

PHÂN LOẠI, KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP LACCASE VÀ PHÂN HỦY PAH CỦA CHỦNG XẠ KHUẨN *STREPTOMYCES* sp. XKBH13 PHÂN LẬP TỪ ĐẤT NHIÊM CHẤT DIỆT CỎ/DIOXIN THUỘC SÂN BAY QUÂN SỰ CŨ BIÊN HÒA

Đàm Thúy Hằng, Đào Thị Ngọc Ánh, Nguyễn Kim Giang, Đặng Thị Cẩm Hà

Viện Công nghệ sinh học

TÓM TẮT

Laccase có nguồn gốc từ các loài thuộc prokaryote ngày càng được quan tâm nghiên cứu vì chúng có thể có nhiều đặc tính quý phù hợp với khả năng ứng dụng như tính bền nhiệt, bền với các hóa chất và pH rất acid hoặc rất kiềm. Laccase có khả năng oxy hóa phổ cơ chất rất rộng bao gồm các hợp chất phenolic và không phải phenolic có liên quan đến lignin cũng như các chất ô nhiễm bền vững với môi trường khác. Chủng xạ khuẩn XKBH13 được phân lập từ đất nhiễm chất diệt cỏ/dioxin tại căn cứ quân sự cũ tại sân bay Biên Hòa. Trong môi trường nuôi cấy có bổ sung dịch chiết malt, chất dẫn truyền điện tử trung gian và sử dụng dịch chiết đất ô nhiễm chứa dioxin và các chất chứa clo khác làm nguồn cacbon, chủng XKBH13 có khả năng sinh laccase cao nhất sau 24 giờ nuôi cấy với hoạt tính 3.747 U/l. Chất cation ứng tốt nhất đối với chủng XKBH13 là catechol ở nồng độ ban đầu là 1 mM. Chủng xạ khuẩn này có thể phát triển trong khoảng pH rộng từ 4-9 và pH thích hợp cho sinh tổng hợp laccase là pH 6.5. Sau 7 ngày nuôi cấy chủng XKBH13 loại bỏ được 67,07% pyrene với nồng độ ban đầu lớn hơn 76 mg/lit. Dựa trên đặc điểm hình thái khuẩn lạc, bào tử và so sánh một phần trình tự gen mã hóa 16S rRNA, chủng XKBH13 được xếp vào chi *Streptomyces* và được đặt tên *Streptomyces* sp. XKBH13. Trình tự đoạn gen mã hóa cho 16S rRNA của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. XKBH13 được đăng ký trên GenBank với mã số là HM210874

Từ khóa: laccase, *Streptomyces* sp. XKBH13, PAH, 16S rRNA

MỞ ĐẦU

Laccase (Benzenediol:oxygen oxidoreductase, E.C.1.10.3.2) là protein (hoặc glycoprotein) có chứa nhiều nguyên tử đồng, thuộc họ các enzyme polyphenol oxidase. Hiện nay, laccase chủ yếu được nghiên cứu trên đối tượng nấm, đặc biệt là từ nấm mục trắng phân hủy gỗ. Một số loại nấm có khả năng sinh laccase được biết đến nhiều nhất là *Agaricus bisporus*, *Botrytis cinerea*, *Chaetomium thermophilum*, *Coprinus cinereus*, *Neurospora crassa*, *Phlebia radiata*, *Pleurotus ostreatus*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Trametes versicolor*.

Nhưng hiện nay, có một số bằng chứng cho thấy sự tồn tại của các protein với những tính chất điển hình của laccase trong các loài prokaryote. Các gen mã hóa họ các enzyme này đã được phát hiện trong một số chủng vi khuẩn, bao gồm các loài sống trong những môi trường khắc nghiệt như *Oceanobacillus theyensis* hoặc *Quixifex aeolicus* và trong vi khuẩn cổ như *Pyrobaaculum aerophilum*. Một số công trình khoa học gần đây đã giả thiết về sự tồn tại của laccase trong xạ khuẩn như *Streptomyces griseus* và *S. lavendulae*, nghiên cứu này dựa trên các phản ứng

xúc tác không đặc hiệu cơ chất.

