

II-212 - ESTUDIO DE LA DINÁMICA POBLACIONAL DE UNA COMUNIDAD MICROBIANA DURANTE LA DEGRADACIÓN DE UNA MEZCLA DE AZOCOLORANTES EN UN REACTOR AEROBIO EMPACADO CON TEZONTLE

Daniel de los Cobos Vasconcelos⁽¹⁾

Doctor en Ciencias Quimicobiológicas por el Instituto Politécnico Nacional, México. Profesor de Asignatura “B” Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México. Posdoctorante DGAPA-UNAM en el Grupo de Investigación en Procesos Anaerobios en el Área de Ingeniería Ambiental del Instituto de Ingeniería de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Cleotilde Juárez Ramírez

Departamento de Ingeniería Bioquímica. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB), Instituto Politécnico Nacional (IPN). Doctora en Ciencias Quimicobiológicas por el Instituto Politécnico Nacional, México. Profesor Investigador de Tiempo Completo ENCB, IPN. Área de Investigación, Biotecnología Ambiental (Diseño y evaluación de bioprocesos y biorreactores para la degradación de pesticidas organoclorados)

Nora Ruiz Ordaz

Departamento de Ingeniería Bioquímica. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB), Instituto Politécnico Nacional (IPN). Doctora en Microbiología por el IPN, México. Profesor Investigador de Tiempo Completo ENCB, IPN. Área de Investigación, Biotecnología Ambiental (Diseño y evaluación de bioprocesos y biorreactores para la degradación de pesticidas organoclorados)

Cutberto José Juvencio Galíndez Mayer

Departamento de Ingeniería Bioquímica. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB), Instituto Politécnico Nacional (IPN). Doctor en Microbiología por el IPN, México. Profesor Investigador de Tiempo Completo ENCB, IPN. Área de Investigación, Biotecnología Ambiental (Diseño y evaluación de bioprocesos y biorreactores para la degradación de compuestos xenobióticos tóxicos y recalcitrantes)

Dirección⁽¹⁾: Instituto de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de México. Circuito Escolar sin número Edificio 5, Cubículo 310. Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, CP 04510, México, D.F. Tel (++) (52) 56 23 36 00 Extensión. 8693, e-mail: ddeloscobosv@iingen.unam.mx

RESUMEN

Se aisló una comunidad microbiana capaz de degradar los azocolorantes Naranja Ácido7 (AO7) y Rojo Ácido 88 (AR88) a partir de muestras de un sitio contaminado con efluentes industriales textiles. asimismo, se evaluó el efecto que tienen las cargas volumétricas de suministro de los azocolorantes (B_{VAZ}) y la velocidad volumétrica de aireación intersticial (Q_{GI}) sobre las velocidades de decoloración y biodegradación de la mezcla de azocolorantes en un módulo rectangular de dos etapas empacado (MHE) en el que se inoculó y estableció la comunidad microbiana aislada. Las determinación de los sustratos y sus intermediarios junto con las eficiencias de remoción de carbono orgánico total (COT) y reducción de la demanda química de oxígeno (DQO), fueron usados como indicadores de la degradación y mineralización de la mezcla de colorantes. Después de 225 días de operación continua del MHE, nueve cepas bacterianas fueron aisladas de la biopelícula adherida al soporte poroso. Los géneros identificados fueron: *Arthrobacter*, *Variovorax*, *Agrococcus*, *Sphingomonas*, *Sphingopyxis*, *Pseudochrobactrum*, *Methylobacterium*, *Mesorhizobium* y *Microbacterium*.

PALABRAS CLAVE: Dinámica poblacional, azocolorantes, reactor empacado.

AGRADECIMIENTOS

Daniel de los Cobos Vasconcelos agradece al CONACyT por la beca otorgada para realizar sus estudios de doctorado. Cleotilde Juárez Ramírez, Nora Ruiz Ordaz y Cutberto José Juvencio Galíndez Mayer agradecen los apoyos otorgados por COFAA-IPN, SIP-IPN y Sistema Nacional de Investigadores – CONACyT.

