

PHÂN LẬP VÀ NHẬN DIỆN VI KHUẨN CHUYÊN HÓA NITƠ TỪ CHẤT THẢI TRẠI NUÔI BÒ SỮA, CHẤT THẢI SỮA VÀ ỨNG DỤNG TRONG XỬ LÝ NƯỚC THẢI NHÀ MÁY SẢN XUẤT SỮA

Bùi Thế Vinh¹, Hà Thanh Toàn² và Cao Ngọc Diệp³

ABSTRACT

Forty-seven bacterial isolates were isolated from thirteen solid and wastewater samples from the milk factories, the cow-milk stations and cow-milk farms. Among 47 isolates, most of them had ammonium-oxidizing and nitrate-reducing abilities and 02/47 isolates (LV1&TR3) were the best bacterial isolates at 700mM. These two isolates were chosen to sequence randomly by automatic sequencer, DNA sequencing were compared with GenBank database of NCBI by BLAST N software; the results showed that LV1 isolate was 99% of the identify with *Arthrobacter mysorens* 16S rRNA, *Arthrobacter protophormiae* 16S rRNA, *Arthrobacter mysorens* strain DSM 12798 16S rDNA and *Arthrobacter* sp. WBF35 16S rDNA; TR3 isolate was 99% of the identify with *Acinetobacter calcoaceticus* strain PVAS6 16S rRNA, *Acinetobacter* sp. SH-94B 16S rRNA, *Acinetobacter calcoaceticus* 16S rRNA. Applying of two isolates (LV1&TR3) in dairy industry wastewater treatment, the results showed that they reduced ammonium level from initial concentration of 20 mg/l to below 5 mg/l, 99.90% nitrate concentration and 27.63% Chemical Oxygen Demand (COD) after 2 days.

Keywords: ammonium-oxidation, cow-milk sludge, dairy wastewater, nitrate-reduction, PCR-16S rRNA

Title: Isolation and identification of nitrogen removal bacteria from cow-milk farm, dairy sludge and their applications in dairy industry wastewater treatment

TÓM TẮT

Từ 13 mẫu chất thải từ trại nuôi bò sữa, chất trạm thu mua sữa bò, nhà máy sữa, phân lập được 47 dòng vi khuẩn đa số có khả năng oxy hóa ammonium và khử nitrat và 02/47 dòng vi khuẩn (LV1 và TR3) có khả năng oxy hóa ammonium và khử nitrat tốt nhất ở nồng độ 700 mM. Kết quả giải trình tự đoạn 16S rDNA của 2 dòng vi khuẩn LV1 và TR3 cho thấy dòng LV1 có tỉ lệ tương đồng với vi khuẩn *Arthrobacter mysorens* 16S rRNA, *Arthrobacter protophormiae* 16S rRNA, *Arthrobacter mysorens* chủng DSM 12798 16S rDNA và *Arthrobacter* sp. WBF35 16S rDNA là 99% và dòng TR3 có mức tương đồng với vi khuẩn *Acinetobacter calcoaceticus* dòng PVAS6 16S rRNA, *Acinetobacter* sp. SH-94B 16S rRNA, *Acinetobacter calcoaceticus* 16S rRNA là 99%. Ứng dụng hai dòng vi khuẩn LV1 và TR3 vào quá trình xử lý nước thải nhà máy sản xuất sữa, kết quả cho thấy chúng làm giảm ammonium từ nồng độ ban đầu 20 mg/l xuống dưới 5 mg/l; COD và NO₃⁻ lần lượt là 27,63% và 99,90%, sau 2 ngày.

