

活性黑 5 脱色产物对直接黄 11 生物脱色的促进作用研究

王兴祖,程翔,郑慧,孙德智

(哈尔滨工业大学市政环境工程学院,哈尔滨 150090)

摘要:以沼泽红假单胞菌 W1 为研究对象,考察了活性黑 5(reactive black 5, RB5)脱色产物对直接黄 11(direct yellow 11, DY11)生物脱色的影响,并对其机制进行了分析.结果表明, RB5 脱色产物能明显加快 DY11 生物脱色的速率.初始浓度为 200 mg/L 的 DY11 加入 RB5 脱色产物后脱色动力学常数 K 值可由 17 mg/(L·h)增加到 42.5 mg/(L·h),优化 RB5 脱色产物投量, K 值可进一步提高到 48.8 mg/(L·h).循环伏安分析结果表明, RB5 脱色产物具有电化学活性,可媒介电子的转移,其可逆氧化峰(E_o)位于 83 mV,可逆还原峰(E_r)位于 -220 mV. FT-IR 和 HPLC-MS 的分析结果表明, RB5 脱色产物中具有电化学活性的物质为 TAHNDS_{DP-1}. TAHNDS_{DP-1} 具有醌式结构,能通过得失 2[H] 的方式在氧化态和还原态之间转化,可作为氧化还原介体加速菌株 W1 对 DY11 的还原.

关键词:沼泽红假单胞菌; RB5 脱色产物; 氧化还原介体; 生物脱色

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2008)11-3194-06

Stimulation of Biodecolorization of Direct Yellow 11 by Decolorization Products of Reactive Black 5

WANG Xing-zu, CHENG Xiang, ZHENG Hui, SUN De-zhi

(School of Municipal & Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China)

Abstract: This study focused on the effects of decolorization products of reactive black 5 (RB5) on anaerobic decolorization of direct yellow 11 (DY11) by *Rhodopseudomonas palustris* W1 and its reaction mechanisms. The results showed that the decolorization products of RB5 could obviously accelerate biological decolorization rate of DY11. For initial concentration of 200 mg/L of DY11, the addition of decolorization products of RB5 resulted in that the decolorization kinetic constant K was increased from 17 mg/(L·h) to 42.5 mg/(L·h), followed by an further increase to 48.8 mg/(L·h) after optimization of RB5 supplement. Cyclic voltammogram analysis demonstrated that the decolorization products of RB5 presented electrochemical activity due to the presence of redox electron transfer mediators, as indicated by an observation of two current peaks of reversible oxidation and reduction appeared at potential of ca. 83 mV and -200 mV, respectively. According to LC-MS and FT-IR analysis, the electrochemically activated species of the decolorization products were characterized to be 7-amino-8-hydroxy-1, 2-naphthoquinone-3, 6-disulphonate-1, 2-diimine (TAHNDS_{DP-1}). TAHNDS_{DP-1} with quinone-like structure was able to transfer between its oxidative and reductive forms by transferring 2[H], which was supposed to be the redox mediator to shuttle electrons from electron donors to azo dyes, thus, improving the reduction of de materials.

Key words: *Rhodopseudomonas palustris*; decolorization products of RB5; redox mediator; biodecolorization

应用于纺织加工工业的染料有偶氮染料、蒽醌染料、芳甲烷染料、杂环染料等.由于偶氮染料具有色谱范围广、色种齐全、牢度高等优点,使其无论在品种或是在数量上均为最大的一类工业染料(约占世界染料市场的 60%~70%)^[1].但许多偶氮染料有三致(致癌、致突变、致畸)作用^[2],并且这些产品正朝着抗光解、抗氧化、抗生物降解的方向发展,因此偶氮染料的降解越来越引起人们重视^[3,4].

偶氮染料其分子特征是含有一个或多个偶氮键(—N=N—),多数偶氮染料分子中还含有氨基、磺酸基、苯环或萘环结构,由于偶氮染料分子具有复杂的化学结构、较低的氧化还原电位以及空间阻碍效应等特点,使得偶氮键的还原裂解反应成为染料

整个矿化过程的限速步骤^[5].细菌对偶氮染料的脱色通常发生在厌氧条件下^[6~8],脱色过程可能包含不同的机制,例如酶的直接脱色、氧化还原介体间接脱色以及源自生物的还原剂如硫化物的化学还原脱色^[9~11].其中,通过加入氧化还原介体强化能够将原先的脱色速度增加好几个数量级^[12].目前有关氧化还原介体还原的研究普遍认为,氧化还原介体在细菌厌氧偶氮还原中是作为细菌与染料分子之间的电子穿梭体发挥作用.即氧化态的介体首先从菌体细

