

# PHÂN LẬP VI KHUẨN PHÂN GIẢI CELLULOSE, TINH BỘT VÀ PROTEIN TRONG NƯỚC RỈ TỪ BÃI RÁC Ở THÀNH PHỐ CẦN THƠ

Hà Thanh Toàn<sup>1</sup>, Mai Thu Thảo<sup>1</sup>, Nguyễn Thu Phương<sup>1</sup>,  
Trần Lê Kim Ngân<sup>1</sup>, Bùi Thế Vinh<sup>2</sup> và Cao Ngọc Diệp<sup>1</sup>

## ABSTRACT

*Sixty-two bacteria isolates composing of 17 proteolytic bacteria, 24 cellulolytic bacteria, 21 amylolytic bacteria were isolated from wastewater of two municipal solidwaste plants Dong Thanh and Tan Long, CanTho city on specific media. Among the whole bacteria isolated, there were 19 mesophilic bacteria and 32 thermophilic bacteria. In which there were 12 isolates having high effectiveness in both of meso and thermophile and in three kinds of material.*

**Keywords:** *wastewater, proteolytic bacteria, cellulolytic bacteria, amylolytic bacteria, mesophile, thermophile*

**Title:** *Isolation of proteolytic, cellulolytic and amylolytic bacteria in wastewater from municipal solidwaste plant in CanTho city*

## TÓM TẮT

*Sáu mươi hai dòng vi khuẩn phân giải chất hữu cơ bao gồm 17 dòng phân giải protein, 24 dòng phân giải cellulose, 21 dòng phân giải tinh bột được phân lập từ nước rỉ ở hai bãi rác Đông Thạnh và Tân Long, Cần Thơ trên những môi trường đặc hiệu. Trong đó tổng số vi khuẩn phân lập được, có 19 dòng vi khuẩn bình nhiệt và 32 dòng vi khuẩn ưa nhiệt. Trong số này có 12 dòng vi khuẩn có độ hữu hiệu cao phân bố 2 dòng vi khuẩn trong mỗi nhóm bình nhiệt hay ưa nhiệt và trong ba loại cơ chất.*

**Từ khóa:** *nước rỉ rác, vi khuẩn phân giải protein, vi khuẩn phân giải cellulose, vi khuẩn phân giải tinh bột, bình nhiệt, ưa nhiệt*

## 1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Ngày nay nền kinh tế - xã hội càng phát triển, dân số tại các vùng đô thị, trung tâm công nghiệp càng tăng nhanh cùng với sự gia tăng dân số, một lượng rác thải phát sinh cũng không ngừng tăng lên. Dự báo đến năm 2010, nước ta sẽ có thêm mười triệu dân sống trong các vùng đô thị, kéo theo sự gia tăng 60% chất thải sinh hoạt, chất thải nguy hại tăng lên ba lần (<http://vietnam.vn/khoahoc>). Lượng rác tăng nhanh chóng, trong khi sự tái sử dụng hầu như không đáng kể và sự quay vòng chất thải gặp nhiều khó khăn. Những sản phẩm phân hủy tự nhiên của rác thải hữu cơ không ngừng đe dọa môi trường tự nhiên của sinh vật. Chất hữu cơ là môi trường thuận lợi cho các vi sinh vật phát triển tạo ra các chất có mùi khó chịu như H<sub>2</sub>S, NH<sub>3</sub> ... làm ô nhiễm môi trường, không những vậy còn là môi trường lý tưởng của vi sinh vật gây bệnh, gây ô nhiễm nguồn nước do các sản phẩm lên men ngấm vào lòng đất, làm biến đổi sâu sắc toàn bộ môi trường, gây bệnh tật, làm

<sup>1</sup> Viện Nghiên cứu Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>2</sup> Nhà máy sữa Cần Thơ

giảm sức khỏe cộng đồng, chiếm đất đai chôn lấp làm bãi rác, làm mất cảnh quan các khu dân cư đô thị .... Vì vậy việc quản lý và xử lý chất thải một cách hợp lý là yêu cầu rất cấp thiết hiện nay.

