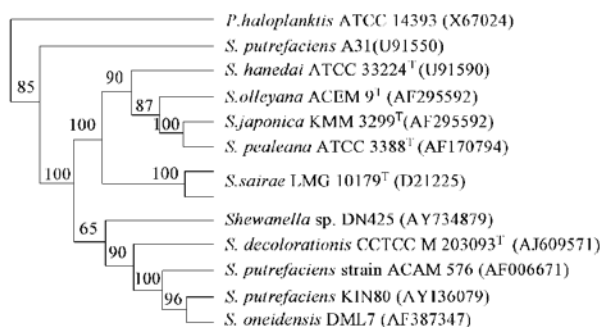


图 4 DN425 菌株的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequence of strain DN425

16S rDNA 扩增测序方法鉴定的结果与菌落、细胞形态及生理生化等方面的鉴定结果一致,进一步确证 AN30 菌株和 DN425 菌株分别属于 *Pseudomonas* 菌属和 *Shewanella* 菌属。

2.2 苯胺降解菌降解苯胺能力的测定

在摇床振荡培养和静置培养条件下分别测定 2 菌株的苯胺降解率,结果如图 5、6 所示。对初始浓度 250 mg/L 的苯胺,在 72h 内,AN30 菌株在好氧条件下的苯胺降解率为 96.1%,DN425 菌株的降解率为 13.8%;在静置培养条件下 AN30 菌株的苯胺降解率为 39.6%,DN425 菌株的降解率仅为 8.6%。表明 AN30 菌株不仅在摇床好氧条件下具有较强的苯胺降解能力,在静置培养条件下也显示出一定的苯胺降解能力,且在 2 种不同条件下 AN30 菌株的苯胺降解率都比 DN425 菌株高。

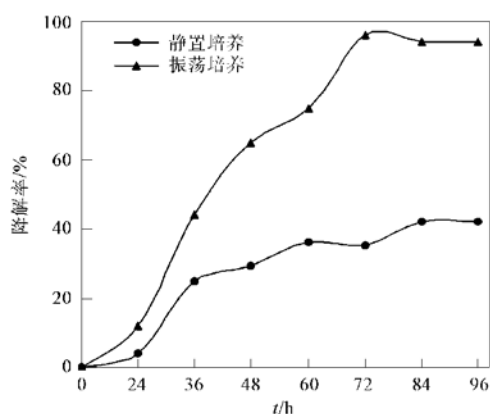


图5 AN30菌株在静置、好氧条件下苯胺降解率比较
Fig. 5 Azor degrading rate of strain AN30 under shaking and static conditions

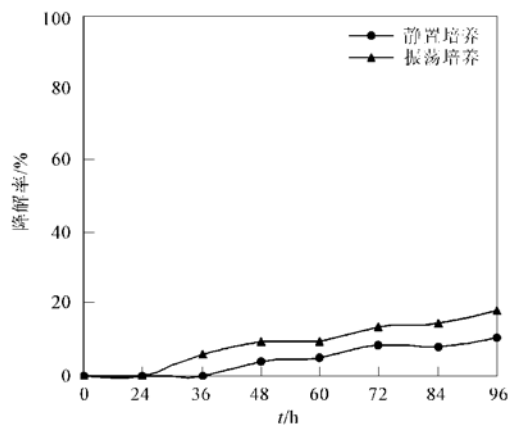


图6 DN425菌株在静置、好氧条件下苯胺降解率比较
Fig. 6 Aniline degrading rate of strain DN425 under shaking and static conditions

2.3 苯胺降解菌脱色能力的证实

在测定苯胺降解率的同时,又分别在摇床振荡培养和静置培养条件下对2菌株的脱色能力进行了测定(图7),结果显示在静置培养条件下菌株AN30对偶氮染料不具有脱色能力,而菌株DN425却具有较强的脱色能力,在静置培养条件下该菌株可在4h内将初始浓度为50 mg/L的偶氮染料酸性大红脱色96%以上。而在摇床振荡培养条件2菌株都不具有脱色能力。

