

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN CÁC VI KHUẨN SINH TỔNG HỢP CÁC CHẤT HOẠT ĐỘNG BỀ MẶT (HĐBM)

LÊ VĂN TRI, PHẠM THỊ THU HIỀN, NGUYỄN THỊ BÍCH LIÊN, VŨ THỊ MINH ĐỨC

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Chất có hoạt tính hoạt động bề mặt (HĐBM) có cấu trúc lưỡng cực: phần ưa nước (hydrophile) và phần kỵ nước (hydrophobe). Ngoài ra chất HĐBM còn có các đặc trưng cơ bản khác như tính định hướng đến bề mặt pha, hấp phụ lên bề mặt phân cách pha, tạo mixen và 1 tập hợp các khả năng tan, tạo bọt, thấm ướt, tạo nhũ... Chất HĐBM được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực như chế tạo chất tẩy rửa, chất nhũ hoá, chất tuyển nổi... và nhất là các phụ gia trong ngành xây dựng.

Chất HĐBM được tổng hợp theo 2 con đường hoá học và sinh học. Chất HĐBM tổng hợp theo con đường sinh học gọi là chất HĐBM sinh học (HĐBMSH - biosurfactant). Về hướng này, đã có những nghiên cứu về kỹ thuật biến tính dầu hạt cao su làm nguyên liệu sản xuất phụ gia trợ nghiền kị ẩm xi măng [2, 3]. Nhìn chung chất HĐBM thu nhận từ nguyên liệu động-thực vật thường có giá thành tương đối cao. Để giảm giá thành người ta đã tận dụng phế thải của nhà máy sản xuất giấy, mía đường để làm phụ gia trong xây dựng.

Nhằm sản xuất phụ gia cho ngành xây dựng theo hướng sử dụng hèm rượu cồn ri đường, chúng tôi tiến hành sinh tổng hợp các chất HĐBMSH từ vi khuẩn. Sau đó đem sản phẩm thu được tương tác với các chất HĐBM khác có sẵn nhưng ít trong dịch hèm nội trên để nâng cao hoạt tính của chúng. Với bài báo này, chúng tôi muốn thông báo những kết quả thu được từ việc “Phân lập và tuyển chọn các vi khuẩn sinh tổng hợp các chất hoạt động bề mặt”.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Các mẫu đất, rác, cỏ, thực phẩm, dầu thô; Máy đo sức căng bề mặt Sigma 70 KSV instruments Ltd; Máy lắc GFL 3017.

Các hoá chất thông dụng để làm môi trường nuôi vi khuẩn.

2.2. Phương pháp

Phân lập và nhận dạng *Bacillus subtilis*, *B.licheniformis* được tiến hành theo chỉ dẫn của Sneath [5], *Pseudomonas* theo Seeley và cộng sự [4].

2.3. Test thay thế chỗ của dầu thô

Nuôi chủng thí nghiệm trong bình nón chứa 50ml môi trường xác định, pH 7. Nhiệt độ ủ 30°C, lắc 180 vòng/phút. Sau 24 giờ lấy mẫu dịch nuôi và làm test thay thế chỗ của dầu thô [6]. Lấy một đĩa petri có đường kính 150 mm, đổ vào đó 40 ml nước cất. Nhỏ 30 μ l dầu thô tổng hợp tạo thành lớp màng phim trên mặt nước. Nhỏ 15 μ l mẫu vào chính giữa lớp màng dầu. Nếu có khả năng thay thế chỗ của dầu, một quãng sáng rõ rệt sẽ được quan sát dưới ánh sáng thích hợp. Đo đường kính của quãng và tính diện tích ($S = \pi r^2$, cm^2).

2.4. Đo sức căng bề mặt (SCBM)

Sức căng bề mặt được đo trên máy Sigma 70 với sự giúp đỡ của Bộ môn Hoá Lí - khoa Hoá học Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - Đại học Quốc gia Hà Nội.

