

NGHIÊN CỨU MỘT SỐ ĐẶC TÍNH CỦA VI KHUẨN *Bacillus* PHÂN LẬP TỪ NƯỚC THẢI LÀNG NGHỀ BÚN PHÚ ĐÔ

Nguyễn Thị Lâm Đoàn*, Lê Thị Quỳnh Chi

Khoa Công nghệ thực phẩm, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

*Tác giả liên hệ: nlddoan@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 29.01.2021

Ngày chấp nhận đăng: 07.04.2021

TÓM TẮT

Các loài thuộc chi *Bacillus* đã, đang càng trở thành nhóm vi sinh vật quan trọng với nhiều ứng dụng trong các lĩnh vực khác nhau như xử lý ô nhiễm môi trường, tạo các sản phẩm lên men truyền thống, trong dược học... Từ mẫu nước thải làng nghề sản xuất bún Phú Đô, nhóm nghiên cứu đã thu được 66 chủng *Bacillus* nhằm từng bước xây dựng bộ sưu tập các chủng thuộc chi quan trọng này. Trong số 66 chủng có 26 chủng sinh cả ba enzyme ngoại bào amylase, protease, cellulase với đường kính vòng phân giải cơ chất lớn lần lượt là 18,3, 20,8 và 20,9mm. Bằng phương pháp nhuộm tím tinh thể đã xác định được 4 chủng (NTB2.1, NTB2.3, NTB2.11, NTB5.7) có khả năng tạo màng sinh vật (biofilm) tốt với $OD_{570nm} \geq 3,17$. Các chủng này ngoài khả năng sinh enzyme và tạo biofilm tốt còn có khả năng kháng một số chủng vi khuẩn gây bệnh *E. coli* và *Salmonella typhimurium* và chúng không đối kháng nhau.

Từ khóa: *Bacillus*, enzyme, màng sinh vật.

Characterization of *Bacillus* Strains Isolated from Rice Vermicelli Phu Do Village Wastewater

ABSTRACT

The *Bacillus* species have become an increasingly important group of microorganisms with many applications such as environmental pollution treatment, traditional fermented products, pharmacy, etc. This study collected 66 strains of *Bacillus* from the wastewater samples of rice vermicelli production families at Phu Do to build up a collection of strains of this genus. The activities of extracellular enzymes of 66 isolates were investigated. The results showed that 26/66 strains secreted all three extracellular enzymes as protease, amylase, and cellulase with the largest substrate resolution ring diameters of 18.3, 20.8 and 20.9mm, respectively. Among them, four different strains NTB2.1, NTB2.3, NTB2.11, NTB5.7 were more active in biofilm formation than others based on the crystalline purple dye method. The data from measurement of absorbability at 570nm (OD_{570}) wavelength showed greater than or equal to 3.17. In addition, these strains inhibit the growth of pathogenic microorganisms such as *E. coli*, *Salmonella* and these strains were not antagonized to each other.

Keywords: *Bacillus*, enzyme, biofilm.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ở Việt Nam, các làng nghề sản xuất tinh bột gạo như bún, bánh đa ngày càng phát triển, mang lại nhiều lợi ích kinh tế xã hội. Tuy nhiên, nước thải từ các làng nghề này hiện nay chưa được xử lý hiệu quả, gây ô nhiễm đến nguồn nước tự nhiên, ảnh hưởng đến cảnh quan, môi trường và sức khỏe của người dân sinh sống xung quanh (Lê Thị Kim Cúc, 2009).

Theo báo cáo của Bộ Tài nguyên và Môi trường (2008) Phú Đô là một trong những làng nghề sản xuất bún lâu đời, phần lớn nước thải trong quá trình chế biến bún ở đây đều đổ trực tiếp ra sông hồ mà không qua bất kỳ khâu xử lý nào, khiến tình trạng ô nhiễm tại đây trở nên nghiêm trọng với hàm lượng COD, BOD5 vượt tiêu chuẩn cho phép hàng chục lần. Đây chính là nguyên nhân khiến cho tình trạng ô nhiễm ngày càng tồi tệ hơn.

Ngày nay việc ứng dụng vi sinh vật trong xử lý nước thải đang được khuyến khích sử dụng, đặc biệt là các chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* (Phạm Kim Liên & Nguyễn Bằng Phi, 2017). Trong nước thải sinh hoạt và nước thải từ công nghiệp thực phẩm nói chung và từ làng nghề sản xuất bún nói riêng có chứa nhiều chất hữu cơ nên việc ứng dụng vi khuẩn *Bacillus* có tiềm năng về các enzyme ngoại bào thủy phân các phân tử hữu cơ lớn là rất có triển vọng (Ngô Tự Thành & cs., 2009). Một số nghiên cứu trước đã tuyển chọn được chủng *Bacillus amyloliquefaciens* H12 có hoạt tính amylase cao để ứng dụng xử lý nước thải làng nghề chế biến tinh bột (Đỗ Thúy Hằng & cs., 2015). Nguyễn Như Ngọc & cs. (2016) đã phân lập được chủng *Bacillus* NT1 có khả năng phân giải các hợp chất hữu cơ xylan, cellulose, tinh bột, protein và ứng dụng trong xử lý nước thải giảm COD từ 80 đến 90%. Ngoài sinh tổng hợp enzyme ngoại bào, khả năng tạo màng sinh vật (biofilm) của *Bacillus* cũng được xem như một tiềm năng trong xử lý nước thải. Biofilm là một tập hợp gồm nhiều tế bào vi sinh vật gắn kết với nhau trên bề mặt một giá thể, giúp hỗ trợ loại bỏ các chất ô nhiễm nhanh hơn, hiệu quả hơn ở dạng sống tự do của vi khuẩn (Nguyễn Quang Huy & Trần Thúy Hằng, 2012). Nghiên cứu của Morikwa (2006) chỉ ra rằng các tế bào vi sinh vật sống trong biofilm khi liên kết với nhau, chống lại tác động của các yếu tố bất lợi của môi trường sống như thiếu các chất dinh dưỡng, tác dụng của chất kháng khuẩn, nhiệt độ cao... tốt hơn so với tế bào sống tự do. Mục đích của nghiên cứu này là xác định, tuyển chọn các chủng *Bacillus* bản địa mang những đặc tính tốt như sinh enzyme ngoại bào, tạo biofilm, hoạt tính kháng khuẩn và xác định khả năng đối kháng làm cơ sở cho việc nghiên cứu ứng dụng vi khuẩn này trong xử lý nước thải làng nghề chế biến tinh bột.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Mẫu nước thải: Các mẫu nước thải sản xuất bún được lấy từ các hộ gia đình làng nghề bún

