

Nghiên cứu nuôi tăng sinh tổ hợp vi sinh vật kỵ khí BKM có khả năng lên men sinh methane trong điều kiện nước biển

Đỗ Thị Thu Hồng¹, Nguyễn Thu Hoài¹, Bùi Thị Việt Hà², Đinh Thúy Hằng^{3,*}

¹Trung tâm Nhiệt đới Việt Nga, Bộ Quốc phòng, 63 Nguyễn Văn Huyền, Hà Nội, Việt Nam

²Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN, 334 Nguyễn Trãi, Hà Nội, Việt Nam

³Viện Vi sinh vật và Công nghệ Sinh học, ĐHQGHN, 144 Xuân Thủy, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 16 tháng 8 năm 2017

Chỉnh sửa ngày 20 tháng 9 năm 2017; Chấp nhận đăng ngày 10 tháng 10 năm 2017

Tóm tắt: Môi trường biển Việt Nam đang ngày càng bị ô nhiễm trầm trọng do hàng ngày phải tiếp nhận lượng chất thải hữu cơ lớn chưa qua xử lý từ đất liền. Trong khi đó, công nghệ xử lý chất hữu cơ phù hợp nhất là phân hủy kỵ khí lại kém hiệu quả trong môi trường biển, mà nguyên nhân chính là do thiếu các vi sinh vật thích nghi tốt với điều kiện môi trường đặc biệt này. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã xây dựng thành công phương pháp duy trì tổ hợp vi sinh vật biển BKM, có khả năng thực hiện quá trình phân hủy kỵ khí chất thải hữu cơ trong môi trường nước biển. Nguồn cơ chất hỗn hợp được sử dụng để nuôi bùn là cám gạo 10% lên men trong 5 ngày, có pH = 4,5, COD = 45000 mg O₂/l, thành phần axit hữu cơ bay hơi (VFA) ở mức ~ 900 mg/l. Bổ sung cơ chất này vào môi trường nước biển nhân tạo ở tỷ lệ 10% cho phép nuôi bùn kỵ khí đạt hoạt tính sinh methane ổn định ở mức 180 mL CH₄/gCOD sau 5 ngày ở nhiệt độ 28 - 30°C. Mật độ methanogen trong bùn được xác định là 2,8×10⁹ MPN/ml, chủ yếu gồm các loài đại diện thuộc bộ dinh dưỡng hydro *Methanomicrobiales* và bộ dinh dưỡng acetate *Methanosarcinales*, theo kết quả phân tích thư viện gen *mcrA*. Nghiên cứu xác định hiệu quả hỗ trợ của tổ hợp BKM trong bình xử lý chất thải chăn nuôi lợn quy mô 2 lít cho thấy quá trình chuyển hóa COD thành methane bắt đầu chỉ sau 10 ngày, và tới 80% COD đã bị loại sau 60 ngày thí nghiệm. Những kết quả bước đầu chứng tỏ bùn kỵ khí được tạo ra và duy trì theo quy trình ở nghiên cứu này có tiềm năng ứng dụng trong thực tế để cải thiện tình trạng kém hiệu quả tại các hệ thống xử lý kỵ khí hoạt động ở điều kiện nước biển.

Từ khóa: Khí sinh học, methanogen, ô nhiễm môi trường biển, vi khuẩn kỵ khí, xử lý chất thải hữu cơ.

1. Mở đầu

Phân hủy kỵ khí các hợp chất hữu cơ để tận thu năng lượng dưới dạng khí sinh học (biogas) được biết đến từ giữa thế kỷ 19 và được nghiên

cứu rộng rãi từ những năm đầu thế kỷ 20 [1]. Hiện tại, phân hủy kỵ khí sinh methane được đánh giá là phương pháp xử lý có hiệu quả cao nhất đối với chất thải hữu cơ, khí methane sinh ra được sử dụng như nguồn năng lượng thay thế ứng dụng trong các lĩnh vực như: khí đốt, sản xuất điện, nhiên liệu ô tô,...[2]. Tuy nhiên, ở điều kiện nước mặn công nghệ này khó đạt hiệu quả xử lý cao do nhiều yếu tố bất lợi như (i) tốc

* Tác giả liên hệ. ĐT.: 84-972523466.

Email: dthang@vnu.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.4532>

độ phân hủy sinh học bị kìm hãm ở nồng độ muối cao, (ii) sự cạnh tranh về cơ chất của vi khuẩn khử sulfate đối với methanogen, (iii) thiếu nguồn vi sinh vật, đặc biệt là methanogen, thích nghi với điều kiện môi trường xử lý. Nếu như trong các hệ thống xử lý kỵ khí ở môi trường nước ngọt, phân trâu bò, bùn cống hay bùn hoạt tính có thể được sử dụng làm nguồn methanogen bổ sung ban đầu thì trong môi trường nước mặn lại không sẵn có các nguồn vi sinh vật tương ứng.

