

NGHIÊN CỨU LOẠI SẮT TRONG NƯỚC THẢI ACID TỪ MỎ KHOÁNG SẢN (AMD) KẾT HỢP XỬ LÝ NƯỚC THẢI CHĂN NUÔI TRONG MÔ HÌNH BỂ SINH HỌC KHỬ SULFATE

Nguyễn Thị Hải, Đinh Thuý Hằng

Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội

Ngày nhận bài: 01.3.2016

Ngày nhận đăng: 20.6.2016

TÓM TẮT

Nước thải acid từ hoạt động khai thác khoáng sản (AMD) có pH thấp (1 – 4), hàm lượng kim loại nặng cao (tới vài nghìn ppm), nếu không được xử lý sẽ gây ảnh hưởng nghiêm trọng tới môi trường. Công nghệ xử lý AMD bằng bể sinh học khử sulfate được ứng dụng tại nhiều nước trên thế giới với hiệu quả cao. Tâm điểm của công nghệ là vi khuẩn khử sulfate (SRB) sử dụng hydrogen hay carbon hữu cơ để khử sulfate thành sulfide, kết tủa ion kim loại và trung hòa pH acid của nước thải. Để triển khai công nghệ, nguồn SRB và cơ chất hữu cơ cần thiết cho vi khuẩn này sinh trưởng cần phải được bổ sung vào bể xử lý. Thông thường, hai yếu tố này được đáp ứng từ phân trâu bò và phế phẩm nông nghiệp (rơm rạ) đưa vào bể sinh học khử sulfate trước khi khởi động. Trong nghiên cứu này, SRB làm giàu từ nước thải chế biến thủy sản được sử dụng làm nguồn vi khuẩn khởi động cho bể sinh học khử sulfate trong mô hình xử lý AMD quy mô phòng thí nghiệm. Xử lý kết hợp AMD với nước thải chăn nuôi trong mô hình này theo chế độ liên tục với thời gian lưu 48 h cho phép loại được 85 – 88% Fe²⁺ trong nước thải (từ nồng độ ban đầu là ~200 mg/L). Phân tích thành phần quần xã vi khuẩn bằng phương pháp điện di biến tính đối với 16S rDNA cho thấy hỗn hợp SRB khởi động gồm ba nhóm SRB chính là *Desulfovibrio*, *Desulfomicrobium* và *Desulfobulbus* spp. Sau khi vận hành ổn định, chỉ có *Desulfovibrio* spp. thích nghi và chiếm ưu thế trong bể sinh học khử sulfate. Kết quả nghiên cứu là cơ sở ban đầu để triển khai ứng dụng công nghệ xử lý AMD kết hợp với các nguồn nước thải có hàm lượng hữu cơ cao, thích hợp cho các mỏ khai thác khoáng sản ở gần vùng dân cư.

Từ khóa: AMD (acid mine drainage), *Desulfovibrio*, kim loại nặng, khử sulfate, SRB (sulfate reducing bacteria)

MỞ ĐẦU

Nước thải acid (AMD) được coi là một trong các mối đe dọa lớn nhất của hoạt động khai thác khoáng sản tới môi trường. Với đặc điểm có pH thấp (2 – 4) và hàm lượng kim loại nặng cao (vài nghìn ppm), AMD có ảnh hưởng lâu dài đối với hệ nước mặt và nước ngầm, làm cho nước tại các khu vực bị ảnh hưởng trực tiếp có pH bằng 4 hoặc thấp hơn, hòa tan nhiều kim loại nặng như sắt, đồng, nhôm, cadmium, arsen, chì, thủy ngân... (Watzlaf *et al.*, 2003).

Ngành khai thác khoáng sản ở nước ta chiếm vị trí quan trọng trong nền kinh tế, đóng góp tới 5,6% GDP. Tuy nhiên các mối nguy hại do ô nhiễm nước thải từ các mỏ khai thác đang được đặt ra ở mức báo động (Báo cáo Đánh giá môi trường chiến lược Quy hoạch phát triển ngành của Tập đoàn Công nghiệp Than và Khoáng sản đến năm 2020). Tổng lượng nước thải từ mỏ năm 2009 ước tính là 38.914.075 m³, tuy nhiên con số này chưa phản ánh đầy đủ thực trạng do chưa tính đến lượng nước rửa trôi khá lớn từ

các bãi thải mỏ (Hồ Sỹ Giao, Mai Thế Toàn, 2010).

