

PHÂN LẬP, NHẬN DIỆN VI KHUẨN TÍCH LŨY POLYPHOSPHAT TỪ CHẤT THẢI TRẠI NUÔI BÒ SỮA, CHẤT THẢI SỮA VÀ ỨNG DỤNG TRONG XỬ LÝ NƯỚC THẢI

Bùi Thế Vinh¹, Hà Thanh Toàn² và Cao Ngọc Diệp³

ABSTRACT

Forty-eight bacterial isolates were isolated from thirteen solid and wastewater samples from the milk factories, the cow-milk stations and cow-milk farms. Among 48 isolates, 15 isolates had polyphosphate-accumulating capabilities. Two isolates (LV1&LV8b) had the high polyphosphate-accumulating abilities. These two polyphosphate-accumulating bacterial 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 100% of the identify with *Arthrobacter protophormiae* 16S rDNA and *Arthrobacter* sp. MIT8B14 16S rDNA; LV8b isolate was 100% of the identify with *Bacillus megaterium* strain PPB7 MB7 16S rDNA, strain PPB5 16S rDNA, strain 2008724130 16S rDNA. Applying of two isolates in artificial wastewater treatment with initial concentration PO_4^{3-} [orthophosphate] 9 ÷ 11 mg/l, LV1 isolate reduced down 1.11 mg/l, LV8b isolate decreased down 3.42 mg/l, combined LV1&LV8b reduced to 2.38 mg/l after 3 days.

Keywords: dairy wastewater, isolation, orthophosphate, PAOs (Polyphosphate-Accumulating Organisms), poly-P

Title: Isolation and identification of Polyphosphate - Accumulating Organisms (PAOs) in dairy, cow-milk farms sludge and their applications in wastewater treatment

TÓM TẮT

Từ 13 mẫu chất thải từ trại nuôi bò sữa, trạm thu mua sữa bò, nhà máy sữa, phân lập được 48 dòng vi khuẩn, trong đó có 15/48 dòng vi khuẩn có khả năng tích lũy polyphosphate (poly-P). Hai dòng vi khuẩn LV1 (-5,98 ppm) và LV8b (11,61 ppm) có khả năng tích lũy poly-P cao. Kết quả giải trình tự đoạn 16S rDNA của 2 dòng vi khuẩn LV1 và LV8b cho thấy dòng LV1 có tỉ lệ tương đồng với vi khuẩn *Arthrobacter protophormiae* 16S rDNA và *Arthrobacter* sp. MIT8B14 16S rDNA là 100% và dòng LV8b có mức tương đồng với vi khuẩn *Bacillus megaterium* dòng PPB7 MB7 16S rDNA, dòng PPB5 16S rDNA, dòng 2008724130 16S rDNA là 100%. Ứng dụng hai dòng vi khuẩn LV1 và LV8b vào trong xử lý nước thải nhân tạo có hàm lượng PO_4^{3-} [orthophosphate] ban đầu từ 9 ÷ 11 mg/l, dòng LV1 làm giảm hàm lượng PO_4^{3-} xuống còn 1,11 mg/l, dòng LV8b làm giảm hàm lượng PO_4^{3-} xuống còn 3,42 mg/l, hai dòng kết hợp làm giảm hàm lượng PO_4^{3-} xuống còn 2,38 mg/l sau 3 ngày xử lý.

Từ khóa: nước thải sữa, orthophosphate, phân lập, poly-P, vi khuẩn tích lũy polyphosphate

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

Hiện nay, tốc độ đô thị hóa nhanh cùng với sự phát triển mạnh mẽ của lĩnh vực chăn nuôi, các ngành công nghiệp như chế biến thực phẩm, chế biến các sản phẩm sinh học... tạo ra số lượng lớn chất thải rắn, nước thải. Các chất thải, nước thải đưa ra môi trường sẽ gây ảnh hưởng xấu đến môi trường sống. Trong chất thải, nước thải có rất nhiều thành phần như polysaccharide, các hợp chất nitơ hữu cơ và vô cơ, photpho,... trong đó, photpho đã được nhận ra là phân tử cơ bản của sự sống, quan trọng trong việc kiểm soát sự phát triển của tảo và các loại thực vật nước trên các dòng sông, các hồ và các vịnh nông gần bờ. Dòng thải photpho xuất phát từ nước thải đô thị và nước thải công nghiệp đưa vào trong nguồn nước bề mặt làm tăng thêm quá trình phú dưỡng ở các hồ, ao... làm giảm lượng oxy trong nước ảnh hưởng xấu đến đời sống của động vật nước, làm giảm giá trị sử dụng của nước (Oldham *et al.*, 2002; Jiang *et al.*, 2004).

