

PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN CHỦNG VI KHUẨN CHỊU NHIỆT ĐỘ CAO, THÍCH NGHI DẢI pH RỘNG, CÓ HOẠT TÍNH CELLULASE CAO VÀ BƯỚC ĐẦU ỨNG DỤNG XỬ LÝ NƯỚC THẢI NHÀ MÁY GIẤY

Vũ Thị Dinh¹, Phan Thị Thu Nga², Hoàng Trung Doãn³, Trần Liên Hà⁴

¹Đại học Khoa học Tự nhiên Hà Nội

^{2,3,4}Đại học Bách Khoa Hà Nội

TÓM TẮT

Năm 2016, theo thống kê của Hiệp hội giấy và bột giấy Việt Nam, sản lượng giấy nước ta đạt khoảng 2.420.000 triệu tấn. Sản xuất 1 tấn giấy cần dùng từ 200 - 500 m³ nước, tuy nhiên, nhiều công ty giấy đang xả nước thải không xử lý ra môi trường, gây ô nhiễm trầm trọng. Hiện nay, phương pháp xử lý sinh học là lựa chọn hàng đầu vì tính an toàn và không gây hại môi trường. Chính vì thế, nghiên cứu của chúng tôi tập trung phân lập, tuyển chọn chủng vi khuẩn chịu nhiệt độ cao, thích nghi dải pH rộng và có hoạt tính cellulase cao với mục đích ứng dụng xử lý nước thải nhà máy giấy. Từ 5 mẫu nước thải nhà máy giấy, đã phân lập được 11 chủng có hoạt tính cellulase, trong đó, chủng TD phân giải cellulose tốt nhất với hoạt lực cellulase lên tới 8,52 (U/ml). Định danh bằng phương pháp sinh hóa và sinh học phân tử, chủng TD tương đồng 99% với chủng *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* BGSC3A288. Chủng TD được gọi tên là *Bacillus subtilis* TD, có khả năng phát triển ở 30°C đến 45°C, tốt nhất ở 35°C và thích nghi với dải pH rộng từ 5 đến 9, tốt nhất ở pH = 6.

Từ khóa: *Bacillus subtilis*, nước thải nhà máy giấy, phân lập vi khuẩn, vi khuẩn phân giải cellulose chịu nhiệt.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Theo số liệu của Bộ Tài nguyên và Môi trường, 43,3% khu công nghiệp Việt Nam có công trình xử lý nước thải tập trung, tuy nhiên trong số này, nhiều công trình hoạt động thực tế rất kém (Bộ Tài nguyên & Môi trường, 2010). Nước thải của ngành sản xuất giấy là một trong những nguồn gây ô nhiễm môi trường nghiêm trọng. Nước thải nhà máy giấy chứa chất rắn lơ lửng, bột giấy, lignin, hóa chất tẩy trắng, chất phụ gia và các chất hữu cơ hòa tan là những hợp chất có độc tính sinh thái cao, có nguy cơ gây ung thư, rất khó phân hủy trong môi trường (Trịnh Lê Hùng, 2009). Các chỉ số về chất lượng nước thải của công nghiệp sản xuất giấy cao hơn giới hạn cho phép rất nhiều, cụ thể: Trong giai đoạn sản xuất bột giấy, hàm lượng TSS: 2000 mg/l, COD: 2500 mg/l, BOD₅: 1900 mg/l, pH: 6,4 - 7,5; trong giai đoạn xeo giấy hàm lượng TSS: 3500 mg/l, COD: 2500 mg/l, BOD₅: 2000 mg/l, pH: 7,5 - 9 (Trần Việt Ba, 2012).

Hiện nay, có nhiều phương pháp xử lý nước thải như: phương pháp vật lý, phương pháp cơ học, phương pháp hóa học, tuy nhiên, các phương pháp này có chi phí cao và chưa xử lý

triệt để nguồn ô nhiễm. Xử lý sinh học là phương pháp có nhiều ưu điểm do thân thiện với môi trường và khắc phục được các hạn chế của phương pháp khác (Desalegn Amenu, 2014). Nước thải nhà máy giấy có tỷ lệ BOD₅/COD \geq 0,5, thích hợp để xử lý sinh học. Cơ sở của phương pháp xử lý sinh học dựa trên hoạt động sống của vi sinh vật để phân hủy các chất hữu cơ gây nhiễm bẩn trong nước thải. Các vi sinh vật sử dụng các chất hữu cơ và một số khoáng chất làm nguồn dinh dưỡng và năng lượng. Trong quá trình dinh dưỡng, vi sinh vật nhận các chất dinh dưỡng để xây dựng tế bào và phát triển nên sinh khối của chúng được tăng lên, sinh khối này dễ dàng loại ra khỏi môi trường nước thải, khi tách phân ly bùn hoạt tính (Ngô Thị Nga, Trần Văn Nhân, 2002).