收稿日期: 2007-11-05; 修订日期: 2008-01-28

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863)项目(2007AA06Z300)

作者简介: 王兴祖(1980~),男,博士研究生,主要研究方向为环境微生物, E-mail: wuxingzhizhong@yahoo.com.cn

* 通讯联系人, E-mail: sdzlab@126.com

胞接受电子变成还原态,还原态的介体与偶氮染料相互作用,使偶氮染料被还原,从而提高偶氮还原效率^[13,14].最近的研究表明,一些偶氮染料如活性红 2 和酸性橙 7 的脱色产物能够显著促进自身的生物脱色^[15,16],研究者推测脱色产物中含有氧化还原介体.由于介体与染料间的作用为非特异的纯化学反应,因此,一种染料产生的介体可能促进其它染料的生物脱色,但鲜见这方面的报道.本实验以沼泽红假单胞菌研究了 RB5 的脱色产物对 DY11 生物脱色的作用及其机制,以期为混合染料的协同生物脱色提供了理论依据,对于生物处理在印染废水中的应用具有指导意义.

1 材料与方法

1.1 染料

偶氮染料 RB5 和 DY11,购自浙江邦化集团有限公司,最大吸收波长分别位于 600 nm 和 416 nm.2 种染料的化学结构见图 1.

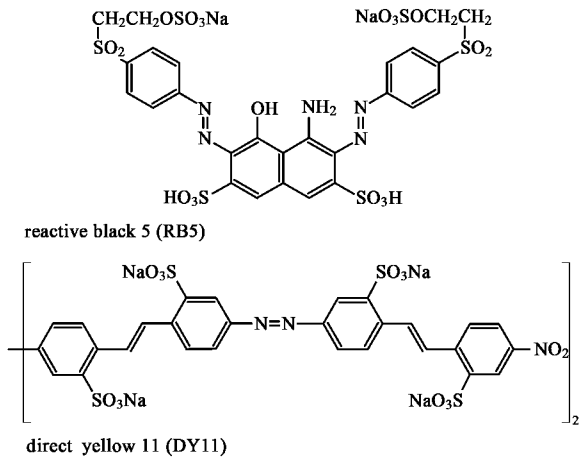


图 1 RB5 和 DY11 的化学结构

Fig.1 Chemical structure of RB5 and DY11

1.2 菌株和脱色培养基

从处理染料废水生物反应器中分离得到 1 株紫色非硫细菌,经鉴定命名为沼泽红假单胞菌 W1 (*Rhodospseudomonas palustris* W1).采用修改的 Van Neil 培养基(碳源修改为 4 g/L 的乳酸钠)作为基础培养基,脱色培养基为基础培养基中添加不同浓度的 DY11.

1.3 脱色实验

脱色实验在 250 mL 广口瓶中进行,装液量 200 mL,培养基经煮沸后移入广口瓶,经吹氮气除氧 30 min 后,以丁基橡胶塞快速密封广口瓶.脱色在厌

氧、光照(2 000 lx)、30℃ 条件下进行.每组实验设 3 个平行样,取其平均值.

1.4 RB5 脱色产物及菌体的获得

用菌株 W1 对 RB5 进行厌氧脱色,待脱色完全后将培养液在 8 000 r/min 下离心 5 min,得到菌体和上清液,菌体作为种子接种,接种后细胞浓度为 50 mg/L 左右;上清液经 0.22 μm 滤膜过滤进一步去除菌体,滤出液即为 RB5 的脱色产物(DM).DM 对 DY11 脱色影响实验中按 1:10 体积比加入 DM.

1.5 DM 对 DY11 的化学脱色

该实验在 1 cm 比色杯中完成.首先用菌株 W1 对浓度为 400 mg/L 的 RB5 进行厌氧脱色,待脱色完全后,将培养液在厌氧工作站中以 0.22 μm 滤膜进行过滤除菌,获得 DM400.然后将 DM400 按 1:10 体积比加入 DY11 脱色培养基中(DY11 终浓度为 360 mg/L),将比色杯以橡胶塞密封测定吸光度.

