

# XÁC ĐỊNH CHỦNG VI KHUẨN *BACILLUS* SP. PHÂN GIẢI PROTEIN VÀ THỬ NGHIỆM XỬ LÝ NƯỚC THẢI THỦY SẢN TO DETERMINE THE PROTEIN-DECOMPOSING BACTERIA *BACILLUS* SP. AND APPLY PRIMARILY IN AQUATIC PRODUCTS PROCESSING WASTEWATER TREATMENT

**Nguyễn Thị Lan Phương, Đỗ Thu Hà**

*Trường Đại học Sư phạm, Đại học Đà Nẵng; Email: Nguyenthilanhphuongsp@gmail.com*

**Tóm tắt** - Từ các mẫu nước thải của một số nhà máy chế biến thủy sản tại thành phố Đà Nẵng, bài báo đã phân lập tuyển chọn được 6 chủng vi khuẩn *Bacillus* có khả năng phân giải protein. Trong 6 chủng này, chúng tôi chọn ra chủng *Bacillus* H1 có hoạt tính mạnh nhất để nghiên cứu đặc điểm sinh học. Kết quả nghiên cứu đã xác định được VK *Bacillus* H1 thuộc loài *Bacillus subtilis*, sinh trưởng thích hợp ở pH 6,5 – 7,5 và ở nhiệt độ 30 – 35°C. Thử nghiệm bổ sung chủng H1 vào quá trình xử lý nước thải thủy sản bằng mô hình bể xử lý hiếu khí cho thấy *Bacillus* H1 làm tăng hiệu quả xử lý ô nhiễm nước thải thủy sản. Cụ thể, sau 5 ngày xử lý với chủng H1, nước thải đầu ra đều đạt tiêu chuẩn xả thải loại B theo QCVN 11:2008/BTNMT.

**Từ khóa** - *Bacillus*; protease; giải trình tự gen 16S; mô hình bể hiếu khí; nước thải.

**Abstract** - From wastewater samples of some aquatic products processing plants in Danang city, 6 strains of protein-decomposing bacteria *Bacillus* sp. were isolated. Of these bacteria, *Bacillus* H1 considered as the strongest protein resolution strain was chosen to serve research on biological characteristics. The result indicated that H1 strain belonged to species *Bacillus subtilis*, got optimum growth at pH 6.5 to 7.5 and temperature of 30 - 35 °C. Applying H1 strain in process of aquatic product waste wastewater treatment by pilot aeroten revealed that H1 strain contributed significantly in reducing pollution indexes. After about 5 days of treatment utilizing H1 strain, the output wastewater met the discharge standards of Vietnamese standard 11:2008/Ministry of Natural Resource and Environment.

**Key words** - *Bacillus*; protease; 16S sequencing; pilot aerotank; wastewater.

## 1. Mở đầu

Nước thải phát sinh từ ngành công nghiệp chế biến thủy sản có đặc tính là giàu hàm lượng các chất hữu cơ chứa nitơ, photpho và dễ bị phân hủy sinh học [1]. Do đó, sử dụng biện pháp sinh học để xử lý nước thải thủy sản được xem là giải pháp hiệu quả và đã được áp dụng ở các cơ sở sản xuất chế biến thủy sản. Nhờ khả năng phân giải của vi sinh vật ở giai đoạn bề hiếu khí hoặc kỵ khí, các đại phân tử hữu cơ bị thủy phân, chuyển hóa thành các chất đơn giản là nguồn dinh dưỡng để vi sinh vật sử dụng, sinh trưởng và phát triển, đồng thời giúp làm sạch nguồn nước thải [1].

*Bacillus* là nhóm vi khuẩn (VK) hiếu khí phân bố rộng rãi trong tự nhiên, đặc biệt là trong môi trường nước. Chúng có khả năng phân giải mạnh hợp chất hữu cơ nhờ khả năng sinh tổng hợp các enzyme ngoại bào, trong đó có protease. Nhiều loài VK *Bacillus* sinh tổng hợp mạnh enzyme protease như *B. cereus*, *B. stercorophilus*, *B. mojavensis*, *B. megaterium* and *B. Subtilis* [2]. Vì vậy, việc nghiên cứu tuyển chọn các chủng vi khuẩn *Bacillus* có khả năng phân giải mạnh protein là hợp chất hữu cơ chiếm tỉ trọng lớn trong thành phần nước thải thủy sản có ý nghĩa khoa học và ứng dụng trong thực tiễn sản xuất.

