

ĐÁNH GIÁ SỰ HÌNH THÀNH BIOFILM VÀ KHẢ NĂNG PHÂN HỦY CHLOROANILINES BỞI BIOFILM CỦA VI KHUẨN *ACINETOBACTER BAUMANNII* GFJ1

ASSESSMENT OF THE FORMATION OF BIOFILM AND CHLOROANILINE BIODEGRADATION BY BIOFILM OF *ACINETOBACTER BAUMANNII* GFJ1

Hà Danh Đức

Trường Đại học Đồng Tháp; hadanhduc@gmail.com

Tóm tắt - *Acinetobacter baumannii* GFJ1 là vi khuẩn phân giải chloroaniline được khảo sát về khả năng hình thành màng sinh học (biofilm) và sử dụng biofilm để phân hủy chloroaniline. Vi khuẩn hình thành màng sinh học (biofilm) trên đĩa polystyrene 96 giếng, ở môi trường có bổ sung nguồn nitơ có mức độ cao hơn môi trường không được bổ sung chất dinh dưỡng hoặc được bổ sung nguồn các bon. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ chloroaniline đến sự hình thành biofilm thấy rằng nồng độ càng cao (từ 0,3 mM trở lên), sự hình thành biofilm càng chậm. Sự phân hủy 3-chloroaniline bởi biofilm ($\leq 58,5 \pm 3,7\%$) thấp hơn so với 4-chloroaniline ($\geq 44,5 \pm 5,5\%$) và 3,4-chloroaniline ($\geq 56,6 \pm 8,8\%$) với nồng độ ban đầu là 0,1 mM. Tốc độ phân hủy này phụ thuộc vào chất dinh dưỡng được bổ sung vào môi trường. Môi trường không được bổ sung chất dinh dưỡng hoặc được bổ sung nguồn các bon có tốc độ phân hủy cao hơn môi trường được bổ sung nguồn nitơ. Tốc độ phân hủy chloroaniline còn phụ thuộc vào lượng vi khuẩn ban đầu trong biofilm.

Từ khóa - *Acinetobacter baumannii* GFJ1; biofilm; chloroaniline; các bon; nitơ; phân hủy.

Abstract - In this study, *Acinetobacter baumannii* strain GFJ1 is investigated for its biofilm formation and biodegradation ability toward several chloroanilines. The determination of biofilm formation on 96-well polystyrene microplates shows that *A. baumannii* GFJ1 forms biofilm at higher levels in mineral medium supplemented with nitrogen sources compared with the medium without co-substrate or mineral medium supplemented with carbon sources. The investigation of chloroaniline concentrations on biofilm formation indicates that the biofilm formation is at slower rates in medium with high chloroaniline concentrations (≥ 0.3 mM). The degradation rate of 3-chloroaniline of biofilm ($\leq 58.5 \pm 3.7\%$) is lower than that of 4-chloroaniline ($\geq 44.5 \pm 5.5\%$) and 3,4-chloroaniline ($\geq 56.6 \pm 8.8\%$) at the initial concentration of 0.1 mM. These degradation rates are affected by co-substrates added into medium. Medium without co-substrate or supplemented with carbon sources results in higher degradation rates of chloroanilines of biofilm. In addition, the biodegradation rates of biofilm belong to cell numbers in biofilm at the beginning.

Key words - *Acinetobacter baumannii* GFJ1; biofilm; chloroaniline; carbon; nitrogen; biodegradation.

1. Đặt vấn đề

Chloroaniline là chất độc hại, gây ảnh hưởng đến sức khỏe con người cũng như các sinh vật khác. Chúng gây các bệnh liên quan đến tuần hoàn, thần kinh, nội tiết và nhất là ung thư.

Chloroaniline được phát hiện rộng rãi trong các nguồn nước như nước thải công nghiệp do thải trực tiếp ra môi trường, hay nước trong các khu ruộng sau khi sử dụng các loại thuốc diệt cỏ có thành phần chứa propanil hay diuron vì chúng thường biến đổi thành các sản phẩm trung gian, nhất là 4-chloroaniline và 3,4-dichloroaniline [1,2]. Ngoài ra, chloroaniline còn được phát hiện trong đất [3] hay trong các lớp bùn lầy và trầm tích [4]. Trong nước thải công nghiệp, nồng độ chloroaniline có thể rất cao [5].