Phú Đô, Nam Từ Liêm, Hà Nội, được ký hiệu NTB1 đến NTB6.

Chủng vi khuẩn: Chủng vi khuẩn *Bacillus* được phân lập từ các mẫu nước thải, ký hiệu là NTB.

Vi khuẩn kiểm định: *E. coli* ATCC 25922 và *S. typhimurium* ATCC 13311 được cung cấp từ Viện Công nghệ sinh học thuộc Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Môi trường nghiên cứu: Môi trường LB (Luria Bentani) lỏng (g/l): Cao nấm men - 5,0; Tryptone - 10,0; NaCl - 10,0; pH 7,0 dùng để phân lập, nuôi cấy vi khuẩn thuộc chi *Bacillus*, xác định khả năng tạo màng và nuôi cấy vi sinh vật kiểm định. Môi trường thạch LB 2% agar (Nguyễn Quang Huy & Trần Thúy Hằng, 2012). Môi trường có chứa cơ chất tinh bột, casein, CMC (carboxymethyl cellulose) (g/l): Agar-17,0; tinh bột, casein, CMC-1,0; pH = 7,0 dùng để xác định khả năng sinh amylase, protease và cellulase (Nguyễn Thị Lâm Đoàn & Nguyễn Thị Thanh Thủy, 2018). Các môi trường được hấp khử trùng 121°C/15 phút, 1 atm.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Lấy mẫu nước thải

Mẫu nước thải được thu thập theo TCVN 4556-1988 và được phân tích ngay sau khi đưa về phòng thí nghiệm, thời gian lưu mẫu không quá 48h.

2.2.2. Phân lập, làm thuần và xác định sơ bộ các đặc điểm vi khuẩn thuộc chi *Bacillus*

Mẫu phân lập được pha loãng tới độ pha loãng cần thiết rồi được xử lý nhiệt ở 80°C trong 10 phút để loại bỏ tế bào sinh dưỡng, sau đó được cấy gọt lên môi trường thạch LB. Nuôi ở nhiệt độ 37°C trong 24h. Chọn khuẩn lạc đặc trưng cho *Bacillus* và tiến hành làm thuần bằng cách cấy rìa trên môi trường LB - agar, cho tới khi quan sát thấy chỉ có một dạng khuẩn lạc duy nhất trên môi trường (Vaseeharan & Ramasamy, 2003).

Xác định vi khuẩn *Bacillus* theo khóa phân loại Bergey's (1986) và mô tả của Nguyễn Thị

Bích Đào & cs. (2015): nhuộm Gram (+), phản ứng catalase (+), phản ứng oxydase (+), khả năng di động.

2.2.3. Khảo sát sinh tổng hợp enzyme ngoại bào

Khả năng sinh enzyme amylase, protease và cellulase ngoại bào của các chủng được đánh giá bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch trong môi trường có bổ sung cơ chất 1% tương ứng gồm tinh bột, casein và CMC theo phương pháp của Nguyễn Lâm Dũng & cs. (1976). Theo đó nhỏ 80µl dịch ly tâm của chủng nghiên cứu sau khi nuôi ở môi trường LB trong 48h vào các lỗ thạch. Sau khi nhỏ dịch để đĩa thạch trong tủ lạnh ở 4°C khoảng 2h để dịch ly tâm khuếch tán đều vào trong thạch. Để đĩa thạch vào tủ ấm 37°C trong 48h để cho lượng dịch trong lỗ thạch thủy phân cơ chất, sau đó đĩa thạch được nhuộm màu bằng dung dịch Lugol 5%. Hoạt tính của enzyme được đo bằng đường kính vòng phân giải cơ chất xung quanh lỗ thạch, tức $D - d$. Trong đó: D là đường kính vòng phân giải (mm), d là đường kính lỗ thạch (5mm).

2.2.4. Khả năng tạo biofilm

Đánh giá khả năng tạo biofilm của *Bacillus* bằng phương pháp nhuộm với tím tinh thể theo O'Toole & cs. (2000).

Các chủng vi khuẩn được nuôi lắc (160 vòng/phút) trong môi trường LB lỏng trong 24h ở 37°C. Sau đó, dịch nuôi cấy được đưa vào các ống eppendorf bổ sung thêm môi trường LB nuôi 24h. Tiếp theo, dịch nuôi cấy được ly tâm lượng tế bào sống trôi nổi không tham gia tạo biofilm trong ống ly tâm được đánh giá bằng đo mật độ quang ở bước sóng 620nm. Sau khi ly tâm bổ sung vào mỗi ống eppendorf 1ml dung dịch tím kết tinh 1% và giữ trong 25 phút ở nhiệt độ phòng. Sau 25 phút loại bỏ dung dịch nhuộm, rửa ống eppendorf 2 lần bằng nước cất và quan sát sự bắt màu của các tế bào bám trên thành ống với tím kết tinh. Đánh giá mật độ tế bào trong biofilm bằng cách hòa tan các tinh thể tím bám trên thành eppendorf trong 1ml ethanol 70%, đo độ hấp thụ OD_{570nm} .

