

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
ĐẠI HỌC ĐÀ NẴNG**

**BÁO CÁO TÓM TẮT
ĐỀ TÀI KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ
CẤP ĐẠI HỌC ĐÀ NẴNG**

**NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT CHẾ PHẨM VI SINH CÓ HOẠT TÍNH XỬ
LÝ SULFATE TỪ CHỦNG VI KHUẨN *DESULFOVIBRIO* SP.
ĐƯỢC PHÂN LẬP TỪ PHÂN TRÂU BÒ**

MÃ SỐ: Đ2015-03-75

Chủ nhiệm đề tài: TS. Phạm Thị Mỹ

Đà Nẵng, 09/2016

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
ĐẠI HỌC ĐÀ NẴNG**

**BÁO CÁO TÓM TẮT
ĐỀ TÀI KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ
CẤP ĐẠI HỌC ĐÀ NẴNG**

**NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT CHẾ PHẨM VI SINH CÓ HOẠT TÍNH XỬ
LÝ SULFATE TỪ CHỦNG VI KHUẨN *DESULFOVIBRIO* SP.
ĐƯỢC PHÂN LẬP TỪ PHÂN TRẦU BÒ**

MÃ SỐ: Đ2015-03-75

Xác nhận của cơ quan chủ trì đề tài
(ký, họ và tên, đóng dấu)

Chủ nhiệm đề tài
(ký, họ và tên)

TS. Phạm Thị Mỹ

Đà Nẵng, 09/2016

NHỮNG THÀNH VIÊN THAM GIA NGHIÊN CỨU ĐỀ TÀI

TT	Họ và tên	Đơn vị công tác và lĩnh vực chuyên môn
1	TS. Bùi Xuân Đông	Khoa Hóa - Trường Đại học Bách Khoa, Đại học Đà Nẵng
2	ThS. Nguyễn Thị Lan Phương	Khoa Sinh – Môi Trường – Trường Đại học Sư phạm, Đại học Đà Nẵng

CÁC CHỮ VIẾT TẮT

SRB	: Sulphate Reducing Bacteria
Cyt C	: Cytochrome C
ATP	: Adenosine triphosphate
ADN	: Acid deoxyribonucleic
GC	: Guanine and Cytosine
PTN	: Phòng thí nghiệm
OD	: Mật độ quang học
CFU	: Colony-forming unit
VSV	: Vi sinh vật

ĐẠI HỌC ĐÀ NẴNG
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

THÔNG TIN KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Thông tin chung:

- Tên đề tài: **Nghiên cứu sản xuất chế phẩm vi sinh có hoạt tính xử lý sulfate từ chủng vi khuẩn *Desulfovibrio* sp. được phân lập từ phân trâu bò**

- Mã số: **Đ2015-03-75**

- Chủ nhiệm: TS. Phạm Thị Mỹ

- Thành viên tham gia: TS. Bùi Xuân Đông, ThS. Nguyễn Thị Lan Phương

- Cơ quan chủ trì: Trường Đại học Sư phạm– Đại học Đà Nẵng

- Thời gian thực hiện: từ 01 tháng 10 năm 2015 đến 30 tháng 09 năm 2016

2. Mục tiêu:

- Sản xuất được chế phẩm sinh học có hoạt tính xử lý sulfate từ chủng vi khuẩn *Desulfovibrio* sp. phân lập từ phân trâu, bò.

- Khảo sát khả năng xử lý nước nhiễm phen sắt ở quy mô phòng thí nghiệm (PTN)

3. Tính mới và sáng tạo:

Bước đầu phân lập được chủng vi khuẩn *Desulfovibrio* sp. có hoạt lực xử lý sulfate ở điều kiện của Việt Nam. Từ vi khuẩn phân lập được đã tiến hành sản xuất chế phẩm sinh học để thử nghiệm trong xử lý nước ở quy mô PTN. Kết quả thu được từ đề tài là tiền đề để nhóm nghiên cứu xây dựng phương pháp xử lý nước nhiễm sulfate và ion kim loại nặng ở quy mô lớn hơn.

4. Tóm tắt kết quả nghiên cứu:

Trong nghiên cứu này, nhóm nghiên cứu đã thu được những kết quả cơ bản sau đây:

1. Đã phân lập được chủng vi khuẩn có hoạt tính khử sulfate là *Desulfovibrio* sp. từ phân trâu, bò. Vi khuẩn đã được định danh tới chi dựa theo khóa phân loại Bergey (*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*), với một số đặc điểm như sau: vi khuẩn hình dấu phẩy; Gram âm; sinh trưởng tốt trên nguồn cơ chất là lactate; điều kiện môi trường thích ứng: pH thích hợp từ 6 - 8, tối ưu ở pH 7, phát triển ở nhiệt độ 30⁰C. Vi khuẩn có khả năng phát triển tốt ở nồng độ muối <5 g/l (trung

đương môi trường nước ngọt). Giống vi khuẩn *Desulfovibrio* sp. có thể được bảo quản bằng phương pháp giữ giống VSV trên môi trường thạch có lớp dầu khoáng.

2. Đã khảo sát và xác định được các thông số của quá trình lên men thu sinh khối *Desulfovibrio* sp. như sau: Môi trường dinh dưỡng là N92M₂; pH môi trường dinh dưỡng bằng 7; nhiệt độ nuôi cấy $t = 30 \pm 2^\circ\text{C}$; thời gian nuôi cấy $\tau = 72$ giờ; khuấy đảo trong suốt quá trình nuôi cấy trên máy lắc; mật độ tế bào ở thời điểm thu sinh khối đạt $9,5 \times 10^8$ CFU/ml canh trường.

3. Tạo chế phẩm vi sinh chứa vi khuẩn *Desulfovibrio* sp. có hoạt tính khử sulfate như sau: sinh khối sau khi thu hồi bằng phương pháp ly tâm, đã phối trộn với chất mang vô trùng (100% than bùn + 5% CaCO_3 + vi lượng) với tỉ lệ 10%

4. Đã khảo sát hiệu quả xử lý nước nhiễm phen sắt bằng chế phẩm sinh học chứa chủng vi khuẩn *Desulfovibrio* sp. ở quy mô PTN. Kết quả thí nghiệm cho thấy sau 8 ngày xử lý pH của mẫu nước nhiễm phen sắt tăng từ 3,8 lên 7,4; hàm lượng H_2S trong nước tăng lên gấp 2 lần chứng minh hàm lượng SO_4^{2-} đã giảm đi sau quá trình xử lý bằng vi khuẩn SRB. Bên cạnh đó H_2S có thể dễ dàng loại bỏ ra khỏi nước vì chúng ít tan trong nước (H_2S có liên kết cộng hóa trị không phân cực).

Kết quả nghiên cứu cũng chứng minh sau quá trình xử lý bằng vi khuẩn SRB hàm lượng ion sắt $[\text{Fe}^{2+}]$ giảm đi 2 lần. Điểm này giải thích bằng việc vi khuẩn SRB đã cố định ion Fe^{2+} và làm chúng lắng xuống bể UASB.

5. Tên sản phẩm:

- Sản phẩm ứng dụng:

500 gr chế phẩm vi sinh dạng khô chứa vi khuẩn *Desulfovibrio* sp. với mật độ $10-50 \cdot 10^7$ CFU/ml

- Sản phẩm khoa học:

Bài báo quốc tế:

Pham Thi My, Bui Xuan Dong, Nguyen Thi Lan Phuong (2015). *Physiological characteristics of the sulphate-reducing bacteria isolated from cattle manure*. Journal: European Applied Sciences (Germany). No: 09/2015. Pages: 52-55. Year 2015 (ISSN 2195-2183).

Bài báo trong nước:

Bùi Xuân Đông, Phạm Thị Mỹ, Trịnh Thị Mỹ Hạnh, Hà Ngọc Tuấn, Lê Thị Hoàng Linh, Thái Văn Kin, Nguyễn Thị Hoàng Yến (2015). *Khảo sát hiệu quả xử lý nước nhiễm phèn sắt bằng phương pháp sinh học*. Tạp chí Khoa học Công nghệ ĐHQĐN. Số: Số 9(94)-2015. Trang: 14-18 (ISSN 1859-1531)

6. Hiệu quả, phương thức chuyển giao kết quả nghiên cứu và khả năng áp dụng:

- *Hiệu quả về công tác giảng dạy:*

Cung cấp thông tin khoa học phục vụ công tác giảng dạy học phần Công nghệ vi sinh cho sinh viên ngành Công nghệ sinh học và kĩ thuật môi trường tại Trường Đại học Sư phạm và các trường thành viên của Đại học Đà Nẵng.

- *Kế hoạch chuyển giao kết quả nghiên cứu:*

Chế phẩm sinh học chứa vi khuẩn *Desulfovibrio* sp. có hoạt tính khử sulfate sau khi nhiệm vụ sẽ được đăng tải trên chợ trực tuyến: Chợ công nghệ và thiết bị Việt nam. <http://www.techmartvietnam.vn> nhằm quảng bá và thu hút nhà đầu tư.

Cơ quan Chủ trì
(ký, họ và tên, đóng dấu)

Ngày 10 tháng 09 năm 2016
Chủ nhiệm đề tài
(ký, họ và tên)

TS. Phạm Thị Mỹ

**UNIVERSITY OF EDUCATION
UNIVERSITY OF DANANG**

INFORMATION ON RESEARCH RESULTS

1. General information:

Project title: A study on the production of bioproduct possessing bioactivity of sulfate subtraction from *Desulfovibrio* sp. isolated from cattle manure

Code number: Đ 2015-03-75

Project Leader: PhD. Pham Thi My

Coordinator: PhD. Bui Xuan Dong, MSc. Nguyen Thi Lan Phuong

Implementing institution: University of education – University of Danang

Duration: from October 01st 2015 to Sept 30th 2016

2. Objective(s):

- Producing bio-compound with the ability of desulfurization from *Desulfovibrio* sp. isolated from cattle excrements
- Observing the treatment capability of polluted water that contaminated by $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ in experimental scale.

3. Creativeness and innovativeness:

Initially isolating *Desulfovibrio* sp. bacteria that could breakdown sulfate under Vietnamese conditions, then we produced bio-compound for water treatment in laboratory scale. The obtained outcome would be the premise for research team to design the treatment method of sulfate and heavy metal contaminated water in the large scale in the future.

4. Research results:

- Desulfurized *Desulfovibrio* sp. (named by *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*) bacteria was isolated from cattle excrements, having some following characteristics : the gram-negative bacteria are comma-shaped; it well grows in lactate medium; optimum pH 6 to 8 (best at 7), temperature at 30°C and salinity at <5g/l (as fresh water). *Desulfovibrio* sp. is conserved by solid medium cover with mineral oil layer.

- Fermentation parameters of *Desulfovibrio* sp.: medium N92M₂; pH 7; temperature $t = 30 \pm 2^\circ\text{C}$; duration $\tau = 72$ hours; stirring whole time; cell concentration at the optimum point was $9,5 \times 10^8$ CFU/ml.

- Bio-compound was made by the following technique: biomass was harvested by cold centrifugal then mixed with 10% of decontaminated carrier (100% peat : 5% CaCO₃; micronutrients).

- The effectiveness of water treatment using *Desulfovibrio* sp. bio-compound was observed in laboratory. As a result, after 8 days of treatment, pH increased from 3.8 to 7.4; H₂S concentration increased double, which proved that SO₄²⁺ concentration had decreased by using SRB process. Besides, H₂S could be removed easily from water because it is less-soluble in water.

In addition, the results also proved that Fe²⁺ reduced half of the initial concentration which means that SRB bacteria had immobilized Fe²⁺ and deposit sediment in UASB tank.

5. Products:

- Application product

Applicable product: 500 gram of the compound contain *Desulfovibrio* sp. bacteria with density of $10-50 \cdot 10^7$ CFU/ml

- Science product

International Journal:

Pham Thi My, Bui Xuan Dong, Nguyen Thi Lan Phuong (2015). *Physiological characteristics of the sulphate-reducing bacteria isolated from cattle manure*. Journal: European Applied Sciences (Germany). No: 09/2015. Pages: 52-55. Year 2015 (ISSN 2195-2183).