Thực tế, methanogen ưa mặn đã được công bố trong một số nghiên cứu. Mori và cộng sự (2012) đã phân lập được chủng methanogen thuộc chi *Methanosaeta* có khả năng sinh trưởng trong môi trường có nồng độ NaCl từ 11,7 – 46,8 g/l, tối ưu ở 16,4 g/l [3]. Stephane và cộng sự (2014) đã phân lập được chủng *Methanococoides vulcani* từ trầm tích biển có khả năng sinh trưởng ở nồng độ NaCl từ 14,6 – 58,5 g/l, tối ưu ở 29,25 g/l [4]. Mặc dù vậy, việc tìm kiếm các chủng methanogen ưa hoặc chịu mặn và ứng dụng vào việc hỗ trợ các hệ thống xử lý kỵ khí ở điều kiện nước biển còn chưa được quan tâm. Ở một số nước, rong biển (như *Laminaria* sp., *Sargassum* sp., *Ulva* sp.) được chủ động nhân rộng canh tác ở các vùng ven biển để lấy sinh khối làm nguyên liệu tạo khí sinh học [5]. Tuy nhiên, để tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình vận hành, nước ngọt đã được bổ sung vào các bể biogas nhằm làm giảm nồng độ muối trong sinh khối của rong biển [6]. Mặc dù vậy, theo một số nghiên cứu, việc bổ sung vi sinh vật tham gia quá trình phân hủy kỵ khí, đặc biệt là methanogen, ưa hoặc chịu mặn có tác dụng rõ rệt trong việc thúc đẩy toàn bộ quá trình [7].

Ở nhiều vùng biển, đặc biệt trên các đảo xa bờ, thường xuyên xảy ra tình trạng khan hiếm nước ngọt, các hệ thống xử lý kỵ khí vận hành hoàn toàn trong điều kiện nước biển là ít phổ biến. Do vậy việc nghiên cứu hệ vi sinh vật giúp cho các hệ thống phân hủy kỵ khí cho các khu vực này như bể tự hoại (khi sử dụng nước biển để dội rửa) hay bể biogas (như chất thải từ

chuồng trại chăn nuôi được dội rửa bằng nước biển) là cần thiết.

Tổ hợp vi sinh vật BKM có nguồn gốc từ trầm tích biển Việt Nam đã được tạo ra qua quá trình làm giàu trong điều kiện nước biển sử dụng rong biển làm cơ chất [8]. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm xây dựng phương pháp nuôi cấy và duy trì tổ hợp này trong điều kiện nước biển, đảm bảo số lượng methanogen cao và ổn định hoạt tính sinh methane trong thời gian dài để tiến tới ứng dụng cho xử lý chất thải hữu cơ trong môi trường nước biển ở quy mô thực tế.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Tổ hợp vi sinh vật BKM được làm giàu từ trầm tích biển Nha Trang trong điều kiện kỵ khí ở môi trường nước biển, sử dụng rong *Ulva* sp. làm cơ chất. Nước biển tự nhiên được thu tại Cửa Lò, Nghệ An. Chất thải nuôi lợn thịt được thu tại trang trại chăn nuôi ở Tây Mỗ, Hà Nội.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Tạo dịch lên men cám gạo

Dịch cám gạo 10% trong môi trường nước biển nhân tạo gồm có (g/l): NaCl 26,4, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 11,4, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1,47, KCl 0,66, KBr 0,09, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,25, NH_4Cl 0,25, KH_2PO_4 0,2 [9] được khử trùng tại 121°C trong 20 phút, sau khi làm nguội bổ sung tổ hợp vi sinh vật BKM theo tỷ lệ 5% thể tích. Bình lên men được đặt ở nhiệt độ $35 \pm 2^\circ C$ trong thời gian 5 ngày, sau đó được đánh giá chất lượng thông qua giá trị pH, hàm lượng COD và tổng lượng VFA.

2.2.2. Nuôi tổ hợp BKM

Tổ hợp vi sinh vật BKM được nuôi tăng sinh trong bình Schott 1 lít chứa 0,5 lít nước biển nhân tạo và 10% dịch lên men cám gạo, loại oxy hoàn toàn bằng khí N_2/CO_2 tỷ lệ 90/10 (v/v). Giống gốc được bổ sung vào bình nuôi

theo tỷ lệ 10%. Bình nuôi sau đó được đặt tại 35°C và theo dõi hoạt tính sinh methane theo thời gian.

2.2.3. Xác định số lượng vi sinh vật trong tổ hợp BKM

Số lượng methanogen được xác định bằng phương pháp Most Probable Number (MPN), các bước tiến hành như sau: Mẫu được pha loãng trong môi trường nước biển nhân tạo kỵ khí rồi cấy vào các ống nghiệm kỵ khí chứa môi trường nước biển nhân tạo (3 ống cho mỗi độ pha loãng), cơ chất sử dụng là Na-acetate (10 mM). Các ống được nuôi tĩnh trong tủ ấm 37°C và theo dõi lượng CH₄ sinh ra trong các ống bằng sắc ký khí để xác định sự có mặt của methanogen. Mật độ methanogen trong mẫu được tính dựa theo bảng chỉ số MPN, đơn vị MPN/ml.

Số lượng vi khuẩn kỵ khí tổng số được xác định bằng phương pháp MPN, các bước tiến hành hoàn toàn tương tự như phương pháp xác định số lượng methanogen. Môi trường nước biển nhân tạo được thay bằng môi trường nuôi cấy vi sinh vật kỵ khí tổng số, thành phần môi trường gồm có (g/l): glucose 5, cao thịt bò 2,5, pepton 5, NaCl 3, amoni-acetat 2, MgSO₄·7H₂O 0,3, FeSO₄·7H₂O 0,01. Các ống MPN được ghi nhận kết quả là các ống có hiện tượng sinh axit, làm giảm pH từ 7 xuống dưới 5.

