

Pemerangkapan *Thiobacillus denitrificans* di dalam gel agaros bagi penurunan nitrat.

(Entrapment of *Thiobacillus denitrificans* in agarose gel for nitrate reduction)

A. B. SALLEH and M. AMINUDDIN

Jabatan Biokimia dan Mikrobiologi, Fakulti Sains dan Pengajian Alam Sekitar,
Universiti Pertanian Malaysia, Serdang, Selangor, Malaysia.

Key words: Entrapment, *Thiobacillus denitrificans*, agarose; nitrate reduction.

RINGKASAN

Thiobacillus denitrificans telah diperangkap hidup-hidup ke dalam gel agaros. Keupayaan sel-sel yang terperangkap untuk menurun nitrat telah dikesan melalui keaktifan enzim nitrat reduktase. Keaktifan enzim yang tinggi telah didapati dari sel-sel yang terperangkap dan pada amnya enzim tersebut telah bertindak serupa seperti di dalam sel-sel yang bebas. Sel-sel yang terperangkap telah berupaya untuk menurun nitrat kepada nitrit apabila larutan nitrat disalurkan ke dalam reaktor berbentuk tiub yang mengandungi sel-gel.

SUMMARY

Thiobacillus denitrificans was entrapped live in agarose gel. The ability of entrapped cells to reduce nitrate was monitored by the activity of the enzyme nitrate reductase. High enzyme activity was obtained from the entrapped cells, and in general the enzyme acts similarly as it was in free cells. Entrapped cells were able to reduce nitrate to nitrite when nitrate solution was perfused through a tubular reactor containing cell-gel.

PENDAHULUAN

Kegunaan enzim dan sel lekatan (immobilised) di dalam bidang-bidang industri pemakanan, perubatan dan pertanian telah dibincang dengan mendalam oleh Wiseman (1978) dan Chibata (1978). Pelekatan sel mungkin dapat mengatasi proses penulinan enzim yang kompleks dan juga boleh menambah kestabilan sesuatu enzim. Sungguh pun terdapat beberapa cara bagi melekatkan sel, pemerangkapan ialah suatu kaedah pelekatan yang didapati sesuai oleh Chibata (1978).

Thiobacillus denitrificans yang terperangkap dipercayai dapat digunakan bagi membuang nitrat di dalam cecair buangan. *Thiobacillus denitrificans* ialah sejenis bakteria kimia lithotropik yang mendapat tenaganya untuk hidup melalui pengoksidaan beberapa jenis sebatian sulfur bukan organik. Ia juga menyahnitrat nitrat ke nitrogen dan lain-lain gas terbitan nitrogen di dalam keadaan anaerobik. Satu enzim penting di dalam bakteria ini ialah nitrat reduktase yang menggunakan sulfid sebagai penderma elektron (Adams *et al.* 1971, Sawhney and Nicholas, 1977). Keaktifan enzim ini dipastikan bagi mengukur kemampuan penyahnitrat sel-sel bakteria yang telah terperangkap.

BAHAN DAN KAEDAH

Kultur dan pengasingan bakteria

Thiobacillus denitrificans strain 'Serdang' telah dipencil oleh Aminuddin *et al.*, (1979). Di dalam kajian ini, pembiakan dan pengasingan bakteria dilakukan mengikut kaedah yang telah mereka gunakan. Ampaian bakteria 10% (berat/isipadu) di dalam penimbal fosfat, pH 7.5 telah di sediakan untuk tindakan selanjutnya.

Kaedah pemerangkapan

Biji agaros (Sigma) sebanyak 5g bagi setiap 100 ml air telah dilarutkan di dalam kelalang yang mempunyai alat pemeluap. Larutan agaros kemudian disejukkan hingga ke 50° sebelum dicampur ampai sel. Bagi menghasilkan kepekatan 3.3% (berat/berat) sel/gel, 20 ml ampai sel dicampur dengan 50 ml larutan agaros. Bagi menghasilkan sel terperangkap, campuran sel dan agaros segera disejukkan di dalam kukus ais hingga beku. Sel-gel telah dipotong mengikut isipadu kubus yang dikehendaki. Bagi semua ujikaji, kecuali jika dinyatakan sebaliknya, sel-gel dipotong dalam bentuk 2-3mm³. Sel-gel telah disimpan di dalam penimbal fosfat pH 7.5 pada suhu 4°.

