

TỐI ƯU HÓA KHẢ NĂNG TỔNG HỢP CHẤT KẾT TỤ SINH HỌC CỦA CHỦNG VI KHUẨN *BACILLUS SUBTILIS* PRO.01.C VÀ THỬ NGHIỆM XỬ LÝ NƯỚC THẢI SAU CHẾ BIẾN SỮA ĐẬU NÀNH

Lê Thị Loan¹, Cao Ngọc Diệp²

TÓM TẮT

Nước thải từ các cơ sở sữa đậu nành vẫn còn chứa một lượng lớn chất hữu cơ nhất là lượng protein trong sữa còn lại sẽ gây ô nhiễm nước nên cần phải được xử lý trước khi thải ra môi trường. Chất kết tụ sinh học (biofloculants) là một hợp chất cao phân tử được tổng hợp trong quá trình phát triển của các vi sinh vật. Chúng có tác dụng nhanh chóng và an toàn cho con người và môi trường nên được nghiên cứu và ứng dụng để xử lý nước thải. Chúng vi khuẩn *Bacillus subtilis* PRO.01.C được phân lập từ mẫu nước thải cơ sở sản xuất hũ tiêu Mỹ Tho ở tỉnh Tiền Giang, có khả năng tổng hợp chất kết tụ sinh học với thành phần môi trường tối ưu gồm tinh bột (1,00%), urea (0,05%), KCl (0,25%) ở pH 6 cho tỷ lệ kết tụ 46,37% với dung dịch kaolin sau 60 phút để lắng, bổ sung dung dịch CaCl₂ và 0,2% dịch nuôi sinh khối vi khuẩn. Ứng dụng chúng vi khuẩn này trong xử lý nước thải sau chế biến sữa đậu nành đã làm giảm các chỉ số BOD₅, chỉ số TSS, chỉ số nitơ tổng, chỉ số photpho tổng và hàm lượng amonium lần lượt là 6,68%, 18,34%, 6,69%, 9,37% và 87,8% so với chỉ số ban đầu. Chỉ tiêu photpho tổng, nitơ tổng, hàm lượng amoni và pH nước thải đạt tiêu chuẩn A của quy chuẩn QCVN₄₀/2011/BTNMT.

Từ khóa: *Bacillus subtilis*, nguồn carbon, nguồn nitrogen, kết tụ sinh học, nước thải cơ sở chế biến sữa đậu nành, PH.

1. GIỚI THIỆU

Ngày nay sữa là 1 trong những loại thức ăn cần thiết cho con người. Sữa đậu nành là 1 trong những nguồn sữa thực vật không thua kém gì về mặt dinh dưỡng so với sữa động vật, chính vì vậy sữa đậu nành là nguồn dinh dưỡng phong phú cho tất cả các loại vi sinh vật trong đất phát triển, nhất là nguồn protein sữa hay còn gọi là casein, gây ra mùi lười thối (Pouilleute *et al.*, 2010).

Công nghệ kết tụ (Flocculation technology) đã được sử dụng rộng rãi trong lĩnh vực xử lý nước thải, đặc biệt là trong công đoạn tiền xử lý của nhiều hệ thống xử lý nước thải, ưu điểm của quá trình này là đầu tư cơ sở hạ tầng nhỏ và thời gian xử lý ngắn. Trong đó, chất kết tụ sinh học (biofloculant) là sản phẩm của hợp chất cao phân tử được hình thành trong quá trình phát triển của vi sinh vật (Shih *et al.*, 2001). Vi khuẩn tổng hợp chất kết tụ sinh học là những loài vi khuẩn có khả năng sử dụng các chất dinh dưỡng trong môi trường để tổng hợp các hợp chất đa phân tử trong tế bào có khả năng tạo sự kết tụ

với các chất khác nhau hình thành một khối nhầy lắng xuống đáy và hợp chất được tiết ra ngoài môi trường hoặc trên bề mặt tế bào vi khuẩn.

Trong xử lý nước thải, chất kết tụ sinh học có nguồn gốc từ vi sinh vật được sử dụng để xử lý nước thải từ xí nghiệp nhuộm (Zang *et al.*, 2002; Deng *et al.*, 2005), các chất lơ lửng vô cơ (bentonite, đất sét, Ca(OH)₂, aluminum oxide) (Shih *et al.*, 2001; Yim *et al.*, 2007), acid humic (Zoubouhs *et al.*, 2004) và các chất lơ lửng khác (Salehzadeh *et al.*, 2000). Sự kết tụ các vật chất này giúp làm giảm các chỉ tiêu như COD và một phần độ đục của nước thải trước khi được xử lý bằng phương pháp khác (Gang *et al.*, 2008). Trong nghiên cứu này, bài báo trình bày kết quả tối ưu hóa các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả kết tụ sinh học của dòng vi khuẩn *Bacillus subtilis* PRO.01.C và ứng dụng trong xử lý nước thải các cơ sở chế biến sữa đậu nành thông qua xác định các chỉ tiêu BOD₅ và TSS, hàm lượng nitơ tổng, hàm lượng photpho tổng (P) và hàm lượng amonium trong thành phần nước thải.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Sử dụng dòng vi khuẩn *Bacillus subtilis* PRO.01.C phân lập từ nước thải của các cơ sở sản

¹ NCS chuyên ngành Vi sinh vật học, Trường Đại học Cần Thơ

² Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

xuất hủ tiêu ở Mỹ Tho, tỉnh Tiền Giang (Lê Thị Loan et al., 2018).

