

NGHIÊN CỨU VI KHUẨN ƯA NHIỆT PHÂN LẬP TỪ Bùn THẢI NHÀ MÁY GIẤY BÃI BẰNG

NGÔ THỊ TƯỜNG CHÂU, LÊ VĂN THIỆN,
HOÀNG THỊ MỸ HẰNG, PHẠM MINH HẰNG
*Trường Đại học Khoa học tự nhiên,
Đại học Quốc gia Hà Nội*

Cùng với sự phát triển mạnh mẽ về kinh tế, xã hội thì lượng bùn thải ra môi trường ngày càng gia tăng. Ở Việt Nam, bùn thải chủ yếu được xử lý bằng cách ép loại nước, phơi khô, đổ bỏ hay chôn lấp. Tuy nhiên, việc đổ bỏ, chôn lấp bùn thải đã và đang gây ra sự ô nhiễm môi trường nghiêm trọng và được xem là lãng phí tài nguyên. Trong khi đó ủ hiếu khí bùn thải với sự tham gia của vi khuẩn ưa nhiệt không chỉ làm giảm thiểu đáng kể lượng bùn thải mà còn góp phần chuyển đổi bùn thải thành phân bón phục vụ cho nông nghiệp. Nghiên cứu này đặt mục tiêu (i) xác định đặc tính của bùn thải Nhà máy giấy Bãi Bằng, (ii) phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn ưa nhiệt có hoạt tính phân hủy chất hữu cơ cao, và (iii) đánh giá khả năng phân hủy bùn thải Nhà máy Bãi Bằng của tập hợp vi khuẩn ưa nhiệt được tuyển chọn. Những kết quả đạt được sẽ là cơ sở khoa học cho việc tận dụng bùn thải nói chung và bùn thải của nhà máy giấy Bãi Bằng nói riêng nhằm sản xuất phân bón hữu cơ vi sinh chất lượng cao.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Phương pháp thu, xử lý và bảo quản mẫu bùn thải

Mẫu bùn thải sau khi ép nước được thu từ hệ thống xử lý nước thải của Nhà máy giấy Bãi Bằng theo phương pháp tổ hợp. Bùn thải được xử lý bằng cách phơi khô tự nhiên trong 3-5 ngày (ngoại trừ mẫu tươi được sử dụng để xác định độ ẩm và đặc tính sinh học), đồng nhất mẫu bằng cách cho qua rây lỗ vuông kích thước 1 mm. Bảo quản trong túi nilon sạch, dán kín ở 4-10°C.

2. Xác định các đặc tính lý, hóa và sinh học của mẫu bùn thải

Độ ẩm, pH (KCl), hàm lượng chất khô được xác định theo Lê Văn Khoa và cs. (2000) [3]; tổng hàm lượng carbon (TC) và carbon hữu cơ (TOC) theo TCVN 6642:2000; tổng N bằng phương pháp Kjeldahl cải biên theo TCVN 6498:1999, N dễ tiêu dạng NO_3^- theo phương pháp disulphophenic; hàm lượng Ca^{2+} , Mg^{2+} trao đổi theo phương pháp Trilon B (EDTA); hàm lượng các kim loại nặng Cu, Ni, Zn, Cd, Pb, Hg, Cr theo phương pháp đo phổ hấp thụ nguyên tử (ASS); xác định tổng số vi khuẩn hiếu khí, nấm mốc và xạ khuẩn bằng phương pháp pha loãng và đếm trên các môi trường thạch đĩa tương ứng là thạch - cao thịt - pepton, Czapeck và Gause I [2]; mật độ *E.coli* O157:H7 giả định trên môi trường thạch MacConkey Sorbitol; *Salmonella* trên môi trường thạch Salmonella - Shigella; ký sinh trùng đường ruột (*Cryptosporidium parvum*, *Giardia duodenalis*, *Cyclospora* spp.) bằng phương pháp làm tiêu bản, phủ màu với kit kháng thể miễn dịch huỳnh quang và đếm bào nang dưới kính hiển vi huỳnh quang, và sán dây bò (*Taenia saginata*) bằng cách quan sát hình thể đặc trưng trên kính hiển vi quang học với độ phóng đại 40 [5].

