

## PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN CHỦNG BACILLUS CÓ KHẢ NĂNG PHÂN GIẢI CELLULOSE ĐỂ XỬ LÝ NƯỚC RỈ RÁC

Trần Liên Hà<sup>1</sup>, Trương Thành Luân<sup>2</sup>, Phạm Đình Vinh<sup>3</sup>

<sup>1,2,3</sup>Trường Đại học Bách khoa Hà Nội

### TÓM TẮT

Nước rỉ rác có các chỉ số ô nhiễm cao và thay đổi theo tuổi của bãi rác và theo mùa trong năm. Tình trạng nước rỉ rác phát thải trực tiếp vào môi trường mà không được kiểm soát sẽ gây ra những tác động xấu đến môi trường và sức khỏe con người. Hiện nay, Việt Nam đã áp dụng một số công nghệ để xử lý nước rỉ rác nhưng chưa có công nghệ nào đáp ứng được yêu cầu về chất lượng dòng thải ra theo QCVN 25/2009-BTNMT. Phương pháp xử lý sinh học quan tâm sử dụng do có rất nhiều ưu điểm như: hiệu quả xử lý cao, không sử dụng hóa chất trong quá trình xử lý nên không gây ô nhiễm thứ cấp, tiêu tốn ít năng lượng cho việc vận hành, thân thiện với môi trường... Một số nghiên cứu đã chỉ ra cellulose là một trong những thành phần chính trong nước rỉ rác. Do đó một trong những giải pháp xử lý nước rỉ rác được đưa ra là sử dụng chế phẩm vi sinh vật *Bacillus* có khả năng phân giải cellulose nhờ khả năng sinh trưởng nhanh, kết lắng tốt, tạo nhiều enzym. Từ 3 mẫu nước thải đã tuyển chọn được chủng V40 có khả năng sinh enzym cellulase tốt nhất (2,921 U/ml). Chủng V40 được định danh bằng Kit API 50 CHB và 16S RNA cho kết quả tương đồng 100% với *Bacillus subtilis* JCM 1465 qua đó đề xuất đặt tên chủng là *Bacillus subtilis* V40. Chủng *Bacillus subtilis* V40 được sử dụng để thử nghiệm xử lý nước rỉ rác có COD là 9712 mg/L sau thời gian 7 ngày hiệu suất xử lý COD đạt 45,93% và mẫu kiểm chứng 2%.

**Từ khóa:** *Bacillus subtilis*, cellulose, enzym cellulase, nước rỉ rác, ô nhiễm môi trường.

### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay, lượng rác thải phát sinh, thải ra môi trường ngày một tăng nhanh về số lượng do sự gia tăng dân số toàn cầu, các hoạt động công nghiệp và lối sống hiện đại (F. N. Ahmed và Lan C. Q., 2012; E. De Torres-Socias và cộng sự, 2014). Theo báo cáo hiện trạng môi trường quốc gia (2016) đến năm 2015, tổng khối lượng chất thải rắn (CTR) sinh hoạt phát sinh tại các đô thị khoảng 38.000 tấn/ngày, trong khi năm 2014, khối lượng CTR sinh hoạt đô thị phát sinh khoảng 32.000 tấn/ngày. Riêng tại Hà Nội và Tp. Hồ Chí Minh, khối lượng CTR sinh hoạt phát sinh lần lượt là 6.420 tấn/ngày và 6.739 tấn/ngày. Theo tính toán mức gia tăng của giai đoạn từ 2011 đến 2015 đạt trung bình 12% mỗi năm và về xu hướng, mức độ phát sinh CTR sinh hoạt đô thị tiếp tục tăng trong thời gian tới (Phạm Ngọc Đăng và cộng sự, 2016). Xử lý chất thải đô thị bằng phương pháp chôn lấp vẫn là hình thức phổ biến. Tuy nhiên, bãi chôn lấp chất thải cũng được xem là nguồn tiềm tàng gây ô nhiễm môi trường do nước rỉ rác, những vấn đề về ô nhiễm môi trường do bãi chôn lấp không hợp vệ sinh, không đạt tiêu chuẩn gây ra nhiều bất cập làm ảnh hưởng tới môi trường xung quanh

và cuộc sống con người (Sinead Morris và cộng sự, 2018). Thành phần phức tạp của nước rỉ rác cũng chính là nguyên nhân gây khó khăn cho việc lựa chọn phương pháp xử lý nước rỉ rác một cách phù hợp (ví dụ: Các chất độc và hóa học sẽ gây khó khăn cho việc áp dụng phương pháp sinh học, còn việc áp dụng phương pháp hóa lý - đông tụ thì kinh phí tốn kém sẽ là một rào cản lớn...). Phương pháp xử lý bằng sinh học sẽ có hiệu quả cho bãi chôn lấp dưới 10 năm, còn phương pháp xử lý bằng hóa lý sẽ hiệu quả hơn với bãi chôn lấp trên 10 năm (F. Kargi và Pamukoglu, M. Y., 2004; S. Kheradmand và cộng sự, 2010; S. M. Raghab và cộng sự, 2013).

