



Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ
website: sj.ctu.edu.vn



ẢNH HƯỞNG CỦA MÔI TRƯỜNG ĐẾN HIỆU SUẤT ĐÔNG TỤ CỦA VI KHUẨN TRONG NƯỚC THẢI TRẠI CHĂN NUÔI HEO Ở ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG

Hồ Thanh Tâm¹ và Cao Ngọc Diệp²

¹ Trường Cao đẳng Cần Thơ

² Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 10/03/2014

Ngày chấp nhận: 30/06/2014

Title:

Environmental factors affecting coaggregation efficiency of bacteria in piggery wastewater in the Mekong Delta, Vietnam

Từ khóa:

Cation tối ưu, nước thải chăn nuôi heo, sự đông tụ, vi khuẩn đông tụ

Keywords:

aggregation, bacteria aggregation, optimal cation, piggery wastewater

ABSTRACT

Four aggregation bacteria strains *Bacillus cereus* KG.05, *Bacillus megaterium* VL.01; *Bacillus sp.* VL.05, *Bacillus aryabhattai* ST.02 were isolated and selected from one hundred fifty piggery wastewater samples of anaerobic digester collected in 13 provinces of the Mekong Delta. From the results of physicochemical methods for the bacterial strain linked with each pair (*Bacillus cereus* KG.05+ *Bacillus megaterium* VL.01), (*Bacillus cereus* KG.05+*Bacillus sp.* VL.05), (*Bacillus cereus* KG.05+ *Bacillus aryabhattai* ST.02) và (*Bacillus megaterium* VL.01+*Bacillus sp.* VL.05) and based on hydrophobic surfaces of cells and pH together with elements (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^{+} , K^{+}) in the environment, coaggregation efficiency of bacteria was determined. The results identified environmental elements affected the performance aggregation process of wastewater treatment optimal value at $\text{pH}=7$ and cation valence I (K^{+}) at a concentration of 30 mM, and cation valence II (Mg^{2+}) at a concentration of 20 mM had aggregated performance >70%. Through which, showed that best pairs of selected strains representing *Bacillus cereus* KG.05+ *Bacillus megaterium* VL.01 microbial community aggregation in piggery wastewater after treatment biogas in the Mekong Delta.

TÓM TẮT

Bốn chủng vi khuẩn đông tụ *Bacillus cereus* KG.05, *Bacillus megaterium* VL.01; *Bacillus sp.* VL.05, *Bacillus aryabhattai* ST.02 được phân lập và tuyển chọn trong 150 mẫu nước thải trại chăn nuôi heo đã qua phân hủy kỵ khí, thu được ở 13 tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long. Dựa vào tính kỵ nước trên bề mặt tế bào, chỉ số pH và nồng độ các cation (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^{+} , K^{+}) trong môi trường để xác định hiệu suất đông tụ của bốn cặp chủng vi khuẩn này (*Bacillus cereus* KG.05+ *Bacillus megaterium* VL.01), (*Bacillus cereus* KG.05+*Bacillus sp.* VL.05), (*Bacillus cereus* KG.05+*Bacillus aryabhattai* ST.02) và (*Bacillus megaterium* VL.01+ *Bacillus sp.* VL.05). Kết quả xác định được yếu tố tương quan trong môi trường ảnh hưởng đến hiệu suất đông tụ trong quá trình xử lý nước thải tối ưu nhất ở $\text{pH} = 7$ và cation hóa trị I (K^{+}) ở nồng độ 30 mM, và cation hóa trị II (Mg^{2+}) ở nồng độ 20 mM cho hiệu suất đông tụ >70%. Qua đó, chọn được cặp chủng vi khuẩn *Bacillus cereus* KG.05 + *Bacillus megaterium* VL.01 đại diện cho 4 cặp chủng vi khuẩn đông tụ để xử lý nước thải chăn nuôi heo sau biogas ở Đồng bằng sông Cửu Long.



1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Ở Việt Nam, đặc biệt là Đồng bằng sông Cửu Long, chăn nuôi heo là nghề đã có từ lâu, ngày nay nhu cầu tiêu thụ thịt heo ngày càng tăng đã thúc đẩy nghề chăn nuôi heo được phát triển và mở rộng với quy mô lớn tại các cơ sở chăn nuôi. Bên cạnh đó là sự phát sinh lượng nước thải rất lớn làm ô nhiễm môi trường. Vấn đề này được khắc phục bằng nhiều biện pháp: sinh học, hóa lý, cơ học,... Trong đó, biện pháp sinh học được sử dụng rộng rãi do có nhiều ưu điểm: an toàn, dễ thực hiện, giá thành rẻ,... (Cao Ngọc Diệp *et al.*, 2012). Đặc biệt là biện pháp ủ yếm khí (biogas) được nhiều người áp dụng, ngoài việc cải thiện tình trạng ô nhiễm còn có thể thu khí metan làm nhiên liệu (Nguyễn Thị Hồng và Phạm Khắc Liệu, 2012). Những lợi ích do công nghệ yếm khí ủ biogas đem lại là không thể phủ nhận, tuy nhiên các chỉ tiêu ô nhiễm vẫn còn ở mức khá cao, vì thế việc tiếp tục xử lý nước thải chăn nuôi heo sau biogas là cần thiết.

Quá trình kết tụ sinh học của các dòng vi khuẩn trong hệ thống bùn hoạt tính, màng sinh học tỏ ra có hiệu quả khi được đưa vào quy trình làm sạch nước thải chăn nuôi heo sau biogas bằng cách gom tụ, kết dính các vật chất lơ lửng có kích thước nhỏ. Nhưng có nhiều nghiên cứu gần đây cho thấy các dòng vi khuẩn chiếm ưu thế lại không có khả năng kết tụ, chúng có một cơ chế riêng ít được nói đến, trong đó quần thể vi khuẩn có khả năng đông tụ lại có tỉ lệ cao (Malik *et al.*, 2003; Malik and Kakii, 2003; Malik *et al.*, 2005). Đông tụ là sự kết dính giữa các tế bào vi khuẩn với nhau (cell to cell) và dính với các hạt vô cơ, hữu cơ lơ lửng và các vi khuẩn khác trong môi trường tạo thành khối nhầy, bên ngoài là tế bào vi khuẩn, bên trong là các vật chất lơ lửng. Các hạt lơ lửng cũng là nguồn dinh dưỡng giúp cho vi khuẩn phát triển và tăng sinh khối, cuối cùng khối nhầy lớn dần rồi từ từ lắng xuống đáy. Kết quả nước sáng màu, giảm lượng ô nhiễm, các huyền phù lắng xuống, nước được làm sạch. Vai trò của sự đông tụ là góp phần tạo thành bùn hoạt tính hay giữ vai trò quan trọng trong quá trình hình thành màng sinh học ứng dụng xử lý nước thải (Malik *et al.*, 2003; Kimchhayarasy *et al.*, 2009).

