

NGHIÊN CỨU CỐ ĐỊNH VI SINH VẬT BẰNG CANXI ALGINAT ỨNG DỤNG TRONG CẢM BIẾN SINH HỌC XÁC ĐỊNH NHANH NHU CẦU OXY SINH HÓA

LÊ THỊ BẢO NGỌC ⁽¹⁾, HUỖNH THỊ KIM TRANG ⁽¹⁾, DƯƠNG HUỖNH THANH LINH ⁽¹⁾,
NGUYỄN THỊ THÙY VÂN ⁽¹⁾, HOÀNG TIẾN CƯỜNG ⁽¹⁾,
NGUYỄN PHÚC HOÀNG DUY ⁽¹⁾, PHẠM THỊ THÙY PHƯƠNG ^(1, 2)

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong thời gian gần đây, việc ứng dụng vi sinh vật nhằm giải quyết các vấn đề về môi trường đã không còn xa lạ. Tuy nhiên, do cấu tạo đơn giản của các vi sinh vật nên chúng rất dễ bị ảnh hưởng bởi các tác động từ bên ngoài như pH, nhiệt độ, độc tính,... Nhiều nghiên cứu cho thấy việc cố định các tế bào vi sinh vật lên giá thể mang lại nhiều lợi ích như tăng nồng độ và hoạt độ của vi sinh vật, nhờ đó tăng 60% hiệu quả loại bỏ các chất ô nhiễm trong nước [1], bảo vệ vi sinh vật khỏi tác động tiêu cực của môi trường, và có thể tái sử dụng vi sinh cố định nhiều lần [2]. Chính vì vậy, vi sinh vật cố định đã được nghiên cứu và ứng dụng rất nhiều trong việc xử lý các loại nước thải chứa độc tính cao như xyanua, kim loại nặng, nước thải dệt nhuộm [3]... Các phương pháp cố định hiện được sử dụng bao gồm hấp phụ, liên kết cộng hóa trị, kết dính và nhốt vi sinh trong mạng lưới polyme [4].

Trong lĩnh vực quan trắc môi trường, nhu cầu oxy hóa học (COD - chemical oxygen demand) và nhu cầu oxy sinh hóa (BOD - biochemical oxygen demand) là hai chỉ số không thể thiếu để đánh giá mức độ ô nhiễm và khả năng tự làm sạch của nguồn nước. Hiện tại, có nhiều thiết bị trên thị trường cho phép xác định nhanh COD, trong khi đó, phương pháp xác định BOD₅ truyền thống, vốn sử dụng vi sinh vật tự do, có thời gian phân tích lên đến 5 ngày khiến cho việc quan trắc chỉ tiêu này theo thời gian thực là không thể. Trong các nghiên cứu trước đây, đã sử dụng vi sinh vật cố định trên giá thể trợ ứng dụng trong cảm biến sinh học nhằm dự đoán nhanh giá trị BOD₅ [4, 5]. Việc cố định vi sinh vật bằng cách hấp phụ lên giá thể trợ có nhiều ưu điểm như quy trình đơn giản, giá thể dễ mua và rẻ tiền. Ngược lại, nhược điểm chính của phương pháp này là thời gian cố định vi sinh vật có thể kéo dài đến vài ngày. Bên cạnh đó, việc cố định vi sinh vật bằng phương pháp này nhìn chung thường dẫn đến tính ổn định kém bởi sự giải hấp và sự sinh trưởng quá mức của vi sinh vật [6]. Do đó, hoạt động trong thời gian dài có thể dẫn đến nhiễm bẩn đường ống và lớp màng trên đầu dò DO khiến cho tín hiệu không ổn định. Những hạn chế này có thể được khắc phục bằng phương pháp nhốt vi sinh vật trong mạng lưới polyme. Polyme thường được sử dụng trong việc cố định vi sinh vật là alginat do đây là polyme có độ bền cơ học cao nên hạn chế được tình trạng thất thoát tế bào vi sinh vật. Thêm vào đó, hệ số khuếch tán qua màng alginat gần bằng nước nên không ảnh hưởng đến quá trình trao đổi chất của vi sinh vật khi kích thước hạt đủ nhỏ [7]. Ngoài ra, alginat có thể chuyển đổi từ dạng lỏng sang gel và ngược lại mà không phụ thuộc vào nhiệt độ [8].

Điều này khiến cho quá trình cố định dễ thực hiện, tuy nhiên, cũng là nguyên nhân làm cho hạt canxi alginat không bền trong quá trình hoạt động. Trong nghiên cứu này, các yếu tố ảnh hưởng đến hoạt động của vi sinh vật cố định trong hạt alginat như kích thước hạt, điều kiện bảo quản được khảo sát nhằm nâng cao hiệu quả của vi sinh vật cố định ứng dụng trong cảm biến sinh học dự đoán nhanh giá trị BOD₅ của nước thải sản xuất giấy.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

