

NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG SINH TRƯỞNG VÀ SINH TỔNG HỢP XENLULOZA CỦA MỘT SỐ CHỦNG *Bacillus* PHÂN LẬP Ở VIỆT NAM

NGUYỄN THẾ TRANG, NGUYỄN THỊ HỒNG HÀ

*Viện Công nghệ sinh học,
Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam*

NGUYỄN THÚY ANGA

*Viện Khoa học năng lượng,
Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam*

Biện pháp sinh học trong xử lý ô nhiễm môi trường hiện rất phổ biến và được triển khai mạnh. Trong đó, sử dụng vi sinh vật môi trường đang là giải pháp có nhiều triển vọng. Nhiều chủng vi sinh vật môi trường đã được sử dụng hữu hiệu để giải quyết triệt để vấn đề ô nhiễm nước thải, rác thải mà các công nghệ trước đây như kỹ thuật kỵ khí, hiếu khí chưa làm được. Trong quá trình xử lý bã thải thì vi sinh vật đóng vai trò quyết định nhất trong việc chuyển hóa hợp chất hữu cơ khó phân hủy như xenluloza và những thành phần còn lại trong bã thải thành những nguồn cacbon dễ hấp thụ cho cây trồng. Tuy nhiên, hiện nay công nghệ này vẫn chưa được đầu tư đúng mức nên nhiều các mô hình hiệu quả chưa được nhân rộng [2; 5; 6; 7].

I. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

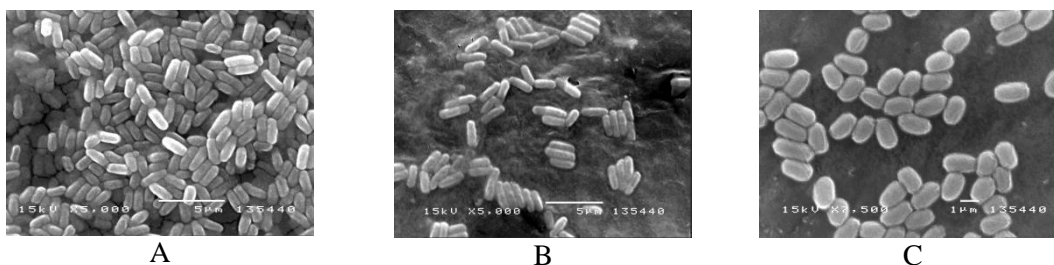
Vật liệu: Ba chủng vi khuẩn *B. licheniformis* ĐA15; *B. subtilis* ĐA33 và *B. megaterium* NT09 trong Bộ sưu tập giống Phòng Công nghệ vật liệu sinh học, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Môi trường: *Môi trường nuôi cấy vi khuẩn:* MPA (g/l): cao thịt 3; pepton 5; NaCl 5; agar 20; nước cất 1.000 ml. *Môi trường xác định hoạt lực enzym:* MPA-CMC (g/l): cao thịt 3; pepton 5; NaCl 5; CMC 1%; agar 20; nước cất 1.000 ml.

Phương pháp nghiên cứu: Xác định hình thái tế bào và khả năng sinh trưởng theo Nguyễn Lân Dũng và cs. [1]. Định lượng hoạt tính xenlulaza bằng phương pháp đường khử của Bernfeld [3] với đường chuẩn nồng độ của glucoza theo phương trình $y = 2,8096x + 0,1064$, trong đó: y là độ hấp phụ (OD) ở bước sóng 540 nm, x là nồng độ glucoza (mg/ml).

