

Phân lập, tuyển chọn và sử dụng vi sinh vật ưa nhiệt trong phân hủy sinh khối bùn thải nhà máy tinh bột sắn FOCOCEV Thừa Thiên Huế

Ngô Thị Tường Châu^{1,*}, Phạm Thị Ngọc Lan²,
Phan Thị Thảo Ly², Lê Văn Thiện¹, Nguyễn Ngân Hà¹

¹Khoa Môi trường, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội,
334 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hà Nội

²Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế, 77 Nguyễn Huệ, Huế

Nhận ngày 08 tháng 6 năm 2016

Chỉnh sửa ngày 12 tháng 7 năm 2016; chấp nhận đăng ngày 06 tháng 9 năm 2016

Tóm tắt: Bằng việc sử dụng môi trường nuôi cấy làm giàu và các loại môi trường phân lập thích hợp, đã phân lập được 78 chủng vi khuẩn, 73 chủng xạ khuẩn và 53 chủng nấm mốc ưa nhiệt từ bùn thải nhà máy tinh bột sắn FOCOCEV Thừa Thiên Huế. Tiến hành đánh giá hoạt lực phân hủy chất hữu cơ bằng phương pháp khuếch tán enzyme, đã tuyển chọn được các chủng vi khuẩn V18, chủng xạ khuẩn X38 và chủng nấm mốc N37 từ các chủng được phân lập. Các chủng này đã không thể hiện đặc tính đối kháng lẫn nhau. Dựa vào đặc điểm hình thái và phân tích trình tự 16S rRNA (hoặc 28S rRNA) đã xác định được các chủng V18, X38 và N37 lần lượt thuộc các loài *Bacillus subtilis*, *Aspergillus fumigatus* và *Streptomyces glaucescens*. So với đối chứng và các công thức thí nghiệm khác, công thức CT8 với việc sử dụng tất cả các chủng được tuyển chọn đã nâng cao đáng kể hiệu quả phân hủy sinh khối bùn thải nhà máy tinh bột sắn FOCOCEV Thừa Thiên Huế với độ giảm khối lượng, thể tích và cellulose lần lượt là 19,73; 33,75 và 29,33%. Vì vậy tập hợp giống vi sinh vật ưa nhiệt này có thể được xem xét sử dụng trong sản xuất phân bón hữu cơ từ bùn thải nhà máy tinh bột sắn FOCOCEV Thừa Thiên Huế nói riêng và bùn thải hữu cơ nói chung.

Từ khóa: Vi sinh vật ưa nhiệt, bùn thải, ủ hiếu khí.

1. Đặt vấn đề

Sự ra đời của nhà máy tinh bột sắn FOCOCEV Thừa Thiên Huế đã giải quyết việc làm cho một bộ phận người dân, góp phần vào sự chuyển đổi cơ cấu cây trồng trên những vùng đất khô hạn, từ đó thúc đẩy sự phát triển kinh tế và xã hội của tỉnh nhà. Tuy nhiên, cùng với việc nâng cấp công suất, chất thải của nhà máy cũng tăng lên đáng kể. Phần bùn thải phát sinh trong

quá trình sản xuất chủ yếu được chất thành đống, tích tụ lâu ngày sinh mùi hôi thối, gây ô nhiễm môi trường nghiêm trọng. Trong khi đó, bùn thải có thể là một nguồn tài nguyên có giá trị nếu được tận dụng làm phân bón. Bằng phương pháp ủ hiếu khí với sự tham gia tích cực của hệ vi sinh vật ưa nhiệt, quá trình phân hủy bùn thải sẽ xảy ra nhanh chóng và triệt để hơn. Đặc biệt, bên cạnh hàm lượng dinh dưỡng tăng đáng kể, sản phẩm phân bón không chứa vi sinh vật và ký sinh trùng gây bệnh, hàm lượng kim loại nặng linh động rất thấp, đáp ứng yêu

