

PHÂN LẬP VÀ ĐÁNH GIÁ ĐẶC TÍNH CỦA CHỦNG VI KHUẨN CÓ KHẢ NĂNG TẠO MÀNG SINH HỌC ĐỊNH HƯỚNG ỨNG DỤNG TRONG XỬ LÝ NƯỚC THẢI

Trần Thị Đào¹, Nguyễn Thị Thanh Phương¹, Nguyễn Thành Trung²,
Nguyễn Huy Thuận², Đỗ Thị Hạnh³, Nguyễn Xuân Cảnh^{1*}

¹Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

²Trung tâm Sinh học phân tử, Trường Y - Dược, Đại học Duy Tân

³Khoa Công nghệ hóa, Đại học Công nghiệp Hà Nội

*Tác giả liên hệ: nxcanh@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 23.06.2020

Ngày chấp nhận đăng: 24.02.2021

TÓM TẮT

Màng sinh học được tạo bởi các vi sinh vật sống bám dính và liên kết với nhau trên bề mặt cơ chất. Hệ thống màng sinh học đã được nghiên cứu, ứng dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau, đặc biệt là xử lý ô nhiễm môi trường. Nghiên cứu này nhằm tìm kiếm và xác định các chủng vi khuẩn có khả năng tạo màng sinh học định hướng ứng dụng trong xử lý nước thải làng nghề. Từ 15 mẫu nước thải thu thập tại làng bún Khắc Niệm, Bắc Ninh, 23 chủng vi khuẩn có khả năng tạo màng sinh học đã được phân lập và xác định đặc tính bằng phương pháp cấy trải trên môi trường LB. Trong đó, 7 chủng vi khuẩn có khả năng tạo màng sinh học tốt nhất gồm B22.5, B22.8, B22.9, B22.10, B22.11, B22.18 và B22.20 đều có khả năng đối kháng với 4 hoặc 5 chủng vi khuẩn kiểm định; 4 chủng có khả năng nhũ tương hóa dầu ăn cao đạt trên 60%. Chủng vi khuẩn đại diện B22.9 đã được xác định thuộc chi *Bacillus* spp., vi khuẩn gram dương, có khả năng hình thành màng sinh học tốt nhất trong môi trường có bổ sung glucose hoặc fructose, ở nhiệt độ 37°C, pH 7.

Từ khóa: Màng sinh học, vi khuẩn, xử lý nước thải.

Isolation and Characterization of Biofilm-Forming Bacteria for Application Potential in Wastewater Treatment

ABSTRACT

Biofilm is a complex structure that is formed by the adherence of living-organisms on their surfaces. The biofilm has been well studied and effectively applied in various-different fields, particularly in solving polluted environmental issues. This research aimed to find and identify the biofilm-forming bacteria which can be used in wastewater treatment in trade villages. Total 23 strains of formed biofilm bacterium were isolated from 15 wastewater samples collected from Khắc Niệm village (Bac Ninh province) where produced rice noodles by spreading on the agar LB medium. There were strains, viz. B22.5, B22.8, B22.9, B22.10, B22.11, B22.18, and B22.20, were not only composed of the highest ability to form biofilm but also resisted to four or five pathogenic bacterial strains. Additionally, 04 strains (B22.5, B22.9, B22.10, and B22.18) had a high emulsifying activity of biosurfactants with an emulsification index above 60%. The complementary study of identifying the biological characteristics of representative strain B22.9 showed that this strain belongs to the *Bacillus* spp., which is gram-positive and having the ability to form a biofilm at high temperatures. The optimum conditions for this strain to form biofilm are on LB medium adding glucose or fructose as a carbon source at 37°C, pH 7, respectively.

Keywords: Biofilm, bacteria, wastewater treatment.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Màng sinh học (biofilm) là một cấu trúc

phức tạp, được tạo ra bởi các vi sinh vật sinh trưởng và bám dính trên bề mặt chất nền (Dunne, 2002). Màng sinh học có thể được tạo ra

từ các nhóm vi sinh vật khác nhau bao gồm vi khuẩn, nấm mốc, nấm men... nhưng phổ biến nhất vẫn là vi khuẩn, các nghiên cứu đã xác định hầu hết các loài vi khuẩn đều có khả năng tạo màng sinh học. Vi khuẩn có thể hình thành màng sinh học trên các loại bề mặt môi trường rắn, lỏng hoặc trên bề mặt môi trường bán lỏng. Quá trình hình thành màng sinh học xảy ra theo một trật tự: bắt đầu bằng sự hấp thụ các hạt dinh dưỡng hữu cơ và vô cơ trên bề mặt môi trường; tiếp đó là sự bám dính của những vi sinh vật đầu tiên vào các hạt dinh dưỡng hữu cơ và vô cơ đó; những vi sinh vật này sinh trưởng và sinh sản tạo thành những khuẩn lạc đầu tiên; sau cùng là sự hình thành phức hệ màng sinh học (Dang & Lovell, 2000). Sự hình thành màng sinh học được xem như là một xu hướng chung của vi khuẩn để sống sót trong tự nhiên (O'Toole & cs., 2000), bởi màng sinh học giúp chúng chống lại các chất kháng sinh, sát trùng, chống lại tác động của một số kim loại nặng, các cation và chất độc; đồng thời bảo vệ tế bào tránh khỏi nhiều yếu tố bất lợi từ môi trường như sự thay đổi độ pH, bức xạ tia cực tím, áp suất thẩm thấu và sự khô hạn (Kokare, 2009).

