

Khảo sát sự phân hủy chloroaniline bởi vi khuẩn *Acinetobacter baumannii* GFJ1

• Hà Danh Đức

Trường Đại học Đồng Tháp

(Bài nhận ngày 25 tháng 09 năm 2015, nhận đăng ngày tháng năm 2016)

TÓM TẮT

Chloroaniline là những hợp chất hữu cơ độc hại gây ô nhiễm môi trường, nhất là nguồn nước gây hại đến sức khỏe con người cũng như các loài thủy sinh vật. *Acinetobacter baumannii* GFJ1 được phân lập tại Thái Lan là dòng vi khuẩn có thể sử dụng một số monochloroaniline, dichloroaniline và trichloroaniline như là nguồn carbon và nitrogen duy nhất. Trong số các loại chloroaniline, GFJ1 có khả năng phân giải 4-chloroaniline và 3,4-

chloroaniline với tốc độ cao nhất. Nghiên cứu động lực học của phản ứng phân hủy trong điều kiện cô đặc vi khuẩn thấy rằng sự phân hủy 4-chloroaniline và 3,4-chloroaniline của *A. baumannii* GFJ1 tuân theo phương trình Michaelis-Menten. Tốc độ phân hủy tối đa đối với 4-chloroaniline và 3,4-chloroaniline tương ứng là $0,23 \pm 0,03$ và $0,37 \pm 0,08 \mu\text{M}/(\text{mg protein. giờ})$.

Từ khóa: *Acinetobacter baumannii* GFJ1, chloroaniline, động lực học

MỞ ĐẦU

Chloroaniline là chất hữu cơ độc hại thuộc nhóm amine được sử dụng rộng rãi trong công nghiệp. Chloroaniline 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 [1]. Việc sử dụng rộng rãi trong các hợp chất đó trong công nghiệp và nông nghiệp gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến môi trường đất, nước và không khí.

Thuốc diệt cỏ hóa học được sử dụng phổ biến ở nước ta cũng như nhiều nước khác trên thế giới. Thuốc diệt cỏ ảnh hưởng rất lớn đến sức khỏe con người cũng như nhiều sinh vật khác. Các loại thuốc diệt cỏ phổ biến ở nước ta có thành phần chứa propanyl hay diuron. Các loại thuốc này khi sử dụng, chúng ngấm vào trong đất và nước rồi biến đổi thành các sản phẩm trung gian, nhất là 4-chloroaniline và 3,4-dichloroaniline [2, 3].

Chloroaniline là những hóa chất độc hại, gây ung thư và các bệnh khác. Vì độc tính cao và khó phân hủy, chloroaniline được coi là chất gây ô

nhiễm môi trường quan trọng [4]. Nó 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 [5]. Do độc tính và được phát hiện rộng rãi trong môi trường, việc loại bỏ những chất độc hại là cần thiết. Một trong những biện pháp hiệu quả nhất để loại bỏ các chloroaniline từ môi trường là phân hủy sinh học, trong đó quá trình loại bỏ phụ thuộc vào khả năng phân hủy của các vi khuẩn và các điều kiện môi trường.

Trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu về tồn dư của các loại chloroaniline trong đất và trong nước. Chẳng hạn 3-chloroaniline, 4-chloroaniline và 3,4-chloroaniline được phát hiện lần lượt với 83 %, 100 % và 100 % số mẫu ở nước sông Rhine (một con sông lớn ở Châu Âu) với nồng độ tương ứng là 1,8; 0,74 và 1,2 $\mu\text{g/L}$. Nồng độ trong nước thải công nghiệp có thể cao hơn, chẳng hạn nồng độ aniline, 4-chloroaniline, 2,3-dichloroaniline, 2,5-dichloroaniline và 3,4-dichloroaniline trong nước

thải từ nhà máy hóa chất ở Anh tương ứng là 11, 6, 21,4, 98, 6, 3, 1 và 260 mg/L.

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 sử dụng vi sinh vật để loại bỏ các hợp chất này đã được tiến hành trên thế giới, tuy nhiên, ở nước ta cho đến nay chưa có công trình nghiên cứu nào về vấn đề này.

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 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 1,16 mg/L H_3BO_3 ; 2,78 mg/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,15 mg/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,69 mg/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 [6]. pH được điều chỉnh trong khoảng $7,0 \pm 0,1$. Môi trường được khử trùng ở nhiệt độ 120°C trong thời gian 15 phút trước khi nuôi cấy vi khuẩn.