Để xử lý các chất độc này trong nước thải bằng biện pháp sinh học với quy mô công nghiệp, cần phải có một lượng vi khuẩn đủ nhiều và môi trường để vi khuẩn hoạt động trong điều kiện tối ưu. Sử dụng biofilm để phân hủy các chất thải là biện pháp đã được ứng dụng rộng rãi trên thế giới. Biofilm dùng trong xử lý sinh học cho hiệu quả cao, với mật độ vi sinh vật dày đặc và có thể hoạt động lâu dài [6]. Sự phân hủy chloroaniline bằng màng sinh học đã được nghiên cứu trên thế giới [5, 7, 8, 9], nhưng chưa được nghiên cứu nhiều ở nước ta.

Trong bài báo này, việc khảo sát ảnh hưởng của chất dinh dưỡng, nồng độ chất hóa học đến sự hình thành màng sinh học và sự phân hủy chloroaniline bằng sinh học được tiến hành. Có nhiều loại chloroaniline, nhưng 3-chloroaniline, 4-chloroaniline và 3,4-dichloroaniline

thường được phát hiện trong môi trường được sử dụng trong thí nghiệm này.

2. Phương tiện và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vi khuẩn phân hủy chloroaniline

Chủng vi khuẩn phân giải chloroaniline – *Acinetobacter baumannii* GFJ1 được phân lập tại phòng thí nghiệm trường Đại học Chulalongkorn (Thái Lan). *A. baumannii* GFJ1 là vi khuẩn có hình que ngắn và có khả năng sử dụng nhiều loại chloroaniline như là nguồn thức ăn của chúng.

2.2. Môi trường nuôi vi khuẩn

Vi khuẩn được nuôi cấy trong dung dịch khoáng chất có các thành phần như sau: 1.419,6mg/l Na_2HPO_4 , 1.360,9mg/l KH_2PO_4 , 98,5mg/l MgSO_4 , 5,88mg/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,16mg/l H_3BO_4 , 2,78mg/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,15mg/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,69mg/l $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,38 mg/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,24 mg/l $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ và 0,10 mg/l MoO_3 [10]. Môi trường được bổ sung bởi các thành phần dinh dưỡng và được đặt tên như sau: 0,01% chất chiết nấm men (yeast extract) (MY001); 0,1% chất chiết nấm men (MY01); 0,01% chất chiết nấm men và 0,1% succinate (MYS); 0,01% chất chiết nấm men và 0,1% citrate (MYC); 0,01% chất chiết nấm men và 0,1% NaNO_3 (MYNa); 0,01% chất chiết nấm men và 0,1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (MYA); 0,01% chất chiết nấm men và 0,1% NH_4Cl (MYAC); và 0,01% chất chiết nấm men, 0,1% succinate và 0,1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (MYSA). pH được điều chỉnh trong khoảng $7,0 \pm 0,1$. Môi trường được khử trùng ở nhiệt độ 121°C trong thời gian 15 phút, được để nguội đến nhiệt độ phòng trước khi nuôi cấy vi khuẩn.

2.3. Đánh giá khả năng hình thành màng sinh học ở các điều kiện dinh dưỡng khác nhau

Tất cả các thí nghiệm đều được thực hiện tại phòng thí nghiệm Sinh hóa, trường Đại học Chulalongkorn (Thái Lan) và được tiến hành ít nhất 3 lần lặp lại.

Phân tích sự hình thành màng sinh học của vi khuẩn *A. baumannii* GFJ1 được thực hiện theo phương pháp O'Toole and Kolte [11]. Vi khuẩn được nuôi cấy bằng đĩa giếng polystyrene có 96 giếng (96-well microplate) để hình thành màng sinh học trên thành giếng. Việc khảo sát ảnh hưởng của điều kiện dinh dưỡng đến sự hình thành màng sinh học được thực hiện trong môi trường khoáng không hoặc có bổ sung các chất là các chất dinh dưỡng là nguồn bổ sung các bon hoặc nitơ.

