

ISOLATION OF SULFUR OXIDIZING BATERIA FROM PIGGERY WASTES IN SOME PROVINCES OF THE MEKONG DELTA

Quach Van Cao Thi^{1*}, Tran Quoc Dung²

¹Vinh Long University of Technology Education, ²Party Committee of Agencies and Enterprises of Vinh Long province

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 27/10/2022	Hydrogen sulfide (H ₂ S) is a toxic gas and produces offensive rotte egg-like odor when it is present in the air. The aim of this study was to isolate and selection of sulfur oxidizing bacteria from piggery wastes for H ₂ S removal. The results showed that 49 sulfur oxidizing bacteria isolates were isolated from sediments and wastewater of piggery farms in Vinh Long, Dong Thap, Hau Giang, Soc Trang provinces and Can Tho city. Among them, two isolates T5 and T11 had higher sulfur oxidizing activity than the rest of isolates with sulfate concentration was 150 mg/l after 10 days inoculation. Preliminary application of sulfur oxidizing capacity on piggery wastewater revealed that two isolates T5 and T11 could reduce pH and increase sulfate concentration (T5 and T11 isolates reached 38.64 and 22.52 mg SO ₄ ²⁻ /l respectively), accompanied with cell growth after 6 days inoculation. Based on their morphological, physiological, biochemical characterization, PCR and 16S rRNA partial sequencing demonstrated that isolate T5 had identity with <i>Acinetobacter</i> sp. 98.08% and T11 had identity with <i>Klebsiella</i> sp. (96.60%) on GenBank.
Revised: 05/4/2023	
Published: 13/4/2023	
KEYWORDS	
<i>Acinetobacter</i>	
Hydrogen sulfide	
<i>Klebsiella</i>	
Piggery waste	
Sulfur oxidizing bacteria	

PHÂN LẬP VI KHUẨN OXID HÓA LƯU HUỖNH TỪ CHẤT THẢI CHĂN NUÔI HEO Ở MỘT SỐ TỈNH ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG

Quách Văn Cao Thi^{1*}, Trần Quốc Dũng²

¹Trường Đại học Sư phạm Kỹ thuật Vĩnh Long, ²Đảng ủy Khối Cơ quan và Doanh nghiệp tỉnh Vĩnh Long

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 27/10/2022	Hydrogen sulfur (H ₂ S) là một trong những khí độc và có mùi trứng thối khó chịu khi chúng hiện diện trong không khí. Mục tiêu của nghiên cứu này là phân lập và tuyển chọn vi khuẩn có khả năng oxid hóa lưu huỳnh từ chất thải chăn nuôi heo để xử lý mùi hôi. Kết quả đề tài đã phân lập được 49 chủng vi khuẩn từ chất thải của các trại chăn nuôi heo ở Đồng bằng sông Cửu Long. Khảo sát hoạt tính oxid hóa lưu huỳnh của các chủng vi khuẩn cho thấy, 30/49 chủng (chiếm 61,22%) có khả năng oxid hóa lưu huỳnh, trong đó 2 chủng T5 và T11 có hoạt tính oxid hóa lưu huỳnh cao nhất với nồng độ sulfate (SO ₄ ²⁻) là 150 mg/l sau 10 ngày bổ sung vi khuẩn. Kết quả ứng dụng bước đầu vi khuẩn để xử lý mùi hôi cho thấy, 2 chủng T5 và T11 có khả năng oxid hóa lưu huỳnh trong nước thải chăn nuôi heo khi chúng làm giảm pH, tăng nồng độ SO ₄ ²⁻ (nồng độ SO ₄ ²⁻ của chủng T5 đạt 38,64 và chủng T11 đạt 22,52 mg SO ₄ ²⁻ /l) cùng với sự tăng mật số vi khuẩn sau 6 ngày bổ sung vi khuẩn. Dựa trên kết quả quan sát đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa, kết quả PCR và giải trình tự đoạn gen 16S RNA cho thấy, chủng T5 tương đồng 98,08% với vi khuẩn <i>Acinetobacter</i> sp., trong khi chủng T11 tương đồng 96,60% với vi khuẩn <i>Klebsiella</i> sp. trên ngân hàng gen.
Ngày hoàn thiện: 05/4/2023	
Ngày đăng: 13/4/2023	
TỪ KHÓA	
<i>Acinetobacter</i>	
Chất thải chăn nuôi heo	
Hydrogen sulfur	
<i>Klebsiella</i>	
Vi khuẩn oxid hóa lưu huỳnh	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.6798>

* Corresponding author. Email: thiqvc@vlute.edu.vn

1. Giới thiệu

Chăn nuôi heo là một trong những hoạt động sản xuất thế mạnh của Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL). Hoạt động này không chỉ góp phần làm tăng thu nhập cho người chăn nuôi mà còn cung cấp một lượng lớn thực phẩm giàu dinh dưỡng, vitamin, khoáng chất cho người tiêu dùng. Ngoài ra, phân heo còn là nguồn phân hữu cơ rất tốt cho cây trồng [1]. Cùng với sự phát triển của ngành chăn nuôi heo, vấn đề môi trường là một trong những yêu cầu cấp bách trong việc quản lý chất thải từ hoạt động chăn nuôi heo. Ngoài việc ô nhiễm chất thải hữu cơ và vi sinh vật đến nguồn nước sinh hoạt và môi trường sống xung quanh, ảnh hưởng đến sức khỏe người dân thì việc ô nhiễm mùi hôi, đặc biệt là mùi H_2S từ hoạt động chăn nuôi heo là vấn đề cần quan tâm hiện nay.