Việt Nam đã áp dụng một số công nghệ để xử lý nước rỉ rác nhưng chưa có công nghệ nào đáp ứng được yêu cầu về chất lượng dòng thải ra theo QCVN 25/2009-BTNMT. Nhiều công nghệ xử lý nước rỉ rác của nước ngoài không phù hợp với đặc điểm của nước rỉ rác ở Việt Nam là có thành phần rất phức tạp do rác thải không được phân loại tại nguồn trước khi đem chôn lấp. Phương pháp xử lý sinh học rất được chú trọng trong thời gian gần đây (đây là quá trình loại bỏ sinh học một số chất ô nhiễm ra khỏi môi trường (C. C. Azubuike và cộng sự,

2016; O. Ojuederie và Babalola, O., 2017), nó được thực hiện bởi các vi sinh vật tự nhiên làm giảm hàm lượng các chất ô nhiễm trong nước rỉ rác) do có rất nhiều ưu điểm như: hiệu quả xử lý cao, không sử dụng hóa chất trong quá trình xử lý do đó không phát sinh ô nhiễm thứ cấp, tiêu tốn ít năng lượng cho việc vận hành, chi phí đầu tư và vận hành không cao, thân thiện với môi trường...

Vi khuẩn thuộc loài *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 (Thirugnanasambandham và cộng sự, 2014). Chính vì thế vi khuẩn này có nhiều ứng dụng trong các lĩnh vực xử lý môi trường khác nhau. Một loạt các nghiên cứu phân lập, tuyển chọn các chủng thuộc chi *Bacillus* từ các nguồn nước thải khác nhau được công bố. Ví dụ như chủng *Bacillus subtilis* NT1 được phân lập với khả năng phân giải và chuyển hóa nhanh các hợp chất hữu cơ có trong nước thải dong riềng, bên cạnh đó chủng này còn có hoạt tính enzym đa dạng (xylanase, cellulase, amylase, protease) và khả năng xử lý COD cao 80 – 90% (Nguyễn Như Ngọc và cộng sự, 2016). Hay như chủng *Bacillus amyloliquefaciens* H12 với khả năng sinh tổng hợp enzym amylase với hoạt tính cao nhằm xử lý tinh bột trong nước thải dong riềng (Đỗ Thúy Hằng và cộng sự, 2015).

Nghiên cứu này nhằm phân lập, tuyển chọn và khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của chủng *Bacillus* có khả năng phân giải cellulose để xử lý nước rỉ rác.

## **2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **2.1. Đối tượng nghiên cứu**

Các mẫu nước rỉ rác được lấy từ Công ty CP Môi trường đô thị và Công nghiệp 11 - URENCO 11, tỉnh Hưng Yên.

### **2.2. Dụng cụ và hóa chất**

#### **2.2.1. Dụng cụ**

Các dụng cụ, thiết bị của phòng thí nghiệm của Bộ môn Vi sinh - Hóa sinh - Sinh học phân tử, Viện Công nghệ sinh học và Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Bách Khoa Hà Nội.

#### **2.2.2. Hóa chất, môi trường**

Cao thịt (Ấn Độ), peptone (Trung Quốc), NaCl (Trung Quốc), agar (Việt Nam), CMC (Nhật Bản), lugol, thuốc tím, fushin, NaOH, HCl, tinh bột tan (Trung Quốc), sữa gầy (Trung Quốc), glucose (Trung Quốc), folin (Đức), agar (Việt Nam), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, tyrosin, TCA, thuốc thử 3,5 – dinitrosalisyllic.

Môi trường sử dụng: môi trường dinh dưỡng NA (nutrient agar): peptone 5g/L, cao thịt 3g/L, NaCl 5g/L, agar 20g/L; Môi trường thử hoạt tính cellulose: peptone 5g/L, cao thịt 3g/L, NaCl 5g/L, agar 20g/L, CMC 10g/L.

Các môi trường được khử trùng ở 121°C trong 20 phút.

### **2.3. Phương pháp nghiên cứu**

#### **2.3.1. Phương pháp phân lập vi khuẩn**

Phương pháp phân lập vi khuẩn dựa trên khả năng chịu nhiệt của bào tử của các loài *Bacillus* (Đào Sỹ Đức, 2007). Từ 3 mẫu nước rỉ rác, lấy 50 mL nước thải vào mỗi bình tam giác 250 mL. Đặt các bình tam giác vào bể ổn nhiệt ở 80°C trong 20 phút. Pha loãng mẫu với các nồng độ pha loãng lần lượt là 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup> theo phương pháp pha loãng tới hạn. Hút 100 µL mẫu ở các nồng độ pha loãng khác nhau chuyển vào đĩa petri chứa môi trường NA. Tiến hành trang đều trên môi trường đến khi bề mặt môi trường khô. Nuôi các đĩa thạch ở 37°C trong 24 giờ.

#### **2.3.2. Phương pháp tuyển chọn dựa trên khả năng tạo cellulase cao**

##### **a. Phương pháp cấy chấm điểm.**

Tiến hành cấy chấm điểm các chủng đã phân lập được trên môi trường thử hoạt tính với cơ chất là CMC. Nuôi các chủng này ở 37°C trong 24 giờ. Sau đó, quan sát và tính tỷ số giữa đường kính vòng phân giải (D<sub>1</sub>) và đường kính khuẩn lạc (d<sub>1</sub>).

