

BÁO CÁO KẾT QUẢ

Đề tài:

**NGHIÊN CỨU VI KHUẨN GÂY HƯ HỎNG
SỮA TRONG VIỆC XỬ LÝ NƯỚC THẢI**

Người thực hiện: Lê Hữu Nhật Phương – 12 Hóa 2

Đỗ Hoàng Thế Phúc - 12 Sinh

Giáo viên hướng dẫn: ThS. Hoàng Thị Hòa, Trường THPT Quốc học Huế

PGS. TS. Hoàng Thị Thái Hòa, Trường Đại học Nông
Lâm, Đại học Huế

LỜI CẢM ƠN

Chúng em xin chân thành cảm ơn đến cô giáo Hoàng Thị Hòa – giáo viên bộ môn Sinh học trường THPT chuyên Quốc học Huế đã tận tình giúp đỡ chúng em trong suốt quá trình thực hiện đề tài trong thời gian vừa qua.

Chúng em xin chân thành cảm ơn cô Hoàng Thị Thái Hòa- Trưởng bộ môn Nông Hóa & Thổ Nhưỡng, trường Đại học Nông Lâm Huế đã tạo điều kiện và giúp đỡ chúng em trong suốt quá trình thực hiện đề tài.

Xin cảm ơn các thầy cô giáo ở các trường Đại học Khoa Học Huế đã tận tình cung cấp nhiều thông tin, những kiến thức cần thiết liên quan đến đề tài này.

Cuối cùng, chúng em xin tiếp thu, ghi nhận những ý kiến đóng góp của quý thầy cô để đề tài hoàn thiện hơn.

Xin chân thành cảm ơn!

MỤC LỤC

STT	Nội dung	Trang
1.	MỞ ĐẦU.....	4
1.1.	Lý do chọn đề tài.....	4
1.2.	Mục tiêu đề tài.....	6
1.3.	Tính mới và tính sáng tạo của đề tài.....	6
1.4.	Khả năng áp dụng của đề tài	6
2.	TỔNG QUAN VẤN ĐỀ NGHIÊN CỨU.....	6
3.	ĐỐI TƯỢNG, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU...	17
3.1.	Đối tượng nghiên cứu	17
3.2.	Nội dung nghiên cứu.....	17
3.3.	Phương pháp nghiên cứu.....	18
4.	KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	21
4.1.	Kết quả phân lập các chủng vi khuẩn gây hư hỏng sữa có trong sữa trên môi trường thạch trên đĩa petri	22
4.2.	Kết quả cấy chuyển các chủng vi khuẩn gây hư hỏng sữa có trong sữa trong môi trường thạch trên đĩa petri lên môi trường thạch nghiêng	23
4.3.	Kết quả xác định hoạt tính phân giải cacbohidrat và lipit của các chủng vi khuẩn ở giai đoạn 3 và chọn lọc ra những chủng vi khuẩn hư hỏng sữa có trong sữa có hoạt tính phân giải cacbohidrat và lipit cao	25
4.4.	Kết quả quá trình sử dụng các vi khuẩn có hoạt tính phân giải cacbohidrat và lipit cao ở giai đoạn 4 để bước đầu ứng dụng trong việc xử lý nước thải	28
5.	HIỆU QUẢ KINH TẾ, XÃ HỘI VÀ MÔI TRƯỜNG.....	31
6.	KẾT LUẬN.....	32
	TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	33
	PHỤ LỤC	37

1. MỞ ĐẦU

1.1. Lý do chọn đề tài

Do nhu cầu phát triển của con người tăng lên, nên nền công nghiệp nước ta ngày càng phát triển hơn. Bên cạnh tăng sản xuất, thì nền công, nông nghiệp nước ta còn thải ra một lượng nước thải, chất thải gây ảnh hưởng đến môi trường tự nhiên, sinh vật sống và đặc biệt nhất là con người.

Hiện nay ô nhiễm nước thải đang là vấn đề cấp bách được thế giới quan tâm trong đó có Việt Nam. Các nhà khoa học dự đoán với tình hình ô nhiễm hiện nay thì trong tương lai con người sẽ thiếu nguồn nước sạch nếu như con người tiếp tục phung phí nguồn nước sạch hiện tại và không có biện pháp quản lý, xử lý chung một cách hợp lý thì vấn nạn trên sẽ sớm xảy ra.

Đứng trước vấn đề này, các nhà khoa học đã ngày đêm nghiên cứu để tìm ra các giải pháp nhằm khắc phục cũng như hạn chế những tác động do nước thải gây ra. Và có một phương pháp đã và đang được nghiên cứu hiện nay được nhiều người áp dụng vào trong hệ thống xử lý nước thải của mình đó là xử lý nước thải bằng vi sinh vật, còn được gọi là chế phẩm vi sinh. Hiện tại phương pháp xử lý này đóng vai trò quan trọng trong việc làm sạch nước thải của các cơ sở sản xuất. Do đó công cuộc nghiên cứu, ứng dụng vi sinh vật trong xử lý nước thải vẫn đang được các nhà khoa học trên thế giới và Việt Nam tiếp tục nghiên cứu và phát triển, phân lập vi sinh xử lý nước thải hữu hiệu có hoạt tính cao để phân hủy và loại bỏ các chất gây ô nhiễm trong nước thải nhằm giảm thiểu ô nhiễm môi trường.

Trong nhiều biện pháp xử lý ô nhiễm, biện pháp sinh học được mọi người đặc biệt quan tâm sử dụng. So với các biện pháp vật lý, hoá học, biện pháp sinh học chiếm vai trò quan trọng về quy mô cũng như giá thành đầu tư, do chi phí năng lượng cho một đơn vị khối lượng chất khử là ít nhất. Đặc biệt xử lý bằng biện pháp sinh học sẽ không gây tái ô nhiễm môi trường - một nhược điểm mà biện pháp hoá học hay mắc phải. Biện pháp sinh học sử dụng một đặc điểm rất quý của vi sinh vật, đặc điểm đã thu hút sự chú ý của các nhà nghiên cứu và các nhà sản xuất là khả năng

đồng hoá được rất nhiều nguồn cơ chất khác nhau của vi sinh vật, từ tinh bột, cellulose, cả nguồn dầu mỡ và dẫn xuất của nó đến các hợp chất cao phân tử khác như protein, lipid, cùng các kim loại nặng như chì, thủy ngân ... Thực chất của phương pháp này là nhờ hoạt động sống của vi sinh vật (sử dụng các hợp chất hữu cơ và một số chất khoáng có trong nước thải làm nguồn dinh dưỡng và năng lượng) để biến đổi các hợp chất hữu cơ cao phân tử có trong nước thải thành các hợp chất đơn giản hơn. Trong quá trình dinh dưỡng này vi sinh vật sẽ nhận được các chất làm vật liệu để xây dựng tế bào, sinh trưởng và sinh sản, nên sinh khối được tăng lên. Biện pháp sinh học để xử lý nước thải có thể làm sạch hoàn toàn các loại nước thải công nghiệp chứa các loại chất bẩn hoà tan hoặc phân tán nhỏ. Do vậy biện pháp này thường dùng sau khi loại bỏ các tạp chất phân tán thô ra khỏi chất thải.

Theo Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn, đến nay, cả nước có 29.557 cơ sở giết mổ gia súc, gia cầm nhỏ lẻ. Phần lớn các cơ sở giết mổ này hoạt động tự phát, không đăng ký kinh doanh, điều kiện cơ sở vật chất không bảo đảm yêu cầu về vệ sinh thú y, an toàn thực phẩm, không có hệ thống thu gom, xử lý chất thải, nước thải gây ô nhiễm nghiêm trọng cho các thành phần môi trường không khí, đất, nước và vệ sinh an toàn thực phẩm. Theo thống kê, hiện nay hơn 90% cơ sở giết mổ gia súc, gia cầm tập trung trên địa bàn tỉnh Thừa Thiên Huế khi được kiểm tra, quan trắc đều có thông số vượt tiêu chuẩn, thiếu hệ thống xử lý chất thải...; điều này đã và đang gây nên tình trạng ô nhiễm môi trường ở mức báo động.

Trong thành phần của sữa thường có chứa nhiều chủng loại vi sinh vật như *Pseudomonas*, *Brevibacterium*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Bacterium fluorescen*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus botulinus*,... Sữa tươi là sản phẩm dễ bị hỏng, nếu không được bảo quản tốt, nó có giá thành rẻ và dễ dàng thu thập, pH trong sữa rơi vào khoảng từ 6,5-6,8 thuận lợi cho sự phát triển của vi sinh vật. Những điều kiện trên biến sữa thành nguồn phân lập vi sinh vật dễ dàng với những loại vi sinh vật có khả năng sản sinh enzyme mạnh để tham gia vào việc xử lý nước thải.

Do đó vấn đề sử dụng các vi sinh vật có ích trong sữa, đặc biệt là vi khuẩn có khả năng xử lý nước thải là điều cần quan tâm và nghiên cứu để giải quyết vấn đề ô

nhễm môi trường nước. Vì vậy, việc phân lập các chủng vi khuẩn có khả năng xử lý nước thải từ sữa là rất cần thiết.

1.2. Mục tiêu của đề tài

1.2.1. Mục tiêu chung

Phân lập và tuyển chọn được một số chủng vi khuẩn gây hỏng sữa có hoạt tính phân giải cao, trên cơ sở đó bước đầu ứng dụng nó trong xử lý nước thải.

1.2.2. Mục tiêu cụ thể

- Phân lập được các chủng có trong sữa và gây hư hỏng sữa có hoạt tính phân giải các chất mạnh (cụ thể là Cacbohidrat và Lipit).
- Xác định được hiệu quả của các chủng phân lập được dựa vào môi trường thử hoạt tính phân giải các chất.
- Bước đầu ứng dụng các chủng có hoạt tính cao làm tăng khả năng xử lý nước thải

1.3. Tính mới và tính sáng tạo của đề tài

1.3.1. Tính mới

- Chưa có nhiều công trình nghiên cứu về phân lập và tuyển chọn chủng vi sinh vật từ sữa tươi bị hỏng cho xử lý nước thải tại Việt Nam.
- Hầu hết các nghiên cứu trước đây về vi khuẩn trong sữa chỉ để phục vụ cho việc xử lý và bảo quản sữa.

1.3.2. Tính sáng tạo

- Lựa chọn nguồn vật liệu để phân lập vi sinh vật đơn giản, phổ biến và dễ sử dụng.
- Nguồn vi sinh vật có trong sữa là rất đa dạng về chủng loại, nên dễ dàng phân lập.

1.4. Khả năng áp dụng

Đề tài có khả năng nhân rộng cao do hiệu quả của nó về mặt kinh tế, xã hội và môi trường. Nguồn sữa sử dụng để phân lập vi khuẩn là phổ biến, rẻ tiền và dễ tìm kiếm. Các chủng vi khuẩn dễ phân lập do sữa có đa dạng các chủng vi sinh vật.

2. TỔNG QUAN VẤN ĐỀ NGHIÊN CỨU

2.1. Khái niệm vi sinh vật và tầm quan trọng của vi sinh vật

2.1.1. Khái niệm

Vi sinh vật là những sinh vật đơn bào có kích thước nhỏ, không quan sát được bằng mắt thường mà phải sử dụng kính hiển vi. Thuật ngữ vi sinh vật không tương đương với bất kỳ đơn vị phân loại nào trong phân loại khoa học. Nó bao gồm cả virus, vi khuẩn, archaea, vi nấm, vi tảo, động vật nguyên sinh...

