

# SỰ PHÂN HỦY CHLOROANILINE BỞI VI KHUẨN *ACINETOBACTER BAUMANNII* GFJ1 TRONG MÔI TRƯỜNG NHIỄM MẶN

## DEGRADATION OF CHLOROANILINE BY *ACINETOBACTER BAUMANNII* GFJ1 IN SALINE MEDIUM

Hà Danh Đức

Trường Đại học Đồng Tháp; hadanhduc@gmail.com

**Tóm tắt** - Chloroaniline là sản phẩm phân hủy từ một số loại thuốc trừ cỏ và nhiều chất hóa học khác. Chloroaniline là những hợp chất hữu cơ độc hại gây ô nhiễm môi trường, nhất là nguồn nước. *Acinetobacter baumannii* GFJ1 là dòng vi khuẩn có thể sử dụng một số loại chloroaniline như nguồn dinh dưỡng duy nhất. Trong môi trường lỏng, GFJ1 có thể sinh trưởng ở nồng độ 3,6 mM 4-chloroaniline và 1,0 mM 3,4-chloroaniline. Nghiên cứu ảnh hưởng của NaCl đối với sự sinh trưởng của vi khuẩn trong môi trường có bổ sung chloroaniline thấy rằng, sự sinh trưởng tỷ lệ nghịch với nồng độ muối. *A. baumannii* GFJ1 có thể sinh trưởng trong môi trường lỏng có chứa 0,1 mM 4-chloroaniline và 4,5% NaCl, hay 0,1 mM 3,4-dichloroaniline và 3,5% NaCl. Tốc độ phân hủy các chất này giảm xuống khi tăng nồng độ NaCl.

**Từ khóa** - *Acinetobacter baumannii* GFJ1; chloroaniline; sinh trưởng; phân hủy; NaCl.

### 1. Đặt vấn đề

Thuốc diệt cỏ là hóa chất độc hại, ảnh hưởng rất lớn đến sức khỏe con người cũng như nhiều sinh vật khác. Ngày nay, thuốc diệt cỏ hóa học được sử dụng phổ biến ở nước ta cũng như nhiều nước khác trên thế giới. Các loại thuốc diệt cỏ phổ biến có thành phần chứa propanil hay diuron và chúng thường biến đổi thành các sản phẩm trung gian, nhất là 4-chloroaniline và 3,4-dichloroaniline [1, 2]. Chẳng hạn 3,4-dichloroaniline được phát hiện trong nước ở ruộng lúa sau khi sử dụng thuốc trừ sâu có thành phần propanil với nồng độ từ 1,0 đến 567,5 µg/l [3].

Ngoài ra, chloroaniline là nguyên liệu chính để sản xuất phẩm nhuộm azo, sử dụng trong công nghiệp chế biến cao su, sản xuất vecni, thuốc chữa bệnh và các sản phẩm khác [4]. Các loại chloroaniline đều có thể gây ảnh hưởng đến sức khỏe con người dù với nồng độ thấp, chúng gây ung thư và các bệnh khác. Vì độc tính cao và khó phân hủy, chloroaniline được liệt kê trong nhóm các hợp chất độc hại ở châu Âu và trong danh sách các chất gây ô nhiễm quan trọng của Cơ quan Bảo vệ Môi trường Hoa Kỳ [5]. Sự tồn dư của các chất này làm ô nhiễm nguồn nước nuôi thủy sản, có thể làm chết cá, tôm và các loài thủy sinh khác. Các nghiên cứu về tồn dư các chất này và sử dụng vi sinh vật để loại bỏ các hợp chất này đã được tiến hành trên thế giới, nhưng chưa được nghiên cứu ở nước ta.

Chloroaniline có thể tồn tại trong nước ngọt, nước lợ và nước mặn. Trong bài này, chúng tôi khảo sát khả năng phân hủy của vi khuẩn *A. baumannii* GFJ1 đối với 4-chloroaniline và 3,4-dichloroaniline, là sản phẩm phân giải chủ yếu từ thuốc trừ cỏ propanil hay diuron trong các môi trường có độ mặn khác nhau.