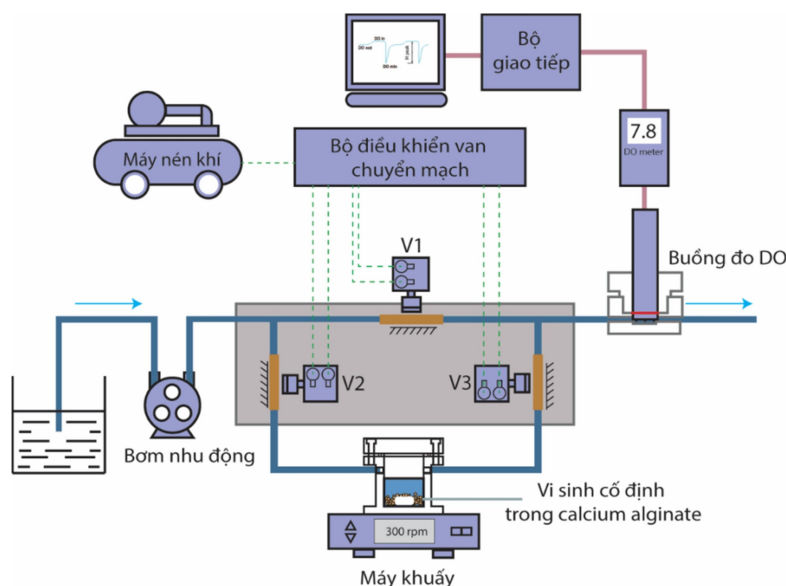
2.1. Phương pháp cố định vi sinh vật trong canxi alginat

Quần thể vi sinh vật lấy từ bể sinh học hiếu khí tại trạm xử lý nước thải Công ty TNHH Sản xuất Thương mại giấy Thiên Trí (huyện Hóc Môn, thành phố Hồ Chí Minh) và được cố định trong canxi alginat [9]. Nước bùn sau khi lấy về để lắng, phần bùn đáy được thu lại và trộn với nước cất tỷ lệ 1:1 sau đó được bổ sung 1,5% natri alginat (SA) (Sigma-Aldrich); 0,2% xanthan gum (HiMedia). Trong đó, xanthan gum được thêm vào giúp ổn định cấu trúc gel, tăng hiệu suất đóng gói bằng cách tạo liên kết H giữa các phân tử với SA [10]. Sau đó, hỗn hợp trên được cho vào xy lanh 20 mL và được cho nhỏ giọt với tốc độ 0,5 mL/phút bằng thiết bị bơm xy lanh tự động vào dung dịch CaCl₂ (Sigma-Aldrich) 2%. Dung dịch CaCl₂ sẽ được khuấy liên tục bằng máy khuấy từ với tốc độ 300 vòng/phút, lớp màng canxi alginat được tạo thành ngay khi hai dung dịch tiếp xúc với nhau. Hạt canxi alginat vừa tạo thành sẽ được khuấy thêm 30 phút trong dung dịch CaCl₂ 2% để ổn định cấu trúc của hạt. Rửa sạch hạt canxi alginat bằng nước cất hai lần và bảo quản chúng ở nhiệt độ 4 °C ± 2 °C trong dung dịch CaCl₂.

2.2. Hệ cảm biến sinh học

Dung dịch GGA (glucose glutamic acid) thường được sử dụng làm dung dịch chuẩn trong các cảm biến sinh học ứng dụng đo BOD [11] cũng được sử dụng làm chất chuẩn trong nghiên cứu này. Dung dịch gốc GGA có giá trị BOD₅ 200 mg/L được tạo thành bằng cách thêm 150 mg D-glucose (HiMedia, Ấn Độ) và 150 mg glutamic acid (HiMedia, Ấn Độ) vào 1 L nước cất hai lần. Sau đó, các dung dịch thử nghiệm được tạo thành bằng cách pha loãng dung dịch gốc với nước uống khoáng Vĩnh Hảo để hạn chế ô nhiễm chất hữu cơ và để đảm bảo áp suất thẩm thấu thích hợp cần thiết cho hoạt động ổn định của tế bào vi sinh vật [12].

Hệ cảm biến sinh học sử dụng trong nghiên cứu này đã được chứng minh có khả năng ứng dụng phân tích nhanh BOD₅ [4, 5] và độc tính Cr(VI) trong nước. Nguyên lý hoạt động của hệ dựa trên hoạt động tiêu thụ oxy hòa tan của vi sinh vật (hình 5), trong đó, hệ van được sử dụng là một hệ thống phân phối chất lỏng không tiếp xúc được mô tả chi tiết ở nghiên cứu trước đó. Trong nghiên cứu này, 5 g hạt canxi alginat cố định vi sinh vật được cho vào buồng phản ứng sinh học và được khuấy bằng máy khuấy từ với tốc độ 300 vòng/phút.



Hình 5. Sơ đồ nguyên lý hệ cảm biến sinh học sử dụng vi sinh vật cố định trong canxi alginat

2.3. Khảo sát ảnh hưởng của điều kiện tạo hạt và bảo quản

Về lý thuyết, kích thước hạt alginat ảnh hưởng đến hoạt động của vi sinh vật cố định và điều kiện bảo quản ảnh hưởng nhiều đến độ bền của hạt nên cũng ảnh hưởng lên hoạt động của vi sinh vật. Trong các nghiên cứu trước đây, độ bền của hạt được đánh giá dựa trên tỷ lệ hạt nguyên còn lại sau khi khuấy so với ban đầu. Sam và các cộng sự đã khảo sát ảnh hưởng của việc khuấy ở tốc độ 180 vòng/phút đến khả năng vỡ hạt [13]. Khảo sát sơ bộ cho thấy hạt canxi alginat được tạo thành trong nghiên cứu này có độ bền cơ học tốt, không bị vỡ ngay cả khi khuấy trộn mạnh (1500 vòng/phút) nên độ bền của hạt được đánh giá thông qua độ trương nở. Hoạt động của vi sinh vật cố định trong hạt alginat được đánh giá thông qua độ biến thiên nồng độ oxy hòa tan trong dung dịch GGA trước và sau quá trình phân hủy vi sinh trong buồng phản ứng sinh học (ΔDO).