Màng sinh học đang thu hút sự quan tâm nghiên cứu và ứng dụng của các nhà khoa học trong nhiều lĩnh vực như xử lý nước thải, xử lý sự cố tràn dầu, ứng dụng trong y học và trong bảo quản thực phẩm, ứng dụng trong công nghiệp dầu khí nhằm nâng cao hệ số thu hồi dầu. Trong lĩnh vực xử lý nước thải, hệ thống màng sinh học được phát triển dựa trên công nghệ mà ở đó, môi trường rắn được thêm vào để tạo môi trường huyền phù làm bề mặt bám dính cho các vi sinh vật, từ đó làm tăng nồng độ vi sinh vật cũng như giảm tỉ lệ tạp nhiễm trong màng sinh học, tạo điều kiện thuận lợi cho các quá trình sinh học như phân hủy, tích lũy, hấp thụ sinh học hoặc khoáng hóa sinh học. Cộng đồng vi sinh vật trong màng sinh học phân hủy các yếu tố dinh dưỡng khác nhau như các hợp chất chứa photpho, hợp chất chứa nitơ, các nguồn vật liệu carbon cũng như là khả năng bẫy các tác nhân gây bệnh trong nước thải. Khi các nhân tố gây ô nhiễm nước bị loại bỏ thì nguồn nước sau đó có thể đưa vào môi trường để sử

dụng cho nông nghiệp hoặc phục vụ các mục đích khác (Dhumadurai & Nooruddin, 2016).

Theo thống kê, làng bún Khắc Niệm (TP. Bắc Ninh) có 150 hộ làm bún, công suất trung bình từ 5 đến 6 tạ bún/hộ/ngày. Nguồn nước thải từ quá trình sản xuất bún được xả trực tiếp ra cống rãnh, kênh mương mà không qua xử lý với tổng lượng nước trên 3.000 m³/ngày, gây ô nhiễm không khí, ảnh hưởng đến sức khỏe con người và sinh vật xung quanh. Kết quả phân tích chất lượng nước thải làng nghề sản xuất bún Khắc Niệm của Chi cục Bảo vệ môi trường tỉnh Bắc Ninh cho thấy, các chỉ tiêu cơ bản để đánh giá chất lượng nước như COD, BOD, hàm lượng Coliform đều cao hơn tiêu chuẩn cho phép từ 20-30 lần (Sở TN&MT Bắc Ninh, 2017). Ở Việt Nam, nghiên cứu ứng dụng màng sinh học trong xử lý nước thải cũng đã được quan tâm, nhưng khả năng ứng dụng và triển khai chưa cao. Một trong những nguyên nhân chính là do chưa lựa chọn được chủng vi sinh vật phù hợp để tối ưu trong quá trình tạo màng sinh học. Nghiên cứu này được đặt ra nhằm tìm kiếm, phát hiện và tối ưu điều kiện tạo màng sinh học của một số chủng vi khuẩn định hướng ứng dụng trong xử lý nước thải làng nghề.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Phân lập vi khuẩn có khả năng tạo màng sinh học

Mẫu nước thải sau khi thu thập được sử dụng để tiến hành phân lập vi khuẩn trên môi trường thạch LB ở điều kiện nhiệt độ 37°C. Sau khi phân lập, các chủng vi khuẩn này được đánh giá khả năng tạo màng sinh học theo phương pháp mô tả bởi O'Toole & cs. (2000). Vi khuẩn được nuôi trong bình tam giác có thể tích 100ml chứa 10ml môi trường LB lỏng, lắc 200 vòng/phút ở 37°C cho đến khi mật độ tế bào đạt OD₆₀₀ = 0,3-0,4. Bổ sung 100μl dịch nuôi cấy vi khuẩn vào ống eppendorf chứa 700μl môi trường LB lỏng, ủ ở 37°C trong điều kiện tĩnh. Sau 24 giờ, loại bỏ dịch nuôi cấy khỏi ống eppendorf, bổ sung 1ml dung dịch tím kết tinh 1% được vào ống eppendorf và giữ ở nhiệt

độ phòng trong 20 phút. Loại bỏ dung dịch tím kết tinh và tráng ống eppendorf hai lần bằng nước cất, quan sát sự bắt màu của các tế bào bám trên thành ống với tím kết tinh, mẫu nào bắt màu nhiều thì mẫu vi khuẩn đó có khả năng tạo màng sinh học tốt.

Mật độ tế bào trong màng sinh học tạo ra được đánh giá theo phương pháp của Morikawa & cs. (2000) như sau: các tinh thể tím bám trên thành eppendorf được hòa tan trong 1ml cồn 70°, mật độ tế bào trong màng sinh học được xác định bằng cách đo độ hấp thụ quang ở bước sóng OD₅₇₀ nm.

2.2. Ảnh hưởng của điều kiện nhiệt độ và pH môi trường nuôi cấy, nguồn dinh dưỡng carbon và nguồn dinh dưỡng nitơ khác nhau đến khả năng tạo màng sinh học của chủng vi khuẩn được tuyển chọn

Chủng vi khuẩn có khả năng tạo màng sử dụng trong nghiên cứu (chủng B22.9) được nuôi trong bình tam giác 100ml chứa 10ml môi trường LB lỏng, lắc 200 vòng/phút ở các điều kiện nhiệt độ 20°C, 30°C, 37°C, 40°C, 50°C và 60°C. Sau 24 giờ nuôi cấy, 100µl dịch nuôi cấy vi khuẩn được bổ sung vào ống eppendorf chứa 700µl môi trường LB lỏng, ủ ở 20°C, 30°C, 37°C, 40°C, 50°C và 60°C trong điều kiện tĩnh. Sau 24 giờ nuôi cấy khả năng tạo màng sinh học của chủng vi khuẩn được xác định theo phương pháp của O'Toole & cs. (2000). Thí nghiệm được tiến hành tương tự để đánh giá ảnh hưởng của pH môi trường với dải pH từ pH 5 đến 10. Giá trị pH môi trường được xác định bằng máy đo pH để bàn (Martini Mi150). Dung dịch NaOH 1N và HCl 1N được sử dụng để điều chỉnh giá trị pH môi trường trong thí nghiệm. Nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng của nguồn dinh dưỡng được thực hiện bằng cách bổ sung 1% các nguồn đường (Arabinose, Rhamnose, Glucose, Fructose, Saccharose, Lactose) hoặc 0,1% các nguồn nitơ khác nhau ((NH₄)₂SO₄, NaNO₃, KNO₃, pepton, cao nấm men) vào môi trường cơ bản có pH 7, nuôi cấy tĩnh ở điều kiện 37°C trong 24h sau đó xác định khả năng tạo màng sinh học thông qua giá trị OD₅₇₀.