**Abstract** - Chloroanilines are intermediates of decomposition of some herbicides and other chemicals. Chloroanilines are toxic organic compounds which pollute the environment, especially the water source. *Acinetobacter baumannii* GFJ1 could use several chloroanilines as the sources of carbon, nitrogen and energy. In liquid medium, GFJ1 could grow at the concentrations of 3.6 mM 4-chloroaniline and 1.0 mM 3,4-chloroaniline. A study of effects of NaCl concentrations on the growth of bacteria in the chloroaniline shows that cell growth is inversely proportional to the concentrations of salt. *A. baumannii* GFJ1 could grow in the liquid mineral medium containing 0.1 mM 4-chloroaniline and 4.5% NaCl, or 0.1 mM 3,4-dichloroaniline and 3.5% NaCl. Similarly, the biodegradation rates of these compounds decrease when NaCl concentrations increase.

**Key words** - *Acinetobacter baumannii* GFJ1; chloroaniline; growth; biodegradation; NaCl.

### 2. Phương tiện và phương pháp nghiên cứu

#### 2.1. Vi khuẩn phân hủy chloroaniline

*Acinetobacter baumannii* GFJ1 là vi khuẩn Gram âm, hiếu khí, có khả năng phân hủy nhiều loại chloroaniline và sử dụng chúng như là nguồn dinh dưỡng hữu cơ duy nhất. *A. baumannii* GFJ1 là vi khuẩn được phân lập từ đất có tiền sử sử dụng nhiều thuốc diệt cỏ (đất có thể đã bị nhiễm chloroaniline – là sản phẩm phân hủy từ thuốc diệt cỏ), tại phòng thí nghiệm vi sinh Trường Đại học Chulalongkorn (Băng Cốc, Thái Lan).

#### 2.2. Môi trường nuôi vi khuẩn

Vi khuẩn được nuôi cấy trong dung dịch khoáng chất có các thành phần như sau: 1.419,6 mg/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.360,9 mg/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 98,5 mg/l MgSO<sub>4</sub>, 5,88 mg/l CaCl<sub>2</sub>. 2H<sub>2</sub>O, 1,16 mg/l H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 2,78 mg/l FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1,15 mg/l ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1,69 mg/l MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 0,38 mg/l CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 0,24 mg/l CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O và 0,10 mg/l MoO<sub>3</sub> [6]. pH được điều chỉnh trong khoảng 7,0 ± 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. Kiểm tra khả năng sinh trưởng và phân hủy aniline chloroaniline của vi khuẩn

Sự sinh trưởng của vi khuẩn được thực hiện trong môi trường khoáng được bổ sung chất chiết nấm men, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> và axit succinic (1,0 g/l mỗi loại). 4-chloroaniline và 3,4-dichloroaniline được sử dụng ở các nồng độ khác nhau.

Vi khuẩn được nuôi trong 1,0l môi trường khoáng, được bổ sung thêm chất dinh dưỡng nói trên để kích thích sự sinh trưởng của chúng. Sau 10 giờ, vi khuẩn được ly tâm

5.000 vòng/phút trong thời gian 20 phút. Mẫu vi khuẩn được rửa lại 2 lần bằng nước chưng cất đã khử trùng, sau đó chuyển vào môi trường nuôi cấy mới ở mức độ cô đặc vi khuẩn ( $3,5 \times 10^9$  vi khuẩn/ml) và sử dụng để phân hủy 4-chloroaniline và 3,4-dichloroaniline ở nồng độ 0,1 mM. Tất cả các thí nghiệm được tiến hành với tốc độ lắc 150 vòng/phút và ở nhiệt độ phòng. Mẫu được lấy theo chu kỳ 3 giờ 1 lần (mỗi lần 1,0 ml) và được bảo quản ở 4°C cho đến khi phân tích. Các thí nghiệm được tiến hành ít nhất 3 lần lặp lại, tại Trường Đại học Chulalongkorn (Thái Lan).