—^[5]。采用 *tdnQ* 基因的引物进行扩增(图8),AN30菌株可以扩增出一条较亮的条带,且大小与文献报道的目标条带(约380bp)相一致。而DN425菌株在相同的扩增条件下可以扩增出3条较亮的条带,大小分别约为760 bp、360 bp及250bp,360bp的扩增条带比目标基因略小。在2菌株中同时扩增出目标条带,说明2苯胺降解菌中都携带有 *tdnQ* 基因。扩增产物带型的差异,尤其DN425菌株的360bp的扩增条带比目标基因略小,可能是2菌株降解苯胺能力差异的原因之一。

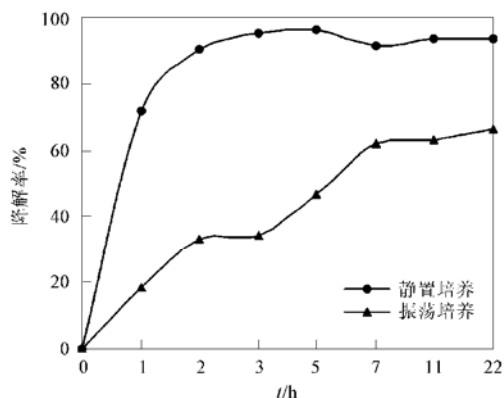


图7 DN425菌株在静置、好氧条件下脱酸性大红K-GP的比较
Fig. 7 Azor degrading rate of strain DN425 under shaking and static conditions

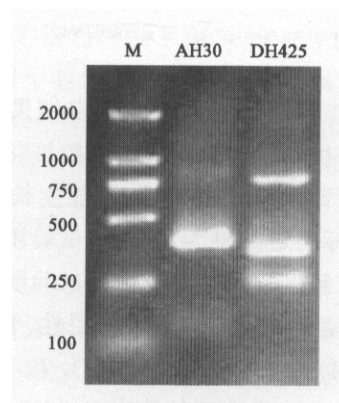


图8 *tdnQ* 基因的扩增

Fig. 8 Amplification of *tdnQ* gene

2.4.2 *fre* 基因的扩增

大肠杆菌黄素还原酶(flavin reductase)具有偶氮还原酶的功能,在测定DN425具有较强的脱色能力之后,采用 *fre* 基因特异性引物对2菌株进行了扩增(图9)。AN30菌株和DN425菌株都可扩增出预期大小为630bp的 *fre* 基因目标片段,同时AN30还可扩增出1条大小为1250bp左右,约为目的基因的2倍的条带,DN425有1条比目标基因略小的扩

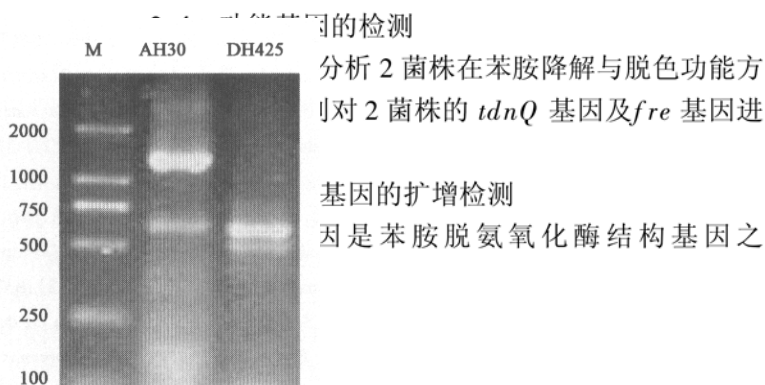


图9 *fre* 基因的扩增

分析2菌株在苯胺降解与脱色功能方面,对2菌株的 *tdnQ* 基因及 *fre* 基因进行扩增检测。因是苯胺脱氨氧化酶结构基因之

增条带. 菌株 DN425 具有降解偶氮染料的能力, 因此具有目标基因; 而菌株 AN30 并不具有降解偶氮染料的能力, 却也能扩增出与 *fre* 基因目标片段大小一致的条带.