Laccase có nguồn gốc từ các loài thuộc prokaryote ngày càng được quan tâm nghiên cứu vì chúng có thể có nhiều đặc tính quý phù hợp với khả năng ứng dụng như tính bền nhiệt, bền với các hóa chất và pH rất acid hoặc rất kiềm. Laccase có khả năng oxy hóa phổ cơ chất rất rộng bao gồm các hợp chất phenolic và không phải phenolic có liên quan đến lignin cũng như các chất ô nhiễm bền vững với môi trường khác. Ưu điểm này khiến cho laccase được ứng dụng nhiều trong các quá trình sinh học khử độc ô nhiễm môi trường như xử lý nước thải công nghiệp từ nhà máy giấy, nhà máy dệt nhuộm, nhà máy khai thác và chế biến dầu mỏ, đất và nước ô nhiễm thuốc trừ sâu, chất diệt cỏ, thuốc nổ và dioxin. Ngoài ra, laccase còn có khả năng tham gia oxy hóa các hợp chất có thể oxy hóa lớn của các hợp chất không phải phenolic bằng cách sử dụng các phân tử hữu cơ hoặc vô cơ có kích thước nhỏ đóng vai trò như những chất dẫn truyền điện tử trung gian. Do đó, các hệ thống xúc tác nhờ phức hợp laccase – chất truyền điện tử trung gian sẽ trở thành hệ thống xúc tác có hiệu quả cao trong xử lý nhiều hợp chất ô nhiễm môi trường như hydrocarbon thơm đa nhân (polycyclic aromatic hydrocarbon PAH),

polychlorinated biphenyl (PCB) từ ngành công nghiệp dầu mỏ, thuốc nổ 2,4,6-trinitrotoluen (TNT) trong ngành khai khoáng, quân sự, thuốc trừ sâu (Dichloro Diphenyl Trichloroethane - DDT), Hexacyclohexan - HCH v.v.), thuốc diệt cỏ hóa học (2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid - 2,4,5-T; 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid - 2,4-D v.v.) dùng trong nông nghiệp.

Mục đích của nghiên cứu này là đánh giá về khả năng sinh enzyme laccase của chủng xạ khuẩn XKBH13 phân lập từ điểm nóng ô nhiễm chất diệt cỏ/dioxin tại sân bay Biên Hòa cùng như khả năng phân hủy hợp chất vòng thơm đa nhân của chúng.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chủng vi sinh vật

Chủng xạ khuẩn XKBH13 phân lập từ đất nhiễm chất diệt cỏ/dioxin tại điểm nóng ô nhiễm thuốc sân bay Biên Hòa. Chủng xạ khuẩn được giữ trong ống thạch nghiêng trên môi trường Gause nghèo có bổ sung dịch chiết đất (dịch chiết đất chứa chủ yếu 2,3,7,8-TCDD là đồng phân dioxin độc nhất và các chất diệt cỏ 2,4,5-T, 2,4-D, TCP, DCP và PAH).

Phương pháp nghiên cứu

Môi trường nuôi cấy

Môi trường nuôi cấy chủng xạ khuẩn XKBH13 là Gause M, có thành phần như sau: KNO₃ 2 g/l, MgSO₄ 0,45 g/l, KH₂PO₄ 0,15 g/l, Na₂HPO₄ 0,35 g/l, NaCl 1 g/l, K₂HPO₄ 0,25 g/l, FeSO₄ 0,01 g/l, cao men 2 g/l, cao malt 0,5 g/l và tinh bột tan 5 g/l.

Nghiên cứu chọn môi trường và điều kiện nuôi cấy thích hợp cho khả năng sinh laccase của chủng XKBH13

Khả năng sinh enzyme laccase của chủng XKBH13 được kiểm tra trên môi trường nuôi cấy lỏng Gause M (pH 6) có bổ sung nguồn chất ô nhiễm là dịch chiết đất nhiễm chất diệt cỏ/dioxin và các chất cảm ứng CuSO₄, veratryl alcohol, MnSO₄. Chủng được nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C, tốc độ lắc 200 rpm. Chủng nghiên cứu được khảo sát ảnh hưởng của pH đến khả năng sinh laccase trong khoảng pH từ 4,5 đến 9. Khả năng sinh trưởng và sinh laccase của chủng xạ khuẩn XKBH13 được khảo sát theo ngày từ 1 đến 7 ngày.

