

PHÂN LẬP VÀ KHẢO SÁT KHẢ NĂNG LOẠI HYDROGEN SULFITE (H_2S) CỦA VI KHUẨN OXY HÓA HỢP CHẤT SULFUR (SOB) TRONG NƯỚC KINH NHIÊU LỘC - THỊ NGHÈ

NGUYỄN KHÁNH HOÀNG, NGUYỄN HOÀI PHONG,
HỨA THẠCH SƠN, NGUYỄN VĂN CƯỜNG

1. MỞ ĐẦU

Nước là một thành phần rất quan trọng đối với sự sống trên trái đất, đây là điều tất yếu mà mọi người đều nhận thức được. Theo tác giả Timi Ecimovic (2005) bề mặt trái đất có diện tích 510,072 triệu km^2 trong đó 70,7% được bao phủ bởi nước. Trong tổng lượng nước của quả đất chỉ có 2,5% là nước ngọt nhưng phần lớn (68,7%) nước ngọt lại có mặt trong các núi băng. Vì thế, lượng nước ngọt con người có thể dễ dàng sử dụng đáp ứng nhu cầu còn lại rất ít (0,4%) trong tổng số nước của trái đất.

Chất lượng của nước có thể sử dụng rất đáng được mọi người quan tâm vì chúng phải đáp ứng được nhu cầu ăn, uống, tắm, giặt. Tuy nhiên, các hoạt động của con người và thiên nhiên hàng ngày đã thải vào nguồn nước rất nhiều hợp chất có thể làm cho nguồn nước trở thành không an toàn cho nhu cầu sử dụng của con người và hệ sinh thái trong môi trường nước. Một trong những hợp chất thải ra do quá trình hoạt động của con người và thiên nhiên có ảnh hưởng rất lớn đến chỉ tiêu màu sắc và mùi của nước chính là Hydrogen sulfite (H_2S).

Trong môi trường nước các hợp chất sulfur tồn tại dưới 3 dạng tùy thuộc vào pH của môi trường, khi môi trường có pH 6 thì 90% tồn tại dạng H_2S và 10% ở trạng thái HS^- , nhưng khi pH môi trường đạt giá trị 10 thì sulfur tồn tại 100% ở trạng thái S^{2-} . Hydrogen sulfite hòa tan trong nước với nồng độ tối đa 0,4 gam/ 100 ml ở điều kiện nhiệt độ 20°C, khi có mặt trong nước chúng sẽ gây mùi hôi như mùi trứng thối làm ảnh hưởng đến giá trị cảm quan.

Thành phố Hồ Chí Minh với mạng lưới kinh rạch và sông có tổng diện tích bề mặt bao phủ là 141 km^2 gồm 5 hệ thống kinh rạch:

- Kinh Nhiêu Lộc - Thị Nghè (NL-TN) bao phủ 33 km^2 ;
- Kinh Tàu Hủ - Đò - Tè bao phủ 37 km^2 ;
- Kinh Tàu Hủ - Bến Nghé bao phủ 12 km^2 ;
- Kinh Tân Hóa - Ông Buồng- Lò Gốm bao phủ 16 km^2 ;
- Kinh Tham Lương - Bến Cát - Vàm Thuật bao phủ 44 km^2 .

Hệ thống kinh rạch của thành phố Hồ Chí Minh hiện nay không còn khả năng tự làm sạch khi phải tiếp nhận gần như toàn bộ lượng nước thải sinh hoạt và nước mưa của thành phố đồng thời với sự lấn chiếm làm thu hẹp diện tích bao phủ của hệ thống kinh rạch dẫn đến tình trạng ô nhiễm ngày càng trầm trọng. Phần lớn hệ thống kinh rạch trong phạm vi nội thành và khu vực đầu nguồn đều bị ô nhiễm nặng và được gọi là “Kinh đen” hoặc “Kinh thúi” bởi quá trình chuyển hóa các hợp chất sulfate do nhóm vi khuẩn khử sulfate (SRB) tạo thành hydrogen sulfite gây mùi thối và khi kết hợp với sắt tạo thành FeS gây màu đen. Vì thế, vào đầu năm 2001 với sự

tài trợ của ngân hàng thế giới thành phố đã khởi động dự án vệ sinh môi trường với mục đích cải tạo kinh NL-TN và cải tạo hệ thống thoát nước của thành phố. Tuy nhiên, hiện nay dự án vẫn còn tiến hành mặc dù đã được ngân hàng thế giới gia hạn đến quý I năm 2009.

