

NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG BẤT HOẠT *VIBRIO* SPP. TRONG NƯỚC BẰNG KỸ THUẬT KẾT HỢP VI BỌT KHÍ, SIÊU ÂM VÀ H₂O₂

Lê Văn Tuấn¹, Đặng Thị Thanh Lộc^{1*}, Nguyễn Văn Hoàng¹

¹Khoa Môi Trường, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

TÓM TẮT

Trong những năm gần đây, việc phát triển công nghệ khử trùng nước không tạo ra dư lượng hoặc sản phẩm phụ đang thu hút nhiều quan tâm nghiên cứu. Nghiên cứu này trình bày kết quả bất hoạt *Vibrio* spp. trong nước bằng kỹ thuật kết hợp vi bọt khí (MNBs), siêu âm (US), và H₂O₂. Khả năng khử trùng bằng MNBs/US/H₂O₂ được xác định tại các điều kiện thí nghiệm khác nhau của liều H₂O₂, và tốc độ sục khí. Các kết quả cho thấy khi kết hợp MNBs/US/H₂O₂ với liều lượng H₂O₂ rất thấp (~ 30% liều H₂O₂ cần thiết để bất hoạt hoàn toàn vi khuẩn), hiệu quả khử trùng đã tăng rất đáng kể và đều cao hơn so với khử trùng riêng lẻ (US, H₂O₂). Cụ thể, với mật độ vi khuẩn ban đầu 10⁵ – 10⁶ CFU/mL và độ mặn 20‰, phương pháp khử trùng kết hợp MNBs (1,5 L/phút)/US (28 kHz)/H₂O₂ (0,9 mg/L) đã cho giá trị khử trùng cộng hưởng 3,3-log và bất hoạt hoàn toàn (5,4 log) *Vibrio* spp. trong vòng 60 phút. Trong khi đó, khử trùng bằng H₂O₂ (0,9 mg/L) chỉ bất hoạt được 1,7 log, và khử trùng bằng US (28 kHz, 100 W) chỉ bất hoạt được 0,5 log vi khuẩn sau 60 phút. Các kết quả bước đầu hứa hẹn phát triển một phương pháp khử trùng mới ứng dụng cho khử trùng nước lợ chẳng hạn như nước nuôi trồng thủy sản.

Từ khóa: Khử trùng nước, bất hoạt *Vibrio* spp., vi bọt khí, siêu âm, H₂O₂.

1. MỞ ĐẦU

Ở Việt Nam và một số nước đang phát triển, vùng ven biển có vai trò quan trọng đối với đời sống con người, trong đó phát triển bền vững dựa vào nguồn nước lợ cho hoạt động nuôi trồng thủy sản và vận tải biển (nước dằn tàu) rất được chú trọng. Thực tế, nhiều nguồn nước cấp phục vụ hoạt động sinh hoạt, sản xuất, nuôi trồng thủy sản đã và đang có dấu hiệu ô nhiễm vi sinh vật gây bệnh, gây nhiều hệ lụy nghiêm trọng về môi trường và vệ sinh an toàn thực phẩm [1–3]. Đây là hệ quả tất yếu của nhu cầu sử dụng nước nhiều, với áp lực đáp ứng tốt cả lượng và chất của nguồn nước cấp cho tất cả các hoạt động; trong khi việc quản lý, kiểm soát các nguồn nước thải (sinh hoạt, bệnh viện, sản xuất công nghiệp, nông nghiệp, nuôi trồng thủy sản,...) ở nhiều địa phương đang còn khá nhiều hạn chế. Ví dụ như, việc kiểm soát dịch bệnh khiến người nuôi thường phải sử dụng nhiều loại kháng sinh; nhu cầu thay nhiều nước cho các ao nuôi thủy sản, khiến việc xử lý nước thải và nước cấp thực hiện không đầy đủ dẫn đến các vi sinh vật gây bệnh, các chất hữu cơ, dinh dưỡng, chất kháng sinh luôn hiện hữu trong cả nguồn nước cấp và nước thải [1–3]. Trên thực tế, áp lực trao đổi một lượng lớn nước biển để nuôi trồng thủy sản thâm canh và siêu thâm canh đang ảnh hưởng đến sản xuất và môi trường nước [2, 3]. Do vậy, việc phát triển công nghệ khử trùng để vừa có thể nhanh chóng, hiệu quả ức chế các vi sinh vật gây bệnh trong nước cấp ao nuôi, vừa an toàn, thân thiện môi trường, và hạn chế hoặc không tạo thành các sản phẩm phụ độc hại đang là nhu cầu hết sức bức thiết hiện nay.

Trong nhiều thập kỷ qua, các kỹ thuật hóa học, vật lý, hóa lý khác nhau đã được phát triển để khử trùng nước. Trong số này, khử trùng bằng clo được áp dụng phổ biến và rộng rãi nhất để khử trùng nước và nước thải. Thật không may, clo có thể phản ứng với các tác nhân hữu cơ hoặc vô cơ trong nước lợ để tạo ra một số sản phẩm phụ khử trùng (DBPs) như THMs, HAAs, bromate [4]. Các chất khử trùng thay thế, chẳng hạn như ozone, nano-đồng, hydrogen peroxide (H₂O₂) và KMnO₄ cũng có một số nhược điểm như chi phí cao, DBPs không mong muốn [5], hoặc các yêu cầu vận hành phức tạp [6–8]. Các phương pháp vật lý (như nhiệt, tia UV, siêu âm, vi sóng, cativation, lọc màng) hoặc các phương pháp hóa lý (như quang xúc tác, điện hóa) cũng đã và đang được nghiên cứu phát triển để khử trùng

nước [6–9]. Nghiên cứu này đánh giá khả năng khử trùng của kỹ thuật kết hợp vi bọt khí (MNBs), siêu âm (US), và H₂O₂ để bất hoạt vi khuẩn *Vibrio* spp. trong môi trường nước lợ.

