

BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF MICROBIAL STRATEGIES, APPLICATIONS FOR PRODUCTION TO REDUCE AIR POLLUTION IN LIVESTOCK AREAS

Nguyen Ha Trung, Bui Thi Thu Ha, Le Huy Hoang, Pham Kien Cuong, Nguyen Thi Tam Thu*

Institute of New Technology/ Academy of Military Science and Technology

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 18/10/2023	The environment and human health are seriously affected by the odor which produced from fermentation of livestock manure. NH ₃ and H ₂ S are the two main components which cause the problem. In order to reduce the odor pollution caused by livestock manure, efficient strains were isolated from swine manure (faeces, urine) in this study. Then, according to ammonia and hydrogen sulfide removal effects, the high efficiency of deodorizing strains was screened. Four strains isolated were identified as <i>Paracoccus</i> sp. N1, <i>Saccharomyces</i> sp. TB2, <i>Bacillus</i> sp. S3, <i>Trichoderma</i> sp. TB1. These strains have the capability to reduce NH ₃ odor from 18.45% to 56.44% and H ₂ S odor from 21.98% to 59.92%. A mixture of these strains in a 1:1:1:1 (v/v) ratio at the concentration of 10 ⁸ CFU/mL reduces waste odor, NH ₃ , and H ₂ S gases by 66.54% and 66.67% after 24 hours of treatment, 78.47% and 81.58% after 72 hours, and 84.69% and 86.67% after 120 hours compared to the control. These results provide the basis for applying the production of livestock waste odor control products in concentrated farming areas.
Revised: 05/01/2024	
Published: 03/02/2024	
KEYWORDS	
Microorganisms	
NH ₃	
H ₂ S	
Odor removal	
Livestock waste	

NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC CỦA MỘT SỐ CHỦNG VI SINH VẬT, ỨNG DỤNG TẠO CHẾ PHẨM KHỬ MÙI KHU CHĂN NUÔI TẬP TRUNG

Nguyễn Hà Trung, Bùi Thị Thu Hà, Lê Huy Hoàng, Phạm Kiên Cường, Nguyễn Thị Tâm Thu*

Viện Công nghệ mới/ Viện Khoa học và Công nghệ quân sự

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 18/10/2023	Môi trường sống và sức khỏe của con người bị ảnh hưởng nghiêm trọng bởi mùi hôi sinh ra từ quá trình phân hủy chất thải gia súc, gia cầm. NH ₃ và H ₂ S là 2 loại khí chính gây ra mùi hôi từ chất thải chăn nuôi. Để giảm thiểu nồng độ khí gây mùi NH ₃ và H ₂ S phát sinh từ các chuồng trại chăn nuôi tập trung, nghiên cứu này đã tiến hành phân lập và tuyển chọn từ chất thải chăn nuôi lợn (phân, nước tiểu) thu được 04 chủng vi sinh vật có khả năng khử mùi NH ₃ và H ₂ S bao gồm <i>Paracoccus</i> sp. N1, <i>Saccharomyces</i> sp. TB2, <i>Bacillus</i> sp. S3, <i>Trichoderma</i> sp. TB1. Các chủng này có khả năng khử mùi của NH ₃ từ 18,45% đến 56,44% và khử mùi H ₂ S từ 21,98% đến 59,92%. Hỗn hợp các chủng với tỷ lệ 1:1:1:1 (v/v) ở nồng độ 10 ⁸ CFU/mL có tác dụng giảm sự tạo mùi của chất thải, khí NH ₃ và H ₂ S tương ứng 66,54% và 66,67% sau 24 giờ xử lý, sau 72 giờ là 78,47% và 81,58%, sau 120 giờ là 84,69% và 86,67% so với đối chứng. Kết quả này là căn cứ để ứng dụng sản xuất chế phẩm khử mùi chất thải chăn nuôi tại các khu tập trung.
Ngày hoàn thiện: 05/01/2024	
Ngày đăng: 03/02/2024	
TỪ KHÓA	
Vi sinh vật	
NH ₃	
H ₂ S	
Khử mùi	
Chất thải chăn nuôi	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.8999>

* Corresponding author. Email: thu.3t.cnm@gmail.com

1. Giới thiệu

Nhu cầu về thực phẩm hiện tăng lên nhanh chóng do sự gia tăng dân số và thu nhập, dẫn tới gia tăng chăn nuôi thâm canh, đặc biệt là trong chăn nuôi gia súc, gia cầm. Tuy nhiên, cùng với mặt tích cực của phát triển tăng gia sản xuất là nguy cơ ô nhiễm môi trường do chất thải của gia súc, gia cầm. Chất thải gia súc, gia cầm chứa nhiều chất hữu cơ cùng các vi sinh vật đường ruột, nếu không được xử lý tốt sẽ gây ra tình trạng ruồi muỗi và nguy cơ phát tán các vi sinh vật gây bệnh. Đặc biệt, mùi hôi do quá trình phân hủy chất thải chăn nuôi ảnh hưởng nghiêm trọng đến sức khỏe con người. Trong đó, các hợp chất chứa nitơ và lưu huỳnh như NH_3 và H_2S là nguyên nhân chính ảnh hưởng tới mức độ độc hại và mùi trong chăn nuôi. NH_3 là chất khí gây mùi dễ nhận biết ở nồng độ 5 - 50 ppm, khi nồng độ tăng lên hơn 100 - 500 ppm gây kích ứng niêm mạc, tăng tiết dịch ở mắt. H_2S thuộc nhóm có ngưỡng phát hiện thấp, chỉ cần một lượng nhỏ ở nồng độ 0,01 - 0,7 ppm cũng có thể gây hiệu ứng mùi cho con người và gây mùi nặng ở nồng độ 3 - 5 ppm, gây ảnh hưởng tới sức khỏe vật nuôi và con người khi tiếp xúc ở nồng độ nhỏ [1].