2.2.4. Phân tích thành phần methanogen trong tổ hợp BKM thông qua thu viện gen *mcrA*

DNA genome của tổ hợp vi sinh vật BKM được tách chiết theo phương pháp do Zhu và cộng sự (2011) mô tả [10]. Đoạn gen *mcrA* (kích thước 530 bp) mã hóa cho tiểu phần α của methyl-coenzyme M reductase được khuếch đại từ khuôn DNA genome sử dụng cặp mồi *mcrAf* (5'-GGTGGTGTMGGATTCACACARTAYCCWACAGC-3') và *mcrAr* (5'-TTCATTGCRTAGTTWGGRTAGTT-3') với điều kiện chu trình nhiệt như sau: biến tính ở 94°C – 5 phút, 30 chu kỳ của 94°C – 50 giây, 55°C – 55 giây; 72°C – 1 phút, kéo dài kết thúc 72°C – 10 phút, giữ ở 20°C [10]. Sản phẩm PCR sau đó

được tinh sạch bằng Kit AccuPrep® (Bioneer, Hàn Quốc).

Đoạn gen *mcrA* sau đó được tách dòng sử dụng Vector pGEM®-T easy (Promega, Mỹ) và Kit pGEM®-T easy vector Systems, các bước tiến hành được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các dòng tế bào khả biến *E. coli* DH5 α chứa đoạn gen *mcrA* sau đó được tuyển chọn trên đĩa thạch LB có bổ sung ampicillin (5 mg/ml), IPTG (8 mg/ml) và X-Gal (2 mg/ml). Plasmid DNA từ các dòng tế bào lựa chọn được tách bằng Gene JET plasmid miniprep Kit (Fermentas). Đoạn gen *mcrA* sau đó được giải trình tự bằng cặp mồi M13F và M13R. Các trình tự gen được xử lý loại phân trình tự của vector bằng phần mềm BioEdit, sau đó so sánh với ngân hàng dữ liệu GenBank sử dụng công cụ Blast Search để xác định các gen có độ tương đồng cao.

2.2.5. Các phương pháp phân tích hóa học

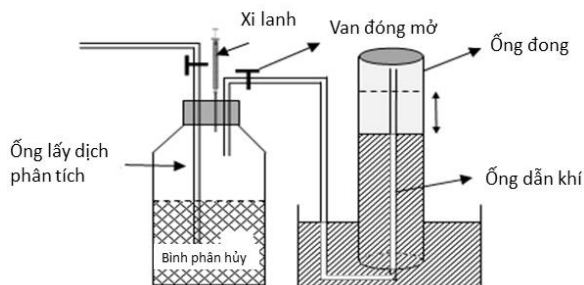
Thành phần CH₄ được xác định trên máy sắc ký khí Agilent 7890A với các thông số chạy mẫu như sau: cột HT-plot/Q (Agilent), đầu dò FID, nhiệt độ đầu dò 250°C, khí mang heli, tốc độ dòng 3 ml/phút, nhiệt độ lò 60°C [2].

Hàm lượng VFA được xác định bằng phương pháp quang phổ [11], các bước tiến hành như sau: Lấy 0,5 ml mẫu vào ống nghiệm rồi thêm 1,5 ml ethylene glycol và 0,2 ml sulfuric acid 19,5 N, sau đó trộn đều. Đun sôi hỗn hợp trong 3 phút và làm lạnh nhanh trong nước lạnh, sau đó thêm 0,5 ml hydroxylamine hydrochloride, 2 ml NaOH 4,5 N, 10 mL FeCl₃ 10%, trộn đều và đo mật độ quang ở bước sóng 495 nm. Nồng độ VFA được xác định dựa trên đường chuẩn xây dựng với acetic acid nồng độ 10 đến 1200 mg/l.

Hàm lượng COD được xác định theo TCVN 6491:1999.

Tổng thể tích khí sinh ra trong bình thí nghiệm được xác định theo phương pháp cột nước. Khí trong bình thí nghiệm theo đường dẫn vào trong ống đong và đẩy dần nước ra khỏi ống, lượng nước bị đẩy ra khỏi ống đong

tương đương với lượng khí sinh ra trong bình thí nghiệm (Hình 1).



Hình 1. Nguyên lý của phương pháp cột nước xác định tổng thể tích khí sinh ra.