Đặc tính của nước thải nhà máy giấy là môi trường nghèo dinh dưỡng, nhiệt độ biến động từ 36°C lên tới 70°C, dải pH rộng khoảng từ 5 - 10 (Trần Việt Ba, 2012). Do đó, trong bài báo này đề cập đến việc phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn chịu được nhiệt độ cao, sinh trưởng trong dải pH rộng và có khả năng phân giải cellulose cao.

II. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

2.1.1. Mẫu nước thải

5 mẫu nước thải lấy từ nhà máy giấy An Hòa thuộc thôn An Hòa, xã Vĩnh Lợi, huyện Sơn Dương, tỉnh Tuyên Quang và các cơ sở sản xuất giấy tại cụm công nghiệp giấy Phú Lâm thuộc thôn Tam Tảo, xã Phú Lâm, huyện Tiên Du, tỉnh Bắc Ninh.

Mẫu bảo quản ở 2 - 4°C trong quá trình phân tích.

2.1.2. Hóa chất và môi trường

Môi trường dinh dưỡng NB (10g/l cao thịt; 10g/l pepton; 5 g/l NaCl); Môi trường thạch phân lập vi khuẩn phân giải cellulose - Hans theo TCVN 6168:2002 (0,5 g/l K_2HPO_4 ; 0,5 g/l KH_2PO_4 ; 1,0 g/l $(NH_4)_2SO_4$; 0,1 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,1 g/l $CaCl_2$; 6,0 g/l NaCl; 0,1 g/l Cao nấm men; 10 g/l Cellulose; 15 g/l agar; Môi trường thử hoạt tính cellulase (10 g/l Cellulose; 15 g/l agar).

Các loại môi trường được thanh trùng ở 121°C trong 15 phút.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập vi khuẩn

Từ các mẫu nước thải, lấy 50 ml cho vào bình tam giác 250 ml chứa 50 ml môi trường NB, chuẩn về pH = 5, nuôi lắc 150 vòng/phút ở 35°C trong 48h.

Xử lý mẫu trên ở 70°C trong 20 phút, sau đó để mẫu về nhiệt độ phòng và tiến hành pha loãng mẫu thập phân trong dung dịch NaCl 0,85% đến nồng độ 10^{-4} . Lấy 0,1 ml mẫu ở các độ pha loãng cấy lên môi trường chọn lọc Hans, mỗi độ pha loãng lặp lại 3 lần, sau đó nuôi ủ các mẫu ở 35°C/48h. Sau thời gian nuôi, chọn, nhận dạng các chủng riêng biệt cấy ria trên môi trường Hans đến khi thu được chủng thuần khiết (Nguyễn Lâm Dũng và cộng sự, 2009).

2.2.2. Tuyển chọn vi khuẩn

Xác định hoạt tính phân giải cellulose theo phương pháp chấm điểm, đục lỗ thạch (Ganesh D. Saratete và cộng sự, 2009):

Phương pháp cấy chấm điểm: Cấy chấm điểm các chủng trên môi trường thử hoạt tính chứa cellulose, nuôi ở 35°C/48h. Sau thời gian nuôi, nhuộm lugol và đo kích thước vòng phân giải, tính tỷ số giữa đường kính vòng phân giải (D1) và đường kính khuẩn lạc (d1).

Phương pháp đục lỗ thạch: Các chủng được chọn tiếp tục tăng sinh trên môi trường NB bổ sung thêm cellulose 1%, nuôi 48 giờ ở 35°C. Sau thời gian nuôi, đem ly tâm với tốc độ 10.000 vòng/phút trong 15 phút, thu dịch trong phía trên. Hút 100 μ l dịch trong thu được sau ly tâm của mỗi chủng cho vào từng giếng (đường kính giếng $d_2 = 8$ mm) trên môi trường thử hoạt tính cellulase ngoại bào. Ủ các đĩa thạch này ở 35°C trong vòng 48h. Sau đó tiến hành nhuộm lugol và tính hiệu số giữa vòng phân giải D2 và đường kính giếng d_2 .

Phương pháp đo hoạt lực enzyme cellulase: Được xác định dựa vào lượng đường khử tạo thành sau phản ứng bằng phương pháp đo quang phổ theo Miller (Miller, 1959).

