

아조염료 분해균 *Citrobacter* sp. MB2 생육특성

권대준¹ · 지원대² · 권오준³ · 이태종³ · 이난희⁴ · 손동화⁵ · 최웅규*

아시아대학교 한약자원학과¹, 대구전략산업기획단 평가기획실², 경북전략산업기획단 평가기획실³, 대구가톨릭대학교 식품영양학과⁴, 대구산업정보대학 조리계열⁵, 아시아대학교 한방식품영양학과

Growth Characteristics of *Citrobacter* sp. MB2, Azo Dyes Decolorizing Bacterium

Dae-Jun Kwoen¹, Won-Dae Ji², O-Jun Kwon³, Tae-Jong Lee³, Nan-Hee Lee⁴, Dong-Hwa Son⁵ and Ung-Kyu Choi*

Department of Oriental Medicinal Food and Nutrition, Asia University, Kyongsan, 712-220, Korea

¹Department of Oriental Medicine Resources, Asia University, Kyongsan, 712-220, Korea

²Daegu Regional Innovation Agency, Daegu, 701-020, Korea

³Department of Evaluation&Planning, Gyeonbuk Regional Innovation Agency, Kyungsan 712-210, Korea

⁴Department of Food Science and Nutrition, Catholic University of Daegu, Kyungsan, 712-702, Korea

⁵Department of Food Preparation, Daegu polytechnic college, Daegu, 706-711, Korea

Received April 27, 2006; Accepted June 26, 2006

A *Citrobacter* sp. MB 2, azo dyes decolorizing bacterium, was isolated from the wastewater and soil and identified as *Citrobacter* sp.. It was examined that optimum conditions for culture media were 0.5% of sucrose, 1.0% of yeast extract, 0.1% of K₂HPO₄, 0.1% of NaHCO₃ per distilled water. The best efficient condition of culture was obtained at pH 7.0, 30°C and aerobic shaking culture. The number of *Citrobacter* sp. MB2 in optimum medium was increased more than 7 fold compared to basal medium and 50 fold compared to nutrient broth. This strain was exhibited strong resistance against metal salts and antibiotics (ampicillin and penicillin G).

Key words: *Citrobacter* sp. MB 2, azo dye, decolorization

서 론

유색의 화합물인 염료는 이미 수천년 전부터 이용되기 시작하여 현재는 섬유, 종이, 플라스틱, 가죽 등의 염색과 유기안료로서 사용될 뿐만 아니라 식품의 착색에도 다량이 사용되고 있다^{1,2}. 염료는 화학구조에 따라 azo 염료, anthraquinone 염료, indigo 염료, 황화염료, diphenylmethane 및 triphenylmethane 염료, pyrazolone 염료, stibene 염료, thiazole 염료, xanthene 염료, azine과 oxazine 및 thiazine 염료, acridine 염료, nitro 및 nitroso 염료, cyanine 염료로 분류되며³, 이들 중 아조기를 가진 화합물 중에는 높은 발암성을 가진 화합물이 많을 것으로 알려져 있다⁴.

아조염료를 분해하기 위한 시도는 많이 이루어져 왔으며, 최근까지 *Phanerochate chrysosporium*^{5,6}, *Streptomyces chromofuscus*⁷, *Aspergillus sojae*⁸, *Staphylococcus* sp.¹, *Streptococcus faecalis*^{9,10},

*Proteus vulgaris*¹¹, *Escherichia coli*, *Coprococcus catus*, *Acidaminococcus fermentans*, *Fusobacterium prausnitzii*, *Bacteroides thetataomi*, *Bifidobacterium infantis*, *Eubacterium bifforme*, *Peptostreptococcus productus*, *Fusobacterium* sp., *Pseudomonas pseudomallei*, *Pseudomonas cepacia*¹²⁻¹⁷ 등의 미생물이 아조염료 분해능이 있는 것으로 보고되어 있다.