2.3. Đánh giá khả năng tạo chất hoạt động bề mặt

Phương pháp được thực hiện theo Nitschke & cs. (2005): Các chủng vi khuẩn đã tuyển chọn được nuôi trong môi trường LB lỏng, lắc với tốc độ 200 vòng/phút ở nhiệt độ 37°C. Sau 24h, dịch nuôi được ly tâm với tốc độ 10.000 vòng/phút trong 10 phút, loại bỏ cặn tế bào, thu phần dịch nổi. Bổ sung 2ml dầu ăn vào 2ml dịch vi khuẩn thu được sau khi ly tâm trong các ống nghiệm nhỏ, đường kính 1cm. Vortex với tốc độ cao trong 1 phút. Sau 24 giờ, thực hiện đo mức độ nhũ tương hóa. Khả năng tạo thành chất hoạt động bề mặt của các chủng vi sinh vật được đánh giá bằng mức độ nhũ tương hóa dầu ăn của dịch nuôi cấy tế bào sau 24 giờ thí nghiệm thông qua chỉ số E24. Dịch nuôi cấy vi khuẩn có khả năng nhũ hóa dầu ăn được nhận biết khi màu của dịch nuôi cấy phía dưới chuyển sang màu trắng đục và làm lớp dầu ăn phía trên trên xuất hiện bọt trắng sữa.

E24 (emulsion index) = [(chiều cao cột nhũ tương hóa)/(tổng chiều cao cột)] × 100%

2.4. Phương pháp đánh giá khả năng kháng khuẩn

Phương pháp được thực hiện theo De Angelis & cs. (2006): Chủng vi khuẩn tuyển chọn được nuôi trong bình tam giác có thể tích 100ml chứa 10ml môi trường LB lỏng, lắc 200 vòng/phút giờ ở 37°C. Sau 24h nuôi cấy, 1ml dịch nuôi được ly tâm 10.000 vòng/phút trong 10 phút thu phần dung dịch nổi, Phần dung dịch nổi này được nhỏ vào giếng thạch trên đĩa petri đã được cấy trải vi khuẩn kiểm định, ủ qua đêm ở 37°C. Thể tích dung dịch nhỏ vào giếng là 100µl. Khả năng kháng khuẩn của chủng vi khuẩn tuyển chọn được thể hiện qua vòng vô khuẩn xuất hiện quanh giếng thạch.

$$\Delta D = D - d$$

trong đó:

D: đường kính vòng vô khuẩn (mm);

d: đường kính lỗ thạch (mm);

1mm ≤ D - d < 5mm: hoạt tính đối kháng yếu;

Phân lập và đánh giá đặc tính của chủng vi khuẩn có khả năng tạo màng sinh học định hướng ứng dụng trong xử lý nước thải

$5\text{mm} \leq D - d < 10\text{mm}$: hoạt tính đối kháng mạnh).

2.5. Định danh chủng tuyển chọn bằng phương pháp so sánh trình tự gen mã hóa 16S rRNA

Gen mã hóa cho vùng 16S rRNA của chủng được tuyển chọn được nhân lên bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') và 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTACGACTT-3'). Sản phẩm PCR sau đó được gửi đi giải trình tự bằng phương pháp Sanger cải tiến. Trình tự hoàn chỉnh sau đó được so sánh với ngân hàng dữ liệu Gene của NCBI bằng công cụ BLAST. Nội dung nghiên cứu này được thực hiện tại trường đại học Duy Tân, Đà Nẵng.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập, tuyển chọn các chủng vi khuẩn có khả năng hình thành màng sinh học

Từ 15 mẫu nước thải thu thập tại các địa điểm khác nhau tại làng bún Khắc Niệm-Bắc Ninh, trên môi trường LB, 23 chủng vi khuẩn đã được phân lập và được ký hiệu lần lượt từ B22.1 đến B22.23. Các chủng vi khuẩn này sau đó được sử dụng để tiến hành xác định khả năng hình thành màng sinh học. Kết quả cho thấy, màu tím kết tinh được phát hiện trên thành ống nuôi của đa số các chủng vi khuẩn phân lập được, đồng nghĩa với việc trên thành các ống này có vi khuẩn bám. Tuy nhiên, lượng vi khuẩn bám trên thành mỗi ống lại khác nhau. Điều đó chứng tỏ, đa số các chủng vi khuẩn đều có khả năng tạo màng sinh học nhưng khả năng tạo màng sinh học của mỗi chủng là khác nhau (Hình 1).