Người ta có thể loại bỏ photpho trong các dòng nước thải có thể bằng phương pháp hóa học hoặc phương pháp sinh học hoặc kết hợp phương pháp hóa học với sinh học. Trong phương pháp hóa học, sử dụng vôi, các muối $FeCl_3$, $FeSO_4$,... để ngưng kết các hợp chất chứa photpho. Các phương pháp hóa học có nhược điểm là chi phí cao do sử dụng nhiều hóa chất, tăng lượng bùn thải, hóa chất còn sót lại trong dòng thải sau xử lý có thể gây ô nhiễm thứ cấp (Jiang *et al.*, 2004). Hiện nay, biện pháp hữu hiệu nhất để xử lý nước thải nói chung và khử photpho ra khỏi nước thải nói riêng là biện pháp sinh học vì biện pháp sinh học hiệu quả cao và triệt để hơn so với biện pháp hóa học, đồng thời không gây tái ô nhiễm môi trường, ngoài ra chi phí đầu tư ít nhất (Chu Thị Thơm *et al.*, 2006). Do đó vấn đề sử dụng vi sinh vật có ích trong tự nhiên, đặc biệt là vi khuẩn có khả năng tích lũy poly-P và nghiên cứu để giải quyết vấn đề ô nhiễm môi trường nước và biện pháp sinh học thường dựa vào sự tích lũy photpho nội bào của vi khuẩn sẽ làm cho lân hòa tan [orthophotphat] trong môi trường giảm và chuyển hóa thành lân khó tan [poly-P]. Vì vậy việc nghiên cứu, phân lập, nhận diện và ứng dụng vi khuẩn tích lũy poly-P vào trong xử lý nước thải 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 (11 mẫu lỏng, 2 mẫu rắn) thu nhận từ 6 trại nuôi bò sữa ở Cần Thơ, Vĩnh Long, Đồng Tháp, Tiền Giang; 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 tích lũy poly-P của các dòng vi khuẩn

Quá trình phân lập vi khuẩn được thực hiện theo phương pháp của Cao Ngọc Diệp và Nguyễn Hữu Hiệp (2002). Lấy các dòng vi khuẩn phân lập được từ các mẫu chất thải trên môi trường tối thiểu (Sikorski *et al.*, 2002) đem cấy trên môi trường khử lân (Wang *et al.*, 2008) (20 g/l glucose; 0,02 g/l pepton; 37,5 mg/l KH_2PO_4 ; 0,02 g/l NH_4Cl ; 0,01 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,005 g/l $CaCl_2$; 0,5 ml/l dung dịch vết kim loại (1,5 g/l $FeCl_3 \cdot 6H_2O$; 0,15 g/l H_3BO_3 ; 0,03 g/l $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; 0,18 g/l KI; 0,12 g/l $MnCl_2 \cdot 4H_2O$; 0,06 g/l $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$; 0,12 g/l $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,15 g/l $CoCl_2 \cdot 6H_2O$; 10,0 g/l EDTA)). Sau đó, chọn những dòng có khả năng phát triển

trên môi trường khử lân và cấy chuyển nhiều lần từ các khuẩn lạc riêng lẻ để tách dòng (làm thuần) các dòng (chủng) vi khuẩn trên môi trường tương ứng. Để kiểm tra nhanh khả năng hình thành poly-P của các dòng vi khuẩn phát triển trên môi trường khử lân, các dòng vi khuẩn này được cấy trên môi trường lân khó tan (Nautiyal, 1999) với chất chỉ thị pH (Bromothymol blue 0,5%), quan sát trong 2 đợt, mỗi đợt 2 ngày, lặp lại 2 lần (không phát triển hoặc phát triển nhưng không hòa tan lân (không tạo vòng halo) trên môi trường lân khó tan). Đồng thời để kiểm tra sự hình thành poly-P của các dòng vi khuẩn này, các dòng vi khuẩn này được nuôi trong môi trường khử lân (lông) trong 15 ngày trên máy lắc xoay vòng, sau đó tiến hành đo hàm lượng poly-P trong dung dịch vi khuẩn tại phòng thí nghiệm Chuyên Sâu, trường Đại Học Cần Thơ (Cao Ngọc Điệp *et al.*, 2010). Mẫu đối chứng không bổ sung vi khuẩn (đối chứng âm).

