

## 研究报告

## 嗜热菌群降解偶氮染料的特性及机制

毕欣妍<sup>1</sup>, 曹珂欣<sup>1</sup>, 黄晓倩<sup>1</sup>, 庄毅<sup>1</sup>, 郭光<sup>1</sup>, 田芳<sup>\*1</sup>, 丁克强<sup>1</sup>, 杨凤<sup>1</sup>, 刘翀<sup>2</sup><sup>1</sup> 南京工程学院环境工程学院, 江苏 南京 211167<sup>2</sup> 中国农业科学院农业环境与可持续发展研究所, 北京 100081

毕欣妍, 曹珂欣, 黄晓倩, 庄毅, 郭光, 田芳, 丁克强, 杨凤, 刘翀. 嗜热菌群降解偶氮染料的特性及机制[J]. 微生物学通报, 2023, 50(4): 1464-1480.

BI Xinyan, CAO Kexin, HUANG Xiaoqian, ZHUANG Yi, GUO Guang, TIAN Fang, DING Keqiang, YANG Feng, LIU Chong. Decolorization characteristics and mechanism of azo dyes by a thermophilic bacterial consortium[J]. Microbiology China, 2023, 50(4): 1464-1480.

**摘要:**【背景】印染废水的出水温度高, 抑制了微生物对偶氮染料的降解, 而关于嗜热菌在高温下降解偶氮染料的报道较少。【目的】富集能在高温下降解偶氮染料的嗜热微生物菌群, 并研究其降解潜力和基因组特征。【方法】通过富集的方法获得嗜热微生物菌群, 利用分光光度法测定其降解特性; 采用全波长扫描、傅里叶变换红外吸收光谱(Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR)和气相质谱(gas chromatography-mass spectrometer, GC-MS)分析其降解机理; 采用植物毒性的方法比较偶氮染料降解前后的毒性; 采用高通量测序技术分析其功能基因和群落结构。【结果】该菌群(SD1)可以在 65 °C降解偶氮染料, *Caldibacillus*、*unclassified\_f\_\_Bacillaceae*、*Geobacillus* 等为优势属, 在降解过程中起关键作用; 菌群 SD1 能在较宽泛的 pH (5.0–9.0)、温度(50–75 °C)、染料浓度(100–500 mg/L)和盐度(1%–5%)降解酸性大红 GR; 偶氮还原酶和 NADH-DCIP 是主要的降解酶, GC-MS 和 FTIR 结果表明菌群 SD1 通过偶氮键断裂降解酸性大红 GR; 植物毒性的结果表明, 经菌群 SD1 脱色后酸性大红 GR 的毒性降低; 与降解有关的功能基因有依赖 NADH 的黄素单核苷酸(flavin mononucleotide, FMN)偶氮还原酶基因和依赖 FMN 的还原酶基因。【结论】嗜热菌群 SD1 在处理高温印染废水中具有很大的应用潜力。

**关键词:** 偶氮染料; 嗜热菌; 脱色; 酸性大红 GR; 宏基因组

资助项目: 国家自然科学基金(31600091); 南京工程学院创新基金(CKJB202207); 江苏省高等学校大学生实践创新训练计划(202211276070Y, 202211276071Y)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31600091), the Innovative Foundation of Nanjing Institute of Technology (CKJB202207), and the Science and Technology Innovation of College Students in Jiangsu Province (202211276070Y, 202211276071Y).

\*Corresponding author. E-mail: tianfang@njit.edu.cn

Received: 2022-12-18; Accepted: 2023-02-08; Published online: 2023-02-22

## Decolorization characteristics and mechanism of azo dyes by a thermophilic bacterial consortium

BI Xinyan<sup>1</sup>, CAO Kexin<sup>1</sup>, HUANG Xiaoqian<sup>1</sup>, ZHUANG Yi<sup>1</sup>, GUO Guang<sup>1</sup>, TIAN Fang<sup>\*1</sup>, DING Keqiang<sup>1</sup>, YANG Feng<sup>1</sup>, LIU Chong<sup>2</sup>

<sup>1</sup> School of Environmental Engineering, Nanjing Institute of Technology, Nanjing 211167, Jiangsu, China

<sup>2</sup> Institute of Environment and Sustainable Development in Agriculture, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

**Abstract:** [Background] The high temperature of textile wastewater inhibits the degradation of azo dyes by microorganisms. Little is known about the degradation of azo dyes by thermophiles. [Objective] To enrich the thermophilic microbiota that can degrade azo dyes at high temperature and study their degradation potential and genomic characteristics. [Methods] We obtained a thermophilic bacterial consortium by the enrichment method and then studied its degradation characteristics by spectrophotometry. The degradation mechanism was analyzed by full-wavelength scanning, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The phytotoxicity of azo dyes before and after degradation was compared. The functional genes and structure were analyzed by high-throughput sequencing. [Results] A bacterial consortium (SD1) was enriched, which can degrade azo dye at 65 °C. SD1 was mainly composed of *Caldibacillus*, unclassified *f\_Bacillaceae*, and *Geobacillus*. It could degrade acid red GR within pH 5.0–9.0, 50–75 °C, dye concentration of 100–500 mg/L, and salinity of 1%–5%. Azo reductase and NADH-DCIP were the main degrading enzymes. The results of GC-MS and FTIR demonstrated that the azo bond was broken by SD1. The phytotoxicity of acid red GR decreased after degradation. The genes encoding NADH-dependent flavin mononucleotide (FMN) azo reductase and FMN-dependent reductase involved in the degradation were detected. [Conclusion] The thermophilic bacterial consortium SD1 has great potential to be applied in the treatment of high-temperature textile wastewater.

**Keywords:** azo dye; thermophilic bacteria; decolorization; acid red GR; metagenome

随着我国印染行业的迅速发展，印染废水年排放量达到  $14.0 \times 10^8$ – $16.0 \times 10^8$  t，是我国主要的工业废水之一<sup>[1]</sup>。偶氮染料是生产中最常用的染料，占有染料总量的 70% 左右，具有致癌、致畸、致突变性等危害<sup>[2]</sup>。在印染过程中会有染料排放到废水中，严重威胁水体环境和人体健康。

偶氮染料大多数是人工合成的芳香化合物，难以自然降解，严重制约了印染废水的处

理效果。印染废水的处理方法主要有物理法、化学法和生物法。物理、化学处理法处理成本高、效率低，常常产生二次污染。与物理、化学法相比，生物处理法具有处理成本低、不会产生二次污染等优点，被广泛应用于印染废水处理中。目前，很多降解偶氮染料的微生物已经被分离出来，包括细菌、真菌和藻类<sup>[3]</sup>。细菌具有繁殖快、二次污染少等优点，而且可以降解很多污染物，被广泛应用在印染废水的处

理中。然而,单一菌株在实际使用过程中适应范围和底物广谱性低,而且和菌群相比脱色率低,不能将产物彻底降解,限制了单一菌株的应用<sup>[3]</sup>。混合菌群可以发挥微生物之间的协同作用,降解效率高,可以实现偶氮染料最大程度的降解<sup>[4]</sup>。

印染废水主要产生于染浴和漂洗过程中,其排放温度可达 50–70 °C,高温严重抑制了普通微生物的活性,阻碍了印染废水的处理<sup>[5–6]</sup>。而利用嗜热菌处理高温印染废水,具有处理成本低、不需要降低废水温度、嗜热菌在高温下降解速度快、可同时灭活废水中的病原菌等优点。同时,嗜热菌产生的嗜热酶适应能力强,可以高效降解有毒污染物。Shen 等<sup>[7]</sup>报道 *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* 以葡萄糖为电子供体可以在 70 °C 以下降解甲基橙。Zhang 等<sup>[6]</sup>富集了可以在 70 °C 降解偶氮染料酸性橙 7 的极端嗜热菌群,主要由 *Caldanaerobacter* (64.0%) 和 *Pseudomonas* (25.4%) 组成。虽然关于嗜热菌降解偶氮染料的研究<sup>[8–9]</sup>较多,但是关于嗜热菌降解偶氮染料的功能基因及其作用机制报道较少。因此,分离能在高温环境下降解偶氮染料的菌株,解析嗜热菌降解偶氮染料的特性和机理,可为强化生物处理高温印染废水提供菌种资源和理论依据。

本研究富集了一个可以在高温环境下脱色酸性大红 GR 的嗜热菌群,并研究该菌群对酸性大红 GR 的脱色效果和影响因素,包括 pH、盐度、染料浓度和偶氮染料的结构差异等关键参数,并利用气相色谱-质谱联用仪(gas chromatography-mass spectrometer, GC-MS)鉴定中间产物。此外,通过高通量测序分析嗜热菌群的群落结构,对该菌群的基因组进行特征分析,以期获得详细的遗传信息。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