Để xác định ảnh hưởng của các chất cảm ứng đến khả năng sinh laccase của chủng XKBH13, các chất cảm ứng guaiacol, veratryl alcohol, ferulic acid,

vanilin, catechol, và 4-hydroxybenzoic được bổ sung với lượng 1 mM, dịch chiết đất chứa dioxin 1ml, phenanthrene và pyrene, mỗi loại 100 ppm, 50 µM MnSO₄, 100 µM CuSO₄. Mẫu đối chứng được nuôi cấy cùng điều kiện tương tự nhưng không bổ sung chất cảm ứng. Hoạt tính của laccase tạo bởi chủng nghiên cứu được xác định dựa vào khả năng oxy hóa 0,5 mM ABTS trong đệm sodium acetate (pH 3) thành hợp chất có màu hấp thụ mạnh nhất tại bước sóng 420 nm ($\epsilon = 36 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Đánh giá khả năng phân hủy PAH

Khả năng phân hủy pyrene (nồng độ ban đầu 100 ppm) được đánh giá theo hàm lượng pyrene giảm trong mẫu nuôi cấy chủng XKBH13 với mẫu đối chứng không bổ sung vi sinh vật. Hàm lượng pyrene còn lại của hai mẫu sau 7 ngày nuôi cấy phân tích trên máy sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) theo phương pháp EPA610.

Phân loại chủng xạ khuẩn XKBH13

Chủng xạ khuẩn XKBH13 được phân loại và định tên dựa vào trình tự gene mã hóa 16S rRNA được nhân lên khi dùng cặp mồi 341F - 907R (Wintzingerode et al., 1997; Mincer et al., 2005). Trình tự đoạn gen mã hóa 16S rRNA được xử lý bằng phần mềm Bioedit và so sánh với các chủng tương đồng trên GenBank. Cây phân loại được xây dựng bằng phần mềm ClustalW.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Khả năng sinh enzyme của chủng xạ khuẩn XKBH13

Chủng xạ khuẩn XKBH13 được phân lập từ đất nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin (DCD) tại điểm nóng ô nhiễm chất diệt cỏ/dioxin tại sân bay Biên Hòa. Chủng xạ khuẩn XKBH13 có khả năng sinh laccase là 2050 U/l trong môi trường Gause M bổ sung chất cảm ứng là VA và Mn²⁺. Hoạt tính laccase thu được của XKBH13 thấp hơn chủng xạ khuẩn XKBH29 (4746 U/l) trong cùng điều kiện nuôi cấy. Tuy nhiên, trên môi trường chứa DCD với vai trò là chất cảm ứng của laccase thì chủng XKBH13 có hoạt tính cao hơn (kết quả không được trình bày ở đây). Vì các chủng xạ khuẩn phân lập từ nguồn ô nhiễm chất diệt cỏ/dioxin nên việc điều chỉnh XKBH13 có khả năng sinh enzyme trên nguồn cơ chất dịch chiết có ý nghĩa lớn, đặc biệt là đối với việc ứng dụng xạ khuẩn để phân hủy sinh học các hợp chất ô nhiễm.

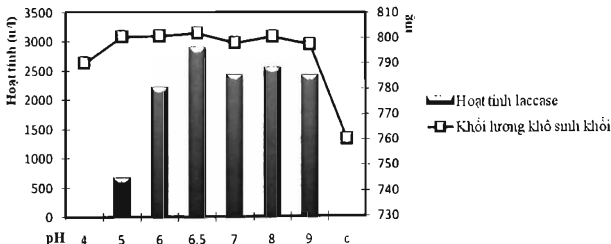
Trong môi trường nuôi cấy Gause M có bổ sung chất chiết malt và một số chất bổ sung làm chất dẫn truyền điện từ trung gian, sử dụng dịch chiết đất làm nguồn carbon, chủng xạ khuẩn XKBH13 có khả năng sinh laccase với hoạt tính 3747 U/l sau 24 giờ nuôi cấy. Tuy nhiên, hoạt tính laccase của chủng nhanh chóng giảm từ ngày thứ hai. So với các chủng có khả năng sinh laccase được phân lập từ các nguồn chất ô nhiễm vòng thơm cho thấy, chủng XKBH13 có hoạt tính tương đối cao. Chủng nấm sợi *Trichoderma* FDNR40 phân lập tại đất nhiễm chất diệt cỏ/dioxin tại Đà Nẵng sinh laccase cao nhất là 0,73 U/l trên môi trường SH1, tuy nhiên, chủng có khả năng sinh hai enzyme ngoại bào khác là lignin peroxidase và mangan peroxidase (Đặng Thị Cẩm Hà *et al.*, 2010).