2.2.5. Khảo sát hoạt tính kháng vi khuẩn gây bệnh

Hoạt tính kháng vi khuẩn gây bệnh được đánh giá bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch của Nguyễn Lâm Dũng & cs. (1976) với các vi khuẩn kiểm định là *S. typhimurium* ATCC 13311 và *E. coli* ATCC 25922. Các chủng vi khuẩn kiểm định được nuôi qua đêm trong môi trường LB lỏng ở 37°C trong 24h. Cấy trang 30µl dịch mỗi chủng vi khuẩn kiểm định vào môi trường LB agar và khoan lỗ thạch, kích thước lỗ thạch (5mm). Nhỏ 80µl dịch ly tâm của chủng nghiên cứu sau khi nuôi ở môi trường LB trong 48h vào các lỗ thạch. Sau khi nhỏ dịch để đĩa thạch trong tủ lạnh ở 4°C khoảng 2h, tiếp đó đĩa thạch được đặt vào tủ ấm 37°C trong 48h. Hoạt tính kháng khuẩn được đánh giá bằng hiệu số $D - d$ (mm), D là đường kính vòng kháng khuẩn (mm), d là đường kính lỗ thạch (5mm).

2.2.6. Đánh giá tính đối kháng giữa các chủng vi khuẩn

Sử dụng phương pháp cấy vạch thẳng vuông góc trên đĩa thạch chứa môi trường LB để đánh giá tính đối kháng giữa các chủng vi khuẩn nghiên cứu. Cấy mỗi chủng dọc theo một đường thẳng riêng rẽ trên đĩa thạch và vuông góc với nhau, nuôi ở 37°C trong 48h. Tiến hành quan sát sinh trưởng của các chủng ở các đường giao nhau khả năng không ức chế xuất hiện khi đường giao nhau đó mọc đan chéo (Lê Thị Hải Yến & Nguyễn Đức Hiền, 2016).

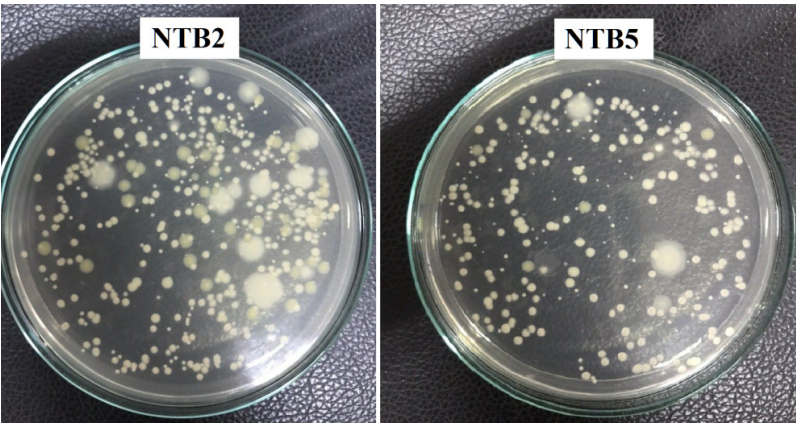
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập và sàng lọc sơ bộ chủng *Bacillus*

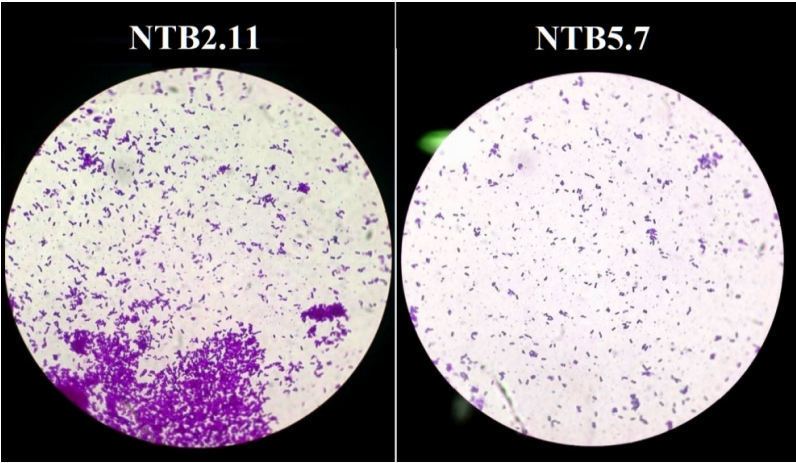
Từ 06 mẫu nước thải đã lựa chọn được 87 chủng với các đặc điểm nhận dạng *Bacillus* như khuẩn lạc tròn, bề mặt nhẵn, rìa răng cưa, màu trắng hoặc hơi vàng (Nguyễn Thị Bích Đào & cs., 2015). Với 87 chủng vi khuẩn phân lập được, tiến hành sàng lọc sơ bộ nhằm xác định sự hiện diện của *Bacillus* đã chọn được 66 chủng bước đầu theo khóa phân loại Bergey's có đặc tính tương ứng với *Bacillus*: Trục khuẩn hình que, Gram dương, catalase và oxidase dương tính, di động (Jonh & cs., 1986), số lượng và ký hiệu các chủng trong từng mẫu được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Số lượng *Bacillus* phân lập từ nước thải sản xuất bún Phú Đô