Nước thải cơ sở chế biến sữa đậu nành tại chợ Hưng Lợi, quận Ninh Kiều, TP. Cần Thơ. Kết quả

hàm lượng các chỉ tiêu ban đầu của nước thải cơ sở chế biến sữa đậu nành được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Hàm lượng các chỉ tiêu của nước thải chế biến sữa đậu nành, quận Ninh Kiều, thành phố Cần Thơ

Chỉ tiêu	Hàm lượng	QCVN 40/2011	
		A	B
pH	6,75*	6 đến 9	5,5 đến 9
Amonium (N-NH ₄ ⁺)	1,02 mg/L**	5	10
Đạm tổng (TKN)	22,4 mg/L**	20	40
Phospho tổng (TP)	3,2 mg/L**	4	6
Nhu cầu oxi sinh học (BOD ₅)	224 mg/L**	75	150
Tổng chất rắn lơ lửng (TSS)	185 mg/L**	50	100

(Nguồn: * Vi sinh vật đất - Viện NC&PT Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ. ** Phòng thí nghiệm chuyên sâu, Trường Đại học Cần Thơ

2.2. Xác định tỷ lệ kết tụ sinh học

Dòng vi khuẩn *Bacillus subtilis* PRO.01.C được nuôi cấy trong 50 ml môi trường tổng hợp chất kết tụ sinh học protein (Hazana et al., 2008), với thành phần 1 lít môi trường gồm: Glucose 20 g, L- acid glutamic 50 g, MgSO₄.7H₂O 0,5 g, yeast extract 0,5 g và điều chỉnh giá trị pH = 7 trong bình tam giác 100 ml. Lắc trên máy lắc xoay vòng ở tốc độ 150 vòng/phút ở nhiệt độ 30°C.

Dung dịch vi khuẩn sau thời gian 1 ngày nuôi cấy được sử dụng để kiểm tra khả năng kết tụ bằng hỗn hợp gồm 90 ml dung dịch kaolin (5 g/l), 10 ml dung dịch CaCl₂ 1% và bổ sung 100 µl dung dịch vi khuẩn với mật số >10⁹ tế bào/ml (tỉ lệ 0,1%). Hỗn hợp được khuấy đều 60 vòng/phút trong 30 giây bằng máy lắc sau đó để yên 5 phút, phân trong ở trên cách mặt nước 2 cm được lấy để xác định độ đục quang phổ ở bước sóng 550 nm (Deng et al., 2003). Mẫu đối chứng thực hiện tương tự nhưng không bổ sung dịch vi khuẩn, tỷ lệ kết tụ được tính theo công thức:

$$\frac{OD_{\text{đối chứng}} - OD_{\text{mẫu}}}{OD_{\text{đối chứng}}} \times 100\%$$

Phương pháp này được sử dụng để xác định tỷ lệ kết tụ sinh học của dòng vi khuẩn *Bacillus subtilis* PRO.01.C trong tất cả các thí nghiệm.

2.3. Tối ưu hóa các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả kết tụ sinh học

Tiến hành khảo sát ảnh hưởng của pH môi

trường, thành phần môi trường nuôi cấy, hiệu lượng dung dịch vi khuẩn *Bacillus subtilis* PRO.01.C đến hiệu quả kết tụ sinh học. Từ đó xác định được các điều kiện thích hợp cho hiệu quả kết tụ cao nhất.

2.3.1. Khảo sát ảnh hưởng của pH môi trường nuôi ử

Ảnh hưởng của pH môi trường nuôi ử đến khả năng tổng hợp chất kết tụ sinh học của chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* PRO.01.C được khảo sát trong khoảng pH từ 2 đến 11.

Thí nghiệm được thực hiện gồm 10 nghiệm thức tương ứng với mỗi nghiệm thức là một giá trị pH khác nhau: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11. Mỗi nghiệm thức được thực hiện với 3 lần lặp lại. Chủng vi khuẩn được nuôi trong môi trường tổng hợp chất kết tụ sinh học protein (Deng et al., 2003) với giá trị pH được điều chỉnh phù hợp ở từng nghiệm thức bằng dung dịch HCl 1M hay NaOH 3M (Merck). Lắc trên máy lắc xoay vòng ở tốc độ 150 vòng/phút ở nhiệt độ 30°C. Sau thời gian 1 ngày, dung dịch vi khuẩn sẽ được đánh giá khả năng kết tụ theo phương pháp đã được mô tả ở mục 2.2. Từ đó chọn ra giá trị pH môi trường nuôi sinh khối thích hợp để tổng hợp chất kết tụ sinh học đạt hiệu quả kết tụ cao nhất.