##### **b. Phương pháp đục lỗ thạch.**

Các chủng VSV nuôi trên môi trường NA có bổ sung 1% CMC ở điều kiện 37°C, tốc độ lắc 150 vòng/phút trong 24 giờ. Sau đó, ly tâm với tốc độ 8.000 vòng/phút trong 15 phút và thu dịch. Nhỏ 100 µL dịch thu được sau ly tâm vào các giếng thạch 8mm (d<sub>2</sub>). Các đĩa thạch

này nuôi ở 37°C trong 24 giờ và tính hiệu số giữa đường kính vòng phân giải (D<sub>2</sub>) và đường kính giếng thạch (d<sub>2</sub>).

c. Phương pháp đo hoạt lực enzym cellulase.

Phương pháp dựa trên cơ sở phản ứng tạo màu giữa đường khử với thuốc thử 3,5-dinitrosalisyllic (DNS). Cường độ màu của hỗn hợp phản ứng tỉ lệ thuận với nồng độ đường khử. Dựa theo đồ thị đường chuẩn glucose với thuốc thử DNS để tính hàm lượng đường khử trong mẫu.

Thiết lập công thức tính hoạt độ enzym và xác định giá trị hoạt độ (U/mL).

Thiết lập công thức:

$$E = (C.1000.V.f)/(180.V'.t) \quad (U/mL)$$

Trong đó:

C: nồng độ tương ứng mà enzym phân cắt, mg/ML;

V: tổng thể tích enzym và cơ chất tham gia phản ứng, mL;

V': thể tích dịch enzym tham gia phản ứng, mL;

f: hệ số pha loãng;

t: thời gian phản ứng của cơ chất và enzym, phút;

180: khối lượng mol của glucose, g/mol.

Dựa vào công thức trên, xác định được hoạt lực enzym cellulase của các chủng.

### **2.3.3. Phương pháp xác định sinh lý, sinh hóa của chủng vi sinh vật bằng Kit API 50 CHB (Nguyễn Thế Trang và cộng sự, 2012)**

Các chủng vi khuẩn nghiên cứu sau khi nghiên cứu đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào, được xác định khả năng đồng hóa các nguồn cacbon và đường bằng bộ KIT chuẩn sinh hóa API 50 CHB. Đây là bộ kit chuẩn gồm 50 phản ứng sinh hóa, bộ KIT chuẩn này được dùng cho vi khuẩn Gram (+).

### **2.3.4. Phương pháp định danh bằng sinh học phân tử.**

a. Tách chiết DNA tổng số.

Tiến hành nuôi tăng sinh chủng V40 trên môi trường NA ở 37°C trong 24 giờ. Hút 1 mL dịch lên men vào 2÷4 ống eppendorf 1,5 mL. Ly tâm 5.000 vòng/phút trong 10 phút, thu sinh khối tế bào để tách DNA. Loại hết phần dịch,

gạn lấy phần cặn sinh khối ở đáy, rửa bằng NaCl 0,09%, ly tâm 5.000 vòng/phút trong 10 phút. Hòa sinh khối tế bào trong 0,5 mL đệm TE và SDS (TE buffer: 15 mM Tris-HCl + 1 mM EDTA (pH = 7,5)). Ủ ở nhiệt độ phòng 10 phút. Thêm lysozym 50 µL/mL và proteinase K. Trộn nhẹ nhàng trong 3 phút, ủ ở 65°C trong 1 giờ. Bổ sung 0,15 mL CH<sub>3</sub>COOK. Ly tâm 10.000 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C. Chuyển dịch nổi sang ống eppendorf mới và bổ sung một lượng tương đương isopropanol. Ly tâm ở 13.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C thu tủa. Rửa tủa bằng EtOH 70%. Làm khô tủa, hòa tan lại DNA với 30 µL trong nước.

b. Phương pháp điện di gel agarose.

Tra mẫu: Mẫu DNA được trộn với đệm mẫu theo tỷ lệ 7:3, tổng lượng dịch là 10µL rồi tra vào các giếng trên gel.

Chạy điện di: DNA được chạy ở chế độ chạy 80 V và 40 mA trong thời gian 40 phút.

Sau đó bản gel được nhuộm trong dung dịch Ethidium Bromide 0,5 µg/mL trong 30 - 45 phút. Gel được soi dưới đèn tử ngoại, DNA được phát sáng nhờ liên kết với Ethidium Bromide.

c. Phản ứng PCR nhân đoạn gen 16S rRNA.

Thành phần của phản ứng PCR chuẩn với thể tích phản ứng là 25µl bao gồm: 5mM dNTPs (Fermentas) 1,5µL; 10X Taq Buffer (NEB) 2,5 µL; 5µM 27F (forward primer) 1µL; 5µM 1492R (reverse primers) 1µL; DNA template 1µL; Taq DNA pol (Sigma) 0,5µL; H<sub>2</sub>O 17,5µL. Trình tự mỗi xuôi và mỗi ngược như sau (Nguyễn Văn Cách, 2010):

Mỗi xuôi 27F:

AGAGTTTGATCCTGGCTCAG;

Mỗi ngược 1492R:

ACGGYTACCTTGTTACGACTT.

Chu trình nhiệt của phản ứng PCR chuẩn: Biến tính ở chu kỳ đầu ở 95°C trong 5 phút. Các chu kỳ sau biến tính trong 30 giây. Bắt cặp mỗi ở nhiệt độ 52°C trong 1 phút. Kéo dài ở 72°C trong 1 phút 30 giây. Thực hiện 35 chu kỳ. Chu kỳ cuối thực hiện ở 72°C trong 5 phút. Kết thúc phản ứng hạ nhiệt độ xuống 4°C. Sau khi có kết quả PCR, đem mẫu đi điện di với phương pháp tương tự với phương pháp điện di

DNA tổng số, 3μL/ giếng.

d. Giải trình tự:

Trình tự đoạn gen 16S rRNA được giải trình tự theo phương pháp Sanger cải tiến trên máy tự động ABI PRISM<sup>®</sup> 3100 Genetic Analyzer.