2.3 Nhận diện các dòng vi khuẩn tích lũy poly-P bằng kỹ thuật PCR

Chọn 2 dòng vi khuẩn vi khuẩn có khả năng tích lũy poly-P (1 dòng có kết quả đo poly-P cao nhất, 1 dòng có kết quả đo poly-P thấp nhất) 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 môi tổng là 8F và 1492R. Giải trình tự đoạn DNA bằng máy giải trình tự tự động ABI 3130 với một trong hai môi 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 Ứng dụng hai dòng có khả năng tích lũy poly-P cao vào trong xử lý nước thải

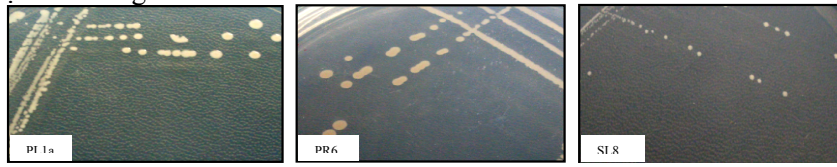
Nuôi nhân mật số hai dòng đã chọn [trình bày ở phần trên] trong môi trường BM/NO₃⁻ (Su *et al.*, 2001) đến khi đạt được mật số tương đối đồng đều là 10⁷ - 10⁸ CFU/ml (khoảng 48 giờ), sau đó ly tâm lạnh và lấy sinh khối chuyển sang môi trường tối thiểu (Sikorski *et al.*, 2002) nhân nuôi tiếp 24 giờ nữa. Tiến hành bố trí thí nghiệm khảo sát khả năng tích lũy poly-P của các dòng này trên môi trường nước thải nhân tạo (Wang *et al.*, 2008) được điều chỉnh nồng độ PO₄³⁻ khoảng 9 - 11 mg/l chứa trong các keo nhựa [có dung tích 5-L], liều lượng vi khuẩn sử dụng là 5% (kết hợp hai dòng vi khuẩn thì mỗi dòng sẽ chủng 2,5%). Nghiệm thức đối chứng không bổ sung vi khuẩn. Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, 3 lần lặp lại ở điều kiện nhiệt độ tự nhiên của phòng thí nghiệm, các nghiệm thức có chủng vi khuẩn được sục khí để tạo điều kiện hiếu khí xen kẽ kỵ khí, nghiệm thức đối chứng không sục khí, thời gian sục khí 2 giờ/ngày, lưu lượng khí trên mỗi bình khoảng 10 lít/phút. Xác định các thông số như hàm lượng PO₄³⁻, mật số vi khuẩn trong nước thải, hàm lượng poly-P trong môi trường (đo hàm lượng poly-P tại phòng thí nghiệm Chuyên Sâu, trường Đại Học Cần Thơ).

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Kết quả phân lập vi khuẩn và kiểm tra khả năng tích lũy poly-P

Phân lập được 48 dòng vi khuẩn trên môi trường tối thiểu từ 13 mẫu chất thải, đa số các dòng vi khuẩn có khuẩn lạc hình tròn, mô, bìa nguyên, màu trắng sữa hay trong, vi khuẩn có hình dạng que ngắn, chuyển động chậm. Kết quả kiểm tra khả

năng phát triển của 48 dòng vi khuẩn này trên môi trường nuôi cấy vi khuẩn khử lân và môi trường lân khó tan nhằm tìm ra các dòng có khả năng tích lũy poly-P thể hiện trên bảng 1.