본 연구에서는 현재 사용되고 염색물질의 절반이상을 차지하고 있는 난분해성 독성물질인 아조계 염료를 분해하기 위하여 대구지역의 염색공단 폐수로부터 아조 염료 분해능이 우수한 새로운 균주인 *Citrobacter* sp.를 분리하고 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

재료. 본 실험에 사용된 아조계 염료는 Sigma사(St Louis, USA)로부터 구입하였으며 이들의 특성은 Table 1에서와 같다. 산성 염료인 acid orange 6(AO6)은 brownish yellow 색을 띠는 식용 색소로서 food yellow 8로 사용되고 있으며, acid orange 10(AO10)은 brownish yellow 색을 띠는 식용색소로서 food orange 4로 사용되고 있다. 반응성 염료인 reactive red 4

*Corresponding author

Phone: 82-53-819-8201; Fax: 82-53-819-8135

E-mail: cuk8272@hanmail.net

Table 1. Dyes used in the experiments

Name	Name	Commerical name	Color index No.	Chemical class
Acid dyes	Orange 6 (AO6)	Tropacolin O	14270	Mono-azo
	Orange 10 (AO10)	Orange G	16230	Mono-azo
	Red 4 (RR4)	Cibacron Brilliant Red 3B-A	18105	Mono-azo
Reactive dyes	Orange 16 (RO16)	Remazol Brilliant Orange 3R	-	Mono-azo
	Black 5 (RB5)	Remazol Black B	-	Dis-azo
Mordant dye	Brown 1 (MB1)	-	20110	Dis-azo
Basic dye	Brown 1 (BB1)	Bismarck Brown Y	21000	Dis-azo
Direct dye	Blue 71 (DB71)	-	34140	Tri-azo

Table 2. Decolorization and growth rates of isolates

Isolates	Decolorization rates (%)								Growth (O.D. at 660 nm)
	AO6	AO10	RR4	RO6	RB5	MB1	BB1	DB71	
MB-2	80.0	78.5	72.9	84.5	81.0	77.7	67.0	85.7	1.35
OB-51	74.5	61.7	79.8	82.7	85.6	54.6	63.5	91.3	1.24
BBY-A3	40.4	27.7	12.8	88.4	85.8	34.8	67.6	88.0	1.23
RB5-61	19.9	24.9	44.2	68.8	56.3	57.7	53.0	69.9	1.54
BBY-A9	73.3	57.2	44.6	76.8	55.8	36.2	53.2	83.4	1.76
ORA-5	33.7	31.8	34.0	63.5	59.3	54.5	69.0	71.5	1.37

(RR4), reactive orange 16(RO16) 및 reactive black 5(RB5)는 각각 bright bluish red, bright yellowish 및 black 색을 띤다. Mordant brown 1(MB1)은 deep brown을 띤다. Basic brown 1(BB1)과 direct blue 71(DB71)은 각각 brown색과 dull blue색을 띤다. 그 외 실험에 사용된 시약은 모두 특급시약을 사용하였다.

아조염료 분해균의 분리 및 선별. 아조 염료 분해균의 분리를 위하여 대구 염색공단 폐수처리장의 활성오니, 폐수 및 폐수가 유출되는 달서천 주위의 물과 토양시료를 20여점 채취하여 균 분리원으로 사용하였다. 균분리용 시료를 1백금이랑 취하여 본 실험에 사용한 염료가 각각 100 ppm 농도로 첨가된 분리용 배지(1.0% glucose, 0.5% peptone, 0.1% KH_2PO_4 , 0.2% K_2HPO_4 , 0.02% NaCl, 0.002% $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 7.0)에 접종하여 30°C에서 3일간 증균배양하여 탈색을 확인하였다. 탈색이 확인된 배양액 0.1 ml를 각 염료가 200 ppm의 농도로 첨가된 분리용 배지 20 ml에 혼합분주 배양하여 clear zone을 기준으로 순수분리하였으며, 형성된 집락을 평판배지에 희선배양하여 순수분리를 재확인하였다. 순수 분리된 균들은 염료가 200 ppm의 농도로 첨가된 분리용 액체 배지에 배양하여 탈색여부를 확인한 후 각각의 염료에 대해 탈색이 재확인된 균들에 대해 성장률과 탈색율을 조사하고 아울러 다른 아조계 염료에 대해서도 탈색능이 우수한 균주를 최종적으로 선별하였다.