Hiện nay có nhiều biện pháp làm giảm mùi chất thải chăn nuôi như biogas, ủ phân sinh học, công nghệ ozon..., nhưng biện pháp sử dụng các chế phẩm có nguồn gốc vi sinh có ưu điểm bảo vệ môi trường và có tác dụng bền vững lâu dài. Các công nghệ xử lý chất thải chăn nuôi bằng biện pháp sinh học bao gồm: Sử dụng đệm lót sinh học, lọc khí sinh học, xử lý chất thải bằng chế phẩm nấm và vi khuẩn,... [2]-[8].

Trên thị trường hiện nay có rất nhiều loại chế phẩm sinh học xử lý chất thải chăn nuôi, có tác dụng xử lý chất thải chuồng trại, tuy nhiên chủ yếu dựa trên nguyên lý sử dụng các chủng vi sinh vật có khả năng phân hủy các hợp chất hữu cơ (protein, lipid, cellulose,...) trong chất thải để ngăn ngừa sự sinh mùi, ví dụ như các chủng *Bacillus* spp, *Saccharomyces* spp,... [9]. Với mục tiêu nâng cao hiệu quả khử mùi của chế phẩm, nghiên cứu tiếp cận giải quyết vấn đề theo hướng kết hợp cơ chế phân hủy chất thải, ức chế các chủng vi sinh vật có hại cùng với cơ chế khử mùi H_2S , NH_3 . Haixia Ma đã đánh giá khả năng hấp thụ trực tiếp H_2S và NH_3 của chất thải chăn nuôi, kết quả cho thấy dịch nuôi cấy của *Pichia kudriavzevii*, *Paracoccus denitrificans* và *Bacillus subtilis* khử tới 85,91% với NH_3 và 90,80% với H_2S [6]. Do đó, việc kết hợp đồng thời cả cơ chế phân hủy chất thải để ngăn mùi sinh ra và cơ chế khử các khí gây mùi để nâng cao hiệu quả khử mùi hoàn toàn có cơ sở thực hiện. Đây cũng chính là điểm khác biệt, là tính mới của nghiên cứu.

Các chủng vi sinh vật được phân lập, tuyển chọn dựa trên khả năng khử mùi H_2S , NH_3 từ các nguồn chất thải thu được tại các khu chăn nuôi tập trung. Dịch nuôi các chủng vi sinh vật này đã được nghiên cứu đánh giá hiệu quả khử mùi H_2S , NH_3 đối với chất thải chăn nuôi ở quy mô phòng thí nghiệm, từ đó làm cơ sở tiến hành thử nghiệm trong điều kiện thực tế tại các khu chăn nuôi tập trung.

2. Vật liệu và phương pháp

2.1. Vật liệu

Chất thải chăn nuôi thu tại một khu chăn nuôi tập trung thuộc xã Tiên Dược, huyện Sóc Sơn, Hà Nội. Chuồng nuôi dạng hờ, số lượng 30 con. Chất thải được lấy vào buổi sáng trước khi tiến hành vệ sinh, rửa chuồng trại. Mẫu được bảo quản trong hộp xốp cách nhiệt chứa đá khô và đưa về phòng thí nghiệm trong ngày.

Các hoá chất của Viện Công nghệ mới đảm bảo độ tinh khiết P.A có nguồn gốc từ Trung Quốc, Mỹ, Canada, Ấn Độ.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Tuyển chọn vi sinh vật [3]

- Môi trường nghiên cứu vi khuẩn oxy hóa ammonia (MT1) (g/l): NH_4Cl (1); Na_2HPO_4 (21,5); KH_2PO_4 (0,9); Glucose (3); dung dịch vi lượng (3); pH 6,5 - 7,0 [4]. Môi trường thạch bổ sung thêm 20 g/L agar.

- *Môi trường nghiên cứu vi khuẩn oxy hóa sulfur (MT2) (g/l)*: Glucoza (5), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (2,27), KH_2PO_4 (1,8), $\text{MgCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,1), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1,98), $\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,023), CaCl_2 (0,03), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,033), Na_2CO_3 (1), $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (15,69), pH 6,5 - 7,0 [4]. Môi trường thạch bổ sung thêm 20 g/L agar.

- *Môi trường phân lập vi sinh vật phân giải tinh bột (MT3) (g/l)*: NH_4Cl (9,0), K_2HPO_4 (0,5), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5), CaCO_3 (3,0), Glucose (20,0), tinh bột tan (10,0), thạch (20,0), pH = 6,5 - 7,0.

- *Môi trường phân lập vi sinh vật phân giải cellulase (MT4) (g/l)*: K_2HPO_4 (1); NaNO_3 (2,5); CMC (5); peptone (2); CaCl_2 (0,1); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,3); NaCl (0,1); FeCl_3 (0,01); thạch (18); pH = 6,5 - 7,0.

Các mẫu thu thập được làm giàu 3 lần liên tiếp trên các môi trường được mô tả như trên, điều kiện nhiệt độ 30°C, nuôi cấy lắc 150 vòng/phút trong thời gian 120 giờ, bình có vi sinh vật phát triển được cấy truyền sang môi trường mới. Cây dịch pha loãng mẫu nghiên cứu (0,05 mL) trang đều lên bề mặt thạch. Nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C trong 72-120 giờ. Thu thập các khuẩn lạc mọc riêng rẽ cấy chuyển sang môi trường đặc hiệu để đánh giá khả năng chuyển hóa thiosulfate và amoni hay khả năng phân hủy chất hữu cơ (tinh bột, cellulose).