Đặc điểm của AMD là có pH thấp, nồng độ sulfate và kim loại cao vượt mức cho phép nhiều lần và mục đích của các công nghệ xử lý AMD là nhằm giải quyết ba yếu tố này. Biện pháp sinh học sử dụng vi khuẩn khử sulfate (SRB) để xử lý nước thải có hàm lượng kim loại nặng cao được đưa vào áp dụng từ những năm 1950 (Sheoran *et al.*, 2010). SRB là các vi khuẩn sinh trưởng kỵ khí, sử dụng sulfate làm chất nhận điện tử cuối cùng để oxy hóa hydro hay các hợp chất hữu cơ và tận thu năng lượng cho mục đích sinh trưởng: $2\text{CH}_2\text{O} + \text{SO}_4^{2-} + \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{S} + 2\text{HCO}_3^-$ (Rabus *et al.*, 2006). Các sản phẩm trao đổi chất của SRB (như H₂S và 2HCO₃⁻) có tác dụng trong việc xử lý AMD, trong đó sulfide hòa tan sẽ tạo phản ứng kết tủa với phần lớn kim loại trong AMD ($\text{H}_2\text{S} + \text{Me}^{2+} \rightarrow \text{MeS} + 2\text{H}^+$), đồng thời tăng pH; các ion bicarbonate thì làm tăng pH và tính kiềm của nước thải (Sheoran *et al.*, 2010). Phần lớn các kim loại chính của AMD được loại khỏi nước thải dưới dạng kết tủa với sulfide

(Gadd, 2004; Zagury *et al.*, 2007). Ngoài ra, khi pH trong môi trường tăng (nhờ các sản phẩm trao đổi chất từ quá trình khử sulfate), nhiều kim loại còn bị tủa ở dạng hydroxide (Gadd, 2004).

Trong bể xử lý bằng SRB, nguồn cacbon hữu cơ cần thiết cho quá trình khử sulfate cần được cung cấp ở mức phù hợp, ở dạng các hợp chất carbon đơn giản như methanol, lactate (Logan *et al.*, 2005) hay các hợp chất cao phân tử như tinh bột, cellulose ở trạng thái tan chậm vào môi trường (như vỏ trấu, rơm rạ) (Doshi, 2006). Trong một số trường hợp, các nguồn nước thải có thành phần carbon hữu cơ phù hợp cũng có thể được bổ sung vào bể phản ứng để đảm bảo quá trình khử sulfate xảy ra ở mức tối ưu (Zagury *et al.*, 2007).

Biện pháp sinh học sử dụng SRB để xử lý AMD được quan tâm do tính an toàn (không gây ô nhiễm thứ cấp như phương pháp hóa học), chi phí thấp, có thể tận dụng một số loại phế thải và dễ dàng triển khai ở nhiều điều kiện địa hình khác nhau, ít có nhu cầu về năng lượng cũng như yếu tố con người trong quá trình vận hành. Bên cạnh đó, biện pháp này cũng có một số yếu điểm, trong đó nổi bật nhất là tính không ổn định đối với lưu lượng thải lớn và đậm đặc, có thể bị ảnh hưởng của thời tiết, yêu cầu về diện tích khá lớn. Mặc dù vậy, xét về tổng thể biện pháp xử lý AMD sử dụng SRB vẫn được đánh giá là công nghệ hữu hiệu, có hiệu quả cao về kinh tế (Doshi, 2006).

Ở Việt Nam, SRB đã được quan tâm nghiên cứu đưa vào ứng dụng trong xử lý nước thải có hàm lượng kim loại cao như nước thải từ làng nghề (Kieu Quỳnh Hoa *et al.*, 2003), xử lý nước thải nhiễm chì cao (Kiều Thị Quỳnh Hoa *et al.*, 2013). Nghiên cứu bước đầu cho thấy bể phản ứng sinh học khử sulfate để loại các ion kim loại trong nước thải dưới dạng sulfide kết tủa có thể được thiết lập thông qua quá trình làm giàu SRB trực tiếp từ nguồn nước thải tại chỗ, sử dụng chất hữu cơ từ phân trâu bò được đưa vào như nguồn SRB ban đầu. Tuy nhiên các nghiên cứu còn chưa đề cập đến việc chủ động tạo ra nguồn SRB thích hợp cho bể phản ứng khử sulfate. Bên cạnh đó, sử dụng các nguồn chất thải/nước thải có hàm lượng hữu cơ cao để bổ sung vào bể xử lý như nguồn cacbon và năng lượng cho quá trình khử sulfate cũng là vấn đề cần nghiên cứu.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Làm giàu tạo nguồn SRB khởi động

Vi khuẩn khử sulfate được làm giàu từ mẫu bùn

của hệ thống xử lý nước thải chế biến thủy sản tại Bình Dương trong môi trường khoáng nước ngọt kỵ khí (thành phần trong 1 L gồm có: Na₂SO₄, 4 g; NaCl, 1 g; MgCl₂.6H₂O, 0,4 g; CaCl₂.2H₂O, 0,15 g; KCl, 0,5 g; MgSO₄.7H₂O, 0,25 g; NH₄Cl, 0,25 g; KH₂PO₄, 0,2 g), có bổ sung hỗn hợp vitamin và vi lượng (Widdel, Bak, 1992) theo tỷ lệ 1 ml/L và N-lactate (10 mM) là nguồn carbon và điện tử duy nhất. Mẫu làm giàu được đặt nuôi tĩnh trong tối tại 28°C, cấy chuyển sang môi trường tươi sau mỗi 7 ngày. Sinh trưởng của SRB trong mẫu được đánh giá thông qua hàm lượng sulfide tạo thành.

