

## PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN CHỦNG VI KHUẨN PHÂN GIẢI PROTEIN VÀ CELLULOSE TRONG NƯỚC RỈ RÁC Ở THỪA THIÊN HUẾ

Hoàng Dương Thu Hương\*, Trần Thị Hạnh Nhi

Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

\*Email:thuhuongcnk32@gmail.com

Ngày nhận bài: 01/7/2019; ngày hoàn thành phản biện: 3/7/2019; ngày duyệt đăng: 02/10/2019

### TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã phân lập được 50 chủng vi khuẩn phân giải protein và 40 chủng vi khuẩn phân giải cellulose. Số lượng vi sinh vật trong các mẫu nước rỉ rác đạt  $17,72 \times 10^6$  CFU/ml –  $31,92 \times 10^6$  CFU/ml. Tuyển chọn được hai chủng vi khuẩn P45 và P54 có khả năng phân giải protein mạnh với hoạt tính enzyme đạt 30,8 mm - 33,5 mm và hai chủng vi khuẩn C12 và C35 có khả năng phân giải cellulose mạnh với hoạt tính enzyme đạt 31,5 mm – 32 mm.

*Từ khóa:* Phân giải cellulose, phân giải protein, vi khuẩn.

### 1. MỞ ĐẦU

Trong những năm gần đây, sự bùng nổ dân số, chất thải rắn (CTR) và nước thải gây ô nhiễm môi trường đã trở thành vấn đề lớn của hầu hết các quốc gia trên thế giới. Lượng CTR ngày càng tăng nhanh, trong khi đó vấn đề tái sử dụng hầu như không đáng kể và gặp nhiều khó khăn. Bên cạnh đó, một lượng lớn nước rỉ rác nếu không xử lý đúng mức sẽ ảnh hưởng đến môi trường đất và đi vào các mạch nước ngầm. Chính vì vậy việc xử lý CTR một cách hợp lý trở nên vô cùng cấp thiết hiện nay [3].

Ở Việt Nam nói chung và ở Thừa Thiên Huế nói riêng, rất nhiều phương pháp xử lý CTR hữu cơ đã được nghiên cứu và đưa vào ứng dụng như đốt, chôn lấp, phân bón hữu cơ vi sinh... Tuy nhiên chúng có nhiều nhược điểm như chi phí cao, đòi hỏi công nghệ cao, tốn diện tích đất chôn lấp... Ngoài ra, qua phân tích CTR sinh hoạt ở nước ta cho thấy, thành phần CTR hữu cơ chiếm khoảng 45 - 55% thậm chí lên đến 80%, do đó phương pháp xử lý CTR bằng công nghệ sinh học được quan tâm, đặc biệt xử lý CTR hữu cơ bằng phương pháp lên men vi sinh vật. Phương pháp này không chỉ hạn chế tình trạng ô nhiễm môi trường, chi phí rẻ mà còn thu được sản phẩm có giá trị kinh tế. Vì vậy, một trong những biện pháp để góp phần xử lý môi trường đó là tách, tạo được các chủng vi khuẩn có khả năng phân giải cellulose và protein mạnh để tạo thành chế phẩm sinh học ứng dụng trong việc xử lý CTR hữu cơ [3].

## **2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **2.1. Đối tượng**

Các chủng vi khuẩn có khả năng phân giải protein và cellulose mạnh được phân lập từ nước rỉ rác của các bãi rác ở Thừa Thiên Huế.

### **2.2. Phương pháp nghiên cứu**

#### **2.2.1. Phương pháp phân lập và đếm số lượng tế bào**

Sử dụng phương pháp Koch để phân lập vi khuẩn có khả năng phân giải protein trên môi trường thạch Vinogradski thạch đĩa nhưng thay nguồn  $\text{KNO}_3$  bằng nguồn gelatin và phân lập vi khuẩn có khả năng phân giải cellulose trên môi trường thạch CMC thạch đĩa [2].

Xác định số lượng tế bào vi khuẩn trong mẫu bằng phương pháp đếm gián tiếp thông qua số lượng khuẩn lạc mọc trên môi trường thạch đĩa [2].

#### **2.2.2. Sơ tuyển các chủng vi khuẩn có khả năng phân giải protein và cellulose**

Các chủng vi khuẩn được cấy vạch lên bề mặt thạch đĩa, nuôi cấy ở thời gian và nhiệt độ thích hợp. Sau đó nhuộm bằng thuốc thử Fraziea đối với vi khuẩn phân giải protein và thuốc thử Lugol đối với vi khuẩn phân giải cellulose [1].