Pencerakinan keaktifan enzim

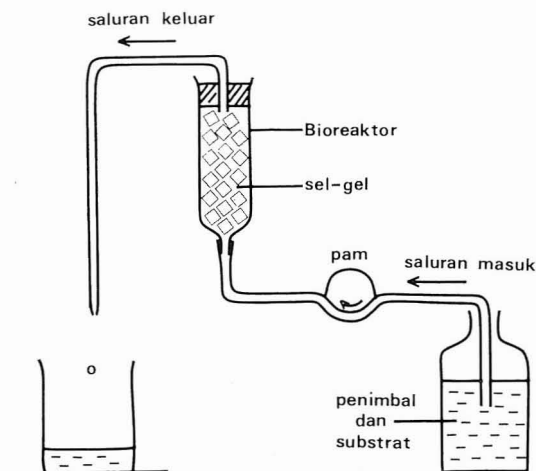
Keaktifan nitrat reduktase adalah diukur dengan mengesan nitrit mengikut kaedah yang disediakan oleh Aminuddin dan Nicholas (1974).

Sel bebas atau kubus-kubus sel-gel dicampur dengan NaNO_3 ($10\mu\text{mol}$), Na_2SO_3 ($20\mu\text{mol}$) dan penimbal fosfat (larutan 50 nM). Sebanyak 2 ml campuran tindakbalas adalah digunakan bagi sel bebas, tetapi jumlah isipadu mungkin ditukar apabila tindakbalas yang mengandungi sel-gel dijalankan. Sel-gel mempunyai ketumpatan kira-kira 1g/ml .

Tindakbalas dijalankan pada suhu 35° dan bekas digoncang sepanjang masa tindakbalas, iaitu selama 30 minit . Sebanyak $20\text{-}200\ \mu\text{l}$ alikot digunakan untuk mengukur nitrit.

Sistem bioreaktor

Sistem ini adalah seperti yang tertera dalam gambarajah 1. Sebanyak 16g sel-gel (berat basah) diisi di dalam tabung plastik tubular (2 cm garis pusat dalam 9 cm panjang). Larutan nitrat (5mM) yang mengandungi sulfit (10mM) dipam daripada bawah supaya kubus-kubus sel-gel tidak menjadi padat. Kepekatan nitrit diukur di dalam cecair yang keluar.



Gambarajah 1: Sistem bioreaktor mengandungi sel-gel bagi penurunan nitrat. Larutan substrat dipam pada kalajuan 0.4 ml/min . Ujikaji dijalankan pada suhu makmal (kira-kira 20°)

KEPUTUSAN DAN PERBINCANGAN

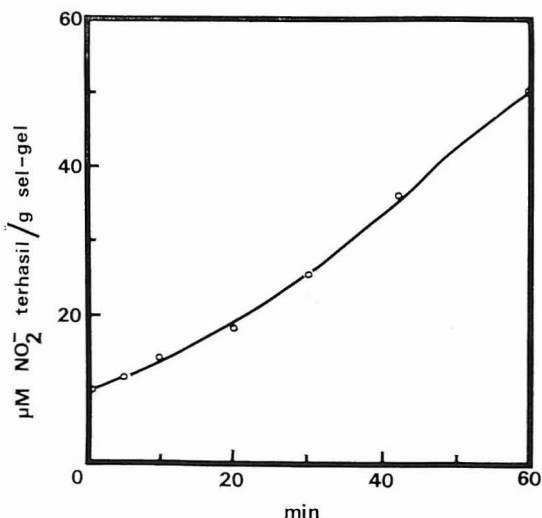
Jadual 1 menunjukkan tindakbalas kawalan yang dijalankan bagi membuktikan adanya aktiviti nitrat reduktase di dalam sel-gel. Keaktifan enzim di dalam sel terperangkap didapati kira-kira 50 peratus daripada keaktifannya di dalam sel bebas.