Phân tích thành phần SRB trong mẫu làm giàu

Thành phần vi sinh vật trong mẫu làm giàu được phân tích thông qua phương pháp điện di biến tính đoạn V3-V5 của 16S rDNA. Theo đó DNA tổng số của mẫu làm giàu được tách chiết theo phương pháp do Zhou và cộng sự (1996) mô tả với cải biến về nồng độ đệm phosphate (tăng từ 100 mM lên 120 mM) trong đệm tách (gồm: 100 mM Tris (pH 8); 100 mM EDTA (pH 8); 120 mM đệm phosphate (Na₂HPO₄/NaH₂PO₄); 1,5 M NaCl; 1% CTAB).

Vùng V3 - V5 của 16S rDNA với độ dài 550 bp được khuếch đại trong phản ứng PCR sử dụng cặp mồi GM5F (CCTACGGGAGGCAGCAG)-GC và 907R (CCGTCAATTCCTTTRAGTTT) (Muyzer *et al.*, 1993). Touch-down PCR với nhiệt độ gắn mồi giảm dần từ 65°C tới 55°C được sử dụng để tăng độ đặc hiệu và giảm sự hình thành các sản phẩm phụ (Muyzer *et al.*, 1993).

Điện di được tiến hành trên gel polyacrylamide 6% với dải biến tính urea/formamide từ 30% đến 60%. Quá trình điện di được thực hiện bằng bộ điện di Dcode™ System (BioRad) trong đệm TAE, ở nhiệt độ 60°C, tại 200 V, trong 3,5 giờ. Sau khi điện di, gel polyacrylamide được nhuộm trong dung dịch ethidium bromide (5 mg/ml) trong 30 phút, sau đó rửa nước và chụp ảnh dưới tia UV trên máy GelDoc (BioRad). Các băng điện di đại diện được cắt, rửa và thổi trong nước qua đêm tại 4°C. Dịch thổi DNA được dùng làm khuôn để thực hiện phản ứng PCR như chu trình nhiệt của phản ứng PCR cho DGGE với cặp mồi GM5F (không có kẹp GC) và 907R. Sản phẩm PCR sau đó được tinh sạch bằng PCR-purification Kit (Bioneer, Hàn Quốc) và giải trình tự với ABI Prism BigDye Terminator cycle sequencing kit và đọc trình tự trên máy tự động 3110 Avant Applied Biosystems. Trình tự gen sau đó được phân tích, so sánh với trình tự 16S rDNA của các loài có liên quan hiện đã công bố trên Database

DDBJ/EMBL/GenBank sử dụng phần mềm BLAST Search. Cây phân loại được dựng theo phương pháp neighbour-joining (Saitou, Nei, 1987), trong đó định dạng cây được tiến hành dựa trên 1000 phép so sánh đa chiều (Felsenstein, 1985).

Xác định nồng độ sulfide

Hàm lượng sulfide trong dịch nuôi SRB được xác định theo phương pháp do Cord-Ruwisch (1986) mô tả, dựa trên nguyên lý phản ứng giữa ion S^{2-} với ion Cu^{2+} tạo CuS có màu nâu đen dạng huyền phù, đo được nhanh ở bước sóng 480 nm. Đường chuẩn được xây dựng cho dãy dung dịch Na_2S có nồng độ từ 0 – 20 mM.

Xác định hàm lượng Fe^{2+}

Hàm lượng Fe^{2+} được xác định bằng thuốc thử phenanthrolin theo phương pháp chuẩn DIN 38406 E1-1 (1983). Mô tả ngắn gọn phương pháp như sau: Mẫu sau khi thu được hạ pH tới 1 bằng dung dịch H_2SO_4 loãng (1% thể tích). Thêm vào 50 ml mẫu 5 ml dung dịch ammonium acetate 5,2 M và 2 ml dung dịch hydroxyl ammonium chloride 1,4 M, trộn đều bằng vortex (hỗn hợp cần có pH nằm trong khoảng 3,4 - 5,5, tối ưu là 4,5). Sau đó thêm 2 ml dung dịch phenanthrolin 21 mM, trộn đều rồi thêm nước cho tới 100 ml, trộn đều và giữ ở nhiệt độ phòng trong 15 phút. Đo mẫu tại bước sóng 510 nm, đường chuẩn được tiến hành với nồng độ $Fe(II)$ từ 5 - 50 μM .

Xác định hàm lượng sulfate

Hàm lượng sulfate được xác định theo trọng lượng $BaSO_4$ kết tủa trong phản ứng giữa 1 ml mẫu với thể tích tương đương dung dịch $BaCl_2$ 0,2 M và HCl 0,2 M sau khi lọc và sấy khô tới mức trọng lượng ổn định.