Thành phần cation, chỉ số pH trong môi trường có ảnh hưởng rất lớn đến quá trình sống, sinh trưởng và hoạt động của vi khuẩn nói chung, đặc biệt là vi khuẩn có vai trò xử lý nước thải trong đó có vi khuẩn đông tụ (Lương Đức Phẩm, 2009). Vì vậy, việc nghiên cứu ảnh hưởng của các yếu tố môi trường (pH, điều kiện cation tối ưu) đến hiệu suất

đông tụ trong xử lý nước thải là rất cần thiết và đóng vai trò thiết thực cho việc xử lý nước thải chăn nuôi heo sau biogas ở Đồng bằng sông Cửu Long bằng công nghệ sinh học với hiệu suất cao.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vi khuẩn

Bốn chủng vi khuẩn có hiệu suất đông tụ cao được phân lập và tuyển chọn trong 150 mẫu nước thải trại chăn nuôi heo sau biogas ở Đồng bằng sông Cửu Long: *Bacillus cereus* KG.05, *Bacillus megaterium* VL.01; *Bacillus* sp. VL.05, *Bacillus aryabhattai* ST.02 (Hồ Thanh Tâm và Cao Ngọc Diệp, 2013) được bảo quản trong ống trữ mẫu có môi trường polypepton lỏng và glycerol, ủ trong tủ ở nhiệt độ (-20°C) tại phòng thí nghiệm vi sinh môi trường, Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học- Trường Đại học Cần Thơ.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Xác định yếu tố pH ảnh hưởng đến hiệu suất đông tụ

Chuẩn bị dịch vi khuẩn: mỗi chủng vi khuẩn được nuôi trong môi trường polypepton lỏng với thể tích bằng 250 ml, được đặt trên máy lắc 120 vòng/phút, ở nhiệt độ 30°C, nuôi trong 24 giờ (Hồ Thanh Tâm và Cao Ngọc Diệp, 2013), mật số vi khuẩn đạt $>10^9$ CFU/ml đã được xác định bằng phương pháp đếm sống nhỏ giọt (Hoben và Somasegaran, 1982). Dịch vi khuẩn được ly tâm 11.000 vòng/phút trong 10 phút để lấy sinh khối. Sinh khối được rửa 2 lần với dung dịch muối (3 mM NaCl + 0,5 mM CaCl₂) và được hòa tan trong 250 ml dung dịch muối (3 mM NaCl + 0,5 mM CaCl₂), tỷ lệ 1:1. Ly tâm nhẹ (650 vòng/phút trong 2 phút) dịch huyền phù vi khuẩn vừa hòa tan để loại bỏ các tế bào tự đông tụ, chuyển 50% (125 ml) dịch huyền phù ở phía trên ống ly tâm qua bình tam giác có dung tích 150 ml. Dịch huyền phù được điều chỉnh OD₆₆₀ = 0,3, pH được điều chỉnh lần lượt ở các giá trị là 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 cho mỗi lần thực hiện thí nghiệm (Kimchhayarasy *et al.*, 2009).

Phối hợp từng cặp chủng vi khuẩn: Mỗi chủng vi khuẩn lấy 20 ml dịch huyền phù đã chuẩn bị ở trên (tỷ lệ 1:1) cho vào bình tam giác có dung tích 150 ml, đặt trên máy lắc có tốc độ 120 vòng/phút, ở 30°C, lắc liên tục trong 6 giờ (Hồ Thanh Tâm và Cao Ngọc Diệp, 2013). Lấy 1,5 ml dịch huyền phù của mỗi cặp chủng vi khuẩn đã phối hợp để đo OD₆₆₀ (OD₀), phần huyền phù còn lại để yên 10 phút, sau đó hút 2,0 ml dịch huyền phù ở phía trên

cho vào tube eppendorf, ly tâm nhẹ trong 2 phút. Hút lấy 1,5 ml dịch huyền phù phía trên tube eppendorf vừa ly tâm để đo OD₆₆₀ (OD_s). Hiệu suất đông tụ của cặp chủng vi khuẩn được tính bằng công thức:

$$HS (\%) = \frac{OD_0 - OD_s}{OD_0} \times 100 \quad (\text{Kimchhayarasy et al., 2009}).$$

*OD₀: OD dịch huyền phù cặp chủng vi khuẩn trước ly tâm nhẹ

*OD_s: OD dịch huyền phù cặp chủng vi khuẩn sau ly tâm nhẹ

2.2.2 Xác định yếu tố cation Ca²⁺, Mg²⁺, K⁺, Na⁺ ảnh hưởng đến hiệu suất đông tụ

Chuẩn bị dịch vi khuẩn, bố trí thí nghiệm tương tự như thí nghiệm trên, nhưng sinh khối vi khuẩn được thu, rửa và hòa tan trong các dung dịch muối lần lượt là muối CaCl₂, MgCl₂, KCl, NaCl ở các nồng độ lần lượt là 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100 mM cho mỗi lần thực hiện thí nghiệm. pH được điều chỉnh ở giá trị tối ưu nhất của thí nghiệm trên vừa xác định.

Phối hợp từng cặp chủng vi khuẩn và tính hiệu suất đông tụ như thí nghiệm trên.

Tất cả các thí nghiệm được thực hiện hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại.

Bảng 1: Hiệu suất đông tụ của 4 cặp vi khuẩn (KG.05+VL.05); (KG.05+VL.01); (KG.05+ST.02); (VL.05+VL.01) qua các chỉ số pH = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9

pH	Hiệu suất đông tụ (%) (KG.05+VL.05)	Hiệu suất đông tụ (%) (KG.05+VL.01)	Hiệu suất đông tụ (%) (KG.05+ST.02)	Hiệu suất đông tụ (%) (VL.01+VL.05)
3	33 ^f	29 ^f	25 ^g	26 ^e
4	42 ^e	44 ^d	44 ^e	32 ^d
5	52 ^d	52 ^c	56 ^d	49 ^c
6	57 ^b	61 ^b	61 ^b	58 ^b
7	72 ^a	76 ^a	74 ^a	70 ^a
8	54 ^c	60 ^b	58 ^c	49 ^c
9	34 ^f	37 ^e	30 ^f	27 ^e

* Các chữ ở trên đầu các số ở cùng một cột khác nhau sẽ khác biệt có ý nghĩa thống kê mức 1%