Từ khóa: chất thải trại nuôi bò sữa, khử nitrat, nước thải nhà máy sữa, oxy hóa ammonium, PCR-16S rRNA

¹ Nhà máy sữa Vinamilk Cần Thơ

² Trường Đại học Cần Thơ

³ Viện Nghiên cứu và phát triển Công nghệ sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

1 GIỚI THIỆU

Giống như các ngành công nghiệp sản xuất các sản phẩm từ nông nghiệp khác, công nghiệp sữa sinh ra nước thải với các đặc trưng là hàm lượng BOD (nhu cầu oxy sinh hóa) và COD (nhu cầu oxy hóa học) cao. Nước thải nhà máy sản xuất sữa (nhà máy sữa) sữa chứa sữa hoặc các sản phẩm từ sữa được pha loãng với nước (tải chất hữu cơ lớn gồm carbohydrat, chất béo, protein (chứa nitơ, photpho,...) các thành phần của chất vệ sinh, tẩy rửa (NaOH, HNO₃,...) từ quá trình vệ sinh thiết bị, đường ống vận chuyển,... Khi các dòng thải của nhà máy sữa được đưa vào trong tự nhiên, chúng sẽ là nguồn phân phát chính các chất hữu cơ (Demirel *et al.*, 2005). Trong các thành phần của nước thải nhà máy sữa, các thành phần chứa nitơ, photpho được chú ý nhiều nhất vì nitơ và photpho kiểm soát quá trình phát triển bùng nổ của tảo ở các ao hồ, lượng nitơ và photpho quá mức gây nên quá trình phú dưỡng làm giảm chất lượng nước, ảnh hưởng đến đời sống động vật, thực vật nước,... (Oldham *et al.*, 2002). Thành phần nước thải thay đổi hàng giờ, ngày và mùa nên quá trình xử lý rất phức tạp. Người ta sử dụng các phương pháp hóa lý và sinh học để xử lý nước thải nhà máy sữa. Tuy nhiên, do chi phí các thuốc thử cao và quá trình loại bỏ COD hòa tan kém trong các quá trình xử lý hóa lý nên các quá trình xử lý sinh học thường được ưu tiên. Quá trình xử lý nước thải nhà máy sữa bằng phương pháp sinh học có thể áp dụng quy trình xử lý hiếu khí hoặc kỵ khí (Demirel *et al.*, 2005). Do đó vấn đề sử dụng các vi sinh vật có ích trong tự nhiên, đặc biệt là vi khuẩn có khả năng khử nitơ (oxy hóa ammonium, khử nitrat) là điều cần quan tâm và nghiên cứu để giải quyết vấn đề ô nhiễm môi trường nước. Vì vậy, việc phân lập các dòng vi khuẩn có khả năng chuyển hóa nitơ ở mức cao và ứng dụng vào trong xử lý nước thải nhà máy sữa là rất cần thiết trong tình hình hiện nay.

2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu

Mười ba mẫu chất thải rắn và lỏng (11 mẫu lỏng và 2 mẫu rắn) thu nhận từ 6 chuồng bò ở Cần Thơ, Đồng Tháp, Vĩnh Long, Tiền Giang, Sóc Trăng, trạm thu mua sữa bò tại thành phố Hồ Chí Minh và nhà máy sữa Vinamilk Cần Thơ.

2.2 Phân lập và kiểm tra khả năng khử nitơ của vi khuẩn khử nitơ

Tiến hành phân lập vi khuẩn khử nitơ trên môi trường tối thiểu [minimal] (Sikorski *et al.*, 2002). Đối với mẫu chất thải rắn: cân 1 g mẫu chất thải rắn cho vào bình tam giác 250 ml chứa 99 ml nước cất vô trùng, đập bình bằng nút bông gòn và giấy dầu. Đem các bình tam giác đã pha loãng lắc trong 30 phút, ở tốc độ 120 vòng/phút. Sau đó rút 1 ml cho vào ống nghiệm chứa 9 ml nước cất vô trùng khuấy mạnh trên máy khuấy (vortex), pha loãng tiếp đến tỉ lệ 10⁻⁴ hoặc 10⁻⁵. Đối với mẫu chất thải lỏng: pha loãng đến tỉ lệ 10⁻² hoặc 10⁻³. Hút lần lượt 30-40μl mẫu nước và mẫu rắn đã pha loãng rồi nhỏ lên bề mặt đĩa petri có môi trường tối thiểu, dùng que trải mẫu phân phối dịch mẫu trải đều khắp mặt thạch, mở nắp đĩa để khô trong khoảng 5-10 phút với ngọn lửa đèn cồn trong tủ cấy. Đĩa môi trường đã trải mẫu được ủ ở 30°C trong tủ ủ vi sinh vật từ 24-48 giờ để vi khuẩn phát triển thành khuẩn lạc. Chọn và cấy chuyển nhiều lần từ các khuẩn lạc riêng rẽ để tách ròng (làm thuần) các dòng (chủng) vi khuẩn.