Vi bọt khí (MNBs) bao gồm các bong bóng nhỏ có đường kính từ vài đến 100 μm (MBs) và các bong bóng có kích thước nhỏ hơn 1 μm (NBs) [10]. Có nhiều phương pháp để tạo ra MNBs như bơm áp lực kết hợp với hiệu ứng venturi, siêu âm, điện hóa, v.v. Các thiết bị MNBs có thể tạo ra vi bọt khí ở mật độ cao (10⁶ - 10⁸ MNBs/mL), điều này thúc đẩy khí hòa tan vào trong nước, làm giảm lực ma sát, chuyển đổi thể zeta trong dung dịch nước, và tạo ra các gốc tự do (được gọi là chất oxy hóa tăng cường) [8, 10]. Các MNBs còn có khả năng tích hợp linh hoạt với một số “chất hoạt hóa” khác, như ozone, UV, axit mạnh để tăng hoạt tính [6, 8–9, 11–12]. Đồng thời, MNBs được sử dụng để tăng cường cấp khí oxy hòa tan trong nước (DO) nhằm thúc đẩy sự phát triển của các sinh vật sống trong môi trường nước (cho ngành nuôi trồng thủy sản) [11].

Gần đây, nhiều nghiên cứu cho thấy siêu âm (US) là một công cụ rất hiệu quả để diệt trùng thực phẩm [13] và khử trùng nước/nước thải [14–15]. Nghiên cứu của Antoniadis và cs. (2007) cho thấy siêu âm (80 kHz, 150 W, 7mm, 2–24kHz) bất hoạt khoảng 3 log *E. coli* [14]. Gao và cs. (2014) báo cáo rằng siêu âm (ở 850 kHz, 62 W trong 20 phút) giảm được khoảng 2,5 log *Bacillus subtilis* [15]. Siêu âm công suất cao (HPU) ở các áp suất khác nhau (100–350 bar, 36 °C, 40 W ± 5 W, tần số cộng hưởng 30 kHz) có thể bất hoạt 7,5 log *E. coli* sau 7 phút [13]. Đáng chú ý, một số nghiên cứu cho thấy US hiệu quả hơn khi kết hợp với tác nhân oxy hóa như ozon [16] hoặc H₂O₂ [8, 12]. Hiệu quả khử trùng khi sử dụng kết hợp US với O₃ cao hơn nhiều so với chỉ sử dụng US [16]. Tuy nhiên, chi phí xử lý vẫn là một trong những thách thức lớn đối với việc áp dụng phương pháp này trong thực tế.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng kỹ thuật kết hợp MNBs, US, và H₂O₂ ở liều lượng thấp (thấp hơn nhiều so với liều H₂O₂ cần thiết để bất hoạt hoàn toàn vi khuẩn) để đánh giá khả năng khử trùng nước mặn lợ chẳng hạn như nước nuôi trồng thủy sản. Hydrogen peroxide (H₂O₂) là một chất oxy hóa mạnh, được sử dụng rộng rãi trong xử lý nước do tính thân thiện với môi trường (không tạo ra các sản phẩm ô nhiễm thứ cấp). Tuy nhiên, nhược điểm của H₂O₂ là kém bền trong môi trường nước nên khó xác định liều lượng oxy hóa cần thiết, tốn nhiều công sử dụng, do đó hiệu quả kinh tế không cao, nhất là trong lĩnh vực nuôi trồng thủy sản. Giả thiết rằng sử dụng US có thể chuyển hóa MNBs trong nước thành trạng thái plasma phát sinh nhiệt, đồng thời tăng cường tạo ra các gốc tự do có hoạt tính mạnh của H₂O₂ [17]. Tuy nhiên hiện vẫn chưa có nhiều công bố ở Việt Nam cũng như trên thế giới về việc áp dụng kết hợp MNBs, US, và H₂O₂ để khử trùng nước. Vi khuẩn *Vibrio* spp., được sử dụng làm vi sinh vật thử nghiệm trong nghiên cứu này, thuộc nhóm vi khuẩn gram âm, bao gồm một số loài đã được biết đến là tác nhân gây bệnh cho người và động vật thủy sản như *V. cholerae*, *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. ordalii*, *V. salmonicida*, *V. parahaemolyticus*, *V. harvey*, *V. vulnificus* trong môi trường nước mặn lợ. Khả năng bất hoạt *Vibrio* spp. bằng MNBs/US/H₂O₂ được khảo sát tại các điều kiện thí nghiệm khác nhau của liều H₂O₂ và tốc độ sục khí. Nghiên cứu này sẽ đánh giá liệu việc kết hợp MNBs, US, và liều thấp H₂O₂ có mang lại lợi ích khử trùng cộng hưởng và tiềm năng ứng dụng của công nghệ này trong xử lý nước.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Phương pháp chuẩn bị mẫu vi khuẩn

Vi khuẩn *Vibrio* spp. được phân lập trong nước của các ao nuôi trồng thủy sản. Phân lập vi khuẩn trên môi trường thạch chọn lọc Thiosulfate-Citrate Bile–Sucrose (TCBS, Himedia, Ấn Độ) ở 37°C trong 24 giờ. Sau đó các khuẩn lạc có màu vàng hoặc xanh lục được xem là *Vibrio* spp. được tiếp tục cấy chuyển 3 lần sang các đĩa thạch TCBS khác nhằm tách từng khuẩn lạc cần nuôi cấy riêng rẽ. Các khuẩn lạc này được định danh vi sinh vật bằng máy định danh vi khuẩn và làm kháng sinh đồ tự động VITEK 2 Compact (60 Clinical 275 60, công ty TNHH BioMerieux Việt Nam) sử dụng phương pháp đo màu để nhận biết các tính chất hóa học của vi sinh vật thông qua sự thay đổi màu sắc của các giếng môi trường có sẵn trong thẻ. Các khuẩn lạc *Vibrio* spp. được nhân giống trên môi trường dinh dưỡng Tryptone Soya Broth (TSB, Himedia, Ấn Độ) bổ sung NaCl để đạt độ mặn 20‰, nuôi cấy ở 37°C với

tốc độ lắc 150 vòng/phút trong vòng 24 giờ. Mật độ vi khuẩn *Vibrio* spp. trong dung dịch được xác định là 10^9 CFU/mL. Mẫu vi khuẩn được bảo quản trong glycerol 30% và -50°C [6].