INTRODUCCIÓN

Las actividades de la industria textil y de manufactura de colorantes están asociados al volumen y complejidad de sus descargas de aguas residuales al medio ambiente (Rai *et al.*, 2005). Dependiendo del tipo de colorante y del tipo de proceso utilizado, se ha estimado que de un 10 a un 30% no se une a las fibras y es vertido al drenaje junto con otros compuestos que son llamados auxiliares (solventes, emulsificadores, dispersantes) que forman parte del proceso (Stolz, 2001). El agua residual también suele contener altas concentraciones de metales pesados, sólidos disueltos totales y tiene elevada demanda química y bioquímica de oxígeno. En forma paralela, la toxicidad de los azocolorantes y sus compuestos derivados está relacionada con la cantidad de sustituyentes y anillos aromáticos que forman parte de su estructura química.

Cuando este tipo de corrientes llega a las plantas de tratamiento de aguas residuales, los compuestos químicos presentes no son removidos ya que su recalcitrancia es alta, además de los efectos nocivos, antes mencionados, sobre los lodos (Moran y col., 1997). Por ello, una de las soluciones con mayores posibilidades de éxito, es el uso de tratamientos específicos ubicados en la fuente de contaminación, que serían las descargas de las industrias textiles.

Para conseguir la eliminación de estas sustancias por medio de procesos biológicos, es necesario combinar dos factores con los que es posible obtener el mejor desempeño: (a) microorganismos que posean las enzimas necesarias para degradar completamente los compuestos en las condiciones de descarga y (b) el diseño de un biorreactor que mejore la eficiencia y velocidad de remoción de los compuestos de interés.

En algunos lugares donde las aguas residuales industriales son vertidas a los cuerpos de agua sin tratamiento, se han detectado ciertos microorganismos que son capaces de degradar compuestos xenobióticos. Muchos microorganismos tales como bacterias, hongos y algas, pueden decolorar e incluso mineralizar completamente muchos de los azocolorantes bajo ciertas condiciones (Vandevivere *et al.*, 1998; McMullan *et al.*, 2001; Stolz, 2001 y 2008; Rai *et al.*, 2005; Van der Zee y Villaverde, 2005; Pandey *et al.*, 2007).

El estudio de la estructura y dinámica de las comunidades microbianas durante los procesos de biodegradación, extiende la comprensión de las relaciones ecológicas y eventualmente se podrá llegar a un mejor control y una operación optimizada de los mismos (Guieysse *et al.*, 2001). Diversas metodologías han sido usadas en este campo, cada una con ventajas y limitaciones específicas. Una estrategia cada vez más extendida es usar el ADN metagenómico como fuente de información de la estructura de la comunidad. Esto, permite rebasar ciertas limitaciones que acompañan a otras técnicas que dependen del crecimiento de microorganismos en medios con diferentes fuentes de carbono o que son afectados por cambios en la fisiología microbiana, además, es bien conocido que sólo una pequeña proporción de la microbiota es cultivable, lo que en parte ha causado que disminuya el uso de metodologías basadas en el cultivo de microorganismos, tales como los patrones de uso de fuentes de carbono (Hackett y Griffiths, 1997; Heuer y Smalla, 1997).

Los métodos de cultivo de comunidades están basados en la definición del ambiente en términos de concentración y flujos de sustratos y productos. Además, el cultivo de comunidades mantiene la diversidad microbiana y sólo se separan los componentes para identificarlos y caracterizarlos. Este tipo de cultivos se basan en la premisa de que la mayoría de las comunidades microbianas en la naturaleza están íntimamente asociadas a diversas superficies y entre sus componentes en conglomerados llamados biopelículas (Stach y Burns, 2002).