#### **2.2.3. Xác định hoạt tính enzyme bằng phương pháp khuếch tán trên thạch**

Các chủng vi khuẩn tuyển chọn được nuôi cấy lắc tốc độ 120 rpm ở nhiệt độ phòng với thời gian thích hợp. Ly tâm dịch nuôi bằng máy ly tâm lạnh, tốc độ 8000 rpm trong 10 phút thu phần dịch nổi.

Chuẩn bị các hộp petri chứa môi trường thạch Vinogradski bổ sung gelatin và CMC tương ứng với các chủng vi khuẩn phân giải protein và cellulose. Tạo giếng thạch có đường kính 12 mm, dùng micropipette hút 0,7 ml dịch enzyme vào giếng. Làm lạnh trong 12 giờ (4 - 6°C) rồi đưa vào tủ ấm 28 - 30°C ủ trong 36 giờ. Nhuộm màu bề mặt thạch và đo đường kính vòng phân giải cơ chất [1].

#### **2.2.4. Xác định một số đặc điểm hình thái**

Quan sát đại thể trên môi trường thạch đĩa, sử dụng phương pháp làm tiêu bản phiến kính để quan sát hình thái tế bào [2].

#### **2.2.5. Xử lý số liệu**

Số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel 2016 và phân tích ANOVA (Duncan's test  $p < 0,05$ ) bằng chương trình SPSS 20.0.

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn có khả năng phân giải protein và cellulose

##### 3.1.1. Tìm hiểu số lượng vi khuẩn

Từ 12 mẫu nước rỉ rác từ các bãi rác ở Thừa Thiên Huế, bằng phương pháp phân lập trên môi trường Vinogradski và CMC thạch đĩa, kết quả về số lượng vi khuẩn phân giải protein và cellulose được trình bày ở bảng 1.

**Bảng 1.** Số lượng vi khuẩn trong các mẫu nước rỉ rác.

| STT | Ký hiệu mẫu | Địa điểm thu mẫu (Bãi rác) | pH  | Thời gian thu mẫu | Số lượng vi khuẩn protein CFU/ml ( $\times 10^6$ ) | Số lượng vi khuẩn cellulose CFU/ml ( $\times 10^6$ ) |
|-----|-------------|----------------------------|-----|-------------------|----------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| 1   | TP1         | Thủy Phương                | 5,6 | 5/1/2019          | 16,87                                              | 30,88                                                |
| 2   | TP2         | Thủy Phương                | 5,0 | 13/1/2019         | 17,72                                              | 28,67                                                |
| 3   | BD1         | Khu huấn luyện quân sự     | 6,3 | 5/1/2019          | 16,71                                              | 31,92                                                |
| 4   | BD2         | Khu huấn luyện quân sự     | 6,7 | 13/1/2019         | 16,91                                              | 25,94                                                |
| 5   | BN1         | Chợ Bến Ngự                | 6,0 | 9/1/2019          | 13,24                                              | 19,24                                                |
| 6   | BN2         | Chợ Bến Ngự                | 4,5 | 17/1/2019         | 10,39                                              | 20,39                                                |
| 7   | AC1         | Chợ An Cựu                 | 5,0 | 9/1/2019          | 9,21                                               | 9,21                                                 |
| 8   | AC2         | Chợ An Cựu                 | 6,0 | 17/1/2019         | 11,84                                              | 21,84                                                |
| 9   | ĐB1         | Chợ Đông Ba                | 4,5 | 5/1/2019          | 15,43                                              | 25,43                                                |
| 10  | ĐB2         | Chợ Đông Ba                | 5,8 | 13/1/2019         | 8,52                                               | 18,52                                                |
| 11  | AL1         | Chợ An Lỗ                  | 6,0 | 9/1/2019          | 12,38                                              | 22,38                                                |
| 12  | AL2         | Chợ An Lỗ                  | 4,5 | 21/1/2019         | 10,63                                              | 20,63                                                |