偶氮染料酸性大红 GR、直接冻黄 G、直接黑 38、酸性橙 7、直接湖蓝 5B、酸性黑 ATT 和直接紫 1, 国药集团化学试剂有限公司。傅里叶变换红外光谱仪, 赛默飞世尔科技公司; GC-MS, 赛默飞世尔科技公司; 紫外可见分光光度计, 岛津公司; MiSeq 平台, Illumina 公司。

富集培养基(g/L): 胰蛋白胍 10.0, NaCl 10.0, 酵母粉 5.0; pH 7.2。

脱色培养基(g/L): Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5, NH<sub>4</sub>Cl 0.3, CaCl<sub>2</sub> 0.1, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2, KCl 0.5, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 1.0, NaCl 7.0, 酵母粉 2.0。

### 1.2 菌株的富集

将印染厂的 10 mL 剩余活性污泥加入到含有 100 mg/L 酸性大红 GR 的富集培养基中, 50 °C 静置培养, 脱色率达到 80% 后, 以 10% 的比例接种到富集培养基中, 并将温度提高到 55 °C, 待脱色稳定后, 提高富集温度。如此反复富集, 温度随着代数增加而增加(每代提高 5 °C), 直至 65 °C 脱色稳定后, 获得极端嗜热菌群。

### 1.3 菌群降解酸性金黄的影响因素

将菌液按 10% (体积分数) 接种到不同 pH 值(5.0、6.0、7.0、8.0 和 9.0)、盐度(1%、2%、3%、4% 和 5%)、温度(50、55、60、65 和 70 °C)、染料浓度(100、200、300、400 和 500 mg/L) 和不同染料结构(直接冻黄 G、直接黑 38、酸性大红 GR、酸性橙 7、直接湖蓝 5B、酸性黑 ATT 和直接紫 1) 的偶氮染料的新鲜脱色培养基中(染料浓度为 100 mg/L), 65 °C 避光静置培养(温度条件除外), 研究环境条件对菌群降解的影响。每个实验设置 3 组重复, 定时测定脱色率。

## 1.4 染料浓度的测定和脱色率的计算

定时取培养液在 12 000 r/min 下离心 5 min, 在染料的对应波长测定未接种的培养基的吸光度  $A_0$  及上清液的吸光度  $A_t$ 。脱色率的计算按照公式(1)进行。

$$q(\%) = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \times 100 \quad (1)$$

## 1.5 酶活性测定

将嗜热菌群 SD1 置于含有 100 mg/L 酸性大红 GR 的培养基中, 65 °C 静置培养 24 h, 以 8 000 r/min 离心 15 min 收集菌体。将菌体置于 pH 7.2 的磷酸钾缓冲液中超声处理 15 min (200 W, 工作 20 s, 间隔 10 s, 4 °C), 12 000 r/min 离心 15 min, 以上清液为粗酶液。用紫外可见分光光度计测定偶氮还原酶、漆酶、锰过氧化物酶、木质素过氧化物酶和 NADH-DCIP 酶活性<sup>[10]</sup>。

## 1.6 降解产物分析

酸性大红 GR 及其降解产物用紫外可见分光光度计分析, 波长范围为 200–900 nm, 间隔为 1 nm。

菌群 SD1 降解酸性大红 GR 48 h (65 °C 静置避光) 的菌液经 12 000 r/min 离心 5 min 后, 用等量的乙酸乙酯萃取中间产物。萃取液经无水硫酸钠干燥, 旋转蒸发仪旋干。样品与 KBr 按 1:100 的质量比混合, 用傅里叶变换红外吸收光谱(Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR)测定降解产物, 波数范围是 500–4 000  $\text{cm}^{-1}$ 。

旋转蒸发仪旋干后的残渣用甲醇溶解, 0.22  $\mu\text{m}$  有机膜过滤。使用 GC-MS 鉴定代谢产物。进样口温度 250 °C, 检测器温度为 280 °C, 以氦气为载气(1 mL/min)。升温程序: 50 °C 5 min, 10 °C/min 升温至 190 °C, 保持 10 min, 然后 10 °C/min 升温至 280 °C, 保持 5 min。

## 1.7 产物毒性测定

采用黄瓜和水稻测定酸性大红 GR 降解前后的植物毒性<sup>[3]</sup>。降解产物采用 1.6 中方法萃取

并溶解在水中。分别用 3 mL 蒸馏水、含有 100 mg/L 酸性大红 GR 和 100 mg/L 降解产物的水浸泡种子, 在 28 °C 培养 7 d 后记录发芽率、胚根和胚芽长度。

## 1.8 菌群的高通量测序

采用 PowerSoil<sup>®</sup> DNA Isolation Kit 提取微生物基因组 DNA, 将基因组 DNA 用 Illumina MiSeq 3000 测序平台进行高通量测序(上海美吉生物医药科技有限公司)。测序数据经筛选、拼接等质控后, 获得的序列进行生物信息学分析。使用 BLAST 将基因集序列与 NR 数据库(non-redundant protein sequence database)比对获得物种注释, 获得菌群的群落结构, 与 eggNOG (evolutionary genealogy of genes: non-supervised orthologous groups) 数据库、KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) 数据库、gene ontology (GO) 进行比对获得预测基因的功能注释。

# 2 结果与分析

## 2.1 群落结构

通过缓慢提高每代富集的温度, 经过 20 代的富集, 逐步淘汰活性较低的微生物, 最终获得了一个可以在 65 °C 降解酸性大红 GR 的嗜热菌群 SD1, 该菌群可以在 24 h 内将 100 mg/L 的酸性大红 GR 完全脱色。该菌群主要由 *Caldibacillus*、*unclassified\_f\_Bacillaceae*、*Geobacillus*、*Parageobacillus* 和 *Aeribacillus* 等组成(图 1)。其中 *Caldibacillus* 占全部序列的 49.0%, *unclassified\_f\_Bacillaceae* 占全部序列的 15.3%, *Geobacillus*、*Parageobacillus* 和 *Aeribacillus* 分别占 13.1%、9.4% 和 8.8%。

## 2.2 环境对菌群 SD1 降解的影响

### 2.2.1 温度对菌群 SD1 降解的影响

印染要经过漂洗、染浴等高温工序, 导致印染废水的温度都较高。微生物对温度非常敏

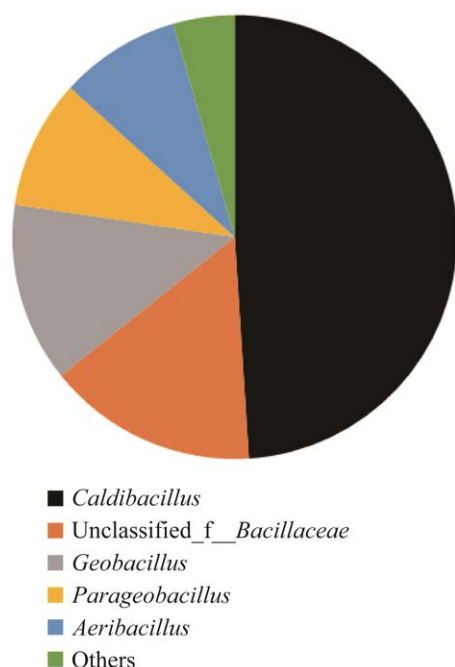


图 1 微生物菌群 SD1 的群落结构

Figure 1 Community structure of the bacterial consortium SD1.

感, 温度高时, 微生物酶会变性从而丧失活力。不同温度对菌群 SD1 降解的影响如图 2A 所示, 12 h 时, 菌群 SD1 在 55、60、65 和 70 °C 的脱色率均超过 50%, 在 24 h 时脱色率超过 90%; 65 °C 时菌群 SD1 的脱色率最高, 达到 96.3%; 75 °C 时, 菌群 SD1 的脱色率在 18 h 时才达到约 50%, 24 h 后脱色率为 72.7%, 因为高温下菌群的酶活性较低, 导致脱色率下降。以上结果表明, 该菌群是嗜热菌群, 高温下代谢能力强, 脱色率高。

### 2.2.2 染料浓度对菌群 SD1 降解的影响

染料具有毒性, 当染料浓度过高时也会抑制菌群的生长, 本实验探究了染料浓度对菌群脱色率的影响, 结果如图 2B 所示。菌群 SD1 的脱色率随着染料浓度的增加而降低。在 12 h 时, 浓度为 100 mg/L 和 200 mg/L 的偶氮染料印染废水的脱色率已经超过 50%, 而当偶氮染料印

染废水中酸性大红 GR 的浓度为 400 mg/L 和 500 mg/L 时, 在 18 h 时脱色率才达到 50%。在 24 h 时, 菌群 SD1 对 100 mg/L 酸性大红 GR 的脱色率最高, 达到 95.6%。在酸性大红 GR 浓度为 200、300、400 和 500 mg/L 时, 24 h 后的脱色率分别为 93.7%、85.1%、79.2% 和 77.5%。当环境中的酸性大红 GR 浓度超过 300 mg/L 时脱色率明显下降。

