

Khả năng tích lũy photpho và tạo biofilm của chủng *Bacillus licheniformis* A4.2 phân lập tại Việt Nam

Nguyễn Quang Huy*, Ngô Thị Kim Toán

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

Nhận ngày 05 tháng 11 năm 2013

Chỉnh sửa ngày 19 tháng 11 năm 2013; chấp nhận đăng ngày 11 tháng 2 năm 2014

Tóm tắt: Màng sinh học (Biofilm) là cấu trúc tập hợp của vi sinh vật và có vai trò quan trọng trong chu trình dinh dưỡng trên cạn và dưới nước. Nghiên cứu màng sinh học ứng dụng trong xử lý nước thải là một trong những nghiên cứu mới hiện nay giúp giảm ô nhiễm đặc biệt là ô nhiễm nước thải có chứa các hợp chất photpho. Từ các mẫu nước thải thu thập từ một số địa điểm ở Thanh Hóa, Hà Nội chúng tôi đã phân lập được 21 chủng vi sinh vật có khả năng hình thành màng sinh học. Trong số các chủng phân lập, chủng A4.2 ngoài khả năng hình thành màng sinh học còn có hoạt tính phân giải photpho trong môi trường nuôi cấy. Kết quả phân tích về hình thái, đặc điểm sinh lý hóa sinh và so sánh trình tự đoạn gen 16S rRNA cho thấy chủng A4.2 tương đồng 99,9% (1411/1413bp) với *Bacillus licheniformis*_X68416. Chủng A4.2 sau 7 ngày nuôi cấy đã chuyển hóa hoàn toàn lượng photpho trong môi trường tương đương 6 mg/l. Khi tăng hàm lượng photpho lên 18 mg/l chủng A4.2 đã chuyển hóa được 39,32% lượng photpho bổ sung sau 7 ngày nuôi cấy.

Từ khóa: Màng sinh học, tích lũy photpho, *Bacillus licheniformis*.

1. Mở đầu

Màng sinh học (biofilm) là một dạng sống tồn tại phổ biến trong tự nhiên của vi sinh vật. Việc hình thành biofilm đem lại nhiều lợi ích cho bản thân vi sinh vật như giúp tế bào tồn tại và chống chịu được những điều kiện bất lợi, tận dụng được nguồn dinh dưỡng của môi trường thông qua mối quan hệ hợp tác giữa các loài

trong biofilm [1-3]. Theo nghiên cứu của Kokare và cộng sự trong tự nhiên tồn tại nhiều chủng vi khuẩn có hoạt tính tạo biofilm bao gồm các vi khuẩn Gram dương (*Streptococcus* sp., *Bacillus subtilis*...) và vi khuẩn Gram âm (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholera*...). Vi sinh vật tạo biofilm hiện đang được nghiên cứu, ứng dụng trong các lĩnh vực y học, công nghiệp và đặc biệt trong xử lý nước thải. Tại Việt Nam, kết quả nghiên cứu của Nguyễn Quang Huy và cộng sự cũng như Trần Thúy Hằng đã phân lập một số nhóm vi

* Tác giả liên hệ. ĐT: 84-4-38582178.
E-mail: huynq17@gmail.com

sinh vật có hoạt tính tạo biofilm từ các nguồn nước, đất thải ô nhiễm [4,5]. Lê Thị Nhi Công và cộng sự đã phân lập các nhóm vi khuẩn tạo biofilm từ nước biển đồng thời có hoạt tính chuyển hóa các chất độc hại là hydrocarbon thơm đa vòng như naphthalene, anthracene, pyrene [6].