Khả năng tạo màng sinh học của các chủng vi khuẩn đã phân lập tiếp tục được đánh giá thông qua tỉ lệ giữa giá trị OD_{600} của dịch nuôi cấy được loại bỏ khỏi ống eppendorf để đánh giá mật độ vi khuẩn sống tự do trong dung dịch nuôi và giá trị OD_{570} đánh giá mật độ vi khuẩn tạo màng sinh học bám trên thành trong ống

eppendorf. Giá trị OD_{600}/OD_{570} càng nhỏ, chứng tỏ vi khuẩn có khả năng tạo màng sinh học lớn và ngược lại. Kết quả nghiên cứu thể hiện trên hình 2 cho thấy, 07 chủng phân lập B22.5, B22.8, B22.9, B22.10, B22.11, B22.18 và B22.20 có khả năng tạo màng sinh học tốt với tỉ lệ OD_{600}/OD_{570} thấp, lần lượt là 0,50; 0,57; 0,29; 0,36; 0,18; 0,42; 0,28. Trong đó, chủng B22.11 có tỉ lệ OD_{600}/OD_{570} thấp nhất với giá trị 0,18 thể hiện khả năng tạo màng sinh học tốt nhất. Giá trị OD_{600}/OD_{570} được xác định cũng tương đồng với lớp màng sinh học dày đặc bám trên thành trong ống eppendorf của chủng B22.11 được thể hiện ở hình 1. Kết quả nghiên cứu này phù hợp với nghiên cứu của Hoàng Phương Hà & cs. (2013), đã phân lập và tuyển chọn được 02 chủng vi khuẩn từ các mẫu nước thải được thu thập tại Hà Nội có khả năng tạo màng sinh học lớn là chủng NLI-6 và NLI-7 với giá trị OD_{620}/OD_{570} đạt lần lượt là 0,38 và 0,32. Tác giả Nguyễn Quang Huy & Ngô Thị Kim Toán (2014) cũng đã phân lập được 04 chủng vi khuẩn có khả năng hình thành biofilm mạnh trong số 21 chủng vi khuẩn được phân lập từ nước thải giàu phospho ở Hà Nội và Thanh Hóa, bao gồm các chủng A4.2, A5.1, A5.2 và A5.3. Saori & cs. (2009) đã phân lập, tuyển chọn được 06 chủng *Pseudoalteromonas* (SB-A1/A2, SB-B1, SB-E1, SB-G1/G2) và 05 chủng *Vibrio* (SB-G3/G4, SB-H1, SB-I1/I2) có khả năng hình thành lớp màng sinh học dày từ mẫu bùn ao nuôi cá.

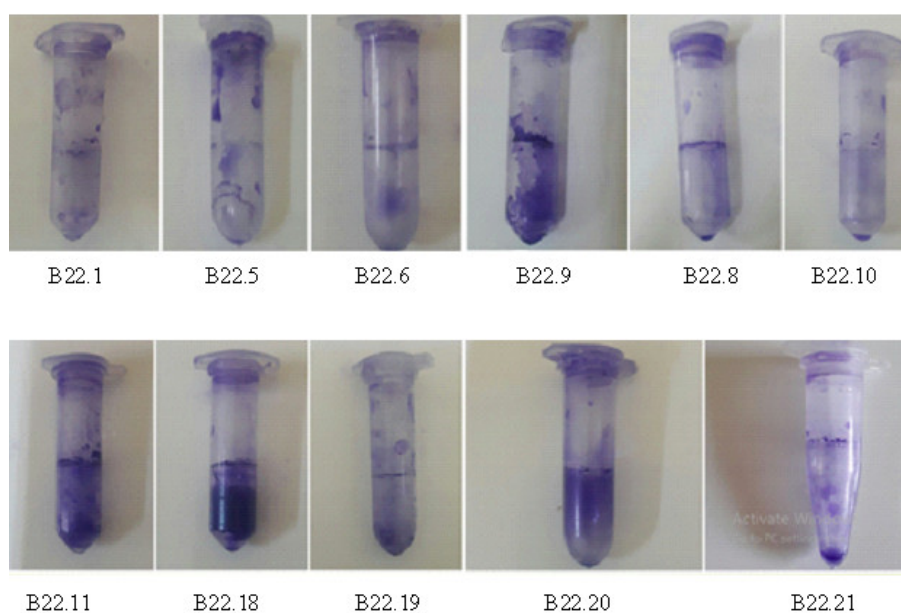
3.2. Khả năng tạo chất hoạt động bề mặt của các chủng vi khuẩn có khả năng tạo màng sinh học cao

Bảy chủng vi khuẩn có khả năng tạo màng sinh học tốt nhất được sử dụng để đánh giá khả năng nhũ tương hóa dầu ăn, chủng nào có chỉ số nhũ tương hóa cao thì khả năng tạo chất hoạt động bề mặt cao. Kết quả cho thấy, trong số 07 chủng thử nghiệm có 04 chủng gồm B22.5, B22.9, B22.10, B22.18 có khả năng nhũ tương hóa dầu ăn cao, chỉ số nhũ tương hóa của 04 chủng này lần lượt là 72,97%, 69,44%, 68,75% và 82,71% (Hình 3). Kết quả nghiên cứu này cũng phù hợp với nghiên cứu của Abraham & cs. (2016) đã phân lập được chủng *Acinetobacter*