Mỗi giếng được bổ sung 150 μ l môi trường. Vi khuẩn được nuôi trong môi trường Luria-Bertani (môi trường LB) trong 12 giờ, được chủng vào từng giếng (1% so với thể tích trong giếng). Đĩa được đặt lại bằng nắp vô trùng và được ủ với tốc độ lắc 100 vòng/phút và ở nhiệt độ phòng. Sau 24 giờ, môi trường được loại ra ngoài, đĩa được rửa nhẹ (không để biofilm tách khỏi thành giếng), rồi làm khô bằng cách lật ngược đĩa. Biofilm hình thành trên thành giếng được nhuộm bằng 300 μ l dung dịch thuốc tím (1%) trong 10 phút. Sau đó thuốc tím được loại ra ngoài, rửa lại bằng nước rồi làm khô. Biofilm được hòa tan bằng dung dịch gồm ethanol và acetone (80%: 20%). Biofilm hình thành trên thành giếng được cạo bằng que tăm để hòa lẫn với dung dịch. Dung dịch sau đó được chuyển vào eppendorf, được bổ sung thêm nước chung cất đến 1,0 ml. Biofilm được xác định phương pháp đo độ đục bằng tán xạ ánh sáng quang phổ kế (spectrophotometer) ở bước sóng 600 nm.

2.4. Ảnh hưởng nồng độ hóa học đến sự hình thành biofilm

Thí nghiệm này được tiến hành tương tự như trên, nhưng chlorianiline được bổ sung vào môi trường từ 0 đến 1,0 mM. Đây là nồng độ chloroaniline nằm trong giới hạn được phát hiện trong môi trường.

2.5. Sự phân hủy chloroaniline bởi biofilm

Sự phân hủy chloroaniline của vi khuẩn được thực hiện trên đĩa giếng với nồng độ 0,1 mM. Sau 24 giờ được ủ để có biofilm, môi trường được loại ra ngoài, rửa nhẹ bằng nước chung cất đã khử trùng và môi trường mới có cùng thành phần dinh dưỡng được bổ sung thêm vào. Sau 6 giờ, một lượng môi trường nhất định được lấy ra ngoài để xác định chloroaniline được phân hủy.

Đối với thí nghiệm xác định sự phân hủy chloroaniline bởi biofilm qua các chu kỳ, một phần mẫu được lấy ra sau 3 giờ để xác định chloroaniline được phân hủy. Địa được tiếp tục ủ để được 24 giờ, sau đó môi trường được loại ra ngoài, rửa nhẹ bằng nước chung cất đã khử trùng và tiếp tục một chu kỳ mới. Trong thí nghiệm này, lượng vi khuẩn hình thành trong biofilm được xác định bằng CFU/giếng. Một số giếng trong đĩa được bổ sung 300 μ l nước chung cất đã khử trùng, và biofilm trên thành và ở đáy giếng được cạo bằng 1 miếng tăm tre đã được khử trùng. Số lượng vi khuẩn từ biofilm tách ra trong dung dịch trong giếng được xác định sau khi pha loãng và trải đều trên đĩa thạch chứa môi trường LB và đếm số khuẩn lạc hình thành sau 12 giờ ủ ở nhiệt độ 30°C.