National Journal:

Bui Xuan Dong, Pham Thi My et all (2015). *Investigating treating efficiency water infected alum by biologic method*. Tạp chí Khoa học Công nghệ ĐHQĐN. Số: Số 9(94)-2015. Trang: 14-18 (ISSN 1859-1531).

6. Effects, transfer alternatives of research results and applicability:

- *Education:*

Providing applicable and accessible scientific reports, information for related subjects such as Micro-biotechnology and Environmental Technology at University of Education and others institutes of Danang's University.

- *Hand over the research results:*

The bio-compound contains desulfurized *Desulfovibrio* sp. bacteria would commercialize online at <http://www.techmartvietnam.vn> to get investment.

Danang, September 10th 2016

IMPLEMENTING INSTITUTION

PROJECT LEADER

ĐẶT VẤN ĐỀ

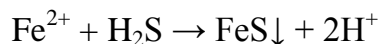
Nước là một nguồn tài nguyên vô cùng quý giá. Con người và các loài sinh vật đều cần nước để tồn tại. Trên trái đất, $\frac{3}{4}$ lãnh thổ là nước, nước trong các đại dương, ở biển, sông ngòi, ao hồ, nước ngầm ở trong lòng đất, tuy nhiên nguồn nước sạch không phải luôn luôn dồi dào như chúng ta vẫn nghĩ.

Tốc độ công nghiệp hoá và đô thị hoá nhanh cùng với sự gia tăng mạnh mẽ dân số, công thêm nhận thức của con người về vấn đề môi trường còn chưa cao... đã làm cho nguồn nước mặt đang ngày càng bị ô nhiễm một cách trầm trọng. Trong khi đó khí hậu đang biến đổi thất thường, nắng nhiều, sự bốc hơi nước cũng tăng lên theo là nguyên nhân của việc thiếu nước trầm trọng. Ở các khu vực miền núi, vùng sâu vùng xa, lượng nước mặt rất khan hiếm, người dân chủ yếu sử dụng nguồn nước ngầm để sinh hoạt và sản xuất. Một thực trạng đang diễn ra tại một số huyện của khu vực Đà Nẵng - Quảng Nam đó là nguồn nước ngầm bị nhiễm phen sắt nặng, gây ra những tác động xấu đến sinh hoạt, sản xuất của con người cũng như các vấn đề môi trường liên quan.

Các phương pháp chủ yếu được ứng dụng để xử lý nước thải nói chung và nước nhiễm phen sắt nói riêng là các phương pháp hóa - lý như khử bằng vôi, dùng tro bếp hay xử lý bằng các chất oxy hóa mạnh (Cl_2 , KMnO_4 , O_3) đi kèm với dùng hệ thống lọc nước... tuy nhiên các phương pháp này khá tốn kém và không an toàn, thường gây ra những vấn đề ô nhiễm thứ cấp. Trong những năm gần đây, sử dụng các chế phẩm VSV để xử lý nước thu hút được sự quan tâm của nhiều nhà khoa học và đạt được những thành công nhất định bởi ưu điểm sản xuất chế phẩm đơn giản mà lại cho hiệu quả sử dụng cao.

Một trong những chủng vi khuẩn được nhiều nhà khoa học quan tâm nghiên cứu ứng dụng trong công nghệ xử lý nước nhiễm phen sắt là chủng vi khuẩn khử sulfate *Desulfovibrio* sp., là vi khuẩn Gram âm, kỵ khí, không hình thành bào tử, tế bào là đơn vibrios có kích thước $0,5-0,7 \mu\text{m} \times 1,5-3 \mu\text{m}$. Vi khuẩn có hình dấu phẩy, duy chuyển nhờ tiên mao, có thể tìm thấy trong bùn đáy ao, trầm tích biển, trong các giếng khoan khai thác dầu khí, mỏ nước ngầm, trong ruột động vật, trong phân [23]... Phương pháp này dựa trên khả năng khử ion sulfate (SO_4^{2-}) đồng thời oxi hóa các hợp chất hữu cơ (lactate, acetate, ethanol, methanol) tạo ion sulfide (H_2S , HS^- ,

S²⁻) của vi khuẩn *Desulfovibrio* sp. Ion sulfide kết hợp với ion sắt hòa tan trong nước tạo kết tủa dưới dạng sulfide bền vững. Phản ứng loại bỏ sắt của vi khuẩn *Desulfovibrio* sp. sử dụng lactate được mô tả như sau:



Ưu điểm của phương pháp này là giá thành xử lý phù hợp, không tạo hóa chất tồn dư gây ô nhiễm thứ cấp, lượng cặn tạo ra từ kết tủa sulfide không đáng kể. Đây chính là tiền đề khoa học, là cơ sở để nghiên cứu thành công đề tài

“Nghiên cứu sản xuất chế phẩm vi sinh có hoạt tính xử lý sulfate từ chủng vi khuẩn *Desulfovibrio* sp. được phân lập từ phân trâu, bò”.

MỤC TIÊU ĐỀ TÀI

- Sản xuất được chế phẩm sinh học có hoạt tính xử lý sulfate từ chủng vi khuẩn *Desulfovibrio* sp. phân lập từ phân bò.
- Khảo sát khả năng xử lý nước nhiễm phen sắt của chế phẩm sinh học ở quy mô phòng thí nghiệm.

Ý NGHĨA CỦA ĐỀ TÀI

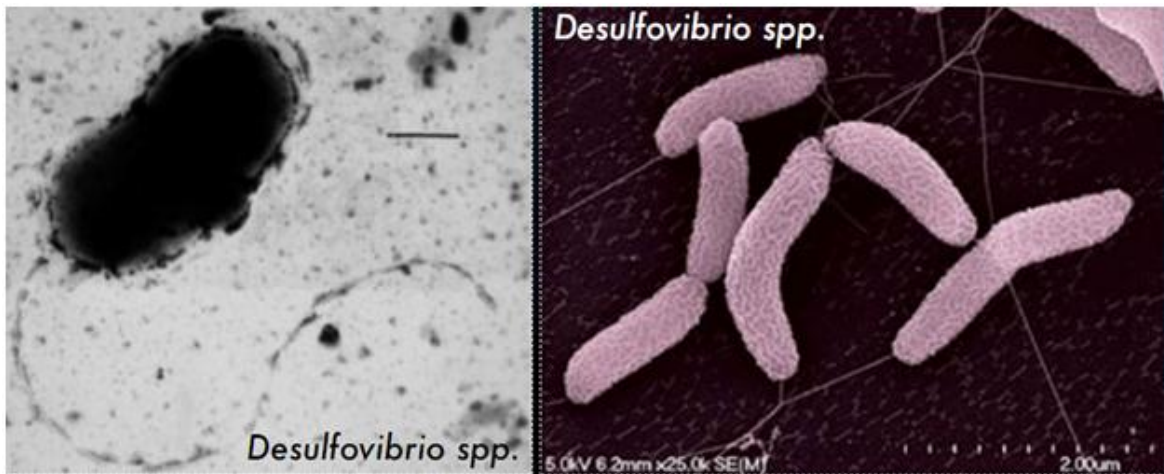
Về mặt khoa học, kết quả nghiên cứu của đề tài mang tính giáo dục cao, phù hợp với xu thế tích hợp những nội dung giáo dục bảo vệ môi trường qua dạy học các môn khoa học mà Bộ GD&ĐT đang triển khai ở các cấp học tiểu học và phổ thông hiện nay. Đó là việc giải quyết các vấn đề môi trường bằng biện pháp sinh học, lợi dụng khả năng phân giải các chất hữu cơ của vi sinh vật để ứng dụng vào xử lý nước theo xu hướng thân thiện với môi trường, thay vì sử dụng các biện pháp hóa học là giải pháp mang lại hiệu quả tức thời trước mắt nhưng lại gây ảnh hưởng lâu dài đến cân bằng hệ sinh thái cũng như sức khỏe con người và các loài động thực vật khác trong tự nhiên.

Về khía cạnh xã hội, kết quả nghiên cứu của đề tài nếu được ứng dụng sẽ nhận được sự hoan nghênh hưởng ứng của cộng đồng vì giải pháp này hướng tới mục tiêu phát triển bền vững, đảm bảo cân bằng giữa lợi ích của thế hệ hiện tại mà không làm tổn hại đến những ích lợi của các thế hệ tương lai.

CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU

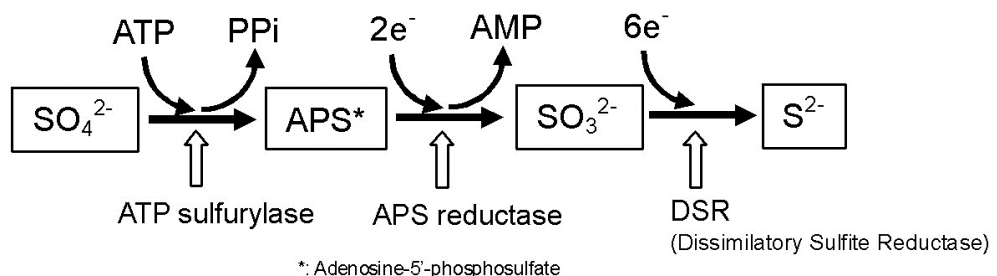
1.1. Sơ lược về vi khuẩn *Desulfovibrio* sp.

Desulfovibrio sp. thuộc nhóm vi khuẩn kỵ khí khử sulfate (Sulfate Reducing Bacteria – SRB) ưa ấm (20 – 40°C). Chúng là nhóm vi khuẩn kỵ khí nghiêm ngặt, gram âm, ưa ẩm, có kích thước tế bào khoảng 0,5-0,7 μm x 1,5-3 μm, hình dấu phẩy, oxy hóa không hoàn toàn các hợp chất hữu cơ với axetat là sản phẩm cuối cùng. Chúng được tìm thấy nhiều có trong đất, trong các vùng trầm tích, bùn lắng ở các đáy ao tù, cống rãnh, sông hồ, biển, trong các vùng có điều kiện sống khắc nghiệt như áp suất cao, nhiệt độ cao, độ mặn cao, hay môi trường quá kiềm, quá axit...và thậm chí tồn tại trong cả phân các loài động vật [2; 3].



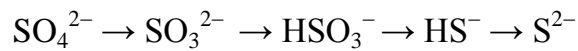
Hình 1.1: Đặc điểm hình thái của vi khuẩn *Desulfovibrio* sp.

Trong quá trình trao đổi chất để tăng sinh *Desulfovibrio* sp. thực hiện việc oxy hóa các chất hữu cơ có trong nước thải bằng cách sử dụng sulfate làm chất nhận điện tử cuối cùng. Sự khử sulfate thành sulfide tiêu thụ 8 điện tử và các quá trình sinh hóa thông qua nhiều bước trung gian với sự tham gia của nhiều enzyme [4; 5].



Hình 1.2: Quá trình khử sulfate thành sulfide

Phản ứng có thể được tóm tắt như sau:



1.2. Lược sử nghiên cứu về chủng vi khuẩn *Desulfovibrio* sp.

Nghiên cứu phân lập các chủng vi khuẩn khử sulfate, đặc biệt là chủng *Desulfovibrio* sp. được nhiều nhà khoa học trên thế giới cũng như trong nước quan tâm và là vấn đề có tính thời sự và ý nghĩa khoa học cao.

1.3. Chế phẩm vi sinh vật và các vấn đề liên quan

Desulfovibrio sp. là chủng vi khuẩn đóng vai trò quan trọng trong chu trình cacbon và lưu huỳnh cũng như tham gia bảo vệ môi trường. Trong quá trình trao đổi chất để tăng sinh *Desulfovibrio* sp. thực hiện việc oxy hóa các chất hữu cơ có trong nước thải bằng cách sử dụng sulfate làm chất nhận điện tử cuối cùng [3], nhờ đó mà giảm hàm lượng sulfate cũng như hấp thụ được các ion kim loại trong nước. Chính vì thế nghiên cứu công nghệ sản xuất chế phẩm vi sinh từ chủng vi khuẩn này là một vấn đề mang tính cấp thiết cao.

