TẠP CHÍ
KHÍ TƯỢNG THỦY VĂN

Check for updates

Bài báo khoa học

Ảnh hưởng của một số yếu tố lên sinh trưởng của Bacillus thuringiensis trong môi trường sử dụng bùn hoạt tính của nhà máy bia

Tạ Thu Hằng[1], Đặng Thị Mai Anh[2]*, Nguyễn Minh Thư[2], Tăng Thị Chính[2], Phùng Thị Thu Trang[1], Ngô Kim Anh[1], Đỗ Thị Thanh Bình[1], Vũ Văn Đàm[1]

[1] Viện Khoa học Khí tượng Thủy văn và Biến đổi Khí hậu; tathuhang311@gmail.com; phungtrang80@gmail.com; kimanhhn2422gmail.com; tbinh2009@gmail.com; vuvandam@gmail.com

[2] Viện Công nghệ môi trường, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam; maianh058@gmail.com; minhthuiet@gmail.com; tangthichinh@gmail.com

*Tác giả liên hệ: maianh058@gmail.com; Tel.: +84–983829899

Ban Biên tập nhận bài: 2/3/2023; Ngày phản biện xong: 13/4/2023; Ngày đăng bài: 25/4/2023

Tóm tắt: Trong nghiên cứu này đề cập đến ảnh hưởng của một số yếu tố (pH, nồng độ chất rắn, độ thoáng khí và lên men) lên sinh trưởng của *B. thuringiensis* (Bt) trong môi trường nuôi cấy sử dụng bùn hoạt tính của nhà máy bia. Vi khuẩn *B. thuringiensis* có khả sinh trưởng trong môi trường có độ pH từ pH 6–8 và hình thành delta–endotoxin cao nhất (617,67 mg/l) ở pH 7. Nồng độ chất rắn cho *delta–endotoxin* cao nhất là 20–25 g/l. Ở tỷ lệ môi trường nuôi cấy trong bình nón 2:10 (v/v) chủng *B.thuringiensis* sinh trưởng tốt nhất, mật độ tế bào đạt cực đại $2,9\times10^8$ CFU/ml và nồng độ delta–endotoxin đạt 619,06 mg/l. Quá trình cấp khí liên tục là cần thiết đối với B. thuringensis trong quá trình nuôi, ngưng cấp khí dù ở giai đoạn nào cũng ảnh hưởng đến *delta–endotoxin* của Bt. Khi nuôi cấy trong hệ lên men với điều kiện pH = 7, oxy hòa tan 4 mg/l, Bt cho độc tính cao hơn khi nuôi bình tam giác, delta–endotoxin đạt 725,05 mg/l sau 48h. Kết quả nghiên cứu cho thấy, *B.thuringiensis* có khả năng sinh trưởng tốt trên bùn hoạt tính từ nước thải bia và có triển vọng ứng dụng trong thực tế.

Từ khóa: B. thuringiensis; Bùn; pH; Nồng độ chất rắn và tỷ lệ môi trường.

1. Mở đầu

Ngày nay, bên cạnh sự phát triển của công nghiệp phục vụ cho đời sống, con người cũng tạo ra một lượng chất thải lớn. Một trong những chất thải đó là bùn thải. Bùn thải từ các nhà máy, kênh mương chứa nước thải sinh hoạt, bệnh viện…. Bùn hầu hết chỉ được loại bỏ bằng phương pháp chôn lấp và một phần được tận dụng làm phân bón. Tuy nhiên, khả năng tận dụng không nhiều và hiệu quả chưa cao. [1] đã sử dụng axit xitric ở pH 3–4 để loại bỏ kim loại trong bùn thải, hiệu quả loại bỏ Cu 60–70% và Zn 90–100%, còn các loại kim loại khác thì chưa thấy đề cập. [2] cũng đề cập đến việc thu hồi phèn trong bùn bằng axit sunfuric. [3] cũng đưa ra các công nghệ xử lý bùn thải như biến bùn thành phân bón, thành nhiên liệu. [4] đã cho thấy nguy cơ tích lũy kim loại nặng trong cải bắp rất cao bởi việc sử dụng phân bón từ bùn thải (As, Cd, Cr, Zn vượt quá giới hạn cho phép rất nhiều. [5] đã đưa ra những rủi ro và kẽ hở trong quản lý bùn đối với sức khỏe con người và môi trường. Vì vậy, việc nghiên cứu sử dụng bùn thải làm nguyên liệu nuôi cấy vi sinh vật phục

vụ cho nông nghiệp và đời sống sẽ góp phần giảm thiểu bùn thải và giảm một số nguy cơ tích lũy kim loại nặng trong cây trồng. Bởi các loại bùn được lựa chọn nuôi cấy vi sinh vật thường là các loại có hàm lượng dinh dưỡng cao, kim loại nặng ở ngưỡng cho phép. Canada là một trong những nước đã nghiên cứu thành công sử dụng bùn thải sinh học để sản xuất các chế phẩm sinh học. [6–8] đã thu nhận được thuốc trừ sâu sinh học khi nuôi cấy Bt trên nước thải và bùn thải có hàm lượng tinh bột cao. [9–10] đã sử dụng bùn thải sinh hoạt, bùn thải công nghiệp nuôi vi sinh tạo phân bón vi sinh cố định đạm, với mật độ đạt 109 CFU/ml. Ngày nay nông nghiệp đang hướng tới nông nghiệp sạch nên việc tìm kiếm các nguồn thuốc trừ sâu sinh học cũng đã được nghiên cứu từ rất sớm, [11–12] đã đề cập đến việc hình thành độc tính của *Bacillus thuringiensis*. Một số nghiên cứu về nuôi cấy *Bacillus thuringiensis* trên bùn thải nước thải ở Canada cũng thu được kết quả khả quan. Kết quả các nghiên cứu [13–17] cho thấy có thể thu nhận thuốc trừ sâu sinh học từ việc nuôi cấy Bt trên nước thải, bùn thải công nghiệp sản xuất tinh bột, hàm lượng *delta–endotoxin* có thể đạt trên 600 mg/l. Nghiên cứu [18] cho thấy khi tạo thuốc trừ sâu sinh học sử dụng bùn thải làm nguyên liệu trong hệ lên men 150 lít có thể tăng lượng bào tử 38–55%, độc tố tăng 30%. [19] cho thấy các chủng Bacillus thuringiensis được phân lập lại từ bùn thải lại cho hoạt tính trừ sâu cao hơn hẳn so với chủng tiêu chuẩn. Ở Việt Nam, các năm qua cũng đã có một số công trình nghiên cứu nuôi cấy Bacillus thuringiensis trên bùn thải sinh học (độc tính *delta–endotoxin* cũng đạt trên 600 mg/l) [20–21]. Tuy nhiên, các nghiên cứu mới dùng ở các quy mô nhỏ trong phòng thí nghiệm, để có thêm dữ liệu và cơ hội mở rộng ứng dụng thuốc trừ sâu sinh học cần có các nghiên cứ thêm về nuôi cấy Bt trên bùn thải. Vì vậy, nghiên cứu này đề cập tới ảnh hưởng của một số yếu lên sinh trưởng của *Bacillus thuringiensis* trong môi trưởng sử dụng bùn hoạt tính của nhà máy bia định hướng cho sản xuất thuốc trừ sâu sinh học.