### 2.2.3 pH 对菌群 SD1 脱色的影响

pH 对微生物的生长、繁殖起着至关重要的作用。pH 的变化会使细菌的表面电荷发生变化, 从而影响养分吸收和酶活力, 影响细菌的降解速度。pH 对菌群 SD1 脱色率的影响如图 2C 所示。在 12 h 时, pH 6.0、7.0 和 8.0 的菌群脱色率都达到 50%, 在 24 h 时分别达到 92.9%、95.6% 和 93.3%。pH 5.0 和 pH 9.0 条件下, 菌群在 24 h 时的降解率较低, 分别达到 88.2% 和 87.6%。因此, 菌群的最适 pH 是 7.0, pH 对菌群脱色的影响较小。总之, 在 pH 中性的环境下, 菌群 SD1 的脱色效果均佳。

### 2.2.4 盐度对菌群 SD1 脱色的影响

为了提高印染效率, 印染厂会加入无机盐来提高着色效果, 因此印染废水中的盐度普遍较高。高盐抑制细菌的生长繁殖, 使得菌体质壁分离, 影响细菌的酶活性, 进而使得细菌的降解效果下降。盐度对菌群 SD1 降解酸性大红 GR 的影响如图 2D 所示。菌群 SD1 的脱色率随盐度的升高而降低。在 1% 盐度环境下脱色效果最好, 达到 95.9%; 在盐度为 2%、3% 和 4% 时, 24 h 的脱色率分别达到了 93.3%、89.1% 和 88.4%; 在盐度为 5% 时, 菌群 SD1 在 24 h 时的脱色率仅为 66.8%。随着盐度的增加, 脱色率随之降低, 说明盐度抑制了菌群 SD1 的降解能力, 盐度越高脱色率越低。在此实验中, 混合菌群 SD1 对染料废水中的盐度有一定的耐受性, 最佳盐度是 1%。

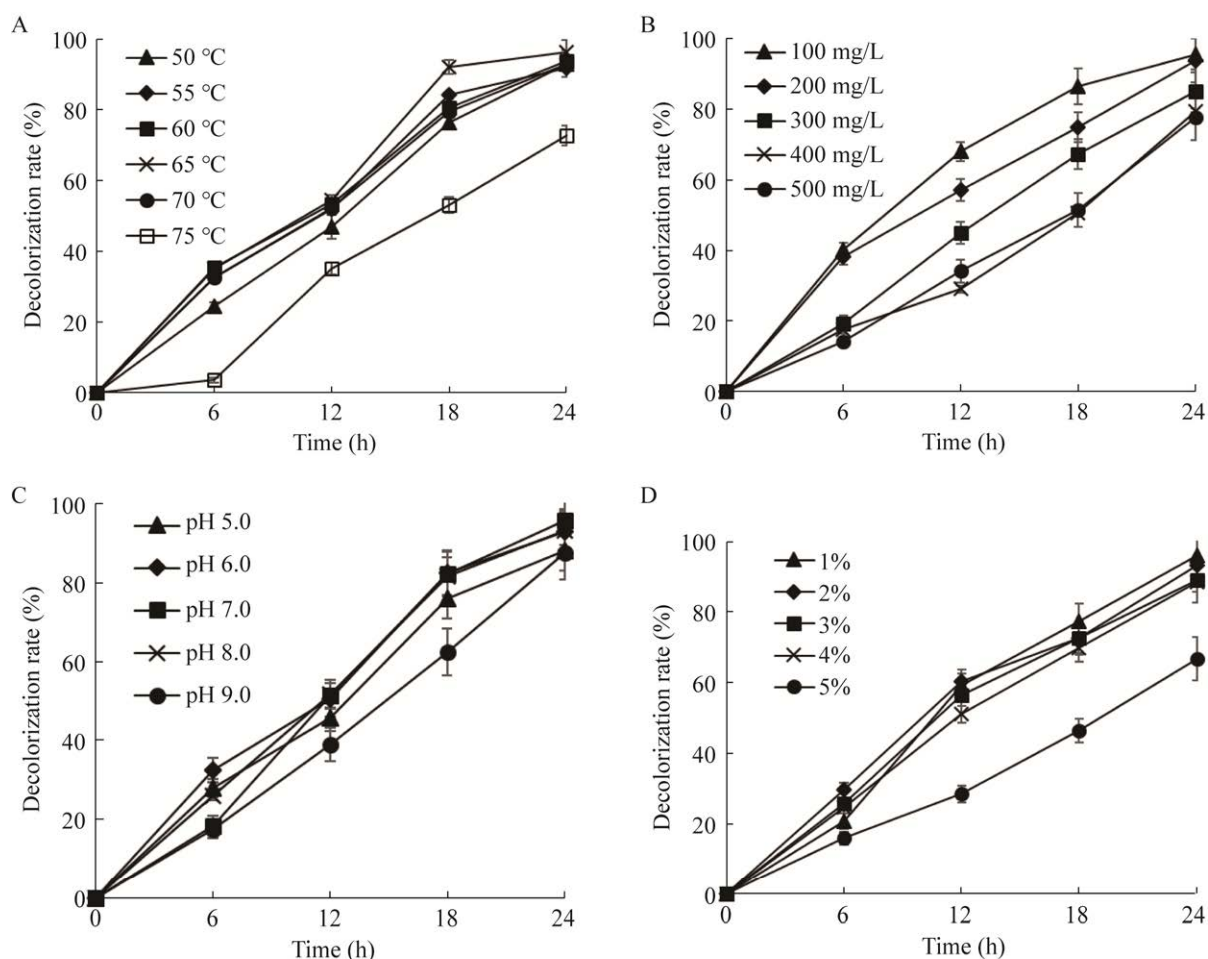


图 2 温度(A)、初始染料浓度(B)、pH (C)和盐度(D)对菌群 SD1 降解酸性大红 GR 的影响

Figure 2 Effect of temperature (A), initial dye concentration (B), pH (C) and salinity (D) on the decolorization of acid red GR by the consortium SD1.

### 2.3 染料结构对菌群 SD1 降解的影响

偶氮染料的分子结构、偶氮键的多少和取代基的种类都影响微生物对偶氮染料的脱色。本研究采用直接冻黄 G、直接黑 38、酸性大红 GR、酸性橙 7、直接湖蓝 5B、酸性黑 ATT 和直接紫 1 等染料。由图 3 可知, 24 h 内, 酸性大红 GR 的降解效果最好, 其脱色率高达 97.1%; 直接冻黄 G、酸性橙 7、直接湖蓝 5B 和直接紫 1 的脱色率分别为 95.4%、94.9%、92.2%和 93.3%; 直接黑 38 和酸性黑 ATT 的脱色率为分别为 76.1%和 57.9%。

### 2.4 降解产物分析

#### 2.4.1 全波长扫描分析

偶氮染料酸性大红 GR 降解前后的全波长扫描如图 4 所示, 染料未降解前在 510 nm 处有一个显著的吸收峰, 这是染料中偶氮结合的一种生色基团组成的共轭系统。24 h 后, 510 nm 处吸收峰消失, 说明酸性大红 GR 降解, 偶氮键和生色团被破坏。由此可以推断菌群 SD1 破坏生色团和共轭体系, 说明酸性大红 GR 的脱色是由微生物降解的, 这与其他人的研究结果<sup>[11]</sup>相同。



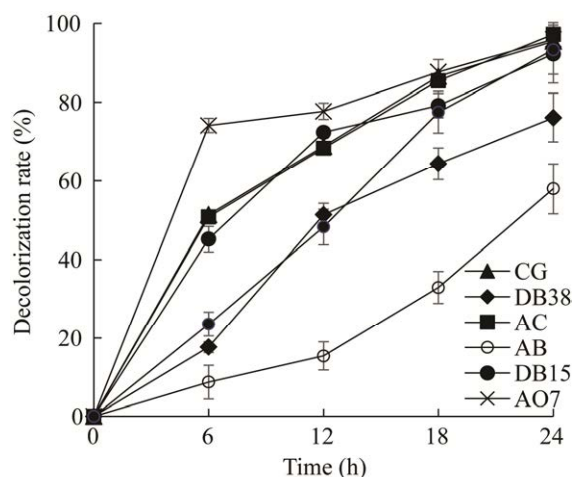


图3 菌群SD1对不同偶氮染料(100 mg/L)的降解  
Figure 3 Decolorization of different azo dyes (100 mg/L) by consortium SD1. Chrysophenine G (CG), direct black 38 (DB38), acid red GR (AC), acid orange 7 (AO7), direct blue 15 (DB15), acid black ATT (AB), direct violet 1 (DV1).

