Khảo sát sự phân hủy aniline bởi vi khuẩn *Pseudomonas moraviensis* AN-5

• **Hà Danh Đức**
Trường Đại học Đồng Tháp
Email: hadanhduc@gmail.com

(Bài nhận ngày 03 tháng 11 năm 2017, nhận đăng ngày 20 tháng 09 năm 2017)

TÓM TẮT

Aniline là những hợp chất hữu cơ độc hại gây ô nhiễm môi trường, nhất là môi trường nước, và gây hại đến sức khỏe con người cũng như các loài thủy sinh vật. Trong số 7 dòng vi khuẩn được phân lập từ bùn và nước cống rãnh của phòng thí nghiệm Đại học Đồng Tháp có khả năng sử dụng aniline như là nguồn carbon và nitrogen duy nhất để sinh trưởng, Pseudomonas moraviensis AN-5 có hiệu quả cao nhất. P. moraviensis AN-5 phân hủy hoàn toàn aniline sau 3 ngày ở nồng độ ≤ 4,0 mM. Sự bổ sung yeast extract và succinate như là nguồn dinh dưỡng thứ 2 làm kích thích sự sinh trưởng và phân hủy aniline của AN-5. Nghiên cứu về con đường phân hủy aniline của AN-5 thấy rằng vi khuẩn này phân hủy aniline theo con đường ortho-cleavage.

Từ khóa: *aniline, Pseudomonas moraviensis AN-5, ortho-cleavage*

MỞ ĐẦU

Aniline là chất hữu cơ độc hại được sử dụng rộng rãi trong công nghiệp và nhiều các ngành khác liên quan. Aniline là nguyên liệu chính để sản xuất phẩm nhuộm azo, sử dụng trong công nghiệp chế biến cao su, sản xuất verni, thuốc chữa bệnh và thuốc diệt cỏ [3, 15].

Việc sử dụng rộng rãi aniline trong công nghiệp gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến môi trường đất, nước và không khí. Aniline là hóa chất độc hại, gây ung thư và các bệnh khác. Vì độc tính cao và khó phân hủy, aniline được coi là chất gây ô nhiễm môi trường quan trọng [14]. Chúng được liệt kê trong nhóm các hợp chất độc hại tại 76/464/CEE của Châu Âu và trong danh sách các chất gây ô nhiễm quan trọng của Cơ quan Bảo vệ Môi trường Hoa Kỳ [16].

Trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu về tồn dư của các loại aniline trong đất và trong nước. Thí dụ aniline trong nước thải từ công ty dược phẩm lên tới 2.480 mg/L [11] hay trong nước ngầm là 17 mg/L [4]. Các các nghiên cứu về sự phân hủy aniline bởi các vi sinh vật trên thế giới đã được công bố [11-13, 20]. Sự tồn dư của chất này làm ô nhiễm hệ sinh thái, nguồn nước nuôi thủy sản, có thể làm chết cá, tôm và các loài thủy sinh khác. Tuy nhiên, cho đến nay chưa có công bố nào về sự nghiên cứu phân hủy aniline tại Việt Nam.

Phòng thí nghiệm Hóa học, Sinh học và Khoa học môi trường ở Trường Đại học Đồng Tháp là nơi sinh viên thường xuyên làm thí nghiệm. Quá trình làm thí nghiệm có thể có một lượng aniline rò rỉ ra môi trường ngoài, thoát qua hệ thống cống rãnh. Trong bài báo này, vi khuẩn phân hủy aniline được phân lập từ rãnh nước phòng thí nghiệm được khảo sát về khả năng sử dụng aniline như là nguồn dinh dưỡng duy nhất cũng như con đường phân hủy cơ chất của chúng.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Vi khuẩn được nuôi cấy trong dung dịch khoáng chất có các thành phần như sau: 1.419,6 mg/L Na_2HPO_4; 1.360,9 mg/L KH_2PO_4; 98,5 mg/L $MgSO_4$; 5,88 mg/L $CaCl_2$. $2H_2O$, 1,16 mg/L H_3BO_4; 2,78 mg/L $FeSO_4.7H_2O$; 1,15 mg/L $ZnSO_4.7H_2O$; 1,69 mg/L $MnSO_4.H_2O$, 0,38 mg/L $CuSO_4.5H_2O$; 0,24 mg/L $CoCl_2.6H_2O$ và 0,10 mg/L MoO_3 [5]. pH được điều chỉnh trong khoảng 7,0 ± 0,1. Môi trường được khử trùng ở nhiệt độ 120 ^oC trong thời gian 15 phút trước khi nuôi cấy vi khuẩn (riêng môi trường có glucose được khử