Phương pháp

Vi khuẩn phân hủy chloroaniline

Chủng vi khuẩn phân giải chloroaniline - *Acinetobacter baumannii* GFJ1 được phân lập từ đất có tiền sử sử dụng nhiều thuốc diệt cỏ tại phòng thí nghiệm trường Đại học Chulalongkorn (Thái Lan). *Acinetobacter baumannii* GFJ1 là vi khuẩn Gram âm, hình que ngắn và có khả năng sử dụng nhiều loại chloroaniline như là nguồn thức ăn của chúng.

Kiểm tra khả năng phân hủy chloroaniline của vi khuẩn

Đánh giá khả năng phân hủy chloroaniline của vi khuẩn được tiến hành ở 2 điều kiện:

Vi khuẩn được nuôi trong môi trường khoáng, sử dụng aniline và các loại chloroaniline như là nguồn carbon và nitrogen duy nhất. Lượng vi

khẩn được đưa vào môi trường ban đầu với khoảng $3,5 \times 10^6$ CFU/mL.

Cô đặc vi khuẩn: Vi khuẩn được nuôi trong 1,0 L môi trường khoáng được bổ sung thêm 1,0 g/L chất chiết nấm men, 1.000 mg/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ và 1.000 mg/L succinic acid để kích thích sự sinh trưởng của vi khuẩn.

Quá trình nuôi cấy được thực hiện với tốc độ lắc 150 vòng/phút và ở nhiệt độ phòng. 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 chung cất đã khử trùng, sau đó chuyển vào môi trường nuôi cấy mới ở mức độ cô đặc vi khuẩn ($3,5 \times 10^9$ CFU/mL) và sử dụng để phân hủy 4-chloroaniline và 3,4-dichloroaniline.

Chloroaniline được pha chế dưới dạng stock trong cồn tuyệt đối và được sử dụng ở các nồng độ khác nhau (từ 0,005–1,0 mM). Thí nghiệm phân hủy của vi khuẩn được tiến hành với tốc độ lắc 150 vòng/phút 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.

Phương pháp phân tích

Nồng độ chloroaniline còn lại 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 $\times$ 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 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 [7]. Sự phân hủy cơ chất của vi khuẩn được tính trên đơn vị protein trích chiết từ toàn bộ vi khuẩn nuôi cấy trong môi trường sau một khoảng thời gian. Hàm lượng protein được xác định theo phương pháp Lowry [8], sử dụng albumin huyết thanh bò

(BSA) làm chất chuẩn và được đo ở bước sóng 730 nm.

Tất cả các thí nghiệm được tiến hành ít nhất 3 lần lặp lại, tại trường Đại học Chulalongkorn (Bangkok, Thái Lan).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kiểm tra khả năng phân giải aniline và các loại chloroaniline

Đánh giá khả năng phân hủy aniline và các loại chloroaniline của vi khuẩn *A. baumannii* GFJ1 được thực hiện trong môi trường khoáng. Trong thí nghiệm này, vi khuẩn sử dụng aniline và các loại chloroaniline để sinh trưởng. Monochloroaniline và dichloroaniline được sử dụng ở nồng độ 0,1 mM, còn 2,4,6-trichloroaniline được sử dụng với nồng độ 0,05 mM vì chúng độc hơn và ít hòa tan trong nước hơn. Nồng độ này ở trong phạm vi nồng độ chloroaniline được phát hiện trong môi trường.

Kết quả cho thấy *A. baumannii* GFJ1 có khả năng sử dụng cả monochloroaniline, dichloroaniline và trichloroaniline làm thức ăn (Bảng 1). Các nghiên cứu trước đây cho thấy, các dòng vi khuẩn sử dụng monochloroaniline và dichloroaniline như là nguồn dinh dưỡng duy nhất như *Delftia tsuruhatensis* H1 [9] và *Bacillus megaterium* IMT21 [10]. Chỉ có một báo cáo duy nhất về sự phân hủy có chọn lọc các monochloroaniline, dichloroaniline và trichloroaniline bởi một hỗn hợp vi khuẩn [11].

