

ĐỘNG HỌC CỦA QUÁ TRÌNH TẠO BIOGAS VÀ QUẦN THỂ METHANOGEN TRONG BỂ LÊN MEN KỶ KHÍ Ở NHIỆT ĐỘ CAO XỬ LÝ KẾT HỢP Bùn THẢI VÀ RÁC HỮU CƠ

Thái Mạnh Hùng¹, Tạ Mạnh Hiếu¹, Phạm Văn Ánh², Nguyễn Hữu Tuyên², Nguyễn Việt Anh², Đinh Thúy Hằng^{1*}

¹ Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, Đại học Quốc Gia Hà Nội

² Viện Khoa học và Kỹ thuật Môi trường, Đại học Xây dựng Hà Nội

TÓM TẮT

Bùn cặn và rác sinh hoạt là những nguồn thải hữu cơ đang gây ô nhiễm ở mức báo động tại các thành phố lớn như Hà Nội, thành phố Hồ Chí Minh. Trong nghiên cứu này, công nghệ lên men kỵ khí ở nhiệt độ cao (55°C) được lựa chọn để thử nghiệm kết hợp xử lý hai loại nguồn thải trên. Thí nghiệm được tiến hành trên hệ thống xử lý có dung tích 1000 L với nguồn thải nạp ban đầu là hỗn hợp bùn bể tự hoại và rác hữu cơ nghiền nhỏ theo tỷ lệ 1:1 (v:v).

Kết quả thí nghiệm cho thấy quá trình tạo khí sinh học đạt tỷ lệ CH₄ cao (trên 70%) sau khi điều kiện pH trong bể phản ứng được ổn định ở mức 7 – 7,2 và có sự hỗ trợ của nguồn vi sinh vật đã được thích nghi trước với cơ chất và điều kiện nhiệt độ cao. Sau 50 ngày vận hành, 80,7% COD trong nguồn thải đã được loại bỏ. Vi sinh vật sinh methane trong bể phản ứng tăng về mật độ theo thời gian và chuyển từ trạng thái có các loài sử dụng hydro chiếm ưu thế (như *Methanomicrobium*) ở thời kỳ đầu của quá trình xử lý sang trạng thái có các loài sử dụng acetate (như *Methanothrix*) chiếm ưu thế ở thời kỳ sau. Tỷ lệ methane sinh ra ở thời kỳ sau đạt mức 60 – 70%.

Những kết quả thu được từ nghiên cứu này là cơ sở khoa học cho việc kiểm soát quá trình phân hủy kỵ khí ở nhiệt độ cao cũng như triển vọng áp dụng của công nghệ này vào thực tế trong việc xử lý bùn bể tự hoại và rác hữu cơ để tận thu năng lượng và bảo vệ môi trường.

Từ khóa: Lên men kỵ khí ở nhiệt độ cao, PCR-DGGE, tận thu năng lượng, vi sinh vật sinh methane (methanogen), xử lý kết hợp bùn bể tự hoại và rác hữu cơ.

MỞ ĐẦU

Bùn cặn thu gom từ các bể tự hoại gia đình cũng như từ các hệ thống xử lý nước thải tập trung là một nguồn ô nhiễm cần phải xử lý, tuy nhiên lại chưa được quan tâm đúng mức ở nước ta hiện nay. Ở Hà Nội mỗi ngày có khoảng 300 m³ bùn cặn được thu gom từ các bể tự hoại, 300 m³ được nạo vét từ hệ thống thoát nước chung. Trong tương lai, sẽ có khoảng 3000 m³ bùn phát sinh từ các hệ thống xử lý nước thải tập trung – xử lý nước thải khu vực nội thành thành phố Hà Nội (Nguyễn Việt Anh, 2010) và con số này sẽ còn tăng lên đáng kể trong tương lai gần. Bên cạnh bùn cặn, rác thải hữu cơ cũng đang là vấn đề nổi cộm đối với môi trường đô thị. Tổng khối lượng chất thải rắn trong nội thành Hà Nội khoảng 2500 tấn/ngày, trong đó 61% là rác thải sinh hoạt và tỷ lệ thu gom đạt 90%. Một phần nhỏ rác thải được tái chế hay được xử lý bằng công nghệ ủ sinh học tại trạm Cầu Diễn, còn lại chủ yếu được chôn lấp, gây ô nhiễm nghiêm trọng cho môi trường không khí, đất, nước mặt và nước ngầm (Nguyễn Việt Anh, 2010).

Bùn cặn và rác sinh hoạt là các nguồn thải có hàm lượng hữu cơ cao, do vậy khả năng phân hủy kỵ khí để thu hồi khí sinh học, cũng như tái sử dụng bã thải làm phân bón trong nông nghiệp là rất lớn, vừa góp phần giải quyết vấn đề môi trường, vừa hỗ trợ nông nghiệp trong việc tiết kiệm sản xuất và nhập khẩu phân bón, đồng thời đóng góp vào việc cung cấp điện từ các nguồn năng lượng thay thế. Công nghệ xử lý kết hợp bùn và rác thải hữu cơ bằng phân hủy sinh học kỵ khí ở nhiệt độ cao lần đầu tiên được đưa vào thử nghiệm ở Việt Nam theo qui mô pilot trong dự án hợp tác giữa Viện Khoa học và Kỹ thuật Môi trường (IESE), trường Đại học Xây dựng Hà Nội và trường Đại học Tổng hợp Kỹ thuật Darmstad, CHLB Đức. Ưu điểm của công nghệ là xử lý được chất thải với hiệu suất cao, tận thu được năng lượng dưới dạng khí methane, tạo ít sinh khối phụ và giảm đáng kể các yếu tố gây bệnh trong chất thải trước khi đưa ra môi trường.