Vi khuẩn *Vibrio* spp. được chuẩn bị trước khi thực hiện thí nghiệm khử trùng một ngày bằng cách nhân giống 100 μL vi khuẩn *Vibrio* spp. trong glycerol (đã chuẩn bị như đã trình bày ở trên) vào 50 mL dung dịch TSB (bổ sung NaCl để đạt độ mặn 20‰). Nuôi cấy ở 37°C với tốc độ lắc 150 vòng/phút trong 24 giờ. *Vibrio* spp. sau khi nhân giống sẽ được sử dụng ngay cho thí nghiệm khử trùng.

2.2. Phương pháp đếm khuẩn lạc *Vibrio* spp.

Mật độ vi khuẩn được xác định bằng kỹ thuật cấy trải trên đĩa thạch TCBS. Mẫu được pha loãng bằng nước muối sinh lý (0,85%) vô trùng, chuẩn bị dãy pha loãng từ 10^0 đến 10^{-2} . Hút 100 μL dung dịch mẫu đã pha loãng hoặc không pha loãng cấy trải trên môi trường thạch TCBS, sau đó ủ ở 37°C trong 24 giờ. Các đĩa có số khuẩn lạc từ 25 đến 300 khuẩn lạc được chọn để đếm và tính mật độ vi khuẩn [6], đối với mẫu sau khử trùng thì các đĩa có số khuẩn lạc < 25 vẫn được đếm và tính giá trị trung bình. Mỗi mẫu sẽ được phân tích lặp lại 3 lần.

2.3. Phương pháp chuẩn bị mẫu nước

Đối với thí nghiệm mẻ: Chuẩn bị 1 L nước cất, bổ sung NaCl để đạt độ mặn 20‰. Độ mặn được đo bằng máy đo độ mặn (HANNA HI 98194, Romania). Bổ sung 1 mL dung dịch nuôi cấy vi khuẩn *Vibrio* spp. đã chuẩn bị trước đó vào nước để đạt giá trị mật độ ban đầu của vi khuẩn là 10^5 – 10^6 CFU/mL. Khuấy trộn đều dung dịch trong 30 phút để vi khuẩn thích nghi với môi trường trước khi tiến hành thí nghiệm.

Đối với thí nghiệm hệ thống: Chuẩn bị 15 L nước máy, đã loại bỏ hoàn toàn clo dư bằng cách sục khí trong 24 giờ. Clo dư trong nước máy sẽ được kiểm tra bằng phương pháp đo quang sử dụng *N,N*-diethyl-*p*-phenylenediamine (DPD) với máy đo (H1701, HANNA, Romania) để đảm bảo hoàn toàn không có clo dư trong nước. Bổ sung NaCl để đạt độ mặn 20‰. Bổ sung 15 mL dung dịch nuôi cấy vi khuẩn *Vibrio* spp. đã chuẩn bị trước đó vào nước để đạt giá trị mật độ ban đầu của vi khuẩn là 10^5 – 10^6 CFU/mL. Khuấy trộn đều dung dịch trong 30 phút để vi khuẩn thích nghi với môi trường trước khi tiến hành thí nghiệm.

2.4. Phương pháp bố trí thí nghiệm khử trùng nước bằng H_2O_2

Dung dịch H_2O_2 (với 30% w/w trong H_2O , Merck) được sử dụng để đánh giá khả năng khử trùng của H_2O_2 . Dung dịch gốc được pha loãng trong nước cất để đạt được các nồng độ H_2O_2 khác nhau cho thí nghiệm khử trùng. Sau đó một lượng H_2O_2 được cho vào cốc có chứa 1000 mL nước có độ mặn 20‰ đã được cấy vi khuẩn *Vibrio* spp. (5 – $6 \log_{10}$ CFU/mL). Các cốc được khuấy từ ở nhiệt độ môi trường xung quanh ($29 \pm 1^\circ\text{C}$) trong 60 phút. Mẫu được lấy ở các mốc thời gian 0, 10, 20, 30, 45, và 60 phút để xác định mật độ vi khuẩn trước và sau khử trùng. Dư lượng H_2O_2 trong mẫu được loại bỏ ngay lập tức bằng dung dịch natri thiosulfat pentahydrat 0,1 M ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; Wako), với tỷ lệ 120 μL $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 M /10 mL mẫu. Mỗi thí nghiệm được thực hiện với ba lần lặp lại.

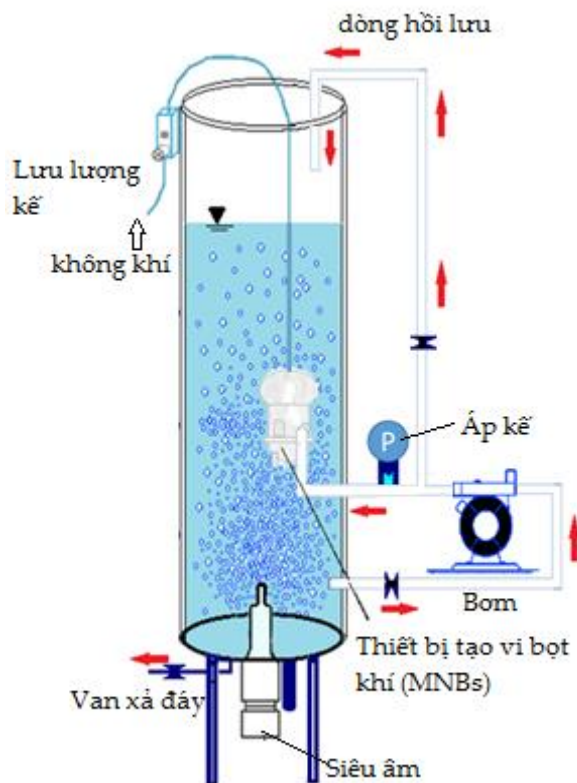
2.5. Thiết bị và phương pháp vận hành hệ thống khử trùng bằng siêu âm, vi bọt khí, và H_2O_2

Thiết bị khử trùng được làm bằng nhựa acrylic trong suốt với tổng thể tích 17,6 L ($D \times H = 192 \times 610$ mm) (Hình 1). Thiết bị này được thiết kế bao gồm một thiết bị tạo MNBs (F.BT 50, Nhật Bản), lưu lượng kế (RK- 1250, KOFLOC Co., Ltd., Nhật Bản), và bơm nước (AP 4500, công suất 50 W). Sóng siêu âm được tạo ra bằng cách sử dụng máy phát sóng siêu âm (JUS01-26, Jetek, Việt Nam) với tần số dao động 28 kHz.