Xác định hàm lượng COD và nitrogen tổng số

Hàm lượng COD được xác định theo phương pháp chuẩn TCVN 6491:1999; Nitrogen tổng số được xác định theo phương pháp chuẩn TCVN 8557:2010.

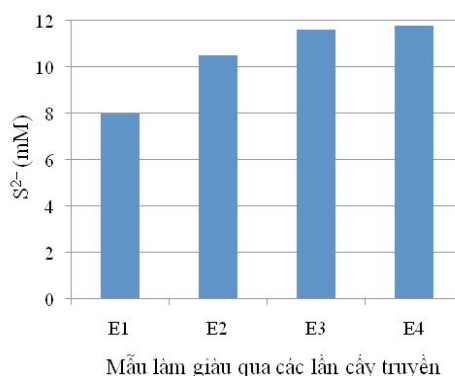
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Làm giàu SRB

Nguồn mẫu sử dụng để làm giàu SRB là nước tầng đáy trong hồ sinh học xử lý nước thải từ nhà máy chế biến thủy sản ở Bình Dương. Mẫu có màu xám đen, nặng mùi sulfide và pH ở mức ~6,5. Vi khuẩn khử sulfate (SRB) được làm giàu từ mẫu nước

thải trong bình serum 100 ml chứa môi trường khoáng dịch thể có sulfate (28 mM) làm chất nhận điện tử duy nhất và Na-Lactate (10 mM) là chất cho điện tử. pH môi trường trong thí nghiệm làm giàu là 6,5 – 6,8, nhiệt độ nuôi cấy là 30°C.

Sự sinh trưởng của SRB trong các mẫu làm giàu được nhận biết sau 5 – 7 ngày nuôi cấy thông qua sản phẩm trao đổi chất sulfide (Hình 1) trong phản ứng tạo kết tủa CuS màu nâu với dung dịch $CuCl_2$. Có thể thấy rằng lượng sulfide sinh ra trong mẫu làm giàu tăng dần qua mỗi lần cấy chuyên, đạt mức khá ổn định (~ 11 mM) tại các lần cấy chuyên thứ ba và bốn, chứng tỏ SRB đã được làm giàu và tích lũy ở mức đạt cân bằng về cấu trúc quần xã và hoạt tính khử sulfate trong mẫu làm giàu.



Hình 1. Hàm lượng sulfide (mM) xác định trong mẫu làm giàu ở các lần cấy chuyên khác nhau sau 7 ngày nuôi (giá trị trung bình của 2 lần đo).

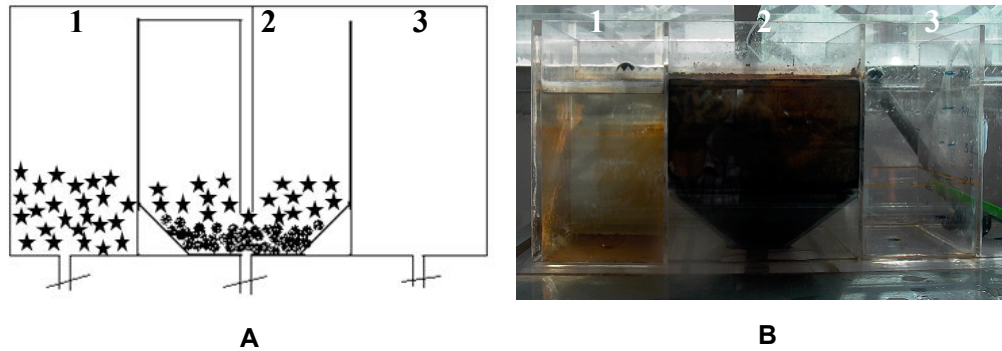
Thiết kế mô hình bể sinh học khử sulfate và vận hành xử lý AMD kết hợp nước thải chăn nuôi

Mô hình xử lý gồm ba bể nối tiếp có thể tích 1 lít mỗi bể (tổng thể tích là 3 lít), trong đó bể số 1 làm chức năng điều hòa, chứa đá dăm (~1/3 thể tích); bể số 2 là bể sinh học khử sulfate được đặt giá thể (phoi bào và đá dăm, tới ~1/3 thể tích) và bổ sung nguồn SRB từ mẫu làm giàu E4 (theo tỷ lệ 5% thể tích bể) và bể số 3 cuối cùng là bể lắng trước khi nước thải được đưa ra ngoài môi trường (Hình 2).