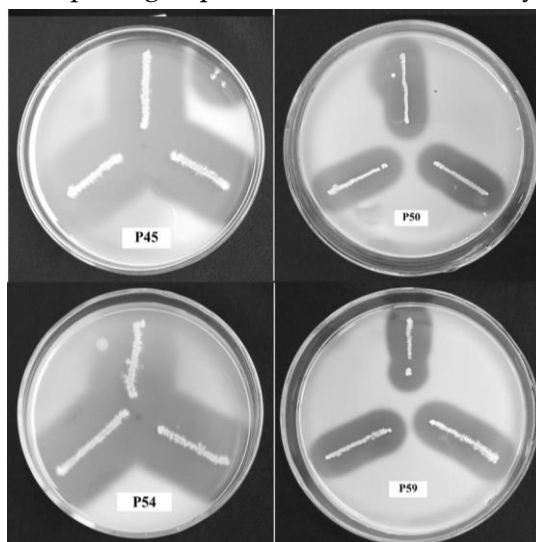
Từ kết quả bảng 1 cho thấy, số lượng vi khuẩn có sự khác biệt và dao động tùy từng vị trí lấy mẫu khác nhau, điều này có thể phụ thuộc vào nguồn chất thải, thời gian thu mẫu khác nhau. Trong đó, bãi rác Thủy Phương và khu huấn luyện quân sự có số lượng vi khuẩn cao nhất, điều này có thể là do 2 địa điểm này tập trung số lượng lớn CTR của thành phố nên đa dạng, phong phú hơn do đó số lượng vi sinh vật cũng cao hơn.

### 3.1.2. Đánh giá khả năng phân giải protein và cellulose

**Bảng 2.** Khả năng phân giải protein của các chủng phân lập.

| Khả năng phân giải | Chiều rộng vạch phân giải | Số chủng | Tỷ lệ (%) |
|--------------------|---------------------------|----------|-----------|
| Yếu                | $w < 10$                  | 11       | 18,33     |
| Trung Bình         | $10 \leq w < 15$          | 24       | 40,00     |
| Mạnh               | $15 \leq w < 20$          | 19       | 31,67     |
| Rất mạnh           | $w \geq 20$               | 6        | 10,00     |

Từ kết quả ở bảng 2 cho thấy, tất cả các chủng vi khuẩn phân lập được đều có khả năng phân giải protein nhưng ở các mức độ khác nhau. Có 24 chủng có khả năng phân giải protein trung bình, chiếm tỷ lệ cao nhất (40%). Các chủng có khả năng phân giải protein mạnh chiếm tỷ lệ khá lớn (31,67%). Thông qua sơ tuyển phát hiện được 6 chủng vi khuẩn có hoạt lực phân giải protein rất mạnh chiếm tỷ lệ 10%.

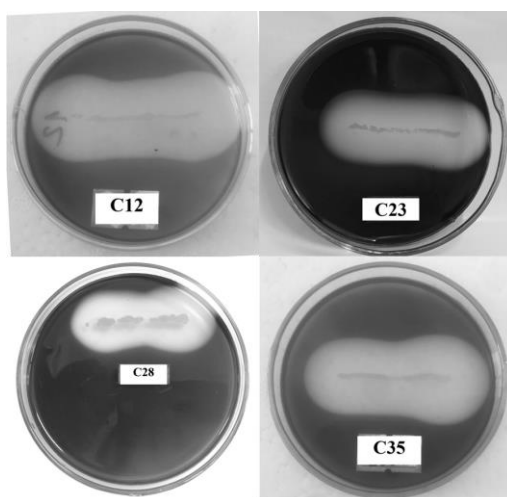


**Hình 1.** Vạch phân giải gelatin mạnh của một số chủng vi khuẩn

**Bảng 3.** Khả năng phân giải CMC của các chủng phân lập.

| Khả năng phân giải | Chiều rộng vạch phân giải | Số chủng | Tỷ lệ (%) |
|--------------------|---------------------------|----------|-----------|
| Yếu                | $w < 10$                  | 12       | 30,00     |
| Trung Bình         | $10 \leq w < 15$          | 15       | 37,5      |
| Mạnh               | $15 \leq w < 20$          | 9        | 22,5      |
| Rất mạnh           | $w \geq 20$               | 4        | 10,00     |

Qua kết quả nghiên cứu chúng tôi nhận thấy, khả năng phân giải cellulose của các chủng vi khuẩn trên môi trường CMC là không đồng đều. Số chủng vi khuẩn phân giải cellulose yếu và trung bình tương đối nhiều (30% - 37,5%), các chủng phân giải cellulose mạnh và rất mạnh ít hơn (10% - 22,5%).