So với một số chủng vi sinh vật có khả năng sinh enzyme laccase khác thì thời gian để thu enzyme có hoạt tính lớn nhất là tương đối ngắn. Ví dụ như chủng xạ khuẩn *Streptomyces cyaneus* CECT 3335 sau 8 ngày nuôi cấy ở nhiệt độ 28°C hoạt tính laccase cao nhất đo được 1200 U/l (Enriqueta *et al.*, 2003). So với các chủng nấm đảm thì thời gian để chủng sinh enzyme có hoạt tính lớn nhất ngắn hơn hẳn. Đa số các chủng nấm đảm sinh laccase đạt hoạt tính cực đại đều có thời gian nuôi cấy kéo dài đến 14 – 21 ngày (Hairaishi *et al.*, 2003). Nếu so sánh thời gian

nuôi cấy và khả năng sinh enzyme của chủng XKBH13 với các chủng nêu trên thì chủng XKBH13 có khả năng sinh laccase tốt hơn và thời gian nuôi cấy ngắn hơn nhiều. Do đó, chủng này có nhiều lợi thế khi áp dụng vào quy mô công nghiệp (với mục đích sản xuất enzyme khi tối ưu được môi trường nuôi cấy hoặc tạo chủng tái tổ hợp) vì thời gian sinh trưởng và tổng hợp enzyme ngắn sẽ rút ngắn được chu kỳ và giảm thiểu chi phí sản xuất.

Ảnh hưởng của pH tới sự phát triển và khả năng sinh laccase của chủng XKBH13

pH là một trong những yếu tố môi trường ảnh hưởng lớn tới khả năng phát triển của vi sinh vật và phạm vi phân bố của chúng trong tự nhiên. Kết quả ở hình 1 cho thấy chủng XKBH13 sinh laccase cao nhất ở môi trường nuôi cấy có pH 6,5 và không phát hiện thấy laccase ở pH 4. Tuy nhiên, có thể thấy rằng sự chênh lệch hoạt tính laccase giữa các giá trị pH từ 6 đến 9 không nhiều. Lượng sinh khối của chủng XKBH13 ở các giá trị pH khác nhau là tương đối giống nhau, thậm chí ở mức pH thấp nhất trong dải pH khảo sát là 4 và cao nhất là 9 lượng sinh khối tạo thành vẫn ở mức cao. Đây là một đặc tính tốt của chủng XKBH13 vì chủng này có khả năng sinh laccase cũng như sinh trưởng tốt trong khoảng pH rộng từ hơi acid đến kiềm.



Hình 1. Ảnh hưởng của pH môi trường nuôi cấy

Ảnh hưởng của chất cảm ứng đến khả năng sinh enzyme của chủng XKBH13

Laccase thuộc nhóm enzyme oxidase có khả năng oxy hóa các hợp chất đa vòng thơm, lignin v.v. Vì thế các chất cảm ứng được chọn cho quá trình

tổng hợp laccase thường là những hợp chất chứa nhiều vòng thơm. Các chất cảm ứng khác nhau có ảnh hưởng không giống nhau đến khả năng sinh laccase của các chủng vi sinh vật. Ngoài ra, khả năng sinh laccase của chủng vi sinh vật còn phụ thuộc vào ion kim loại hóa trị hai có trong môi trường nuôi cấy

như Cu^{2+} , Mn^{2+} , Cd^{2+} , Mg^{2+} (Manubens et al., 2007). Mục đích của nghiên cứu này là tìm ra các chất cảm ứng thích hợp nhằm nâng cao khả năng tổng hợp laccase của chủng XKBH13.

Kết quả ở bảng 1 cho thấy, chất cảm ứng tốt nhất đối với chủng XKBH13 là catechol, ở các mẫu chứa chất cảm ứng còn lại đều có hoạt tính laccase thấp hơn mẫu đối chứng, điều này cho thấy các chất cảm ứng đã lựa chọn không phù hợp hoặc nồng độ đưa vào chưa thích hợp với chủng XKBH13 ngoại trừ catechol.

Số sánh với một số kết quả nghiên cứu về xạ khuẩn đã được công bố trên thế giới thì chủng *S. psammoticus* MTCC 7334 nuôi cấy ở điều kiện nhiệt độ môi trường, pH tối ưu với chất cảm ứng tốt nhất là pyrogallol và para-anisidine sau hai ngày nuôi cấy

hoạt tính laccase lớn nhất đo được là 5900 U/l (Niladevi, Prema, 2008). Trong công trình này chất cảm ứng pyrogallol và para-anisidine đã làm tăng 50% khả năng sinh enzyme của chủng. Catechol chỉ làm tăng thêm khả năng sinh tổng hợp laccase thêm 14,5% ở chủng XKBH13 trong khi đó Pyrogallol và para-anisidine làm tăng khả năng tổng hợp laccase của chủng *S. psammoticus* MTCC 7334 lên tới 50%.