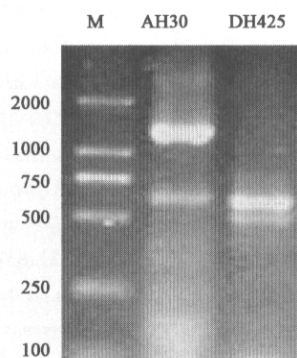


图 9 *fre* 基因的扩增

Fig. 9 Amplification of *fre* gene

3 讨论

苯胺的毒害作用不仅严重影响人及动物的健康, 而且还会毒害细菌, 使细菌不能有效地使之分解. 因此从环境中分离筛选高效的苯胺降解菌, 是消除环境中苯胺污染的重要环节. 染料尤其偶氮染料生物降解过程中会形成苯胺及其衍生物. 在处理高色度印染废水时, 采用兼有脱色和苯胺降解功能的双功能高效微生物, 可将脱色过程中形成的苯胺在脱色处理的同时去除, 从而避免造成对环境的二次污染. 本研究筛选的兼具脱色和苯胺降解功能的细菌 DN425, 有望在这方面发挥独特的作用. 绝大多数微生物对偶氮染料的脱色仅在厌氧或缺氧条件下才能进行^[13~15], 而随之产生的苯胺及其衍生物在厌氧条件下很难被微生物继续降解矿化^[3,4,16,17], 通常需要在好氧条件下, 经过多种微生物的共同作用才可实现彻底降解^[18]. 因此可以将该菌株投加到厌氧段与好氧段相联的处理工艺, 如 ABR 与 SBR 串联的印染废水处理工艺, 以最大限度地发挥 DN425 菌株的处理效果. 也可将对偶氮染料脱色效果较好的 DN425 菌株和对苯胺降解率较高的 AN30 菌株联合使用, 在处理系统的厌氧与好氧工艺段, 使不同的菌发挥相应的长处. 本实验室利用现有的 ABR 与 SBR 串联的印染废水处理工艺^[6], 将 2 株菌分别或单独投加到处理系统中, 已取得了较好的处理效果.

尽管 DN425 菌株与 AN30 菌株相比苯胺降解率较低, 但 DN425 菌株鉴定结果显示其属于

Shewanella 菌属, 而 *Shewanella* 菌属具有降解苯胺的能力尚未见有文献报道.

tdnQ 基因是在苯胺脱胺氧化过程中起作用的基因, Boon 等人用变性梯度凝胶电泳 (denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE) 的方法证实不同苯胺或 3-氯苯胺降解菌中 *tdnQ* 基因的多样性^[11]. 本研究采用 *tdnQ* 基因特异性引物成功地在 AN30 菌株和 DN425 菌株中同样检测到了 *tdnQ* 基因的存在, 表明 *tdnQ* 基因在不同的苯胺降解菌中广泛存在. 有关 AN30 菌株及 DN425 菌株中 *tdnQ* 基因的深入研究正在本实验室进行之中.

偶氮染料降解的关键是偶氮还原酶将偶氮键还原断裂形成无色的芳香胺. Suzuki 等人从芽孢杆菌 OY122 中分离纯化到 1 株具有偶氮还原酶活性的酶^[19]. Russ 等人将来自大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 的 *fre* 基因克隆到在厌氧条件下可降解萘磺酸的鞘氨醇单胞菌 (*Sphingomonas* sp.) BN6 中, 发现菌株的偶氮还原酶活性提高了 35 倍, 证明了大肠杆菌黄素还原酶具有偶氮还原酶的功能^[12]. 本研究中发现不能降解偶氮染料酸性大红的 AN30 菌株也同样可以扩增出 *fre* 基因, 而另有文献报道一些能够降解偶氮染料的菌却扩增不出 *fre* 基因^[20]. *fre* 基因的表达产物黄素还原酶与降解偶氮染料的偶氮还原酶之间复杂关系, 仍有待进一步深入研究.

4 结论

(1) 从处理印染废水的活性污泥中分离得到 2 株苯胺降解菌 AN30 和 DN425, 从菌落、细胞形态、生理生化及 16S rDNA 基因扩增测序等方面进行了鉴定, 2 株菌分别属于 *Pseudomonas* 菌属和 *Shewanella* 菌属.

(2) 菌株 AN30 在振荡好氧条件下 72h 内对 250 mg/L 苯胺的降解率为 96.1%, DN425 菌株的降解率为 13.8%; 在静置缺氧条件下 AN30 的苯胺降解率为 39.6%, DN425 菌株的降解率仅为 8.6%. DN425 菌株在静置缺氧条件下 4h 内可将初始浓度为 50 mg/L 的偶氮染料酸性大红彻底脱色, 而 AN30 菌株对酸性大红不具有脱色能力.