Nhiều phương pháp xử lý rác hữu cơ được nghiên cứu và đưa vào ứng dụng như biện pháp đốt hay chôn lấp lại biểu hiện những nhược điểm như chi phí cao, công nghệ cao, tốn diện tích đất chôn lấp, .... Qua phân tích thành phần rác thải sinh hoạt ở nước ta cho thấy, thành phần rác thải hữu cơ chiếm khoảng 45 – 55% thậm chí lên đến hơn 80%, là tỉ lệ cao nên rất thích hợp với phương pháp xử lý bằng công nghệ sinh học.

Xử lý rác thải hữu cơ bằng phương pháp lên men vi sinh vật là một công nghệ mới. Mặc dù công nghệ này vẫn còn nhiều hạn chế như chưa tận thu được hết các chất hữu cơ chứa trong rác hay lượng khí phân hủy vẫn bị thoát ra ngoài, làm ảnh hưởng đến môi trường... Song, nó có nhiều ưu thế nổi bật hơn hẳn so với các phương pháp chôn lấp, thiêu hủy. Bởi sản phẩm thu được vừa có giá trị kinh tế, vừa góp phần hạn chế tình trạng ô nhiễm môi trường, chi phí rẻ (một tấn rác xử lý bằng công nghệ sinh học chỉ hết 160.000đ, trong khi đó nếu đem thiêu hủy thì phải tốn 30 – 40 USD)...(<http://congnghemoi.com.vn>)

Biện pháp xử lý sinh học bao gồm các công việc nghiên cứu, phân lập các chủng vi sinh vật có khả năng phân hủy các hợp chất hữu cơ trong rác thải sinh hoạt, để tạo ra một chế phẩm biến rác thải hữu cơ thành phân hữu cơ an toàn cho đất. Do điều kiện rác thải ở nước ta chủ yếu là rác thải hữu cơ với thành phần chính là xác bã động- thực vật nên tỉ lệ cellulose, tinh bột và protein trong rác thải là khá cao. Do đó cần chọn được những chủng vi sinh vật có khả năng phân giải các cơ chất trên có hiệu quả cao, trong đó vi khuẩn là một đối tượng mà chúng ta cần quan tâm. Vấn đề này hiện nay cũng đã và đang có rất nhiều nghiên cứu và đã ứng dụng nhiều nơi nhưng do thành phần rác, điều kiện môi trường ở mỗi nơi cũng rất khác nhau, vì vậy mà các chế phẩm này không hiệu quả khi áp dụng ở các địa phương khác. Chính vì thế mà cần có một đề tài nghiên cứu phân lập vi khuẩn phân giải các cơ chất trên trực tiếp tại địa phương để nhân lên và tạo ra một chế phẩm sinh học phù hợp hơn.

Mục tiêu của đề tài “Phân lập các dòng vi khuẩn phân hủy cellulose, tinh bột và protein trong nước thải của bãi rác” đồng thời chọn lọc được dòng vi khuẩn phân hủy các hợp chất hữu cơ trên tốt nhất để ứng dụng trong việc xử lý rác thải hữu cơ trong tương lai gần.

## 2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Môi trường nuôi cấy pha chế cho 1 lít môi trường

#### 2.1.1 Môi trường phân lập vi khuẩn phân giải protein (*proteolytic bacteria*)

- Peptone	5.0 g
- Dung dịch thịt (Meat extract)	3.0 g
- Dịch trích nấm men (Yeast extract)	1.0 g
- Agar	20 g
- Sữa tươi	300 ml

- Nước cất 700 ml
- Agar (môi trường đặc)\* 20 g
- pH = 6.5

2.1.2 Môi trường phân lập vi khuẩn phân giải cellulose (*Cellulolytic bacteria*)(Ryckeboer et al., 2002)

- (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.0 g
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0 g
- MgSO<sub>4</sub> 0.5 g
- NaCl 0.009 g
- CMC (carboxymethylcellulose) 10g
- Cycloheximide 0.2 g
- Agar (môi trường đặc)\* 20 g
- pH = 6.8

2.1.3 Môi trường phân lập vi khuẩn phân giải tinh bột – *Mt1* (*amylolytic bacteria*) (*Ekologija* (Vilnius, 2003)

- NH<sub>4</sub>Cl 9.0 g
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g
- MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0.5 g
- CaCO<sub>3</sub> 3.0 g
- Glucose 20.0 g
- Tinh bột tan 10.0 g
- Agar (môi trường đặc)\* 20 g
- pH = 7.0

\* Nếu sử dụng môi trường đặc bổ sung agar

## 2.2 Phương pháp thu mẫu nước rỉ rác

Nước rỉ rác chảy ra tạo thành rãnh và đọng vũng, mẫu nước rỉ rác được thu bằng cách cho nước rỉ vào trong ống nhựa (khoảng 500 ml nước rỉ rác) và vị trí lấy mẫu cách mặt nước đọng vũng khoảng 2 – 3 cm. Có 2 nguồn nước rỉ rác từ

- Bãi rác Đông Thạnh (Cần Thơ) là bãi rác đã xử lý.
- Bãi rác Tân Long (Hậu Giang) là bãi rác đang xử lý.