Hình 2. Vạch phân giải CMC mạnh của một số chủng vi khuẩn

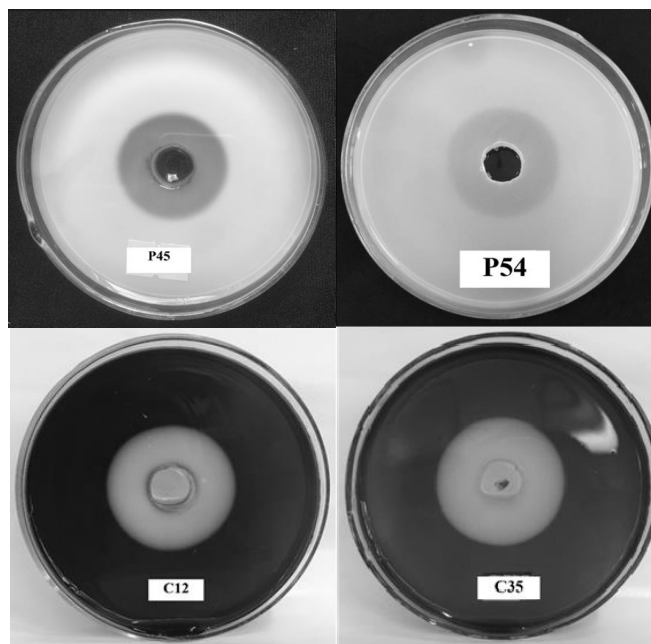
### 3.1.3. Hoạt lực phân giải gelatin và CMC của các chủng vi khuẩn tuyển chọn

Trong số các chủng vi khuẩn phân lập được, chúng tôi chọn ra 20 chủng có kích thước vạch phân giải lớn nhất để tiến hành tuyển chọn bằng phương pháp khuếch tán thạch đĩa. Kết quả được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Kích thước vòng phân giải gelatin và CMC của các chủng vi khuẩn.

|                        | STT | Chủng      | Kích thước (mm)          |
|------------------------|-----|------------|--------------------------|
| Vòng phân giải gelatin | 1   | P2         | 24,50 <sup>d</sup>       |
|                        | 2   | P3         | 19,00 <sup>g</sup>       |
|                        | 3   | P5         | 24,56 <sup>d</sup>       |
|                        | 4   | P17        | 23,50 <sup>e</sup>       |
|                        | 5   | P22        | 26,16 <sup>c</sup>       |
|                        | 6   | P37        | 29,33 <sup>b</sup>       |
|                        | 7   | <b>P45</b> | <b>30,80<sup>a</sup></b> |
|                        | 8   | P50        | 28,83 <sup>b</sup>       |
|                        | 9   | <b>P54</b> | <b>33,50<sup>a</sup></b> |
|                        | 10  | P59        | 20,67 <sup>f</sup>       |
| Vòng phân giải CMC     | 11  | C5         | 13,16 <sup>d</sup>       |
|                        | 12  | C10        | 19,00 <sup>c</sup>       |
|                        | 13  | <b>C12</b> | <b>32,00<sup>a</sup></b> |
|                        | 14  | C16        | 17,33 <sup>c</sup>       |
|                        | 15  | C23        | 26,33 <sup>b</sup>       |
|                        | 16  | C28        | 24,83 <sup>b</sup>       |
|                        | 17  | C31        | 23,33 <sup>b</sup>       |
|                        | 18  | C32        | 24,33 <sup>b</sup>       |
|                        | 19  | <b>C35</b> | <b>31,50<sup>a</sup></b> |
|                        | 20  | C39        | 26,33 <sup>b</sup>       |

Trong 20 chủng đã xác định hoạt tính enzyme, chủng P45 và P54 có vòng phân giải gelatin lớn nhất, hiệu số vòng phân giải lần lượt là 30,8 mm và 33,5 mm, chủng C12 và C35 có vòng phân giải CMC lớn nhất, hiệu số vòng phân giải lần lượt là 32,0 mm và 31,5 mm.



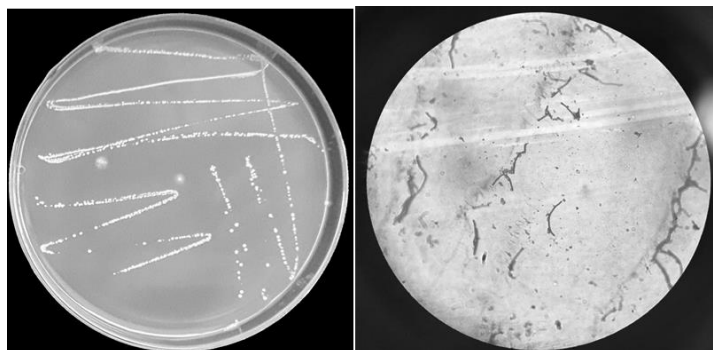
**Hình 3.** Vòng phân giải gelatin và CMC của các chủng vi khuẩn mạnh.