Kết quả nghiên cứu này phù hợp với kết quả của Min et al., (2010); Kimchhayarasy et al., (2009) cho thấy các chủng vi khuẩn đông tụ hoạt động được ở môi trường có pH dao động từ 3-9 và tối ưu nhất là pH=7. Kết quả Bảng 1 cho thấy 4 cặp chủng vi khuẩn đông tụ thực hiện thí nghiệm đều hoạt động có hiệu suất đông tụ cao ở pH=7 và tối ưu nhất là cặp *Bacillus cereus* KG.05+ *Bacillus megaterium* VL.01. Các chủng vi khuẩn đông tụ thích nghi tốt ở môi trường trung tính (pH=7). Khi ở môi trường acid cao (pH=3) hay bazơ cao

2.3 Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng phần mềm thống kê SPSS 16, so sánh sự khác biệt có ý nghĩa thống kê bằng phép thử DUNCAN và LSD ở mức độ 1%, phần mềm Statgraphic 4.0 để phân tích mối tương quan giữa các yếu tố môi trường ảnh hưởng đến hiệu suất đông tụ.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Ảnh hưởng của pH đến hiệu suất đông tụ của vi khuẩn

Bốn cặp chủng vi khuẩn (*Bacillus cereus* KG.05 + *Bacillus megaterium* VL.01), (*Bacillus cereus* KG.05 + *Bacillus* sp. VL.05), (*Bacillus cereus* KG.05 + *Bacillus aryabhattai*) và (*Bacillus megaterium* VL.01+ *Bacillus* sp. VL.05) được thực hiện thí nghiệm lần lượt qua các dung dịch có pH là 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9. Kết quả cho thấy vi khuẩn đông tụ được phân lập từ 150 mẫu nước thải tại khu vực Đồng bằng sông Cửu Long sống trong môi trường pH giới hạn từ 3 đến 9. Tuy nhiên, khả năng tạo sự đông tụ có hiệu suất cao (hiệu suất ≥57%) ở giá trị pH dao động từ 6 đến 8 và tối ưu nhất là pH = 7. Qua thống kê cho thấy giá trị pH=7 của 4 cặp chủng vi khuẩn thực hiện thí nghiệm đều có hiệu suất đông tụ từ 70 – 76% và khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1% so với 6 giá trị pH còn lại của từng cặp chủng vi khuẩn thực hiện thí nghiệm (Bảng 1).

(pH=9), vi khuẩn đông tụ hoạt động kém hiệu quả (hiệu suất đông tụ <40%). Bởi vì pH trong môi trường có ảnh hưởng đến điện tích trên bề mặt các protein ở màng ngoài của tế bào vi khuẩn, qua đó tác động đến sự kết dính giữa các tế bào vi khuẩn, làm thay đổi hiệu suất đông tụ, vì một trong các cơ chế tạo sự đông tụ đã được chứng minh dựa vào liên kết giữa protein lectin của tế bào này với oligosaccharide của tế bào kia (Malik et al., 2003). Theo Ryan và Russell, (2013) sự chênh lệch điện tích do pH sẽ làm ảnh hưởng đến sự tương tác định

hướng của protein và oligosaccharide không còn đặc hiệu. Vì vậy, pH của môi trường có tác động rất lớn đến sự thích nghi và khả năng hoạt động của các chủng vi khuẩn đông tụ. Như vậy, với khoảng pH của nước thải chăn nuôi heo sau biogas ở Đồng bằng sông Cửu Long dao động từ 6 – 8 thì vi khuẩn đông tụ cũng có thể hoạt động tốt để cho hiệu suất cao nhất.

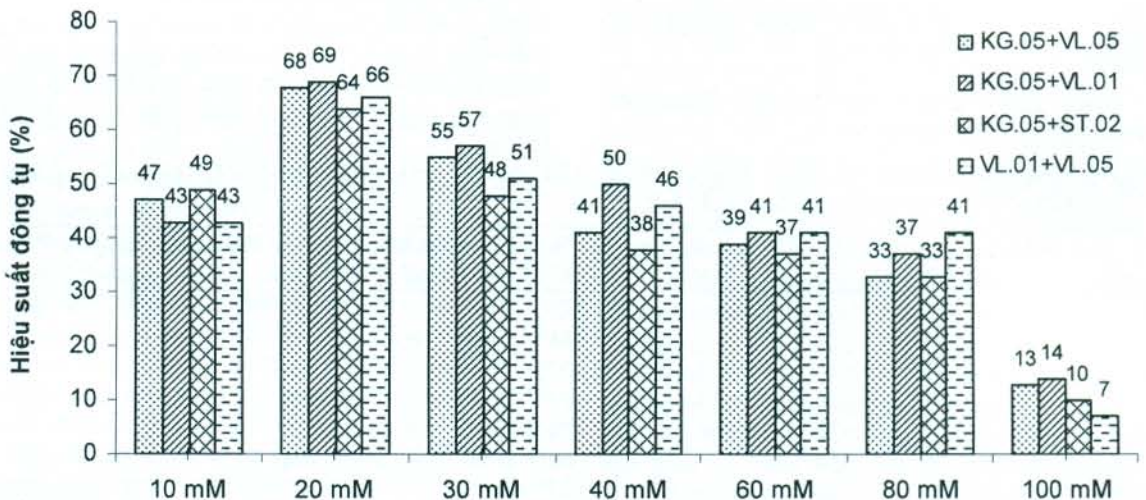
3.2 Ảnh hưởng của cation Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^{+} , K^{+} đến hiệu suất đông tụ của vi khuẩn

3.2.1 Ảnh hưởng của cation Ca^{2+} đến hiệu suất đông tụ của vi khuẩn

Sau khi tiến hành thí nghiệm 7 nồng độ cation Ca^{2+} trong muối CaCl_2 (10, 20, 30, 40, 60, 80 và 100 mM) ở pH = 7 cho 4 cặp chủng vi khuẩn đông tụ (*Bacillus cereus* KG.05 + *Bacillus megaterium* VL.01), (*Bacillus cereus* KG.05 + *Bacillus* sp. VL.05), (*Bacillus cereus* KG.05 + *Bacillus aryabhattai*) và (*Bacillus megaterium* VL.01 + *Bacillus* sp. VL.05). Kết quả được ghi nhận và trình bày ở Hình 1.