Bảng 1. Sự sinh trưởng và khả năng phân giải aniline và các loại chloroaniline của *A. baumannii* GFJ1 trong môi trường khoáng, vi khuẩn sử dụng các cơ chất như là nguồn carbon và nitrogen duy nhất

Cơ chất	Nồng độ (mM)	Sự sinh trưởng lũy thừa theo giờ của vi khuẩn	Khả năng phân hủy cơ chất [$\mu\text{M}/(\text{mg protein.giờ})$]
Aniline	0,1	$0,0032 \pm 0,0007$	$0,747 \pm 0,009$
2-Chloroaniline	0,1	$0,0049 \pm 0,0002$	$0,307 \pm 0,016$
3-Chloroaniline	0,1	$0,0054 \pm 0,0004$	$0,885 \pm 0,045$
4-Chloroaniline	0,1	$0,0251 \pm 0,0001$	$2,879 \pm 0,157$
2,3-Dichloroaniline	0,1	$0,0131 \pm 0,0017$	$1,178 \pm 0,221$
3,4-Dichloroaniline	0,1	$0,0225 \pm 0,0073$	$2,751 \pm 0,183$
2,4,6-Trichloroaniline	0,05	$0,0089 \pm 0,0008$	$0,202 \pm 0,036$

baumannii GFJ1 là dòng vi khuẩn đầu tiên được phân lập có khả năng phân giải aniline và cả ba loại chloroaniline trên. Vi khuẩn *A. baumannii* GFJ1 phân giải 4-chloroaniline và 3,4-dichloroaniline cao hơn cả nên được lựa chọn cho thí nghiệm tiếp theo. Đây là kết quả rất thú vị vì 3,4-dichloroaniline là sản phẩm phân hủy trung gian của các loại thuốc trừ cỏ quan trọng có chứa propanyl như Prefit 300 EC, Profit 500 EC, Caranyl 48 SC; hay diuron như Karmex 80 WP, Ansaron.

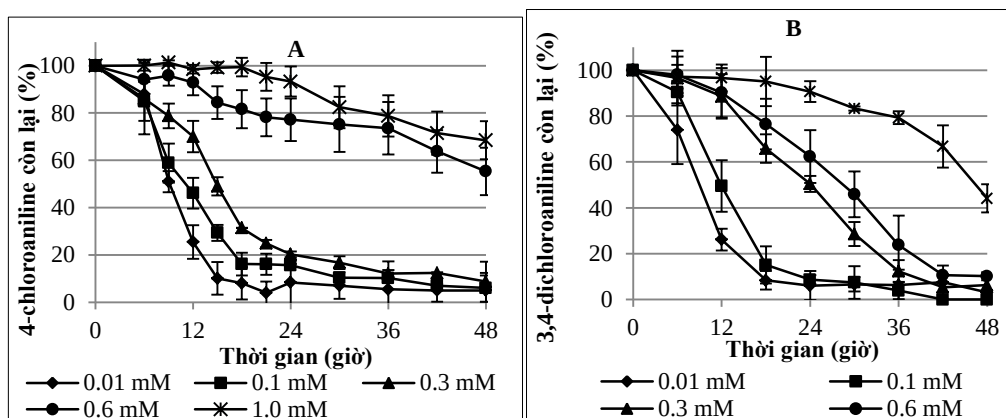
Sự phân hủy aniline, 2-chloroaniline và 3-chloroaniline có tốc độ thấp hơn 2,3-dichloroaniline và 3,4-dichloroaniline là kết quả bất ngờ vì dichloroaniline độc hơn và thường khó phân hủy hơn aniline và monochloroaniline. Điều này chứng tỏ vi khuẩn phân hủy có sự chọn lọc. Sự sinh trưởng của vi khuẩn với sự phân hủy cơ chất nhìn chung tỷ lệ thuận với nhau, ngoại trừ 2-chloroaniline. Có nhiều cách để thể hiện tốc độ phân hủy của vi khuẩn như phần trăm cơ chất bị phân hủy hay mM cơ chất/giờ. Trong thí nghiệm này chúng tôi tính toán tốc độ dựa trên hàm lượng protein trích chiết từ vi khuẩn. Phương pháp này thể hiện được sự phân hủy cơ chất trên một lượng sinh khối (thể hiện bằng lượng protein) nhất định của vi khuẩn vì tốc độ sinh trưởng của vi khuẩn khác nhau trong môi trường có cơ chất khác nhau nên lượng vi khuẩn sau một thời gian nuôi cấy cũng khác nhau.