2. Nguyên liệu và phương pháp

2.1. Quy trình nghiên cứu

Bước 1. Thủy phân bùn hoạt tính lấy từ nhà máy bia tạo nguyên liệu cơ sở cho nuôi cấy Bacillus thuringiensis.

Bước 2. Điều chỉnh các thông số theo các yêu cầu thí nghiệm.

Bước 3. Xác định các chỉ tiêu trong các thí nghiệm.

Bước 4. Tổng hợp số liệu, đánh giá số liệu, đưa ra các chỉ số thích hợp cho nuôi cấy Bacillus thuringiensis.

2.2. Nguyên liệu

Bảng 1. Đặc tính của bùn thải của Nhà máy bia Hà Nội.

Chỉ tiêu	**Đơn vị tính**	**Số lượng**	**Chỉ tiêu**	**Đơn vị tính**	**Số lượng**
Bùn thải	**m^3/ngày**	**10**	**Mg**	**mg/kg**	**4238 ± 7,9**
TOC	g/kg	213,5 ± 11,2	K	mg/kg	2736 ± 9,7
VSS	%	52,7 ± 0,5	Na	mg/kg	8320,4 ± 11,2
TNK	g/kg	22,2 ± 1,2	As	mg/kg	9,7 ± 0,4
TN	g/kg	24,1 ± 1,8	Hg	mg/kg	1,2 ± 0,05
TP	g/kg	18 ± 0,9	Pb	mg/kg	17,2 ± 0,3
Ca	mg/kg	9541 ± 8,9			

Chủng vi khuẩn Bacillus thuringiensis var. kurstaki HD–1, nguồn gốc Canada.

Môi trường nuôi cấy và hoạt hóa *B. thuringiensis*: TSB (*Tryptone Soya Broth*), TSA (*Tryptone Soya Agar*).

2.3. Phương pháp xác định mật độ tế bào và bào tử

Để xác định số lượng tế bào, mẫu được pha loãng bằng muối sinh lý (0,85% w/v) đã khử trùng. Mẫu pha loãng (0,1 ml) được cấy trên đĩa thạch chứa môi trường TSA và được ủ ở 30^{o}C trong 24h để cho khuẩn lạc phát triển hoàn thiện.

Để xác định bào tử, mẫu pha loãng được làm nóng trong bể dầu 80^{o}C 10 phút sau đó để lạnh trong nước đá 5 phút. Số lượng tế bào và bào tử được xác định thông qua đếm khuẩn lạc sinh trưởng trên môi trường thạch TSA. Công thức xác định:

$$X = a \times b \times 10 \text{ (CFU/ml)} \quad (1)$$

Trong đó a là số lượng khuẩn lạc xuất hiện trên đĩa petri; b là nghịch đảo của nồng độ pha loãng.

2.4. Phương pháp xác định nồng độ độc tố delta–endotoxin trong dịch nuôi cấy

Delta–endotoxin được xác định trên cơ sở hòa tan tinh thể protein độc trong môi trường kiềm: 1ml mẫu dịch nuôi cấy được ly tâm 10000 g trong 10 phút ở 4^{o}C. Phần cặn bao gồm bào tử, tinh thể protein độc, mảnh vụn tế bào và phần rắn lơ lửng còn lại được sử dụng để xác định nồng độ tinh thể protein độc hòa tan (*delta–endotoxin*). Phần cặn được rửa 3 lần mỗi lần bằng 1 ml 0.14M NaCl–0,01% Triton X – 100. Việc rửa này giúp loại bỏ các protein và các *proteaza* còn bám vào phần cặn. Phần cặn đã rửa chứa tinh thể protein được thủy phân trong dung dịch NaOH 0,05N (pH 12,5) trong 3h ở 30^{o}C trong điều kiện có khuấy. Dịch huyền phù sau đó được ly tâm ở 10000 g trong 10 phút ở 4^{o}C, phần cặn sau khi ly tâm sẽ được loại bỏ còn phần dịch nổi sẽ được dùng để xác định hàm lượng delta–endotoxin theo phương pháp Bradford sử dụng BSA làm chất chuẩn [22].

2.5. Các phương pháp nghiên cứu:

2.5.1. Nghiên cứu ảnh hưởng của pH

Bùn thải được tiền xử lý bằng phương pháp thủy phân, sau đó được điều chỉnh về các pH khác nhau trước khi khử trùng ở 121^{o}C trong 15 phút. Các mẫu bao gồm: TSB (*Tryptone Soya Broth*), pH5 (bùn được điều chỉnh về pH = 5), pH6 (bùn được điều chỉnh về pH = 6), pH7 (bùn được điều chỉnh về pH = 7) và pH8 (bùn được điều chỉnh về pH = 8). Các môi trường sử dụng bùn làm nguyên liệu có hàm lượng rắn là 20 g/l, thể tích dịch nuôi cấy 2:10 (v/v).

Từ giống gốc *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki HD–1 hoạt hóa trên môi trường dịch thể TSB ở 30^{o}C, 200 vòng/phút trong 12h cấy vào các phương án thí nghiệm trên với tỷ lệ 1% về thể tích. Sau đó nuôi cấy ở 30^{o}C, 200 vòng/phút. Tiến hành lấy mẫu ở 0h, 12, 24. 36, 48, 60,72 h để xác định mật độ tế bào, bào tử và nồng độ *delta–endotoxin*.

2.5.2. Phương pháp nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ chất rắn

Bùn lấy từ nhà máy bia tại công đoạn lắng được ly tâm để tách chất rắn sau đó tái huyền phù bằng dịch nổi ly tâm với các nồng độ rắn khác nhau để tiến hành thí nghiệm. Thí nghiệm được chia làm 6 phương án: TN1 (môi trường TSB), TN2 (môi trường bùn thải bia chứa 1,5% chất rắn), TN3 (môi trường bùn thải bia chứa 2,0% chất rắn), TN4 (môi trường bùn thải bia chứa 2,5% chất rắn) và TN5 (môi trường bùn thải bia chứa 3,0% chất rắn). Tất cả các môi trường pH ban đầu đều được điều chỉnh bằng 7.