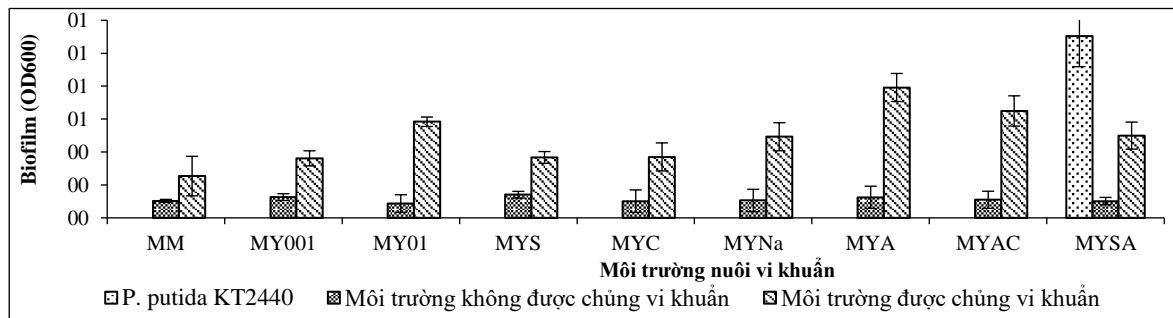
2.6. Phương pháp phân tích

Nồng độ chloroaniline trong dung dịch được xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC - High Performance Liquid Chromatography), với cột 5 μ m, 250 mm \times 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%).

3. Kết quả và bình luận

3.1. Ảnh của chất dinh dưỡng đến sự hình thành biofilm

Phân tích sự hình thành màng sinh học của vi khuẩn *A. baumannii* GFJ1 trên đĩa giếng thấy rằng *A. baumannii* GFJ1 hình thành màng sinh học với các mức độ khác nhau, tùy thuộc vào chất dinh dưỡng được bổ sung vào môi trường nuôi vi khuẩn. Vi khuẩn hình thành biofilm thấp nhất khi không được bổ sung chất dinh dưỡng nào (môi trường MM), và cao nhất khi được bổ sung $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (môi trường MYA, Hình 1). Ngoại trừ môi trường MM, các môi trường còn lại đều được bổ sung 0,01% chất chiết nấm men để kích thích sự sinh trưởng của vi khuẩn. Môi trường được bổ sung nguồn nitơ đường như dẫn đến sự hình thành biofilm cao hơn môi trường bổ sung nguồn các bon. Môi trường được bổ sung cả nguồn nitơ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ và các bon (succinate) làm giảm sự hình thành biofilm so với môi trường chỉ có $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Hình 1). Như vậy, không phải càng nhiều chất dinh dưỡng thì sự hình thành biofilm càng cao. Trong thí nghiệm này, vi khuẩn *P. putida* KT2440 là vi khuẩn có khả năng hình thành biofilm được chọn làm đối chứng dương, và môi trường không có vi khuẩn là đối chứng âm. Các nghiên cứu khác cũng thấy rằng, sự hình thành biofilm chịu ảnh hưởng của nguồn dinh dưỡng [12, 13, 14].



Hình 1. Ảnh hưởng của các chất dinh dưỡng đến mức độ hình thành biofilm trên đĩa polystyrene 96 giếng

3.2. Ảnh của chất dinh dưỡng đến sự phân hủy chloroaniline bởi biofilm

Đĩa sau khi hình thành biofilm sau 24 giờ được sử dụng

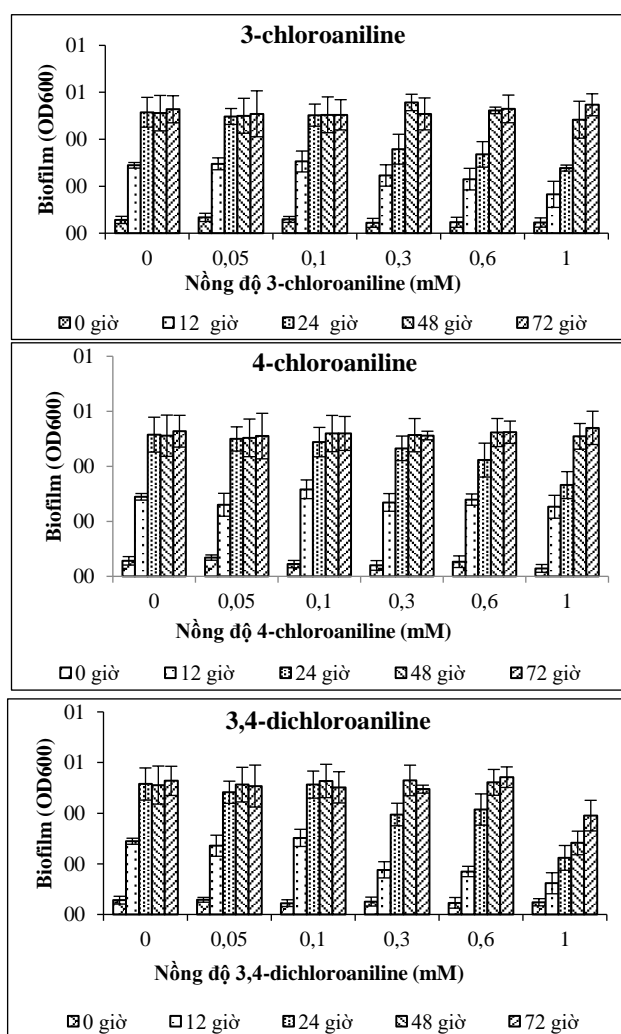
để đánh giá ảnh của chất dinh dưỡng đến sự phân hủy chloroaniline. Kết quả thấy rằng, sau 6 giờ ủ, sự phân hủy 4-chloroaniline và 3,4-dichloroaniline chênh lệch không