(3) AN30 菌株和 DN425 菌株均携带有苯胺脱氨氧化酶基因和黄素还原酶基因.

参考文献:

- [1] Liu Z, Yang H, Huang Z, et al. Degradation of aniline by newly isolated, extremely aniline-tolerant *Delftia* sp. AN3[J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2002, 58: 679~682.

- [2] Meyers N L. Molecular cloning and partial characterization of the pathway for aniline degradation in *Pseudomonas* sp. strain CIT I [J]. *Current Microbiol.*, 1992, **24**(6): 303~ 310.
- [3] Fumiyasu F, Christopher P S. Nucleotide sequences and regulational analysis of genes involved in conversion of aniline to catechol in *Pseudomonas putida* UCC22 (pTDN1) [J]. *J. Bacteriology*, 1997, **179**(2): 399~ 408.
- [4] 刘志培, 杨惠芳. 假单胞菌 S-42 对偶氮染料的脱色和降解代谢 [J]. *微生物学报*, 1989, **29**(6): 18~ 426.
- [5] 徐向阳, 张明洲, 俞秀娥. 高效脱色菌的特性及其在染色废水厌氧处理中的生物强化作用 [J]. *中国沼气*, 2001, **19**(2): 3 ~ 7.
- [6] 任随周, 郭俊, 曾国驱, 等. 处理印染废水的厌氧折流板反应器 (ABR) 中微生物种群多样性 [J]. *生态学报*, 2005, **25**(9): 2297~ 2303.
- [7] Fujii T, Takeo M, Maeda Y. Plasmid-encoded genes specifying aniline oxidation from *Acinetobacter* sp. strain YAA [J]. *Microbiology*, 1997, **143**: 93~ 99.
- [8] 中国标准出版社第二编辑室. 水质分析方法国家标准汇编 [M]. 北京: 中国标准出版社, 1996. 169~ 171.
- [9] Zhou J, Bruns M A, Tiedje J M. DNA recovery from soils of diverse composition [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, **62**(7): 316~ 322.
- [10] Edwards U, Rogall T, Blocker H, *et al.* Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes: characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA [J]. *Nucleic Acids Research.*, 1989, **17**: 7843~ 7853.
- [11] Boon N, Goris J, Vos P D, *et al.* Genetic Diversity among 3-Chloroaniline and Aniline-Degrading Strains of the Comamonadaceae [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, **67**(3): 1107~ 1115.
- [12] Russ R, Rau J, Stolz A. The function of cytoplasmic flavin reductases in the reduction of azo dyes by bacteria [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, **66**(4): 1429~ 1434.
- [13] Rafii F, Franklin W, Cerniglia C E. Azoreductase activity of anaerobic bacterial isolated from human intestinal microflora [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1990, **56**(7): 2164~ 2151.
- [14] Rau J, Stolz A. Oxygen insensitive Nitroreductases NfsA and NfsB of *Escherichia coli* function under anaerobic conditions as lawson dependent azo reductases [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, **69**(6): 3448~ 3455.
- [15] Maier J, Kandelbauer A, Erlacher A, *et al.* A new alkali-thermostable azoreductase from *Bacillus* sp. strain SF [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004, **70**(2): 837~ 844.
- [16] Isik M, Sponza D T. Effect of oxygen on decolorization of azo dyes by *Escherichia coli* and *Pseudomonas* sp. and fate of aromatic amines [J]. *Process Biochemistry*, 2003, **38**: 1183~ 1192.
- [17] Stolz A. Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes [J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2001, **56**: 69~ 80.
- [18] Huang W, Schmidt A, Nortemann B, *et al.* Mineralization of the sulfonated azo dye mordant yellow 3 by 6-aminonaphthalene-2-sulfonate-degrading bacterial consortium [J]. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 1991, **57**: 3144~ 3149.
- [19] Suzuki Y, Yoda T, Ruhul A. *et al.* Molecular cloning and characterization of the gene coding for azoreductase from *Bacillus* sp. OY122 isolated from soil [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, **276**(12): 9059~ 9065.
- [20] 许玫英, 李建军, 曹渭, 等. 染料脱色菌的分子分类和有关基因与其脱色特性的关系 [J]. *微生物学杂志*, 2004, **24**(6): 25 ~ 28.