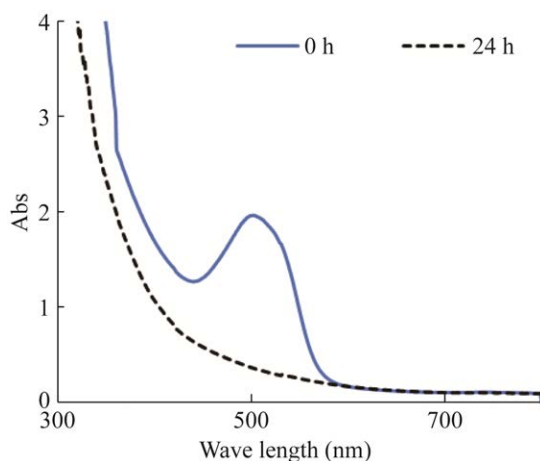


图4 酸性大红GR降解前后全波长扫描图  
Figure 4 UV-visible absorption spectra of acid red GR before and after decolorization.

#### 2.4.2 红外扫描光谱实验

酸性大红GR降解前后的红外光谱扫描如图5所示。酸性大红GR的红外光谱中,1584  $\text{cm}^{-1}$ 代表偶氮键的吸收峰,在1201  $\text{cm}^{-1}$ 是-C-N的吸收峰,这2个吸收峰是偶氮染料特有的吸收峰。这2个峰在脱色后消失,表明偶氮键已被

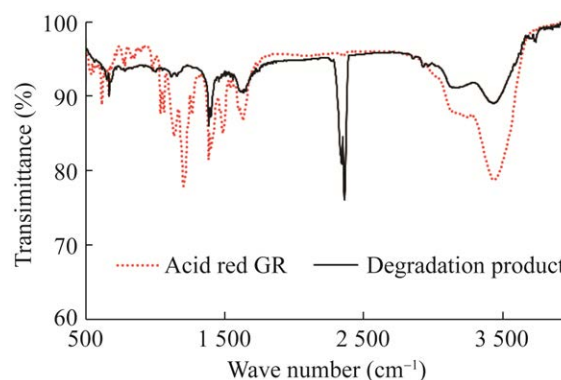


图5 酸性大红GR降解前后红外扫描光谱图  
Figure 5 FTIR spectra of acid red GR before and after decolorization.

裂解。波数3300–3500  $\text{cm}^{-1}$ 是酸性大红GR中N-H在的伸缩振动吸收峰,说明-NH<sub>2</sub>存在于酸性大红GR中。脱色后该峰降低,说明产生了其他带-NH<sub>2</sub>的中间产物。618  $\text{cm}^{-1}$ 处的峰值和1189  $\text{cm}^{-1}$ 处的吸收峰分别是-C-S-和S=O伸缩振动吸收峰,说明染料中含有SO<sub>3</sub><sup>-</sup>,脱色后2个吸收峰消失,表明磺酸脱落。同时,1600  $\text{cm}^{-1}$ 附近的峰值为苯环结构的吸收峰,经微生物降解后减弱,这时苯环结构被打开,降解产物的毒性降低。

#### 2.4.3 GC-MS 气相色谱质谱检测实验

GC-MS的结果表明,酸性大红GR的主要降解产物是苯胺、苯甲酸、苯乙烯和异戊酸。微生物首先破坏酸性大红GR中的偶氮键,形成苯胺、苯二胺和1-氨基-2-萘酚-6,8-二磺酸。然后,1-氨基-2-萘酚-6,8-二磺酸脱羧基、氨基,苯环打开,形成苯乙烯,进一步降解成苯甲酸、异戊酸(表1)。

#### 2.5 植物毒性试验

实验结果表明,黄瓜、水稻种子在蒸馏水中的发芽率为100%(表2)。酸性大红GR处理后黄瓜和水稻的发芽率较低,只有25.0%和33.3%;而降解后的黄瓜和水稻萌发率明显提高,分别

表 1 酸性大红 GR 降解产物的质谱数据和化学结构

Table 1 Mass spectral data and chemical structures of degradation product of Acid red GR

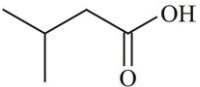
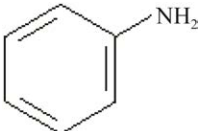
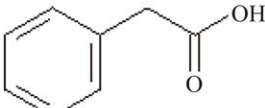
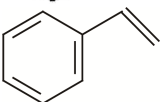
Serial No.	Time (min)	Molecular weight	Precusorions (m/z-structure)	Molecular formula	Chemical structures	Chemical name
1	6.02	102	60	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>		Isovaleric acid
2	8.45	93	93	C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> N		Aniline
3	13.00	136	136	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>		Phenylacetic acid
4	6.78	104	104	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub>		Styrene

表 2 酸性大红 GR (100 mg/L)及其降解产物的植物毒性(48 h)

Table 2 Phytotoxicity of dye Acid red GR (100 mg/L) and its degradation products extracted after degradation (48 h)

Parameters studied	<i>Cucumis sativus</i>			<i>Oryza sativa</i>		
	Germination (%)	Shoot length (cm)	Root length (cm)	Germination (%)	Shoot length (cm)	Root length (cm)
Distilled water	100.0	5.42±1.1	4.73±0.9	100.0	5.88±0.9	4.72±0.7
Acid red GR	25.0	0.76±0.4	0.35±0.2	33.3	0.48±0.2	1.72±0.4
Metabolite	66.7	4.16±0.9	3.83±0.7	75.0	4.63±0.7	4.08±0.4

达到 66.7%和 75.0%。降解后处理的黄瓜和水稻的根长和芽长明显高于处理前,说明经过菌群 SD1 的降解后酸性大红 GR 的毒性降低,这与他人研究结果<sup>[12]</sup>相同。在许多情况下,偶氮染料可以被微生物降解成低毒化合物,甚至被矿化成二氧化碳和水<sup>[13]</sup>。总之,酸性大红 GR 的降解产物具有较低的植物毒性,表明菌群 SD1 具有较好的解毒潜力。

## 2.6 酶活性分析

偶氮还原酶、漆酶、木质素过氧化物酶、锰过氧化物酶和 NADH-DCIP 酶都是微生物降解偶氮染料过程中重要的酶<sup>[14]</sup>。酸性大红 GR 降解前后的酶活性如表 3 所示。与降解前相比,偶氮还原酶的活性提高了 878.4%;其次是

NADH-DCIP 酶,比降解前提高了 219.2%;锰过氧化物酶提高了 13.8%。菌群 SD1 中未检测到漆酶和木质素过氧化物酶活性。

## 2.7 宏基因组分析

微生物的宏基因组测序可以提供代谢功能基因的概况。通过高通量测序总共获得了 76 873 946 个原始序列。经质量控制后获得 76 023 426 个序列,经组装后获得 4 792 个重叠群。选择拼接效果最佳的序列,对结果进行开放阅读框(open reading frame, ORF)预测,获得 12 015 个 ORF,平均长度为 652 bp。

利用 CAZymes 功能分析所有碳水化合物新陈代谢的相关基因,得到 CAZy 注释(图 6A)。该菌群所有基因被分为 6 个主要酶类:61 个糖



表 3 脱色前(对照)和脱色后微生物细胞的酶活性

Table 3 Enzyme activities in the microbial cells before (control) and after decolorization

Time (h)	Azo reductase ( $\mu\text{g}/(\text{min}\cdot\text{mg}\cdot\text{protein})$ )	Laccase ( $\text{U}/(\text{min}\cdot\text{mg}\cdot\text{protein})$ )	Manganese peroxidase ( $\text{U}/(\text{min}\cdot\text{mg}\cdot\text{protein})$ )	Lignin peroxidase ( $\text{U}/(\text{min}\cdot\text{mg}\cdot\text{protein})$ )	NADH-DCIP ( $\mu\text{g}/(\text{min}\cdot\text{mg}\cdot\text{protein})$ )
0	0.426	0	0.036	0	0.265
24	4.168	0	0.041	0	0.846