Kí hiệu mẫu	Số lượng chủng phân lập	Kí hiệu chủng
NTB1	15	NTB1.1 - NTB1.15
NTB2	11	NTB2.1 - NTB2.11
NTB3	9	NTB3.1 - NTB3.9
NTB4	10	NTB4.1 - NTB4.10
NTB5	9	NTB5.1 - NTB5.9
NTB6	12	NTB6.1 – NTB6.12
Tổng	66	



Hình 1. Khuẩn lạc *Bacillus* từ các mẫu nước thải bún



Hình 2. Hình thái tế bào của chủng NTB 2.11 và NTB 5.7

3.2. Khả năng sinh enzyme ngoại bào của các chủng nghiên cứu

Nước thải của các làng nghề chế biến lương thực, thực phẩm, đặc biệt chế biến bún có đặc tính chung là rất giàu chất hữu cơ, dễ phân hủy sinh học, phần lớn đều thải trực tiếp ra ngoài

mà không qua xử lý, gây ô nhiễm môi trường đất và suy giảm chất lượng nước ngầm ảnh hưởng trực tiếp đến người dân làng nghề (Trần Liên Hà & cs., 2018).

Có 66 chủng *Bacillus* phân lập từ nước thải làng nghề chế biến bún được sàng lọc để tuyển chọn các chủng có khả năng phân hủy các hợp

chất hữu cơ thông qua việc khảo sát sơ bộ khả năng sinh enzyme amylase, protease và cellulase của các chủng *Bacillus* qua đường kính phân giải tinh bột, casein và CMC. Kết quả được trình bày tại bảng 2 và hình 3.

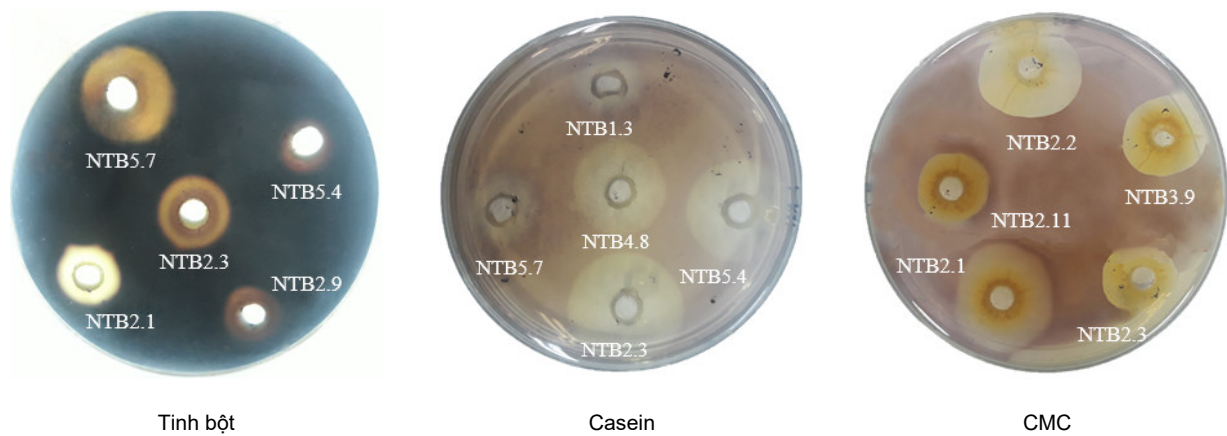
Kết quả cho thấy các chủng *Bacillus* có khả năng tiết các loại enzyme ngoại bào ở các mức độ khác nhau. Số chủng sinh cả 3 loại enzyme ngoại bào 26/66 chủng chiếm 39,39%. Trong đó chọn đường kính vòng phân giải lớn hơn 6 là chủng sinh enzyme mạnh thì đối với thử nghiệm amylase thu được 17 chủng với đường kính phân giải từ 6,5-18,3mm, protease thu được 17 chủng với đường kính phân giải từ 6,2-20,8mm và cellulase thu được 18 chủng với đường kính

phân giải từ 6,1-20,9mm. Đường kính vòng phân giải của enzyme amylase, protease, cellulase lớn nhất lần lượt là 18,3mm (NTB5.7), 20,8mm (NTB2.3) và 20,9mm (NTB2.1). Kết quả nghiên cứu của Đỗ Thị Thanh Dung & cs. (2017) khảo sát khả năng sinh ba enzyme của chủng *Bacillus* phân lập từ khu vực nuôi tôm của tỉnh Sóc Trăng cũng cho thấy 30/54 chủng *Bacillus* sinh cả ba enzyme và đường kính vòng phân giải lớn nhất của amylase, protease, cellulase lần lượt là 15mm; 13mm; 16,33mm. Ngô Tự Thành & cs. (2009) cũng đã tìm ra chủng *Bacillus* T20 và M27 có đường kính vòng phân giải cơ chất tinh bột là 19,5 và 20mm và vòng phân giải CMC là 20mm ở cả hai chủng.