Các hợp chất chứa photpho trong tự nhiên thường khó phân giải [7]. Các nguồn nước thải chăn nuôi, biogas...thường có hàm lượng photpho cao. Theo tiêu chuẩn Việt Nam về nước thải, hàm lượng photpho trong nước thải vượt quá 6 mg/l có thể dẫn đến hiện tượng phú dưỡng (dư thừa các chất dinh dưỡng), gây tác động trực tiếp đến động vật, thực vật và gây ảnh hưởng đến môi trường sinh thái. Việc xử lý nước thải giàu photpho thường khó thực hiện bằng con đường sinh học do trong tự nhiên số lượng loài vi sinh vật phân giải chuyển hóa photpho không nhiều. Một số chủng vi sinh vật phân lập trong tự nhiên có khả năng tích lũy phosphate cao thuộc các chi: *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Bacillus*,...[8,9]. Kết quả nghiên cứu của Bao và cộng sự về khả năng thu nhận tích lũy photpho của các chi vi khuẩn cho thấy sau 20 giờ vi khuẩn thuộc chi *Pseudomonas* có khả năng thu nhận 14,34 mg/l khi tiến hành ở điều kiện yếm khí, chi *Enterobacteriaceae* có khả năng thu nhận 8,91 mg/l, chi *Alcaligenes* là 6,43 mg/l, *Staphylococcus* là 6,23 mg/l, *Bacillus* là 4,41 mg/l ở điều kiện hiếu khí [8]. Sự tích lũy phosphate cung cấp nguồn năng lượng cho vi sinh vật phát triển. Trong cơ thể vi sinh vật, photpho tích lũy ở dạng chủ yếu là phosphate. Phosphate chiếm đến 12% trọng lượng tế bào đối với vi khuẩn có hoạt tính tích lũy phosphate, trong khi ở vi khuẩn không tích lũy phosphate chỉ có khoảng 1-3%. Việc nghiên cứu các chủng vi sinh vật có hoạt tính tạo biofilm đồng thời có hoạt tính phân giải chuyển hóa hợp chất chứa photpho rất có ý nghĩa trong

việc nâng cao việc xử lý nước thải áp dụng phương pháp sinh học. Hiện nay tại Việt Nam chưa có công trình nào đề cập đến việc các vi sinh vật có hoạt tính tạo biofilm đồng thời có khả năng tích lũy photpho. Trong bài báo này chúng tôi trình bày các kết quả nghiên cứu bước đầu về phân lập các chủng vi sinh vật có khả năng tích lũy photpho để làm cơ sở ứng dụng trong việc tạo sản phẩm giúp làm giảm ô nhiễm nước có hàm lượng hợp chất photpho cao.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

Các mẫu nước thải được thu thập tại một số địa điểm có chứa hàm lượng photpho cao như nước thải bể biogas từ Vĩnh Lộc - Thanh Hóa, khu tập trung nước thải của làng Vạn Phúc - Hà Đông - Hà Nội. Các mẫu sau khi được thu thập sẽ được bảo quản lạnh sau đó vận chuyển về phòng thí nghiệm để phân tích trong ngày.

Môi trường nuôi cấy

Môi trường nghiên cứu được sử dụng là môi trường khoáng acetate (AMM) với thành phần: CH_3COONa : 3,68 g; Na_2HPO_4 : 28,73 mg; NH_4Cl : 57,27 mg; MgSO_4 : 131,82 mg; K_2SO_4 : 26,74 mg; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 17,2 mg; HEPES: 12 g; dung dịch khoáng vi lượng: 2 ml; thạch: 15 g; nước cất: 1 lít.

Thành phần dung dịch khoáng vi lượng được sử dụng bao gồm: EDTA: 50 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 5 g; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 1,6 g; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 5 g; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 1,1 g; H_3BO_3 : 50 mg; KI: 10 mg; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 50 mg; nước cất: 1 lít [9].

Đánh giá khả năng tạo màng sinh học

Đánh giá sự hình thành màng sinh học theo phương pháp nhuộm với tím kết tinh. Mật độ tế

bào trong biofilm được xác định bằng cách đo độ hấp thụ ở bước sóng 570 nm [10]. Mật độ tế bào trong môi trường được đánh giá bằng cách đo độ hấp thụ ở bước sóng 620nm.

Phương pháp nghiên cứu ảnh hưởng của các yếu tố môi trường đến sự phát triển và tạo biofilm: Các chủng vi sinh vật có hoạt tính tạo màng biofilm sau khi được phân lập được nuôi cấy ở các nhiệt độ, pH khác nhau trong 24 giờ, sau đó được quan sát, đánh giá khả năng hình thành màng biofilm bằng cách đo độ hấp thụ ánh sáng ở bước sóng 570 nm.