Cấy giống với tỷ lệ 1% (v/v) vào các mẫu trên và nuôi cấy lắc ở 200 vòng/phút, 30^{o}C. Lấy mẫu ở các thời điểm 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72h để xác định số lượng tế bào, sự hình thành bào tử và *delta–endotoxin*.

2.5.3. Ảnh hưởng của độ thoáng khí

Để nghiên cứu ảnh hưởng của độ thoáng khí tiến hành thí nghiệm như sau: Chuẩn bị môi trường bùn bia có nồng độ chất rắn 2,0% và pH môi trường bằng 7. Dịch môi trường

được phân vào các bình với tỷ lệ (v/v) khác nhau theo các phương án thí nghiệm sau: TN1 (tỷ lệ dịch 2:10), TN2 (tỷ lệ dịch 3:10), TN3 (tỷ lệ dịch 4:10) và TN4 (tỷ lệ dịch 5:10).

Các phương án thí nghiệm sau khi cấy giống được nuôi cấy ở 200 vòng/phút, 30^{o}C. Mẫu thí nghiệm được lấy ở 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72h để xác định mật độ tế bào, bào tử và nồng độ *delta–endotoxin*.

2.5.4. Nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy liên tục và gián đoạn

Đối với nhóm vi sinh vật có khả năng hình thành bào tử thì điều kiện nuôi cấy có ảnh hưởng rất nhiều tới việc hình thành bào tử. Vì vậy, nghiên cứu ảnh hưởng của việc nuôi cấy gián đoạn tới quá trình sinh trưởng, hình thành bào tử và độc tính *delta–endotoxin* của Bt là cần thiết. Thí nghiệm được bố trí như sau:

Bùn bia có nồng độ chất rắn 2,0% được xử lý bằng phương pháp thủy phân rồi điều chỉnh về pH = 7, khử trùng và được cấy giống với tỷ lệ 1% (v/v) rồi được nuôi cấy ở 200 vòng/phút ở 30^{o}C, các thí nghiệm được bố trí như sau:

TN5: nuôi cấy lắc liên tục

TN6: nuôi cấy lắc liên tục 0–2h, để tĩnh ở nhiệt độ phòng 12–24h, sau đó tiếp tục nuôi cấy lắc tới 72h.

TN7: nuôi lắc liên tục từ 0–24h, để tĩnh ở nhiệt độ phòng 24–36h, sau đó tiếp tục nuôi cấy lắc tới 72h.

TN8: nuôi lắc liên tục từ 0–36h, để tĩnh ở nhiệt độ phòng 36–48h, sau đó tiếp tục nuôi cấy lắc tới 72h.

Tất cả các thí nghiệm đều lấy mẫu ở 0, 12, 24, 36, 48, 60 và 72h để xác định số lượng tế bào, sự hình thành bào tử và *delta–endotoxin*.

2.5.5. So sánh kết quả nuôi cấy *B. thuringiensis* trong bình nón và bình lên men

Tiến hành so sánh về mật độ tế bào, sự hình thành bào tử và *delta–endotoxin* nuôi cấy trong bình nón 500 ml, thể tích dịch 100 ml với bình lên men 15 lít thể tích làm việc 10 lít.

- Thí nghiệm bình tam giác được bố trí như sau: bùn được xử lý bằng phương pháp thủy phân, nồng độ chất rắn của bùn 2,0%, pH = 7, tỷ lệ dịch nuôi cấy 1:5, tỷ lệ giống 1% (v/v), nuôi ở 30^{o}C 200 vòng/phút.

- Thí nghiệm nuôi cấy trong bình lên men 15 lít thể tích làm việc 10 lít được thực hiện với các thông số như sau: môi trường nuôi cấy là bùn thải chứa 2,0% chất rắn được xử lý bằng phương pháp thủy phân và được khử trùng, tỷ lệ giống 1% (v/v), lượng oxy hòa tan luôn duy trì 4 mg/l, pH luôn được duy trì 7±1 bằng NaOH 4N và H_2SO_4 4N thông qua hệ thống bơm tự động, chất kiểm soát bọt sử dụng là *polypropylene glycol* (PPG, sigma), nhiệt độ trong suốt quá trình lên men 30±1^{o}C.

Mẫu được lấy tại các thời điểm 0, 12, 24, 36, 48h để xác định mật độ tế bào, bào tử và *delta–endotoxin*.

3. Kết quả và thảo luận

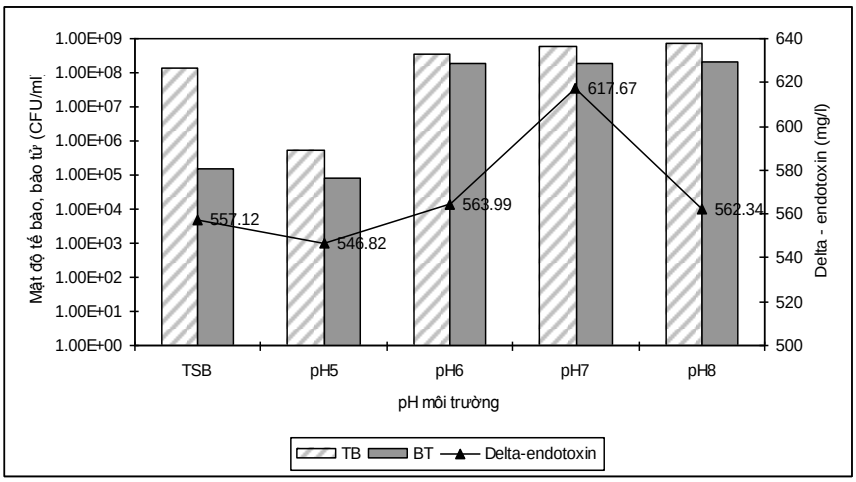
3.1. Ảnh hưởng của pH

pH là một trong các nhân tố có ảnh hưởng rất nhiều đến quá trình sinh trưởng và hình thành các sản phẩm của vi sinh vật. Sau đây là kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của pH khác nhau lên khả năng sinh trưởng, hình thành bào tử và độc tố *delta–endotoxin* của *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki HD–1 (Hình 1). Hình 1 chỉ ra rằng, đối với môi trường có pH từ 6–8 Bt sinh trưởng tốt, mật độ cực đại đạt 108.

