

## NGHIÊN CỨU SỰ HẤP PHỤ KIM LOẠI NẶNG BỞI VI KHUẨN *BACILLUS SUBTILIS* CÓ BIỂU HIỆN POLYHISTIDINE 6X TRÊN BỀ MẶT TẾ BÀO

Đặng Vũ Bích Hạnh<sup>(1)</sup>, Trần Linh Thuớc<sup>(2)</sup>, Đặng Vũ Xuân Huyền<sup>(3)</sup>

(1) Trường Đại học Bách khoa, ĐHQG-HCM

(2) Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(3) Viện Môi trường và Tài nguyên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 11 tháng 08 năm 2010, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 01 tháng 12 năm 2010)

**TÓM TẮT:** Vi khuẩn *Bacillus subtilis* có và không có biểu hiện polyhistidine 6x trên bề mặt tế bào và không có biểu hiện được nghiên cứu khả năng hấp phụ ion  $Ni^{2+}$  và  $Cu^{2+}$  có mặt trong nước thải với các nồng độ ban đầu từ 2ppm đến 200ppm, hấp phụ đạt cân bằng khi tăng pH từ 4-6. Kết quả cho thấy khả năng hấp phụ ion  $Cu^{2+}$  của *B. subtilis* có gắn 6x His cao hơn *B. subtilis* không có biểu hiện là 1,33 lần. Đối với trường hợp  $Ni^{2+}$ , *B. subtilis* có gắn 6x His có khả năng hấp phụ cao hơn *B. subtilis* thông thường là 1,8 lần. Cả hai loại có gắn và không gắn His 6x đều hấp phụ tuân theo mô hình hấp phụ của Langmuir và phương trình động học bậc II. Đặc điểm gắn của các ion kim loại này trên bề mặt của cả hai loại có và không có His 6x là gắn trên một vị trí cho đến khi đạt bão hòa.

### 1. GIỚI THIỆU CHUNG

Ô nhiễm kim loại nặng là một vấn đề lớn đang được quan tâm trên thế giới, đặc biệt tại những khu công nghiệp ở các nước đang phát triển như Việt Nam. Các công nghệ xử lý ô nhiễm kim loại nặng bằng các phương pháp như lắng, lọc, keo tụ... đã được áp dụng từ lâu. Tuy nhiên, các phương pháp này thường có giá thành cao và tích lũy trong môi trường sau quá trình xử lý. Do đó, xử lý sinh học bằng thực vật hay vi sinh vật đã và đang thu hút các công trình nghiên cứu (Leila, 2009. Gupta, 2008a. Mater, 2004; Yan, 2003). Đặc biệt, sử dụng tế bào vi sinh vật có biểu hiện peptide có khả năng gắn kim loại nặng trên bề mặt tế bào là một vật liệu hấp phụ sinh học đầy tiềm năng để xử lý những kim loại độc hại trong môi trường. Một số loại có thể kể đến như các vi khuẩn

Gram âm như *E.coli* (Sousa, 1996, 1998; Kotrba, 1999a, b), Gram dương như *Staphylococcus carnosus* (Stahl, 1997; Wernerus, 2001), các tế bào nấm men *Saccharomyces cerevisiae* (Kuroda, 2001). Vi khuẩn Gram dương thường được ứng dụng trong các vật liệu hấp phụ thay thế do vách tế bào dày và tốc độ sinh sản nhanh.

Bài báo này sẽ trình bày các kết quả sử dụng hệ thống *B. subtilis* biểu hiện hexa-His oligopeptide trên vách tế bào để tạo dòng tái tổ hợp tăng khả năng hấp phụ kim loại nặng nhằm cung cấp một vật liệu hấp phụ sinh học ứng dụng trong xử lý môi trường. Ion  $Ni^{2+}$  và  $Cu^{2+}$  được sử dụng như một mô hình nghiên cứu khả năng hấp phụ của *B. subtilis*.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 2.1. Chủng *B. subtilis* biểu hiện 6x-His oligopeptide trên bề mặt tế bào

Chủng *B. subtilis* mang 6x-His oligopeptide được cung cấp từ Phòng thí nghiệm Công nghệ Sinh học Phân tử, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên TP.HCM. Chủng được hoạt hóa qua đêm trong 5l LB chứa 100 $\mu$ g/ml erythromycin và 10 $\mu$ g/ml neomycin (LB/Ery+Neo). Một ml môi trường nuôi cấy tiêm vào 50ml môi trường S với kháng sinh tương tự (HS/Ery+Neo). Lắc ở 250rpm, 37°C và kiểm tra tăng sinh ở OD<sub>578nm</sub>. Tế bào thu ở giai đoạn đầu của phase ổn định, huyền phù trong 80% glycerol.