## 2. Phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Phương pháp phân lập vi sinh vật

Các mẫu nước thải thủy sản được thu tại cống xả thải các nhà máy chế biến thủy sản khu công nghiệp Thọ Quang với những vị trí cách xa nắp xả 0m, 1m, 2m, 3m, ở độ sâu khoảng 10 - 20 cm.

Mẫu thu về được phân tích và phân lập dựa trên phương pháp phân lập của Egorov [3].

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu khả năng phân giải protein và khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố môi trường đến sự sinh trưởng, sinh hoạt tính của VK

Xác định các chủng VSV có hoạt tính protease bằng phương pháp đục lỗ thạch; Môi trường nuôi cấy có bổ sung casein và sử dụng thuốc thử  $HgCl_2$ ; Khả năng sinh hoạt tính của vi khuẩn được xác định bằng đường kính vòng phân giải trên đĩa thạch [4].

Chủng VK nghiên cứu sau đó được nuôi cấy lác ở các điều kiện nhiệt độ, pH khác nhau nhằm khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố môi trường đến khả năng sinh trưởng, sử dụng phương pháp đo mật độ quang [4]. Đo đường kính vòng phân giải tương ứng với các mốc thời gian nuôi cấy khác nhau để xác định thời điểm VK sinh enzyme mạnh nhất [3].

### 2.3. Phương pháp định danh chủng vi khuẩn tuyển chọn

Sử dụng phương pháp nhuộm Gram và nhuộm bào tử kết hợp với khóa phân loại theo Bergey [5] để định danh chủng vi sinh vật đến tên chi và sử dụng các phương pháp sinh học phân tử trong phòng thí nghiệm kết hợp với so sánh kiểu hình để định danh đến tên loài.

#### 2.3.1. Nhuộm Gram

Tiến hành theo phương pháp Hucker cải tiến [4].

#### 2.3.2. Nhuộm bào tử

Nhuộm với lục Fuchsin Ziehl và xanh Methylene Loeffler theo phương pháp Ogietska [4].

#### 2.3.3. Phương pháp tách chiết và tinh sạch ADN tổng số

Tách ADN tổng số theo Kit tách chiết Microbial DNA của Qiagen, Đức.

#### 2.3.4. Phương pháp nhân bản gen đích bằng kỹ thuật PCR

Nhân bản vùng gen 16S bằng kỹ thuật PCR trên máy PCR model 9700 với các cặp mồi 27F:

AGAGTTTGATCTGGCTCAG; mỗi 1492R:  
TACGGYTACCTTGTTACGACTT. Chu trình nhiệt:

94°C: 3 phút  
94°C: 45 giây  
55°C: 45 giây  
72°C: 45 giây  
72°C: 10 phút

} 35 chu kỳ

### 2.3.5. Phương pháp giải trình tự và hiệu chỉnh trình tự

Sản phẩm PCR điện di trên gel agarose 0,8% và tinh sạch bằng bộ kit QiAquick (Qiagen, Đức) được sử dụng làm khuôn cho phản ứng giải trình tự trực tiếp với mỗi 27F/1492R; đọc kết quả trên hệ thống ABI 3100; hiệu chỉnh bằng mắt với phần mềm Chromas Pro1.7.6. Các trình tự phân tích được sắp xếp thẳng hàng bằng phần mềm Bioedit v7.0.5.2. Trình tự nucleotide của các chủng được so sánh với các trình tự đã có trên Genbank, sử dụng công cụ BLAST trong NCBI [6].

### 2.3.6. Phương pháp xác lập mô hình tiến hóa

Dữ liệu trình tự nucleotide sẽ được khảo sát phân bố nucleotide, kiểm tra các giả thuyết và xác định mô hình tiến hóa tối ưu bằng cách sử dụng chuẩn thông tin Akaike được hiệu chỉnh (corrected AICc - Akaike Information Criterion) trong phần mềm Modeltest v3.7 [7]. Kết quả khảo sát sẽ được sử dụng làm tham số đầu vào để tính toán ma trận, khoảng cách di truyền và xây dựng cây phát sinh chủng loại theo phương pháp phân tích tiến hóa, tiết kiệm tối đa Maximum Parsimony (MP) [8].