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

Bảng 1: Tổng hợp kết quả khả năng phát triển của vi khuẩn trên môi trường nuôi cấy vi khuẩn khử lân và trên môi trường lân khó tan

TT	Dòng vi khuẩn	A	B	Dòng được chọn	TT	Dòng vi khuẩn	A	B	Dòng được chọn
1	VC7b	VC7b			25	LV2a1		LV2a1	
2	VC8b	VC8b			26	LV2a2		LV2a2	
3	VC12b		VC12b		27	LV3		LV3	
4	VC17a	VC17a			28	LV4a		LV4a	
5	VC17b	VC17b			29	LV5	LV5	LV5	*
6	VC17c	VC17c			30	LV8b	LV8b	LV8b	*
7	VC18	VC18			31	OM4		OM4	
8	VC19	VC19			32	OM5	OM5		
9	VC21		VC21		33	OM6	OM6	OM6	*
10	VC22	VC22			34	OM10	OM10		
11	VC33	VC33			35	OM12		OM12	
12	VC35	VC35			36	OM13		OM13	
13	PR1b		PR1b		37	BT1	BT1		
14	PR4	PR4	PR4	*	38	BT2	BT2		
15	PR5	PR5	PR5	*	39	BT3	BT3	BT3	*
16	PR6	PR6	PR6	*	40	BT5		BT5	
17	PR7a		PR7a		41	BT12	BT12	BT12	*
18	PR7b		PR7b		42	SL3		SL3	
19	PR7c		PR7c		43	SL5	SL5	SL5	*
20	PL1a	PL1a	PL1a	*	44	SL8	SL8	SL8	*
21	PL3a	PL3a	PL3a	*	45	3b4b	3b4b		
22	PL6a	PL6a	PL6a	*	46	3b7b	3b7b		
23	PL6b		PL6b		47	TR2	TR2		
24	LV1	LV1	LV1	*	48	TR3	TR3	TR3	*

(A) Dòng được chọn khi kiểm tra trên môi trường nuôi cấy vi khuẩn khử lân; (B) Dòng được chọn khi kiểm tra trên môi trường lân khó tan; (*) Dòng được chọn khi giao giữa A và B

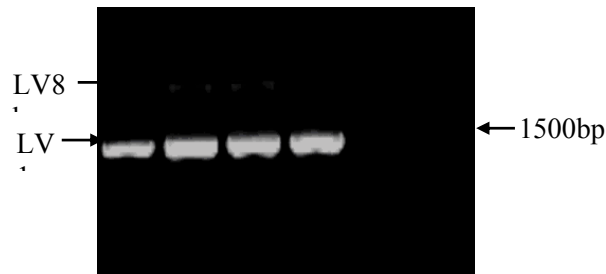
Sau khi kiểm tra, chọn được 15 dòng vi khuẩn có khả năng tích lũy poly-P (PR4, PR5, PR6, PL1a, PL3a, PL6a, LV1, LV5, LV8b, OM6, BT3, BT12, SL5, SL8, TR3) (Bảng 2), đa số các dòng vi khuẩn phát triển chậm (36 giờ), khuẩn lạc vi khuẩn tròn, nhỏ, mô, bìa nguyên, màu trắng sữa hay trong, vi khuẩn có hình dạng que ngắn, chuyển động chậm (Bảng 2). Có 04/15 dòng vi khuẩn tích lũy poly-P tương đối cao trong môi trường gồm LV8b (11,61 ppm), PR5 (10,36 ppm), SL5 (10,10 ppm) và OM6 (10,00 ppm) (so với đối chứng âm); 06/15 dòng vi khuẩn tích lũy poly-P cao hơn so với đối chứng âm (SL8, PR6, PR4, BT3, PL1a, LV5); và lượng poly-P trong môi trường của 05/15 dòng vi khuẩn (LV1, BT12, PL3a, PL6a, TR3) thấp hơn đối chứng âm (hình thành poly-P trong nội bào vi khuẩn, Cao Ngọc Diệp *et al.*, (2010)). Chọn hai dòng vi khuẩn LV8b (poly-P cao nhất) và LV1 (poly-P thấp nhất) để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo sau.