1.6 分析方法

1.6.1 DY11 浓度的测定

将脱色后的 4 mL 培养液在 8 000 r/min 下离心 5 min,取上清液在分光光度计上测定 416 nm 处的吸光度值,DY11 浓度由 416 nm 处的吸光度值确定,其浓度与吸光度值的关系式见式(1)($R^2 = 0.9976$):

$$\text{DY11 浓度}(\text{mg/L}) = \text{吸光度值} \times 69.302 \quad (1)$$

1.6.2 RB5 脱色产物的循环伏安分析

循环伏安分析采用三电极体系,以玻碳电极($d = 3 \text{ mm}$)为工作电极,铂丝为辅助电极,Ag/AgCl 为参比电极.实验中用 263A 型电化学分析仪测试并做循环伏安曲线.扫描速率为 50 mV/s,扫描范围在 $-500 \sim 500 \text{ mV}$.所用支持电解质 Na_2SO_4 的浓度为 0.1 mol/L.实验前样品经高纯氮气除氧 30 min.

1.6.3 RB5 脱色产物的 FT-IR 分析

将样品经 0.45 μm 滤膜过滤,置于 60℃ 水浴上蒸去水分,再经烘箱干燥得到粉末样品.将其研磨后采用 PE 公司 Spectrum One 型傅立叶红外光谱仪和 Diffuse Reflectance Sampling Accessory 进行扫描测其红外光谱.波长的扫描范围为 $400 \sim 4\,000 \text{ cm}^{-1}$,扫描步长为 $8 \text{ cm}^{-1}/\text{s}$,扫描次数为 16 次.研细的 KBr 粉末做参比.

1.6.4 RB5 脱色产物的 HPLC-MS 分析

高效液相色谱分析条件.将样品经 0.45 μm 滤膜过滤,采用 Finnigan surveyor 型(美国热电集团)PDA 检测器和自动进样器进行测试.色谱柱为 ODS 2-C18 柱(Phenomenex spherisorb 3 型,100 mm × 2.0 mm),进样量为 2 μL,流速为 0.2 mL/min.流动相成

分:水 50%,乙腈 50%, 25 mmol/L醋酸铵.检测波长为 265、318 和 600 nm.

质谱分析条件.ESI 离子源; m/z 扫描范围:100 ~ 1 000;扫描周期 1 s;离子源喷射电压:5.0 kV;毛细管温度:275℃;夹套气(N_2)压力:6 125 kPa;辅助气(N_2)压力:875 kPa;检测方式为:正、负离子检测.

2 结果与讨论

2.1 DM 对 DY11 生物脱色的影响

用菌株 W1 对浓度为 200 mg/L 的 RB5 进行脱色,脱色完全后按 1.4 获得 DM200,将其接入含有不同浓度 DY11(200 ~ 3 200 mg/L)的培养基中,以研究 DM 对 DY11 生物脱色的影响.结果表明(图 2 和表 1),未加 DM 时菌株 W1 对 DY11 的生物脱色接近零级动力学,且降解速率随初始染料浓度的增加而增加,当初始染料浓度从 200 mg/L 增加到 3 200 mg/L,动力学常数 K 值从 8.95 mg/(L·h) 增加到 93.22 mg/(L·h).加入 DM 后 DY11 生物脱色仍然为零级动力学(图 3 和表 2),并且降解速率随初始染料浓度的增加而增加,但脱色速率明显加快.初始浓度为 200 mg/L 的 DY11 在加入 DM 后其 K 值为 21.4 mg/(L·h),是对照的 2.4 倍,随着初始染料浓度升高,RB5 脱色产物对菌株 W1 生物脱色的促进作用下降.当染料浓度达到 3 200 mg/L 时,动力学常数 K 值为 133.2 mg/(L·h),仅为对照的 1.4 倍,这可能是因为单位时间内菌体产生的还原力有限,这些还原力不足以还原更多的染料.

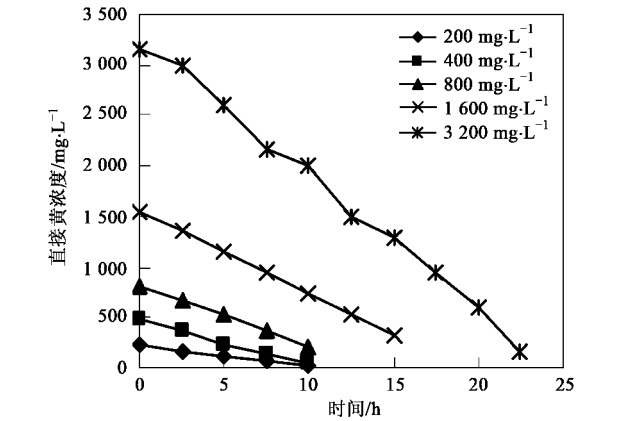


图 2 未加 DM 时不同浓度 DY11 生物脱色曲线
Fig.2 Biodecolorization profiles of DY11 under different concentrations free DM