2.2.3. Phương pháp định danh vi khuẩn

Đặc tính sinh lý, sinh hóa: Khả năng sinh bào tử, nhuộm Gram và các phản ứng hóa sinh trên môi trường đặc hiệu (Nguyễn Lâm Dũng và cộng sự, 2009). Sau đó, nhận diện sơ bộ chủng dựa trên khóa phân loại Bergay (Gibbons và Buchanon, 1989).

Phương pháp sinh học phân tử: Dựa trên phân tích trình tự 16S rRNA của các chủng vi khuẩn (Nguyễn Lâm Dũng và cộng sự, 2009).

Phản ứng PCR sử dụng cặp mồi xuôi 27F với trình tự 5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3', mồi ngược 1492R với trình tự 3'TACGGYTACCTTGTACGACTT5'. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR với các giai đoạn: Biến tính ở chu kỳ đầu ở 95°C trong 5 phút. Các chu kỳ sau biến tính trong 30 giây; Bắt cặp mồi ở 52°C trong 1 phút; Kéo dài ở 72°C trong 1 phút 30 giây; Thực hiện 35 chu kỳ; Chu kỳ cuối ở 72°C trong 5 phút; Kết thúc phản ứng hạ nhiệt độ xuống 4°C (Richard

Devereux and Sherry S. Wilkinson, 2004).

Kết quả giải trình tự 16S rRNA của vi khuẩn được phân tích so sánh với các trình tự trên ngân hàng gen quốc tế NCBI bằng chương trình BLAST để định danh loài vi sinh vật.

2.2.4. Khảo sát ảnh hưởng của điều kiện ngoại cảnh

Chuẩn bị chủng: Nuôi chủng TD trên môi trường NB ở 35°C trong 21 giờ với tốc độ lắc 150 vòng/phút. Thu dịch sinh khối, mỗi thí nghiệm cấp 5% dịch nuôi vào bình tam giác 250 mL chứa 100 mL môi trường NB.

Khảo sát:

Nhiệt độ: Môi trường NB được chuẩn về pH = 7. Nuôi tĩnh các bình lần lượt ở nhiệt độ 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C và 50°C.

Tốc độ lắc: Môi trường NB được chuẩn về pH = 7. Các bình được nuôi cùng ở 35°C với tốc độ lắc lần lượt là 50 vòng/phút, 100 vòng/phút, 150 vòng/phút, 200 vòng/phút, 250 vòng/phút và nuôi tĩnh.

Khảo sát pH: Môi trường NB được chuẩn về các pH = 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11. Nuôi các

bình thí nghiệm ở 35°C với tốc độ lắc 150 vòng/phút.

Mỗi thí nghiệm lặp lại 3 lần. Sau mỗi 3 giờ và kéo dài tới 48 giờ nuôi ủ, hút 3 mL dịch mẫu ở các thời điểm đo mật độ quang học.

2.2.5. Khảo sát khả năng xử lý của chủng phân lập quy mô bình tam giác 250 ml

Chủng TD được nuôi trên môi trường NB với pH = 6 ở 35°C trong 21 giờ, với tốc độ lắc 150 vòng/phút. Sau thời gian nuôi cấy, kiểm tra mật độ tế bào trong dịch thu được. Cấp 5% dịch nuôi các mật độ 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶ CFU/mL tương ứng vào các bình tam giác 250 mL chứa 100 mL nước thải. Sử dụng thêm một bình tam giác 250 mL chứa 100 mL nước thải không bổ sung chủng làm mẫu kiểm chứng. Nuôi các mẫu trên ở 35°C với tốc độ lắc 150 vòng/phút, sau mỗi 24 giờ, khảo sát khả năng và tính hiệu suất xử lý nước thải của chủng TD ở mỗi mật độ cấp giống qua xác định chỉ số COD theo TCVN 6491:1999.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập chủng vi khuẩn