Theo Lê Văn Khoa (1995) [2], khi hàm lượng chất hữu cơ trong nước thải càng cao thì nồng độ H_2S càng cao. Kết quả nghiên cứu của Bùi Thị Nga và Nguyễn Văn Toàn (2006) [3] tại khu vực trại chăn nuôi thực nghiệm khu II Đại học Cần Thơ cho thấy, tại nơi thải trực tiếp nước thải thì hàm lượng nhu cầu oxy hóa học (COD - chemical oxygen demand) trung bình khoảng 878,9 mg/l, đạm amon ($N-NH_4^+$) là 70,4 mg/l và H_2S là 32 mg/l vượt quá mức cho phép về tiêu chuẩn nước sạch và nước sinh hoạt của Việt Nam. Nghiên cứu của Kim và cộng sự (2004) [4] cho thấy, phần lớn các acid hữu cơ dễ bay hơi là nguồn gốc phát sinh mùi hôi từ chất thải chăn nuôi heo. Bên cạnh đó, các hợp chất sulfur cũng là nguyên nhân chính gây ra mùi hôi trong chất thải chăn nuôi heo, đặc biệt là hydrogen sulfide (H_2S). H_2S là một loại khí độc không màu, có mùi hôi giống như mùi trứng thối khi chúng ở nồng độ rất thấp trong môi trường. Trong tự nhiên có nhiều nhóm vi khuẩn có khả năng oxy hóa các hợp chất sulfur như H_2S , sulfur (S^0) và thiosulfate ($S_2O_3^{2-}$) được gọi là vi khuẩn oxy hóa sulfur (sulfur oxidizing bacteria, SOB) [5]. Vi khuẩn SOB hiện diện rộng rãi trong môi trường tự nhiên và tham gia hầu hết vào các phản ứng oxy hóa các hợp chất sulfur như trong bùn hoạt tính [6], từ các hồ kiềm hay hồ soda (soda lake) [7], từ các nơi có nồng độ muối rất cao [8], trong các mỏ dầu thô [9] thậm chí ở vùng Nam cực và Bắc cực [10].

Hiện nay, trên thế giới có nhiều biện pháp để xử lý mùi hôi nhưng nhìn chung các biện pháp vẫn còn tốn kém. Do đó, các nhà khoa học trên thế giới đã và đang tập trung vào việc sử dụng các biện pháp sinh học cho việc loại bỏ mùi hôi từ các trại chăn nuôi, nhất là trại chăn nuôi heo, trong đó quan tâm hàng đầu của các nhà khoa học là các vi khuẩn có thể xử lý mùi hôi từ các hợp chất hữu cơ và nhất là các vi khuẩn oxy hóa lưu huỳnh (sulfur oxidizing bacteria, SOB). Tuy nhiên, lĩnh vực này ở nước ta hiện nay vẫn chưa được các nhà khoa học quan tâm và nghiên cứu nhiều. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm phân lập 1 số chủng vi khuẩn có khả năng oxy hóa lưu huỳnh từ các trại chăn nuôi heo nhằm ứng dụng chúng trong việc xử lý mùi hôi trong tương lai.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Mẫu bùn và nước thải thu thập từ các trại chăn nuôi heo (qui mô từ 500-1000 con) ở một số tỉnh Đồng bằng Sông Cửu Long như Vĩnh Long, Kiên Giang, Sóc Trăng, Hậu Giang và thành phố Cần Thơ dùng để phân lập vi khuẩn. Mẫu bùn và nước thải được thu ở một trại nuôi heo từ mỗi tỉnh. Mẫu bùn và nước thải được thu ở 5 vị trí/trại nuôi heo và được cho vào các chai đựng mẫu vô trùng và mang về phòng thí nghiệm vi sinh để tiến hành công tác phân lập.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp phân lập và định danh vi khuẩn

Vi khuẩn oxy hóa lưu huỳnh được phân lập trên môi trường Cha [11]. Các bước thực hiện như sau: cân 1g mẫu bùn hoặc hút 1 mL nước thải chăn nuôi heo cho vào 99 mL nước cất vô trùng trong bình erlenmeyer 250 mL, đập bình bằng nút bông và giấy dầu. Đem các bình erlenmeyer đã pha loãng đặt trên máy lắc 120 vòng/phút để đồng nhất mẫu. Hút lần lượt 100 μ L

mẫu nước và mẫu bùn đã pha loãng rồi nhỏ lên đĩa petri có môi trường Cha. Dùng que gạt thủy tinh phân phối dịch mẫu trải đều khắp mặt thạch. Đĩa môi trường được ủ ở 30°C từ 24 - 48 giờ ngày để khuẩn lạc vi khuẩn phát triển.