Phân loại chủng vi sinh vật nghiên cứu dựa kit thử API và trình tự gen 16 S rARN

Phương pháp phân loại vi sinh vật được tiến hành bằng quan sát hình thái khuẩn lạc, tế bào qua kính hiển vi điện tử và kính hiển vi quang học, kết hợp với phân tích các đặc điểm sinh lý sinh hóa (kit API, BioMérieux, Pháp). Giải trình tự gen 16S rARN được thực hiện trên máy giải trình tự gen tự động ABI PRISM 3100 Avant (Hoa Kỳ) tại Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, ĐHQG HN. Kết quả giải trình tự được so sánh với trình tự 16S rARN các loài đã có trong ngân hàng gen quốc tế. Ảnh kính hiển vi điện tử được chụp tại Trung tâm Khoa học Vật liệu, Trường ĐH Khoa học Tự nhiên.

Đánh giá khả năng tích lũy photpho

Đánh giá khả năng tích lũy photpho của vi sinh vật thông qua hàm lượng phosphate còn lại

trong môi trường. Hàm lượng phosphate được đánh giá dựa trên nguyên tắc tạo phức giữa gốc phosphate, amonium molybdat và kali antimon tatrát thành một phức chất màu xanh đậm và được đo ở bước sóng 710 nm [11].

3. Kết quả và thảo luận

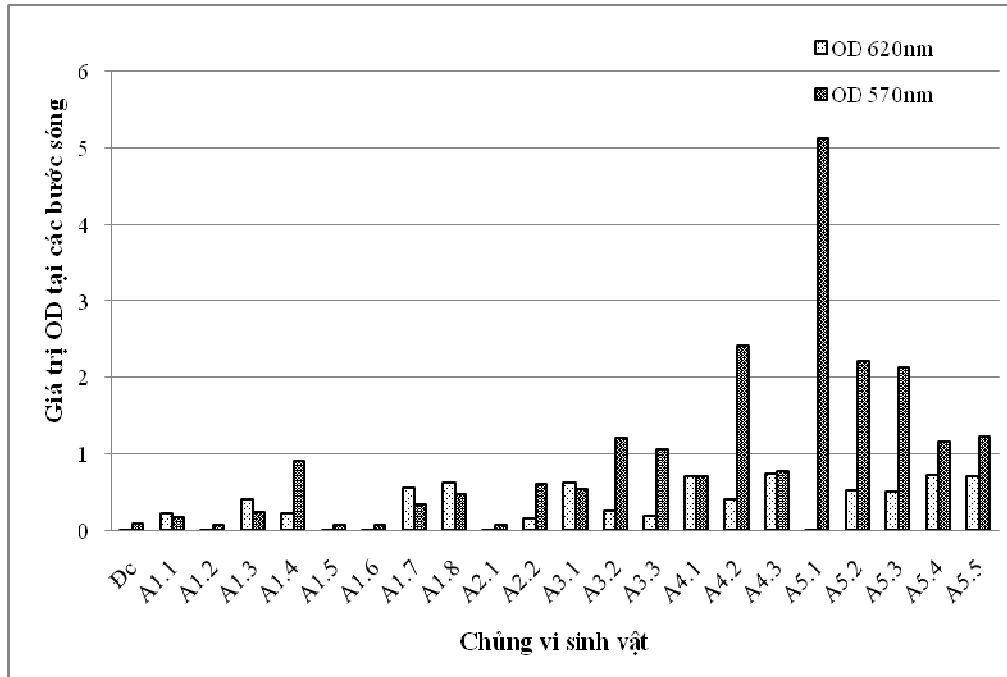
3.1. Phân lập các chủng có khả năng tạo màng sinh học

Từ các mẫu nước thải từ bể xử lý biogas cũng như nước thải tại khu vực nuôi tôm trên môi trường AMM chúng tôi đã phân lập được 21 chủng vi sinh vật (bảng 1). Các chủng vi sinh vật phân lập có đặc điểm chung có màu trắng đục, hơi vàng, hay hồng, hình thái khuẩn lạc tròn, một số khuẩn lạc có viền xung quanh.

Bằng phương pháp nhuộm với tím kết tinh bước đầu chúng tôi đã đánh giá được khả năng hình thành biofilm của 21 chủng vi khuẩn phân lập. Kết quả cho thấy một số chủng vi khuẩn phân lập có khả năng hình thành biofilm, trong đó các chủng A4.2, A5.1, A5.2 và A5.3 có khả năng hình thành màng sinh học tốt nhất so với các chủng còn lại. Giá trị OD tại bước sóng 570 nm của các chủng A4.2, A5.1, A5.2 và A5.3 tương ứng là 2,42; 5,13; 2,01 và 2,14 trong khi các chủng phân lập khác còn lại đều thấp hơn 2,0 (Hình 1).