Hoạt tính sinh methane được xác định dựa trên thể tích methane tạo thành và COD bị loại [12]. Công thức tính như sau:

Hoạt tính sinh methane = Thể tích CH_4 tạo thành (ml) / COD bị loại (g)

2.2.6. *Thiết lập thí nghiệm xử lý chất thải chăn nuôi trong phòng thí nghiệm ở mô hình mẻ 2 lít*

Thí nghiệm tiến hành trong bình Schott 2 lít. Chất thải lợn lợn thịt (Tây Mỗ, Hà Nội) được trộn với nước biển (Cửa Lò, Nghệ An) có độ mặn 26‰ theo tỷ lệ 1:4 để đạt hàm lượng COD ~ 16000 mg O_2/L . Dịch nuôi chứa tổ hợp vi sinh vật BKM được bổ sung vào mô hình theo tỷ lệ 10% thể tích. Đậy kín bình bằng nút cao su có gắn hệ thống thu mẫu khí và ống thu mẫu dịch (Hình 2). Thí nghiệm được tiến hành ở nhiệt độ 30 – 35°C, lắc định kỳ bằng tay và theo dõi thay đổi về pH, tổng thể tích khí sinh ra, thành phần CH_4 , COD trong bình thí nghiệm.



Hình 2. Xử lý chất thải chăn nuôi trong mô hình phòng thí nghiệm thể tích 2 lít.

3. Kết quả và thảo luận

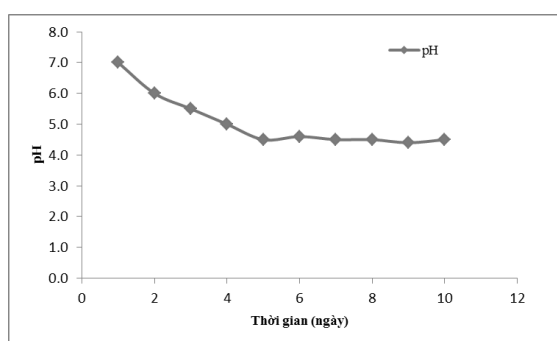
3.1. Tạo cơ chất phù hợp để nuôi tổ hợp vi sinh vật BKM

Tổ hợp vi sinh vật BKM gồm các vi sinh vật có nguồn gốc từ trầm tích biển Nha Trang, được làm giàu qua nhiều bước cấy truyền trong môi trường nước biển (hoàn toàn không có mặt oxy), chứa rong biển làm cơ chất [8]. Điều kiện làm giàu này cho phép tích lũy không chỉ methanogen mà còn các loài vi sinh vật khác tham gia quá trình chuyển hóa cacbon hữu cơ thành methane như vi khuẩn lên men sinh axit, vi khuẩn sinh acetate. Thông qua việc xác định số lượng cũng như hoạt tính sinh methane của methanogen trong tổ hợp, chúng ta có thể đánh giá một cách gián tiếp sự có mặt của các nhóm vi khuẩn kỵ khí còn lại vì sản phẩm trao đổi chất quyết định mức sinh trưởng của nhóm methanogen [12].

Để tạo nguồn cơ chất phù hợp cho tổ hợp vi sinh vật BKM (gồm methanogen và các nhóm vi khuẩn kỵ khí khác), chúng tôi lựa chọn cám gạo hòa trong nước biển nhân tạo (10%) và tiền xử lý bằng lên men. Có chứa các thành phần protein, lipid, glucid cùng nhiều khoáng chất, nguyên tố vi lượng, vitamin...cám gạo là cơ chất phù hợp cho sự sinh trưởng của nhóm vi khuẩn kỵ khí thực hiện các bước phân hủy đầu tiên của quá trình sinh methane là thủy phân và lên men sinh axit. Nguồn vi khuẩn lên men bổ sung vào bước tiền xử lý chính là tổ hợp BKM. Kết quả nghiên cứu cho thấy vi khuẩn lên men trong tổ hợp này thích nghi rất nhanh với điều kiện lên men, làm giảm pH liên tục trong 5 ngày, đạt mức ~ 4,5 ở ngày thứ 5 và giữ ổn định ở pH này trong thời gian dài (Hình 3).

Phân tích thành phần cacbon hữu cơ của dịch cám gạo sau 5 ngày lên men cho thấy hỗn hợp này có hàm lượng COD rất cao, ở mức 45000 mg O_2/L , trong đó tổng hàm lượng axit béo bay hơi (VFA) đạt ~ 900 mg/L (tương ứng với ~2% COD), chứng tỏ quá trình lên men đã diễn ra tích cực. Với thành phần cacbon hữu cơ được xác định như trên, dịch cám gạo được xử lý bằng lên men vi sinh này có thể sử dụng làm

ơ chất cho mục đích nuôi tăng sinh tổ hợp BKM, tỷ lệ phù hợp trong khoảng từ 5 – 10% để có COD ở mức ~ 2000 – 5000 mg/L. Bên cạnh đó, khi sử dụng dịch cám gạo lên men này làm cơ chất để nuôi tổ hợp BKM, quá trình lên men sẽ tiếp tục tạo ra VFA cho các bước sinh acetate và sinh methane tiếp sau mà không bị dừng lại ở khâu tích lũy VFA như trong giai đoạn lên men. Dịch cám gạo lên men được bảo quản ở nhiệt độ 4°C trong quá trình thí nghiệm để tránh thay đổi đáng kể về thành phần dinh dưỡng.

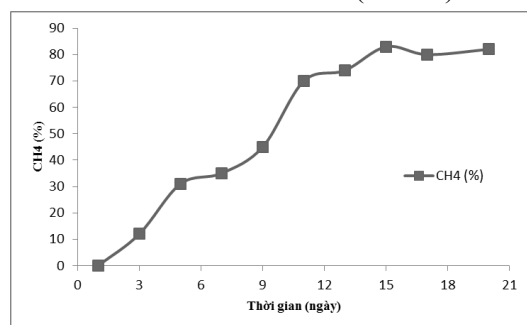


Hình 3. Biến đổi pH trong dịch cám gạo 10% theo thời gian lên men (mỗi điểm là giá trị trung bình của 2 lần đo).