CFU/ml và tương đương với môi trường TSB. Còn đối với môi trường có pH = 5 mật độ tế bào tăng trưởng chậm và gần như không thay đổi so với thời điểm 0h. Mật độ cực đại chỉ đạt khoảng 105 CFU/ml cao hơn so với thời điểm 0h khoảng 10 lần. Tương tự đối với mật độ bào tử ở các môi trường có pH 6–8 cũng tăng theo thời gian và cực ađại đạt khoảng

108 CFU/ml, còn ở pH = 5 mật độ bào tử chỉ đạt 104 CFU/ml gần như không có sự khác biệt so với thời điểm ban đầu. *Delta–endotoxin* ở các pH khác nhau cũng cho giá trị khác nhau. Ở pH 6–8 nồng độ delta – endotoxin nhận được sau 48h cao và tương đương với nồng độ trên môi trường TSB, pH = 7 cho nồng độ *delta–endotoxin* cao nhất đạt 617,67 mg/l. Đối với pH = 5 không chỉ ức chế khả năng sinh trưởng và hình thành bào tử mà còn ức chế cả quá trình hình thành *delta–endotoxin*, nồng độ cực đại chỉ đạt 546,82 mg/l. Từ kết qủa cho thấy, ở pH 6–8 chủng Bt có khả năng sinh trưởng và hình thành độc tố tốt, trong đó pH 7 cho khả năng hình thành độc tố tốt nhất.

Với kết quả hàm lượng *delta–endotoxin* thu được đạt mức cao nhất ở pH = 7 trong khuôn khổ thí nghiệm này là tương đồng với nghiên cứu trước [16, 18].



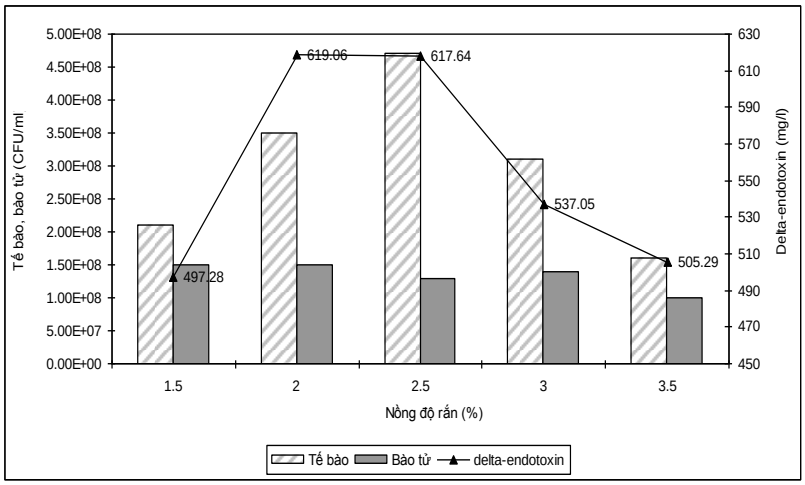
Hình 1. Ảnh hưởng của pH lên khả năng sinh trưởng, hình thành bào tử và delta–endotoxin của Bacillus thuringiensis var. kurstaki HD–1.

3.2. Ảnh hưởng của nồng độ bùn

Bên cạnh pH môi trường nuôi cấy thì chất dinh dưỡng hay nồng độ chất rắn cũng ảnh hưởng nhiều đến quá trình sinh trưởng, hình thành bào tử và độc tố của chủng *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki HD–1. Sau đây là các kết quả đề cập tới ảnh hưởng của nồng độ chất rắn của bùn lên khả năng sinh trưởng, hình thành bào tử và độc tố của chủng vi khuẩn Bacillus thuringiensis var. kurstaki HD–1.

Ảnh hưởng của sự biến đổi nồng độ chất rắn (1,5; 2,0; 2,5; 3,0 và 3,5%) của bùn tới mật độ tế bào, bào tử và *delta–endotoxin* được chỉ ra ở hình 2. Kết quả chỉ ra rằng với nồng độ chất rắn 1,5–3,5% mật độ tế bào không có sự khác biệt nhiều, mật độ đều đạt khoảng 108CFU/ml. Tuy nhiên, mật độ tế bào có xu hướng tăng dần ở nồng độ rắn 1,5–2,5% và có xu hướng giảm ở nồng độ chất rắn cao hơn. Mật độ bào tử ở các nồng độ chất rắn khác nhau không có sự biến động nhiều. Nồng độ *delta–endotoxin* có xu hướng tăng ở nồng độ chất rắn 1,5–2,5% và cao nhất đạt 619,06 mg/l, còn ở nồng độ chất rắn > 2,5% lại có xu hướng giảm. Tuy nhiên khi so sánh ở các nồng độ rắn khác nhau cho thấy ở nồng độ chất rắn 1,5% cho nồng độ *delta–endotoxin* thấp nhất chỉ đạt 497,28 mg/l; ở nồng độ chất rắn 2,0–2,5% cho nồng độ *delta–endotoxin* cao nhất khoảng > 600 mg/l, còn ở nồng độ chất rắn lớn hơn 2,5% nồng độ *delta–endotoxin* 505,29–537,05 mg/l.

Điều này cho thấy, khi nồng độ chất rắn tăng (> 2,5%) mặc dù có kích thích sinh trưởng và hình thành bào tử, nhưng nồng độ chất rắn cao cũng làm tăng độ nhớt và sự hỗn tạp dẫn đến hạn chế trao đổi oxy tác động đến quá trình hình thành *delta–endotoxin*. Ở nồng độ chất rắn 1,5% chủng vi khuẩn Bt vẫn sinh trưởng và hình thành bào tử tốt nhưng lượng *delta–endotoxin* lại thấp. Kết quả này có thể lý giải như sau khi nồng độ chất dinh dưỡng thấp thì chỉ đủ cung.



Hình 2. Ảnh hưởng của nồng độ chất rắn lên khả năng sinh trưởng, hình thành bào tử và delta – endotoxin.

3.3. Ảnh hưởng của độ thoáng khí

Độ thoáng khí hay lượng oxy hòa tan, là một nhân tố có ảnh hưởng rất nhiều đến quá trình sinh trưởng của vi sinh vật nói chung và *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki HD–1 nói riêng. Hơn nữa *B. thuringiensis* là chủng vi khuẩn hiếu khí nên lượng oxy cung cấp trong quá trình sinh trưởng, phát triển ảnh hưởng rất nhiều đến mật độ và khả năng hình thành các sản phẩm của chúng. Thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của tỷ lệ thể tích môi trường nuôi cấy lên khả năng sinh trưởng, tạo bào tử và độc tính của *B. thuringiensis* được trình bày ở hình 3.