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào



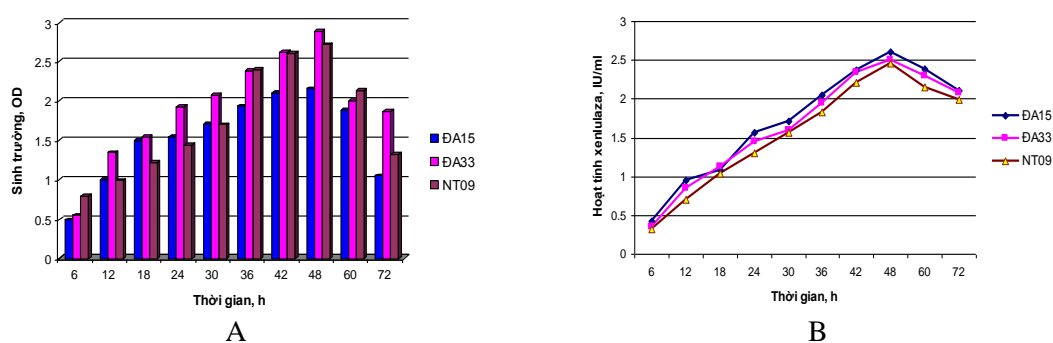
Hình 1: Hình thái tế bào các chủng vi khuẩn

B. licheniformis ĐA15 (A) ; *B. subtilis* ĐA33 (B) ; *B. megaterium* NT09 (C)

Đặc điểm hình thái tế bào của các chủng vi khuẩn nghiên cứu được xác định khi nuôi cấy trên môi trường MPA, sau 24-48 giờ quan sát hình tế bào. Kết quả Hình 1 cho thấy 2 chủng ĐA15 và ĐA33 đều có tế bào hình que dài, kích thước từ 1-5 μm . Chủng NT09 có tế bào hình que ngắn hơn, kích thước 1-2 μm .

2. Ảnh hưởng của thời gian đến sinh trưởng và sinh tổng hợp xenlulaza

Ảnh hưởng của thời gian đến sinh trưởng của các chủng vi khuẩn: Thời gian là yếu tố cần thiết cho sinh trưởng của bất cứ loài nào, thời gian nào là thời điểm vi sinh vật sinh trưởng mạnh nhất tùy thuộc vào mỗi loài. Ba chủng vi khuẩn lựa chọn được nuôi cấy trên môi trường MPA, nhiệt độ 37°C, điều kiện lắc 200 vòng/phút. Sau khi cấy giống thu mẫu 6 giờ một lần, tiến hành đo OD với bước sóng 600 nm. Kết quả trình bày ở Hình 2 cho thấy thời gian tối ưu cho sinh trưởng của 3 chủng vi khuẩn là 48 giờ, OD chủng ĐA15 đạt 2,155, ĐA33: 2,89, NT09: 2,715. Từ 6-48 giờ các chủng sinh trưởng rất nhanh. Từ 48 giờ trở đi sinh trưởng của các chủng nghiên cứu giảm dần. Các chủng vi khuẩn lựa chọn được nuôi trong môi trường MPA lỏng có bổ sung 0,1% CMC, nuôi 37°C, lắc 200 vòng/phút. Lấy mẫu dịch nuôi cấy cứ sau 6 giờ một lần, xác định khả năng sinh tổng hợp xenlulaza của các chủng nghiên cứu.



Hình 2: Ảnh hưởng thời gian đến sinh trưởng (A) và sinh tổng hợp xenlulaza (B)

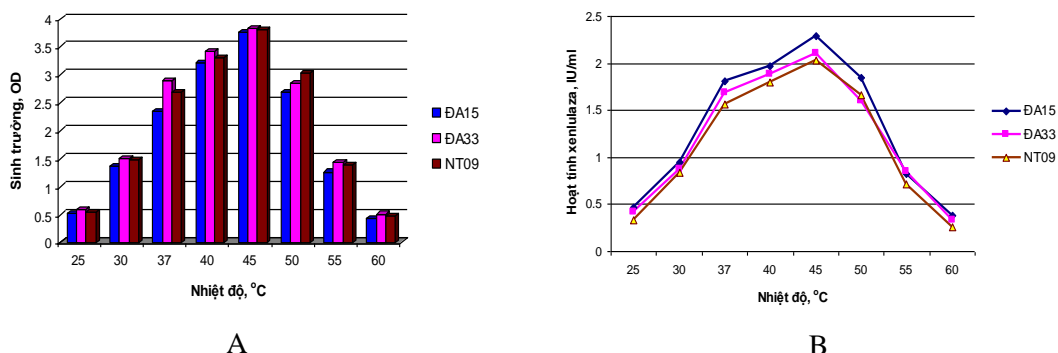
Kết quả hình 2B cho thấy 3 chủng vi khuẩn sau 6 giờ nuôi cấy, lượng enzym sinh ra tăng liên tục nhưng tương đối khác nhau. Chủng ĐA15 từ 6-24 giờ tăng nhanh, sau đó chậm dần, tiếp tục tăng nhanh từ 42-48 giờ, lượng enzym sinh ra nhiều nhất tại thời điểm 48 giờ, đạt 2,6 IU/ml, ở hình 2A cho thấy chủng ĐA33 và NT09 lượng sinh khối sinh ra rất lớn song khả năng sinh tổng hợp xenlulaza không cao bằng chủng ĐA15. Hai chủng còn lại cũng đạt lượng enzym cao nhất ở 48 giờ, chủng ĐA33 đạt 2,5 IU/ml, chủng NT09 đạt 2,45 IU/ml. Sau 48 giờ lượng enzym sinh ra của cả 3 chủng đều giảm.

3. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy đến khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp xenlulaza

Chịu được nhiệt độ cao là một trong những tiêu chí quan trọng trong ứng dụng xử lý phế thải làm phân bón. Chúng tôi tiến hành nuôi cấy các chủng vi khuẩn ở dải nhiệt độ: 25, 30, 37, 40, 45, 50, 55 và 60°C. Các chủng vi khuẩn nuôi trên môi trường MPA, lắc 200 vòng/phút. Sau 48 giờ nuôi cấy chúng tôi tiến hành đánh giá sự sinh trưởng. Kết quả được thể hiện ở hình 3.

Kết quả ở hình 3A cho thấy các chủng vi khuẩn có khả năng chịu được nhiệt độ khá cao, ở 25-30°C chủng sinh trưởng yếu nhưng từ 37 - 50°C chủng sinh trưởng rất tốt, cả 3 chủng đạt tối ưu ở nhiệt độ 45°C, ĐA15 OD đạt 3,76, ĐA33 đạt 3,82, NT09 đạt 3,8. Ở 55-60°C 3 chủng sinh trưởng yếu. Nhiệt độ là yếu tố rất quan trọng, nó quyết định sự sinh trưởng và sinh tổng hợp enzym của các chủng vi sinh vật. Để xác định ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng sinh enzym xenlulaza, ba chủng vi khuẩn được nuôi trong môi trường MPA, lắc 200 vòng/phút và nuôi ở các dải nhiệt độ 25, 30, 37, 40, 45, 50, 55, 60°C. Sau 48 giờ nuôi cấy tiến hành lấy kết quả. Kết quả hình 4b cho thấy dải nhiệt độ sinh tổng hợp xenlulaza của ba chủng vi khuẩn từ 37-50°C và nhiệt độ sinh tổng hợp xenlulaza tối ưu là 45°C, chủng ĐA15 đạt 2,3 IU/ml, ĐA33 đạt 2,1 IU/ml, NT09 đạt 2 IU/ml. Nếu nhiệt độ nuôi cấy dưới 37°C và cao hơn 50°C thì khả năng sinh xenlulaza của các chủng đều yếu. Qua kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh

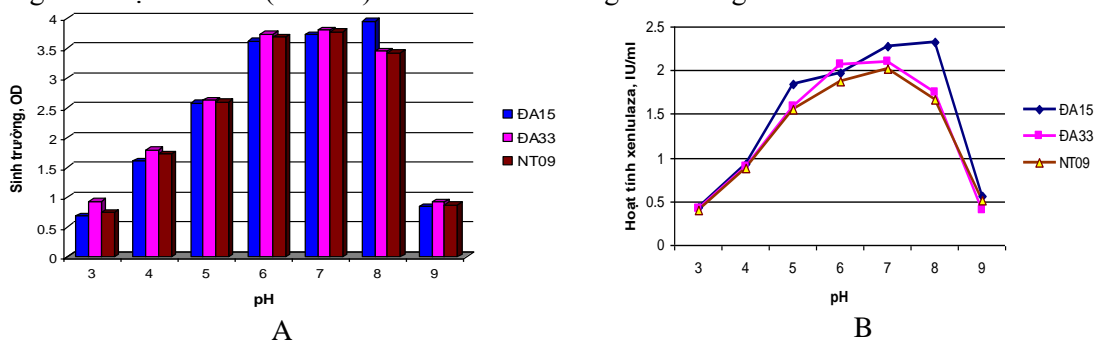
trường và sinh tổng hợp xenlulaza cho thấy cả ba chủng lựa chọn đều là thuộc nhóm vi sinh vật ưa nhiệt, phù hợp với yêu cầu xử lý bã thải.