Vi sinh vật đóng vai trò vô cùng quan trọng trong thiên nhiên cũng như trong cuộc sống của con người. Nó biến đá mẹ thành đất trồng, nó làm giàu chất hữu cơ trong đất, nó tham gia vào tất cả các vòng tuần hoàn vật chất trong tự nhiên. Nó là các khâu quan trọng trong chuỗi thức ăn của các hệ sinh thái. Nó đóng vai trò quyết định trong quá trình tự làm sạch các môi trường tự nhiên. Trong bảo vệ môi trường, người ta đã sử dụng vi sinh vật làm sạch môi trường, xử lý các chất thải độc hại. Sử dụng vi sinh vật trong việc chế tạo phân bón sinh học, thuốc bảo vệ thực vật không gây độc hại cho môi trường, bảo vệ môi cân bằng sinh thái.

2.1.2. Đặc điểm chung

- Kích thước nhỏ bé: kích thước vi sinh vật thường được đo bằng micromet.
- Hấp thu nhiều, chuyển hóa nhanh. Vi khuẩn lactic (*Lactobacillus*) trong 1 giờ có thể phân giải một lượng đường lactozơ nặng hơn 1000-10000 lần khối lượng của chúng.
- Sinh trưởng nhanh, phát triển mạnh. So với các sinh vật khác thì vi sinh vật có tốc độ sinh trưởng cực kì lớn.
- Năng lực thích ứng mạnh và dễ phát sinh biến dị.
- Phân bố rộng, chủng loại nhiều.
- Do tính chất dễ phát sinh đột biến nên số lượng loài vi sinh vật tìm được ngày càng tăng.
- VSV gồm nhiều nhóm phân loại khác nhau, là những cơ thể đơn bào hay tập hợp đơn bào, có kích thước hiển vi.

2.1.3. Vai trò của vi sinh vật

- Trong tự nhiên:

Tích cực:

+ Vi sinh vật là mắt xích quan trọng trong các chu trình chuyển hóa vật chất và năng lượng trong tự nhiên.

+ Tham gia vào việc gìn giữ tính bền vững của hệ sinh thái và bảo vệ môi trường.

Tiêu cực:

+ Gây bệnh cho người, động – thực vật.

+ Là nguyên nhân gây hư hỏng thực phẩm.

- Trong nghiên cứu di truyền: Là đối tượng lí tưởng trong công nghệ di truyền, công nghệ sinh học...

- Bảo vệ môi trường: Vi sinh vật tham gia tích cực vào quá trình phân giải các phế thải nông nghiệp, phế thải công nghiệp, rác sinh hoạt ...

2.1.4. Tầm quan trọng

Vi sinh vật sống trong đất và trong nước tham gia tích cực vào quá trình phân giải các xác hữu cơ biến chúng thành CO_2 và các hợp chất vô cơ khác dùng làm thức ăn cho cây trồng. Các vi sinh vật cố định nitơ thực hiện việc biến khí nitơ (N_2) trong không khí thành hợp chất nitơ (NH_3 , NH_4^+) cung cấp cho cây cối. Vi sinh vật có khả năng phân giải các hợp chất khó tan chứa P, K, S và tạo ra các vòng tuần hoàn trong tự nhiên. Vi sinh vật còn tham gia vào quá trình hình thành chất mùn. Vi sinh vật có vai trò quan trọng trong năng lượng (sinh khối hoá thạch như dầu hoả, khí đốt, than đá). Trong các nguồn năng lượng mà con người hy vọng sẽ khai thác mạnh mẽ trong tương lai có năng lượng thu từ sinh khối. Sinh khối là khối lượng chất sống của sinh vật.

Vi sinh vật là lực lượng sản xuất trực tiếp của ngành công nghiệp lên men bởi chúng có thể sản sinh ra rất nhiều sản phẩm trao đổi chất khác nhau (các loại axit, enzym, rượu, các chất kháng sinh, các axit amin, các vitamin...). Trong công nghiệp

tuyển khoáng, nhiều chủng vi sinh vật đã được sử dụng để hoà tan các kim loại quý từ các quặng nghèo hoặc từ các bãi chứa xỉ quặng. Vi sinh vật có hại thường gây bệnh cho người, cho gia súc, gia cầm, tôm cá và cây trồng. Chúng làm hư hao hoặc biến chất lương thực, thực phẩm, vật liệu, hàng hoá. Chúng sản sinh các độc tố trong đó có những độc tố hết sức nguy hiểm. Chỉ riêng sự tấn công của virus HIV cũng đủ gây ra ở 50 triệu người nhiễm HIV. Cuối thế kỷ XX khoảng 30 triệu người nhiễm.

2.2. Phương pháp sinh học xử lý nước thải

Bản chất của phương pháp sinh học trong xử lý nước thải là sử dụng khả năng sống và hoạt động của vi sinh vật để khoáng hóa các chất hữu cơ trong nước thải thành các chất vô cơ, các chất khí đơn giản và nước. Quá trình xử lý sinh học nước thải nhằm khử các chất hữu cơ (BOD, COD hoặc TOC), nitrat hóa, khử nitrat, khử Phospho và ổn định chất thải nhờ quá trình chuyển hóa hợp chất hữu cơ thành chất khí và thành vỏ tế bào. Vi sinh vật tạo ra các bông bùn cặn sinh học và loại các bông bùn cặn này ra khỏi nước thải. Các quá trình xử lý nhân tạo điều xuất phát từ các quá trình xảy ra trong tự nhiên bao gồm 2 kiểu sinh trưởng:

- Sinh trưởng lơ lửng đồng nghĩa với bùn hoạt tính ở điều kiện hiếu khí (làm thoáng khí, sục hay thổi khí và khuấy đảo) và điều kiện kỵ khí (sục CO_2 hoặc khuấy đảo hoặc cho dòng chảy ngược).

- Sinh trưởng gắn kết đồng nghĩa với màng sinh học ở điều kiện hiếu khí và điều kiện kỵ khí. Nhờ các biện pháp nhân tạo, hoạt tính của Vi sinh vật được tăng cường và hiệu quả làm sạch chất bẩn được tăng lên đáng kể.

Điều kiện nước thải phải đưa vào xử lý sinh học: Các loại nước thải sinh hoạt, đô thị, của một số ngành công nghiệp (thực phẩm, thủy sản, chế biến nông sản, chăn nuôi, có thể có công nghiệp giấy...) có chứa nhiều chất hữu cơ hòa tan gồm hydratcacbon, protein và các hợp chất chứa N phân hủy từ protein, các chất béo... có cả một số chất vô cơ như H_2S , sulphit, amoniac và các hợp chất chứa N khác... có thể đưa vào xử lý sinh học. Phương pháp xử lý sinh học nước thải có thể dựa trên cơ sở hoạt động của Vi sinh vật để phân hủy các chất hữu cơ nhiễm bẩn nước. Do vậy, điều kiện tiên quyết vô cùng quan trọng là nước thải phải là môi trường sống của

quần thể sinh vật phân hủy các chất hữu cơ có trong nước thải. Để đảm bảo điều kiện này, nước thải phải thỏa mãn:

- Không có chất độc làm chết hoặc ức chế hoàn toàn hệ vi sinh trong nước thải.

- Chú ý đến hàm lượng kim loại nặng. Xếp theo thứ tự mức độ độc hại của chúng: $Sb > Ag > Cu > Hg > Co > Ni > Pb > Cr_3+ > V > Cd > Zn > Fe$. Muối của các kim loại này ảnh hưởng nhiều đến hoạt động sống của vi sinh vật. Nếu quá nồng độ cho phép, các vi sinh vật không thể sinh trưởng được và có thể chết. Như vậy, không thể tiến hành xử lý sinh học. Nếu nồng độ chúng nhỏ hơn giới hạn sẽ hạn chế tốc độ làm sạch của nước, nếu nước thải chứa nhiều chất độc thì tính toán theo chất độc nhất.

Nước thải đưa vào xử lý sinh học có 2 thông số quan trọng là BOD và COD. Tỉ số của 2 thông số này phải là: $COD/BOD \leq 2$ hoặc $BOD/COD \geq 0.5$, mới có thể đưa vào xử lý sinh học (hiếu khí). Nếu COD lớn hơn BOD nhiều lần, trong đó gồm có xenlulozo, hemixenlulozo, protein, tinh bột chưa tan thì phải qua xử lý sinh học kỵ khí.

2.3. Nước thải từ lò giết mổ gia súc, gia cầm

2.3.1. Nguồn thải

Môi trường đang là một vấn đề thách thức đối với các quốc gia nói chung, và với Việt Nam nói riêng. Sự phát triển của ngành lương thực, thực phẩm nhằm đáp ứng được nhu cầu ngày càng tăng của con người đang đồng thời gây ra những vấn đề ô nhiễm ngày một tăng, đặc biệt là ngành giết mổ gia súc gia cầm, có thể được gọi là một trong những ngành gây ra ô nhiễm cao đối với môi trường. Trên thế giới hiện nay, để cung ứng đủ lượng thịt cho nhu cầu tiêu dùng của con người ngày một gia tăng đòi hỏi các cơ sở giết mổ gia súc, gia cầm tại các địa phương và các thành phố lớn trên thế giới phải hoạt động hết công suất. Theo báo cáo hàng năm của OECD-FAO (2011), giá gia súc trong giai đoạn 2011 – 2020 trung bình sẽ cao hơn 30% so với thập kỷ trước. Giá cao và nhu cầu tăng lên đối với tất cả các loại thịt làm gia tăng nguồn cung trong nước (OECD-FAO, 2012). Sản xuất thịt hàng năm dự kiến sẽ tăng trưởng 22% từ năm 2006 đến năm 2016 trên toàn thế giới. Cũng theo báo cáo của

Tổng cục thống kê Ireland (CSO, 2011), số xác động vật của gia súc giết lấy thịt ở Ireland là 1600 nghìn đầu gia súc, 2421 nghìn đầu lợn, 2730 nghìn đầu cừu trong năm 2009, và trong năm 2010 là 1717 nghìn đầu gia súc, 2657 nghìn đầu lợn, 2.383 nghìn đầu cừu. Kết quả là lượng chất thải từ các cơ sở giết mổ này thải ra môi trường đang là một mối lo và cần phải được các cơ quan, nhà chức trách có thẩm quyền quản lý nghiêm ngặt hơn nữa và quan trọng nhất là phải tìm ra cách thức để có thể xử lý nguồn chất thải này để giảm những tác động tiêu cực lên môi trường, tránh những ảnh hưởng xấu đến sức khỏe của con người.

