

## ĐẶC ĐIỂM CỦA VI KHUẨN PHÂN LẬP TỪ XỬ LÝ SINH HỌC TÂY ĐỘC NƯỚC THẢI BỊ Ô NHIỄM 2,4,6-TRINITROTOLUENE

Đặng Thị Cẩm Hà, Nguyễn Quang Huy, Nguyễn Thanh Thủy

Viện Công nghệ sinh học

### TÓM TẮT

Vi khuẩn hiếu khí đóng một vai trò rất quan trọng trong phân hủy sinh học và loại bỏ độc tố của nước thải bị ô nhiễm 2,4,6-trinitrotoluene (TNT). Quá trình phân hủy này phụ thuộc vào sự có mặt của các enzyme nội bào và/hoặc ngoại bào. Hai chủng vi khuẩn BQNR và BQNT2 được phân lập từ nước thải chứa 1600 ppm TNT cho thấy khả năng sinh enzyme ngoại bào. Chủng BQNR được nuôi cấy trong môi trường muối khoáng chứa 100 ppm TNT, hoạt tính enzyme peroxidase được xác định ở mức độ khác nhau, 52,5 U/l đối với LiP và 251,2 U/l đối với MnP. Chủng BQNT2 sinh LiP và laccase với hoạt tính lần lượt là 24,9 U/l và 15 U/l. Trình tự đầy đủ gen 16S rRNA chủng BQNR có độ tương đồng cao với loài *Pseudomonas stutzeri* và được phân loại là *Pseudomonas* sp. BQNR. Trình tự gen 16S rRNA của chủng BQNT2 giống với *Achromobacter xylooxidans* và được đặt tên là *Achromobacter* sp. BQNT2. Trình tự hai chủng BQNR và BQNT2 được đăng ký trên GenBank có mã số lần lượt là EU741649 và FJ179539. Trên môi trường muối khoáng chứa 600 ppm TNT, ở 37°C trong điều kiện lắc, chủng BQNR phát triển tốt nhất. Sau 5 ngày nuôi cấy, chủng BQNR loại bỏ được 99,35% TNT với nồng độ ban đầu 100 ppm.

**Từ khóa:** *Achromobacter*, enzyme ngoại bào, phân hủy sinh học, *Pseudomonas*, 2,4,6-Trinitrotoluen (TNT)

### MỞ ĐẦU

2,4,6-trinitrotoluen (TNT) là loại thuốc nổ được sản xuất, sử dụng phổ biến trong lĩnh vực quân sự và phi quân sự từ năm 1902. Sự phát triển của ngành công nghiệp khai thác mỏ sử dụng thuốc nổ để phá đá, đào hầm luôn tiềm ẩn nguy cơ ô nhiễm môi trường. Đặc biệt, nước thải từ quy trình sản xuất thuốc nổ có chứa TNT và nhiều hợp chất mạch vòng nitro khác với nồng độ rất cao. Tại một số khu vực thuộc xí nghiệp sản xuất thuốc nổ phục vụ cho ngành công nghiệp khai thác than của tỉnh Quảng Ninh, nguồn nước xung quanh đều đã bị ô nhiễm TNT nghiêm trọng. Nồng độ TNT trong nước thải cao tới 1.600 ppm và nước có màu đỏ sẫm. Chất này có độc tính cao đối với nhiều sinh vật, ở nồng độ 20 mg TNT/l ức chế sự phát triển của nấm (Esteve *et al.*, 2001). Vi khuẩn Gram (+) bị ức chế phát triển ở nồng độ thấp hơn 50 mg TNT/l, trong khi đó vi khuẩn Gram (-) vẫn có khả năng phát triển được ở nồng độ trên 100 mg TNT/l (Ben *et al.*, 2005). Đối với con người, TNT được biết đến là chất gây ung thư nhóm C, gây hồng gan, rối loạn chức năng cơ thể dẫn đến các bệnh về đường tiêu hóa và hô hấp (Smets *et al.*, 2007).