Qua hình 1 cho thấy hiệu suất đông tụ của 4 cặp

chủng vi khuẩn hoạt động tối ưu nhất ở nồng độ 20 mM Ca^{2+} trong muối CaCl_2 cho hiệu suất đông tụ từ 64-69%, cao hơn so với 6 nồng độ còn lại và khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1%. Khi kiểm tra kết quả từng cặp chủng vi khuẩn ở cùng nồng độ cation Ca^{2+} mức 20 mM cho thấy hiệu suất đông tụ giữa 3 cặp vi khuẩn KG.05 + VL.01; KG.05 + VL.05; VL.05 + VL.01 lần lượt là 69, 68, 66% khác biệt không có ý nghĩa ở mức 1%, riêng cặp vi khuẩn KG.05 + ST.02 có hiệu suất đông tụ thấp nhất (64%) và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với 2 cặp chủng vi khuẩn KG.05 + VL.05 và KG.05 + VL.01. Thí nghiệm được tiến hành bắt đầu ở mức nồng độ 10 mM Ca^{2+} , hiệu suất đông tụ của 4 cặp vi khuẩn không cao (<50%), hiệu suất đông tụ được tăng lên khi nồng độ Ca^{2+} được bổ sung 20 mM, nồng độ Ca^{2+} được tiếp tục tăng lên từ 30 mM đến 100 mM thì hiệu suất đông tụ giảm dần và thấp nhất ở mức nồng độ 100 mM Ca^{2+} trong môi trường. Kết quả nghiên cứu cho thấy cation Ca^{2+} trong môi trường có ảnh hưởng đến cơ chế đông tụ của vi khuẩn để tạo sự đông tụ với hiệu suất tối ưu nhất khi có nồng độ cation Ca^{2+} phù hợp nhất (20 mM) và có mức giới hạn trên là 100 mM (Hình 1).

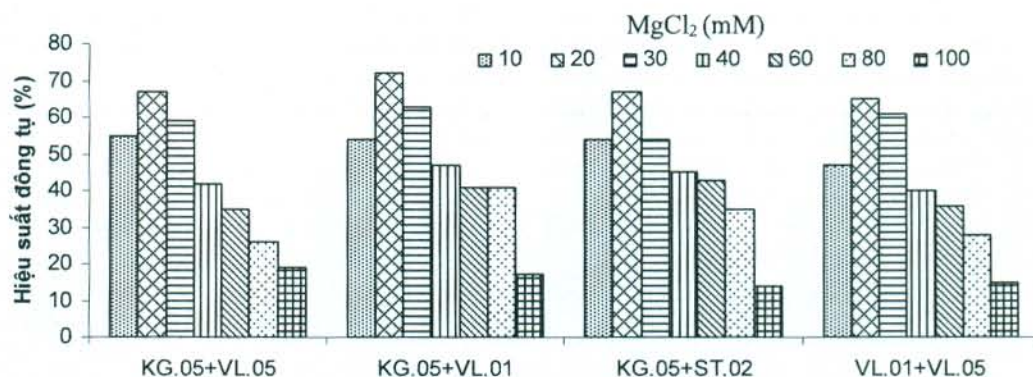


Hình 1: Hiệu suất đông tụ 4 cặp chủng vi khuẩn qua 7 nồng độ Ca^{2+} trong muối CaCl_2

3.2.2 Ảnh hưởng của cation Mg^{2+} đến hiệu suất đông tụ của vi khuẩn

Mg^{2+} là thành phần luôn hiện diện trong nước thải, đặc biệt là nước thải chăn nuôi heo sau biogas (Nguyễn Thị Thu Hà, 2008), do đó vi khuẩn đông tụ hoạt động cũng chịu ảnh hưởng bởi nồng độ cation Mg^{2+} đến khả năng hoạt động tối ưu của chúng. Qua kết quả kiểm tra lý hóa với 7 nồng độ Mg^{2+} trong muối MgCl_2 (10, 20, 30, 40, 60, 80 và 100 mM) với pH=7 cho 4 cặp chủng vi khuẩn đông

tụ (*Bacillus cereus* KG.05 + *Bacillus megaterium* VL.01), (*Bacillus cereus* KG.05 + *Bacillus* sp. VL.05), (*Bacillus cereus* KG.05 + *Bacillus aryabhattai*) và (*Bacillus megaterium* VL.01 + *Bacillus* sp. VL.05). Kết quả được ghi nhận (Hình 2). Bốn cặp chủng vi khuẩn đều hoạt động tối ưu khi môi trường có 20 mM Mg^{2+} , đạt hiệu suất đông tụ từ 65-72% cao hơn so với 6 nồng độ Mg^{2+} còn lại (10, 30, 40, 60, 80 và 100 mM) và khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1%.



Hình 2: Hiệu suất đông tụ 4 cặp chủng vi khuẩn qua 7 nồng độ Mg^{2+} trong muối $MgCl_2$

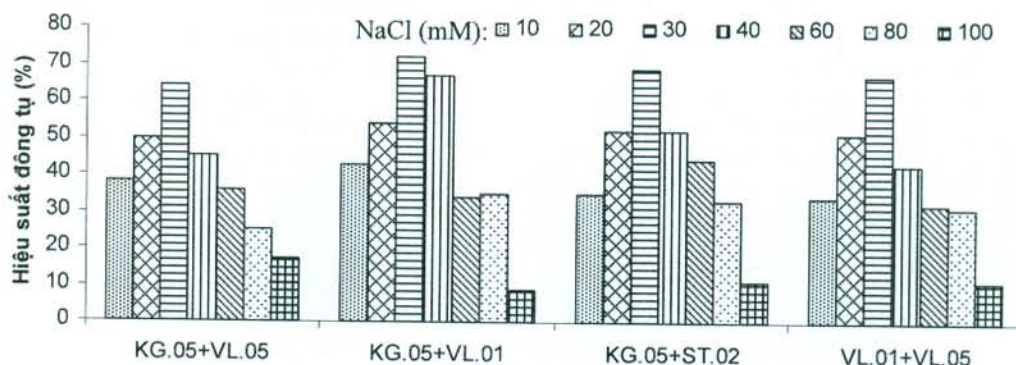
Trong 4 cặp chủng vi khuẩn thực hiện thí nghiệm, cặp KG.05+VL.01 có hiệu suất đông tụ cao nhất (72%) và khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1% so với 3 cặp chủng vi khuẩn còn lại. Khi phân tích tổng thể qua 7 nồng độ muối được kiểm tra ở 4 cặp vi khuẩn thì ở mỗi nồng độ đều có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1%. Tuy nhiên, khi so sánh từng nồng độ trong mỗi cặp vi khuẩn thì hiệu suất đông tụ có những nồng độ không có sự khác biệt hoặc khác biệt không ý nghĩa thống kê như ở nồng độ 60 mM và 80 mM ở cặp KG.05+VL.01 đều cho hiệu suất đông tụ 41%, cặp chủng vi khuẩn KG.05+ST.02 ở nồng độ 10 mM cho hiệu suất đông tụ là 54% khi nồng độ cation Mg^{2+} được tăng đến 20 mM thì hiệu suất đông tụ tăng đến 67%, tiếp tục tăng nồng độ cation Mg^{2+} lên 30 mM, hiệu suất đông tụ lại bằng với hiệu suất ở nồng độ 10 mM (54%), khi tiếp tục tăng nồng độ cation Mg^{2+} lên đến 100 mM thì hiệu suất đông tụ chỉ còn từ 14-19%.

