

# Nghiên cứu hoạt tính enzym ngoại bào của một số chủng *Bacillus* mới phân lập và khả năng ứng dụng chúng trong xử lý nước thải

Ngô Tự Thành, Bùi Thị Việt Hà\*, Vũ Minh Đức, Chu Văn Mẫn

Khoa Sinh, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN, 334 Nguyễn Trãi, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 02 tháng 4 năm 2007

**Tóm tắt.** Vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* phân bố rộng rãi trong tự nhiên, đa dạng về sinh thái. Các loài *Bacillus* đã, đang và ngày càng trở thành những vi sinh vật quan trọng hàng đầu về mặt ứng dụng. Các ứng dụng của chúng bao trùm hàng loạt lĩnh vực, từ sản xuất thực phẩm thủ công truyền thống đến công nghệ lên men hiện đại, đến sinh học phân tử, y-dược học chữa các bệnh hiểm nghèo, mỹ phẩm, xử lý môi trường ô nhiễm, thu hồi bạc kim loại từ các phế liệu. Chính vì lẽ đó nên đã có ngày càng nhiều các nghiên cứu sâu về chi *Bacillus* này cũng như mở rộng ứng dụng của chúng đối với đời sống con người. Từ thiên nhiên nhiệt đới và á nhiệt đới đa dạng của Việt Nam, chúng tôi đã thu nhận các chủng *Bacillus* có hoạt tính phong phú từ các vùng sinh thái khác nhau nhằm từng bước xây dựng bộ sưu tập các chủng của chi vi khuẩn quan trọng này. Trong kết quả nghiên cứu, chúng tôi phân lập được 236 chủng *Bacillus* từ các mẫu đất và nước thải khác nhau, trong đó đã khảo sát hoạt tính các enzym ngoại bào như proteaza, amylaza và CMC-aza của 236 chủng. Trong số đó, các chủng T20, TR6 và TH5 có tác dụng tốt trong xử lý nước thải. Các giá trị BOD<sub>5</sub> của nước thải nhà máy sữa Vinamilk Gia Lâm Hà Nội được xử lý lactic có và không có dịch nuôi chủng T20 lần lượt là 1250 và 730mg/L. Các giá trị BOD<sub>5</sub> của nước thải ấy được xử lý lactic có và không có huyền dịch tế bào TR6 lần lượt là 800 và 610mg/L. Các giá trị BOD<sub>5</sub> của nước thải sông Tô Lịch xử lý lactic có và không có dịch nuôi chủng TH5 pha loãng lần lượt là 165 và 92mg/L.

**Từ khóa:** *Bacillus*.spp, enzyme, wastewater treatment.

## 1. Đặt vấn đề

Vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* có tiềm năng lớn về các enzym ngoại bào. Nhiều trong số các enzym ngoại bào này là những enzym thủy phân các phân tử hữu cơ lớn. Chính vì thế vi khuẩn này có nhiều ứng dụng trong các lĩnh vực khác nhau [1] như: công nghiệp sản xuất

chất tẩy rửa [1,2], công nghiệp thực phẩm - bánh kẹo - đồ uống [3,4], công nghiệp dược phẩm [5], công nghiệp thuộc da [1,6], công nghiệp dệt [5], và trong xử lý chất thải [1,7]. Riêng về ứng dụng vi khuẩn này trong xử lý nước thải thì chưa thấy tài liệu nào công bố. Tuy nhiên, như trên đã nói, nhiều enzym ngoại bào của *Bacillus* là enzym thủy phân các phân tử hữu cơ lớn, và vì trong nước thải sinh hoạt và nước thải từ công nghiệp thực phẩm nói chung rất giàu chất hữu cơ nên việc ứng dụng vi

\* Tác giả liên hệ. ĐT: 84-4-38588856  
E-mail: habtv@vnu.edu.vn

khuẩn này để xử lý các loại nước thải đó là có triển vọng. Bài báo này trình bày ba hoạt tính enzym thủy phân ngoại bào của một số chủng *Bacillus* và thăm dò khả năng ứng dụng để xử lý nước thải sông Tô Lịch và nước thải nhà máy sữa Vinamilk Gia Lâm Hà Nội. Những chủng này nằm trong số 236 chủng mới phân lập từ các vùng địa lý khác nhau nhằm khai thác tính đa dạng về sinh lý và sự thích ứng bằng enzym của *Bacillus* [8].