*Xử lý mẫu:* mẫu nước rỉ rác sau khi đem vào phòng thí nghiệm sẽ được pha loãng 4 - 5 lần bằng nước cất tiệt trùng. Các mẫu nước sau khi pha loãng có thể sử dụng ngay cho các bước tiếp theo, nếu không thì đậy kín nắp rồi cất vào tủ lạnh.

## 2.3 Phương pháp phân lập các dòng vi khuẩn

*Trãi mẫu:* Hút 0,1 ml dung dịch mẫu nước rỉ (đã pha loãng), nhỏ lên đĩa petri có chứa môi trường phân lập (đặc) tương ứng cho từng nhóm vi khuẩn phân giải cellulose, tinh bột hay protein. Từ giọt nước này ta tiến hành trải mẫu (lấy dụng cụ trải khử trùng bằng cách hơ đỏ trên đèn cồn và chờ cho nó nguội). Sau đó đặt

chúng vào giọt nước mẫu và trải đều chúng ra trên mặt môi trường). Chờ cho đến khi mặt môi trường khô thì đem vào tủ ủ để ủ.

- Mẫu trải từ mẫu nước (A) ủ ở 30°C.
- Mẫu trải từ mẫu nước (B) ủ ở 55°C.

*Nhận diện khuẩn lạc sau 24 giờ ủ:* Các khuẩn lạc của vi khuẩn có khả năng phân giải protein (sử dụng casein trong sữa), sử dụng tinh bột hay cellulose sẽ tạo ra một vòng tròn trong suốt bao quanh khuẩn lạc và khuẩn lạc ăn khuyết vào môi trường.

*Cấy:* dùng kim cấy (đã khử trùng bằng cách hơi trên đèn cồn) chạm vào khuẩn lạc (lựa khuẩn lạc rời). Sau đó tiến hành cấy theo đường “zic zac” cho đường cấy cuối cùng không chạm vào đường cấy đầu tiên.

Cấy chuyên cho tới khi nào xuất hiện các khuẩn lạc rời nhau, đồng nhất về hình dạng và kích thước thì tiến hành xem mẫu, xác định độ rỗng bằng kính hiển vi quang học, và trữ trong ống nghiệm nắp đen với môi trường tương ứng và xem như một dòng hay chủng (isolate) riêng biệt.

### 3 KẾT QUẢ THẢO LUẬN

Từ mẫu nước rỉ rác, chúng tôi phân lập được 17 dòng (isolate) vi khuẩn phân giải protein bao gồm 4 dòng phát triển ở nhiệt độ phòng (30°C) gọi là vi khuẩn bình nhiệt (mesophilic bacteria) và 13 dòng phát triển ở nhiệt độ cao (55°C) gọi là vi khuẩn ưa nhiệt (thermophilic bacteria)(Hình 1a và hình 1b) có khuẩn lạc to, màu xậm, phát triển nhanh (sau 24 giờ), điều đặc biệt trong 4 dòng vi khuẩn bình nhiệt phân lập ở nước rỉ từ bãi rác Đông Thạnh mà bãi rác này đã xử lý hay ngưng hoạt động, trái lại 13 dòng vi khuẩn ưa nhiệt lại phân lập từ nước rỉ ở bãi rác Tân Long và bãi rác này trong quá trình xử lý hay tiếp tục nhận rác mới.



**Hình 1a:** Vi khuẩn phân giải protein bình nhiệt (30°C) phát triển trên môi trường sữa tươi

**Hình 1b:** Vi khuẩn phân giải protein ưa nhiệt (55°C) phát triển trên môi trường sữa tươi

Khả năng hay độ hữu hiệu của chúng có thể đánh giá sơ bộ qua đường kính của vòng tròn chung quanh khuẩn lạc hay còn gọi là halo (Hình 2).