3.2.3 Ảnh hưởng của cation Na^+ đến hiệu suất đông tụ của vi khuẩn

NaCl là loại muối phổ biến, có nhiều trong thức ăn của heo, trong quá trình phân giải các chất trong thức ăn, lượng NaCl được đào thải ra môi trường nước thải rất lớn qua phân và nước tiểu, do đó trong nước thải chăn nuôi heo nồng độ cation Na^+ rất cao, hơn nữa các chủng vi khuẩn đông tụ được phân lập từ môi trường nước thải này, do vậy khi thực hiện kiểm tra hóa lý 4 cặp vi khuẩn đông tụ (*Bacillus cereus* KG.05 + *Bacillus megaterium*

VL.01), (*Bacillus cereus* KG.05 + *Bacillus sp.* VL.05), (*Bacillus cereus* KG.05 + *Bacillus aryabhattai*) và (*Bacillus megaterium* VL.01 + *Bacillus sp.* VL.05) trong môi trường có cation Na^+ trong muối NaCl với 7 nồng độ (10, 20, 30, 40, 60, 80 và 100 mM) ở pH=7. Kết quả cho thấy khi môi trường có cation Na^+ nồng độ 10 mM thì hiệu suất đông tụ của 4 cặp vi khuẩn rất thấp khoảng 40%, nhưng khi tăng nồng độ lên 20, 30 mM thì hiệu suất đông tụ cũng dần tăng lên từ 50 – 72%. Khi thí nghiệm được tiếp tục tăng nồng độ Na^+ trong muối NaCl lên từ 40 – 100 mM thì hiệu suất đông tụ bắt đầu giảm dần đến 100 mM thì gần như các cation này ức chế hoàn toàn sự kết dính của các tế bào vi khuẩn với nhau, có cặp vi khuẩn KG.05+VL.01 hiệu suất đông tụ chỉ còn 9% (Hình 3).

Từ Hình 3 cho thấy cả 4 cặp vi khuẩn đông tụ (*Bacillus cereus* KG.05 + *Bacillus megaterium* VL.01), (*Bacillus cereus* KG.05 + *Bacillus sp.* VL.05), (*Bacillus cereus* KG.05 + *Bacillus aryabhattai*) và (*Bacillus megaterium* VL.01 + *Bacillus sp.* VL.05) đều có hiệu suất đông tụ cao ở nồng độ 30 mM Na^+ trong muối NaCl và khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1% so với các nồng độ còn lại. Trong đó, cặp vi khuẩn KG.05 + VL.01 có hiệu suất đông tụ cao nhất (72%) và cũng chính cặp chủng vi khuẩn KG.05 + VL.01 có hiệu suất đông tụ thấp nhất (9%) ở nồng độ 100 mM Na^+ trong muối NaCl. Điều này cho thấy yếu tố cation Na^+ trong môi trường có ảnh hưởng rất lớn đến quá trình hoạt động tối ưu của vi khuẩn đông tụ.



Hình 3: Hiệu suất đông tụ 4 cặp chủng vi khuẩn qua 7 nồng độ Na^+ trong muối NaCl

Kết quả này cũng phù hợp với Min *et al.*, (2010) khi cho 2 chủng vi khuẩn *Sphingomonas natatoria* 2.1gfp và *Micrococcus luteus* 2.13 kết cặp nhau và bổ sung cation Na^+ đến nồng độ 90 mM thì khả năng kết dính của cặp dòng vi khuẩn này bị vô hiệu. Sự kết dính bề mặt tế bào vi khuẩn tạo sự đông tụ trong môi trường phụ thuộc vào nồng độ cation trong môi trường. Đặc biệt để đạt được hiệu suất đông tụ cao nhất thì cation hóa trị I cần có nồng độ cao hơn cation hóa trị II. Kết quả cho thấy cả 4 cặp chủng vi khuẩn có nồng độ Na^+ trong muối NaCl 10 mM thì hiệu suất chưa được 50%, khi tăng lên 20 mM thì hiệu suất có tăng lên theo tỷ lệ thuận của nồng độ muối cho đến 30 mM. Khi ở nồng độ muối NaCl lên đến 40 mM thì hiệu suất đông tụ bắt đầu giảm nhưng không nhiều thậm chí tại mức nồng độ 60 mM và 80 mM ở cặp chủng vi khuẩn KG.01+VL.01 lại có hiệu suất đông tụ tương đương nhau và khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 1% và khả năng kết dính của cặp vi khuẩn gần như vô hiệu khi nồng độ muối lên đến 100 mM.

3.2.4 Ảnh hưởng của cation K^+ đến hiệu suất đông tụ của vi khuẩn

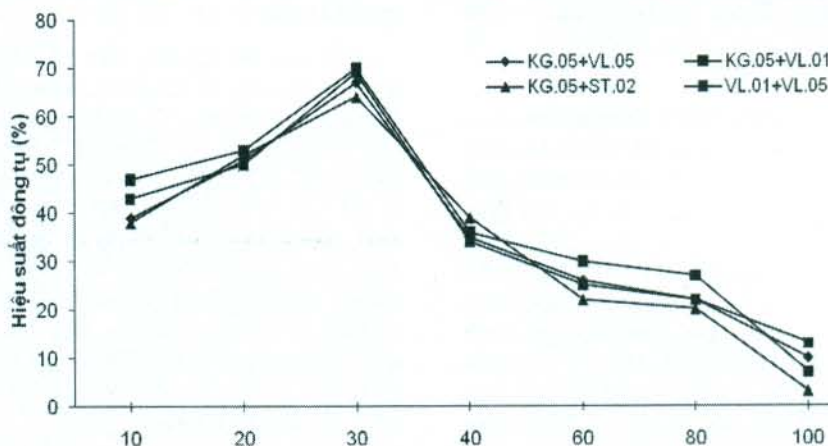
Tương tự như các thí nghiệm trên, 4 cặp chủng khuẩn đông tụ (*Bacillus cereus* KG.05+*Bacillus megaterium* VL.01), (*Bacillus cereus* KG.05 + *Bacillus sp.* VL.05), (*Bacillus cereus* KG.05 + *Bacillus aryabhattai*) và (*Bacillus megaterium* VL.01 + *Bacillus sp.* VL.05) cũng được kiểm tra hóa lý với 7 nồng độ K^+ trong muối KCl khác nhau (10, 20, 30, 40, 60, 80 và 100 mM), pH=7. Kết quả cho thấy cả 4 cặp vi khuẩn đều cho hiệu suất đông tụ cao ở nồng độ 30 mM K^+ trong muối KCl và khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1% so với 6 nồng độ còn lại. Kết quả thí nghiệm này cho thấy nồng độ muối KCl từ 20 đến 30 mM là vi khuẩn đông tụ hoạt động có hiệu quả (Hiệu suất từ 50 –

70%), khi nồng độ K^+ cao thì ức chế hoàn toàn quá trình đông tụ của vi khuẩn (hiệu suất đông tụ còn 3% ở nồng độ 100 mM). Khi so sánh hiệu suất đông tụ giữa các cặp chủng vi khuẩn thực hiện thí nghiệm cho thấy cặp vi khuẩn KG.05 + VL.01 có hiệu suất đông tụ cao nhất là 70% tiếp đến là cặp VL.01 + VL.05 (69%), KG.05 + VL.05 (67%), KG.05 + ST.02 (64%) (Hình 4).