* Tác giả liên hệ. ĐT.: 84-917691012
Email: ngotuongchau@hus.edu.vn

cầu sử dụng trong nông nghiệp mà không ảnh hưởng đến môi trường và sức khỏe cộng đồng [1, 2]. Mục tiêu của nghiên cứu này là tạo nguồn giống vi sinh vật ưa nhiệt và đánh giá khả năng ứng dụng trong phân hủy sinh khối bùn thải nhà máy tinh bột sắn FOCOCEV Thừa Thiên Huế, tạo điều kiện thuận lợi cho sản xuất phân bón hữu cơ chất lượng cao.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Các chủng vi sinh vật ưa nhiệt có khả năng phân hủy chất hữu cơ cao được phân lập và tuyển chọn từ bùn thải nhà máy tinh bột sắn FOCOCEV Thừa Thiên Huế.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- *Phân lập vi sinh vật ưa nhiệt:* Mẫu bùn thải được thu theo phương pháp tổ hợp, sau khi ủ ở 30°C-2 ngày và 50°C-3 ngày được sử dụng làm mẫu gây cấy. Các môi trường được sử dụng trong quá trình phân lập bao gồm: (i) Môi trường nuôi cấy làm giàu (10% bùn thải khô, 1% giấy lọc, 0,5% cao nấm men, 0,1% pepton và 0,1% K₂HPO₄ trong 1 lít nước cất, pH 7,5) [3]; và (ii) Môi trường thạch dinh dưỡng (NA), thạch tinh bột casein (SCA) và thạch khoai tây dextrin (PDA) lần lượt cho mục đích phân lập vi khuẩn, xạ khuẩn và nấm mốc [4]. Nuôi cấy làm giàu bằng cách thêm 10 g mẫu gây cấy vào 1 lít môi trường, nuôi trên máy lắc ở 150 vòng/phút, 50°C, trong 10 ngày. Sau đó, ria cấy dịch nuôi cấy làm giàu với độ pha loãng thích hợp lên các đĩa chứa môi trường phân lập. Ủ ở 50°C trong 3, 7 và 10 ngày tương ứng với mục đích phân lập vi khuẩn, nấm và xạ khuẩn. Các khuẩn lạc riêng rẽ mọc tốt trên các đĩa tiếp tục được thuần khiết và cấy chuyển giữ giống.

- *Tuyển chọn vi sinh vật ưa nhiệt:* Các chủng vi sinh vật có khả năng phân hủy chất hữu cơ cao được tuyển chọn bằng phương pháp khuếch tán enzyme. Theo đó, các đĩa thạch chứa môi trường thích hợp được bổ sung riêng

biệt 1% tinh bột, 1% carboxymethyl cellulose (CMC) và 1% casein được sử dụng để đánh giá khả năng phân hủy tinh bột, cellulose và protein một cách tương ứng. Dịch nuôi cấy của các chủng vi sinh vật được nhỏ vào các lỗ trên bề mặt các đĩa thạch. Ủ ở 5-6°C trong 8 giờ để dịch enzyme khuếch tán vào bề mặt thạch, rồi ủ ở 50°C trong 2-3 ngày để dịch enzyme phân giải cơ chất. Nhuộm các đĩa thạch có bổ sung tinh bột và CMC bằng thuốc nhuộm Lugol và casein bằng thuốc nhuộm Fraziae. Đo kích thước vòng phân giải cơ chất [5]. Chọn mỗi chủng có hoạt lực cao nhất cho mỗi nhóm vi sinh vật ưa nhiệt (vi khuẩn, nấm và xạ khuẩn).

- *Kiểm tra tính đối kháng giữa các chủng vi sinh vật ưa nhiệt:* Sử dụng phương pháp cấy vuông góc trên môi trường thạch đĩa, ủ các đĩa ở 50°C trong 4 ngày [6].

- *Định danh các chủng vi sinh vật ưa nhiệt:* Dựa vào đặc điểm hình thái và phân tích trình tự gen 16S rRNA (đối với vi khuẩn và xạ khuẩn) và 28S rRNA (đối với nấm mốc). Các trình tự này sẽ được so sánh với dữ liệu tương ứng sẵn trên ngân hàng dữ liệu NCBI bằng phần mềm BLAST [7].