선별균의 동정. 선별된 아조염료 분해균의 동정은 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology¹⁸⁾의 방법에 따라 배양학적, 형태학적, 생화학적 및 영양학적 특성들을 기초로 동정하였다.

탈색율의 측정. 아조 염료의 탈색율은 Dubin과 Wright의 방법¹⁹⁾에 준하여 측정하였다. 본 실험에 사용된 아조 염료가 최고 흡광치를 나타내는 각각의 파장(AO6 425 nm, AO10 475 nm, RR4 522 nm, RO16 490 nm, RB5 596 nm, MB1 487 nm,

BB1 442 nm, DB71 570 nm)에서 spectrophotometer(UV-1601, Shimadzu, Japan)를 사용하여 흡광도를 측정하였다. 탈색율은 아래의 식 (1)과 같이 계산되었으며, 대조구로는 멸균된 배지를 사용하였다.

$$\text{Decolorization (\%)} = \frac{[(\text{initial absorbance}) - (\text{observed absorbance}) / (\text{initial absorbance})] \times 100}{(1)}$$

결과 및 고찰

아조염료 분해균의 분리 및 동정. 대구 염색공단 폐수처리장의 활성오니, 폐수 및 폐수가 유출되는 달서천 주위의 물과 토양시료로부터 각종 아조계 염료를 분해하는 약 80여종의 균을 순수분리하였으며, 이들 분리균중 사용한 모든 균주에 대해 탈색능이 확인된 균주는 Table 2에서와 같이 6종이었으며, 이들 중 사용한 아조염료 모두에 대해 가장 높은 탈색율을 보인 MB2균을 본 실험의 공시균으로 최종선정하였다. 최종 선별된 균주 MB2 아조염료에 대한 탈색효과는 Fig. 1과 같다.

최종선별된 아조계 염료 분해균 MB2의 형태학적, 배양학적, 생화학적 및 영양학적 특성을 조사한 결과는 Table 3에 나타내었다. 최종 선별된 아조염료 분해균 MB2는 gram 음성, 무아포, 통성혐기성 간균으로 동정에 필요한 각종 실험결과를 Bergey's manuals of Systematic Bacteriology¹⁸⁾의 분류동정표와 비교하여 본 결과 *Citrobacter* sp.의 한 균종으로 동정하였고 *Citrobacter* sp. MB2로 명명하였다(Fig. 2).

지 등²⁰⁾은 모노아조 색소 탈색균을 하수로부터 *Klebsiella pneumoniae*를 분리·동정한 바 있으며, 그 외 *Phanerochate chrysosporium*^{5,6)}, *Streptomyces chromofuscus*⁷⁾, *Aspergillus sojae*⁸⁾, *Staphylococcus* sp.¹⁾, *Streptococcus faecalis*^{9,10)}, *Proteus vulgaris*¹¹⁾, *Escherichia coli*, *Coprococcus catus*, *Acidaminococcus*