## 2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Vi sinh vật

Các chủng *Bacillus* dùng trong nghiên cứu được phân lập từ đất ở nhiều vùng địa lý và từ nước thải sông Tô Lịch Hà Nội cũng như nước thải nhà máy sữa Vinamilk Gia Lâm Hà Nội.

### 2.3. Phân lập *Bacillus*

Các mẫu phân lập được pha loãng tới độ pha loãng cần thiết rồi được xử lý nhiệt ở 80°C trong 15 phút, sau đó được cấy gọt lên môi trường thạch dinh dưỡng. Nuôi ở nhiệt độ 28-30°C trong 24 giờ. Các khuẩn lạc mọc lên được kiểm tra hiển vi và kiểm tra các đặc điểm khác, nếu phù hợp với các đặc điểm của *Bacillus* thì được cấy chuyển sang thạch nghiêng để bảo quản.

### 2.3. Xác định hoạt tính proteaza, amylaza và xenlulaza (CMC-aza)

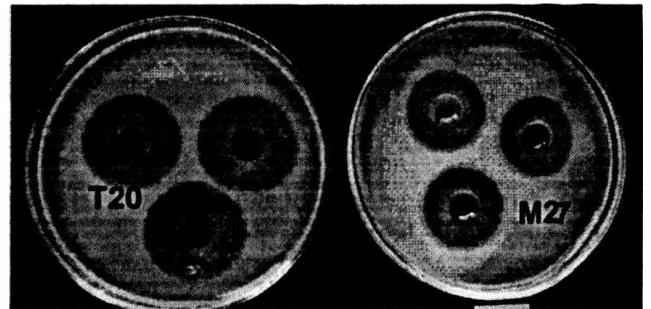
Các hoạt tính này được xác định theo kỹ thuật khuếch tán trên thạch

### 2.4. Xác định nhu cầu oxy sinh hoá 5 ngày (BOD<sub>5</sub>) (Theo tiêu chuẩn Việt Nam ISO 5815:1989).

## 3. Kết quả và thảo luận

### 3.1. Phân lập *Bacillus*

Từ các mẫu đất ở các vùng địa lý thuộc nhiều tỉnh khác nhau, đã phân lập được 236 chủng *Bacillus*. Một số chủng đã được kiểm tra về các hoạt tính enzym thủy phân ngoại bào, như được trình bày dưới đây.

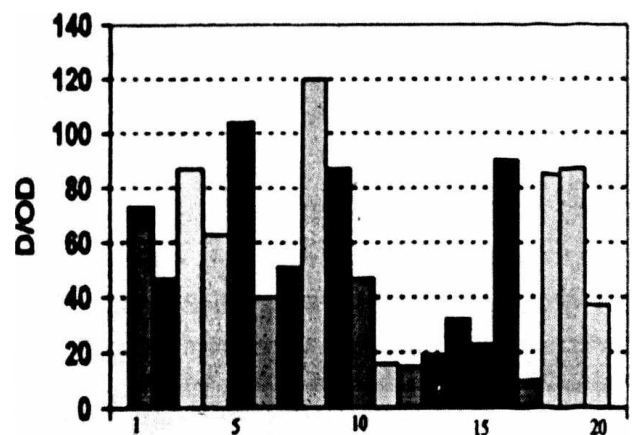


Hình 1. Vùng phân huỷ gelatin của hai chủng T20 và M27.