Hình 3: Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh trưởng (A) và sinh tổng hợp xenlulaza (B)

4. Ảnh hưởng của pH môi trường đến khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp xenlulaza

pH môi trường ảnh hưởng rất lớn đến sinh trưởng của các vi sinh vật. Với mục tiêu chọn chủng có khả năng phân giải xenluloza để xử lý bã thải thì chủng vi sinh vật có khả năng tồn tại ở dải pH rộng là rất cần thiết. Chủng nghiên cứu được nuôi trong môi trường MPA lỏng, nhiệt độ 45°C, lắc 200 vòng/phút, và dải pH môi trường là: 3; 4; 5; 6; 7; 8 và 9. Nuôi trong thời gian 48 giờ thu dịch đo OD (600 nm) kiểm tra sinh trưởng của chủng.

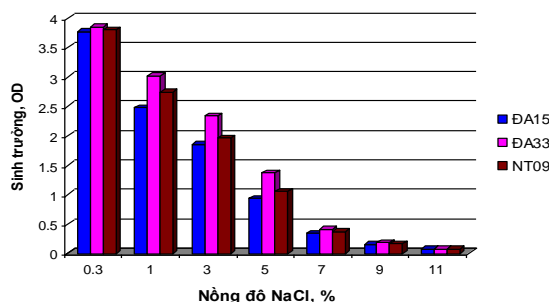


Hình 4: Ảnh hưởng của pH đến sinh trưởng (a) và sinh tổng hợp xenlulaza (b)

Kết quả trên cho thấy 3 chủng lựa chọn có thể sinh trưởng ở dải pH rộng 3-9, pH tối ưu của chủng ĐA15 ở pH 8, OD đạt 3,95, ĐA33 đạt 3,81, NT09 đạt 3,78 và hai chủng này tối ưu ở pH 7. Nếu sử dụng các chủng này vào xử lý bã thải có khoảng pH từ 6-8. Độ pH môi trường không chỉ ảnh hưởng tới sinh trưởng của vi khuẩn mà còn tác động rất lớn đến quá trình sinh tổng hợp xenlulaza của chủng. Để nghiên cứu sự ảnh hưởng đó, 3 chủng lựa chọn được nuôi cấy trong môi trường MPA lỏng và ở dải pH 3-9, nhiệt độ 45°C, lắc 200 vòng/phút. Sau 48 giờ lấy dịch làm đường khử thu kết quả. Hình 5b trên cho thấy pH 7 là pH tối ưu cho sinh tổng hợp enzym của 2 chủng ĐA33 (2,1 IU/ml) và NT09 (2 IU/ml), chủng ĐA15 sinh tổng hợp xenlulaza cao nhất ở pH 8 đạt 2,28 IU/ml