3.2. Nuôi tổ hợp BKM

Việc nhân nuôi tổ hợp BKM bằng nguồn cơ chất là dịch cám gạo lên men được tiến hành trong môi trường nước biển nhân tạo hoàn toàn không có mặt oxy. Tỷ lệ cơ chất được đưa vào môi trường là 10%, tương đương với COD là 4500 mg/l và hàm lượng VFA ban đầu là ~ 90 mg/l. Theo tỷ lệ bổ sung cơ chất này, pH ban đầu của môi trường đạt mức ~ 6,5, thích hợp đối với quá trình chuyển hóa cacbon hữu cơ thành methane. Tổ hợp BKM được đưa vào bình nuôi theo tỷ lệ 10% thể tích và nuôi ở 35°C. Có thể thấy rằng methanogen trong tổ hợp BKM dễ dàng thích nghi với môi trường nước biển chứa cơ chất cám gạo lên men, dẫn đến pH trong bình nuôi tăng dần và đạt giá trị ~7 sau 2 tuần. Methane cũng xuất hiện trong khí sinh học thu được từ bình nuôi ngay sau 3

ngày và tăng đều trong các ngày tiếp theo, đạt mức rất cao là 83% sau 2 tuần (Hình 4).



Hình 4. Thành phần methane trong hỗn hợp khí sinh ra ở bình nuôi BKM theo thời gian (mỗi điểm là giá trị trung bình của 2 lần đo).

Theo lượng COD đã được chuyển hóa và lượng methane sinh ra tại các thời điểm, tổ hợp BKM khi sinh trưởng ở điều kiện môi trường nước biển được bổ sung cám gạo lên men có hoạt tính sinh methane ổn định ở mức 180 mL CH₄/gCOD sau 5 ngày và liên tục duy trì ổn định ở 10 ngày tiếp theo.

Mẫu dịch nuôi ở thời điểm sau 2 tuần có hoạt tính sinh methane ổn định và tỷ lệ methane cao nhất được phân tích mật độ vi sinh vật, gồm có tổng số vi khuẩn kỵ khí (chủ yếu là các vi khuẩn lên men) và tổng số methanogen. Các nhóm vi sinh vật này được xác định bằng phương pháp MPN sử dụng môi trường dịch thể đặc hiệu. Kết quả thu được cho thấy tổ hợp BKM đã đạt mức sinh trưởng cao trong điều kiện môi trường nước biển và cơ chất cám gạo lên men, đạt mật độ methanogen $2,8 \times 10^9$ MPN/ml và mật độ vi khuẩn kỵ khí tổng số $4,6 \times 10^{10}$ MPN/ml. Mật độ vi sinh vật thu được trong nghiên cứu này là rất cao so với bùn kỵ khí từ hệ thống UASB (methanogen ~ 4×10^8 MPN/ml, vi khuẩn lên men $9,5 \times 10^9$ MPN/ml) [13] hay trong hạt bùn bể biogas (methanogen ~ 10^6 MPN/ml) [14].

3.3. Phân tích thành phần methanogen trong tổ hợp BKM

Đa dạng methanogen trong tổ hợp BKM được đánh giá thông qua thiết lập thư viện gen

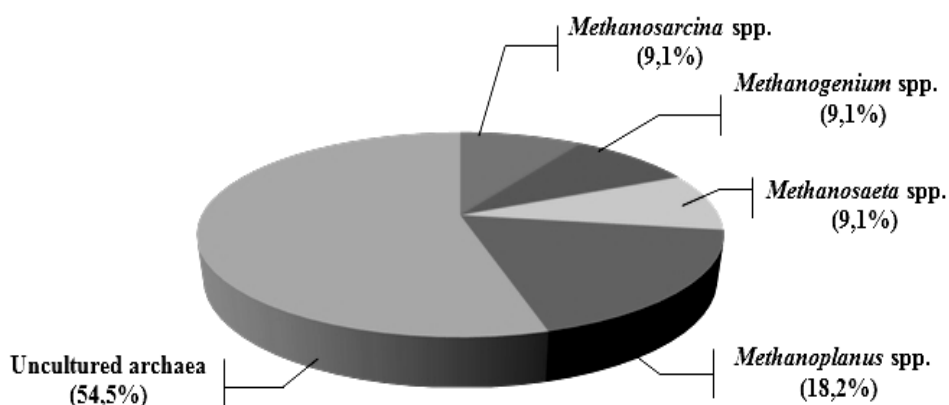
mcrA mã hóa cho tiểu đơn vị α của methyl coenzyme M reductase. Gen này có mặt ở mọi loài methanogen, là nhân tố thiết yếu của chuỗi phản ứng sinh hóa tạo methane và có tính bảo thủ khá cao, thường được sử dụng làm chỉ thị phân tử để nghiên cứu đa dạng methanogen trong tự nhiên [10]. Tổng số 44 dòng tế bào biến nạp mang đoạn chèn gen *mcrA* khuếch đại từ DNA genome của tổ hợp BKM đã được lựa chọn và giải trình tự.