Các thí nghiệm khử trùng được tiến hành dạng mẻ. Trước khi thí nghiệm, thiết bị khử trùng được làm sạch bằng cách rửa sạch nhiều lần bằng nước máy, lau bằng ethanol 70° , sau đó rửa lại bằng 5-10 L mẫu.

15 L mẫu nước đã được chuẩn bị trước đó được bơm vào hệ thống. Trong các thí nghiệm kết hợp, liều lượng H_2O_2 thích hợp đã được thêm vào nước, US và MNBs được bắt đầu ngay sau khi bố

sung H₂O₂ (~ 30 giây). Tiến hành lấy mẫu theo thời gian sau các khoảng thời gian 0, 10, 20, 30, 45, và 60 phút khử trùng. Mẫu nước được lấy tại vị trí van xả đáy (Xem hình 1). Dư lượng H₂O₂ trong mẫu được loại bỏ ngay lập tức bằng dung dịch natri thiosulfat pentahydrat 0,1 M (Na₂S₂O₃ • 5H₂O; Wako), với tỷ lệ 120 µL Na₂S₂O₃ 0,1 M / 10 mL mẫu. Mẫu được phân tích ngay sau thí nghiệm khử trùng. Mỗi thí nghiệm được tiến hành với ba lần lặp lại.



Hình 1. Sơ đồ hệ thống khử trùng

2.6. Phương pháp xử lý số liệu

Đánh giá hiệu quả khử trùng *Vibrio* spp. thông qua số log₁₀ của tỷ lệ vi khuẩn giảm được từ số lượng khuẩn lạc trước và sau xử lý.

$$\text{Log bất hoạt} = \text{Log} (N_t/N_0) \quad (1)$$

Trong đó: N₀ là số khuẩn lạc vi khuẩn *Vibrio* spp. trong mẫu nước ban đầu; N_t là số khuẩn lạc *Vibrio* spp. trong mẫu nước sau xử lý tại thời điểm t.

Giá trị khử trùng cộng hưởng của phương pháp kết hợp MNBs/US/H₂O₂ được tính theo công thức sau [6]:

$$\text{Giá trị cộng hưởng (log bất hoạt)} = \text{Log bất hoạt của phương pháp kết hợp MNBs/US/H}_2\text{O}_2 - (\text{Log bất hoạt của MNBs} + \text{Log bất hoạt của US} + \text{Log bất hoạt của H}_2\text{O}_2) \quad (2)$$

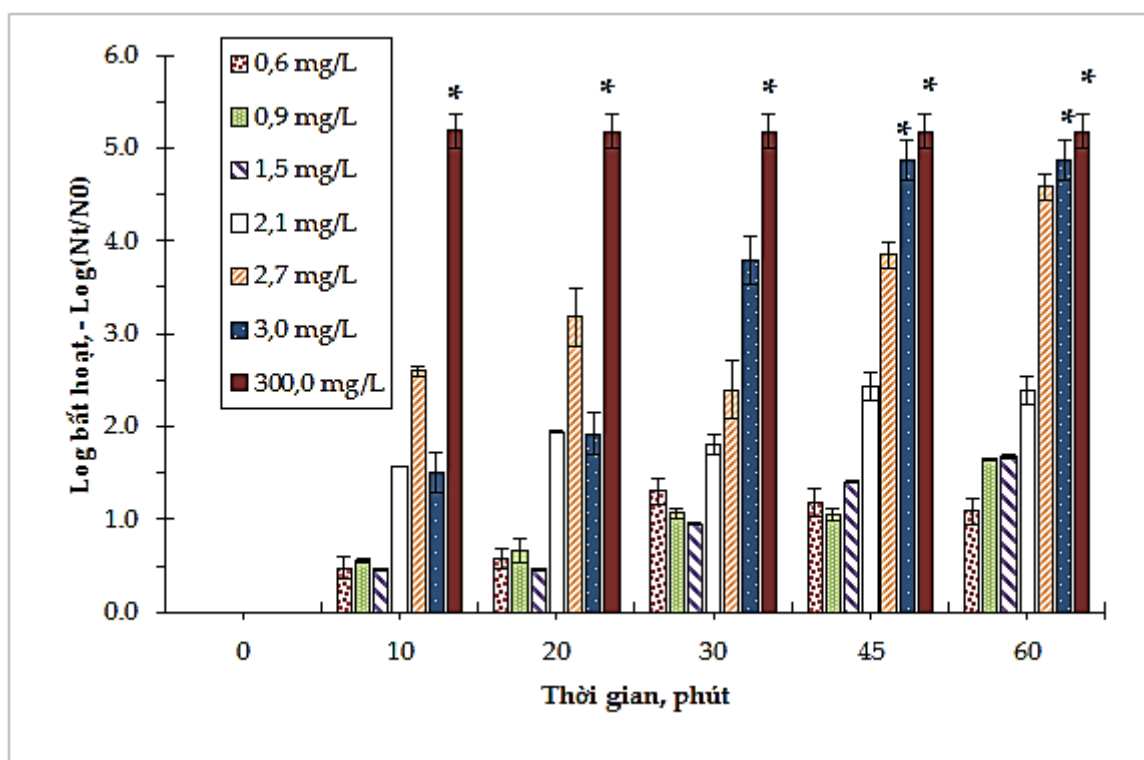
Theo công thức trên, giá trị dương có nghĩa là hiệu quả của phương pháp khử trùng kết hợp lớn hơn tổng hiệu quả của các phương pháp khử trùng đơn lẻ, có nghĩa là tồn tại lợi ích khử trùng cộng hưởng. Giá trị âm phản ánh kết quả ngược lại. Giá trị 0 nghĩa là hiệu quả của phương pháp khử trùng kết hợp bằng tổng hiệu quả của các phương pháp khử trùng đơn lẻ, như vậy sự kết hợp này không có giá trị cộng hưởng.