### 2.3.7. Phương pháp xây dựng cây tiến hóa

Để xây dựng cây tiến hóa bằng phương pháp MP, dữ liệu DNA được chuyển vào phần mềm Bioedit v7.0.5.2 với các thông số tiến hóa được lấy từ kết quả phân tích của mô hình tiến hóa Modeltest v3.7. Cây tiến hóa được phân tích từ các mô hình trích xuất từ phần mềm Mega 6.0.6 [9] và chúng được thực hiện với 1000 lần lặp lại để xác định giá trị ủng hộ (bootstrap) [8].

### 2.3.4. Phương pháp bố trí thí nghiệm xử lý nước thải

Bổ sung dung dịch nuôi cấy lacc của chủng VK được chọn vào bể xử lý sinh học hiếu khí (30L) với tỉ lệ số lượng VSV/V<sub>nước thải</sub> được xác định. Ở bể đối chứng, lượng nước thải xử lý cũng tương đương nhưng không bổ sung VK.

Xác định pH bằng máy đo nhanh pH. Xác định COD theo phương pháp Hồi lưu kín - Trắc quang. Xác định BOD<sub>5</sub> của mẫu nước thải bằng bộ xác định BOD 6 vị trí - BOD Sensor system 6 - Velp. Xác định hàm lượng Nitơ tổng số theo phương pháp Kjeldahl (chưng cất đạm) [10].

## 3. Kết quả và thảo luận

### 3.1. Kết quả xác định VK có hoạt tính protease

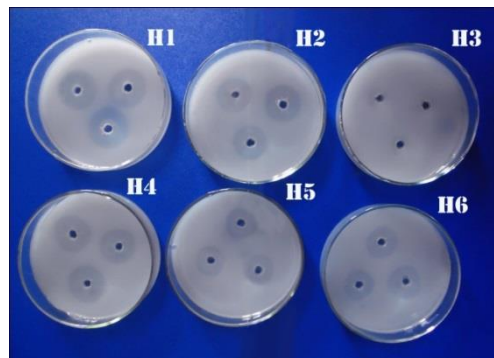
Từ các chủng VK phân lập được, xác định được 6 chủng VK có hoạt tính protease. Kết quả được trình bày ở Bảng 1 và Hình 1.

Kết quả phân lập cho thấy, chủng VK H1 có khả năng sinh tổng hợp protease mạnh nhất, tương ứng với đường kính vòng phân giải lớn nhất. Do đó, chúng tôi tiếp tục đưa chủng H1 vào nghiên cứu đặc điểm sinh học và khả năng

ứng dụng chúng trong xử lý nước thải thủy sản.

**Bảng 1.** Vòng phân giải của các chủng VK có hoạt tính protease

| STT | Kí hiệu chủng | Đường kính vòng phân giải (D-d, mm) |
|-----|---------------|-------------------------------------|
| 1   | H1            | 25 ± 0,5                            |
| 2   | H2            | 21 ± 0,5                            |
| 3   | H3            | 8 ± 0,5                             |
| 4   | H4            | 22 ± 0,5                            |
| 5   | H5            | 15 ± 0,5                            |
| 6   | H6            | 18 ± 0,5                            |



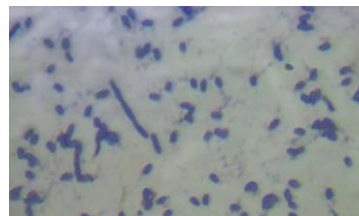
**Hình 1.** Vòng phân giải protease của 6 chủng VK có hoạt tính