Kết quả so sánh các trình tự gen với ngân hàng dữ liệu GenBank cho phép xếp 44 dòng tế bào mang gen *mcrA* vào 5 nhóm khác nhau (Bảng 1, Hình 5). Ba nhóm I, II, III đều gồm 4 dòng tế bào (mỗi nhóm chiếm 9,1% trên tổng số dòng tế bào của thư viện gen), tương ứng có độ tương đồng cao với *Methanosarcina* spp.

(98%), *Methanogenium* spp. (95%) và *Methanosaeta* spp. (94%). Nhóm IV với 8 dòng tế bào (chiếm tỷ lệ 18,2% trong thư viện gen) có độ tương đồng cao về trình tự gen *mcrA* với *Methanoplanus limicola* (96%). Nhóm V với 24 dòng tế bào trên tổng số 44 là nhóm có tỷ lệ cao nhất (54,5%), gồm những trình tự gen *mcrA* có độ tương đồng cao với các đoạn gen *mcrA* thu được trực tiếp từ môi trường (uncultured archaea), không phải từ các chủng thuần khiết đã phân lập được. Nhóm này lại được chia thành hai nhóm phụ, V(1) gồm 15 dòng tế bào, có trình tự gen *mcrA* nằm trong bộ *Methanosarcinales* và V(2) gồm 9 dòng tế bào có trình tự gen *mcrA* nằm trong bộ *Methanomicrobiales*.

Bảng 1. Đa dạng của methanogen trong tổ hợp BKM thể hiện qua phân tích thư viện gen *mcrA*

Tên nhóm	Các dòng tế bào	Tỷ lệ (%)	Loài gần gũi nhất (% tương đồng về trình tự)
Nhóm I	2, 13, 24, 20	9,1	<i>Methanosarcina acetivorans</i> (98%) <i>Methanosarcina siciliae</i> (98%) <i>Methanosarcina mazei</i> (98%)
Nhóm II	25, 35, 34, 37	9,1	<i>Methanogenium boonei</i> (95%)
Nhóm III	14, 23, 41, 43	9,1	<i>Methanosaeta pelagic</i> (94%)
Nhóm IV	1, 16, 17, 18, 21, 28, 32, 39	18,2	<i>Methanoplanus limicola</i> (96%)
Nhóm V	V(1) 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 26, 30, 38, 42	34,1	Uncultured archaea (<i>Methanosarcinales</i>)
	V(2) 19, 22, 27, 29, 31, 33, 36, 40, 44	20,4	Uncultured archaea (<i>Methanomicrobiales</i>)



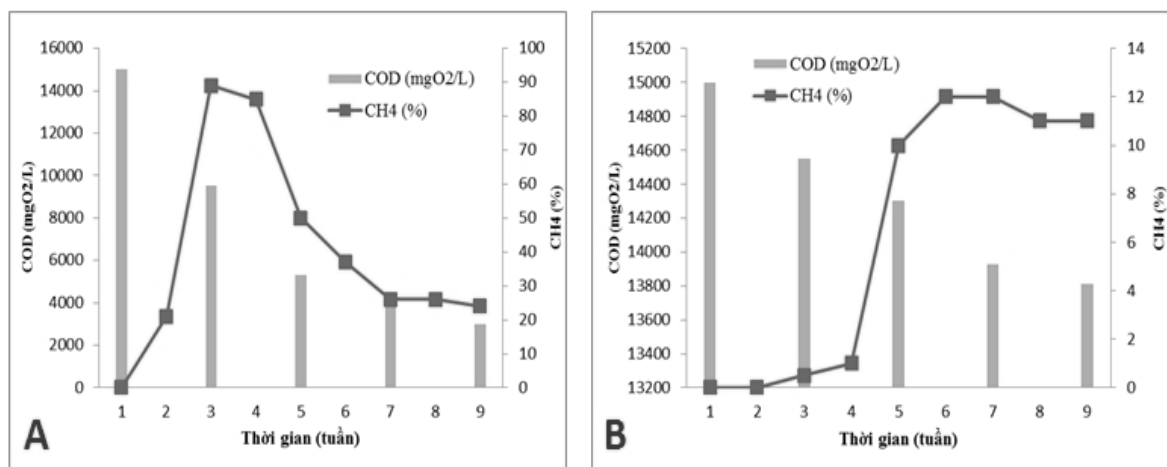
Hình 5. Cấu trúc quần xã methanogen trong tổ hợp BKM dựa trên phân tích thư viện gen *mcrA*.