Kết quả của các thí nghiệm sẽ được tính toán và xử lý bằng Microsoft Excel. Các phân tích thống kê được thực hiện bằng phần mềm R (phiên bản 4.0.5, có tại <http://cran.R-project.org>). Ý nghĩa thống kê được kiểm tra ở mức 5% ($p < 0,05$).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Hiệu quả khử trùng nước của H₂O₂

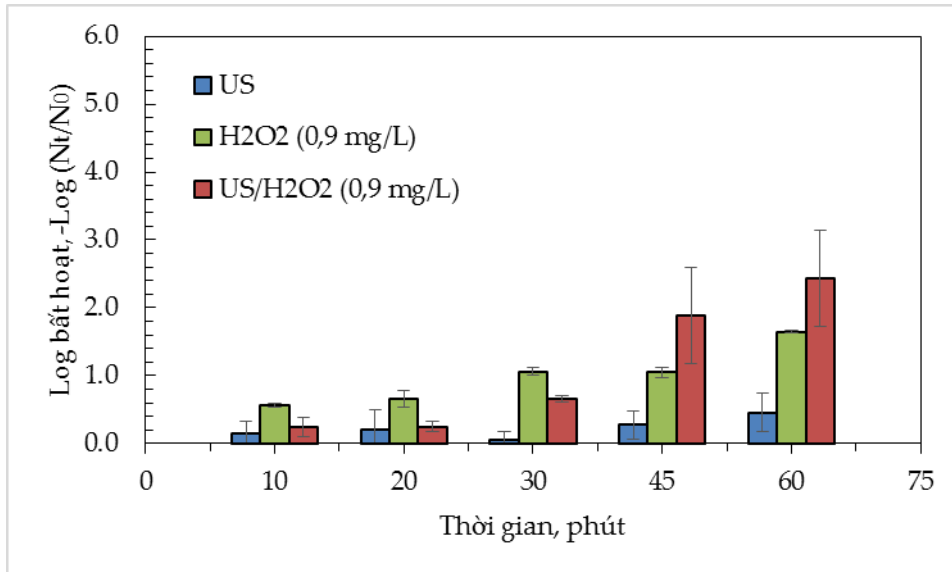
Khử trùng *Vibrio* spp. bằng H₂O₂ được khảo sát theo các nồng độ H₂O₂ tăng dần từ 0,6 đến 300,0 mg/L và kết quả được trình bày ở Hình 2. H₂O₂ là một chất oxy hóa mạnh, hiệu quả khử trùng *Vibrio* spp. tăng lên đáng kể khi tăng nồng độ H₂O₂ và thời gian tiếp xúc. Cụ thể, khi sử dụng H₂O₂ với các nồng độ 0,6; 0,9; 1,5; 2,1 và 2,7 mg/L trong 60 phút đã bất hoạt được lần lượt 1,2; 1,7; 1,7; 2,5 và 4,7 log. Khi tăng nồng độ của H₂O₂ đến 3,0 mg/L đã bất hoạt được hoàn toàn 5,0 log *Vibrio* spp. sau 45 phút. Khi sử dụng H₂O₂ nồng độ 300,0 mg/L đã bất hoạt được hoàn toàn 5,3 log vi khuẩn sau 10 phút. Vì 3,0 mg/L được xác định là liều H₂O₂ hợp lý đối với bất hoạt *Vibrio* spp., liều lượng H₂O₂ thấp hơn (chẳng hạn 0,9 mg/L) được sử dụng để xác định tác dụng cộng hưởng của phương pháp khử trùng kết hợp MNBs/US/H₂O₂.



Hình 2. Hiệu quả bất hoạt *Vibrio* spp. của H₂O₂ với các liều lượng khác nhau (0,6–300,0 mg/L). (Điều kiện thí nghiệm: mật độ vi khuẩn ban đầu là 5–6 log₁₀ (CFU/mL), độ mặn 20‰, nhiệt độ 29 ± 1 °C). Dấu (*) biểu thị cho vi khuẩn đã bị bất hoạt hoàn toàn.

3.2. Khả năng khử trùng nước bằng US và kết hợp US/H₂O₂

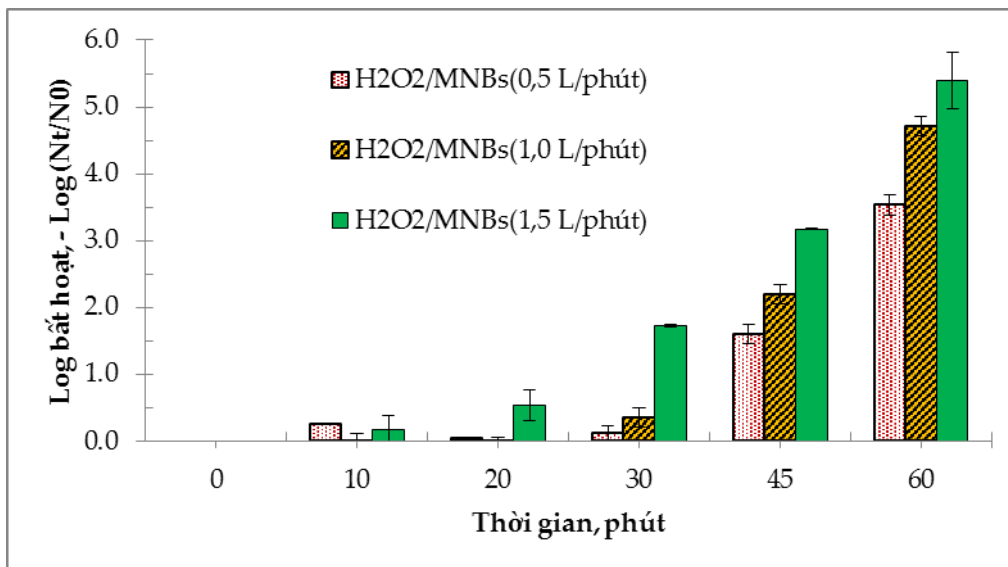
Sử dụng siêu âm với tần số 28 kHz kết hợp liều thấp H₂O₂ (nồng độ 0,9 mg/L; ~ 30% so với liều H₂O₂ cần thiết để bất hoạt hoàn toàn vi khuẩn) để khử trùng *Vibrio* spp. trong thời gian 60 phút, kết quả được trình bày ở Hình 3. Nhìn chung, khử trùng bằng phương pháp kết hợp US (28 kHz)/H₂O₂ (0,9 mg/L) cho hiệu quả cao hơn so với khử trùng bằng US (28 kHz) và H₂O₂ (0,9 mg/L) riêng lẻ. Cụ thể, với mật độ vi khuẩn ban đầu là 5–6 log₁₀ (CFU/mL), khử trùng bằng phương pháp kết hợp US/H₂O₂ (0,9 mg/L) trong 60 phút đã bất hoạt được 2,4 log *Vibrio* spp.; trong khi khử trùng riêng lẻ bằng US và H₂O₂ (0,9 mg/L) chỉ bất hoạt được lần lượt 0,5 và 1,7 log *Vibrio* spp. (Hình 3).