#### 2.4. Phương pháp phân tích

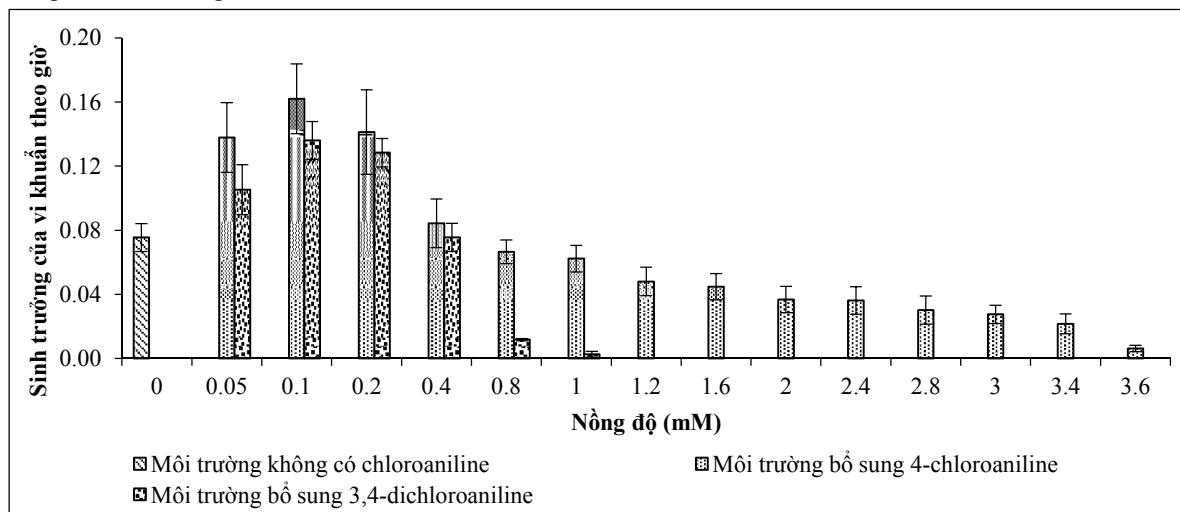
Nồng độ chloroaniline trong dung dịch được xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC - High Performance Liquid Chromatography), với cột (5  $\mu$ m, 250 mm $\times$ 4,6 mm; Hyperclone, Phenomenex, USA) và đầu dò quang phổ tử ngoại 240 nm. Pha động là hỗn hợp acetonitrile (70%) và nước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

Sự sinh trưởng của vi khuẩn trong môi trường lỏng được thực hiện bằng cách đo độ đục tán xạ ánh sáng quang phổ kế (spectrophotometer) ở bước sóng 600 nm. Sự sinh trưởng thập phân của vi khuẩn được tính theo phương pháp của Zeyer [7]. Hàm lượng protein trích chiết từ vi khuẩn được xác định theo phương pháp Lowry [8], dùng albumin huyết thanh bò (BSA) làm chất chuẩn và được đo ở bước sóng 730 nm.

Sự ức chế phân hủy chloroaniline của vi khuẩn được tính toán dựa trên phương pháp Amor [9]. Tốc độ phân hủy chloroaniline (r) phụ thuộc vào nồng độ muối (S). Hệ số ức chế ( $K_i$ ) được tính toán dựa trên phương trình:

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{r_{\max}} + \frac{S}{r_{\max} K_i}$$

Trong đó  $r_{\max}$  là nồng độ muối tối đa.



Hình 1. Sự sinh trưởng của vi khuẩn ở môi trường không có chloroaniline và có các nồng độ 4-chloroaniline và 3,4-dichloroaniline khác nhau

#### 3.2. Ảnh hưởng của nồng độ muối đến phân hủy 4-chloroaniline và 3,4-dichloroaniline

Chloroaniline có thể tồn tại trong vùng nước lợ hay nước mặn, ảnh hưởng đến sinh vật thủy sinh nuôi trong ao như tôm hay ảnh hưởng đến hệ sinh thái của môi trường biển hay ven biển. Ngoài ra, trong nước thải công nghiệp chứa chloroaniline có thể chứa nồng độ muối cao. Sự