Từ các dòng vi khuẩn đã ròng, tiến hành nuôi cấy trên môi trường tối thiểu có bổ sung ammonium và nitrat ở dạng hợp chất (NH_4Cl , NaNO_3) ở các nồng độ 400, 500, 600 và 700 mM nhằm kiểm tra khả năng oxy hóa ammonium và khử nitrat của các dòng vi khuẩn trên. Chọn hai dòng vi khuẩn có khả năng khử NH_4^+ và NO_3^- tốt nhất ở nồng độ 700 mM để thực hiện thí nghiệm tiếp theo.

2.3 Nhận diện các dòng vi khuẩn khử nitơ bằng kỹ thuật PCR

Sử dụng hai dòng vi khuẩn có khả năng oxy hóa ammonium và khử nitrat tốt nhất ở nồng độ 700 mM để nhân mật số trên môi trường LB (Maniatis *et al.*, 1982), DNA vi khuẩn được trích theo qui trình của Neumann *et al.* (1992); phản ứng PCR được thực hiện để nhân đoạn DNA 16S rRNA với cặp mồi tổng là 8F và 1492R. Giải trình tự đoạn DNA bằng máy giải trình tự tự động ABI 3130 với 1 trong 2 cặp mồi trên, so sánh trình tự trên ngân hàng dữ liệu (GenBank) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) bằng chương trình BLAST N để xác định mức độ đồng hình của các dòng vi khuẩn.

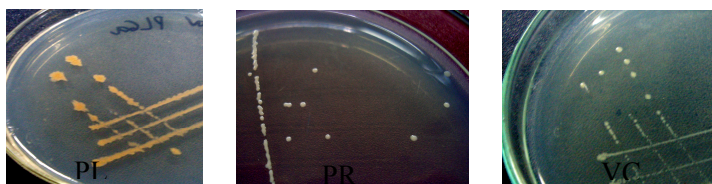
2.4 Xử lý nước thải nhà máy sữa

Nhân nuôi hai dòng vi khuẩn có khả năng oxy hóa ammonium và khử nitrat tốt nhất ở nồng độ 700 mM trong môi trường BM/ NO_3^- (Su *et al.*, 2001) đã khử trùng trong bình tam giác 250 ml đặt trên máy lắc ở nhiệt độ phòng. Sau 24-36 giờ, mật số vi khuẩn trong mỗi bình đạt khoảng $10^7 \div 10^9$ CFU/ml được sử dụng cho thí nghiệm.

Đánh giá khả năng xử lý nước thải nhà máy sữa của hai dòng vi khuẩn trên bằng cách: Đo nồng độ ammonium trong nước thải sữa, sau đó bổ sung thêm ammonium vào để đạt nồng độ khoảng 20, 30, 40, 50 mg/l, sau đó cho nước thải vào các chai nước suối nhỏ với thể tích 400 ml/chai. Chủng 5% dịch vi khuẩn vào các chai nước suối chứa nước thải sữa, lắc đều và để ở nhiệt độ phòng. Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, 3 lần lặp lại. Xác định hàm lượng COD, NO_3^- , NH_4^+ của nước thải trước và sau 48 giờ xử lý.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Kết quả phân lập và đánh giá khả năng khử nitơ của các dòng vi khuẩn phân lập



Hình 1: Khuẩn lạc của một số dòng vi khuẩn phát triển trên môi trường tối thiểu

Phân lập được 47 dòng vi khuẩn từ 13 mẫu chất thải. Đa số khuẩn lạc các dòng vi khuẩn phân lập đều có dạng tròn, màu trắng đục, mô, bìa nguyên, kích thước 0,2-2 mm và khi bảo quản ở 4°C thường phát triển đặc tính nhầy. Hầu hết 47 dòng phát triển trên môi trường tối thiểu có hình que ngắn, có khả năng chuyển động. Hình 1

cho thấy hình ảnh khuẩn lạc của một số dòng vi khuẩn phát triển trên môi trường tối thiểu (dòng PL6, PR4, VC).