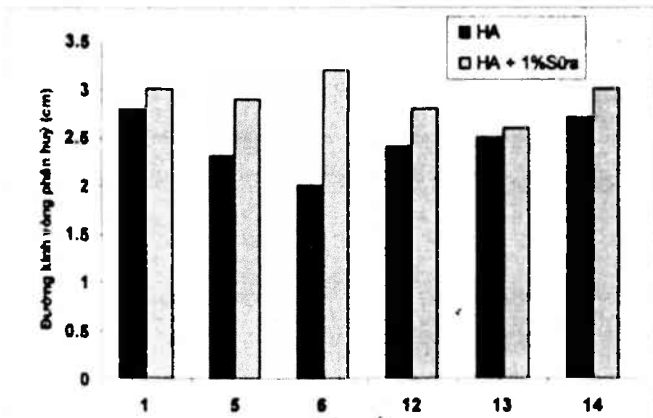
### 3.2 Hoạt tính proteaza

- Các chủng T20 và M27 thể hiện hoạt tính phân huỷ gelatin và phân huỷ sữa gầy, như nêu trong hình 1 trong đó chủng T20 mạnh hơn chủng M27.

- Các chủng TR1, TR5, TR6, TR12 TR13 và TR14 thể hiện một hoạt tính proteaza được cảm ứng bởi 1% sữa gầy, như nêu trong hình 2.



Hình 2. Tác dụng cảm ứng của sữa gầy đối với hoạt tính proteaza của 6 chủng TR.



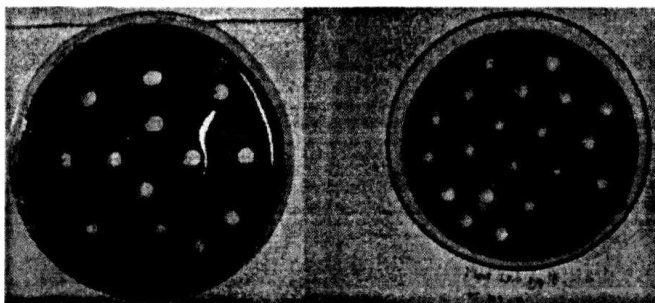
Hình 3. Khả năng phân hủy sữa gầy của 20 chủng (TH1-TH20) trên môi trường MP.

- Các chủng từ TH1 đến TH20 thể hiện khả năng phân hủy sữa gầy như trên hình 3, trong đó các chủng TH5 và TH8 là mạnh nhất.

### 3.3. Hoạt tính amylaza

- Các chủng T20 và M27, trong thử nghiệm cấy điểm, đều thể hiện hoạt tính amylaza, với đường kính vòng phân hủy bằng 19,5 và 20mm theo thứ tự.

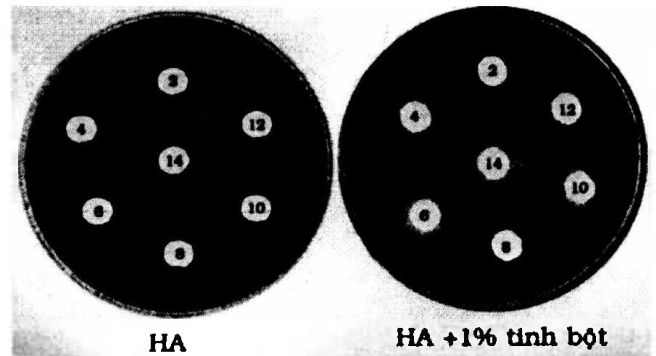
- Các chủng TR4, TR6, TR8, TR10, TR12, và TR14, trong thử nghiệm đục lỗ, mặc dù không thể hiện hoạt tính amylaza ngoại bào trên môi trường HA dịch thể nhưng đã thể hiện hoạt tính này trên môi trường HA dịch thể +1% tinh bột (hình 4).