Các kích cỡ kim tiêm được khảo sát trong nghiên cứu này là 18G; 20G; 23G; 26G ở khoảng cách rơi tự do 20 cm (kí hiệu mẫu hạt tương ứng với kích cỡ kim tiêm) và 18G ở khoảng cách rơi tự do 5 cm (kí hiệu mẫu hạt là 18GH). Điều kiện bảo quản được khảo sát bằng cách thay đổi nồng độ $CaCl_2$ ở các mức 0,1%, 0,4% và 1%.

2.3.1. Đánh giá hoạt động của vi sinh vật cố định

Hoạt động của vi sinh vật cố định được đánh giá thông qua giá trị ΔDO theo thời gian bảo quản hạt ở các nồng độ $CaCl_2$ khác nhau. Ngoài ra, hoạt động của vi sinh vật ở các kích thước hạt khác nhau còn được đánh giá thông qua độ dốc (hệ số a- thể hiện độ nhạy tín hiệu), khoảng tuyến tính và hệ số tương quan R^2 của phương trình đường chuẩn giữa BOD_5 và giá trị ΔDO ghi nhận trên hệ thống khi vận hành cảm biến sinh học với dung dịch GGA.

2.3.2. Đánh giá độ trương nở

Các hạt canxi alginate chứa vi sinh vật được chụp trong buồng tối tại các thời điểm: sau khi tạo, sau khi bảo quản trong khoảng thời gian nhất định và sau khi khuấy liên tục trong nước cất hai lần trong 24 giờ ở tốc độ 1500 vòng/phút. Kích thước hạt trung bình được xác định bằng phần mềm ImageJ. Độ trương nở của các hạt sau khi bảo quản và khuấy được đánh giá theo công thức (1).

$$\text{Độ trương nở (\%)} = \left(\frac{D_2 - D_1}{D_1} \right) \times 100 \quad (1)$$

Trong đó, D_1 và D_2 lần lượt là đường kính hạt trước và sau quá trình khảo sát.

2.4. Phương pháp xác định nhanh BOD_{bio} trong nước thải nhà máy giấy bằng cảm biến sinh học

Nước thải giấy được lấy từ đầu vào tại trạm xử lý nước thải Công ty TNHH Sản xuất Thương mại giấy Thiên Trí theo phương pháp chuẩn được quy định ở TCVN 5999:1995 [14], thời gian lấy mẫu trong tháng 2, tháng 3 và tháng 6 năm 2022. Sau khi lấy, mẫu sẽ được bảo quản ở nhiệt độ từ 1 - 4°C, sau đó được xác định giá trị BOD_{bio} trên hệ cảm biến sinh học và BOD_5 bằng phương pháp truyền thống trong vòng 24 giờ [15]. Giá trị BOD_{bio} của nước thải giấy được xác định bằng phương pháp lựa chọn hệ số pha loãng thích hợp và dựa vào dung dịch chuẩn GGA [5].

2.5. Phương pháp phân tích và xử lý số liệu

Các kết quả ghi nhận được xử lý bằng phần mềm Origin. Dữ liệu được trình bày dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn (SD).

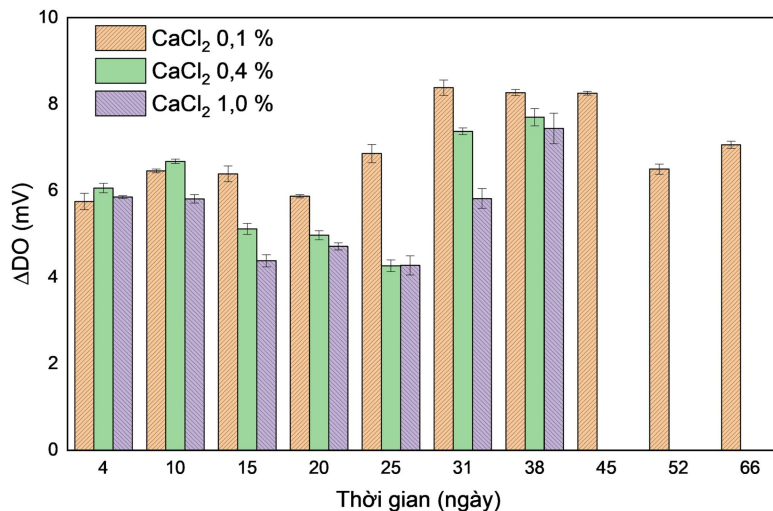
Hệ số biến thiên (CV) được sử dụng để đánh giá sự ảnh hưởng của nồng độ $CaCl_2$ trong bảo quản hạt canxi alginate đến giá trị ΔDO ghi nhận trên hệ cảm biến sinh học theo thời gian. Tất cả các phân tích thống kê được thực hiện bằng kiểm định ANOVA một chiều với mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của nồng độ $CaCl_2$ đến giá trị ΔDO ghi nhận trên hệ cảm biến sinh học theo thời gian