Kết quả kiểm tra sự phát triển của 47 dòng vi khuẩn phân lập được trên môi trường tối thiểu có bổ sung NH_4^+ , NO_3^- cho thấy đa số các dòng vi khuẩn phân lập (46/47) được phát triển trên cả hai môi trường bổ sung NH_4^+ , NO_3^- (có khả năng oxy hóa ammonium và khử nitrat). Ở nồng độ 400mM, có 46/47 dòng phát triển trên cả hai môi trường. Ở nồng độ 500mM, mức độ phát triển của các dòng vi khuẩn lúc này giảm hẳn, chỉ có 36/47 dòng vi khuẩn phát triển trên cả hai môi trường, các dòng phát triển tốt như LV1, LV2a1, LV3, 3b7b, TR3. Khảo sát tiếp 36/47 dòng vi khuẩn trên ở nồng độ 600mM, có 19/47 dòng có khả năng phát triển trên cả hai môi trường. Ở nồng độ 700mM, khả năng phát triển của các dòng vi khuẩn giảm rõ rệt (Bảng 1), có 04/47 dòng (PR7b, LV1, OM5, TR3) phát triển trên cả hai môi trường, trong đó 2 dòng LV1 và TR3 có khả năng khử nitrat mạnh nhất. Chọn 2 dòng LV1 và TR3 để thực hiện thí nghiệm tiếp theo.

Bảng 1: Khả năng phát triển của các dòng vi khuẩn trên môi trường tối thiểu bổ sung 700 mM NH_4^+ , NO_3^-

TT	Dòng vi khuẩn	Môi trường	
		NH_4^+	NO_3^-
1	VC17c	+	-
2	VC18	+	-
3	VC19	-	+
4	VC22	-	+
5	VC33	-	+
6	VC35	+	-
7	PR7a	+	-
8	PR7b	+	+
9	LV1	+	++
10	LV3	-	+
11	OM5	+	+
12	OM10	-	+
13	BT1	-	+
14	BT2	-	+
15	SL5	-	+
16	3b4b	-	+
17	3b7b	-	+
18	TR2	-	+
19	TR3	+	++

(-): không phát triển; (+): phát triển yếu; (++) : phát triển trung bình; (+++): phát triển khá; (++++): phát triển tốt

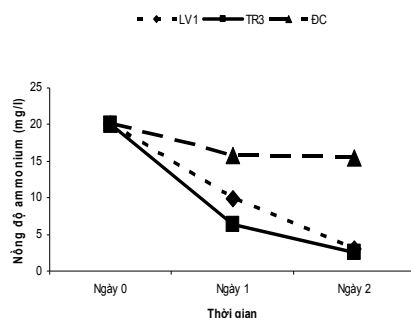
3.2 Nhận diện dòng vi khuẩn LV1 và TR3

Hình 2 thể hiện kết quả điện di sản phẩm PCR của hai dòng vi khuẩn LV1 và TR3. Kết quả giải trình tự đoạn 16S rRNA của 2 dòng vi khuẩn LV1 và TR3 cho thấy dòng LV1 có tỉ lệ tương đồng với vi khuẩn *Arthrobacter mysorens* 16S rRNA, *Arthrobacter protophormiae* 16S rRNA, *Arthrobacter mysorens* chủng DSM 12798 16S rRNA và *Arthrobacter* sp. WBF35 16S rRNA là 99% và dòng TR3 có mức tương đồng với vi khuẩn *Acinetobacter calcoaceticus* dòng PVAS6 16S rRNA, *Acinetobacter* sp. SH-94B 16S rRNA, *Acinetobacter calcoaceticus* 16S rRNA là 99% (Hình 3 và Hình 4).