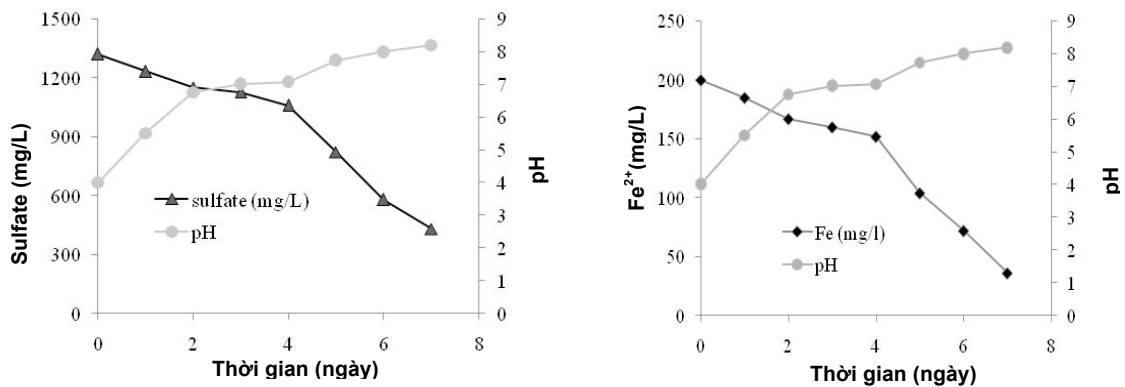
Nguồn AMD được thu thập từ mỏ than Trảng Khê ở Quảng Ninh có pH ~4, nồng độ Fe^{2+} là 286 mg/l và nồng độ sulfate là 1886 mg/l. Hàm lượng carbon của nước thải AMD rất thấp, không phù hợp cho sinh trưởng của SRB, theo đó nước thải sau biogas của trang trại nuôi lợn thịt có thành phần COD là 1066 mg O_2/L và thành phần nitrogen tổng số là 88 mg/L được đồng thời bổ sung vào bể xử lý

theo tỷ lệ 30%. Như vậy hỗn hợp nước thải đầu vào quy trình xử lý có pH 4,2 với nồng độ Fe^{2+} là 200 mg/l, nồng độ sulfate là 1320 mg/l, COD 320 mg O_2/L và nitrogen tổng số ở mức 22,4 mg/L. Nước thải được chuyển qua các bể xử lý theo nguyên lý chảy tràn, trong đó từ bể số 1 sang bể số 2 là dòng

chảy hướng đáy, còn từ bể số 2 sang bể số 3 là dòng chảy tràn bề mặt. Thí nghiệm được tiến hành theo hai chế độ mẻ và liên tục, hiệu quả xử lý được đánh giá qua thay đổi của giá trị pH, nồng độ sulfate cũng như Fe^{2+} tại các điểm lấy mẫu sau bể khử sulfate (bể số 2) hoặc bể lắng (bể số 3).



Hình 2. Mô hình xử lý AMD trong phòng thí nghiệm. A – Sơ đồ mô hình; B – Mô hình thực tế; 1) Bể trung hòa chứa AMD đầu vào; 2) Bể sinh học khử sulfate; 3) Bể lắng chứa nước thải đầu ra.



Hình 3. Xử lý AMD kết hợp nước thải chăn nuôi trong mô hình bể sinh học khử sulfate vận hành theo mẻ. A – Khử sulfate trong nước thải; B – Loại Fe^{2+} trong nước thải.

Ở thí nghiệm vận hành theo mẻ, nước thải được đưa vào bể số 1 và chảy tràn sang bể số 2 với tốc độ dòng chảy 80 ml/h (tương đương 1,92 lít/ngày) rồi dừng lại, theo đó nước thải được giữ lại trong bể số 2 trong thời gian 7 ngày để đánh giá quá trình thích nghi và xử lý do vi khuẩn khử sulfate tại đây (Hình 3). Có thể thấy rằng pH của nước thải đã tăng từ 4,2 đến 5 ngay sau 12 h tiếp xúc với bể số 1 và 2 nhờ tác dụng của đá dăm có bản chất là đá vôi tại các bể này, pH đạt mức ~6,8 ở ngày thứ 4 khi quá trình khử

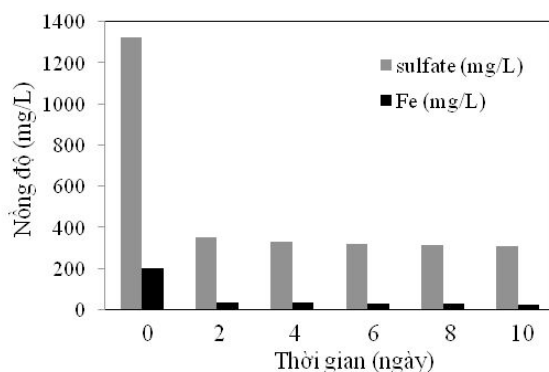
sulfate bắt đầu được kích hoạt. Trong khi đó quá trình khử sulfate chỉ diễn ra tích cực sau ngày thứ 4 do SRB bổ sung từ dịch làm giàu đòi hỏi thời gian thích nghi với môi trường trong bể xử lý và phát triển. Sau 4 ngày, pH vẫn tiếp tục tăng nhẹ do sản phẩm trao đổi chất sulfide được tạo ra từ quá trình khử sulfate.