Từ kết quả kiểm tra hóa lý 4 cặp vi khuẩn đông tụ (*Bacillus cereus* KG.05 + *Bacillus megaterium* VL.01), (*Bacillus cereus* KG.05 + *Bacillus sp.* VL.05), (*Bacillus cereus* KG.05 + *Bacillus aryabhattai*) và (*Bacillus megaterium* VL.01 + *Bacillus sp.* VL.05) phân lập trong nước thải trại chăn nuôi heo sau biogas, ở Đồng bằng sông Cửu Long với 4 loại muối đại diện có cation hóa trị I (Na^+ , K^+) và hóa trị II (Ca^{2+} , Mg^{2+}) cho thấy các cation trong môi trường cũng là nhân tố tác động có ảnh hưởng lớn đến cơ chế đông tụ của vi khuẩn. Đặc biệt là sự kết dính các tế bào vi khuẩn với nhau để tạo sự đông tụ trong quá trình xử lý nước thải, tùy theo đặc điểm cấu trúc của tế bào vi khuẩn mà nồng độ cation thích hợp để tạo sự đông tụ được tối ưu. Nhìn chung, các dòng vi khuẩn chúng tôi nghiên cứu có môi trường thích hợp ở nồng độ 20 mM đối với cation hóa trị II và 30 mM đối với cation hóa trị I. Khi nồng độ các cation này thích hợp thì vi khuẩn đông tụ phát huy cơ chế đông tụ để tạo sự đông tụ có hiệu suất cao nhất. Từ các kết quả trên có thể nhận định, hiệu suất đông tụ của các cặp vi khuẩn có chịu sự ảnh hưởng của các loại cation với các nồng độ khác nhau trong môi trường. Trong đó, cation hóa trị I (Na^+ và K^+) ở nồng độ 30 mM; cation hóa trị II (Ca^{2+} và Mg^{2+}) ở nồng độ 20 mM là điều kiện tối ưu cho sự đông tụ của các cặp vi. Nguyên nhân sự khác biệt có ý nghĩa giữa các giá trị hiệu suất đông tụ ở các nồng độ khác nhau có thể là do sự thay đổi nồng độ hay

điện tích cation trong môi trường sẽ làm thay đổi cấu trúc bề mặt tế bào của các chủng vi khuẩn, dẫn đến hiệu suất đông tụ bị ảnh hưởng. Hơn nữa liên kết giữa các chủng vi khuẩn là nhờ liên kết lectin-oligosaccharide các thành phần ngoại bào lipopolysaccharides (LPSs), exopolysaccharides (EPSs); protein lectin và các thành phần này chịu sự tác động của điện tích trong môi trường nên nồng độ cation cũng sẽ ảnh hưởng đến hiệu suất đông tụ của cặp vi khuẩn. Nồng độ cation của từng loại muối khảo sát ban đầu thấp so với nhu cầu của các chủng vi khuẩn nên hiệu suất đông tụ của các cặp vi khuẩn chưa đạt cao nhất. Khi khảo sát đến nồng độ thích hợp cho hoạt động của chúng, hiệu suất đông tụ đạt tối ưu. Tiếp tục tăng nồng độ muối của các cation, lượng dư thừa của các cation làm thay đổi tính thấm của màng, thay đổi cấu trúc bề mặt tế bào vi khuẩn nên hiệu suất đông tụ càng giảm khi lượng thừa cation càng nhiều. Kết quả này cũng tương đồng với kết quả của Min *et al.* (2010), đã khảo sát các yếu tố hóa, lý ảnh hưởng đến sự đông tụ của 2 chủng vi khuẩn *Sphingomonas natatoria* 2.1gfp và *Micrococcus*

luteus 2.13 trong bùn hoạt tính của nước thải sinh hoạt. Khi tế bào vi khuẩn được pha loãng trong các dung dịch có nồng độ khác nhau của các muối CaCl_2 , MgCl_2 , MgSO_4 và NaCl , KCl cho thấy sự đông tụ bị hạn chế khi nồng độ muối NaCl , KCl (cation hóa trị I) ở 90 mM, trong khi đó nồng độ các muối CaCl_2 , MgCl_2 , MgSO_4 (cation hóa trị II) chỉ cần 40 mM. Điều này cho thấy sự thay đổi nồng độ hay điện tích cation trong môi trường sẽ làm thay đổi cấu trúc bề mặt vỏ tế bào sẽ ảnh hưởng đến sự đông tụ. Hơn nữa protein dạng lectin cũng sẽ ảnh hưởng bởi nồng độ cation xung quanh nó, điều này làm thay đổi hiệu suất đông tụ. Đối với vi khuẩn Gram dương (*Bacillus*), vách tế bào có các thành phần peptidoglycan (chiếm 95%) và acid teichoic mang điện tích âm, nên các cation Ca^{2+} và Mg^{2+} ... có thể gắn kết vào bề mặt tế bào thông qua liên kết ion với các thành phần này; làm giảm điện tích âm trên bề mặt các tế bào vi khuẩn. Vì thế, chúng không còn bị ngăn cản bởi lực đẩy tĩnh điện cùng dấu, dẫn đến chúng có thể kết cụm với nhau thông qua các tương tác khác, qua đó làm tăng hiệu suất đông tụ của các cặp vi khuẩn.



Hình 4: Hiệu suất đông tụ 4 cặp chủng vi khuẩn qua 7 nồng độ K^+ trong muối KCl

3.2.5 Cặp cation tối ưu cho hiệu suất đông tụ

Thực tế trong môi trường nước thải tồn tại rất nhiều loại cation hóa trị I, II (Lương Đức Phẩm (2009), vì thế chúng sẽ cùng tác động đến hiệu suất đông tụ của các cặp vi khuẩn. Từ kết quả thí nghiệm trên chúng tôi chọn được nồng độ cation hóa trị I (Na^+ , K^+) là 30 mM, cation có hóa trị II là 20 mM (Ca^{2+} , Mg^{2+}), là nồng độ tối ưu nhất giúp vi

khuẩn hoạt động cho hiệu suất đông tụ cao nhất. Thí nghiệm tiếp theo được thực hiện để tìm được cặp cation tối ưu nhất khi kết hợp với 2 loại cation hóa trị I và hóa trị II với nhau được ghi nhận ở Bảng 2. Kết quả nghiên cứu ở Bảng 2 thể hiện vi khuẩn hoạt động tối ưu khi môi trường có hai loại muối $\text{MgCl}_2 + \text{KCl}$ đạt hiệu suất đông tụ từ 82 – 94% và khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1% so với 3 cặp muối còn lại.