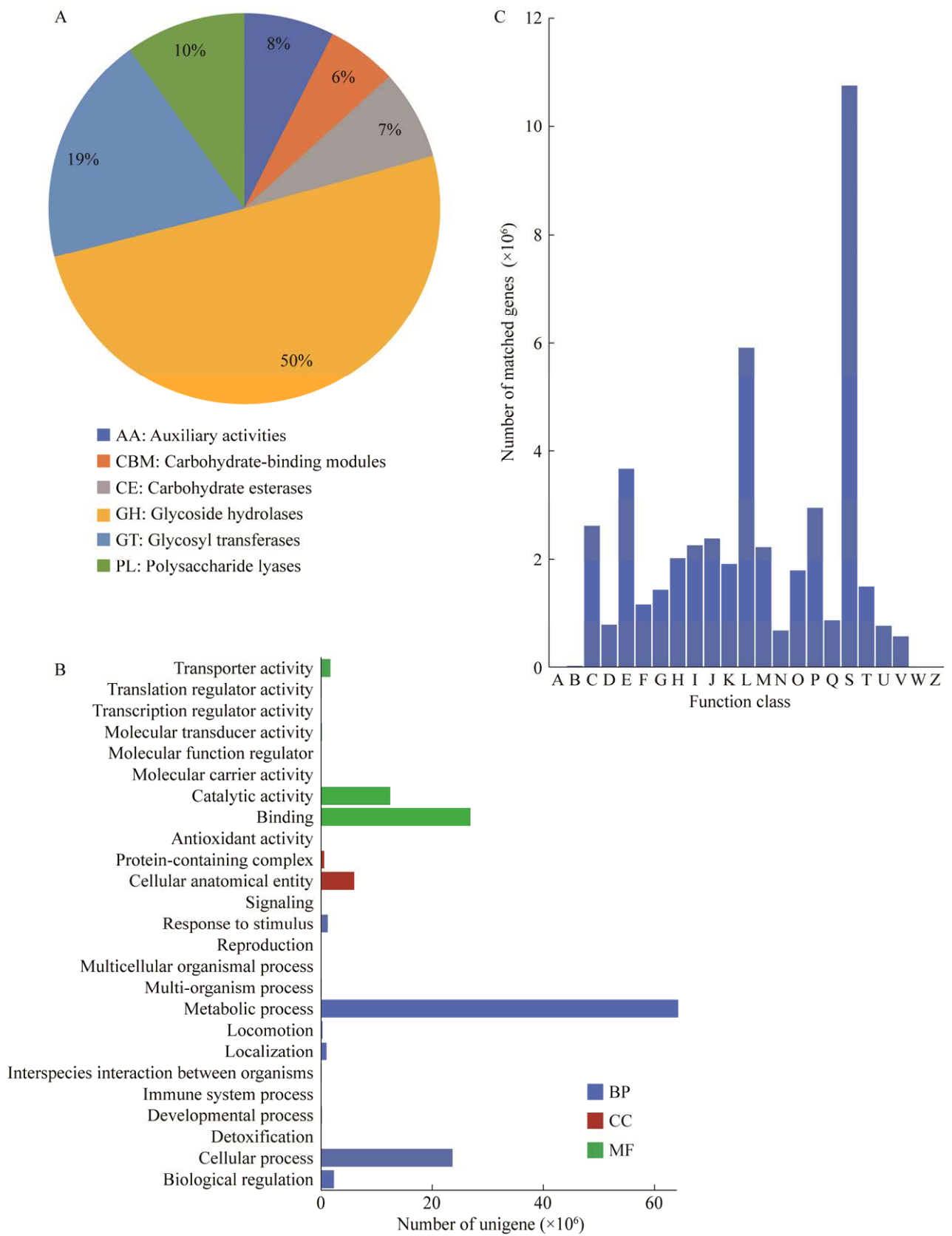
苷水解酶(glycoside hydrolases, GH), 23 个糖基转移酶(glycosyl transferases, GT), 7 个碳水化合物结合模块(carbohydrate-binding modules, CBM), 9 个碳水化合物酯酶(carbohydrate esterases, CE), 9 个辅助活性酶(auxiliary activities, AA)和 12 个多糖裂解酶(polysaccharide lyases, PL)。GH 能破坏碳水化合物的 O-糖苷键。GH 在碳水化合物水解过程中起着主要的作用<sup>[15]</sup>。GT 催化糖基与糖苷氨基酸的结合。因此, GH 和 GT 的高丰度可能对微生物在酸性大红 GR 环境中的生存起着重要作用。

根据 GO 的功能注释, 将该菌群的基因分为 26 个功能组: 包含 14 个生物过程(biological process, BP), 2 个细胞组成(cellular component, CC)和 9 个分子功能(molecular function, MF) (图 6B)。基于 GO 功能注释, 222 282 812 个基因归为 BP。代谢过程是 BP 中最大的组, 其次是细胞过程。CC 的中主要基因是细胞结构体(cellular anatomical entity) (114 938 102 条)和蛋白复合物(16 296 690 条)。在 MF 中, 基因数量最多的基因是结合(487 397 002 条), 其次是催化活性(219 319 816 条)。催化活性包括氧化还原酶活性、水解酶活性和跨膜活性转运蛋白活性<sup>[10]</sup>。这些基因与染料降解过程中的还原活性和跨膜过程有关。

基于菌群的 clusters of orthologs groups (COG)分析, 菌群的基因序列可分为 23 个功能类别(图 6C), 包括氨基酸运输和代谢, 复制、

重组与修复, 能量产生和转换, 无机离子转运和代谢, 细胞壁/细胞膜/膜结构的生成, 转录, 以及碳水化合物运输和代谢。有机化合物的代谢产生的 NADH 或 NADPH 可被偶氮还原酶作为还原性等价物破坏偶氮键<sup>[16]</sup>。为了更好地分析该菌群的代谢通路, 将该菌群的基因序列与 KEGG 数据库进行了注释(图 6D)。结果表明, 该菌群的代谢通路包含 6 类, 包括代谢、细胞过程、环境信息处理、遗传信息处理、人类疾病和有机系统。其中代谢途径中获得的注释信息最多(表 4), 包括多环芳烃降解(ko00624)、氨基苯甲酸酯降解(ko00627)、氯代环己烷和氯苯的降解(ko00361)、苯甲酸代谢(ko00362)、脂肪酸降解(ko00071)等。偶氮染料含有苯环, 以上代谢通路与芳香化合物的代谢相关。

与偶氮染料降解相关的基因如表 5 所示。偶氮染料可通过氧化还原酶降解为芳香胺, 该菌群宏基因组中发现断裂偶氮键的还原酶, 如 1 个依赖 NADH 的黄素单核苷酸(flavin mononucleotide, FMN)偶氮还原酶和 2 个依赖 FMN 的还原酶。这些基因都可以用来还原偶氮键<sup>[17]</sup>。同时, 宏基因组中有 4 个依赖 NAD(P)H 的醌氧化还原酶和 17 个基因依赖 NADH 的醌氧化还原酶。该菌群宏基因组中发现 1 个邻苯二酚-1,2-双加氧酶、2 个邻苯二酚-2,3-双加氧酶、3 个苯甲酸-1,2-双加氧酶、1 个原儿茶酸-3,4-双加氧酶、2 个萘-1,2-双加氧酶、6 个邻氨基苯甲酸-1,2-双加氧酶、单加氧酶、乙烯苯双加氧酶等。