Hình 4. Tác dụng cảm ứng của tinh bột đối với amylaza của 7 chủng nghiên cứu.

- Các chủng từ TH1 đến TH20, trong thử nghiệm đục lỗ, đều không thể hiện hoạt tính phân hủy tinh bột trên môi trường HA và môi trường HA + 1% tinh bột. Tuy nhiên, nếu glucoza trong môi trường HA được thay thế

bằng tinh bột với cùng lượng thì 17/20 chủng thể hiện vòng phân hủy tinh bột (hình 5).

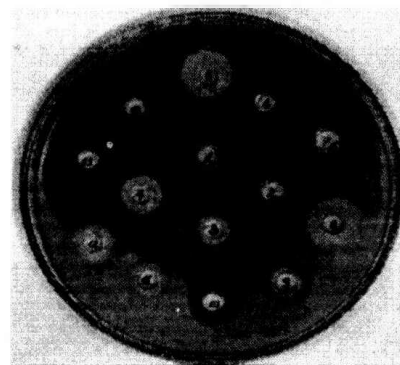


Hình 5. Hoạt tính phân hủy tinh bột của các chủng từ TH1 đến TH20. Bên trái là các lỗ được tra dịch nuôi các chủng trên môi trường HA+1% tinh bột; tất cả các chủng đều không thể hiện hoạt tính phân hủy tinh bột, ở đây chỉ trình bày một số chủng trong đó. Bên phải là các lỗ được tra dịch nuôi các chủng trên môi trường HA trong đó glucoza được thay bằng tinh bột, kết quả là một số chủng thể hiện hoạt tính phân hủy tinh bột.

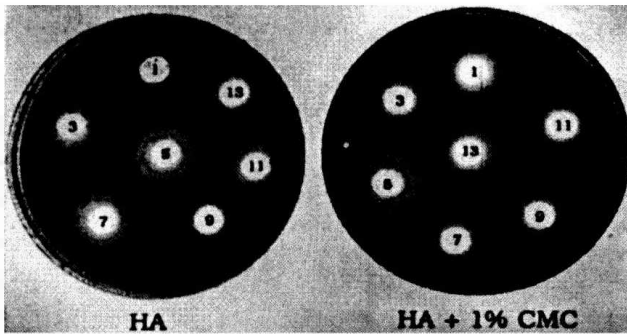
### 3.4. Hoạt tính CMC-aza

- Hai chủng T20 và M27 đều thể hiện hoạt tính CMC-aza ở mức 20mm, theo thử nghiệm cấy điểm trên môi trường MT4.

- Các chủng từ TR1 đến TR14, trừ chủng số 10, tất cả đều thể hiện hoạt tính CMC-aza trên môi trường HA kiềm (hình 6a), và hoạt tính này tăng lên đáng kể nếu môi trường nuôi được bổ sung CMC (hình 6b).

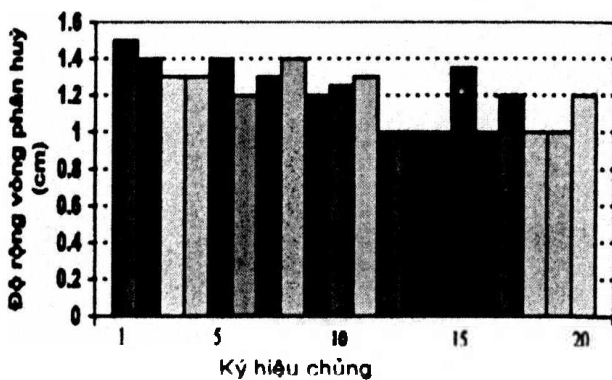


Hình 6a. Các chủng từ TR1 đến TR14 nuôi trên môi trường HA kiềm, trừ chủng số 10, đều thể hiện vòng hoạt tính CMC-aza, theo thử nghiệm đục lỗ.