### 3.2. Kết quả nghiên cứu đặc điểm sinh học chủng VK tuyển chọn

#### 3.2.1. Định danh chủng vi khuẩn

##### a. Nhuộm Gram

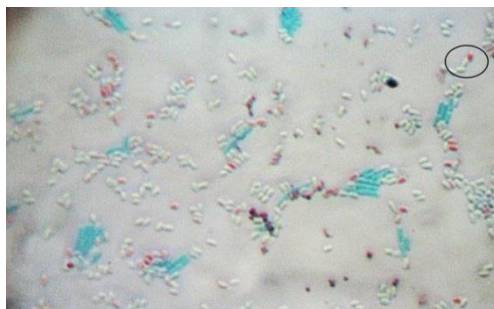
Quan sát dưới kính hiển vi ở vật kính 100 cho thấy chủng VK H1: có dạng trực khuẩn, một số xếp thành chuỗi dài, bắt màu tím khi nhuộm Gram. Như vậy, chủng VK H1 được xác định là thuộc nhóm trực khuẩn Gram dương [5].



**Hình 2.** Chủng H1 bắt màu tím khi nhuộm Gram

##### b. Nhuộm bào tử

Chủng vi khuẩn H1 sinh bào tử sau 3 tháng nuôi cấy trên môi trường thạch. Quan sát kết quả nhuộm bào tử ở vật kính 100 xác định được nội bào tử VK chủng H1 bắt màu đỏ, tế bào chất bắt màu xanh nhạt.



**Hình 3.** Bào tử chủng VK H1

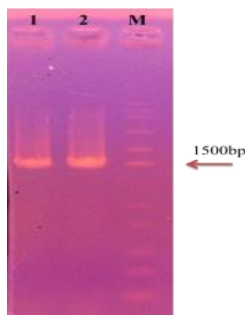
Tiến hành nuôi cấy VK H1 trên bề mặt môi trường

thạch, sau 24h nuôi cấy, khuẩn lạc mọc đều, có màu đục. Điều này chứng tỏ VK H1 có khả năng sinh trưởng tốt trong điều kiện hiếu khí.

Đối chiếu những kết quả nghiên cứu trên với khóa định loại của Bergey có thể kết luận chủng VK H1 thuộc chi *Bacillus*. Đó là những trực khuẩn Gram dương, sinh bào tử và hiếu khí [5].

### c. Kết quả tách chiết, làm sạch ADN tổng số và nhân bản trình tự DNA với cặp mồi 27F/1492R chủng VK H1

DNA tổng số của 02 mẫu VK H1 đã được tách chiết thành công với chất lượng DNA cao. Sản phẩm PCR điện di trên gel chỉ xuất hiện 1 băng duy nhất, có kích thước khoảng 1500 bp, phù hợp với kích thước lý thuyết dự đoán [11].



**Hình 4.** Sản phẩm PCR VK *Bacillus* H1  
(Giếng 1 – 2: các mẫu H1, M: marker phân tử).

### e. Kết quả giải trình tự gen chủng VK *Bacillus* H1

Kết quả xác định trình tự vùng gen 16S cho ảnh điện di đồ với các đỉnh huỳnh quang rõ nét, cường độ mạnh và rõ ràng). Sau khi loại bỏ trình tự mồi và các vùng tín hiệu nhiễu, chúng tôi đã thu được trình tự nucleotide của chủng H1 có độ dài là 1285 nucleotide.

> H1

```
CCCTGATAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAA
CACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAAC
TCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTT
TGAACCCCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTC
GGCTACCACCTACAGATGGACCCGCGGCGCATTA
GCTAGTTGGTGAGGTAACGGGCTACCAAGGCAC
CGATGCGTAGCGACCTGAGAGGCTGATCGGCC
ACACTGGGACTGAGACACGGCCGAGACTCCTAC
GGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGA
CGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGA
TGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAG
GGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTAC
CTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAA
CTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG
CAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGC
TCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCC
CCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTG
GGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATT
CCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGG
AGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCT
GTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAG
CGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCG
TAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCG
CCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTC
```