Với mong muốn góp phần vào việc cải thiện môi trường thành phố Hồ Chí Minh cụ thể góp phần cải thiện chất lượng nước trong hệ thống kinh rạch, nhóm nghiên cứu đã tiến hành phân lập vi khuẩn có khả năng oxy hóa hợp chất sulfur trong nước kinh NL-TN sau khi đã khảo sát khả năng loại hydrogen sulfite có trong nước với quy mô phòng thí nghiệm sẽ tiến hành nghiên cứu cố định nhằm tạo ra chế phẩm sinh học xử lý H_2S trong có trong nước thải sinh hoạt.

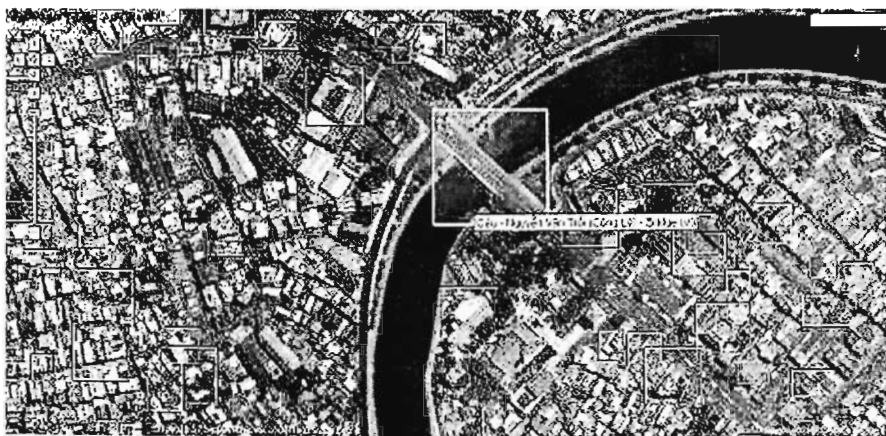
2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nguyên liệu và hóa chất

- Mẫu nước thu nhận từ kinh Nhiêu Lộc, Thị Nghè.
- Môi trường: PCA, PGA, Peptone, Colistine; Thuốc nhuộm Gram (Difco); Bộ test định danh vi sinh vật: ID32E (bioMérieux).
- Tủ cấy (Juoan, France).
- Nồi hấp (Hitachi, Japan).
- Máy đo quang UV-VIS (Thermo Electron Cooperation, USA).
- Kính hiển vi điện tử.
- Mô hình thử nghiệm khả năng phân giải sunfite của vi khuẩn.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Phương pháp lấy mẫu và chuẩn bị mẫu



Hình 1. Cầu Công Lý (cầu Nguyễn Văn Trỗi)- Nơi lấy mẫu (Source: www.wikimapia.org)

11 mẫu được lấy tại kênh NL-TN ở cầu Nguyễn Văn Trỗi có vị trí ($10^{\circ}47'29''N$; $106^{\circ}40'55''E$), độ sâu 0,1-0,2 m. Nhiệt độ của mẫu nước ở khoảng $26^{\circ}C$. Mẫu được lấy ở hai mùa mưa và mùa khô, trong mùa mưa (từ tháng 4 đến tháng 10) và mùa khô (từ tháng 11 đến tháng 3) năm 2007 (bảng 1). Mẫu nước được dùng để phân tích hàm lượng sunfite và phân lập vi

sinh vật. Nước được lấy tại kênh và cho vào erlen đã triệt trùng giữ ở nhiệt độ môi trường mang về phòng thí nghiệm. Mẫu được kiểm tra trong thời gian 24 giờ.