**2.3.5. Thử nghiệm khả năng xử lý nước rỉ rác của chủng *Bacillus subtilis* V40 quy mô phòng thí nghiệm**

- Chủng V40 được nuôi và tăng sinh trực tiếp trong môi trường nước rỉ rác đã thanh trùng có bổ sung thành phần 1% peptone, 0,5% NaCl ở điều kiện 35°C, pH 7, 150 rpm, tỷ lệ cấp giống 5%.

- Chuẩn bị bình tam giác 250ml như nhau có chứa 100 ml nước rỉ rác, điều chỉnh về pH 7 và thanh trùng ở điều kiện 121°C, trong 15 phút.

- Chủng V40, sau 48h nuôi cấy, ly tâm thu sinh khối, bổ sung khoảng 10<sup>6</sup> CFU/ml (tương ứng với 1ml sinh khối) chủng V40 vào bình tam giác TN có chứa nước rỉ rác đã chuẩn bị

như trên. Mẫu kiểm chứng không bổ sung chủng V40.

- Nuôi bình TN và bình KC ở cùng điều kiện trong tủ lắc 150 rpm, 35°C.

- Lấy mẫu sau 24h và kiểm tra sự thay đổi của COD trong các bình tam giác.

Hàm lượng COD và hiệu suất xử lý được xác định theo TCVN 6491:1999 (ISO 6060:1989).

**3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**3.1. Kết quả phân lập vi sinh vật**

Từ 3 mẫu nước rỉ rác, phân lập được 38 chủng vi khuẩn có khả năng phân giải cellulose. Các chủng này đều có khả năng tạo bào tử vì khả năng sống sót được sau khi đã gia nhiệt mẫu lên 80°C trong 20 phút. Sau đó, các khuẩn lạc được tách riêng rẽ và làm thuần để sử dụng cho các thí nghiệm sau. Kết quả được thống kê trong bảng 1.

**Bảng 1. Kết quả phân lập các chủng vi sinh vật từ 3 mẫu nước rỉ rác**

TT	Tên chủng	Hình thái khuẩn lạc	D1/d1
1	V9	Trắng đục, tròn, bề mặt nhẵn nheo	5,00
2	V12	Trắng đục, tròn	6,00
3	V20	Trắng ngà, bề mặt nhẵn nheo, viền răng cưa	6,50
4	V23	Trắng đục, bề mặt nhẵn nheo, viền răng cưa	6,40
5	V24	Trắng đục, bề mặt nhẵn nheo, viền răng cưa	6,00
6	V28	Trắng đục, bề mặt nhẵn nheo, viền răng cưa	5,33
7	V36	Trắng đục, bề mặt nhẵn nheo, viền răng cưa	5,33
8	V40	Trắng đục, bề mặt nhẵn nheo, viền răng cưa	5,30

*Trong đó: D1 là đường kính vòng phân giải. d1 là đường kính khuẩn lạc.*

Các chủng phân lập được nhìn chung đều có đặc điểm hình thái là màu trắng, bề mặt nhẵn nheo, khuẩn lạc có kích thước to nhỏ khác nhau. Trong đó có một số chủng có khả năng phân hủy cellulose tốt, thể hiện ở tỉ lệ D1/d1 cao, điển hình như 8 chủng ở bảng 1: V9 có tỷ lệ D1/d1 = 5, V12 có tỷ lệ D1/d1 = 6, V20 có tỷ lệ D1/d1 = 6,5, V23 có tỷ lệ D1/d1 = 6,4, V24 có tỷ lệ D1/d1 = 6, V28 có tỷ lệ D1/d1 = 5,33, V36 có tỷ lệ D1/d1 = 5,33, V40 có tỷ lệ D1/d1 = 5,3.

**3.2. Kết quả tuyển chọn vi sinh vật dựa trên phương pháp đục lỗ thạch và hoạt lực enzym cellulase**

Tiến hành phương pháp đục lỗ thạch với 8 chủng V9, V12, V20, V23, V24, V28, V36, V40 bằng cách ly tâm dịch thu được sau nuôi lỏng 24 giờ với tốc độ 8.000 vòng/phút trong 15 phút. Dịch nổi được nhỏ vào các giếng thạch và nuôi trong tủ ấm 24 giờ. Sau đó nhuộm lugol để quan sát và đo kích thước vòng phân giải (D2). Kết quả được thể hiện ở hình 1 và bảng 2.



Hình 1. Kết quả tuyển chọn bằng phương pháp đục lỗ thạch

Bảng 2. Kết quả tuyển chọn chủng vi khuẩn bằng phương pháp đục lỗ thạch hoạt độ enzyme cellulase của các chủng vi khuẩn

TT	Chủng	D2 (mm)	D2-d2 (mm)	Hoạt lực enzyme (U/mL)
1	V9	18,7	10,7	0,676
2	V12	20,0	12,0	0,609
3	V20	23,0	15,0	1,030
4	V23	27,0	19,0	1,807
5	V24	25,0	17,0	1,651
6	V28	25,6	17,6	1,044
7	V36	16,5	8,5	0,846
8	V40	24,4	16,4	2,921

Trong đó: D2 là đường kính vòng phân giải (mm), d2 là đường kính lỗ thạch (mm).