- *Nhân sinh khối vi sinh vật ưa nhiệt:* Được thực hiện bằng nuôi cấy lắc trong môi trường dinh dưỡng ở 150 vòng/phút, 50°C, trong 5 ngày. Ly tâm thu sinh khối và tạo dịch cấy có mật độ 10⁷ tế bào/ml. Riêng với xạ khuẩn và nấm mốc, nuôi cấy trên môi trường sử dụng nguồn cơ chất phối trộn cám gạo: vỏ lạc theo tỉ lệ 1:1 và tỉ lệ nước: cơ chất là 8:10, ủ ở 50°C, trong 5 ngày. Thu sinh khối và tạo dịch cấy với mật độ 10⁷ bào tử/ml.

- *Đánh giá khả năng phân giải sinh khối bùn thải:* Bùn thải nhà máy FOCOCEV Thừa Thiên Huế được trộn đều và phân phối vào các chậu với khối lượng là 1 kg/chậu. Bố trí các công thức sau: (1) đối chứng (bùn thải không bổ sung vi sinh vật); (2) bùn thải + vi khuẩn; (3) bùn thải + xạ khuẩn; (4) bùn thải + nấm mốc; (5) bùn thải + vi khuẩn + xạ khuẩn; (6) bùn thải + vi khuẩn + nấm mốc; (7) bùn thải + xạ khuẩn + nấm mốc; và (8) bùn thải + vi khuẩn + xạ khuẩn + nấm mốc. Mật độ và lượng giống cấy là như nhau (mật độ 10⁷ tế bào hoặc bào tử/ml

và lượng giống là 5%). Độ ẩm khối ủ 55-60%, ủ ở 50°C, trong 45 ngày. Khối lượng và thể tích khối ủ được xác định bằng phương pháp cân và đo đạc. Cellulose được định lượng trên nguyên tắc hòa tan bằng acid và kiềm [8].

• *Phương pháp xử lý số liệu:* Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Số liệu được tính giá trị trung bình và xử lý bằng Microsoft Excel 2010 và Duncan's test theo chương trình SPSS 16.

3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

3.1. Phân lập và tuyển chọn vi sinh vật ưa nhiệt

Dựa vào sự khác biệt về hình thái khuẩn lạc, đã phân lập được 78 chủng vi khuẩn (V1-

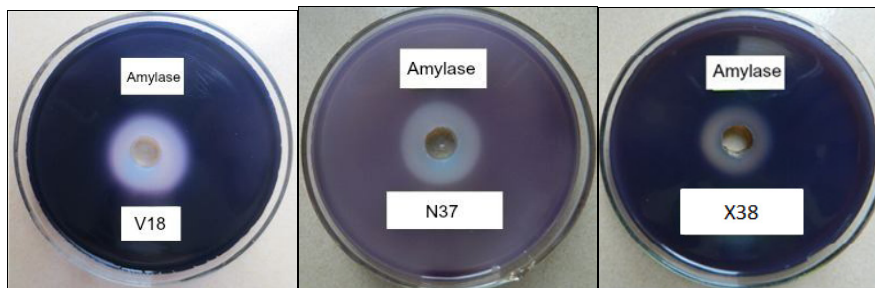
V78), 73 chủng xạ khuẩn (X1-X73) và 53 chủng nấm mốc (N1-N53) lần lượt trên các môi trường NA, PDA và SCA. Từ đó đã tuyển chọn được chủng vi khuẩn V18, chủng xạ khuẩn X38 và chủng nấm mốc N37 có hoạt tính phân hủy các chất hữu cơ cao. Kết quả được trình bày ở bảng 1 và hình 1, 2 và 3.