Bảng 1. Đặc điểm và số lượng chủng vi sinh vật phân lập

Địa điểm thu mẫu	Số lượng chủng phân lập	Ký hiệu
Nước thải từ bể biogas tại Vĩnh Lộc – Thanh Hóa.	13 chủng	Các chủng từ A1.1 đến A1.8; Các chủng A2.1 và A2.2 và các chủng từ A3.1 đến A3.3.
Nước thải khu tập trung rác thải Vạn Phúc – Hà Đông – Hà Nội.	8 chủng	Các chủng từ A4.1 đến A4.3; Các chủng từ A5.1 đến A5.5.

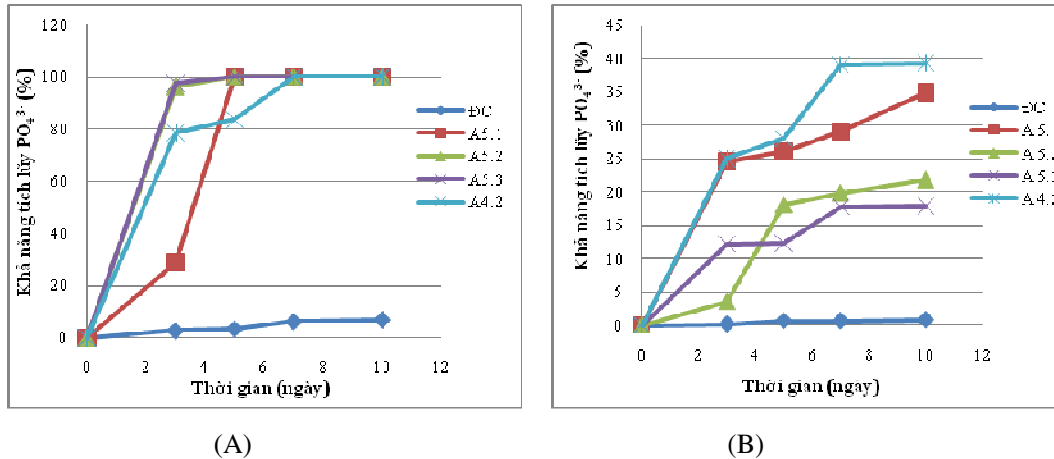


Hình 1. Khả năng tạo biofilm của một số chủng vi sinh vật phân lập.

3.2. Khả năng tích lũy phân giải phosphate của các chủng tạo biofilm

Khả năng sử dụng photpho của các chủng có hoạt tính tạo biofilm phân lập được đánh giá thông qua hàm lượng phosphate được tích lũy trong vi sinh vật dẫn đến việc giảm hàm lượng của hợp chất này trong môi trường nuôi cấy. Kết quả nghiên cứu cho thấy, cả 5 chủng vi sinh vật có hoạt tính tạo biofilm tuyển chọn đều có khả năng tích lũy photpho nhanh và mạnh. Với hàm lượng photpho là 6 mg/l trong môi trường nuôi cấy, cả 4 chủng A5.1, A5.2, A5.3 và 4.2 sau 7 ngày nuôi cấy đã không còn phát hiện

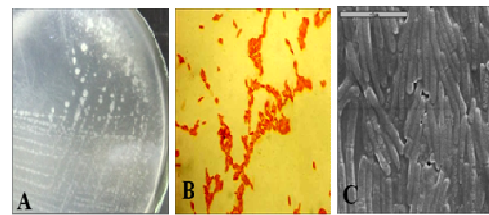
được phosphate còn trong môi trường (hình 2A). Chúng tôi đã tiếp tục bổ sung và tăng hàm lượng photpho trong môi trường nuôi cấy lên gấp 3 lần ở mức 18 mg/l. Tại nồng độ này kết quả nghiên cứu cho thấy chủng A4.2 có khả năng sử dụng phosphate tốt nhất so với các chủng còn lại. Lượng phosphate trong dịch nuôi của chủng A4.2 giảm đi 39,32% sau 7 ngày trong khi với các chủng A5.1, A5.2, A5.3 lượng giảm tương ứng là 29,88%, 20,77% và 17,94% (hình 2B). Đây là những kết quả đầu tiên trình bày về khả năng tích lũy phosphate từ các chủng vi sinh vật tạo biofilm phân lập ở Việt Nam.