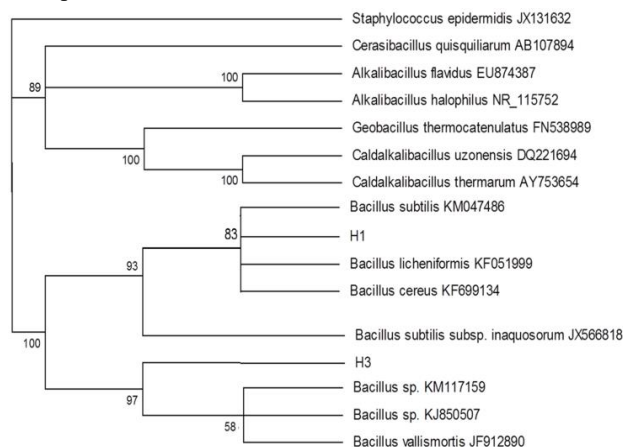
```
CGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTC
AAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAGCGGTGG
AGCATGTGTTTAATTCTGAAGCAACGCGAAGAA
CCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTA
GAGATAGGACGTCCCCCTCGGGGGCAGAGTGAC
AGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTG
AGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC
CTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACT
CTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAG
GTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATG
ACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAA
CAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAAT
CCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCT
GCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTA
ATCGCGGATCAGCA
```

### f. Kết quả giải BLAST và xây dựng cây phát sinh chủng loại

Kiểm tra tính tương đồng của trình tự 16S mẫu VK *Bacillus* H1 với các trình tự sẵn có trên ngân hàng Genbank bằng công cụ BLAST cho thấy trình tự trên tương đồng cao (99%) với một số loài trong chi *Bacillus* (*Bacillus subtilis* KM047486, *Bacillus licheniformis* KF051999, *Bacillus cereus* KF699134) thuộc họ *Bacillaceae*. Việc so sánh với cơ sở dữ liệu trên Genbank nhằm mục đích cho một kết quả tham chiếu với nhóm loài tương đồng nhất với trình tự truy vấn. Kết quả BLAST không thể kết luận chính xác về loài. Với những trường hợp BLAST có độ bao phủ và tương đồng cao (99%) cũng không thể suy ngược lại tên loài bởi kết quả BLAST chỉ hiển thị trình tự tương đồng nhất mà trên Genbank hiện có.

Do kết quả của BLAST cho ra những điểm nghi vấn chưa chuẩn xác, vì vậy chúng tôi sử dụng phương pháp dựng cây phát sinh chủng loại để tiếp tục xác định tên khoa học cho chủng H1.

Cây tiến hóa được xây dựng theo phương pháp MP. Kết quả được biểu thị ở Hình 6:



**Hình 6.** Mối quan hệ họ hàng của H1 với các loài/thứ trong cùng chi lấy trên Genbank theo phương pháp MP

Kết quả phân tích cây tiến hóa này một lần nữa khẳng định chủng VK H1 được xếp vào chi *Bacillus* với giá trị bootstrap trên 93%. Trong cây tiến hóa, VK H1 cũng với 3 loài có quan hệ gần gũi (*Bacillus subtilis* KM047486, *Bacillus licheniformis* KF051999, *Bacillus cereus* KF699134) tách ra thành 1 nhánh riêng. Cây tiến hóa này cũng chỉ ra, mức độ gần

gửi của VK H1 với 3 loài là tương đương nhau, với giá trị bootstrap 64%, do đó, chưa thể khẳng định chính xác được VK H1 là thuộc nhóm nào trong 3 loài gần gũi này.

Sử dụng phương pháp so sánh kiểu hình khuẩn lạc ở cùng điều kiện nuôi cấy, nhận thấy chủng VK *Bacillus* H1 có các đặc điểm sinh học rất giống với loài *Bacillus subtilis*. Cụ thể: sau 2 ngày nuôi cấy, khuẩn lạc có màu trắng đục, dẹt, không tròn đều, có rìa nhỏ ở mép. Nội bào tử hình thành ở gần tâm, kích thước tế bào  $2\mu\text{m} \times 1 - 1,5\mu\text{m}$  [12]. Ngoài ra, khuẩn lạc không có dạng phân thù hình vẩy địa y như *Bacillus licheniformis* và khi nuôi cấy trong điều kiện yếm khí, khuẩn lạc VK H1 không hình thành, do đó VK H1 không phải là *Bacillus cereus* [12]. Như vậy, có thể kết luận chủng VK H1 thuộc loài *Bacillus subtilis*.