Phương pháp phân hủy sinh học có nhiều ưu điểm do hiệu quả xử lý cao và thân thiện với môi

trường nên được nhiều quốc gia tiên tiến trên thế giới áp dụng. Rất nhiều vi sinh vật được nghiên cứu có khả năng phân hủy TNT thuộc nhóm nấm đảm và nấm mục *P. chrysosporium*, *Phlebia radiata*, *Trametes vericolor*; xạ khuẩn *Streptomyces viridosporus* T7A, *Streptomyces* strain SR10, *Streptomyces chromofuscus* A11 và chiếm ưu thế nhất là vi khuẩn với đại diện thuộc các chi *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Clostridium*, *Desulfovibrio*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Burkholderia*.... chúng sử dụng TNT như nguồn nitrogen, một số ít sử dụng làm nguồn carbon và năng lượng cho quá trình sinh trưởng (Spain, 1995, Esteve *et al.*, 2001, Nyanhongo *et al.*, 2005). Các enzyme nội bào và ngoại bào có vai trò đặc biệt quan trọng tham gia vào quá trình phân hủy sinh học TNT. Enzyme ngoại bào phân hủy lignin gồm lignin peroxidase (LiP), manganese peroxidase (MnP) và laccase có khả năng phân hủy rồi khoáng hóa hoàn toàn TNT cũng như các sản phẩm chuyển hóa từ TNT là aminodinitrotoluene (ADNTs) (Nyanhongo *et al.*, 2005). Ba enzyme này còn tham gia vào quá trình phân hủy nhiều hợp chất mạch vòng có cấu trúc tương tự lignin như các hydrocacbon thơm đa vòng (PAHs), polyphenol, các hợp chất chứa Cl (dioxin), thuốc nhuộm và thuốc nổ (Nyanhongo *et al.*, 2005). Sự khoáng hóa TNT khi có mặt của LiP và MnP đã được chứng minh xảy ra trong môi trường nuôi cấy

nấm đảm *Phanerochaete chrysosporium* và *Phlebia radiate* (Aken *et al.*, 1999; Nyanhongo *et al.*, 2005). Gần đây, một số nghiên cứu đã đề cập đến khả năng sinh tổng hợp enzyme phân hủy lignin ở vi khuẩn. Như vậy, vi khuẩn là đối tượng có nhiều triển vọng để lên men thu các loại enzyme và là nhóm vi sinh vật quan trọng nhất trong bioreactor xử lý nước bị ô nhiễm chất hữu cơ khó phân hủy.

Mục đích của nghiên cứu này nhằm đánh giá khả năng phát triển, phân hủy TNT, sinh tổng hợp ba enzyme ngoại bào LiP, MnP và laccase của các chủng vi khuẩn. Đồng thời phân loại hai chủng vi khuẩn phân hủy TNT phân lập từ nước thải bị ô nhiễm TNT đang được xử lý bằng phương pháp kích thích sinh học ở quy mô pilot phòng thí nghiệm.

## NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Nguyên liệu

Mẫu nước thải bị ô nhiễm TNT lấy từ cơ sở sản xuất thuốc nổ phục vụ cho ngành công nghiệp khai thác than đang xử lý bằng công nghệ phân hủy sinh học ở quy mô 10 l trong điều kiện phòng thí nghiệm đã được sử dụng để phân lập vi khuẩn.

### Phương pháp nghiên cứu

Phân lập chủng vi khuẩn có khả năng phát triển trên môi trường chứa TNT bằng phương pháp làm giàu với 3 lần lắc trên môi trường muối khoáng chứa TNT với nồng độ 100 ppm, ở 37°C, tốc độ lắc 200 vòng/phút. Môi trường muối khoáng sử dụng trong nghiên cứu có thành phần như sau K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 11,3 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4,84 g/l, MgSO<sub>4</sub> 0,16 g/l, NaCl 8,0 g/l và (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 g/l.

### Khảo sát khả năng sinh enzyme LiP, MnP và laccase

Hoạt tính LiP được xác định theo phương pháp của Crawford và đồng tác giả (1993) sử dụng 2,4-DCP làm cơ chất, biểu hiện bằng sự gia tăng hấp thụ ánh sáng ở bước sóng 510 nm ( $\epsilon_{510} = 29100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Hoạt tính MnP được xác định theo phương pháp được mô tả bởi Wunch và đồng tác giả (1997). Trong phương pháp này guaiacol được sử dụng là cơ chất, biểu hiện bằng sự gia tăng hấp thụ ánh sáng ở bước sóng 465 nm ( $\epsilon_{465} = 12100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Hoạt tính laccase được xác định theo phương pháp của Han và đồng tác giả (2005) sử dụng ABTS làm cơ chất, biểu hiện bằng sự gia tăng hấp thụ ánh sáng ở bước sóng 420 nm ( $\epsilon_{420} = 36000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

Một đơn vị hoạt tính enzyme (U/l hay U/ml) là lượng enzym cần thiết để chuyển hóa 1  $\mu\text{mol}$  cơ chất trong một phút.

### Khả năng phân hủy TNT

Khả năng phân hủy TNT được xác định theo phương pháp của Hồ Việt Quý (1999) đối với các hợp chất polynitro vòng thơm. Sự thay đổi TNT trong môi trường được đo bằng phương pháp so màu sau khi chiết bằng benzen và lên màu bằng dung dịch NaOH trong dung môi acetone.