Tương tự như sulfate, quá trình loại Fe^{2+} cũng chỉ diễn ra tích cực sau 4 ngày (Hình 3B), song song với

quá trình khử sulfate nhờ kết tủa ở dạng sulfide kim loại. Trong 4 ngày đầu, hàm lượng Fe^{2+} có giảm nhẹ do pH tăng, tạo điều kiện cho quá trình oxy hóa Fe^{2+} thành Fe^{3+} tách ra khỏi dung dịch ở dạng kết tủa oxit sắt Fe_3O_4 có màu vàng nâu (Hình 2B). Như vậy, quá trình xử lý sinh học khử sulfate thực sự chỉ diễn ra từ ngày thứ 4 trở đi và trong thời gian 3 ngày hệ thống đã loại được 73% sulfate và 86% Fe^{2+} . Hàm lượng COD trong nước thải sau 7 ngày còn ở mức thấp là 12,7 mg O_2 /ml, chứng tỏ SRB trong hệ thống đã sử dụng COD một cách tích cực cho quá trình khử sulfate.

Sau 7 ngày là thời gian thích nghi và ổn định

hoạt tính khử sulfate của SRB trong mô hình tại nghiên cứu này, nước thải được tiếp tục đưa vào mô hình với tốc độ thấp hơn, ở mức 60 ml/h và vận hành theo chế độ liên tục. Tại vận tốc dòng vào này, thời gian lưu của nước thải trong mô hình đạt ~48 h. Hiệu quả xử lý nước thải trong mô hình được đánh giá thông qua phân tích các giá trị pH, hàm lượng sulfate và hàm lượng Fe^{2+} trong nước thải tại đầu ra sau bể số 3 (Hình 4). Có thể thấy rằng sau khi SRB trong bể sinh học đã ổn định hoạt tính khử sulfate, với thời gian lưu ~48 h nước thải sau khi qua mô hình xử lý loại được 74 – 77% sulfate và 85 – 88% Fe^{2+} .



Hình 4. Xử lý AMD kết hợp nước thải chăn nuôi trong mô hình bể sinh học khử sulfate vận hành liên tục với thời gian lưu của nước thải trong mô hình là 48 h.

Lượng sắt thấp nhất đo được ở nước thải đầu ra là 24 mg/L (hiệu suất xử lý đạt 88%), tuy nhiên vẫn còn cao hơn quy định đối với nước thải (5 mg/L theo QCVN40-2011). Theo các nghiên cứu đã công bố về xử lý AMD bằng bể sinh học khử sulfate, ngưỡng giới hạn cho hàm lượng kim loại (trong đó có Fe) trong nước thải đầu vào là rất cao, có thể tới > 1000 mg/L (Costa1, Duarte, 2005; Zugury *et al.*, 2006;). Như vậy ở đây không có hiện tượng ức chế SRB do hàm lượng kim loại nặng cao. Quá trình xử lý chưa đạt hiệu quả tối đa có thể là do (i) thiếu COD hoặc (ii) thời gian lưu của nước thải còn ngắn.

Ở các bể sinh học khử sulfate truyền thống dùng trong xử lý AMD, nguồn COD cho quá trình khử sulfate luôn được cung cấp ở mức dư từ phân trâu bò và rơm rạ (Zagury *et al.*, 2007); bên cạnh đó thời gian lưu của nước thải cũng thường rất dài (10 ngày đến 2 tuần) (Kieu Quynh Hoa *et al.*, 2003; Zugury *et al.*, 2006) để đảm bảo nước thải ra có hàm lượng kim loại nặng đạt mức quy định. Trong nghiên cứu này, SRB được làm giàu trước đó trong điều kiện thích hợp với AMD đã được sử dụng thay cho phân trâu bò để khởi động bể sinh học khử sulfate. Với cách

này, quá trình thích nghi và sinh trưởng của SRB đã được rút ngắn đáng kể, từ 3 – 4 tuần (Kieu Quynh Hoa *et al.*, 2003; Zagury *et al.*, 2007) xuống còn 4 ngày. Nghiên cứu cũng cho thấy, nguồn nước thải có hàm lượng hữu cơ cao như nước thải chăn nuôi có thể được kết hợp xử lý cùng với AMD cho hiệu quả cao và theo kinh nghiệm rút ra thì tỷ lệ phối trộn của nước thải này trong hỗn hợp đầu vào có thể được điều chỉnh cho phù hợp với hàm lượng kim loại nặng trong nước thải để đảm bảo hiệu suất xử lý đạt mức tối ưu.