đáng kể và cao hơn 3-chloroaniline (Bảng 1). Điều này chứng tỏ vị trí của chlorine trong phân tử quyết định tốc độ phân hủy của vi khuẩn. Trong môi trường MM, MY001, MYS và MYC, tốc độ phân hủy gần như tương đương và cao hơn môi trường MY01, MYA, MYC và MYAC. Đây là kết quả gây ngạc nhiên vì biofilm hình thành khi vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường MY01, MYA, MYC và MYAC cao hơn các môi trường khác, tức là có số lượng vi khuẩn nhiều hơn. Việc bổ sung chất chiết nấm men với nồng độ 0,1% dẫn đến sự hình thành biofilm cao hơn nhưng lại phân hủy thấp hơn ở nồng độ 0,01%. Điều này có thể

giải thích rằng, ở nồng độ chất chiết nấm men cao, vi khuẩn sử dụng chất dinh dưỡng trong chất chiết nấm men cao để sinh trưởng thay vì sử dụng chloroaniline. Cùng một lượng như nhau của $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ và NH_4Cl , sự hình thành biofilm cao hơn, nhưng sự phân hủy chloroaniline lại thấp hơn trong trường có NaNO_3 . Kết quả này có thể giải thích là vi khuẩn *A. baumannii* GFJ1 có khuynh hướng sử dụng nitơ từ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ và NH_4Cl cao hơn từ NaNO_3 và chloroaniline. Qua thí nghiệm này cho thấy rằng chất dinh dưỡng đóng vai trò rất quan trọng trong việc hình thành biofilm cũng như sự phân hủy chất hóa học.

Bảng 1. Sự phân hủy chloroaniline ở các môi trường có các nguồn dinh dưỡng khác nhau bởi biofilm sau 6 giờ ủ

Chloroaniline	Sự phân hủy chloroaniline (%) ở các môi trường khác nhau							
	MM	MY001	MY01	MYS	MYC	MYA	MYAC	MYSA
3-chloroaniline	33,6 ± 3,7	57,6 ± 3,1	28,2 ± 2,2	58,5 ± 3,7	53,6 ± 1,1	15,5 ± 2,9	21,1 ± 1,8	19,4 ± 2,4
4-chloroaniline	84,4 ± 9,4	93,3 ± 3,5	76,6 ± 11,1	94,4 ± 4,4	89,9 ± 7,7	44,5 ± 5,5	64,4 ± 6,6	65,5 ± 7,3
3,4-dichloroaniline	88,6 ± 8,5	96,6 ± 4,6	82,2 ± 5,4	94,4 ± 5,4	92,8 ± 3,3	56,6 ± 8,8	71,8 ± 8,8	84,4 ± 4,6