Khả năng chuyển hóa thiosulfate và amoni của các chủng lựa chọn đối với môi trường chứa cơ chất tương ứng là thiosulfate (1000 mg/l) và amoni (500 mg/l) được phân tích dựa trên khả năng tạo thành ion sulfate và nồng độ amoni còn lại trong dịch nuôi cấy tương ứng [4]. Khả năng phân giải tinh bột và cellulose được xác định bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch với môi trường chứa cơ chất tương ứng là tinh bột tan (1 g/l) và CMC (1 g/l).

2.2.2. Định danh vi sinh vật

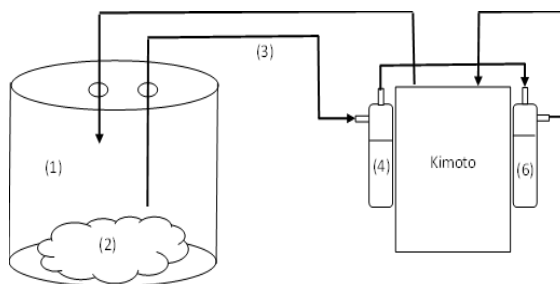
Các chủng vi khuẩn có các đặc tính mong muốn được định danh bằng phương pháp giải trình tự đoạn gen 16S rRNA (đối với vi khuẩn) hoặc trình tự 26S rRNA (đối với nấm men, nấm mốc). Các khuẩn lạc thuần khiết được sử dụng để tách DNA tổng số sử dụng kit Genomic DNA Extraction. ADN tổng số thu được được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1% trong đệm TAE 1X. Các đoạn ADN tổng số đủ điều kiện được sử dụng làm khuôn để nhân đoạn gen 16S rRNA. Thành phần phản ứng PCR (μl): ADN tổng số 1; Buffer 2,5; Tag polymerase 1, dNTP 2,5, Primer 27f/1492r (đối với vi khuẩn) và ITS1/ITS4 (đối với nấm) 1/1; dH_2O 16. Phản ứng PCR được thực hiện theo quy trình 35 chu kỳ như mô tả trước đây [7]. Các sản phẩm PCR được làm sạch và được giải trình tự trên thiết bị iSeq100 (Illumina). Các trình tự nucleotide hoàn chỉnh được so sánh với ngân hàng dữ liệu gen của NCBI bằng cách sử dụng công cụ BLAST.

2.2.3. Xác định điều kiện sinh trưởng và phát triển của các chủng vi sinh vật tuyển chọn

Các yếu tố môi trường khảo sát, bao gồm, pH (5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 và 8,0), nhiệt độ (25°C, 28°C, 30°C, 32°C và 35°C), thời gian nuôi cấy (0 giờ, 24 giờ, 48 giờ, 72 giờ, 96 giờ, 120 giờ, 144 giờ và 168 giờ). Các chủng vi khuẩn được nuôi trong môi trường dịch thể ở các điều kiện nghiên cứu với tốc độ lắc 150 vòng/phút. Xác định khả năng sinh trưởng của vi sinh vật bằng đếm số lượng khuẩn lạc trên môi trường thạch đĩa tương ứng.

2.2.4. Phương pháp thu mẫu khí

Mô hình được điều chỉnh dựa trên mô tả của Burgos SA (2010) [5] (Hình 1). Không khí gây mùi từ chất thải (2) được thu bằng máy hấp thụ khí HS7-KIMOTO (5). Buồng chứa mẫu (1) bằng nhựa với thể tích 10L. Buồng dạng hình trụ bao gồm 2 cổng, 1 cổng để hút không khí trong bình sục vào ống hấp phụ (4) và (6) với tốc độ 1 L/phút trong 10 phút, tại đây chứa dung dịch hấp phụ tương ứng với NH_3 và H_2S (theo phương pháp MASA Method 401 và MASA Method 701). Cổng còn lại dẫn để cân bằng áp suất bên trong bình. Buồng được bịt kín bằng silicone đảm bảo không bị lẫn không khí bên ngoài.



Hình 1. Mô hình thí nghiệm đánh giá hiệu quả khử mùi chất thải chăn nuôi quy mô phòng thí nghiệm

2.2.5. Xác định khả năng khử mùi của chủng vi sinh vật tuyển chọn [6]

* Đối với từng chủng đơn lẻ:

Cho 500 g chất thải vào bình, trộn đều. Với mỗi dịch nuôi vi sinh vật lấy 100 mL phun đều lên bề mặt chất thải, đóng kín bằng nắp nhựa, để ở nhiệt độ phòng. Đo nồng độ khí H_2S và NH_3 trong mỗi chai tại các thời điểm 0 giờ, 24 giờ, 72 giờ và 120 giờ, được tính bằng công thức:

$$C = (a \times B)/(Ba \times Vo) \quad (1)$$

Trong đó

C: Nồng độ H_2S hoặc NH_3 trong không khí, mg/m^3

a: Hàm lượng H_2S hoặc NH_3 xác định theo đường chuẩn, mg

B: Tổng thể tích dung dịch mẫu thử, mL

Ba: Thể tích dung dịch lấy để phân tích, mL

Vo - Thể tích mẫu không khí đã được đưa về điều kiện chuẩn, m^3 .

Đánh giá hiệu quả xử lý được xác định bằng công thức:

$$S = (T - t)/T \times 100 \quad (2)$$

Trong đó, S là độ giảm mùi, %

T là nồng độ khí gây mùi trong bình đối chứng không bổ sung vi sinh vật, mg/m^3

t là nồng độ khí gây mùi trong bình thử nghiệm bổ sung vi sinh vật, mg/m^3

* Đối với hỗn hợp chủng

Dịch nuôi vi sinh vật được phối trộn với tỷ lệ (1:1:1:1) thành dung dịch có nồng độ $7,8 \times 10^8$ CFU/mL và được phun đều 100 mL lên bề mặt chất thải, đóng kín bằng nắp nhựa phủ silicon xung quanh để ngăn phát tán mùi, để ở nhiệt độ phòng. Đo nồng độ khí H_2S và NH_3 trong mỗi bình tại các thời điểm 0 giờ, 24 giờ, 72 giờ và 120 giờ. Hiệu quả giảm mùi của hỗn hợp chủng vi sinh vật được đánh giá theo công thức (2) được trình bày ở mục trên.