Bảng 2. Đường kính vòng phân giải cơ chất của các chủng *Bacillus*

Ký hiệu chủng	Đường kính vòng phân giải cơ chất D - d (mm)		
	Tinh bột	Casein	CMC
NTB1.1	6,5 ± 0,21	5,2 ± 0,15	6,1 ± 0,07
NTB1.3	14,4 ± 0,42	4,3 ± 0,03	10,1 ± 0,12
NTB1.4	7,7 ± 0,58	10,1 ± 0,36	6,9 ± 0,10
NTB1.5	3,5 ± 0,22	6,2 ± 0,12	4,1 ± 0,03
NTB1.6	9,2 ± 0,49	11,1 ± 0,31	2,4 ± 0,02
NTB1.7	13,3 ± 0,26	7,2 ± 0,42	1,1 ± 0,13
NTB1.8	8,3 ± 0,34	5,1 ± 0,12	7,2 ± 0,25
NTB1.10	7,5 ± 0,25	9,2 ± 0,25	14,8 ± 0,21
NTB1.14	13,0 ± 0,45	8,9 ± 0,17	11 ± 0,18
NTB1.15	5,8 ± 0,15	11,2 ± 0,25	16,8 ± 0,25
NTB2.1	5,1 ± 0,12	12,9 ± 0,12	20,9 ± 0,19
NTB2.2	2,5 ± 0,05	15,1 ± 0,21	18,6 ± 0,53
NTB2.3	5,5 ± 0,15	20,8 ± 0,29	10,2 ± 0,35
NTB2.4	12,9 ± 0,12	5,7 ± 0,25	9,8 ± 0,29
NTB2.9	3,9 ± 0,03	9,7 ± 0,13	7,9 ± 0,10
NTB2.11	15,2 ± 0,35	7,9 ± 0,06	9,8 ± 0,26
NTB3.9	9,3 ± 0,46	10,8 ± 0,35	14,9 ± 0,62
NTB4.2	6,5 ± 0,05	4,93 ± 0,03	5,17 ± 0,03
NTB4.8	4,0 ± 0,00	11,8 ± 0,29	7,9 ± 0,32
NTB4.9	13,7 ± 0,58	9,8 ± 0,23	4,1 ± 0,20
NTB5.1	10,8 ± 0,29	11,8 ± 0,21	5,8 ± 0,25
NTB5.2	15,1 ± 0,23	5,5 ± 0,04	7,9 ± 0,11
NTB5.3	4,3 ± 0,46	4,8 ± 0,09	11,9 ± 0,47
NTB5.4	3,2 ± 0,02	13,8 ± 0,29	11,8 ± 0,25
NTB5.7	18,3 ± 0,58	4,9 ± 0,12	5,9 ± 0,14
NTB5.9	12,4 ± 0,35	9,8 ± 0,25	3,9 ± 0,11

Ghi chú: Số liệu được biểu diễn dưới dạng: giá trị trung bình (Mean) ± sai số chuẩn (SEM); Số lần nhắc lại thí nghiệm là 3 lần.



Hình 3. Vòng phân giải cơ chất khác nhau của một số chủng *Bacillus*

3.3. Khả năng hình thành biofilm của các chủng *Bacillus*

Nghiên cứu biofilm 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 (Nguyễn Quang Huy & Ngô Thị Kim Toán, 2014).

Có 26 chủng *Bacillus* có khả năng sinh cả 3 enzyme ngoại bào được đánh giá khả năng tạo biofilm bằng phương pháp nhuộm tím tinh thể. Kết quả hình 4 cho thấy 20/26 chủng có khả năng tạo biofilm. So sánh giá trị OD_{620} và OD_{570} cho thấy mật độ tế bào dạng liên kết tại OD_{570} tăng lên đáng kể so với mật độ tế bào tại bước sóng 620nm (OD_{620}) đặc trưng cho mật độ tế bào sống tự do. Điều đó chứng tỏ phần lớn tế bào của các chủng đã chuyển từ dạng sống tự do sang dạng liên kết và hình thành biofilm. Kết quả này cũng tương tự với kết quả nghiên cứu của Nguyễn Quang Huy & Trần Thúy Hằng (2012) khi so sánh hai giá trị OD_{620} và OD_{570} của 11 chủng *Bacillus* có hoạt tính tạo biofilm mạnh cho thấy giá trị OD_{620} thấp hơn so với giá trị OD_{570} . Nghiên cứu của Hoàng Phương Hà & cs. (2016) đã khảo sát trên 02 chủng *Bacillus fusiformis* D10 và *Pseudomonas denitrificans* D32, kết quả cho thấy các chủng có khả năng tạo biofilm mạnh với chỉ số OD_{570} cao gấp 4 lần OD_{620} .

Trong số 26 chủng có 09 chủng có khả năng tạo biofilm tốt có $OD_{570} > 2,5$ trong đó chủng

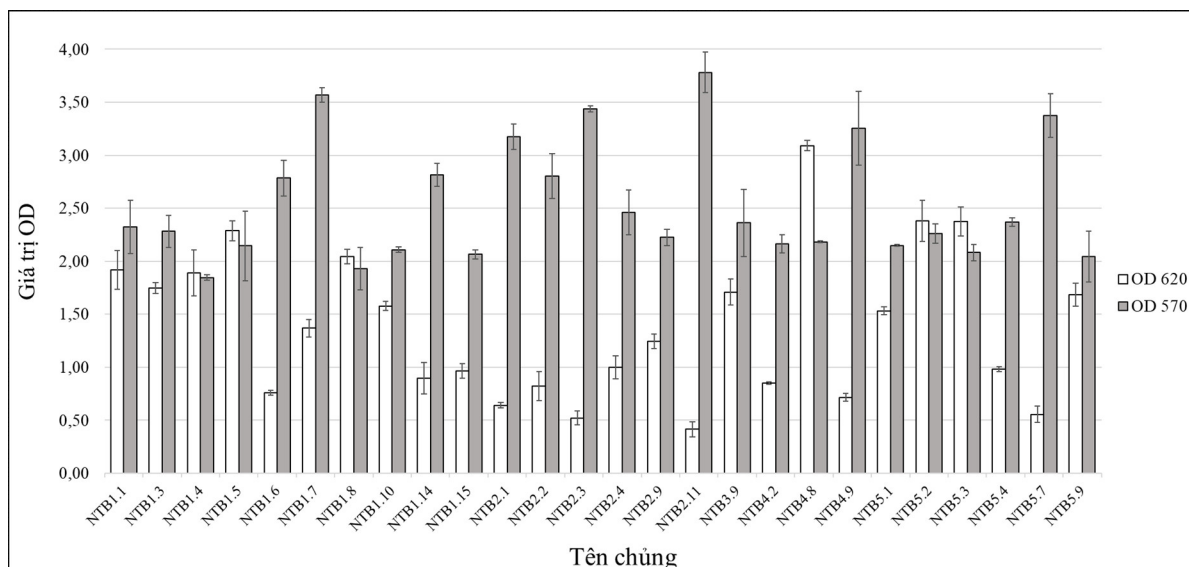
NTB1.7, NTB2.1, NTB2.3, NTB2.11, NTB4.9, NTB5.7 có khả năng tạo biofilm tốt hơn so với các chủng còn lại với giá trị OD_{570} lần lượt là 3,57; 3,17; 3,44; 3,78; 3,26; 3,37. Theo nghiên cứu của Nguyễn Quang Huy & Trần Thúy Hằng (2012) cho thấy các chủng *Bacillus* M4.9 và M4.10 có giá trị OD_{570} tương ứng 3,8 và 3,3 có khả năng tạo biofilm tốt. Quan sát màng sinh vật của vi khuẩn *Bacillus* trên giá thể nhựa nhận thấy chủng có chỉ số OD_{570} càng lớn thì càng dễ quan sát (Hình 4, Hình 5).