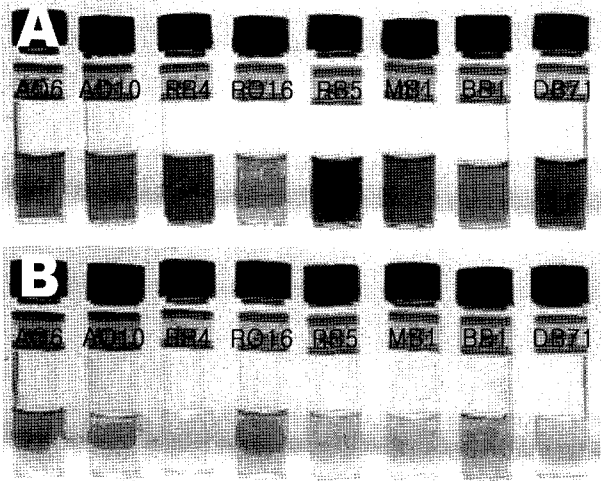


Fig. 1. Photographs of azo-dye decolorization by the selected strain MB 2. A, Control; B, Decolorized; Each azo dyes was added with concentration of 100 ppm to the basal medium containing 1.0% glucose, 0.5% peptone, 0.1% KH₂PO₄, 0.2% K₂HPO₄, 0.02% NaCl, 0.002% CaCl₂ · H₂O and 0.02% MgSO₄ · 7H₂O.

Table 3. Morphological, physiological and biochemical characteristics of isolated strain MB2

Characteristics	MB2
Cell form	rod
Cell size (µm)	0.64-0.8 × 1.23-1.28
Motility	+
Endospore formation	-
Gram stain	-
Acid-fast stain	-
Oxygen requirement	-
Oxidation-fermentation test	Fermentative
Hydrolysis of gelatin	-
Nitrate reduction	+
Lysine decarboxylase	-
Voges-Proskauer test	-
Methyl red test	+
Urease production	-
Oxidase test	+
Indole test	+
Catalase test	+
H ₂ S formation	+
Acid production from carbohydrates	+
Gas from D-glucose	+
ONPG* hydrolysis	+
Growth in KCN medium	+
Malonate utilization	-
Growth at 37°C	+

*ONPG: *o*-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside

fermentans, *Fusobacterium prausnitzii*, *Bacteroides thetaiotaomi*, *Bifidobacterium infantis*, *Eubacterium bifforme*, *Peptostreptococcus productus*, *Fusobacterium* sp., *Pseudomonas pseudomallei*, *Pseudomonas cepacia*¹²⁻¹⁷⁾ 등이 아조염료에 탈색능이 있는 것으로 보고되고 있다.

Citrobacter sp. MB2에 의한 아조염료의 경시적 탈색. 각종



Fig. 2. Electron micrograph of *Citrobacter* sp. MB 2. (×30,000)

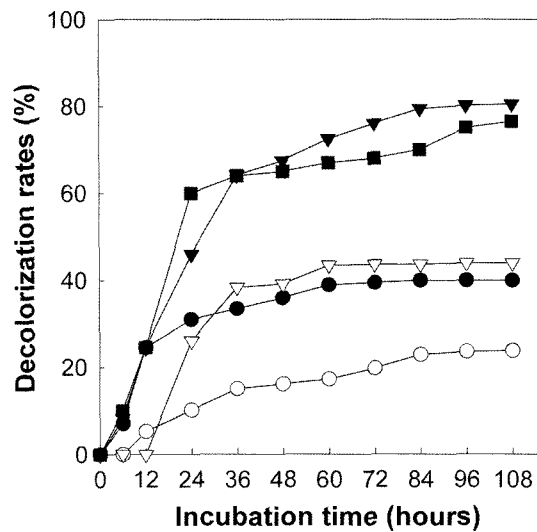


Fig. 3. Time course of decolorization in a culture of *Citrobacter* sp. MB2. -●-, AO6; -○-, RR4; -▼-, RB5; -▽-, BB1; -■-, DB71. Cultures were grown in a basal medium contained 1.0% glucose, 0.5% peptone, 0.1% KH₂PO₄, 0.2% K₂HPO₄, 0.02% NaCl, 0.002% CaCl₂ · H₂O and 0.02% MgSO₄ · 7H₂O.