Dựa vào bảng 2, nhận thấy chủng V23 cho hiệu số giữa đường kính vòng phân giải và đường kính lỗ thạch cao nhất trong tất cả các chủng này đó là 19 mm. Các chủng còn lại đều cho đường kính vòng phân giải khá cao như V28 (17,6 mm), V24 (17 mm), V40 (16,4 mm). Tuy nhiên, khi xác định hoạt độ enzyme cellulase, dù kết quả định tính chủng V40 không phải là cao nhất, nhưng định lượng thì chủng V40 chính là chủng có hoạt độ enzyme cellulase cao nhất là 2,921 U/mL. Đối với công bố về cellulase của một số tác giả, như: Đỗ Xuân Hiên, cellulase thu được từ chủng *Bacillus subtilis* TCN1Đ60 có hoạt độ 0,06 U/mg (Đỗ Xuân Hiên, 2016) hay trong công

bố của tác giả Parushi Nargotra, cellulase từ chủng *Bacillus subtilis* SV1 đạt 2,201 IU/mL ± 0,06 U/ml sau 72 giờ lên men (Parushi Nargotra và cộng sự, 2016). Qua đó có thể thấy khả năng sinh cellulase của chủng V40 là tương đối cao, do đó chủng V40 được chọn để định danh.

### 3.4. Đặc tính sinh lý sinh hóa của chủng V40

Các chủng vi khuẩn nghiên cứu sau khi nghiên cứu đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào, được xác định khả năng đồng hóa các nguồn cacbon và đường bằng bộ KIT chuẩn sinh hóa API 50 CHB. Đây là bộ kit chuẩn gồm 50 phản ứng sinh hóa, bộ KIT chuẩn này được dùng cho vi khuẩn Gram (+).

Bảng 3. Đặc tính sinh lý sinh hóa của chủng V40 thử bằng KIT API 50 CHB

TT	Cơ chất	V40	TT	Cơ chất	V40	TT	Cơ chất	V40
1	Glycerol	±	18	Mannitol	+	35	D-Raffinoza	+
2	Erythritol	-	19	Sorbitol	+	36	Amidon	±
3	D-Arabinoza	-	20	α Methyl-D Manosit	-	37	Glycogen	±
4	L-Arabinoza	+	21	α Methyl-D Glucosit	-	38	Xylitol	-
5	Riboza	+	22	N Acetyl glucosamin	±	39	β-Gentiobioza	+
6	D-Xyloza	-	23	Amygdalin	+	40	D-Turanoza	-
7	L-Xyloza	-	24	Arbutin	+	41	D-Lyxozza	-
8	Adonitol	-	25	Esculin	+	42	D-Tagatoza	-

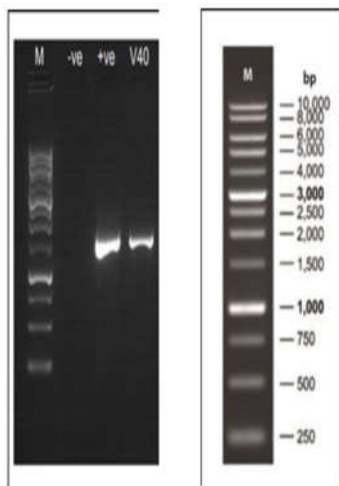
TT	Cơ chất	V40	TT	Cơ chất	V40	TT	Cơ chất	V40
9	β Methyl - xylosit	-	26	Salicin	+	43	D-Frucoza	-
10	Galactoza	±	27	Cellobioza	+	44	L-Frucoza	-
11	D-Glucoza	+	28	Maltoza	+	45	D-Arabitol	-
12	D-Frucoza	+	29	Lactoza	+	46	L-Arabitol	-
13	D-Manoza	+	30	Melibioza	+	47	Gluconat	-
14	L-Sorboza	-	31	Saccaroza	+	48	2 ceto-gluconat	-
15	Rhamnoza	+	32	Trehaloza	+	49	5 ceto-gluconat	-
16	Dulcitol	-	33	Inulin	±			
17	Inositol	±	34	Melezitoza	±			

Trong đó: “+” là có phản ứng, “-” là không phản ứng, “±” phản ứng nhưng không rõ ràng.

Chủng V40 được tăng sinh trong môi trường NB, nhiệt độ 35°C, tốc độ lắc 150 vòng/phút trong 48 giờ. Sau đó, kiểm tra đặc tính sinh lý sinh hóa bằng KIT API 50 CHB, thu được kết quả ở bảng 4. Sau khi thử KIT

API 50 CHB, tiến hành đọc kết quả nhận thấy chủng V40 có độ tương đồng cao với loài *Bacillus*.