Ở Việt Nam, năng lực giết mổ gia súc, gia cầm này, trừ một vài nhà máy chế biến thịt công nghiệp và được quy hoạch tổ chức khá hơn ở thành phố Hồ Chí Minh, còn lại ở hầu hết các địa phương trong cả nước, đặc biệt là các tỉnh thành phố ở phía Bắc, phần lớn gia súc lớn đều được giết mổ theo cách thức giản đơn và tại chỗ, trong các lò giết mổ hình thành tự phát ngay trong cộng đồng dân cư, hay thậm chí ngay tại gia đình chăn nuôi. Theo thống kê của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn năm 2014, hiện nay trong 53/64 tỉnh thành trên toàn quốc mới có khoảng 851 cơ sở giết mổ đã được kiểm tra đánh giá, ngoài ra còn hơn 28.285 cơ sở giết mổ nhỏ lẻ, trong đó ở 12 tỉnh trọng điểm phía Bắc có khoảng 11485 điểm, trong đó chỉ có khoảng 59 cơ sở giết mổ tập trung (chưa đến 1%). Điều này cho thấy, hiện trạng về năng lực giết mổ gia súc, gia cầm ở Việt Nam hầu hết được thực hiện theo cách thức giản đơn và tại chỗ, trong các lò giết mổ hình thành tự phát ngay trong cộng đồng dân cư, hay thậm chí ngay tại gia đình chăn nuôi. Chỉ có một số ít nhà máy chế biến thịt công nghiệp và được quy hoạch tổ chức với hệ thống xử lý nước thải và chất thải theo tiêu chuẩn, tập trung chủ yếu ở các thành phố lớn như Hà Nội, Hồ Chí Minh. Trong khi đó, các chất thải trong quá trình giết mổ gia súc, gia cầm bao gồm nước thải và chất thải rắn. Các chất thải rắn phát sinh từ các lò giết mổ thực chất là các thành phần không được sử dụng trong quá trình giết mổ như: cặn, phân, các chất bẩn trong lòng ruột của các con gia súc và các mảnh vụn từ lông, mề, ruột, xương,... Các thành phần này chứa lượng lớn các chất hữu cơ chưa phân hủy và rất nhiều các loại vi khuẩn, vi rút, nấm có hại cho sức khỏe của con người, nếu không được xử lý sẽ gây ô nhiễm môi trường và đe dọa nghiêm trọng tới sức khỏe của con người. Với đặc điểm của hệ thống lò giết mổ nhỏ lẻ, tự phát và thiếu tập trung, lượng chất thải và

nước thải phát sinh từ các lò giết mổ thường không được xử lý mà đổ thẳng ra môi trường, hoặc nếu có cũng xử lý chưa hiệu quả, mang tính đối phó. Đứng trước thực trạng đó, yêu cầu thực tế đặt ra là cần phải tập trung và kế hoạch hoá các khu vực lò giết mổ, để có thể xây dựng hệ thống xử lý nước thải và chất thải tập trung, nhằm đảm bảo các yêu cầu về tiêu chuẩn môi trường.

2.3.2. Nước thải

Đặc tính nước thải các lò giết mổ trên thế giới Hầu hết nước thải lò giết mổ được tạo ra trong sản xuất sản phẩm thịt do các quá trình làm sạch: rửa thịt trước và sau khi giết mổ động vật và rửa sàn nhà và các trang thiết bị. Nước thải từ lò giết mổ thường chứa một lượng lớn protein, chất béo và chất hữu cơ lơ lửng (nghĩa là thịt, xương và nội tạng). Đặc điểm của nước thải lò giết mổ phụ thuộc vào loại và số lượng gia súc bị giết hàng ngày. Nói chung, nước thải lò giết mổ có hàm lượng COD, BOD, TN, NH_4^+ và TSS cao (Bayrs, 2012). Hàm lượng trung bình COD, BOD, TN and TSS trong nước thải lò giết mổ có thể đạt các giá trị lần lượt là 4221mg/l, 1209 mg/l, 427 mg/l và 1164 mg/l (Borowski and Szopa, 2012). Đặc tính của một số lò giết mổ theo các nghiên cứu trên thế giới trong đó, hàm lượng BOD và COD của nước thải giết mổ là tương đối cao nằm vào khoảng 900-11000 mg/L đối với BOD và 1820-27.500 mg/L đối với COD. Tổng nitơ và amoni thường dao động trong khoảng 190-735mg/L đối với tổng nitơ và 0-221 mg/L đối với amoni. Việc xả nước thải lò giết mổ có chứa chất gây ô nhiễm cường độ cao vào các nguồn nước là một trong những vấn đề môi trường quan trọng của các cơ sở giết mổ (Ủy ban Châu Âu, 2005).

Hầu hết các công đoạn trong quy trình giết mổ gia súc đều có sử dụng nước, do đó lượng nước thải là tương đối lớn, ước tính cứ trung bình một con heo thì có ra 0,5 m³ nước thải.

Lượng nước thải lớn, chứa hàm lượng TSS, BOD, COD và chất béo cao. Ngoài ra còn có chứa nhiều protein và các chất dinh dưỡng dễ phân hủy sinh học khác.

Nước thải của các cơ sở giết mổ động vật gồm có thịt, mỡ, một số phụ phẩm xương (chiếm 30-40%), nội tạng, da, lông của các loại gia súc (trâu, bò, heo, dê), gia

cầm (gà, vịt, ngan, ...). Trong đó, hợp chất hữu cơ chiếm khoảng 70% – 80% gồm cellulose, protit, axit amin. Nước thải còn chứa nhiều loại vi trùng, virus và trứng giun sán gây bệnh như: Virus lở mồm long móng, Brucella, Salmonella, Leptospira, Microbacteria tuberculosis. Ngoài ra, lượng huyết rơi vãi trong và sau công đoạn chọc tiết và lượng huyết ứ đọng trong bụng heo là một trong những nhân tố làm nước thải tại các cơ sở giết mổ ô nhiễm một cách trầm trọng.

Bảng 2.1. Thành phần nước thải giết mổ gia súc

STT	Thông số	ĐVT	Giá trị đầu vào	QCVN 40:2011/BTNMT	
				Cột A	Cột B
1	pH	-	6,5 – 8,5	6 – 9	5,5 – 9
2	BOD ₅	mg/l	1.500 – 2.000	30	50
3	COD	mg/l	2.000 – 2.800	75	150
4	TSS	mg/l	350 – 700	50	100
5	N tổng số	mg/l	100 – 250	20	40
6	P tổng số	mg/l	10 – 50	4	6
7	Dầu mỡ	mg/l	50 – 200	5	10
8	Tổng Coliforms	MPN/100 ml	10 ⁴ - 10 ⁵	3.000	5.000

Nguồn: <https://kimhoanghiep.com/xu-ly-nuoc-thai-giet-mo-gia-suc-gia-cam>

Nước thải từ các lò mổ gia súc và gia cầm có các tác hại sau:

Tác hại đến môi trường: Tác hại đến môi trường của nước thải do các thành phần ô nhiễm tồn tại trong nước thải gây ra.

- COD, BOD: sự khoáng hoá, ổn định chất hữu cơ tiêu thụ một lượng lớn và gây thiếu hụt oxy của nguồn tiếp nhận dẫn đến ảnh hưởng đến hệ sinh thái môi trường nước. Nếu ô nhiễm quá mức, điều kiện yếm khí có thể hình thành. Trong quá trình phân huỷ yếm khí sinh ra các sản phẩm như H₂S, NH₃, CH₄,... làm cho nước có

mùi hôi thối và làm giảm pH của môi trường. - SS: lắng đọng ở nguồn tiếp nhận, gây điều kiện yếm khí.

- Nhiệt độ: nhiệt độ của nước thải sinh hoạt thường không ảnh hưởng đến đời sống của thủy sinh vật nước.

- Vi trùng gây bệnh: gây ra các bệnh lan truyền bằng đường nước như tiêu chảy, ngộ độc thức ăn, vàng da,...

- Ammonia, P: đây là những nguyên tố dinh dưỡng đa lượng. Nếu nồng độ trong nước quá cao dẫn đến hiện tượng phú dưỡng hoá.

- Màu: mất mỹ quan.

- Dầu mỡ: gây mùi, ngăn cản khuếch tán oxy trên bề mặt.

2.4. Một số kết quả nghiên cứu về ứng dụng vi sinh vật trong xử lý nước thải

2.4.1. Trên thế giới

Một điểm đặc trưng trong nước thải chế biến thịt và thủy hải sản là sự hiện diện với hàm lượng lớn các chất hữu cơ cao phân tử như protein, amino acid, lipid và một số chất khác. Các chất hữu cơ cao phân tử này do chậm phân hủy nên chính là tác nhân khiến nguồn nước bị ô nhiễm nặng nề (Chowdhury, 2010 và Johns, 1995). thuộc vào loại nguyên liệu chế biến, chất phụ gia sử dụng, loại sản phẩm sản xuất... nhưng phần chất hữu cơ chủ yếu đều là protein (Gonzalez, 1996), có lẽ là do protein thường chiếm từ 15-25% trọng lượng tươi các loại cá và thịt gia súc (Johns, 1995 và Sikorski, 1990). Do vậy, để giảm thiểu ô nhiễm, bên cạnh các phương pháp xử lý hóa học, hóa lý, cơ học thì xử lý sinh học được đặc biệt quan tâm và đem lại hiệu quả cao do đặc trưng ô nhiễm nồng độ lớn các protein có thể phân hủy sinh học trong nước thải chế biến thịt và thủy hải sản. Trong quá trình xử lý nước thải bằng phương pháp sinh học, sự phân giải protein mở đầu bằng giai đoạn thủy phân và nhiều nghiên cứu đã chứng minh rằng đây là giai đoạn quan trọng, quyết định tốc độ và hiệu quả xử lý (Frolund, 1995 và Burgess, 2008). Ở giai đoạn này, một số nhóm vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp enzyme ngoại bào phân giải các hợp chất protein không tan thành các đơn phân tử (các monomer và oligomer) dễ tan hơn và dễ hấp thụ hơn đóng vai trò then chốt. Trong số các vi sinh vật có khả năng sinh enzyme

ngoại bào cao, vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* được biết đến khá nhiều do chúng có thể sử dụng được đa dạng nguồn cơ chất để tăng sinh khối và phát triển, do vậy *Bacillus* đã và đang được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau của đời sống nói chung và trong công tác xử lý nước thải nói riêng ở Việt Nam như nước nuôi thủy sản (Robert, 1998), nước sông, hồ bị ô nhiễm bởi chất thải sinh hoạt (Buchanon, 1996). Nhờ có hoạt tính enzyme ngoại bào cao, các loài thông dụng khác nhau của *Bacillus* như *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*..., khi được bổ sung vào các loại nước thải nói trên, đã chứng tỏ hiệu lực phân hủy chất hữu cơ cao hơn hẳn so với các chủng tự nhiên sẵn có trong nước thải (Robert, 1998).

2.4.2. Tại Việt Nam

Tại Việt Nam trong khoảng 10 năm trở lại đây, vấn đề nghiên cứu và ứng dụng vi sinh vật trong xử lý nước thải nói chung đã được nhiều nhà khoa học và công nghệ quan tâm. Trung tâm Công nghệ Sinh học, Đại học quốc gia Hà Nội đã nghiên cứu thành phần vi sinh vật trong chế phẩm vi sinh EM của Nhật Bản, kết hợp với các chủng xạ khuẩn để tạo ra chế phẩm riêng tại Việt Nam ứng dụng vào xử lý chất thải làm phân bón hữu cơ vi sinh. Tại Viện Công nghệ Sinh học, Viện Khoa học Và Công Nghệ Việt Nam, Lý Kim Bằng và cộng sự đã phân lập tuyển chọn vi khuẩn và xạ khuẩn chịu nhiệt phân hủy Xenluloza tạo chế phẩm Micromic 3 để bổ sung vào hệ thống xử lý rác thải sinh hoạt làm tăng tỉ lệ bùn hữu cơ và rút ngắn thời gian ủ. Tại Đại học Bách Khoa Hà Nội đã nghiên cứu phân lập tuyển chọn nấm sợi phân giải xenluloza dùng trong xử lý rác hữu cơ, Viện Công nghệ Sinh học Nông nghiệp, Trường Đại học Nông nghiệp I đã nghiên cứu sản xuất chế phẩm dùng khử mùi hôi và vệ sinh chuồng trại chăn nuôi.