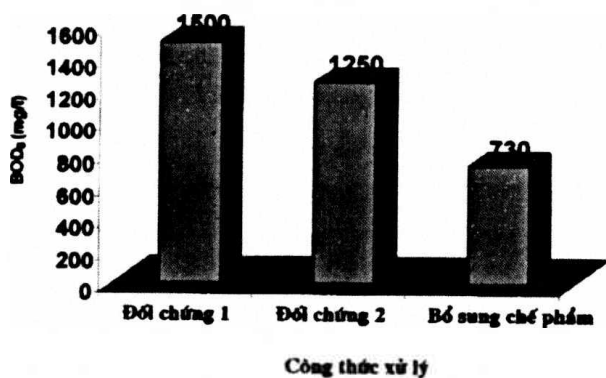


Hình 6b. Các chủng TR mang số hiệu 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 thể hiện một hoạt tính CMC-aza được cảm ứng bằng CMC ở mức độ khác nhau.

Các chủng từ TH1 đến TH20 đều không biểu hiện hoạt tính CMC-aza trên môi trường HA, nhưng 14 chủng trong số đó biểu hiện hoạt tính này trên môi trường HA+1% CMC (hình 7).



Hình 7. Khả năng phân hủy CMC của các chủng từ TH1 đến TH20, theo thử nghiệm đục lỗ. 14 chủng có đường kính vòng phân hủy > 10mm là những chủng có hoạt tính.



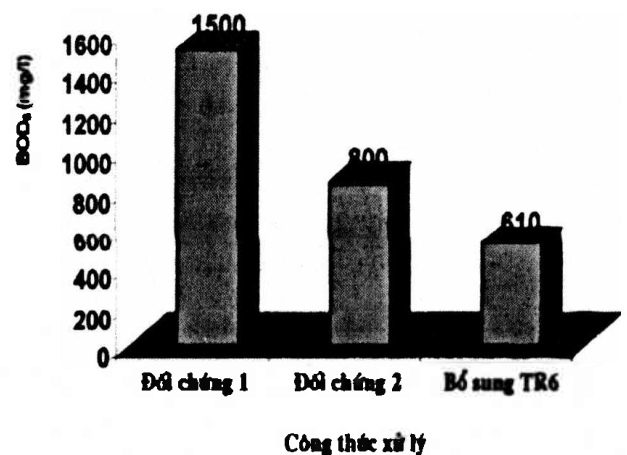
Hình 8. Tác dụng của chế phẩm T20 trong xử lý nước thải. Đối chứng 1: Mẫu nước thải không xử lý. Đối chứng 2: Mẫu nước thải xử lý lắng không bổ sung chế phẩm.

Nhìn chung, cả ba hoạt tính enzym nói trên (proteaza, amylaza và CMC-aza) ở các chủng nghiên cứu là rất đa dạng, cả về mức độ hoạt tính và về mức được cảm ứng. Điều đó tạo nhiều khả năng lựa chọn những chủng thích hợp cho mục đích xử lý môi trường ô nhiễm hữu cơ.

### 3.5. Thăm dò khả năng xử lý nước thải

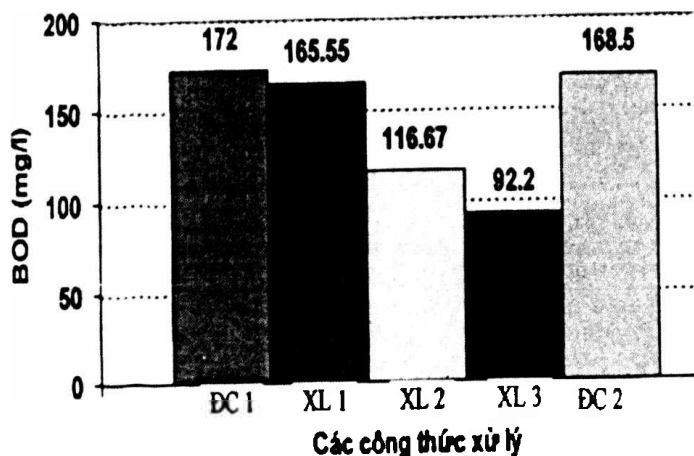
#### 3.5.1. Xử lý nước thải nhà máy sữa Vinamilk Gia Lâm Hà Nội

