

TẠO CHẤT TRỢ KEO TỤ TRÊN BÙN THẢI BỞI VI KHUẨN PHÂN LẬP TỪ NHÀ MÁY SẢN XUẤT BIA HÀ NỘI

Nguyễn Hải Vân¹, Đào Thị Ngọc Ánh¹, Ngô Thị Huyền Trang¹,
Nguyễn Duy Trung¹, Nguyễn Việt Hoàng², Nguyễn Mai Dương³, Đặng Thị Cẩm Hà^{1*}

¹Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam, *dangcha80@yahoo.com

²Viện Công nghệ Môi trường, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam

³Văn phòng Bộ, Bộ Khoa học và Công nghệ

TÓM TẮT: Một trong những nghiên cứu công nghệ gần đây gây được sự chú ý bởi tính bền vững, kinh tế và an toàn là tái sử dụng bùn sinh học của các hệ thống xử lý nước thông qua sử dụng chất trợ keo tụ sinh học (EPS) từ vi khuẩn. Từ bùn thải của hệ thống xử lý nước thải ở nhà máy bia Hà Nội đóng tại Mê Linh, Vĩnh Phúc, 10 chủng vi khuẩn đã được phân lập trên môi trường TSB. Chủng BES19 là một trong 10 chủng vi khuẩn trên đã được phân loại dựa trên trình tự đầy đủ của gene mã hóa 16S rRNA. Vi khuẩn này thuộc chi *Bacillus* và được đặt tên là *Bacillus* sp. BES19. Các chủng vi khuẩn nghiên cứu đều thể hiện khả năng tạo bông rõ rệt, hoạt tính keo tụ với cao lạnh có bổ sung Ca^{2+} nồng độ 150mg/l đạt được từ 36 đến 80% khi bổ sung lượng EPS khác nhau. EPS sinh tổng hợp bởi chủng BES19 có hoạt tính keo tụ tốt nhất đạt 80% với hàm lượng LB - EPS và TB - EPS sinh ra lần lượt là 4330 mg/l và 689 mg/l. Kết quả này mở ra hướng nghiên cứu mới về sản xuất các chất trợ keo tụ sinh học thân thiện môi trường thay thế dần cho các chất trợ keo tụ hóa học đang được sử dụng hiện nay.

Từ khóa: *Bacillus*, bùn thải, chất trợ keo tụ sinh học, EPS, vi khuẩn.

MỞ ĐẦU

Với sự phát triển bùng nổ về kinh tế và xã hội, bùn thải đang trở thành một gánh nặng cho các doanh nghiệp không chỉ ở Việt Nam mà ngay cả ở các nước có nền kinh tế, khoa học kỹ thuật tiên tiến trên thế giới. Theo cơ quan bảo vệ môi trường Hoa Kỳ (US-EPA), chi phí xử lý bùn thải chiếm tới 50% chi phí vận hành của hệ thống xử lý nước thải. Ở Việt Nam, bùn thải chủ yếu được xử lý bằng cách ép loại nước, phơi khô, đổ bỏ hay chôn lấp, chỉ một phần rất nhỏ được sử dụng làm phân bón. Việc thải, chôn lấp bừa bãi không chỉ gây ra sự lãng phí nguồn nguyên liệu có khả năng tái tạo mà còn gây ô nhiễm môi trường nghiêm trọng. Một trong những nghiên cứu công nghệ mới đáng chú ý là tái sử dụng bùn sinh học của các hệ thống xử lý nước thải thông qua sử dụng chất trợ keo tụ sinh học từ vi sinh vật.

Chất trợ keo tụ sinh học là các polymer sinh học được tiết ra bên ngoài môi trường nuôi cấy hoặc trên thành tế bào (extracellular polymeric substances - EPS) [30]. Thành phần chính của EPS là các polysaccharide và protein, ngoài ra còn có một lượng nhỏ là lipid, nucleic acid và

các polymer sinh học khác [10, 11]. Các dạng EPS tồn tại bên ngoài của tế bào được chia thành hai loại là EPS liên kết - TB-EPS (bao vỏ, polyme nang, gel đặc, polyme liên kết yếu, và các chất hữu cơ đính kèm) và EPS hòa tan - LB-EPS (đại phân tử hòa tan, chất keo, và chất nhớt) [12, 21]. TB - EPS gắn chặt với tế bào, trong khi LB - EPS liên kết yếu và hòa tan vào dung dịch [24].

Một số chức năng đặc hiệu và quan trọng của EPS phụ thuộc vào thành phần cấu trúc và hệ sinh thái của vi sinh vật. EPS từ vi khuẩn có tiềm năng rất lớn và chính các đặc tính hóa lý của EPS quyết định khả năng ứng dụng khác nhau của chúng trong thương mại. Các ứng dụng từ được phẩm đến chế biến thực phẩm, mở rộng hơn là khử độc, tái tạo sinh học, công nghệ sinh học, và hóa dầu [17]. Trong công nghệ tái tạo sinh học và xử lý nước thải, EPS đóng vai trò quan trọng trong sự tạo bông, lắng cặn và loại bỏ kim loại nặng thông qua khả năng tạo phức [1].