Từ 95 chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* đã phân lập, xác định được chủng vi khuẩn BaPG có hoạt tính protease cao nhất (24,5), chủng BaD có hoạt tính amylase cao nhất (22,0) và chủng BaRT9 có hoạt tính cellulase cao nhất (21,5). Sáu chủng vi khuẩn được lựa chọn (BaD, BaPG, BaPG3, BaRT 9, BaRT 6 và BaPT4) đều có tính đối kháng mạnh đối với 2 chủng vi khuẩn gây bệnh chủ yếu ở tôm là *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*. Tổng hợp các kết quả nghiên cứu đã lựa chọn tổ hợp gồm 4 chủng vi khuẩn (BaD, BaPG, BaRT 9 và BaRT 6) có khả năng kháng

khuẩn và có hoạt tính enzym phân hủy chất hữu cơ mạnh, để sử dụng trong sản xuất chế phẩm sinh học phục vụ nuôi trồng thủy sản (Khuất Hữu Thanh và Bùi Văn Đạt, 2010).

Quách Thị Minh Tâm và Bùi Thị Xuân Diệu (2015) đã kết luận từ chất thải lò giết mổ gia súc đã phân lập được vi khuẩn có khả năng phân hủy lông gia súc (lông heo) và lông gia cầm. Khả năng phân hủy cơ chất chứa keratin không chỉ phụ thuộc vào hoạt tính keratinase mà còn phụ thuộc vào các yếu tố khác (có thể là tế bào vi khuẩn và kiểu cấu trúc keratin, Edward et al., 2001). Trong thí nghiệm, hai dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy lông heo mạnh (*Bacillus flexus* Kr11) và lông gia cầm mạnh (*Bacillus megaterium* Kr45) đều thuộc chi *Bacillus*, kỳ vọng ứng dụng để xử lý rác thải chứa keratin. Dòng vi khuẩn Kr45 liên quan gần với loài *Bacillus megaterium* với khả năng phân hủy lông gà nguyên hoàn toàn sau 10 tuần có tiềm năng đưa vào thử nghiệm ứng dụng phân hủy lông gia cầm ở điều kiện môi trường tự nhiên để làm thức ăn chăn nuôi.

Bacillus là nhóm vi khuẩn hiện diện đa số trong các chế phẩm vi sinh dùng cho nuôi trồng thủy hải sản đặc biệt là nuôi tôm. Chúng có thể được phân lập dễ dàng từ trong đất, nước. Tuy nhiên hiện nay các chủng vi sinh vật và chế phẩm vi sinh vật dùng trong nuôi trồng thủy hải sản đều phải nhập ngoại với giá thành rất cao. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành phân lập các chủng *Bacillus* từ chính các mẫu đất, nước và tôm trong các ao nuôi tôm ở tỉnh Bến Tre. Các chủng vi sinh vật này được sàng lọc để chọn chủng *Bacillus* an toàn và mang các đặc tính có lợi như: khả năng sinh enzyme ngoại bào cellulase, amylase, protease, lipase và khả năng đối kháng với vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh chủ yếu trên tôm. Chủng *Bacillus* tiềm năng được tiến hành định danh và khảo sát biên độ pH, khả năng chịu mặn. Các thông số khảo sát này làm cơ sở cho việc ứng dụng các chủng vi sinh vật này trong việc sản xuất chế phẩm vi sinh (Nguyenx Văn Phúc và Phan Thị Phương Trang, 2017).

Võ Hồng Thi và cs. (2012) cho thấy từ nước thải sản xuất giàu đạm của một vài nhà máy chế biến thịt và thủy hải sản, đã lựa chọn được 10 chủng *Bacillus* có khả năng phân giải protein tốt từ 30 chủng phân lập, bao gồm 7 chủng có nguồn gốc từ

nước thải chế biến thủy sản và 3 chủng có nguồn gốc từ nước thải chế biến thịt. Kết quả khảo sát hoạt tính phân giải protein của 10 chủng này cho thấy hoạt tính protease đạt cực đại sau 72 giờ nuôi cấy ở pH 7 và 50°C. Những kết quả ban đầu này có thể được coi là cơ sở để triển khai nghiên cứu ứng dụng khả năng xử lý nước thải chế biến thịt và thủy hải sản trong thực tế với các mức độ nước thải ô nhiễm khác nhau của các tổ hợp *Bacillus* tuyển chọn.

Lê Hoàng Việt và cs (2015) cho thấy hiệu suất xử lý các chất ô nhiễm của nước thải lò giết mổ bằng mô hình hai giai đoạn cao hơn hiệu suất xử lý của mô hình một giai đoạn. Quá trình nitrat hóa, khử ni-trat của xử lý hai giai đoạn xảy ra tốt hơn xử lý một giai đoạn. Ở thời gian tồn lưu nước 6 giờ mô hình hai giai đoạn cho nước thải sau xử lý đạt QCVN 40:2011 (cột A).

Lê Công Nhất Phương và cs (2012) cho thấy từ kết quả thực nghiệm trong phòng thí nghiệm, đã xác định được khả năng kết hợp của hai nhóm vi khuẩn *Nitrosomonas* và *Anammox* trong cùng một thiết bị để xử lý ammonium trong nước thải giết mổ. Ở cùng tải trọng N-NH₄ nước thải đầu vào thì tải trọng thấp và lưu lượng nước thải cao có hiệu quả loại N-NH₄ tốt hơn so với tải trọng cao hơn và lưu lượng nước thải thấp hơn. Mô hình thí nghiệm hoạt động hiệu quả với hiệu suất xử lý đạt 92% ở tải trọng 0,04 kg N-NH₄/m³/ngày và 87,8% ở tải trọng 0,14 kg N-NH₄/m³/ngày. Do hai nhóm vi khuẩn này có đặc tính sinh lý khác nhau nên việc sử dụng giá thể (mô hình sinh học dính bám) tỏ ra thích hợp cho hai nhóm vi khuẩn này hoạt động chung trong cùng thiết bị. Với giá thể là sợi polyacrylic thì hiệu quả xử lý ammonium tốt hơn giá thể là sợi bông tắm.

Tuy nhiên hầu như chưa có kết quả nghiên cứu về phân lập và tuyển chọn vi sinh vật từ nguồn sữa bị hư hỏng cho xử lý nước thải.

3. ĐỐI TƯỢNG, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

3.1. Đối tượng nghiên cứu

- Các chủng vi sinh vật phân lập từ sữa có hoạt tính phân giải cao.
- Nước thải từ lò mổ gia súc và gia cầm.

3.2. Nội dung nghiên cứu

- Nghiên cứu, phân lập các chủng vi khuẩn gây hư hỏng sữa từ sữa có hoạt tính phân giải cacbohidrat và lipit cao trong nước thải.

- Nghiên cứu hiệu quả của các chủng vi khuẩn phân lập được đối với sự phân giải các chất cacbohidrat và lipit và ứng dụng trong việc xử lý nước thải.

3.3. Phương pháp nghiên cứu

3.3.1. Giai đoạn 1: Chuẩn bị môi trường phân lập & Khử trùng dụng cụ:

- Thời gian: tháng 9 - 10/2018.

- Địa điểm: Khoa Nông học, trường Đại học Nông Lâm Huế

- Phương pháp tiến hành:

* Chuẩn bị môi trường NA với các hóa chất bao gồm: 10 g peptone/lít nước cất, 3 g cao thịt/ lít nước cất, 5 g NaCl/lít nước cất, 20 g agar/lít nước cất. Môi trường NA sẽ được khử trùng ở nhiệt độ 121°C trong vòng 20 phút.

* Chuẩn bị môi trường SKM với các hóa chất bao gồm: 10 g peptone/lít nước cất, 3 g cao thịt/ lít nước cất, 5 g NaCl/ lít nước cất, 15 g agar/ lít nước cất, 28 g bột sữa gầy (skimmed milk)/lít nước cất. Môi trường NA+ sữa gầy được khử trùng ở 121°C trong vòng 20 phút.

* Tất cả các môi trường nêu trên được chuẩn bị ở độ pH = 7.0 ± 0.2

* Khử trùng dụng cụ bao gồm: Ống nghiệm, Ống đong, Que cấy, bình thể tích các loại, Que khuấy, đĩa Petri được khử trùng trong máy khử trùng ở 121°C, 1atm trong vòng 20 phút.

* Pha loãng 2 mẫu sữa với 3 độ pha loãng là 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} .

3.3.2. Giai đoạn 2: Quan sát hình thái khuẩn lạc có trong sữa:

- Thời gian: tháng 10/2018.

- Địa điểm: Khoa Nông học, Trường Đại học Nông Lâm Huế.

- Phương pháp tiến hành:

*Thực hiện cấy trang 3-4 ml dung dịch mẫu ở 3 độ pha loãng 3 lần nhắc lại lên môi trường nuôi dưỡng NA, môi trường SKM trong các đĩa petri 2 lần nhắc lại, nuôi

cấy các loại vi khuẩn trong tất cả các mẫu sữa pha loãng ở 37°C trong tủ định ôn trong vòng 48 h để quan sát và nhận diện sơ bộ những khuẩn lạc xuất hiện phổ biến nhất trong các đĩa thạch.

3.3.3. Giai đoạn 3: *Nuôi cấy các chủng vi khuẩn nghi ngờ là Bacillus và các chủng vi khuẩn khác phân lập từ sữa trên môi trường thạch nghiêng trong ống nghiệm:*

- Thời gian: tháng 11/2018.

- Địa điểm: Khoa Nông học, Trường Đại học Nông Lâm Huế.

- Phương pháp tiến hành:

- 1) Tiến hành lấy mẫu vi khuẩn từ khuẩn lạc theo phương pháp đánh số chủng:

- +Thực hành đánh số từ I đến XVI cho các chủng vi khuẩn có khuẩn lạc xuất hiện với độ thường gặp cao trên các đĩa thạch petri ở giai đoạn 2.

- 2) Cấy chuyển từ môi trường thạch rắn petri sang môi trường thạch nghiêng trong ống nghiệm:

- + Dùng que cấy lấy mẫu vi khuẩn tương ứng với các khuẩn lạc đã được đánh số.

- + Cấy zigzag các mẫu trên môi trường thạch nghiêng với mục đích quan sát khuẩn lạc rõ nhất, cấy lên môi trường thạch 3 lần nhắc lại cho đến khi thu được chủng thuần nhất.

3.3.4 Giai đoạn 4: *Thử hoạt tính phân giải cacbohidrat và lipit của các loại vi khuẩn đã nuôi cấy trên môi trường:*

- Thời gian: tháng 11/2018.

- Địa điểm: Khoa Nông học, Trường Đại học Nông Lâm Huế.

- Phương pháp tiến hành:

Đánh giá hiệu quả phân giải cacbohidrat, lipit theo phương pháp xác định vòng hoạt tính sản sinh từ protease trên thạch. Khảo sát với cacbohidrat, thay nguồn nitrogen bằng gelatin, lipit với môi trường khoáng bổ sung nguồn lipit bằng dầu thực vật.