**Hình 2: Đánh giá độ hữu hiệu hay khả năng phân giải protein qua các halo**

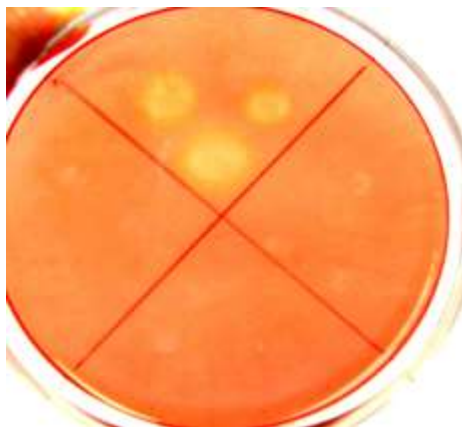


Trái lại với vi khuẩn phân giải protein, vi khuẩn phân hủy cellulose có khuẩn lạc có kích thước nhỏ hơn, hình trắng đục, phát triển tương đối chậm sau 2-4 ngày (Hình 3).



**Hình 3: Khuẩn lạc vi khuẩn phân giải cellulose phát triển trên môi trường bổ sung CMC**

Có 14 dòng vi khuẩn phân giải cellulose bình nhiệt được phân lập từ nước rỉ của bãi rác Đông Thạnh (Hình 4a) và 10 dòng vi khuẩn phân giải cellulose ưa nhiệt được phân lập từ nước rỉ của bãi rác Tân Long (Hình 4b) trong tổng số 24 dòng vi khuẩn phân lập được đều có màu với congo đỏ.



**Hình 4a:Vi khuẩn phân giải cellulose bình nhiệt phát triển trên môi trường CMC nhuộm với congo đỏ**



**Hình 4b:Vi khuẩn phân giải cellulose ưa nhiệt phát triển trên môi trường CMC nhuộm với congo đỏ**

Cùng với vi khuẩn phân giải protein và cellulose, chúng tôi phân lập được 21 dòng vi khuẩn phân giải tinh bột trong đó có 11 dòng vi khuẩn bình nhiệt phân lập từ nước rỉ rác của bãi rác Đồng Thạnh và 9 dòng vi khuẩn ưa nhiệt phân lập từ nước rỉ rác ở bãi rác Tân Long (Hình 5), tất cả những dòng vi khuẩn phân giải tinh bột đều bắt màu với Iod. Khuẩn lạc của các dòng vi khuẩn phân giải tinh bột có hình dạng tròn, độ nổi mô, màu trắng đục như sữa, phát triển nhanh trong môi trường tinh bột tan (từ 1-2 ngày). Sự hiện diện của các halo bao quanh các khuẩn lạc có thể cho kết quả bước đầu đánh giá khả năng phân giải tinh bột của từng dòng vi khuẩn khác nhau.



(a)



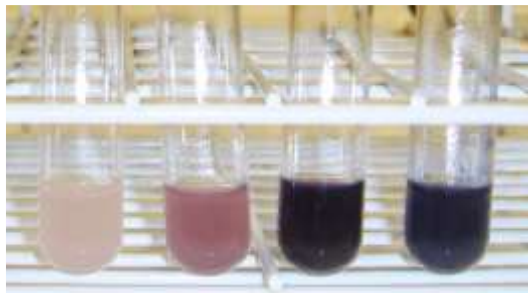
(b)

**Hình 5: Vi khuẩn phân hủy tinh bột tạo ra halo chung quanh khuẩn lạc (a) và được nhuộm với iod để thấy phân tinh bột bị mất đi (vùng sáng)(b)**

Ngoài ra, việc đánh giá khả năng phân giải tinh bột của các dòng vi khuẩn này có thể thực hiện trong môi trường lỏng bổ sung thuốc thử Iod để thấy sự hiện diện còn lại của tinh bột (ống nghiệm màu trong hay vàng lợt [ít tinh bột] hoặc màu nâu xậm [tinh bột còn nhiều]) (Hình 6a và hình 6b).