### 3.5. Kết quả định danh bằng phương pháp sinh học phân tử



(a)



(b)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus subtilis strain DSM 10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2682	2682	100%	0.0	100%	NR_027552.1
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus subtilis strain IAM 12118 16S ribosomal RNA, complete sequence</a>	2677	2677	100%	0.0	99%	NR_112116.2
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus subtilis subsp. inaquosorum strain BQSC 3A28 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2677	2677	100%	0.0	99%	NR_104873.1
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus subtilis subsp. subtilis strain 168 16S ribosomal RNA, complete sequence</a>	2673	2673	100%	0.0	99%	NR_102783.2
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus subtilis strain NBRC 13719 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2661	2661	99%	0.0	100%	NR_112629.1
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus halotolerans strain DSM 8802 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	2659	2659	100%	0.0	99%	NR_115063.1
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus vallismortis strain DSM 11031 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2659	2659	100%	0.0	99%	NR_024696.1
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus Mojavensis strain JFO15718 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2659	2659	100%	0.0	99%	NR_024693.1
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus nakamurai strain NRRL B-41091 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	2655	2655	100%	0.0	99%	NR_151897.1
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus subtilis strain JCM 1465 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2655	2655	98%	0.0	100%	NR_113265.1

(c)

**Hình 2. Kết quả định danh chủng V40**

(a) Kết quả chạy điện di sản phẩm sau PCR;

(b) Hình ảnh trình tự gen của chủng V40;

(c) Hình ảnh so sánh độ tương đồng của chủng V40 với các chủng trên Genbank.



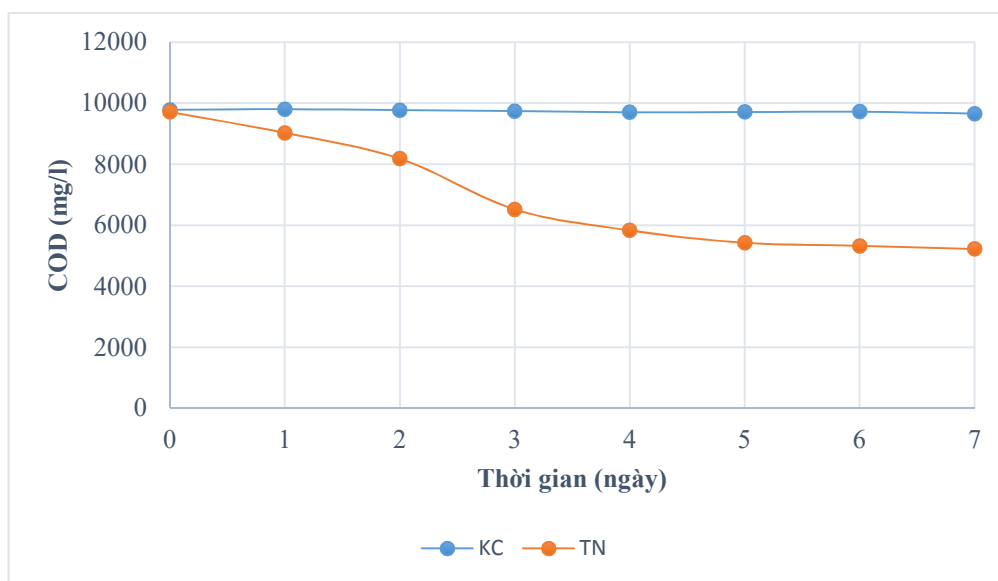
Gene mã hoá rRNA có tính bảo thủ cao nên được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu đa dạng vi sinh vật là một trong các thông tin quan trọng để định loại vi sinh vật. Hiện nay trong ba loại gene mã hoá rRNA của vi khuẩn (5S, 16S, 23S) thì gene mã hoá cho 16S rRNA được nghiên cứu và sử dụng nhiều nhất do có tính bảo thủ cao và kích thước khoảng 1500 bp đủ để phân loại giữa các loài và dễ thao tác thí nghiệm.

Hình 2 (a) là hình ảnh điện di sản phẩm sau PCR, dựa vào hình ảnh ta có thể thấy sản phẩm điện di thu được chỉ có duy nhất 1 vạch sáng đậm rõ nét đồng thời không bị đứt gãy và không lẫn RNA. Sản phẩm PCR 16s rRNA sau khi tinh sạch được gửi đi giải trình tự hai chiều bằng máy ABM 300, kết quả thu được đem đi chạy trên chương trình BLAST để xác định độ tương đồng với các chủng trong ngân hàng gen ta thu được kết quả thể hiện ở hình 2 (b,c). Kết quả cho thấy chủng V40 có độ tương đồng cao

với *Bacillus subtilis* JCM 1465 lên tới 100%.

Đồng thời dựa vào đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa của chủng V40 mà ta đã khảo sát ở trên ta có thể khẳng định chủng V40 thuộc loài *Bacillus subtilis* (*Bacillus subtilis* là trực khuẩn hình que, có khả năng tạo bào tử, đặc biệt là có khả năng chịu đựng các điều kiện môi trường khắc nghiệt, vi khuẩn *Bacillus subtilis* với khả năng sinh tổng hợp enzyme ngoại bào phân giải các hợp chất hữu cơ không tan thành các đơn phân tử (các monomer và oligomer) dễ tan hơn và dễ hấp thụ, ngoài ra, vi khuẩn *Bacillus subtilis* có thể sử dụng được đa dạng nguồn cơ chất để tăng sinh khối và phát triển) (Thirugnanasambandham và cộng sự, 2014). Vì vậy, đề xuất đặt tên chủng là *Bacillus subtilis* V40. Từ đây, tiến hành sử dụng chủng này cho các nghiên cứu tiếp theo.