trùng ở nhiệt độ 110 ^oC để tránh sự biến tính của chúng). Môi trường đặc dùng để cấy vi khuẩn được thêm vào 2 g/L agar trước khi khử trùng.

Phân lập và nhận diện vi khuẩn

Mẫu bùn và nước cống rãnh từ phần xả thải của phòng thí nghiệm Trường Đại học Đồng Tháp được thu và bảo quản trong nước đá cho đến khi tiến hành thí nghiệm. 5,0 g mẫu được cho vào bình tam giác rồi thêm môi trường dung dịch khoáng chất cho đến 100 mL. 10,0 mM aniline được thêm vào trong mẫu. Sau 5 ngày ủ ở nhiệt độ phòng (28 – 32 ^oC), 1,0 mL dung dịch được chuyển vào 100 mL môi trường dung dịch khoáng chất và 10,0 mM aniline được bổ sung. Quá trình như vậy được lặp lại sau 30 ngày, vi khuẩn được phân lập trên đĩa agar với aniline là chất cung cấp nguồn nitrogen và carbon duy nhất. Các dòng vi khuẩn đã phân lập được khảo sát khả năng phân hủy aniline để đánh giá hiệu quả của chúng.

Dòng vi khuẩn có hiệu quả cao nhất được định danh dựa vào phân tích 16S rDNA theo phương pháp được mô tả bởi Li [11]. 1466 bp 16S được nhân lên với cặp mồi đặc hiệu 27f (5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3') và 1.492r (5'-TACGGHTACCTTACGACT-3'). Quá trình được tiến hành với tổng cộng 20,0 mL PCR buffer chứa 2,0 mmol/l $MgCl_2$; 10,0 ng DNA; 0,2 mmol/l x4 dNTP; 1,0 mmol mỗi loại primer; 1,0 U Taq polymerase. Sự phản ứng được thực hiện bằng thermal cycler (PTC 220, Bio-Rad Inc., USA) ở 94 ^oC trong 5,0 phút cho pha khởi đầu, tiếp theo là quá trình nhân lên trong 35 chu kỳ ở 94 ^oC trong 1,0 phút, sau đó chuyển sang 1,0 phút ở 55 ^oC và 1,5 phút ở 72 ^oC. Giai đoạn cuối cùng được tiến hành ở 72 ^oC trong 5,0 phút. Sản phẩm của PCR được làm sạch bởi UNIQ-10 EZ Spin Column PCR Production Purification Kit (Shanghai Sangon Co. Ltd.). Cuối cùng là quá trình đọc mã 16S được tiến hành. Trình tự của 16S rDNA được phân tích ở NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

Cây di truyền thể hiện sự phân loại của dòng vi khuẩn được thiết lập dựa trên trình tự 16S rDNA, sử dụng phần mềm MEGA 7.0. 16S rRNA của các dòng vi khuẩn được sắp xếp ở CLUSTAL X. Quá trình được thực hiện bằng phương pháp neighbor-joining [17]. Sự phân tích Bootstrap được thực hiện với 1000 resamplings [6].

Kiểm tra khả năng phân hủy aniline của vi khuẩn trong môi trường lỏng

Vi khuẩn được nuôi trong môi trường khoáng, sử dụng aniline như là nguồn carbon và nitrogen duy nhất, hoặc được bổ sung thêm các nguồn chất dinh dưỡng khác (glucose, succinate, $(NH_4)_2SO_4$, $NaNO_3$ và Yeast extract (YE)). Lượng vi khuẩn được chủng vào môi trường ban đầu với khoảng $3,5x10^6$ cfu/ml.