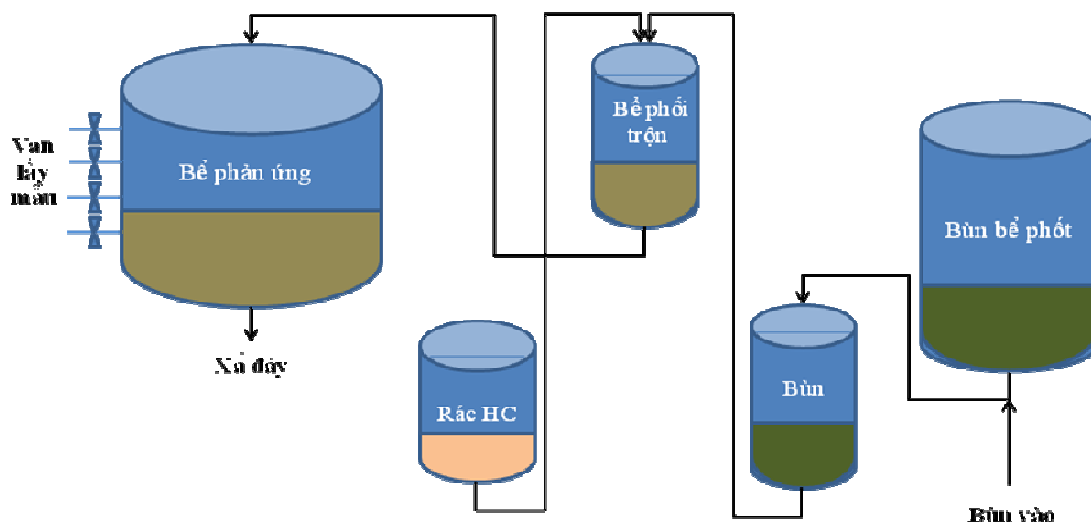
Trong nghiên cứu này, quá trình phân hủy tạo khí sinh học cũng như quần thể vi sinh vật sinh methane được xem xét ở khía cạnh động học về chuyển hóa vật chất và thay đổi thành phần loài vi sinh vật theo thời gian vận hành của bể phản ứng lên men kỵ khí xử

lý hỗn hợp bùn cặn và rác sinh hoạt ở điều kiện nhiệt độ cao, nhằm đưa ra những cơ sở khoa học ban đầu cho việc triển khai ứng dụng công nghệ vào thực tế trong tương lai gần.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Hệ thống pilot lên men kỵ khí ở nhiệt độ cao dung tích 1000 lít

Hệ thống lên men kỵ khí ở nhiệt độ cao dung tích 1000 lít do hãng Passavant-Roediger (CHLB Đức) sản xuất và lắp đặt tại Viện KH&KT Môi trường, ĐHXD Hà Nội (Hình 1). Hệ thống được vận hành bán tự động, cho phép kiểm soát chặt chẽ các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình phân hủy như chế độ nạp liệu, nhiệt độ, độ pH, dung tích và các thành phần trong pha khí của bể phản ứng.



Hình 1- Hệ thống pilot lên men kỵ khí ở nhiệt độ cao.

Nguyên liệu sử dụng cho thí nghiệm phân hủy gồm có bùn bể tự hoại, rác thải hữu cơ được xay nhuyễn. Bùn và rác được định lượng tương ứng ở hai bể riêng biệt theo tỷ lệ 1:1 (vol/vol), sau đó được trộn đều ở bể phối trộn. Trong một số trường hợp nước được bổ sung thêm vào hỗn hợp để đạt độ ẩm 97%. Từ bể phối trộn, hỗn hợp bùn và rác được bơm vào bể phản ứng, là một bể kỵ khí, có cánh khuấy và hệ thống gia nhiệt, ổn định nhiệt độ ở 55°C ($\pm 0,5^{\circ}\text{C}$).

Chế độ nạp liệu và vận hành hệ thống

Nguyên liệu được nạp theo mẻ với thể tích 700 lít (70% dung tích của bể phản ứng). Quá trình lên men được tiến hành ở nhiệt độ ổn định 55°C, pH 6,8 – 7,2 (điều chỉnh bằng NaHCO₃ và Na₂CO₃). Để rút ngắn thời gian ổn định quá trình phân hủy, nguồn vi sinh vật sinh methane lấy gốc từ bùn công qua thích nghi với cơ chất bùn/rác hữu cơ và nhiệt độ 55°C được bổ sung vào bể phản ứng (với mật độ tế bào 10⁶/ml) tại thời điểm pH đã ổn định ở mức >6. Lượng và thành phần khí tạo ra trong bể phản ứng (CO₂, CH₄, H₂S, O₂ và các khí khác) được xác định bằng các thiết bị đo khí tự động thiết kế gắn liền với bể phản ứng. Mẫu để phân tích các chỉ tiêu hóa học và vi sinh vật được thu từ bể phản ứng qua van thu mẫu ở mức 20 cm từ đáy bể sau mỗi 24 giờ vận hành.

Phân tích các yếu tố môi trường

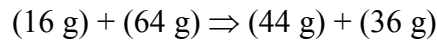
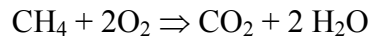
COD (Chemical Oxygen Demand, nhu cầu oxy hóa học): được xác định theo phương pháp TCVN 6491:1999.

VS (Votiled solids, chất rắn bay hơi) được xác định thông qua nung lượng chất rắn (TS) ở 55°C cho đến khi khối lượng không đổi (Greenberg *et al.*, 1995).