### 2.2. Kiểm tra năng lực gắn kim loại nặng của dòng NDH03/pNDH11-6xHis *B. subtilis*

Bổ sung 250ml LB/Ery+Neo+Chl vào 5ml *B. subtilis* đã hoạt hóa, nuôi cấy qua đêm trong môi trường tương tự ở 37°C và lắc ở 250rpm cho đến khi đạt 0.8 ở OD<sub>578</sub> lúc này sinh khối ở giữa phase tăng sinh (phase log) (El-Helow, 2000). Tiếp tục thêm IPTG và xylose để nồng độ cuối đạt 0.5mM và 0.5% theo thứ tự, nuôi tiếp 3giờ. Thu nhận tế bào bằng cách ly tâm với tốc độ 6,000rpm ở 4°C trong 10 phút. Rửa với nước cất. Cho tế bào vào các bình tam giác chứa Ni(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> và Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> với nồng độ cuối của Ni<sup>2+</sup> và Cu<sup>2+</sup> đạt 2ppm, 10ppm, 50ppm, 100ppm, 150ppm và 200ppm. Điều chỉnh pH ban đầu đạt 6 cho đến khi nồng độ tế bào đạt 4-5mg tế bào/ml. Lắc nhẹ trong 80phút. Mẫu được thu sau mỗi 20 phút, ly tâm và phân tích dịch nổi bằng máy hấp phụ quang phổ điện từ (Analytikjena 600) để xác định lượng Ni<sup>2+</sup> và

Cu<sup>2+</sup> còn lại. pH khảo sát được thực hiện trong khoảng từ 4;4,5;5;5,5;6. Khảo sát đặc điểm gắn được thực hiện bằng chương trình Sigma Plot 10.0.

## 3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

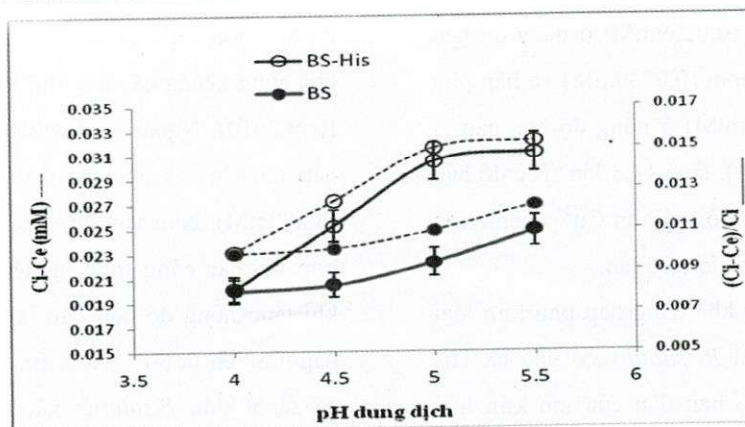
Trong bài báo này nhóm tác giả khảo sát năng lực hấp phụ ion kim loại nặng (Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>) và một số đặc điểm hấp phụ của vi khuẩn *Bacillus subtilis* và dòng vi khuẩn *Bacillus subtilis*/pNDH11-6xHis được biến đổi bằng công nghệ gene để mang thêm hexohistidine (6xHis) trên bề mặt tế bào nhằm mục đích tăng cường năng lực hấp phụ ion kim loại thông qua khả năng gắn kèm nối “chelate” của 6xHis với ion kim loại hóa trị 2.

### 3.1. Ảnh hưởng của pH lên khả năng hấp phụ ion kim loại của vi khuẩn *B. subtilis*

pH trong dung dịch là thông số quan trọng kiểm soát quá trình hấp phụ sinh học (Bhavanath Jha, 2009), do đó sự ảnh hưởng của nồng độ ion H<sup>+</sup> cần được nghiên cứu. Khảo sát khả năng hấp phụ ion Ni<sup>2+</sup> của sinh khối vi khuẩn *B. subtilis* (BS) và vi khuẩn *B. subtilis* có 6x His trên bề mặt tế bào (BS-His) ở các giá trị pH 4-6 với nồng độ Ni<sup>2+</sup> ban đầu trong dung dịch là 0,034mM (2ppm). Kết quả được trình bày trên hình 3.1 cho thấy ở trường hợp vi khuẩn bình thường mức độ hấp phụ Ni<sup>2+</sup> tăng lên theo giá trị pH và cao nhất ở 5,5. Như vậy, kết quả của bài báo phù hợp với các nghiên cứu trước đây đối với *Bacillus sp.* phân lập được trong bùn hoạt tính, khi tăng pH trong khoảng từ 3-6 thì khả năng hấp phụ Cu<sup>2+</sup> của *B. subtilis* tăng lên (Waihung Lo, 2003).

Tương tự, khi quy về điều kiện nồng độ chuẩn, khả năng hấp phụ ( $C_i - C_e / C_i$ ) cũng tăng lên theo pH và cao nhất là pH 5,5 với khả năng hấp phụ là 0,011 so với pH 4 là 0,008. Khi vi khuẩn có 6x His trên bề mặt thì khả năng gắn của  $Ni^{2+}$  cũng cao nhất ở pH 5,5 với khả năng hấp phụ  $Ni^{2+}$  của vi khuẩn *B.subtilis* có 6x His

trên bề mặt cao hơn vi khuẩn bình thường 1,36 lần, do sự cạnh tranh của ion  $H^+$  với ion kim loại nặng ở vị trí bề mặt của tế bào (El-Helow, 2000). Ở pH 6, bắt đầu có hiện tượng kết tủa kim loại nên không thể ghi nhận được chính xác mức độ hấp phụ  $Ni^{2+}$  ở pH này.