1.4. Tổng quan về nước nhiễm phèn sắt và các vấn đề liên quan

Phương pháp xử lý nước nhiễm phèn sắt bằng vi khuẩn SBR được dự đoán có giá thành xử lý phù hợp, không tạo hóa chất tồn dư gây ô nhiễm thứ cấp, lượng cặn tạo ra từ kết tủa sulfide không đáng kể. Vì thế, trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành khảo sát hiệu quả xử lý nước sinh hoạt bị nhiễm phèn sắt ở địa bàn xã Hòa Nhơn, Hòa Vang, Đà Nẵng bằng chế phẩm vi sinh từ chủng vi khuẩn khử sulfate được phân lập từ phân gia súc.

CHƯƠNG 2: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu, hóa chất và các thiết bị sử dụng

2.1.1. Vật liệu

- Phân bố nhận tại khu vực Hòa Nhơn – Hòa Vang – Đà Nẵng.
- Mẫu nước thải để làm giàu vi khuẩn được thu nhận từ kênh Phú Lộc – Hòa Minh – Đà Nẵng.
- Mẫu nước bị nhiễm phen sắt trên địa bàn Hòa Vang – Đà Nẵng.
- Chế phẩm vi sinh thu nhận được từ chủng vi khuẩn *Desulfovibrio* sp.
- Mô hình khảo sát khả năng xử lý nước bị nhiễm phen sắt ở quy mô phòng thí nghiệm.

2.1.2. Thiết bị, dụng cụ và hóa chất sử dụng để nghiên cứu

a) Thiết bị

Trong nghiên cứu này sử dụng một số thiết bị chính sau:

Bảng 2.1: Các loại thiết bị sử dụng chính

STT	Tên thiết bị	Model	Nhà sản xuất	Xuất xứ
1	Cân phân tích	AUY220	Shimadu	Nhật
2	Máy đo pH	MP220	pH Metter	Thụy Sĩ
3	Bếp đun	HP-2100	Gali electric	Trung Quốc
4	Tủ cấy vô trùng	ESCO SMART CONTROL	Esco MicroPte.Ltd	Australia
5	Tủ âm	INB500	Memmert	Đức
6	Kính hiển vi quang học	CX31RTSS	Olympus	Phillipine
7	Nồi hấp (Autoclave)	CL-40L	ALP	Nhật
8	Máy cất nước một lần	2104	GFL	Đức
9	Tủ mát	LC-300D	Alaska	Nhật

Và các thiết bị thông dụng khác trong phòng thí nghiệm Vi hóa sinh và Công nghệ sinh học.

b) Dụng cụ

- Đĩa petri, ống nghiệm, bình tam giác 250 ml, lọ penicillin, lọ serum, ống đong 100 ml và 200 ml, cốc thủy tinh 100 ml và 250 ml.
- Bình tia chứa nước vô trùng, bình xít chứa cồn 90⁰.
- Que cấy: que cấy vòng, que trang...
- Đèn cồn, bật lửa, eppendorf.
- Bông thấm nước và bông không thấm nước.
- Giấy báo, giấy kit nylon, găng tay, khẩu trang, viết.

c) Hóa chất

Để thực hiện các thí nghiệm trong nghiên cứu chúng tôi sử dụng các hóa chất chính như:

- Nước cất vô trùng, cồn 70⁰ và cồn 90⁰
- Thuốc nhuộm Gram: gồm dung dịch tím kết tinh (Crystal violet), dung dịch iốt, dung dịch tẩy màu Etanol, dung dịch nhuộm bổ sung Safranin.
- Thuốc thử 1,10-Phenantrolin.
- Các hóa chất như: BaCl₂, KI, Na₂S₂O₃, NaOH, HCl, hồ tinh bột, hoá chất pha các loại môi trường...

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Làm giàu và khảo sát sơ bộ sự hiện diện của vi khuẩn khử sulfat trong phân bò

a) Thí nghiệm làm giàu

Vi khuẩn khử sulfat (SRB) trong mẫu phân bò thu thập về được làm giàu bằng cách cấy vào bình serum chứa môi trường dịch thể nước ngọt (nước kênh Phú Lộc) với tỷ lệ 10%, nuôi trong tủ ấm 30°C. Các lần cấy truyền tiếp theo được tiến hành sau mỗi 5 – 7 ngày nuôi cấy theo tỷ lệ 10% thể tích. Qua mỗi lần cấy truyền, số lượng SRB trong mẫu được tăng lên.

b) Thí nghiệm nhận biết sự xuất hiện của khí H₂S

- Nhận biết bằng cảm quan thông qua mùi của khí thoát ra.
- Nhận biết bằng hóa chất: dùng dung dịch SO₂.

2.2.2. Phân lập chủng vi khuẩn khử sulfat

Mẫu làm giàu lần 2 được dùng để phân lập vi khuẩn SRB.

Thành phần môi trường N92M₁ dùng để phân lập vi khuẩn SRB.

Điều kiện kỵ khí được tạo ra bằng cách sử dụng túi Anaerocult A[®] (Merck)

Bảng 2.2: Thành phần môi trường N92M₁ [44]

STT	Thành phần	Số lượng	Đơn vị
1	K ₂ HPO ₄	0,5	g
2	NH ₄ Cl	15	g
3	CaCl ₂	0,1	g
4	KCl	0,5	g
5	MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,5	g
6	Na ₂ SO ₄	1,0	g
7	NaHCO ₃	0,5	g
8	Axit thioglycolic	0,1	g
9	FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,5	g
10	Axit ascobic	0,1	g
11	Chiết xuất nấm men	0,5	ml
12	Axit lactic (40%)	1	ml
13	Nước cất	800	ml
14	Nước biển	200	ml
15	Agar	1,5 -2	%

Môi trường được chỉnh ở pH 7 -7,2; tiệt trùng ở 121⁰C, lấy ra ở 80⁰C. Phân phối môi trường vào các đĩa petri ở điều kiện vô trùng.

Cấy mẫu làm giàu (10%) vào đĩa petri và nuôi trong điều kiện kỵ khí.

Khuẩn lạc đơn phát triển được chuyển sang môi trường dịch thể N92M₂

Thành phần môi trường N92M₂ dùng để nuôi tăng sinh vi khuẩn.

Bảng 2.3. Thành phần môi trường N92M₂ [45]

STT	Thành phần	Số lượng	Đơn vị
1	K ₂ HPO ₄	0,2	g
2	NH ₄ Cl	0,3	g
3	NaCl	1,0	g
4	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,16	g
5	KCl	0,5	g
6	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,4	g
7	Na ₂ SO ₄	3,0	g
8	NaHCO ₃	1,0	g
9	Na ₂ S·9H ₂ O	0,3	g
10	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,4	g
11	Chiết xuất nấm men	0,1	ml
12	Axit lactic (40%)	1	ml
13	Nước cất	1000	ml

2.2.3. Phương pháp nhuộm Gram, quan sát hình thái khuẩn lạc dưới kính hiển vi quang học

2.2.4. Thử nghiệm tính di động của vi khuẩn

2.2.5. Xác định đặc điểm sinh lý của chủng vi khuẩn phân lập được

Để xác định được đâu là điều kiện tối ưu cho khả năng sinh trưởng của chủng vi khuẩn *Desulfovibrio* sp. các thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của nguồn cơ chất,

yếu tố môi trường như: nhiệt độ, pH, nồng độ muối và nguồn cơ chất đã tuân tự được thực hiện.

Nhiệt độ. Các chủng SRB thuần khiết được nuôi cấy trong môi trường dịch thể kỵ khí có pH = 7, ở các nhiệt độ: 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 37°C. Sinh trưởng của SRB được đánh giá thông qua xác định nồng độ sulfide và sinh khối (OD₆₀₀) theo thời gian.

pH. Chủng vi khuẩn thuần khiết được nuôi cấy trong môi trường dịch thể kỵ khí có pH khác nhau: pH 4, pH 5, pH 6, pH 7, pH 8 trong tủ ấm 30°C. Sinh trưởng của vi khuẩn được đánh giá thông qua xác định nồng độ sulfide và sinh khối (OD₆₀₀).

Độ muối. Chủng vi khuẩn thuần khiết được nuôi trong môi trường dịch thể kỵ khí ở pH 7, có độ muối khác nhau là 0, 1, 5, 10, 15, 20, 25 g/l, nuôi trong tủ ấm 30°C. Sinh trưởng của SRB được đánh giá thông qua xác định nồng độ sulfide và sinh khối (OD₆₀₀).

Nguồn cơ chất. Chủng vi khuẩn thuần khiết được nuôi cấy trong môi trường dịch thể kỵ khí có bổ sung các nguồn cơ chất khác nhau như lactate, acetate. Sinh trưởng của vi khuẩn được đánh giá thông qua xác định nồng độ sulfide.

2.2.6. Khảo sát đường cong sinh trưởng của *Desulfovibrio* sp.

a) Phương pháp đếm khuẩn lạc

b) Phương pháp định lượng tế bào bằng đo mật độ quang học

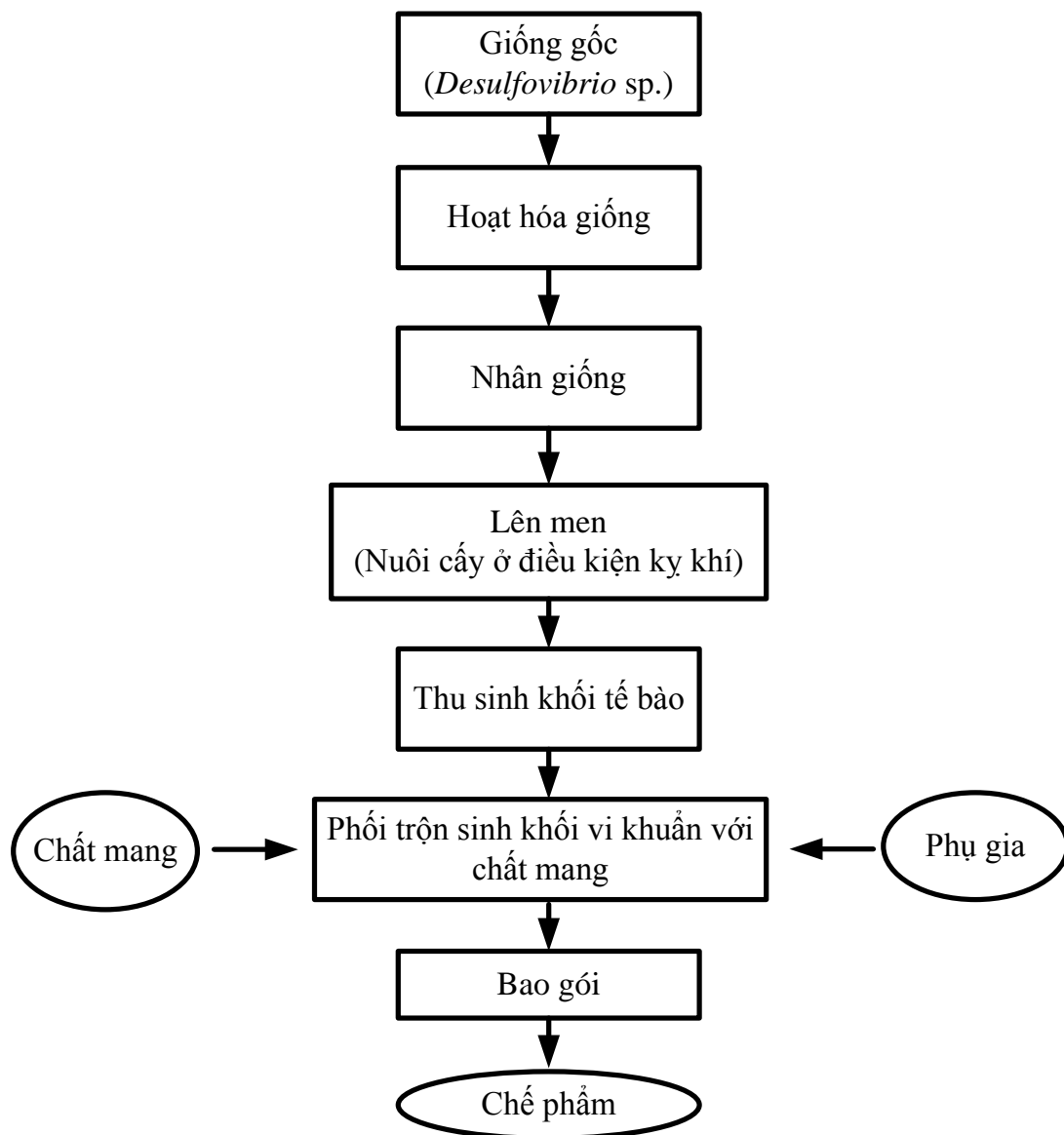
2.2.7. Phương pháp bảo quản giống vi sinh vật

2.2.8. Phương pháp sản xuất chế phẩm vi sinh từ chủng vi khuẩn khử sulfate

Công nghệ sản xuất chế phẩm sinh học từ chủng vi khuẩn *Desulfovibrio* sp. được tóm tắt theo sơ đồ sau (hình 2.1).