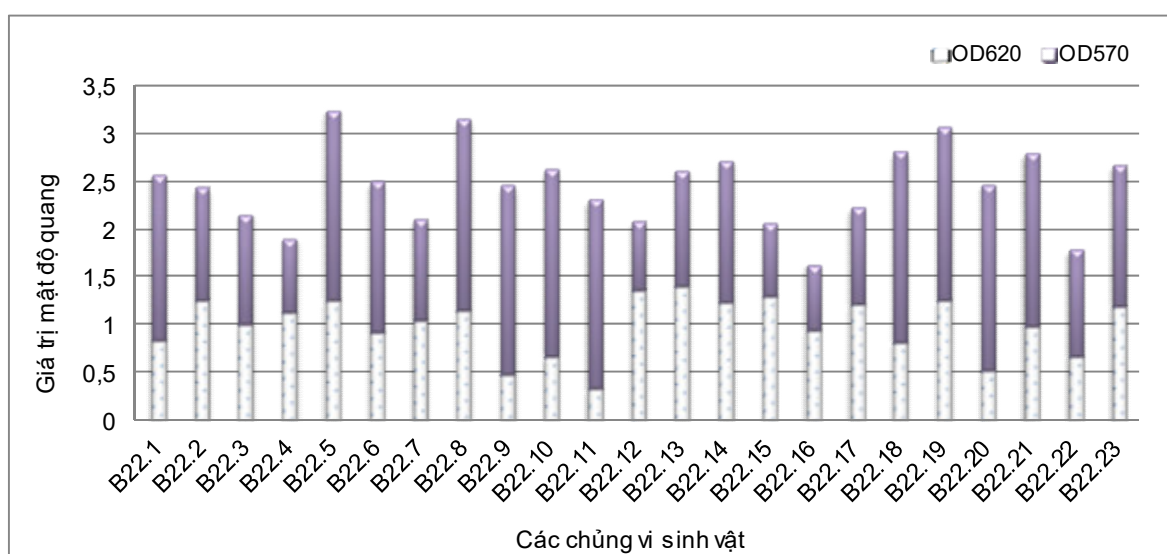
M6 vừa có khả năng tạo màng sinh học vừa có khả năng sinh chất hoạt động bề mặt tốt.

Chất hoạt động bề mặt sinh học là hợp chất trao đổi thứ cấp không độc hoặc có độc tính thấp được sinh ra bởi vi sinh vật như vi khuẩn, nấm mốc, nấm men trong môi trường nuôi cấy chứa hợp chất hữu cơ là nguồn carbon (Wael & cs., 2019). Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng các phân tử chất hoạt động bề mặt có thể tạo điều kiện thuận lợi cho sự gắn kết và phát triển của

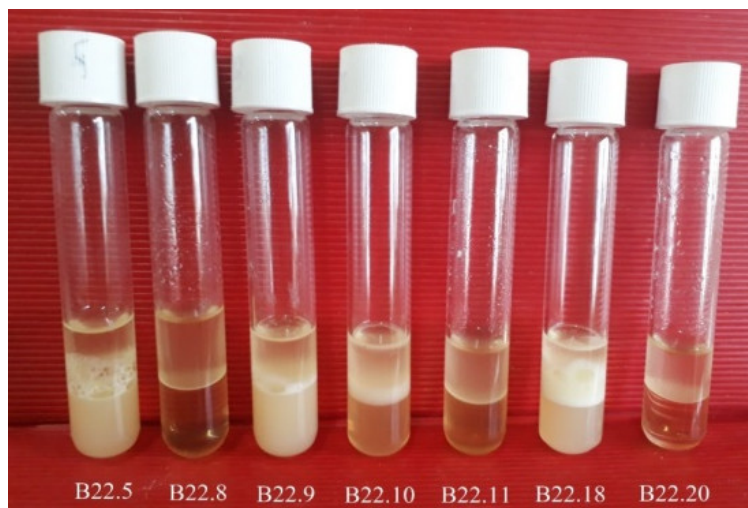
vi sinh vật trên một bề mặt. Bởi chúng làm giảm sức căng bề mặt và nhờ đó tăng cường khả năng lan rộng và bám dính của vi sinh vật, hình thành màng nổi hay màng bám dính với bề mặt rắn. Đồng thời, chất hoạt động bề mặt cũng tạo phức với các phân tử kim loại nặng, làm giảm độc tính cho vi sinh vật trong môi trường sống của chúng. Như vậy, chất hoạt động bề mặt sinh học có liên quan tới khả năng tạo màng sinh học của vi sinh vật.



Hình 1. Màng sinh học của các chủng vi khuẩn phân lập hình thành trên thành ống khi nhuộm bằng tím tinh thể



Hình 2. Khả năng tạo biofilm của các chủng vi khuẩn phân lập



Hình 3. Khả năng nhũ hóa dầu ăn của các chủng vi khuẩn có khả năng tạo màng sinh học cao

3.3. Khả năng kháng vi sinh vật kiểm định của các chủng vi khuẩn tuyển chọn

Với mục tiêu sử dụng các chủng vi khuẩn có khả năng tạo màng sinh học để ứng dụng trong xử lý nước thải cũng như giảm ô nhiễm môi trường, các chủng vi khuẩn đã tuyển chọn được sử dụng để đánh giá khả năng đối kháng với một số chủng vi khuẩn có khả năng gây bệnh thường xuất hiện trong môi trường nước thải như *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Aeromonas hydrophila* và *Micrococcus sp.* Hoạt tính đối kháng của các chủng vi khuẩn tuyển chọn được xác định bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch, được mô tả như trong nội dung phương pháp. Kết quả cho thấy, các chủng vi khuẩn nghiên cứu đều có khả năng đối kháng với các chủng vi khuẩn kiểm định. Tuy nhiên, mỗi chủng vi khuẩn có khả năng tạo màng sinh học khác nhau có khả năng ức chế sinh trưởng với mỗi chủng vi khuẩn kiểm định khác nhau. Trong đó, chủng B22.5 và B22.8 ức chế sinh trưởng yếu với các chủng vi sinh vật kiểm định. Chủng B22.10 ức chế sinh trưởng mạnh với các chủng *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* và *Aeromonas hydrophila*. Chủng B22.18 có khả năng ức chế sinh trưởng tốt với các chủng *Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophila* và *Micrococcus sp.* Chủng B22.20 có khả năng đối

kháng mạnh với chủng *Staphylococcus aureus* và ức chế sinh trưởng yếu với 04 chủng vi khuẩn kiểm định còn lại. Trong khi đó, chủng B22.11 có khả năng ức chế sinh trưởng mạnh với cả hai chủng vi khuẩn kiểm định là *Escherichia coli* và *Staphylococcus aureus*. Chủng B22.9 có khả năng ức chế sinh trưởng yếu với *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* và *Salmonella typhi* nhưng lại có khả năng ức chế sinh trưởng mạnh với cả hai chủng *Aeromonas hydrophila* và *Micrococcus sp.*