### Phân loại vi khuẩn

Vi khuẩn được phân loại bằng cách xác định và so sánh trình tự gen mã hóa 16S rRNA với các chủng vi khuẩn đã được công bố trên ngân hàng gen quốc tế. DNA tổng số của hai chủng vi khuẩn BQNR và BQNT2 được tách và sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR. Sử dụng cặp mồi (11F) gtt tga tcc tgg ctc ag và (1492R) ggy tac ctt gtt acg actt để nhân gen mã hóa 16S rRNA với kích thước khoảng 1.500 bp. Sản phẩm PCR được gắn vào vector PCR 2.1, biến nạp vào vi khuẩn *E. coli* INV $\alpha$ F'. Trình tự nucleotide gen mã hóa 16S rRNA được xác định bằng máy xác định trình tự nucleotide tự động ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer. Cây phát sinh chủng loại được xây dựng bằng phần mềm Clustal X, ChromasPro version 1.4.1 và trình tự gen mã hóa 16S rRNA hai chủng BQNR, BQNT2 được đăng ký trên GenBank.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Đặc điểm hình thái của hai chủng vi khuẩn BQNR và BQNT2

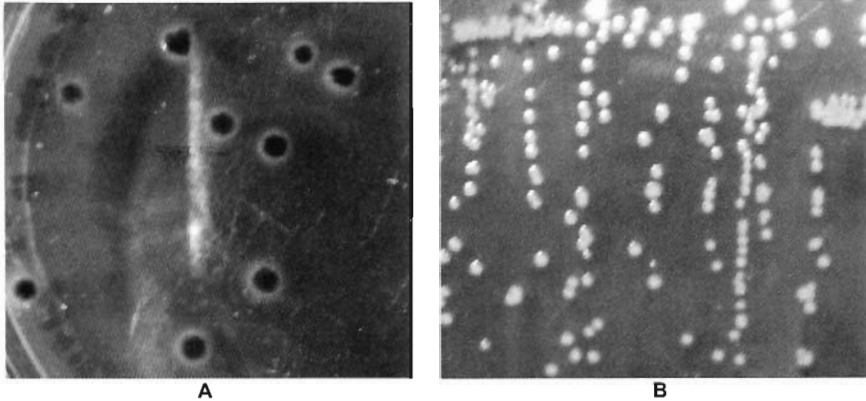
Hai chủng BQNR và BQNT2 được nuôi ở 37°C trên môi trường muối khoáng thạch không có và có 100 ppm TNT. Sau 5 ngày, khuẩn lạc của chủng BQNR phát triển thành hình tròn, bề mặt trơn ướt, lồi bóng và có màu đỏ trên môi trường chứa TNT (Hình 1A) và màu trắng đục trên môi trường không có TNT (Hình 1B).

Chủng BQNT2 có khuẩn lạc hình tròn, bề mặt lồi bóng, nhày, màu vàng nhạt và làm đục môi trường xung quanh khi có TNT (Hình 2A) và màu trắng sữa khi không có TNT (Hình 2B).

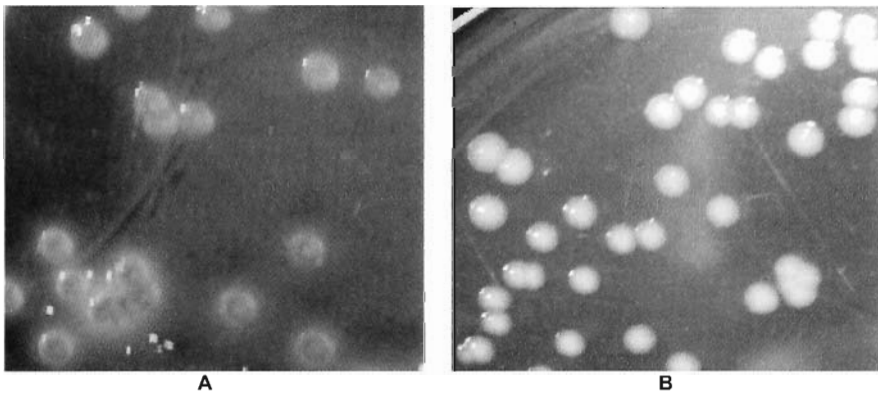
Như vậy, có khả năng hai chủng vi khuẩn BQNR và BQNT2 đã sử dụng TNT để phát triển. Đa số vi khuẩn sử dụng và phân hủy TNT nhờ hệ enzyme nội bào. Nhiều công trình nghiên cứu công

bổ các sản phẩm từ quá trình phân hủy TNT bởi vi khuẩn được tích tụ trong sinh khối tế bào như hydroxylamino dinitrotoluen (HADNT), aminodinitrotoluen (ADNT), diaminonitrotoluen (DANT), các hợp chất azoxyl trinitrotoluen (AZT)

(Esteve *et al.*, 2001; Smets *et al.*, 2007). Như vậy có khả năng chủng BQNR và BQNT2 đã phân hủy TNT và tích tụ các sản phẩm tương tự trong sinh khối tế bào nên phát triển thành các khuẩn lạc có màu đỏ và màu vàng.