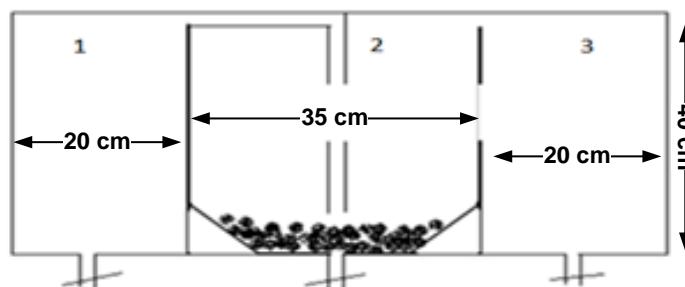
Trong nghiên cứu này chúng tôi lựa chọn chất mang cho chủng vi khuẩn *Desulfovibrio* sp. là than bùn và CaCO₃ bổ sung thêm vi lượng. Trước khi đưa vào sử dụng chất mang được hấp ở 121°C trong thời gian 20 phút để tiêu diệt các VSV có hại. Nhóm nghiên cứu thành lập 3 công thức phối trộn chất mang theo các tỉ lệ khác nhau và tiến hành khảo sát để tìm ra công thức tốt nhất sản xuất chế phẩm. Các công thức phối trộn như sau:

- NT1: 100% than bùn + 5 % CaCO₃+ vi lượng + 10% VSV
- NT2: 80% than bùn + 5 % CaCO₃+ vi lượng + 10% VSV
- NT3: 60% than bùn + 5 % CaCO₃+ vi lượng + 10% VSV



Hình 2.1: Quy trình công nghệ sản xuất chế phẩm sinh học từ chủng *Desulfovibrio sp.* mới phân lập

2.2.9. Lập mô hình khảo sát khả năng xử lý nước nhiễm phèn sắt của chế phẩm vi sinh từ chủng vi khuẩn *Desulfovibrio sp.*



Hình 2.2: Mô hình xử lý nước nhiễm phèn sắt trong phòng thí nghiệm

(1)- Bể điều hòa chứa nước nhiễm phèn sắt đầu vào; (2) Bể UASB xử lý nước nhiễm phèn sắt bằng chế phẩm sinh học từ chủng vi khuẩn *Desulfovibrio sp.*; (3) Bể lắng chứa nước đầu ra sau khi xử lý

Các thông số của bể UASB được thiết kế như trên hình 1 với tổng chiều dài của bể là 75cm, chiều rộng 40cm và chiều cao 40 cm.

Nước bị nhiễm phèn sắt được cho vào bể điều hòa số 1 để làm lắng một số cặn sỏi, cát có trong nước. Sau đó nước bị nhiễm phèn sắt được chuyển sang bể kỵ khí (UASB) số 2 có chứa sẵn chế phẩm sinh học từ chủng vi khuẩn *Desulfovibrio sp.*

2.2.10. Xác định sự thay đổi pH của mẫu nước nhiễm phèn sắt bằng máy đo pH (Hanna Hi 2210)

2.2.11. Phân tích hoá học

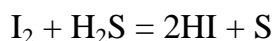
a) Định lượng sulfate [6]

Nguyên lý: SO_4^{2-} kết hợp với Ba^{2+} tạo kết tủa BaSO_4 theo phương trình: $\text{Ba}^{2+} + \text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{BaSO}_4$ kết tủa trắng. Hàm lượng sulfate được xác định thông qua hàm lượng chất kết tủa BaSO_4 tạo thành.

b) Xác định nồng độ sulfide [7]

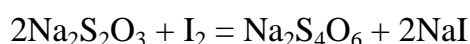
Nguyên lý

Dựa vào phản ứng oxi hóa khử giữa S^{2-} và I_2 khi cho một lượng dư iot đã biết trước thể tích và nồng độ vào trong mẫu nước có chứa H_2S .



Sau đó chuẩn độ ngược lượng dư iot bằng dung dịch natri thiosulfat

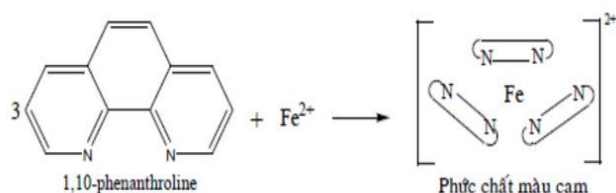
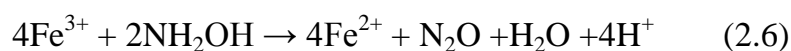
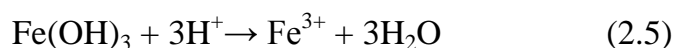
(Na₂S₂O₃) với chỉ thị hồ tinh bột.



c) Xác định nồng độ ion kim loại Fe bằng phương pháp trắc phổ dùng thuốc thử 1,10-phenantrolin [8].

Nguyên lý

Sắt bị khử thành dạng Fe²⁺ bằng cách đun sôi với acid và hydroxylamine sau đó được xử lý với 1,10-phenantrolin. Ba phân tử phenantrolin tạo hợp chất cồng của với mỗi một nguyên tử Fe²⁺ tạo thành phức chất có màu đỏ- cam.



Phức chất [Fe(phe)₃]²⁺ có độ hấp thụ cao nhất đo ở bước sóng (λ_{max}) 510nm, cường độ màu khá bền trong khoảng pH từ 2,5 đến 9 và màu sắc tỷ lệ với hàm lượng Fe(II).

Quan hệ giữa nồng độ sắt và độ hấp thụ là tuyến tính.

2.2.12. Phương pháp xử lý số liệu

Các thí nghiệm trong nghiên cứu được lặp lại tối thiểu 3 lần, kết quả đưa ra là trung bình hoặc có tính chất đại diện tốt nhất cho 3 lần thí nghiệm.

Trong một số thí nghiệm có số lần lặp lại cao hơn và số liệu được xử lý thống kê. Giá trị trung bình (mean) được tính theo phương trình sau:

$$x = \frac{\sum x_i}{n}$$

Trong đó, x – là giá trị trung bình của mẫu; x_i – là giá trị của phép đo thứ i; n-là tổng số lần đo hay xác định

CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Làm giàu và phân lập vi khuẩn khử sulfate (SRB) từ phân bò

3.1.1. Kết quả khảo sát sơ bộ sự hiện diện của vi khuẩn khử sulfate từ phân bò

Vi khuẩn khử sulfate có trong mẫu phân bò được làm giàu bằng cách cấy vào bình serum chứa môi trường dịch thể kỵ khí giàu chất hữu cơ với tỷ lệ 10%, nuôi trong tủ ấm 30⁰C. Dịch thể được sử dụng để làm giàu là nước thải trên kênh Phú Lộc, Đà Nẵng. Các lần cấy truyền tiếp theo được tiến hành sau 5 ÷7 ngày nuôi cấy theo tỷ lệ 10% thể tích.

Để khảo sát sự hiện diện của SRB nhằm rút ngắn quá trình phân lập nhóm nghiên cứu đã thực hiện thí nghiệm quan sát, cảm quan và xử lý bằng phản ứng hóa học với các mẫu được xử lý trong bình serum. Nhận thấy các hiện tượng như sau:

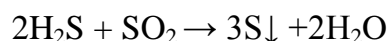
Đầu tiên, nhận thấy trong bình serum xuất hiện bọt khí, ngửi có mùi trứng thối của khí H₂S.

Tiếp đến, khi cho từ từ dung dịch SO₂ vào ống nghiệm có chứa dịch ủ của phân bò và nước thải giàu chất hữu cơ (sau 7 ngày ủ) thì dung dịch trong ống



Hình 3.1: Mẫu làm giàu

nghiệm xuất hiện kết tủa màu trắng đục và sau chuyển thành màu vàng nhạt của tinh thể lưu huỳnh. Sở dĩ có hiện tượng như vậy vì trong ống nghiệm đã xảy ra phản ứng hóa học sau:



Từ những quan sát trên đây đã chứng minh được trong bình serum đã xảy ra quá trình khử sulfate thành sulfide dưới sự hoạt động của vi khuẩn khử sulfate. Từ đó, nhóm nghiên cứu sử dụng mẫu nguyên liệu trong bình serum để phân lập vi khuẩn SRB.

3.1.2. Kết quả quá trình phân lập vi khuẩn

Trên cơ sở khảo sát sơ bộ, mẫu làm giàu lần 2 được sử dụng để phân lập vi khuẩn. Việc phân lập được tiến hành cấy trên đĩa thạch petri với môi trường N92M₁, sau 48h trên bề mặt đĩa thạch xuất hiện các loại khuẩn lạc (hình 3.2).



Hình 3.2: Hình thái các khuẩn lạc được cấy từ mẫu làm giàu

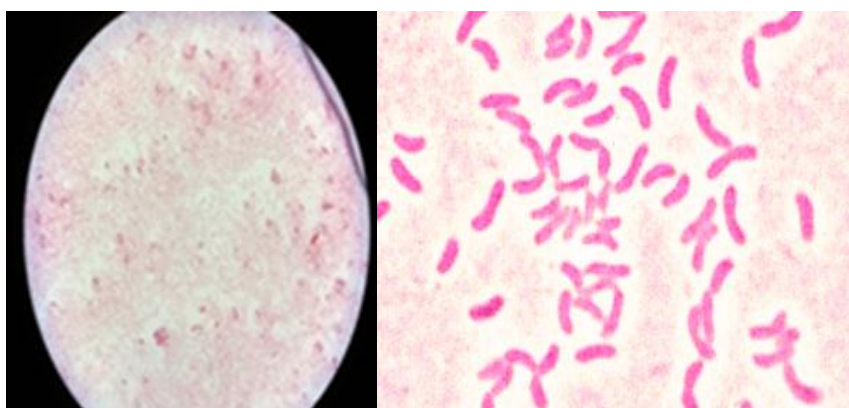
Quan sát hình thái các khuẩn lạc hình thành trong đĩa petri có xuất hiện khuẩn lạc đơn có đặc điểm hình thái như sau:

- Khuẩn lạc có hình dạng: tròn, nhỏ.
- Bề mặt khuẩn lạc xù xì, mép khuẩn lạc không đều.
- Màu sắc: khuẩn lạc có màu đen

Hình thái khuẩn lạc quan sát được có mô tả tương tự như kết quả nghiên cứu của tác giả Nguyễn Thị Thu Huyền (2011) [7] về vi khuẩn khử sulfate *Desulfovibrio sesulfiricans* ĐH3P ưa ẩm sử dụng dầu thô được phân lập từ giếng khoa dầu khí mỏ Đại Hùng, Vũng Tàu và tác giả Nguyễn Thị Hải (2012) [3] về các chủng vi khuẩn khử sulfate phân lập từ nước thải của các nhà máy khai thác khoáng sản.

3.1.3. Kết quả nhuộm Gram, quan sát hình thái tế bào dưới kính hiển vi

Để kiểm tra chủng vi khuẩn vừa phân lập được thuộc nhóm Gram (-) hay Gram (+), nhóm nghiên cứu sử dụng phương pháp nhuộm Gram và quan sát hình dạng tế bào dưới kính hiển vi quang học, thu được một số kết quả như hình 3.3 sau:



Hình 3.3: Kết quả nhuộm Gram vi khuẩn phân lập được

- Vi khuẩn sulfate (SRB) bắt màu đỏ tía với thuốc nhuộm Gram, chứng tỏ đây là vi khuẩn Gram (-).

- Hình thái tế bào: hình phẩy khuẩn.