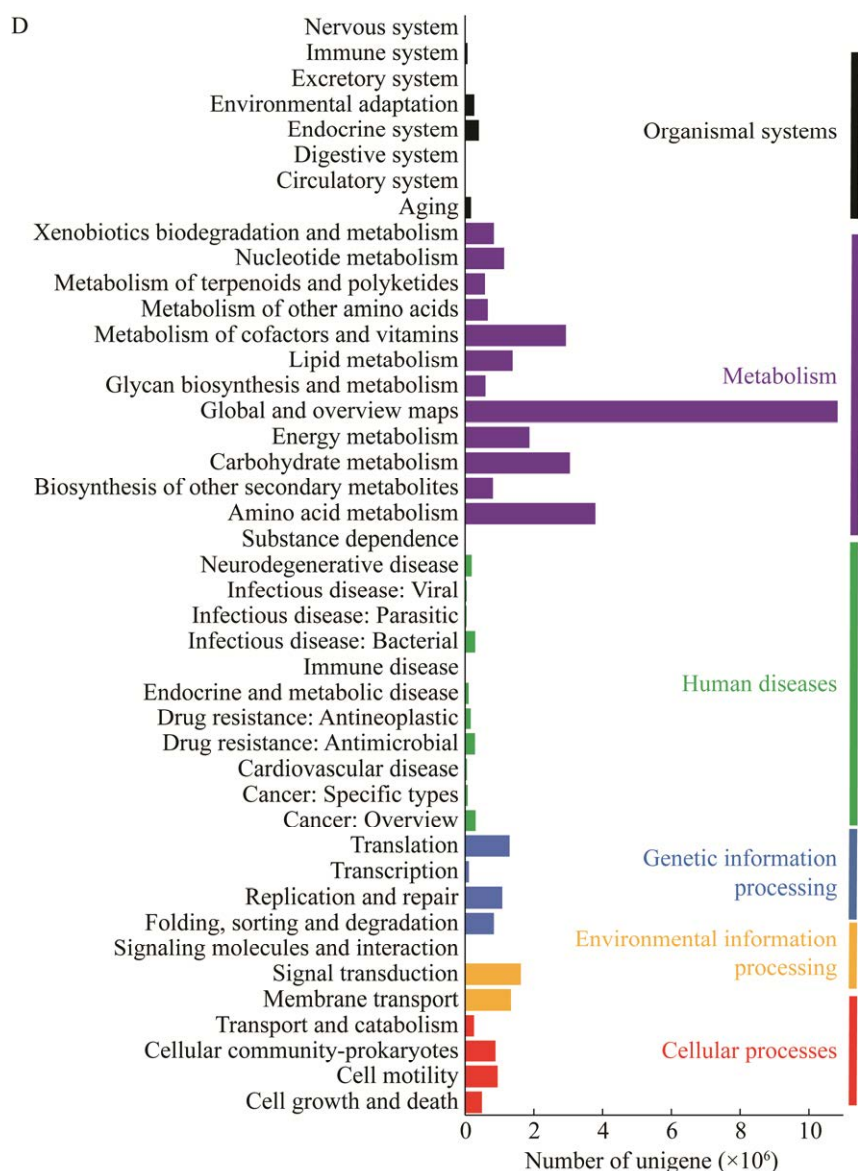


图6 嗜热菌群的宏基因组分析 A: CAZymes 注释的差异基因分布比例图. B: 基因功能分类. BP: 生物过程; CC: 细胞成分; MF: 分子功能. C: COG 功能分类. D: KEGG 分类图

Figure 6 Metagenomic analysis of the thermophilic bacterial consortium. A: Distribution scale diagram of differential genes annotated to CAZymes. B: COG function classification. BP: Biological process; CC: Cellular components; MF: Molecular function. C: Gene function classification in the consortium HT1, A: RNA processing and modification; B: Chromatin structure and dynamics; C: Energy production and conversion; D: Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning; E: Amino acid transport and metabolism; F: Nucleotide transport and metabolism; G: Carbohydrate transport and metabolism; H: Coenzyme transport and metabolism; I: Lipid transport and metabolism; J: Translation, ribosomal structure and biogenesis; K: Transcription; L: Replication, recombination and repair; M: Cell wall/membrane/envelope biogenesis; N: Cell motility; O: Post-translational modification, protein turnover, chaperones; P: Inorganic ion transport and metabolism; Q: Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism; S: Function unknown; T: Signal transduction mechanisms; U: Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport; V: Defense mechanisms; W: Extracellular structures; Z: Cytoskeleton. D: KEGG classification map.

表 4 主要代谢途径

Table 4 Dominating metabolic pathways

Pathway	Pathway ID	Unigene (KO)
Metabolism	ko00190	K05578, K05573, K00339, K00338, K00334, K00330, K00340, K13378, K00336, K13380, K00342, K05577, K03935, K03940
Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation	ko00624	K14581, K04102, K18077, K18074, K18075
Aminobenzoate degradation	ko00627	K18248, K05600, K16319, K16320, K05599, K11311, K10215
Chlorocyclohexane and chlorobenzene degradation	ko00361	K03381, K01856, K00446, K07104, K04098
Benzoate degradation	ko00362	K05549, K05550, K10217, K01617, K01821, K10216, K00449, K14333, K04116, K22270
Fatty acid degradation	ko00071	K00626, K01692, K01825, K01782, K00632, K07516, K13767
Glycolysis/Gluconeogenesis	ko00010	K00128, K04072, K00129, K00138
Sedoheptulose-bisphosphatase	ko01100	K03738, K04021, K15755, K15754, K14751, K14750

表 5 菌群中与酸性大红 GR 降解相关的基因

Table 5 Genes related to acid red GR biodegradation in the bacterial consortium

KO	KO description
K01118	FMN-dependent NADH-azoreductase [EC: 1.7.1.17]
K00299	FMN reductase [EC: 1.5.1.38]
K19285	FMN reductase (NADPH) [EC: 1.5.1.38]
K03883	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5 [EC: 7.1.1.2]
K03881	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 4 [EC: 7.1.1.2]
K00343	NADH-quinone oxidoreductase subunit N [EC: 7.1.1.2]
K00342	NADH-quinone oxidoreductase subunit M [EC: 7.1.1.2]
K00341	NADH-quinone oxidoreductase subunit L [EC: 7.1.1.2]
K00340	NADH-quinone oxidoreductase subunit K [EC: 7.1.1.2]
K00339	NADH-quinone oxidoreductase subunit J [EC: 7.1.1.2]
K00338	NADH-quinone oxidoreductase subunit I [EC: 7.1.1.2]
K00337	NADH-quinone oxidoreductase subunit H [EC: 7.1.1.2]
K00336	NADH-quinone oxidoreductase subunit G [EC: 7.1.1.2]
K00335	NADH-quinone oxidoreductase subunit F [EC: 7.1.1.2]
K00334	NADH-quinone oxidoreductase subunit E [EC: 7.1.1.2]
K13378	NADH-quinone oxidoreductase subunit C/D [EC: 7.1.1.2]
K00332	NADH-quinone oxidoreductase subunit C [EC: 7.1.1.2]
K13380	NADH-quinone oxidoreductase subunit B/C/D [EC: 7.1.1.2]
K00331	NADH-quinone oxidoreductase subunit B [EC: 7.1.1.2]
K00330	NADH-quinone oxidoreductase subunit A [EC: 7.1.1.2]
K18164	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex assembly factor 7
K03885	NADH dehydrogenase [EC: 1.6.99.3]
K03940	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 7 [EC: 7.1.1.2 1.6.99.3]

(待续)

(续表 5)

KO	KO description
K03935	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 2 [EC: 7.1.1.2 1.6.99.3]
K05578	NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit 6 [EC: 7.1.1.2]
K05577	NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit 5 [EC: 7.1.1.2]
K05576	NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit 4L [EC: 7.1.1.2]
K05573	NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit 2 [EC: 7.1.1.2]
K00446	Catechol 2,3-dioxygenase [EC 1.13.11.2]
K07104	Catechol 2,3-dioxygenase [EC: 1.13.11.2]
K03381	Catechol 1,2-dioxygenase [EC: 1.13.11.1]
K05550	Benzoate/Toluate 1,2-dioxygenase subunit beta [EC: 1.14.12.10 1.14.12.-]
K05549	Benzoate/Toluate 1,2-dioxygenase subunit alpha [EC: 1.14.12.10 1.14.12.-]
K05784	Benzoate/Toluate 1,2-dioxygenase reductase component [EC: 1.18.1.-]
K00449	Protocatechuate 3,4-dioxygenase, beta subunit [EC: 1.13.11.3]
K14581	Naphthalene 1,2-dioxygenase ferredoxin reductase component [EC: 1.18.1.7]
K14578	Naphthalene 1,2-dioxygenase ferredoxin component
K10215	Monooxygenase [EC: 1.14.13.-]
K00451	Homogentisate 1,2-dioxygenase [EC: 1.13.11.5]
K14750	Ethylbenzene dioxygenase ferredoxin component
K00450	Gentisate 1,2-dioxygenase [EC: 1.13.11.4]
K16320	Anthranilate 1,2-dioxygenase small subunit [EC: 1.14.12.1]
K11311	Anthranilate 1,2-dioxygenase reductase component [EC: 1.18.1.-]
K16319	Anthranilate 1,2-dioxygenase large subunit [EC: 1.14.12.1]
K18248	Anthranilate 1,2-dioxygenase ferredoxin component
K05600	Anthranilate 1,2-dioxygenase (deaminating, decarboxylating) small subunit [EC: 1.14.12.1]
K05599	Anthranilate 1,2-dioxygenase (deaminating, decarboxylating) large subunit [EC: 1.14.12.1]
K13953	Alcohol dehydrogenase, propanol-preferring [EC: 1.1.1.1]
K03737	Pyruvate-ferredoxin/Flavodoxin oxidoreductase [EC: 1.2.7.1 1.2.7.-]
K00138	Aldehyde dehydrogenase [EC: 1.2.1.-]
K00128	Aldehyde dehydrogenase (nad <sup>+</sup> ) [EC: 1.2.1.3]
K00129	Aldehyde dehydrogenase (nad(p) <sup>+</sup> ) [EC: 1.2.1.5]
K04021	Aldehyde dehydrogenase
K18077	Terephthalate 1,2-dioxygenase reductase component [EC: 1.18.1.-]
K18075	Terephthalate 1,2-dioxygenase oxygenase component beta subunit [EC: 1.14.12.15]
K18074	Terephthalate 1,2-dioxygenase oxygenase component alpha subunit [EC: 1.14.12.15]
K04098	Hydroxyquinol 1,2-dioxygenase [EC: 1.13.11.37]
K03738	Aldehyde: Ferredoxin oxidoreductase [EC: 1.2.7.5]
K23511	Riboflavin transport system permease protein
K23512	Riboflavin transport system permease protein
K23510	Riboflavin transport system substrate-binding protein
K00861	Riboflavin kinase [EC: 2.7.1.26]