+ Thực hiện cấy chuyển các vi khuẩn từ ống nghiệm đánh số từ giai đoạn 3. Khi thạch nguội, tiến hành kẻ 3 đường phân biệt trên môi trường thạch nuôi ở 36.5°C sau 48 giờ, sử dụng thuốc thử Fraziae để xác định hoạt tính vòng phân giải môi trường có chứa gelatin, thuốc thử lugol để xác định hoạt tính vòng phân giải môi trường có chứa nguồn lipit là dầu thực vật.

Sử dụng thuốc thử Fraziae* để xác định hoạt tính vòng phân giải môi trường có chứa gelatin, thuốc thử Lugol** để xác định hoạt tính vòng phân giải môi trường có chứa nguồn lipit là dầu thực vật

*Ghi chú: *Thuốc thử Frazie bao gồm: 15g HgCl₂, 20ml HCl đậm đặc, 100ml nước cất*

*** Thuốc thử Lugol bao gồm 2g KI, 1g I₂, 200ml nước cất.*

3.3.5. Giai đoạn 5: Thử nghiệm trên môi trường nước thải, so sánh các chỉ tiêu về tỉ lệ cacbohidrat và lipit trong các mẫu nước thải trước và sau khi xử lí bằng các chủng vi khuẩn từ sữa để chứng minh hiệu quả của vi khuẩn từ sữa hư đến khả năng xử lí nước thải.

- Thời gian: tháng 12/2018.

- Địa điểm thu thập mẫu nước thải tại lò giết mổ gia súc, gia cầm Bãi Dâu, thành phố Huế, tỉnh Thừa Thiên Huế. Các thí nghiệm tiến hành tại Khoa Nông học, trường Đại học Nông Lâm Huế.

- Phương pháp tiến hành:

** Công thức thí nghiệm:*

+ Bố trí thí nghiệm xử lí nước thải (Mẫu nước thải được thu thập từ các lò mổ gia súc và gia cầm với hàm lượng cacbohidrat và lipit cao) bằng các chủng vi khuẩn có hoạt tính phân giải cacbohidrat và lipit cao trong điều kiện sục khí liên tục.

100% nước thải và được tiến hành thí nghiệm với 3 lần nhắc lại với 2 chủng có hoạt tính phân giải cao nhất ở giai đoạn 4 (bao gồm chủng III và chủng X):

Thí nghiệm đối chứng: Đối chứng được tiến hành như mẫu thật nhưng không cho vi khuẩn vào.

- Bình 1: 500 ml nước thải và cho vi khuẩn chủng III vào (0,5 g/lit).
- Bình 2: 500 ml nước thải và cho vi khuẩn chủng X vào (0,5 g/lit).

Toàn bộ các bình đựng mẫu nước thải bao gồm: Bình đựng nước thải không cho vi khuẩn và các bình đựng nước thải đã cho vi khuẩn của 2 chủng vào được đảm bảo trong điều kiện sục khí liên tục trong vòng từ 3-4 ngày.

* *Cách lấy nước thải*: Tiến hành khảo sát và chọn 3 vị trí: đầu, giữa và cuối nguồn thải, để thu mẫu nước, sau đó trộn chung với nhau lấy mẫu đại diện làm thí nghiệm. Mẫu nước được thu vào buổi sáng. Tráng chai, lọ thu mẫu bằng nước tại hiện trường, ấn chai xuống dưới mặt nước từ 20-30 cm cho nước chảy vào từ từ, nhấc chai lên đây nắp lại trữ lạnh ở 4°C sau đó đem về phòng thí nghiệm Khoa Nông học, Trường Đại học Nông Lâm Huế để phân tích.

* *Chỉ tiêu và phương pháp theo dõi*: Theo dõi các thông số chất lượng nước trước và sau khi xử lý với vi khuẩn gồm các chỉ tiêu như sau: pH (pH met), BOD₅ (TCVN 6001-1995), COD (phương pháp K₂Cr₂O₇), N tổng (phương pháp Kjeldahl), P tổng (phương pháp so màu), SS (phương pháp khối lượng), NO₃⁻ (TCVN 6180:1996), NH₄⁺ (phương pháp indophenol blue).

Xác định hiệu suất xử lý theo công thức:

$$H (\%) = \frac{(M_{\text{vào}} - M_{\text{ra}})}{M_{\text{vào}}} \times 100$$

Trong đó:

H: Hiệu suất xử lý (%).

$M_{\text{vào}}$: nồng độ thông số đầu vào (mg/l).

M_{ra} : nồng độ thông số đầu ra (mg/l)

3.4. Phương pháp xử lý số liệu

Xử lý số liệu với các chỉ tiêu như trung bình, SD và tính toán số liệu và vẽ đồ thị, biểu đồ bằng phần mềm Excel.

4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

4.1. Kết quả phân lập các chủng vi khuẩn gây hư hỏng sữa có trong sữa trên môi trường thạch trên đĩa petri

+ Hoàn tất môi trường chuẩn bị cho việc nuôi cấy vi khuẩn trong sữa:

Môi trường NA (Nutrient Agar) là loại môi trường phổ biến, giàu dinh dưỡng, phân lập được phần lớn các loại vi khuẩn, thích hợp cho việc quan sát các khuẩn lạc phân lập được từ các mẫu sữa.

Môi trường SKM (Skimmed milk agar) là loại môi trường thường gặp trong việc kiểm định các mẫu sữa, giàu dinh dưỡng và thuận lợi quan sát được hình thái các khuẩn lạc phân lập được từ các mẫu sữa.

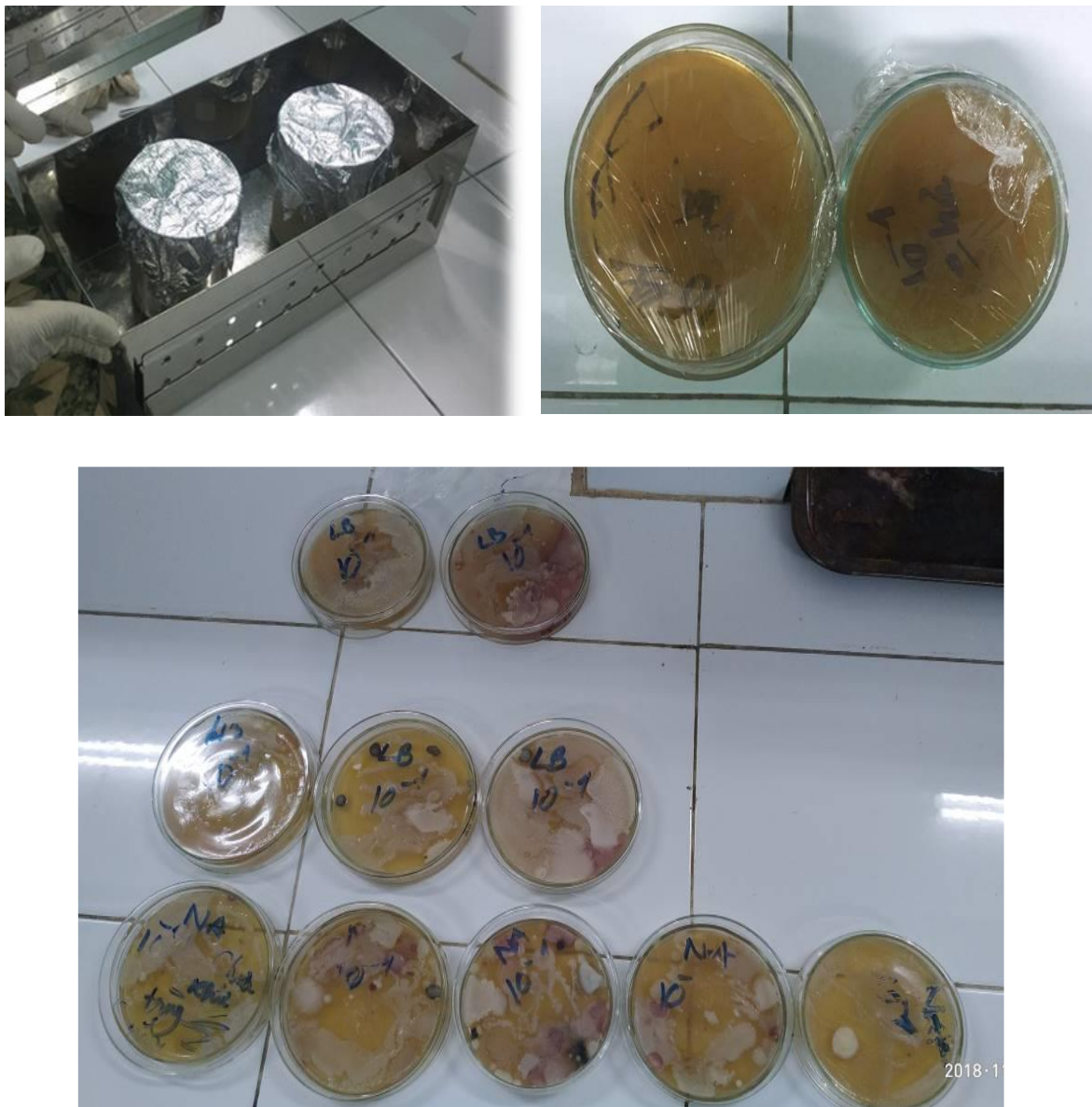
+ Quan sát được hình thái khuẩn lạc có trong các đĩa petri của các mẫu sữa có độ pha loãng khác nhau qua đó chọn lọc ra chủng vi khuẩn có hình thái khuẩn lạc phổ biến cho giai đoạn tiếp theo.

+ Tiến hành giai đoạn phụ: Định danh sơ bộ hình thái khuẩn lạc được nghi ngờ của *Bacillus spp.* Giai đoạn có vai trò quan trọng trong hướng phát triển của đề tài trong tương lai. *Bacillus spp.* thường có mặt với mật độ cao trong sữa, có khả năng sản sinh enzym phân giải các chất cacbohydrat và lipit mạnh mẽ. Một số loại thuộc *Bacillus spp.* có vai trò trong việc ức chế các trực khuẩn trong nước thải phát triển như E. Coli hay Coliform tăng khả năng xử lý nước thải. Ba chủng vi khuẩn có khuẩn lạc nghi ngờ là *Bacillus spp.* bao gồm:

* *Bacillus subtilis*: khuẩn lạc dạng tròn, rìa răng cưa không đều, màu vàng xám, đường kính 3 – 5 mm, sau 2 – 3 ngày nuôi cấy có bề mặt nhẵn nheo, màu hơi nâu.

* *Bacillus licheniformis*: khuẩn lạc dạng tròn, màu hồng trắng, đường kính 2-4 mm, phát triển thành từng đám trên đĩa petri.

* *Bacillus Cereus*: rìa răng cưa không đều, màu trắng sữa, chiếm diện tích lớn, phát triển nhanh dọc theo chiều dài đĩa petri.



Hình 4.1. Kết quả phân lập các chủng vi khuẩn gây hư hỏng sữa

4.2. Kết quả cấy chuyển các chủng vi khuẩn gây hư hỏng sữa có trong sữa trong môi trường thạch trên đĩa petri lên môi trường thạch nghiêng

Thực hiện cấy chuyển với số lần nhắc lại cho đến khi thu được chủng đồng nhất trên môi trường thạch nghiêng. Điều này tạo điều kiện thuận lợi cho việc đánh giá hoạt tính các chủng đồng nhất này ở giai đoạn tiếp theo.