3.2. Tính đối kháng giữa các chủng vi sinh vật ưa nhiệt được tuyển chọn

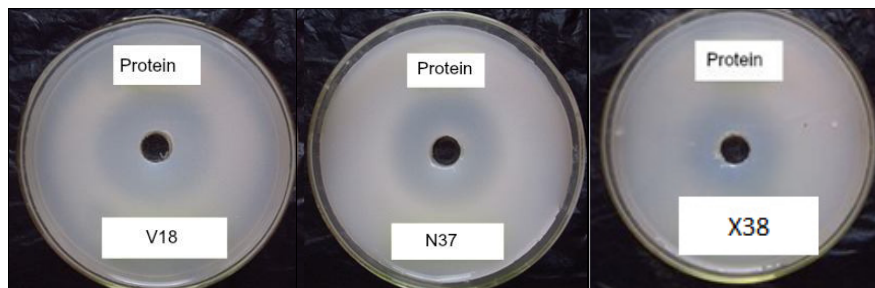
Tính đối kháng giữa các chủng vi sinh vật ưa nhiệt đã được kiểm tra bằng phương pháp cấy vuông góc. Kết quả cho thấy giữa chúng không thể hiện đặc tính đối kháng lẫn nhau (Hình 4).

Bảng 1. Đường kính vòng phân giải các chất hữu cơ của các chủng vi sinh vật ưa nhiệt

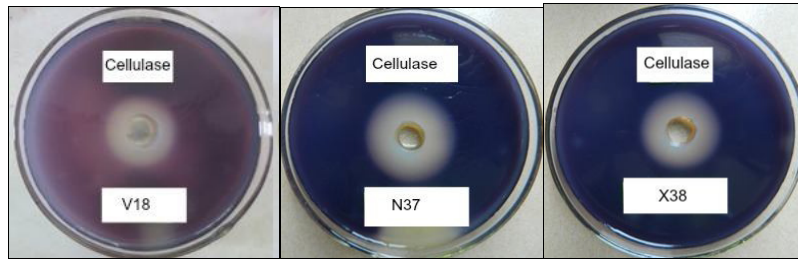
Kí hiệu chủng	Đường kính vòng phân giải (mm)		
	Tinh bột	Casein	CMC
V18	22,50	25,52	20,05
N37	17,55	20,05	23,17
X38	16,55	19,65	20,25



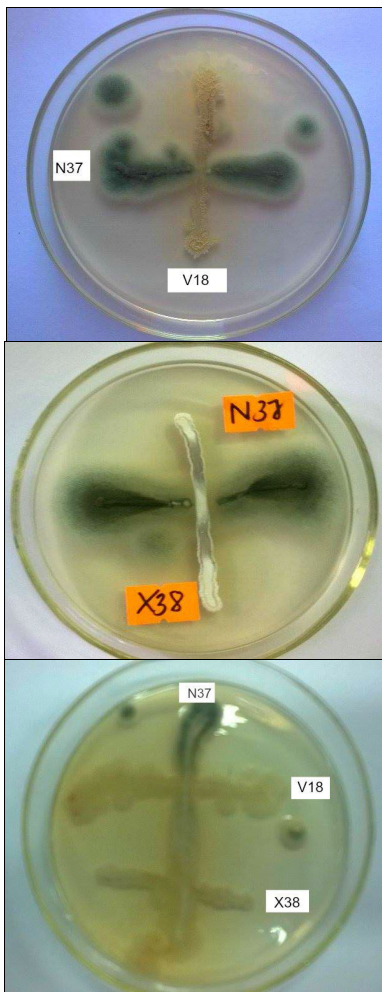
Hình 1. Vòng phân giải tinh bột của các chủng vi sinh vật ưa nhiệt.



Hình 2. Vòng phân giải casein của các chủng vi sinh vật ưa nhiệt.



Hình 3. Vòng phân giải CMC của các chủng vi sinh vật ưa nhiệt.

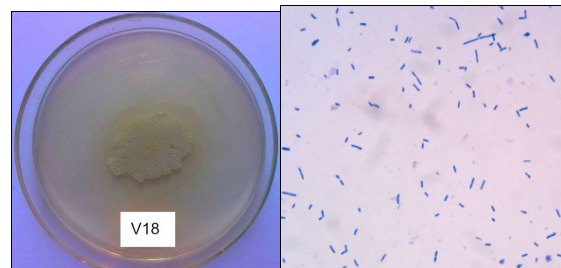


Hình 4. Tính đối kháng của tập hợp các chủng V18, X38 và N37.