Kết quả cho thấy, tỷ lệ dịch nuôi cấy tăng thì khả năng sinh trưởng và hình thành *delta–endotoxin* của *B. thuringiensis* giảm. Ở TN1 tỷ lệ dịch nuôi cấy 2:10 (v/v) nồng độ *delta–endotoxin* đạt 619,06 mg/l, TN2 tỷ lệ dịch 3:10 (v/v) nồng độ đạt 519,06 mg/l, TN3 tỷ lệ dịch 4:10 (v/v) nồng độ đạt 476,92 mg/l, còn TN4 tỷ lệ dịch nuôi cấy 5:10 (v/v) nồng độ chỉ đạt 454,91 mg/l. Kết quả trên có thể đưa ra nhận xét như sau, độ thoáng khí có ảnh hưởng rất nhiều tới quá trình sinh trưởng, phát triển, hình thành bào tử và độc tính *delta–endotoxin* của *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki HD–1. Thể tích dịch nuôi cấy trên thể tích bình chứa tăng dẫn đến giảm nồng độ oxy hòa tan ức chế quá trình sinh trưởng, phát triển của *B. thuringiensis* dẫn đến giảm mật độ bào tử và giảm sự hình thành độc tính *delta–endotoxin*. Vì vậy, trong quá trình nuôi cấy *B. thuringiensis* lượng oxy hòa tan đóng vai trò quan trọng đối với sinh trưởng hình thành bào tử và độc tính. Kết quả thí nghiệm này cho thấy tỷ lệ dịch nuôi cấy 2:10 là thích hợp cho quá trình sinh trưởng, phát triển và hình thành độc tính *delta–endotoxin*.

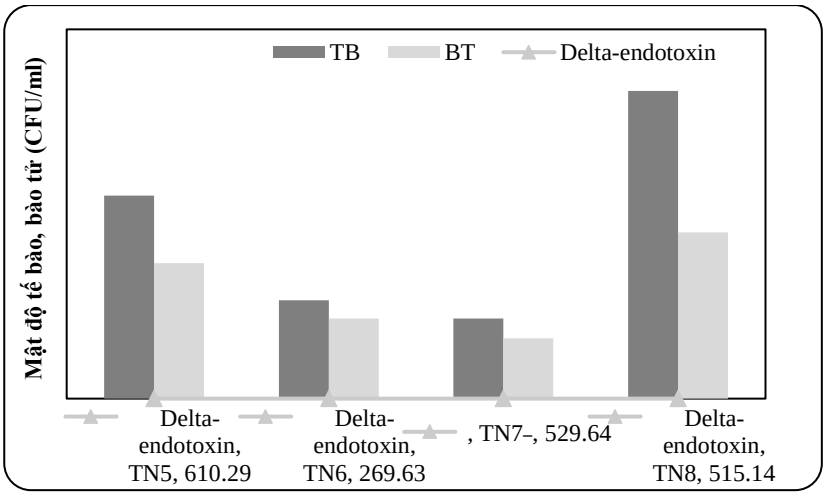
3.4. Ảnh hưởng điều kiện nuôi cấy liên tục và gián đoạn

Bên cạnh, sự ảnh hưởng của tỷ lệ thể tích môi trường nuôi cấy thì điều kiện cấp khí liên tục và giám đoạn cũng ảnh hưởng tới quá trình sinh trưởng và hình thành độc tính của *B. thuringiensis*. Hơn nữa, chủng vi khuẩn này lại có khả năng hình thành bào tử và các sản phẩm trong quá trình hình thành bào tử thì việc dừng dừng cấp khí tại các giai đoạn sinh trưởng của chúng có thể kích thích sự hình thành bào tử. Do đó tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng điều kiện nuôi cấy liên tục và giám đoạn đến khả năng sinh trưởng, hình thành bào tử và độc tố *delta–endotoxin* của chủng vi khuẩn *B.thuringiensis* là có cơ sở. Kết quả thu được như sau:

Ở TN5 chủng vi khuẩn *B.thuringiensis* nuôi cấy trên bùn thải bia trong điều kiện nuôi cấy lắc liên tục thì mật độ tế bào và bào tử cực đại vẫn đạt khoảng 108CFU/ml sau 24h và nồng độ *delta–endotoxin* cực đại 610,29 mg/l sau 48h. TN6 chủng vi khuẩn *B. thuringiensis*

nuôi cấy trên bùn thải bia trong điều kiện dừng lắc trong giai đoạn 12–24h, đây là giai đoạn sinh trưởng mạnh của chủng vi khuẩn *B. thuringiensis*. Kết quả thu được cho thấy, trong giai đoạn 12–24h khi dừng lắc mật độ bào tử gần như không thay đổi, còn mật độ tế bào chỉ tăng khoảng 10 lần. Mật độ tế bào tăng trong giai đoạn này có thể là các tế bào đã đang trong giai đoạn phân chia dù ngừng cấp oxy nhưng lương oxy hòa tan trong dịch vẫn có thể đủ cho chúng sử dụng cho quá trình phân chia. Sau đó mật độ tế bào và bào tử tiếp tục tăng và đạt đến khoảng 108CFU/ml sau 48h, trễ hơn so với thời điểm đạt cực đại của thí nghiệm nuôi cấy liên tục. Còn đối với độc tính của phương án thí nghiệm này thu được là rất thấp, nồng độ cao nhất chỉ đạt 269,63 mg/l (60h). Điều này cho thấy nếu ngưng cung cấp oxy vào giai đoạn sinh trưởng của *B. thuringiensis* không những ảnh hưởng tới mật độ tế bào, bào tử mà còn làm giảm mạnh khả năng hình thành độc tính của chủng *B. thuringiensis*. TN7 dừng nuôi cấy lắc 24–36h, đây là giai đoạn mà mật độ tế bào của chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* đã đi vào giai đoạn ổn định nhưng nó vẫn có ảnh hưởng tới mật độ tế bào, bào tử và nồng độ delta–endotoxin. Mật độ tế bào của TN7 đã đạt 108CFU/ml sau 24h, nhưng sau đó ngừng nuôi cấy lắc mật độ tế bào đã giảm xuống còn khoảng 107CFU/ml và mật độ này duy trì cho tới 72h. Điều này có thể giải thích như sau: Hạn chế cung cấp oxy ở giai đoạn 24–36h và đây cũng là giai đoạn nguồn dinh dưỡng của môi trường cũng đã giảm. Đo đó, dù sau giai đoạn đó lại cung cấp oxy trở lại nhưng môi trường đã cạn nguồn dinh dưỡng nên không còn đủ khả năng kích thích sự sinh trưởng và phát triển của tế bào nên số lượng của chúng chỉ duy trì ở 107CFU/ml, thậm trí số lượng tế bào còn có thể giảm nếu nguồn dinh dưỡng của môi trường còn quá ít. Tương tự như mật độ tế bào, mật độ bào tử của TN7 cũng giảm từ 107CFU/ml xuống 106CFU/ml trong khoảng thời gian 24–36h. Sau đó, lại tăng và đạt 107CFU/ml sau 48h và duy trì cho đến khi kết thúc thí nghiệm. Sự tăng mật độ bào tử sau 48h, có thể do sau khi thí nghiệm được nuôi cấy lắc lại các tế bào vi khuẩn trong dịch nuôi cấy đã sinh trưởng hoàn thiện và chuyển sang giai đoạn hình thành bào tử vì vậy số lượng bào tử lại tăng. Đối với nồng độ *delta–endotoxin* cũng có xu hướng tăng dần từ 0–48h. Khác với số lượng tế bào và bào tử, delta–endotoxin vẫn tăng trong giai đoạn 24–36h (giai đoạn hạn chế cung cấp oxy) và đạt cực đại tại 48h (529,65 mg/l) và sau đó giảm dần. Khi so sánh với kết quả TN5 cho thấy nồng độ *delta–endotoxin* của TN7 thấp hơn khoảng 80 mg/l mặc dù thời gian đạt cực đại là như nhau. Qua đó cho thấy, nếu hạn chế cung cấp oxy trong giai đoạn 24–36h, không những ảnh hưởng tới mật độ tế bào, bào tử mà còn ảnh hưởng tới nồng độ *delta–endotoxin*. Đối với TN8 dừng nuôi cấy lắc trong giai đoạn 36–48h kết quả cho thấy, mặc dù trước 36h mật độ tế bào và bào tử đã đạt khoảng 108CFU/ml, nhưng do việc dừng lắc hạn chế cung cấp oxy mà cả mật độ tế bào và bào tử đều giảm. Vì trong giai đoạn này, lượng dinh dưỡng trong môi trường giảm nếu hạn chế cấp oxy thì sẽ ức chế sự phát triển của tế bào và bào tử. Mật độ tế bào giảm còn khoảng 107CFU/ml, mật độ bào tử giảm còn khoảng 106CFU/ml. Đối với nồng độ *delta–endotoxin* có xu hướng tăng dần từ 0–60h và đạt cực đại tại 60h với nồng độ 515,14 mg/l sau đó giảm. Cũng tương tự như TN7, nồng độ *delta–endotoxin* vẫn tăng ngay cả trong giai đoạn hạn chế cung cấp oxy, nhưng giá trị cực đại của TN8 so với TN5 (nuôi cấy lắc liên tục) là thấp hơn khoảng 95 mg/l, và thời gian đạt cực đại cũng trễ hơn so với TN5 12h.