Các nghiên cứu gần đây trên thế giới cho thấy, nhiều chủng vi sinh vật có khả năng sinh ra lượng lớn EPS có hoạt tính keo tụ cao như

Virgibacillus sp. Rob, *Bacillus* sp. Gilbert và *Artrobacter* sp. Raats [2, 16, 22]. Tuy nhiên, hầu hết các nghiên cứu về EPS hiện nay đều sử dụng môi trường nhân tạo để nuôi cấy vi sinh vật sinh EPS và nhược điểm của nó là giá thành sản xuất EPS cao [18]. Theo các nghiên cứu trong những năm gần đây, bùn thải sinh học có tiềm năng tái sử dụng cho các mục đích khác nhau bởi hàm lượng chất hữu cơ, nitơ và photpho cao [27]. Ưu điểm nổi bật của hướng nghiên cứu này là tận dụng thành phần dinh dưỡng trong bùn thải để thay thế cho môi trường nhân tạo đắt tiền thường được sử dụng trong quá trình nuôi cấy vi sinh vật để tạo ra các sản phẩm sinh học có ích như chế phẩm sinh học cải tạo đất, thuốc trừ sâu sinh học, màng PE, chất keo tụ, chất trợ keo tụ. Việc tận dụng bùn thải vừa giúp giảm giá thành vừa góp phần bảo vệ môi trường. Bùn thải đảm bảo chất lượng từ các nhà máy chế biến, các chất hóa cơ đã trở thành nguyên liệu đầu vào cho rất nhiều sản phẩm.

Ở Việt Nam, nghiên cứu về EPS làm chất trợ keo tụ sinh học là một vấn đề rất mới, các công trình khoa học công bố về hợp chất này chưa nhiều. Bên cạnh đó, sự đa dạng của vi sinh vật có khả năng sinh EPS khá cao nhưng chúng hầu như chưa được nghiên cứu cơ bản nhằm khai thác, phục vụ các mục đích khác nhau trong phát triển kinh tế. Tiềm năng phân lập và tuyển chọn vi khuẩn có khả năng sinh EPS cho mục đích tăng tốc độ và giảm chi phí xử lý nước thải ô nhiễm rất lớn. Vì vậy, mục tiêu của nghiên cứu này là phân lập và sàng lọc một số chủng vi khuẩn có khả năng sinh EPS trên môi trường bùn từ Nhà máy bia Hà Nội; đánh giá một số đặc điểm của EPS từ chủng vi khuẩn đã chọn lọc.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu là bùn sinh học từ hệ thống xử lý hiếu khí nước thải của Nhà máy bia Hà Nội tại Mê Linh, Vĩnh Phúc để phân lập vi sinh vật. Bùn được cô đặc tới nồng độ 20g MLSS/L được sử dụng làm nguồn nguyên liệu để nuôi cấy vi sinh vật. Bùn thải được bảo quản ở 4°C.

Cao lanh được sử dụng để đánh giá hoạt tính tạo bông của EPS do có thể bề mặt xấp xỉ -

30 mV, tương đương với thể bề mặt của bùn sinh học [1, 19]. Cao lanh sử dụng trong nghiên cứu có kích thước hạt nhỏ hơn 38 μm được cung cấp bởi Viện Khoa học vật liệu, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Phân lập các chủng vi khuẩn sinh EPS

Sử dụng môi trường thạch Tryptic Soy Agar (TSA) với độ pha loãng tới hạn để phân lập vi khuẩn sinh EPS. Chọn lọc các vi khuẩn có độ nhầy nhớt cao trên các đĩa thạch đã được nuôi ở 30°C sau 24-48 giờ.

Phân loại vi khuẩn

Chủng vi khuẩn có hoạt tính keo tụ cao nhất được phân loại theo phương pháp truyền thống và phương pháp so sánh trình tự gene mã hóa 16S rRNA với các chủng vi khuẩn đã được công bố trên Genbank. Cặp mồi được sử dụng là: 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') và 1492R (5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3'). PCR được thực hiện với chu trình nhiệt như sau: 95°C/10 phút, 30 chu kỳ: (94°C/60 giây - 55°C/60 giây - 72°C/90 giây), 72°C/7 phút, giữ ở nhiệt độ 4°C sau khi phản ứng kết thúc. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%. Sản phẩm DNA sau khi được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR được làm sạch bằng kit QIAGEN. Trình tự gene mã hóa 16S rRNA được xác định bằng máy đọc trình tự tự động ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer và Sequence Analysis. Sử dụng các phần mềm Clustal X và Mega 5 để xây dựng cây phát sinh chủng loại.

Nuôi vi khuẩn sinh EPS trên môi trường bùn thải

Giống cấp 2 các chủng vi khuẩn nuôi cấy trên môi trường TSB pH7, ở 30°C, lắc 200 vòng/phút trong 24 giờ được sử dụng làm giống. Nguồn giống này được bổ sung vào môi trường bùn thải (20g MLSS/L) với tỷ lệ 3% v/v. Các bình được nuôi cấy ở 30°C, lắc 200 vòng/phút. Sau 24 giờ, 3% v/v giống cấp 3 được cấy chuyển tiếp vào 50 mL môi trường bùn thải, nuôi ở 30°C, lắc 200 vòng/phút. Sau 48 giờ, dịch nuôi cấy trên bùn lần 2 được sử dụng để đánh giá số lượng vi sinh vật theo phương pháp MPN và các nghiên cứu tiếp theo.