JADUAL 1
Tindakbalas kawalan mengesan keaktifan nitrat reduktase di dalam sel terperangkap.

Keadaan	M nitrit terhasil/jam/g sel-gel
sel-gel, NO_3^- , SO_3^{2-}	66
tanpa NO_3^-	0
tanpa SO_3^{2-}	21
sel-gel direbus*	9
tanpa sel-gel	0

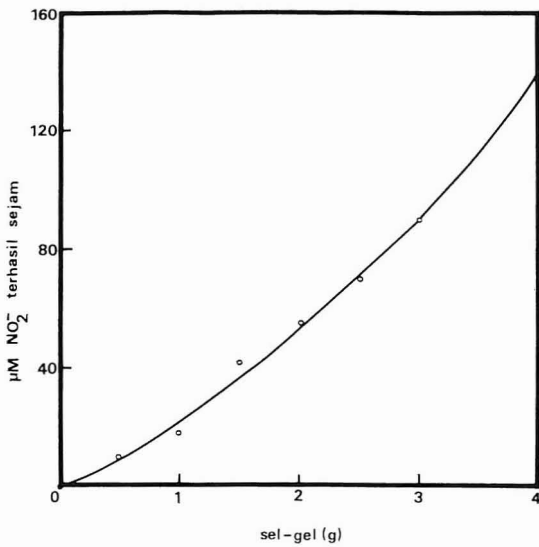
* sel-gel didalam penimbal dipanaskan di dalam kukus air menggelegak selama 15 min . sebelum pencerakinan keaktifan enzim dijalankan. 1g sel-gel mengandungi 0.033g sel; 0.03g sel bebas menghasilkan 113 M nitrit/jam.

Gambarajah 2, yang menunjukkan kesan masa terhadap penghasilan nitrit, dan gambarajah 3, yang mengesani keaktifan nitrit reduktase mengikut pertambahan sel-gel dalam campuran tindakbalas seterusnya menunjukkan ciri-ciri tindakbalas enzim yang lazim. Aktiviti enzim bertambah mengikut pertambahan masa tindakbalas dan pertambahan sel.



Gambarajah 2: Kesan masa terhadap keaktifan nitrat reduktase di dalam sel-gel. 1g sel-gel digunakan di dalam 2 ml campuran tindakbalas bagi setiap jangkamasa.

PEMERANGKAPAN *THIOBACILLUS DENITRIFICANS* DI DALAM GEL AGAROS



Gambarajah 3: Kesan pertambahan sel-gel terhadap keaktifan nitrat reduktase. 0 - 4g sel-gel digunakan di-dalam 8 ml campuran tindakbalas.

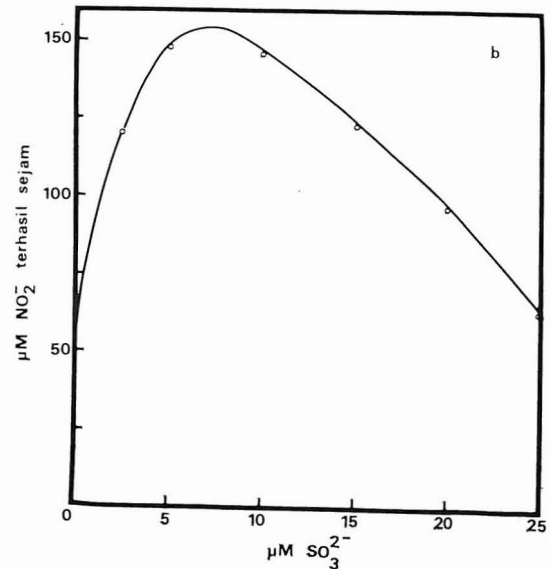
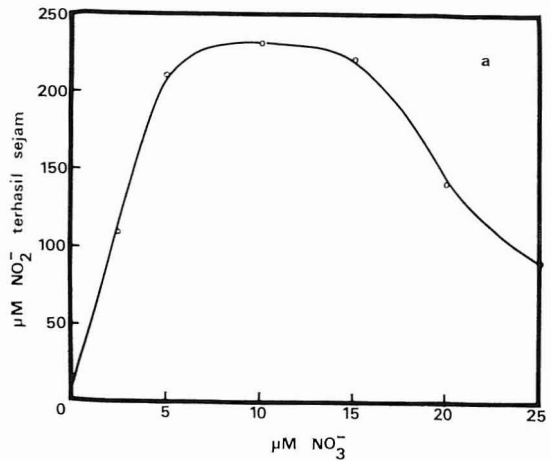
Kesan substrat-substrat terhadap keaktifan nitrat reduktase di dalam sel terperangkap adalah dibentangkan di dalam gambarajah 4a dan 4b. Penurunan nitrat dipastikan oleh kepekatan awal nitrat dan sulfit yang digunakan di dalam campuran tindakbalas. Kepekatan substrat yang tinggi merencat keaktifan enzim. Keputusan ini adalah bersamaan dengan laporan yang dibuat oleh Adams *et al.* (1971) yang membuat kajian dengan ekstrak *Thiobacillus denitrificans* (strain 'Oslo').