Bảng 1. Chi tiết và thông số của mẫu nước

Số thứ tự	Lô	Thời gian lấy mẫu	Mùa	Nhiệt độ (°C)	pH	Thủy triều
1	N1	Tháng 11 - tháng 3	Khô	26	6,5	Lên
2	N2	Tháng 11 - tháng 3	Khô	25,5	6,7	Xuống
3	N3	Tháng 11 - tháng 3	Khô	26	6,5	Xuống
4	N4	Tháng 11 - tháng 3	Khô	26	6,5	Xuống
5	N5	Tháng 11 - tháng 3	Khô	26,5	6,8	Lên
6	N6	Tháng 11 - tháng 3	Khô	26	6,5	Xuống
7	N7	Tháng 4 - tháng 10	Mưa	24	7,1	Lên
8	N8	Tháng 4 - tháng 10	Mưa	24,5	7,0	Xuống
9	N9	Tháng 4 - tháng 10	Mưa	25	7,1	Lên
10	N10	Tháng 4 - tháng 10	Mưa	25	7,0	Xuống
11	N11	Tháng 4 - tháng 10	Mưa	25,5	7,0	Xuống

2.2.2. Phương pháp phân lập vi sinh vật. (Harvey- Prescott, 2002):

Ba loại môi trường dùng để phân lập vi khuẩn (môi trường Thiosulfate, pH = 8,5; môi trường Beijerick, pH = 7,4; môi trường *Thiobacillus thiooxidans*, Ph = 4,4).

Sử dụng pipette đã triệt trùng hút 5 ml mẫu vào ống nghiệm chứa sẵn 20 ml dung dịch môi trường đã triệt trùng. Ủ ở 37°C và theo dõi trong thời gian 14 ngày. Hàng ngày tiến hành cấy khảo sát sự phát triển của vi khuẩn từ môi trường lỏng sang môi trường rắn. Môi trường rắn được chuẩn bị bằng cách thêm 1,5% agar (15 g / 1000 ml).

2.2.3. Phương pháp phân lập và làm thuần để chọn vi khuẩn.

Sử dụng kỹ thuật cấy phân lập để tạo khuẩn lạc riêng lẻ trên môi trường phân lập tương ứng. Tăng sinh vi khuẩn đã phân lập trên môi trường tăng sinh dạng rắn và dạng lỏng. Tiến hành khảo sát tính chất sinh hóa, hình dạng, kích thước, tính chất bắt màu bằng kỹ thuật thử nghiệm sinh hóa, nhuộm Gram.

2.2.4. Phương pháp làm tăng sinh vi khuẩn (Harvey- Prescott, 2002)

Cấy chuyển vi khuẩn vào môi trường mới nhằm tăng sinh khối để phục vụ công tác khảo sát khả năng xử lý hydrogen sulfite. Các môi trường tăng sinh gồm thạch nghiêng, đĩa Petri và môi trường lỏng.

2.2.5. Phương pháp khảo sát hàm lượng H_2S (APHA, AWWA and WPCF, TCVN- 4667- 88)

Nguyên tắc: Phương pháp này thử nghiệm khả năng làm giảm H_2S bởi các loại vi khuẩn oxy hóa hợp chất sunfur kết hợp với dung dịch iode.

Tiến hành:

- Chuẩn bị dung dịch iode: 20 g KI, 500 ml nước cất, 5 g iode, HCl (1 : 1); dung dịch $Na_2S_2O_3$ 0,05N.

- Chuẩn độ mẫu blank: cho 10 ml dung dịch iode và 5 ml nước cất và một vài giọt HCl vào erlen 250 ml và lắc đều. Đặt các erlen vào trong tối khoảng 15 ml. sau đó chuẩn độ với dung dịch $Na_2S_2O_3$ 0,1 N, sử dụng chất chỉ thị là hồ tinh bột. Thể tích $Na_2S_2O_3$ 0,01 N chuẩn độ được gọi là (V_o). Lặp lại thí nghiệm như trên 3 lần.

- Chuẩn độ với mẫu thử nghiệm bao gồm H_2S : thêm 5 ml dung dịch H_2S vào erlen sau đó tiến hành tương tự như mẫu blank.