### **3.2. Đặc điểm hình thái của các chủng vi khuẩn**

#### **3.2.1. Chủng P45**

Khuẩn lạc dạng tròn, màu trắng đục tiết ra môi trường sắc tố vàng, bề mặt lồi và trơn bóng. Khuẩn lạc đạt 1 – 1,5 mm sau 2 ngày nuôi cấy.

Tiến hành nhuộm Gram chủng P45 và quan sát trên kính hiển vi với độ phóng đại x100, cho thấy tế bào chủng P45 bắt màu hồng, có hình que dài và đứng riêng lẻ.

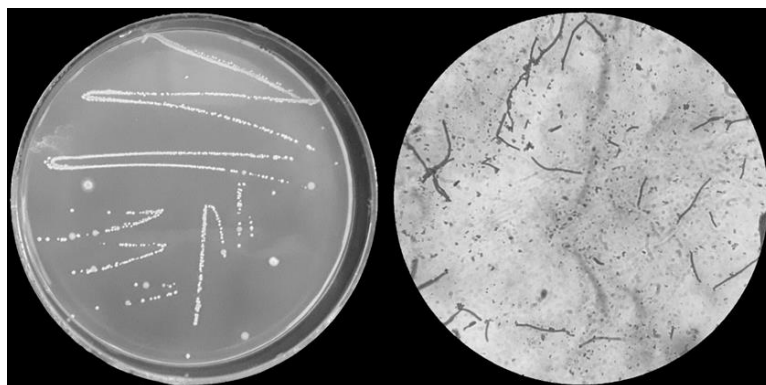


**Hình 4.** Hình thái khuẩn lạc và tế bào của chủng P45 (x100)

### 3.2.2. Chủng P54

Khuẩn lạc dạng tròn, màu vàng tiết ra môi trường sắc tố vàng, bề mặt lồi và nhẵn, viền xung quanh trơn bóng. Khuẩn lạc đạt 2 -3 mm sau 2 ngày nuôi cấy.

Tiến hành nhuộm Gram chủng P54 và quan sát trên kính hiển vi với độ phóng đại x100, cho thấy tế bào chủng P54 bắt màu hồng, có hình que dài và đứng riêng lẻ.

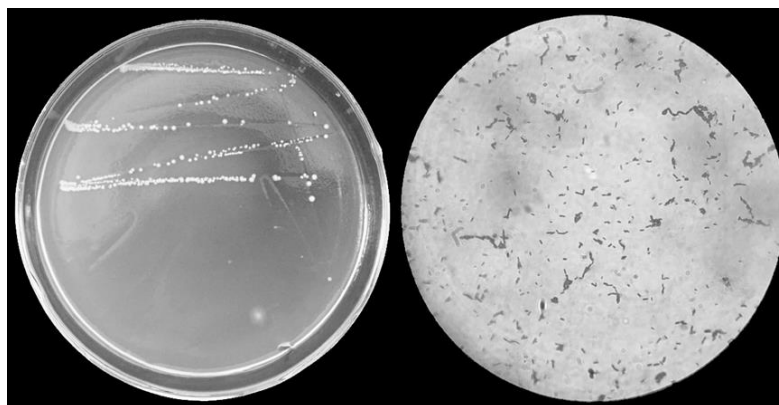


Hình 5. Hình thái khuẩn lạc và tế bào của chủng P54 (x100)

### 3.2.3. Chủng C12

Khuẩn lạc mọc gọn, hình tròn, màu trắng vàng đục, mép khuẩn lạc răng cưa, bề mặt có vòng tròn đồng tâm, trơn bóng, nhìn nghiêng có dạng bằng, không tiết sắc tố ra môi trường, có kích thước nhỏ 0,5 – 1,5 mm sau 3 ngày nuôi cấy.

Tiến hành nhuộm Gram chủng C12 và quan sát trên kính hiển vi với độ phóng đại x100, cho thấy tế bào chủng C12 bắt màu hồng, có hình que ngắn và đứng riêng lẻ.