Phân tích thư viện gen *mcrA* cho thấy methanogen trong tổ hợp BKM thuộc hai bộ *Methanomicrobiales* (nhóm II, IV và V(2)) và *Methanosarcinales* (nhóm I, III và V(1)). Về đặc điểm sinh lý, methanogen thuộc bộ *Methanomicrobiales* (như các chi *Methanogenium*, *Methanoplanus*, *Methanomicrobium*,...) chuyên biệt sử dụng $H_2 + CO_2$ và formate làm chất cho điện tử để tạo CH_4 , một số loài có thể sử dụng alcohol, tuy nhiên hoàn toàn không sử dụng acetate. Trong khi đó, methanogen thuộc bộ *Methanosarcinales* (như các chi *Methanosarcina*, *Methanolobus*, *Methanosaeta*,...) lại có tính chuyên biệt cao trong sử dụng acetate và một số hợp chất C1 như methanol, methylamine để tạo CH_4 [15]. Như vậy, việc sử dụng cám gạo lên men làm cơ chất cho phép nuôi tăng sinh khối đối với đa dạng methanogen, bao gồm cả nhóm dinh dưỡng hydro và nhóm dinh dưỡng acetate. Do vậy phương pháp nuôi này có thể áp dụng để tạo nguồn vi sinh vật thích hợp cho quá trình phân hủy kỵ khí sinh methane trong điều kiện nước biển khi có mặt đa dạng cơ chất khác nhau.

3.4. Đánh giá hiệu quả của tổ hợp BKM trong xử lý chất thải chăn nuôi ở mô hình mẻ 2 lít

Hoạt tính của tổ hợp vi sinh vật BKM được đánh giá thông qua thí nghiệm xử lý chất thải nuôi lợn thịt trong điều kiện môi trường nước biển (Hình 1). Trong thí nghiệm này, chất thải chăn nuôi được trộn với nước biển theo tỷ lệ 1/4 (v/v), tương đương COD trước khi xử lý là 15000 mg/l. Dịch nuôi BKM được bổ sung vào bình xử lý ở mức 10% thể tích.

Kết quả cho thấy tổ hợp BKM đã có tác dụng khởi động nhanh quá trình phân hủy kỵ khí sinh methane trong bình thí nghiệm. Methane xuất hiện trong thành phần khí tạo ra ở ngày thứ mười, tăng đều ở những ngày tiếp theo và đạt cực đại (lên tới 89%) sau 3 tuần (Hình 6A). Trong khi đó ở đối chứng không bổ sung giống khởi động, methane chỉ bắt đầu xuất hiện ở tuần thứ tư và tăng rất chậm theo thời gian, cao nhất đạt 12% sau 6 tuần (Hình 6B). Tỷ lệ CH_4 trong mô hình thí nghiệm sau tuần thứ ba thì giảm dần do lượng cacbon hữu cơ trong bình giảm, hiệu suất loại COD của mô hình đạt 80% sau 60 ngày, từ 15000 mg/l còn ~ 3000 mg/l (Hình 6A). Tại cùng thời điểm hiệu suất loại COD trong mẫu đối chứng chỉ đạt ~10%.



Hình 6. Chuyển hóa COD thành methane theo thời gian ở mô hình mẻ 2 lít. A - Mẫu thí nghiệm có bổ sung tổ hợp vi sinh vật BKM; B - Đối chứng không bổ sung vi sinh vật (mỗi điểm là giá trị trung bình của 2 lần đo).

Kết quả thí nghiệm chứng tỏ quá trình lên men kỵ khí sinh methane hoàn toàn có khả năng đạt hiệu suất cao trong điều kiện nước biển nếu có nguồn vi sinh vật khởi động phù hợp.

4. Kết luận

Tổ hợp vi sinh vật BKM có tính thích nghi cao với điều kiện nước biển được nuôi cấy sinh thành công trong điều kiện phòng thí nghiệm sử dụng cơ chất là cám gạo tiền xử lý bằng lên men sinh học. Phương pháp này cho phép tạo được dịch tế bào chứa $2,8 \times 10^9$ MPN/ml methanogen và $4,6 \times 10^{10}$ MPN/ml vi khuẩn kỵ khí tổng số sau 15 ngày nuôi, hoạt tính sinh methane ổn định ở mức 8 mmol CH₄/g COD. Theo kết quả phân tích thư viện gen *mcrA*, tổ hợp BKM có thành phần methanogen đa dạng, bao gồm các chi dinh dưỡng hydro (*Methanogenium*, *Methanoplanus*, *Methanomicrobium*) và các chi dinh dưỡng acetate (*Methanosarcina*, *Methanosaeta*), do vậy có khả năng thích nghi cao với nhiều dạng cơ chất khác nhau trong môi trường. Khả năng hỗ trợ quá trình khởi động và tăng hiệu quả phân hủy kỵ khí sinh methane của tổ hợp BKM được chứng minh qua thí nghiệm xử lý chất thải nuôi lợn thịt trong điều kiện nước biển ở mô hình mẻ 2 lít. Sự có mặt của các vi sinh vật trong tổ hợp BKM cho phép khởi động nhanh quá trình phân hủy chỉ sau 10 ngày, đạt hiệu suất loại COD ~ 80% sau 2 tháng với thành phần CH₄ trong hỗn hợp khí sinh ra đạt cực đại lên đến 89%. Kết quả nghiên cứu thu được có ý nghĩa quan trọng trong việc hướng tới ứng dụng BKM để hỗ trợ các hệ thống xử lý kỵ khí chất thải hữu cơ trong điều kiện nước biển, góp phần bảo vệ môi trường biển Việt Nam.

Tài liệu tham khảo

- [1] Bitton G, Wastewater microbiology, New York, USA (1999).
- [2] Chen S., Qiang H., Distinctive non-methanogen archaeal populations in anaerobic digestion,

Applied Microbiology Biotechnology, 100 (2016) 419.