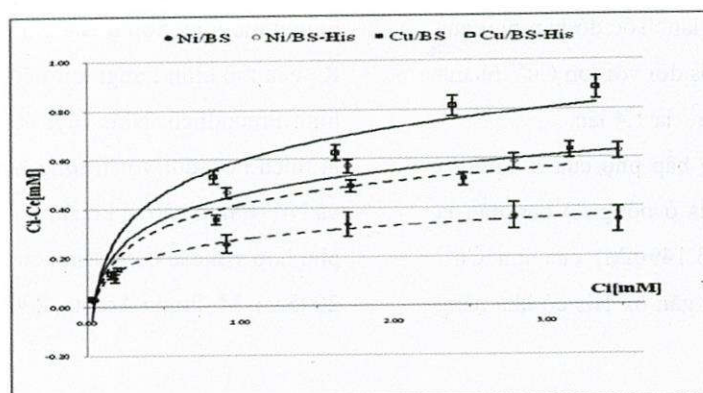


**Hình 3.1.** Hấp phụ  $Ni^{2+}$  bởi *B.subtilis* ở các pH khác nhau. (●)BS, *Bacillus subtilis* bình thường. (○), BS-His, *Bacillus subtilis* có 6x His trên bề mặt tế bào;  $C_i$ , nồng độ  $Ni^{2+}$  ban đầu;  $C_e$ , nồng độ  $Ni^{2+}$  trong dung dịch ở thời điểm cân bằng;  $C_i - C_e$ , nồng độ  $Ni^{2+}$  đã bị hấp phụ.

### 3.2. Ảnh hưởng của nồng độ ban đầu của ion kim loại lên khả năng hấp phụ kim loại nặng ở *B.subtilis*

Tiếp theo, khảo sát ảnh hưởng của nồng độ ban đầu của ion kim loại trong dung dịch lên khả năng hấp phụ kim loại của vi khuẩn

*B.subtilis*. Trường hợp này, 2 ion kim loại được khảo sát là  $Ni^{2+}$  và  $Cu^{2+}$ . Dãy nồng độ ion ban đầu được khảo sát từ 2 – 200ppm (0,034 – 3,407mM) ở trường hợp  $Ni^{2+}$  và 2-200ppm (0,031 – 3,140mM) ở trường hợp  $Cu^{2+}$ . Kết quả được trình bày trên hình 3.2 cho thấy:



**Hình 3.2.** Hấp phụ  $Ni^{2+}$  và  $Cu^{2+}$  bởi vi khuẩn *B. subtilis* theo nồng độ ban đầu của ion trong dung dịch. BS, vi khuẩn *B. subtilis*; BS-His, vi khuẩn *B. subtilis* có 6x His trên bề mặt.  $C_i$ , nồng độ ban đầu;  $C_e$ , nồng độ ion ở thời điểm cân bằng;  $C_i - C_e$ , nồng độ ion đã bị hấp phụ

a. Khả năng hấp phụ kim loại nặng của vi khuẩn *B. subtilis* tăng theo nồng độ ban đầu của  $\text{Cu}^{2+}$ , *B. subtilis* hấp phụ ở nồng độ  $\text{Cu}^{2+}$  2ppm (0,0314mM) là 1,6ppm (0,03mM) và ở nồng độ ban đầu 200ppm (3,149mM) của ion  $\text{Cu}^{2+}$  là 40ppm (0,629mM), tăng 25 lần. Tương tự đối với ion  $\text{Ni}^{2+}$ , *B. subtilis* bình thường hấp phụ được 1,4ppm (0,0239mM) ở nồng độ ban đầu của  $\text{Ni}^{2+}$  là 2ppm (0,0340mM) và hấp phụ được 20ppm (0,34mM) ở nồng độ ban đầu là 200ppm (3,407mM), tăng 14,3 lần. Tốc độ hấp phụ của *B. subtilis* đối với ion  $\text{Cu}^{2+}$  nhanh hơn hấp phụ với ion  $\text{Ni}^{2+}$  là 1,75 lần.

b. Tương tự khả năng hấp phụ kim loại nặng của vi khuẩn *B. subtilis* có gắn 6x His tăng theo nồng độ ban đầu của ion kim loại nặng, khả năng hấp phụ của *B. subtilis* 6x His ở nồng độ  $\text{Cu}^{2+}$  2ppm (0,0314mM) là 1,94ppm (0,031mM) và ở nồng độ ban đầu 200ppm (3,149mM) của ion  $\text{Cu}^{2+}$  là 53,2ppm (0,838mM), tăng 27,4 lần. Đối với ion  $\text{Ni}^{2+}$ , *B. subtilis* gắn 6x His hấp phụ được 1,84ppm (0,0313mM) ở nồng độ ban đầu của  $\text{Ni}^{2+}$  là 2ppm (0,0340mM) và hấp phụ được 36ppm (0,613mM) ở nồng độ ban đầu là 200ppm (3,407mM), tăng 19,6 lần. Tốc độ hấp phụ của *B. subtilis* có gắn 6xHis đối với ion  $\text{Cu}^{2+}$  nhanh hơn hấp phụ với ion  $\text{Ni}^{2+}$  là 1,4 lần.