Bảng 1. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc các chủng phân lập

STT	Mẫu	Chủng	Hình thái	D ₁ /d ₁
1	Nước nguồn	TD	Khuẩn lạc màu trắng ngà, mép răng cưa, bề mặt nhẵn, vòng phân giải lớn	6,03
2		TD1	Khuẩn lạc màu hồng, mép răng cưa, nhẵn, vòng phân giải vừa	1,07
3		TAD	Khuẩn lạc màu trắng ngà, mép răng cưa, vòng phân giải lớn	5,77
4	Bể vi sinh	VS41	Khuẩn lạc nhỏ, tròn, trắng, vòng phân giải vừa	1,38
5		VS42	Khuẩn lạc tròn, lan to hẳn lên mặt thạch, vòng phân giải nhỏ	/
6		VS43	Khuẩn lạc tròn trắng, vòng phân giải nhỏ	/
7		VS44	Khuẩn lạc tròn, lan to hẳn lên mặt thạch, vòng phân giải to	1,13
8		VS45	Khuẩn lạc tròn, hẳn lên mặt thạch, vòng phân giải nhỏ	/
9		VS46	Khuẩn lạc trắng bề mặt nhẵn, không có vòng phân giải	/
11		VS47	Khuẩn lạc trắng, không có mép, vòng phân giải nhỏ	/
12		VS48	Khuẩn lạc tròn nhỏ, trắng bóng, không có vòng phân giải	/
13	Bể cân bằng	CB41	Khuẩn lạc trắng, không có mép, vòng phân giải lớn	4,53
14		CB42	Khuẩn lạc tròn lan trên bề mặt thạch, vòng phân giải lớn	5,83
15		CB43	Khuẩn lạc tròn, vòng phân giải nhỏ	/
16		CB44	Khuẩn lạc nhỏ, trắng cở tâm, vòng phân giải lớn, bề mặt nhẵn	6,25
17		CB45	Khuẩn lạc nhỏ, tròn, trắng, vòng phân giải lớn	1,08
18	Bể lắng 1	L141	Khuẩn lạc đục, mép răng cưa, không có vòng phân giải	/
19		L142	Khuẩn lạc trắng, cở tâm trắng sữa, vòng phân giải lớn	3,27
20	Bể lắng 2	L241	Khuẩn lạc tròn trắng bề mặt nhẵn, vòng phân giải vừa	3,39
21		L242	Khuẩn lạc tròn, không có vòng phân giải	/

Từ các mẫu nước thải, sau khi xử lý ở pH = 5 trong 48 giờ và nhiệt độ 70°C trong 20 phút, nuôi cấy trên môi trường Hans đã phân lập được 11 chủng vi khuẩn có khả năng phân giải cellulose được thể hiện ở bảng 1.

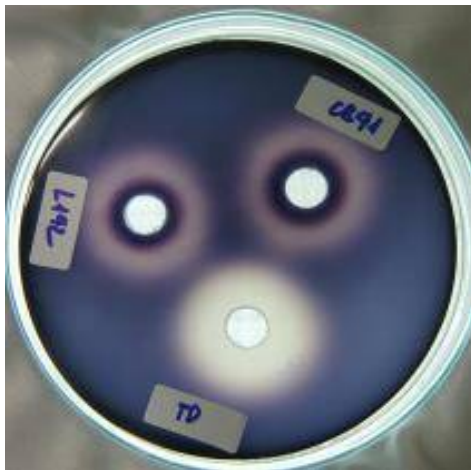
3.2. Tuyển chọn chủng vi khuẩn

11 chủng phân lập ở trên, tiếp tục tuyển chọn khả năng phân giải cellulose bằng phương pháp cấy chấm điểm, đục lỗ thạch và xác định hoạt lực enzyme, kết quả thu được cụ thể bảng 2.

Bảng 2. Khả năng phân giải cellulose của các chủng qua các phương pháp tuyển chọn

Chủng	TD	TD1	TAD	VS41	VS44	CB41	CB42	CB44	CB45	L142	L241
D1/d1	6,03	1,07	5,77	1,38	1,13	4,53	5,83	6,25	1,08	3,27	3,39
D2-d2 (mm)	24,91	/	22,02	/	/	22,3	20,39	23,37	/	22,11	17,34
Hoạt lực (U/ml)	8,52	/	7,06	/	/	6,64	7,16	7,44	/	7,09	5,84

D1: Đường kính vòng phân giải cellulose phương pháp cấy chấm điểm; d1: Đường kính khuẩn lạc; D2: Đường kính vòng phân giải cellulose phương pháp đục lỗ; d2 = 8 mm: Đường kính giếng.



Hình 1. Khả năng phân giải cellulose của chủng TD

Kết quả các thí nghiệm cho thấy, chủng TD có khả năng phân giải cellulose mạnh nhất: Phương pháp chấm điểm cho tỷ lệ đường kính vòng phân giải so với đường kính khuẩn lạc là 6,03; hiệu số đường kính vòng phân giải qua

phương pháp đục lỗ là 24,91 mm cao hơn chủng vi khuẩn PV41 (24,5 mm) (Nguyễn Ngọc Trúc Ngân và Phạm Thị Ngọc Lan, 2014) và hoạt lực enzyme cellulase qua phương pháp xác định hoạt lực enzyme đạt 8,52 (U/ml) cao hơn chủng PTCX04 (5,73 (U/ml)) của một số nghiên cứu trước đó (Phạm Bích Hiền và cộng sự, 2011).