2.2.6. Phương pháp phân tích

- Phương pháp phân tích nồng độ khí NH_3 : Theo phương pháp phân tích amoniac sử dụng indophenol và so màu UV – Vis.

- Phương pháp phân tích nồng độ khí H_2S : Bằng phương pháp phân tích S^{2-} sử dụng p-amino dimetyl anilin và $FeCl_3$, so màu UV-Vis.

- Xác định hàm lượng sulfate trong dịch nuôi cấy: Theo phương pháp SMEWW 4500 SO_4^{2-} -E

- Xác định hàm lượng amoni trong dịch nuôi cấy: Theo TCVN 5988-1995.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Phân lập, tuyển chọn vi sinh vật

Từ mẫu chất thải chăn nuôi lợn sau 3 lần làm giàu liên tiếp, 15 chủng được phân lập trong đó có 5 chủng có khả năng oxy hóa amonia ký hiệu từ N1 đến N5; 7 chủng có khả năng oxy hóa thiosulfate ký hiệu từ S1 đến S7, 5 chủng có khả năng phân hủy cả tinh bột và cellulose trong đó có 1 chủng N1 có khả năng oxy hóa aminia, 1 chủng S3 có khả năng oxy hóa sulfur; 3 chủng còn lại ký hiệu TB1 đến TB3. Kết quả được trình bày tại Bảng 1.

Bảng 1. Đặc tính của một số chủng phân lập được

TT	Ký hiệu chủng	Khả năng oxy hóa amonia	Khả năng oxy hóa thiosulfate	Khả năng phân hủy tinh bột	Khả năng phân hủy cellulose	Phân loại ban đầu (Dựa vào hình thái khuẩn lạc)
1.	N1	+++	-	+	+	Vi khuẩn
2.	N2	++	-	-	-	Vi khuẩn
3.	N3	++	-	-	-	Vi khuẩn
4.	N4	+++	-	-	-	Vi khuẩn
5.	N5	++	-	++	-	Vi khuẩn
6.	S1	-	++	-	-	Vi khuẩn
7.	S2	-	++	-	-	Vi khuẩn
8.	S3	-	+++	+++	++	Vi khuẩn
9.	S4	-	+++	-	-	Vi khuẩn
10.	S5	-	++	-	-	Vi khuẩn
11.	S6	-	+++	-	-	Vi khuẩn
12.	S7	-	+	-	-	Vi khuẩn
13.	TB1	-	-	+++	++	Nấm mốc
14.	TB2	+	-	+++	+++	Nấm men
15.	TB3	-	-	++	++	Vi khuẩn

Các chủng sau khi xác định đặc tính tương ứng sẽ được lựa chọn đánh giá đối với từng cơ chất đặc hiệu để tuyển chọn chủng có hoạt tính cao nhất và xác định điều kiện sinh trưởng tốt nhất cho mỗi chủng để nuôi cấy tạo chế phẩm khử mùi.

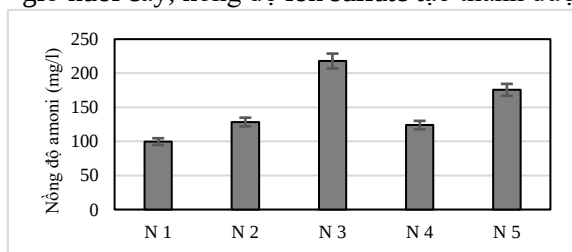
3.1.1. Tuyển chọn vi sinh vật oxy hóa amonia

Các chủng có khả năng oxy hóa amonia được nuôi cấy lắc trên môi trường dịch thể MT1 có nồng độ amoni ban đầu là 500 mg/L. Khả năng oxy hóa amoni của chủng được xác định bằng cách định lượng amoni còn lại theo TCVN 5988-1995. Sau 120 giờ nuôi cấy, nồng độ NH_4^+ còn lại được thể hiện ở Hình 2.

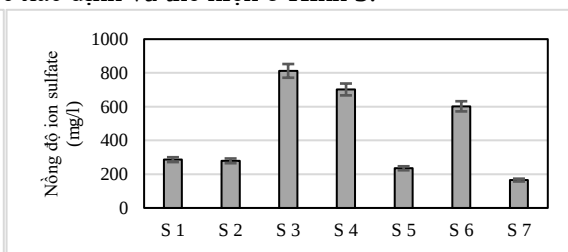
Kết quả thu được cho thấy nồng độ amoni trong dịch nuôi cấy giảm đi nhiều nhất đối với chủng N1 (còn lại 99,6 mg/L), giảm tương ứng 80,1%. Kết quả phù hợp với các nghiên cứu của một số tác giả, chủng *Bacillus* KJ804254 trong môi trường với nồng độ amoni ban đầu là 10 g/l sau 48 giờ lượng amoni còn lại là 48,53% [3]. Chủng N1 cũng là chủng có khả năng phân hủy tinh bột và cellulose nên chủng N1 được lựa chọn cho nghiên cứu tiếp theo.