Phương pháp xác định khối lượng và thành phần của EPS

Tách LB-EPS và TB-EPS thô

Dịch nuôi cấy các chủng vi khuẩn trên bùn lần 2 được ly tâm với tốc độ 4.000 g ở 4°C trong thời gian 20 phút. Phần lỏng thu được chứa LB-EPS thô, phần cặn chứa TB-EPS thô. Phần cặn được bổ sung dung dịch muối (NaCl 0,05%) tới thể tích ban đầu, vortex 2 phút cho hỗn hợp đồng nhất. Sau đó, hỗn hợp được ủ ở 60°C trong 30 phút. Ly tâm ở 4°C với tốc độ 4.000 g trong 20 phút, phần lỏng thu hồi được chứa TB-EPS thô.

Thu hồi và xác định khối lượng EPS

LB-EPS thô và TB-EPS thô được bổ sung dung dịch ethanol 98% với tỷ lệ 1:2 (EPS: Ethanol). Để qua đêm ở -20°C, sau đó ly tâm với tốc độ 4.000 g ở 4°C trong thời gian 20 phút, thu phần kết tủa và sấy ở 105°C tới khối lượng không đổi.

Xác định thành phần EPS

Hàm lượng carbohydrate của EPS được xác định bằng phương pháp axit phenol-sulfuric [5]. Hàm lượng protein của EPS được xác định theo phương pháp của Lowry (1951) [15].

Quy trình đánh giá hoạt tính keo tụ của EPS

Các chủng vi khuẩn sau khi nuôi cấy trên bùn thải sinh học được sử dụng trực tiếp làm nguyên liệu cho thí nghiệm đánh giá hoạt tính keo tụ. Thí nghiệm được thực hiện trên máy Jar-test, 500 mL dung dịch cao lạnh (5 g cao lạnh/l) được khuấy ở 120 vòng/phút trong 5 phút. Bổ sung thêm Ca²⁺ (150 mg/l) và dịch nuôi cấy trên bùn của các chủng vi khuẩn với các thể tích 0,5 ml; 1 ml; 2 ml; 3 ml; 4 ml; 6 ml tiếp tục khuấy với tốc độ trên trong 5 phút sau đó giảm tốc độ khuấy xuống 70 vòng/phút trong 30 phút.

Chuyển toàn bộ hỗn hợp sang ống đong 500mL để lắng trong 30 phút. Thu hồi 400ml nước trong phía trên đem đo độ đục (NTU) từ đó xác định hoạt tính keo tụ (FA).

Công thức tính hoạt tính keo tụ:

$$FA = \frac{(NTU)_0 - (NTU)_x}{(NTU)_0} \times 100 (\%)$$

Trong đó, (NTU)₀ là độ đục của mẫu so sánh (không có B-EPS); (NTU)_x là độ đục của mẫu (có B-EPS); FA là hoạt tính keo tụ (%).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập vi khuẩn sinh EPS

Dựa trên đặc điểm nhầy nhớt của khuẩn lạc trên đĩa thạch, 10 chủng vi khuẩn (được đặt tên BES) đã được phân lập từ bùn thải Nhà máy bia Hà Nội. Đặc điểm khuẩn lạc và tế bào của mười chủng vi khuẩn được thể hiện trong hình 1-10.

Phân loại chủng vi khuẩn

Quan sát dưới kính hiển vi điện tử, chủng BES19 có dạng trực khuẩn dài, tròn hai đầu, kích thước khoảng 1,01-1,25µm x 3,4-4,8µm, mọc thành chuỗi. Hình ảnh quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét cho thấy rõ một lớp màng nhầy giữa các tế bào là minh chứng cho khả năng sinh EPS của chủng EPS19 (hình 1).

So sánh với các trình tự gen 16S rRNA thu thập từ Genbank, cây phát sinh chủng loại của chủng BES19 (hình 2) đã được xây dựng dựa trên phương pháp của Saitou & Nei (1987) [23], thước đo phân sự sai khác 1/10 nucleotide.

So sánh trình tự của gen 16S rRNA thu được cho thấy, chủng BES19 có mức tương đồng 100% với các chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* như *Bacillus subtilis* DYU1, *Bacillus subtilis* 30C3-1, *Bacillus subtilis* 30AA2-2, *Bacillus subtilis* 30P2, *Bacillus subtilis* CJ2. Trong số đó, chủng *Bacillus subtilis* DYU1 được biết đến có khả năng sinh EPS có hoạt tính keo tụ rất tốt [31]. Ngoài ra, trình tự gen 16S rRNA chủng BES19 còn tương đồng với các chủng *Bacillus licheniformis* T14 (98%), *Bacillus* sp. Gilbert (91%). Chủng *Bacillus licheniformis* T14 được phát hiện có khả năng sinh EPS [25] và chủng *Bacillus* sp. Gilbert có hoạt tính keo tụ rất tốt [28].