được bổ sung chloroaniline ở các nồng độ khác nhau. Vi khuẩn nuôi cấy trong môi trường MYNa có sự hình thành biofilm ở mức trung bình, nhưng có sự phân hủy chloroaniline ở mức cao (được mô tả ở thí nghiệm sau). Ở nồng độ chloroaniline khác nhau, sự khác nhau giữa mức độ hình thành biofilm không đáng kể, ngoại trừ 3,4-dichloroaniline ở nồng độ 1,0 mM (Hình 1). Ở nồng độ chloroaniline từ 0 đến 0,1 mM, biofilm được hình thành đạt đến mức cao nhất sau 24 giờ và không thay đổi đáng kể ở các ngày tiếp theo. Ở nồng độ cao hơn, vi khuẩn cần nhiều thời gian hơn để hình thành biofilm đạt đến mức cực đại. Sự hình thành biofilm phụ thuộc vào mức độ sinh trưởng của vi khuẩn. Quan sát thấy rằng, ở nồng độ chất hóa học cao, vi khuẩn sinh trưởng chậm hơn nên sự hình thành biofilm diễn ra chậm hơn. 3,4-dichloroaniline độc hơn các loại monochloroaniline khác. Ở nồng độ 1,0 mM, 3,4-dichloroaniline ức chế sự phát triển của vi khuẩn dẫn đến mức độ hình thành biofilm thấp. Biofilm là một hình thức sống của vi khuẩn, chúng bám vào giá thể và tụ tập lại với nhau, hình thành màng EPS (Extracellular polymeric substances) để chúng có thể tồn tại tốt hơn trước các điều kiện bất lợi của môi trường, chẳng hạn như các chất độc hóa học. Chloroaniline vừa là chất độc, vừa là nguồn dinh dưỡng cho vi khuẩn. Điều đáng lưu ý trong thí nghiệm này là không có chứng cứ rằng chloroaniline kích thích sự hình thành biofilm của vi khuẩn. Chloroaniline ở nồng độ cao ức chế sự hình thành biofilm thông qua ức chế sự sinh trưởng của chúng.

3.4. Sự phân hủy chloroaniline bởi biofilm có lượng vi khuẩn ban đầu khác nhau ở các chu kỳ khác nhau

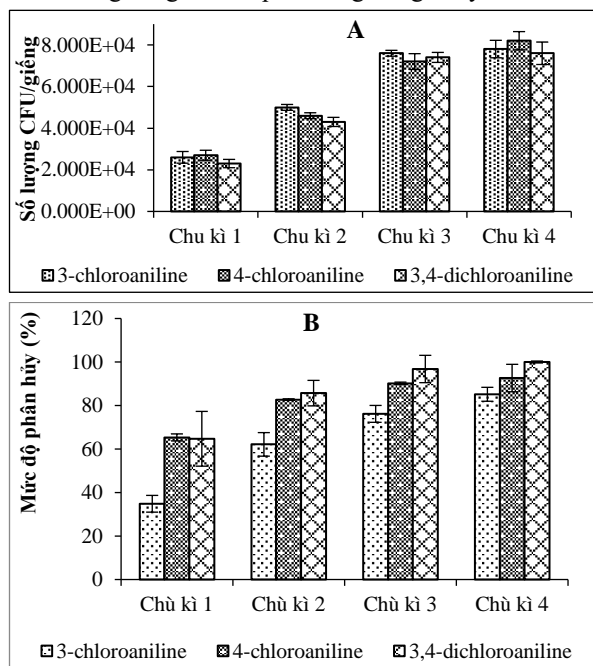
Thí nghiệm này được thực hiện trong môi trường MYNa, trên đĩa polystyrene 96 giếng với nồng độ chloroaniline ban đầu là 0,1 mM. Trong thí nghiệm này, việc xác định số lượng vi khuẩn trong biofilm được đếm trực tiếp số CFU/giếng thay vì nhuộm màu thuốc tím vì đĩa còn được sử dụng ở các chu kỳ sau. Ngoài ra việc đếm số lượng tế bào trong biofilm để xác định sự hoạt động của vi khuẩn chính xác hơn vì có thể có những vi khuẩn trong biofilm đã chết sau các chu kỳ. Kết quả thấy rằng, ở chu kỳ thứ 2, số lượng tế bào trong biofilm gấp đôi chu kỳ thứ nhất, chu kỳ thứ 3 gần như gấp đôi chu kỳ thứ 2. Trong lúc đó ở chu kỳ thứ 3 và 4, lượng vi khuẩn trong biofilm không thay đổi đáng kể (Hình 3A). Có lẽ khi lớp biofilm đã dày, vi khuẩn trong biofilm, nhất là lớp phía trong trở nên khó tiếp cận với nguồn dinh dưỡng và oxy nên chúng không tăng thêm được nữa.