3.1.2. Tuyển chọn vi sinh vật oxy hóa sulfur

Các chủng có khả năng oxy hóa sulfur được cấy chuyển sang nuôi lắc trên môi trường dịch thể chứa thiosulfate (MT2) với nồng độ 100 mg/l. Khả năng oxy hóa thiosulfate ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) thành ion sulfate (SO_4^{2-}) của chủng được xác định theo phương pháp SMEWW 4500 SO_4^{2-} - E. Sau 120 giờ nuôi cấy, nồng độ ion sulfate tạo thành được xác định và thể hiện ở Hình 3.



Hình 2. Khả năng chuyển hóa của các chủng phân lập đối với amoni



Hình 3. Khả năng chuyển hóa của các chủng phân lập đối với thiosulfate

Hàm lượng ion sulfate thu được trong dịch nuôi cấy cao nhất là 81,5 mg/L (S3); 70,2 mg/L (S4) và 60,2 mg/L (S6), tương ứng giảm 81,5%, 70,2% và 60,2% lượng thiosulfate ban đầu.

Chủng S3 có hoạt tính oxy hóa sulfur cao nhất; đồng thời chủng này cũng có khả năng phân hủy tinh bột và cellulose cao (Bảng 1) nên được tuyển chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.1.3. Tuyển chọn vi sinh vật phân giải tinh bột và cellulose

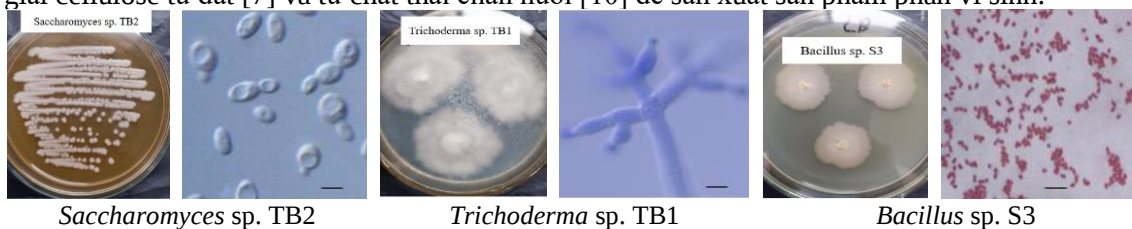
Các chủng có khả năng phân hủy tinh bột được đánh giá thông qua đường kính vòng phân giải với hàm lượng tinh bột ban đầu là 1000 mg/L. Kết quả về khả năng phân giải tinh bột và cellulose của các chủng được thể hiện ở Bảng 2.

Bảng 2. Khả năng phân giải tinh bột và cellulose của một số chủng phân lập được

STT	Ký hiệu	Hoạt tính phân giải tinh bột thông qua vòng phân giải (D-d, cm)	Hoạt tính phân giải cellulose thông qua vòng phân giải (D-d, cm)
1	TB1	1,56	2,20
2	TB2	2,45	2,07
3	TB3	1,93	1,37
4	N1	1,23	0,80
5	S3	2,08	1,18

Cả 5 chủng phân lập được đều có khả năng phân giải tinh bột và cellulose khá cao, trong đó chủng TB1 có khả năng phân giải cellulose mạnh nhất và phân giải tinh bột khá cao; chủng TB2 có khả năng phân giải tinh bột và cellulose đều cao, đường kính vòng phân giải đạt từ 2,07-2,45 cm, chủng N1 có khả năng phân giải tinh bột và cellulose thấp nhất nhưng lại có hoạt tính oxy hóa amonia cao, chủng S3 có khả năng phân giải tinh bột cao và cellulose ở mức vừa nhưng lại có hoạt tính oxy hóa sulfur cao nhất. Do đó, các chủng TB1, TB2, N1 và S3 được định danh và xác định các đặc điểm sinh trưởng với mục đích làm chế phẩm khử mùi chuồng trại chăn nuôi. Hình thái khuẩn lạc và tế bào của một số chủng được thể hiện trên Hình 4.

Kết quả phân lập này khá đồng nhất với nghiên cứu trước đây về tuyển chọn vi sinh vật phân giải cellulose từ đất [7] và từ chất thải chăn nuôi [10] để sản xuất sản phẩm phân vi sinh.



Hình 4. Hình thái khuẩn lạc và tế bào của một số chủng

3.1.4. Định danh các chủng vi sinh vật

Bốn chủng được lựa chọn để nghiên cứu tiếp được tách DNA tổng số, sau đó dùng DNA tổng số làm khuôn để thực hiện phản ứng PCR nhân đoạn gen 16S rRNA đối với 2 chủng vi khuẩn S3 và N1 bằng cặp mồi 27F/1492R; nhân đoạn gen 26S DNA bằng cặp mồi ITS1/ITS4 đối với 2 chủng TB1 và TB2. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose để lấy đoạn gen có kích thước mong muốn. Sản phẩm được làm sạch bằng kit và gửi đi giải trình tự trên thiết bị iSeq100 (Illumina). Các trình tự nucleotide hoàn chỉnh được so sánh với ngân hàng dữ liệu gen của NCBI bằng cách sử dụng công cụ BLAST. Kết quả nhận được cho thấy chủng N1 tương đồng trên 99% với các chủng thuộc chi *Paracoccus* nên được đặt tên là *Paracoccus* sp. N1. Chủng S3 tương đồng trên 99,5% với các chủng thuộc chi *Bacillus* nên được đặt tên là *Bacillus* sp. S3. Chủng nấm men TB2 có trình tự tương đồng trên 99% với trình tự của các chủng *Saccharomyces* nên được đặt tên là *Saccharomyces* sp. TB2. Chủng nấm mốc TB1 có trình tự tương đồng trên 98,9% với các chủng thuộc chi *Trichoderma* nên được đặt tên là *Trichoderma* sp. TB1. Các chủng thuộc các chi *Bacillus*, *Trichoderma*, *Saccharomyces* đều được công bố nhiều về khả năng phân hủy các hợp chất tinh bột và cellulose, đồng thời cũng được dùng nhiều trong các chế phẩm khử mùi. Vì vậy, các chủng này được nghiên cứu điều kiện để nhân sinh khối/bào tử để tạo chế phẩm khử mùi chuồng trại chăn nuôi.