Kết quả nhuộm Gram và hình thái tế bào vi khuẩn khử sulfat (SRB) quan sát được hoàn toàn phù hợp với kết quả năm 2012 của tác giả Nguyễn Thị Hải [3] trong nghiên cứu “*Phân lập vi khuẩn khử sulphate (SRB) để ứng dụng trong xử lý nước thải axit từ hoạt động khai thác khoáng sản*”, công bố trên Tạp chí Công nghệ Sinh học 6(7): 42 – 40, 2012

3.1.4. Kết quả kiểm tra khả năng di động của chủng vi khuẩn phân lập được

Để kiểm tra khả năng di động của chủng vi khuẩn vừa phân lập được, nhóm tác giả tiến hành sử dụng que cấy đầu nhọn để cấy mẫu vi khuẩn vào môi trường thạch mềm N92M₁ và đồng thời làm mẫu đối chứng với chủng *Lactobacillus casei* trong môi trường MRS (thành phần môi trường thể hiện ở phụ lục 1) để so sánh.

Kết quả quan sát hiện tượng trong ống nghiệm sau 2-3 ngày nuôi cấy chủng vi khuẩn phân lập được và mẫu đối chứng được thể hiện trong hình 3.4 a và 3.4 b.



Hình 3.4: Tính di động của vi khuẩn SRB (a) và *Lactobacillus casei* trong môi trường

Từ đặc điểm quan sát ở hình 3.4 nhóm nghiên cứu nhận thấy rằng:

+ Đối với mẫu chủng vi khuẩn vừa phân lập được (hình 3.4 a)

- Vi khuẩn làm đục môi trường.
- Vi khuẩn phát triển lan ra khỏi vết cấy.

+ Đối với mẫu đối chứng là vi khuẩn *Lactobacillus casei* (hình 3.4b)

- Môi trường không bị đục.
- Vi khuẩn phát triển quanh đường cấy.

Những đặc điểm được mô tả trên đây chứng minh rằng chủng vi khuẩn phân

lập được có khả năng di động nhờ sử dụng tiên mao.

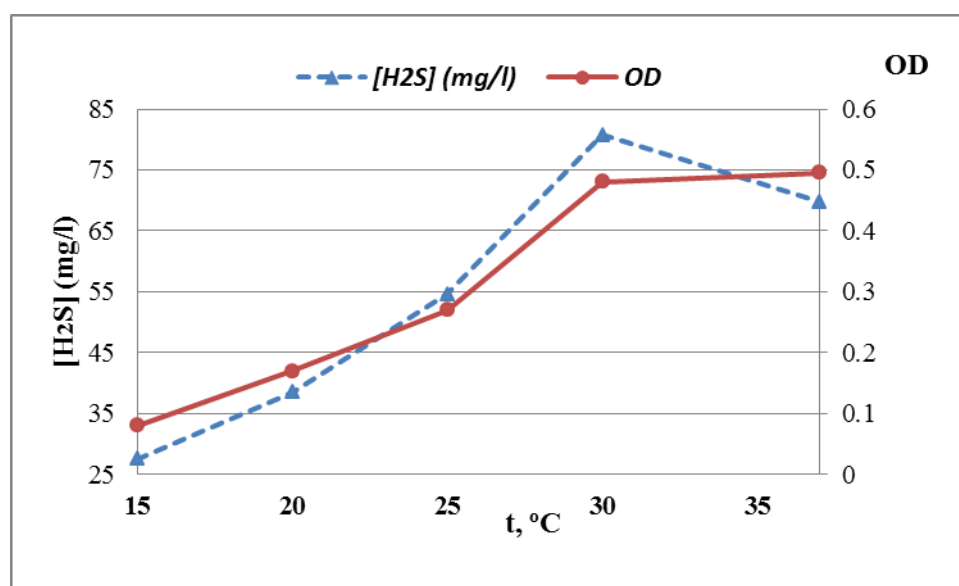
Từ những kết quả thu được qua quá trình phân tích trên, cho thấy vi khuẩn phân lập được từ phân bò thuộc chủng vi khuẩn khử sulfate (SRB). Điều này hoàn toàn phù hợp với các nghiên cứu về vi khuẩn khử sulfate đã công bố trong và ngoài nước [27; 35; 26; 17; 44; 6; 7; 3...].

3.1.5. Kết quả nghiên cứu đặc điểm sinh lý của chủng vi khuẩn khử sulfate vừa mới phân lập được

Với mục tiêu xác định được khả năng sử dụng chủng SRB mới phân lập trong các ứng dụng thực tế, chúng tôi tiến hành nghiên cứu các đặc điểm sinh lý của chúng. Cụ thể là, tiến hành khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố môi trường như: nhiệt độ, pH, nồng độ muối và nguồn cơ chất để xác định được đâu là điều kiện tối ưu cho khả năng sinh trưởng của vi khuẩn SRB vừa phân lập được. Sự sinh trưởng của chủng này trong các điều kiện khác nhau được đánh giá thông qua hàm lượng H_2S tạo thành (xác định bằng phương pháp chuẩn độ iốt).

a). Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ

Nhiệt độ là yếu tố có ảnh hưởng quan trọng đến sự sinh trưởng của vi khuẩn [46]. Thí nghiệm tiến hành trên môi trường dịch thể N92M₂ có bổ sung axit lactic làm nguồn cacbon, pH 7 và nuôi ở dải nhiệt độ 15 - 37°C. Kết quả thể hiện ở hình 3.5.



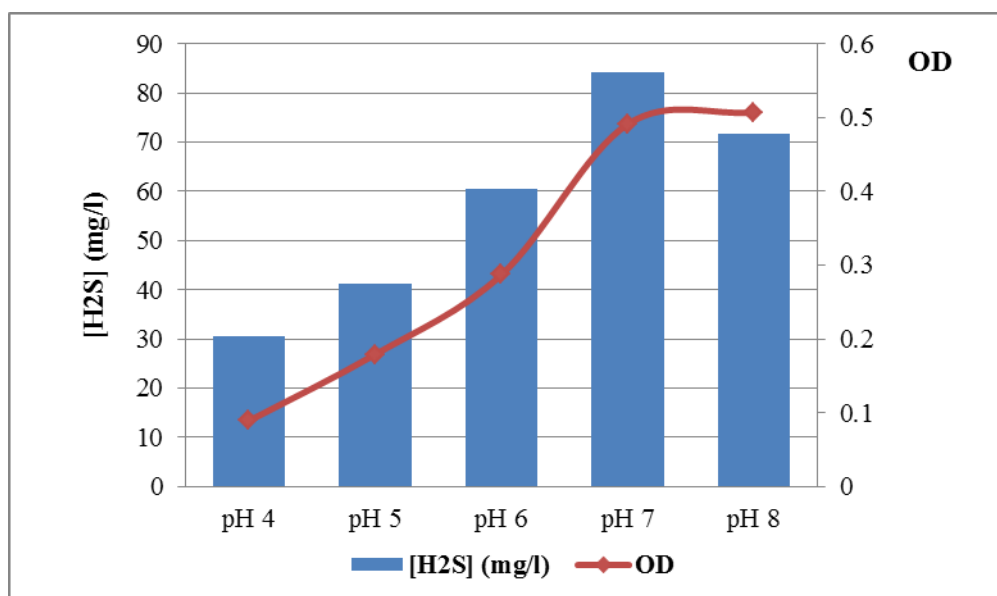
Hình 3.5: Ảnh hưởng của nhiệt độ lên mức tăng sinh và khả năng khử sulfate của chủng vi khuẩn phân lập được.

Kết quả nghiên cứu ở hình 3.5 cho thấy các chủng SRB mới phân lập đều sinh trưởng và tạo sulfide tốt trong vùng nhiệt độ từ 25 đến 37°C, cao nhất ở 30°C.

Như vậy, chủng SRB mới phân lập thuộc nhóm ưa ấm (mesophilic), là các vi khuẩn khử sulfate phổ biến nhất trong tự nhiên.

b) Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của pH môi trường

pH là yếu tố rất quan trọng không chỉ ảnh hưởng tới sinh lý của SRB mà còn quyết định khả năng ứng dụng của chúng trong việc xử lý nước thải. Thí nghiệm được tiến hành trên môi trường dịch thể N92M₂ có bổ sung axit lactic làm nguồn carbon, pH thay đổi trong khoảng từ 4 – 8, nuôi ở 30°C. Sự ảnh hưởng của pH được thể hiện qua hàm lượng H₂S sinh ra trong quá trình nuôi cấy và mật độ tế bào (OD) (hình 3.6).

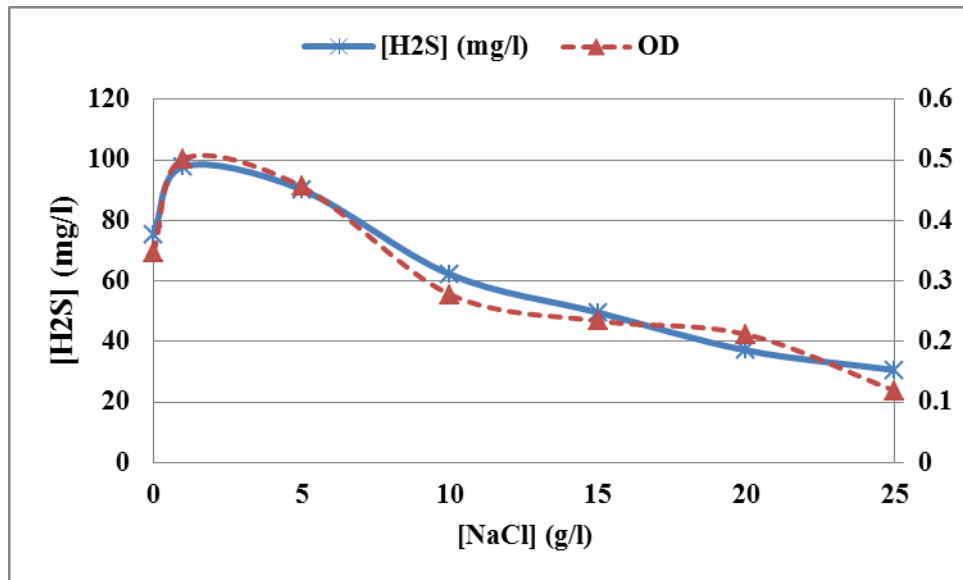


Hình 3.6: Ảnh hưởng của pH môi trường lên mức tăng sinh và khả năng khử sulfate của chủng vi khuẩn phân lập được

Kết quả cho thấy, chủng vi khuẩn tăng sinh và có hoạt tính khử sulfate cao nhất ở pH 7 và bị ức chế ở pH < 6. Điều này hoàn toàn phù hợp vì môi trường pH trung tính là môi trường thích hợp nhất đối với đa số vi khuẩn. Đối với vi khuẩn SRB, khoảng pH thích hợp nằm trong khoảng từ 6 – 9. Tuy nhiên, đối với từng loại SRB lại có pH thích hợp riêng. SRB ưa ấm có pH thích hợp nằm trong khoảng từ 6,8 – 7,5.

c) Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ muối

Độ mặn là một trong các yếu tố môi trường quan trọng ảnh hưởng đến sinh lý của vi khuẩn trong tự nhiên [1], do vậy chúng tôi tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ muối đến sinh trưởng và tốc độ khử sulfate thành sulfide đối với chủng SRB phân lập được (hình 3.7).