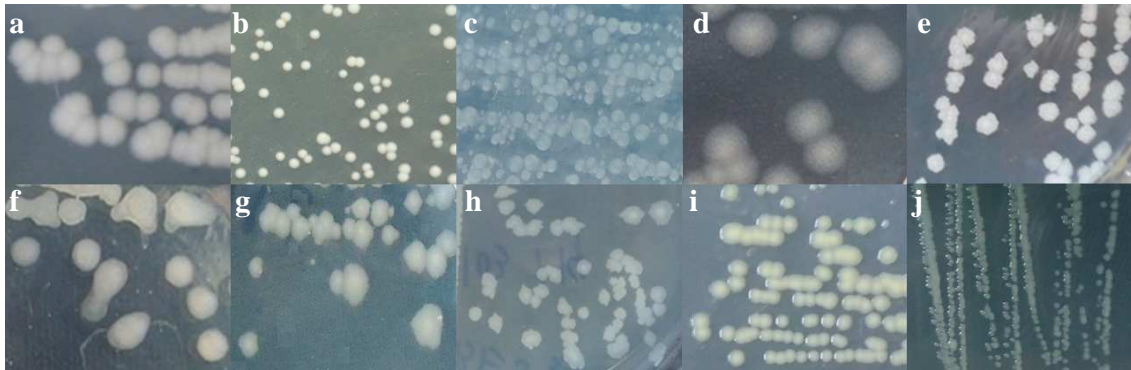
Như vậy, dựa trên các đặc tính hình thái và trình tự đoạn gen 16S rRNA so sánh với các loài thuộc chi *Bacillus*, chủng vi khuẩn BES19 được xếp vào chi *Bacillus* và được đặt tên là *Bacillus* sp. BES19.

Khả năng sinh trưởng của vi khuẩn trên bùn thải

Lựa chọn các chủng vi khuẩn có khả năng tổng hợp EPS trên môi trường bùn thải là mục tiêu chính của nghiên cứu này. Vì vậy, các chủng vi khuẩn đã phân lập được nuôi cấy trên

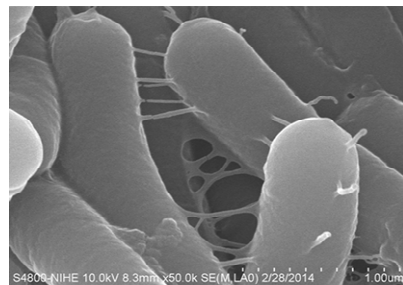
bùn để đánh giá khả năng sinh trưởng và tiềm năng sinh EPS. Theo nghiên cứu của Nguyễn Thị Vân Trang và nnk. (2012) [20], bùn thải từ Nhà máy bia Hà Nội có tính ổn định cao với nồng độ cacbon hữu cơ, nitơ và photpho lần

lượt là 232,8; 20,5 và 19,1 g/kg. Vì vậy, bùn thải từ hệ thống xử lý nước thải của nhà máy bia Hà Nội được lựa chọn để trở thành nguồn nguyên liệu cơ bản để thực hiện các ứng dụng nghiên cứu tiếp theo.