### 3 讨论与结论

在印染废水处理的过程中,脱色是降解偶氮染料的关键步骤。本研究从印染厂的活性污泥中富集出1个可在65℃高效脱色偶氮染料的微生物菌群SD1。Zhang等<sup>[6]</sup>富集的菌群可在70℃降解酸性橙7,14h的脱色率达到14.6%。*Anoxybacillus* sp. PDR2可在55℃降解偶氮染料直接黑G,而当温度提高到65℃时脱色率显著下降,48h的脱色率只有65%<sup>[8]</sup>。以*Caldanaerobacter*为主的菌群EX-AO7可以完全降解酸性橙7,24h的脱色率(100 mg/L)达到100%<sup>[18]</sup>。而嗜热菌(*Geobacillus thermoleovorans*) KNG 112在55℃下可脱色快红E,最大的降解浓度为5 mg/L<sup>[9]</sup>,脱色率低于本研究富集的菌群。

在菌群SD1中,*Caldibacillus*、*unclassified\_f\_Bacillaceae*、*Geobacillus*、*Parageobacillus*和*Aeribacillus*等属相对丰度较高。*Caldibacillus*属于*Bacillaceae*,可以在50–70℃范围内生长<sup>[19]</sup>。截至目前尚无关于该菌降解偶氮染料的报道。*Bacillaceae*中有很多极端环境微生物,包含一些嗜热菌,如*Novibacillus thermophiles* SG-1可以在55℃条件下降解偶氮染料<sup>[20]</sup>。*Geobacillus*是严格的中度嗜热菌,生长温度范围为55–70℃,但是不能在35℃以下和76℃以上生存。有研究发现*Geobacillus* sp.可以在55℃降解偶氮染料直接黑G,偶氮还原酶和漆酶是主要的降解酶<sup>[4]</sup>。*Geobacillus thermoleovorans* KNG 112脱色偶氮染料(紫红RI和固红E)的最佳温度是55℃<sup>[9]</sup>。*Parageobacillus*属于嗜热菌,生长温度范围为37–68℃,主要来源于木质纤维素能源生产中,可以降解多聚糖<sup>[21]</sup>。*Aeribacillus*也属于嗜热菌,可以降解多环芳烃等有机物<sup>[22]</sup>。虽然截至目前尚无*Parageobacillus*和*Aeribacillus*降解偶氮染料的报道,但是该属可降解纤维素和多环芳烃,

而纤维素和多环芳烃降解中需要大量的酶如漆酶和过氧化物酶等,也可以降解偶氮染料。

本研究考察了pH、盐度、温度、染料浓度和不同染料结构等因素对微生物脱色效率的影响。适当的高温可促进微生物的繁殖,增加微生物的数量和酶活性,提高脱色率<sup>[23]</sup>。然而温度过高可导致微生物活性降低,甚至死亡。在印染过程中,染浴和漂洗阶段温度高达50–70℃。该菌群在高温环境中微生物的活性高,并能有效清除病原微生物<sup>[3]</sup>。高浓度的染料会抑制菌群的生长繁殖,降低其降解率。染料的毒性随浓度的升高而增大,同时也会产生高浓度的芳香族化合物,抑制微生物的活性<sup>[3,11]</sup>。该菌群在较广的浓度范围内具有较强的降解能力,在处理高温、高浓度的染料废水中具有很大的应用潜力。

菌群SD1对酸性大红GR、直接冻黄G、酸性橙7、直接湖蓝5B和直接紫1的降解较好,可能是因为酸性橙7是单偶氮染料,而酸性大红GR、直接冻黄G、直接湖蓝5B和直接紫1是双偶氮染料,与直接黑38(三偶氮染料)和酸性黑ATT(四偶氮染料)相比结构简单,更能被微生物降解。很多研究发现,偶氮键数量少和结构简单的偶氮染料脱色率比结构复杂、偶氮键多的降解效果好<sup>[3,8]</sup>。Chen等<sup>[8]</sup>也发现直接黑38由于其本身的分子结构不同,偶氮双键很难被还原,导致脱色率较低。在实际生产中,印染废水的成分非常复杂,包含多种染料,导致降解困难。该菌群可以降解多种染料,在实际中具有很大的应用价值。

偶氮键的还原裂解是偶氮染料脱色的关键步骤,可以被偶氮还原酶、漆酶、锰过氧化物酶、木质素过氧化物酶和NADH-DCIP酶等催化降解。有研究发现,偶氮还原酶是断裂偶氮键的关键酶,漆酶可同时降解偶氮染料和中间



产物,而过氧化物酶可降解偶氮染料,也可以高效降解磺化染料<sup>[24]</sup>。本研究中,偶氮还原酶在降解后活性提高最多,是主要的降解酶。酸性大红 GR 经偶氮还原酶降解后形成苯胺类化合物,然后脱去氨基和羧基。很多研究发现偶氮染料降解过程中会产生苯胺类中间代谢产物<sup>[10]</sup>,苯环上的磺酸在高温下容易脱落<sup>[3]</sup>。偶氮染料酸性金黄 G 经过微生物降解后生成 3-氨基苯磺酸和 N-苯基-1,3-苯二胺<sup>[17]</sup>。以上结果表明,酸性大红 GR 的偶氮键断裂,发色基团脱落。

该菌群的宏基因中发现和降解偶氮染料相关的基因。其中依赖 NADH 的黄素单核苷酸(FMN)偶氮还原酶和依赖 FMN 的还原酶都可以用来还原偶氮键<sup>[17]</sup>。醌氧化还原酶负责电子传递链参与还原偶氮键,提高偶氮染料的降解速率<sup>[25]</sup>。偶氮染料断裂后形成的芳香胺可降解为邻苯二酚,其可被单加氧酶或双加氧酶进一步降解,是芳香环断裂中重要的酶<sup>[26]</sup>。邻苯二酚双加氧酶能够断裂邻苯二酚的苯环结构,是降解邻苯二酚的关键酶<sup>[12]</sup>。

嗜热菌群 SD1 通过偶氮还原酶将酸性大红 GR 中的偶氮键断裂,生成苯胺、苯二胺和 1-氨基-2-萘酚-6,8-二磺酸。在降解产物中,也鉴定出了苯胺。1-氨基-2-萘酚-6,8-二磺酸经过脱氨基和羧基生成 2-萘酚,在萘-1,2-双加氧酶的作用下将苯环打开,经过脱羧基生成邻苯二酚;在邻苯二酚双加氧酶的作用下,可将苯环打开,进入三羧酸循环。酸性大红 GR 中的偶氮键断裂形成的苯胺、苯二胺经过脱氨基,在邻苯二酚双加氧酶的作用下,将苯环打开并进一步降解。FMN 和黄素腺嘌呤二核苷酸(flavin adenine dinucleotide, FAD)可以作为氧化还原介质通过氧化还原电势在细胞间传递<sup>[27]</sup>。

同时,在宏基因组中发现了 1 个乙醇脱氢酶,该酶可降解芳香环断裂后形成的中间产物<sup>[27]</sup>。此

外,丙酮酸-铁氧还蛋白/黄素氧化还原酶可将丙酮酸氧化成乙酰辅酶 A 和二氧化碳,产生的还原电子可转移到铁氧还蛋白或黄氧还蛋白参与偶氮染料的降解。乙醛脱氢酶也参与三羧酸循环,产生的还原当量可用来还原偶氮染料<sup>[17]</sup>。核黄素存在于氧化还原活性酶辅因子中,如 FMN 和 FAD。这些辅助因子可以作为氧化还原介质通过氧化还原电势在细胞间传递<sup>[28]</sup>。

根据以上结果,菌群生物降解偶氮染料酸性大红 GR 的过程可以总结为:(1) 菌群利用酵母粉作为能量来源和电子供体;(2) 细胞通过三羧酸循环生成苹果酸,在此过程中,琥珀酰 CoA 合成酶将琥珀酸 CoA 转化为琥珀酸,并产生 ATP 和 NAD (即能量)提供给细胞电子传输系统;(3) 电子单通过加氧酶基因、NADH-醌氧化还原酶、依赖于 FMN 的 NADH 偶氮还原酶基因和 FMN 还原酶传递到核黄素,核黄素将电子转移到胞外;(4) 核黄素作为氧化还原介质,将产生的电子转移到偶氮染料,导致偶氮染料脱色和降解。

总而言之,嗜热菌群 SD1 在高温环境下对酸性大红 GR 具有显著的脱色性能。该菌群在较宽的 pH、温度、盐度和初始染料范围内都有较高的脱色效果。菌群 SD1 通过断裂偶氮键降解酸性大红 GR。植物毒性的结果表明,SD1 可将酸性大红 GR 的毒性降低。用宏基因组测序鉴定了参与降解的关键基因。该菌群在高温下具有很高的脱色效率,表明该菌群在高温印染废水的处理中具有很大的应用潜力。

## REFERENCES

- [1] 薛罡. 印染废水治理技术进展[J]. 工业水处理, 2021, 41(9): 10-17.  
XUE G. Technology progress of dyeing wastewater treatment[J]. Industrial Water Treatment, 2021, 41(9): 10-17 (in Chinese).