Từ kết quả trên có thể thấy nếu hạn chế cung cấp oxy trong giai đoạn sinh trưởng và phát triển của B.thuringiensis có khả năng gây ức chế mạnh đối với quá trình hình thành độc tính *delta–endotoxin* và TN2 (ngưng cung cấp oxy 12–24h) cũng cho thấy nồng độ *delta–endotoxin* đạt được là rất thấp 269,63 mg/l. Khi so sánh kết quả của 4 phương án thí nghiệm chỉ có phương án TN5 (nuôi cấy lắc liên tục) cho kết quả về sinh trưởng, hình thành bào tử và *delta–endotoxin* là tốt nhất. Qua đó có thể khẳng định rằng việc cấp oxy trong suốt quá trình nuôi cấy *B. thuringiensis* là cần thiết để cho mật độ tế bào, bào tử và *delta–endotoxin* cao.



Hình 3. Ảnh hưởng của chế độ nuôi cấy lên khả năng sinh trưởng, hình thành bào tử và delta – endotoxin.

Các kết quả về tỷ lệ dịch nuôi cũng như việc cấp khí liên tục hay giám đoạn trong quá trình nuối cấy Bt cho các kết quả hoàn toàn tương ứng với nghiên cứu [12, 18]. Điều này, cho thấy việc nuôi cấy Bt trên nước thải bia ở Việt Nam cũng hoàn toàn có tính khả thi.

3.5. Nuôi cấy B. thuringensis trong bình nón và bình lên men 15 lít

Kết quả nuối cấy Bacillus thuringiensis var. kurstaki HD–1 cũng cho thấy sự khác biệt rõ kết quả được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Kết quả nuôi cấy *B.thuringiensis* trong bình nón và bình lên men.

Thời gian (h)	Bình nón			Bình lên men		
	TB (CFU/ml)	BT (CFU/ml)	Endo (mg/l)	TB (CFU/ml)	BT (CFU/ml)	Endo (mg/l)
0	$5,2\times10^4$	$2,1\times10^3$	186,31	$4,0\times10^4$	$2,8\times10^4$	163,16
12	$4,6\times10^6$	$4,7\times10^4$	275,86	$3,0\times10^7$	$6,5\times10^4$	443,01
24	$2,5\times10^8$	$1,4\times10^8$	342,78	$2,4\times10^8$	$1,3\times10^8$	570,22
36	$3,0\times10^8$	$1,6\times10^8$	423,28	$8,5\times10^8$	$1,8\times10^8$	599,61
48	$3,3\times10^8$	$1,8\times10^8$	621,29	$3,9\times10^8$	$2,0\times10^8$	725,05

Ghi chú: TB: mật độ tế bào; BT: mật độ bào tử; Endo: nồng độ delta–endotoxin

Kết quả cho thấy mật độ tế bào đều tăng dần từ 0–24h và đạt khoảng 108CFU/ml và 24–48h mật độ tế bào gần như không có sự thay đổi vẫn duy trì khoảng 108CFU/ml. So sánh số lượng tế bào của thí nghiệm trong bình lên men và thí nghiệm trong bình nón cho thấy, trong giai đoạn 0–24h mật độ tế bào trong bình lên men tăng nhanh hơn so với trong bình nón. Điều này có thể giải thích như sau, trong bình lên men tất cả các thông số: lượng oxy hòa tan, pH, nhiệt độ đều được duy trì trong suốt quá trình nuôi cấy và điều kiện này là ổn định nên nó khích thích sự phát triển số lượng tế bào tốt hơn so với thí nghiệm trong bình nón. Tuy nhiên, mật độ cực đại ở cả hai thí nghiệm chỉ đạt 108CFU/ml. Điều này cũng có thể giải thích như sau, khi mật độ của chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* đạt đến một giá trị nhất định nào đó thì các tế bào có xu hướng ức chế sự phát triển của nhau. Vì vậy, mặc dù các thông số nuôi cấy vẫn duy trì đảm bảo nhưng số lượng cũng không tăng. điều này cũng có thể giải thích bằng cách khác như sau, sau 24h nguồn dinh dưỡng trong môi trường nuôi cấy bắt đầu suy giảm vì mặc dù các điều kiện nuôi cấy khác vẫn duy trì đảm bảo nhưng mật độ tế bào cũng không thể tăng.

Đối với bào tử của *B. thuringiensis*, mật độ cũng tăng dần 0–24h và đạt khoảng 108CFU/ml sau 24h và sau đó mật độ được duy trì cho tới 48h ở cả hai thí nghiệm bình nón và bình lên men. Khác với tế bào, mật độ bào tử của thí nghiệm bình lên men trong giai

đoạn 0–12h tăng rất chậm và gần như là không tăng (mật độ khoảng 104CFU/ml). Có thể trong giai đoạn này ở thí nghiệm lên men có các điều kiện thích hợp nên kích thích chủng vi khuẩn B.thuringiensis hình thành tế bào dinh dưỡng nhiều hơn hình thành bào tử.