Các hạt canxi alginate thường được bảo quản ở nhiệt độ 4°C để hạn chế sự sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật trong hạt [16]. Mặc dù nồng độ $CaCl_2$ tối ưu đã được khảo sát trong quá trình tạo hạt [17], nhưng với mục đích bảo quản hạt lại chưa được quan tâm. Khi ngâm SA trong dung dịch $CaCl_2$, quá trình hydrat hóa của SA xảy ra đồng thời với quá trình tạo liên kết chéo với Ca^{2+} [18]. Nồng độ $CaCl_2$ thấp có thể dẫn đến khả năng không đủ liên kết tạo thành mạng lưới gel, do đó quá trình hydrat hóa của màng SA chiếm ưu thế dẫn đến sự trương nở hạt. Tuy nhiên, ở nồng độ $CaCl_2$ cao, các liên kết chéo giữa Ca^{2+} và SA hình thành nhiều, chồng chéo lên nhau, cản trở hoạt động của vi sinh vật. Do đó, nồng độ $CaCl_2$ cần được khảo sát để xác định áp suất thẩm thấu thích hợp để bảo quản các hạt canxi alginate. Sự ảnh hưởng của nồng độ $CaCl_2$ đến giá trị ΔDO ghi nhận trên hệ cảm biến sinh học theo thời gian được thể hiện qua hình 6. Kết quả cho thấy, sau 38 ngày khảo sát ở các

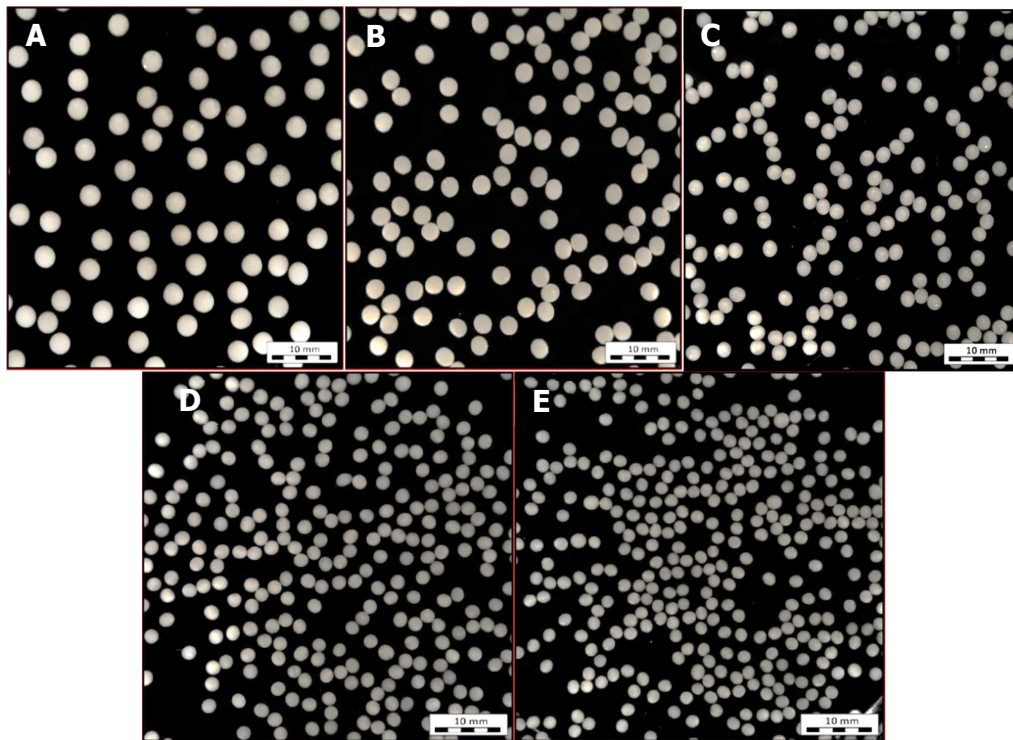
nồng độ 0,1%; 0,4% và 1,0%, giá trị ΔDO lần lượt là $6,85 \text{ mV} \pm 1,07 \text{ mV}$; $6,03 \text{ mV} \pm 1,30 \text{ mV}$ và $5,47 \text{ mV} \pm 1,11 \text{ mV}$. Sau 04 ngày đầu bảo quản ở các nồng độ CaCl_2 khác nhau, giá trị ΔDO không có sự khác biệt về mặt thống kê đối với các nồng độ khảo sát ($p\text{-value} < 0,05$); tuy nhiên, khi tăng thời gian bảo quản các giá trị này có sự biến thiên rõ rệt. Cụ thể là ở nồng độ 0,4% và 1,0%, hệ số biến thiên giá trị ΔDO trong 20 ngày lần lượt là 14,16% và 14,53%. Khi thời gian bảo quản kéo dài đến 38 ngày, hệ số biến thiên tăng lên lần lượt là 21,51% và 20,38%. Trong khi đó, hạt được bảo quản trong CaCl_2 ở nồng độ 0,1% cho thấy sự ổn định cao hơn với hệ số biến thiên sau 38 ngày là 15,56%. Nồng độ này sau đó được khảo sát đến ngày thứ 66 và kết quả cho thấy giá trị ΔDO giảm nhẹ về mức $6,98 \text{ mV} \pm 0,99 \text{ mV}$ gần giống với những ngày đầu; nhờ đó hệ số biến thiên giảm còn 14,23%. Chính vì vậy, nồng độ CaCl_2 0,1% được sử dụng để bảo quản các hạt canxi alginat.