Aniline được pha chế dưới dạng stock trong cồn tuyệt đối. Thí nghiệm được tiến hành với tốc độ lắc 150 vòng/phút ở nhiệt độ phòng. Mẫu được lấy theo chu kì 3 giờ 1 lần (mỗi lần 1,0 ml) và được bảo quản ở 4 ^oC cho đến khi phân tích. Các thí nghiệm về khả năng phân hủy aniline như là nguồn hữu cơ duy nhất được thực hiện ở các nồng độ aniline khác nhau, và các thí nghiệm về sự ảnh hưởng của chất dinh dưỡng đến sự phân hủy aniline hay sinh trưởng của vi khuẩn được thực hiện ở nồng độ 10,0 mM aniline.

Nồng độ aniline trong môi trường lỏng được xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC - High Performance Liquid Chromatography), với cột (5 µm, 250 mm×4,6 mm; Hyperclone, Phenomenex, USA) và đầu dò quang phổ tử ngoại 240 nm. Pha động là hỗn hợp acetonitrile (70 %) và nước tinh khiết (30 %).

Sự sinh trưởng lũy thừa của vi khuẩn được xác định bằng phương pháp đo độ đục bằng tán xạ ánh sáng quang phổ kế (spectrophotometer) ở bước sóng 600 nm (OD_{600}). Sự sinh trưởng của vi khuẩn được tính theo phương pháp của Zeyer [22]. Tất cả các thí nghiệm được tiến hành ít nhất 3 lần lặp lại, tại Đại học Chulalongkorn (Bangkok, Thái Lan).

Phân tích mức độ khác nhau của các nghiệm thức được thực hiện bằng phần mềm SPSS phiên bản 22. Sự khác biệt này được thể hiện bằng các chữ cái. Các chữ cái giống nhau thể hiện sự giống nhau hoặc sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê

giữa các nghiệm thức với P < 0,05. Các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức.

Xác định cách thức phân hủy vòng benzene của vi khuẩn khi phân hủy aniline

Việc xác định cách thức phân hủy aniline dựa vào việc phát hiện enzyme catechol 2,3-dioxygenase và catechol 1,2-dioxygenase trích ly từ vi khuẩn khi ủ trong môi trường có aniline.

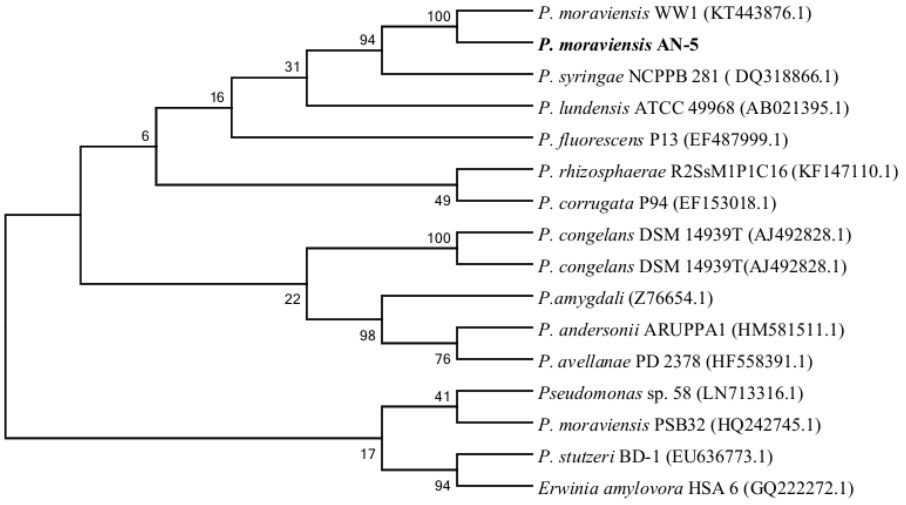
Phương pháp xác định enzyme này được thực hiện theo mô tả của Liu [13]. Vi khuẩn được nuôi trong môi trường có 10,0 mM aniline sau 12 giờ, mẫu được ly tâm ở tốc độ 10.000 rpm trong 5 phút, rửa lại bằng dung dịch Tris-HCl buffer (pH = 7,8) rồi cho vào trong dung dịch này. Tế bào sau đó được phá hủy nhờ French (Thermo Electron Corporation) ở 12.000 psi. Mẫu được ly tâm ở 10.000 rpm trong 5 phút, và phần dung dịch phía trên được sử dụng để phân tích. 3,0 mL bao gồm 2,0 mL phosphate buffer; 0,6 mL 1 mM catechol; 0,2 mL nước khử ion và 0,2 mL dung dịch trích ly từ tế bào. Các enzyme catechol 1,2-dioxygenase và chlorocatechol 1,2-dioxygenase được phân tích dựa trên sự hình thành sản phẩm trung gian là 2-hydroxymuconic semialdehyde ở 375 nm [18] và muconic acid ở 260 nm [10].