- [3] Mori K., Iino T., Suzuki K.I., Yamaguchi K., Kamagata Y, Aceticlastic and NaCl-requiring methanogen *Methanosaeta pelagica* sp. nov. isolated from marine tidal flat sediment, Applied Environmental Microbiology, 78 (2012) 3416.
- [4] Stephane H., Chalopin M., Colombo D., *Methanocoides vulcani* sp. nov., a marine methylotrophic methanogen that uses betaine, choline and N,N-dimethylethanolamine for methanogenesis, isolated from a mud volcano, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 64 (2014) 1978.
- [5] Bruhn A., Dahl J., Nielsen H.B., Nikolaisen L., Rasmussen M. B., Markager S., Bioenergy potential of *Ulva latuca*: biomass yield, methane production and combustion, Bioresource Technology 102 (2011) 2595.
- [6] Chynoweth D.P., Owens J.M., Legrand R.L., Renewable methane from anaerobic digestion of biomass, Renewable Energy, 22 (2001) 1.
- [7] Amani T., Nosrati N., Sreekrishnan R, Anaerobic digestion in view point of microbiological, chemical and operational aspects – A review, Environmental Reviews, 18 (2010) 255.
- [8] Nguyễn Thu Hoài, Nguyễn Thị Tuyền, Nguyễn Lâm Dũng, Đinh Thúy Hằng, Làm giàu và phân lập vi sinh vật nhóm methanogen từ trầm tích biển Việt Nam, Tạp chí Công nghệ sinh học 12(2) (2014) 373.
- [9] Widdel F., Bak F., Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria, In Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer KH eds. The Prokaryotes, 2nd ed. Springer, Berlin Heidelberg New York (1992) 3352.
- [10] Zhu C., Zhang J., Tang Y., Xu Z., Song R., Diversity of methanogenic archaea in a biogas reactor fed with swine feces as the mono-substrate by *mcrA* analysis. Microbiological Research 166 (2011) 27.
- [11] Siedlecka E.M., Kumirska J., Ossowski T, Glamowski P., Golebiowski M., Gajdus J., Kaczynski Z., Stepnowski P., Determination of volatile fatty acids in environmental aqueous samples, Polish Journal of Environmental Studies, 17(3) (2008) 351.
- [12] Hussain A., Dubey S. K., Specific methanogenic activity test for anaerobic degradation of influents, Applied Water Science, 7 (2017) 535.

- [13] Liu S., Population dynamics on anaerobic sludge granulation in UASB reactors, *Journal of Environmental Sciences* 5(3) (1993) 323.
- [14] Karakashev D., Bastone D.J., Angelidaki, Influence of environmental conditions on methanogenic compositions in anaerobic biogas reactors, *Applied and Environment Microbiology*, 71(1) (2004) 331.
- [15] Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J., Brock *Biology of Microorganisms*, 14th ed. Pearson Education Inc., USA (2015).

Study on Cultivation of the Anaerobic Microbial Consortium BKM Capable of Methane Fermentation under Seawater Conditions

Do Thi Thu Hong¹, Nguyen Thu Hoai¹, Bui Thi Viet Ha², Dinh Thuy Hang³

¹*Vietnam Russia Tropical Center, Ministry of National Defence, 63 Nguyen Van Huyen, Hanoi, Vietnam*

²*Faculty of Biology, VNU University of Science, 334 Nguyen Trai, Hanoi, Vietnam*

³*Institute of Microbiology and Biotechnology, VNU University of Science, 144 Xuan Thuy, Hanoi, Vietnam*

Abstract: Marine environment in Vietnam has been severely polluted due to daily discharge of untreated organic wastes from land. Meanwhile, anaerobic digestion, the most efficient technology for the treatment of organic wastes is commonly ineffective in marine environment, the main reason is the lack of microorganisms capable of adapting to this special environmental conditions. In the present study, we showed an effective method to cultivate the marine microbial consortium BKM capable of performing the process of anaerobic digestion of organic wastes under seawater conditions. A complex substrate derived from 5-day fermented 10% rice bran in synthetic seawater, that had pH of 4.5, COD ~ 45000 mg O₂/L, VFA ~ 900 mg/L was developed to apply as substrate for the cultivation procedure. Anaerobic synthetic seawater medium containing 10% of the fermented rice bran has been proven effective in cultivation of the BKM consortium and allowed to reach a stable specific methane production activity of 180 mL CH₄/g COD after 5 days at 28 - 30°C. The 15 day well-grown culture of BKM contained 2.8×10⁹ MPN/ml methanogens, mainly belonged to hydrogenotrophic *Methanomicrobiales* and acetoclastic *Methanosarcinales*, as showed by analyses of *mcrA* gene library. In a 2 liter laboratory bioreactor model containing poultry manure mixed in seawater, the BKM culture showed highly effective, enabling the methane production to start after just 3 days of incubation, reaching 80% COD elimination after 60 days. The preliminary results indicated that BKM consortium cultivated in seawater medium with fermented 10% rice bran as showed in this study would have high application potential in anaerobic organic waste treatment systems operating under seawater condition.

Keywords: Biogas, methanogen, marine environmental pollution, anaerobic bacteria, organic waste treatment.