3.4. Tuyển chọn chủng *Bacillus* có hoạt tính kháng vi khuẩn gây bệnh

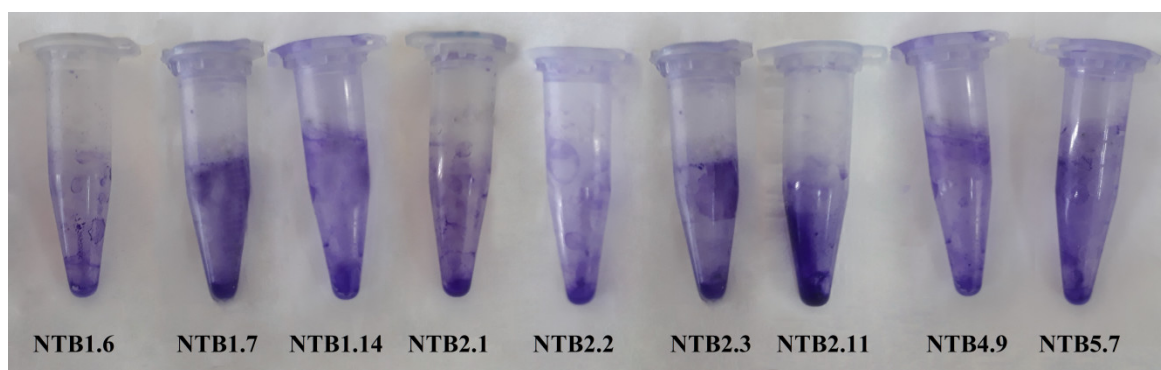
Nước làm lan truyền các nguồn bệnh và trong thực tế các bệnh lây lan qua môi trường nước đặc biệt là nước thải là nguyên nhân chính gây ra nhiều loại bệnh có thể dẫn đến tử vong, nhất là ở các nước đang phát triển. Các tác nhân gây bệnh thường được bài tiết ra trong phân của người và động vật bị bệnh, bao gồm các nhóm chính sau: Các vi khuẩn (đặc biệt *E. coli*, *Salmonella*...), virus, động vật đơn bào, giun kí sinh. Tiêu chí đánh giá chất lượng về mặt vi sinh vật của nước thường được sử dụng rộng rãi, nhất là chỉ số *E. coli* (TCVN 6187 - 2, 1996). Chính vì vậy, bên cạnh khả năng sinh enzyme ngoại bào, khả năng tạo biofilm thì khả năng kháng lại các vi khuẩn gây bệnh cũng là một đặc điểm rất quan trọng của chủng vi khuẩn *Bacillus*.

Có 09 chủng *Bacillus* có khả năng tạo biofilm cao nhất được tiếp tục được kiểm tra khả

năng kháng lại *E. coli* và *Salmonella typhimurium* theo phương pháp đục lỗ thạch.