Hàm lượng H_2S được xác định theo công thức:

$$X_{H_2S} = \frac{(V_o - V_x) \cdot 17 \cdot N_{Na_2S_2O_3} \cdot 1000}{V_{H_2S}};$$

với: nồng độ $Na_2S_2O_3$ là $N_{Na_2S_2O_3} = 0,1N$; Thể tích H_2S : $V_{H_2S} = 5$ ml; 17 là khối lượng (grams) của H_2S ; 1000 là thể tích pha loãng; V_x là thể tích của $Na_2S_2O_3$ 0.05N được sử dụng để chuẩn độ 5 ml mẫu H_2S ; V_o là thể tích của $Na_2S_2O_3$ 0,05 N được sử dụng để chuẩn độ 5 ml mẫu blank.

2.3. Khảo sát khả năng xử lý Hydrogen sulfite của vi khuẩn có trong môi trường

- Mẫu nước khảo sát được lấy từ kênh NLTN và tiến hành xử lý trong phòng thí nghiệm dưới dạng mô hình bể hiếu khí. Thể tích mẫu nước thử nghiệm là 50 lít với số lượng vi khuẩn khoảng 10^3 - 10^4 CFU/ml. Tốc độ khí được sục vào khoảng 10 lít khí/giây nhằm mục đích có thể duy trì được mức DO bình thường với điều kiện hiếu khí trên 3 mg/l (Frank A. Spellman. 2003). Thí nghiệm thực hiện 3 lần

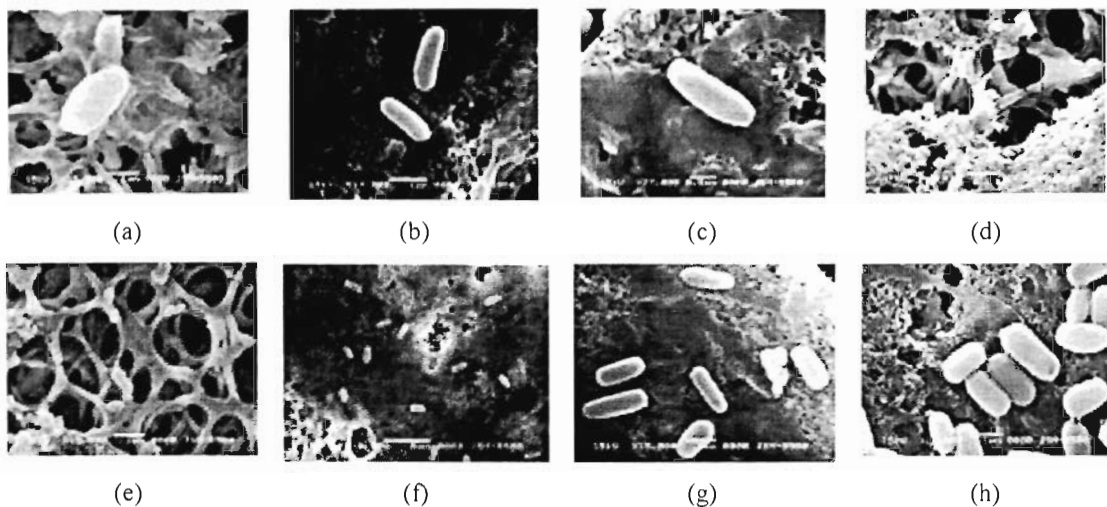
- Thu nhận mẫu nước trong mô hình sau mỗi giờ và phân tích hàm lượng H_2S bằng phương pháp Iot đồng thời xác định pH của mẫu bằng pH kế.

- Tiến hành thử nghiệm trong điều kiện không bổ sung vi khuẩn để đối chứng.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập vi khuẩn có trong mẫu nước

Vi khuẩn oxy hóa các hợp chất sunfur được phân lập từ mẫu nước kênh NL-TN trong ba loại môi trường gồm M_1 (pH 4,4), M_2 (pH 7,2) and M_3 (pH 8,5). Các chủng vi khuẩn này có khả năng sử dụng các hợp chất sunfur (mọc trên môi trường phân lập chuyên biệt) và đều là trực khuẩn gram âm. Trong số các vi khuẩn phân lập được chỉ 8 chủng có khả năng oxy hóa các hợp chất sunfite (Số liệu trình bày trong bảng 2). 8 chủng vi khuẩn oxy hóa hợp chất sunfite được khảo sát hình dạng bằng kính hiển vi điện tử (hình ảnh của SOB thể hiện trong hình 2).