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập vi khuẩn phân hủy aniline

Từ mẫu bùn – nước từ hệ thống cống rãnh chúng tôi đã phân lập được tổng cộng 7 dòng vi khuẩn được đặt tên theo thứ tự từ AN-1 đến AN-7. Trong số này có 5 dòng vi khuẩn Gram âm và 2 dòng vi khuẩn Gram dương. Dòng vi khuẩn AN-5 có khả năng phân hủy aniline cao nhất (qua phân tích HPLC, số liệu so sánh không được thể hiện ở đây) được sử dụng để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

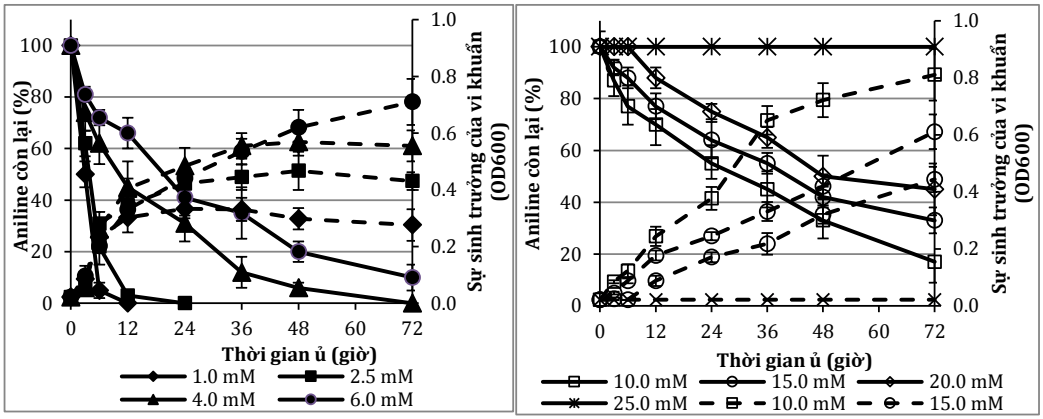
Dòng vi khuẩn AN-5 có Gram âm, được định danh qua phân tích 16S rDNA. Kết quả cho thấy vi khuẩn này có 99,99 % giống với *Pseudomonas moraviensis*, và được đặt tên là *P. moraviensis* AN-5. Qua phân tích trên cây phả hệ dựa trên trình tự 16S rDNA và MEGA 7.0 cũng cho thấy, dòng vi khuẩn này có quan hệ gần với *P. moraviensis* (Hình 1).