Bảng 2: Sự tích lũy poly-P của 15 dòng vi khuẩn trong môi trường

Số TT	Dòng vi khuẩn	Kết quả đo poly-P (ppm)	Số TT	Dòng vi khuẩn	Kết quả đo poly-P (ppm)
1	OM6	10,00	9	PR6	9,01
2	SL5	10,10	10	BT3	3,79
3	SL8	9,20	11	BT12	-5,02
4	LV1	-5,98	12	PL1a	0,51
5	LV5	0,31	13	PL3a	-1,73
6	LV8b	11,61	14	PL6a	-2,60
7	PR4	8,66	15	TR3	-2,28
8	PR5	10,36	16	ĐC	0,00

Ghi chú: Kết quả trên được đo tại PTN Chuyên sâu, Đại học Cần Thơ

3.2 Nhận diện các dòng vi khuẩn LV1 và LV8b có khả năng tích lũy poly-P cao



Hình 2: Phổ điện di sản phẩm PCR được nhân lên từ DNA của hai dòng vi khuẩn LV1 và LV8b

Hình 2 cho thấy Phổ điện di sản phẩm PCR được nhân lên từ DNA của hai dòng vi khuẩn LV1 và LV8b. Kết quả giải trình tự đoạn 16S rDNA của 2 dòng vi khuẩn LV1 và LV8b cho thấy dòng LV1 có tỉ lệ tương đồng với vi khuẩn *Arthrobacter protophormiae* 16S rDNA và *Arthrobacter* sp. M1T8B14 16 SrDNA là 100% và

dòng LV8b có mức tương đồng với vi khuẩn *Bacillus megaterium* dòng PPB7 MB7 16S rDNA, dòng PPB5 16S rDNA, dòng 2008724130 16S rDNA là 100%.

3.3 Khả năng chuyển hóa PO_4^{3-} trong nước thải nhân tạo của hai dòng vi khuẩn LV1 và LV8b

3.3.1 Khả năng chuyển hóa PO_4^{3-} trong điều kiện sục khí 2 giờ/ngày

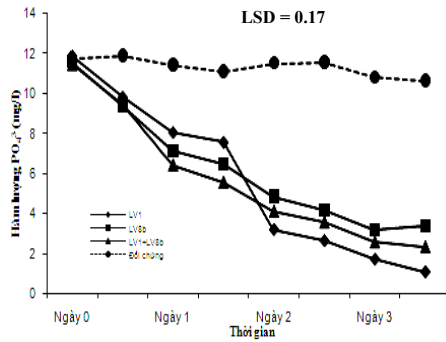
Kết quả trên hình 3 cho thấy: Hàm lượng PO_4^{3-} trong các mẫu nước thải giảm dần theo thời gian ở các nghiệm thức có bổ sung các dòng vi khuẩn LV1, LV8b và kết hợp LV1 với LV8b vào nước thải để xử lý. Sau 3 ngày xử lý, hàm lượng PO_4^{3-} trong nước thải < 4 mg/l (đạt loại A, TCVN 5945 : 2005) ở tất cả các nghiệm thức có bổ sung vi khuẩn, trong khi đó nghiệm thức đối chứng (không chủng vi khuẩn) có hàm lượng PO_4^{3-} vẫn ở mức cao (10,67 mg/l).

Đối với dòng LV1: Qua 2 ngày xử lý thì hàm lượng PO_4^{3-} đã đạt tiêu chuẩn nước thải loại A (< 4 mg/l). Tốc độ chuyển hóa PO_4^{3-} trong nước thải xảy ra nhanh nhất vào khoảng thời gian 24 giờ đến 46 giờ (hàm lượng PO_4^{3-} giảm từ 7,57 mg/l xuống còn 2,67 mg/l), sau đó hàm lượng PO_4^{3-} vẫn tiếp tục giảm dần theo thời gian, từ mẫu nước thải ban đầu có hàm lượng PO_4^{3-} là 11,86 mg/l sau 3 ngày xử lý với dòng LV1 thì hàm lượng PO_4^{3-} chỉ còn ở mức 1,11 mg/l.