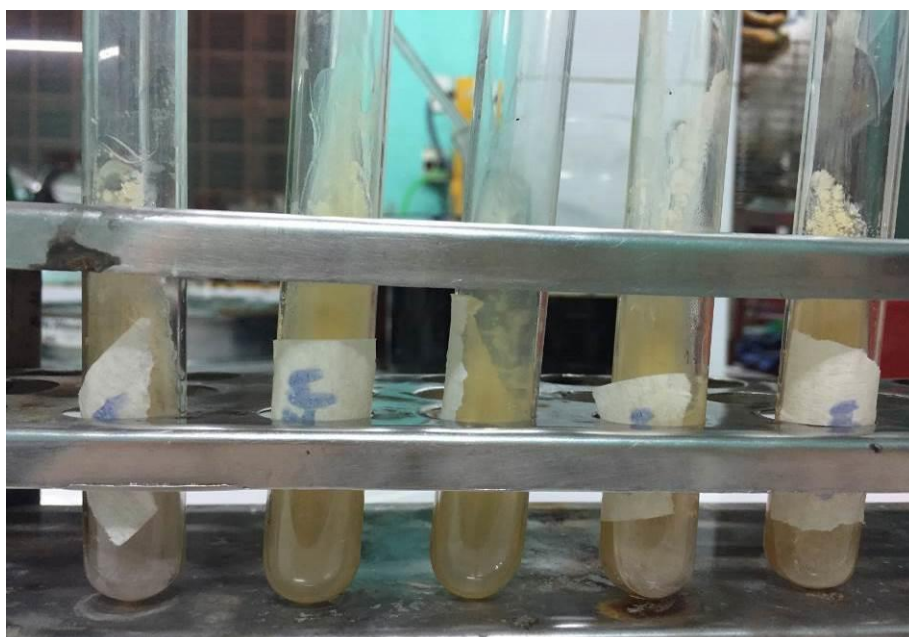
Bảng 4.1. Theo dõi sự đồng nhất của hình thái khuẩn lạc của 16 chủng được phân lập từ giai đoạn trước

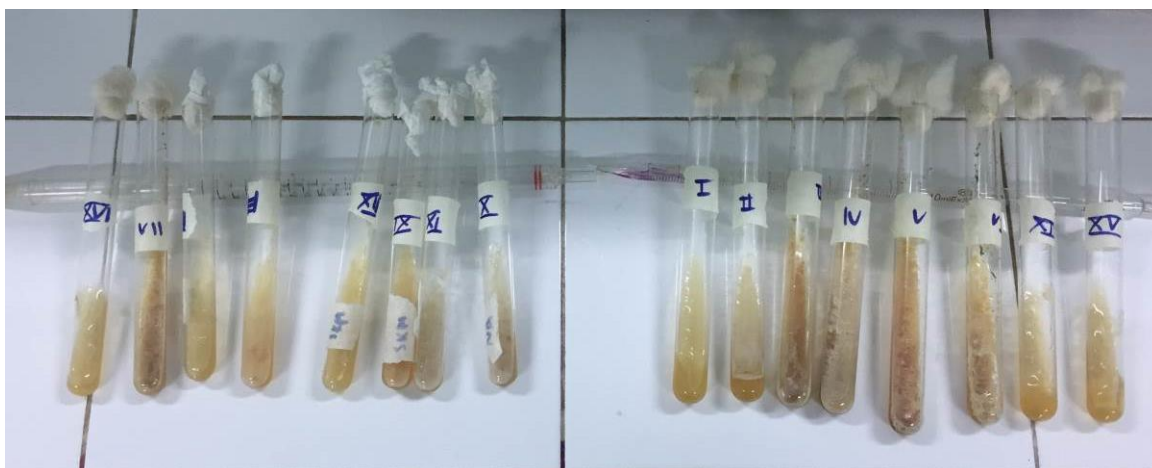
Chủng/Số lần cấy nhắc lại	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XVIII	XIV	XV	XVI
Lần 1	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+
Lần 2	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Lần 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Ghi chú: “+” bị nhiễm các loại vi khuẩn khác và hình dạng khuẩn lạc không đồng nhất.

“-” không bị nhiễm các loại vi khuẩn khác và hình dạng khuẩn lạc đồng nhất.

Từ bảng 4.1, cho thấy các chủng vi khuẩn phân lập được ở giai đoạn trước được cấy chuyển lặp lại cho đến khi thu được sự phát triển đồng nhất trên môi trường thạch nghiêng. Ở lần nhắc lại thứ 3, môi trường thạch nghiêng cho thấy sự đồng nhất trong hình thái khuẩn lạc.





Hình 4.2. Kết quả cấy chuyển các chủng vi khuẩn gây hư hỏng sữa có trong sữa trong môi trường thạch trên đĩa petri lên môi trường thạch nghiêng

4.3. Kết quả xác định hoạt tính phân giải cacbohidrat và lipid của các chủng vi khuẩn ở giai đoạn 3 và chọn lọc ra những chủng vi khuẩn hư hỏng sữa có trong sữa có hoạt tính phân giải cacbohidrat và lipid cao

Bảng 4.2. Kết quả xác định hoạt tính phân giải cacbohidrat
(Môi trường khoáng với nguồn đạm là Gelatin)

Chủng	Đặc điểm vòng phân giải
II	Loang (+++)
III	Loang (+++)
IV	Loang (+++)
X	Loang (+++)
XVI	Loang (+++)

Từ kết quả bảng 4.2 cho thấy chọn lọc các chủng II, III, IV, X, XVI có vòng phân giải lớn, phát triển loang trên bề mặt đĩa thạch chứa môi trường chứng minh cho khả năng phân giải cacbohidrat cao. Các chủng II, III, IV, X, XVI có vòng phân giải lớn, phát triển loang trên bề mặt đĩa thạch chứa môi trường.

Bảng 4.3. Kết quả xác định hoạt tính phân giải lipit

(Môi trường khoáng với nguồn lipit là dầu thực vật)

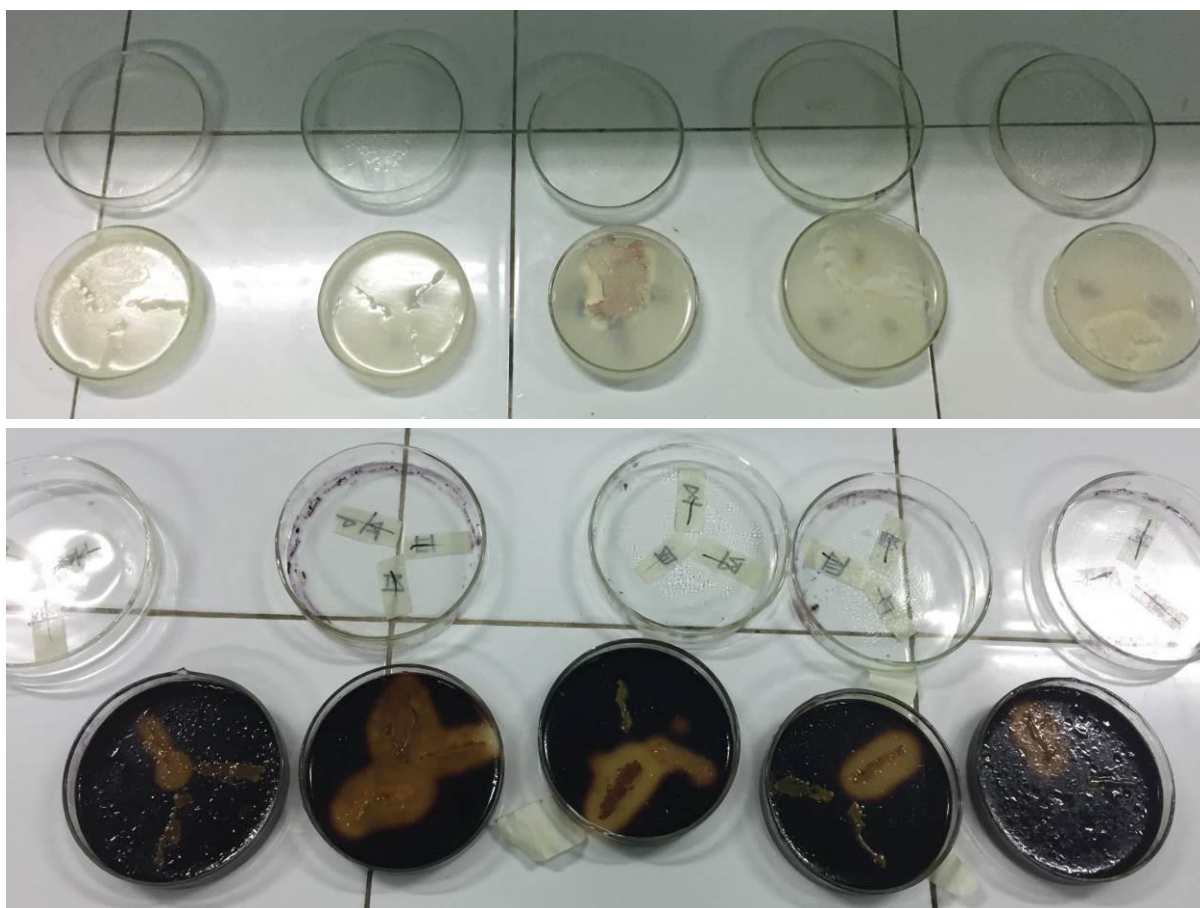
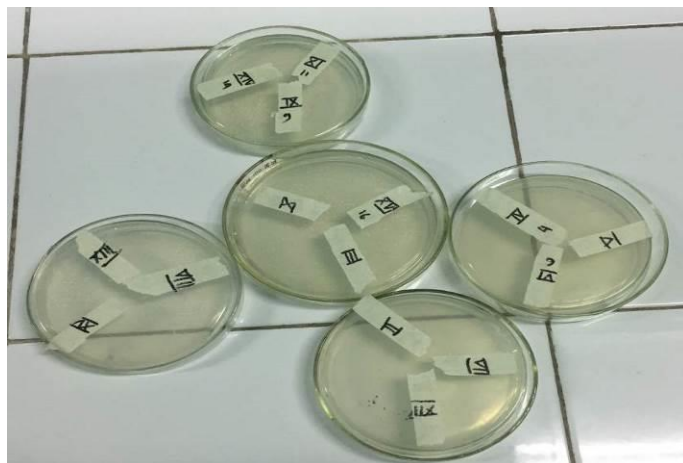
Chủng	Đường kính trong (mm)	Đường kính ngoài (mm)	Hiệu số (mm)	Đặc điểm hoạt tính
II	8,5	11,6	3,1	++
III	4,8	7,0	2,2	++
IV	-	-	-	Loang (++++)
V	-	-	-	Loang (++++)
VI	5,2	6,8	1,6	+
VII	5,0	6,3	1,3	+
VIII	5,3	8,2	2,9	++
IX	-	-	-	Loang (++++)
X	-	-	-	Loang (++++)
XI	-	-	-	Loang (++++)
XII	-	-	-	Loang (++++)
XIII	4,5	6,8	2,3	++
XIV	5,0	6,3	1,3	+
XV	5,4	7,2	1,8	+
XVI	3,1	5,0	1,9	+

Ghi chú: Nếu hiệu số đường kính ngoài và trong của vòng phân giải < 2 , kí hiệu “+”: có hoạt tính phân giải lipit nhưng yếu.