Hình 1. Hình thái khuẩn lạc chủng BQNR trên môi trường có TNT (A) và không có TNT (B).



Hình 2. Hình thái khuẩn lạc chủng BQNT2 trên môi trường có TNT (A) và không có TNT (B).

### Khả năng sinh enzyme LiP, MnP và laccase

Hệ enzyme ngoại bào phân hủy lignin bao gồm LiP, MnP và laccase có vai trò quan trọng tham gia vào quá trình phân hủy các hợp chất ô nhiễm mạch vòng như PAHs, dioxin, DDT, HCH và TNT v.v. (Nyanhongo *et al.*, 2005). Trong nghiên cứu này khả năng sinh ba loại enzyme LiP, MnP và laccase của hai chủng vi khuẩn BQNR và BQNT2 đã được tiến hành nghiên cứu. Sau 3 ngày nuôi cấy trên môi

trường muối khoáng chứa 100 ppm TNT, dịch môi trường được xử lý loại sinh khối tế bào và sử dụng để xác định hoạt tính enzyme.

Chủng BQNR có khả năng sinh tổng hợp hai loại enzyme LiP, MnP và không có hoạt tính laccase. Còn chủng BQNT2 sinh tổng hợp được LiP và laccase. Đây là những đặc điểm rất quan trọng của hai chủng vi khuẩn này. Cho đến nay, chưa có nhiều công bố về khả năng sinh enzyme ngoại bào peroxidase và laccase ở vi khuẩn. Gần đây, một số

công trình nghiên cứu công bố vi khuẩn *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter* có khả năng sinh tổng hợp enzyme thủy phân lignin (Kumar *et al.*, 2006). Tuy nhiên, các nghiên cứu về khả năng sinh hai loại enzyme peroxidase này trên đối tượng vi khuẩn chưa được tiến hành. Duy nhất enzyme laccase đã được nghiên cứu ở vi khuẩn *Bacillus subtilis*, *Bacillus halodurans* và *Bacillus licheniformis* (Martins *et al.*, 2002; Koschorreek *et al.*, 2008). Song con đường phân hủy và khoáng hóa hoàn toàn TNT khi có sự tham gia của các enzyme ngoại bào LiP, MnP và laccase đã được chứng minh ở các loài nấm đảm. Các loài nấm *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Nematoloma frowardii*, *Phlebia radiata*... đều có khả năng khoáng hóa trực tiếp TNT (Nyanhongo *et al.*, 2005). Một số nghiên cứu sử dụng enzyme LiP và MnP đã được tinh sạch để đánh giá khả năng phân hủy và các sản phẩm từ chuyển hóa của TNT đã được tiến hành. Enzyme LiP (H8) tách từ nấm *P. chrysosporium* có khả năng chuyển hóa hoàn toàn 50 mg/l 2,4-diamino-6-nitrotoluen và 2-amino-4,6-dinitrotoluen trong 1 h và 48 h (Nyanhongo *et al.*, 2005). Enzyme MnP từ nấm *P. radiata* có khả năng khoáng hóa 22% TNT và 76% 2-amino-4,6-dinitrotoluen sau 5 ngày. Khi nồng độ ADNT và DANT là 10 mg/l thì sự chuyển hóa xảy ra dưới 2 ngày và 3 h (Aken *et al.*, 1999).

**Bảng 1.** Khả năng sinh tổng hợp enzyme LiP, MnP và laccase.

Chủng vi khuẩn	LiP (U/l)	MnP (U/l)	Laccase (U/l)
BQNR	52,6	215,2	-
BQNT2	24,9	-	15