2.3.2. Khảo sát ảnh hưởng của lượng carbon, nitrogen và khoáng vô cơ

Các nguồn carbon, nitrogen và khoáng vô cơ khảo sát được trình bày trong bảng 2. Các nguồn dinh dưỡng này được lựa chọn vì nguồn dinh dưỡng phổ biến là Yeast Extract (Merck) và thành phần hữu cơ còn lại của Trung Quốc.

Phương pháp tiến hành bằng cách nhân sinh khối chủng vi khuẩn trong 20 ml môi trường với sự phối hợp của ba nguồn carbon, nitrogen và khoáng vô cơ ở trên, với giá trị pH đã chọn, nhiệt độ 30°C, lắc 150 vòng/phút, sau thời gian 1 ngày tiến hành xác định hiệu quả kết tụ với dung dịch kaolin theo như mô tả ở mục 2.2. Phối hợp ba nguồn dinh dưỡng (3 nguồn carbon + 4 nguồn nitrogen + 4 nguồn khoáng vô cơ) có 48 nghiệm thức khác nhau và mỗi nghiệm thức được thực hiện 3 lần lặp lại (Bảng 2) (phân tích theo lô phụ lục 2).

Bảng 2. Các nguồn carbon, nitrogen và khoáng vô cơ được bổ sung trong môi trường nuôi sinh khối chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* PRO.01.C

Nguồn khoáng vô cơ	Nguồn nitrogen	Nguồn carbon
KCl (0,5%)	Acid glutamic (5%)	Glucose (1%)
FeCl ₃ (0,5%)	Yeast extract (0,05%)	Sucrose (1%)
CaCl ₂ (0,5%)	Urea (0,05%)	Tinh bột (1%)
K ₂ HPO ₄ (0,2%) + KH ₂ PO ₄ (0,5%)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (0,05%)	

Kết quả cuối cùng chọn ra được môi trường tối ưu có nguồn carbon, nitrogen và khoáng vô cơ thích

Bảng 3. Nghiệm thức bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên khảo sát ảnh hưởng của các tỷ lệ carbon, nitrogen và khoáng vô cơ đến hiệu quả kết tụ sinh học

Nguồn khoáng vô cơ	Nguồn nitrogen				Nguồn carbon
	N (b,%)	N (b,%)	N (b,%)	N (b,%)	
K (a,%)	1	4	7	10	C (c,%)
	2	5	8	11	C (c,%)
	3	6	9	12	C (c,%)
K (a,%)	13	16	19	22	C (c,%)
	14	17	20	23	C (c,%)
	15	18	21	24	C (c,%)
K (a,%)	25	28	31	34	C (c,%)
	26	29	32	35	C (c,%)
	27	30	33	36	C (c,%)
K (a,%)	37	40	43	46	C (c,%)
	38	41	44	47	C (c,%)
	39	42	45	48	C (c,%)

Ghi chú: K: nguồn khoáng vô cơ; a: mức độ (%); N: nguồn nitrogen; b: mức độ (%); C: nguồn carbon, c: mức độ (%)

2.3.4. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ dịch vi khuẩn bổ sung

hợp cho vi khuẩn tổng hợp chất kết tụ sinh học cho tỷ lệ kết tụ cao nhất.

2.3.3. Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ nguồn carbon, nitrogen và khoáng vô cơ đến hiệu quả tổng hợp chất kết tụ sinh học

Nhân sinh khối chủng vi khuẩn trong môi trường gồm 3 nguồn carbon, nitrogen và khoáng đã được chọn ở thí nghiệm trên. Mỗi nguồn dinh dưỡng sẽ được chia thành 3 mức độ khác nhau và phối hợp tạo ra 27 nghiệm thức với tỷ lệ carbon, nitrogen và khoáng vô cơ bổ sung khác nhau (bảng 3).

Chủng vi khuẩn được nhân sinh khối trong ống ficol 50 ml chứa 20 ml môi trường tổ hợp từ 3 nguồn dinh dưỡng với tỷ lệ khác nhau, điều chỉnh về giá trị pH cho tỷ lệ kết tụ cao nhất đã chọn, ủ lắc 150 vòng/phút ở nhiệt độ 30°C. Đánh giá khả năng kết tụ với dung dịch kaolin, phân tích hồi quy tuyến tính 3 nhân tố từ đó chọn ra nghiệm thức có tỷ lệ bổ sung thích hợp cho vi khuẩn tổng hợp chất kết tụ sinh học cho tỷ lệ kết tụ cao nhất.