### 3. Kết quả và bình luận

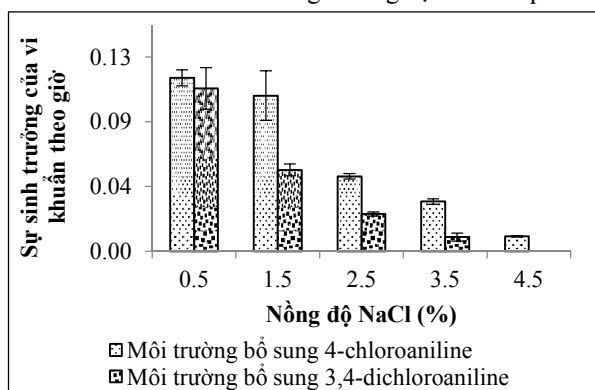
#### 3.1. Ảnh hưởng của nồng độ 4-chloroaniline và 3,4-dichloroaniline đến sự sinh trưởng của vi khuẩn

Thí nghiệm đánh giá khả năng sinh trưởng của vi khuẩn trong môi trường lỏng được thực hiện nhằm xác định khả năng ứng dụng của vi khuẩn trong với nồng độ 4-chloroaniline và 3,4-dichloroaniline khác nhau. Thí nghiệm cho thấy rằng, *A. baumannii* GFJ1 có thể sinh trưởng ở nồng độ cao nhất là 3,6 mM 4-chloroaniline và 1,0 mM 3,4-dichloroaniline (Hình 1). 3,4-DCA có độc tính cao hơn nên vi khuẩn có khả năng sinh trưởng ở nồng độ thấp hơn. Nghiên cứu trước đây cho thấy, *A. baumannii* CA2, *P. putida* CA16 và *Klebsiella* sp. CA17 có thể sinh trưởng trong môi trường có nồng độ 4-chloroaniline cao nhất là 1,2 mM [10]. Điều này cho thấy *A. baumannii* GFJ1 có thể sinh trưởng trong môi trường có nồng độ chloroaniline cao. Trong môi trường nuôi vi khuẩn, sự sinh trưởng của chúng có nồng độ 4-chloroaniline và 3,4-dichloroaniline từ 0,05 đến 0,4 mM, cao hơn trong môi trường không có chloroaniline, bởi vì chloroaniline là nguồn thức ăn giúp vi khuẩn sinh trưởng tốt hơn. Sự sinh trưởng nhanh nhất trong môi trường có nồng độ 0,1 mM chloroaniline, tức là nồng độ thích hợp nhất đối với vi khuẩn. Tuy nhiên, khi nồng độ chloroaniline cao, sự sinh trưởng của vi khuẩn thấp hơn do độc tính của chúng. Ngoài 4-chloroaniline và 3,4-dichloroaniline, sự sinh trưởng của vi khuẩn với sự có mặt của các chloroaniline khác cũng được thực hiện. Chẳng hạn, *A. baumannii* GFJ1 có thể sinh trưởng trong môi trường chứa tối đa 2,8 mM 3-chloroaniline, nhưng chỉ sinh trưởng trong môi trường có tối đa 0,3 mM 2,4,6-trichloroaniline. 2,4,6-trichloroaniline có độc tính cao hơn các loại chloroaniline kể trên, nên chúng ức chế sự sinh trưởng vi khuẩn ở nồng độ thấp hơn.

khảo sát khả năng phân hủy chloroaniline ở các nồng độ muối khác nhau có vai trò quan trọng trong việc đánh giá khả năng ứng dụng của *A. baumannii* GFJ1.

Trong môi trường lỏng có nồng độ 4-chloroaniline và 3,4-dichloroaniline là 0,1 mM, *A. baumannii* GFJ1 có thể sinh trưởng ở nồng độ muối tương ứng là 4,5% và 3,5% NaCl (Hình 2). Ở nồng độ 0,5% NaCl, tốc độ sinh trưởng

của vi khuẩn trong môi trường có 4-chloroaniline và 3,4-dichloroaniline chênh lệch không đáng kể, nhưng khi nồng độ muối càng cao thì sự sinh trưởng trong môi trường có 4-chloroaniline cao hơn. 3,4-dichloroaniline độc hơn nên vi khuẩn có thể sinh trưởng ở nồng độ muối thấp hơn.