(-): Không xác định được

Chủng BQNR sinh tổng hợp hai loại enzyme ngoại bào LiP và MnP; chủng BQNT2 lại có hoạt tính LiP và laccase do đó nếu được tối ưu môi trường để tăng hiệu quả sinh ba enzyme ngoại bào này của cả hai chủng thì hiệu quả xử lý sẽ cao hơn. Đồng thời hai chủng BQNR và BQNT2 có thể được lựa chọn để nghiên cứu lên men thu enzyme thô, xác định các đặc tính của LiP, MnP và laccase trên cơ sở so sánh với ba enzyme này ở những loài nấm đảm đã được nghiên cứu trước đó. Các enzyme peroxidase và laccase được hai chủng này sinh ra là đối tượng cho nghiên cứu thử nghiệm khả năng phân hủy và

loại màu nước thải TNT. Hướng nghiên cứu này theo công nghệ tăng cường sinh học sử dụng tập đoàn vi sinh vật bổ sung vào bioreactor hay sử dụng enzyme thô để loại bỏ TNT cũng như các dẫn xuất và sản phẩm chuyển hóa từ TNT trong đất và nước bị ô nhiễm.

### Phân loại hai chủng vi khuẩn BQNR và BQNT2

Gen mã hóa 16S rRNA của hai chủng vi khuẩn BQNR và BQNT2 được tách dòng phân loại phân tử bằng phương pháp so sánh trình tự gen mã hóa 16S rRNA với các chủng vi khuẩn đã được công bố trên ngân hàng gen.

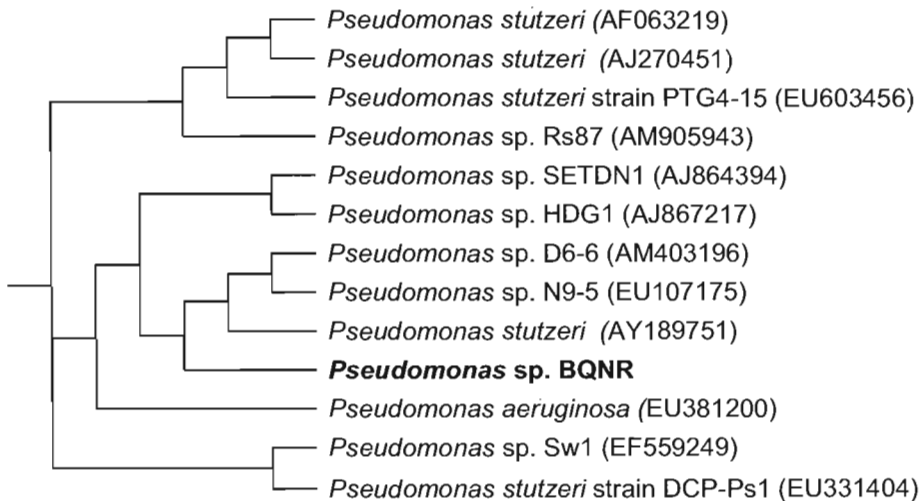
Trình tự gen mã hóa 16S rRNA của chủng BQNT2 có quan hệ gần gũi với các đại diện thuộc chi *Achromobacter* và độ tương đồng cao nhất với vi khuẩn *Achromobacter xylosoxidans* (99%). Ngoài ra, chủng này cũng có độ tương đồng cao với vi khuẩn *Alcaligenes xylosoxidans* tới 99%. Trình tự gen mã hóa 16S rRNA của chủng đã được đăng ký trên GenBank với mã số FJ179539 và có tên là *Achromobacter* sp. BQNT2. Hai vi khuẩn *Achromobacter xylosoxidans* và *Alcaligenes xylosoxidans* có khả năng phân hủy một số hợp chất như PAHs, 2,4,6-tribromophenol, p-nitrophenol... (Niansheng Wan *et al.*, 2007; Nishino *et al.*, 2000). Chủng vi khuẩn *Achromobacter xylosoxidans* Ns được phân lập từ trầm tích đầm lầy có khả năng phân hủy p-nitrophenol. Chủng này sử dụng p-nitrophenol như nguồn carbon, nitơ và năng lượng duy nhất, chịu được nồng độ lên tới 1,8 mM, phân hủy hoàn toàn sau 7 ngày ở điều kiện hiếu khí (Niansheng Wan *et al.*, 2007).

So sánh trình tự gen mã hóa 16S rRNA của chủng BQNR là chủng thứ hai trong nghiên cứu này với các chủng vi khuẩn đã được công bố trên ngân hàng gen quốc tế cho thấy độ tương đồng cao với các loài thuộc chi *Pseudomonas* nhất là loài *Pseudomonas stutzeri* (98%).