Bảng 2: Hiệu suất đồng tụ của vi khuẩn trong môi trường có phối hợp cặp cation hóa trị I (Na^+ , K^+) 30 mM và cation hóa trị II (Ca^{2+} , Mg^{2+}) 20 mM

Cation bổ sung	Hiệu suất đồng tụ (%) KG.05+VL.05	Hiệu suất đồng tụ (%) KG.05+VL.01	Hiệu suất đồng tụ (%) KG.05+ST.02	Hiệu suất đồng tụ (%) VL.05+VL.01
$\text{Mg}^{2+} + \text{K}^+$	82 ^a	94 ^a	88 ^a	85 ^a
$\text{Mg}^{2+} + \text{Na}^+$	76 ^c	91 ^b	86 ^b	82 ^b
$\text{Ca}^{2+} + \text{K}^+$	80 ^b	92 ^b	83 ^c	77 ^c
$\text{Ca}^{2+} + \text{Na}^+$	74 ^d	88 ^c	77 ^d	83 ^b

* Các chữ ở trên đầu các số ở cùng một cột khác nhau sẽ khác biệt có ý nghĩa thống kê mức 1%

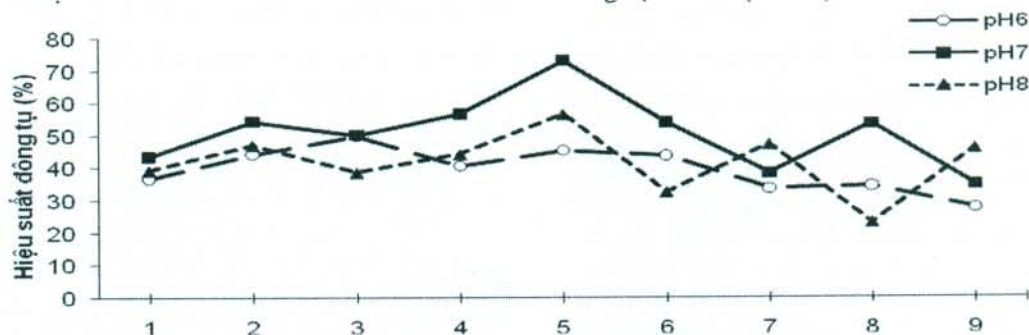
Từ Bảng 2 cho thấy cặp vi khuẩn KG.05 + VL.01 có hiệu suất đồng tụ cao nhất khi thực nghiệm với 4 hỗn hợp muối ($\text{CaCl}_2 + \text{NaCl}$); ($\text{CaCl}_2 + \text{KCl}$); ($\text{MgCl}_2 + \text{NaCl}$); ($\text{MgCl}_2 + \text{KCl}$), trong đó cặp cation Mg^{2+} với K^+ trong muối MgCl_2 và KCl có hiệu suất đồng tụ cao nhất (94%), các cặp vi khuẩn KG.05 + VL.05; KG.05 + ST.02, VL.01 + VL.05 cũng có hiệu suất đồng tụ rất cao từ 74 đến 88% khi hoạt động trong môi trường hỗn hợp muối ($\text{MgCl}_2 + \text{KCl}$) và cao hơn ở 3 hỗn hợp muối còn lại. Với kết quả này cho thấy cation Mg^{2+} với K^+ có ảnh hưởng rất lớn đến hiệu suất đồng tụ của các cặp chủng vi khuẩn đồng tụ được phân lập ở Đồng bằng sông Cửu Long.

Trong thành phần nước thải chăn nuôi heo (sau biogas) sự hiện diện cation Mg^+ và K^+ rất cao đây là yếu tố tồn dư từ thức ăn dư thừa hoặc từ chất thải (phân, nước tiểu...) của heo thải ra, khi thực hiện công nghệ xử lý biogas thì các cation này giảm không đáng kể (Nguyễn Thị Thu Hà, 2008). Bên cạnh đó, để sống được trong môi trường này, các vi sinh vật phải thích nghi, cân bằng quá trình trao đổi tính thẩm thấu của màng. Đối với vi khuẩn đồng tụ, các cation còn tham gia vào cầu nối hữu ích cho sự kết dính của các tế bào vi khuẩn với

nhau, qua đó làm tăng hiệu suất đồng tụ của các cặp vi khuẩn. Tùy vào đặc tính của từng chủng vi khuẩn và sự kết đôi giữa các tế bào với nhau, cặp muối cation hóa trị I và II sẽ có nồng độ thích hợp để hiệu suất đồng tụ đạt tối ưu. Từ kết quả thí nghiệm có thể nhận định, cặp vi khuẩn KG.05 + VL.01 có hiệu suất đồng tụ cao nhất trong môi trường có cặp cation Mg^{2+} và K^+ tương ứng với cặp muối 20 mM $\text{MgCl}_2 + 30$ mM KCl .

3.2.6 *Tương quan nồng độ cation Mg^{2+} , K^+ và chỉ số pH trong môi trường đến hiệu suất đồng tụ của vi khuẩn.*

Kết quả thí nghiệm trên cho thấy, hiệu suất đồng tụ của cặp vi khuẩn *Bacillus cereus* KG.05 + *Bacillus megaterium* VL.01 luôn cao nhất so với ba cặp vi khuẩn còn lại. Chúng tôi chọn cặp vi khuẩn KG.05+VL.01 để kiểm tra tính tương quan các yếu tố pH = 6, 7, 8 và cation K^+ ở nồng độ 10, 20, 30 mM, cation Mg^{2+} ở nồng độ 20, 30, 40 mM để xác định được nồng độ cation và chỉ số pH trong môi trường phù hợp cho vi khuẩn đồng tụ hoạt động tối ưu nhất để có hiệu suất cao. Kết quả cho thấy hiệu suất đồng tụ cao nhất (>70%) tập trung quanh giá trị pH=7, cation K^+ ở nồng độ 20 mM, Mg^{2+} ở nồng độ 30 mM (Hình 5).