Diversas condiciones, tales como las propiedades de la superficie y la interfase, disponibilidad de nutrientes, composición de la comunidad microbiana y las condiciones hidrodinámicas pueden afectar la estructura de la biopelícula, la cual ha demostrado ser el punto clave en cuanto a funcionalidad se refiere, ya que además de proteger y regular, contiene espacios intersticiales o canales en los que circula líquido, funcionando como sistema de distribución de nutrientes así como de intercambio de productos metabólicos con el medio (Davey y O'Toole, 2000). El uso de biopelículas en el tratamiento aeróbico de varios compuestos tóxicos recalcitrantes ha aumentado, siendo una buena alternativa a los sistemas de células en suspensión.

Los filtros sumergidos aireados o reactores empacados (PBR por sus siglas en inglés), permiten que la biomasa crezca en forma de biopelícula en el soporte, ocasionando que los canales o espacios en el soporte se obstruyan, generando diferentes condiciones de aireación y crecimiento en el biorreactor. Esto puede ser una ventaja o desventaja dependiendo del tipo de comunidad que se requiera para determinado contaminante, sin embargo, a

menos que se modifique el diseño del reactor, no existe un control para seleccionar las zonas de aerobiosis/anaerobiosis, ya que las obstrucciones son aleatorias, aunque preferentemente se presentan en las capas más cercanas a la alimentación (Gavrilescu y Macoveanu, 2000).

En este trabajo se realizó la compartimentalización del biorreactor con un deflector vertical, para reducir la dispersión axial del líquido (mezclado en contraflujo) y favorecer localmente la turbulencia en cada compartimento. También el empacamiento con rocas fragmentadas reduce la dispersión axial, pero complica el mezclado del líquido y la difusión del oxígeno a lo largo del reactor. Una combinación de ambas, el empacado y la compartimentalización, evita el mezclado en contraflujo mientras que favorece la transferencia de oxígeno al medio; particularmente cuando difusores con orificios muy pequeños son usados para suministrar el aire (con el oxígeno necesario para el metabolismo aerobio). Por estas razones, el sistema propuesto fue concebido como un biorreactor horizontalmente segmentado y empacado con tezontle (BHSE), para degradar azocolorantes y sus intermediarios.

OBJETIVO

Estudiar el efecto de sucesivos incrementos en la carga volumétrica de alimentación de azocolorantes ($B_{V,AZ}$) y el gasto volumétrico intersticial de aire (Q_{GI}) sobre la composición de una comunidad microbiana capaz de utilizar como fuente de carbono y energía colorantes azoicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

El reactor empacado utilizado fue un recipiente de polimetilmetacrilato de 5/16 de pulgada, separado por una placa central del mismo material (figura 1). Se suministró aire a través de difusores de tubería de Tygoon fijados en canales. Como empaque se utilizó roca volcánica de alta porosidad (tezontle rojo) previamente esterilizada.

En cuanto a la comunidad microbiana empleada, se aislaron microorganismos que utilizaron como fuente de carbono, energía y nitrógeno una mezcla de azocolorantes, a partir de cultivos microbianos seleccionados, así como de muestras de suelo y agua provenientes de una zona de la Presa La Requena del Estado de Hidalgo, donde eran descargadas aguas residuales de una industria textil cercana.

La inoculación del reactor empacado se realizó siguiendo el método de cultivo de comunidades propuesto por Stach y Burns, 2002. Posteriormente, el reactor se inundó con 5.4 litros de una mezcla de colorantes de 100 ppm (50 ppm cada uno), en la 1ª sección el gasto volumétrico intersticial de aire se fijó en 0.025 VVM, mientras que en la 2ª sección no se inyectó aire, en estas condiciones se operó en lote durante una semana para permitir la colonización del reactor. Posteriormente se inició la alimentación y el muestreo del reactor de acuerdo al esquema de operación de la tabla 1.