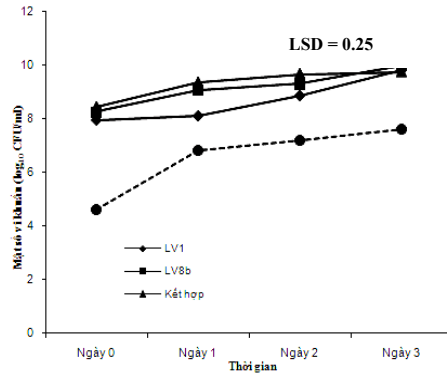
So với dòng vi khuẩn LV1, tốc độ chuyển hóa PO_4^{3-} trong nước thải của dòng vi khuẩn LV8b yếu hơn. Tuy nhiên, dòng LV8b vẫn có thể chuyển hóa PO_4^{3-} trong nước thải, hàm lượng PO_4^{3-} trong nước thải đạt tiêu chuẩn nước thải loại B (< 6 mg/l) sau 2 ngày xử lý và đạt tiêu chuẩn nước thải loại A sau 3 ngày. Cụ thể, sau 2 ngày xử lý, từ nước thải ban đầu có hàm lượng PO_4^{3-} là 11,58 mg/l giảm xuống chỉ còn 4,19 mg/l (đạt loại tiêu chuẩn nước thải loại B), đến ngày thứ 3 thì dòng LV8b làm giảm hàm lượng PO_4^{3-} xuống còn 3,42 mg/l (đạt tiêu chuẩn nước thải loại A).

Sự kết hợp hai dòng LV1 và LV8b cho kết quả tương đối tốt, từ nước thải ban đầu với hàm lượng PO_4^{3-} là 11,5 mg/l, sau 1 ngày xử lý đã đạt nước thải loại B (5,6 mg/l) và sau 2 ngày thì đạt nước thải loại A (3,61 mg/l). Tuy nhiên, sự kết hợp không mang lại kết quả đột biến khi giá trị về hàm lượng PO_4^{3-} của nghiệm thức kết hợp từ ngày thứ 2 trở về sau gần như nằm giữa giá trị về hàm lượng PO_4^{3-} của hai nghiệm thức LV1 và LV8b. Sự kết hợp giữa hai dòng có thể mang lại hiệu quả cao khi mục tiêu xử lý chỉ cần đạt tiêu chuẩn nước thải loại B và không có nhiều thời gian để xử lý. Lúc đó chỉ cần 1 ngày để xử lý và cho ra nước thải loại B.

Kết quả trên Hình 4 cho thấy: Mật số vi khuẩn ở các nghiệm thức được chủng dịch vi khuẩn vào thời điểm ban đầu trong khoảng 7,96 – 8,46 \log_{10} CFU/ml, riêng nghiệm thức đối chứng 4,63 \log_{10} CFU/ml. Mật số vi khuẩn của cả 4 nghiệm thức đều tăng qua từng ngày. Sau 3 ngày mật số của nghiệm thức LV8b là cao nhất (9,98 \log_{10} CFU/ml) và mật số của nghiệm thức đối chứng là thấp nhất.

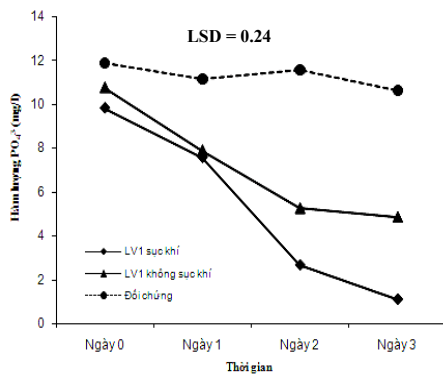


Hình 3: Khả năng chuyển hóa PO₄³⁻ trong nước thải của các dòng vi khuẩn tích lũy poly-P trong điều kiện sục khí 2 giờ/ngày

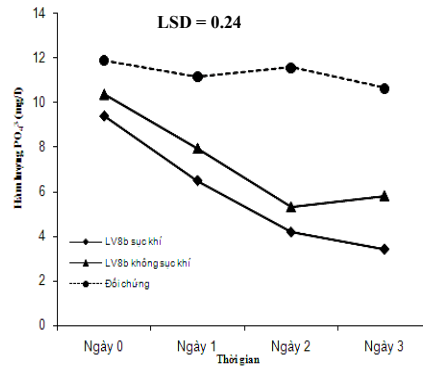


Hình 4: Sự biến động mật số vi khuẩn theo thời gian (log₁₀CFU/ml) trong điều kiện có sục khí 2 giờ/ngày