2.2 DM 浓度对 DY11 生物脱色的影响

用菌株 W1 分别对浓度为 0 ~ 1 600 mg/L 的 RB5 进行脱色,脱色完全后按 1.4 获得一系列浓度不同

表 1 未加 DM 时不同浓度 DY11 的生物脱色动力学			
Table 1 Kinetics of DY11 biodecolorization under different concentrations free DM			
初始染料浓度 /mg·L ⁻¹	反应速率方程	K	R^2
200	$c = -8.9506t + 234.97$	-8.9506	0.9878
400	$c = -16.969t + 442.59$	-16.969	0.9828
800	$c = -22.332t + 809.28$	-22.332	0.9947
1 600	$c = -58.193t + 1\,656.4$	-58.193	0.9748
3 200	$c = -93.223t + 3\,330.3$	-93.223	0.9684

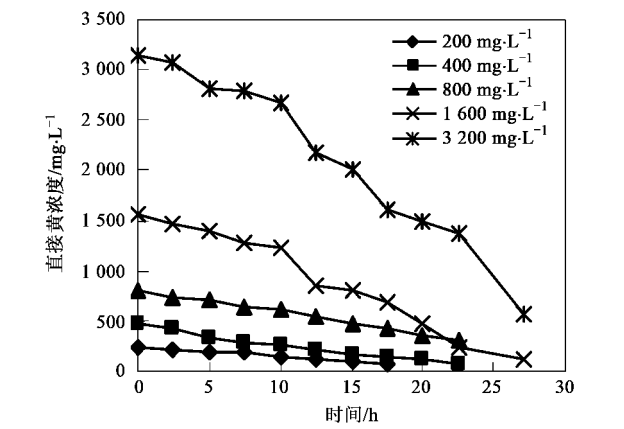


图 3 加入 DM 时不同浓度 DY11 的生物脱色曲线
Fig.3 Biodecolorization profiles of DY11 under different concentrations when supplemented with DM

表 2 加入 DM 时不同浓度 DY11 的生物脱色动力学			
Table 2 Kinetics of DY11 biodecolorization under different concentrations when supplemented with DM			
初始染料浓度 /mg·L ⁻¹	反应速率方程	K	R^2
200	$c = -21.414t + 229.09$	-21.414	0.9991
400	$c = -42.468t + 469.22$	-42.468	0.9962
800	$c = -58.491t + 807.14$	-58.491	0.9965
1 600	$c = -81.878t + 1\,554.2$	-81.878	0.9997
3 200	$c = -133.29t + 3\,238$	-133.29	0.9949

的 DM(DM0 ~ DM1600),然后分别将其按体积比1:10 接入含有 400 mg/L 的 DY11 脱色培养基中,以研究 DM 浓度对 DY11 生物脱色的影响.结果表明(图 4 和表 3),在 DM0 ~ DM400 范围内,菌株 W1 对 DY11 的脱色速率随 DM 浓度的升高迅速提高,DM400 的脱色动力学常数 K 值达到了 48.8 mg/(L·h),与不加 DM 的空白 DM0 相比增加了 2.2 倍.进一步提高 DM 浓度(> DM400) K 值增加不明显,而浓度高于 DM400 的 DM 对菌株 W1 生长有抑制作用(数据未列),因此,DM400 对 DY11 生物脱色的促进作用是适宜的.