Tiến hành kiểm tra khả năng kết tụ sinh học của chủng vi khuẩn với kaolin ở những nồng độ khác nhau: 0,01; 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25; 0,30%. Đánh giá

khả năng kết tụ bằng cách bổ sung 10 ml dung dịch 1% muối kim loại đã xác định ở thí nghiệm trên vào 90 ml dung dịch kaolin (5 g/l) vào cốc 250 ml. Sau đó thêm dung dịch vi khuẩn tổng hợp chất kết tụ sinh học ở những nồng độ khác nhau. Mẫu đôi chứng thực hiện tương tự nhưng không dùng vi khuẩn tổng hợp chất kết tụ sinh học. Khuấy đều hỗn hợp trong 30 giây bằng máy khuấy từ, giữ yên hỗn hợp trong 5 phút, lấy phần trong cách mặt nước 2 đến 3 cm xác định chỉ số OD ở bước sóng 550 nm. Tính khả năng kết tụ và chọn nồng độ vi khuẩn tổng hợp chất kết tụ sinh học có khả năng kết tụ cao nhất. Thí nghiệm gồm 7 nghiệm thực và mỗi nghiệm thực được thực hiện với 3 lần lặp lại.

2.3.5. Thử nghiệm hiệu suất xử lý nước thải cơ sở chế biến sữa đậu nành của chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* PRO.01.C

Áp dụng các điều kiện thích hợp về độ pH, muối kim loại bổ sung, nguồn dinh dưỡng nuôi và liều lượng dịch vi khuẩn đã tìm được cho chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* PRO.01.C để xử lý nước thải cơ sở chế biến sữa đậu nành ở quy mô phòng thí nghiệm (bình 10 lít). Quy trình như sau: 8 lít nước thải sau chế biến sữa đậu nành được chừa trong bình có thể tích 10 lít chưa, bổ sung muối khoảng kim loại, dung dịch vi khuẩn thích hợp; sục khí trong 5 phút, để yên 60 phút. Thu phần nước trong bình trên để xác định các chỉ tiêu pH, BOD₅, TSS, hàm lượng nitơ tổng, hàm lượng photpho tổng (P) và hàm lượng amonium của nước thải sau xử lý ở phòng thí nghiệm chuyên sâu, Trường Đại học Cần Thơ.

2.3.6. Ghi nhận kết quả và xử lý

Số liệu thí nghiệm được phân tích bằng phần mềm thống kê Statgraphics Centurion XVI.1 và Microsoft Office Excel 2013.

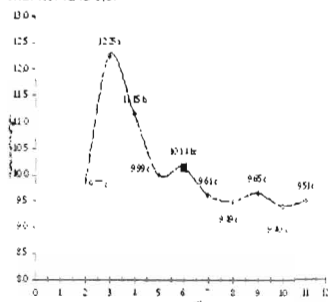
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả tối ưu hóa đồng vi khuẩn

3.1.1. Giá trị pH

Tỷ lệ kết tụ kaolin đồng vi khuẩn *Bacillus subtilis* PRO.01.C lúc ban đầu là 9,77% ở pH 2, sau khi pH môi trường nuôi cấy nâng lên pH 3 cho tỷ lệ kết tụ cao nhất (12,25%) và khác biệt có ý nghĩa so với các độ pH khác. Kết quả thể hiện ở hình 1 cho thấy pH từ 2, 5 và 7, 8, 9, 10, 11 cho tỷ lệ kết tụ kaolin giảm dần; ở pH 4 giảm so với pH 3 nhưng khác biệt những giá trị pH khác và pH 6 có tỉ lệ kết tụ sinh học

không khác biệt với pH 4. Tương đồng nghiên cứu của Zhi-qiang *et al.* (2007) chất kết tụ sinh học MMF1 từ hỗn hợp vi khuẩn MM1 gồm hai chủng *Staphylococcus* sp. (BAFRT4) và *Pseudomonas* sp. (CYG51) cho tỷ lệ kết tụ cao nhất ở pH từ 5,5 đến 6 và nghiên cứu của Là *et al.* (2009) dùng *Bacillus licheniformis* X14 cho thấy pH tối ưu cho sự tổng hợp chất kết tụ là 6,5.



Hình 1. Ảnh hưởng của pH đến hiệu quả kết tụ sinh học đồng vi khuẩn PRO.01.C

Ghi chú: Những số trên mỗi điểm theo sau cùng 1 chữ không khác ý nghĩa thống kê ở mức độ 1%

Ở các giá trị pH khác nhau thì ảnh hưởng khác nhau đến khả năng tổng hợp chất kết tụ sinh học của đồng vi khuẩn *Bacillus subtilis* PRO.01.C có pH ảnh hưởng đến diện tích trên bề mặt của chất kết tụ sinh học do các nhóm chức tạo nên làm ảnh hưởng đến sự hấp thụ và sự liên kết giữa chất kết tụ với phân tử kaolin. Theo kết quả thí nghiệm, pH 6 được chọn là pH môi trường nuôi đồng vi khuẩn để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo vì pH 3 quá chua cần phải điều chỉnh acid vô cơ tổn kinh phí khi áp dụng đại trà.