3.3. Đặc tính sinh hóa của các chủng được tuyển chọn

Tăng sinh chủng TD trong môi trường NB ở 35°C trong 24 giờ. Sau đó, xử lý nhiệt dịch tăng sinh ở 70°C trong 20 phút và nhuộm Gram. Kết quả cho thấy chủng TD là vi khuẩn Gram dương, hình que, ngắn và có khả năng sinh bào tử.

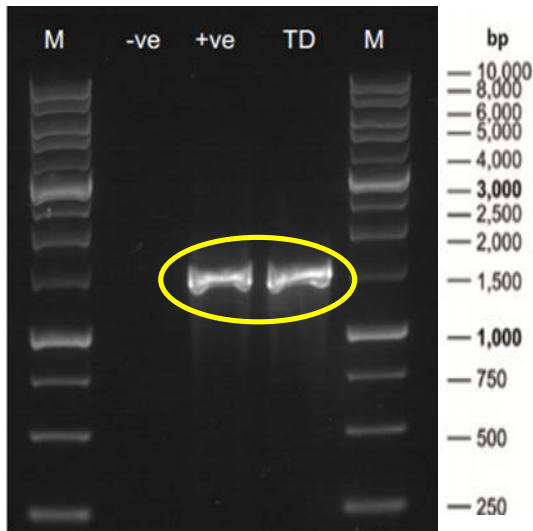
Tiến hành thử nghiệm một số tính chất sinh hóa chủng TD thu được kết quả ở bảng 3.

Bảng 3. Tính chất sinh hóa của chủng TD

Tính chất sinh hóa	Kết quả	Tính chất sinh hóa	Kết quả
Gram	+	β-Galactosidase	-
Catalase	+	Indol	-
Di động	+	Sinh H ₂ S	-
Phân giải huyết	-	Phản ứng Voges - Proskauer	+
D-Xylose	-	Citrat	+
Sucrose	+	Lysine decarboxylase	+
D- Mannitol	+	Ornithine decacboxylase	-
Glucose	+	Arginine dihydrolase	-
Lactose	-	Ure	-

Chủng TD có nhiều tính chất sinh hóa giống với *Bacillus spp.* như: Catalase dương tính, Voges - Proskauer dương tính, Glucose dương tính, D - Mannitol dương tính, Citrat dương tính, Arginine Dihydrolase âm tính, D - Xylose âm tính, Ure âm tính... (O'donnell và cộng sự, 1980).

3.4. Kết quả định danh bằng sinh học phân tử



Hình 2. Sản phẩm PCR của chủng TD
 -ve: Nước - Mẫu kiểm soát âm;
 +ve: DNA chủng *E.coli* - Mẫu kiểm soát dương.

Giải trình tự gen 16S rRNA của chủng TD với kích thước 1492 bp. Phân tích so sánh tương quan về cấu trúc, kết hợp sử dụng thuật toán xử lý dữ liệu BLAST

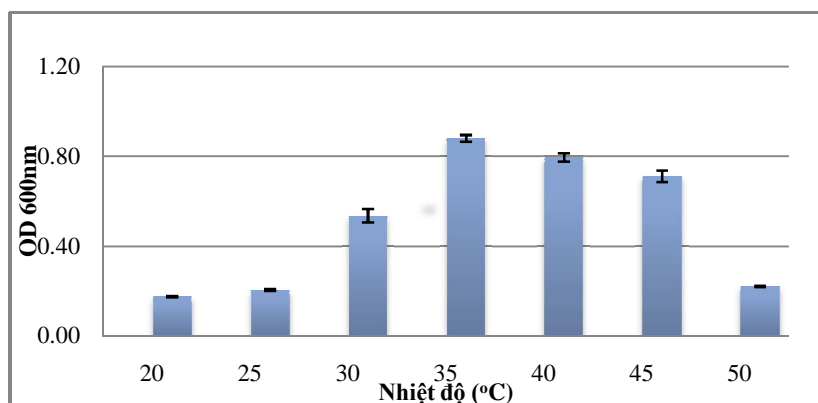
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>), nhận thấy trình tự 16S rRNA của chủng TD tương đồng 99% với các chủng *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* BGSC3A288; *Brevibacterium halotolerans* DSM 8802; *Bacillus subtilis* DSM10; *Bacillus subtilis* IAM121188; *Bacillus vallismortis* DSM11031; *Bacillus mojavenensis* IFO15718; *Bacillus subtilis* 168; *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* NBRC1012g39; *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42; *Bacillus subtilis* NBRC13719 và gần gũi nhất với chủng *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* BGSC3A288.