Hình 2. Khả năng tích lũy phosphate của 4 chủng vi sinh vật trên môi trường AMM. A: với hàm lượng phosphate 6 mg/l; B: với hàm lượng phosphate 18mg/l.

3.3. Đặc điểm sinh học, phân loại và ảnh hưởng của một số yếu tố môi trường đến sự sinh trưởng tạo màng biofilm của chủng A4.2

Hình thái khuẩn lạc của chủng A4.2 phân lập trên môi trường AMM có hình tròn, nhẵn, màu trắng đục, có các viền tia xung quanh lan toàn bộ mặt thạch (hình 3A). Kết quả nhuộm Gram và quan sát dưới kính hiển vi quang học cho thấy tế bào chủng A4.2 là Gram (+) có hình que, dạng chuỗi (Hình 3B). Khi quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét các tế bào hình que của A4.2 liên kết chặt chẽ với nhau qua mạng lưới ngoại bào, một cấu trúc điển hình của biofilm (Hình 3C). Trên kết quả phân tích về hình thái tế bào và nhuộm Gram có thể kết luận bước đầu chủng A4.2 thuộc chi *Bacillus*.



Hình 3. Hình thái chủng tế bào chủng A4.2 trên môi trường AMM (A), qua kính hiển vi quang học $\times 1000$ lần (B) và qua kính hiển vi điện tử quét $\times 10.000$ lần (C).

Nhiệt độ và pH là một trong những yếu tố có ảnh hưởng đến khả năng hình thành màng sinh học cũng như hoạt tính tích lũy photpho của các chủng vi sinh vật và cũng là một đặc điểm sinh lý hóa sinh phân loại. Kết quả thí nghiệm đánh giá khả năng hình thành màng sinh học của chủng A4.2 ở các điều kiện pH và nhiệt độ khác nhau được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Các yếu tố môi trường ảnh hưởng đến sự phát triển và tạo biofilm của chủng A4.2

Yếu tố môi trường				
Nhiệt độ			Độ pH	
Nhiệt độ (°C)	Khả năng hình thành biofilm (OD 570 nm)	pH	Khả năng hình thành biofilm (OD 570 nm)	
25	0,932 ± 0,0145	4	0,037 ± 0,0068	
30	1,245 ± 0,0464	5	0,020 ± 0,0004	
37	1,290 ± 0,0054	6	1,006 ± 0,1448	
45	1,511 ± 0,0302	7	1,795 ± 0,0335	
50	2,370 ± 0,0145	8	1,065 ± 0,1374	
55	0,458 ± 0,0042	9	0,170 ± 0,0034	

Chủng A4.2 có khả năng hình thành màng sinh học ở nhiệt độ từ 30-50°C và có khả năng hình thành màng biofilm tốt nhất ở 50°C. Đây là một đặc điểm khá chú ý vì các chủng tạo biofilm thường có khả năng chống chịu với các điều kiện bất lợi trong đó có yếu tố nhiệt độ từ môi trường. Chủng A4.2 có thể hình thành màng biofilm tốt ở trong dải pH khá rộng từ 6-8

và tối ưu ở pH môi trường nuôi cấy là 7,0 (Bảng 2). Kết quả này phù hợp với điều kiện mẫu thu thập ở môi trường phân lập cũng như các kết quả nghiên cứu trước đây của Nguyễn Quang Huy [4] và Trần Thuý Hằng [5] về các chủng tạo biofilm phân lập tại các vùng bị ô nhiễm tại Việt Nam.

Bảng 3. Một số đặc điểm sinh hoá của chủng A4.2 theo kit API (BioMérieux)