Nếu hiệu số đường kính ngoài và trong của vòng phân giải > 2 , kí hiệu “++”: hoạt tính phân giải lipit mạnh hơn.

“++++” loang mạnh ứng với vòng phân giải có kích thước lớn và loang trên bề mặt đĩa thạch chứa môi trường.

Từ bảng 4.3 cho thấy cả 15 chủng nuôi đồng nhất trên môi trường thạch nghiêng đều có hoạt tính phân giải lipid, đặc biệt chủng IV, V, IX, X, XI, XII có vòng phân giải có kích thước lớn và loang trên bề mặt đĩa thạch chưa môi trường ứng với khả năng phân giải lipid mạnh mẽ nhất.



Hình 4.3. Kết quả xác định hoạt tính phân giải cacbohidrat và lipid của các chủng vi khuẩn

4.4. Kết quả quá trình sử dụng các vi khuẩn có hoạt tính phân giải cacbohidrat và lipit cao ở giai đoạn 4 để bước đầu ứng dụng trong việc xử lý nước thải

Tiến hành quan sát độ đục của nước thải sau 3-4 ngày sục khí liên tục:

- Ở bình đối chứng chứa mẫu nước thải nhưng không cho vi khuẩn vào: Sau 3-4 ngày sục khí liên tục, độ đục của mẫu ít thay đổi so với ban đầu.

- Ở 2 bình chứa chủng vi khuẩn II và X sau 3-4 ngày sục khí liên tục, độ đục của mẫu thay đổi nhiều so với ban đầu. Cụ thể là:

+ Ở bình chứa chủng vi khuẩn II: Độ đục thay đổi rõ rệt nhất sau 3-4 ngày sục khí liên tục so với ban đầu, độ đục giảm xuống và mẫu nước thải ở bình chứa chủng vi khuẩn II trở nên trong hơn so với bình đối chứng và trước khi sục khí liên tục 3-4 ngày.

+ Ở bình chứa chủng vi khuẩn X: Độ đục thay đổi rõ sau 3-4 ngày sục khí liên tục so với ban đầu, độ đục giảm xuống và mẫu nước thải ở bình chứa chủng vi khuẩn X trở nên trong hơn so với bình đối chứng và trước khi sục khí liên tục 3-4 ngày.

Bảng 4.4. Mẫu nước thải đối chứng trước và sau khi sục khí 3-4 ngày

Chỉ tiêu	Đơn vị tính	Trước khi sục khí	Sau khi được sục khí	TCVN 5945:2005	
				Cột B	Cột C
pH	-	$7,25 \pm 0,12$	$7,20 \pm 0,15$	5,5 – 9	5 - 9
SS	mg/L	$165 \pm 7,76$	$158 \pm 5,78$	100	200
COD	mg/L	$1.545 \pm 174,2$	$1.459 \pm 154,3$	50	100
BOD ₅	mg/L	$875 \pm 70,2$	$812 \pm 68,3$	80	400
N tổng	mg/L	$100,5 \pm 12,1$	$95,2 \pm 10,2$	30	60
P tổng	mg/L	$20,3 \pm 1,5$	$18,4 \pm 1,4$	6	8
NO ₃ ⁻	mg/L	$14,5 \pm 0,53$	$13,6 \pm 0,35$	-	-
NH ₄ ⁺	mg/L	$38,6 \pm 5,23$	$36,4 \pm 3,35$	10	15

Ghi chú: Số liệu trong bảng là giá trị trung bình $\pm$ SD

Tiến hành so sánh tỉ lệ các cacbohidrat và lipit ở bình đối chứng và ở các bình chứa chủng vi khuẩn sau khi được sục khí liên tục trong 3-4 ngày.

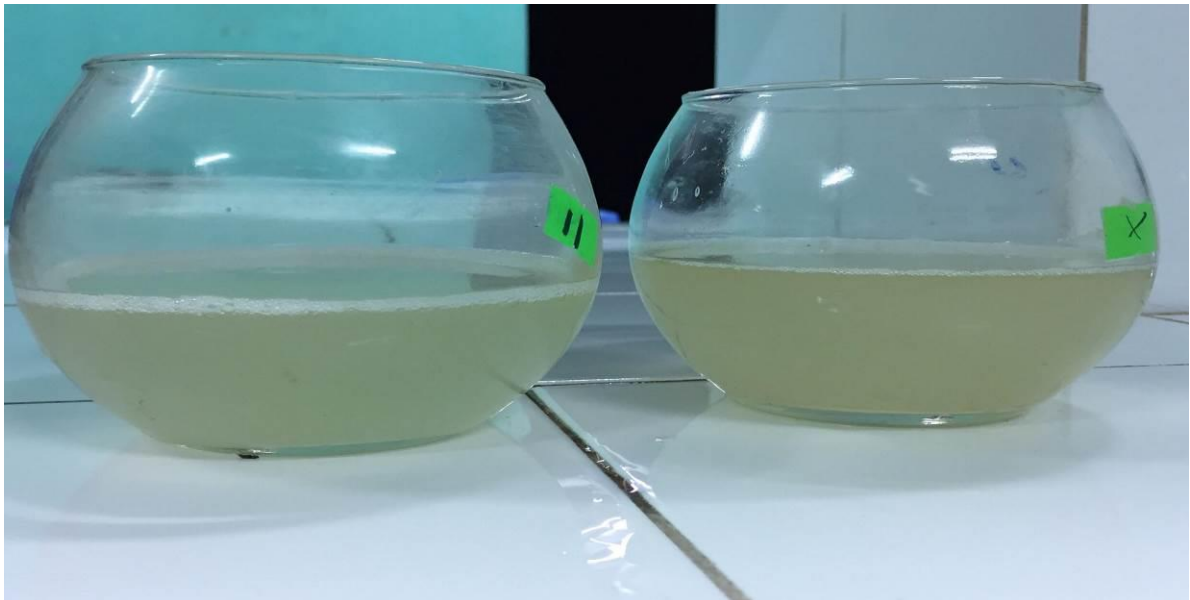
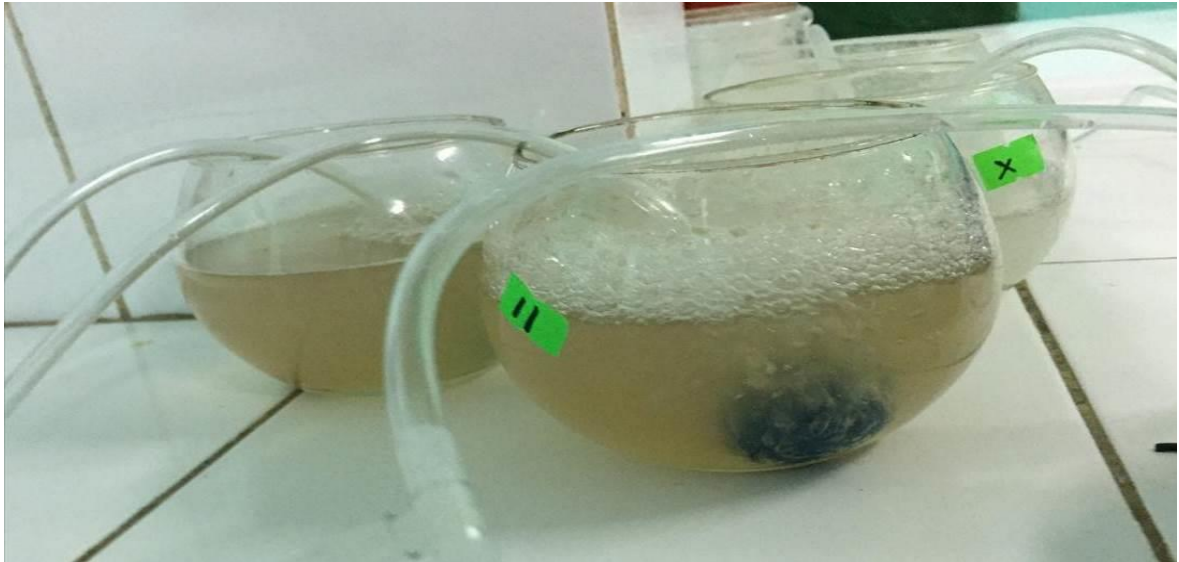
Kết quả bảng 4.4 cho thấy nồng độ COD và BOD₅ từ lò giết mổ gia súc cao gấp nhiều lần so với tiêu chuẩn cho phép, so với cột B khoảng 10 – 30 lần, nên đây là nguồn gây ô nhiễm nghiêm trọng. Tỷ lệ BOD₅/COD khá cao, cho thấy nước thải từ lò giết mổ gia súc có hàm lượng chất hữu cơ dễ phân hủy sinh học cao, nên rất phù hợp với xử lý sinh học. Ngoài ra hàm lượng các chất khác như SS, N tổng và P tổng đều cao hơn mức cho phép nhiều lần.

Bảng 4.5. Mẫu nước thải xử lý chủng vi khuẩn II và X sau khi được sục khí liên tục trong 3-4 ngày

Chỉ tiêu	Đơn vị tính	Sau khi được xử lý và sục khí	
		Chủng II	Chủng X
pH	-	7,16 ± 0,15	7,15 ± 0,13
SS	mg/L	85 ± 3,89	90 ± 4,67
COD	mg/L	196 ± 14,30	202 ± 12,20
BOD ₅	mg/L	155 ± 10,90	170 ± 12,80
N tổng	mg/L	45,5 ± 9,71	50,4 ± 8,71
P tổng	mg/L	15,9 ± 1,9	14,5 ± 2,43
NO ₃ ⁻	mg/L	8,5 ± 0,43	7,3 ± 0,35
NH ₄ ⁺	mg/L	30,4 ± 5,21	32,4 ± 5,45

Ghi chú: Số liệu trong bảng là giá trị trung bình ± SD

Kết quả bảng 4.5 cho thấy sau khi xử lý chủng II và X vào trong nước thải lấy từ lò mổ gia súc và gia cầm thì các chỉ tiêu như SS, COD, BOD₅, N tổng và P tổng đều giảm xuống, đặc biệt là COD và BOD giảm xuống nhiều lần so với mẫu ban đầu chưa xử lý. Trong hai chủng thử nghiệm thì chủng II, có khả năng xử lý tốt hơn so với chủng X.



Hình 4.4. Xử lý nước thải với 2 chủng II và X

Bảng 4.6. Hiệu suất xử lý nước thải của 2 chủng vi khuẩn II và X sau khi được sục khí liên tục trong 3-4 ngày

Chỉ tiêu	Hiệu suất xử lý (%)	
	Chủng II	Chủng X
SS	48,5	45,5
COD	87,3	86,9
BOD ₅	82,3	80,6
N tổng	54,7	49,9
P tổng	21,7	28,6
NO ₃ ⁻	41,4	49,7
NH ₄ ⁺	21,2	16,1

Kết quả bảng 4.6 cho thấy hiệu quả xử lý cao nhất đối với chỉ tiêu COD là 86,9 – 87,3% và BOD₅ là 80,6 – 82,3%, sau đó đến N tổng (49,9 – 54,7%) và SS (45,5 – 48,5%).