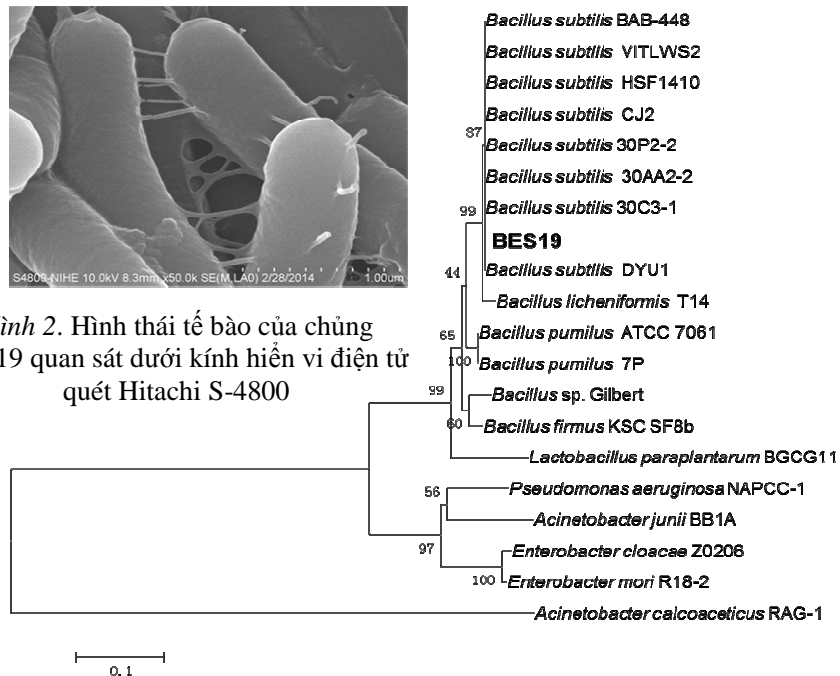


Hình 1. Hình thái khuẩn lạc của 10 chủng vi khuẩn phân lập

a: BES9 Khuẩn lạc trắng tròn, viền quanh đều, bề mặt khô, hơi lồi; b: BES13 Khuẩn lạc nhỏ, tròn, màu trắng, viền quanh đều, bề mặt lồi và ướt; c: BES16 Khuẩn lạc nhỏ, tròn, màu trắng, bề mặt hơi lồi và ướt; d: BES17 Khuẩn lạc trắng tròn, viền ngoài hơi mờ, bề mặt khô, hơi lồi; e: BES18 Khuẩn lạc trắng đục, nhỏ, có vòng tâm nhỏ ở giữa, viền ngoài không đều, bề mặt nhẵn, ướt; f: BES19 Khuẩn lạc hình tròn, màu trắng, viền quanh đều, bề mặt rất phồng; g: BES28 Khuẩn lạc tròn, màu trắng, viền quanh không đều, bề mặt hơi lồi và ướt; h: BES30 Khuẩn lạc dẹt nhỏ, màu trắng đục, viền quanh không đều, bề mặt khô; i: BES31 Khuẩn lạc nhỏ, tròn, màu vàng nhạt, viền quanh đều, bề mặt lồi và ướt; j: BES33 Khuẩn lạc nhỏ, tròn, màu vàng nhạt, viền quanh đều, bề mặt lồi và ướt.



Hình 2. Hình thái tế bào của chủng BES19 quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét Hitachi S-4800



Hình 3. Cây phát sinh chủng loại chủng *Bacillus* sp. BES19

Bảng 2. Số lượng của 10 chủng sinh trưởng trên bùn

Chủng vi khuẩn	MPN/mL
BES9	$4,6 \times 10^7$
BES13	$1,1 \times 10^9$
BES16	$4,6 \times 10^6$
BES17	$1,1 \times 10^7$
BES18	$4,6 \times 10^8$
BES19	$2,4 \times 10^8$
BES28	$7,5 \times 10^7$
BES30	$4,3 \times 10^7$
BES31	$4,6 \times 10^8$

Kết quả đánh giá số lượng vi khuẩn (bảng 2) cho thấy, các chủng vi khuẩn phân lập được đều có khả năng phát triển tốt trên bùn thải. Số lượng vi khuẩn sinh trưởng dao động từ 10^6 đến 10^9 MPN/mL. Trong đó, chủng BES13 có số lượng khá cao và tốt nhất ($1,1 \times 10^9$ MPN/mL). Trong khi số lượng MPN của chủng BES16 thấp nhất ($4,6 \times 10^6$ MPN/mL). Các chủng còn lại đều dao động trong khoảng từ $4,6 \times 10^7$ đến $4,6 \times 10^8$ MPN/mL (bảng 2).

Hoạt tính keo tụ và chi phí để sản xuất các chất keo tụ sinh học là hai thách thức lớn khi sử dụng EPS vào các mục đích khác nhau. Việc tạo ra các chất keo tụ sinh học có hiệu quả và kinh tế có thể thực hiện trên nguồn nguyên liệu đầu vào là bùn thải. Đây là nguồn nguyên liệu tái sử dụng giá rẻ, giàu cacbon, nitơ và các chất dinh dưỡng khác. Vi sinh vật có thể sử dụng các nguồn dinh dưỡng có sẵn trong bùn thải công nghiệp [4]. Việc tận dụng bùn thải để thay thế cho môi trường nhân tạo đất liền trong quá trình nuôi cấy vi sinh vật để tạo ra các sản phẩm sinh học có ý nghĩa lớn vì vừa giúp giảm giá thành vừa góp phần bảo vệ môi trường. Thừa hưởng thành quả của các nghiên cứu trước đó, bùn thải từ Nhà máy bia Hà Nội đã được xác định là có thể sử dụng làm nguồn nguyên liệu để tạo EPS bởi các vi khuẩn đã được chọn lọc.

Hàm lượng và thành phần EPS

Kết quả khối lượng EPS thu được sau quá

trình phân tách LB-EPS và TB-EPS của 10 chủng vi sinh vật được thể hiện ở bảng 3. Hàm lượng EPS sinh tổng hợp bởi các chủng khác nhau dao động trong khoảng từ 2737 đến 5018 mg/L. Nhìn chung, lượng EPS mà các chủng sinh ra chủ yếu là LB-EPS, chiếm hơn 70% tổng lượng EPS, còn lại là TB-EPS. Hàm lượng EPS tổng số từ chủng BES19 cao nhất 5018 mg/l trong khi EPS từ mẫu bùn đối chứng là 3857 mg/l. Hàm lượng EPS tổng số từ các chủng như BES13, BES16, BES30, BES33 thấp hơn so với EPS từ mẫu bùn đối chứng. Kết quả này có thể do EPS sẵn có trong bùn được các chủng này sử dụng làm nguồn dinh dưỡng nhiều hơn lượng EPS mà chúng tổng hợp được.