5. Ảnh hưởng của nồng độ NaCl đến sinh trưởng của các chủng vi khuẩn

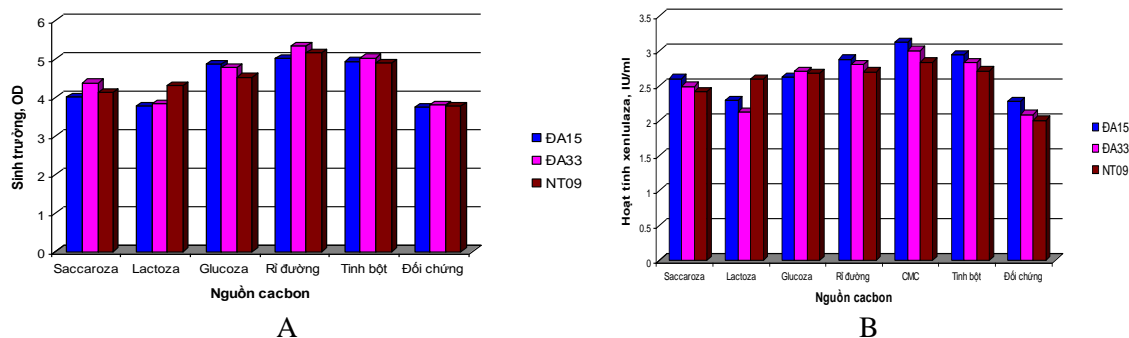
Ba chủng vi khuẩn được nuôi trong môi trường MPA nhưng thay thế nồng độ NaCl từ 0,3% bằng dải nồng độ 1, 3, 5, 7, 9 và 11%, điều kiện 45°C, lắc 200 vòng/phút, sau 48 giờ nuôi cấy lấy mẫu xác định sinh trưởng bằng phương pháp đo mật độ quang OD (600 nm). Kết quả trình bày trên Hình 5 cho thấy ở nồng độ 0,3% (đôi chứng) và nồng độ 1-5% ba chủng sinh trưởng tốt, từ 7% NaCl các chủng sinh trưởng yếu và gần như không sinh trưởng ở nồng độ 9-11%.



Hình 5: Ảnh hưởng của nồng độ NaCl đến sinh trưởng của các chủng vi khuẩn

6. Ảnh hưởng của nguồn cacbon đến sinh trưởng và sinh tổng hợp xenlulaza

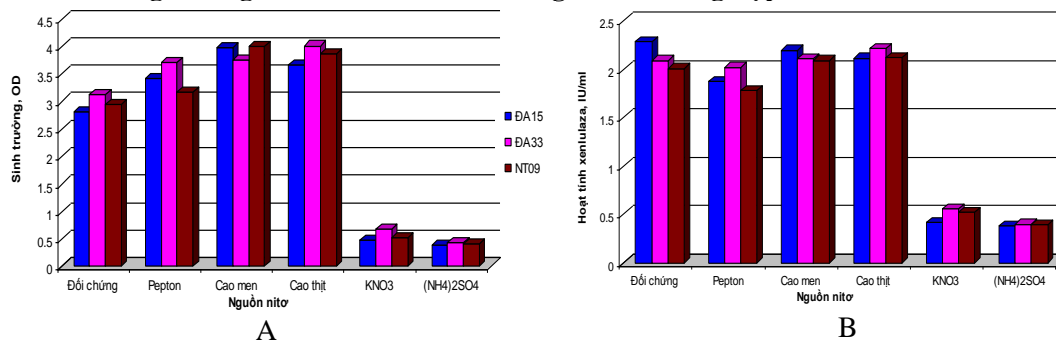
Nghiên cứu ảnh hưởng của nguồn cacbon lên sinh trưởng và sinh tổng hợp xenlulaza của các chủng vi khuẩn trên các nguồn cơ chất khác nhau, chủng vi khuẩn được nuôi trên môi trường cơ sở bổ sung glucoza, lactoza, sacaroza, tinh bột, CMC và ri đường, dưới điều kiện nhiệt độ 45°C, lắc 200 vòng/ phút. Sau 48 giờ nuôi cấy thu kết quả và được trình bày dưới Hình 6.



Hình 6: Ảnh hưởng của nguồn cacbon đến sinh trưởng (A) và sinh tổng hợp xenlulaza (B)

Hình 6 cho thấy các chủng sinh trưởng tốt trên môi trường có nguồn cacbon là glucoza, ri đường và tinh bột. Trong đó nguồn ri đường có tác dụng tốt lên sinh trưởng của các chủng ĐA15 sinh trưởng OD đạt 5,02, ĐA33 đạt 5,33, NT09 đạt 5,17. Hoạt lực xenlulaza nhận được từ các nguồn cacbon khác nhau của các chủng có khác nhau. Trong các loại cơ chất dùng thí nghiệm thì CMC và tinh bột và ri đường có ảnh hưởng tốt nhất lên sinh tổng hợp xenlulaza của các chủng. Lactoza là nguồn cacbon không thích hợp cho sinh trưởng và sinh tổng hợp xenlulaza của 2 chủng ĐA15 và ĐA33.