Hình 1. Cây phả hệ thể hiện dòng vi khuẩn phân hủy aniline *P. moraviensis* AN-5

Kiểm tra khả năng phân hủy aniline ở các nồng độ khác nhau

Đánh giá khả năng sử dụng aniline như là nguồn hữu cơ duy nhất được tiến hành với các nồng độ cơ chất khác nhau. Kết quả cho thấy, ở nồng độ càng cao thì tốc độ phân hủy aniline càng giảm (Hình 2). Sự phân hủy cơ chất và sinh trưởng của vi khuẩn hoàn toàn bị ức chế ở nồng độ 25,0 mM. Sự giảm tốc độ này là do aniline là chất độc, chúng ức chế vi khuẩn khi tăng nồng độ. Sự sinh trưởng của vi khuẩn cũng được đánh giá đồng thời với quá trình phân hủy aniline. Ở nồng độ aniline thấp (1,0 hay 2,5 mM), hay quá cao (15,0 và 20,0 mM) lượng vi khuẩn trong môi trường không nhiều bằng ở nồng độ 10,0 mM. Khi nồng độ aniline thấp, vi khuẩn không có lượng dinh dưỡng dồi dào để sinh trưởng, và khi nồng độ quá cao thì chúng lại ức chế sinh trưởng. Ở nồng độ ≤ 4,0 mM, aniline hoàn toàn biến mất sau 3 ngày ủ. Ở nồng độ 20,0 mM, vi khuẩn cần 6 giờ pha lag mới bắt đầu phân hủy aniline, và chúng phân hủy 67 % sau 3 ngày. Thí nghiệm được tiếp tục cho đến 5 ngày nhưng ở nồng độ này, chúng không hoàn toàn phân hủy hết cơ chất. Có lẽ do thiếu khoáng chất và ảnh hưởng của chất trung gian trong quá trình sinh trưởng đã ức chế sự phân hủy hoàn toàn của aniline ở nồng độ này. Ở các nghiệm thức đối chứng, aniline thay đổi không đáng kể sau thời gian ủ.



Hình 2. Sự phân hủy aniline của vi khuẩn *P*. *moraviensis* AN-5 như nguồn hữu cơ duy nhất (nét liền) và sự sinh trưởng của chúng (nét đứt) ở các nồng độ khác nhau

Các nghiên cứu về sự phân hủy aniline trên thế giới đã công bố trước đây như *Psedomodas* sp. [2, 7, 9], *Erwinia amylovora* HSA6 [11] hay *Delfr*ia sp. [12, 13]. So với chúng, *P*. *moraviensis* AN-5 thể hiện sự phân hủy aniline khá tốt khi trong môi trường không cần một nguồn hữu cơ nào khác ngoài aniline và lượng vi khuẩn ban đầu khá ít. *Pseudomonas* sp. K1 có thể phân hủy aniline với nồng độ 8,0 mM nhưng trong môi trường đã có sẵn nguồn nitrogen [9]. Ở một nghiên cứu khác, *Delftia* sp. XYJ6 bị ức chế ở nồng độ 3.000 mg/L [21]. Phát hiện này có ý nghĩa quan trọng khi ứng dụng AN-1 để làm sạch môi trường khi aniline có nồng độ cao.

Ảnh hưởng của các chất dinh dưỡng đến sự sinh trưởng và phân hủy aniline của vi khuẩn

Các chất dinh dưỡng bao gồm nguồn carbon (glucose và succinate) và nitrogen ($NaNO_3$, $(NH_4)_2SO_4$, và YE) được thêm vào trong quá trình ủ vi khuẩn. Kết quả cho thấy, sự có mặt bất kỳ một nguồn dinh dưỡng nào đều kích thích sự sinh trưởng của vi khuẩn (Bảng 1). Vi khuẩn sử dụng các chất dinh dưỡng bổ sung này để sinh trưởng ngoài nguồn cơ chất là aniline. Sự bổ sung glucose

và $NaNO_3$ không thay đổi đáng kể tốc độ sử dụng aniline. Trong khi đó, bổ sung YE và succinate kích thích cả sự sinh trưởng và phân hủy aniline. Succinate vừa là nguồn carbon, vừa là nguồn năng lượng. YE là nguồn carbon, nitrogen và chứa nhiều chất cần thiết khác giúp cho vi khuẩn phát triển tốt hơn. Công bố trước đây cho thấy, sự bổ sung 1,0 g/L glucose hay $(NH_4)_2SO_4$ làm tăng nhẹ tốc độ phân hủy aniline của *Candida tropicalis* AN1 [19].