pH optimum yang berada di dalam lengkungan pH 8.0 (gambarajah 5) adalah juga bersamaan dengan hasil kajian Adams *et al.* (1971).

Jadual 2 pula menunjukkan kesan saiz kubus sel-gel terhadap keaktifan enzim. Tindaklah hairan jika didapati kubus yang terkecil memberi keaktifan yang tinggi. Keaktifan pasti tertakluk kepada faktor-faktor seperti keluasan permukaan gel dan kemudahan substrat dan hasil untuk

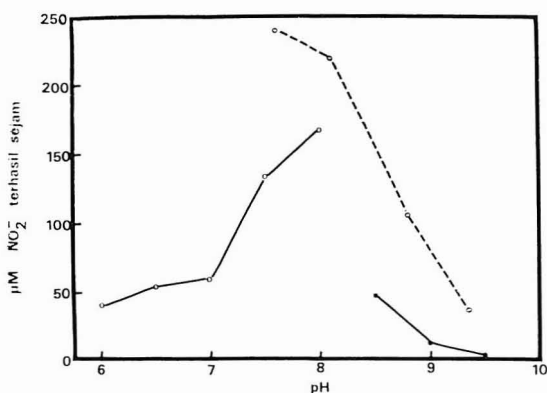
JADUAL 2
Kesan saiz kubus sel-gel terhadap keaktifan nitrat reduktase

Saiz kubus sel-gel	µM nitrit terhasil/jam/g sel-gel
1 mm ³	142
2-3 mm ³	63
4-5 mm ³	38



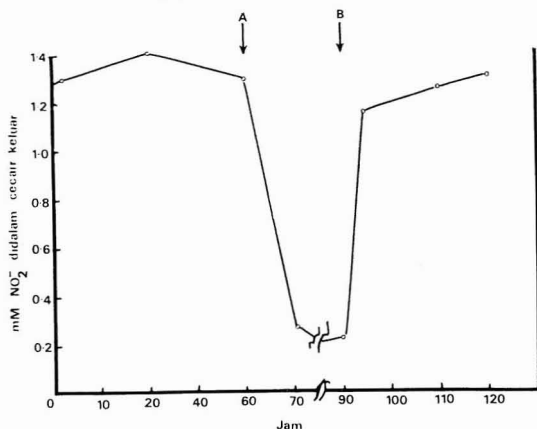
Gambarajah 4: Kesan kepekatan awal nitrat (a) dan sulfit (b) terhadap keaktifan nitrat reduktase di dalam sel-gel. 2g sel-gel digunakan di dalam 4 ml campuran tindakbalas.

meresap kepada dan daripada sel-sel yang terperangkap. Faktor-faktor ini juga mungkin dikawali oleh kepekatan agaros di dalam gel. Kepekatan agaros menentukan kepadatan gel dan kepekatan gel yang diguna disini sesuai bagi pengendalian sel-gel. Kepekatan yang lebih rendah akan menghasilkan gel yang terlalu lembek. Kepadatan gel mungkin juga akan mempengaruhi kemampuan kaedah pemerangkapan, di mana kebocoran sel mungkin berlaku semasa sel-gel digunakan untuk sesuatu proses.