Bởi vì môi trường chưa nuôi vi khuẩn (hèm ri đường đối chứng - ĐC) cũng làm giảm sức căng bề mặt tới một khoảng nhất định cho nên để so sánh hoạt tính giữa các chủng, chúng tôi dùng đại lượng % giảm SCBM [7]:

$$\% \text{ Giảm SCBM} = \frac{\text{SCBM đối chứng} - \text{SCBM sau khi nuôi}}{\text{SCBM đối chứng}} \times 100$$

2.5. Xác định nồng độ tới hạn tạo mixen (critical micelle concentration -CMC)

Mixen là các hạt keo, gồm một hạt nhân ở giữa và một lớp điện tử kép bao quanh. Đối với 1 hệ đã cho nếu nồng độ chất HDBM tăng thì sức căng bề mặt sẽ giảm đến một giá trị nào đó và sau đó dù nồng độ dung dịch tăng nhưng sức căng bề mặt không giảm. Nồng độ đó là nồng độ tới hạn tạo mixen.

CMC của dịch nuôi (đã li tâm loại bỏ tế bào) được xác định bằng cách đo sức căng bề mặt của dịch nuôi sau khi đã pha loãng tới các nồng độ khác nhau bằng nước cất. Điểm chuyển biến trên đường cong được xác định là CMC của dịch nuôi [8].

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập và sơ tuyển các chủng *Bacillus* và *Pseudomonas* có khả năng sinh tổng hợp các chất có hoạt tính hoạt động bề mặt sinh học (HDBMSH)

Từ 30 mẫu đất, dầu thô, rom rác, đất mùn, thực phẩm, lá cây các loại, chúng tôi đã thu được 53 chủng *Bacillus*, 6 chủng *Pseudomonas*. Các chủng được nuôi trên môi trường LB chứa 20 gam hèm ri đường, 5 gam cao men, 10g pepton, nước 1 lít, pH 7,5 chỉnh bằng NaOH. Lắc 180 vòng/phút/30°C/24 giờ. Thử khả năng thay thế của dầu thô. Các chủng có hoạt tính sẽ đẩy dầu, tạo thành quãng trong trên mặt màng phim. Chọn lựa các chủng có diện tích thay thế chỗ của dầu rộng. Kết quả sơ tuyển sau khi đã lặp lại 3 lần được trình bày ở bảng 1 dưới đây.

Từ kết quả trên bảng 1, chúng tôi nhận thấy các chủng có hoạt tính thay thế chỗ của dầu một cách mạnh mẽ đều là các *Bacillus*. ở Việt nam đã có những nghiên cứu về sinh tổng hợp các chất HDBM của *Pseudomonas* [1]. Tuy nhiên các chủng *Pseudomonas* mà chúng tôi thu được (kí hiệu từ P1-P6) có hoạt tính thấp. Có thể do có hệ enzym thủy phân mạnh cho nên các *Bacillus* có khả năng sử dụng nhiều loại cơ chất khác nhau. Mặt khác do có bào tử nên các *Bacillus* thường chịu đựng tốt các hoàn cảnh bất lợi và tần suất bắt gặp chúng sẽ lớn hơn.