Sự phân hủy 2,4,6-trichloroaniline cũng đã được tiến hành ở nồng độ 0,1 mM. Tuy nhiên, ở nồng độ này dường như 2,4,6-trichloroaniline không hoàn toàn hòa tan trong điều kiện thí nghiệm nên kết quả không phản ánh đúng mức phân hủy và không được trình bày ở đây. Trên thực tế cũng chưa có nghiên cứu nào trên thế giới về sự phân hủy 2,4,6-trichloroaniline bằng biện pháp sinh học có nồng độ cao hơn 0,05 mM.

Kiểm tra khả năng phân giải 4-chloroaniline và 3,4-dichloroaniline của *A. baumannii* GFJ1 được cô đặc

Sự phân hủy 4-chloroaniline và 3,4-dichloroaniline được thực hiện trong điều kiện cô đặc vi khuẩn để đánh giá khả năng ứng dụng *A. baumannii* GFJ1 ở quy mô công nghiệp. Trong

điều kiện này, các chất dinh dưỡng khác gồm chất chiết nấm men, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ và succinic acid được bổ sung. Tốc độ phân hủy 4-chloroaniline và 3,4-dichloroaniline phụ thuộc vào nồng độ chloroaniline trong môi trường (Hình 1). Ở nồng độ thấp, từ 0,01 - 0,3 mM, tốc độ phân hủy diễn ra nhanh hơn. Ở nồng độ 0,1 mM, vi khuẩn phân hủy hơn 80 % cả 4-chloroaniline và 3,4-dichloroaniline sau 18 giờ. Trái lại, ở nồng độ 1,0 mM, vi khuẩn phân hủy với tốc độ chậm hơn và chúng mất 18 giờ. Ở nồng độ này, vi khuẩn mất 48 giờ để phân hủy $31,5 \pm 8,0$ % 4-chloroaniline và $55,9 \pm 6,2$ % 3,4-dichloroaniline. Ở nồng độ cao hơn, môi trường trở nên độc đối với vi khuẩn nên sự phân hủy diễn ra chậm hơn.



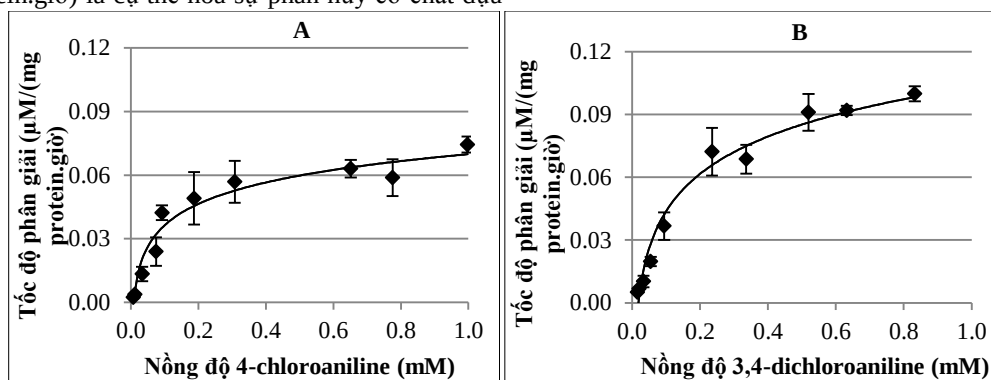
Hình 1. Sự phân hủy 4-chloroaniline (A) và 3,4-dichloroaniline (B) ở các nồng độ khác nhau

Nghiên cứu động lực học của sự phân hủy cơ chất ở các nồng độ khác nhau thấy rằng quan hệ giữa nồng độ và tốc độ phân hủy đối với 4-chloroaniline và 3,4-dichloroaniline tuân theo phương trình Michaelis-Menten trong trường hợp vi khuẩn bị giới hạn sinh trưởng (Hình 2). Trong thực tế thì ở điều kiện cô đặc, sự sinh trưởng của vi khuẩn là không đáng kể [12]. Trong khoảng nồng độ từ 0,005-1,0 mM, nồng độ càng cao thì tốc độ phân hủy theo đơn vị protein càng cao và ngược lại. Tương tự như vậy, sự phân hủy 4-chloroaniline bởi *A. baumannii* GFJ2 cũng tuân theo phương trình Michaelis-Menten [13]. Việc tính toán tốc độ phân