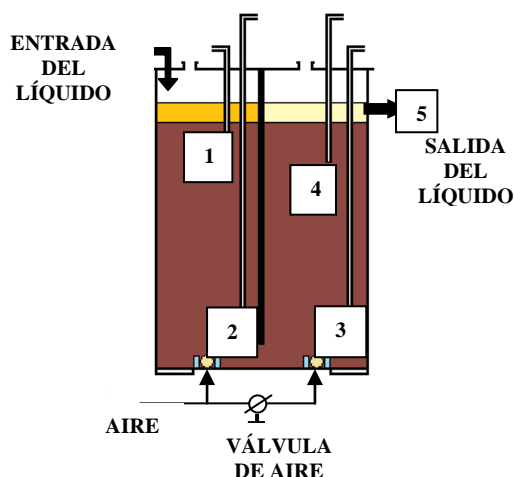


Figura 1. Diagrama experimental del reactor de lecho empacado. Puntos de muestreo: 1 a 5

Después de alcanzar cada período estable y antes de iniciar la siguiente condición de operación del reactor, se tomaron muestras tanto del sobrenadante y de la biomasa desprendida mecánicamente del soporte. Ambas muestras se analizaron mediante técnicas convencionales de microbiología, el sobrenadante fue analizado además mediante técnicas fisicoquímicas (DQO soluble por el método 8000, COT por el método 10129, N_2 total por el método 10071 (Hach, 2002), y concentración de colorantes e intermediarios por HPLC un método desarrollado durante la investigación). A partir de la biomasa desprendida se obtuvo ADN para su análisis mediante técnicas de biología molecular. Las muestras de tezontle con células inmovilizadas (previamente fijadas y deshidratadas) fueron observadas por microscopía electrónica de barrido en un microscopio de la marca JEOL, modelo JSM-5800 LV.

Las muestras se sembraron en medio sólido de cuenta estándar (CE) y en medio sólido sintético adicionado con los colorantes utilizados, las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 2 y 7 días respectivamente. Las colonias desarrolladas se resembraron en placas de agar cuenta estándar. Este proceso se repitió hasta obtener las cepas predominantes de la comunidad microbiana a través de los cambios de operación del biorreactor.

Con la finalidad de evaluar la riqueza de especies de la comunidad, se obtuvo el ADN de la biomasa desprendida del soporte y se analizó mediante dos técnicas: electroforesis en gel de poliacrilamida con gradiente de temperatura (*TGGE por sus siglas en inglés*, *Iniciadores: U968-GC* → 5'-(*Pinza GC*)-AAC GCG AAG AAC CTT AC-3'. *L1401* → 5'-CGG TGT GTA CAA GAC CC-3'. *Pinza GC* → 5'-CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G-3'), amplificación aleatoria de ADN polimórfico (*RAPD por sus siglas en inglés*, *Iniciadores: 1283* → 5'-GCG ATC CCC A-3'. *1290* → 5'-GTG GAT GCG A-3'). Para la identificación de cada microorganismo se amplificó un fragmento de aproximadamente 1300 pb del 16S rDNA (*Iniciadores: 8FPL* → 5'-GCG GAT CCG CGG CCG CTG CAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG-3'. *13B* → 5'-CGG GAT CCC AGG CCC GGG AAC GTA TTC AC-3') que fue secuenciado y comparado en la base de datos del Gen Bank del NCBI.