3. Phân lập các chủng vi khuẩn ưa nhiệt từ mẫu bùn thải

3.1. Chuẩn bị bùn thải: Bùn thải sau xử lý được sử dụng làm cơ chất cho nuôi cấy làm giàu và các thí nghiệm phân hủy bởi dịch chiết nuôi cấy của vi khuẩn ưa nhiệt.

3.2. Chuẩn bị mẫu cấy: Ủ mẫu bùn thải ở 30°C trong 2 ngày và 60°C trong 3 ngày.

3.3. Môi trường nuôi cấy

- *Môi trường nuôi cấy làm giàu (môi trường bùn)*: gồm bùn thải khô (10%), giấy lọc (1%), cao nấm men (0,5%), pepton (0,1%) và K_2HPO_4 (0,1%) trong nước cất (pH 7,5-8). Nuôi cấy làm giàu được chuẩn bị bằng cách thêm 10 g mẫu vào 1 lít môi trường bùn, nuôi ở 60°C trong 10 ngày dưới điều kiện hiếu khí.

- *Môi trường phân lập bao gồm*: VL agar và Waskman agar [4].

3.4. Tiến trình phân lập: Từ dịch huyền phù được pha loãng của dịch nuôi cấy làm giàu trong nước vô trùng, sự phân lập đã được tiến hành bằng phương pháp cấy ria trên các đĩa môi trường. Các đĩa được ủ ở 50-60°C trong 2-3 ngày.

4. Tuyển chọn các chủng vi khuẩn ưa nhiệt có khả năng phân hủy chất hữu cơ cao

Các chủng vi khuẩn có khả năng phân hủy chất hữu cơ cao được tuyển chọn từ các chủng vi khuẩn ưa nhiệt phân lập được bằng phương pháp khuếch tán enzyme trên môi trường thạch đĩa. Trong đó, các đĩa thạch chứa môi trường thạch cao thịt pepton được bổ sung riêng biệt 1% tinh bột, 1% CMC (carboxymethyl cellulose) và 1% casein tương ứng với việc tuyển chọn các chủng phân hủy tinh bột, cellulose và protein. Cây vạch các chủng vi khuẩn được phân lập lên các đĩa thạch nói trên. Nuôi cấy ở 35°C trong 3 ngày. Sau đó, nhuộm các đĩa thạch có bổ sung tinh bột và CMC bằng thuốc nhuộm Lugol và casein bằng thuốc thử Fraziae [2]. Đánh giá khả năng phân hủy các chất hữu cơ thông qua giá trị hiệu số giữa kích thước vạch phân hủy cơ chất và kích thước khuẩn lạc.

5. Khả năng phân hủy sinh khối bùn thải của tập hợp chủng vi khuẩn ưa nhiệt:

Vi khuẩn ưa nhiệt có hoạt tính phân giải chất hữu cơ cao được nuôi cấy trong môi trường bùn (pH ban đầu 7,5-8,0) ở 60°C trong 10 ngày. Tính % độ giảm khối lượng khô của bùn sau nuôi cấy tại điều kiện thí nghiệm và đối chứng (không cấy vi khuẩn ưa nhiệt).

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Đặc tính lý, hóa và sinh học của bùn thải từ nhà máy giấy Bãi Bằng

Công nghệ xử lý nước thải của nhà máy giấy Bãi Bằng dựa trên nguyên tắc sử dụng vi sinh vật hiếu khí để phân hủy các chất ô nhiễm hữu cơ trong nước thải và tạo nên khối của chúng (bùn sinh học). Một phần bùn sinh học này được đưa trở lại bể hiếu khí, phần còn lại được loại bỏ (bùn thải). Khi thải vào môi trường với một lượng lớn sẽ gây ô nhiễm môi trường và được xem là lãng phí tài nguyên. Vì vậy, với mục đích tận dụng bùn thải từ hệ thống xử lý nước thải nhà máy giấy Bãi Bằng làm nguồn phân bón, các đặc tính của bùn thải đã được nghiên cứu. Kết quả được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1

