

Phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn sinh lipase từ nước thải nhà hàng

Bạch Ngọc Minh*, Nguyễn Thị Anh Thu, Nguyễn Thị Thanh Kiều, Huỳnh Hoàn Mỹ

Viện Sinh học Nhiệt đới, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 9/621 Xa lộ Hà Nội, phường Linh Trung, TP Thủ Đức, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 21/10/2022; ngày chuyển phản biện 24/10/2022; ngày nhận phản biện 25/11/2022; ngày chấp nhận đăng 28/11/2022

Tóm tắt:

Chất thải sinh hoạt đang là vấn đề nan giải tại các đô thị lớn. Các chất thải dạng lỏng từ dịch vụ ăn uống lâu ngày sẽ kết váng trên mặt nước, gây ô nhiễm môi trường và làm tắc nghẽn dòng chảy trong hệ thống cống. Nghiên cứu này nhằm chọn lọc chủng vi khuẩn có khả năng sinh lipase cao, có thể sử dụng để xử lý ô nhiễm do chất thải lỏng có lipid từ các nhà hàng ăn uống. Kết quả phân lập được 50 chủng vi khuẩn có hoạt tính lipase từ mẫu nước được lấy ở nhà hàng thuộc các khu vực tại TP Hồ Chí Minh. Tiến hành sàng lọc dựa vào đường kính vòng phân giải lipid, tuyển chọn được 10 chủng có vòng phân giải 9-11 mm. Kết quả định lượng cho thấy, chủng GV-04 và BT-06 được phân lập từ mẫu nước thải ở khu vực quận Gò Vấp và Bình Thạnh cho hoạt độ lipase cao nhất (GV-04 là 0,3250 UI/ml, BT-06 là 0,3158 UI/ml). Kết quả định danh cho thấy, hai chủng GV-04 và BT-06 lần lượt là *Bacillus subtilis* và *Bacillus amyloliquefaciens*.

Từ khóa: *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, lipase, phân giải lipid.

Chỉ số phân loại: 1.6, 2.8

Isolation and selection of lipase-producing bacteria from restaurant wastewater

Ngoc Minh Bach*, Thi Anh Thu Nguyen, Thi Thanh Kieu Nguyen, Hoan My Huynh

Institute of Tropical Biology, Vietnam Academy of Science and Technology, 9/621 Hanoi Highway, Linh Trung Ward, Thu Duc City, Ho Chi Minh City, Vietnam

Received 21 October 2022; revised 25 November 2022; accepted 28 November 2022

Abstract:

Domestic waste is a problem in big cities. Liquid wastes from food and drink services can be clumped to form a fatty layer on the water surface, causing environmental pollution and clogging the flow of the sewer system. This study aims to select bacterial strains capable of producing highly active lipase that can be used to deal with pollution from liquid waste containing lipids from restaurants. There are 50 strains of bacteria with lipase activity that have been isolated from water samples collected at restaurants in Ho Chi Minh city areas. Screening based on the diameter of the lipid degradation zone, 10 selected strains have a resolution ring of 9-11 mm. Quantitative results showed that strains GV-04 and BT-06 isolated from wastewater samples in Go Vap and Binh Thanh districts areas showed the highest lipase activity (GV-04 was 0.3250 UI/ml, BT-06 was 0.3158 UI/ml). The identification results showed that the two strains, GV-04 and BT-06, were *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens*, respectively.

Keywords: *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, lipase, lipolysis.