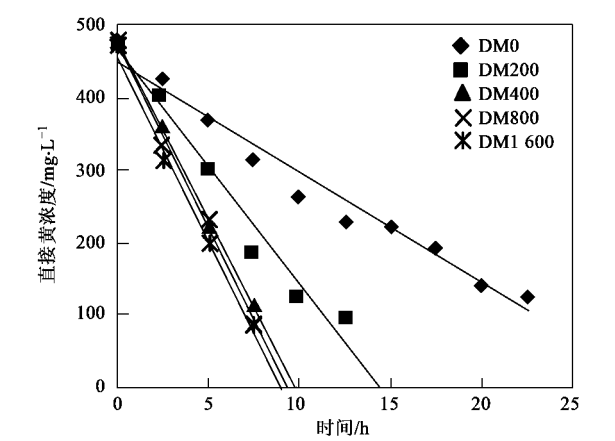


图 4 不同浓度 DM 下 DY11 的生物脱色曲线

Fig.4 Biodecolorization profiles of DY11 under different concentrations of DM

表 3 不同浓度 DM 下 DY11 的生物脱色动力学

Table 3 Kinetics of DY11 biodecolorization under different concentrations of DM

DM	反应速率方程	K	R ²
DM0	$c = -15.333t + 448.48$	-15.333	0.970 1
DM200	$c = -32.858t + 469.22$	-32.858	0.973 6
DM400	$c = -48.762t + 472.9$	-48.762	0.996 6
DM800	$c = -50.613t + 472.58$	-50.613	0.996 5
DM1600	$c = -50.784t + 457.58$	-50.784	0.990 9

2.3 DM 的化学脱色及循环伏安分析

氧化还原介体是脱色产物促进偶氮染料脱色的主要原因^[15,16]. 在无菌株 W1 存在的 DM400 中, DY11 浓度在 5 min 内由 360 mg/L 降为 326 mg/L, 表明 DM 对 DY11 的脱色是自发进行的纯粹的化学反应, 但无菌体持续提供还原力则 DM 对 DY11 的脱色有限, 因此, DM 在 DY11 生物脱色中的作用应为氧化还原介体的作用.

为了进一步确定 DM 氧化还原介体的性质, 分别对 RB5 和 DY11 的脱色产物进行了循环伏安分析. 结果表明(图 5 和图 6), DY11 的脱色产物在 -500~500 mV 扫描范围内没有成对可逆的氧化还原峰出现, 即 DY11 不具有氧化还原介体的性质. RB5 的脱色产物有一对明显的可逆的氧化还原峰, 其可逆氧化峰(E_o)位于 83 mV 左右, 可逆还原峰(E_r)位于 -220 mV, 证明 RB5 脱色产物具有氧化还原介体的性质. RB5 脱色产物对 DY11 脱色的促进是通过氧化还原介体的机制来实现的.

既有强极性磺化基团又有高分子量的偶氮染料难以穿过细胞膜进入胞内被还原^[17,18], 目前的研究表明, 这些染料的还原主要是由胞膜上的酶来催化

完成的^[19]. 但由于染料磺酸基的负极性受到细胞表面的负极性排斥以及染料分子结构空间位阻等的影响, 降低了这些偶氮还原酶的催化效能. 氧化还原介体的加入则能大大加快偶氮染料的还原速率, 因为这些介体能作为电子穿梭体加速菌体和染料间的电子传递, 从而促使还原当量从菌体向偶氮染料转移. 已报道的用于偶氮染料还原的介体主要为外源加入的醌型和黄素型化合物^[20], 另外, 一些染料脱色产生的中间体也能作为氧化还原介体(内源性介体). 本实验的结果表明, RB5 的脱色产物可作为氧化还原介体, 加速偶氮染料的还原.