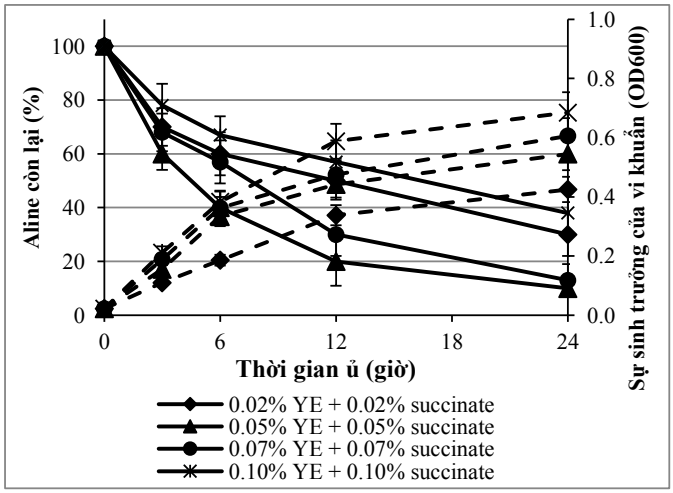
Bảng 1. Sự sinh trưởng và sự phân hủy aniline (10.0 mM) bởi *P. moraviensis* AN-5 trong điều kiện dinh dưỡng khác nhau (số liệu được tính toán sau 1 ngày ủ)

Chất bổ sung (0,05% mỗi chất)	Sự phân hủy aniline (μM/giờ)	Sinh trưởng của vi khuẩn/giờ
Không có	171.7 ± 10.0^{a}	0.015 ± 0.000^{a}
Glucose	187.5 ± 11.2^{a}	0.017 ± 0.001^{b}
Succinate	284.2 ± 21.2^{c}	0.019 ± 0.001^{c}
$NaNO_3$	199.2 ± 16.1^{ab}	0.015 ± 0.001^{a}
$(NH_4)_2SO_4$	262.5 ± 18.3^{c}	0.016 ± 0.002^{ab}
YE	279.2 ± 22.2^{c}	0.016 ± 0.001^{ab}
YE + $(NH_4)_2SO_4$	283.3 ± 24.3^{c}	0.018 ± 0.002^{bc}
YE + Succinate	325.0 ± 22.3^{cd}	0.023 ± 0.002^{d}

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau (a, b, c và d) thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức trong cùng một cột ($p > 0,05$)

Ảnh hưởng của nồng độ dinh dưỡng đến sự sinh trưởng và phân hủy aniline của vi khuẩn

YE và succinate kích thích sự sinh trưởng và phân hủy aniline của AN-5 được khảo sát để tìm ra nồng độ chất dinh dưỡng phù hợp nhất. Trong thí nghiệm này, việc bổ sung càng nhiều chất dinh dưỡng thì sự sinh trưởng của vi khuẩn càng cao (Hình 3). Nồng độ 0,05 % YE và 0,05 % succinate trong môi trường dẫn đến sự phân hủy aniline cao nhất. Ở nồng độ chất dinh dưỡng thấp, sự sinh trưởng của vi khuẩn thấp, nên số lượng của vi khuẩn chưa đủ nhiều để phân hủy nhanh aniline. Nhưng khi nồng độ của chúng quá cao, vi khuẩn sử dụng chất dinh dưỡng đó để sinh trưởng thay vì aniline nên sự phân hủy aniline giảm xuống.

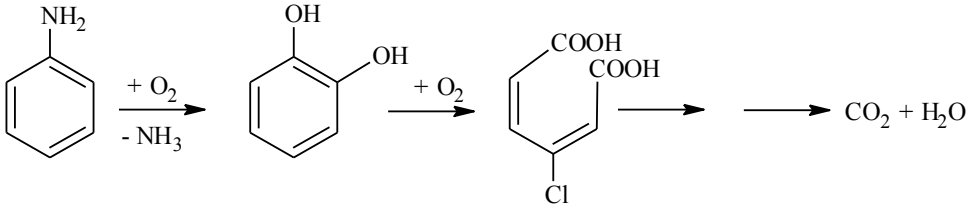


Hình 3. Ảnh hưởng của nồng độ YE và succinate đến sự phân hủy aniline (10,0 mM) (nét liền) và sự sinh trưởng (nét đứt) của vi khuẩn *P. moraviensis* AN-5

Xác định con đường phân hủy aniline của *P. moraviensis* AN-5.