아조염료가 각각 50 ppm의 농도로 첨가된 균분리용 배지를 기본 배지로 하여 배양시간에 따른 아조 염료의 탈색율을 조사한 결과는 Fig. 3과 같다. AO7의 경우 배양초기인 배양 12시간까지 급격한 탈색을 보였으며 그 이후 점진적으로 탈색이 진행되었다. RR4는 배양시간의 경과에 따라 비교적 완만하게 탈색이 진행되는 경향을 보였다. RB5는 배양초기부터 탈색이 진행되어 배양 36시간까지 급속한 탈색을 보였으며, 이 이후에도 계속적인 탈색을 나타내었고, BB1의 경우 배양 12시간째까지는 탈색이 관찰되지 않았으나 배양 12시간부터 36시간까지 급격한 탈색이 이루어진 후 배양 108시간까지 서서히 탈색이 진행되는 경향을 보였다. DB71의 경우는 배양 24시간째 까지 급속도로 탈색이 이루어졌으나, 이후로는 탈색속도가 둔화되었다. 실험에 사용된 염료중 RR4를 제외하고는 배양초기인 24시간에서 36시간 사이에 대부분의 탈색이 진행되는 것으로 나타났다.

Citrobacter sp. MB2의 최적 성장조건. 분리균 *Citrobacter* sp. MB2의 최적 성장조건을 조사하기 위하여 탄소원, 질소원,

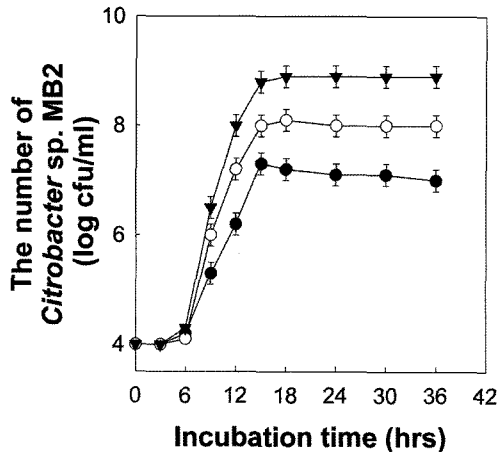


Fig. 4. Growth of *Citrobacter sp. MB2* on the improved medium. ●-●: Nutrient broth, ○-○: Basal medium (1.0% glucose, 0.5% peptone, 0.1% KH_2PO_4 , 0.2% K_2HPO_4 , 0.02% NaCl, 0.002% $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 7.0), ▼-▼: Improved medium (sucrose 0.5%, yeast extract 1.0%, K_2HPO_4 0.1%, NaHCO_3 0.1%, pH 7.0).

무기염류, 생육인자를 농도별로 달리 첨가하여 조사한 결과 최적 배지조성은 탄소원으로 sucrose 0.5%, 질소원으로 Yeast extract 1.0%, 무기염류로 K_2HPO_4 0.1%와 NaHCO_3 0.1%, pH 7.0인 것으로 확인되었으며, 30°C에서 진탕배양할 경우 성장에 가장 유리한 것으로 조사되었다(data not shown). 최적 성장조건에서 *Citrobacter sp. MB2*의 배양시간에 따른 균성장률을 개선전의 분리용 배지 및 enriched medium인 nutrient broth (NB)와 비교하여 실험한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. *Citrobacter sp. MB2*는 사용배지에 관계없이 배양 6시간 이후에는 급속한 성장을 나타내었다. NB에 배양한 경우는 배양 15시간째에 최고의 균성장(2.0×10^7 cfu/ml)을 보인 후 점차 감소하는 경향을 보인 반면, 분리용 배지와 개선된 최적배지의 경우 15시간 까지 급격한 성장을 보여 각각 1.2×10^8 cfu/ml와 7.6×10^8 cfu/ml의 개체수에 도달한 후 차츰 성장이 둔화되는 것으로 나타났다. 개선된 최적배지에서의 균성장은 분리용 배지나 nutrient broth에서의 균성장보다 각각 7배 및 50배 이상 증가된 결과이다.