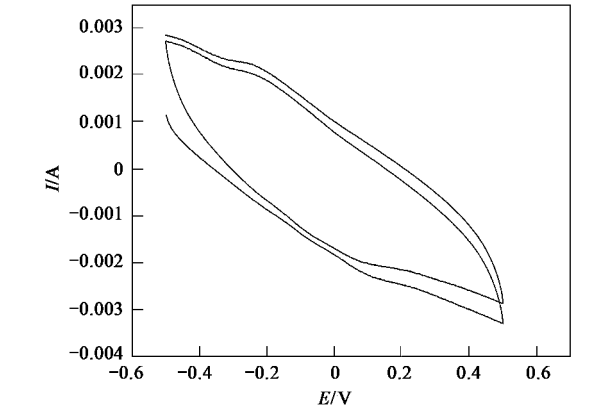


图 5 DM 的循环伏安特性

Fig.5 Cyclic voltammogram of DM

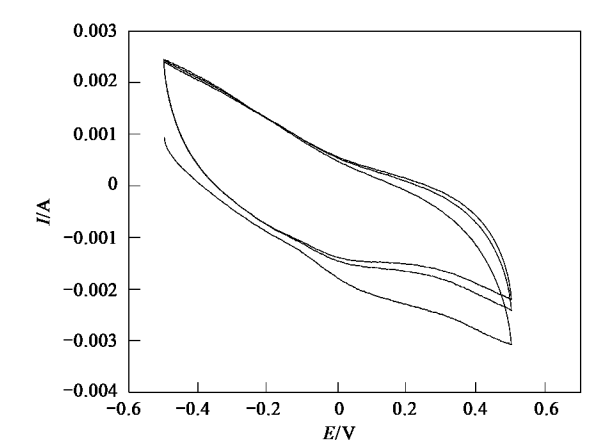


图 6 DY11 脱色产物的循环伏安特性

Fig.6 Cyclic voltammogram of decolorization products of DY11

2.4 RB5 脱色产物的红外分析结果

为确定 DM 的成分, 对 DM 进行了 FT-IR 分析. 图 7 是 RB5 和 DM 的 FT-IR 谱图, 在 RB5 的 FT-IR 谱图上, 3 446 cm^{-1} 处宽而强的吸收峰为 N—H 伸缩振动, 3 376 cm^{-1} 处宽而强的吸收峰为 OH 伸缩振动吸

收峰^[21]; $1\,595\text{ cm}^{-1}$ 为苯环 $\text{C}=\text{C}$ 键的伸缩振动吸收峰; $1\,499\text{ cm}^{-1}$ 是偶氮结构与苯环结构吸收峰的重叠; $1\,341\text{ cm}^{-1}$ 为 N 原子连接于苯环的 $\text{C}-\text{N}$ 特征吸收峰, $1\,226\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\,049\text{ cm}^{-1}$ 为 $\text{C}-\text{O}$ 键的伸缩振动吸收峰; 999 cm^{-1} 处代表苯环的轴向振动吸收峰; 845 cm^{-1} 处为苯环的不饱和 $\text{C}-\text{H}$ 键面外变形振动吸收峰. 在 DM 的 FT-IR 谱图上, $3\,441\text{ cm}^{-1}$ 处宽而强的吸收峰为 $\text{N}-\text{H}$ 伸缩振动; $3\,381\text{ cm}^{-1}$ 处宽而强的吸收峰为 OH 伸缩振动; $1\,595\text{ cm}^{-1}$ 处苯环 $\text{C}=\text{C}$ 伸缩振动吸收峰迁移至 $1\,566\text{ cm}^{-1}$ 处, 说明苯环主体结构没有被破坏; $1\,499\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰消失, 结合此时的脱色结果说明偶氮结构被破坏; $1\,464\text{ cm}^{-1}$ 处的新峰代表 $\text{C}=\text{N}$ 的伸缩振动; 代表 $\text{C}-\text{O}$ 键的 $1\,049\text{ cm}^{-1}$ 处吸收峰迁移至 $1\,045\text{ cm}^{-1}$ 处. 红外分析的结果表明, 脱色过程除了 RB5 偶氮结构的破坏外, DM 中还有新基团 $\text{C}=\text{N}$ 的出现, 推测 DM 中存在醌型化合物.

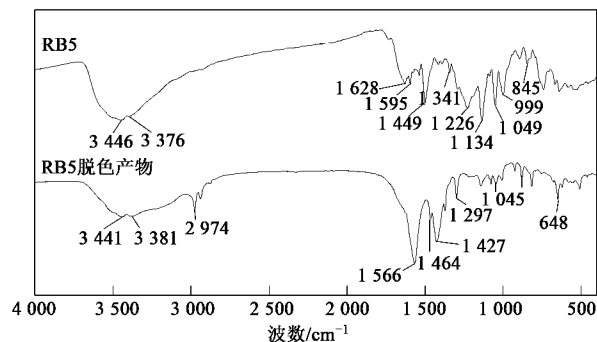


图 7 RB5 脱色前后的 FT-IR 谱图

Fig.7 FT-IR spectra of RB5 and decolorization products of RB5

2.5 RB5 脱色产物的液质分析结果

对 DM 进行的 HPLC-MS 分析表明, 除残留的 RB5 之外, DM 中主要含有 2 种脱色产物(图 8 和图 9). 分别为 2-(4-氨基苯磺酰)乙醇(p-Base)和 7-氨基-8-羟基-1, 2-萘醌-3, 6-二磺酸-1, 2-二亚胺

(TAHNS_{DP-1}). 其中 TAHNS_{DP-1} 的质谱图上伴随有 m/z 为 349 和 348 的峰出现, 分别为 TAHNS_{DP-1} 的还原态 1, 2, 7-三氨基-8-羟基-3, 6-二磺酸萘 (TAHNS) 和 TAHNS_{DP-1} 的水解产物 2-羟基萘醌-3, 6-二磺酸亚胺(TAHNS_{DP-2}), 结合 RB5 的结构进行分析可知, RB5 偶氮键断裂后直接生成的是 TAHNS, 而 TAHNS_{DP-1} 是来自 TAHNS 的自氧化产物. 根据 p-Base 的分子结构判断, 其不具有氧化还原介体的性质.