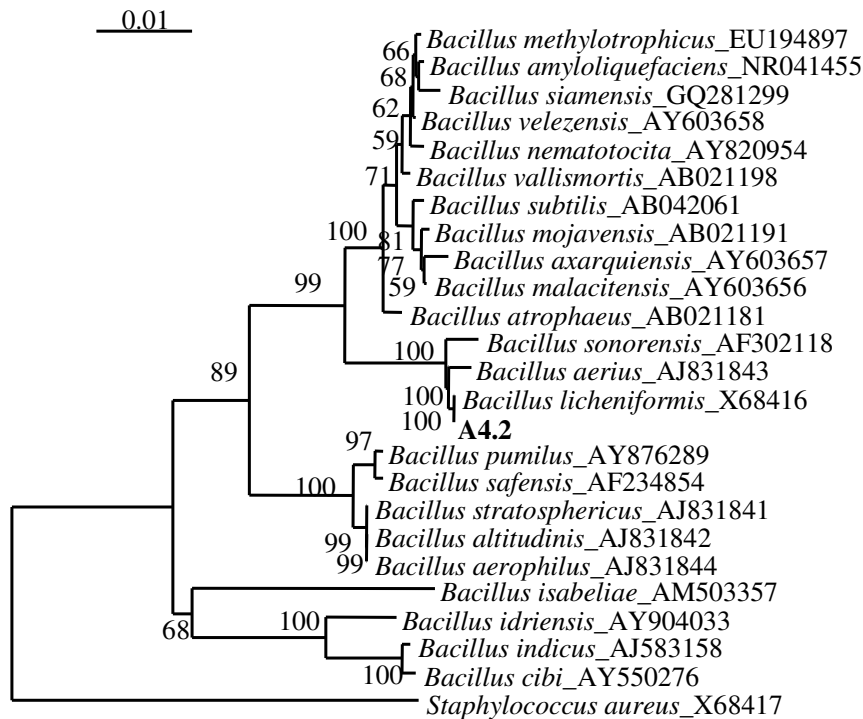
Khả năng sử dụng các chất	Chủng A4.2	Đối chứng <i>Bacillus subtilis</i>
KNO ₃	+	-
L- tryptophan	-	-
L- arginine	+	+
Urea	-	-
Esculin ferric citrate	+	+
Gelatine	+	+
4-nitrophenyl β D-galactopyranoside	+	+
D- glucose	+	+
L- arabinose	+	-
D- mannose	+	+
D- mannitol	+	+
N- acetyl- glucosamine	+	-
D- mantose	+	+
Potassium gluconate	+	+
Capric acid	-	-
Adipic acid	-	-
Malic acid	+	+
Trisodium Citrate	-	-
Phenyl Acetic acid	-	-

Ghi chú: -: Không sử dụng; +: Có sử dụng

Kết quả ở bảng 3 cho thấy chủng A4.2 có thể sử dụng hầu hết các loại cơ chất cacbon khác nhau (bảng 3). Chủng A4.2 cũng sử dụng nitrat, điều này phù hợp với các chủng có khả năng tích lũy phosphate cũng chuyển hóa được hợp chất chứa nitơ trong nghiên cứu của Jorgensen và Pauli [9]. So sánh kết quả phân tích theo kit API so sánh với chủng chuẩn *B. subtilis* tương ứng thì chủng A4.2 có khả năng thuộc chi *Bacillus*.

Kết quả phân tích trình tự gen 16S rARN của chủng A4.2 cho thấy đoạn gen này tương đồng 99,9 % (1411/1413 bp) với đoạn gen 16S

rARN của *Bacillus licheniformis*_X68416 trong ngân hàng gen (Hình 4). Kết hợp với các đặc điểm hình thái, sinh lý sinh hóa, chủng A4.2 có thể là *Bacillus licheniformis*. Kết quả nghiên cứu của Jorgensen và Pauli [9] cũng như kết quả Bao và cộng sự [8] đều cho thấy nhiều loài trong chi *Bacillus* có khả năng tích lũy photpho khá phổ biến trong tự nhiên. *Bacillus cereus* là một trong các chủng vi sinh vật đã được nghiên cứu khả năng thu nhận photpho, ở điều kiện yếm khí sau 2 giờ *B. cereus* đã thu nhận được 13,7 mg/l photpho trong môi trường so với mẫu đối chứng [12].



Hình 4. Cây phát sinh chủng loại dựa vào trình tự 16S rARN của chủng vi khuẩn A4.2 .

4. Kết luận

Đã phân lập tuyển chọn chủng vi khuẩn A4.2 có khả năng sử dụng photpho và tạo màng sinh học từ các mẫu nước thải ô nhiễm tại Việt Nam.

Dựa trên các đặc điểm hình thái tế bào, đặc điểm sinh lý sinh hóa và kết quả phân tích trình tự gen 16S rARN cho thấy chủng A4.2 thuộc loài *Bacillus licheniformis*.