So sánh khả năng hấp phụ của *B. subtilis* có và không có 6x His ở nồng độ ban đầu là 200ppm (tương ứng 3,149mM) của ion  $\text{Cu}^{2+}$  cho thấy *B. subtilis* có gắn 6x His có khả năng

hấp phụ ion kim loại nặng cao hơn 1,33 lần. Đối với trường hợp  $\text{Ni}^{2+}$ , *B. subtilis* có gắn 6x His có khả năng hấp phụ cao hơn *B. subtilis* thông thường là 1,8 lần.

Kết quả của Johncy Rani, 2010 cho thấy nếu tăng nồng độ từ 10 đến 100mg/L thì *B. subtilis* tăng khả năng phát triển và có thể loại bỏ 65% ion  $\text{Cu}^{2+}$ . Như vậy, *B. subtilis* sống có khả năng kháng các ion kim loại nặng (Johncy Rani, 2010). Ngoài ra, *Bacillus sp.* có năng lực hấp thu  $\text{Cu}^{2+}$  ở mức độ cao nhất là 400mg/l (6,299mM). Như vậy, kết quả của bài báo phù hợp với các công trình nghiên cứu trước đây, khi tăng nồng độ ban đầu làm tăng khả năng hấp phụ lên từ 80 – 90%. Bài báo lần đầu tiên so sánh giữa *B. subtilis* và *B. subtilis* có gắn 6xHis cho thấy khả năng tạo phức với protein trên bề mặt với các ion kim loại nặng.

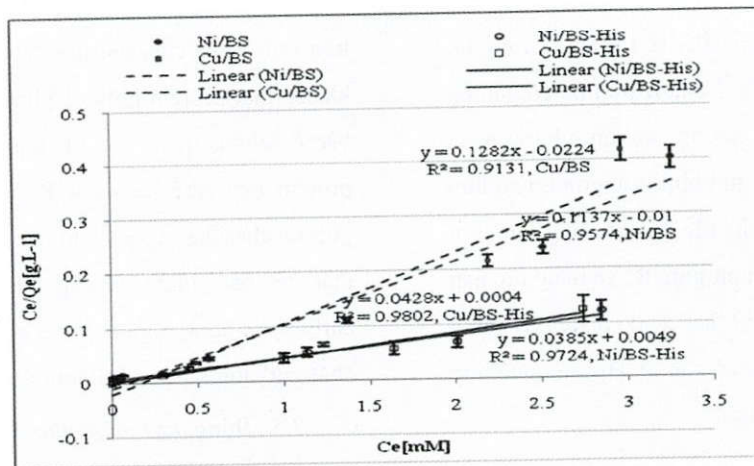
### 3.3. Mô hình hấp phụ đẳng nhiệt của sự hấp phụ ion kim loại bởi *B. subtilis*

Kết quả khảo sát đường đẳng nhiệt hấp phụ ion kim loại bởi vi khuẩn *B. subtilis* theo mô hình Langmuir được thể hiện ở Hình 3.3 và theo mô hình Freundlich được thể hiện ở Hình 3.4. Kết quả tính toán các thông số theo mô hình được tổng hợp ở Bảng 3.1, cho thấy hệ số  $R^2$  của mô hình Langmuir đều cao hơn của mô hình Freundlich. Như vậy, mô hình Langmuir là thích hợp đối với trường hợp hấp phụ  $\text{Cu}^{2+}$  và  $\text{Ni}^{2+}$  bởi tế bào vi khuẩn *B. subtilis*. Điều này phù hợp với các công trình của E. Ince Yilmaz, 2005 và M. Prado Acosta, 2000.

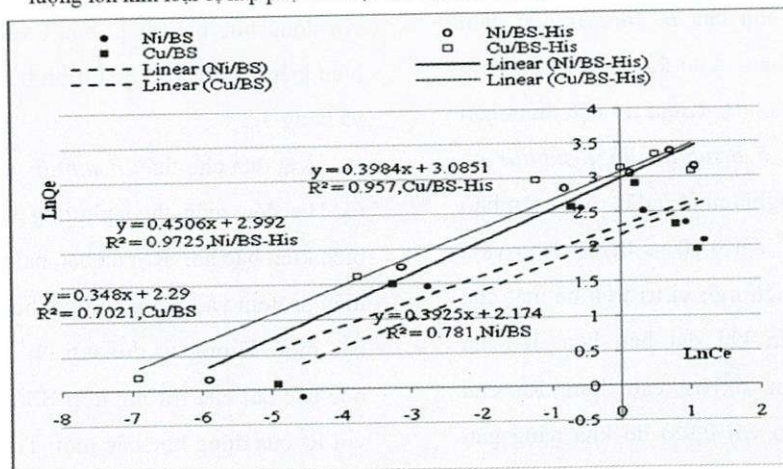
**Bảng 3.1.** Các hằng số Langmuir và Freundlich đối với sự hấp phụ ion  $\text{Cu}^{2+}$  và  $\text{Ni}^{2+}$  bởi *B.subtilis*