Đặc tính lý, hóa và sinh học của bùn thải nhà máy giấy Bãi Bằng

Stt	Chỉ tiêu	Đơn vị	Kết quả
1	Độ ẩm	%	48,9
2	pH (KCl)		8,04
3	Tổng hàm lượng chất khô	%	51,1
4	Tổng hàm lượng chất hữu cơ	%	29,62
5	Tổng cacbon (TC)	%	26,78
6	Tổng cacbon hữu cơ (TOC)	%	13,46
7	Tổng nitơ (TN)	%	3,85

8	Tổng nitơ dễ tiêu (N-NO ₃)	%	0,01
9	Ca ²⁺ trao đổi	%	5,1
10	Mg ²⁺ trao đổi	%	2,7
11	Cu	mg/kg	16,25
12	Ni	mg/kg	12,86
13	Zn	mg/kg	73,44
14	As	mg/kg	14,57
15	Cd	mg/kg	0,11
16	Pb	mg/kg	22,11
17	Hg	mg/kg	0,19
18	Cr	mg/kg	10
19	Vi khuẩn tổng số	CFU/g	534 x 10 ⁹
20	Nấm tổng số	CFU/g	346 x 10 ⁵
21	Xạ khuẩn tổng số	CFU/g	467 x 10 ⁶
22	Tổng vi khuẩn ưa nhiệt	CFU/g	818 x 10 ⁶
23	Tổng nấm ưa nhiệt	CFU/g	425 x 10 ³
24	Tổng xạ khuẩn ưa nhiệt	CFU/g	625 x 10 ⁴
25	<i>E.coli</i> O157:H7	CFU/g	
26	<i>Salmonella</i>	CFU/g	
27	<i>Cryptosporidium parvum</i>	Vi khuẩn/20 µl	0
28	<i>Giardia duodenalis</i>	Vi khuẩn/20 µl	5
29	<i>Cyclospora</i> spp.	Vi khuẩn/20 µl	6
30	<i>Taenia saginata</i>	con/g	0

Một độ ẩm ban đầu của nguyên liệu là 50-60% thường được xem là tối ưu cho ủ hiếu khí (composting) bởi nó cung cấp đủ nước để duy trì sự sinh trưởng, phát triển của vi sinh vật nhưng cũng không quá nhiều để ngăn chặn luồng không khí. Khi điều kiện trở nên khô hơn 35-40%, hoạt động của vi khuẩn bị ức chế. Trong khi độ ẩm trên 65% lại khiến cho quá trình phân hủy chậm, sinh mùi bởi điều kiện yếm khí và rửa trôi chất dinh dưỡng [1]. Trong nghiên cứu này, độ ẩm của mẫu bùn thải nhà máy giấy Bãi Bằng (48,9%) có thể được xem là thích hợp cho quá trình ủ phân. Trong suốt quá trình ủ hiếu khí, pH của đồng ủ nói chung biến đổi trong khoảng 5,5 và 8,5 [1]. pH ban đầu của đồng ủ phụ thuộc vào thành phần nguyên liệu. Trong giai đoạn đầu, các acid hữu cơ có thể tích lũy như là sản phẩm phụ của sự phân giải chất hữu cơ bởi vi khuẩn và nấm. Việc pH giảm sẽ khuyến khích sự phát triển của nấm để phân hủy lignin và cellulose. Thông thường, các acid hữu cơ tiếp tục bị phân hủy và pH tăng lên. Sau đó pH có khuynh hướng trở nên trung tính bởi vì khí amoniac hoặc bị mất vào trong khí quyển hoặc tham gia vào quá trình phát triển mới của vi khuẩn. Phân hữu cơ thành phẩm thường có pH 6- 8. Vì thế pH của nguyên liệu ủ ban đầu có ảnh hưởng đáng kể đến hoạt động của hệ vi sinh vật trong quá trình ủ hiếu khí. Ở đây, bùn thải nhà máy giấy Bãi Bằng có pH kiềm (pH 8,04) do trong quá trình hình thành bùn thải có chứa một lượng lớn CaCO₃ (chất có trong hạt sơ sợi cellulose) và là thích hợp để được sử dụng làm nguyên liệu ban đầu cho quá trình ủ hiếu khí sản xuất phân bón hữu cơ. Bên cạnh đó, trong số nhiều yếu tố cần thiết cho sự phân hủy của vi khuẩn, C và N là quan trọng nhất và là yếu tố hạn chế phổ biến nhất. Tỷ lệ C: N lý tưởng cho quá trình ủ hiếu khí nói chung là khoảng 30: 1 (theo trọng lượng). Trong nghiên cứu này, bùn thải nhà máy giấy Bãi Bằng có tỷ lệ C: N là khoảng 7: 1, vì vậy nên phối trộn thêm nguồn C khác để đạt hiệu quả phân hủy cao. Ngoài ra, tất cả các dạng ủ hiếu khí sản xuất phân bón hữu cơ đều phụ thuộc vào hoạt động của vi khuẩn và nấm. Vi khuẩn chịu trách nhiệm cho hầu hết các quá trình phân hủy và sinh nhiệt trong đồng ủ, xạ khuẩn đóng vai trò quan trọng trong việc phân hủy các phân tử hữu