Vi khuẩn sau khi phân lập sẽ được kiểm tra một số đặc điểm về cơ bản như: hình thái khuẩn lạc (màu sắc, kích thước, độ nổi, dạng bìa), khả năng chuyển động, hình dạng tế bào và nhuộm Gram và bào tử. Một số chủng có hoạt tính oxid hóa lưu huỳnh cao sẽ được định danh bằng kỹ thuật PCR [12] và giải trình tự đoạn gene 16S RNA.

2.2.2. Phương pháp đánh giá khả năng oxid hóa lưu huỳnh của các chủng vi khuẩn

Khả năng oxid hóa lưu huỳnh của các chủng vi khuẩn phân lập được xác định bởi sự tích tụ SO_4^{2-} trong môi trường nuôi cấy theo mô tả của Asano và cộng sự (2007) [13]. Các bước thực hiện như sau: môi trường Cha được cho vào trong các ống nghiệm và được khử trùng. Các chủng vi khuẩn phân lập được bổ sung vào trong môi trường Cha và ủ khoảng 10 ngày ở 30°C để xác định nồng độ SO_4^{2-} sinh ra trong môi trường. Nồng độ SO_4^{2-} có thể được xác định bằng phương pháp sắc ký ion hay phương pháp đo độ đục (turbidimetric method). Trong phương pháp đo độ đục, đo sự hấp thụ của các mẫu ở bước sóng 430 nm trên máy đo quang phổ và so sánh với đường chuẩn để xác định nồng độ SO_4^{2-} của các chủng vi khuẩn.

2.2.3. Ứng dụng bước đầu khả năng oxid hóa lưu huỳnh của các chủng vi khuẩn trên nước thải chăn nuôi heo

Để đánh giá khả năng oxid hóa lưu huỳnh của các chủng vi khuẩn trên nước thải chăn nuôi heo, thí nghiệm được tiến hành như sau: nước thải chăn nuôi heo được cho vào các bình tam giác với thể tích 150 mL (bổ sung 10 g/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) và khử trùng ở nhiệt độ 121°C trong 20 phút. Bổ sung vi khuẩn chủng T5 và T11 (5% vi khuẩn ở mật số 10^8 CFU/mL) vào các bình sau khi khử trùng và đặt các bình trên máy lắc ở vận tốc 120 vòng/phút.

Thí nghiệm được bố trí thành các nghiệm thức như sau: nghiệm thức đối chứng: nước thải không có bổ sung vi khuẩn; nghiệm thức 1: nước thải được bổ sung vi khuẩn chủng T5 và nghiệm thức 2: nước thải được bổ sung vi khuẩn chủng T11. Mỗi nghiệm thức thí nghiệm được lặp lại ba lần. Các chỉ tiêu theo dõi thí nghiệm bao gồm: mật số vi khuẩn, giá trị pH và nồng độ SO_4^{2-} của các nghiệm thức thí nghiệm ở ngày 0, 2, 4 và ngày 6. Mật số tế bào vi khuẩn được xác định dựa theo phương pháp đếm sống của Hoben và Somasegaran (1982) [14].

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Kết quả phân lập vi khuẩn

Dựa trên đặc điểm về hình dạng, màu sắc và kích thước của khuẩn lạc vi khuẩn phát triển trên môi trường Cha sau 1 - 3 ngày ủ ở 30°C, 49 chủng vi khuẩn được phân lập từ các mẫu nước và mẫu bùn của các trại chăn nuôi heo ở các tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long như Vĩnh Long, Kiên Giang, Sóc Trăng, Hậu Giang và thành phố Cần Thơ. Sự phân bố của các chủng vi khuẩn phân lập được có cả trên mẫu nước (25/49 chủng) chiếm 51% và mẫu bùn (24/49 chủng) chiếm 49% cho thấy sự đa dạng và phong phú của nhóm vi khuẩn này trong tự nhiên, nơi có sự hiện diện của hợp chất lưu huỳnh. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Barbosa và cộng sự (2006) [6], Sorokin và cộng sự (2006) [8], Kodama và Watanabe (2003) [9], Sattley và Madigan (2006) [10]. Nguồn gốc của các dòng vi khuẩn phân lập trên môi trường Cha được trình bày chi tiết ở Bảng 1.

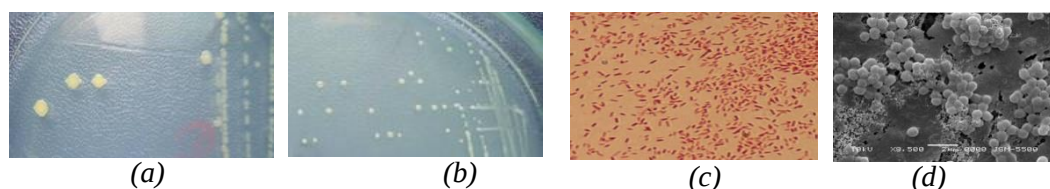
Bảng 1. Nguồn gốc các dòng vi khuẩn phân lập trên môi trường Cha

Nguồn phân lập	Số chủng vi khuẩn	Địa điểm
Bùn	7	Kiên Giang
Nước	9	
Bùn	5	Hậu Giang
Bùn	9	
Nước	3	Cần Thơ