**Hình 6a: Khả năng phân hủy tinh bột của vi khuẩn phân hủy tinh bột bình nhiệt trong môi trường lỏng với thuốc thử Iod**



**Hình 6b: Khả năng phân hủy tinh bột của vi khuẩn phân hủy tinh bột ưa nhiệt trong môi trường lỏng với thuốc thử Iod**

Theo Strom (1985) khi ủ phân hữu cơ từ sản phẩm sinh học ở nhiệt độ cao (>60°C) thường xuất những nhóm vi sinh vật chịu nhiệt như các loài nấm *Aspergillus fumigatus*, *Trichoderma*... hay nhóm xạ khuẩn *Streptomyces* và vi khuẩn *Bacillus*. Tuy nhiên, sự điều tra chi tiết hơn của Ryckeboer *et al.* (2003) trong các nhóm bình nhiệt có các loài thuộc giống *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Cellulomonas cellulans*, *Rhodococcus rhodochrous*, *Pseudomonas alcaligenes*, còn nhóm chịu nhiệt thì phổ biến nhất là các loài trong giống *Bacillus*, kể đến *Geobacillus* thế nhưng trong điều kiện yếm khí thì sự xuất hiện của loài vi khuẩn *Clostridium thermocellum* chủ yếu phân hủy cellulose (Schwarz, 2001). Trong điều tra các nhóm vi khuẩn xuất hiện trong phân hữu cơ từ rác thải sinh học, sự xuất hiện của loài *Thermoanaerobacterium thermosaccharolytum* phân hủy các nguồn carbohydrat (tinh bột, cellulose) trong điều kiện yếm khí và ủ nóng (Ueno *et al.*, 2006) nhưng nhiều nghiên cứu gần đây cho thấy vi khuẩn *Bacillus*, *Clostridium* thường hiện diện nhiều trong phân hữu cơ (compost) ủ tại gia đình hay thương mại (Guo *et al.*, 2007; Vrint *et al.*, 2007).

Những dòng vi khuẩn phân giải protein, cellulose và tinh bột mà chúng tôi phân lập được chưa xác định tên giống loài, đặc biệt các dòng vi khuẩn bình nhiệt được tìm thấy trong nước rỉ ở bãi rác ngưng hoạt động (bãi rác Đông Thạnh) còn các dòng vi khuẩn ưa nhiệt lại tìm thấy trong nước rỉ ở bãi rác đang hoạt động (bãi rác Tân Long), điều quan trọng là khả năng ứng dụng chúng vào trong việc xử lý rác thải hữu cơ rất có triển vọng và tiềm năng cao; trong mỗi nhóm chúng tôi chọn được 2 dòng vi khuẩn có độ hữu hiệu cao ở từng nhóm nhiệt độ để nhân nuôi sinh khối và ứng dụng vào xử lý rác thải hữu cơ trong tương lai.

#### 4 KẾT LUẬN

- Từ trong mẫu nước rỉ ở bãi rác, chúng tôi phân lập được 17 dòng vi khuẩn phân giải protein, 24 dòng vi khuẩn phân giải cellulose và 21 dòng vi khuẩn phân giải tinh bột.
- Ứng dụng những dòng vi khuẩn có độ hữu hiệu cao trong việc xử lý rác thải hữu cơ.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Guo, Y., N. Zhu, S. Zhu and C. Deng. 2007. Molecular phylogenetic diversity of bacteria and its spatial distribution in composts. *J. of Applied Microbiology* 103, 1344-1354.
- Ren, Z., T.E. Ward, B.E. Logan and J.M. Regan. 2007. Characterization of the cellulolytic and hydrogen-producing activities of six mesophilic *Clostridium* species. *J. of Applied Microbiology* 103, 2258-2266.
- Ryckeboer, J., J. Mergaet, J. Gosemans, K. Deprins and J. Swings. 2003. Microbiological aspects of biowaste during composting in a monitored compost bin. *J. of Applied Microbiology* 94, 127-137.
- Schwarz, W.H. 2001. The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56, 634-649.
- Strom, P.F. 1985. Identification of Thermophilic Bacteria in Solid-Wastes Composting. *Applied Environmental and Microbiology* 50, 906-913.

- Ueno, Y., D. Sasaki, H. Fukui, S. Harita, M. Ishii and Y. Igarashi. 2006. Changes in bacterial community during fermentative hydrogen and acid production from organic waste by thermophilic anaerobic microflora *J. of Applied Microbiology* 101, 331-343.
- Vrints, M, S. Bertrand and J.M. Collend. 2007. A bacterial population study of commercialized wastewater inoculants *J. of Applied Microbiology* 103, 2006-2015.