Tuy nhiên, theo nghiên cứu của Cavallazzi và đồng tác giả (2005) một số hợp chất vòng thơm là tiền chất của lignin như hydroxybenzoic acid và vanillin ở nồng độ 1 mM làm giảm khả năng sinh laccase của chủng nấm đảm *Lenitula edodes*. Tác dụng cảm ứng sinh enzyme laccase của các hợp chất vòng thơm và ion kim loại còn phụ thuộc vào bản chất di truyền của vi sinh vật.

Bảng 1. Ảnh hưởng của chất cảm ứng tới khả năng sinh laccase của chủng XKBH13.

Chất cảm ứng	Nồng độ	Hoạt tính qui đổi (%)
Đối chứng	0	100
Cu^{2+}	16 mg/l	16.4
Mn^{2+}	50 mM	99.3
VA	1 mM	70.9
Catechol	1 mM	114.5
Guaiacol	1 mM	73.5
Ferulic acid	1 mM	53.4
4-hydroxybenzoic	1 mM	49.0
Vanillin	1 mM	78.4
Pyren	100 ppm	77.4
Phenanthrene	100 ppm	64.5
DC	1 ml	86.4

Khả năng phân hủy pyrene của chủng xạ khuẩn XKBH13

Các điểm nóng ô nhiễm dioxin do phun rải thuốc diệt cỏ tại Việt Nam cũng bị ô nhiễm một lượng nhỏ các chất hydrocarbon thơm đa nhân (PAH). Do đó, trong nghiên cứu này, chúng tôi xác định khả năng phân hủy một đại diện rất bền vững của PAH bởi chủng xạ khuẩn phân lập được. Pyrene thường được chọn để khảo sát khả năng phân hủy sinh học bởi nó có 4 vòng benzen, có tính độc cao với con người, môi trường và thuộc loại khó phân hủy sinh học.

Kết quả ở hình 2 và bảng 2 cho thấy, sau 7 ngày nuôi cấy chủng XKBH13 loại bỏ được 67,07% pyrene. Đây là cơ sở quan trọng cho thấy rằng

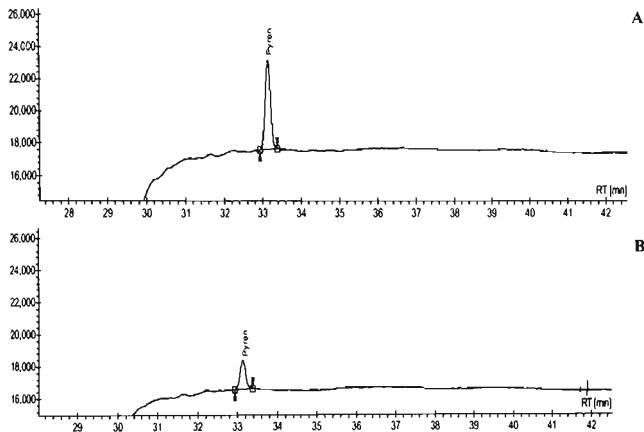
chủng XKBH13 có nhiều tiềm năng ứng dụng trong việc xử lý chất ô nhiễm thuộc nhóm PAH.

Hiện nay trên thế giới và ở Việt Nam có nhiều công trình nghiên cứu khả năng phân hủy PAHs của các chủng vi sinh vật khác nhau. Chủng KCP8 của Nguyễn Bá Hữu và đồng tác giả phân lập tại Khe Chè có khả năng phân hủy hỗn hợp PAH: phenanthrene, anthracene sau 7 ngày nuôi cấy ở môi trường muối khoáng là 76,12%, anthracene là 71,09% và fluoranthrene là 41,01% (Nguyễn Bá Hữu, 2002). Weissenfels và đồng tác giả (1991) đã công bố chủng *Alcaligenes denitrificans* WW1 phân hủy fluoranthrene rất mạnh với tốc độ 300 mg/l mỗi ngày. Các chủng *Aureobacterium* sp., *Arthrobacter*

sp., *Rhodococcus* sp. phân lập từ trầm tích biển có khả năng phân hủy mạnh PAHs. Các chủng trên có khả năng phân hủy 89,94% phenanthrene và 93,4% fluoranthene, pyrene sau một tuần nuôi cấy, hơn thế nữa sau 25 ngày nuôi cấy các chủng này phân hủy 99,98% phenanthrene, 99,97% fluoranthene, pyrene

(Weissenfels *et al.*, 1990). Tuy nhiên các tác giả không đề cập đến khả năng sinh enzyme ngoại bào của chúng.