Tabla 1. Esquema de operación del reactor horizontal empacado en régimen continuo

Q_{GI} (VVM)	F (L h ⁻¹)	Tiempo acumulado(días)	$B_{v,AZ}$ (mg L ⁻¹ d ⁻¹)
0.025	0.01	52	4.44
	0.03	69	13.33
	0.05	83	22.22
	0.07	100	31.11
	0.09	119	40
0.052	0.09	128	40
	0.11	133	48.89
	0.13	139	57.78
	0.15	150	66.67
	0.18	178	80
0.075	0.18	199	80
0.1	0.18	209	80
0.05 (2)	0.18	229	80

RESULTADOS

La mezcla de Naranja ácido 7 y Rojo ácido 88, a 50 ppm cada uno, fue suministrada incrementando la velocidad de alimentación después de alcanzar el estado de equilibrio dinámico para cada condición de operación, de tal manera que la carga volumétrica se modificó de 4.44 mg L⁻¹ d⁻¹ con una Q_{GI} de 0.025 VVM hasta 80 mg L⁻¹ d⁻¹ con una Q_{GI} de 0.1 VVM, donde no fue posible observar un incremento de la velocidad volumétrica de remoción de azocolorantes, así como las eficiencias de reducción de la DQO y del COT (de los Cobos *et al.*, 2012). De la condición inicial hasta 31.11 mg L⁻¹ d⁻¹ se obtuvo la completa decoloración del medio alimentado.

Pudo observarse que en las primeras cargas volumétricas suministradas, los microorganismos lograron establecerse en el MHE y formaron una biopelícula delgada que cubría las piedras de tezontle (figura 2b). Lo interesante de esta colonización fue la especialización de los microorganismos que dependía de los sustratos disponibles, por lo que su predominancia en ciertas regiones del módulo se hizo evidente: las muestras obtenidas de las piedras de tezontle cercanas a la alimentación, contenían microorganismos con mayor actividad decolorante que los obtenidos a partir de las muestras de soporte próximo a la salida de las muestras líquidas (figura 3a). Esto demuestra la importancia de la formación de biopelícula y del establecimiento de las condiciones adecuadas para su supervivencia. La diferencia en capacidad de decoloración entre la primera y segunda etapa del MHE fue muy evidente en las primeras cargas volumétricas alimentadas con un Q_{GI} de 0.025 hasta 0.052 VVM.

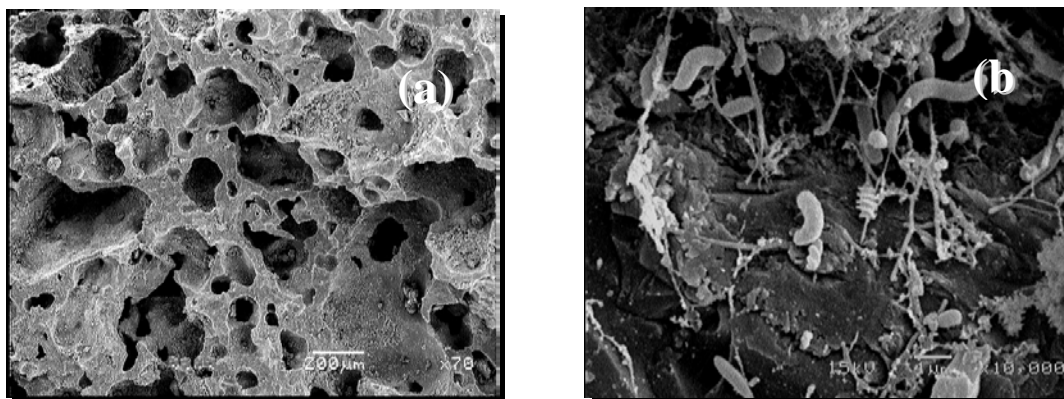


Figura 2. Microfotografías de la superficie altamente porosa de una piedra de tezontle (a) y un acercamiento donde se aprecian los microorganismos que conforman la comunidad adherida (b).