3.2. Điều kiện sinh trưởng và phát triển của các chủng vi sinh vật

3.2.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình sinh trưởng và phát triển của các chủng vi sinh vật được thể hiện trong Bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng sinh trưởng của các chủng

Nhiệt độ	Mật độ (CFU/ml)			
	Chủng N1	Chủng S3	Chủng TB1	Chủng TB2
25°C	(2,8±0,3).10 ⁵	(1,5±0,3).10 ⁶	(2,1±0,1).10 ⁷	(1,9±0,4).10 ⁷
28°C	(1,4±0,5).10 ⁶	(7,1±0,3).10 ⁷	(1,8±0,3).10⁸	(3,4±0,2).10⁸
30°C	(7,6±0,1).10⁸	(6,6±0,4).10⁸	(4,8±0,1).10 ⁷	(2,6±0,6).10 ⁸
32°C	(1,8±0,3).10 ⁷	(2,3±0,8).10 ⁷	(3,5±0,4).10 ⁷	(6,5±0,1).10 ⁷
35°C	(4,3±0,2).10 ⁶	(1,7±0,3).10 ⁶	(1,1±0,2).10 ⁷	(1,2±0,3).10 ⁶

Kết quả trình bày trên Bảng 3 cho thấy, chủng N1, S3 có khả năng phát triển tốt nhất tại nhiệt độ 30°C, trong khi chủng TB1, TB2 lại phát triển mạnh ở 28°C và cùng đạt nồng độ cao nhất khoảng 10⁸ CFU/ml. Kết quả nhận được cũng phù hợp với các kết quả nghiên cứu trước đây về điều kiện nhiệt độ của các chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* và *Paracoccus* là 30-35°C [6], trong khi các chủng nấm thường có điều kiện nhiệt độ tối ưu thấp hơn, từ 25-28°C.

3.2.2. Ảnh hưởng của pH

pH là một trong những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của pH đến quá trình sinh trưởng và phát triển của 4 chủng vi sinh vật trình bày ở Bảng 4 cho thấy hai chủng vi khuẩn N1 và S3 có pH sinh trưởng phù hợp nhất là 7,0, trong khi chủng nấm sợi *Trichoderma* sp. TB1 có pH phù hợp nhất là 5,0, chủng nấm men TB2 có pH phù hợp nhất là 6,0. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Bùi Thị Thu Hà (2015) khi cho thấy các chủng oxi hóa ammonia sinh trưởng và phát triển tốt ở giá trị pH = 7,0 [4].

Bảng 4. Ảnh hưởng của pH đến sinh trưởng của các chủng phân lập được

pH	Mật độ (CFU/ml)			
	Chủng N1	Chủng S3	Chủng TB1	Chủng TB2
5,0	(2,5±0,4).10 ⁴	(4,2±0,7).10 ⁶	(2,3±0,4).10⁸	(1,3±0,4).10 ⁶
5,5	(1,4±0,3).10 ⁶	(2,8±0,1).10 ⁷	(1,8±0,4).10 ⁸	(1,9±0,2).10 ⁷
6,0	(1,6±0,3).10 ⁷	(6,5±0,8).10 ⁷	(2,8±0,1).10 ⁷	(2,6±0,6).10⁸
6,5	(2,8±0,6).10 ⁷	(1,3±0,7).10 ⁸	(2,5±0,4).10 ⁷	(6,1±0,2).10 ⁷
7,0	(1,3±0,2).10⁸	(2,9±0,2).10⁸	(1,1±0,2).10 ⁷	(4,2±0,7).10 ⁶
7,5	(1,7±0,1).10 ⁷	(7,7±0,7).10 ⁷	(1,5±0,3).10 ⁶	(4,3±0,6).10 ⁶
8,0	(1,5±0,3).10 ⁶	(1,5±0,2).10 ⁶	(2,6±0,6).10 ⁵	(1,5±0,1).10 ⁶

3.2.3. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy

Để đánh giá khả năng phát triển của các chủng vi sinh vật, mật độ vi sinh vật được kiểm tra ở các thời điểm khác nhau, kết quả được thể hiện ở Bảng 5.

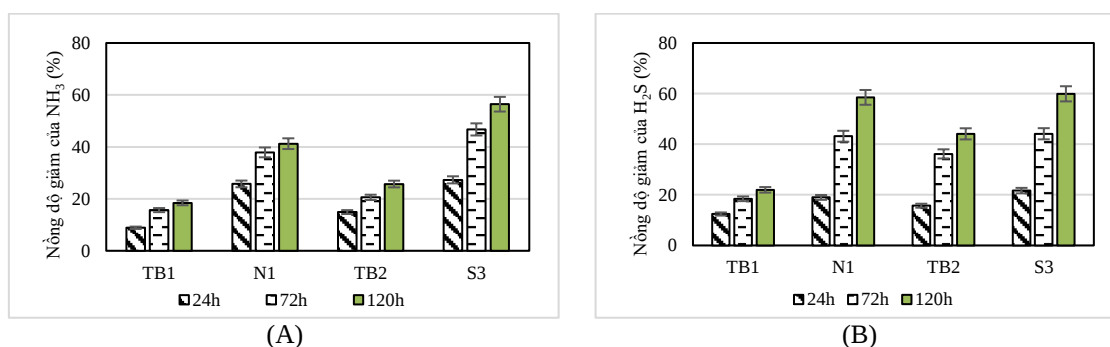
Bảng 5. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến sinh trưởng của các chủng phân lập được