3.3.2 So sánh khả năng chuyển hóa PO₄³⁻ trong điều kiện không sục khí và có sục khí (2 ngày/giờ)



Hình 5: Khả năng chuyển hóa PO₄³⁻ của dòng vi khuẩn LV1



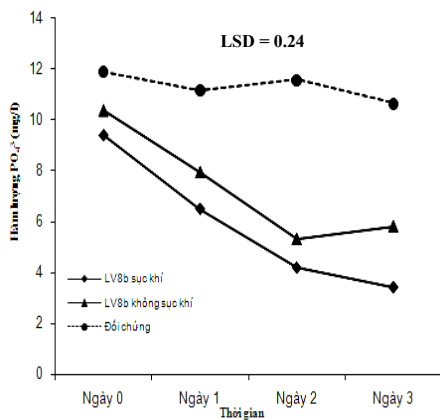
Hình 6: Khả năng chuyển hóa PO₄³⁻ của dòng vi khuẩn LV8b

Việc sục khí đối với dòng vi khuẩn LV1 mang lại hiệu quả cao: Không có sục khí thì nước thải đạt tiêu chuẩn nước thải loại B sau 2 - 3 ngày xử lý, có sục khí thì nước thải đạt tiêu chuẩn nước thải loại A sau 2 ngày xử lý (Hình 5).

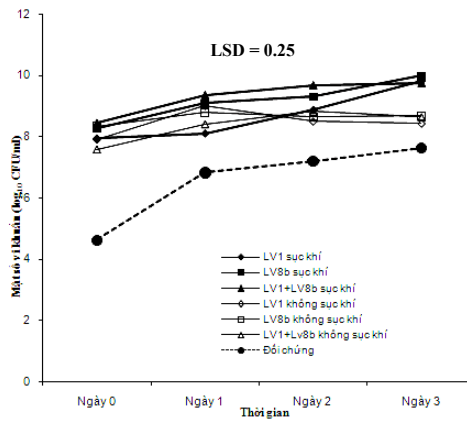
Tương tự dòng LV1, đối với dòng vi khuẩn LV8b: Trong trường hợp có sục khí thì hiệu quả chuyển hóa PO₄³⁻ tốt hơn, hàm lượng PO₄³⁻ giảm nhanh hơn. Cụ thể, sau 3 ngày xử lý: nước thải đạt tiêu chuẩn loại A (có sục khí), tiêu chuẩn loại B (không sục khí) (Hình 6).

Đối với hai dòng kết hợp thì hiệu quả của việc sục khí vẫn tương tự. Cụ thể: không sục khí thì sau 2, 3 ngày đạt được tiêu chuẩn loại B, trong khi đó có sục khí thì chỉ sau 1 ngày xử lý đã đạt tiêu chuẩn loại B và sau 2, 3 ngày thì đạt tiêu chuẩn loại A (Hình 7).

Tác dụng của việc sục khí đến mật số vi khuẩn: Các nghiệm thức có sục khí thì mật số vi khuẩn sẽ tăng lên theo thời gian, nếu không có sục khí thì mật số vi khuẩn chỉ tăng nhanh trong ngày đầu tiên sau đó có dấu hiệu tăng chậm hơn và thậm chí còn giảm xuống, điều này có thể giải thích vì khi sục khí sẽ giúp vi khuẩn tiếp xúc với chất dinh dưỡng dễ dàng hơn, vi khuẩn phát triển tốt hơn (Hình 8).



Hình 7: Khả năng chuyển hóa PO_4^{3-} của hai dòng vi khuẩn LV1 + LV8b



Hình 8: Ảnh hưởng của quá trình sục khí lên mật số vi khuẩn

3.3.3 Kết quả định lượng poly-P trong nước thải sau xử lý

Tiến hành định lượng poly-P trong các mẫu nước thải nhân tạo sau 3 ngày xử lý có sục khí. Kết quả thể hiện trong Bảng 3:

Bảng 3: Kết quả định lượng polyphosphate

Nghiệm thức	Hàm lượng poly-P (mg/l)
LV1	26,75
LV8b	26,31
LV1+LV8b	25,56
Đối chứng	7,87