Chủng vi khuẩn *Bacillus licheniformis* A4.2 sau 7 ngày nuôi cấy đã chuyển hóa hoàn toàn 6 mg/l photpho trong môi trường nuôi cấy.

Lời cảm ơn

Công trình được hoàn thành với kinh phí từ đề tài: “Nghiên cứu phát triển công nghệ màng

sinh học trong xử lý nước thải giàu N, P” do Bộ Công thương tài trợ. Công trình có sử dụng các trang thiết bị của Phòng thí nghiệm Trọng điểm công nghệ Enzym và Protein, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên.

Tài liệu tham khảo

- [1] CR. Kokare, S. Chakraborty, AN. Khopade, KR. Mahadik, Biofilm: Importance and applications, Ind. J. Biotechnol. 8 (2009) 159.
- [2] HC. Flemming, 1993, Biofilm and environmental protection, Wat. Scien. Technol, 27(1993) 1.
- [3] V. Lazarova, J. Manem, Innovative biofilm treatment technologies for water and wastewater treatment, Biofilms II: process analysis and applications, Wiley-Liss, New York, United States. (2000) 159.

- [4] NQ. Huy, NTP. Lien, TT. Hang, Characterization of biofilm-forming bacteria isolated from soil in Vietnam, *J. Science VNU*. 27(2S) (2011) 187.
- [5] TT. Hang, NQ. Huy, Isolate biofilm forming *Bacillus* strains from contamination site in trade villages in Vietnam, *J. Science VNU*. 27(2S) (2011) 157.
- [6] LT N. Cong, HT. Huyen, NN. Minh, Phenol degradation of biofilm formed by mixing-marine bacteria, *J. Science VNU*. 28 (2S) (2012) 75.
- [7] WAJ. Benthum, MDM. Loosdrecht, JJ. Heijnen, Control of heterotrophic layer formation on nitrifying biofilms in a biofilm airlift suspension reactor. *Biotechnol. Bioeng.* 53(4) (1997) 397.
- [8] LL. Bao, L. Dong, H. Xiang-kun, Z. Rong-xin, L. Jie, X. Yang, Guang-qing, Photphorus accumulation by bacteria isolated from a continuous-flow two-sludge system, *J. Environ. Sci.* 19 (4) (2007) 391.
- [9] K. Jørgensen, A. Paulii, Polyphosphate accumulation among denitrifying bacteria in activated sludge, *Anaerobe*. 1 (1995) 161.
- [10] GA. O'Toole, R. Kolter, The initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis, *Mol. Microbiol.* 28 (1998) 449.
- [11] APHA/AWWA/WEF, Standard methods for the examination of water and wastewater, 19th ed (1995), Washington, DC.
- [12] M. Sidat, F. Bux, H. Kasan, Polyphosphate accumulation by bacteria isolated from activated sludge, *Water SA*. 25 (2) (1999) 175.

Phosphorus Accumulation by *Bacillus licheniformis* A4.2 Isolated from Vietnam

Nguyễn Quang Huy*, Ngô Thị Kim Toán

Faculty of Biology, VNU University of Science, 334 Nguyễn Trãi, Hanoi, Vietnam

Abstract: Biofilms can be defined as communities of microorganisms. Biofilms are applied in medicine, industry and wastewater treatment. In this study, we have isolated 21 bacteria strains on acetate mineral medium (AMM). Among these isolate, four strains A4.2, A5.1, A5.2, and A5.3 showed strong biofilm forming ability. Strain A4.2 was highest phosphorus accumulation among four strains. This bacterium was formed biofilm optimal temperature at 50°C and optimal pH at 7. This strain use to much substance such as D- glucose, L- arabinose, D- mannose, D- maltose for growth. 16S rRNA sequence analysis of strain A4.2 indicated that strain was related phylogenetically to *Bacillus* genus. Strain A4.2 was 99.9% similarity in 16S rRNA sequence with *Bacillus licheniformis*_X68416 in Gene bank. Strain *Bacillus licheniformis* A4.2 has completely degraded 6 mg per liter of photphorus in the culture media and accumulated 39.32% (18 mg per liter) photphorus supplemented in the medium after 7 days.

Keywords: *Bacillus licheniformi*, biofilms, photphorus accumulation.