Hình 4. Khả năng hình thành biofilm của một số chủng *Bacillus*

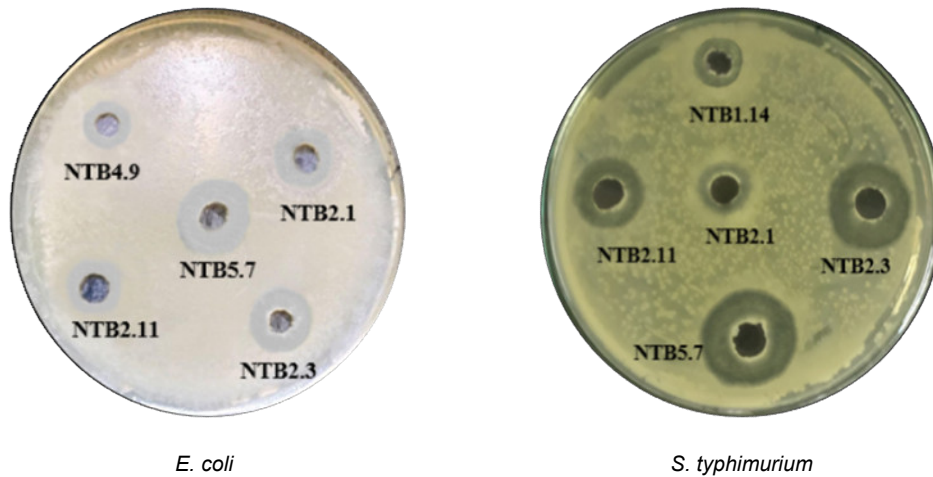


Hình 5. Khả năng tạo biofilm của một số chủng *Bacillus*

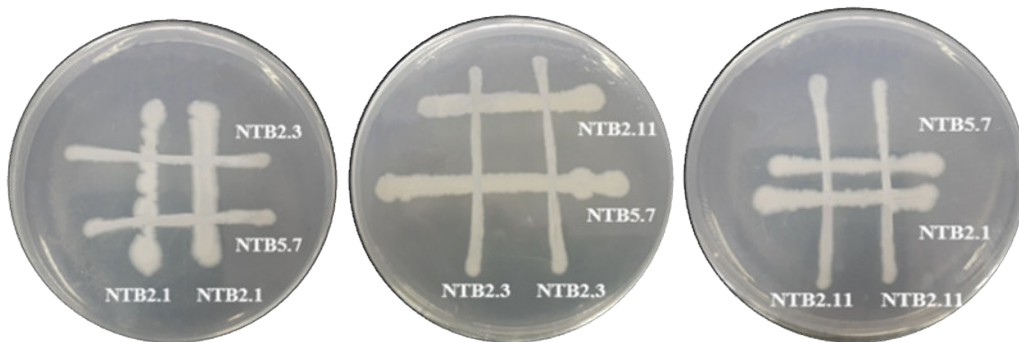
Bảng 3. Các chủng *Bacillus* kháng *E. coli* và *Salmonella typhimurium*

Ký hiệu chủng	Đường kính vòng kháng khuẩn D - d (mm)	
	<i>E.coli</i>	<i>S. typhimurium</i>
NTB1.6	ND	3,1 ± 0,04
NTB1.7	2,1 ± 0,02	ND
NTB1.14	ND	4,5 ± 0,07
NTB2.1	6,1 ± 0,07	4,3 ± 0,05
NTB2.2	ND	2,2 ± 0,09
NTB2.3	8,0 ± 0,03	10,0 ± 0,03
NTB2.11	5,2 ± 0,06	6,8 ± 0,04
NTB4.9	4,1 ± 0,06	ND
NTB5.7	9,8 ± 0,23	12,5 ± 0,48

Ghi chú: ND (not determine): không xác định.



Hình 6. Hoạt tính kháng vi khuẩn gây bệnh của các chủng *Bacillus*



Hình 7. Tính đối kháng của các chủng *Bacillus* tuyển chọn

Số liệu được biểu diễn dưới dạng: giá trị trung bình (Mean) $\pm$ sai số chuẩn (SEM); Số lần nhắc lại thí nghiệm là 3 lần

Kết quả cho thấy đường kính vòng kháng khuẩn với *Salmonella typhimurium* đạt 2,2-12,5mm lớn hơn đối với *E. coli* đạt 2,1-9,8mm trong đó có 4/9 chủng (NTB2.1, NTB2.3, NTB2.11, NTB5.7) có khả năng kháng cả 2 loại vi khuẩn gây bệnh (Bảng 3 và Hình 6).

Kết quả này tương đối phù hợp với nghiên cứu của Lê Thị Hải Yến & cs. (2016) khi nghiên cứu *Bacillus subtilis* phân lập từ mẫu đất và mẫu phân tại các trại gà ở 6 tỉnh và thành phố Cần Thơ với vòng kháng *E. coli* nhỏ hơn vòng kháng của *Salmonella*. Ngoài ra, tác giả đã tuyển chọn được chủng VL28 có đường kính vòng kháng khuẩn lớn đối với cả 2 vi khuẩn gây bệnh *E. coli* đạt trung bình 10mm, *Salmonella*

đạt trung bình 13mm. Marahiel & Nakano. (1993) đã chứng minh các chủng *Bacillus subtilis* có thể sinh ra các chất kháng khuẩn phổ rộng như subtilin, bacilysin, macobacillin để tiêu diệt vi khuẩn gây bệnh.

3.5. Đánh giá tính đối kháng của các chủng nghiên cứu

Để xử lý nước thải hữu cơ một cách tốt nhất thì hệ vi sinh vật tuyển chọn cần phải có sự tương trợ lẫn nhau, nếu chúng đối kháng với nhau thì việc cùng bổ sung chủng vào nước thải là vô nghĩa.

Có 04 chủng NTB2.1, NTB2.3, NTB2.11, NTB5.7 vừa có khả năng sinh enzyme ngoại bào, tạo biofilm tốt, và khả năng kháng khuẩn gây bệnh được sử dụng để nghiên cứu khả năng đối kháng lẫn nhau của chúng. Kết quả cho

thấy các chủng nghiên cứu không đối kháng nhau, cả 4 chủng đều sinh trưởng, phát triển bình thường tại các điểm giao nhau, không có sự ức chế giữa các chủng (Hình 7). Như vậy, chúng hoàn toàn có thể sinh trưởng và phát triển trong cùng một môi trường cũng như phối hợp chúng trong xử lý nước thải hữu cơ.