### 3.6. Kết quả xử lý COD quy mô phòng thí nghiệm



Hình 3. Kết quả xử lý COD quy mô phòng thí nghiệm của chủng V40

Bước đầu thử nghiệm khả năng xử lý của chủng V40 trong quy mô phòng thí nghiệm đối với mẫu nước rỉ rác đã được thanh trùng nhằm chứng minh trong nước rỉ rác không còn chủng vi sinh vật nào khác trước khi bổ sung chủng V40. Hai bình TN và KC được nuôi trong cùng điều kiện, sau 7 ngày thí nghiệm, trong khi bình kiểm chứng COD không có dấu hiệu giảm

(2%) nguyên nhân là do vi sinh vật trong mẫu kiểm chứng đã bị thanh trùng nên không có sự phát triển nên COD hầu như không thay đổi.

Bình TN từ nồng độ COD của mẫu ban đầu là 9712 mg/L, sau 7 ngày xử lý còn 5221 mg/L tương ứng với hiệu quả xử lý 45,93%. Giải thích cho việc COD không có dấu hiệu tiếp tục giảm là do các yếu tố tác động trực tiếp gây

ảnh hưởng đến hiệu quả xử lý của chúng. Việc bổ sung trực tiếp chủng sau nuôi cấy vào môi trường nước thải có nồng độ ô nhiễm cao đã dẫn đến việc các chủng phải mất một thời gian để thích nghi với môi trường, đồng thời thành phần trong nước rỉ rác khá phức tạp nên có khả năng một số chất mà chủng không thể sử dụng nên hàm lượng COD giảm chậm.

Các số liệu tổng kết thành phần nước rỉ rác tại bãi chôn lấp trên địa bàn Hà Nội cho thấy nồng độ các chất ô nhiễm rất cao và dao động trong khoảng rất rộng: COD = 1.000 - 42.000 mg/l, BOD<sub>5</sub> = 500 - 15.000 mg/l (Viện KH và CN Việt Nam, 2006), gây khó khăn rất nhiều cho công tác xử lý, hiện nay chưa có phương pháp nào sử dụng trực tiếp vi sinh vật trực tiếp ngay từ đầu (khi nồng độ các chất ô nhiễm cao), hầu hết đều sử dụng phương pháp hóa học, keo tụ để làm giảm thành phần ô nhiễm xuống mức thích hợp (COD = 2.000 – 4.000 mg/L) mới có thể xử lý được bằng phương pháp sinh học, điều đó có thể vô tình gây phát sinh ô nhiễm thứ cấp, đồng thời phần nào đó các chất hóa học tồn dư sau quá trình xử lý hóa học, keo tụ sẽ trực tiếp ức chế quá trình xử lý sinh học, nên việc chủng V40 có thể trực tiếp bổ sung vào nước rỉ rác ngay khi nồng độ chất ô nhiễm cao làm giảm hàm lượng các chất ô nhiễm trong nước rỉ rác, ổn định thành phần và biên độ dao động của nước rỉ rác sẽ làm giảm sự phụ thuộc hóa chất, không gây ô nhiễm thứ cấp đồng thời sẽ hỗ trợ rất tốt cho các bước xử lý tiếp theo.

#### **4. KẾT LUẬN**

Đã tuyển chọn được chủng vi khuẩn V40 trong 38 chủng phân lập từ 3 mẫu nước rỉ rác có năng lực sinh tổng hợp cellulose cao, hoạt độ cellulase xác định được là 2,921 U/mL. Đã xác định được các đặc tính sinh hóa của chủng V40, tương đồng với các đặc tính của chủng *Bacillus subtilis*. Đã định tên bằng kỹ thuật sinh học phân tử thành công chủng V40 có độ tương đồng 100% so với chủng *Bacillus subtilis* và đặt tên là *Bacillus subtilis* V40. Chủng *Bacillus subtilis* V40 đã được sử dụng để bổ sung vào xử lý nước rỉ rác với nồng độ

10<sup>6</sup> CFU/ml thấy rằng, hiệu suất xử lý COD cao hơn nhiều so với đối chứng. Chỉ số COD nước rỉ rác ban đầu cao, đạt 9712 mg/L, sau 7 ngày xử lý bằng chủng V40 đạt hiệu suất xử lý lên tới 45,93% trong khi đối chứng sau 7 ngày hầu như chỉ số COD không giảm. Chủng V40 hoàn toàn có thể sử dụng làm tác nhân để xử lý nước rỉ rác hiệu quả.

#### **Lời cảm ơn!**

*Nghiên cứu này thực hiện với sự hỗ trợ của Đề tài mã số: KC.08.17/16-20, Bộ Khoa học và Công nghệ. Các tác giả chân thành cảm ơn Chương trình.*