Hình 2. 8 loại vi khuẩn được chụp dưới kính hiển vi - N3.1TT (a); N3.3TT (b); N3.4TT (c); N3.6TT (d); N6.1TT (e); N6.2TT (f); N10.1 K (g); N11.1 K (h)

(Giải thích kí hiệu **N3.6TT**: Là vi khuẩn có số thự tự 6 được phân lập từ mẫu nước số 3 trên môi trường *trung tính*; **K** môi trường *kiềm*)

Bảng 2. Tính chất và số lượng vi khuẩn phân lập được từ mẫu nước

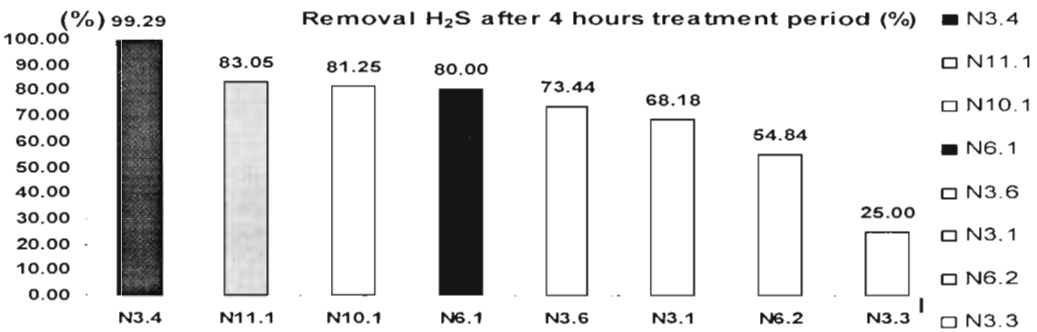
STT	Lô	M ₁	M ₂	M ₃	Mùa	Số vi khuẩn phân lập	pH	Thủy triều
1	N1	O	O	O	Khô	0	6,5	Xuống
2	N2	O	O	O	Khô	0	6,7	Lên
3	N3	O	X	O	Khô	4	6,5	Xuống
4	N4	O	O	O	Khô	0	6,5	Xuống
5	N5	O	O	O	Khô	0	6,8	Lên
6	N6	O	X	O	Khô	2	6,5	Xuống
7	N7	O	O	O	Mưa	0	7,1	Lên
8	N8	O	O	O	Mưa	0	7,0	Xuống
9	N9	O	O	O	Mưa	0	7,1	Lên
10	N10	O	O	X	Mưa	1	7,0	Xuống
11	N11	O	O	X	Mưa	1	7,0	Xuống

X. mẫu có vi khuẩn được chọn; O. mẫu không có vi khuẩn được chọn.

Bảng 2 chỉ ra rằng có 4 mẫu nước phân lập được vi khuẩn (2 mẫu của mùa mưa và 2 mẫu của mùa khô). Có 2 mẫu nước phân lập được vi khuẩn trong môi trường trung tính (M_2), trong khi đó số còn lại phát triển trong môi trường kiềm (M_3). Quá trình phân lập vi khuẩn đã chọn được 6 chủng vi khuẩn từ mẫu nước mùa khô và 2 chủng vi khuẩn từ mẫu nước mùa mưa.

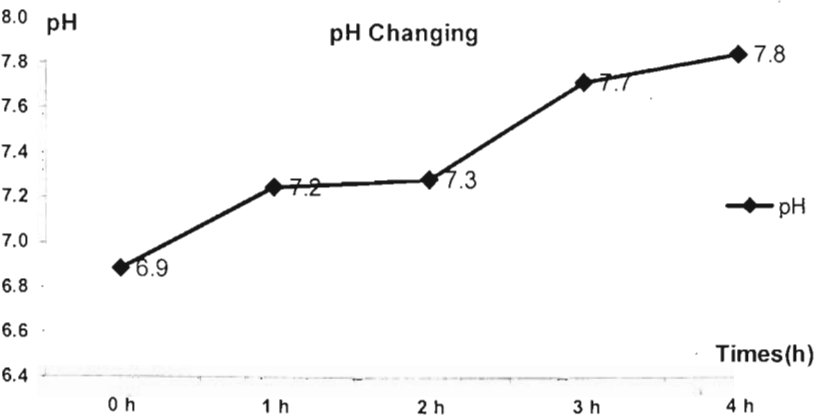
3.2. Khả năng khử các hợp chất sulfur của vi khuẩn