3.3. Kết quả định danh các chủng vi sinh vật ưa nhiệt

Chủng vi khuẩn V18 trên môi trường NA xuất hiện khuẩn lạc ở dạng khô, có màu trắng

đục, lan rộng trên bề mặt thạch, mép nhăn và khá dày. Tế bào có hình que ngắn nhỏ các tế bào đứng riêng lẻ hoặc tạo thành chuỗi ngắn, Gram dương (Hình 5). Kết quả phân tích trình tự đoạn gen 16S rRNA cho thấy tương đồng 100% với trình tự đoạn gen 16S rRNA của chủng *Bacillus subtilis* IAM 12118 (mã số truy cập NR 112116.1) và *Bacillus subtilis* NCDO 1769 (mã số truy cập NR 118972.1).



Hình 5. Hình thái khuẩn lạc và tế bào của chủng vi khuẩn V18.

Chủng xạ khuẩn X38 trên môi trường SCA xuất hiện khuẩn lạc có màu trắng, dạng tròn đường kính 5 mm, cứng chắc, xù xì. Khuẩn ty khí sinh phát triển tạo thành nhiều vòng tròn đồng tâm, sau 5 ngày khuẩn lạc chuyển màu từ trắng qua màu xám. Rìa khuẩn lạc có màu sáng hơn. Hệ khuẩn ty phân nhánh mạnh, không có vách ngăn. Cuống sinh bào tử dạng xoắn lò xo (từ 2-5 vòng xoắn) và được sắp xếp theo kiểu đối xứng đơn trên khuẩn ty khí sinh (Hình 5). Kết quả phân tích trình tự đoạn gen 16S rRNA của chủng X38 là tương đồng 99% với trình tự đoạn gen 16S rRNA

của chủng xạ khuẩn thuộc loài *Streptomyces glaucescens* có mã số truy cập CP009438.1.

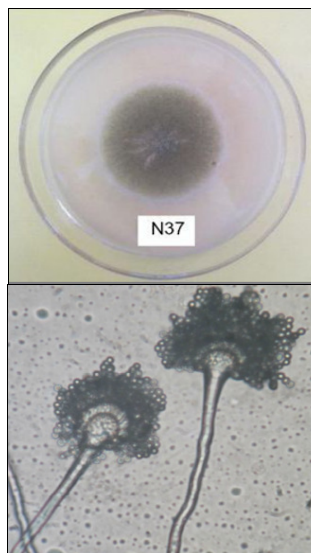
Chủng nấm mốc N37 trên môi trường PDA xuất hiện khuẩn lạc có màu xanh rêu đậm, bờ tròn, mịn, mọc ăn sâu vào môi trường. Sợi nấm có vách ngăn ngang, tế bào chân phân hóa rõ, cuống sinh bào tử dài, không phân nhánh và phình to ở đỉnh, phía trên là lớp tế bào hình chai tạo thành bông. Bào tử đính có hình cầu, mọc thành chuỗi (Hình 6). Kết quả phân tích trình tự đoạn gen 28S rRNA cho thấy tương đồng 100% với trình tự đoạn gen 28S rRNA của chủng nấm mốc thuộc loài *Aspergillus fumigatus* có mã số truy cập KM491894.1.