Tổng Nito được xác định bằng phương pháp Kjendahl, trong đó toàn bộ nitơ vô cơ và hữu cơ trong mẫu phân tích được chuyển về dạng ammonium bằng sử dụng axit sulphuric với chất xúc tác là K₂SO₄ ở nhiệt độ 420°C trong 30 phút. Lượng ammonium sau đó được xác định qua phương pháp chuẩn độ (Greenberg *et al.*, 1995).

Tổng Phospho được xác định bằng phương pháp sử dụng xanh molipden, trong đó toàn bộ phospho trong mẫu được chuyển về dạng PO₄³⁻ nhờ xử lý bằng hỗn H₂SO₄ đặc và HClO₄ dưới tác dụng của nhiệt độ. Phản ứng của PO₄³⁻ với Mo⁶⁺ sau đó tạo thành xanh-molipden, đo được ở bước sóng 725 nm, mức độ của màu tỷ lệ với hàm lượng phospho có trong mẫu phân tích (Greenberg *et al.*, 1995).

Xác định hiệu suất chuyển hóa (Sobotka *et al.*, 1983; Chernicharo, 2007): Khí methane sinh ra theo lý thuyết được xác định dựa trên lượng COD bị phân hủy:



Để oxy hóa hoàn toàn 1 mole CH_4 thành CO_2 và H_2O cần có 2 mole O_2 . Như vậy, cứ 16 g CH_4 được tạo ra và chuyển vào pha khí tương ứng với việc loại được 64 g COD từ nguồn thải. Trong điều kiện nhiệt độ và áp suất thường, công thức này cho phép ước tính 350 ml CH_4 tương ứng với mỗi gam COD bị phân hủy. Công thức chung để xác định lượng CH_4 có thể sinh ra theo lý thuyết như sau:

$$V_{\text{CH}_4} = \frac{\text{COD}_{\text{CH}_4}}{K(t)}$$

trong đó: V_{CH_4} = thể tích methane tạo thành (L)

COD_{CH_4} = lượng COD nạp được chuyển hóa thành methane (gCOD)

$K(t)$ = hệ số hiệu chỉnh dành cho nhiệt độ vận hành của bể phản ứng (gCOD/L)

$$K(t) = \frac{P.K}{R.(273 + T)}$$

Trong đó: P = áp suất khí quyển (1 atm)

K = COD tương ứng với 1 mole CH_4 (64 g COD/mole)

R = hằng số khí (0,08206 atm·L/mole·°K)

T = Nhiệt độ vận hành của bể phản ứng (°C)

Xác định mật độ vi sinh vật sinh methane bằng quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang

Do chứa coenzyme F_{420} , tế bào của nhiều loài vi sinh vật sinh methane có đặc tính tự phát sáng dưới ánh đèn huỳnh quang. Mức độ phát sáng thường tỷ lệ với hoạt tính sinh học của tế bào, tuy nhiên mức độ này cũng giảm rất nhanh khi tế bào bị phơi ra ánh sáng (Dolfing, Mulder, 1985; Gorris *et al.*, 1988). Mặc dù vậy, qua quan sát mẫu bùn dưới kính hiển vi huỳnh quang để phát hiện các tế bào tự phát sáng, người ta có thể đánh giá được một cách định tính trạng thái hoạt động của vi sinh vật sinh methane trong bể phản ứng.

Để quan sát được hiện tượng này, mẫu bùn tươi được nhỏ trực tiếp lên màng nitrocellulose (kích thước lỗ 0,2 μm) đặt trên giấy lọc để thấm khô, sau đó quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang qua kính lọc bước sóng 461 nm.

Tách DNA tổng số

DNA tổng số của quần thể vi sinh vật từ các mẫu bùn được tách chiết trực tiếp theo phương pháp do Zhou và đồng tác giả (1996) mô tả với cải biến về nồng độ đệm phosphate (120 mM) và nồng độ proteinase K ($14 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$).

Phân tích PCR-DGGE gen 16S rDNA

DNA tổng số tách chiết trực tiếp từ các mẫu bùn được sử dụng làm khuôn trong phản ứng khuếch đại các đoạn gen 16S rDNA với cặp mồi đặc hiệu đối với cổ khuẩn 0348aF (TCCAGGCCCTACGGG) và 0691R (GGATTACARGATTCAC) (Wanatabe *et al.*, 2004). Để ổn định mức di chuyển của các đoạn gen trong phân tích DGGE, kẹp GC (Muezer *et al.*, 1993) được gắn vào đầu 5' của mồi xuôi 0348aF.

Hỗn hợp phản ứng PCR gồm 1 μl mồi xuôi và mồi ngược (nồng độ 50 pmol/ μl), 5.0 U Taq-polymerase (Fermentas), 5 μl đệm $10\times$ (chứa 20 mM Mg^{2+}), 5 μl hỗn hợp dNTP (2,5 mM mỗi loại), 3 μl DNA khuôn (khoảng 300 pg) và bổ sung nước tới thể tích 50 μl . Phản ứng khuếch đại được thực hiện trên thiết bị Mastercycler (Eppendorf, Đức) qua 30 chu trình nhiệt (gồm biến tính ở 94°C trong 1 phút, gắn mồi ở 49°C trong 1 phút, kéo dài chuỗi ở 72°C trong 2 phút) và bước kéo dài cuối cùng ở 72°C trong 8 phút.