Đối với độc tính *delta–endotoxin*, ở cả hai phương án thí nghiệm nồng độ delta–endotoxin đều tăng theo thời gian và đạt cực đại tại 48h. Tuy nhiên, khi quan sát trong suốt quá trình nuôi cấy cho thấy, nồng độ *delt–endotoxin* trong thí nghiệm lên men tăng nhanh hơn so với thí nghiệm bình tam giác. Nồng độ delta–endotoxin trong thí nghiệm bình lên men qua các thời điểm 0h, 12h, 24h, 36h và 48h là: 163,16 mg/l; 443,01 mg/l; 570,22 mg/l; 599,61 mg/l; 725,05 mg/l. Nồng độ *delta–endotoxin* trong thí nghiệm bình tam giác qua các thời điểm 0h, 12h, 24h, 36h và 48h là: 186,31 mg/l; 275,86 mg/l; 342,78 mg/l; 423,28 mg/l và 621,29 mg/l. Từ kết quả về nồng độ độc tính trên cho thấy, khi nuôi cấy trên bình lên men cho nồng độ độc tính cực đại (725,05 mg/l) cao hơn so với nuôi cấy trên bình tam giác (621,29 mg/l) khoảng 130 mg/l. Qua đó cho thấy, nếu duy trì các thông số ổn định trong quá trình nuôi cấy chủng B.thuringiensis có thể kích thích chúng hình thành độc tính *delta–endotoxin* cao hơn. Các kết quả nghiên cứu của Việt Nam cũng tương đồng với các kết quả nghiên cứu trước của một số tác giả [14–16] nuôi cấy Bt trên nước thải và bùn thải sản xuất tinh bột. Măc dùng lượng bào tử, tế bào, và endotoxin của thí nghiệm nuôi cấy Bt trên bùn thải bia trong bình lên men 15 lít không cao bằng kết quả [14–16] nuôi trên nước thải và bùn thải sản xuất tinh bột. Nhưng đây là bước đầu cho thấy khi nâng mô hình nuôi cấy với các điều kiện pH, oxy và nhiệt độ luôn được duy trì ổn định có thể thu được sản phẩm có hàm lượng độc tính cao hơn. Đây cũng là cơ sở để có thể hướng tới quy mô sản xuất lớn hơn sau này.

Từ các kết quả trên có thể được ra nhận xét như sau: quá trình lên men trong bình lên men 15 lít thể tích làm việc 10 lít có mật độ tế bào và bào tử là tương đương với thí nghiệm trong bình nón và giá trị nồng độ *delta–endotoxin* ở thí nghiệm nuôi cấy trong bình lên men là cao hơn so với trong bình nón, giá trị cực đại đạt được là 725,05 mg/l .

4. Kết luận

Từ các nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố lên sinh trưởng của Bacillus thuringiensis var. kurstaki HD–1 khi sử dụng bùn hoạt tính từ trạm xử lý nước thải sản xuất bia trên cho thấy: pH7 là thích hợp nhất cho sinh trưởng và hình thành *delta–endotoxin* của B. thuringiensis (nồng độ cực đại 617,67 mg/l). Nồng độ chất rắn 2–2,5% tốt nhất cho sinh trưởng và hình thành *delta–endotoxin* của *B. thuringiensis* (nồng độ cực đại 619,06 mg/l). Tỷ lệ dịch nuôi cấy 2:10 là thích hợp nhất cho sinh trưởng và hình thành *delta–endotoxin* của *B. thuringiensis*. Chế độ nuôi cấy có cấp khí liên tục là thích hợp nhất cho sự sinh trưởng và hình thành độc tính của *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki HD–1. *B. thuringiensis* nuôi cấy trong bình lên men với điều kiện môi trường luôn duy trì ổn định cho độc tính *delta–endotoxin* (đạt 725,05 mg/l) cao hơn so với trong bình nón.

Các kết quả trên cho thấy bùn hoạt tính của trạm xử lý nước thải sản xuất bia có thể thay thế được môi trường TSB để nuôi cấy thu nhận thuốc trừ sâu sinh học từ vi khuẩn B.thuringiensis.

Tuy nhiên các kết quả nghiên cứu vẫn còn một số hạn chế như bố trí các bước nhảy của pH còn dài có thể chưa chọn được đúng điểm tối ưu. Phần hạn chế này nhóm tác giải xin bổ sung số liệu ở công bố sau với các kết quả chạy động thái lên men ở các pH khác nhau.

Đóng góp của tác giả: Xây dựng ý tưởng nghiên cứu: Đ.T.M.A., T.T.T.H.; Xử lý số liệu: V.V.Đ., N.M.T.; Viết bản thảo bài báo: Đ.T.M.A., P.T.T.T., Đ.T.T.B.; Chỉnh sửa bài báo: N.K.A.

Lời cảm ơn: Bài báo được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí của Nhiệm vụ Hợp tác quốc tế khoa học và công nghệ theo nghị định thư Canada: “Tiếp cận công nghệ sạch nghiên cứu xử lý, tái chế bùn thải sinh học thành nguyên liệu tạo ra chế phẩm vi sinh vật hữu ích phục

vụ cho nông lâm nghiệp", nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn PGS.TS. Nguyễn Hồng Khánh, chủ nhiệm nhiệm vụ.

Lời cam đoan: Tập thể tác giả cam đoan bài báo này là công trình nghiên cứu của tập thể tác giả, chưa được công bố ở đâu, không được sao chép từ những nghiên cứu trước đây; không có sự tranh chấp lợi ích trong nhóm tác giả.