3.4. Khả năng phân hủy sinh khối bùn thải của vi sinh vật ưa nhiệt

Mẫu bùn thải của nhà máy chế biến tinh bột sắn FOCOCEV Thừa Thiên Huế có pH tương đối thấp (pH 5,72), độ ẩm thấp (32,5%), tỉ lệ C:N cao (50:1) và mật độ vi sinh vật tổng số tương đối cao (vi khuẩn $92,4 \cdot 10^6$ CFU/g, nấm $85,6 \cdot 10^6$ CFU/g, xạ khuẩn $56,4 \cdot 10^6$ CFU/g). Ngoài ra mẫu còn chứa một số kim loại nặng có hàm lượng dưới mức cho phép cũng như vi sinh vật và kí sinh trùng gây bệnh (*E. coli* $31 \cdot 10^2$ MPN/g, *Cryptosporidium parvum* $18 \cdot 10^2$ tế bào/g, *Giardia duodenalis* $25 \cdot 10^1$ tế bào/g). Việc bổ sung các chủng vi sinh vật ưa nhiệt vào khối ủ có ảnh hưởng đến sự phân hủy sinh khối bùn thải và cho hiệu quả xử lý tốt hơn so với công thức đối chứng (Bảng 2, 3). Đặc biệt ở công thức có sự phối hợp của cả ba chủng vi sinh vật được tuyển chọn đã nâng cao một cách đáng kể hiệu quả phân hủy sinh khối bùn thải, với độ giảm về khối lượng, chiều cao khối ủ và hàm lượng cellulose lần lượt là 19,73; 33,75 và 29,33%. Qua đó cho thấy tiềm năng ứng dụng của tập hợp giống vi sinh vật ưa nhiệt này trong sản xuất phân bón hữu cơ từ bùn thải nhà máy sản xuất tinh bột sắn FOCOCEV.



Hình 6. Hình thái khuẩn lạc, hệ sợi khuẩn ty và cuống sinh bào tử của chủng xạ khuẩn X38.



Hình 7. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc và bào tử của chủng nấm mốc N37.

Bảng 2. Độ giảm chiều cao và khối lượng của khối ủ sau 45 ngày

Công thức	Chiều cao khối ủ (cm)			Khối lượng khối ủ (kg)			
	Trước thí nghiệm	Sau thí nghiệm	Độ giảm (%)	Trước thí nghiệm	Sau thí nghiệm	Độ giảm (%)	
1	Đối chứng	8,0	7,3 ^a ± 0,0	8,8	1,52	1,40 ^a ± 0,02	7,89
2	V18	8,0	6,3 ^b ± 0,2	21,3	1,50	1,33 ^b ± 0,03	11,33
3	X38	8,0	6,1 ^c ± 0,3	23,8	1,50	1,28 ^c ± 0,02	14,67
4	N37	8,0	6,2 ^c ± 0,2	22,5	1,50	1,30 ^b ± 0,02	13,33
5	V18 + X38	8,0	5,6 ^c ± 0,3	30,0	1,52	1,26 ^{cd} ± 0,03	17,10
6	V18 + N37	8,0	6,2 ^c ± 0,2	24,4	1,52	1,27 ^c ± 0,02	16,45
7	X38 + N37	8,0	5,8 ^d ± 0,3	32,5	1,50	1,24 ± 0,02	17,33
8	V18 + X38 + N37	8,0	5,3^f ± 0,3	33,8	1,52	1,22 ± 0,02	19,73

Ghi chú: Sự khác nhau giữa các chữ cái trên cùng một cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$

Bảng 3. Độ giảm hàm lượng cellulose của khối ủ sau 45 ngày

STT	Công thức	Lượng cellulose trong 1 gam mẫu (g)	Độ giảm (g)	Tỷ lệ giảm (%)
1	Đối chứng	0,78 ^a	0,02	2,56
2	Chủng V18	0,75 ^b	0,10	13,33
3	Chủng X38	0,77 ^{ab}	0,15	19,48
4	Chủng N37	0,78 ^a	0,09	11,53
5	Chủng V18 + X38	0,77 ^{ab}	0,18	23,37
6	Chủng V18 + N37	0,72 ^c	0,11	15,28
7	Chủng X38 + N37	0,75 ^b	0,16	21,33
8	Chủng V18 + X38 + N37	0,75^b	0,22	29,33

Ghi chú: Sự khác nhau giữa các chữ cái trên cùng một cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$