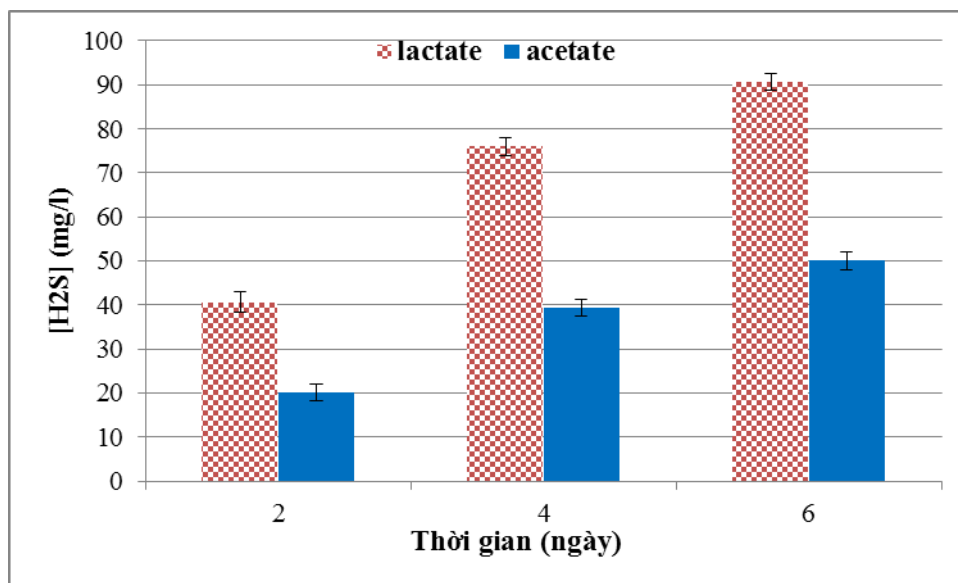
Hình 3.7: Ảnh hưởng của nồng độ muối lên mức tăng sinh và khả năng khử sulfate của chủng vi khuẩn phân lập được

Từ kết quả ở hình 3.7 cho thấy rằng chủng vi khuẩn vừa phân lập được tăng sinh tốt và thể hiện hoạt tính khử sulfate cao ở các nồng độ muối < 5g/l và đạt mức cao nhất tại nồng độ muối 1g/l. Khi tiếp tục tăng nồng độ muối > 5g/l thì cả hai đặc tính này đều giảm dần. Kết quả nghiên cứu này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Nguyễn Thị Hải và cộng sự (2012) [3] khi nghiên cứu chủng vi khuẩn *Desulfovibrio* sp. Đây cũng là một trong những yếu tố được sử dụng làm cơ sở để xác định chủng vi khuẩn mới phân lập được.

d) Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của nguồn cơ chất

Nguồn cơ chất thông thường nhất của SRB là các chất hữu cơ đơn giản được hình thành từ quá trình lên men yếm khí như các axit hữu cơ (axit lactic, axit acetic), rượu (methanol, ethanol) và hydro [35]. Để phân biệt khả năng oxy hóa hoàn toàn và không hoàn toàn ở chủng SRB mới phân lập, chúng tôi tiến hành thử nghiệm khả năng sinh trưởng của chúng với cơ chất là acetate so sánh với lactate. Thí nghiệm được tiến hành trên môi trường dịch thể N92M₂, và thay đổi nguồn cơ

chất lần lượt là axit lactic, axit acetic, pH 7, nuôi ở 30⁰C. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của cơ chất lên khả năng khử sulfate thành sulfide của chủng vi khuẩn phân lập được thể hiện hình 3.8:



Hình 3.8: Ảnh hưởng của nguồn cơ chất lên khả năng khử sulfate của chủng vi khuẩn mới phân lập

Khi nuôi cấy chủng vi khuẩn SRB trên môi trường có các nguồn cơ chất cacbon khác nhau, qua 6 ngày khảo sát ta thấy: hoạt tính khử sulfate thành sulfide của vi khuẩn SRB mạnh nhất trên môi trường có bổ sung lactate và tăng trưởng kém trên môi trường có acetate làm nguồn cơ chất. Kết quả thu được ở trên hoàn toàn phù hợp so với các nghiên cứu khác nhau trên thế giới về khả năng sử dụng lactate là nguồn cung cấp cacbon chính cho hoạt động của vi khuẩn khử sulfate [27; 35; 17...].

Từ các kết quả nghiên cứu trên đây nhóm tác giả tổng hợp được đặc điểm phân loại của chủng vi khuẩn mới phân lập được (bảng 3.1)

Đối chiếu các đặc điểm về hình thái, sinh lý, sinh hoá của chủng vi khuẩn mới phân lập được so với khoá phân loại Bergey (1989), chúng tôi thấy chủng vi khuẩn mới phân lập có đặc điểm giống với chi vi khuẩn *Desulfovibrio* sp. do Kluyver và cộng sự mô tả năm 1936.

Kết luận: Chủng vi khuẩn SRB vừa phân lập có tên phân loại là chủng vi khuẩn *Desulfovibrio* sp.

Bảng 3.1: Bảng tổng hợp đặc điểm phân loại của chủng vi khuẩn vừa phân lập

STT	Đặc điểm	Kết quả
1	Hình thái khuẩn lạc mọc trên đĩa thạch: - Hình dạng khuẩn lạc - Bề mặt khuẩn lạc - Màu sắc khuẩn lạc - Độ chắc của khuẩn lạc	- Tròn, nhỏ. - Xù xì, mép khuẩn lạc không gọn. - Khuẩn lạc có màu đen. - Mềm, có khả năng bám dính vào môi trường.
2	Nhuộm Gram	Vi khuẩn Gram (-)
3	Quan sát hình thái tế bào dưới kính hiển vi quang học.	- Hình phẩy khuẩn
4	Tính di động của vi khuẩn	Vi khuẩn có khả năng di động nhờ tiên mao.
5	Đặc tính sinh lý: - pH môi trường - Nồng độ muối - Nhiệt độ	- pH=6 ÷8, tối ưu ở khoảng pH=7 - Môi trường nước ngọt ([NaCl] < 5 g/l) - 30 ⁰ C
6	Đặc tính sinh hóa - Nguồn Cacbon - Chất nhận điện tử	- Sinh trưởng tốt trên nguồn cơ chất lactate - Sulfate, Thiosulfate

3.2. Kết quả khảo sát quá trình lên men

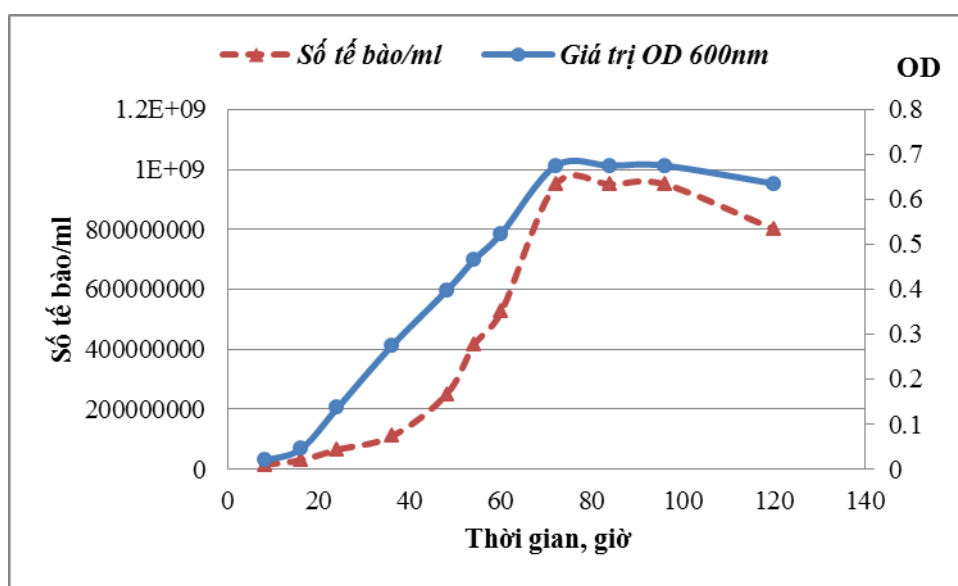
Trước khi đưa giống vào nuôi cấy, nhóm nghiên cứu tiến hành khảo sát thời gian nhân giống. Mục đích của việc nhân giống nhằm làm tăng số lượng tế bào VSV đáp ứng đủ lượng giống cần thiết để tiến hành lên men.

Nhóm nghiên cứu tiến hành nuôi chủng vi khuẩn *Desulfovibrio* sp. mới phân lập trên môi trường N92M₂ trong điều kiện tối ưu như sau: pH 7, t = 30±2°C, nguồn cơ chất lactate, nồng độ muối 1g/l. Để khảo sát thời gian nhân giống chúng tôi tiến hành định lượng tế bào bằng cách đo độ đục tế bào và đếm khuẩn lạc của dịch nhân giống ở các thời gian khác nhau. Kết quả nghiên cứu được thể hiện ở bảng 3.2.

Bảng 3.2. Kết quả đo độ đục và số lượng tế bào tại thời điểm khảo sát

Thời gian (giờ)	OD _{600nm}	Mật độ tế bào (CFU/ml)
8	0,019	$1,5 \times 10^7$
16	0,045	$3,0 \times 10^7$
24	0,136	$6,5 \times 10^7$
36	0,275	$1,1 \times 10^8$
48	0,397	$2,5 \times 10^8$
54	0,465	$4,15 \times 10^8$
60	0,524	$5,25 \times 10^8$
72	0,675	$9,5 \times 10^8$
84	0,675	$9,5 \times 10^8$
96	0,675	$9,5 \times 10^8$
120	0,635	$8,0 \times 10^8$

Từ kết quả đo độ đục nhóm nghiên cứu xây dựng được đường cong sinh trưởng của *Desulfovibrio* sp. ở hình 3.9.



Hình 3.9: Đường cong sinh trưởng của vi khuẩn *Desulfovibrio* sp. trong thời gian 120 giờ

Đường cong sinh trưởng của chủng vi khuẩn *Desulfovibrio* sp. cho thấy rằng sau 72 giờ thì nồng độ vi khuẩn ổn định và đạt giá trị cực đại ($9,5 \times 10^8$ CFU/ml) do đó chúng tôi đã chọn thời gian thích hợp nhất cho quá trình nhân giống là 72 giờ. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Tsuneishi N. và cộng sự [43].

Chủng vi khuẩn *Desulfovibrio* sp. sau khi nhân giống được chuyển vào thiết bị lên men để thực hiện quá trình lên men chìm trên môi trường N92M₂ với các điều kiện tối ưu đã xác định (pH 7, t = 30±2°C, nguồn cơ chất lactate, nồng độ muối 1g/l).

Dựa vào kết quả của đường cong sinh trưởng (hình 3.9) nhận thấy rằng sau thời gian nuôi cấy 3 ngày (72 giờ) sinh khối tế bào đạt giá trị cực đại nên nhóm nghiên cứu chọn thời gian thu sinh khối vi khuẩn là 3 ngày. Sinh khối tế bào vi khuẩn sau khi thu được đem đi ly tâm với tốc độ 5000 vòng/phút trong thời gian 20 phút.

3.3. Kết quả nghiên cứu lựa chọn chất mang và các phụ gia sinh học để sản xuất chế phẩm vi sinh từ chủng vi khuẩn *Desulfovibrio* sp.

Hiện nay các nước trên thế giới đều sản xuất loại chế phẩm VSV trên nền chất mang, trong đó sinh khối VSV được tẩm nhiễm vào chất mang là các hợp chất hữu cơ hoặc không hữu cơ, tự nhiên hoặc tổng hợp có tác dụng làm nơi trú ngụ và bảo vệ VSV chuyên tính trong chế phẩm từ khi sản xuất đến lúc sử dụng. Lựa chọn chất mang và các phụ gia phối trộn để sản xuất chế phẩm vi sinh là một khâu quan trọng để nâng cao hiệu quả của chế phẩm.

Trong nghiên cứu này chúng tôi lựa chọn chất mang cho chủng vi khuẩn *Desulfovibrio* sp. là than bùn, CaCO₃ bổ sung thêm vi lượng. Với tỷ lệ phối trộn chất mang khác nhau tổ hợp thành 3 nghiệm thức, trong điều kiện thí nghiệm như nhau, chúng tôi tiến hành định lượng tế bào vi khuẩn theo phương pháp đếm khuẩn lạc để chọn ra công thức tốt nhất sản xuất chế phẩm. Kết quả thí nghiệm được thể hiện trong bảng 3.3.

Bảng 3.3: So sánh số lượng tế bào vi khuẩn trong các nghiệm thức có cơ chất khác nhau

Nghiệm thức	Tỷ lệ phối trộn	Số lượng tế bào (CFU/ml)
NT1	100% than bùn + 5 % CaCO ₃ + vi lượng + 10% VSV	4,5x10 ⁸
NT2	80% than bùn + 5 % CaCO ₃ + vi lượng + 10% VSV	2,5x10 ⁸
NT3	60% than bùn + 5 % CaCO ₃ + vi lượng + 10% VSV	6,2x10 ⁷

Kết quả bảng 3.3. cho thấy rằng tỉ lệ phối trộn chất mang khác nhau ảnh hưởng rất lớn đến mật độ tế bào vi khuẩn trên một đơn vị khối lượng. Nghiệm thức NT3 cho giá trị nhỏ nhất ($6,2 \times 10^7$ CFU/ml) và ở NT1 tỉ lệ sống sót và sinh trưởng của chủng *Desulfovibrio* sp. là mạnh nhất ($4,5 \times 10^8$ CFU/ml). Chính vì thế nhóm nghiên cứu quyết định chọn NT1 làm công thức sản xuất chế phẩm vi sinh.