Thời gian	Mật độ (CFU/ml)			
	Chủng N1	Chủng S3	Chủng TB1	Chủng TB2
0 giờ	(1,8±0,1).10 ¹	(2,7±0,1).10 ¹	(1,1±0,6).10 ¹	(1,3±0,4).10 ¹
24 giờ	(1,7±0,2).10 ⁴	(5,1±0,3).10 ⁴	(1,4±0,3).10 ²	(2,2±0,1).10 ⁴
48 giờ	(1,6±0,1).10 ⁵	(6,5±0,4).10 ⁶	(1,8±0,1).10 ³	(2,6±0,6).10 ⁶
72 giờ	(3,8±0,3).10 ⁶	(2,3±0,8).10⁸	(3,7±0,1).10 ⁴	(3,5±0,4).10 ⁷
96 giờ	(1,3±0,2).10⁸	(3,4±0,4).10⁸	(1,8±0,4).10 ⁶	(2,8±0,3).10⁸
120 giờ	(2,6±0,4).10 ⁷	(3,8±0,7).10 ⁷	(1,3±0,2).10⁷	(5,4±0,4).10 ⁷
144 giờ	(8,4±0,5).10 ⁶	(2,1±0,3).10 ⁷	(6,1±0,5).10 ⁶	(3,3±0,1).10 ⁶

Kết quả tại Bảng 5 cho thấy mức độ sinh trưởng của các chủng vi sinh vật (VSV) tăng rất nhanh ở thời gian đầu của quá trình nuôi cấy. Chủng N1 đạt mức sinh trưởng cực đại sau 96 giờ nuôi cấy, đạt $1,3 \cdot 10^8$ CFU/ml và giảm mật độ từ 120 giờ nuôi cấy. Chủng vi khuẩn oxi hóa sulfur S3 đạt mức độ cực đại trong khoảng thời gian 72 – 96 giờ và bắt đầu giảm số lượng sau 120 giờ. Chủng TB1 lại đạt nồng độ cao nhất là 10^7 CFU/ml sau 120 giờ nuôi cấy. Chủng nấm men TB2 đạt nồng độ cực đại là 10^8 CFU/ml sau 96 giờ và bắt đầu giảm mật độ sau 120 giờ. Như vậy, thời gian thích hợp cho các chủng N1, S3 và TB2 sinh trưởng là 96 giờ, trong khi chủng nấm sợi TB1 có thời gian sinh trưởng phù hợp là 120 giờ.

Sau khi lựa chọn được điều kiện nuôi cấy phù hợp, các chủng này được nuôi cấy ở điều kiện phù hợp đạt mật độ trên 10^8 CFU/mL để thu sinh khối để tạo chế phẩm thử nghiệm khả năng khử mùi NH_3 và H_2S .

3.3. Khả năng khử mùi của từng vi sinh vật đối với khí NH_3 và H_2S



Hình 5. Khả năng khử mùi của các vi sinh vật đối với khí NH_3 (A) và H_2S (B)

Trong thí nghiệm này, dịch nuôi cấy của từng chủng vi sinh vật, có nồng độ đạt 10^8 CFU/mL, được phun trực tiếp vào chất thải để đánh giá khả năng khử mùi. Kết quả cho thấy 4 chủng vi sinh vật đã được sàng lọc có khả năng giảm mùi tăng dần theo thời gian từ 24 đến 120 giờ (Hình 5A, B). Tại thời điểm 120 giờ, *Paracoccus* sp. N1 và *Bacillus* sp. S3 thể hiện khả năng khử mùi tốt hơn so với các chủng còn lại (41,24 và 56,44% đối với NH_3 ; 58,51 và 59,92% đối với H_2S), trong khi các chủng *Trichoderma* sp. TB1 và *Saccharomyces* sp. TB2 có tỷ lệ khử mùi đều dưới 30%. Kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Haixia Ma cho thấy *Paracoccus denitrificans* và *Bacillus licheniformis* có hiệu quả khử mùi cao, tương ứng là 85,91% với NH_3 và 90,80% với H_2S khi tiến hành xử lý trong 10 ngày [6]. Đối với 2 chủng *Trichoderma* sp. TB1 và *Saccharomyces* sp. TB2 tuy không thể hiện khả năng khử NH_3 và H_2S cao (dưới 30%) nhưng đây là 2 chủng vi sinh vật đóng góp cho khả năng phân giải các chất hữu cơ trong chất thải [2]. Việc phối hợp cả 4 chủng như trên cho thấy tiềm năng của việc kết hợp giữa 2 cơ chế phân hủy chất thải để ngăn mùi sinh ra và cơ chế khử các khí gây mùi, tăng cường hiệu quả khử mùi của sản phẩm.

3.4. Khả năng khử mùi của dịch nuôi các vi sinh vật đối với chất thải

Sau khi lấy mẫu khí định kỳ trong lô thí nghiệm, nồng độ các khí H_2S và NH_3 được xác định theo mục 2.2, kết quả được trình bày tại Bảng 6.