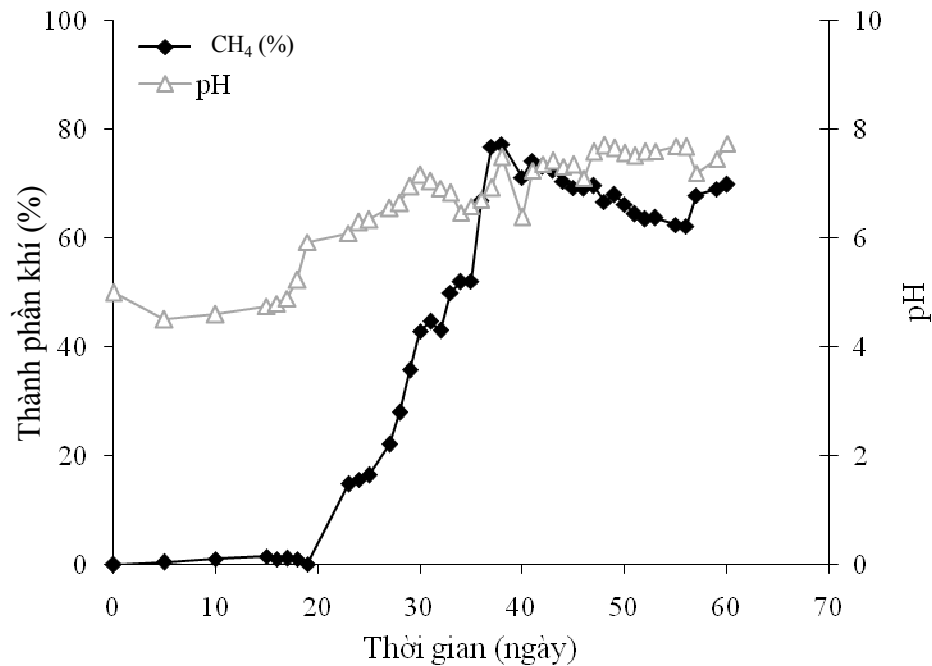
Sản phẩm PCR có độ dài 350 bp được phân tách bằng điện di biến tính (DGGE) tiến hành trên gel polyacrylamide 8% trong đệm TAE với độ biến tính (urea/formamid) là 25 – 60%. Điện di được thực hiện trên máy D-Code (Bio-Rad, Mỹ) trong đệm TAE tại nhiệt độ ổn định 60°C, hiệu điện thế 100V trong thời gian 16 giờ. Gel polyacrylamide sau đó được nhuộm trong dung dịch ethidium bromide (5 mg/ml) trong 30 phút, rửa nước trong 5 phút và chụp ảnh trên bàn chiếu tia UV sử dụng máy Gel-Doc (Bio-Rad, Mỹ).

Các băng chính được cắt, thổi gel trong nước, khuếch đại, tinh sạch và giải trình tự trên máy tự động 3110 Avant Applied Biosystems (ABI, Mỹ). 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 công cụ BLAST Search.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Nạp liệu và ổn định điều kiện lên men

Hỗn hợp bùn cặn và rác hữu cơ (tỷ lệ 1:1, v:v) được đưa vào bể phản ứng theo mẻ 700 L, quá trình lên men diễn ra ở 55°C. Trong 2 tuần đầu, do hoạt động của quá trình thủy phân và lên men sinh acid, pH trong bể phản ứng giảm mạnh, xuống tới mức 4,5. Trong thời gian này kết quả từ thiết bị đo khí tự động cũng cho thấy hoàn toàn chưa có methane được sinh ra, chứng tỏ nhóm methanogen còn chưa bắt đầu hoạt động (Hình 2). Để tạo điều kiện thuận lợi cho methanogen sinh trưởng, pH trong bể được điều chỉnh về 6 – 6,2 bằng các dung dịch NaHCO_3 và Na_2CO_3 , sau đó nguồn methanogen đã thích nghi trước đó với cơ chất và nhiệt độ cao được bổ sung vào bể phản ứng.

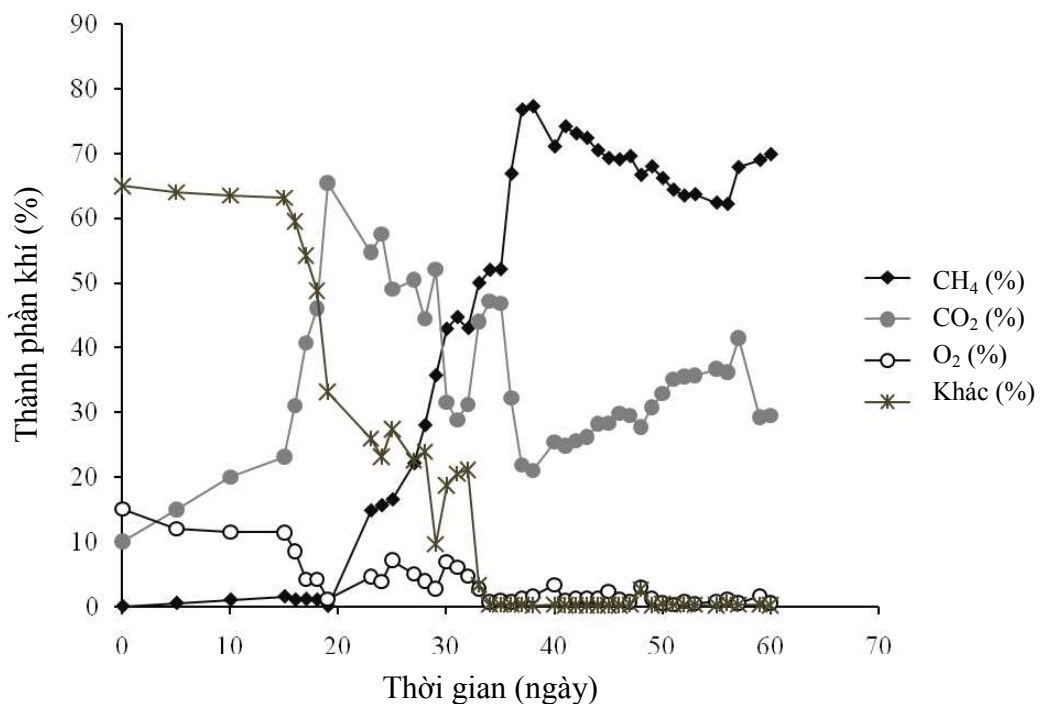


Hình 2- Điều kiện pH và quá trình sinh CH_4 trong bể phản ứng kỵ khí ở nhiệt độ 55°C