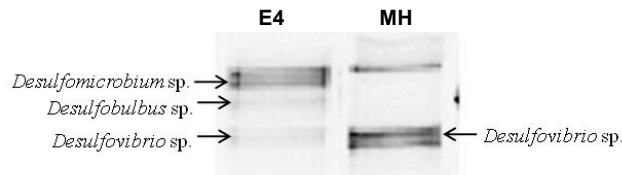
Phân tích thành phần SRB trong mẫu làm giàu và trong bể sinh học khử sulfate

Để có thể sử dụng quần xã SRB được tạo ra trong quá trình làm giàu cho bể sinh học khử sulfate một cách bền vững, thành phần vi khuẩn trong mẫu làm giàu E4 (lần cấy chuyên thứ tư) được phân tích dựa trên tính đa dạng của trình tự 16S rDNA phân tách trên gel điện di biến tính. Bên cạnh đó, quần xã vi khuẩn trong bùn bể sinh học khử sulfate (bể số 2 của mô hình xử lý) cũng được phân tích và so sánh với mẫu làm giàu (Hình 5).

Quá trình làm giàu đã tạo ra một quần xã vi khuẩn với một số nhóm chiếm ưu thế, thể hiện qua các băng đậm nét trên gel điện di biến tính. Cắt băng, tách DNA, giải trình tự và so sánh với ngân hàng dữ liệu GenBank cho thấy SRB thuộc các chi *Desulfomicrobium*, *Desulfobulbus* và *Desulfovibrio* chiếm ưu thế trong mẫu làm giàu E4. Cả ba chi này đều gồm các loài vi khuẩn có khả năng oxy hóa lactate, tuy nhiên theo hai hướng (i) oxy hóa không hoàn toàn (dừng lại ở acetate) như *Desulfovibrio* hoặc (ii) oxy hóa hoàn toàn (tới CO₂) như *Desulfomicrobium* và *Desulfobulbus*. Với thành phần SRB khá đa dạng theo như kết quả phân tích này, mẫu làm giàu E4 có tiềm năng tốt trong ứng dụng

cho bể sinh học khử sulfate để xử lý nước thải AMD.

Trong bể sinh học khử sulfate của mô hình xử lý, nhóm *Desulfovibrio* spp. tương tự như trong mẫu làm giàu E4 cũng được tìm thấy đóng vai trò chiếm ưu thế. SRB thuộc chi *Desulfovibrio* có khả năng thích nghi với các môi trường có các yếu tố lý hóa nằm trong biên độ dao động lớn, do vậy thường chiếm số đông và đóng vai trò quan trọng trong các hệ thống xử lý AMD (Doshi, 2006). Trong khi đó, các đại diện của *Desulfomicrobium*, *Desulfobulbus* spp. trong mẫu làm giàu E4 đã không thích nghi được với điều kiện vận hành của mô hình và không còn chiếm ưu thế trong bể sinh học khử sulfate.



Hình 5. Gel điện di biến tính (DGGE) biểu diễn thành phần vi khuẩn trong mẫu làm giàu E4 và bùn từ bể sinh học khử sulfate trong mô hình (MH) thông qua tính đa dạng của đoạn 16S rDNA.

KẾT LUẬN

Mô hình xử lý AMD kết hợp nước thải chăn nuôi bằng bể sinh học khử sulfate vận hành theo chế độ liên tục với thời gian lưu của nước thải là 48 h đạt hiệu suất xử lý 88% đối với thành phần Fe²⁺ trong nước thải. Hỗn hợp SRB gồm *Desulfovibrio*, *Desulfomicrobium*, và *Desulfobulbus* spp. tạo ra qua quá trình làm giàu từ nước thải chế biến thủy sản trong môi trường chứa lactate (10 mM) và sulfate (28 mM) làm chất cho và nhận điện tử duy nhất được dùng làm vi sinh khởi động cho bể sinh học khử sulfate, rút ngắn thời gian khởi động một cách đáng kể. Kết hợp xử lý nước thải chăn nuôi có hàm lượng chất hữu cơ cao với AMD theo công nghệ bể sinh học khử sulfate có thể khắc phục được đặc điểm thiếu hụt nguồn cacbon và năng lượng cho SRB sinh trưởng. Kết quả nghiên cứu này là tiền đề để triển khai công nghệ xử lý AMD kết hợp một cách linh hoạt với các nguồn nước thải/chất thải giàu hữu cơ khác để đạt hiệu quả cao, phù hợp với điều kiện ở nhiều khu vực khai thác mỏ gần nơi sinh hoạt của dân cư.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu được hỗ trợ kinh phí từ đề tài QG.15.33 của Đại học Quốc gia Hà Nội.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Cord-Ruwisch R, Widdel F (1986) Corroding iron as a hydrogen source for sulfate reduction in growing cultures of sulphate-reducing bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 25: 169-174.
- Costa1 MC, Duarte JC (2005) Bioremediation of acid mine drainage using acidic soil and organic wastes for promoting sulphate-reducing bacteria activity on a column reactor. *Water, Air, Soil Pollut* 165: 325-345.
- Doshi SM (2006) *Bioremediation of acid mine drainage using sulfate-reducing bacteria*. Research project - Final Report (funded by U.S. Environmental Protection Agency). Accessed at: https://clu-in.org/download/studentpapers/S_Doshi-SRB.pdf
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Kieu Thi Quynh Hoa, Petter Sottnik, Lai Thuy Hien, La Thi Lai, Joern Kasbohm (2003) The anaerobic lab-scale test of heavy metal wastewater treatment of the Van Chang Craft-settlement, Nam Dinh province. *J Geol B* 21: 66-71.
- Kiều Thị Quỳnh Hoa, Nguyễn Thanh Bình, Đặng Thị Yên, Vương Thị Nga (2013) Nâng cao hiệu quả loại bỏ chì trong nước thải ô nhiễm chì của hỗn hợp chủng vi khuẩn khử sulfate nội tại thu được từ nước thải ô nhiễm. *Tạp chí Sinh học* 35: 73-78.