Tài liệu tham khảo

1. Veeken, A.H.M.; Hamelers, H.V.M. Removal of heavy metals from sewage sludge by extraction with organic acids. *Wat. Sci. Tech.* **1999**, *40(1)*, 129–136.
2. AbdoM, S.E.; Ewida, K.T.; Youssef, Y.M. Recovery of alum from wasted sludge produced from water treatment plants. *J. Environ. Sci. Health. Part A.* **1993**, *28*, 1205–1216.
3. Yasuda, Y. Sewage sludge utilization technology in Tokyo. *Water Sci. Technol.* **1991**, *23(10–12)*, 1743–1752.
4. Wang, P.F.; Zhang, S.H; Wang, C.; Hou, J.; Guo, P.C.; Lin, Z.P. Study of heavy metal in sewage sludge and in Chinese cabbage grown in soil amended with sewage sludge. *Afr. J. Biotechnol.* **2008**, *7(9)*, 1329–1334.
5. Przewrocki, P.; Kulczycka, J.; Wzorek, Z.; Kowalski, Z.; Gorazda, K.; Jodko, M. Risk Analysis of Sewage Sludge – Poland and EU Comparative Approach. *Pol. J. Environ. Stud.* **2004**, *13(2)*, 237–244.
6. Adjalle K.D.; Brar S.K.; Verma M.; Tyagi R.D.; Valero J.R.; Surampalli R.Y. Ultrafiltration recovery of entomotoxicity from supernatant of *Bacillus thuringiensis* fermented wastewater and wastewater sludge. *Process Biochemistry* **2007**, *42*, 1302–1311.
7. Adjialle, K.D.; Brar, S.K.; Tyagi, R.D.; Valero, J.R.; Surampali, R.Y. Photostabilization of *Bacillus thuringiensis* fermented wastewater and wastewater sludge based biopesticides using additives. *Acta Tropica* **2009**, *111*, 7–14.
8. Adjialle, K.D.; Tyagi, R.D.; Brar, S.K.; Valero, J.R.l; Surampali, R.Y. Recovery of entomotoxicity components from *Bacillus thuringiensis* fermented wastewater and sludge: Ultrafiltration scale–up approach. *Sep. Purif. Technol.* **2009**, *69*, 275–279.
9. Ben, R.F.; Tyagi, R.D.; Prévost, D. Acid and alkaline treatment for enhancing the growth of rhizobia in sludge. *Can. J. Microbiol.* **2009**, *47*, 467–474.
10. Faouzi, B.R.; Rajeshwar, D.T.; Danielle, P.; Rao, Y.S. Wastewater Sludge as a New Medium for Rhizobial grow. *Watwe Qual. Res. J. Canada* **2002**, *37(2)*, 353–370.
11. Sherrer, P.; Luthy, P.; Trumpi, B. Production of δ–endotoxin by Bacillus thuringiensis as a function of glucose concentration. *Appl Microbiol*. **1973**, *25*, 644–646.
12. Avignone, R.C.; Arcas, J.M.C. Bacillus thuringiensis, sporulation and δ–endotoxin production in oxygen limited and nonlimited culture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **1997**, *8*, 301–304.
13. Satinder, K.; Brar, M.; Verma, R.D.; Tyagi, J.R.; Valero, R.Y.; Surampali, R.Y. Efficient centrifugal recovery of Bacillus thuringiensis biopesticides from fermented wastewater and wastewater sludge. *Water Res.* **2009**, *40*, 1310–1320.
14. Khanh, D.V.; Rajeshwar, D.T.; José, R.V.; Rao, Y.; Surampalli, R.Y. Bath and fed–bath fermentation of Bacillus thuringiensis using starch industry wastewater as fermentation substrate. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2009**, *33(6)*, 691–700.
15. Khanh, D.V.; Tyagi, R.D.; Valero, J.R.; Surampali, R.Y. Impact of different pH control agents on biopesticidal activity od Bacillus thuringiensis during the fermentation on starch industry wastewater. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2009**, *32*, 511–519.

16. Khanh, D.V.; Tyagi, R.D.; Brar, S.K.; Valero, J.R.; Surampali, R.Y. Starch industry wastewater for production of biopesticides – ramifications of solids concentrations. *Environ. Technol.* **2009**, *3(4)*, 393–405.
17. Khanh, D.V.; Tyagi, R.D.; Brar, S.K.; Valero, J.R.; Surampali, R.Y. Induced production of chitin to enhance entomotoxicity of Bacillus thuringiensis employing starch industry wastewater as substrate. *Bioresour. Technol.* **2009**, *100*, 5260–5269.
18. Yezza, A.; Tyagi, R.D.; Valero, J.R.; Surampali, R.Y.; Smith, J. Scale – up biopesticide production processes using wastewater sludge as a raw material. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, *31*, 545–552.
19. Mohammedi, S.; Bala Subramanian, S.; Yan, S.; Tyagi, R.D.; Valero, J.R. Molecular screening of Bacillus thuringiensis strains from wastewater sludge for biopesticide production. *Process Biochem.* **2006**, *41*, 829–835.
20. Anh, Đ.T.M.; Chính, T.T.; Khành, N.H. Ảnh hưởng của một số yếu tố lên sinh trưởng của Bacillus thuringiens trong môi trường sử dụng bùn hoạt tính của nhà máy bia. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ* 2014.
21. Chinh, T.T.; Hoa, N.T.; Anh, D.T.M.; Khanh, N.H.; Binh, N.D. Wastewater sludge of brewing wastewater treatment system as a new medium for biopesticide *Bacillus thuringensis*. Báo cáo Khoa học hội thảo VAST–BAS lần thứ nhất về Khoa học và Công nghệ, 2014, pp. 557–564.
22. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantitites of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254.

Effect of environmental factors on growth of Bacillus thuringiensis in medium using activated sludge of beer wastewater

Ta Thu Hang[1], Dang Thi Mai Anh[2]*, Nguyen Minh Thu[2], Tang Thi Chinh[2], Phung Thi Thu Trang[1], Ngo Kim Anh[1], Do Thi Thanh Binh[1], Vu Van Dam[1]

[1] Vietnam Institute of Meteorology, Hydrology, and Climate change; tathuhang311@gmail.com; phungtrang80@gmail.com; kimanhhn2422gmail.com; tbinh2009@gmail.com; vuvandam@gmail.com
[2] Institute of Environmental Technology, Vietnam Academy of Science and Technology; maianh058@gmail.com; minhthuiet@gmail.com; tangthichinh@gmail.com

Abstract: This paper mentions the influence of some factors concluding pH; sludge concentration; aeration; and fermentation on the growth of B. thuringiensis (Bt) via culturing environment, which is used activated sludge for brewery wastewater. Moreover, B. thuringiensis (Bt) can be grown at pH 6–8 and made the highest delta-endotoxin about 617.67 mg/l with pH7 and 20–25 g/l of sludge concentration. Furthermore, B. thuringiensis (Bt) gained the best growth, maximum cell density with 2.9×10^8 CFU/ml and 619.06 mg/l of delta-endotoxin concentration when it is cultured in conical flask environment with 2:10 (v/v) rate. In the culturing process, B. thuringiensis (Bt) is provided non-stop aeration because delta-endotoxin will be affected seriously in any stage if the aeration is not enough. When B. thuringiensis (Bt) is cultured in fermentating condition with pH = 7 and dissolved oxygen is 4mg/l, its toxicity is higher than as it is cultured in conical flask, and delta-endotoxin gains at 725.05 mg/l after 48h. Research results indicate that B.thuringiensis can be grown very well in activated sludge environment from beer wastewater and it has been potentiality for practical application.

Keywords: B. thuringiensis; Sludge; pH; Total solid concentration and the rate of medium.