So sánh với một số nghiên cứu gần đây, lượng EPS từ các chủng vi khuẩn trong nghiên cứu này cao hơn chủng *Serratia* sp.1 [18] đạt 2300 mg/l. Cũng trong một nghiên cứu khác, EPS thu được từ 13 chủng vi khuẩn khác nhau khi nuôi cấy trên bùn thải dao động trong khoảng từ 700 đến 1700 mg/l [19]. Sự biến động về hàm lượng EPS được tạo ra từ các chủng vi khuẩn khác nhau có thể bắt nguồn từ quá trình trao đổi chất khác nhau của chúng [1].

Thành phần EPS của 10 chủng vi khuẩn được thể hiện ở bảng 3. Nồng độ cacbonhydrate nằm trong khoảng từ 230 đến 365 mg/l và protein nằm trong khoảng từ 534 đến 989 mg/l. Chủng BES19 có nồng độ cacbonhydrate và protein cao nhất, lần lượt 365 mg/l và 989 mg/l. Ở cả 10 chủng, nồng độ cacbonhydrate trong EPS thấp hơn nồng độ protein; thành phần cacbonhydrate và protein trong LB-EPS cao hơn trong TB-EPS. Trong nhiều nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng protein đóng vai trò quan trọng trong việc hình thành bông bùn [6, 13, 29]. Protein góp phần làm tăng sự gắn kết của keo tụ qua tương tác kỵ nước và cầu nối cation đa hóa trị. Và nhờ đó, chúng củng cố sự ổn định của mạng polymer sinh học [10]. Tuy nhiên, một số nghiên cứu khác lại chứng minh rằng cacbonhydrate đóng vai trò quan trọng trong keo tụ với khả năng hình thành cầu nối giữa các nhóm chức mang điện tích âm và các cation đa hóa trị trong bùn [7, 8, 9, 11].

Hàm lượng và đặc tính EPS có thể bị ảnh

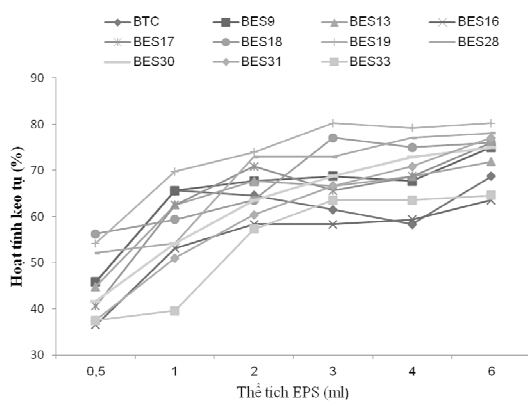
hưởng bởi một số yếu tố như thành phần của môi trường (nguồn carbon, nitơ), cũng như điều kiện nuôi cấy (nhiệt độ, pH, thời gian) [3, 14, 26]. Các kết quả nhận được cho thấy sự đa dạng

của vi sinh vật sinh tổng hợp EPS liên quan đến các yếu tố sinh trưởng và môi trường để tạo EPS phù hợp cho các mục đích ứng dụng thực tế khác nhau.

Bảng 3. Trọng lượng khô và thành phần EPS của 10 chủng vi khuẩn

Chủng vi khuẩn	EPS (mg/l)		Cacbonhydrate (mg/l)		Protein (mg/l)	
	LB	TB	LB	TB	LB	TB
BES9	3120	738	230	103	563	36
BES13	3430	522	271	37	628	98
BES16	2202	535	253	24	456	78
BES17	2150	804	208	41	578	130
BES18	3118	424	231	22	574	93
BES19	3317	523	262	26	725	111
BES28	4330	689	328	37	875	113
BES30	3079	322	233	32	520	73
BES31	2157	623	211	19	574	99
BES33	2768	495	253	22	692	108
BTC	2160	642	235	28	689	107

Hoạt tính keo tụ



Hình 4. Hoạt tính keo tụ của EPS từ 10 chủng vi khuẩn

Hoạt tính keo tụ của 10 chủng vi khuẩn đã phân lập được đánh giá bằng thí nghiệm keo tụ cao lạnh với các thể tích EPS khác nhau, nồng độ cation Ca^{2+} 150 mg/l (hình 4). Ảnh hưởng của EPS tới hoạt tính keo tụ của các chủng vi khuẩn được trình bày ở hình 13. Mười chủng vi khuẩn đã được phân lập khi nuôi cấy trên bùn thải sinh học đều có khả năng keo tụ tạo bông với dung dịch cao lạnh khi có mặt cation Ca^{2+} .

Hoạt tính tạo bông của các chủng đạt từ 36 đến 80%. Sự biến động trong hoạt tính keo tụ giữa các chủng có thể do EPS sinh từ các chủng vi khuẩn khác nhau có thành phần và tính chất khác nhau, dẫn đến khả năng tạo bông keo tụ khác nhau.