Dịch nuôi 4 ngày tuổi của chủng T20 trên môi trường HA được loại bỏ tế bào và dùng làm chế phẩm (chế phẩm T20), được bổ sung vào nước thải theo tỷ lệ 1/2 (v/v) và xử lý hiếu khí lắc. Hình 8 cho thấy chế phẩm T20 làm giảm đáng kể BOD<sub>5</sub> của nước thải được xử lý, xuống còn 730, so với 1250mg/L của công thức xử lý lắc không có chế phẩm.



Hình 9. Tác dụng của chế phẩm TR6 trong xử lý nước thải. Đối chứng 1: Mẫu nước thải không xử lý. Đối chứng 2: Mẫu nước thải xử lý lắng không bổ sung chế phẩm.

Trong một thí nghiệm khác, 10ml huyền dịch tế bào TR6 có OD<sub>600</sub> = 0,6 được bổ sung vào 50ml nước thải trước khi xử lý lắc. Hình 9 cho thấy chế phẩm này làm giảm rõ rệt BOD<sub>5</sub> của nước thải, xuống còn 610 so với 800mg/L của mẫu xử lý lắng không bổ sung chế phẩm.



Hình 10. Hiệu quả xử lý nước thải bằng chế phẩm TH5. Hai công thức xử lý với chế phẩm là XL2 và XL3 xem chi tiết trong bài.

### 3.5.2. Xử lý nước thải sông Tô Lịch

Huyền dịch tế bào chủng TH5 có  $OD_{600} = 1,7$  được dùng ở hai nồng độ, như trong các công thức thí nghiệm sau đây:

- + ĐC 1 (đối chứng 1): nước thải trước xử lý.
- + ĐC 2 (đối chứng 2): nước thải để yên không lắc,  $30^{\circ}\text{C}$ , 5 ngày.
- + XL 1: xử lý lắc 200 vòng/phút,  $30^{\circ}\text{C}$ , 5 ngày.
- + XL 2: xử lý lắc có chế phẩm (10ml/50ml nước thải), 200 vòng/phút,  $30^{\circ}\text{C}$ , 5 ngày.
- + XL 3: xử lý lắc có chế phẩm (10m chế phẩm pha loãng gấp đôi/50ml nước thải), 200 vòng/phút,  $30^{\circ}\text{C}$ , 5 ngày.

Hình 10 cho thấy chế phẩm TH5 ở hai nồng độ khác nhau (công thức XL2 và XL3) làm giảm mạnh  $BOD_5$  xuống còn 116,67 và 92,2mg/L theo thứ tự, so với 165,55mg/L ở công thức xử lý không có chế phẩm. Điều đáng chú ý là ở nồng độ thấp của chế phẩm (công thức XL3) hiệu quả xử lý lại cao hơn ở nồng độ cao của chế phẩm (công thức XL2). Điều này có thể liên quan đến một hiệu ứng phụ: việc đưa chế phẩm ở nồng độ cao vào nước thải có thể cũng đưa thêm chất hữu cơ vào đó, do đó bù lại một phần BOD được giảm do tác dụng của chế phẩm. Vì vậy trong thực tiễn xử lý, sử dụng chế

phẩm bào tử có thể là một giải pháp khác nhằm tránh hiệu ứng phụ có thể có vừa nêu.