Classification numbers: 1.6, 2.8

*Tác giả liên hệ: Email: greensi02@gmail.com

1. Đặt vấn đề

Theo các nghiên cứu của Đại học Arizona (Hoa Kỳ) về tỷ lệ rác thải trong nhà hàng, dầu mỡ chiếm từ 9,55% tới 11,3% tổng số lượng thực phẩm nhập vào [1]. Các chất thải dầu mỡ từ thực phẩm thừa có thể gây tắc nghẽn đường cống, gây ra các mùi hôi thối, kích thích sự tăng trưởng của vi sinh vật gây hại [2]. Các phương pháp xử lý dầu mỡ trong nước thải bằng vật lý như sử dụng các thiết bị đánh tan mỡ, hút bỏ mỡ; hoặc xử lý bằng phương pháp hóa học để phá vỡ lớp dầu mỡ rồi xả vào môi trường. Tuy rằng, biện pháp này hiệu quả và dễ tìm kiếm hóa chất, xử lý nhanh nhưng lại tốn kém. Ngoài ra, các hợp chất này rất độc hại cho con người và gây ô nhiễm môi trường. Sử dụng vi sinh vật xử lý nước thải là giải pháp mà con người đang hướng đến, để giúp môi trường sạch hơn. Đây cũng là giải pháp thân thiện với môi trường. Vi sinh vật có khả năng sử dụng dầu mỡ thừa làm nguồn dinh dưỡng, phân hủy hoàn toàn và giúp loại bỏ lớp dầu mỡ có trong đường ống [3].

Hầu hết lipase vi khuẩn có nguồn gốc từ các loài thuộc *Bacillus* [4, 5]. Một số khác từ các chi *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Chromobacterium*, *Pseudomonas* [6, 7]. Nhiều loài trong các chi nấm *Aspergillus*, *Candida*, *Humicola*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus* và *Yarrowia* sinh lipase mạnh, được nghiên cứu và ứng dụng ở các lĩnh vực khác nhau [8]. Với sự đa dạng lớn về đặc tính, khả năng xúc tác hình thành nhiều liên kết ester khác nhau, các lipase vi sinh vật là đối tượng hấp dẫn cho những ứng dụng công nghiệp. Hiện nay, các nhà khoa học đã thực hiện các nghiên cứu để đưa các enzyme hoạt động trong điều kiện pH kiềm vào nhiều lĩnh vực công nghiệp khác nhau, đặc biệt là công nghiệp sản xuất chất tẩy rửa và xử lý môi trường [9].

Ở Việt Nam, một số nghiên cứu về lipase đã được báo cáo. Tác giả D.M. Lam và cs (2012) [10] đã phân lập chủng vi khuẩn sinh tổng hợp lipase từ nước thải và khảo sát hoạt tính lipase của 102 chủng *Pseudomonas*. T.D. Khoa và cs (2011) [11] đã nghiên cứu thu nhận và thử nghiệm hoạt tính lipase trên 10 chủng *Bacillus*. D.M. Lam và cs (2012) [10] đã phân lập 250 chủng *Bacillus* từ rừng ngập mặn, chọn ra 8 chủng có khả năng sinh lipase kiềm, hoạt động ở pH 9 và nồng độ muối 3%. T.T.B. Lan và cs (2012) [12] đã nghiên cứu việc sử dụng enzyme lipase từ *Candida rugosa* và *Porcine pancreas* xúc tác phản ứng transester hoá dầu dừa.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Bốn mẫu nước thải được thu ở cuối đường xả thải hoặc bể lắng nước thải tại các nhà hàng ở 4 quận: Phú Nhuận (PN), Gò Vấp (GV), Bình Thạnh (BT), Thủ Đức (TD).

Phương pháp lấy mẫu được quy định ở TCVN 5999:1995 (ISO 5667/10: 1992) về chất lượng nước - lấy mẫu - hướng dẫn lấy mẫu nước thải.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phân lập vi khuẩn có khả năng sinh lipase: Các mẫu nước thải được pha loãng tới nồng độ thích hợp để phân lập ở 37°C trong 48 giờ, trên môi trường TBA (Tributylin agar) [13]. Các khuẩn lạc xuất hiện vòng phân giải xung quanh được tuyển chọn để tiếp tục sàng lọc bằng phương pháp định tính và định lượng, nhằm xác định hoạt tính enzyme. Thành phần môi trường TBA được liệt kê ở bảng 1.

Bảng 1. Thành phần môi trường Tributyrin agar phân lập vi khuẩn.