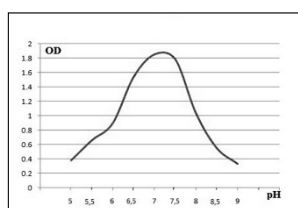
### 3.2.2. Ảnh hưởng của các yếu tố môi trường đến khả năng sinh trưởng và phân giải protein của VK H1

Kết quả nghiên cứu thời điểm sinh hoạt tính protease mạnh nhất cho thấy, chủng VK *Bacillus subtilis* H1 bắt đầu sinh tổng hợp enzyme protease sau 24h nuôi cấy. Thời điểm sinh hoạt tính protease mạnh nhất là vào khoảng sau 48h. Lúc này, đường kính vòng phân giải đạt cực đại (Bảng 2). Sau đó, khả năng sinh enzyme giảm dần theo thời gian.

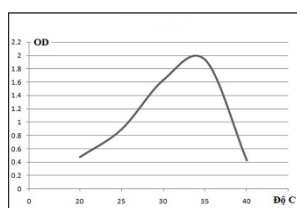
Nghiên cứu cũng nhận thấy VK H1 có khả năng sinh trưởng trong phổ pH và nhiệt độ khá rộng, pH từ 5-9 và nhiệt độ từ 20 – 40°C. Trong đó, điều kiện tối ưu nhất cho VK sinh tổng hợp enzyme phân giải là ở khoảng pH trung tính (6,5 – 7,5) và nhiệt độ 32 – 36°C (Hình 7 - 8)

**Bảng 2.** Đường kính vòng phân giải protein của chủng H1

| Thời gian nuôi cấy lỏng (T) | Đường kính vòng phân giải (D-d, mm) sau thời gian T |
|-----------------------------|-----------------------------------------------------|
| 12h                         | 0                                                   |
| 24h                         | 16 ± 0,5                                            |
| 48h                         | 25 ± 0,5                                            |
| 72h                         | 21 ± 0,5                                            |



**Hình 7.** Đồ thị biểu diễn OD (mật độ quang) theo pH của chủng H1



**Hình 8.** Đồ thị biểu diễn OD (mật độ quang) theo nhiệt độ của chủng H1

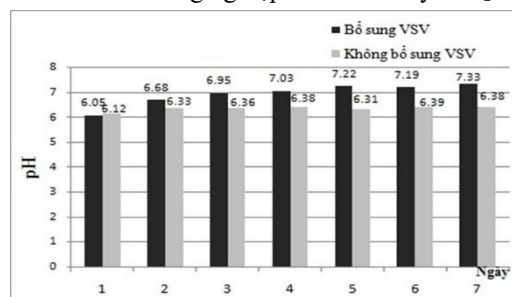
### 3.3. Xử lý nước thải thủy sản bằng bể xử lý sinh học hiếu khí

Kết quả thực nghiệm sử dụng chủng VK H1 xử lý nước thải bằng mô hình bể hiếu khí, với mật độ vi sinh vật  $4.10^9$  (CFU/lit), sau khoảng thời gian 7 ngày cho thấy khả năng thay đổi đáng kể các chỉ tiêu pH, COD/BOD và nitơ tổng so với bể đối chứng không bổ sung VK H1 (Hình 9-10).

#### 3.3.1. pH

Việc phân giải các protein bởi vi khuẩn thường sản sinh ra các sản phẩm làm thay đổi giá trị pH của môi trường, vì vậy pH là một chỉ số phản ánh hoạt động của các chủng

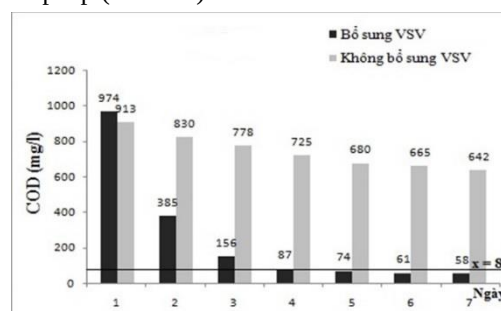
VK trong quá trình phân hủy protein trong nước thải. Kết quả từ Hình 9 cho thấy, giá trị pH trong bể nước thải xử lý với chủng VK H1 đã thay đổi từ 6,05 đến 7,03 sau 3-4 ngày và đạt 7,33 sau 7 ngày. Trong khi đó, giá trị pH trong bể đối chứng không thay đổi đáng kể, dao động trong khoảng 6,12 đến 6,38. Ngoài ra, đáng chú ý là giá trị pH sau xử lý nằm trong khoảng pH trung tính (6,95 – 7,03), thích hợp cho sự sinh trưởng của chủng H1, và trong khoảng cho phép về nước thải công nghiệp chế biến thủy sản [13].