Enzyme 1,2-dioxygenase và catechol 2,3-dioxygenase trong dịch trích ra từ tế bào vi khuẩn được khảo sát để xác định phương thức phân hủy aniline của AN-5. Kết quả cho thấy, hoạt động của emzyme 1,2-dioxygenase là chủ yếu (3,1 µmol/min/g vi khuẩn tươi), còn 2,3-dioxygenase là không đáng kể (0,6 µmol/min/g vi khuẩn tươi). Trong quá trình chạy HPLC, sự biến mất của aniline (Retention time = 3,2 phút), có sự xuất hiện của chất trung gian trùng với phổ xuất hiện với catechol (Retention time = 2,6 phút). Điều này chứng tỏ *P. moraviensis* AN-5 phân hủy aniline tại vị trí *ortho* (*ortho* cleavage pathway) là chủ yếu. Từ đó, con đường phân hủy aniline được đề xuất ở Hình 4. Nghiên cứu trước đây cũng cho thấy kết quả tương tự như *Pseudomonas* Ki [22] phân hủy aniline theo hướng *ortho*.

Trái lại, nhiều nghiên cứu khác cho thấy sự phân hủy aniline của *Pseudomonas* sp. theo con đường meta [1, 9, 8, 14], hay *Delftia* sp. AN3 [23] và *Delftia* sp. XYJ6 [20] cũng phân hủy aniline theo *meta*-cleavage. Một nghiên cứu khác cho thấy sự phân huỷ diễn ra theo cả *ortho* và *meta*-cleavage [1]. Sự phân hủy theo con đường *meta*-cleavage có nhược điểm là không phân hủy triệt để và sản phẩm cuối là các chất hữu cơ [22].



Hình 4. Sơ đồ thể hiện sự phân hủy aniline theo con đường *ortho*-cleavage của *P. moraviensis* AN-5

KẾT LUẬN

P. moraviensis AN-5 được phân lập từ bùn và nước của hệ thống cống rãnh có tiềm năng nhiễm aniline. Vi khuẩn có thể phân hủy aniline mà không cần sự bổ sung thêm nguồn hữu cơ nào khác. Thí nghiệm phân tích vai trò của chất dinh dưỡng bổ sung đến sự hoạt động của vi khuẩn thấy rằng, sự bổ sung thêm YE và succinate kích thích sự sinh trưởng và phân hủy aniline của chúng. Sự xác định con đường phân phân hủy aniline của AN-5 cho thấy chúng phá vỡ vòng benzene tại vị trí *ortho*. Nghiên cứu này có ý nghĩa quan trọng trong việc ứng dụng vi khuẩn để tẩy sạch aniline nhiễm bẩn trong nước hay trong đất trong tương lai.

Examing the aniline degradation by *Pseudomonas moraviensis* AN-5

• **Ha Danh Duc**
Đồng Tháp University

ABSTRACT

Aniline is a toxic aromatic compound causing environmental pollution, especially water problems, which harmfully affect to human and aquatic species. Seven bacterial strains were isolated from the sewerage of biological and chemical laboratories using aniline as a sole carbon and nitrogen source. Among them, Pseudomonas moraviensis AN-5 showed the highest efficiency. The aniline-degrading P. moraviensis AN-5 utilized aniline completely after 3 days at concentrations ≤ 4.0 mM. The addition of yeast extract and succinate stimulated the growth and aniline degradation of the strain. The investigation of aniline degraration pathway of P. moraviensis AN-5 showed that aniline was degraded by AN-5 via the ortho-clevage pathway.

***Keywords**: aniline, Pseudomonas moraviensis AN-5, ortho-cleavage*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. N.Y. Aokik, S. Murakami, R. Shinke, Microbial metabolism of aniline through a *meta*-cleavage pathway: Isolation of strains and production of catechol 2,3-dioxygenase, *Agricultural and Biological Chemistry*, 54, 1, 205–206 (1990).

[2]. S. Bathe, Conjugal transfer of plasmid pNB2 to activated sludge bacteria leads to 3-chloroaniline degradation in enrichment cultures, *Letters in Applied Microbiology*, 38, 6, 527–531 (2004).

[3]. N. Boon, J. Goris, P. De Vos, W. Verstraete, E.M. Top, Genetic diversity among 3-chloroaniline- and aniline-degrading strains of the *Comamonadaceae*, *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 3, 1107–1115 (2001).

[4]. E.M. Boyd, K. Killham, J. Wright, S. Rumford, M. Hetheridge, R. Cumming, Toxicity assessment of xenobiotic contaminated groundwater using lux modified *Pseudomonas fluorescens*, *Chemosphere*, 35, 9, 1967–1985 (1997).