Trong số các chủng gần gũi, chủng *Pseudomonas stutzeri* có khả năng phân hủy dầu diesel, *Pseudomonas* sp. Sw1 phân hủy chất diệt cỏ, *Pseudomonas* sp. HDG1 phân hủy PAHs, *Pseudomonas* sp. N9-5 phân hủy dầu. Nhiều loài thuộc chi *Pseudomonas* như *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas savastanoi* được nghiên cứu và chúng mình có khả năng phân hủy TNT cùng nhiều hợp chất hữu cơ khó phân hủy khác (Esteve *et al.*, 2001). Đặc biệt hai vi khuẩn *P. savastanoi* và *P. aeruginosa* chủng MX khoáng hóa được 1 - 2% TNT có trong

môi trường nuôi cấy (Oh *et al.*, 2003; Martin *et al.*, 1997). Chủng BQNR đã được đặt tên *Pseudomonas* sp. BQNR và trình tự đầy đủ gen mã hóa 16S rRNA trên GenBank có mã số là EU741649. Dựa trên trình

tự gen và độ tương đồng với các chủng vi khuẩn được so sánh chúng tôi xây dựng cây phát sinh chủng loại của vi khuẩn *Pseudomonas* sp. BQNR (Hình 3).



Hình 3. Cây phát sinh chủng loại của vi khuẩn *Pseudomonas* sp. BQNR

### Khả năng phân hủy TNT

Sau 5 ngày nuôi cấy trên môi trường muối khoáng chứa TNT nồng độ 100 ppm, dịch môi trường được sử dụng để phân tích lượng TNT còn lại nhằm đánh giá khả năng phân hủy. Vi khuẩn *Pseudomonas* sp. BQNR phân hủy được 99,35% lượng TNT có trong môi trường. Chủng *Pseudomonas* sp. BQNR phân hủy tốt TNT khi so sánh với các chủng đã nghiên cứu. Tác giả Oh và đồng tác giả (2003) công bố vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* chủng MX phân hủy được 100% TNT với nồng độ ban đầu là 100 mg/l. Riêng chủng BQNT2 sẽ được đánh giá khả năng phân hủy TNT ở công trình sau. Cho đến nay, có nhiều nghiên cứu chứng minh khả năng phân hủy TNT của các chủng vi khuẩn hiếu khí, kỵ khí và kỵ khí không bắt buộc. Đa số chúng sử dụng TNT làm nguồn nitrogen, một số có khả năng sử dụng làm nguồn nitrogen duy nhất. Các sản phẩm từ sự phân hủy TNT bởi vi khuẩn bao gồm HADNTs, ADNTs, DANTs, TAT, DNT, phức hệ hydrit-TNT Meisenheimer... trong đó ADNTs, DANTs lại dễ dàng bị phân hủy và khoáng hóa hoàn toàn nhờ các enzyme phân hủy lignin

(Esteve *et al.*, 2001; Nyanhongo *et al.*, 2005). Sản phẩm DNT được tạo thành từ sự khử TNT khi có sự tham gia của nhóm old yellow enzyme được nhiều loài vi khuẩn sử dụng dễ dàng như *Pseudomonas* sp. DNT, *Burkholderia* sp. DNT, *Commonas* sp. JS 765, *Burkholderia cepacia* R34, *Acidovorax* sp. JS42 (Spain, 1995; Zoe, Bruce, 2006).

Như vậy, hai chủng vi khuẩn BQNR và BQNT2 đóng vai trò quan trọng trong quá trình xử lý nước ô nhiễm TNT ở quy mô pilot phòng thí nghiệm. Hiệu quả thu được khả quan, nồng độ TNT giảm tới 84% so với ban đầu là 1.600 ppm sau 3 tuần xử lý bằng phương pháp kích thích sinh học.

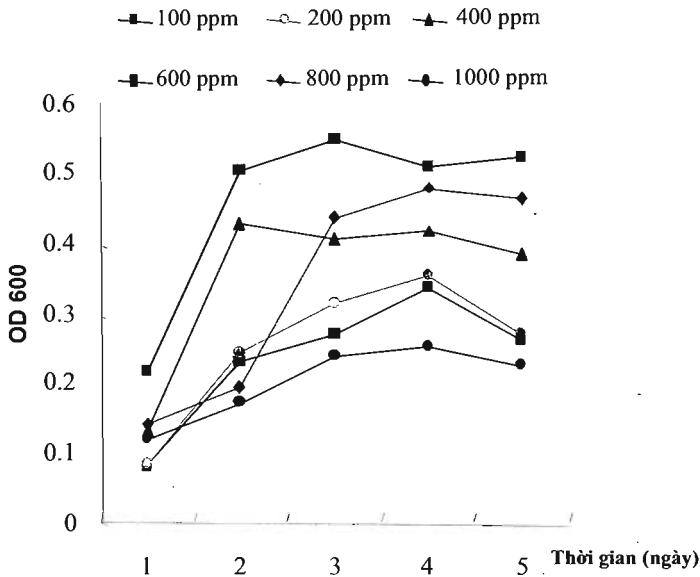
### Ảnh hưởng của nồng độ TNT

Trong nước thải màu đỏ của các cơ sở sản xuất thuốc nổ thì nồng độ TNT còn lại rất cao. Do đó nhóm vi sinh vật nào có khả năng phát triển và phân hủy TNT ở nồng độ cao đóng vai trò quan trọng trong quá trình phân hủy sinh học. Một trong các nội dung nghiên cứu của công trình này nhằm khảo sát ảnh hưởng nồng độ TNT cũng như nồng độ thích hợp cho khả năng phát triển của chủng *Pseudomonas*

sp. BQNR.