cơ phức tạp như cellulose, lignin, chitin và protein mà không được phân hủy bởi các dạng vi khuẩn khác và nấm. Trong khi đó, nấm bao gồm nấm mốc và nấm men lại chịu trách nhiệm phân hủy nhiều mạch thực vật phức tạp trong nguyên liệu đồng ủ, đặc biệt chúng tấn công các bã thải hữu cơ rất khô, có tính acid và hàm lượng N thấp cho sự phân hủy bởi vi khuẩn. Ở đây mẫu bùn thải nghiên cứu có chứa một mật độ tương đối cao của các nhóm vi sinh vật ưa ẩm và ưa nhiệt. Vì vậy sẽ là rất thuận lợi khi được sử dụng làm nguyên liệu cho quá trình ủ phân. Mặt khác, bùn thải nhà máy giấy Bãi Bằng cũng có chứa một hàm lượng kim loại nặng và một số vi sinh vật và ký sinh trùng gây bệnh.

2. Phân lập vi khuẩn ưa nhiệt từ bùn thải

Vi khuẩn ưa nhiệt có vai trò hết sức quan trọng trong quá trình ủ phân, quyết định đến chất lượng của phân bón thành phẩm. Vì vậy, từ bùn thải nhà máy giấy Bãi Bằng, chúng tôi đã tiến hành phân lập các chủng vi khuẩn ưa nhiệt trên các loại môi trường khác nhau, kết quả được trình bày ở bảng 2. Qua đó cho thấy, có... chủng vi khuẩn ưa nhiệt đã được phân lập. Tất cả các khuẩn lạc trên đĩa thạch đã được chọn dựa vào các đặc điểm như kích thước, màu sắc, viền khuẩn lạc, độ dày của khuẩn lạc...

Bảng 2

Kết quả phân lập vi khuẩn ưa nhiệt từ bùn thải trên các loại môi trường

Stt	Môi trường phân lập	Số chủng vi khuẩn ưa nhiệt	Ký hiệu chủng
1	VL agar	6	GV1 đến GV6
2	Waskman agar	5	GW1 đến GW5

3. Tuyển chọn các chủng vi khuẩn ưa nhiệt có khả năng phân hủy chất hữu cơ cao

Từ 11 chủng vi khuẩn ưa nhiệt được phân lập, tiến hành tuyển chọn các chủng có khả năng phân hủy chất hữu cơ cao, kết quả cho thấy có 11 chủng thể hiện hoạt tính phân hủy cellulose (chiếm 100%), 11 chủng thể hiện hoạt tính phân hủy tinh bột (chiếm 100%) và 9 chủng thể hiện hoạt tính phân hủy protein (chiếm 81,82%). Trong đó, chủng GV6 có hoạt tính phân hủy CMC cao nhất (hiệu số kích thước vạch phân hủy đạt 10 mm), chủng GW4 có hoạt tính phân hủy tinh bột cao nhất (hiệu số kích thước vạch phân hủy đạt 7 mm) và chủng GW4 có hoạt tính phân hủy casein cao nhất (hiệu số kích thước vạch phân hủy đạt 10 mm) (hình 1, 2 và 3).