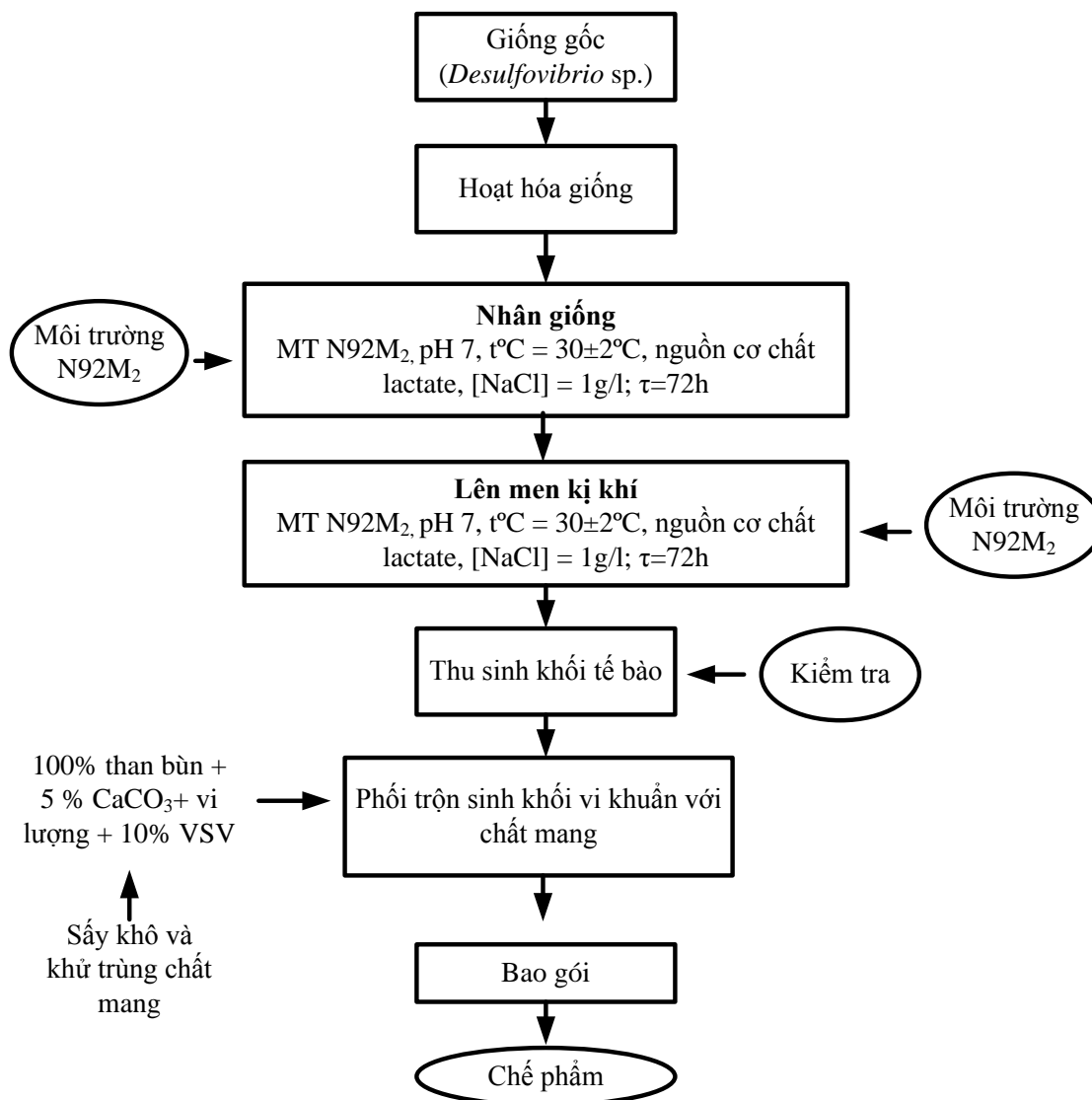
Chế phẩm sau khi được bao gói sẽ được bảo quản ở nhiệt độ $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Để xác định thời gian bảo quản của chế phẩm nhóm nghiên cứu tiến hành khảo sát mật độ tế bào vi khuẩn của chế phẩm.

Bảng 3.4: Kết quả khảo sát thời gian bảo quản của chế phẩm vi sinh

	0 tháng	1 tháng	2 tháng	3 tháng	4 tháng
Mật độ tế bào (CFU/ml)	$4,5 \times 10^8$	8×10^7	$8,5 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$	$2,5 \times 10^4$

Dựa vào kết quả khảo sát mật độ tế bào vi khuẩn trong chế phẩm theo thời gian (bảng 3.4) nhận thấy rằng sau 3 tháng tỉ lệ sống sót của vi khuẩn trong chế phẩm thấp hơn mức giới hạn ($2,5 \times 10^4$ CFU/ml) do đó chế phẩm vi sinh giảm giá trị sử dụng. Chính vì vậy mà chế phẩm tạo ra từ chủng vi khuẩn *Desulfovibrio* sp. có thời gian sử dụng là 3 tháng

Quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh từ chủng vi khuẩn *Desulfovibrio* sp. được mô tả theo sơ đồ sau:



Hình 3.10: Quy trình công nghệ sản xuất chế phẩm sinh học từ chủng *Desulfovibrio sp.* được phân lập từ phân bò

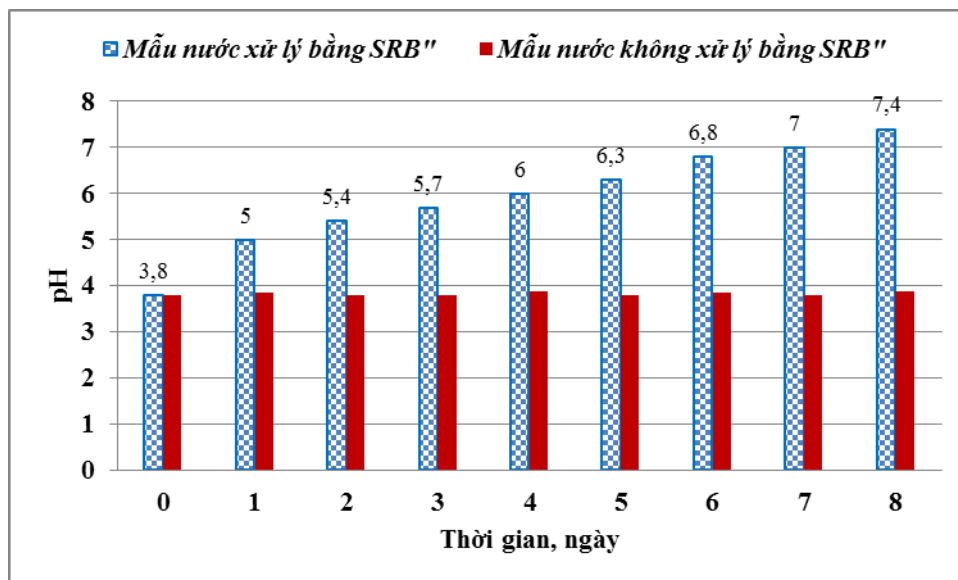
3.4. Kết quả khảo sát khả năng xử lý nước nhiễm phèn sắt của vi khuẩn khử sulfate kỵ khí

Để thử khả năng khử sulfate của chế phẩm sinh học vừa sản xuất nhóm nghiên cứu tiến hành khảo sát khả năng xử lý nước nhiễm phèn sắt ở quy mô phòng thí nghiệm.

3.4.1. Kết quả sự thay đổi pH của nước nhiễm phèn sắt theo thời gian

Mẫu nước nhiễm phèn sắt thu được tại xã Hòa Nhơn, Hòa Vang, Đà Nẵng trước khi đem đi xử lý thì được tiến hành khảo sát tính chất. Kết quả khảo sát tính chất nước nhiễm phèn sắt như sau: pH = 3,8, nồng độ sắt $[Fe^{2+}] = 57 \text{ mg/l}$; hàm

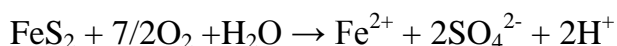
lượng H₂S [H₂S]= 45.7mg/l. Sau đó mẫu nước được đưa vào xử lý theo mô hình (hình 2.2). Sau 8 ngày khảo sát khả năng xử lý nước bị nhiễm phen sắt bằng chế phẩm sinh học từ chủng vi khuẩn SRB với mật độ khoảng 4,5x10⁸ (CFU/ml) ở quy mô phòng thí nghiệm nhận thấy sự thay đổi pH của mẫu nước như sau (hình 3.11).



Hình 3.11: Sự thay đổi pH của nước nhiễm phen qua 8 ngày xử lý

Như chúng ta đã biết, nước bị nhiễm phen là nước có pH thấp. Kết quả nghiên cứu của các nhà khoa học cho thấy acid trong nước phen ở khu vực này là sulphuric acid, được hình thành khi các khoáng sulfide (như pyrite, FeS₂) trong quặng tiếp xúc với oxy và nước [8].

Quá trình oxy hóa khoáng sulfide:



Đặc điểm của nước bị nhiễm phen sắt: nước có hàm lượng ion Fe²⁺ cao, nước có mùi tanh và có nhiều cặn bản màu vàng.

Vi khuẩn SRB thực hiện trao đổi chất, oxy hóa các chất hữu cơ sử dụng sulfate làm chất nhận điện tử cuối cùng [35]. Sự khử sulfate thành sulfide tiêu thụ 8 điện tử và các quá trình sinh hóa thông qua nhiều bước trung gian với sự tham gia của nhiều enzyme [26; 31]. Phản ứng có thể được tóm tắt như sau [40]:



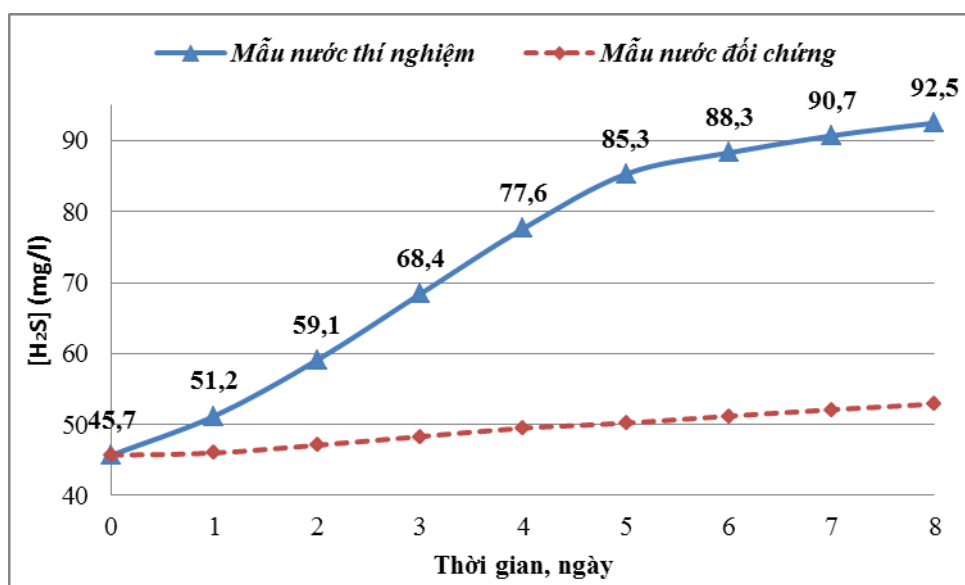
Kết quả từ hình 3.11 cho thấy giá trị pH trong của mẫu nước nhiễm phen sắt sau 8 ngày xử lý bằng chủng vi khuẩn SRB đã thay đổi từ 3,8 lên 6,8 sau 6 ngày và

đạt giá trị 7,4 sau 8 ngày. Trong khi đó giá trị pH trong bể đối chứng thay đổi không đáng kể.