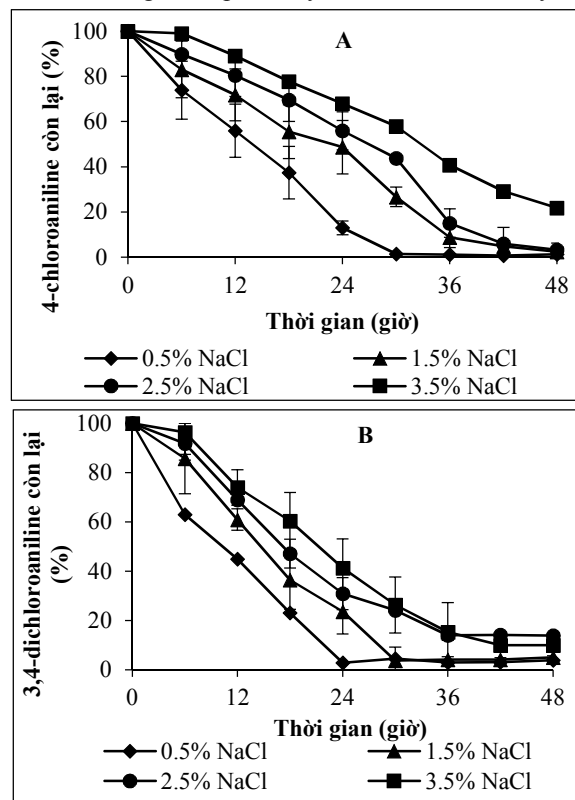


**Hình 2.** Sự sinh trưởng của vi khuẩn trong môi trường có các nồng độ 0,1 mM 4-chloroaniline và 3,4-dichloroaniline và các nồng độ muối khác nhau

Khảo sát quá trình phân hủy 4-chloroaniline và 3,4-dichloroaniline thấy rằng, nồng độ muối càng cao thì sự phân hủy càng chậm lại (Hình 3). Ở nồng độ muối cao, sự chênh lệch áp suất thẩm thấu tăng lên đã ức chế sự hoạt động của vi khuẩn. Ở nồng độ 0,5% NaCl, vi khuẩn gần như phân hủy toàn bộ 4-chloroaniline trong vòng 30 giờ, và 3,4-dichloroaniline trong vòng 24 giờ. Ở các nồng độ 0,5%, 1,5% và 2,5% NaCl, vi khuẩn phân hủy chloroaniline mà không có pha lag. Trong lúc đó, ở nồng độ 3,5% NaCl, chúng cần 6 giờ pha lag và tốc độ phân hủy chậm hơn. Với nồng độ muối cao, vi khuẩn cần có thời gian để thích nghi trước khi sử dụng chloroaniline như là nguồn thức ăn.

Tốc độ phân hủy cụ thể của vi khuẩn đối với 4-chloroaniline và 3,4-dichloroaniline (tính theo  $\mu\text{M/hr}$  và  $\mu\text{M}/(\text{mg protein.giờ})$ ) là tương đương nhau và tỷ lệ nghịch với nồng độ muối (Bảng 1). Hàm lượng protein trong các nghiệm thức gần như bằng nhau, nhưng khi tốc độ phân hủy chậm hơn, dẫn đến tốc độ phân hủy tính theo đơn vị protein thấp hơn. Nghiên cứu trước đây thấy rằng,

*Myroides odoratimimus* LWD09 có thể phân hủy 3,4-dichloroaniline ở nồng độ muối cao nhất là 5%, nhưng không có báo cáo về sự ảnh hưởng của NaCl đến sự phân hủy 4-chloroaniline [10]. Hai dòng vi khuẩn phân hủy 4-chloroaniline là *A. denitrificans* PA2 và *Cellulomonas* sp. PA1 có thể sinh trưởng cao nhất là 5% NaCl, nhưng không có báo cáo về ảnh hưởng của muối đến sự phân hủy chloroaniline [11]. Những số trên đây cho thấy *A. baumannii* GFJ1 có thể chịu đựng được nồng độ muối vừa phải, và có thể ứng dụng để làm sạch nước lợ hay nước mặn. Trong các thí nghiệm trên đây, các đối chứng không có vi khuẩn, không có sự phân hủy chloroaniline nào xảy ra.