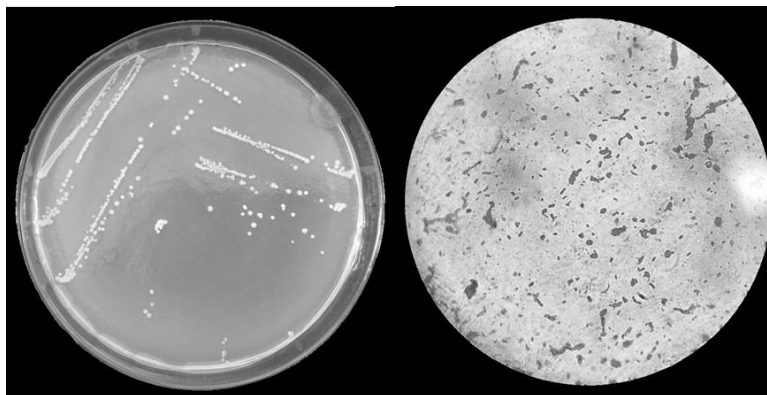


Hình 6. Hình thái khuẩn lạc và tế bào của chủng C12 (x100)

### 3.2.4. Chủng C35

Khuẩn lạc mọc gọn, hình tròn, màu trắng sữa, mép trơn, bề mặt có nhiều nếp, không tiết sắc tố ra môi trường, có kích thước nhỏ 1 - 2 mm sau 3 ngày nuôi cấy.

Tiến hành nhuộm Gram chủng C35 và quan sát trên kính hiển vi với độ phóng đại x100, cho thấy tế bào chủng C35 bắt màu hồng, có hình que ngắn và đứng riêng lẻ.



**Hình 7.** Hình thái khuẩn lạc và tế bào của chủng C35 (x100)

#### **4. KẾT LUẬN**

Số lượng vi sinh vật có trong các mẫu nước rỉ rác ở Thừa Thiên Huế khá cao và biến động tùy từng vị trí lấy mẫu:  $17,72 \times 10^6$  CFU/ml –  $31,92 \times 10^6$  CFU/ml.

Trong 50 chủng vi khuẩn phân giải protein và 40 chủng vi khuẩn phân giải cellulose phân lập được từ nước rỉ rác ở 12 địa điểm khác nhau ở Thừa Thiên Huế, đã tuyển chọn được 2 chủng P45 và P54 có khả năng phân giải protein mạnh và 2 chủng C12 và C35 có khả năng phân giải cellulose mạnh.

#### **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

- [1]. Nguyễn Lâm Dũng, Phạm Thị Trân Châu, Nguyễn Thanh Hiền, Lê Đình Lương, Đoàn Xuân Mượu, Phạm Văn Ty, 1978. Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật, Tập 2. Nxb. Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
- [2]. Phạm Thị Ngọc Lan, 2012. Giáo trình thực tập Vi sinh vật học. Nxb. Đại học Huế.
- [3]. <https://westerntechvn.com.vn/cong-nghe-vi-sinh-vat-trong-xu-ly-rac-thai.htm>

## ISOLATION AND SELECTION OF PROTEOLYTIC AND CELLULOLYTIC BACTERIA FROM WASTEWATER OF MUNICIPAL SOLID WASTE IN THUA THIEN HUE PROVINCE

Hoang Duong Thu Huong\*, Tran Thi Hanh Nhi

Faculty of Biology, University of Sciences, Hue University

\*Email: [thuhuongcnk32@gmail.com](mailto:thuhuongcnk32@gmail.com)

### ABSTRACT

In this study, fifty proteolytic and forty cellulolytic bacteria were isolated from wastewater of municipal solid waste. The number of bacteria was from  $17,72 \times 10^6$  CFU/ml –  $31,92 \times 10^6$  CFU/ml. Among the whole bacteria isolated, P45 and P54 which were selected had the ability to resolve the strongest protein with enzyme activity at 30,8 mm - 33,5 mm. In addition, there were two strains including C12 and C35 which were able to resolve the strongest cellulose reached enzyme activity at 31,5 mm - 32 mm.

**Keywords:** cellulolytic, proteolytic, bacteria.



**Hoàng Dương Thu Hương** sinh ngày 30/04/1990. Bà tốt nghiệp chuyên ngành Công nghệ sinh học năm 2013, tốt nghiệp Thạc sĩ chuyên ngành Công nghệ sinh học năm 2015 tại Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế. Từ năm 2013 đến nay là cán bộ giảng dạy tại Bộ môn Công nghệ sinh học, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế.



**Trần Thị Hạnh Nhi** sinh ngày 21/10/1996, là sinh viên khóa K38 chuyên ngành Công nghệ sinh học, Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế.