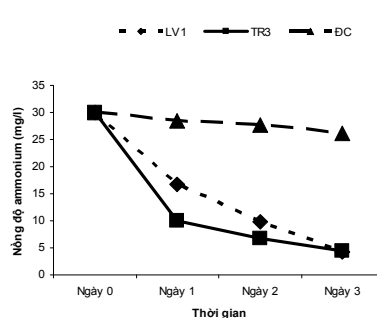
3.3 Xử lý nước thải nhà máy sữa

3.3.1 Khả năng oxy hóa ammonium trong nước thải nhà máy sữa của hai dòng vi khuẩn LV1 và TR3

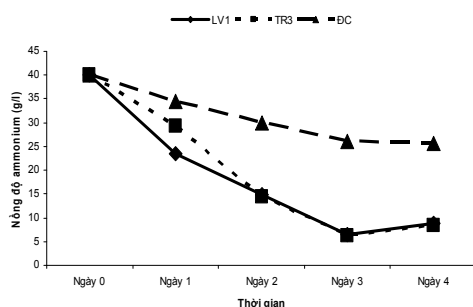
Kết quả xử lý ammonium trong nước thải nhà máy sữa với nồng độ ban đầu lần lượt là 20, 30, 40 và 50 mg/l của hai dòng vi khuẩn LV1 và TR3 sau 48 giờ thể hiện ở Hình 5, Hình 6, Hình 7 và Hình 8. Cả hai dòng vi khuẩn LV1 và TR3 có khả năng oxy hóa ammonium trong nước thải nhà máy sữa. Thời gian xử lý càng dài khi nồng độ ammonium trong nước thải sữa càng nhiều. Ở nồng độ ammonium 20 mg/l, nồng độ ammonium trong nước thải xuống dưới 5 mg/l (đạt loại A, TCVN 5945 : 2005) chỉ sau hai ngày xử lý. Ở nồng độ ammonium 30 mg/l, mất 3 ngày xử lý để nồng độ ammonium trong nước thải đạt loại A. Ở nồng độ ammonium 40 mg/l, mất 3 ngày để nồng độ ammonium trong nước thải đạt < 10 mg/l. Và ở nồng độ 50 mg/l, sau 4 ngày xử lý, nồng độ ammonium vẫn cao hơn 10 mg/l.



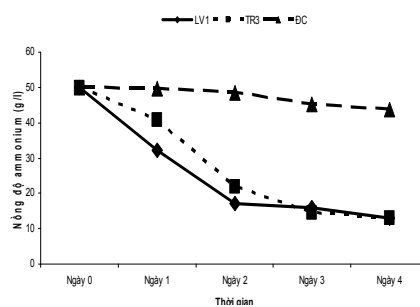
Hình 5: Khả năng xử lý ammonium trong nước thải nhà máy sữa của hai dòng vi khuẩn LV1, TR3 với nồng độ ammonium ban đầu 20 mg/l



Hình 6: Khả năng xử lý ammonium trong nước thải nhà máy sữa của hai dòng vi khuẩn LV1, TR3 với nồng độ ammonium ban đầu 30 mg/l



Hình 7: Khả năng xử lý ammonium trong nước thải nhà máy sữa của hai dòng vi khuẩn LV1, TR3 với nồng độ ammonium ban đầu 40 mg/l



Hình 8: Khả năng xử lý ammonium trong nước thải nhà máy sữa của hai dòng vi khuẩn LV1, TR3 với nồng độ ammonium ban đầu 50 mg/l

3.3.2 Khả năng làm giảm COD và loại bỏ NO_3^- trong nước thải nhà máy sữa của hai dòng vi khuẩn LV1 và TR3 sau 48 giờ

Kết quả thể hiện trên Bảng 2 cho thấy khả năng loại bỏ COD và NO_3^- trong nước thải nhà máy sữa sau 48 giờ của hai dòng vi khuẩn LV1 và TR3. Tỷ lệ loại bỏ COD của hai dòng vi khuẩn là 27,63%, thấp hơn mẫu đối chứng (34,21%). Trong

khi đó, tỉ lệ loại bỏ NO_3^- của dòng vi khuẩn LV1, TR3 và LV1+TR3 rất cao (>99%), đặc biệt là dòng LV1 (không phát hiện), chứng tỏ hai dòng vi khuẩn này có khả năng khử nitrat rất tốt.