Từ các kết quả trên cho thấy chủng XKBH13 có khả năng phân hủy khá tốt so với khả năng phân hủy các PAH của các chủng đã công bố.



Hình 2. Phổ HPLC hàm lượng pyren trong mẫu không có vi sinh vật (VSV) (A) và mẫu nuôi cấy chủng XKBH13 (B).

Bảng 2. Khả năng phân hủy sinh học pyrene của chủng XKBH13

Mẫu	Diện tích peak	mg/l	Hiệu suất phân hủy (%)
Môi trường không có VSV	897.3	76.36	-
XKBH13	295.5	25.15	67,07

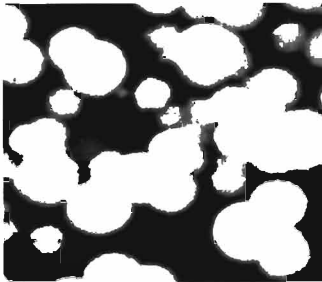
Phân loại chủng xạ khuẩn

Do chủng XKBH13 được phân lập từ đất nhiễm chất diệt cỏ/dioxin từ sân bay Biên Hòa với các đặc điểm sinh laccase tốt nên đã được tiếp tục nghiên cứu định tên. Các phương pháp sử dụng đặc điểm hình thái khuẩn lạc, bảo tử kết hợp với xác định trình tự gen mã hóa 16S rRNA đã được tiến hành.

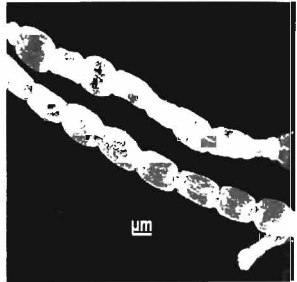
Khuẩn lạc chủng XKBH13 có bề mặt bóng xốp (Hình 3A) có nhiều khuẩn ty khí sinh dạng sợi mảnh bao phủ. Bề mặt khuẩn lạc lồi ở giữa có màu hồng nhạt xung quanh có viền trắng đường kính 0,3-0,4 cm. Bảo tử trần có dạng hình trứng (Hình 3B), kết dính với nhau tạo thành các chuỗi dạng thẳng đường kính 0,3-0,4 μm . Bề mặt bảo tử không trơn nhẵn có nhiều nếp gấp chạy dọc theo

thân bào từ. Từ các đặc điểm của bào tử trên kính hiển vi điện tử có thể thấy chủng XKBH13 có nhiều đặc điểm của các đại diện thuộc chi *Streptomyces*.

Đoạn gen mã hóa 16S rRNA (550 bp) của chủng XKBH13 đã được xác định và so sánh với các trình tự gen 16S rRNA của các chủng xạ khuẩn đã công bố trên các GenBank (Hình 4).



A



B

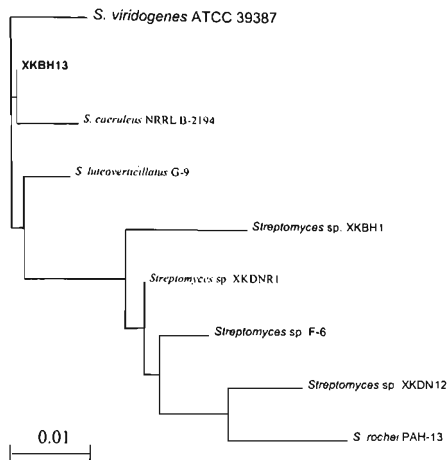
Hình 3. A. Hình thái khuẩn lạc chủng xạ khuẩn XKBH13. B. Hình thái bào tử chủng xạ khuẩn XKBH13 dưới kính hiển vi điện tử quét với độ phóng đại 15 000 lần

Chủng xạ khuẩn XKBH13 tương đồng 100% với loài *S. luteovercillus* G-9, và *S. caeruleus* NRRL B-2194 và tương đồng trên 96% với nhiều đại diện của chi *Streptomyces*. Dựa trên đặc điểm hình thái khuẩn lạc, bào tử và so sánh một phần trình tự gen mã hóa 16S rRNA, chủng XKBH13 có thể được xếp vào chi *Streptomyces* và được đặt tên *Streptomyces* sp. XKBH13. Trình tự đoạn gen mã hóa cho 16S rRNA của chủng xạ khuẩn XKBH13 được đăng ký trên GenBank với mã số là HM210874