**Hình 3.** Sự phân hủy 4-chloroaniline và 3,4-dichloroaniline trong môi trường có các nồng độ 4-chloroaniline và 3,4-dichloroaniline là 0,1 mM và các nồng độ muối khác nhau

**Bảng 1.** Tốc độ phân hủy thể của 4-chloroaniline và 3,4-dichloroaniline trong môi trường có nồng độ muối khác nhau

Nồng độ muối NaCl (%)	3,4-dichloroaniline		4-chloroaniline	
	Khả năng phân hủy cơ chất ( $\mu\text{M}/\text{giờ}$ )	Khả năng phân hủy cơ chất [ $\mu\text{M}/(\text{mg protein.giờ})$ ]	Khả năng phân hủy cơ chất ( $\mu\text{M}/\text{giờ}$ )	Khả năng phân hủy cơ chất [ $\mu\text{M}/(\text{mg protein.giờ})$ ]
0	6,65 ± 0,67	0,037 ± 0,007	7,40 ± 0,40	0,042 ± 0,003
0,5	5,37 ± 0,23	0,026 ± 0,002	4,03 ± 0,32	0,020 ± 0,001
1,5	3,40 ± 0,05	0,017 ± 0,001	2,61 ± 0,51	0,014 ± 0,002
2,5	2,91 ± 0,09	0,015 ± 0,001	2,59 ± 0,04	0,012 ± 0,000
3,5	2,53 ± 0,25	0,013 ± 0,001	2,12 ± 0,22	0,010 ± 0,001

Sự ức chế của muối được tính toán để phân tích ảnh hưởng của môi trường nhiễm mặn đến khả năng phân hủy chloroaniline. Kết quả cho thấy, hệ số ức chế của NaCl là 2,66% và 2,76%. Hệ số này thể hiện ngưỡng nồng độ muối mà chúng ức chế sự phân hủy, là mức 1/2 của nồng độ muối ức chế hoàn toàn sự phân hủy cơ chất.

**4. Kết luận**

*A. baumannii* GFJ1 có thể sinh trưởng trong môi trường có nồng độ chloroaniline khác nhau, phụ thuộc vào độc tính của chúng. Vi khuẩn có thể sinh trưởng ở nồng độ 3,6 mM 4-chloroaniline, 1,0 mM 3,4-dichloroaniline. Sự phân hủy chloroaniline và sự sinh

trường của vi khuẩn phụ thuộc vào nồng độ muối trong môi trường. Vi khuẩn có thể sinh trưởng tối đa 4,5% và 3,5% NaCl trong môi trường tương ứng có chứa 0,1 mM 4-chloroaniline và 0,1 mM 3,4-dichloroaniline. Ở cùng nồng độ muối, tốc độ phân giải 4-chloroaniline và 3,4-dichloroaniline tương tự nhau. Sự khảo sát khả năng phân hủy chloroaniline ở các nồng độ muối khác nhau cho thấy *A. baumannii* GFJ1 có tiềm năng ứng dụng để xử lý các nguồn nước khác nhau.

### 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] Ednei, G.P., Renato, Z., Márcia, H.S., Fábio, F.G., Manoel, L.M., Sérgio, L.O.M., and Enio, M. "Risk assessment of surface water contamination by herbicide residues: monitoring of propanil degradation in irrigated rice field waters using HPLC-UV and confirmation by GC-MS", *Journal of the Brazilian Chemical Society* 18, 2007, 585-589.
- [4] 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), 2001, 1107-1115.
- [5] 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, 1979, 233.
- [6] 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.
- [7] 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).
- [8] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, "Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent", *Journal of Biological Chemistry*, 193 (1), 265-275 (1951).
- [9] Amor, L., Kennes, C., and Veiga, M.C. "Kinetics of inhibition in the biodegradation of monoaromatic hydrocarbons in presence of heavy metals", *Bioresource technology* 78, 2001, 181-185.
- [10] Vangnai, A.S., and Petchkroh, W. "Biodegradation of 4-chloroaniline by bacteria enriched from soil", *FEMS microbiology letters* 268, 2007, 209-216.

(BBT nhận bài: 16/12/2015, phân biện xong: 13/01/2016)