5. HIỆU QUẢ KINH TẾ, XÃ HỘI VÀ MÔI TRƯỜNG

5.1. Hiệu quả kinh tế, xã hội của đề tài

Nhờ áp dụng công nghệ xử lý nước bằng sinh học không dùng hóa chất, không cần bể tự hoại nên hệ thống tiêu thụ ít điện năng và vận hành an toàn. Với hàng loạt ưu điểm như không gây mùi hôi ra môi trường xung quanh, có thể mở rộng công suất hoạt động, mô hình xử lý nước thải sinh học sẽ mang lại hiệu quả kinh tế cao hơn rất nhiều so với các phương pháp xử lý nước thải khác. Xử lý nước thải bằng công nghệ vi sinh thường có hệ thống công nghệ đơn giản, chủ yếu tập trung vào khả năng của vi sinh vật, nhờ đó mà công nghệ hầu hết dễ vận hành. Có thể nói công nghệ xử lý nước thải bằng vi sinh vật là công nghệ xử lý ô nhiễm sinh thái nhất, hầu như không sử dụng hoá chất, nước thải sau xử lý có thể đạt chất lượng rất cao. Quá trình thường dùng nhất trong xử lý nước thải là quá trình sinh học hiếu khí, nên còn được gọi là quá trình ôxi hoá vi sinh thì chất ôxi hoá là ôxi không khí, rẻ nhất.

5.2. Hiệu quả về môi trường

Sử dụng hoạt động của vi sinh vật để phân hủy hết các hợp chất hữu cơ gây nhiễm bẩn trong nước thải. Vi sinh vật (VSV) sử dụng chất hữu cơ làm nguồn dinh dưỡng, năng lượng. Trong quá trình dinh dưỡng chúng nhận chất dinh dưỡng tạo tế bào mới, sinh trưởng, sinh sản nên tế bào của chúng tăng lên. VSV có vai trò quyết định chúng có thể sử dụng hợp chất hữu cơ ở thể rắn cũng như hòa tan trong nước và phân giải chúng đến muối vô cơ, CO₂ và nước. Trong những trường hợp thuận lợi nhất của môi trường, chúng đóng vai trò quan trọng trong chuyển hóa chất gây ô nhiễm như chúng có thể cung cấp oxi cho môi trường nước, tiết vào môi trường các chất có khả năng kìm hãm sinh trưởng của VSV có hại, ngoài ra chúng có thể hấp thụ các kim loại nặng, đồng thời góp phần hạn chế phí phạm nguồn tài nguyên nước trong quá trình xử lý. Chính vì vậy sẽ làm giảm thiểu ô nhiễm môi trường nước, cải thiện chất lượng sống của con người.

6. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

- Tuyển chọn và xác định được 16 chủng vi sinh vật có hoạt tính phân giải hợp chất cacbohydrat và lipit cao từ nguồn sữa bị hư hỏng.

- Xác định được 2 chủng II và X có hoạt tính phân giải cacbohydrat và lipit cao để xử lý nước thải từ lò mổ gia súc và gia cầm.

- Nước thải thu được từ lò mổ gia súc gia cầm có mức độ ô nhiễm vượt so với các tiêu chuẩn cho phép nhiều lần.

- Sau khi xử lý với 2 chủng vi sinh vật trên thì chất lượng nước thải được cải thiện tốt hơn, tuy nhiên vẫn còn vượt tiêu chuẩn cho phép nhưng không nhiều.

- Tiếp tục xác định hoạt tính và định danh 2 chủng vi sinh vật II và X, xác định khả năng nhân sinh khối trong các điều kiện khác nhau, thử nghiệm khả năng xử lý trên các loại nước thải khác nhau.

- Tiến hành chiết xuất hai loại enzyme ngoại bào nguồn gốc từ các chủng

vi khuẩn cho hoạt tính mạnh ở các thí nghiệm trước, sử dụng phương pháp định tính, định lượng enzym, và đánh giá khoảng nhiệt độ và pH tối ưu cũng như độ tăng hoạt tính khi cho thêm các cơ chất như các ion kim loại Zn^{2+} , Ca^{2+} , ...

- Nghiên cứu sử dụng môi trường phân lập lactobacillus có khả năng sản xuất axit lactic (có nhiều trong sữa và các sản phẩm từ sữa) kết hợp với chủng vi khuẩn ưa lạnh phân lập trong sữa nhằm tăng hiệu quả xử lý các chất thải, đặc biệt là các chất thải rắn (phân gà, phân trâu,..) để mở rộng đề tài cho các vòng thi tiếp theo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tài liệu tiếng Việt

- [1]. Nguyễn Hoàng Anh và cộng sự (2017), “Phân lập, tuyển chọn vi khuẩn *Bacillus* spp. từ dạ cỏ bò có khả năng sinh enzyme β -glucanase và bước đầu xác định đặc tính của enzyme”, Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam, tập 15, số 1: 85-91.
- [2]. Vũ Thị Dinh và cộng sự (2018), “Phân lập, tuyển chọn chủng vi khuẩn chịu nhiệt độ cao, thích nghi dải pH rộng, có hoạt tính cellulose cao và bước đầu ứng dụng xử lý nước thải nhà máy giấy”, Tạp chí khoa học và công nghệ lâm nghiệp số 1-2018.
- [3]. Nguyễn Hữu Hiệp và Nguyễn Thị Hải Lý (2012), “Phân lập các dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy tinh bột”, Tạp chí Khoa học 2012:21a 37-44.
- [4]. Nguyễn Quang Huy, Trần Thúy Hằng (2012), “Phân lập các chủng *Bacillus* có hoạt tính tạo màng sinh vật (biofilm) và tác dụng kháng khuẩn của chúng”, Tạp chí Sinh học, 2012, 34(1): 99-106.
- [5]. Nguyễn Văn Phúc, Phan Thị Phượng Trang (2017), Phân lập, định danh và xác định các đặc tính có lợi của chủng *Bacillus* spp. từ ao nuôi tôm ở tỉnh Bến Tre, <https://nctu.edu.vn/phan-lap-dinh-danh-va-xac-dinh-cac-dac-tinh-co-loi-cua-chung-bacillus-spp-tu-ao-nuoi-tom.html>

- [6]. Lê Công Nhất Phương, Lê Thị Cẩm Huyền, Nguyễn Huỳnh Tấn Long (2012), Xử lý ammonium trong nước thải giết mổ bằng việc sử dụng kết hợp quá trình nitrit hóa một phần/anammox, Tạp chí Sinh học, 34(3SE): 105-110.
- [7]. Khuất Hữu Thanh, Bùi Văn Đạt (2010), Phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn Bacillus để tạo chế phẩm sinh học sử dụng trong nuôi trồng thủy sản, Tạp chí Khoa học và Công Nghệ, T. 48, S. 5.
- [8]. Quách Thi Thanh Tâm và Bùi Thị Minh Diệu (2015), Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn có khả năng phân hủy lông gia súc - lông gia cầm từ các lò mổ gia súc ở ba huyện Tam Bình, Long Hồ và Vũng Liêm, tỉnh Vĩnh Long, Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ Phần B: Nông nghiệp, Thủy sản và Công nghệ Sinh học: 41 (2015): 1-11.
- [9]. Võ Hồng Thi và cộng sự (2012), “Hoạt tính protease của một số chủng Bacillus phân lập từ nước thải chế biến thịt và thủy hải sản”, Tạp chí Khoa học ĐHQGHN, Khoa học Tự nhiên và Công nghệ 28 (2012) 116-124.
- [10]. Lê Hoàng Việt, Nguyễn Võ Châu Ngân, Lưu Trọng Tác và Lê Thị Bích Vi (2014), Đánh giá hiệu quả xử lý nước thải giết mổ gia súc tập trung của đĩa quay sinh học và lồng quay sinh học, Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ, Phần A: Khoa học Tự nhiên, Công nghệ và Môi trường, 35 (2014): 46-53.

2. Tài liệu nước ngoài

- [11]. Bayr S. et al. (2012), “Effect of additives on process stability of mesophilic anaerobic monodigestion of pig slaughterhouse waste”, Bioresource Technology, 120, pp.106–113.
- [12]. Borowski S., Szopa J.S. (2007), “Experiences with the dual digestion of municipal sewage sludge”, Bioresour Technol, 98: 1199– 1207.
- [13]. Buchanon RE, N. E. Gibbons, Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology, 8th Ed, The Williams and Wilkins company, Baltimore, 1989.
- [14]. Burgess JE, B. I. Pletschke, Hydrolytic enzymes in sewage sludge treatment: A minireview, Water SA 34 (2008) 343.

- [15]. Chowdhury P, T. Viraraghavan, A. Srinivasan, Biological treatment processes for fish processing wastewater – A review, *Bioresource Technology* 101 (2010) 439.
- [16]. Frolund B, T. Griebet, P. H. Nielsen, Enzymatic activity in the activated sludge flox matrix, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43(1995) 755.
- [17]. Gonzalez JF, Wastewater treatment in the Fishery Industry, *FAO Fisheries Technical Paper*, No. 355/FAO, Rome, Fisheries Dept., 1996.
- [18]. Johns MR, Developments in wastewater treatment in the meat processing industry: A review, *Bioresource Technology* 54 (1995) 203.
- [19]. Robert DR, Martin W and Kathryn JB (1998),” Bacterial Tracking in a Dairy Production System Using Phenotypic and Ribotyping Methods”, *Journal of Food Protection*, Vol. 61, No. 10, 1998, Pages 1336-1340.
- [20]. Sikorski Z, *Seafood Resource: Nutrient Composition and Preservation*. CRC Press Inc., Boca Raton, 1990.
- [21]. Teh KH, Lindsay D, Palmer J, et al., 2013. Lipolysis within single culture and co-culture biofilms of dairy origin. *Int JFood Microbiol*, 163(23):129-135
- [22] Lei YUAN, Faizan A. SADIQ, Tong-jie LIU, Yang LI, Jing-si GU, Huan-yi YANG, Guo-qing HE (2018),” Spoilage potential of psychrotrophic bacteria isolated from raw milk and the thermo-stability of their enzymes”, *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)*
- [23] Gislene B. de Oliveira, Luciana Favarin, Rosa H. Luchese¹, Douglas McIntosh (2015), “Psychrotrophic bacteria in milk: How much do we really know?”, *Brazilian Journal of Microbiology* 46, 2, 313-321
- [25] Juliana FLACH, Valeska GRZYBOWSKI, Geciane TONIAZZO, Gertrudes CORÇÃO (2016),” Adhesion and Production of Degrading Enzymes by Bacteria Isolated from Biofilms in Raw Milk Cooling Tanks”, *Food Science and Technology*, Page 571-576
- [26] El-Shafei H, Abdel-Aziz M, Ghaly M, Abdalla A (2010): “Optimizing some factors affecting alkaline protease production by a marine bacterium

- Streptomyces albidoflavus*. Proceeding of fifth scientific environmental conference, Zagazig University, 125 – 142
- [27] Takai T. (2008): Cell proliferation at 122°C and isotopically heavy CH₄ production by a hyperthermophilic methanogen under highpressure cultivation. PNAS.105 (31):10949–51.
- [28] Goff, H. D., & Griffiths, M. W. (2006): Major advances in fresh milk and milk products. Journal of Dairy Science, 89, 1163-1173.
- [29] Bali, O.S., Imène F., Rouaa L., Hamadi A. & Ayadi, M.A. (2013): Study of Proteolytic and Lipolytic Activities of *Pseudomonas* spp. Isolated From Pasteurized Milk in Tunisia. Journal of Agricultural Science, 5(7).

PHỤ LỤC

Hình ảnh thí nghiệm