trăm cơ chất bị phân hủy thể hiện được ảnh hưởng của nồng độ chất hóa học đối với khả năng phân hủy của vi khuẩn, với nồng độ cơ chất khác nhau, nhưng lượng sinh khối của vi khuẩn ban đầu như nhau. Sự tính toán dựa trên lượng protein thể hiện được tốc độ phân hủy cụ thể của đối với cơ chất, vì cùng tỷ lệ phần trăm cơ chất bị phân hủy, sự phân hủy tính theo μM sẽ cao hơn khi nồng độ cơ chất cao hơn. Ở nồng độ càng cao thì tốc độ phân hủy của vi khuẩn tính bằng đơn vị $\mu\text{M}/(\text{mg protein.giờ})$ cao hơn mặc dù tỷ lệ phần trăm phân hủy thấp hơn vì có nồng độ chloroaniline cao và nồng độ protein không thay đổi đáng kể trong điều kiện cô đặc vi

khuẩn. Tốc độ phân hủy tính theo $\mu\text{M}/(\text{mg protein.giờ})$ là cụ thể hóa sự phân hủy cơ chất dựa

trên một lượng vi khuẩn nhất định.



Hình 2. Mối quan hệ giữa tốc độ phân giải và nồng độ 4-chloroaniline (A) và 3,4-dichloroaniline (B)

Bảng 2. Đánh giá khả năng phân giải 4-chloroaniline và 3,4-dichloroaniline của *A. baumannii* GFJ1

Cơ chất	Tốc độ phân hủy tối đa, $K_{\max}$ ($\mu\text{M}/(\text{mg protein.giờ})$)	Hệ số bão hòa, K_s (mM)
4-Chloroaniline	$0,23 \pm 0,03$	$0,68 \pm 0,18$
3,4-Dichloroaniline	$0,37 \pm 0,08$	$1,15 \pm 0,28$

Dựa trên những số liệu về mối tương quan giữa nồng độ cơ chất và tốc độ phân hủy, tốc độ phân hủy tối đa ($K_{\max}$) và hệ số bão hòa (K_s) đã được tính toán (Bảng 2) dựa trên phương pháp của Dixon [14]. Tốc độ tối đa thể hiện tiềm năng phân hủy chloroaniline của vi khuẩn. Hệ số bão hòa thể hiện ái lực đối với cơ chất. Các chỉ số này nói lên hiệu quả thực của vi khuẩn trong việc phân giải cơ chất. Chúng thể hiện động năng phân hủy và có ý nghĩa quan trọng trong đánh giá khả năng áp dụng chúng trong phòng thí nghiệm cũng như ở quy mô công nghiệp.

Các nghiên cứu về sự phân hủy chloroaniline của các dòng vi khuẩn và nấm trước đây thường được thực hiện ở một nồng độ cơ chất nhất định và không khảo sát động năng của chúng. Duy chỉ có nghiên cứu trên ở *A. baumannii* GFJ2 khi phân hủy 4-chloroaniline và 3,4-dichloroaniline là có khảo sát sự phân hủy ở nhiều nồng độ khác nhau. Kết quả thấy rằng tốc độ phân hủy tối đa 4-chloroaniline và 3,4-dichloroaniline tương ứng là 0,17 và 0,36 $\mu\text{M}/(\text{mg protein.giờ})$ [13]. So với *A. baylyi* GFJ2 thì tốc độ phân hủy 4-chloroaniline của *A. baumannii* GFJ1 cao hơn và 3,4-dichloroaniline thì tương đương. Tốc độ phân hủy

tính trên đơn vị protein của 3,4-dichloroaniline ở nồng độ 0,2 - 1,0 mM cao hơn so với 4-chloroaniline. Tốc độ phân hủy tối đa cũng như hệ số bão hòa đối với 3,4-dichloroaniline cũng cao hơn. Điều này chứng tỏ vi khuẩn *A. baumannii* GFJ1 có cơ chế đặc biệt đối với 3,4-dichloroaniline.