Trường hợp	Mô hình Langmuir			Mô hình Freundlich		
	$Q_L(\text{mmol g}^{-1})$	$K_L(\text{L.mmol}^{-1})$	$R^2$	$b_f(\text{L.g}^{-1})$	$K_F(\text{mmol g}^{-1})$	$R^2$
$\text{Cu}^{2+}/\text{BS-His}$	23,36	107,00	0,98	0,398	21,86	0,96
$\text{Cu}^{2+}/\text{BS}$	7,800	-5,72	0,91	0,348	9,87	0,70
$\text{Ni}^{2+}/\text{BS-His}$	25,97	7,86	0,97	0,451	20,06	0,97
$\text{Ni}^{2+}/\text{BS}$	8,795	-11,38	0,96	0,393	8,79	0,78

(BS, *B.subtilis*; BS-His, *B.subtilis* có 6x His trên bề mặt tế bào)



**Hình 3.3.** Đường đẳng nhiệt hấp phụ ion  $\text{Cu}^{2+}$  và  $\text{Ni}^{2+}$  của *Bacillus subtilis* theo mô hình Langmuir. BS, *Bacillus subtilis*; BS-His, *Bacillus subtilis* có 6x His trên bề mặt tế bào;  $C_e$ , nồng độ ion trong dung dịch ở điểm cân bằng;  $Q_e$ , lượng ion kim loại bị hấp phụ bởi một đơn vị khối lượng tế bào ở điểm cân bằng.



**Hình 3.4.** Đường đẳng nhiệt hấp phụ ion  $\text{Cu}^{2+}$  và  $\text{Ni}^{2+}$  của *B.subtilis* theo mô hình Freundlich.  $C_e$ , nồng độ ion trong dung dịch ở điểm cân bằng;  $Q_e$ , lượng ion kim loại bị hấp phụ bởi một đơn vị khối lượng tế bào ở điểm cân bằng.

Tuy nhiên, ở trường hợp *B. subtilis* có 6x His trên bề mặt tế bào không có sự khác biệt rõ về hệ số  $R^2$  giữa hai mô hình. Tiếp tục khảo sát năng lực hấp phụ ion kim loại nặng của *B.subtilis* có 6x His cho thấy ở mô hình Langmuir năng lực hấp phụ đạt 25,97mmol  $Ni^{2+}$  /1gam sinh khối vi khuẩn, ở mô hình Freundlich đạt 20,06mmol  $Ni^{2+}$  /1 gam sinh khối vi khuẩn, như vậy năng lực hấp phụ trong mô hình Langmuir cao hơn mô hình Freundlich ở *B.subtilis* có gắn 6x His là 1,3 lần. Tương tự, ở sự hấp phụ ion  $Cu^{2+}$  của *B.subtilis* có gắn 6x His,  $R^2$  chênh lệch không cao lắm nhưng năng lực hấp phụ  $Cu^{2+}$  ở mô hình Langmuir cao hơn mô hình Freundlich (23,36 mmol/g so với 21,86mmol/g), so sánh giữa  $R^2$  và năng lực hấp phụ cho thấy ở cả hai loại *B.subtilis* bình thường và *B.subtilis* có gắn 6x His đều phù hợp với mô hình Langmuir.

#### 3.4. Khảo sát đặc điểm gắn trong sự hấp phụ $Cu^{2+}$ và $Ni^{2+}$ bởi *B. subtilis*

Kết quả phân tích hồi quy tuyến tính cho thấy đường hấp phụ của *B. subtilis* đều nằm trong khoảng dự báo và có độ tin cậy trên 95% với  $R^2=0,98$ ,  $P=0,0001$ . Kiểm tra đặc điểm gắn đối với ion  $Cu^{2+}$  ở *B.subtilis* và *B.subtilis* có gắn 6x His có ý nghĩa nhất ở đặc điểm gắn bão hòa một vị trí ( $R^2$  đạt 0,90 và 0,98). Như vậy, ion  $Cu^{2+}$  chỉ gắn lên một vị trí trên bề mặt của *B.subtilis* cho đến khi đạt bão hòa.  $R^2$  của *B.subtilis* có gắn 6xHis cao hơn  $R^2$  của *B.subtilis* (0,90 so với 0,98) do khả năng gắn của *B.subtilis* 6xHis cao hơn, chứng tỏ sự có mặt của protein polyhistidine làm tăng diện tích bề mặt tiếp xúc, trên protein này chứa nhóm

chức tương tự với bề mặt tế bào giúp gia tăng ái lực với ion kim loại.