Ghi chú: Kết quả trên được đo tại PTN Chuyên sâu, Đại học Cần Thơ

Bảng 3 cho thấy cả hai dòng vi khuẩn LV1 và LV8b đều có khả năng tích lũy lượng poly-P cao trong môi trường, 3 nghiệm thức có chủng vi khuẩn vào nước thải có hàm lượng poly-P gần tương đương nhau và cao hơn nhiều so với nghiệm thức đối chứng (số dĩ hàm lượng poly-P của các nghiệm thức vi khuẩn cao hơn nghiệm thức đối chứng do các dòng vi khuẩn có khả năng tích lũy poly-P từ orthophosphate trong môi trường và lượng poly-P có trong tế bào vi khuẩn). Điều này chứng tỏ cả hai dòng vi khuẩn LV1 và LV8b đều có khả năng tích lũy poly-P mạnh, có thể ứng dụng vào thực tiễn xử lý nước thải. Trong đó, dòng LV1 là dòng tốt hơn và rất có tiềm năng trong việc xử lý những nguồn nước thải giàu photpho.

4 KẾT LUẬN

Phân lập được 48 dòng vi khuẩn từ 13 mẫu chất thải trên môi trường tối thiểu. Có 15/48 dòng vi khuẩn có khả năng tích lũy poly-P. Hai dòng vi khuẩn LV1 và LV8b

có khả năng tích lũy poly-P cao. Kết quả giải trình tự đoạn 16S rDNA của 2 dòng vi khuẩn LV1 và LV8b cho thấy dòng LV1 có tỉ lệ tương đồng với vi khuẩn *Arthrobacter protophormiae* 16S rDNA và *Arthrobacter* sp. MIT8B14 16 SrDNA là 100% và dòng LV8b có mức tương đồng với vi khuẩn *Bacillus megaterium* dòng PPB7 MB7 16S rDNA, dòng PPB5 16S rDNA, dòng 2008724130 16S rDNA là 100%. Ứng dụng hai dòng vi khuẩn LV1 và LV8b vào trong xử lý nước thải nhân tạo có hàm lượng PO_4^{3-} ban đầu từ 9 ÷ 11 mg/l, dòng LV1 làm giảm hàm lượng PO_4^{3-} xuống còn 1,11 mg/l, dòng LV8b làm giảm hàm lượng PO_4^{3-} xuống còn 3,42 mg/l, hai dòng kết hợp làm giảm hàm lượng PO_4^{3-} xuống còn 2,37 mg/l sau 3 ngày xử lý.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Cao Ngọc Diệp, Khổng Thị Thu Vân, Bùi Thế Vinh. 2010. Phân lập và nhận diện vi khuẩn tích lũy poly-P trong nước rỉ rác. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 8(3A), pp 915-922.
- Cao Ngọc Diệp và Nguyễn Hữu Hiệp. 2002. *Thực tập vi sinh vật đại cương*. Viện Nghiên Cứu và Phát Triển Công Nghệ Sinh Học, Trường Đại Học Cần Thơ.
- Chu Thị Thơm, Phan Thị Lài và Nguyễn Văn Tô. 2006. *Cải Tạo Môi Trường Bằng Chế Phẩm Vi Sinh Vật*, Nxb Lao Động.
- Jiang, F., M.B. Beck, R.G Cummings, K. Rowles and D. Russell, D. 2004. Estimation Of Costs Of Phosphorus Removal In Wastewater Treatment Facilities: Construction *De Novo*. *Water Policy Working Paper #2004- 010*, pp.1-28.
- Oldham, W.K. and B. Rabinowitz. 2002. Development of biological nutrient removal technology in western Canada. *Journal of Environmental Engineering*, 1, pp.33-43.
- Maniatis T., E.F. Fritsch and J. Sambrook. 1982. *Molecular Cloning*, pp.61 - 444.
- Nautiyal, C. S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters* 170, pp. 265-270.
- 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.
- Wang, D.B, X.M. Li, Q. Yang, G.M. Zeng, D.X. Liao and J. Zhang. 2008. Biological phosphorus removal in sequencing batch reactor with single-stage oxic process. *Bioresource Technology*, 99(13), pp.5466-5473.