Hình 6. Đồ thị thể hiện giá trị ΔDO theo thời gian ở các nồng độ CaCl_2 0,1%; 0,4% và 1,0%

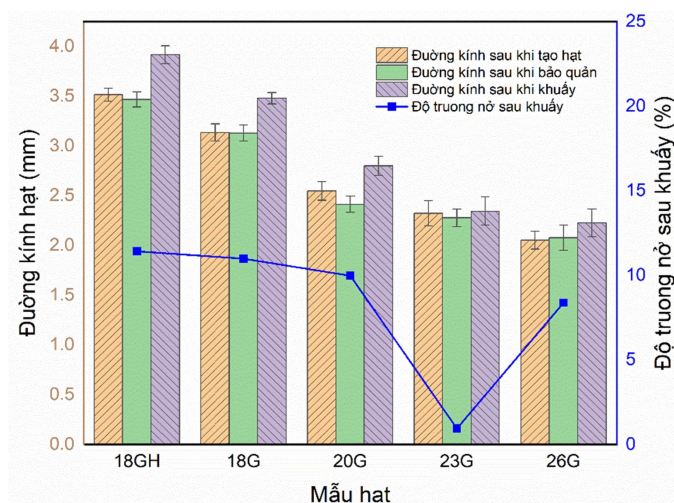
3.2. Ảnh hưởng của điều kiện tạo hạt đến kích thước hạt và độ trương nở

Các kích thước hạt khác nhau được tạo ra từ thay đổi kích cỡ kim tiêm và khoảng cách rơi tự do. Kích cỡ kim tiêm càng lớn và khoảng cách rơi tự do càng ngắn thì hạt sẽ có kích thước lớn hơn. Theo đó, với khoảng cách rơi tự do 5 cm và kích cỡ kim tiêm 18G, mẫu hạt 18GH cho kích thước hạt trung vị lớn nhất là 3,525 mm và với khoảng cách rơi tự do là 20 cm, các kích cỡ kim tiêm 18G, 20G, 23G và 26G cho kích thước hạt trung vị giảm dần lần lượt là 3,125; 2,550; 2,350 và 2,050 mm (Hình 3). Kết quả này cho thấy, việc điều chỉnh kích thước hạt alginat có thể dễ dàng thực hiện bằng cách thay đổi kích cỡ kim tiêm và khoảng cách rơi tự do. Vấn đề đặt ra ở đây là liệu việc điều chỉnh kích thước hạt có giúp tăng cường hoạt động vi sinh vật cố định hay không. Để có câu trả lời cho vấn đề này, cần phải đánh giá cả độ bền, thể hiện qua độ trương nở của hạt, và hoạt động vi sinh vật cố định, thể hiện qua giá trị ΔDO của dung dịch chuẩn GGA.



Hình 7. Các mẫu hạt canxi alginat 18GH (A), 18G (B), 20G (C), 23G (D), 26G (E) trong buồng tối

Độ bền của các hạt alginat có kích thước khác nhau được đánh giá qua giá trị kích thước trung bình ở ba giai đoạn: sau khi tạo, sau 20 ngày bảo quản và sau khi khuấy 24 giờ ở tốc độ 1500 vòng/phút trong nước cất hai lần. Như được quan sát thấy ở Hình 4, không có tình trạng trương nở xảy ra ở tất cả các cỡ hạt sau quá trình bảo quản ($CV < 3\%$). Khi cho khuấy các hạt này trong nước ở tốc độ 1500 vòng/phút, có thể dễ dàng nhận thấy tình trạng trương nở ở tất cả các cỡ hạt gây ra sự hấp thu nước vào trong các hạt canxi alginat. Thực tế, alginat tạo liên kết chéo khi có mặt các ion Ca^{2+} giống như mô hình hộp trứng [18]. Trong điều kiện khuấy liên tục trong nước, các phân tử nước với kích thước nhỏ có thể xâm nhập vào cấu trúc hạt canxi alginat kéo giãn các liên kết này khiến kích thước hạt tăng lên. Kết quả ở Hình 4 cho thấy mức độ trương nở ở các kích thước hạt 18GH, 18G, 20G, 23G và 26G sau khuấy so với kích thước sau khi vừa được tạo lần lượt là 11,41%; 10,99%; 9,97%; 0,95% và 8,38%. Điều này cho thấy kích thước hạt càng lớn, phân tử nước càng dễ xâm nhập vào cấu trúc hạt. Tuy nhiên, khi hạt quá bé (26G), cấu trúc hạt dường như không bền vững cũng dẫn đến độ trương nở lớn hơn so với hạt 23G.