Nguồn phân lập	Số chủng vi khuẩn	Địa điểm
Bùn	2	Vĩnh Long
Nước	4	
Bùn	6	Sóc Trăng
Nước	4	
Tổng	49	

3.2. Đặc điểm khuẩn lạc và hình dạng tế bào các chủng vi khuẩn phân lập

Hầu hết các chủng vi khuẩn phân lập được có khuẩn lạc dạng tròn (43/49 chủng) chiếm 87,76%, bìa nguyên (45/49 chủng) chiếm 91,84%, Màu sắc của các khuẩn lạc vi khuẩn cũng có sự đa dạng và phong phú bao gồm màu trắng đục (24/49 chủng) chiếm 44,98%, độ nổi khuẩn lạc là mô (42/49 chủng) chiếm 85,71%. Kích thước khuẩn lạc của các chủng vi khuẩn phân lập phát triển trên môi trường agar sau 1 - 3 ngày cũng có sự biến động, có những chủng có kích thước rất nhỏ chẳng hạn như chủng T1 (0,1 mm), trong khi đó có những chủng có kích thước rất lớn như chủng T47 (>2 mm) nhưng nhìn chung các khuẩn lạc có kích thước dao động từ 0,2 - 0,6 mm. Kết quả nhuộm Gram cho thấy tất cả các chủng vi khuẩn phân lập được là những tế bào vi khuẩn Gram âm khi tế bào chúng bắt màu hồng của fuchsin (Hình 1). Quan sát dưới kính hiển vi cho thấy, tất cả các chủng vi khuẩn phân lập có dạng hình que ngắn và là những tế bào chuyển động.



Hình 1. Kết quả phân lập vi khuẩn oxid hóa lưu huỳnh
(a, b): khuẩn lạc vi khuẩn chủng T5 và T11 trên môi trường Cha; (c): Ảnh nhuộm Gram chủng T5;
(d): Ảnh chụp dưới kính hiển vi điện tử chủng T5

3.3. Khả năng oxid hoá lưu huỳnh của các chủng vi khuẩn phân lập

Khả năng oxid hoá lưu huỳnh của các chủng vi khuẩn phân lập được kiểm tra bằng cách đo nồng độ SO_4^{2-} tích tụ trong môi trường nuôi cấy sau 10 ngày bổ sung vi khuẩn. Kết quả cho thấy, 30/49 chủng vi khuẩn phân lập đều có khả năng oxid hóa lưu huỳnh (chiếm 61,22%), điều này được chứng minh bởi nồng độ SO_4^{2-} tăng sau 10 ngày sau khi bổ sung vi khuẩn so với các ống nghiệm không có bổ sung vi khuẩn. Trong đó chủng T5 và T11 có nồng độ SO_4^{2-} (150 mg/l) cao nhất so với các chủng còn lại, thấp nhất là chủng T8, T44 và T47 (nồng độ SO_4^{2-} là 10 mg/l). Nhìn chung, các chủng vi khuẩn có khả năng oxid hóa lưu huỳnh cho ra SO_4^{2-} có nồng độ SO_4^{2-} dao động trong khoảng 10 - 150 mg/l sau 10 ngày bổ sung vi khuẩn.

Kết quả đo pH cũng cho thấy ở các ống nghiệm có bổ sung vi khuẩn thì pH giảm so với các ống nghiệm không có bổ sung vi khuẩn (pH=6,8) sau 10 ngày. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu của Mason và Kelly (1998) [15], Asano và cộng sự. (2007) [13], Kleerebezem và Mendez (2002) [16], Sublette (2002) [17], Chung và cộng sự (1996) [18]. Các tác giả này cho rằng, khi có sự hiện diện của vi khuẩn oxid hóa lưu huỳnh, chúng sẽ oxid hóa những hợp chất lưu huỳnh như S^0 , thiosulfate và H_2S ... để lấy điện tử và nguồn năng lượng cho hoạt động tế bào của chúng. Kết quả của quá trình này sẽ tạo ra SO_4^{2-} và acid làm cho pH của môi trường giảm theo [19]-[21].

Thiosulfate là một cơ chất phổ biến và thích hợp nhất đối với vi khuẩn oxid hóa lưu huỳnh. Nó không chỉ hòa tan tốt trong nước, bền ở nhiệt độ cao mà còn là nguồn điện tử và năng lượng cho sự phát triển tế bào vi khuẩn SOB. Chính vì vậy mà các nhà khoa học thường sử dụng thiosulfate để phân lập vi khuẩn SOB thay vì các hợp chất lưu huỳnh khác. Thêm vào đó, nghiên cứu của các tác giả như Brune (1989) [22], Kelly cùng cộng sự (1997) [23] và Tang cùng cộng sự

(2009) [21] chứng minh rằng vi khuẩn oxid hóa lưu huỳnh có khả năng oxid hóa thiosulfate thì cũng có khả năng tương tự đối với H_2S .

Như vậy, dựa trên các đặc điểm về hình thái khuẩn lạc như hình dạng, màu sắc, kích thước cũng như hình dạng tế bào vi khuẩn (hình que), khả năng chuyển động (tế bào chuyển động), kết quả nhuộm Gram (Gram âm) cũng như thử khả năng oxid hóa lưu huỳnh (tạo ra SO_4^{2-}) và sự giảm pH trên môi trường Cha của các dòng vi khuẩn phân lập thì các chủng vi khuẩn phân lập được có những đặc tính của nhóm vi khuẩn oxid hóa lưu huỳnh.