Bảng 1. Diện tích thay thế chỗ của dầu thô ở các chủng vi khuẩn phân lập

STT	Chủng	S (cm ²)	pH cuối	STT	Chủng	S (cm ²)	pH cuối
1	ĐS	13,8	6,0	31	IFO1	5,7	6,5
2	ĐB1	19,6	7,0	32	IFO5	11,33	6,0
3	Đ2	13,8	6,0	33	RHD7	62,4	6,0
4	Đ3	12,5	6,0	34	RHD8	50,3	6,5
5	ĐB4	22,7	6,0	35	RHD9	12,5	7,0
6	ĐB5	12,8	6,0	36	RHD10	22,8	6,3
7	Đ6	9,6	5,5	37	RHD11	19,6	6,5
8	ĐB7	41,8	7,0	38	RHD20	22,8	6,5
9	Đ8	6,15	6,5	39	RHD21	19,6	5,0
10	Đ25	16,6	6,0	40	RHD33	9,2	6,0
11	Đ103	11,3	6,0	41	Cd1	64,8	6,5
12	Đ104	22,0	6,0	42	Cd2	63,5	6,5
13	Đ106	19,6	6,0	43	Cd3	22,8	6,5
14	ĐG	9,0	6,0	44	Cd4	19,5	7,0
15	ĐP	9,6	6,5	45	Cd5	51,5	6,5
16	L1	26,4	6,5	46	Cd6	37,3	6,0
17	L2	22,9	5,0	47	Cd7	7,5	6,0
18	L3	33,2	6,0	48	Cd8	22,8	5,0
19	L4	16,6	7,0	49	Cd9	11,4	5,0
20	L5	16,0	7,0	50	Cd11	60,8	6,5
21	L41	7,0	5,0	51	Cd12	46,5	6,5
22	L42	8,0	5,0	52	Cd15	23,7	6,0
23	L45	8,0	5,0	53	Cd16	38,46	6,5
24	L48	7,5	5,0	54	P1	9,0	7,0
25	L54	3,5	7,0	55	P2	11,5	7,0
26	L59	3,0	7,0	56	P3	19,6	6,0
27	LKG	5,5	6,0	57	P4	23,7	6,0
28	T1	64,5	6,5	58	P5	28,2	6,0
29	T2	19,6	6,5	59	P6	15,8	6,5
30	T3	37,2	6,0				

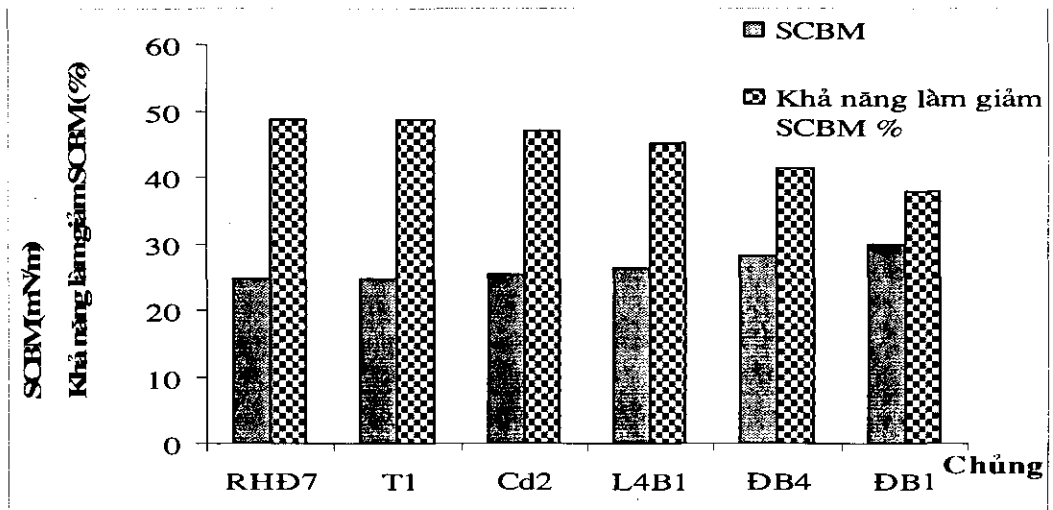
Chú thích. Kí hiệu chữ cái ở đầu tên chủng chỉ nguồn nguyên liệu được sử dụng để phân lập: Đ: đất; L: lá các loại cây cỏ; T: Thực phẩm; Cd: dầu thô; R: rác, mùn rác. Riêng chữ P chỉ các Pseudomonas.