Chi *Streptomyces* là chi chiếm số lượng lớn trong đất và có vai trò rất quan trọng đối với hệ sinh thái đất. Một số chủng thuộc chi *Streptomyces* cũng có khả năng sinh enzyme laccase tương đối tốt. Chủng *S. cyaneus* CECT 3335 có khả năng sinh enzyme laccase cao tới 1.200 U/l sau 8 ngày nuôi cấy (Enriqueta et al., 2003). Hai chủng *S. viridosporus* T7A và *S. badius* 252 ngoài khả năng sinh enzyme ngoại bào còn có khả năng phân hủy lignin tương đối tốt (Gottschalk et al., 2003).

Trong số các chủng có quan hệ họ hàng với

chủng XKBH13 (Hình 4), chủng XKBH1 phân lập tại đất nhiễm chất diệt cỏ/dioxin tại Biên Hòa có khả năng tổng hợp laccase (1.756 U/l), MnP và LiP, ngoài ra chủng này còn phân hủy được trên 50% pyrene và anthracene. Chủng XKDN11 được phân lập từ bioreactor xử lý đất nhiễm chất diệt cỏ/dioxin tại sân bay Đà Nẵng, chủng này có khả năng phân hủy 31,32% phenanthrene, 51,24% anthracene và 40% fluoranthrene với nồng độ mỗi chất ban đầu 50 ppm mỗi chất sau 10 ngày nuôi cấy. Chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. XKDN12 cũng được phân lập từ đất nhiễm chất độc hóa học tại Đà Nẵng sau 7 ngày nuôi cấy phân hủy được 32,72% phenanthrene, 39,01% anthracene, 23,32% fluoranthene và 32,1% dibenzofuran. Một số chủng như *Streptomyces* sp. F-6 được phân lập tại Trung Quốc có khả năng phân hủy lignin. *S. rochei* PAH-13 có khả năng phân hủy PAH, phân lập ở Ấn Độ (Laine, Jorgensen, 1996). Kết quả trong nghiên cứu này góp phần khẳng định sự đa dạng của chi *Streptomyces* nói riêng trong đất nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin cũng như sự đa dạng của các vi sinh vật sinh enzyme ngoại bào nói chung.



Hình 4. Cây phát sinh chủng loại của chủng xạ khuẩn XKBH13

KẾT LUẬN

Chủng xạ khuẩn XKBH13 được phân lập từ đất nhiễm chất diệt cỏ/dioxin tại điểm nóng ô nhiễm thuộc sân bay Biên Hòa. Dựa vào đặc điểm hình thái khuẩn lạc, bào tử và trình tự đoạn gen mã hóa 16S rRNA cho thấy chủng này thuộc chi *Streptomyces* và được đặt tên là *Streptomyces* sp. XKBH13. Trình tự đoạn gen 16S rRNA được đăng ký trên GenBank với mã số là HM210874.

Streptomyces sp. XKBH13 có khả năng sinh tổng hợp laccase cao trên môi trường Gause M có bổ sung dịch chiết đất chứa dioxin, hoạt tính laccase cao nhất đo được sau 1 ngày nuôi đạt 3747, 69 U/l.

Chủng này phát triển tốt trong dải pH rộng từ 4 đến 9, và sinh laccase cao nhất ở pH 6,5. Chất cảm ứng sinh laccase hiệu quả nhất đối với chủng XKBH13 là catechol.

Chủng *Streptomyces* sp. XKBH13 có khả năng phát triển tốt trên môi trường có mặt PAH và loại bỏ

được 67% pyrene sau một tuần nuôi cấy.

Lời cảm ơn: Công trình này được thực hiện nhờ kinh phí Đề tài do Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam tài trợ: "Nghiên cứu công nghệ sản xuất enzyme ngoại bào laccase, manganese peroxidase, lignin peroxidase (MnP, LiP) từ vi sinh vật phục vụ xử lý các chất ô nhiễm đa vòng thơm".

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Cavallazzi J, Kasuya C, Soares M (2005) Screening of inducers for laccase production by *Lentinula edodes* in liquid medium. *Braz J Microbiol* 36: 383-387.