Từ các kết quả phân tích đặc tính sinh học và cấu trúc 16S rRNA nêu trên, chủng vi khuẩn TD định danh là chủng *Bacillus subtilis* TD.

3.5. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ và pH

3.5.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ

Khảo sát sự phát triển của chủng TD ở các nhiệt độ khác nhau, trong cùng điều kiện môi trường dinh dưỡng NB với pH = 7, nuôi tĩnh. Kết quả cho thấy chủng TD, có khả năng chịu nhiệt. Chúng có thể phát triển tốt ở nhiệt độ từ 30°C đến 45°C và tốt nhất ở 35°C với mật độ tế bào OD_{600nm} = 0,88.

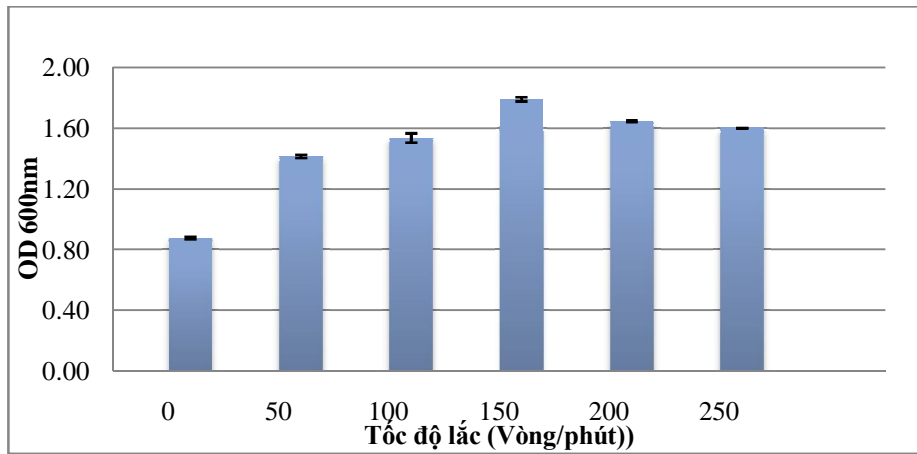


Hình 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự phát triển của chủng TD sau 24 giờ

3.5.2. Ảnh hưởng của tốc độ lắc

Chủng TD phát triển tốt nhất ở 35°C. Tiến hành nuôi chủng TD ở 35°C với chế độ cấp khí khác nhau. Kết quả thu được cho thấy, chế độ

cấp khí khác nhau, chủng TD phát triển với tốc độ khác nhau và phát triển tốt nhất khi nuôi lắc ở 150 vòng/phút với giá trị OD_{600nm} = 1,79.