Theo đồ thị ở hình 2, khí methane bắt đầu được sản sinh khi pH trong môi trường đạt mức ≈ 6 . Cần lưu ý là trong các hạt bùn vi sinh vật sinh methane được bảo vệ bởi vi khuẩn ở các lớp ngoài, do vậy pH thực tế trong vi môi trường cận kề nhóm vi sinh vật này thường cao hơn so với pH đo được trong bể phản ứng (Bitton, 1999; Chernicharo, 2007).

Xác định thành phần khí sinh học

Thành phần khí biogas tạo ra trong bể phản ứng (Hình 3) cho thấy điều kiện kỵ khí cho quá trình lên men được đảm bảo và khí tạo ra chủ yếu gồm CO₂ và CH₄. Có thể thấy rằng đường cong khí CO₂ và đường cong khí methane là 2 đường cong gần đối xứng qua trục ngang 45% khí (Hình 3), thể hiện mối tương quan giữa nhóm methanogen sử dụng H₂ (như *Methanobacterium*, *Methanomicrobium*) và nhóm methanogen sử dụng acetate (như *Methanotrrix*, *Methanosarcina*) trong bể phản ứng thay đổi theo thời gian xử lý.



Hình 3. Thành phần khí biogas tạo ra trong bể phản ứng theo thời gian

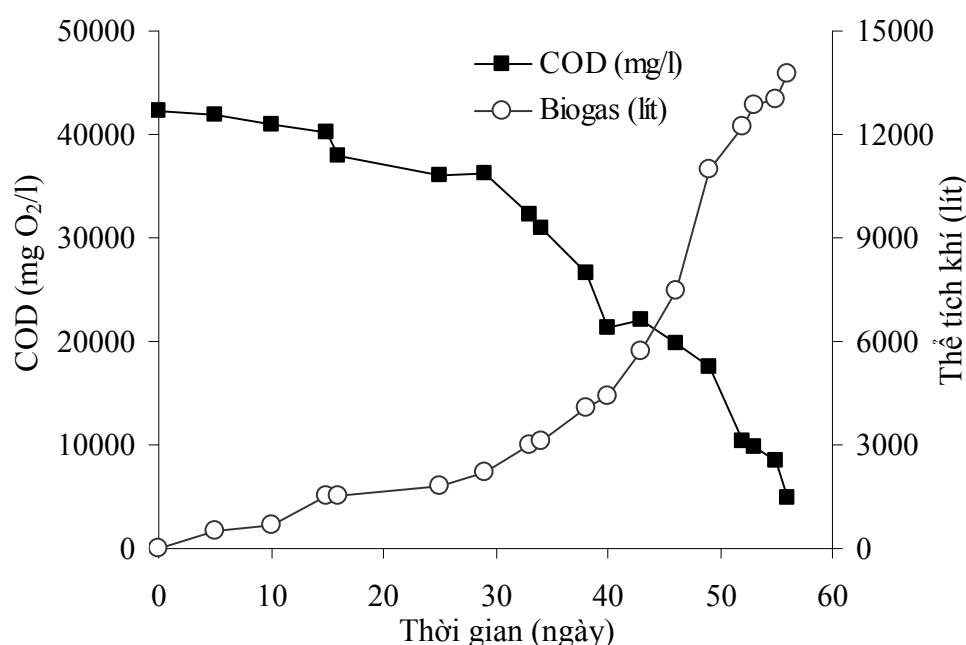
Trong 20 ngày đầu thành phần khí CO₂ liên tục tăng, trong khi đó CH₄ chưa xuất hiện phản ánh quá trình lên men sinh acid và điều kiện pH thấp trong bể phản ứng. Trong 20 ngày tiếp theo, % CO₂ giảm và % CH₄ tăng (theo tỷ lệ gần tương đương), chứng tỏ nhóm methanogen sử dụng H₂ chiếm ưu thế, sử dụng CO₂ để sản sinh CH₄ (theo phương trình phản ứng $\text{CO}_2 + \text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$). Trong pha tiếp sau, từ ngày 40 đến ngày 60, % CH₄ trong khí tạo ra giảm và % CO₂ tăng (tỷ lệ tương đương), chứng tỏ nhóm sử dụng

acetate đã chiếm ưu thế, tạo CO₂ từ phản ứng sinh CH₄ (theo phương trình phản ứng CH₃COOH → CH₄ + CO₂), theo đúng quy luật của bể lên men kỵ khí (Chernicharo, 2007).

Từ ngày thứ 60 trở đi, xu hướng tăng của nhóm sử dụng H₂ lại bắt đầu (tỷ lệ CH₄ tăng và tỷ lệ CO₂ giảm), tuy nhiên tổng thể tích khí sinh ra giảm dần, chứng tỏ quá trình lên men đã đi vào giai đoạn cuối.

Hiệu suất chuyển hóa COD

Tổng thể tích khí tạo ra tăng đều theo thời gian, song song theo đó COD của nguyên liệu thải trong bể xử lý giảm dần (Hình 4).