Thành phần	Nồng độ (g/l)	Thành phần	Nồng độ (g/l)
Peptone	5	K ₂ HPO ₄	0,5
Tributyrin	10	KH ₂ PO ₄	0,5
Cao nấm men	3	Agar	15
Ammonium nitrate	10	pH	7,5-8,0

Phương pháp định tính xác định khả năng sinh lipase: Dịch vi khuẩn nuôi cấy sau 48 giờ trên môi trường Lysogenia Broth (LB) lỏng (peptone 10 g/l, cao nấm men 5 g/l, NaCl 10 g/l) có bổ sung 1% dầu olive được nhũ hoá. Sau đó, hút 40 µl dịch khuẩn sau khi lắc tăng sinh lên giấy lọc đường kính 1,5 cm trên đĩa môi trường thạch TBA, đo đường kính vòng phân giải sau 48 giờ.

Phương pháp định lượng xác định khả năng sinh lipase: Sử dụng phương pháp đo quang phổ hấp thụ với cơ chất là p-nitrophenyl palmitate (p-NPP) ở bước sóng mật độ quang (OD) 410 nm [14].

Đặc điểm hình thái và sinh hóa: Các chủng được lựa chọn đã được kiểm tra hình thái, sinh hóa như khả năng di động; thử nghiệm khả năng sinh H₂S và khả năng sử dụng đường trên môi trường TSI (Triple-sugar iron agar); khả năng chuyển hoá citrate, sản xuất indole, hoạt tính oxidase, khả năng chịu mặn và hình thành nội bào tử [15].

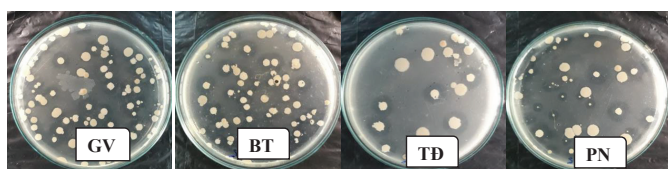
Định danh bằng sinh học phân tử: Mẫu vi khuẩn được gửi định danh tại Phòng Thí nghiệm vi sinh thuộc Viện Sinh học Nhiệt đới. Phương pháp phân tích dựa vào trình tự gen 16S rDNA được nhân lên bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGG CTCAG3') và 1492R (5'-GGTTACCTTGTACG ACTT - 3'). Sử dụng phần mềm BLAST để so sánh mức độ tương đồng của chuỗi trình tự vùng 16S rRNA với dữ liệu trên ngân hàng gen của NCBI (National Center for Biotechnology Information) để xác định tên loài của chủng vi khuẩn [15].

Xử lý số liệu: Tất cả các thí nghiệm được thực hiện 3 lần để lấy giá trị trung bình. Kết quả được xử lý thống kê bằng phần mềm Statgraphics Centurion XV để kiểm tra sự khác biệt giữa các kết quả thu được ở mức ý nghĩa $\alpha=0,05$.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Kết quả phân lập các chủng vi sinh vật có khả năng sinh lipase

Kết quả phân lập ở nồng độ 10^{-4} , 10^{-5} thu được 50 chủng vi sinh vật có đường kính vòng phân giải khác nhau trên môi trường TBA. Trong đó có 10 chủng vi sinh vật có vòng phân giải cao từ 9 mm trở lên. Các chủng này sẽ được làm thuần, giữ giống và tiến hành các thử nghiệm tiếp theo. Trên hình 1 là các hình ảnh một số khuẩn lạc đặc trưng trên môi trường phân lập TBA.



Hình 1. Các chủng vi sinh vật có khả năng phân giải lipid phân lập được ở 4 khu vực. GV: Gò Vấp; BT: Bình Thạnh; TĐ: Thủ Đức; PN: Phú Nhuận.

3.2. Kết quả kiểm tra các đặc tính sinh hoá

Các chủng được chọn lọc được nhuộm gram và tiến hành thử nghiệm các phản ứng sinh hóa cơ bản, để phân loại sơ bộ các chủng vi khuẩn. Bảng 2 thể hiện kết quả nhuộm gram của 10 chủng vi khuẩn được chọn, quan sát dưới vật kính 100X.

Kết quả nhuộm gram của 10 chủng được khảo sát, tất cả đều có hình que dài kích thước dao động 1-3 μm . Trong đó, có 4 chủng gram âm và 6 chủng gram dương, 4 chủng xếp chuỗi dài và 6 chủng là các tế bào đơn.