3.4. Ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy đến khả năng hình thành màng sinh học của các chủng vi khuẩn tuyển chọn

Các kết quả nghiên cứu bên trên cho thấy 03 chủng vi khuẩn gồm B22.9, B22.10, B22.18 vừa có khả năng tạo màng sinh học cao, vừa có khả năng sinh chất hoạt động bề mặt tốt, vừa có khả năng đối kháng với vi sinh vật kiểm định tốt và phổ rộng. Đánh giá sơ bộ về hình thái đã xác định, cả ba chủng vi khuẩn được lựa chọn này đều là trực khuẩn gram dương, có khuẩn lạc màu trắng sữa, nhẵn, bề mặt khuẩn lạc lõm. Nghiên cứu tiếp theo nhằm xác định các điều kiện môi trường thích hợp để tối ưu hóa việc tạo màng của các chủng đã tuyển chọn. Do 03 chủng đã lựa chọn có nhiều đặc điểm chung nên chủng B22.9 được sử dụng làm chủng đại diện cho các nghiên cứu tiếp theo.

Phân lập và đánh giá đặc tính của chủng vi khuẩn có khả năng tạo màng sinh học định hướng ứng dụng trong xử lý nước thải

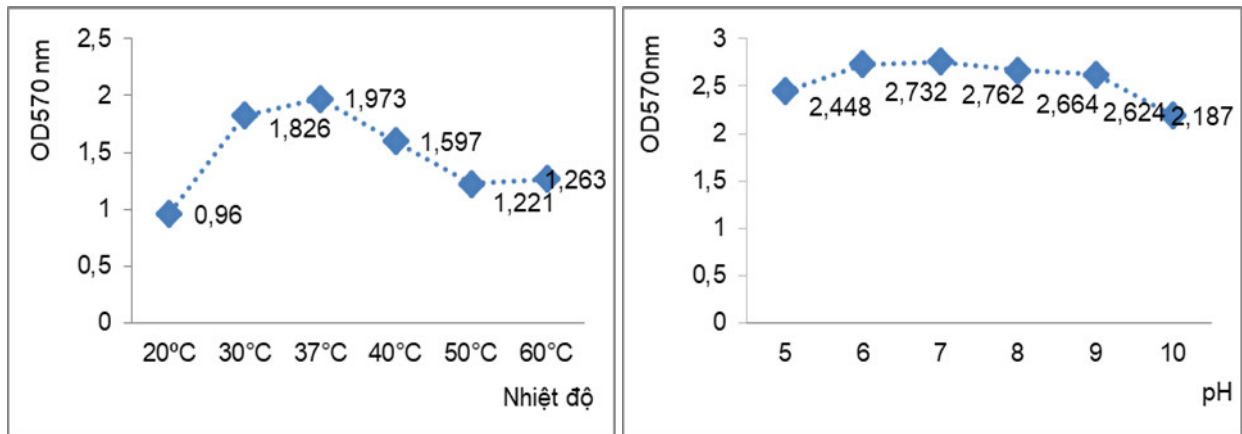
3.4.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ và pH môi trường

Chủng vi khuẩn B22.9 được đánh giá khả năng hình thành màng sinh học ở các mốc nhiệt độ nuôi cấy 20°C, 30°C, 37°C, 40°C, 50°C và 60°C cũng như trên môi trường có pH từ pH 5 đến pH 10, việc thực hiện đánh giá được mô tả như nội dung phương pháp.

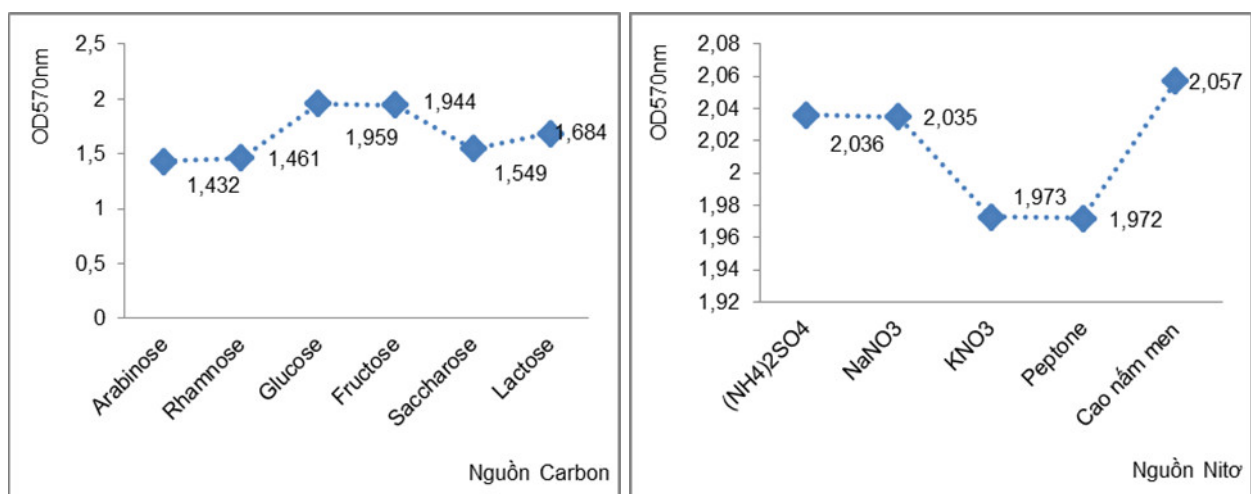
Kết quả cho thấy, chủng vi khuẩn B22.9 có khả năng tạo màng sinh học tốt ở điều kiện môi trường có nhiệt độ từ 30°C đến 40°C và pH từ 5-9. Tuy nhiên, nhiệt độ và pH tối ưu để tạo màng sinh học của chủng này là 37°C và pH 7 (Hình 5). Trên thực tế, pH môi trường nước thải làng nghề thường có pH thấp, trong khi đó khả năng

tạo màng sinh học của chủng B22.9 ở pH5 và pH7 có sự khác biệt không đáng kể do đó hoàn toàn có thể sử dụng chủng này khi ứng dụng để xử lý nước thải