Hình 4. Chuyển hóa COD thành biogas (CO₂ và CH₄) trong bể phản ứng kỵ khí

Theo lý thuyết, trong quá trình lên men kỵ khí, khoảng 70 – 90% COD được chuyển hóa thành CH₄, tùy thuộc bản chất nguồn nguyên liệu cần xử lý (Bitton, 1999; Chernicharo, 2007). Trên cơ sở thể tích khí thu được và kết quả phân tích COD trong hỗn hợp bùn bể tự hoại và rác hữu cơ ở thời điểm ban đầu và thời điểm sau 50 ngày xử lý (Bảng 1), hiệu suất loại bỏ COD trong thí nghiệm đạt 80,7% (cách tính được trình bày ở phần vật liệu và phương pháp), là tỷ lệ khá cao đối với các hệ xử lý kỵ khí tạo biogas.

Bảng 1. Thành phần hóa học của nguyên liệu thải trong bể phản ứng

Tên Mẫu	Các chỉ tiêu hóa học				
	COD (mg O ₂ /l)	VSS (mg/l)	N tổng số (mg/l)	P tổng số (mg/l)	Thể tích khí (lít)
Bùn bể tự hoại	14500	1916	1751,3	863,6	0
Rác hữu cơ	118450	111420	769,5	916,8	0
Hỗn hợp bùn/rác (tỷ lệ 1:1) ban đầu	48175 (33,722 kg)	28908	413	261	0
Hỗn hợp bùn/rác (tỷ lệ 1:1) sau 50 ngày	8460 (5,922 kg)	3952	409	96,4	8729 (70% CH ₄)

Chú thích: Giá trị biểu hiện trong ngoặc ở cột COD đối với mẫu hỗn hợp bùn/rác ở thời điểm ban đầu và sau 50 ngày xử lý là tổng lượng COD tính cho toàn bộ thể tích nguyên liệu (700 lít). Thể tích khí là thể tích thực ghi được trên thiết bị đo khí tại bể phản ứng.

Các kết quả phân tích hóa học thực hiện đối với nguyên liệu nạp ban đầu (Bảng 1) cho thấy tỷ lệ dinh dưỡng trong bể phản ứng là COD:N:P = 158:1,18:1, tức là nitơ bị thiếu hụt (hay nói cách khác là lượng cacbon trong nguyên liệu quá cao) để quá trình phân hủy có thể diễn ra một cách tối ưu. Theo Chernicharo (2007) thì tỷ lệ tối ưu cho các quá trình lên men kỵ khí đối với các nguồn thải giàu hydratcarbon như trong thí nghiệm này là COD:N:P = 350:5:1.

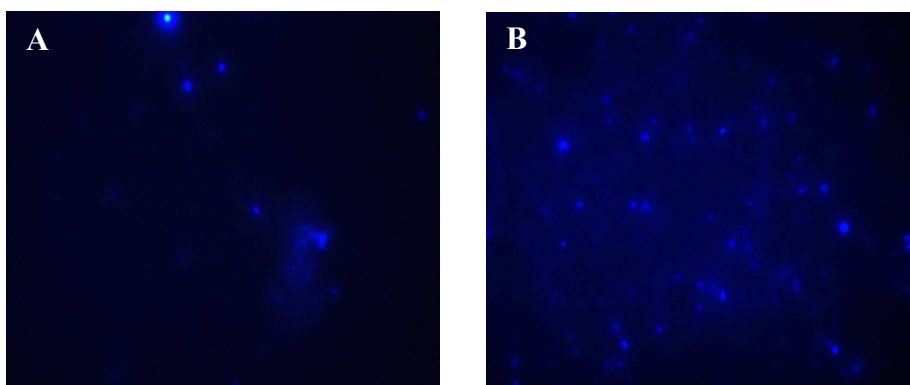
Có thể thấy mặc dù quá trình tạo khí biogas trong thí nghiệm vẫn diễn ra ổn định với hiệu suất khá cao và cho tỷ lệ methane trong biogas cao, tuy nhiên kết quả có thể sẽ còn tốt hơn nếu điều chỉnh được lượng dinh dưỡng trong nguyên liệu nạp theo tỷ lệ tối ưu dành cho quá trình lên men kỵ khí. Các biện pháp điều chỉnh có thể là bổ sung nguồn nitơ vô cơ vào bể phản ứng (Akunna *et al.*, 1992; Bitton, 1999), điều chỉnh tỷ lệ phối trộn giữa bùn bể tự hoại (thường có hàm lượng nitơ cao) và rác hữu cơ (thường có hàm lượng cacbon cao) (Bảng 1) để đạt tỷ lệ dinh dưỡng mong muốn, vv...

Biến đổi về số lượng và cấu trúc quần thể vi sinh vật sinh methane trong bể phản ứng

Lên men kỵ khí có thể được coi như một hệ sinh thái, trong đó nhiều nhóm vi sinh vật cùng tham gia chuyển hóa các hợp chất hữu cơ phức tạp thành các sản phẩm cuối cùng như CH₄, CO₂, H₂S, H₂O và NH₄ cùng với sinh khối vi sinh vật. Toàn bộ quá trình có thể