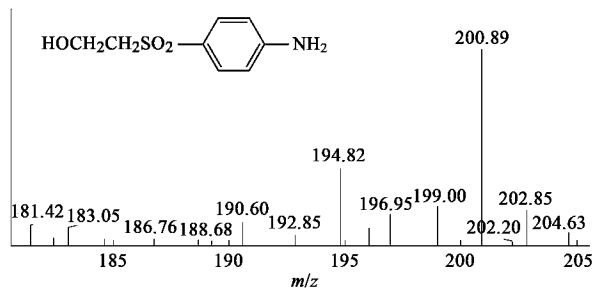


图 8 p-Base 的质谱图

Fig. 8 Mass spectra of p-Base205

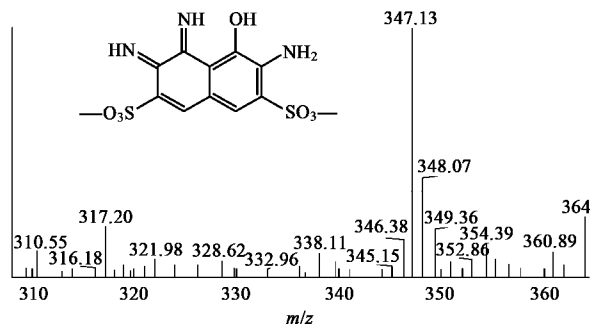


图 9 TAHNS_{DP-1} 的质谱图

Fig.9 Mass spectra of TAHNS_{DP-1}

TAHNS 的转化过程如图 10, TAHNS 和 TAHNS_{DP-1} 的相互转化反应能向着 TAHNS_{DP-1} 的方向自发进行, TAHNS 发生自氧化脱去 $2[\text{H}]$ 生成氧化态的 TAHNS_{DP-1}, 在此过程中能够提供两分子的

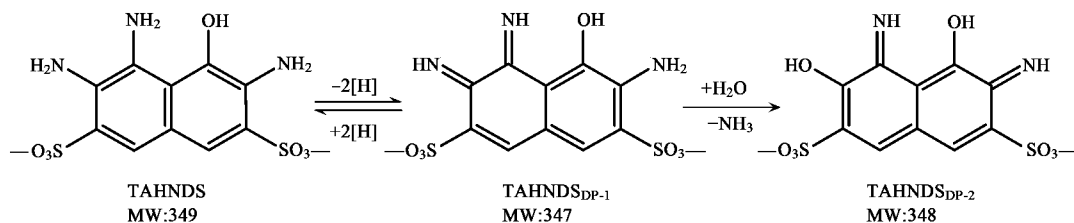


图 10 TAHNS、TAHNS_{DP-1} 和 TAHNS_{DP-2} 间的转化过程

Fig.10 Transformation of TAHNS, TAHNS_{DP-1} and TAHNS_{DP-2}

电子,使偶氮键得到还原.而氧化态的 $\text{TAHNDS}_{\text{DP-1}}$ 再从细菌细胞处得到电子,重新生成还原态的 TAHNDS ,进而再去还原其他染料分子. TAHNDS 从而得以作为氧化还原中间体穿梭于电子供体与染料的偶氮结构之间,促进偶氮结构的还原.

3 结论

(1)DY11 的厌氧生物脱色符合零级动力学,动力学常数 K 值随初始染料浓度的升高而升高,DM 能够明显增加 DY11 的脱色速率,当初初始染料浓度为 200 mg/L 时其 K 值可以达到 21.4 mg/(L·h),是对照的 2.4 倍.

(2)不同浓度的 DM 均能促进 DY11 的厌氧生物脱色,在适宜的 DM 浓度(DM400)下,DY11 的脱色速率常数 K 值可提高到 3.2 倍.过高浓度的 DM 不会进一步增加 DY11 的脱色速率,反而会抑制菌株 W1 生长.

(3)DM 对 DY11 生物脱色的促进作用是通过氧化还原介体的机制来完成.DM 的可逆氧化峰(E_0)位于 83 mV,可逆还原峰(E_r)位于 -220 mV.