Như vậy, giá trị pH của nước nhiễm phen sắt sau khi được xử lý bằng chủng vi khuẩn SRB nằm trong khoảng trung tính (7-7,4), thích hợp cho mục đích phục vụ sinh hoạt của người dân.

3.4.2. Kết quả thay đổi hàm lượng sulfate theo thời gian

Cùng với sự thay đổi pH của mẫu nước nhiễm phen sắt, trong quá trình xử lý hàm lượng sulfate cũng biến đổi theo thời gian. Chúng tôi tiến hành khảo sát thay đổi hàm lượng sulfate thông qua việc xác định hàm lượng khí H₂S hòa tan trong hệ thống xử lý nước thải được sinh ra qua 8 ngày xử lý (hình 3.12).

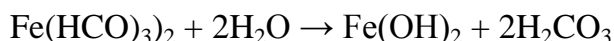


Hình 3.12: Sự thay đổi hàm lượng H₂S của nước nhiễm phen sắt qua 8 ngày xử lý

Kết quả từ hình 3.12 cho thấy, sau 8 ngày xử lý bằng chủng vi khuẩn SRB hàm lượng H₂S tăng gấp 2 lần (từ 45,7 mg/l đến 92,5 mg/l). Trong khi đó, ở mẫu nước đối chứng – mẫu nước xử lý không dùng vi khuẩn SRB thì hàm lượng H₂S tăng lên không đáng kể (từ 45,7 mg/l lên 52,9 mg/l). Nguyên nhân của sự tăng hàm lượng H₂S là do vi khuẩn SRB sử dụng sulfate làm chất nhận điện tử cuối cùng để oxy hóa các hợp chất hữu cơ và tận thu năng lượng cho mục đích sinh trưởng. Trong quá trình đó khí H₂S được sinh ra. Kết quả nghiên cứu trên đây hoàn toàn phù hợp với các công trình nghiên cứu của các nhà khoa học trong nước và trên thế giới [3; 45].

3.4.3. Kết quả sự thay đổi nồng độ ion sắt trong nước nhiễm phèn sau 8 ngày xử lý

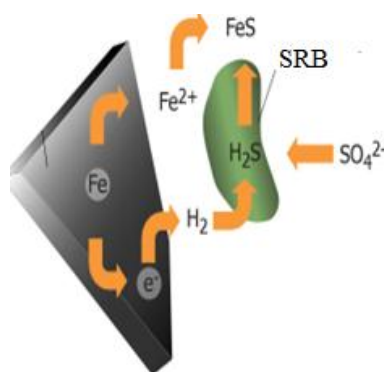
Nguyên nhân chủ yếu của nước ngầm nhiễm phèn là do hàm lượng ion sắt trong nước ngầm quá cao, và phân bố không đồng đều giữa các lớp trầm tích dưới đất sâu. Trong nước ngầm sắt thường tồn tại ở dạng ion, sắt có hóa trị 2 (Fe^{2+}) là thành phần của các muối hòa tan. Sắt (II) bicacbonat là một muối không bền, nó dễ dàng thủy phân thành sắt (II) hydroxyt theo phản ứng sau:



Nếu trong nước có oxy hòa tan, sắt (II) hydroxyt sẽ bị oxy hoá thành sắt (III) hydroxyt theo phản ứng sau: $4\text{Fe}(\text{OH})_2 + 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2 \rightarrow 4\text{Fe}(\text{OH})_3 \downarrow$

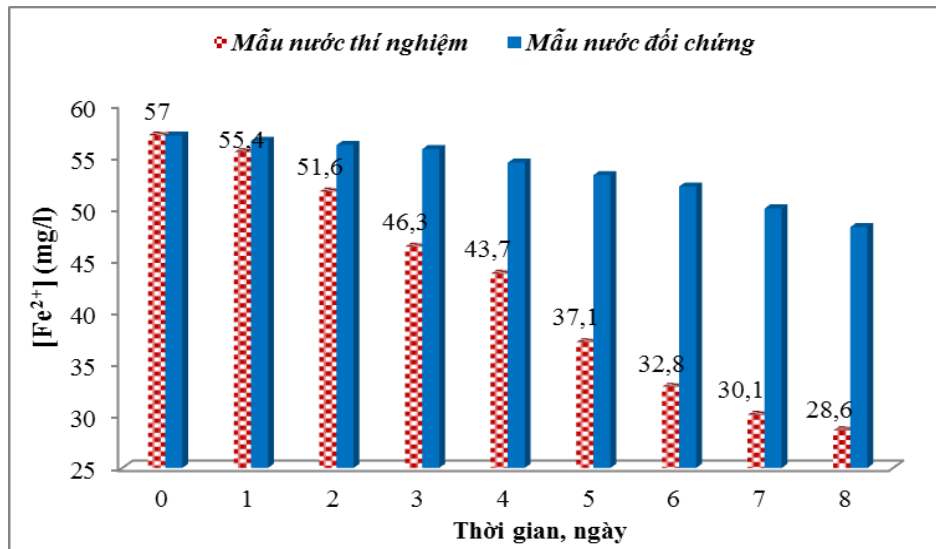
Hàm lượng sắt trong nước cao sẽ tạo ra mùi tanh khó chịu và có nhiều cặn bẩn màu vàng gây ảnh hưởng xấu đến chất lượng nước ăn uống, sinh hoạt và sản xuất, làm vàng quần áo khi giặt, làm hư hỏng các sản phẩm của ngành dệt may, giấy, phim ảnh, đồ hộp và làm giảm tiết diện vận chuyển nước của đường ống vì cùng với nước cứng sắt có một hợp chất không tan sẽ đóng cặn lên bên trong đường ống...[8]

Trong quá trình xử lý nước nhiễm phèn sắt vi khuẩn SRB khử ion sulfate (SO_4^{2-}) đồng thời oxi hóa các hợp chất hữu cơ (lactate, acetate, ethanol, methanol) tạo ion sulfide (H_2S , HS^- , S^{2-}) của vi khuẩn SRB. Ion sulfide kết hợp với ion sắt hòa tan trong nước tạo kết tủa dưới dạng sulfide bền vững [29; 36] (hình 3.13).



Hình 3.13: Quá trình tạo FeS bằng vi khuẩn SRB

Sự thay đổi hàm lượng ion sắt trong nước nhiễm phèn sắt sau 8 ngày xử lý được thể hiện ở đồ thị sau (hình 3.14)



Hình 3.14: Sự thay đổi hàm lượng ion sắt trong nước nhiễm phen sắt sau 8 ngày xử lý

Theo kết quả nghiên cứu ở đồ thị hình 3.14 nhận thấy rằng, sau 8 ngày xử lý bằng chủng vi khuẩn SRB, hàm lượng ion sắt trong mẫu nước thí nghiệm giảm từ 57 mg/l xuống còn 28,6 mg/l (giảm 2 lần). Trong khi đó, ở mẫu nước đối chứng (không xử lý bằng VSV) thì hàm lượng ion sắt giảm từ 57 mg/l đến 48,2 mg/l, nguyên nhân chủ yếu dẫn đến sự giảm này là có thể do hàm lượng ion sắt bị giữ lại trong bể điều hòa. Tuy nhiên, hàm lượng ion sắt trong mẫu thí nghiệm giảm mạnh hơn. Điều này chứng minh được hiệu quả xử lý nước nhiễm phen bằng vi khuẩn SRB. Vi khuẩn SRB đã cố định các ion sắt và làm lắng xuống đáy bể. Như vậy để loại bỏ sắt chỉ cần thu hồi cặn lắng và đem đi xử lý để thu hồi sắt ở dạng có thể sử dụng.

3.5. Bảo quản giống *Desulfovibrio* sp. trong môi trường thạch có lớp dầu khoáng

Với mục đích hạn chế hay đình chỉ sự trao đổi chất, sự sinh sản và phát triển...của vi khuẩn SRB trong các điều kiện môi trường khác nhau cần phải tiến hành bảo quản sao cho giống vẫn giữ được nguyên tính chất, đặc điểm hình thái và đặc biệt là hoạt lực của nó trong thời gian dài.

Sử dụng phương pháp giữ giống vi khuẩn SRB trên môi trường thạch có lớp dầu khoáng. Giống được giữ trong tủ lạnh ở điều kiện nhiệt độ 4÷5⁰C.



Hình 3.15: Giữ giống vi khuẩn trên môi trường thạch có lớp dầu khoáng

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Trong nghiên cứu này, nhóm nghiên cứu đã thu được những kết quả cơ bản sau đây:

1. Đã phân lập được chủng vi khuẩn có hoạt tính khử sulfate là *Desulfovibrio* sp. từ phân gia súc. Vi khuẩn đã được định danh tới chi dựa theo khóa phân loại Bergey (*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*) với một số đặc điểm như sau: vi khuẩn hình dấu phẩy; Gram âm; sinh trưởng tốt trên nguồn cơ chất là lactate; điều kiện môi trường thích ứng: pH thích hợp từ 6 - 8, tối ưu ở pH 7, phát triển ở nhiệt độ 30°C. Vi khuẩn có khả năng phát triển tốt ở nồng độ muối <5 g/l (tương đương môi trường nước ngọt). Giống vi khuẩn *Desulfovibrio* sp. có thể được bảo quản bằng phương pháp giữ giống VSV trên môi trường thạch có lớp dầu khoáng.

2. Đã khảo sát và xác định được các thông số của quá trình lên men thu sinh khối *Desulfovibrio* sp. như sau: Môi trường dinh dưỡng là N92M₂; pH môi trường dinh dưỡng bằng 7; nhiệt độ nuôi cấy $t = 30 \pm 2^\circ\text{C}$; thời gian nuôi cấy $\tau = 72$ giờ; khuấy đảo trong suốt quá trình nuôi cấy trên máy lắc; mật độ tế bào ở thời điểm thu sinh khối đạt $9,5 \times 10^8$ CFU/ml canh trường.

3. Tạo chế phẩm vi sinh chứa vi khuẩn *Desulfovibrio* sp. có hoạt tính khử sulfate và ion kim loại như sau: sinh khối sau khi thu hồi bằng phương pháp ly tâm lạnh, đã phối trộn với chất mang vô trùng (100% than bùn + 5% CaCO₃ + vi lượng) với tỉ lệ 10%

4. Đã khảo sát hiệu quả xử lý nước nhiễm phen sắt bằng chế phẩm sinh học chứa chủng vi khuẩn *Desulfovibrio* sp. ở quy mô PTN. Kết quả thí nghiệm cho thấy sau 8 ngày xử lý pH của mẫu nước nhiễm phen sắt tăng từ 3,8 lên 7,4; hàm lượng H₂S trong nước tăng lên gấp 2 lần chứng minh hàm lượng SO₄²⁺ đã giảm đi sau quá trình xử lý bằng vi khuẩn SRB. Bên cạnh đó H₂S có thể dễ dàng loại bỏ ra khỏi nước vì chúng ít tan trong nước (H₂S có liên kết cộng hóa trị không phân cực).

Kết quả nghiên cứu cũng chứng minh sau quá trình xử lý bằng vi khuẩn SRB hàm lượng ion sắt [Fe²⁺] giảm đi 2 lần. Điểm này giải thích bằng việc vi khuẩn SRB đã cố định ion Fe²⁺ và làm chúng lắng xuống bể UASB.

KIẾN NGHỊ

Trong nghiên cứu tiếp theo nhóm nghiên cứu định hướng một số hướng nghiên cứu như sau:

1. Phân tích trình tự gen 16S rRNA: gen 16S rRNA của chủng phân lập trên được khuếch đại trong phản ứng PCR để xây dựng được cây phân loài và định danh được chủng vi khuẩn khử sulfate thuộc chi *Desulfovibrio* vừa phân lập được.

2. Khảo sát khả năng sinh độc tố của vi khuẩn SRB và chứng minh tính an toàn của chúng đối với sức khỏe con người nhằm đưa chế phẩm SRB vào ứng dụng trong thực tế

3. Nghiên cứu công nghệ sấy sinh khối vi sinh vật thu hồi được từ quá trình lên men để sản xuất chế phẩm vi sinh.

4. Thử nghiệm xử lý các ion kim loại nặng và sulfate của chủng *Desulfovibrio* sp. trên các mẫu nước thải thực tế.