Hình 1: Hoạt tính phân hủy cellulose của chủng vi khuẩn GV6.



Hình 2: Hoạt tính phân hủy tinh bột của chủng vi khuẩn GW4



Hình 3: Hoạt tính phân hủy protein của chủng vi khuẩn GW4.

4. Khả năng phân hủy sinh khối bùn thải của tập hợp chủng vi khuẩn ưa nhiệt

Tập hợp 3 chủng vi khuẩn ưa nhiệt có khả năng phân hủy chất hữu cơ cao được tuyển chọn đã được sử dụng làm đối tượng cho nghiên cứu đánh giá khả năng phân hủy sinh khối bùn thải

nhà máy giấy Bãi Bằng. Kết quả cho thấy khối lượng bùn trong mẫu thí nghiệm được cấy bởi tập hợp vi khuẩn ưa nhiệt đã giảm hơn nhiều so với mẫu đối chứng trong quá trình ủ ở 60°C. Tốc độ giảm khối lượng của bùn tăng tuyến tính đến ngày thứ 8. Phần chất rắn của bùn thải đã giảm khoảng 36% sau 8 ngày ủ. Trong mẫu đối chứng chỉ khoảng 15% phần chất rắn đã được giảm sau 8 ngày ủ.

III. KẾT LUẬN

Đặc tính của bùn thải nhà máy giấy Bãi Bằng đã được xác định: độ ẩm, pH và mật độ vi sinh vật rất thích hợp cho việc sử dụng làm nguyên liệu ủ phân; tuy nhiên cần bổ sung nguồn C và có sự hiện diện của một số ký sinh trùng đường ruột gây bệnh.

Đã tuyển chọn được 03 chủng vi khuẩn ưa nhiệt có khả năng phân hủy chất hữu cơ cao từ 11 chủng được phân lập từ bùn thải nhà máy giấy Bãi Bằng.

Tập hợp các chủng vi khuẩn ưa nhiệt có khả năng làm giảm khối lượng bùn thải nhà máy giấy Bãi Bằng khi ủ ở 60°C (giảm đến 36% trọng lượng khô sau 8 ngày).

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ phát triển khoa học và công nghệ quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số: 106-NN.04-2014.53.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Ngô Thị Tường Châu**, 2013. Công nghệ sinh học môi trường, Nxb. Đại học Huế.
2. **Nguyễn Lâm Dũng, Phạm Thị Trân Châu, Nguyễn Thanh Hiền, Phạm Văn Ty**, 1978. Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học, Nxb. KHKT, Hà Nội, tập 2.
3. **Lê Văn Khoa, Lê Đức, Nguyễn Xuân Cự**, 2000. Phương pháp phân tích Đất-Nước-Phân bón-Cây trồng, Nxb. Giáo dục.
4. **U.S. Environmental Protection Agency**, 1993. Methods for microbiological analyses of sewage sludge.

RESEARCH ON THERMOPHILIC BACTERIA ISOLATED FROM SEWAGE SLUDGE OF BAI BANG PAPER MILL

NGO THI TUONG CHAU, LE VAN THIEN,
HOANG THI MY HANG, PHAM MINH HANG

SUMMARY

The strongly development of the socio-economy is one of reasons contributed the increasing amount of sewage sludge discharged into the environment. In Vietnam, the sewage sludge is primarily treated by dewatering, drying, disposal or burial. However, the sewage sludge disposal and burial have caused serious environmental pollution and been considered as a waste of resources. In present study, the physical, chemical and biological properties of sewage sludge from Bai Bang paper mill were determined and 11 thermophilic bacterial strains were isolated from the sludge. Of which, three strains with the highest ability to degrade organic compounds (cellulose, starch and protein) were selected. The structure of sludge was modified and its weight was decreased during incubation at 60°C obtained by a mixture of these selected thermophilic bacterial strains compared with control tests without bacteria. The solid fraction of sludge was decreased about 36% after 8 days of incubation.