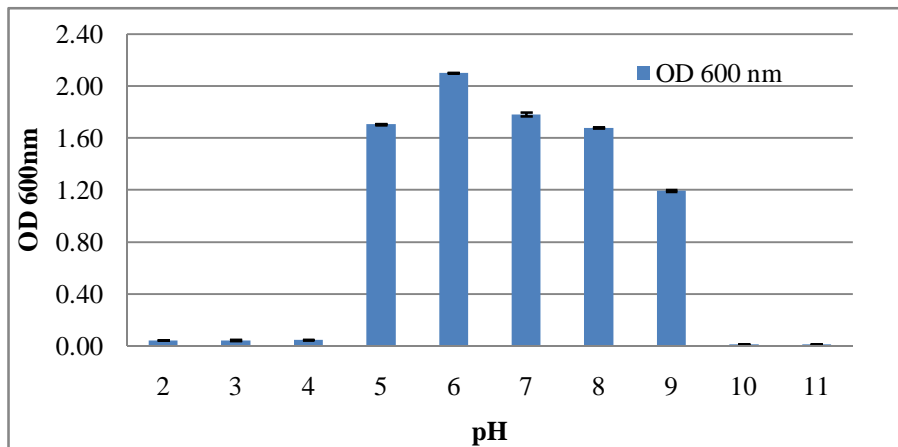


Hình 4. Ảnh hưởng của tốc độ lắc đến sự phát triển của chủng TD sau 24 giờ

3.5.3. Ảnh hưởng của pH

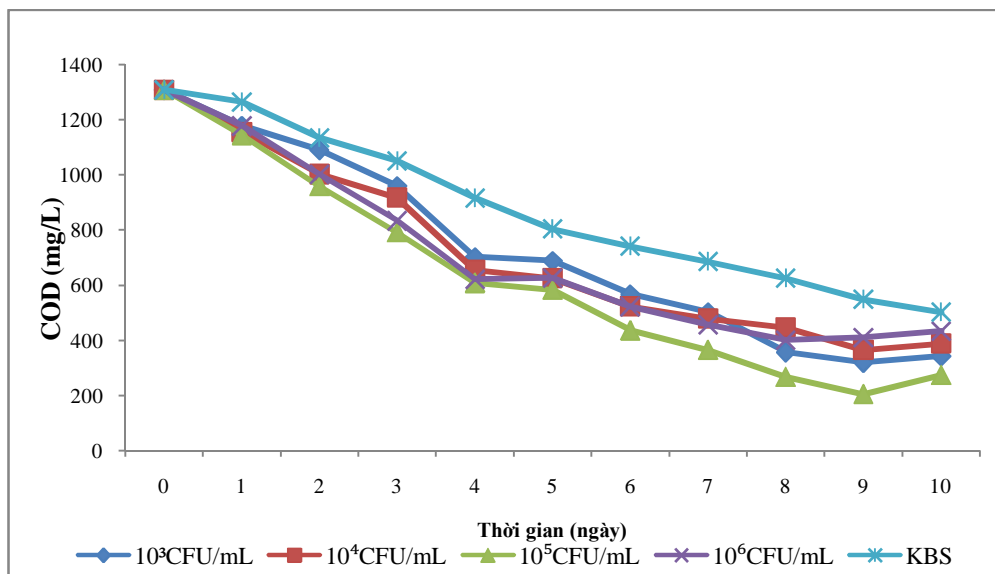
Khảo sát sự phát triển của chủng TD ở các pH khác nhau cho thấy, chúng phát triển tốt từ pH = 5 cho đến pH = 9 và tốt nhất ở pH = 6

với giá trị OD_{600nm} lên tới 2,10. Chủng TD có khả năng chịu axit đến kiềm thích nghi được với nguồn nước thải có pH dao động từ 5 - 9.



Hình 5. Ảnh hưởng của pH đến sự phát triển của chủng TD sau 24 giờ

3.6. Khảo sát khả năng xử lý nước thải nhà máy giấy của chủng TD ở quy mô bình tam giác 250 ml



Hình 6. Hiệu quả xử lý COD của chủng TD ở quy mô bình tam giác 250 mL

Kết quả ở hình 6 cho thấy, khi bổ sung chủng TD vào mẫu nước thải, hàm lượng COD giảm đáng kể. Hàm lượng COD ban đầu là 1309,1 (mg/L), sau 3 ngày cho thấy sự khác biệt rõ rệt giữa mẫu bổ sung thêm chủng TD còn khoảng 793,0 - 918,3 mg/L với mẫu không bổ sung và chỉ có vi sinh vật nền (1051,7 mg/L). Sau 9 ngày, hàm lượng COD trong mẫu bổ sung chủng TD đạt 205,7 mg/L thấp hơn nhiều so với mẫu kiểm chứng không bổ sung 548,6 mg/L.

Mật độ bổ sung chủng khác nhau cho hiệu quả xử lý nước thải khác nhau. Trong đó, khi bổ sung mật độ 10^5 CFU/ml, khả năng xử lý nước thải tốt nhất với tốc độ xử lý nhanh hơn và hiệu suất xử lý ở ngày thứ 9 đạt tới 84,3%.

IV. KẾT LUẬN

Từ các mẫu nước thải nhà máy giấy đã phân lập được 11 chủng có khả năng phân giải cellulose, trong đó chủng TD có khả năng chịu được nhiệt độ cao, thích nghi với dải pH tương đối rộng và phân giải cellulose tốt nhất.

Đã nghiên cứu và xác định được một số đặc tính sinh hóa và trình tự cấu trúc gene 16S rRNA của chủng TD. Từ đó chủng TD được đề nghị định danh loài là *Bacillus subtilis* TD.

Đã khảo sát được khả năng phát triển của chủng TD trong các điều kiện nhiệt độ, tốc độ lắc và pH khác nhau, kết quả cho thấy chủng TD có khả năng chịu và phát triển ở nhiệt độ cao lên tới 45°C, tỷ lệ cấp khí tốt nhất 150 vòng/phút, trong dải pH từ axit nhẹ (pH = 5) đến kiềm (pH = 9).

Bước đầu sử dụng chủng TD xử lý nước thải nhà máy giấy ở quy mô bình tam giác 250 mL với chế độ cấp khí lắc 150 vòng/phút cho thấy hiệu quả khá cao, hiệu suất COD đạt tới 84,3% sau 9 ngày xử lý.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Trịnh Lê Hùng (2009). *Kỹ thuật xử lý nước thải*. Nhà xuất bản Giáo dục.

2. Ngô Thị Nga, Trần Văn Nhân (2002). *Giáo trình công nghệ xử lý nước thải*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật.