3.4. Kết quả định danh vi khuẩn bằng kỹ thuật PCR và giải trình tự đoạn gene 16S rRNA

Các chủng vi khuẩn có hoạt tính oxid hóa lưu huỳnh được chọn để thực hiện phản ứng PCR. Kết quả điện di trên gel agarose cho thấy tất cả các chủng vi khuẩn kiểm tra đều xuất hiện band DNA ở vị trí khoảng 1,500 bp (Hình 2).



Hình 2. Kết quả khuếch đại đoạn gene 16S rRNA của các chủng vi khuẩn oxid hóa lưu huỳnh bằng kỹ thuật PCR

Ba chủng có khả năng oxid hoá lưu huỳnh cao nhất được chọn để giải trình tự. Kết quả cho thấy, 2 chủng T3 và T5 tương đồng 97,12 - 98,08% với vi khuẩn *Acinetobacter* sp., trong khi chủng T11 tương đồng 96,60% với vi khuẩn *Klebsiella* sp. trên ngân hàng gen (Hình 3 và 4).

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☐	Acinetobacter radioresistens strain OsEp_Plm_1...	Acineto...	1081	1081	88%	0.0	98.08%	1402	MT367790.1
☐	Acinetobacter sp. strain NyZ450 16S ribosomal R...	Acineto...	1081	1081	88%	0.0	98.08%	1341	MT459299.1
☐	Acinetobacter radioresistens strain SRSU4 16S ri...	Acineto...	1081	1081	88%	0.0	98.08%	1231	MT258988.1
☐	Acinetobacter radioresistens O139 gene for 16S...	Acineto...	1081	1081	88%	0.0	98.08%	1408	LC515575.1
☐	Acinetobacter sp. strain EB19 16S ribosomal RN...	Acineto...	1081	1081	88%	0.0	98.08%	1402	MH130306.1

Hình 3. Kết quả Blast trình tự chủng T5 trên ngân hàng NCBI

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☐	Klebsiella pneumoniae strain BYK-9 16S riboso...	Klebsiell...	1533	1533	99%	0.0	96.60%	1504	KP255917.1
☐	Klebsiella sp. strain Q2 16S ribosomal RNA gen...	Klebsiell...	1526	1526	99%	0.0	96.49%	1410	MN733074.1
☐	Klebsiella quasipneumoniae strain KP18-31 chro...	Klebsiell...	1526	12156	99%	0.0	96.49%	5157396	CP045641.1
☐	Klebsiella quasipneumoniae strain TH114 chrom...	Klebsiell...	1526	12161	99%	0.0	96.49%	5109521	CP035207.1

Hình 4. Kết quả Blast trình tự chủng T11 trên ngân hàng NCBI

Việc sử dụng những hợp chất lưu huỳnh như dimethylsulfide (DMS) của vi khuẩn thuộc giống *Acinetobacter* đã được nghiên cứu bởi Fuse và cộng sự (2000) [24]. Nghiên cứu của Potivichayanon và cộng sự (2006) [25] chứng minh vi khuẩn *Acinetobacter* có thể loại bỏ H_2S . Kết quả nghiên cứu của Aguilar và cộng sự (2008) [26] cho thấy vi khuẩn *Acinetobacter* cũng có khả năng oxid hóa những hợp chất lưu huỳnh như S^0 hoặc thiosulfate thành SO_4^{2-} . Điều này cho thấy 2 chủng vi khuẩn T3 và T5 phân lập được cũng có hoạt tính của giống *Acinetobacter* đã được báo cáo trước đây. Trong khi đó, khả năng oxid hoá lưu huỳnh của vi khuẩn *Klebsiella* sp. cũng được báo cáo bởi nhiều tác giả. Nghiên cứu của Behera và cộng sự (2016) [27] cho thấy vi

khuẩn *Klebsiella* chủng SOB-7 phân lập từ đất cây được ở Ấn Độ có khả năng sinh sulfate là 243 mg/ml và làm giảm pH từ 7,0 xuống 4,0. Trong khi đó, nghiên cứu của Yousef và cộng sự (2019) [28] cho thấy vi khuẩn *Klebsiella* sp. phân lập từ chất thải và nước thải công nghiệp ở Ai Cập cũng có khả năng oxid hóa lưu huỳnh với nồng độ sulfate được sinh ra trong môi trường dao động từ 76 đến 155 mg/mL và giá trị pH giảm từ $7,5 \pm 0,2$ xuống $5,0 \pm 0,5$.