Trong nghiên cứu khảo sát khả năng xử lý hydrogen sulfite, nồng độ H_2S có chỉ số trung bình khoảng 0,59 ppm và giá trị pH của mẫu nước ở điều kiện trung tính (số liệu phân tích không được thể hiện trong bài báo cáo). Số liệu khảo sát được trình bày ở hình 3 cho thấy khả năng oxy hóa H_2S của vi khuẩn phân lập được từ mẫu. Sau 4 giờ xử lý chủng N3.4 được khảo sát cho kết quả xử lý cao nhất hàm lượng H_2S giảm 99,29%, trong khi đó chủng N3.3 được xử lý cho kết quả thấp nhất trong 8 chủng được khảo sát chỉ giảm được 25%.



Hình 3. Khả năng xử lý H_2S của các chủng vi khuẩn trong điều kiện mô hình

Trong các nghiên cứu của chúng tôi các chủng N3.4; N11.1; N10.1; N6.1 có khả năng phân giải H_2S trên 80% đây là con số rất có ý nghĩa trong quá trình lựa chọn ứng dụng vi sinh vật trong xử lý môi trường vì hiệu quả khá cao, trong khi đó các chủng khác khả năng xử lý dưới 80% như N3.6; N3.1; N6.2, N3.3.



Hình 4: Giá trị pH sau 4 giờ khảo sát và xử lý với các chủng vi sinh vật phân lập được

Khả năng phân giải H_2S của những vi khuẩn phân lập được từ nước kinh NL-TN sau 4 giờ cho thấy rằng những sản phẩm tạo thành không làm giảm pH môi trường. Số liệu thí nghiệm trong hình 5 cho thấy giá trị pH trung bình trong quá trình xử lý với các chủng vi sinh vật đều tăng (số liệu của từng thí nghiệm không thể hiện trong báo cáo).

4. KẾT LUẬN

Trong kết quả nghiên cứu của chúng tôi đã phân lập được 8 chủng vi khuẩn có khả năng khử H_2S từ kênh NLTN.

Tất cả chúng đều là vi khuẩn hiếu khí và là trực khuẩn Gram âm.

Trong 8 chủng này có 4 chủng N3.4; N11.1; N10.1; N6.1 có khả năng loại H_2S trên 80% trong đó chủng N3.4 có khả năng loại H_2S cao nhất là 99,29%.

Sản phẩm tạo thành từ quá trình oxy hóa hydrogen sulfite không làm giảm giá trị pH của môi trường (không tạo thành axit)

Từ kết quả nghiên cứu có thể tiếp tục ứng dụng những chủng vi khuẩn có khả năng xử lý H_2S cao bằng kỹ thuật cố định vi sinh vật nhằm tạo ra sinh phẩm xử lý môi trường. Tuy nhiên, cần phải tiến hành khảo sát thêm khả năng xử lý và các đặc tính sinh học của các chủng vi khuẩn này để có thể thương mại hóa sản phẩm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. A. J. H. Janssen, G. Lettinga, and A. de Keizer - Removal of hydrogen sulphide from wastewater and waste gases by biological conversion to elemental sulphur Colloidal and interfacial aspects of biologically produced sulphur particles, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **151** (1999)389-397.
2. Alex T. Nielsen, Wen - Tso Liu, Carlos Filipe, Leslie Grady Jr., Soren Molin, and David A. Stahl - Identification of a Novel Group of Bacteria in Sludge from a Deteriorated Biological Phosphorus Removal Reactor, *Applied and Environmental Microbiology* **65** (3) (1999) 1251-1258.
3. Altschul S. F., Thomas L. M., Alejandro A. S., Jinghui Z., Zheng Z., Webb M., and Lipman D. J. - Gapped BLAST and PSI - BLAST: a new generation of protein databases search program, *Nucleic Acids Research* **25** (17) (1997) 3389-3402.
4. Andrew S. Ball, David B. Nedwell and Rupert G. Perkins - Oxidation of hydrogen sulphide in sour gas by *Chlorobium limicola*, *Enzyme and Microbial Technology* **41** (2007) 702-705.
5. APHA AWWA and WPCF - Standard Method for Examination of Water and Wastewater 20th ed., Washington, D.C. American Public Health Association, 1998, p. 1325.
6. Aragno M. - Aerobic chemolithoautotrophic bacteria, In J. K. Kristjansson (ed.), *Thermophilic bacteria*, Boca Raton: CRC Press, Fla, 1991, pp. 7-103.
7. Bitton Gabriel - *Wastewater Microbiology*, Chichester: John Wiley & Sons, 3rd ed. 2005, p. 768.
8. Brock T. D., and H. G. Schlegel - *Autotrophic bacteria*, Wis: Springer - Verlag, Madison, 1989, pp. 1 - 15.