3.1.2. Nguồn carbon, nguồn nitơ và khoáng vô cơ

Kết quả từ bảng 4 cho thấy, từ 48 nghiệm thực môi trường gồm 3 chất từ ba nguồn carbon, nitrogen và khoáng vô cơ thì đồng vi khuẩn *Bacillus subtilis* PRO.01.C cho khả năng tổng hợp chất kết tụ sinh học đạt hiệu quả cao nhất là 29,65% sau thời gian 1 ngày với thành phần môi trường gồm nguồn carbon dạng tinh bột (1%), nguồn nitrogen là urea (0,05%) và nguồn khoáng vô cơ là KCl (0,5%).

Bảng 4. Ảnh hưởng của nguồn carbon, nitrogen và khoáng vô cơ đến khả năng tổng hợp chất kết tụ sinh học của dòng vi khuẩn *Bacillus subtilis* PRO.01.C

Dòng vi khuẩn	Nguồn carbon	Nguồn Nitrogen C.V = 8,84%				Nguồn khoáng vô cơ KCl = 25,38% FeCl ₃ = 16,57% CaCl ₂ = 23,49% K ₂ HPO ₄ +KH ₂ PO ₄ = 12,49% LSD.01=1,03 C.V = 6,04%
		Glutamate (5%)	Yeast Extract (0,05%)	Urea (0,05%)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (0,05%)	
<i>Bacillus subtilis</i> PRO.01.C	Glucose (1%) 13,76%	17,95	26,28	20,10	12,30	KCl (0,5%)
		04,49	03,58	08,55	10,82	FeCl ₃ (0,5%)
		14,18	20,23	20,97	17,25	CaCl ₂ (0,5%)
		14,05	11,13	13,52	04,69	K ₂ HPO ₄ (0,2%)+KH ₂ PO ₄ (0,5%)
	Sucrose (1%) 22,37%	28,45	43,97	27,63	14,35	KCl (0,5%)
		13,61	10,83	14,73	19,37	FeCl ₃ (0,5%)
		14,56	59,74	43,06	18,21	CaCl ₂ (0,5%)
		08,37	04,47	19,31	17,20	K ₂ HPO ₄ (0,2%)+KH ₂ PO ₄ (0,5%)
	Tinh bột (1%) 22,34% LSD.01=0,93 C.V = 8,92%	30,96	21,10	29,65	31,89	KCl (0,5%)
		44,97	19,57	25,51	22,81	FeCl ₃ (0,5%)
		15,08	19,33	22,92	16,41	CaCl ₂ (0,5%)
		20,36	14,24	16,28	06,33	K ₂ HPO ₄ (0,2%)+KH ₂ PO ₄ (0,5%)

3.1.3. Tỷ lệ tinh bột, ure và KCl

Kết quả tối ưu hòa tỷ lệ tinh bột, ure và KCl bổ sung trong thành phần môi trường nhân sinh khởi chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* PRO.01.C được trình bày ở bảng 5 cho thấy ở các nghiệm thực gồm tinh bột/sucrose (1%), YE/glutamate (0,05%) và FeCl₃/CaCl₂ (0,5%) khác biệt có ý nghĩa so với các nghiệm thực còn lại, tuy nhiên nghiệm thực tinh bột (1%), ure (0,05%) và KCl (0,5%) thấp hơn hai nghiệm thực trên nhưng không nhiều và xét về mặt kinh tế thì sử dụng tinh bột thay cho sucrose hay urea thay cho YE/glutamate (0,5%) và KCl thay cho CaCl₂ sẽ rẻ hơn ở số lượng lớn. Điều này chứng tỏ thành phần dinh dưỡng trong nước thải hồ tiêu có nhiều tinh bột và sự bổ sung ure trong quá trình chế biến hồ tiêu làm tăng khả năng tổng hợp chất kết tụ sinh học từ vi khuẩn dòng PRO.01.C. Từ kết quả thí nghiệm chọn nghiệm thực tinh bột (1%), ure (0,05%) và KCl (0,5%) là thành phần môi trường nuôi cấy chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* PRO.01.C có tỷ lệ kết tụ tối ưu nhất.

Sử dụng các số liệu kết quả thí nghiệm trên phân tích tìm ra phương trình hồi qui nhiều biến bằng chương trình Statgraphics XVI, dựa trên phương trình xác định được nghiệm thực tối ưu nhất cho môi trường nuôi sinh khối chủng vi khuẩn

Bacillus subtilis PRO.01.C. Kết quả phân tích tương quan cho thấy tỷ lệ kết tụ (%) có tương quan với 10 biến theo phương trình:

Tỷ lệ kết tụ = 51,6438 + 205,219*Hàm lượng KCl + 52,1834*Hàm lượng tinh bột + 494,686*Hàm lượng Urea + 215,759*Hàm lượng KCl*Hàm lượng KCl - 69,8813*Hàm lượng KCl*Hàm lượng tinh bột - 1197,42*Hàm lượng KCl*Hàm lượng Urea - 9,55548*Hàm lượng tinh bột*Hàm lượng tinh bột - 905,34*Hàm lượng tinh bột*Hàm lượng Urea + 620,119*Hàm lượng Urea*Hàm lượng Urea + 1940,33*Hàm lượng KCl*Hàm lượng tinh bột*Hàm lượng Urea