Hình 2. Ảnh hưởng của nồng độ chloroaniline và thời gian đến sự hình thành biofilm trên đĩa giếng

3.3. Ảnh hưởng của nồng độ chloroaniline đến sự phát triển của biofilm

Khả năng hình thành màng sinh học chịu ảnh hưởng của điều kiện môi trường, trong đó có nồng độ các chất hóa học. Trong thí nghiệm này, môi trường MYNa được lựa chọn và

Sự phân hủy chloroaniline cũng tăng lên từ chu kì 1 đến chu kì 3, nhưng giữa chu kì 3 và 4 lại không thay đổi đáng kể. Ở chu kì thứ nhất, sự phân hủy 3-chloroaniline, 4-chloroaniline và 3,4-dichloroaniline không quá 65,3% sau 3 giờ, nhưng ở chu kì 4, sự phân hủy chloroaniline đạt tới hơn 92% (Hình 3B). Sự tăng tốc độ sử dụng cơ chất là do lượng vi khuẩn trong biofilm tăng lên (Hình 3A). Ở thí nghiệm trên cho thấy, thành phần môi trường đóng vai trò quan trọng hơn số lượng vi khuẩn ban đầu trong biofilm trong việc phân hủy chloroaniline. Nhưng trong thí nghiệm này, cùng một môi trường như nhau ở các chu kì, kết quả lại khác. Tuy nhiên cũng rất khó xác định được sự phân hủy này bao nhiêu phần trăm là do vi khuẩn trong biofilm và bao nhiêu phần trăm là của vi khuẩn từ tách ra từ biofilm di chuyển vào môi trường lỏng. Nhưng qua sự so sánh trên, ta thấy lượng vi khuẩn trong biofilm cũng đóng vai trò quan trọng trong xử lý chất độc hại.



Hình 3. Sự hình thành biofilm trên đĩa polystyrene 96 giếng (A) và sự phân hủy chloroaniline bởi biofilm (B)

Trong thí nghiệm trước thì sự hình thành biofilm ở nồng độ 0,1 mM đạt cực đại sau 1 ngày và không thay đổi ở các ngày tiếp sau. Tuy nhiên trong thí nghiệm này, lượng vi khuẩn tăng lên ở chu kì thứ 2 và thứ 3. Sự thay thế môi trường đã cạn kiệt dinh dưỡng bằng môi trường mới giúp vi khuẩn có thêm nguồn dinh dưỡng là nguyên nhân làm kích thích sự sinh trưởng của vi khuẩn, dẫn đến làm tăng sự hình thành biofilm. Trong quá trình hình thành biofilm, mỗi khi bám vào bề mặt, vi khuẩn tiếp tục phân chia, thu nhận thêm tế bào mới và nhận thêm cả tế bào từ môi trường lỏng để hình thành lớp biofilm dày hơn. Vi sinh vật cần thiết các chất dinh dưỡng cho sự sinh trưởng, hình thành thêm lớp màng EPS để mở rộng phạm vi biofilm [15]. Nghiên cứu này có ảnh hưởng quan trọng đến ứng dụng biofilm trong việc phân hủy chất độc hại.