Vi khuẩn *Pseudomonas* sp. BQNR có khả năng phát triển trong khoảng nồng độ TNT từ 100 đến 1000 ppm. Tại nồng độ 100 và 200 ppm chủng phát triển ở mức trung bình. Trong khoảng nồng độ từ 400 đến 800 ppm chủng phát triển tốt. Nồng độ TNT là 600 ppm thích hợp nhất cho sự phát triển của chủng, sinh khối tạo thành nhiều nhất. Ở nồng độ 1000 ppm chủng đã bị ức chế phát triển. Theo một số nghiên cứu nồng độ TNT là 113 ppm ức chế sự phát triển của vi sinh vật. Vi khuẩn Gram (+) bị ức chế

phát triển ở nồng độ TNT thấp hơn 50 ppm nhưng vi khuẩn Gram (-) vẫn có khả năng phát triển ở nồng độ TNT trên 100 ppm (Ben *et al.*, 2005). Nguồn nước thải sử dụng trong nghiên cứu có nồng độ TNT lên đến 1.600 ppm. Như vậy, chủng BQNR vẫn có khả năng phát triển ở nồng độ 1.000 ppm là hoàn toàn phù hợp. Đây là một đặc điểm rất thuận lợi để ứng dụng chủng trong phân hủy sinh học bằng phương pháp kích thích sinh học, làm giàu sinh học hoặc xử lý trong các bioreactor với các điều kiện có thể kiểm soát được.



Hình 4. Ảnh hưởng của nồng độ TNT đến khả năng phát triển của chủng BQNR.

## KẾT LUẬN

Hai chủng vi khuẩn BQNR và BQNT2 được phân lập từ nguồn nước ô nhiễm TNT với nồng độ rất cao 1.600 ppm đang được xử lý bằng phương pháp phân hủy sinh học quy mô 10 l. Chủng BQNT2 có khả năng sinh hai loại enzyme LiP, laccase với hoạt tính lần lượt là 24,9 U/l và 15 U/l. Hoạt tính LiP, MnP của chủng BQNR là 52,5 U/l và 251,2 U/l. Chủng BQNT2 tương đồng cao nhất với vi khuẩn *Achromobacter xylosoxidans* và được đặt tên là *Achromobacter* sp. BQNT2 (FJ179539). Chủng BQNR có quan hệ gần gũi nhất với loài *Pseudomonas stutzeri* và được đặt tên là *Pseudomonas* sp. BQNR (EU741649). Sau 5 ngày

nuôi cấy, vi khuẩn *Pseudomonas* sp. BQNR phân hủy được 99,35% TNT với nồng độ ban đầu là 100 ppm. Chủng này phát triển tốt nhất tại nồng độ TNT 600 ppm ở 37°C.

**Lời cảm ơn:** Công trình này được thực hiện nhờ sự hỗ trợ kinh phí của Đề tài: “Nghiên cứu xử lý tẩy độc các hợp chất hữu cơ chứa Cl bằng phương pháp hóa học và sinh học tiên tiến”.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

Aken VB, Horichter M, Scheiber K, Hatakka AI, Naveau H, Agathos SN (1999) Transformation and mineralization

of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by manganese peroxidase from the white-rot basidiomycete *Phlebia radiata*. *Biodegradation* 10: 83-91.

Ben S, Laurent E, Saysed EF, Agathos NS (2005) Promising strategies for the mineralisation of 2,4,6-trinitrotoluene. *Rev Environ Sci Biotechnol* 4: 39-60.

Crawford DL, Ramachandra M (1993) Bacterial extracellular lignin peroxidase. United States Patent: 5200338.

Esteve NA, Caballero A, Ramos JL (2001) Biological degradation of 2,4,6-trinitrotoluene. *Microbiol Mol Biol Rev* 65: 335-352.

Han MJ, Choi HT, Song HG (2005) Purification and Characterization of laccase from the White Rot Fungus *Trametes versicolor*. *J Microbiol* 43(6): 555-560.