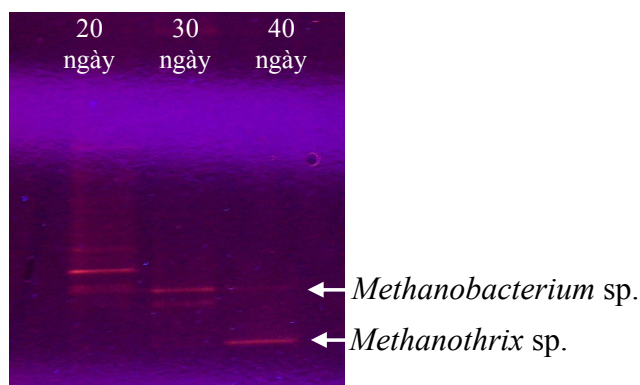
được phân chia thành nhiều bước trao đổi chất khác nhau với sự tham gia của bốn nhóm vi sinh vật chính là (i) nhóm thủy phân, (ii) nhóm lên men sinh acid, (iii) nhóm sinh acetate và (iv) nhóm sinh methane. Các nhóm vi sinh vật này hoạt động dựa trên mối quan hệ cộng sinh phụ thuộc vào hoạt tính sinh học cũng như sản phẩm trao đổi chất của nhau (Archer, Kirsop, 1991), trong đó methanogen là nhóm cuối cùng quyết định tốc độ xử lý của toàn bộ hệ thống. Tình trạng của quần thể methanogen (thể hiện qua số lượng và thành phần loài) có thể phản ánh tình trạng hoạt động của bể phản ứng.

Quan sát mẫu bùn dưới kính hiển vi huỳnh quang (coenzyme F₄₂₀ của methanogen) cho thấy tập đoàn methanogen đã được thiết lập và tồn tại bền vững trong bể phản ứng ở thời điểm hàm lượng CH₄ trong biogas đạt 50 – 60% (Hình 5B) so với thời điểm ban đầu khi CH₄ chưa được sinh ra (Hình 5A).



Hình 5- Thay đổi mật độ tế bào methanogen trong bể phản ứng theo thời gian (quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang). A- thời điểm xuất phát (0% CH₄); B-sau 4 tuần (30% CH₄)

Về cấu trúc, quần thể methanogen trong bể phản ứng cũng biến đổi tương ứng theo thời gian vận hành (Hình 6). Có thể thấy rằng methanogen sử dụng hydro (*Methanobacterium* sp.) có mặt trong bể phản ứng từ khi methane mới bắt đầu được tạo ra (thời điểm 20 ngày), tuy nhiên số lượng lại giảm dần trong những ngày sau đó (bằng mờ ở thời điểm 40 ngày). Ngược lại, nhóm methanogen sử dụng acetate (*Methanothrix* sp.) mặc dù xuất hiện trong bể phản ứng muộn hơn (thời điểm 30 ngày) nhưng lại được củng cố về số lượng theo thời gian (bằng rõ nét ở thời điểm 40 ngày).



Hình 6. Phân tích cấu trúc tập đoàn methanogen trong bể phản ứng theo thời gian bằng điện di biến tính gen 16S rDNA. Các thời điểm phân tích 20, 30 và 40 ngày. Các băng điện di chính (mũi tên chỉ) được cắt, giải trình tự và so sánh với ngân hàng dữ liệu.

Kết quả này hoàn toàn phù hợp với kết quả phân tích thành phần khí CO₂ và CH₄ trong biogas đã trình bày ở trên. Theo một số nghiên cứu, *Methanothrix* là nhóm methanogen thường xuất hiện trong các quá trình sinh methane ở nhiệt độ cao (Zinder *et al.*, 1984; Henson *et al.*, 1989), trong khi đó ở nhiệt độ ấm (30 – 37 °C) *Methanosarcina* lại là nhóm chiếm ưu thế (Archer, Kirsop, 1991; Steinberg, Regan, 2008). Đáng chú ý là trong quá trình tạo khí sinh học, trên 70% lượng methane sinh ra là do các nhóm sử dụng acetate như *Methanosarcina* hay *Methanothrix* đảm nhiệm (Archer, Kirsop, 1991; Bitton, 1999).

Như vậy, thông qua các phân tích về số lượng và thành phần methanogen trong bể phản ứng có thể nhận biết được tình trạng vận hành (ổn định hay không ổn định, đang ở giai đoạn nào của quá trình phân hủy) của bể. Lần đầu tiên trong nghiên cứu này động học của nhóm methanogen trong bể phản ứng kỵ khí được sử dụng như yếu tố chỉ thị để theo dõi quá trình vận hành của bể.

KẾT LUẬN

Lên men kỵ khí ở nhiệt độ cao đã được thử nghiệm thành công trong bể phản ứng 1000 lít đối với hỗn hợp bùn bể tự hoại và rác thải hữu cơ nghiền nhỏ (theo tỷ lệ thể tích 1:1), với sự hỗ trợ từ nguồn vi sinh vật sinh methane đã được thích nghi trước với điều kiện lên men (cơ chất và nhiệt độ cao) cùng với việc điều chỉnh pH. Tỷ lệ methane trong khí sinh học đã tăng đều sau 2 tuần và đạt mức ổn định 60 – 70% sau 5 tuần vận hành. Hiệu suất xử lý của