4. Kết luận

Sự hình thành biofilm của vi khuẩn phân hủy chloroaniline-*A. baumannii* GFJ1 chịu sự ảnh hưởng của chất

dinh dưỡng và nồng độ chloroaniline trong môi trường. Vi khuẩn hình thành biofilm cao trong môi trường được bổ sung $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ và NH_4Cl , nhưng các chất này lại ức chế sự phân hủy chloroaniline. Ở nồng độ chất hóa học cao ($\geq 0,3$ mM), sự hình thành biofilm diễn ra chậm hơn so với chloroaniline ở nồng độ thấp. Sự thay thế môi trường đã cạn kiệt nguồn dinh dưỡng bằng môi trường mới cùng thành phần dinh dưỡng dẫn đến sự hình thành thêm biofilm ở một vài chu kì tiếp sau. Trên 92% chloroaniline được phân hủy bởi biofilm của vi khuẩn *A. baumannii* GFJ1 trong môi trường MYNa ở chu kì thứ 4. Kết quả nghiên cứu này đóng góp một phần quan trọng trong ứng dụng biofilm để phân hủy các chất hóa học độc hại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] A. Dahchour, G. Bitton, C.M. Coste, J. Bastide, "Degradation of the herbicide propanil in distilled water", *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 36 (1), 1986, 556-562.
- [2] V.E. Herrera-Gonzalez, N. Ruiz-Ordaz, J. Galindez-Mayer, C. Juarez-Ramirez, F. Santoyo-Tepole, E.M. Montiel, "Biodegradation of the herbicide propanil, and its 3,4-dichloroaniline by-product in a continuously operated biofilm reactor", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29 (3), 2013, 467-474.
- [3] Boehncke, A., Kielhorn, J., Konnecker, G., Pohlentz-Michel, C., and Mangelsdorf, I., "4-Chloroaniline. Concise International Chemical Assessment Document 48", 2003.
- [4] U.S Environmental Protection Agency, Region 5 Surperfund, Sauget Area 2, 2011.
- [5] Livingston, A.G., and Willacy, A., "Degradation of 3,4-dichloroaniline in synthetic and industrially produced wastewaters by mixed cultures freely suspended and immobilized in a packed-bed reactor", *Applied Microbiology and Biotechnology* 35, 1991, 551-557.
- [6] Nasib Qureshi, B.A.A., Thaddeus C Ezeji, Patrick Karcher and Ian S Maddox, "Biofilm reactors for industrial bioconversion processes: employing potential of enhanced reaction rates", 2005, 1-21.
- [7] Bathe, S., Schwarzenbeck, N., and Hausner, M. (2005). Plasmid-mediated bioaugmentation of activated sludge bacteria in a sequencing batch moving bed reactor using pNB2. *Letters in Applied Microbiology* 41, 242-247.
- [8] González, A.J., Bautista, L.X.C., Papalia, M., Radice, M., Gutkind, G., Magdaleno, A., Planes, E.L., Rossini, G.D.B., Gallego, A., and Korol, S.E., "Biodegradation of p-Chloroaniline and Ammonium Removal in Continuous Biofilm Reactors", *Clean – Soil, Air, Water* 42, 2014, 449-455.
- [9] Radianingtyas, H., Robinson, G.K., and Bull, A.T., "Bacterial community structure and physiological state in a biofilm reactor degrading 4-chloroaniline", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62, 2003, 423-429.
- [10] 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), 2003, 1532-1541.
- [11] O'toole, G.A., and Kolter, R., "Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis", *Molecular Microbiology* 28, 1998, 449-461.
- [12] Allan, V.J., Callow, M.E., Macaskie, L.E., and Paterson-Beedle, M., "Effect of nutrient limitation on biofilm formation and phosphatase activity of a *Citrobacter* sp". *Microbiology* 148, 2002, 277-288.
- [13] Chen, X., Suwamo, S.R., Chong, T.H., McDougald, D., Kjelleberg, S., Cohen, Y., Fane, A.G., and Rice, S.A., "Dynamics of biofilm formation under different nutrient levels and the effect on biofouling of a reverse osmosis membrane system", *Biofouling* 29, 2013, 319-330.
- [14] Srinandan, C.S., Jada, V., Cecilia, D., and Nerurkar, A.S., "Nutrients determine the spatial architecture of *Paracoccus* sp. Biofilm", *Biofouling* 26, 2010, 449-459.
- [15] Kumar, C.G., and Anand, S.K., "Significance of microbial biofilms in food industry: a review", *International Journal of Food Microbiology* 42, 1998, 9-27.