Bảng 6. Nồng độ H_2S và NH_3 trong mẫu thí nghiệm, mg/m^3

Thời điểm	Đối chứng		Thí nghiệm		Nồng độ giảm (%)	
	NH_3	H_2S	NH_3	H_2S	NH_3	H_2S
0 giờ	15,40 ± 0,02	0,18 ± 0,03	-	-	-	-
24 giờ	12,91 ± 0,04	0,36 ± 0,03	4,32 ± 0,01	0,12 ± 0,03	66,54	66,67
72 giờ	12,59 ± 0,01	0,38 ± 0,01	2,71 ± 0,04	0,07 ± 0,01	78,47	81,58
120 giờ	12,28 ± 0,02	0,30 ± 0,05	1,88 ± 0,05	0,04 ± 0,02	84,69	86,67

Kết quả thu được cho thấy nồng độ khí H_2S sau 24 giờ giảm rõ rệt ở mẫu thí nghiệm so với nồng độ khí H_2S ở mẫu đối chứng (66,67%). Hiệu quả khử mùi của dung dịch tăng dần và sau

120 giờ đạt 84,69%. Tương tự, nồng độ khí NH_3 ở lô đối chứng có xu hướng tăng trong thời gian thí nghiệm, còn ở lô thí nghiệm nồng độ khí NH_3 đo được giảm đáng kể từ 24 giờ (66,54%) tới 120 giờ (78,47%). Sau 120 giờ, nồng độ của cả H_2S và NH_3 ở mẫu đối chứng đều có xu hướng giảm, do đó thí nghiệm dừng lại sau 120 giờ. Kết quả thu được phù hợp với nghiên cứu của tác giả Phạm Bích Hiền khi sử dụng chế phẩm gồm các chủng VSV để xử lý chất thải chăn nuôi dạng rắn; nồng độ khí NH_3 giảm 73,1% và khí H_2S giảm 78% sau 3 ngày [9]. Kết quả cũng phù hợp với nghiên cứu của tác giả Bùi Thị Thu Hà [4] cho thấy khả năng khử mùi NH_3 và H_2S lần lượt là 83,3% và 72,0% sau 96 giờ xử lý chất thải chăn nuôi trong điều kiện biển đảo bằng tổ hợp các vi sinh vật chịu mặn.

4. Kết luận

Từ các mẫu chất thải chăn nuôi tại khu tăng gia tập trung đã phân lập được 04 chủng vi sinh vật có khả năng giảm mùi NH_3 và H_2S có thể sử dụng làm chế phẩm khử mùi khu chăn nuôi tập trung. Sau 120 giờ, các chủng *Paracoccus* sp. N1, *Saccharomyces* sp. TB2, *Bacillus* sp. S3, *Trichoderma* sp. TB1 có khả năng khử mùi NH_3 lần lượt là 41,24%, 25,71%, 56,44%, 18,45% và khử mùi H_2S tương ứng là 58,51%, 44,1%, 59,92% và 21,98%.

Hỗn hợp các chủng với tỷ lệ (1:1:1:1) ở nồng độ $7,8 \cdot 10^8$ CFU/mL có tác dụng giảm sự tạo mùi của chất thải, với nồng độ khí NH_3 giảm tương ứng 66,54%, 78,47%, 84,69% và khí H_2S giảm 66,67%, 81,58%, 86,67% sau 24, 72 và 120 giờ xử lý so với đối chứng.

Lời cảm ơn

Công trình này được hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài thuộc Chương trình Nghiên cứu khoa học hậu cần quân sự 2022: “Nghiên cứu sản xuất chế phẩm vi sinh để nâng cao hiệu suất khử mùi cho các khu chăn nuôi tập trung tại các đơn vị quân đội” của Viện Công nghệ mới.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] H. D. Bui, X. T. Nguyen, and D. T. Vu, *Lecture on agricultural waste management*. Ha Noi: Agriculture publishing house, 2011.
- [2] J. Zhu, "A review of microbiology in swine manure odor control," *Agriculture, Ecosystems & Environment*, vol. 78, no. 2, pp. 93-106, 2000.
- [3] R. Bajagain, P. Gautam, T. T. N. Le, R. H. Dahal, J. Kim, and S.-W. Jeong, "Isolation and Screening of Odor-Reducing Microbes from Swine Manure and Its Role in Reducing Ammonia Release in Combination with Surfactant Foam," *Applied Science*, vol. 12, no. 4, p. 1806-1818, 2022.
- [4] T. T. H. Bui and T. T. T. Nguyen, "Survey deodorizing ability of enriched microorganism consortia from sea water and sewage sludge samples," *Journal of Military Science and Technology*, vol. 35, no. 19, pp. 143-147, 2015.
- [5] A. Burgos, J. G. Fadel, and E. J. DePeters, "Prediction of Ammonia Emission from Dairy Cattle Manure Based on Milk Urea Nitrogen: Relation of Milk Urea Nitrogen to Urine Urea Nitrogen Excretion," *Journal of Dairy Science*, vol. 90, no. 12, pp. 5499-5508, 2007.
- [6] H. Ma, F. Li, E. Niyitanga, X. Chai, S. Wang, and Y. Liu, "The Odor Release Regularity of Livestock and Poultry Manure and the Screening of Deodorizing Strains," (in English), *Microorganisms*, vol. 9, no. 12, pp. 2488-2901, 2021.
- [7] T. T. T. Nguyen, T. X. P. Tran, T. D. Cao, T. H. X. Le, and T. H. H. Truong, "Isolation and selection of some cellulose decomposition microorganisms in agricultural waste to make microbial organic fertilizer," *Huaf journal of agricultural science & technology*, vol. 1, no. 1, pp. 159-168, 2017.
- [8] I. Wysocka, J. Gębicki, and J. Namieśnik, "Technologies for deodorization of malodorous gases," *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 26, no. 10, pp. 9409-9434, 2019.
- [9] T. B. H. Pham, "Research on microorganisms to treat solid livestock waste," Doctoral thesis, VNU University of Science, Vietnam National University, Ha Noi, 2012.
- [10] T. M. Nguyen, T. L. D. Doan, and V. C. Pham, "Selection of microorganism to produce the new microbiological product (Vnua-MiosV) for treatment of livestock waste," *Vietnam Journal of Agriculture and Rural development*, vol. 3/2021, no. 1, pp. 102-109, 2020.