Nghiên cứu của Nguyễn Quang Huy & Trần Thúy Hằng (2012) cũng cho thấy chủng U1.3 và U3.7 có khả năng hình thành màng sinh học tốt ở điều kiện môi trường có nhiệt độ từ 30°C đến 40°C. Chủng U1.3 có thể phát triển ở nhiệt độ cao trên 45°C. Nghiên cứu của Kaustubh & Vidya (2015) cũng cho thấy các chủng vi khuẩn có khả năng hình thành màng sinh học tốt nhất ở điều kiện môi trường 37°C, ở môi trường có pH 7 và pH 10 các chủng này có khả năng sinh trưởng và hình thành biofilm tốt.



Hình 5. Ảnh hưởng của nhiệt độ và pH môi trường đến khả năng tạo màng sinh học của chủng vi khuẩn B22.9



Hình 6. Ảnh hưởng của carbon và nitơ trong môi trường đến khả năng tạo màng sinh học của chủng vi khuẩn B22.9

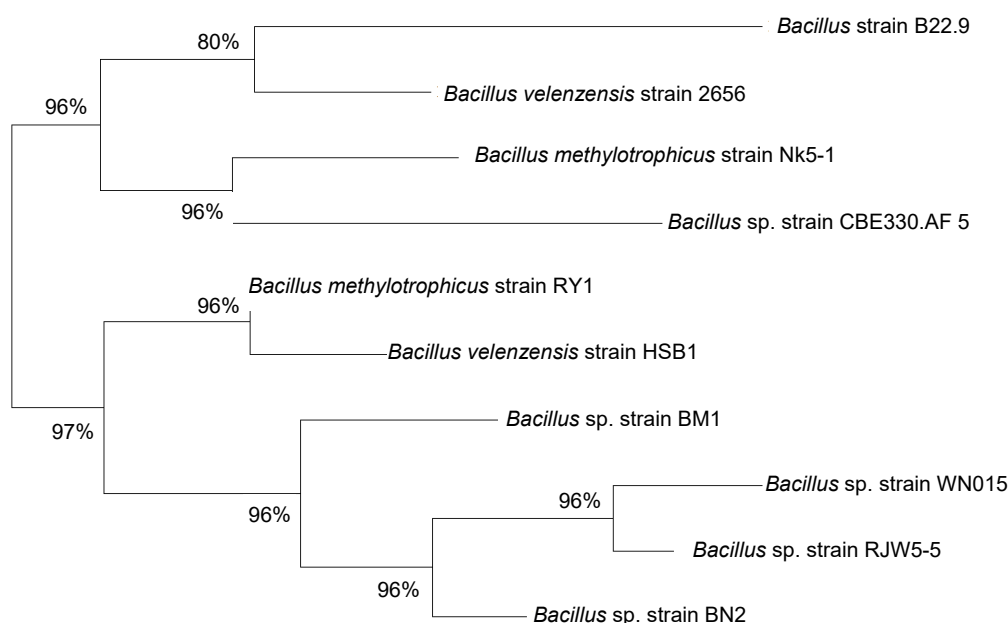
3.4.2. Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng

Với mục đích đánh giá, kiểm tra điều kiện môi trường dinh dưỡng phù hợp cho sự hình thành màng sinh học của chủng B22.9 để cung cấp thông tin cho nghiên cứu ứng dụng sau này, chủng B22.9 đã được nuôi trên các môi trường có chứa nguồn đường và nitơ khác nhau, sau đó xác định mức độ hình thành màng sinh học thông qua chỉ số OD₅₇₀. Kết quả cho thấy khả năng hình thành màng sinh học của chủng B22.9 là khác nhau khi nuôi trên các nguồn đường khác nhau, tuy nhiên hiệu quả nhất vẫn là trên nguồn glucose và fructose (Hình 6). Điều này hoàn toàn phù hợp với điều kiện môi trường nước thải làng nghề, đặc biệt là nghề bún vì trong môi trường có chứa nhiều tinh bột có thể chuyển hóa nhanh thành glucose và fructose, cung cấp dinh dưỡng cho chủng B22.9. Với kết quả xác định ảnh hưởng của nguồn nitơ có thể rõ ràng nhận thấy sự ảnh hưởng của các nguồn nitơ khác nhau là không khác nhau đáng kể đối với việc hình thành màng sinh học (Hình 6), do vậy khi ứng dụng chủng vi khuẩn này, hoàn toàn có thể tận dụng các nguồn nitơ vô cơ sẵn có trong môi trường.

3.5. Kết quả định danh chủng B22.9

Gen mã hóa 16S rRNA có tính bảo thủ cao, được ứng dụng rộng rãi trong việc định loại vi sinh vật. Sản phẩm PCR 16s rRNA của chủng B22.9 sau khi tinh sạch được gửi đi giải trình tự bằng phương pháp Sanger. Trình tự thu được sau đó được so sánh mức độ tương đồng với các trình tự trong ngân hàng dữ liệu Gene bằng công cụ BLAST, kết quả được thể hiện trên hình 7.