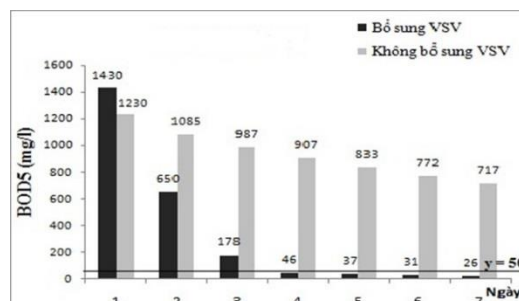
**Hình 9.** Đồ thị biểu diễn sự thay đổi pH của nước thải qua 7 ngày xử lý

#### 3.3.2. COD, BOD

Giá trị COD được dùng để đánh giá tổng hàm lượng các chất vô cơ và hữu cơ trong nước [1]. Sau 7 ngày xử lý với chủng H1 cho thấy, chỉ số COD trong bể giảm từ 974 mg/l xuống 58 mg/l (giảm 94%). Trong đó, COD giảm mạnh nhất vào ngày đầu tiên và sau 5 ngày xử lý COD giảm còn 74 mg/l (Hình 10), đạt mức quy định về nước thải công nghiệp chế biến thủy sản [2]. Trong khi đó, ở bể đối chứng COD giảm từ 913 mg/l xuống 642 mg/l (giảm 29,7%) sau 7 ngày. Giá trị COD vẫn cao hơn khoảng 8 lần so với chi tiêu cho phép (Hình 10).



**Hình 10.** Đồ thị biểu diễn sự thay đổi COD trong nước thải qua 7 ngày xử lý



**Hình 11.** Đồ thị biểu diễn sự thay đổi BOD5 trong nước thải qua 7 ngày xử lý

Tương tự, thực nghiệm giám sát chỉ tiêu BOD, là thông số phản ánh mức độ ô nhiễm hữu cơ trong nước thải [1],

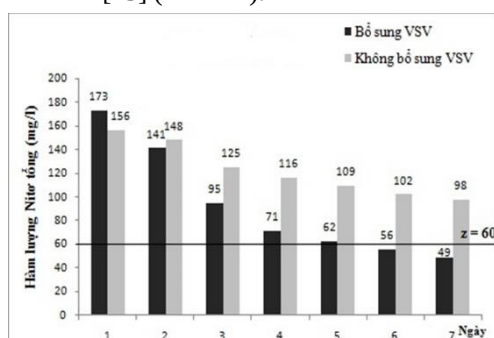


qua từng ngày xử lý cũng nhận được kết quả tương tự. Trong bể xử lý có mật chủng H1, chỉ số BOD<sub>5</sub> của nước thải đầu ra giảm từ 1430 mg/l xuống 26 mg/l (giảm 98%). Đặc biệt, BOD<sub>5</sub> giảm mạnh nhất vào ngày đầu tiên và đạt đến giá trị 46 mg/l sau 4 ngày xử lý (Hình 11), đạt mức quy định về nước thải công nghiệp chế biến thủy sản [2]. Trong khi đó, BOD<sub>5</sub> trong bể đôi chủng giảm từ 1230 mg/l xuống 717 mg/l (giảm 41,7%) sau 7 ngày và giá trị BOD<sub>5</sub> vẫn cao hơn khoảng 14 lần so với chỉ tiêu cho phép (Hình 11).

### 3.3.3. Nito tổng số

Đặc tính của dòng chất thải thủy sản là có dư lượng protein cao. Do đó, việc theo dõi sự thay đổi chỉ tiêu nito tổng số là có ý nghĩa trong đánh giá hiệu quả xử lý loại nước thải này.