4. Kết luận

Đã tạo được một tập hợp giống vi sinh vật ưa nhiệt gồm các chủng vi khuẩn V18, xạ khuẩn X38 và nấm mốc N37 có tiềm năng ứng dụng trong sản xuất phân bón hữu cơ từ bùn thải. Trong đó chủng V18 có khả năng phân giải tinh bột và casein cao nhất với đường kính vòng phân giải tương ứng đạt 22,5 mm và 25,52 mm; chủng X38 có khả năng phân giải CMC cao nhất với đường kính vòng phân giải đạt 20,25 mm. Các chủng V18, N37 và X38 lần lượt thuộc các loài *Bacillus subtilis*, *Aspergillus fumigatus* và *Streptomyces glaucescens*. Việc bổ sung tập hợp giống này vào khối ủ đã nâng cao đáng kể hiệu quả phân hủy sinh khối bùn

thải nhà máy tinh bột sắn FOCOCEV Thừa Thiên Huế với độ giảm khối lượng, thể tích và cellulose tương ứng là 19,73; 33,75 và 29,33%.

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] Willson G.B., Dalmat D., Sewage sludge composting in the U.S.A, BioCycle, 24(5) (1983) 20.

- [2] Krzysztof Z., Paweł B., Intensification of sewage sludge composting. *Biotechnol. Food Sci.*, 75(1) (2011) 15.
- [3] Yusaku F., Shigeru K., Isolation and identification of thermophilic bacteria from sewage sludge compost. *J. Ferment. Bioeng.*, 72 (1991) 334.
- [4] Balasundaran M., Development of microbial inoculants for aerobic composting. KPRI Research Report N° 324, 2008.
- [5] Ponnuswamy V., Samuel G.P.V., A simple method for the detection of protease activity on agar plates using bromocresolgreen dye. *J. Biochem. Tech.*, 4(3) (2013) 628-630.
- [6] Johnson L.F., Curl E.A., Bond J.H., Fribourg H.A., *Methods of studying soil microflora and plant disease relationships*. Burges Publishing Co., Minneapolis, Minnesota, 1959.
- [7] Altschul S.F., Madden T.F., Schaffer A.A., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J., Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25 (1997) 3389-3402.
- [8] Viện Thổ nhưỡng Nông hóa, Sổ tay phân tích Đất-Nước-Phân bón-Cây trồng, NXB Nông nghiệp, Hà Nội, 1983.

Isolation, Selection and Utilization of Thermophilic Microorganisms in Degrading Sludge from Thua Thien Hue FOCOCEV Tapioca Starch Processing Factory

Ngo Thi Tuong Chau¹, Pham Thi Ngoc Lan²,
Phan Thi Thao Ly², Le Van Thien¹, Nguyen Ngan Ha¹

¹*Faculty of Environmental Sciences, VNU University of Science, 334 Nguyen Trai, Thanh Xuan, Hanoi*

²*Faculty of Biology, Hue University of Sciences, 77 Nguyen Hue, Hue*

Abstract: By using an enrichment culture medium and suitable isolation media, there were 78 bacterial, 73 actinomyces and 53 fungal strains isolated from sludge of Thua Thien Hue FOCOCEV tapioca starch processing factory. Based on the degradation activities of organic compounds that were determined by the well diffusion method, strains namely V18, X38 and N37 were selected. They did not show mutual antagonism. The strains V18, N37 and X38 were identified as members of the species *Bacillus subtilis*, *Aspergillus fumigatus*, and *Streptomyces glaucescens*, respectively based on their morphology characteristics and 16S rRNA (or 28S rRNA) gene sequences analysis. Compared to the control and other experimental formulations, the formulation in which FOCOCEV sludge was inoculated jointly with three thermophilic microbial strains, could enhance remarkably the sludge digestion with the decrease of dry weight, pile height, and cellulose content were 19.73, 33.75 and 29.33%, respectively. Therefore, this consortium may be considered for the utilization in composting of FOCOCEV sludge particularly and other organic sludges generally.

Keywords: Thermophilic microorganisms, sludge, aerobic composting.