Dựa vào bảng phân tích ANOVA, có ý nghĩa thống kê giữa các biến ở mức độ tin cậy 99,0%, số liệu thống kê bình phương của R (R-squared là hệ số tương quan chỉ ra sự tác động của các yếu tố dinh dưỡng nguồn carbon, nguồn nitrogen và khoáng vô cơ) tác động đến khả năng tổng hợp chất kết tụ sinh học tỷ lệ kết tụ (%) của chủng vi khuẩn là 46,37%. Số liệu thống kê R-squared (adjusted f.f.) phù hợp hơn để so sánh các mô hình với các số khác nhau của các biến độc lập là 51,77%. Sai số chuẩn của các ước tính cho thấy độ lệch chuẩn của các số dự là 8,61. Giá trị này có thể được sử dụng để xây dựng giới hạn dự báo cho các quan sát.

Bảng 5. Ảnh hưởng của sự thay đổi tỷ lệ (%) tinh bột, (%) ure, (%) và KCl (%) đến tỷ lệ kết tụ (%) của chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* PRO.01.C

Ký hiệu	Nguồn KCl	Nguồn nitrogen			Tinh bột (%)
		Ure (0,025%) 17,32%	Ure (0,050%) 17,65%	Ure (0,075%) 18,81%	
<i>Bacillus subtilis</i> PRO.01.C LSD.01=1.49 CV (KCl)=13,93% LSD.01=2.51 CV (N) = 9,99% LSD.01=2.73 CV (tinh bột) = 9,89%	KCl (0,25%) 27,95%	23,34	34,36	38,39	Tinh bột (0,50%) = 16,35%
		22,02	46,37	12,75	Tinh bột (1,00%) = 19,43%
		22,96	37,30	14,07	Tinh bột (1,50%) = 17,80%
	KCl (0,50%) 08,92%	17,98	08,47	03,58	Tinh bột (0,50%)
		08,08	08,36	05,66	Tinh bột (1,00%)
		11,08	11,27	05,77	Tinh bột (1,50%)
	KCl (0,75%) 16,71% LSD.01 = 1,49	09,02	14,86	05,85	Tinh bột (0,50%)
		14,04	06,82	34,75	Tinh bột (1,00%)
		18,62	07,03	39,37	Tinh bột (1,50%)

ANOVA

Main plot	df	SS	MS	F tính	F bảng		CV (A) %	13.93
					5%	1%		
Rep.	2	24.2113	12.10565	1.96	6.94	18.01		
KCl (A)	2	4944.87	2472.434	399.32	6.94	18.01		
Error (A)	4	24.7665	6.19163					
Subplot (B)	2	24.2084	12.10418	3.80	3.88	6.93		
A x B	4	925.603	231.4008	72.68	3.26	5.21	CV (B) %	9.99
Error (B)	12	38.2079	3.183995					
Subsubplot C	2	127.834	63.91715	20.50	3.25	5.25		
A x C	6	3296.5	549.4173	176.24	2.36	3.35	CV (C) %	9.89
B x C	4	97.6019	24.40048	7.83	2.63	3.89		
A x B x C	8	2863.98	357.9974	114.84	2.21	3.04		
Error C	36	112.225	3.117357					
Total	80	12480						

CF = 25832.38

Thay Tỷ lệ kết tụ = A, Hàm lượng Tinh bột = X, Hàm lượng Urea = Y, Hàm lượng KCl = Z, ta được phương trình:

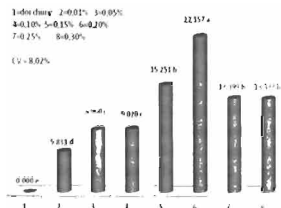
$$A = 51,6438 \cdot 205,219 \cdot Z + 52,1834 \cdot X + 494,686 \cdot Y + 215,759 \cdot Z \cdot Z + 69,8813 \cdot Z \cdot X + 1197,42 \cdot Z \cdot Y + 9,55548 \cdot X \cdot X + 905,34 \cdot X \cdot Y + 620,119 \cdot Y \cdot Y + 1940,33 \cdot Z \cdot X \cdot Y$$

Khi cô định các biến X, Y, Z trong khoảng biên độ X (0,5-1,5%), Y (0,025-0,075%) và Z (0,25-0,75%)

phương trình hồi quy không cho ra được điểm tối ưu trong miền khảo sát (khoảng biên độ các biến). Tuy nhiên sự tương quan giữa KCl và urea, urea và tinh bột, tinh bột và KCl cũng như tương quan 3 nhân tố KCl x urea x tinh bột đều có trị số F rất có ý nghĩa thống kê (>0,01) (xem bản ANOVA). Vì thế 3 nhân tố 3 mức độ: tinh bột 1%, urea 0,05% và KCl 0,25% tối ưu nhất với tỷ lệ kết tụ là 46,37% (Bảng 5).