Tương tự, khảo sát đặc điểm gắn của  $Ni^{2+}$  đối với *B.subtilis* và *B.subtilis* có gắn 6xHis cho thấy  $R^2$  của *B.subtilis* là 0,9550 và của *B.subtilis* 6xHis là 0,9653, P là 0,0008 và 0,0005. Ở các đặc điểm khác các giá trị  $R^2$  cao hơn nhưng giá trị P lại thấp hơn hoặc thậm chí không có nghĩa. Đối với ion  $Ni^{2+}$ , *B.subtilis* và *B.subtilis* có gắn 6xHis gắn tương tự  $Cu^{2+}$ , gắn trên một vị trí cho đến khi đạt bão hòa, ái lực khi có mặt protein polyhistidine trên bề mặt tế bào *B.subtilis* mạnh hơn khi không có biểu hiện protein này (thể hiện khi P cao hơn) do các polysaccharides ngoại bào và protein trên bề mặt tế bào chứa những nhóm chức như carboxylic acid, nhóm amino acid có khả năng "bắt giữ" ion kim loại (Pooja Singh, 2004).

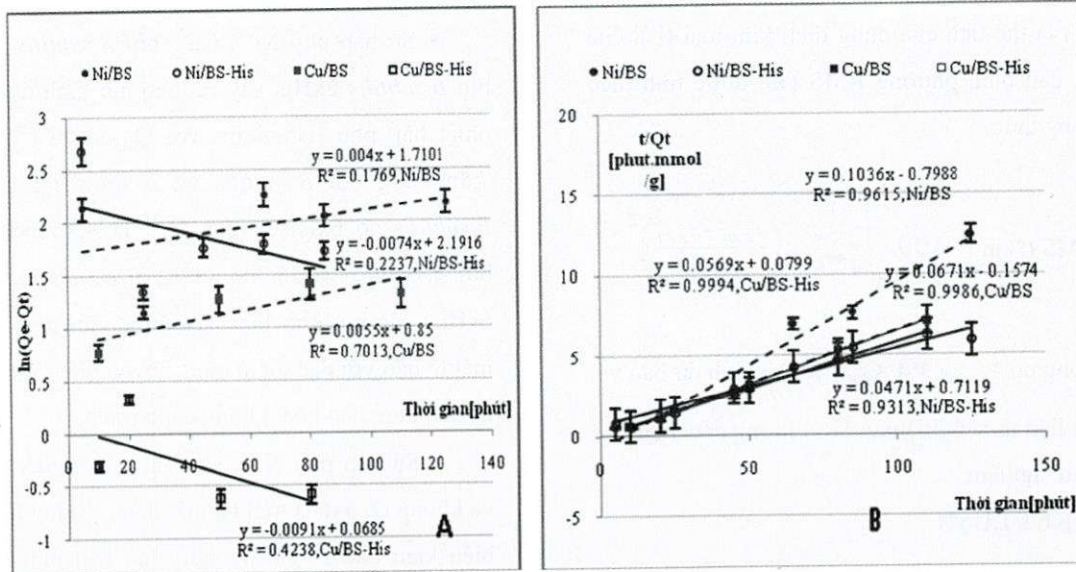
#### 3.5. Động học hấp phụ biểu kiến $Cu^{2+}$ , $Ni^{2+}$ bởi *B.subtilis*

Động học bậc I biểu kiến của sự hấp phụ  $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  bởi tế bào *B.subtilis* được khảo sát với động học biểu kiến bậc I và với động học biểu kiến bậc II. Kết quả trình bày trên hình 3.5 và bảng 3.2.

Kết quả cho thấy *B.subtilis* và *B.subtilis* có 6x His đều tuân theo phương trình động học biểu kiến bậc hai.  $R^2$  của bậc hai ở  $Cu^{2+}$  có biểu hiện protein và không có biểu hiện đều cao hơn bậc một. Tương tự đối với  $Ni^{2+}$ ,  $R^2$  của động học bậc hai của trường hợp BS/His cao hơn so với  $R^2$  của động học bậc một; Trị số RMS cũng củng cố kết luận này. Động học bậc hai của hấp phụ  $Cu^{2+}$  và  $Ni^{2+}$  bởi BS và BS/His, có RMS rất thấp với trị số thấp nhất là 0,094% và cao

nhất cũng chỉ là 19,9% so với trên trị số 40%

của các trường hợp theo động học bậc một.



**Hình 3.5.** Động học biểu kiến hấp phụ  $\text{Cu}^{2+}$  và  $\text{Ni}^{2+}$  bởi *Bacillus subtilis* (A, Động học hấp phụ bậc 1 biểu kiến; B, Động học hấp phụ bậc 2 biểu kiến; BS, *B. subtilis*; BS-His, *B. subtilis* có 6x His trên bề mặt tế bào;  $Q_e$ , lượng ion kim loại bị hấp phụ bởi một đơn vị khối lượng tế bào ở điểm cân bằng,  $Q_t$ , số lượng ion kim loại bị loại bỏ)

**Bảng 3.2.** Tổng hợp so sánh các giá trị thực nghiệm và tính toán của động học biểu kiến hấp phụ  $\text{Cu}^{2+}$  và  $\text{Ni}^{2+}$  bởi *B. subtilis*