Kết quả cho thấy sau 7 ngày xử lý, khi bổ sung chủng VK *Bacillus subtilis* H1 thì hàm lượng N<sub>tổng</sub> giảm nhiều hơn (giảm 71,7%) so với khi không bổ sung (giảm 37,2%). Đặc biệt, N<sub>tổng</sub> giảm mạnh nhất vào ngày thứ hai và sau 6 ngày xử lý với việc bổ sung chủng H1, N<sub>tổng</sub> giảm còn 55,8 mg/l, đạt mức quy định tại cột B của QCVN 11: 2008/BTNMT [13] (Hình 12).



Hình 12. Đồ thị biểu diễn sự thay đổi N<sub>tổng</sub> trong nước thải qua 7 ngày xử lý

## 4. Kết luận

Trong 6 chủng VK có khả năng phân giải protein phân lập được từ các mẫu nước thải thủy sản thu được tại Đà Nẵng, đề tài đã xác định chủng VK H1 là có hoạt tính protease mạnh nhất.

Bằng các nghiên cứu định danh VSV, chúng tôi đã khẳng định được chủng VK H1 thuộc loài *Bacillus subtilis*. Những khảo sát về đặc điểm sinh học cho thấy chủng *Bacillus subtilis* H1 sinh trưởng thích hợp nhất ở khoảng pH trung tính (6,5 – 7,5), nhiệt độ 30– 35°C.

Thử nghiệm chủng *Bacillus subtilis* H1 vào xử lý nước thải thủy sản bằng mô hình bể hiếu khí với mật độ VK 4.10<sup>9</sup> (CFU/ lit) nhận thấy, quá trình xử lý đạt hiệu quả cao hơn so với khi không bổ sung VSV. Sau 5 ngày xử lý, nước thải đầu ra đạt mức pH trung tính và các chỉ tiêu trong nước thải đều đạt tiêu chuẩn QCVN 11:2008/ BTNMT.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Lê Gia Hy, 2010, *Giáo trình công nghệ vi sinh vật xử lý chất thải*, NXB Giáo dục Việt Nam.
- [2] Martins, W.C.A.d.N.M.L.L., Production and properties of an extracellular protease from Thermophilic bacillus sp Brazilian, *Journal of Microbiology*, 2003. 35: p. 91-96.
- [3] Egorov N.S, Nguyễn Lâm Dũng, 1983, *Thực hành vi sinh vật*, NXB Mir Moskva, NXB KH-KT
- [4] Nguyễn Lâm Dũng, 2003, *Giáo trình Vi sinh vật học*, NXB Giáo dục Việt Nam.
- [5] Sneath HAP, H.G., 1986, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Baltimore, MD: Williams and Wilkins. p. 1104-1140.
- [6] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>
- [7] David Posada, K.A.C., 1998, Modeltest: Testing the model of DNA substitution, *Bioinformatics*, 14(9): p. 817-818.
- [8] Tamura, K., et al., MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods, *Molecular Biology and Evolution*, 2011. 28(10): p. 2731-2739.
- [9] Koichiro Tamura, G.S., Daniel Peterson, Alan Filipski and Sudhir Kumar, MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0, *Mol. Biol. Evol.*, 2013. 30(12): p. 725–2729.
- [10] Lê Thị Hiền Thảo (chủ biên), 2009, *Quy trình quan trắc và phân tích chất lượng môi trường*, Nhà xuất bản Xây Dựng.
- [11] Ara K, O.K., Nakamura K, Yamane K, Sekiguchi J, Ogasawara N., 2007, *Bacillus minimum genome factory: effective utilization of microbial genome information*, *Biotechnol Appl Biochem*, 46(3): p. 169-78.
- [12] Donald Breakwell, B.M., Kyle Smith, Christopher Adams, Richard Robison. *Colony Morphology*, <http://www.microbelibrary.org/component/resource/laboratory-test>.
- [13] Quy chuẩn kỹ thuật Quốc gia về nước thải công nghiệp chế biến thủy sản, 2008, Bộ Tài nguyên và Môi trường: Hà Nội. p. 9.

(BBT nhận bài: 03/11/2014, phản biện xong: 13/11/2014)