9. Brune D. C. - Sulfur oxidation by phototrophic bacteria., *Biochim. Biophys. Acta* **975** (1989) 189-221.
10. Brune D. C. - Sulfur compounds as photosynthetic electron donors. In R. E. Blankenship, M. T. Madigan, and C. E. Bauer, *Anoxygenic photosynthetic bacteria*, The Netherlands: Kluwer, Dordrecht, 1995, pp. 847-870.
11. Caroline M. O'Hara - Manual and Automated Instrumentation for Identification of Enterobacteriaceae and Other Aerobic Gram - Negative Bacilli., *Clinical Microbiology Reviews* **18** (1) (2005) 147-162.
12. Chirajyoti Deb, Ranadhir Chakraborty, Amar N. Ghosh, Nitai C. Mandal, Tusharmouli Mukherjee, Pradosh Roy - A generalized transducing thiophage (TPC - 1) of a facultative sulfur chemolithotrophic bacterium, *Bosea thiooxidans* CT5, of α - *Proteobacteria*, isolated from Indian soil, *FEMS Microbiology Letters* **227** (1) (2003) 87-92.
13. Chris Easter, Chris Quigley, Peter Burrowes, Jay Witherspoon and Dirk Apgar - Odor and air emissions control using biotechnology for both collection and wastewater treatment systems, *Chemical Engineering Journal* **113** (2005)93-104.
14. Christoph Griesbeck et al - Mechanism of Sulfide - Quinone Reductase Investigated Using Site - Directed Mutagenesis and Sulfur Analysis, *Biochemistry* **41**(39) (2002) 11552-11565.
15. Dam Sao Mai, Nguyen Khanh Hoang, Vu Dinh Huy, Abdurakhmonov Abdusattor, Abdurakhmonov Ibromkhim - The metal corrosion ability of sulfate reducing bacteria isolated from the mine White Tiger, *Petrovietnam journal Vietnam* (4) (2007) 24-28.
16. Dam Sao Mai, Nguyen Khanh Hoang, Vu Dinh Huy, Abdurakhmonov Abdusattor, Abdurakhmonov Ibromkhim - The biocide effect to sulfate reducing bacteria isolated from the mine White Tiger, *Petrovietnam journal Vietnam* (5) (2007) 33-37.
17. Daniel C. Brune - Sulfur oxidation by phototrophic bacteria, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **97** (5) (1989) 189-221.

SUMMARY

ISOLATED AND SURVEYED REDUCE HYDROGEN SULFITE (H₂S) ABILITY OF SULFUR-OXIDIZING BACTERIA (SOB) IN THE WATER OF NHIEU LOC - THI NGHE CANAL

8 strains of Sulfur oxidizing bacteria (SOB) were isolated and tested in order to remove hydrogen sulfide (H₂S) from Nhieu Loc - Thi Nghe canal in the aerotank pilot scale. The desulphurization ability of the strains N3.4; N11.1; N10.1; N6.1; N3.6; N3.1; N6.2; N3.3 were decreased (99.29%; 83.05%; 81.25%; 80.00%; 73.52%; 68.18%; 41.91%; 25.00%) respectively

Địa chỉ:

Nhận bài ngày 22 tháng 3 năm 2009

Nguyễn Khánh Hoàng, Nguyễn Hoài Phong, Hứa Thạch Sơn,

Trường Đại học Công nghiệp Tp. Hồ Chí Minh.

Nguyễn Văn Cường,

Khoa Kỹ thuật Y sinh, Trường đại học Chung Yuan, Đài Loan.