Bảng 2: Kết quả xử lý nước thải nhà máy sữa của các dòng vi khuẩn sau 48 giờ

	Thí nghiệm							
	Đối chứng		LV1		TR3		LV1+TR3	
	COD (mgO_2/L)	NO_3^- (mg/L)	COD (mgO_2/L)	NO_3^- (mg/L)	COD (mgO_2/L)	NO_3^- (mg/L)	COD (mgO_2/L)	NO_3^- (mg/L)
Trước xử lý	243,2	89,49	243,2	89,49	243,2	89,49	243,2	89,49
Sau xử lý	160	49,83	176	KPH	176	0,22	216	0,09
Tỉ lệ giảm(%)	34,21	44,32	27,63	100	27,63	99,75	11,18	99,90

KPH: không phát hiện

4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Từ 13 mẫu chất thải từ trại nuôi bò sữa, chất trạm thu mua sữa bò, nhà máy sữa, phân lập được 47 dòng vi khuẩn. Trong đó, hai dòng vi khuẩn LV1 và TR3 có khả năng oxy hóa ammonium và khử nitrat tốt nhất ở nồng độ 700 mM. Kết quả giải trình tự đoạn 16S rDNA của 2 dòng vi khuẩn LV1 và TR3 cho thấy dòng LV1 có tỉ lệ tương đồng với vi khuẩn *Arthrobacter mysorens* 16S rRNA, *Arthrobacter protophormiae* 16S rRNA, *Arthrobacter mysorens* chủng DSM 12798 16S rDNA và *Arthrobacter* sp. WBF35 16S rDNA là 99% và dòng TR3 có mức tương đồng với vi khuẩn *Acinetobacter calcoaceticus* dòng PVAS6 16S rRNA, *Acinetobacter* sp. SH-94B 16S rRNA, *Acinetobacter calcoaceticus* 16S rRNA là 99%. Ứng dụng hai dòng vi khuẩn LV1 và TR3 vào trong xử lý nước thải nhà máy sữa, chúng làm giảm ammonium từ nồng độ ban đầu 20 mg/l xuống dưới 5 mg/l và tỉ lệ loại bỏ COD, NO_3^- lần lượt là 27,63% và 99,90%, sau 2 ngày.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Demirel, B., O. Yenigun and T.T. Onay. 2005. Anaerobic treatment of dairy wastewaters: a review. *Process Biochemistry*, 40, pp. 2583-2595.
- Maniatis T., E.F. Fritsch and J. Sambrook. 1982. *Molecular Cloning*, pp.61 - 444.
- Neumann B, Pospiech A and Schairrer HU. 1992. Rapid isolation of genomic DNA from Gram - negative bacteria. *Trends Genet* 8: 332-333.
- Oldham, W.K. and B. Rabinowitz. 2002. Development of biological nutrient removal technology in western Canada. *Journal of Environmental Engineering*, 1, pp.33-43.
- Sikorski, J., M. Möhle and W. Wackernagel. 2002. Identification of complex composition, strong strain diversity and directional selection in local *Pseudomonas stutzeri* population from marine sediment and soils. *Environmental Microbiology*, 4(8), pp.465-476.
- Su, J.J., B.Y. Liu and Y.C. Chang. 2001. Identifying an interfering factor on chemical oxygen demand (COD) determination in piggery wastewater and eliminating the factor by an indigenous *Pseudomonas stutzeri* strain. *Applied Microbiology*, 33(6), pp.440-444.