Đặng Thị Cẩm Hà, Trần Thị Như Hòa, Nguyễn Bá Hữu, Nguyễn Nguyễn Quang, Đàm Thúy Hằng, Nguyễn Quang Huy (2010) Phân hủy hydrocarbon thơm đa nhân và sinh tổng hợp peroxidase, laccase của chủng vi khuẩn BDNR10 và chủng nấm sợi FDNR40, *Tạp chí Độc học* 14: 8-13.

Ennqueta AM, Arenas M, Rodríguez J, Soliveri J, Ball

AS, Hernández M (2003) Kraft pulp biobleaching and mediated oxidation of a nonphenolic substrate by laccase from *Streptomyces eximius* C1-C1 3335. *Appl Environ Microbiol* 69(4): 1953-1958.

Gottschalk L, Bon E, Nohregu R (2003) Lignin peroxidase from *Streptomyces viridosporis* T7A: Enzyme concentration using ultrafiltration. *Appl Biochem Biotechnol* 147(1-3): 23-32

Haimishi A (2003) Biodiversity of dioxin-degrading microorganism and potential utilization in bioremediation. *Microb Environ* 18(3): 105-125.

Laine M, Jorgensen KS (1996) Straw compost and bioremediated soil as inocula for the bioremediation of chlorophenol contaminated soil. *Appl Environ Microbiol* 62(5): 1507-1513.

Manubens A, Canessa P, Carolina F, Marcella A, Loreto S, Rafael V (2007) Manganese affects the production of laccase in the basidiomycete *Cycloporus subvermispora*. *FEMS Microbiol Lett* 275: 139-145.

Mincer TJ, Fencal W, Jensen PR (2005) Culture dependent and culture-independent diversity within the

obligate marine actinomycete genus *Salinispora*. *Appl Environ Microbiol* 71(11): 7019-7028.

Nguyễn Bá Hữu (2002) Nghiên cứu các nhóm vi sinh vật và khả năng phân hủy hydrocacbon thơm đa nhân của một số chủng vi khuẩn trong quá trình xử lý ô nhiễm dầu tại Khe Chè, Quảng Ninh. Luận án thạc sỹ sinh học.

Niladevi KN, Prema P (2005) Mangrove actinomycetes as the source of ligninolytic enzyme. *Actinomycetologica*, 19(2): 40-47.

Niladevi KN, Prema P (2008) Effect of inducers and process parameters on laccase production by *Streptomyces psammoticus* and its application in dye decolourization. *Bioresour Technol* 99(11): 4583-4589.

Weissenfels W, D, Beyer M, Klein J, Rehm H. J (1990) Microbial metabolism of fluoranthene: isolation and identification of ring fission products. *Appl Microbiol and Biotechnol* 34(4): 528-535.

Wintzingerode V, Göbel F, Stackebrandt E (1997) Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol Rev* 21: 213-229.

CHARACTERIZATION, LACCASE PRODUCTION AND PAH BIODEGRADATION OF ACTINOMYCES *STREPTOMYCES* SP.XKBBH13 ISOLATED FROM HERBICIDE/DIOXIN CONTAMINATED SOIL IN BIENHOA FORMER MILITARY BASE

Dam Thuy Hang, Dao Thi Ngoc Anh, Nguyen Kim Giang, Dang Thi Cam Ha*

Institute of Biotechnology

SUMMARY

Laccase from prokaryote are interested in research because of their characteristics such as thermal stability, chemical resistance and pH stability. Laccase has a wide range of substrates including phenolic and non-phenolic compounds as well as other persistent organic pollutants. Actinomycete strain XKBBH13 was isolated from herbicide/dioxin contaminated soil in BienHoa former military base. This strain produced laccase with highest activity of 3 747 U/l after 24 hours in cultural medium containing malt extract and mediator, contaminated soil extract added as carbon source. *Streptomyces* sp XKBBH13 showed growth capability in large range of pH from 4-9 and produced high laccase activity at pH 6.5. The best laccase production was detected in medium containing 1 mM catechol as an inducer source. After 7 days cultivation, XKBBH13 degraded 67.07% pyrene with more than 76 mg/L at initial concentration. Based on colonial morphology, sporephore observed by scanning electronic microscope and partial sequence of 16S rRNA gene, the strain XKBBH13 could be classified as *Streptomyces* XKBBH13. The partial 16S rRNA gene sequence of *Streptomyces* sp. XKBBH13 was deposited in the GenBank with the accession number HM210874.

Keywords: laccase, *Streptomyces* sp. XKBBH13, PAH, 16S rRNA

* Author for correspondence: Tel: +84-4-38360892; E-mail: dangcha80@yahoo.com