bể đạt 80,7%, là giá trị khá cao đối với các quá trình xử lý kỵ khí. Mật độ của methanogen trong bể phản ứng tăng dần theo thời gian, thành phần cũng chuyển dần từ những loài sử dụng hydro (như *Methanomicrobium*) ở giai đoạn đầu sang các loài sử dụng acetate (như *Methanotrix*) ở giai đoạn sau của quá trình xử lý. Những kết quả thu được rất có ý nghĩa, cho thấy khả năng kiểm soát được quá trình xử lý, cũng như triển vọng áp dụng công nghệ lên men kỵ khí ở nhiệt độ cao vào xử lý bùn cặn và rác hữu cơ, hiện đang là vấn đề nan giải tại các đô thị lớn ở nước ta.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện trong khuôn khổ Dự án hợp tác quốc tế ”Nghiên cứu giải pháp xử lý tổng hợp chất thải ở quy mô bán tập trung ở các đô thị Việt Nam. Ví dụ điển hình ở thành phố Hà Nội (Semi-San)”, do Bộ KH&CN Việt Nam và Bộ GD&NC Đức BMBF tài trợ. Các tác giả xin trân trọng cảm ơn Viện KH&KT Môi trường, Đại học Xây dựng đã tạo điều kiện cho tiến hành các nghiên cứu và Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, ĐHQGHN đã tạo điều kiện về cơ sở vật chất trong quá trình thực hiện các phân tích vi sinh vật.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Akunna JC, Bizeau C, Moletta R (1992) Denitrification in anaerobic digester: possibilities and influence of wastewater COD/N-Nox ratio. *Environ Technol* 13: 825 – 836.
- Archer DB, Kirsop BH (1991) The microbiology and control of anaerobic digestion, p. 43 – 91. In: *Anaerobic digestion: a waste treatment technology*, Wheatly A (Ed) Elsevier Applied Science, London, UK.
- Bitton G (1999) *Wastewater microbiology*. John Wiley & Sons, New York, USA.
- Chernicharo CAL (2007) *Anaerobic reactors*. IWA Publishing, London, UK.
- Dolfing J, Mulder JW (1985) Comparison of methane production rate and coenzyme F₄₂₀ content of methanogenic consortia in anaerobic granular sludge. *Appl Environ Microbiol* 49: 1142 – 1145.

Gorris LG, Kok TM, Kroon BM, Drift C, Vogels GD (1988) Relationship between methanogenic cofactor content and maximum specific methanogenic activity of anaerobic granular sludges. *Appl Environ Microbiol* 54: 1126 – 1130.

Greenberg AE, Clesceri LS, Eaton AD, Franson MAH (Ed) (1995) *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 19th Edition. American Public Health Association, Washington DC.

Henson JM, Smith PH, White DC (1989) Examination of thermophilic methane-producing digesters by analysis of bacterial lipids. *Appl Environ Microbiol* 50: 1428 – 1433.

Muezer 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 rARN. *Appl Environ Microbiol* 59: 695-700.

Nguyễn Việt Anh (2010) Giải pháp thu gom và xử lý chất thải tổng hợp theo mô hình bán tập trung cho các đô thị Việt Nam. Báo cáo tại hội thảo “*Quản lý tổng hợp chất thải đô thị. Nghiên cứu điển hình ở Hà Nội*”, Hà Nội 21/11/2010.

Sobotka M, Votruba J, Havlik I, Minkevich IG (1983) The mass-energy balance of anaerobic methane production. *Folia Microbiol* 28: 195 – 204.

Steinberg LM, Regan JM (2008) Phylogenetic comparison of methanogenic communities from an acidic, oligotrophic fen and an anaerobic digester treating municipal wastewater sludge. *Appl Environ Microbiol* 74: 6663 – 6671.

Wanatabe T, Akasawa S, Nakamura A, Nagaoka K, Kimura M (2004) DGGE method for analyzing 16S rDNA of methanogenic archaeal community in paddy field soil. *FEMS Microbiol Lett* 232:153 – 163.

Zhou J, Bruns MA, Tiedje JM (1996) DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microbiol* 62: 316 – 322.

Zinder SH, Cardwell SC, Anguish T, Lee M, Koch M (1984) Methanogenesis in a thermophilic (58 °C) anaerobic digester: *Methanotherix* sp. as an important aceticlastic methanogen. *Appl Environ Microbiol* 47: 796 – 807.

DYNAMICS OF BIOGAS PRODUCTION AND METHANOGENIC POPULATION IN THE THERMOPHILIC ANAEROBIC DIGESTER FOR CO-TREATMENT OF SLUDGE AND ORGANIC WASTE

Thai Manh Hung¹, Ta Manh Hieu¹, Pham Van Anh², Nguyen Huu Tuyen², Nguyen Viet Anh², Dinh Thuy Hang^{1*}

¹ *Institute of Microbiology and Biotechnology, Vietnam National University Hanoi*

² *Institute of Environmental Science and Engineering (IESE), Hanoi University of Civil Engineering*

* **Corresponding author:** Tel. +84 972 523 466 E-mail: dthang@vnu.edu.vn

SUMMARY

Sludge and organic solid waste are significant pollutant sources that cause much concern in big cities such as Hanoi and Ho Chi Minh city. In this study, thermophilic anaerobic digestion at 55°C was chosen for co-treatment of the above two types of wastes. The experiment was carried out in a 1000-L volume reactor fed with a mixture of septic sludge and organic waste at 1:1 ratio (vol/vol).

The obtained results showed that the produced biogas contained high ratio of CH₄ (above 70%) as soon as pH in the reactor was stabilized at 7 – 7.2 and microbial seeding previously adapted to the fermentation conditions was added. After 50 days of operation, 80,7% of COD from the waste was removed. Density of methanogens in the reactor increased over the time, and the methanogenic community changed from that dominated by hydrogenotrophic species (such as *Methanomicrobium*) at early stages of the treatment to that dominated by acetoclastic species (such as *Methanotherix*) at later stages. The ratio of methane in biogas at later stages of the digestion reached 60 – 70%.

Output from the present study would serve as the scientific arguments for control of anaerobic digestion process, as well as for potential application of thermophilic anaerobic digestion in the treatment of sludge and organic solid waste, aiming at energy production and environmental protection in the near future.

Keywords: Thermophilic anaerobic fermentation, methanogens, energy recovery, PCR-DGGE