(4)根据 FT-IR 和 HPLC-MS 的结果可知,DM 的主要成分为 p-Base 和 $\text{TAHNDS}_{\text{DP-1}}$. TAHNDS 和 $\text{TAHNDS}_{\text{DP-1}}$ 之间的相互转化表明, $\text{TAHNDS}_{\text{DP-1}}$ 可以作为偶氮染料脱色的氧化还原介体,即 RB5 脱色产物中起促进脱色作用的氧化还原介体是 $\text{TAHNDS}_{\text{DP-1}}$.

参考文献:

- [1] Stolz A. Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2001, **56**: 69-80.
- [2] Brown M A, de Vito S C. Predicting azo dye toxicity[J]. Environ Sci Technol, 1993, **23**: 249-324.
- [3] 许玫英,郭俊,钟小燕,等.一个降解染料的希瓦氏菌新种——中国希瓦氏菌[J].微生物学报,2004, **44**: 561-565.
- [4] 郭建博,周集体,王栋,等.偶氮染料循环伏安行为和生物厌氧脱色相关性研究[J].环境科学,2006, **27**(10): 2067-2070.
- [5] dos Santos A B. Reductive decolourisation of dyes by thermophilic anaerobic granular sludge [D]. Wageningen, The Netherlands: Wageningen University, 2005.
- [6] Asad S, Amoozegar M A, Pourbabae A A, et al. Decolorization of textile azo dyes by newly isolated halophilic and halotolerant bacteria [J]. Biores Technol, 2007, **98**: 2082-2088.
- [7] Beydilli M I, Pavlostathis S G. Decolorization kinetics of the azo dye

- Reactive Red 2 under methanogenic condition: effect of long-term culture acclimation[J]. Biodegradation, 2005, **16**: 135-146.
- [8] Bhatt N, Patel K C, Keharia H, et al. Decolorization of diazo dye Reactive Blue 172 by *Pseudomonas aeruginosa* [J]. J Basic Microbiol, 2005, **45**: 407-418.
- [9] Hu T L. Degradation of azo dye RP2B by *Pseudomonas luteola* [J]. Water Sci Technol, 1998, **38** (4-5): 299-306.
- [10] dos Santos A B, Cervantes F J, Yaya-Beas R E, et al. Effect of redox mediator, AQDS, on the decolourisation of a reactive azo dye containing triazine group in a thermophilic anaerobic EGSB reactor [J]. Enzyme Microb Technol, 2003, **33**: 942-951.
- [11] Cervantes F J, Enríquez J E, Galindo-Petátón E, et al. Biogenic sulphide plays a major role on the riboflavin-mediated decolourisation of azo dyes under sulphate reducing conditions [J]. Chemosphere, 2007, **68**: 1082-1089.
- [12] Field J A, Brady J. Riboflavin as a redox mediator accelerating the reduction of azo dye mordant yellow 10 by anaerobic granular sludge [J]. Water Sci Technol, 2003, **48**: 187-193.
- [13] dos Santos A B, Bisschops I A E, Cervantes F J, et al. Effect of different redox mediators during thermophilic azo dye reduction by anaerobic granular sludge and comparative study between mesophilic (30°C) and thermophilic (55°C) treatments for decolourisation of textile wastewaters [J]. Chemosphere, 2004, **55**: 1149-1157.
- [14] van der Zee F P, Bisschops I A E, Lettinga G, et al. Activated carbon as an electron acceptor and redox mediator during the anaerobic biotransformation of azo dyes [J]. Environ Sci Technol, 2003, **37**: 402-408.
- [15] Méndez-Paz D, Omil F, Lema J M. Anaerobic treatment of azo dye acid orange 7 under fed-batch and continuous conditions [J]. Water Res, 2005, **39**(5): 771-778.
- [16] Chang J S, Chen B Y, Lin Y S, et al. Stimulation of bacterial decolorization of an azo dye by extracellular metabolites from *Escherichia coli* strain NO₃ [J]. Biores Technol, 2004, **91**(3): 243-248.
- [17] Levine W G. Metabolism of azo dyes: implication for detoxification and activation [J]. Drug Metabolism Review, 1991, **23**: 253-309.
- [18] 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**: 1429-1434.
- [19] Stolz A. Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2001, **56**: 69-80.
- [20] dos Santos A B, Cervantes F J, Van Lier J B. Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: perspectives for anaerobic biotechnology [J]. Biores Technol, 2007, **98**: 2369-2385.
- [21] 赵瑶兴,孙祥玉.有机分子结构光谱鉴定[M].北京:科学出版社,2004. 75.