Trường hợp hấp phụ	$Q_e$ thực nghiệm [mg.g <sup>-1</sup> ]	Động học bậc 1 biểu kiến				Động học bậc 2 biểu kiến			
		$Q_e$ tính toán	$K_I$ (phút <sup>-1</sup> )	$R^2$	RMS (%)	$Q_e$ tính toán	$K_{II}$ (gmmol <sup>-1</sup> phút <sup>-1</sup> )	$R^2$	RMS (%)
Cu/BS-His	17,534	0,9909	0,0685	0,42	47,174	17,574	156,64	0,999	0,105
Cu/BS	19,116	1,0055	0,85	0,7	47,369	14,903	40,36	0,998	9,856
Ni/BS-His	21,184	0,9926	2,1916	0,22	42,626	21,231	1,566	0,931	0,094
Ni/BS	18,861	1,004	1,7104	0,41	42,240	9,652	1,567	0,961	19,932

(BS, *B. subtilis*; BS-His, *B. subtilis* có 6x His trên bề mặt tế bào;  $Q_e$ , lượng ion kim loại bị hấp phụ bởi một đơn vị khối lượng tế bào ở điểm cân bằng;  $K_I$ , hằng số động học biểu kiến bậc I;  $K_{II}$ , hằng số động học biểu kiến bậc II;  $R^2$ , giá trị R bình phương theo đồ thị; RMS, giá trị căn trung bình bình phương- root mean square)

Thời gian lưu của dung dịch trong bể phản ứng có thể được tính toán dựa trên kết quả từ phương trình bậc hai vừa đạt được. Giá trị  $Q_e$  và  $K_{II}$  đã được trình bày trong bảng 3.2, số lượng ion kim loại bị loại bỏ,  $Q_t$ , có thể được tính như sau:

$$Q_t = \frac{(C_i - C_f)V_D}{m_D} \text{ trong đó } C_i \text{ là nồng độ}$$

kim loại còn lại trong dung dịch theo thiết kế ở tại điểm cuối của quá trình,  $Q_e$  là lượng chất bị hấp phụ trên một đơn vị chất hấp phụ tại thời

điểm cân bằng,  $m_D$  là trọng lượng khô của vật liệu sinh học đã sử dụng trong thí nghiệm (g),  $V_D$  là thể tích của dung dịch kim loại (L). Giá trị căn bình phương RMS (%) được tính theo công thức:

$$RMS (\%)_n = 100 \cdot \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left( \frac{x_{mod} - x_{exp}}{x_{exp}} \right)^2}$$

trong đó  $x_{mod}$  và  $x_{exp}$  là mô hình dự báo và dữ liệu thực nghiệm, n là số lượng các điểm thực nghiệm.

#### 4. KẾT LUẬN

Từ kết quả thực nghiệm đã thu được có thể rút ra các kết luận sau đây:

- Sự hấp phụ ion  $Ni^{2+}$  là cao nhất ở pH 5,5; mức độ hấp phụ  $Ni^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  tăng theo nồng độ ion ban đầu từ 2 – 200ppm; *B.subtilis* có

6xHis luôn có mức độ hấp phụ ion kim loại cao hơn *B.subtilis* từ 1,3 đến 1,7 lần.

- Sự hấp phụ  $Ni^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  bởi *B.subtilis* và bởi *B.subtilis* 6xHis xảy ra theo mô hình đẳng nhiệt hấp phụ Langmuir; với  $Q_L$  của  $Cu^{2+}$  là 7,8mmol/g bởi *B.subtilis* và 23,4mmol/g bởi *B.subtilis* có 6xHis;  $Q_L$  của  $Ni^{2+}$  là 8,8mmol/g bởi *B.subtilis* và 26,0mmol/g bởi *B.subtilis* có 6xHis; các ion kim loại này được gắn trên bề mặt tế bào với đặc điểm gắn chuyên biệt một vị trí đến mức bão hòa, không cạnh tranh.

- Sự hấp phụ  $Ni^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  bởi *B.subtilis* có và không có 6xHis trên bề mặt đều có động học biểu kiến bậc 2; giá trị năng lực hấp phụ tại điểm cân bằng  $Q_e$  thực nghiệm có sự phù hợp rất cao với  $Q_e$  tính toán ở trường hợp *B.subtilis* có 6xHis (RMS 0,1%) ở trường hợp *B.subtilis* có sự sai lệch đáng kể của 2 trị số này (RMS 9,9 – 19,9%).