- Gadd G (2004) Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. *Geoderma* 122: 109-119.
- Hồ Sỹ Giao, Mai Thế Toàn (2010) Những điểm nóng môi trường trong hoạt động khai thác mỏ ở Việt Nam. *Hội nghị khoa học kỹ thuật mỏ quốc tế 23 – 25/9/2010, Hạ Long, Việt Nam*.
- Logan MV, Reardon KF, Figueroa LA, McLain JE, Ahmann DM (2005) Microbial community activities during establishment, performance, and decline of bench-scale passive treatment systems for mine drainage. *Water Res* 39: 4537-4551.
- Muyzer G, De Waal EC, Utterlinden AG (1993) Profiling of complex microbial population by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 59: 695-700.
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-425.
- Sheoran AS, Sheoran V, Choudhary RP (2010) Bioremediation of acid-rock drainage by sulfate-reducing prokaryotes: A review. *Min Eng* 23: 1073-1100.
- Watzlaf G, Schroeder K, Kleinmann R, Kairies C, Nairn R (2003) The passive treatment of coal mine drainage. *US Department of Energy NETL*: 72.
- Widdel F, Bak F (1992) Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria. In *The Prokaryotes*, 2nd ed. Springer, Berlin Heidelberg New York: 3352-3378.
- Zagury GJ, Kulnieks VI, Neculita CM (2006), Characterization and reactivity assessment of organic substrates for sulphate-reducing bacteria in acid mine drainage treatment. *Chemosphere* 6: 944-954.
- Zagury GJ, Neculita C, Bussière B (2007) Passive treatment of acid mine drainage in bioreactors: Short review, applications, and reasearch needs. *Proceeding at the 60th Canadian Geotechnical Conference, Ottawa Canada, October 21-24, 2007*: 1439-1446.
- Zhou J, Bruns MA, Tiedje JM (1996) DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microbiol* 62: 316-322.

ELIMINATION OF IRON FROM ACIDIC MINE DRAINAGE (AMD) IN THE CO-TREATMENT WITH POULTRY WASTEWATER THROUGH A SULFATE-REDUCING BIOREACTOR

Nguyen Thi Hai, Dinh Thuy Hang✉

Institute of Microbiology and Biotechnology, Vietnam National University Hanoi

SUMMARY

Acid mine drainage (AMD) is contaminated water from mining industry, characterized by low pH (1 – 4) and high concentration of heavy metals (up to thousands ppm). AMD is highly toxic to aquatic life and soil ecology surrounding the mining areas, therefore should be treated adequately before discharging to the environment. The treatment technology based on sulfate-reducing bioreactors has been applying widely with high efficiency. Sulfate-reducing bacteria (SRB) stand at the central point of the technology, use hydrogen and organic carbons to reduce sulfate to sulfide, that involve in metal precipitation and pH neutralization. For establishing the technology, sources of SRB as well as organic substrates necessary for the bacteria should be acquired from outside. In many cases, these two requirements can be supplied from cow manure and agriculture residues (such as rice straws) added to the bioreactor before operating. In the present study, a mixed culture of SRB enriched from aquaculture-processing wastewater was used to start up the sulfate-reducing bioreactor for the AMD-treatment laboratory model. Cotreatment of AMD and poultry wastewater in this model operated under continuous mode with retention time of 48 h allowed to remove 85 – 88% Fe²⁺ in the AMD (from the original concentration of 200 mg/L). Study of the bacterial community via DGGE analyses of the 16S rDNA fragments showed that the enrichment culture consisted of three main SRB genera *Desulfovibrio*, *Desulfomicrobium* and *Desulfobulbus* spp., whereas in the sediment of the bioreactor only *Desulfovibrio* spp were found dominating. The obtained results would serve as basis for the development of biological-based technology to treat AMD together with organic-rich wastewater sources, suitable for mines located closely to residential areas.

Keywords: AMD, *Desulfovibrio*, heavy metal, sulfate reduction, SRB

✉ *Authors for correspondence:* Tel: +84-972523466; E-mail: dthang@vnu.edu.vn