Hình 3. Khả năng bất hoạt *Vibrio* spp. của siêu âm (US) ở tần số 28 kHz và H₂O₂ (0,9 mg/L). (Điều kiện thí nghiệm: mật độ vi khuẩn ban đầu là 5–6 log₁₀ (CFU/mL), độ mặn 20‰, nhiệt độ phòng 29 ± 1 °C).

3.3. Khả năng khử trùng nước bằng H₂O₂ kết hợp với vi bọt khí MNBs

Khả năng khử trùng của phương pháp kết hợp H₂O₂ nồng độ 0,9 mg/L với MNBs ở các tốc độ sục khí thay đổi từ 0,5 L/phút, 1,0 L/phút, và 1,5 L/ phút được đánh giá trong thời gian 60 phút, với mật độ vi khuẩn ban đầu là 5–6 log₁₀ (CFU/mL), và kết quả được trình bày ở Hình 4. Kết quả thực nghiệm cho thấy hiệu quả khử trùng tăng khi tăng tốc độ sục khí. Cụ thể, phương pháp khử trùng kết hợp H₂O₂ (0,9 mg/L)/MNBs (0,5 L/ phút) đã bất hoạt 3,5 log vi khuẩn *E. coli* trong 60 phút. Khi tiếp tục tăng tốc độ sục khí của MNBs lên lần lượt 1,0 L/phút và 1,5 L/phút thì hiệu quả khử trùng tăng tương ứng là 4,7-log và 5,4-log bất hoạt. Trong khi đó, khử trùng bằng H₂O₂ (0,9 mg/L) chỉ bất hoạt được 1,7 log. Ngoài ra, MNBs không có tác dụng khử trùng.



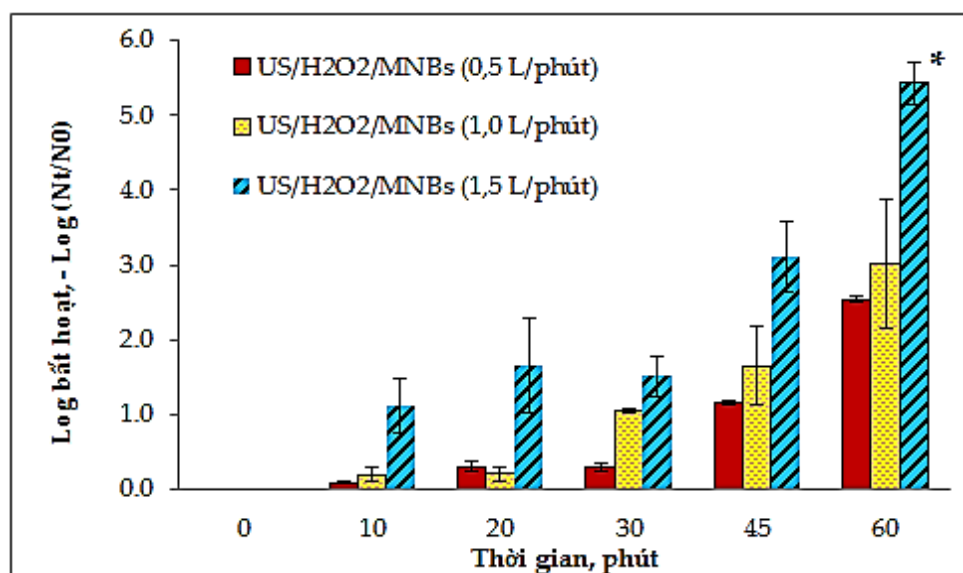
Hình 4. Khả năng bất hoạt *Vibrio* spp. của phương pháp kết hợp H₂O₂ (0,9 mg/L) và vi bọt khí (MNBs) ở các tốc độ sục khí khác nhau (0,5 L/phút, 1,0 L/phút, và 1,5 L/phút). (Điều kiện thí nghiệm: mật độ vi khuẩn ban đầu là 5–6 log₁₀ (CFU/mL), độ mặn 20‰).

3.4. Khả năng khử trùng nước bằng phương pháp kết hợp US/H₂O₂/MNBs (ở các tốc độ sục khí khác nhau)

Khả năng khử trùng của phương pháp kết hợp US ở tần số 28 kHz, H₂O₂ nồng độ 0,9 mg/L, và MNBs ở tốc độ sục khí 0,5-1,5 L/ phút được đánh giá trong thời gian 60 phút, với mật độ vi khuẩn ban đầu là 10⁵ - 10⁶ CFU/mL và kết quả được trình bày ở Hình 5. Kết quả thực nghiệm cho thấy, hiệu quả khử trùng của phương pháp kết hợp US/H₂O₂/MNBs tăng khi tăng tốc độ sục khí. Cụ thể, với các tốc độ sục khí MNBs lần lượt là 0,5 L/phút, 1,0 L/phút, và 1,5 L/phút, hiệu quả bất hoạt *Vibrio* spp. của phương pháp kết hợp MNBs/US/H₂O₂ tương ứng lần lượt là 2,5-log, 3,0-log và 5,4-log (Hình 5).