3.2. Khả năng làm giảm sức căng bề mặt của dịch nuôi

Một trong các đặc tính quan trọng của chất HDBM là khi phân tán vào nước nó làm giảm sức căng bề mặt của hệ dung dịch. Vì vậy để đánh giá chính xác hơn khả năng sinh tổng hợp các chất HDBMSH của các chủng, chúng tôi tiến hành đo sức căng bề mặt của dịch nuôi trước và sau thí nghiệm. 50 ml môi trường LB -hèm ri đường pH 7,5 được phân vào các bình nón dung tích 250 ml, khử trùng 121°C/30 phút. Các chủng có diện tích thay thế dầu lớn được cấy riêng rẽ vào từng bình, lắc 180 vòng/phút trong 24 giờ ở 30°C. Li tâm loại bỏ tế bào. Dịch trong được đo sức căng bề mặt trên máy Sigma 70. Đối chứng (ĐC) là dịch li tâm môi trường chưa cấy vi khuẩn. Kết quả 3 lần lặp lại được trình bày ở bảng 2.

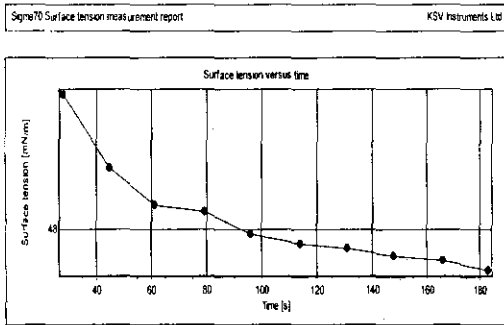
Bảng 2. Sức căng bề mặt của các dịch nuôi chủng vi khuẩn

STT	Chủng	Sức căng bề mặt (mN/m)	Giảm sức căng bề mặt (%)	pH
1	ĐB7	24,494	49,03	6,0
2	RHĐ7	24,640	48,75	7,0
3	T1	24,705	48,59	6,0
4	RHD11	24,799	48,41	7,0
5	Cd1	24,801	48,40	6,0
6	Cd2	25,477	46,99	6,5
7	L4B1	26,367	45,12	6,0
8	ĐB5	27,287	43,22	7,0
9	ĐB4	28,125	41,48	6,0
10	ĐB1	29,834	37,92	7,0
11	Đ104	39,885	17,01	6,0
12	ĐC	48,064		7,5

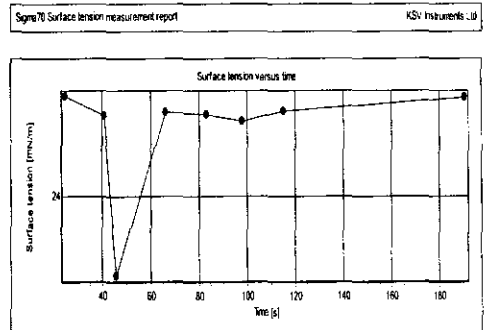


Hình 1. Sức căng bề mặt (SCBM) của dịch nuôi một số chủng và khả năng làm giảm SCBM ở môi trường nuôi chúng

Sau 2 thí nghiệm trên, bước đầu chúng tôi đã chọn lựa được 5 chủng có khả năng làm giảm SCBM của môi trường từ 48% - 49% và dưới mức 25 mN/m. Khả năng làm giảm SCBM của các chủng được trình bày ở hình 1.