Hình 5: Tính tương quan các yếu tố pH và nồng độ cation K^+ , Mg^{2+} trong môi trường hoạt động tối ưu của vi khuẩn đồng tụ

Ghi chú: (1) $\text{KCl.20-MgCl}_2.10$; (2) $\text{KCl.20-MgCl}_2.20$; (3) $\text{KCl.20-MgCl}_2.30$; (4) $\text{KCl.30-MgCl}_2.10$; (5) $\text{KCl.30-MgCl}_2.20$; (6) $\text{KCl.30-MgCl}_2.30$; (7) $\text{KCl.40-MgCl}_2.10$; (8) $\text{KCl.40-MgCl}_2.20$; (9) $\text{KCl.40-MgCl}_2.30$ (mM)

Kết quả thống kê cho thấy hiệu suất đông tụ ở giá trị pH=7 là cao nhất và khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1% so với giá trị pH = 6 và 8, tuy nhiên khi so sánh hiệu suất đông tụ ở mức pH = 6 và 8 thì hiệu suất đông tụ tại hai giá trị pH này khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Từ kết quả này, chúng tôi có thể khẳng định rằng giới hạn pH thích hợp cho vi khuẩn đông tụ hoạt động tối ưu là từ 6 đến 8 và hiệu quả nhất là pH=7. Tương tự, chúng tôi cũng xác định được nồng độ cation hóa trị II (Mg^{2+}) là 20 mM và cation hóa trị I (K^+) là 30 mM có trong môi trường sẽ tác động đến hiệu quả kết dính của tế bào vi khuẩn và tạo được sự đông tụ với hiệu suất cao nhất. Vậy hiệu suất đông tụ của cặp chủng vi khuẩn *Bacillus cereus* KG.05+*Bacillus megaterium* VL.01 không chỉ do tính kỵ nước cao của bề mặt tế bào mà còn chịu sự chi phối của yếu tố pH và các cation trong môi trường đặc biệt là cation Mg^{2+} và K^+ ảnh hưởng rất lớn đến hiệu suất đông tụ trong quá trình xử lý nước thải. Từ kết quả này cặp chủng vi khuẩn đông tụ *Bacillus cereus* KG.05+ *Bacillus megaterium* VL.01 được xem là đại diện cho cộng đồng các vi khuẩn tạo sự đông tụ trong nước thải chăn nuôi heo sau biogas ở Đồng bằng sông Cửu Long.

4 KẾT LUẬN

Hiệu suất đông tụ của vi khuẩn trong công nghệ sinh học xử lý nước thải chịu tác động bởi nhiều yếu tố trong môi trường, đặc biệt là yếu tố pH và các cation. Bảng phương pháp kiểm tra hóa lý 4 cặp chủng vi khuẩn đông tụ (*Bacillus cereus* KG.05 + *Bacillus megaterium* VL.01), (*Bacillus cereus* KG.05 + *Bacillus* sp. VL.05), (*Bacillus cereus* KG.05 + *Bacillus aryabhattai*) và (*Bacillus megaterium* VL.01 + *Bacillus* sp. VL.05) đã xác định được môi trường pH = 7 cùng với sự hiện diện của 20 mM cation Mg^{2+} và 30 mM cation K^+ thì vi khuẩn đông tụ hoạt động tối ưu nhất, cho hiệu suất đông tụ >70%. Với kết quả nghiên cứu này, việc kiểm soát hiệu suất đông tụ của vi khuẩn thông qua các yếu tố môi trường hứa hẹn có những đóng góp thiết thực trong việc cải thiện hiệu quả xử lý nước thải chăn nuôi heo sau biogas ở khu vực Đồng bằng sông Cửu Long.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Cao Ngọc Diệp, Nguyễn Tân Bình và Nguyễn Thị Xuân My, 2012. Ứng dụng chế phẩm sinh học xử lý nước – bùn đáy ao cá tra nuôi công nghiệp, *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 23a 1-10.
2. Hồ Thanh Tâm và Cao Ngọc Diệp, 2013. Vi khuẩn đông tụ (aggregation) trong nước thải trại chăn nuôi heo ở Đồng bằng sông Cửu Long. *Báo cáo Khoa học Hội nghị Khoa học Công nghệ sinh học Toàn quốc 2013*, quyển số 2, trang: 518-522.
3. Hoben H. and P. Somasegaran, 1982. Comparison of the Pour, Dpread, and Drop plate methods for enumeration of *Rhizobium* spp. In inoculants made from presterilized peat. *Applied and Environmental Microbiology*. 1246-1247.
4. Kimchhayarasy, P., K. Kakii and T. Nikata, 2009. Intergeneric coaggregation of non-flocculating *Acinetobacter* spp. isolates with other sludge-constituting bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 107 (4): 394-400.
5. Lương Đức Phẩm, 2009. *Công nghệ xử lý nước thải bằng biện pháp sinh học*. NXB Giáo dục Việt Nam.
6. Malik, A., and K. Kakii, 2003. Pair dependent co-aggregation behavior of nonflocculating sludge bacteria. *Biotechnol. Lett.* 25, 981-986.
7. Malik, A., M. Sakamoto, S. Hanazaki, M. Osawa, T. Suzuki, M. Tochigi, and K. Kakii, 2003. Coaggregation among nonflocculating bacteria isolated from activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 6056-6063.
8. Malik, A., M. Sakamoto, T. Ono, and K. Kakii, 2003. Coaggregation between *Acinetobacter johnsonii* S35 and *Microbacteria esteraromaticum* strains isolation from sewage activated sludge. *Bioscience and Bioengineering*. 96, 10-15.

9. Malik, A., P. Kimchhayarasy, and K. Kakii, 2005. Effect of Surfactants on Stability of *Acinetobacter Johnsonii* S35 and *Oligotropha Carboxidovorans* S23 Coaggregates. *Fems Microbiology Ecology*. 51 (3): 313-321.
10. Min, K.R., M.N. Zimmer and A.H. Rickard, 2010. Physicochemical parameters influencing coaggregation between the freshwater bacteria *Sphingomonas natatoria* 2.1 and *Micrococcus luteus* 2.13, *Biofouling*. 26, 931-940.
11. Nguyễn Thị Thu Hà, 2008. *Xử lý nước thải chăn nuôi heo*. Luận văn Thạc sĩ. Trường Đại học Bách Khoa TP Hồ Chí Minh.
12. Nguyễn Thị Hồng, Phạm Khắc Liệu, 2012. Đánh giá hiệu quả xử lý nước thải chăn nuôi lợn bằng hầm Biogas quy mô hộ gia đình ở Thừa Thiên Huế. *Tạp chí khoa học*, Đại học Huế, (73)4: 81-91.
13. Ryan J. P. and Russell T. H., 2013. Rapid aggregation of biofuel-producing algae by the bacterium *Bacillus* sp. Strain RP1137, *Appl Environ Microbiol*, 79 (19): 6093-6101.