Gambarajah 5: Kesan pH terhadap keaktifan nitrat reduktase didalam sel gel. 1g sel-gel digunakan di dalam 2ml campuran tindakbalas. Penimbal yang diguna ialah posfat (—○—), TRIS-HCl (—□—) dan borate (—●—).

Kemampuan sel-gel menurun nitrat ke nitrit boleh dilihat di dalam Gambarajah 6, dalam mana sel-gel dimasukkan ke dalam satu tabung dan larutan mengandungi substrat-substrat di pam melalui celah-celah sel-gel yang tersusun. Di dalam kajian ini telah di dapati sel-sel terperangkap dapat menurun nitrat ke nitrit. Sungguh pun ujikaji telah berjalan selama 120 jam terus menerus kemampuan untuk menurun nitrat tidak terjejas.



Gambarajah 6: Penurunan nitrat ke nitrit oleh bioreaktor sel-gel. Larutan mengandungi nitrat dan sulfid disalur melalui bioreaktor pada permulaan ujikaji. Pada titik A, larutan substrat diganti dengan larutan penimbal sahaja dan kemudian larutan substrat disalur kembali pada titik B.

Telah di dapati juga bahawa sel-gel agak stabil juga semasa di dalam penyimpanan. Keaktifan enzim berkurangan ca. 50 peratus selepas 60 hari disimpan pada suhu 4° dan selepas 7 hari pada suhu 35°.

RUMUSAN

Keputusan-keputusan yang diperolehi adalah menggalakkan, dan menunjukkan potensi penggunaan sel *Thiobacillus denitrificans* terperangkap. Kajian selanjutnya perlu dilakukan bagi menentukan matrik pemerangkap tahan lasak terutama jika sel-gel diguna di dalam keadaan yang tidak begitu terkawal (field conditions). Polymer-polimer asli dan sintetik lain sedang dikaji juga. Keaktifan enzim juga berkemungkinan dapat ditingkatkan, dan enzim-enzim penurunan nitrat yang lain penting dikesani. Akhir kata di dalam sistem bioreaktor, satu sistem optimum belum dikaji untuk mendapatkan prestasi yang lebih tinggi dari sel-sel yang terperangkap.

PENGHARGAAN

Ucapan terima kasih kepada Cik Chew Mee Li dan Encik Burhanuddin Shamsuddin di atas bantuan teknik, dan Cik Hafizah Abdul Kadir yang telah menaip manuskrip ini.

RUJUKAN

- ADAMS, C.A., WARNES, G.M., NICHOLAS, D.J.D. (1971): A sulphite dependent nitrate reductase from *Thiobacillus denitrificans*. *Biochim. Biophys. Acta.* **235**, 398-405.
- AMINUDDIN, M., NICHOLAS, D.J.D. (1974): An AMP independent sulphite oxidase from *Thiobacillus denitrificans*. *J. Gen. Microbiol.* **82**, 103-113.
- AMINUDDIN, M., KHAIRUDDIN AL BAKRY, NYONYA A. RAZAK (1979): *Thiobacillus denitrificans* - isolation, growth and some biochemical studies, *Mal. Microbiol. Symp. Abstract.* **2**, 27-28.
- CHIBATA, I. (1978): *Immobilised Enzymes*. Tokyo. Kondansha Ltd.
- SAWHNEY, V., NICHOLAS, D.J.D. (1979): Sulphite and NADH - dependent nitrate reductase from *Thiobacillus denitrificans*. *J. Gen. Microbiol.* **100**, 49-58.
- WISEMAN, A. (1978): *Topics in Enzyme and Fermentation Technology* Vols. 1 and 2. Chichester. Ellis Horwood Ltd.

(Received 7 January 1981)