Hồ Việt Quý (1999) Các phương pháp phân tích quang học trong hóa học, Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Hà Nội.

Koschorreck K, Richter SM, Ene AB, Roduner E, Schmid RD, Urlacher VB (2008) Cloning and characterization of a new laccase from *Bacillus licheniformis* catalyzing dimerization of phenolic acids. *Appl Microbiol Biotechnol* 79: 217-224.

Kumar R, Kumar A (2006) United States Patent, Patent No: US 7022511 B2.

Martin JL, Comfort SD, Shea PJ, Kokjohn TA, and Drijber RA (1997) Denitration of 2,4,6-trinitrotoluene by *Pseudomonas savastanoi*. *Can J Microbiol* 43: 447-455.

Martins LO, Soares CM, Pereira MM, Teixeira M, Costa T, Jones GH, Henriques AQ (2002) Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the

*Bacillus subtilis* endospore coat. *J Biol Chem* 277(21): 18849-18859.

Nishino SF, Paoli GC, and Spain JC (2000) Aerobic Degradation of Dinitrotoluenes and Pathway for Bacterial Degradation of 2,6-Dinitrotoluene. *Appl Environ Microbiol* 66(5): 2139-2147.

Nyanhongo GS, Schroeder M, Steiner W, Gubitz GM (2005) Biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT): An enzymatic perspective. *Biocatal Biotransfor* 23(2): 53-69.

Oh BT, Shea PJ, Drijber RA, Vasilyeva GK, Sarath G (2003) TNT biotransformation and detoxification by a *Pseudomonas aeruginosa* strain. *Biodegradation* 14: 309-319.

Pasti-Grigsby MB, Lewis TA, Crawford DL, Crawford RL (1996) Transformation of 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) by actinomycetes isolated from TNT-Contaminated and Uncontaminated Environments. *Appl Environ Microbiol*: 1120-1123.

Smets BF, Hong Y, Esteve AN (2007) TNT biotransformation: when chemistry confronts mineralization. *Appl Microbiol Biotechnol* 76: 267-277.

Spain JC (1995) Biodegradation of nitroaromatic compounds. *Microbiol* 49: 523-555.

Niansheng Wan, Ji-Dong Gu, Yan Yan (2007) Degradation of *p*-nitrophenol by *Achromobacter xylosoxidans* Ns isolated from wetland sediment. *Int Biodeter Biodegr* 59(2): 90-96.

Wunch KG, Feibelman T, Bennett JW (1997) Screening for fungi capable of removing benzo[a]pyrene in culture. *Appl Microbiol Biotechnol* 47: 620-624.

Zoe CS, Bruce NC (2006) Bacterial pathways for degradation of nitroaromatics. *Nat Prod* 23: 845-850.

## CHARACTERIZATION OF BACTERIAL ISOLATES FROM DETOXIFICATION BIOTREATMENT OF 2,4,6-TRINITROTOLUENE CONTAMINATED WASTEWATER

Dang Thi Cam Ha\*, Nguyen Quang Huy, Nguyen Thanh Thuy

*Institute of Biotechnology*

### SUMMARY

Aerobic bacteria play a very important role in biodegradation and detoxification of wastewater contaminated 2,4,6-trinitrotoluene (TNT). Decomposition process depends on the presence of intracellular and/or extracellular enzymes. Two bacterial strains BQNR and BQNT2 were isolated from explosive wastewater containing 1600 ppm TNT showed ability in production of extracellular enzyme. In mineral salt medium containing 100 ppm TNT inoculated with BQNR strain, activity of peroxidase enzymes were determined at different level, 52,5 U/l for LiP and 251,2 U/l for MnP. Strain BQNT2 produced LiP and laccase with activity 24,9 U/l and 15 U/l, respectively. The full sequence of BQNR 16S rRNA gene has a high

\* Author for correspondence: Tel: 84-4-38360892; Fax: 84-4-38363144; E-mail: dangcamha@ibt.ac.vn

homology to *Pseudomonas stutzeri* species and it was classified as *Pseudomonas* sp. BQNR. The 16S rRNA gene sequence of BQNT2 showed high similarity to *Achromobacter xylooxidans* and named as *Achromobacter* sp. BQNT2. These sequences of two BQNR and BQNT2 examined strains were deposited in the GenBank with accession number EU741649 and FJ179539, respectively. In shaking with mineral salt medium containing 600 ppm TNT, at 37°C bacterium BQNR showed best growth. In cultural medium BQNR strain removed 99,35% TNT with initial concentration 100 ppm after 5 days.

**Keywords:** 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT), *Achromobacter*, Biodegradation, extracellular enzyme, *Pseudomonas*