Sin embargo, cuando la B_{VAZ} fue aumentada a $40 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, las eficiencias de decoloración, y reducción de la DQO y del COT disminuyeron. Bajo estas condiciones de operación, la concentración de oxígeno disuelto en la 2ª sección (sin aireación) fue de 0.8 mg L^{-1} , lo que probablemente ocasionó la disminución de la capacidad de degradación de la comunidad microbiana. A continuación, se tomaron las muestras correspondientes, se mantuvo la misma carga volumétrica y se aumentó la velocidad de aireación a 0.052 VVM, con un aumento consiguiente de la concentración de oxígeno disuelto tanto en la 1ª como en la 2ª sección. En este caso, las eficiencias de decoloración, reducción de la DQO y eliminación del COT igualaron y hasta mejoraron sus valores previos (de los Cobos *et al.*, 2012). El efecto de la velocidad de aireación sobre la degradación quedó evidenciado de esta manera. La recuperación subsecuente de la capacidad de la comunidad para alcanzar de nuevo una mayor velocidad volumétrica de reducción de la DQO permitió seguir retando al sistema hasta llegar a las condiciones finales antes descritas.

El aspecto más relevante fue que a lo largo del proceso se observó el cambio de los componentes de la comunidad microbiana inicial conforme aumentó la B_{VAZ} . Esto pudo observarse debido a las diferencias de los patrones de bandas entre la 1ª y la 2ª sección, mientras el Q_{GI} se mantuvo por debajo de 0.075 VVM. Con el aumento del gasto volumétrico de aire a 0.1 VVM, los patrones de bandas en las 2 secciones comenzaron a ser similares, lo que también concuerda con un mayor desprendimiento de la biomasa adherida y una tendencia a la uniformidad de las secciones (figura 3b) al modificar el patrón de circulación del efluente, de flujo pistón en la 2ª sección a un estado pseudohomogéneo donde se presentó mezclado axial del medio.

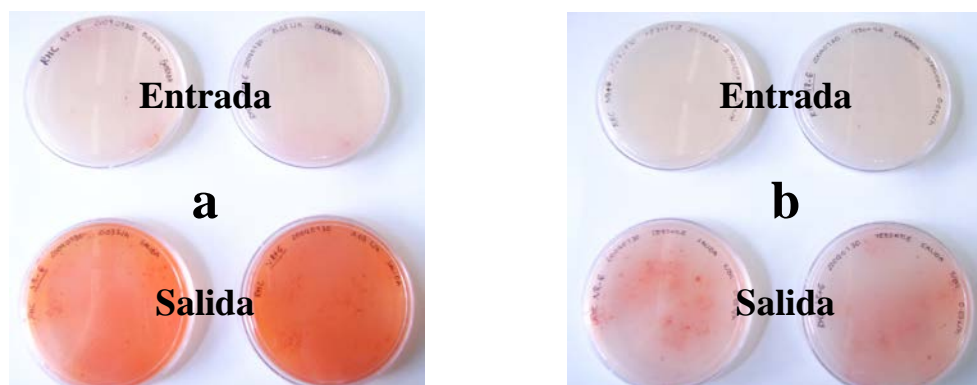


Figura 3. Cultivo en medio sólido con colorantes inoculado con suspensiones obtenidas de la primera y de la segunda etapa del MHE en plena operación. (a) B_V de 4.44 a 48.89 $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$. (b) B_V de 57.78 a 80 $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$.

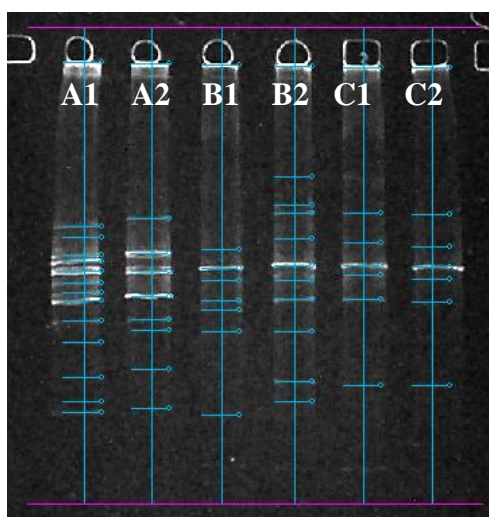


Figura 3. Patrones de bandas de la comunidad microbiana adherida al soporte durante la operación del bioreactor a diferentes $B_{V,AZ}$ y Q_{GI} , obtenidas por electroforesis en gel de poliacrilamida con gradiente de temperatura a partir de amplicones de ADN de 450 pb con los iniciadores U968 y L1401. 1→ 1ª sección; 2→ 2ªsección; A = 4.44 $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}/0.025 \text{ VVM}$; B = 66.67 $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}/0.052 \text{ VVM}$; C = 80 $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}/0.1 \text{ VVM}$