Kết quả so sánh trình tự cho thấy, chủng B22.9 có mức độ tương đồng cao từ 96-97% với trình tự các loài thuộc chi *Bacillus*. Do vậy, Chủng B22.9 được xác định là vi khuẩn thuộc chi *Bacillus*. Đây là chi vi khuẩn được biết đến với nhiều ứng dụng trong lĩnh vực xử lý môi trường. Trần Đức Thảo & cs. (2018) đã ứng dụng vi khuẩn *Bacillus* với mật độ 10⁸ CFU/ml để xử lý nước thải sinh hoạt ở ký túc xá đã cho chất lượng nước đầu ra đạt tiêu chuẩn QCVN 14:2008/BTNMT. Vũ Thị Dinh & cs. (2018) cũng đã phân lập được chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* TD từ mẫu nước thải tại nhà máy giấy có tiềm năng ứng dụng trong xử lý nước thải.



Hình 7. Cây phân loại chủng B22.9

4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, bảy chủng vi khuẩn có khả năng tạo màng sinh học tốt đã được phân lập từ 15 mẫu nước thải được thu thập ở làng bún Khắc Niệm-Bắc Ninh. Các chủng vi khuẩn này đều có khả năng đối kháng với 4-5 chủng vi khuẩn kiểm định. Trong số đó đã xác định 04 chủng có khả năng nhũ tương hóa dầu ăn cao. Đồng thời nghiên cứu cũng đã xác định được điều kiện môi trường nuôi cấy thích hợp đến khả năng tạo màng sinh học của chủng vi khuẩn B22.9 là ở nhiệt độ môi trường 37°C, pH 7 và nguồn dinh dưỡng có chứa glucose hoặc fructose. Chủng B22.9 đã được xác định thuộc chi *Bacillus* spp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abraham P.K., Ravi T.V., Vidya C. & Kodali P. (2016). Emulsifying activity of a biosurfactant produced by a marine bacterium. *Biotech.* 6: 177. doi: 10.1007/s13205-016-0494-7
- Dang H. & Lovell C.R. (2000). Bacterial primary colonization and early succession on surfaces in marine waters as determined by amplified rRNA gene restriction analysis and sequence analysis of 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology.* 66: 467-475.
- De Angelis M., Siragusa S., Berloco M., Caputo L., Settanni L., Alfonsi G., Amerio M., Grandi A. & Gobbetti M. (2006). Selection of potential probiotic *Lactobacilli* from pig feces to be used as additives in pelleted feeding. *Research in Microbiology.* 157: 792-801.
- Dunne Jr. W.M. (2002). Bacterial Adhesions: seen any good biofilms recently? *Clinical Microbiology Reviews.* 15: 155-166.
- Dhumadurai D. & Nooruddin T. (2016). Microbial biofilm: Important and application. *Intech Open - Croatia.*
- Hoàng Phương Hà, Nguyễn Quang Huy & Nghiêm Ngọc Minh (2013). Nghiên cứu khả năng tạo màng sinh học (biofilm) của một số chủng vi khuẩn chuyển hóa nitrogen. Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật.
- Kokare C.R., Chakraborty S., Khopade A.N & Mahadik K.R. (2009). Biofilm: Importance and applications. *Indian Journal of Biotechnology.* 8: 159-168.
- Morikawa M., Kagihiro S., Haruki M., Takano K., Branda S., Kolter R. & Kanaya S. (2006). Biofilm formation by a *Bacillus subtilis* strain that produces γ - polyglutamate. *Microbiology.* 152: 2801-2807.
- Nguyễn Quang Huy & Ngô Thị Kim Toán. (2014). Khả năng tích lũy photpho và tạo biofilm của chủng *Bacillus licheniformis* A4.2 phân lập tại Việt Nam. *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN, Khoa học Tự nhiên và Công nghệ.* 30(1): 43-50.
- Nguyễn Quang Huy & Trần Thúy Hằng. (2012). Phân lập các chủng *Bacillus* có hoạt tính tạo màng sinh vật (biofilm) và tác dụng kháng khuẩn của chúng. *Tạp chí Sinh học.* 34(1): 99-106.
- Nitschke M., Costa S.G. & Contiero J. (2005). Rhamnolipid surfactants: An update on the general aspects of these remarkable biomolecules. *Biotechnology Progress.* 21: 593-600.
- O'toole G.A., Gibbs K.A., Hager P.W., Phibbs P.V.J. & Kolter R. (2000). The global carbon metabolism regulator *crc* is a component of a signal transduction pathway required for biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology.* 182(2): 425-431.
- Saori I., Kenji W., Ryota O. & Masaaki M. (2009). Biofilm formation and proteolytic activities of *Pseudoalteromonas* bacteria that were isolated from fish farm sediments. *Microbial Biotechnology.* 2(3): 361-369.
- Trần Đức Thảo, Trần Thị Kim Chi, Trương Thị Thùy Trang, Nguyễn Thị Liễu, Trần Thị Thu Hiền & Nguyễn Tiến Hán (2018). Nghiên cứu khả năng xử lý nước thải sinh hoạt bằng công nghệ bùn hoạt tính có bổ sung chế phẩm sinh học *Bacillus* sp. *Tạp chí Khoa học & Công nghệ.* 50: 100-105.
- Vũ Thị Dinh, Phan Thị Thu Nga, Hoàng Trung Doãn & Trần Liên Hà. (2018). Phân lập tuyển chọn chủng vi khuẩn chịu nhiệt độ cao, thích nghi dải pH rộng, có hoạt tính cellulose cao, và bước đầu ứng dụng xử lý nước thải nhà máy giấy. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp.* 1: 1-10.