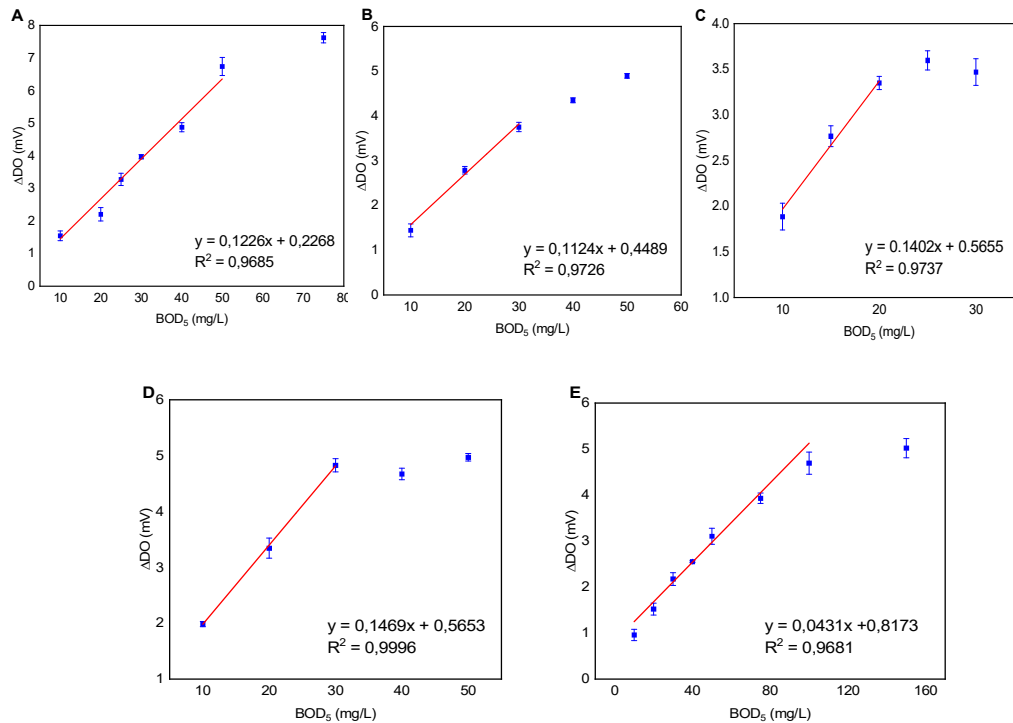


Hình 8. Ảnh hưởng kích thước hạt đến độ trương nở của hạt sau khuấy

3.3. Ảnh hưởng của kích thước hạt đến hoạt động của vi sinh vật

Kết quả thể hiện ở Hình 5 cho thấy hệ số tương quan R^2 ở tất cả các trường hợp đều lớn hơn 0,95, chứng tỏ có mối tương quan tuyến tính giữa giá trị ΔDO và nồng độ BOD_5 của dung dịch GGA. Tuy nhiên, kích thước hạt khác nhau cho khoảng tuyến tính và độ nhạy của phép đo khác nhau. Điều này là do tốc độ khuếch tán dinh dưỡng và oxy hòa tan qua màng alginat có ảnh hưởng lớn đến hoạt động của vi sinh vật [19].

Ở cùng một khối lượng hạt, kích thước hạt nhỏ có thể gia tăng bề mặt tiếp xúc giữa vi sinh vật với chất dinh dưỡng, do đó chất dinh dưỡng khuếch tán tốt đến vi sinh vật dẫn đến khoảng tuyến tính kéo dài từ nồng độ BOD_5 10 mg/L đến 100 mg/L được quan sát thấy ở mẫu hạt kích thước thấp nhất 26G (hình 9A). Tuy nhiên, với kích thước quá nhỏ, các hạt này có xu hướng lèn chặt, tạo vùng tù khiến chất dinh dưỡng không được phân bố đều trong buồng phản ứng. Điều này dẫn đến tình trạng, cùng một nồng độ BOD_5 nhưng giá trị ΔDO thu được khi sử dụng hạt 26G nhỏ hơn nhiều so với các hạt có kích thước lớn hơn. Kết quả là cảm biến sinh học sử dụng mẫu hạt 26G có độ nhạy thấp hơn nhiều so với các hạt còn lại ($a = 0,0431$). Đối với hạt có kích thước lớn hơn, yếu tố ảnh hưởng chủ yếu đến hoạt tính của hạt lại là độ trương nở. Tình trạng trương nở như quan sát thấy ở các mẫu hạt 18GH, 18G và 20G có thể dẫn đến sự thất thoát vi sinh vật khiến cho độ nhạy tín hiệu và hệ số tương quan thu được thấp hơn so với mẫu hạt 23G. Điều này cho thấy, nếu không bị ảnh hưởng bởi độ trương nở, kích thước hạt nhỏ hơn sẽ giúp vi sinh cố định hoạt động tốt hơn, từ đó nâng cao hiệu quả làm việc của cảm biến sinh học [20]. Tuy nhiên, kích thước hạt không được nhỏ quá để tránh tình trạng cản trở sự phân bố đều nồng độ dinh dưỡng trong buồng phản ứng. Chính vì vậy mẫu hạt 23G được chọn để ứng dụng trong cảm biến sinh học xác định nhanh giá trị BOD của nước thải sản xuất giấy sao cho cảm biến có độ nhạy cao nhất, độ tuyến tính tốt nhất và khoảng tuyến tính chấp nhận được.