Khi khảo sát với các thể tích bùn khác nhau, đều thấy hiện tượng tạo bông. Thể tích EPS bổ sung càng lớn thì kích thước bông bùn càng to dẫn tới quá trình lắng hạt xảy ra nhanh hơn. Do vậy, hoạt tính cao lạnh tăng khi thể tích EPS bổ sung tăng lên. Trong đó hoạt tính keo tụ của chủng BES19 cao nhất, đạt 80% khi bổ sung 3 ml dịch nuôi cấy trên bùn. So sánh với kết quả nghiên cứu từ một số công bố khác, EPS của hai chủng này có hoạt tính keo tụ tương đương với chủng *Serratia* sp.1 [18] cũng nuôi cấy trên bùn thải đạt 79,1%. Hoạt tính keo tụ của một số chủng *Bacillus* trong một nghiên cứu khác của More et al. (2012) [19] xác định được dao động từ 37 đến 81%.

KẾT LUẬN

Từ những kết quả thu được trong công trình này có thể kết luận: mười chủng vi khuẩn phân

lập được từ bùn thải Nhà máy bia Hà Nội đều sinh trưởng tốt trên bùn thải. Lượng EPS tổng hợp bởi các chủng phân lập được từ 2737 đến 5018 mg/l, khả năng tạo bông cao nhất với dung dịch cao lạnh khi có mặt cation Ca^{2+} (150 mg/l) dao động từ 36 đến 80%.

Chủng BES19 có hoạt tính tạo bông tốt nhất đạt 80% với hàm lượng LB - EPS và TB - EPS cao nhất, lần lượt là 4330 mg/l và 689 mg/l. Chủng BES19 thuộc chi *Bacillus* và được đặt tên là *Bacillus* sp. BES19.

Lời cảm ơn: Công trình được sự hỗ trợ về kính phí của đề tài Nghị Định thư: “Nghiên cứu tạo chất trợ keo tụ từ bùn thải sinh học để ứng dụng trong xử lý nước thải” thuộc Viện Công nghệ môi trường, năm 2013-2014.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bala-Subramanian S., Yan S., Tyagi R. D., Surampalli R. Y., 2010. Extracellular polymeric substances (EPS) producing bacterial strains of municipal wastewater sludge: isolation, molecular identification, EPS characterization and performance for sludge settling and dewatering. *Water Res.*, 44(7): 2253-2266.
- Cosa S., Mabinya L. V., Olaniran O. A., Okoh O. O., Bernard K., Deyzel S., Okoh A. I., 2011. Biofloculant production by *Virgibacillus* sp. Rob isolated from the bottom sediment of Algoa Bay in the Eastern Cape, South Africa. *Molecules*, 16: 2431-2442.
- De Vuyst L., Degeest B., 1999. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev.*, 23: 153-177.
- Drouin M., Lai C. K., Tyagi R. D., Surampalli R. Y., 2008. *Bacillus licheniformis* proteases as high value added products from fermentation of wastewater sludge: pretreatment of sludge to increase the performance of the process. *Water Sci. Technol.*, 57: 423-429.
- DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28: 35-356.
- Fang H. H. P., Jia X. S., 1996. Extraction of extracellular polymer from anaerobic sludge. *Biotechnol. Tech.*, 10: 803-808
- Flemming H. C., Wingender J., 2001. Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)-Part I: Structural and ecological aspects. *Water Sci. Technol.*, 43(6): 1-8.
- Higgins M. J., Novak J. T., 1997. Characterization of exocellular protein and its role in bioflocculation. *J. Environ. Eng-ASCE.*, 123: 479-485.
- Higgins M. J., Novak J. T., 1997. Dewatering and settling of activated sludges: the case for using cation analysis. *Water Environ. Res.*, 69: 225-232.
- Jorand F., Zartarian F., Thomas F., Block J.C., Bottero J.Y., Villemin G., Urbain V., Manem J., 1995. Chemical and structure (2D) linkage between bacteria within activated sludge flocs. *Water Res.*, 29(7): 1639-1647.
- Korstgens V., Flemming H. C., Wingender J., Borchard W., 2001. Influence of calcium ions on the mechanical properties of a model biofilm of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Water Sci. Technol.*, 43: 49-57.
- Lapidou C. S., Rittmann B., 2002. A unified theory for extracellular polymeric substances, soluble microbial products, and active and inert biomass. *Water Res.*, 36(11): 2711-2720.
- Liao B. Q., Aleen D. G., Droppo I. G., Leppard G. G., Liss S. N., 2001. Surface properties of sludge and their role in bioflocculation and settleability. *Water Res.*, 35(2): 339-350.
- Looijesteijn P. J., Boels I. C., Kleerebezem M., Hugenholtz J., 1999. Regulation of exopolysaccharide production by *Lactobacillus lactis* subsp. *cremoris* by the sugar source. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 5003-5008.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L.,