3.5. Ứng dụng bước đầu khả năng oxid hóa lưu huỳnh của các chủng vi khuẩn trên nước thải chăn nuôi heo

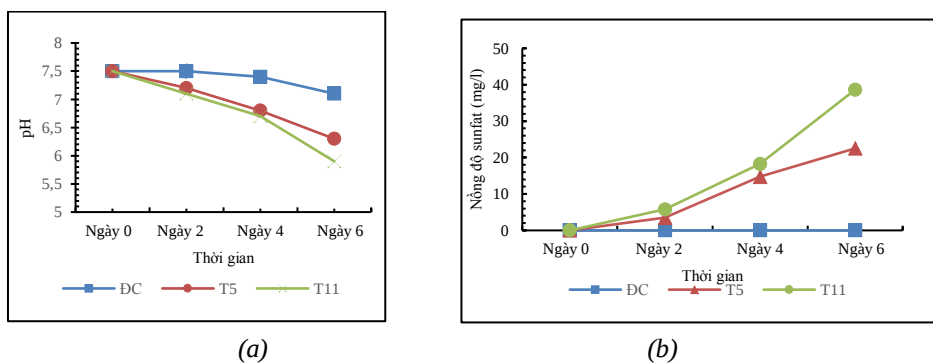
Kết quả quan sát mật số tế bào trung bình của 2 chủng vi khuẩn T5 và T11 trong nước thải chăn nuôi heo với thể tích 150 mL (bổ sung 10.000 mg/l $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 = 4050 \text{ mg/l}$ dạng S) cho thấy, 2 chủng này đều phát triển và tăng mật số qua các ngày nuôi cấy. Trong khi đó, nghiệm thức đối chứng (không có bổ sung vi khuẩn) không có khuẩn lạc vi khuẩn phát triển trên môi trường agar. Hai chủng T5 và T11 đạt mật số lớn hơn 10^5 tế bào/mL ở ngày nuôi thứ 2, mật số tế bào 2 chủng T5 và T11 cao nhất là ở ngày thứ 4 (chủng T5 là $2,18 \times 10^7$ CFU/mL và chủng T11 là $3,32 \times 10^9$ CFU/mL). Ở ngày 6, mật số vi khuẩn của 2 chủng này giảm, điều này có thể do các chất dinh dưỡng cần thiết cho sự tăng trưởng và phát triển của vi khuẩn trong môi trường đã được vi khuẩn sử dụng (Bảng 2).

Bảng 2. Mật số vi khuẩn (CFU/mL) của 2 chủng T5 và T11 trong nước thải chăn nuôi heo

Nghiệm thức	Ngày 0	Ngày 2	Ngày 4	Ngày 6
Đối chứng	0 ^c	0 ^c	0 ^c	0 ^c
Chủng T5	$1,25^b \times 10^4$	$1,36^b \times 10^6$	$2,18^b \times 10^7$	$1,26^b \times 10^5$
Chủng T11	$2,36^a \times 10^6$	$3,01^a \times 10^8$	$3,32^a \times 10^9$	$2,93^a \times 10^7$

Ghi chú: Các giá trị trong cùng một cột có các ký tự theo sau giống nhau thì sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($P < 0.05$)

Trong khi đó, giá trị pH (Hình 5) ở 2 nghiệm thức có chủng vi khuẩn cũng giảm (pH dao động từ 7,1 - 5,9) qua các ngày nuôi cấy so với nghiệm thức không có bổ sung vi khuẩn (giá trị pH không thay đổi pH = 7,5). Kết quả này được Tang và cộng sự (2009) [21] giải thích chi tiết theo phương trình như sau: $\text{S}_2\text{O}_3^{2-} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{SO}_4^{2-} + 2\text{H}^+$.



Hình 5. Ảnh hưởng của 2 chủng vi khuẩn T5 và T11 lên pH (a) và nồng độ sulfate (b) trong nước thải chăn nuôi heo

Hai nghiệm thức có bổ sung vi khuẩn có sự tăng nồng độ SO_4^{2-} qua các ngày 2, 4 và ngày 6, trong đó chủng T11 cho nồng độ SO_4^{2-} trong nước thải cao hơn chủng T5 (chủng T11 đạt 38,64 mg SO_4^{2-} /l và chủng T5 đạt 22,52 mg SO_4^{2-} /l sau 6 ngày bổ sung). Trong khi đó, nồng độ SO_4^{2-} không được phát hiện thậm chí sau 6 ngày nuôi cấy ở nghiệm thức đối chứng (Hình 5). Kết quả này cho thấy khi có sự hiện diện của vi khuẩn SOB trong môi trường có bổ sung $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, chúng sẽ oxid hóa hợp chất này và tạo ra sản phẩm sau cùng là SO_4^{2-} . Tang và cộng sự (2009) [21] giải thích sự hình thành SO_4^{2-} theo phương trình đã được trình bày ở phần trên.

Khi so sánh khả năng oxid hóa $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ trong ống nghiệm của 2 chủng vi khuẩn T5 và T11, kết quả cho thấy chủng T5 trong ống nghiệm có khả năng oxid hóa $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ mạnh hơn chủng T11 khi nồng độ SO_4^{2-} tăng cao hơn và pH giảm thấp hơn chủng T11 sau 10 ngày chủng vi khuẩn. Tuy nhiên, khi ứng dụng 2 chủng vi khuẩn này trên nước thải chăn nuôi heo thì khả năng oxid hóa $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ của chủng T11 lại tốt hơn chủng T5 sau 6 ngày chủng vi khuẩn. Điều này có thể là do chủng T11 thích nghi với các điều kiện trong nước thải chăn nuôi heo như pH, nhiệt độ và các yếu tố dinh dưỡng khác tốt hơn chủng T5. Kết quả là nồng độ SO_4^{2-} trong nước thải tăng cao hơn nồng độ SO_4^{2-} trong ống nghiệm thậm chí chỉ sau 6 ngày bổ sung vi khuẩn chủng T11 (trên nước thải nồng độ SO_4^{2-} sau 6 ngày là 38,64 mg/l so với thí nghiệm trong ống nghiệm là 10 mg/l). Ngược lại chủng T5 cho nồng độ SO_4^{2-} sinh ra trong thí nghiệm với nước thải sau 6 ngày là 22,52 mg/l thấp hơn so với trên ống nghiệm là 52,5 mg/l.