- [2] 王怡琴, 谢学辉, 郑秀林, 张庆云, 许可欣, 柳建设. 激活剂促进微生物降解偶氮、蒽醌和三苯甲烷类染料研究进展[J]. 化工进展, 2019, 38(6): 2968-2976.  
WANG YQ, XIE XH, ZHENG XL, ZHANG QY, XU KX, LIU JS. Advances in research on activators promoting microbial degradation of dyes[J]. Chemical Industry and Engineering Progress, 2019, 38(6): 2968-2976 (in Chinese).
- [3] 陈国涛, 万超超, 安雪姣, 冯琳琳, 夏祥, 张庆华. 嗜热复合菌群对偶氮染料的脱色特性及其脱毒[J]. 应用与环境生物学报, 2020, 26(4): 800-808.  
CHEN GT, WAN CC, AN XJ, FENG LL, XIA X, ZHANG QH. Decolorization and detoxification of the azo dyes by thermophilic microflora[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2020, 26(4): 800-808 (in Chinese).
- [4] CHEN Y, FENG LL, LI HG, WANG YX, CHEN GT, ZHANG QH. Biodegradation and detoxification of direct black G textile dye by a newly isolated thermophilic microflora[J]. Bioresource Technology, 2018, 250: 650-657.
- [5] YASEEN DA, SCHOLZ M. Textile dye wastewater characteristics and constituents of synthetic effluents: a critical review[J]. International Journal of Environmental Science and Technology, 2019, 16(2): 1193-1226.
- [6] ZHANG F, GUO X, QIAN DK, SUN T, ZHANG W, DAI K, ZENG RJ. Decolorization of acid orange 7 by extreme-thermophilic mixed culture[J]. Bioresource Technology, 2019, 291: 121875.
- [7] SHEN N, HUO YC, CHEN JJ, ZHANG F, ZHENG H, ZENG RJ. Decolorization by *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* with dissolved hydrogen under extreme thermophilic conditions[J]. Chemical Engineering Journal, 2015, 262: 847-853.
- [8] CHEN GT, AN XJ, FENG LL, XIA X, ZHANG QH. Genome and transcriptome analysis of a newly isolated azo dye degrading thermophilic strain *Anoxybacillus* sp.[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2020, 203: 111047.
- [9] RAJASHEKARAPPA KK, MAHADEVAN GD, NEELAGUND SE, SATHYNARAYANA M, VIJAYA D, MULLA SI. Decolorization of amaranth RI and fast red E azo dyes by thermophilic *Geobacillus thermoleovorans* KNG 112[J]. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 2022, 97(2): 482-489.
- [10] GUO G, LIU C, HAO JX, TIAN F, DING KQ, ZHANG C, YANG F, LIU TF, XU J, GUAN ZB. Development and characterization of a halo-thermophilic bacterial consortium for decolorization of azo dye[J]. Chemosphere, 2021, 272: 129916.
- [11] SEYEDI ZS, ZAHRAEI Z, KASHI FJ. Decolorization of reactive black 5 and reactive red 152 azo dyes by new haloalkaliphilic bacteria isolated from the textile wastewater[J]. Current Microbiology, 2020, 77(9): 2084-2092.
- [12] CHEN GT, AN XJ, LI HG, LAI FJ, YUAN E, XIA X, ZHANG QH. Detoxification of azo dye direct black G by thermophilic *Anoxybacillus* sp. PDR2 and its application potential in bioremediation[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2021, 214: 112084.
- [13] WANG R, LI HN, LIU YF, CHEN JH, PENG F, JIANG ZB, LIU JS, SONG HT. Efficient removal of azo dyes by *Enterococcus faecalis* R1107 and its application in simulated textile effluent treatment[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2022, 238: 113577.
- [14] LAKHAN SINGH R, SINGH PK, SINGH RP. Enzymatic decolorization and degradation of azo dyes-a review[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2015, 104: 21-31.
- [15] ZHANG QY, XIE XH, LIU YB, ZHENG XL, WANG YQ, CONG JH, YU CZ, LIU N, SAND W, LIU JS. Co-metabolic degradation of refractory dye: a metagenomic and metaproteomic study[J]. Environmental Pollution, 2020, 256: 113456.
- [16] IMRAN M, ARSHAD M, NEGM F, KHALID A, SHAHAROONA B, HUSSAIN S, MAHMOOD NADEEM S, CROWLEY DE. Yeast extract promotes decolorization of azo dyes by stimulating azoreductase activity in *Shewanella* sp. strain IFN4[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2016, 124: 42-49.
- [17] GUO G, HAO JX, TIAN F, LIU C, DING KQ, XU J, ZHOU W, GUAN ZB. Decolorization and detoxification of azo dye by halo-alkaliphilic bacterial consortium: systematic investigations of performance, pathway and metagenome[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2020, 204: 111073.
- [18] YAN Y, GENG ZQ, DAI K, GUO X, ZENG RJ, ZHANG F. Decoupling mechanism of acid orange 7 decolorization and sulfate reduction by a *Caldanaerobacter* dominated extreme-thermophilic consortium[J]. Journal of Hazardous Materials, 2021, 419: 126498.

- [19] WUSHKE S, LEVIN DB, CICEK N, SPARLING R. Facultative anaerobe *Caldibacillus debilis* GB1: characterization and use in a designed aerotolerant, cellulose-degrading coculture with *Clostridium thermocellum*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(16): 5567-5573.
- [20] TANG J, WANG YQ, YANG GQ, LUO HL, ZHUANG L, YU Z, ZHOU SG. Complete genome sequence of the dissimilatory azo reducing thermophilic bacterium *Novibacillus thermophiles* SG-1[J]. Journal of Biotechnology, 2018, 284: 6-10.
- [21] MADIKA A, SPENCER J, LAU MSH, SHENG LL, ZHANG Y, MINTON NP. pMTL60000: a modular plasmid vector series for *Parageobacillus thermoglucosidasius* strain engineering[J]. Journal of Microbiological Methods, 2022, 202: 106600.
- [22] TAO WY, LIN JZ, WANG WD, HUANG H, LI S. Biodegradation of aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons by the thermophilic bioemulsifier-producing *Aeribacillus pallidus* strain SL-1[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2020, 189: 109994.
- [23] 李进家, 范晓丹, 张道虹, 袁正通, 周佳滢, 王雪琦. 高盐度复杂染料废水脱色菌群的降解特性[J]. 中国环境科学, 2021, 41(6): 2631-2638
- LI JJ, FAN XD, ZHANG DH, YUAN ZT, ZHOU JY, WANG XQ. Biodegradation characteristics of high-salinity complex dyes wastewater with high salinity by the bacterial consortium[J]. China Environmental Science, 2021, 41(6): 2631-2638 (in Chinese).
- [24] SONG L, SHAO YF, NING SX, TAN L. Performance of a newly isolated salt-tolerant yeast strain *Pichia occidentalis* G1 for degrading and detoxifying azo dyes[J]. Bioresource Technology, 2017, 233: 21-29.
- [25] ZHANG QY, XIE XH, LIU YB, ZHENG XL, WANG YQ, CONG JH, YU CZ, LIU N, LIU JS, SAND W. Fructose as an additional co-metabolite promotes refractory dye degradation: performance and mechanism[J]. Bioresource Technology, 2019, 280: 430-440.
- [26] AN XJ, CEN Y, CHEN GT, FENG LL, ZHANG QH. Integrated metagenomic and metaproteomic analyses reveal potential degradation mechanism of azo dye-direct black G by thermophilic microflora[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2020, 196: 110557.
- [27] TAN L, SHAO YF, MU GD, NING SX, SHI SN. Enhanced azo dye biodegradation performance and halotolerance of *Candida tropicalis* SYF-1 by static magnetic field (SMF)[J]. Bioresource Technology, 2020, 295: 122283.
- [28] ZHANG SL, AN XJ, GONG JM, XU ZH, WANG LW, XIA X, ZHANG QH. Molecular response of *Anoxybacillus* sp. PDR2 under azo dye stress: an integrated analysis of proteomics and metabolomics[J]. Journal of Hazardous Materials, 2022, 438: 129500.