Hình 9. Mối tương quan giữa nồng độ BOD_5 và giá trị ΔDO ở các mẫu hạt 18GH (A), 18G (B), 20G (C), 23G (D), 26G (E)

3.4. Dự đoán nhanh BOD_5 trong nước thải nhà máy giấy bằng cảm biến sinh học

Để dự đoán nhanh và chính xác giá trị BOD_5 , dung dịch chuẩn sử dụng trong cảm biến sinh học phải có thành phần tương tự nước thải thực để đảm bảo mức độ hô hấp của vi sinh vật là như nhau, nghĩa là cùng thu nhận được giá trị ΔDO tương tự nhau khi vận hành cảm biến với dung dịch chuẩn và nước thải có cùng giá trị BOD_5 . Về lý thuyết, dung dịch chuẩn GGA chỉ chứa các hợp chất đơn giản là nguồn dinh dưỡng thích hợp cho hầu hết các vi sinh vật nên sẽ được tiêu thụ nhanh hơn so với nước thải sản xuất giấy vốn chứa các hợp chất phức tạp và khó phân hủy sinh học hơn. Tuy nhiên, kết quả cho thấy mức độ hô hấp của vi sinh vật trong môi trường dung dịch chuẩn GGA và nước thải sản xuất giấy tương đương nhau, cho giá trị BOD_{bio} và BOD_5 không có sự khác biệt về mặt thống kê với giá trị p-value > 0,4 trong tất cả các lần đo (Bảng 1). Điều này là do nguồn vi sinh vật cố định được lấy từ chính nhà máy xử lý nước thải, nhờ đó những chủng vi sinh vật không thích ứng được với môi trường nước thải đã bị đào thải còn các chủng vi sinh vật có khả năng phân hủy tốt nước thải đã được giữ lại.

Bảng 3. So sánh giá trị BOD_{bio} và BOD₅ của nước thải giấy

Thời gian	Lần đo	BOD _{bio} (mg/L)	p-value	BOD ₅ (mg/L)
Ngày 25/02/2022	Lần 1	188,03 ± 6,48	0,8910	182,00 ± 11,93
	Lần 2	171,22 ± 8,44	0,7020	
Ngày 03/03/2022	Lần 1	200,24 ± 10,18	0,9856	197,17 ± 5,33
	Lần 2	205,83 ± 20,15	0,8932	
Ngày 08/03/2022	Lần 1	168,19 ± 12,95	0,9982	169,00 ± 7,37
	Lần 2	164,31 ± 9,19	0,9430	
Ngày 13/06/2022	Lần 1	79,18 ± 4,51	0,7024	75,67 ± 2,49
	Lần 2	77,72 ± 0,84	0,8825	
Ngày 16/06/2022	Lần 1	79,01 ± 3,30	0,4484	84,33 ± 1,76
	Lần 2	87,32 ± 3,37	0,7583	

4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, quần thể vi sinh vật tự nhiên trong nước thải sản xuất giấy đã được cố định thành công trong mạng canxi alginate và ứng dụng trong cảm biến sinh học để dự đoán nhanh giá trị BOD₅ của nước thải sản xuất giấy. Kết quả nghiên cứu cho phép rút ra các kết luận sau:

- Hoạt động của vi sinh vật cố định chịu ảnh hưởng bởi kích thước hạt và điều kiện bảo quản. Hạt có kích thước trung bình khoảng 2,35 mm, được tạo với kích thước kim tiêm 23G và khoảng cách rơi tự do 20 cm, có hoạt tính vi sinh tốt nhất trong việc dự đoán BOD₅ của dung dịch chuẩn GGA. Việc bảo quản hạt alginate trong dung dịch CaCl₂ 0,4% giúp duy trì hoạt động ổn định của vi sinh vật cố định lên đến hơn 66 ngày.

- Giá trị BOD₅ của nước thải sản xuất giấy có thể dự đoán chính xác bằng cảm biến sinh học sử dụng vi sinh vật cố định trong hạt alginate và dung dịch chuẩn GGA.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số NCUD.02-2019.52

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bouabidi Z. B., El-Naas M. H. and Zhang Z., *Immobilization of microbial cells for the biotreatment of wastewater: A review*, Environmental Chemistry Letters, 2019, **17**:241-257
2. Lee K. Y. and Heo T. R., *Survival of Bifidobacterium longum immobilized in canxi alginate beads in simulated gastric juices and bile salt solution*, Applied environmental microbiology, 2000, **66**:869-873
3. Chen C. Y., Kao C. M. and Chen S. C., *Application of Klebsiella oxytoca immobilized cells on the treatment of cyanide wastewater*, Chemosphere, 2008, **71**:133-139