#### **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. F. N. Ahmed và C. Q. Lan (2012). Treatment of landfill leachate using membrane bioreactors: A review. *Desalination*, 287: 41-54.
2. C. C. Azubuiké, C. B. Chikere và G. C. Okpokwasili (2016). Bioremediation techniques-classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. *World J. Microbiol. Biotechnol*, 32: 180.
3. Nguyễn Văn Cách (2010). Báo cáo khoa học đề tài: Nghiên cứu ứng dụng công nghệ vi sinh và hệ thống thiết bị tiết kiệm năng lượng để xử lý nước thải sinh hoạt đô thị - Mã số KC.04.23/06-10, Trung tâm thông tin Tư liệu Quốc gia Việt Nam, Hà Nội.
4. Phạm Ngọc Đăng, Tăng Thế Cường, Trần Thế Loan, Nguyễn Hưng Thịnh, Vũ Đình Nam và Nguyễn Hoàng Ánh (2016). Báo cáo hiện trạng môi trường quốc gia năm 2016: Bức tranh toàn cảnh môi trường đô thị Việt Nam. Bộ Tài nguyên và Môi trường.
5. Đào Sỹ Đức (2007). Nghiên cứu xử lý dịch đen nhà máy sản xuất bột giấy bằng phương pháp hóa học và sinh học. Luận văn thạc sỹ hóa học, Trường đại học Khoa học tự nhiên, Hà Nội.
6. Đỗ Thúy Hằng, Trần Liên Hà và 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 & Công nghệ*.
7. Đỗ Xuân Hiền (2016). Báo cáo tổng hợp đề tài KC.08/11-15: Nghiên cứu xây dựng công nghệ tích hợp hóa lý - sinh học thích ứng, hiệu quả, an toàn và bền vững với môi trường sinh thái để xử lý nước rỉ rác tại bãi chôn lấp rác tập trung. Bộ Khoa học và Công nghệ.
8. F. Kargi và M. Y. Pamukoglu (2004). Adsorbent supplemented biological treatment of pre-treated landfill leachate by fed-batch operation. *Bioresour. Technol*, 94: 285-291.
9. S. Kheradmand, A. Karimi-Jashni và M. Sartaj (2010). Treatment of municipal landfill leachate using a combined anaerobic digester and activated sludge system. *Waste Manag*, 30: 1025-1031.



10. Sinead Morris, Guiomar Garcia-Cabellos, Deirdre Enright, David Ryan và Anne-Marie Enright (2018). Bioremediation of Landfill Leachate Using Isolated Bacterial Strains. *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation*, 6: 26-35.

11. Nguyễn Như Ngọc, Nguyễn Văn Cách và 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*.

12. O. Ojuederie và O. Babalola (2017). Microbial and Plant-Assisted Bioremediation of Heavy Metal Polluted Environments: A Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 14: 1504.

13. Parushi Nargotra, Surbhi Vaid và Bijender Kumar Bajaj (2016). Cellulase Production from *Bacillus subtilis* SV1 and Its Application Potential for Saccharification of Ionic Liquid Pretreated Pine Needle Biomass under One Pot Consolidated Bioprocess. *Fermentation*, 2, 19.

14. S. M. Raghav, A. M. Abd El Meguid và H. A. Hegazi (2013). Treatment of leachate from municipal solid waste landfill, *HBRC J*, 9: 187-192.

15. Thirugnanasambandham, K. Sivakumar, V. Prakash và M.J. (2014). Analysis of Efficiency of *Bacillus subtilis* To Treat Bagasse Based Paper and Pulp Industry Wastewater. *A Novel Approach*, 58: 198 – 204.

16. E. De Torres-Socias, L. Prieto-Rodríguez, A. Zapata, I. Fernándezcalderero, I. Oller và S. Malato (2014). Detailed treatment line for a specific landfill leachate remediation. *Brief economic assessment*.

17. Nguyễn Thế Trang, Nguyễn Thị Đà và Trần Đình Mẫn (2012). Nghiên cứu tuyển chọn vi khuẩn ưa nhiệt sinh  $\alpha$ -amylaza bền nhiệt phân lập ở Việt Nam. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 50: 219-229.

18. Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam (2006), Báo cáo đề tài Mã số TC-MT/07-04-3: Nghiên cứu so sánh các công nghệ xử lý nước rỉ rác đạt tiêu chuẩn loại B (TCVN) trong nước và trên thế giới ứng dụng cho bãi chôn lấp rác trên địa bàn Hà Nội.

## ISOLATION AND SCREENING OF CELLULASE PRODUCING BACILLUS STRAINS FOR LEACHATE TREATMENT

Tran Lien Ha<sup>1</sup>, Truong Thanh Luan<sup>2</sup>, Pham Dinh Vinh<sup>3</sup>  
<sup>1,2,3</sup>Hanoi University of Science and Technology

### SUMMARY

Leachate has high pollution and varies with the age of the landfill and the seasonality of the year. Leakage emissions directly into the environment without control will cause adverse effects on the environment as well as human health. Currently, Vietnam has applied a number of technologies for leachate treatment, but no technology has met the quality requirements of QCVN 25/2009-BTNMT. The microbiological method is used because there are many advantages such as; high treatment efficiency, no chemical use during treatment so no secondary pollution, low energy consumption for transportation green, etc. Some studies have shown that cellulose is one of the major components in leachate. One of the solutions for leachate treatment is the use of *Bacillus*, which is capable of degrading cellulose due to its rapid growth, good deposition, and enzymatic activity. From the 3 leachate samples, the V40 strain produced cellulase of 2,921 U/ml was selected. The V40 strain was identified by Kit 50 CHB and 16S rRNA for 100% homology with *Bacillus subtilis* JCM 1465 which suggested naming *Bacillus subtilis* V40. *Bacillus subtilis* V40 was used with concentration with  $10^6$  CFU/ml to treat leachate of COD at 9712 mg/L after 7 days, the efficient of 45.93% COD treatment and 2% for control samples.

**Keywords:** *Bacillus subtilis*, cellulose, enzyme cellulase, landfill leachate, leachate treatment.

Ngày nhận bài : 07/11/2018

Ngày phản biện : 19/11/2018

Ngày quyết định đăng : 26/11/2018