7. Ảnh hưởng của nguồn nitơ đến sinh trưởng và sinh tổng hợp xenlulaza



Hình 7: Ảnh hưởng của nguồn nitơ đến sinh trưởng (A) và sinh tổng hợp xenlulaza (B)

Trong thành phần của môi trường cơ sở nuôi cấy vi khuẩn chủ yếu là nguồn nitơ, vì vậy nitơ có ảnh hưởng rất lớn đến sinh trưởng và sinh tổng hợp xenlulaza của các chủng vi khuẩn. Để nghiên cứu ảnh hưởng đó, các chủng vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường cơ sở trong đó nguồn nitơ được thay thế với lượng tương ứng bằng nguồn nitơ khác: pepton, cao men, cao thịt, KNO_3 , $(NH_4)_2SO_4$. Kết quả được trình bày dưới hình 7.

Kết quả hình 7 cho thấy các chủng vi khuẩn thích hợp với nguồn nitơ hữu cơ: pepton, cao men, bột đậu tương. Hầu hết các nguồn nitơ hữu cơ không ức chế sinh tổng hợp xenlulaza của các chủng vi khuẩn.

III. KẾT LUẬN

Đã nghiên cứu lựa chọn được một số điều kiện nuôi cấy thích hợp cho sinh trưởng và sinh tổng hợp xenlulaza của 3 chủng vi khuẩn đều sinh trưởng tốt ở khoảng nhiệt độ 37-50°C, điều này cho thấy chúng đều là những vi sinh vật ưa nhiệt, có khả năng sinh trưởng ở pH rộng từ 5-8, khả năng chịu NaCl từ 1-5. Sinh trưởng đạt cực đại sau 42 giờ và sinh tổng hợp xenlulaza đạt cực đại của chủng ĐA15 đạt 2,6 IU/ml, chủng ĐA33 đạt 2,5 IU/ml và chủng NT09 đạt 2,45 IU/ml sau 48 giờ nuôi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Lâm Dũng, Đoàn Xuân Mượu, Nguyễn Phùng Tiến, Đặng Đức Trạch, Phạm Văn Ty, 1977. Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học, Nxb. KH KT, Hà Nội, Tập 3.
2. Trần Đình Mẫn, Nguyễn Thế Trang, Phan Thị Tuyết Minh, Nguyễn Văn Xuân, 2009. Xây dựng mô hình xử lý rác thải sinh hoạt bằng công nghệ vi sinh tại thị trấn Lâm - Ý Yên - Nam Định, Báo cáo khoa học Hội nghị Công nghệ sinh học Toàn quốc 2009, Nxb. Đại học Thái Nguyên: 924-927.
3. Bernfeld, A. P., 1995. Methods in Enzymology, 1: 149-158.
4. Bhat, M. K., 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. Biotech. Adv, 18: 355-383.
5. Jiayang Cheng, Bin Liu, 2011. Journal of Environment Engineering, 127 (8): 705-711.
6. Annamalai N., R. Thavasi, S. Vijayalakshmi, T. Balasubramanian, 2011. World J Microbiol Biotechnol, 27: 2111-2115.
7. Schwarz W.H., 2002. Appl.Microbiol, Biotechnol, 56: 634-649.

THE GROWN AND SYNTHETIC CAPACITY OF CELLULASE BY SOME *Bacillus* STRAINS ISOLATED IN VIETNAM

NGUYEN THE TRANG, NGUYEN THI HONG HA, NGUYEN THUY NGA

SUMMARY

Currently biological measures in handling environmental pollution is very popular and powerful deployment. In this field, microbial environment approach is the best studied of the world, focusing on microorganisms isolated from nature or creation of new microbial strains capable nurturing, forming probiotics. The use of environmental microorganisms are considered effective measures to solve the problem thoroughly polluted waste water, waste that previous technologies such as engineering anaerobic, aerobic not done. In the process, the microbial residues play a decisive role in the metabolism of organic compounds such as cellulose persistent and the rest of the residues into easily absorbed carbon source for plants. However, current technologies have not been properly invested so much less efficient models to be replicated.