4. Pham T. T. P., Nguyen P. H. D., Nguyen T. T. V. and Duong H. T. L., *Self-build packed-bed bioreactor for rapid and effective BOD estimation*, Environmental Science Pollution Research, 2019, **26**:25656-25667
5. Ngoc L. T. B., Tu T. A., Hien L. T. T., Linh D. N., Tri N., Duy N. P. H., Cuong H. T. and Phuong P. T. T., *Simple approach for the rapid estimation of BOD5 in food processing wastewater*, Environmental Science Pollution Research, 2020, **27**:20554-20564
6. Dzionek A., Wojcieszynska D. and Guzik U., *Natural carriers in bioremediation: A review*, Electronic Journal of Biotechnology, 2016, **23**:28-36
7. Leenen E. J., Dos Santos V. A., Grolle K. C., Tramper J. and Wijffels R., *Characteristics of and selection criteria for support materials for cell immobilization in wastewater treatment*, Water Research, 1996, **30**:2985-2996
8. Draget K. I., Skjåk-Bræk G. and Olav S., *Alginat based new materials*, International journal of biological macromolecules, 1997, **21**:47-55
9. Damayanti A., Kumoro A. and Bahlwan Z., *Review canxi alginat beads as immobilizing matrix of functional cells: extrusion dripping method, characteristics, and application*, IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, 2021, IOP publishing.
10. Mong Thu T. T. and Krasaekoopt W., *Encapsulation of protease from Aspergillus oryzae and lipase from Thermomyces lanuginosus using alginat and different copolyme types*, Agriculture and Natural Resources, 2016, **50**:155-161.
11. Reshetilov A., Arlyapov V., Alferov V. and Reshetilova T., *BOD biosensors: application of novel technologies and prospects for the development*. In State of the Art in Biosensors-Environmental and Medical Applications, 2013, InTech
12. Liu C., Zhao H., Gao S., Jia J., Zhao L., Yong D. and Dong S., *A reagent-free tubular biofilm reactor for on-line determination of biochemical oxygen demand*, Biosensors and Bioelectronics, 2013, **45**:213-218.
13. Sam S. P., Adnan R. and Ng S. L., *Statistical optimization of immobilization of activated sludge in PVA/alginat cryogel beads using response surface methodology for p-nitrophenol biodegradation*, Journal of Water Process Engineering, 2021, **39**:101725.
14. TCVN 5999:1995, *Chất lượng nước - Lấy mẫu - Hướng dẫn lấy mẫu nước thải*.
15. TCVN 6663-3:2016, *Chất lượng nước - Lấy mẫu - Phần 3: Bảo quản và xử lý mẫu nước*.
16. Mohebrad B., Ghods G. and Rezaee A., *Dairy wastewater treatment using immobilized bacteria on canxi alginat in a microbial electrochemical system*, Journal of Water Process Engineering, 2022, **46**:102609.
17. Li J., Wu Y., He J. and Huang Y., *A new insight to the effect of canxi concentration on gelation process and physical properties of alginat films*, Journal of Materials Science, 2016, **51**:5791-5801

18. Hecht H. and Srebnik S., *Structural characterization of natri alginat and canxi alginat*, Biomacromolecules, 2016, **17**:2160-2167.
19. Namane A., Amrouche F., Arrar J., Ali O. and Hellal A., *Bacterial behaviour in the biodegradation of phenol by indigenous bacteria immobilized in Ca-alginat beads*, Environmental Technology, 2020, **41**:1829-1836.
20. Dursun A. Y. and Tepe O., *Internal mass transfer effect on biodegradation of phenol by Ca-alginat immobilized Ralstonia eutropha*, Journal of Hazardous Materials, **126**:105-111.

SUMMARY

IMMOBILIZATION OF MICROORGANISMS USING CANXI ALGINAT FOR RAPID ESTIMATION OF BIO-CHEMICAL OXIDATION DEMAND BY BIOSENSOR

Immobilized microorganisms have been shown to have outstanding advantages over the free ones, especially in the field of wastewater treatment. Natural gel materials such as alginat allow substrates to diffuse well across the membrane, thereby improving the efficiency of immobilized microbial activity. These supports, however, appeared to be swollen or even soluble during treatment. In this study, the factors affecting the stability of canxi alginat beads and the activity of immobilized microorganisms in the BOD biosensor were investigated. By changing the needle size and distance, the particle size of alginat beads can be adjusted. The results show that the smaller the particle size, the higher metabolic activity of immobilized microorganisms; however, very small alginat beads whose diameter is less than 2.3 mm are not stable. Immersion in CaCl_2 solution of 0.4% can maintain the stable activity of immobilized microorganisms in alginat beads up to more than 66 days. By using the prepared alginat d beads and GGA standard solutions, the developed biosensor can accurately predict the BOD_5 value of wastewater from paper mills.

Keywords: Immobilization, calcium alginate, BOD, biosensor, paper production wastewater, cố định, nước thải sản xuất giấy.

Nhận bài ngày 26 tháng 7 năm 2022

Phản biện xong ngày 20 tháng 9 năm 2022

Hoàn thiện ngày 28 tháng 9 năm 2022

⁽¹⁾ Viện Công nghệ Hóa học, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

⁽²⁾ Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

Liên hệ: **Phạm Thị Thùy Phương**

Viện Công nghệ Hóa học, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

Số 1A Thanh Lộc 29, phường Thanh Lộc, Quận 12, Tp. Hồ Chí Minh

Điện thoại: 0909617896; Email: pttphuong@ict.vast.vn