Después de la identificación inicial, se hizo el seguimiento de la comunidad a partir de las muestras sustraídas del reactor empacado cuando se evaluó la degradación de azocolorantes e intermediarios. La comunidad microbiana respondió a los cambios ejercidos en el medio por las diferentes condiciones de operación probadas, al variar la proporción de las diferentes especies que la conformaban. Se observó que la comunidad microbiana al final tuvo muchos cambios en su conformación comparada con la inicial, por una parte perdiendo diversidad y haciéndose más especializada y por otra mostrando cambios en las cepas identificadas (Tabla 2), debido probablemente a que los cambios en las condiciones de operación del reactor motivaron que microorganismos que en un principio se encontraban en mayor proporción, fueran desplazados por aquellos que incrementaron su presencia en el sistema. Todas estos géneros han mostrado antecedentes de capacidades de degradación de xenobióticos y alta sobrevivencia a condiciones ambientales adversas (de los Cobos *et al.*, 2012).

Tabla 2. Similitud de secuencias del 16S rADN de las cepas predominantes cultivables que conforman la comunidad microbiana inicial seleccionada (izquierda) y de las cepas predominantes cultivables que conforman la comunidad microbiana establecida durante la operación del MHE (derecha).

Nombre	% similitud	Clave de acceso al Gene Bank	Nombre	% similitud	Clave de acceso al Gene Bank
<i>Ideonella</i> sp. B513	98	AB049107	<i>Arthrobacter</i> sp.	94	EU362180.1
<i>Caulobacter</i> sp. IMCC1706	99	DQ664200	<i>Variovorax</i> sp.	95	AF426000.1
<i>Mycobacterium</i> sp. K337W	99	DQ372733	<i>Agrococcus</i> sp.	97	GQ18833.1
<i>Sphingomonas wittichii</i> RW1	98	CP000699	<i>Sphingomonas</i> sp.	96	EF128173.1
<i>Sphingomonas</i> sp. Mar-33	99	EF128173	<i>Sphingopyxis</i> sp.	97	EU240203.1
Bacteria Comamonadaceae b4M	97	EF540485	<i>Microbacterium</i> sp.	97	EU714346.1
<i>Mesorhizobium</i> sp. no cultivada	80	AM934992	<i>Pseudochrobactrum</i> sp.	91	AM263420.1
			<i>Methylobacterium</i> sp.	94	Z23160.1
			<i>Mesorhizobium</i> sp.	97	DQ839129