Qua kết quả trên cho thấy tỷ lệ kết tụ sinh học có thể tăng thêm khi tăng liều lượng vi khuẩn tỷ lệ

kết tụ cao ở liều lượng vi khuẩn 0,2% cho tỷ lệ kết tụ 22,157%. Đối với đồng vi khuẩn *Bacillus subtilis* PRO.01.C đạt hiệu quả kết tụ sinh học cao so với các nghiên cứu khác như: Dong *Bacillus coagulans* As 101 liều lượng 40 ml/lít cho tỷ lệ kết tụ là 90% (Salehizadeh *et al.*, 2000), đồng *Bacillus licheniformis* liều lượng 150 ml/L cho tỷ lệ kết tụ 98,4% (Shih *et al.*, 2001).



Các nồng độ dung dịch vi khuẩn

Hình 2. Ảnh hưởng của liều lượng dung dịch vi khuẩn lên khả năng kết tụ sinh học của đồng vi khuẩn *Bacillus subtilis* PRO.01.C

Bảng 6. Kết quả xử lý nước thải chế biến sữa đậu nành của đồng vi khuẩn *Bacillus subtilis* PRO.01.C

Chỉ tiêu (theo bảng 1)	Trước khi xử lý	Sau khi xử lý với <i>Bacillus subtilis</i> PRO.01.C	Tỷ lệ giảm (%)	QCVN 40: 2011 /BTNTMT	
				A	B
pH	6,75	7,02 (tăng)	04,00	6 - 9	5,5 - 9
Ammonium (N-NH ₄ ⁺)	1,02	0,18	87,81	5	10
Đạm tổng (TKN)	22,4	20,9	06,69	20	40
Phospho tổng (TP)	3,2	2,9	09,37	4	6
Nhu cầu oxy sinh học (BOD ₅)	224,0	213,5	06,68	75	150
Tổng chất rắn lơ lửng (TSS)	185	151	18,34	50	100

Chi chú: * Kết quả trung bình 3 lần lặp lại

4. KẾT LUẬN

Nguồn carbon, nitrogen và khoáng vô cơ dùng để nuôi sinh khối đồng vi khuẩn *Bacillus subtilis* PRO.01.C tổng hợp chất kết tụ sinh học cho hiệu quả cao là tinh bột, urea và KCl; ở pH 6; và liều lượng dịch vi khuẩn 0,2%. Ứng dụng đồng vi khuẩn *Bacillus subtilis* PRO.01.C trong xử lý nước thải cơ sở chế biến sữa đậu nành bổ sung muối kim loại thích hợp và liều lượng vi khuẩn 0,2%, sau 60 phút để lắng. Kết quả khảo sát cho thấy các chỉ tiêu trong nước thải cơ sở chế biến sữa đậu nành đã giảm xuống như hàm lượng BOD₅ (6,68%); TSS (18,34%); nitơ tổng (6,69%); photpho tổng (9,37%) và hàm lượng amonium (87,8%) và pH nước thải tăng nhẹ.

3.2. Thử nghiệm hiệu quả xử lý nước thải cơ sở chế biến sữa đậu nành ở thể tích 10 lít

Kết quả xử lý nước thải cơ sở chế biến sữa đậu nành của đồng vi khuẩn *Bacillus subtilis* PRO.01.C thể hiện trong bảng 6 cho thấy pH tăng, chỉ tiêu nitơ tổng giảm 6,69%, phospho tổng giảm 9,37% và hàm lượng amonium giảm 87,8%. Các chỉ tiêu này so với quy định nước thải đầu ra của QCVN_40/2011/BTNMT đều đạt. Chỉ tiêu TSS giảm 18,34% và chỉ tiêu BOD₅ giảm 6,68%, hai chỉ tiêu này chưa đạt so với quy định của QCVN_40/2011/BTNMT quy định nước thải đầu ra loại A.

Kết quả từ bảng 6 cho thấy pH nước thải sau xử lý có tăng nhẹ (trung tính), lượng ammonium hòa tan thấp nhưng cũng giảm đáng kể, đạm tổng giảm ở mức A, phospho tổng thấp (dưới mức cho phép) trong khi nhu cầu oxy sinh học và tổng chất rắn lơ lửng giảm nhẹ (do xử lý trong thời gian ngắn); kết quả này cho thấy hiệu quả sử dụng đồng *B. subtilis* PRO.01.C để xử lý nước thải chế biến sữa đậu nành, quận Ninh Kiều, thành phố Cần Thơ giảm đáng kể nhất TKN và TP đạt yêu cầu xả thải ra môi trường.