Đáng chú ý, tất cả các giá trị cộng hưởng của phương pháp khử trùng kết hợp MNBs (0,5 - 1,5 L/ phút)/US/H₂O₂ (0,9 mg/L) đều cho giá trị dương, điều này chứng tỏ hiệu quả của phương pháp khử trùng kết hợp MNBs/US/H₂O₂ là lớn hơn tổng của các phương pháp khử trùng riêng lẻ. Phân tích tương quan Pearson cho thấy mối tương quan thuận giữa giá trị cộng hưởng và tốc độ sục khí ($r = 0,62$ $p = 0.006478$). Cụ thể, các giá trị cộng hưởng của phương pháp khử trùng kết hợp MNBs/US/H₂O₂ (0,9 mg/L) với các tốc độ sục khí 0,5 L/phút, 1,0 L/phút, và 1,5 L/ phút sau 60 phút lần lượt là 0,4-log, 0,9-log, và 3,3-log. Như vậy, sự kết hợp MNBs/US/H₂O₂ mang lại lợi ích cộng hưởng hơn so với các phương pháp khử trùng đơn lẻ, và giá trị cộng hưởng tăng khi tăng tốc độ sục khí của MNBs.

Cơ chế khử trùng của phương pháp kết hợp MNBs/US/H₂O₂ đến nay vẫn chưa được làm rõ, tuy nhiên có thể giải thích như sau: Hiệu quả khử trùng tăng nhẹ khi kết hợp siêu âm với H₂O₂, điều này có thể do sự tác động của siêu âm với hiệu ứng cavitacy xảy ra trong môi trường có kết hợp với H₂O₂ giúp tăng cường sự phân tán của các gốc tự do (như OH•) vào nước [8, 14, 17]; các gốc OH• này được biết là đóng vai trò quan trọng vào hiệu quả khử trùng [14, 15]. Trong nghiên cứu này, việc sử dụng công nghệ tạo vi bọt khí sẽ cho phép chuyển toàn bộ chất lỏng trở thành vô số bọt khí kích thước rất nhỏ giúp chúng tồn tại lâu hơn trong môi trường nước, đồng thời tăng cường sự lưu chuyển nước trong hệ thống; điều này gia tăng rất đáng kể diện tích tiếp xúc khí-nước [6, 9, 10] và tăng cường hoạt tính của các chất khử trùng. Giả thiết rằng sự kết hợp đồng thời US, H₂O₂ và MNBs có thể chuyển hóa vi bọt khí trong nước thành trạng thái plasma phát sinh nhiệt [8, 17] và có áp lực lớn khi nổ tung tạo ra năng lượng, đồng thời tăng cường tạo ra các gốc tự do của H₂O₂ như superoxide (O₂^{-•}) và hydroxyl (•OH) [8, 14, 15, 17]. Các gốc tự do này có hoạt tính rất mạnh, dễ dàng đi qua màng tế bào vi khuẩn *Vibrio* spp, phá hủy cấu trúc màng tế bào và oxy hóa các chất nội bào, và gây chết tế bào [14, 15]. Do vậy, phương pháp khử trùng kết hợp MNBs/US/H₂O₂ sẽ thúc đẩy hoạt lực của H₂O₂ và gia tăng đáng kể hiệu quả khử trùng nước.



Hình 5. Khả năng khử trùng *Vibrio* spp. của phương pháp kết hợp siêu âm (28 kHz), H₂O₂ (0,9 ppm) và MNBs ở các tốc độ sục khí khác nhau (0,5 L/phút, 1,0 L/phút, và 1,5 L/phút). (Điều kiện thí nghiệm: mật độ vi khuẩn ban đầu là 10⁵ - 10⁶ CFU/mL, độ mặn 20‰). Dấu (*) biểu thị cho vi khuẩn đã bị bất hoạt hoàn toàn.

4. KẾT LUẬN

So với khử trùng bằng US hay H₂O₂ đơn lẻ, phương pháp khử trùng bằng phương pháp kết hợp MNBs/US/H₂O₂ đạt hiệu quả xử lý cao hơn rõ rệt. Các kết quả thực nghiệm cho thấy sự kết hợp MNBs/US/H₂O₂ đã tăng đáng kể hiệu quả khử trùng *Vibrio* spp. trong nước và tạo ra các lợi ích cộng hưởng (như rút ngắn thời gian xử lý, giảm lượng hóa chất H₂O₂ sử dụng). Trong khi khử trùng riêng lẻ bằng US hay H₂O₂ chỉ giảm được lần lượt 0,5 log và 1,7 log vi khuẩn sau 60 phút; phương pháp khử trùng kết hợp bằng MNBs/US/ H₂O₂ đã bất hoạt hoàn toàn 5,4 log *Vibrio* spp. trong vòng 60 phút. Bên cạnh đó, giá trị khử trùng cộng hưởng có mối tương quan thuận với tốc độ sục khí ($p < 0,01$). Cụ thể, khi tăng tốc độ sục khí từ 0,5 - 1,5 L/phút, giá trị cộng hưởng tăng từ 0,4-log - 3,3-log. Kết quả của nghiên cứu này hứa hẹn một giải pháp mới nhằm nâng cao hiệu quả khử trùng nước nuôi trồng thủy sản theo hướng thân thiện với môi trường.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Samuel Fuhrimann, Phuc Pham-Duc, Guéladio Cissé, Nguyen Thuy Tram, Hoang Thu Ha, Do Trung Dung, PhamNgoc, Hung Nguyen-Viet, Tuan Anh Vuong, Jürg Utzinger, Christian Schindler, Mirko S. Winkler (2016). Microbial contamination along the main open wastewater and storm water channel of Hanoi, Vietnam, and potential health risks for urban farmers. *Science of the Total Environment* 566–567, 1014–1022.
2. Phạm Đình Đôn (2014). Ô nhiễm môi trường trong nuôi trồng và chế biến thủy sản ở đồng bằng sông Cửu Long. *Tạp chí Môi trường*, 6.
3. Tổng cục Thủy sản, 2022. Diễn biến chất lượng môi trường nước vùng nuôi tôm nước lợ, cá tra trong tháng 3 năm 2022 tại 29 tỉnh đại diện cho 63 tỉnh, thành phố trên cả nước. <https://tongcucthuysan.gov.vn/vi-vn/nu%C3%B4i-tr%E1%BB%93ng-th%E1%BB%A7y-s%E1%BA%A3n/qu%E1%BA%A3n-l%C3%BD-m%C3%B4i-tr%E1%BB%9Dng/doc-tin/017279/2022-04-29/dien-bien-chat-luong-moi-truong-nuoc-vung-nuoi-tom-nuoc-lo-ca-tra-trong-thang-3-nam-2022-tai-29-tinh-dai-dien-cho-63-tinh-thanh-pho-tren-ca-nuoc> (Truy cập lúc 11:30 ngày 07/5/2022).
4. Liu W., Yanmei Z., Christopher C., Dongsheng, W. (2011). Formation of disinfection byproducts in typical Chinese drinking water. *Journal of Environmental Sciences*. 23(6) 897-903.
5. Von Gunten U. (2003). Ozonation of drinking water: part II. Disinfection and byproduct formation in presence of bromide, iodide or chlorine. *Water Research*. 37, 1469–1487.
6. Dang, T.-L.T., Imai, T., Le, T.V., Nguyen, D.M.K., Higuchi, T., Yamamoto, K., Kanno, A. & Sekine, M. (2016). Synergistic effect of pressurized carbon dioxide and sodium hypochlorite on the inactivation of *Enterococcus* sp. in seawater. *Water Research*. 106, 204-213.
7. Tsolaki, E., & Diamadopoulos, E. (2010). Technologies for ballast water treatment: a review. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 85(1), 19–32.
8. Carpenter, J., Badve, M., Rajoriya, S., George, S., Saharan, V. K., & Pandit, A. B. (2017). Hydrodynamic cavitation: An emerging technology for the intensification of various chemical and physical processes in a chemical process industry. *Reviews in Chemical Engineering*. 33(5), 433–468. <https://doi.org/10.1515/revce-2016-0032>.
9. Amidou Samie (2017). *Escherichia coli - Recent Advances on Physiology, Pathogenesis and Biotechnological Applications*. ISBN 978-953-51-3329-2. InTech, Croatia.
10. Takahashi, M., Shirai, Y., Sugawa, S. (2021). Free-radical generation from bulk nanobubbles in aqueous electrolyte solutions: ESR spin-trap observation of microbubble-treated water. *Langmuir*. 37 (16), 5005-5011.
11. Dang, T.-L.T., Le, T.V., Harada, H., Duong, V.H., Pham, K.L., Duong, T.C. (2020). Enhancement of water disinfection efficiency using UV radiation with the aid of a liquid-film-forming device. *Vietnam Journal of Science and Technology*. 58 (3A), 203-210.