금속염 내성검사. 선별된 아조 염료 분해균 *Citrobacter sp. MB2*의 각종 염에 대한내성을 조사한 결과는 Table 4와 같다. *Citrobacter sp. MB2*의 금속염에 대한 최저생육저해농도는 (minimal inhibitory concentration, MIC)는 HgCl_2 , $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 및 CuSO_4 의 경우는 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도범위로 조사된 반면, $\text{MnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 와 NaHAsO_4 그리고 LiCl_2 의 경우는 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도였으며, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 와 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 에 대해서는 900 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 조사되어 사용한 대부분의 금속염에 대한 강한 내성을 보였다.

항생제 내성검사. 선별된 아조 염료 분해균 *Citrobacter sp. MB2*의 각종 항생제에 대한 저항성 또는 감수성을 조사하기 위해 항생제가 여러 가지 농도로 첨가된 배지에 균을 배양하여 그 생육여부로서 결정한 최저 생육저해농도는 Table 5와 같다. *Citrobacter sp. MB2*의 항생제에 대한 MIC는 사용한 항생제 중 단백질 합성 저해제로 알려진 chloramphenicol과 tetracycline

Table 4. Minimal inhibitory concentration of metals on the growth of *Citrobacter sp. MB2*

Metals	MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	≤ 200
CrO_3	≤ 450
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	≤ 300
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	> 900
HgCl_2	≤ 250
LiCl_2	> 1000
$\text{MnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	> 1000
NaHAsO_4	> 1000
$\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	≤ 820
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	> 900

Cells were cultivated in the presence of each metal for 48 hours.

Table 5. Minimal inhibitory concentration of antibiotics on the growth of *Citrobacter sp. MB2*

Antibiotics	MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
Ampicillin	> 1000
Chloramphenicol	≤ 10
Kanamycin	≤ 150
Neomycin	≤ 25
Penicillin G	> 1000
Rifampicin	≤ 400
Streptomycin	≤ 200
Tetracyclin	≤ 20

Cells were cultivated in the presence of each antibiotic for 48 hours.

에 대해서는 각각 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이고, neomycin에 대해서는 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 나타나 이들 항생제에는 내성이 약한 것으로 조사되었다. 반면, ampicillin과 세포벽 합성 저해제로 알려진 penicillin G에 대해서는 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상으로 나타나 이 균은 ampicillin과 penicillin G에 대해 강한 내성을 가지는 것으로 조사되었다.

초 록

염색공단 주변의 토양과 하수로부터 아조염료 분해 · 탈색능이 우수한 MB2균을 분리하여 *Citrobacter sp.*로 동정하였다. *Citrobacter sp. MB2*의 성장 최적배지 및 배양조건은 sucrose 0.5%, yeast extract 1.0%, K_2HPO_4 0.1%, NaHCO_3 0.1%, pH 7.0, 배양온도 30°C에서 호기적 진탕배양이었으며, 최적배지에서의 균성장은 분리용 배지나 nutrient broth에서의 균성장보다 각각 7배 및 50배 이상 개체수가 증가하였다. *Citrobacter sp. MB2*는 금속염에 대해 강한 내성을 보였으며, 항생제 ampicillin과 penicillin G에 대해서 강한 내성을 보였다.