CONCLUSIONES

- Los microorganismos en mayor proporción de la comunidad microbiana, pertenecientes a 9 géneros bacterianos, fueron identificados por secuenciación de un fragmento amplificado del 16S rADN. Los géneros bacterianos identificados fueron: *Arthrobacter*, *Variovorax*, *Agrococcus*, *Sphingomonas*, *Sphingopyxis*, *Pseudochrobactrum*, *Methylobacterium*, *Mesorhizobium* y *Microbacterium*. Solamente dos microorganismos pertenecientes a los géneros *Sphingomonas* y *Mesorhizobium* mantuvieron su presencia a lo largo del proceso.
- La variación en las condiciones de operación provocaron modificaciones en la riqueza de la comunidad microbiana estudiada, que posiblemente estuvo asociada a la pérdida de la capacidad degradadora de azocolorantes y de transformación de metabolitos intermediarios en última instancia.
- Empleando cargas volumétricas hasta de 40 mg L⁻¹ h⁻¹ lograron obtenerse eficiencias de decoloración mayores al 99%, así como eficiencias de remoción de COT hasta de 97%, de reducción de la DQO hasta de un 99% y de intermediarios cuantificados por HPLC mayor a 99%.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. DAVEY, M.E. AND O'TOOLE G. A. 2000. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiol Mol Biol Rev.* 64(4): 847-867.
2. DE LOS COBOS-VASCONCELOS, D., RUIZ-ORDAZ, N., GALÍNDEZ-MAYER, J., POGGI-VARALDO, H., JUÁREZ-RAMÍREZ, C., LÓPEZ-MUÑOZ, A. 2012. Aerobic biodegradation of a mixture of sulfonated azo dyes by a bacterial consortium immobilized in a two-stage sparged packed-bed biofilm reactor. *Eng. Life Sci.* 12(1): 39-48. DOI:10.1002/elsc.201000227.
3. GUIEYSSE, B., WIKSTRÖM, P., FORSMAN, M., MATTIASON, B. 2001. Biomonitoring of continuous microbial community adaptation towards more efficient phenol-degradation in a fed-batch bioreactor. *Appl Microbiol Biotechnol.* 56: 780-787.
4. GRAVILESCU, M. AND MACOVEANU, M. 2000. Attached-growth process engineering in wastewater treatment. *Bioprocess Eng.* 23: 95-106.
5. HACH COMPANY. 2002. Water analysis handbook. 4a. edición. Colorado U.S.A. pag. 657-669, 739-742.
6. HACKETT, C.A., GRIFFITHS, B.S. 1997. Statistical analysis of the time course of biolog substrate utilization. *J Microbiol Methods* 30: 63-69.

7. HEUER, H., SMALLA, K. 1997. Evaluation of community-level catabolic profiling using BIOLOG GN microplates to study microbial community changes in potato phyllosphere. *J Microbiol Methods* 30: 49–61.
8. MCMULLAN, G., MEEHAN, C., CONNEELY, A., NIRBY, N., ROBINSON, T., NIGAM, P., BANAT, I.M., MARCHANT, R., SMYTH, W.F. 2001. Mini Review: Microbial decolourisation and degradation of textile dyes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56: 81-87.
9. MORAN, C., HALL, M.E., HOWELL, R.C. 1997. Effects of sewage treatment on textile effluent. *J. Soc. Dyers. Colour.* 113: 272-274.
10. PANDEY, A., SINGH, P., IYENGAR, L. 2007. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes. Review. *Int Biodeterior Biodegradation.* 59: 73-84.
11. RAI, H., BHATTACHARYA, M., SINGH, J., BANSAL, T.K., VATS, P., BANERJEE, U.C. 2005. Removal of dyes from the effluent of textile and dyestuff manufacturing industry: a review of emerging techniques with reference to biological treatment. *Crit Rev Environ Sci Technol.* 35: 219–238.
12. STACH, J.E.M., BURNS, R.G. 2002. Enrichment versus biofilm culture: a functional and phylogenetic comparison of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading microbial communities. *Environ Microbiol.* 4(3): 169-182.
13. STOLZ, A. 2001. Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. *Appl Microbiol Biotechnol.* 56: 69-80.
14. STOLZ, A. 2008. Molecular characteristics of xenobiotic-degrading sphingomonads. *Appl Microbiol Biotechnol.* 81: 793-811.
15. VAN DER ZEE, F.P., VILLAVERDE, S. 2005. Combined anaerobic-aerobic treatment of azo dyes – A short review of bioreactor studies. *Water Res.* 39: 1425-1440.
16. VANDEVIVERE, P.C., BINACHI, R., VERSTRATE, W. 1998. Treatment of wastewater from textile wet processing industry: review of emerging technologies. *J Chem Technol Biotechnol.* 72: 289-302.