[5]. W. Dejonghe, E. Berteloot, J. Goris, N, Boon, K. Crul, S. Maertens, M. Hofte, P. De Vos, W. Verstraete, E.M. Top, Synergistic degradation of linuron by a bacterial consortium and isolation of a single linuron-degrading *Variovorax*, *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 3, 1532–1541 (2003).

[6]. J. Felsenstein, PHYLIP (Phylogeny Inference Package), version 3.6a. Distributed by the author. Department of Genome Science, University of Washington, Seattle; 2002.

[7]. F. Fukumori, C.P. Saint, Nucleotide sequences and regulational analysis of genes involved in conversion of aniline to catechol in *Pseudomonas putida* UCC22(pTDN1). *Journal of Bacteriology*, 179, 2, 399–408 (1997).

[8]. N. Kodama, S. Murakami, R. Shinke, K. Aoki, Production of catechol by transpositional mutants of aniline-assimilating *Pseudomonas species* AW-2, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82, 5, 480–483 (1996).

[9]. A. Konopka, D. Knight, R.F. Turco, Characterization of a *Pseudomonas* sp.

capable of aniline degradation in the presence of secondary carbon sources, *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 2, 385–389 (1989).

[10]. O. Hayaishi, M. Katagiri, S. Rothberg, Studies on oxygenases, *The Journal of Biological Chemistry*, 229, 905–920 (1957).

[11]. J. Li, Jin Z, B. Yu, Isolation and characterization of aniline degradation slightly halophilic bacterium, *Erwinia* sp. strain HSA 6, *Microbiological Research*, 165, 5, 418–26 (2010).

[12]. Q. Liang, M. Takeo, M. Chen, W. Zhang, Y. Xu, M. Lin, Chromosome-encoded gene cluster for the metabolic pathway that converts aniline to TCA-cycle intermediates in *Delftia tsuruhatensis* AD9, *Microbiology*, 151, 10, 3435–3446 (2005).

[13]. Z. Liu, H. Yang, Z. Huang, P. Zhou, S.J. Liu, Degradation of aniline by newly isolated, extremely aniline-tolerant *Delftia* sp. AN3, *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 5, 679–782 (2002).

[14]. N.L. Meyers, Molecular cloning and partial characterization of the pathway for aniline degradation in *Pseudomonas* sp. strain CIT1, *Current Microbiology*, 24, 303–310 (1992).

[15]. U. Meyer, Biodegradation of synthetic organic colorants, Academic Press Ltd, London, England (1981).

[16]. F. Register, Priority Pollutant List (promulgated by the U.S. Environmental Protection Agency under authority of the Clean Water Act of 1977), Federal Register, 44, 233 (1979).

[17]. N. Saitou, M. Nei, The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees, *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406–425 (1987).

[18]. J.M. Sala-Trepat, W.C. Evans, The *meta*-cleavage of catechol by *Azobacter* species, *European Journal of Biochemistry*, 20, 400–413 (1971).

[19]. D. Wang, G. Zheng, S. Wang, D. Zhang, L. Zhou, Biodegradation of aniline by *Candida tropicalis* AN1 isolated from aerobic granular sludge, *Journal of Environmental Sciences (China)*, 23,12, 2063–2068 (2011).

[20]. L. Wang, S. Barrington, J.W. Kim, Biodegradation of pentyl amine and aniline from petrochemical wastewater, *Journal of Environmental Management*, 83, 2, 191–197 (2007).

[21]. C. Xiao, J. Ning, H. Yan, X. Sun, J. Hu, Biodegradation of Aniline by a newly isolated *Delftia* sp. XYJ6. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 17, 3, 500–505 (2009).

[22]. J. Zeyer, A, Wasserfallen, K.N. Timmis, Microbial mineralization of ring-substituted anilines through an *ortho*-cleavage pathway, *Applied and Environmental Microbiology*, 50, 2, 447–453 (1985).

[23]. T. Zhang, J. Zhang, S. Liu, Z. Liu, A novel and complete gene cluster involved in the degradation of aniline by *Delftia* sp. AN3. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 20, 6, 717–724 (2008).