Bảng 2. Mô tả hình dạng tế bào của 10 chủng vi sinh vật dưới vật kính 100X.

STT	Tên mẫu	Mô tả
1	GV-02	Gram âm, tế bào que, ngắn khoảng nhỏ hơn 1 μm , đơn lẻ.
2	GV-04	Gram dương, tế bào que, ngắn khoảng 1,5-2 μm , đơn lẻ.
3	GV-10	Gram dương, tế bào que, ngắn khoảng 1 μm , đơn lẻ.
4	GV-12	Gram dương, tế bào que, ngắn khoảng 1 μm , đơn lẻ.
5	TĐ-02	Gram âm, tế bào que, ngắn khoảng 1-1,5 μm , đơn lẻ.
6	TĐ-06	Gram âm, tế bào que ngắn, dài khoảng 1,5-2 μm , đơn lẻ.
7	BT-06	Gram dương, tế bào que dài, 2,5-3 μm , xếp chuỗi.
8	PN-03	Gram âm, tế bào que, ngắn khoảng 1,5-2 μm , xếp chuỗi.
9	PN-08	Gram dương, tế bào hình que, dài 2-4 μm , xếp chuỗi.
10	PN-09	Gram dương, tế bào que, dài khoảng 2-3 μm , xếp chuỗi.

Kết quả kiểm tra các đặc tính sinh hóa được thể hiện ở bảng 3. Cả 10 chủng đều có khả năng di động, phát triển được trong môi trường hiếu khí và có phản ứng oxidase dương tính. Có 6 chủng có khả năng phát triển trong môi trường kỵ khí, 7 chủng có phản ứng Citrate dương tính, 8 chủng có khả năng sinh bào tử, 2 chủng có phản ứng Indole dương tính. Hầu như các chủng được phân lập không sử dụng được Lactose và Sucrose (9/10 chủng) và có 2 chủng không sử dụng được glucose.

Bảng 3. Kết quả thử nghiệm các đặc tính sinh hóa của 10 chủng vi sinh vật.

Tên mẫu	Các đặc tính sinh hóa								
	ĐD	HK	KK	CT	BT	Indole	TSI		Oxidase
							Glu	Lac&Suc	
GV-02	+	+	-	-	+	-	+	-	+
GV-04	++	+	+	-	+	-	+	-	+
GV-10	++	+	+	+	-	-	-	-	+
GV-12	+++	+	-	+	+++	-	+	-	+
TĐ-02	+++	+	+	+	-	-	+	-	+
TĐ-06	+++	+	+	+	+	+	+	+	+
BT-06	++	+	+	+	+++	-	+	-	+
PN-03	+++	+	-	+	+	+	+	-	+
PN-08	+	+	-	-	+	-	-	-	+
PN-09	+++	+	+	+	+	-	+	-	+

ĐD: di động; HK: hiếu khí; KK: kỵ khí; CT: citrate; BT: bào tử; Glu: glucose; Lac&Suc: lactose & sucrose; ISI: triple sugar iron.

Dịch tăng sinh vi khuẩn sau khi nuôi cấy 48 giờ trong môi trường LB với các nồng độ NaCl là 0, 5, 10 và 15%, được xác định bằng máy đo quang phổ LaMotte ở bước sóng 600 nm, để nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ NaCl đến sự sinh trưởng của vi khuẩn. Sự sinh trưởng của các chủng vi sinh vật được thể hiện trong bảng 4.

Bảng 4. Kết quả mật độ quang của 10 chủng vi sinh vật ở các nồng độ muối khác nhau.