12. Le Van Tuan, Dang Thi Thanh Loc, Tran Thi Thuy Linh, Truong Quy Tung, Hidenari Yasui, Shigeo Fujii. (2020). Performance of ultrasonic wave and H₂O₂ as an advanced oxidation process in pre-treatment of landfill leachate using aerated biofilter. *Vietnam Journal of Science and Technology*. 58 (5A), 1-9.
13. Ortuño, C., Quiles, A., & Benedito, J. (2014). Inactivation kinetics and cell morphology of *E. coli* and *S. cerevisiae* treated with ultrasound-assisted supercritical CO₂. *Food Research International*, 62, 955–964. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.05.012>
14. Antoniadis, A., Poullos, I., Nikolakaki, E., & Mantzavinos, D. (2007). Sonochemical disinfection of municipal wastewater. *Journal of Hazardous Materials*. 146(3), 492–495. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.04.065>
15. Gao, S., Hemar, Y., Ashokkumar, M., Paturel, S., & Lewis, G. D. (2014). Inactivation of bacteria and yeast using high-frequency ultrasound treatment. *Water Research*. 60, 93–104. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.04.038>
16. Kevin C. Failor, Bruce Silver Westin Yu, Jason E. Heind. (2022). Biofilm disruption and bactericidal activity of aqueous ozone coupled with ultrasonic dental scaling. *JADA Foundational Science*. 1(C) 100003.
17. J.A. Gallego-Jua' rez, K.F. Graff. (2015). Introduction to power ultrasonics. *Power Ultrasonics*. 1–6. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-1-78242-028-6.00001-6>.

INACTIVATION OF *VIBRIO* SPP. IN WATER USING MICRO-NANO-BUBBLES, ULTRASOUND, AND HYDROGEN PEROXIDE

ABSTRACT

Recently, the development of water disinfection technology that does not generate chemical residues or by-products is attracting much research interest. This study presents the results of *Vibrio* spp. disinfection using a combination treatment of micro-nano-bubbles (MNBs), ultrasound (US), and hydrogen peroxide (H₂O₂). Bactericidal performance of the combined treatment was conducted at various conditions of H₂O₂ dosages and airflow rates. The results show that with H₂O₂ added at ~30% of a normal H₂O₂ (dose required for sufficient disinfection by H₂O₂ alone), disinfection efficiency of the combined MNBs/US/H₂O₂ treatment was greatly enhanced and higher than that of individual treatments (US, H₂O₂). Specifically, under treatment conditions (initial bacterial density of 10⁵ – 10⁶ CFU/mL and salinity of 20‰), the combined treatment of MNBs (1.5 L/min)/US (28 kHz)/ H₂O₂ (0.9 mg/L) achieved a synergy value of 3.3-log and completely inactivation (5.4-log reduction) of *Vibrio* spp. within 60 min. Meanwhile, disinfection with H₂O₂ (0.9 mg/L) led to only 1.7 log reduction, and disinfection with US (28 kHz, 100 W) reduced only 0.5-log within 60 min. These results promise an alternative method for brackish water disinfection applications such as aquaculture water treatment.

Keywords: Water disinfection, *Vibrio* spp. inactivation, H₂O₂, ultrasound, micro-nano-bubbles.

Lê Văn Tuấn, Tiến sĩ, Khoa Môi trường, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế, 77 Nguyễn Huệ, Huế, Việt Nam. Điện thoại: 0905009669. Email: levantuan@hueuni.edu.vn

Đặng Thị Thanh Lộc (*Corresponding author*), Tiến sĩ, Khoa Môi trường, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế, 77 Nguyễn Huệ, Huế, Việt Nam. Điện thoại: 0914050514. Email: dangthithanhloc@hueuni.edu.vn

Nguyễn Văn Hoàng, học viên cao học ngành Khoa học Môi trường, Khoa Môi trường, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế, 77 Nguyễn Huệ, Huế, Việt Nam. Điện thoại: 0981642940. Email: vanhoang.vatlieu@gmail.com