Khi mật số vi khuẩn tăng qua các ngày nuôi thì giá trị pH cũng giảm theo, đồng thời nồng độ SO_4^{2-} tích tụ trong môi trường cũng tăng theo. Kết quả này cho thấy sự hiện diện của 2 chủng vi khuẩn T5 và T11 đã oxid hóa hợp chất lưu huỳnh (cụ thể là $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) trong nước thải chăn nuôi heo như là nguồn điện tử và năng lượng cho sự tăng trưởng và phát triển của tế bào của chúng và tạo sản phẩm sau cùng là SO_4^{2-} . Khả năng oxid hóa hợp chất lưu huỳnh trong phòng thí nghiệm và ngoài thực tế của 2 chủng vi khuẩn T11 và T5 là rất thấp. Đối với chủng T5, trong phòng thí nghiệm khả năng oxid hóa chỉ đạt 0,4% (4050 ppm S cho vào và 17,5 ppm S được sinh ra dưới dạng SO_4^{2-}), trong khi đó chủng T11 chỉ đạt 0,08%. Khi ứng dụng 2 chủng vi khuẩn này để xử lý nước thải thì kết quả trái ngược nhau, chủng T11 cho kết quả oxid hóa hợp chất S nhiều hơn so với chủng T5. Qua thí nghiệm trên cho thấy rằng, việc tối ưu hóa môi trường nuôi cấy là rất cần thiết.

4. Kết luận

Trong nghiên cứu này, đã tiến hành phân lập được 30 chủng vi khuẩn có khả năng oxid hoá hợp chất lưu huỳnh trong chất thải chăn nuôi heo ở một số tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long, trong đó 2 chủng T5 và T11 có hoạt tính cao nhất với nồng độ SO_4^{2-} là 150 mg/l sau 10 ngày bổ sung vi khuẩn. Hai chủng T5 và T11 được giải trình tự với kết quả chủng T5 tương đồng 98,08% với vi khuẩn *Acinetobacter* sp., trong khi chủng T11 tương đồng 96,60% với vi khuẩn *Klebsiella* sp. trên ngân hàng gen. Hai chủng vi khuẩn T5 và T11 có khả năng oxid hóa lưu huỳnh trong nước thải chăn nuôi heo khi chúng làm giảm pH, tăng nồng độ SO_4^{2-} (chủng T5 đạt 22,52 mg SO_4^{2-} /l và chủng T11 đạt 38,64 mg SO_4^{2-} /l) cùng với sự tăng mật số của chúng sau 6 ngày bổ sung.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] H. T. T. Hoa and D. D. Thuc, "Chemical properties of some organic fertilizers and crop by-products used in agriculture on sandy soils in Thua Thien Hue province," (in Vietnamese), *Science Journal of Hue University*, no. 57, pp. 59-68, 2010.
- [2] L. V. Khoa, *Environment and pollution*. Viet Nam Education publishing House, 1995.
- [3] B. T. Nga and N. V. Toan, "Surface water quality and organic waste in experimental breeding farm area II Can Tho University," (in Vietnamese), *Can Tho University Journal of Science*, vol. 5, pp. 158-166, 2006.
- [4] M. K. Kim, K. M. Choi, C. R. Yin, K. Y. Lee, W. T. Im, J. H. Lim, and S. T. Lee, "Odorous swine wastewater treatment by purple non-sulfur bacteria, *Rhodospseudomonas palustris*, isolated from eutrophicated ponds," *Biotechnology Letters*, vol. 26, pp. 819-822, 2004.
- [5] D. M. Sylvia, J. J. Fuhrmann, P. G. Hartel, and Zuberer, *Principles and Application of Soil Microbiology*, 2nd edition. Upper Saddle River, New Jersey, 2005.
- [6] V. L. Barbosa, S. D. Atkins, V. P. Barbosa, Burgess, and R. M. Stuetz, "Characterization of *Thiobacillus thioautotrophicus* isolated from an activated sludge bioreactor used for hydrogen sulfide treatment," *Journal of Applied Microbiology*, vol. 101, pp. 1269-1281, 2006.
- [7] D. Y. Sorokin, T. P. Tourova, T. V. Kolganova, K. A. Sjollem, and J. G. Kuenen, "Thioalkalispira microaerophila gen. nov., sp. nov., a novel lithoautotrophic, sulfur-oxidizing bacterium from soda lake," *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 52, pp. 2175-2182, 2002.