- Randall R. J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
16. Mabinya V. L., Cosa S., Nwodo U. U., Okoh A. I., 2012. Studies on biofloculant production by *Arthrobacter* sp. Raats, a freshwater bacteria isolated from Tyume River, South Africa. *Int. J. Mol. Sci.*, 13: 1054-1065.
 17. Mishra A., Jha B., 2013. Microbial Exopolysaccharides. In E. Rosenberg, E. F. DeLong, F. Thompson, S. Lory, E. Stackebrandt (Eds.), *The prokaryotes: Applied bacteriology and biotechnology* 4th ed., pp. 179-192.
 18. More T. T., Yan S., Hoang N. V., Tyagi R. D., Surampalli R. Y., 2012. Bacterial polymer production using pre-treated and its flocculation and dewatering potential. *Bioresour. Technol.*, 121: 425-431.
 19. More T. T., Yan S., John R. P., Tyagi R. D., Surampalli R. Y., 2012. Biochemical diversity of the bacterial strains and their biopolymer producing capabilities in wastewater sludge. *Bioresour. Technol.*, 121: 304-311.
 20. Nguyễn Thị Vân Trang, Đặng Thị Mai Anh, Phạm Tuấn Linh, Tăng Thị Chính, Nguyễn Hồng Khánh, 2012. Nghiên cứu tiềm năng tái sử dụng bùn thải thành môi trường nuôi cấy vi sinh vật hữu ích, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 50(2B): 236-244.
 21. Nielsen P. H., Jahn A., 1999. Extraction of EPS. In J. Wingender, T. R. Neu, and H.-C. Flemming (ed.), *Microbial extracellular polymeric substances*. Springer, Berlin, Germany, p. 49-72.
 22. Piyo N., Cosa S., Mabinya V. L., Okoh A. I., 2011. Assessment of biofloculant production by *Bacillus* sp. Gilbert, a marine bacterium isolated from the bottom sediment of Algoa Bay. *Mar. Drugs.*, 9(7): 1232-1242.
 23. Saitou N., Nei M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4(4): 406-425
 24. Sheng G. P., Lu H. Q., Li X. Y., 2010. Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: a review. *Biotechnol Adv.*, 28(6): 882-94.
 25. Spanò A., Gugliandolo C., Lentini V., Maugeri T. L., Anselmo G., Poli A., Nicolaus B., 2013. A novel EPS-producing strain of *Bacillus licheniformis* isolated from a shallow vent off Panarea Island (Italy). *Curr. Microbiol.*, 67(1): 21-29.
 26. Tallon R., Bressollier P., Urdacı M. C., 2003. Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP 56. *Research Microbiol.*, 154: 705-712.
 27. Tyagi R. D., Surampalli R. Y., Yan S., Zhang T. C., Kao C. M., Lohani B. N., 2009. Sustainable Sludge Management: Production of Value Added Products. American Society of Civil Engineers, USA. p. 4.
 28. Ugbenyen A. M, Cosa S., Mabinya L. V., Okoh A. I., 2014. Biofloculant production by *Bacillus* sp. Gilbert isolated from a marine environment in South Africa. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 50(1): 49-54.
 29. Urbain V., Block J. C., Manem J., 1993. Bioflocculation in activated sludge: An analytical approach, *Water Res.*, 27(5): 829-838.
 30. Wingender J., Neu T. R., Flemming H. C., 1999. *Microbial extracellular polymeric substances: characterization, structure and function*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York.
 31. Wu J. Y., Ye H. F., 2007. Characterization and flocculating properties of an extracellular biopolymer produced from a *Bacillus subtilis* DYU1 isolate. *Process. Biochem.* 42(7): 1114-1123.

EXTRACELLULAR POLYMERIC SUBSTANCES PRODUCTION IN SLUDGE BY BACTERIA ISOLATED FROM HANOI BREWERY

Nguyen Hai Van¹, Dao Thi Ngoc Anh¹, Ngo Thi Huyen Trang¹, Nguyen Duy Trung¹,
Nguyen Viet Hoang², Nguyen Mai Duong³, Dang Thi Cam Ha¹

¹Institute of Biotechnology, VAST

²Institute of Environmental Technology, VAST

³The Office, MOST

SUMMARY

In general, chemical flocculates commonly used in wastewater treatment are known to be expensive and ultimate disposal costs. In order to solve these problems, production of biopolymer from bacteria through re-use of municipal wastewater sludge has been studied because of its sustainability, safety and economics. In this study, 10 EPS producing bacterial strains were isolated from wastewater treatment plant of Hanoi brewery. These bacterial strains were cultured in sterilized sludge for EPS production. Flocculation activity and EPS compositions included dry weight, concentration of carbohydrate and protein were analyzed. All examined bacterial strains isolated showed clearly ability of flocs formation, the kaolin clay flocculation activity with presence of 150 mg Ca²⁺/l achieved from the study ranged from 36 to 80% when 0.5-6 ml volume of EPS was added. EPS concentration of 10 bacteria strains varied from 2737 to 5018 mg/l. One out of ten strains, BES 19 bacteria provided the highest flocculation activity of 80% with LB-EPS and TB-EPS concentrations at 4,330 mg/l and 689 mg/l, respectively. BES19 strain was classified based on sequence of full 16S rRNA coding gene. This bacterium belonged to *Bacillus* genus and named *Bacillus* sp. BES19. These results provide basics for production of biopolymer which are sustainable and renewable.

Keywords: *Bacillus*, bacteria, extracellular polymeric substances, EPS, sludge.

Ngày nhận bài: 2-1-2014