4. KẾT LUẬN

Từ mẫu nước thải làng bún Phú Đô đã phân lập được 66 chủng *Bacillus* và sàng lọc được 26/66 chủng có khả năng sinh cả 3 enzyme ngoại bào amylase, protease, cellulase đường kính vòng phân giải cơ chất lớn nhất lần lượt là 18,3mm, 20,8mm và 20,9mm. Trong đó các chủng NTB2.1, NTB2.3, NTB2.11, NTB5.7 có khả năng tạo biofilm tốt với $OD_{570} \geq 3,17$, đồng thời kháng được *E. coli* và *Salmonella typhimurium* với đường kính vòng kháng khuẩn lần lượt là 5,2-9,8mm, 4,3-12,5mm và chúng không đối kháng nhau. Bốn chủng vi khuẩn này làm cơ sở cho việc nghiên cứu ứng dụng chúng trong xử lý nước thải làng nghề chế biến tinh bột.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bộ Khoa học, Công nghệ và Môi trường (1988). TCVN 4556-1988 - Nước thải: Phương pháp lấy mẫu, vận chuyển và bảo quản mẫu.
- Bộ Khoa học, Công nghệ và Môi trường (1998). TCVN 4558-1998 - Nước thải - phương pháp lấy mẫu, vận chuyển và bảo quản mẫu.
- Bộ Khoa học, Công nghệ và Môi trường (1996). TCVN 6187-2: 1996 - Chất lượng nước - Phát hiện và đếm vi khuẩn Coliform, vi khuẩn Coliform chịu nhiệt và *Escherichia coli* giả định.
- Bộ Tài nguyên và Môi trường (2008). Báo cáo môi trường Quốc gia năm 2008. Môi trường làng nghề Việt Nam.
- Đỗ Thị Thanh Dung, Lê Thanh Bình, Hoàng Thị Đăng Dương, Võ Đình Quang & Phan Thị Phụng Trang (2017). Tuyển chọn các chủng *Bacillus* spp. sinh enzyme và kháng *Vibrio parahaemolyticus* gây hội chứng chết sớm (EMS) trên tôm. Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ: Chuyên san Khoa học Tự nhiên. 1(6): 23-31.
- Đỗ Thúy Hằng, Trần Liên Hà & Nguyễn Như Ngọc (2015). Phân lập và tuyển chọn chủng vi sinh vật

có khả năng phân giải tinh bột trong nước thải làng nghề sản xuất và chế biến tinh bột. Tạp chí Khoa học và Công nghệ. 28: 57-60.

Hoàng Phương Hà, Nguyễn Quang Huy, Hoàng Thị Yến (2016). Nghiên cứu một số điều kiện thích hợp cho sinh trưởng và tạo biofilm của các chủng vi khuẩn khử nitrate. Tạp chí Công nghệ sinh học. 14(1): 191-196.

John G.H., Noel R.K., Peter H.A.S., James T.S. & Stanley T.W. (1986). Bergey's manual of Systematic Bacteriology. 9th Edition. The Williams & Wilkins.

Lê Thị Hải Yến & Nguyễn Đức Hiền (2016). Khảo sát đặc tính probiotic các chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* phân lập tại các tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long. Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ. 2: 26-32.

Lê Thị Kim Cúc (2009). Báo cáo tổng kết dự án điều tra hiện trạng môi trường làng nghề gây ô nhiễm ở các tỉnh trọng điểm. Viện Khoa học Thủy lợi Việt Nam.

Marahiel M.A. & Nakano M.M. (1993). Regulation of peptide antibiotic production in *Bacillus*. Molecular Microbiology. 7(5): 631-636.

Morikwa M. (2006). Beneficial biofilm formation by industrial bacteria *Bacillus subtilis* and related species. J Biosci Bioeng. 101: 1-8.

Ngô Tự Thành, Bùi Thị Việt Hà, Vũ Minh Đức & Chu Văn Mẫn (2009). Nghiên cứu hoạt tính enzyme ngoại bào của một số chủng *Bacillus* mới phân lập và khả năng ứng dụng chúng trong xử lý nước thải. Tạp chí Khoa học Đại học Quốc gia Hà Nội, Khoa học Tự nhiên và Công nghệ. 25: 101-106.

Nguyễn Lâm Dũng, Đoàn Xuân Mượu, Nguyễn Phùng Tiến, Đặng Đức Thanh & Phạm Văn Ty, (1976). Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học (Tập 2). Nhà xuất bản Khoa học Kỹ thuật. Hà Nội

Nguyễn Như Ngọc, Nguyễn Văn Cách & Nguyễn Thị Diệp (2016). Phân lập, tuyển chọn chủng vi khuẩn *Bacillus* bản địa có khả năng phân giải chất hữu cơ trong nước thải làng nghề chế biến tinh bột dong riềng. Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn. 1(2): 1010-107.

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 Đại học Quốc gia Hà Nội, Khoa học Tự nhiên và Công nghệ. 30(1): 45-50.

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.

Nguyễn Thị Bích Đào, Trần Quang Khánh Vân, Nguyễn Văn Khanh & Nguyễn Quang Linh

- (2015). Phân lập và tuyển chọn các chủng *Bacillus* ức chế vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh tôm chế sôm ở tỉnh Thừa Thiên Huế. Tạp chí Khoa học Đại học Huế. 100(1): 15-28.
- Nguyễn Thị Lâm Đoàn & Nguyễn Thị Thanh Thủy (2018). Đánh giá đặc tính probiotic và xác định một số đặc điểm của các chủng vi khuẩn lactic phân lập từ ruột gà ri. Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam. 7(92): 104-111.
- O'Toole G.A., Kaplan H.B. & Kolter R. (2000). Biofilm formation as microbial development. Ann. Rev Microbiol. 54: 49-79.
- Phạm Kim Liên & Nguyễn Bằng Phi (2017). Nghiên cứu xử lý nước thải sinh hoạt của xí nghiệp xử lý nước thải bằng vi khuẩn *Bacillus subtilis*. Tạp chí khoa học Đại học Thủ Dầu Một. 4(35): 66-22.
- Trần Liên Hà, Nguyễn Thị Linh, Nguyễn Như Ngọc & Nguyễn Văn Cách (2018). Tuyển chọn vi khuẩn sinh pectinase ứng dụng trong xử lý nước thải làng nghề sản xuất tinh bột dong riềng. Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp. 6: 3-9.
- Vaseeharan B. & Ramasamy P. (2003). Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Letters in Applied Microbiology. 36(2): 83-87.