## THE STUDY ON HEAVY METAL REMOVED BY BACILLUS SUBTILIS WITH POLYHISTIDINE 6X ON CELL SURFACE

Dang Vu Bich Hanh<sup>(1)</sup>, Tran Linh Thuoc<sup>(2)</sup>, Dang Vu Xuan Huyen<sup>(3)</sup>

(1) University of Technology, VNU-HCM

(2) University of Sciences, VNU-HCM

(3) Institute for Environment & Natural Resources, VNU-HCM

**ABSTRACT:** A recombinant *Bacillus subtilis* clone displaying hexahistidine oligopeptide (6x-His) was generated to enhance the adsorption of  $Ni^{2+}$  and  $Cu^{2+}$  ions for environmental treatment application with initial concentrations of 2ppm to 200ppm. The equilibrium amount of metal ions adsorbed onto the bacteria increased with increasing of pH from 4.0 to 6.0. The engineered clone was shown to have a  $Ni^{2+}$  and  $Cu^{2+}$  relative adsorption of 1.33 and 1.8 as compared to the control strain, as expected. Among the models tested, namely the Langmuir, Freundlich isotherms, the biosorption



equilibrium for both  $Ni^{2+}$  and  $Cu^{2+}$  was best described by the Langmuir model. For the ligand binding with heavy metal ions, namely the one and two site saturation, one and two site saturation with nonspecific, one and two site competition on cell for both engineered and control strain was best revealed by one site saturation.

**Keywords:** *Bacillus subtilis*, heavy metal ions, ligand binding.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Bhavanath J., Shaik B., Santlal J., Biswajit M., Mukund C. Thakur. *Biosorption of Cd(II) and Pb(II) onto brown seaweed, Lobophora variegata (Lamouroux): kinetic and equilibrium studies. Biodegradation 20:1-13, (2009).*
- [2]. El-Helow, E.R., Sabry, S.A. & Amer, R.M. *Cadmium biosorption by a cadmium resistant strain of Bacillus thuringiensis: regulation and optimization of cell surface affinity for metal cations. BioMetals 13, 273-280. (2000).*
- [3]. Johncy Rani, M., Hemambika B., Hemapriya J., and Rajeshkannan V. *Comparative Assessment of Heavy Metal Removal by Immobilized and Dead Bacterial Cells: A Biosorption Approach. Global Journal of Environmental Research 4 (1): 23-30, ISSN 1990-925X, (2010).*
- [4]. Ince Yilmaz E., and Ensari N.Y. *Cadmium biosorption by Bacillus circulans strain EB1. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 21:777-779, (2005).*
- [5]. Leila Chebil Ajjabi, Lassaad Chouba. *Biosorption of  $Cu^{2+}$  and  $Zn^{2+}$  from aqueous solutions by dried marine green macroalga Chaetomorpha linum, Journal of Environmental Management 90, 3485-3489. (2009).*
- [6]. Kotrba M., Doleckova L., Lorenzo V., Ruml T. *Enhanced bioaccumulation of heavy metal ions by bacterial cells due to surface display of short metal binding peptides. Appl. Environ. Microbiol. 65, 1092-1098. (1999a).*
- [7]. Kuroda K., Shibasaki S., Ueda M., Tanaka A. *Cell surface-engineered yeast displaying a histidine oligopeptide (hexa-His) has enhanced adsorption of and tolerance to heavy metal ions. Appl. Microbiol. Biotechnol. 57, 697-701. (2001).*
- [8]. Gavrilescu, M. *Removal of heavy metals from the environment by biosorption, Eng. Life Sci. 4, 219-232; (2004).*
- [9]. Gupta, V.K., Rastogi, A. *Biosorption of lead from aqueous solutions by green algae Spirogyra species: equilibrium and adsorption kinetics. J. Hazard. Mater. 153 (1), 407-414. (2008).*
- [10]. Prado Acosta M., Valdman E., Leite S.G.F., Battaglini F. and Ruzal S.M. *Biosorption of copper by Paenibacillus polymyxa cells and their exopolysaccharide. World Journal of Microbiology & Biotechnology 21: 1157-1163, (2005).*

- [11]. Pooja Singh and Swaranjit Singh Cameotra. *Enhancement of metal bioremediation by use of microbial surfactants. Biochemical and Biophysical Research Communications* 319, 291–297, (2004).
- [12]. Sousa C., Cebolla A., Lorenzo V. *Enhanced metal sorption of bacterial cells displaying poly-His peptides. Nat. Biotechnol.* 14, 1017-1020. (1996).
- [13]. Sousa C., Kotrba P., Ruml T., Cebolla A., Lorenzo V. *Metal sorption by Escherichia coli cells displaying yeast and mammalian metallothioneins anchored to the outer membrane protein Lam B. J. Bacteriol.* 180, 2280-2284. (1998).
- [14]. Stahl S., Uhlen M. *Bacterial surface display: trends and progress. Trends Biotechnol.* 15, 185-192. (1997).
- [15]. Wernerus H., Lehtio J., Teeri T., Nygren P-A, Stahl S. *Generation of metal-binding staphylococci through surface display of combinatorially engineered cellulose-binding domains. Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4678-4684. (2001).
- [16]. Yan G., Viraraghavan T. *Heavy-metal removal from aqueous solutions by fungus Mucor rouxii, Water Res.,* 37, 4486–4496. (2003).
- [17]. Waihung L., Lau M, Hong Chua N., Peter H. F. Yu, Shirley N. Sin and Po-Keung Wong. (2003). *Biosorption and desorption of copper (II) ions by Bacillus sp. Applied Biochemistry and Biotechnology.* Volume 107, Numbers 1-3, 581-591.