## 4. Kết luận

Đã phân lập được 236 chủng *Bacillus* từ các mẫu đất và nước thải khác nhau, trong đó đã khảo sát hoạt tính các enzym ngoại bào như proteaza, amylaza và CMC-aza của 236 chủng. Trong số đó, các chủng T20, TR6 và TH5 có tác dụng tốt trong xử lý nước thải. Các giá trị  $BOD_5$  của nước thải nhà máy sữa Vinamilk Gia Lâm Hà Nội được xử lý lắc có và không có dịch nuôi chủng T20 lần lượt là 1250 và 730mg/L. Các giá trị  $BOD_5$  của nước thải ấy được xử lý lắc có và không có huyền dịch tế bào TR6 lần lượt là 800 và 610mg/L. Các giá trị  $BOD_5$  của nước thải sông Tô Lịch xử lý lắc có và không có dịch nuôi chủng TH5 pha loãng lần lượt là 165 và 92mg/L.

## Lời cảm ơn

Công trình có sự hỗ trợ của chương trình NCCB trong KHITN (Bộ KH&CN). Các tác giả xin chân thành cảm ơn PGS.TS Kiều Hữu Ảnh đã đọc và góp cho bản thảo.

## Tài liệu tham khảo

- [1] R. Gupta, Q.K. Beg, P.Lorenz, Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications, *Appl Microbiol Biotechnol* 59 (2002) 15.
- [2] H. Outtrup, T.S. Jorgensen ST, The importance of *Bacillus* species in the production of industrial enzymes. In: *Berkeley R, Heyndrickx M, Logan N, De Vos P* (eds), *Applications and systematics of Bacillus and relatives*, Blackwell publishing, UK, 2002, pp 206-218.
- [3] P.G. Dalev, Utilization of waste feathers from poultry slaughter for production of a protein concentrate, *Bioresour Technol* 48 (1994) 265.

- [4] B.D. Rebeca, Pena-Vera MT, Diaz – Castaneda M, Production of fish protein hydrolysates with bacterial proteases; yield and nutritional value, *J Food Sci* 56 (1991) 309.
- [5] M. Schallmey, A. Singh, P.O.Ward, Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production, *Can J Microbiol* 50 (2004) 1.
- [6] A. Hammed, T. Keshavarz, C.S. Evan, Effect of dissolved oxygen tension and pH on the production of extracellular protease from a new isolate of *Bacillus subtilis* K<sub>2</sub>, for use in leather processing, *J Chem Technol Biotechnol* 74 (1999) 5.
- [7] M. Kubo, J. Okajima, F. Hasumi, Isolation and characterization of soybean waste – degrading microorganisms and analysis of fertilizer effects of the degraded products, *Applied and Environmental Microbiology* 60 (1994) 243.
- [8] F.G. Priest, Extracellular Enzyme synthesis in the Genus *Bacillus*, *Bacteriological Reviews* 41 (1977) 711.

## Study on extracellular enzymes of some newly isolated *Bacillus* strains and their ability to use them for wastewater treatment

Ngo Tu Thanh, Bui Thi Viet Ha, Vu Minh Đức, Chu Van Man

*Faculty of Biology, College of Science, VNU, 334 Nguyen Trai, Hanoi, Vietnam*

236 *Bacillus* strains were isolated from soil and wastewater samples. The activities of extracellular enzymes of 36 isolates were investigated. Most of them secreted extracellular protease, amylase, and carboxymethylcellulase. Under the laboratory conditions, the wastewater treatment with preparations made from strains T20, TR6 and TH5 decreased significantly BOD<sub>5</sub> values of wastewaters. Examples: BOD<sub>5</sub> values of wastewater from Vinamilk Gia Lam Ha Noi treated by shaking without and with cultural fluid of the strain T20 were 1250 and 730 mg/L, respectively; BOD<sub>5</sub> values of wastewater from To Lich river treated by shaking without and with diluted cell suspension of the strain TH5 were 165 and 92 mg/L, respectively.

**Keywords:** *Bacillus*.spp, enzyme, wastewater treatment.