Chủng *Bacillus subtilis* PRO.01.C kết hợp với chủng *Bacillus subtilis* PO.03.B để xử lý nước thải hộ tiêu Mỹ Tho đạt hiệu quả cao trong giai đoạn đầu của qui trình xử lý nước thải hộ tiêu hoàn chỉnh hơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Deng, S., Yu, G., Ting, Y., P. 2005. Production of a biofloculant by *Aspergillus parasiticus* and its application in dye removal. *Colloid Surf B Biointerfaces*, 44: 179-186.
- Gong, W. X., S. G. Wang., X. F. Sun., X. W. Liu., Q. Y. Yue and B. Y. Gao, 2008. Biofloculant production by culture of *Serratia ficaria* and its

- application in wastewater treatment. *Bioresour Technol.* 99: 4668-4674.
3. Hazana R. and Norli I. 2008. Flocculating activity of bioflocculant producing bacteria isolated from Closed drainage system at Prai industrial Zone, Penang, Malaysia. International Conference on Environmental Research and Technology.
4. Loan L. T., T. V. Phuong and C. N. Diep. 2018. Isolation and identification of bioflocculant-producing bacteria, heterotrophic nitrogen removal bacteria and poly-phosphate bacteria in wastewater from "My Tho rice noodle" factories, Tien Giang province, Vietnam. International Journal of Innovations in Engineering and Technology (IJET) 10 (2): 185-198.
5. Li, W. W., S. Zhong, H. Y. Lei, R. W. Chen, Q. Yu and H. L. Li. 2009. Production of a novel bioflocculant by *Bacillus licheniformis* X14 and its application to low temperature drinking water treatment. *Bioresour Technol.* 100: 3650-3656.
6. Poulieute, Bùi Bá Bồng và Cao Đức Phát. 2010. Báo cáo "Chăn nuôi Việt Nam và triển vọng 2010". Ấn phẩm của tổ chức PRISE của Pháp.
7. Salehzadeh, H., M. Vossoughi and I. Aleinzadeh, 2000. Some investigations on bioflocculant production bacteria. *Biochem Eng J.* 5: 39-44.
8. Shih, I. L., Y. T Van, L. C. Yeh, H. G. Lin and Y. N Chang. 2001. Production of a biopolymer flocculant from *Bacillus licheniformis* and its flocculation properties. *Bioresour Technol.* 78 (3): 267-272.
9. Yim, J. H., S. J. Kim, S. H. Ahn, H. K. Lee. 2007. Characterization of a novel bioflocculant, P-KG03, from a marine dinoflagellate, *Gyrodinium impudicum* KG03. *Bioresour Technol.* 98 361-367.
10. Zang J., Z. Liu., S. Wang and P. Jiang. 2002. Characterization of a bioflocculant produced by the marine myxobacterium *Nannocystis* sp. NU2. *Appl Microbiol Biotechnol.* 59: 517-522.
11. Zhi-qiang, Z., Bo, L., Si-qing, X., Xue-jiang, W. and A-ming, Y. 2007. Production and application of a novel bioflocculant by multiple-microorganism consortia using brewery wastewater as carbon source. *Journal of Environmental Sciences.* 19:667-673.
12. Zouboulis A. I., Xiao-Li C., I. A. Katsoyannis. 2004 The application of bioflocculant for the removal of humic acids from stabilized landfill leachates. *J Environ Manage.* 70 (1): 35-41.

OPTIMIZATION OF BIOFLOCCULANT PRODUCED BY *Bacillus subtilis* STRAIN PRO.01.C AND ITS APPLICATION IN WASTEWATER TREATMENT AFTER SOY-MILK PROCESSING

Le Thi Loan, Cao Ngoc Diep

Summary

Wastewater after soy-milk processing of factories contain a large number of organic (especially residual protein) and it must be treated before discharging into the environment. Bioflocculation is an extracellular polymer, which is produced by microorganisms. It is safety, strong effect, biodegradable and harmless to humans and the environment in comparison to conventional synthesis flocculants, therefore they may be researched and applied in wastewater treatment from soy-milk processing factories. *Bacillus subtilis* strain PRO.01.C was isolated from wastewater of My Tho rice-noodle factories in Tien Giang province, Vietnam. The optimal medium for *Bacillus subtilis* strain PRO.01.C consisted of starch (1.0%), urea (0.05%), and KCl (0.25%) at pH 6 with kaolin solution after 60 minutes together with CaCl₂ solution and 0.2% inoculant (bacterial liquid) increased the flocculating activity up to 46.37%. Applying this strain for wastewater treatment after soy-milk processing, the results showed that it reduced Biochemical Oxygen Demand (BOD), total solid suspension (TSS), total nitrogen, total phosphorus and ammonium concentrations 6.68%, 18.34%, 6.69%, 9.37% and 87.8%, in comparison to initial wastewater, respectively. Especially, total phosphate, total nitrogen, ammonium parameters and pH reached to A standard of QCVN₄₀/2011/BTNMT.

Keywords: *Bacillus subtilis*, bioflocculant, carbon source, nitrogen source, pH, wastewater.

Người phản biện: PGS.TS. Lê Như Kiều

Ngày nhận bài: 27/8/2019

Ngày thông qua phản biện: 27/9/2019

Ngày duyệt đăng: 4/10/2019