Tên mẫu	Nồng độ muối			
	0%	5%	10%	15%
GV-02	1,88 $\pm$ 0,0011	1,25 $\pm$ 0,0016	1,24 $\pm$ 0,0041	1,24 $\pm$ 0,0041
GV-04	1,74 $\pm$ 0,0087	0,85 $\pm$ 0,0017	1,22 $\pm$ 0,0123	0,01 $\pm$ 0,0000
GV-10	1,68 $\pm$ 0,0020	1,00 $\pm$ 0,0174	1,22 $\pm$ 0,0168	0,10 $\pm$ 0,1517
GV-12	1,52 $\pm$ 0,0000	1,00 $\pm$ 0,0020	0,98 $\pm$ 0,0040	0,03 $\pm$ 0,0002
TĐ-02	1,45 $\pm$ 0,00046	1,44 $\pm$ 0,0090	0,69 $\pm$ 0,0015	0,01 $\pm$ 0,0001
TĐ-06	1,42 $\pm$ 0,0087	1,23 $\pm$ 0,0173	0,84 $\pm$ 0,0029	0,01 $\pm$ 0,0001
BT-06	1,33 $\pm$ 0,0027	1,22 $\pm$ 0,0009	0,99 $\pm$ 0,0003	0,01 $\pm$ 0,0003
PN-03	1,01 $\pm$ 0,0012	1,57 $\pm$ 0,0137	0,87 $\pm$ 0,0026	0,01 $\pm$ 0,0003
PN-08	1,98 $\pm$ 0,0243	1,49 $\pm$ 0,0008	1,24 $\pm$ 0,0006	0,01 $\pm$ 0,0001
PN-09	1,80 $\pm$ 0,0019	1,30 $\pm$ 0,0021	0,05 $\pm$ 0,0055	0,01 $\pm$ 0,0000

Trong cùng một cột, các giá trị được đánh dấu bởi các chữ cái giống nhau thì sự khác nhau không có ý nghĩa về mặt thống kê theo phân tích ANOVA ($\alpha=0,05$).

Khả năng chịu mặn của 50 chủng vi sinh vật phân lập được từ 4 mẫu nước thải nhà hàng được đánh giá qua giá trị OD_{600nm}, sau khi nuôi cấy trong môi trường LB lỏng có chứa các nồng độ muối tương ứng là 0, 5, 10 và 15% sau 48 giờ. Tất cả 10 chủng phân lập được đều có khả năng thích nghi và phát triển ở tất cả các nồng độ muối từ 0-10 %. Giá trị OD_{600nm} của các chủng vi sinh vật biến thiên qua các nồng độ muối khác nhau. Trong đó, có 2 chủng GV-02 và GV-10 có khả năng chịu mặn ở nồng độ muối 15%.

3.3. Phương pháp định tính khả năng sinh lipase

Dịch vi khuẩn được cấy từ ống nghiệm vào môi trường LB lỏng có bổ sung 1% dầu olive được nhũ hoá, lắc trong 48 giờ. Đồ đĩa môi trường TBA, đặt giấy lọc tròn, đường kính 1,5 cm đã được hấp khử trùng vào đĩa môi trường TBA. Dùng pipet hút 0,004 ml dịch khuẩn sau khi lắc tăng sinh lên giấy lọc, sao cho dịch khuẩn không tràn ra ngoài môi trường. Sau 48 giờ đo đường kính vòng phân giải. Kết quả được thể hiện trên bảng 5.

Bảng 5. Kết quả định tính khả năng sinh lipase bằng phương pháp đo vòng phân giải của chủng vi khuẩn phân lập trên môi trường TBA.

Số thứ tự	Chủng	Đường kính vòng phân giải (mm)
1	GV-04	11,67 ^{a±} 0,577
2	GV-10	10,67 ^{ab±} 0,577
3	BT-06	10,00 ^{bc±} 0,577
4	GV-02	9,67 ^{cd±} 0,577
5	TĐ-06	9,67 ^{cd±} 0,577
6	PN-08	9,33 ^{de±} 0,577
7	TĐ-02	9,33 ^{de±} 0,577
8	PN-03	9,33 ^{def±} 0,577
9	GV-12	9,00 ^{efg±} 0,000
10	PN-09	9,00 ^{efg±} 0,000

Trong cùng một cột, các giá trị được đánh dấu bởi các chữ cái giống nhau thì sự khác nhau không có ý nghĩa về mặt thống kê, các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê theo phân tích ANOVA ($\alpha=0,05$).