Key words: *Citrobacter sp. MB 2*, 아조염료, 탈색

참고문헌

1. Park, E. H., M. S. Jang, I. H. Cha, Y. L. Choi, Y. S. Cho, C. H. Kim, and Y. C. Lee. (2005) Decolorization of a sulfonated

- azo dye, congo red, by *Staphylococcus* sp. EY-3. *J. Microbiol. Biotechnol.* **15**, 221-225.
2. An, S. Y., S. K. Min, I. H. Cha, Y. L. Choi, Y. S. Cho, C. H. Kim, and Y. C. Lee. (2002) Decolorization of triphenylmethane and azo dyes by *Citrobacter* sp. *Biotechnol. Lett.* **24**, 1037-1040.
 3. Ji, W. D., Choi, U. K., Son, D. H. and Chung, Y. G. (1996) Inhibitory effect of azo dyes on microbial growth. *J. Korean Soc. Hygien. Sci.* **2**, 29-37.
 4. Jenkins, C. L. (1978) Textile dyes are potential hazards. *J. Environ. Health.* **40**, 256-260.
 5. Goszczynski, S., Paszczynski, A., Sasti-Grigsby, M. B., Crawford, R. L. and Crawford, D. L. (1994) New pathway for degradation of sulfonated azo dyes by microbial peroxidases of *Phanerochate chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*. *J. Bacteriol.* **176**, 1339-1347.
 6. Spadaro, J. T., Gold, M. H. and Renganathan, V. (1992) Degradation of azo dyes by the lignin-degrading fungus *Phanerochate chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 2398-2401.
 7. Gregory, P. (1993) Dyes and dyes intermediates, *Encyclopedia of chemical Tehcnology*, vol. 8. pp. 544-545. John Wiley & Sons, New York, USA.
 8. Ryu, B. H. and Weon, Y. D. (1992) Decolorization of azo dyes by *Aspergillus sojae* B-10. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2**, 215-219.
 9. Walker, R. and Gingell, R. (1971) Mechanisms of azo reduction by *Streptococcus faecalis*. II. the role of soluble flavins. *Xenobiotica.* **1**, 231-239.
 10. Walker, R., Gingell, R. and Murrells, D. F. (1971) Mechanisms of azo reduction by *Streptococcus faecalis* I. Optimization of assay conditions. *Xenobiotica.* **1**, 221-229.
 11. Dubin, P. and Wright, K. L. (1975) Reduction of azo food dyes in cultures of *Proteus vulgaris*. *Xenobiotica* **5**, 563-571.
 12. Chizuko, T., Ogawa, T., Koga, D. and Idaka, E. (1981) Biodegradability of azo and triphenylmethane dyes by *Pseudomonas pseudomallei* 13NA. *Coloration Technol.* **97**, 166-169.
 13. Chung K. T., Fulk, G. E. and Egan, M. (1978) Reduction of azo dyes by intestinal anaerobes. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**, 558-562.
 14. Ogawa, T., Tatome, C., and Idaka, E. (1981) Biodegradation of p-aminoazobenzene by continuous cultivation of *Pseudomonas pseudomallei* 13NA. *Coloration Technol.* **97**, 435-438.
 15. Ogawa, T., Tatome, C., Idaka, E. and Kamiya, H. (1986) Biodegradation of azo dyes by continuous cultivation of *Pseudomonas cepacia* 13NA. *Coloration Technol.* **102**, 12-14.
 16. Raffi, F., Franklin, W. and Cerniglia, C. E. (1990) Azoreductase activity of anaerobic bacteria isolated from human intestinal microflora. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 2146-2151.
 17. Ryan, A. J., Roxon, J. J. and Sivayavirajana, A. (1968) Bacterial azo reduction - a metabolic reaction in mammals. *Nature.* **219**, 854-855.
 18. Holt, J. G., Krig, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T. and Williams, S. T. (1994) In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 9th ed. Williams and Wilkins, Baltimore, USA.
 19. Dubin, P. and Wright, K. L. (1975) Reduction of azo food dyes in cultures of *Proteus vulgaris*. *Xenobiotica* **5**, 563-571.
 20. Ji, W. D., Son, D. H., Jeong, M. S., Choi, U. K., Chung, H. C., Choi, K. Y. and Chung, Y. G. (1996) Characteristics of monoazo dye-decolorizing bacterium *Klebsiella pneumoniae* DB51. *J. Korean Soc, Hygien. Sci.* **2**, 1-6.