3. Nguyễn Lâm Dũng, Ngô Đình Quyết, Phạm Văn Ty (2009). *Vi sinh vật học*. Nhà xuất bản Giáo dục, Hà Nội.

4. Nguyễn Ngọc Trúc Ngân, Phạm Thị Ngọc Lan (2014). Tìm hiểu khả năng phân giải cellulose của vi sinh vật phân lập từ chất thải rắn của nhà máy FOCOCEV Thừa Thiên Huế. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, Trường Đại học Khoa học Huế, tập 1, số 1.

5. Phạm Bích Hiên, Đào Văn Thông, Lương Hữu Thành, Vũ Thúy Nga (2011). Tuyển chọn chủng vi sinh vật có khả năng phân giải xenluloza cao cho sản xuất chế phẩm xử lý phế thải chăn nuôi dạng rắn. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam* số 3(24).

6. TCVN 6168: 2002. Chế phẩm vi sinh vật phân giải xenlulo/Microbial preparation for cellulose degradation.

7. TCVN 6491:1999. Chất lượng nước - Xác định nhu cầu oxi hóa học/Water quality - Determination of the chemical oxygen demand.

8. Trần Việt Ba (2012). Nghiên cứu nâng cao hiệu quả xử lý của các bể hiếu khí bằng cách điều chỉnh dinh dưỡng thích hợp cho vi khuẩn đối với hệ thống xử lý nước thải của nhà máy giấy Bãi Bằng.

9. Bộ Tài nguyên & Môi trường (2010). *Báo cáo Môi trường quốc gia năm 2009*. Môi trường Khu công nghiệp Việt Nam.

10. Ganesh D. Saratete, Yung-Chung Lo, Wen-Ming Chen, Ming-Der Bai, Jo-Shu Chang (2009). Isolation of cellulose-hydrolytic and applications of the cellulolytic enzymes for cellulosic biohydrogen production. *Enzyme and Microbial Technology*, 44(417-425).

11. N. E. Gibbons R. E. Buchanon (1989). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Vol.8: The Williams and Wilkins company, Baltimore.

12. A. G. O'donnell, J. R. Norris, R. C. W. Berkeley, D. Claus, T. Kaneko, N. A. Logan, R. Nozaki (1980). Characterization of *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, and *Bacillus amyloliquefaciens* by Pyrolysis Gas-Liquid Chromatography, Deoxyribonucleic Acid-Deoxyribonucleic Acid Hybridization, Biochemical Tests, and API Systems. *International Journal of Systematic Bacteriology*, pp. 448-459.

13. Miller (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3): 426-428.

14. Richard Devereux, Sherry S. Wilkinson (2004). Amplification of ribosomal RNA sequences. *Molecular Microbial Ecology Manual*, Second Edition 3.01: 509-522.

**ISOLATION AND SELECTION OF BACTERIA STRAINS ADAPTED
TO HIGH TEMPERATURES, WIDE pH RANGE, HAVE HIGH
CELLULASE ACTIVITY AND THE FIRST INITIAL APPLICATION
TO WASTEWATER TREATMENT OF PAPER MILLS**

Vu Thi Dinh¹, Phan Thi Thu Nga², Hoang Trung Doan³, Tran Lien Ha⁴

¹VNU University of Science

^{2,3,4}Ha Noi University of Science and Technology

SUMMARY

In 2016, according to the Vietnam Pulp and Paper Association, the country's paper production reached 2,420,000 million tons. Each ton of manufactured paper requires about 200 - 500 m³ of water, however, many paper mills are discharged into environment with out untreated wastewater, causing serious pollution. At present, biological treatment method is the best choice because of its safety and not harmful to the environment. Therefore, our research focused on the isolation and selection of bacteria strains adapting to high temperatures, wide pH range and having high cellulase activity for the purpose of wastewater treatment. From 5 wastewater samples of paper mill, 11 strains with cellulase activities have been isolated, among them, TD strain assimilate cellulose the best with activity of cellulase up to 8.52 (U/ml). Identified by biochemical and molecular biology, the TD strain is 99% similarity with *Bacillus subtilis* subsp. inaquosorum BGSC3A288 strain. The TD strain's name is *Bacillus subtilis* TD, could grow at 30°C to 45°C, pH range of 5 to 9 but the best conditions are 35°C and pH of 6.

Keywords: *Bacillus subtilis*, isolated bacteria, thermotolerant bacteriaassimilate cellulose, wastewater of paper mill.

Ngày nhận bài : 20/4/2017

Ngày phản biện : 26/4/2017

Ngày quyết định đăng : 02/5/2017