- [8] D. Y. Sorokin, T. P. Tourova, A. M. Lysenko, and G. Muyzer, "Diversity of culturable halophilic sulfur-oxidizing bacteria in hypersaline habitats," *Microbiology*, vol. 152, pp. 3013-3023, 2006.
- [9] Y. Kodama and K. Watanabe, "Isolation and characterization of a sulfur-oxidizing chemolithotroph growing on crude oil under anaerobic conditions," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 69, pp. 107-112, 2003.
- [10] W. M. Sattley and M. T. Madigan, "Isolation, characterization, and ecology of cold-active, chemolithotrophic, sulfur-oxidizing bacteria from perennially ice-covered Lake Fryxell, Antarctica," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 72, pp. 5562-5568, 2006.
- [11] J. M. Cha, W. S. Cha, and J. Lee, "Removal of organosulfur odor compounds by *Thiobacillus novellus* SRM, sulfur oxidizing microorganism," *Process Biotechnology*, vol. 34, pp. 659-665, 1999.
- [12] H. Heuer, M. Krsek, P. Baker, K. Smalla, and E. M. Wellington, "Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 63, pp. 3233-3241, 1997.
- [13] R. Asano, T. Sasaki, and Y. Nakai, "Isolation and characterization of sulfur oxidizing bacteria from cattle manure compost," *Animal Science Journal*, vol. 78, pp. 330-333, 2007.
- [14] H. J. Hoben and P. Somasegaran, "Comparison of the Pour, Spread, and Drop Plate Methods for Enumeration of Rhizobium spp. in Inoculants Made from Presterilized Peat," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 44, pp. 1246-1247, 1982.
- [15] J. Mason and D. P. Kelly, "Thiosulfate oxidation by obligately heterotrophic bacteria," *Microbial Ecology*, vol. 15, pp. 123-134, 1988.
- [16] R. Kleerebezem and R. Mendez, "Autotrophic denitrification for combined hydrogen sulfide removal from biogas and post - denitrification," *Water Science and Technology*, vol. 45, pp. 349-356, 2002.
- [17] K. L. Sublette and N. D. Sylvester, "Oxidation of hydrogen sulfide by continuous cultures of *Thiobacillus denitrificans*," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 29, pp. 753-758, 1987.
- [18] Y. C. Chung, C. Huang, and C. P. Tseng, "Operation optimization of *Thiobacillus thioparus* CH11 biofilter for hydrogen sulfide removal," *Journal of Biotechnology*, vol. 52, pp. 31-38, 1996.
- [19] Y. C. Chung, C. Huang, and C. P. Tseng, "Biodegradation of hydrogen sulfide by a laboratory-scale immobilized *Pseudomonas putida* CH11 biofilter," *Biotechnology Progress*, vol. 12, pp. 773-778, 1996.
- [20] H. Kim, J. Y. Kim, S. J. Chung, and Q. Xie, "Long - term operation of a biofilter for simultaneous removal of H₂S and NH₃," *Air and Waste Management Association*, vol. 52, pp. 1389-1398, 2002.
- [21] K. Tang, V. Baskaran, and M. Nemati, "Bacteria of the sulfur cycle: An overview of microbiology, biokinetics and their role in petroleum and mining industries," *Biochemical Engineering Journal*, vol. 44, pp. 73-94, 2009.
- [22] D. C. Brune, "Sulfur oxidation by phototrophic bacteria," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 975, pp. 189-221, 1989.
- [23] D. P. Kelly, J. K. Shergill, W. P. Lu, and A. P. Wood, "Oxidative metabolism of inorganic sulfur compounds by bacteria," *Antonie van Leeuwenhoek*, vol. 71, pp. 95-107, 1997.
- [24] H. Fuse, O. Takimura, K. Murakami, Y. Yamaoka, and T. Omori, "Utilization of dimethyl sulfide as a sulfur source with the aid light by *Marinobacterium* sp. strain DMS - S1," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 66, pp. 5527-5532, 2000.
- [25] S. Potivichayanon, P. Pokethitiyook, and M. Kruatrachue, "Hydrogen sulfide removal by a novel fixed - film bioscrubber system," *Process Biochemistry*, vol. 41, pp. 708-715, 2006.
- [26] J. R. P. Aguilar, J. J. P. Cabriaes, and M. M. Vega, "Identification and characterization of sulfur oxidizing bacteria in an artificial wetland that treats wastewater from a tannery," *International Journal of Phytoremediation*, vol. 10, pp. 359-370, 2008.
- [27] B. C. Behera, S. K. Singh, M. Patra, R. R. Mishra, B. K. Sethi, S. K. Dutta, and H. N. Thatoi, "Partial Purification and Characterisation of Sulphur Oxidase from *Micrococcus* sp. and *Klebsiella* sp. isolated from Mangrove Soils of Mahanadi River Delta, Odisha, India," *Universal Journal of Microbiology Research*, vol. 4, no. 3, pp. 66-78, 2016.
- [28] N. Yousef, A. Mawad, E. Aldaby, and M. Hassanein, "Isolation of sulfur oxidizing bacteria from polluted water and screening for their efficiency of sulfide oxidase production," *Global NEST Journal*, vol. 20, no. 3, pp. 259-264, 2019.