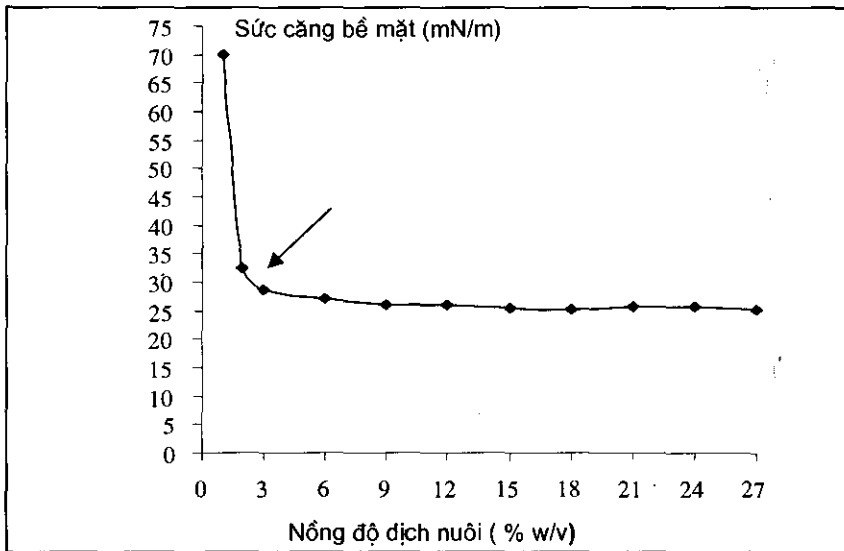
Hình 2. SCBM của môi trường đối chứng



Hình 3. SCBM của dịch nuôi cấy chủng T1

3.3. Xác định nồng độ tối hạn tạo mixen (CMC) của dịch nuôi

Chủng T1 có hoạt tính ổn định được nuôi trên môi trường LB chứa hèm rỉ đường, lắc 180 vòng/phút/24h/30°C. Li tâm lấy dịch trong. Pha loãng dịch này với nước cất thành các nồng độ từ 1,5% - 27% (v/v), trộn đều trên máy. Đo sức căng bề mặt của các mẫu trên máy Sigma70. Đối chiếu là nước cất có SCBM là 70,853 mN/m và dịch nuôi đã li tâm, chưa pha loãng là 24,922 mN/m. SCBM của các mẫu và CMC được trình bày ở hình 2 dưới đây.



Hình 2. Nồng độ tối hạn tạo mixen của dịch nuôi chủng T1 được pha loãng từ 1,5-27% (v/v)

Như vậy dịch nuôi chủng T1 ở nồng độ 3% đã làm giảm SCBM của nước cất từ 70,853 mN/m xuống còn 28,658 mN/m, có nghĩa là đã làm giảm 59,55% SCBM của nước cất.

Chúng tôi nhận thấy dịch nuôi chủng T1 có chứa chất HĐBM bởi vì nó làm giảm sức căng bề mặt xuống dưới 30 mN/m và nồng độ tới hạn tạo mixen thấp (khoảng 2 - 3% v/v). Hình 2 cũng cho thấy sau điểm CMC dù nồng độ dung dịch tăng lên nhưng SCBM không giảm.

3.4. Sơ bộ phân loại chủng T1

Chủng T1 có tế bào hình que mảnh, chiều ngang khoảng 0,8 - 0,9 μm , dài khoảng 2 - 5 μm . Bào tử hình ovan, ở giữa tế bào, không làm phình tế bào mẹ nhưng chậm được hình thành. Chủng này thường tiết ra sắc tố màu hồng pulcherrimin, nhất là khi nuôi trên môi trường chứa nguồn cacbon thích hợp. Về các đặc tính sinh lí sinh hóa, chủng phân giải casein mạnh, dịch hóa gelatin tốt, phân giải tinh bột khá mạnh, sinh trưởng ở 50°C, chịu nồng độ muối 7%. Từ những đặc tính trên, chúng tôi nhận thấy chủng có nhiều điểm giống với *Bacillus licheniformis*.

4. KẾT LUẬN

Từ các nguồn thực phẩm, rác, dầu thô chúng tôi đã phân lập và tuyển chọn được 3 chủng T1, RHD7, Cd1 có khả năng sinh tổng hợp các chất hoạt động bề mặt một cách mạnh mẽ trong môi trường hèm ri đường.

Ba chủng này làm giảm sức căng bề mặt của dịch nuôi 46% - 49%.