Kết quả nghiên cứu này hoàn toàn phù hợp và có sự tương đồng với một số nghiên cứu đã được công bố trước đó. C.T. Hou và cs (1992) [16] đã làm một nghiên cứu tổng quan về khả năng sinh lipase từ 1229 vi sinh vật, bằng phương pháp đo vòng phân giải trên đĩa thạch, bao gồm nhiều chi và loài. Khoảng 25% chủng có xét nghiệm dương tính với lipase. Những chủng lipase dương tính tiếp tục được phân thành ba loại theo hoạt động của enzyme: chủng sinh lipase tốt, vừa và yếu có vòng phân giải có đường kính lần lượt là 10, 7,5 hoặc 5 mm. D.M. Lam và cs (2012) [10] đã nghiên cứu khả

năng sinh lipase của các chủng *Bacillus*, tác giả đã phân lập được 8 chủng vi khuẩn có đường kính vòng phân giải dao động từ 16 đến 21 mm.

3.4. Phương pháp định lượng khả năng sinh lipase

Dịch tăng sinh vi khuẩn được đo lượng khả năng sinh lipase sử dụng phương pháp đo quang phổ hấp thụ với cơ chất là p-nitrophenyl palmitate (p-NPP) ở bước sóng OD 410 nm. Kết quả được trình bày ở bảng 6.

Bảng 6. Kết quả định tính khả năng sinh lipase.

Chủng	Giá trị UI/ml	Chủng	Giá trị UI/ml
GV-04	0,33 ^{a±} 0,0003	TĐ-02	0,20 ^{a±} 0,0006
BT-06	0,32 ^{b±} 0,0001	PN-08	0,20 ^{a±} 0,0001
GV-10	0,26 ^{c±} 0,0001	GV-12	0,20 ^{a±} 0,0001
GV-02	0,25 ^{d±} 0,0002	PN-03	0,20 ^{a±} 0,0008
TĐ-06	0,23 ^{c±} 0,0015	PN-09	0,18 ^{a±} 0,0004

Trong cùng một cột, các giá trị được đánh dấu bởi các chữ cái giống nhau thì sự khác nhau không có ý nghĩa về mặt thống kê, các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê theo phân tích ANOVA ($\alpha=0,05$).

Kết quả ở bảng 6 cho thấy, 10 chủng vi sinh vật có hoạt tính từ 0,18 đến 0,33 IU/ml sau 24 giờ nuôi cấy, so sánh với một số nghiên cứu của D.M. Lam và cs (2012) [12] nghiên cứu tuyển chọn *Bacillus* sinh lipase kiểm từ rừng ngập mặn, kết quả của nghiên cứu có 8 chủng có khả năng phân giải lipid (chiếm 2,4%) trong tổng số 250 chủng thử nghiệm, với hoạt độ lipase dao động từ 0,03 đến 0,15 UI/ml. Kết quả cho thấy, 10 chủng vi sinh vật phân lập được có khả năng biểu hiện hoạt tính lipase từ 0,1789 UI/ml đến 0,3250 UI/ml là khá cao.

3.5. Định danh chủng vi sinh vật bằng sinh học phân tử

Định danh 2 chủng vi sinh vật có giá trị UI từ 0,3 UI/ml trở lên, là chủng có ký hiệu mã hóa GV-04 và BT-06 bằng phương pháp giải trình tự gen 16S rRNA.

Kết quả chạy PCR cho thấy, chủng BT-06 cho sản phẩm dài 1439 cặp base. Số nucleotide loại A và T chiếm 42,95%, số nucleotide loại G và C chiếm 53,03%. Kết quả phân tích bằng BLAST cho thấy, trình tự đoạn gen 16S rRNA của chủng BT-06 có độ tương đồng 100% với loài *Bacillus amyloliquefaciens*. Chủng GV-04 cho sản phẩm PCR dài 1458 cặp base. Số nucleotide loại A và T chiếm 43,48% và số nucleotide loại G và C chiếm 52,67%. Kết quả phân tích bằng BLAST cho thấy, trình tự đoạn gen 16S rRNA của chủng GV-04 có độ tương đồng 100% với loài *Bacillus subtilis* (hình 2).