KẾT LUẬN

A. baumannii GFJ1 có khả năng sử dụng aniline và một số monochloroaniline, dichloroaniline và trichloroaniline như là nguồn carbon và nitrogen duy nhất để sinh trưởng. Trong số các loại chloroaniline, GFJ1 có khả năng phân giải 4-chloroaniline và 3,4-chloroaniline với tốc độ cao nhất. Ở nồng độ chloroaniline càng cao, tỷ lệ phần trăm phân hủy càng thấp do độc tính của chất hóa học. Phân tích động lực học của phân hủy bởi vi khuẩn đã được cô đặc thấy rằng sự phân hủy 4-chloroaniline và 3,4-chloroaniline của *A. baumannii* GFJ1 tuân theo phương trình Michaelis-Menten. Với kết quả này, *A. baumannii* GFJ1 nên được tiếp tục nghiên cứu để ứng dụng phân hủy chloroaniline xử lý những nơi bị ô nhiễm, nhất là ô nhiễm nguồn nước.

Investigation of the biodegradation of chloroaniline by *Acinetobacter baumannii* strain GFJ1

• **Ha Danh Duc**

Dong Thap University

ABSTRACT

Chloroanilines are toxic aromatic compounds which cause environmental pollution, especially water problems, which harmfully affect human and aquatic species. Acinetobacter baumannii strain GFJ1 isolated from soil in Thailand was the first bacterial strain that could utilize several monochloroaniline, dichloroaniline and trichloroanilines as sources of carbon and nitrogen for growth. Among these compounds,

GFJ1 degraded 4-chloroaniline and 3,4-chloroaniline with higher rates than others. The analysis of aerobic utilization profile via resting cells showed that the degradation kinetics followed the Michaelis-Menten model with the maximum specific degradation towards 4-chloroaniline and 3,4-dichloroaniline of 0.23 ± 0.03 and 0.37 ± 0.08 $\mu\text{M}/(\text{mg cell protein} \cdot \text{hour})$, respectively.

Keywords: *Acinetobacter baumannii GFJ1, chloroaniline, degradation kinetics*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. 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).
- [2]. 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, 556–562 (1986).
- [3]. V.E. Herrera-Gonzalez, N. Ruiz-Ordaz, J. Galindez-Mayer, C. Juarez-Ramirez, F. Santoyo-Tepole, E.M. Montiel, Biodegradation of the herbicide propanyl, and its 3,4-dichloroaniline by-product in a continuously operated biofilm reactor, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29, 3, 467–474 (2013).
- [4]. U. Meyer, Biodegradation of synthetic organic colorants, Academic Press Ltd, London, England (1981).
- [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, 233 (1979).
- [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, 1532–1541 (2003).
- [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]. L.L. Zhang, D. He, J.M. Chen, Y. Liu, Biodegradation of 2-chloroaniline, 3-

- chloroaniline, and 4-chloroaniline by a novel strain *Delftia tsuruhatensis* H1, *Journal of Hazardous Materials*, 179, 875–882 (2010).
- [10]. X.F. Yao, F. Khan, R. Pandey, J. Pandey, R.G. Mourant, R.K. Jain, J.H. Guo, R.J. Russell, J.G. Oakeshott, G. Pandey, Degradation of dichloroaniline isomers by a newly isolated strain, *Bacillus megaterium* IMT21, *Microbiology*, 157, 3, 721–726 (2011).
- [11]. G. Lu, W. Song, B. Xu, C. Wang, Biodegradation of Alogenated Anilines in River Water, in *Advances in Water Resources and Hydraulic Engineering*, Springer Berlin Heidelberg, 716–721 (2009).
- [12]. A. Cortés, M. Cascante, M.L. Cárdenas, A. Cornish-Bowden, Relationships between inhibition constants, inhibitor concentrations for 50 % inhibition and types of inhibition: new ways of analysing data, *Biochemical Journal*, 357, 1, 263–268 (2001).
- [13]. P. Hongsawat, A.S. Vangnai, Biodegradation pathways of chloroanilines by *Acinetobacter baylyi* strain GFJ2, *Journal of Hazardous Materials*, 186, 2–3, 1300–1307 (2011).
- [14]. P. Hongsawat, A.S. Vangnai, Biodegradation pathways of chloroanilines by *Acinetobacter baylyi* strain GFJ2, *Journal of Hazardous Materials*, 186, 2–3, 1300–1307 (2011).
- [15]. M. Dixon, The determination of enzyme inhibitor constants, *Biochemical Journal*, 55, 1, 170–171 (1953).