Nồng độ tới hạn tạo mixen của chủng T1 là thấp, khoảng 2% - 3% (v/v).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Trần Đình Mẫn, Nguyễn Đình Việt, Lại Thuý Hiền - Tối ưu hoá điều kiện nuôi cấy chủng vi khuẩn *Pseudomonas* sp. ASB tạo chất hoạt động bề mặt, Báo cáo khoa học, Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc, Hà Nội, 2003, tr.106-109.
2. Hoàng Dương Thanh - Đóng góp vào việc tổng hợp chất tạo nhũ từ dầu hạt cao su, luận văn Thạc sĩ khoa học Hoá học, khoa Hoá học, Trường ĐHKHTN- Đại học Quốc gia Hà Nội, 1998.
3. Hoàng Văn Thịnh - Nghiên cứu kĩ thuật biến tính dầu cao su làm nguyên liệu sản xuất phụ gia trợ nghiền kĩ ẩm xi măng, luận văn thạc sĩ khoa học Hoá học, khoa Hoá học, Trường ĐHKHTN, Đại học Quốc gia Hà Nội, 2003.
4. Seeley H. W., Vandemark P. J., Lee J. J. - A Labotary manual of microbiology, Fourth edition, Amazon.com (1990) 257-258.
5. Sneath P. H. A. - Endospore-forming gram positive rods and cocci, in: Bergey's manual of systematic bacteriology, Holt J. G editor-in-chief, Williams & Wilkins Baltimore, Vol. 2, 1986, pp. 1104 - 1139.
6. Thaniyavarn J., Morikawa M., Ezaki S., Kanaya S., and Imanaka T. - Characterization of lipopeptide surfactant produced by *Bacillus licheniformis* F2.2, Annual report of I.C.Biotech, International Center for Biotechnology, Osaka Univ., Osaka Japan 19 (1996) 830-838.
7. Sutthivanitchakul B., Thaniyavarn J., and Thaniyavarn S. - Biosurfactant production on rice straw hydrolysate by *Bacillus licheniformis* F2.2 Annual reports of I.C.Biotech, International Center for Biotechnology, Osaka Univ. Osaka Japan 20 (1997) 934-945.

8. Yakimov M. M., Timmis K. N., Wray V., and Fredrickson H. L. - Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS 50, Appl. Environ. Microbiol **61** (1995) 1706-1713.

SUMMARY

ISOLATION AND SCREENING BIOSURFACTANT (BS) PRODUCING BACTERIA

There are two broad classes of surfactants: chemically synthesized surfactants and biologically synthesized surfactants - biosurfactants (BS). BS have potentials of their broad range of industrial application and have several advantages over the chemical surfactants. In many areas of industrial applications, chemical surfactants have substituted by BS.

From soil, grass, food, raw oil samples we isolated 59 strains of *Bacillus* and *Pseudomonas*. Oil displacement of every isolate was checked. Crude oil 15 μ l was put onto the surface of 40 ml of distilled water in petri dish Φ 150 mm. Then 15 μ l of the culture sample solution was gently put on the center of the oil membrane. Area of clear halo was calculated ($S = \pi r^2$). From 59 tested isolates, 12 strains have oil displacement areas of about 30-60 cm².

Using Sigma 70 tensiometer, surface tension and critical micelle concentration (CMC) were determined with the help of the Department of Physico - Chemistry, faculty of Chemistry, Ha Noi University of Science. Among 11 tested strains, five were able to decrease the surface tension to levels below 25 mN/m when cultivated in molasses medium. Before growth, surface tension of molasses medium is about 48.064 mN/m (because the control medium itself reduced the surface tension to some extent). After growth in this medium, DB7 strain could reduce tension from 49.03 mN/m to 24.494 mN/m. There fore, surface tension reduction of the DB7 strain is 49 %. For CMC study, a range of cultivated medium dilution from 1.5 - 27% (v/v) was prepared. Surface tension measurement of each was done. Results showed that T₁ strain had CMC as 2- 3% (v/v).

T₁ is a rod shaped spore - forming, gram positive, catalaza potisive, motile, facultative anaerobic bacterium. This strain hydrolyzed gelatin, casein and starch, grew in medium with 7% (wt/v) NaCl, at temperature from 25 - 50°C .The T₁ strain was identified as member of the genus *Bacillus* with high similarity to *B.licheniformis*.

Địa chỉ:

Nhận bài ngày 7 tháng 1 năm 2007

Lê Văn Tri, Phạm Thị Thu Hiền, Nguyễn Thị Bích Liên,

Công ty cổ phần công nghệ sinh học.

Vũ Thị Minh Đức,

Đại Học Quốc Gia Hà Nội.