

LÀM GIÀU VÀ ĐỊNH DANH NHÓM VI KHUẨN ANAMMOX TỪ Bùn CỦA HỆ THỐNG XỬ LÝ NƯỚC THẢI CHĂN NUÔI LỢN

Lê Công Nhất Phương, Ngô Kế Sương, Nguyễn Tiến Thắng
Viện sinh học nhiệt đới, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam
Lê Thị Bạch, Trần Hiếu Nhuệ - Trường Đại học Xây dựng
Kenji Furukawa, Phạm Khắc Liệu - Kumamoto University, Japan
Takao Fuji - Sojo University, Japan

Tóm tắt: Nghiên cứu phát triển và làm giàu các vi khuẩn Anammox từ bùn kỵ khí bể UASB trong hệ thống xử lý nước thải chăn nuôi lợn ở TP Hồ Chí Minh đã được thực hiện thành công. Kết quả thu được sau 9 tháng vận hành liên tục cho thấy hiệu quả khử $N-NH_4$ tăng dần từ 0 đến 81,5%, khử $N-NO_2$ tăng dần từ 0 đến 85,6% và một lượng nhỏ nitrat được sinh ra (1,0-1,5 mg/l), điều này chứng tỏ có xảy ra phản ứng với sự tham gia của các vi khuẩn Anammox. Sinh khối đã làm giàu được phân tích bằng kỹ thuật sinh học phân tử, bởi phản ứng PCR đặc hiệu khuếch đại gen 16S rDNA và kết quả thu được có độ tương đồng cao với vi khuẩn KOLL2, KU2 và *Candidatus Brocadia anammoxidans*.

Summary: The preliminary enrichment of anammox (anaerobic ammonium oxidation) bacteria from sludge of UASB system treating swine wastewater in Ho Chi Minh city was successfully carried out. Data from 9 months of continuous enrichment showed the simultaneous consumption of ammonium and nitrite (0-81,5 % and 0-85,6 % of influent concentration, respectively) and the production of small amount of nitrate (1,0-1,5 mg/L), which meant anammox reaction had occurred. Analysis of enriched biomass by PCR and 16S rDNA sequencing techniques confirmed the existence of anammox bacteria with the high similarity with KOLL2a and KU2 strains and *Candidatus Brocadia anammoxidans* bacteria, all of which are well known as microorganisms having anammox activity.

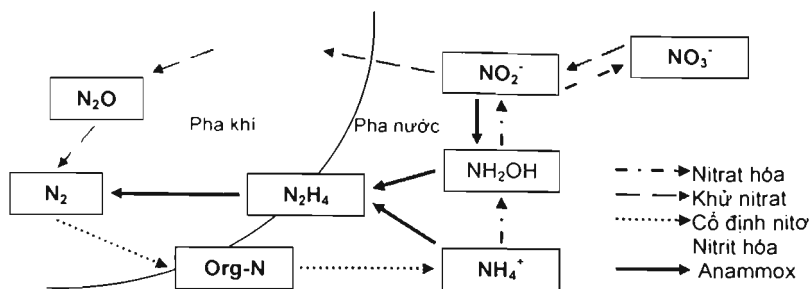
Từ khóa: anammox, nitơ amôn, bùn kỵ khí, xử lý nước thải chăn nuôi lợn.

1. GIỚI THIỆU

Ngoài chu trình biến đổi nitơ thông thường nitrit hóa, nitrat hóa, khử nitrat và cố định nitơ còn có sự chuyển đổi kỵ khí trong quá trình oxy hóa nitơ amôn với sự có mặt của một chủng vi sinh vật tự dưỡng (*anammox*), trong đó nitrit đóng vai trò chất nhận điện tử (hình 1). Quá trình oxy hóa kỵ khí nitơ amôn này được mô phỏng bằng phương trình hóa học (1) (Van de Graaf và cs., 1995, 1996; Strous và cs., 1997).

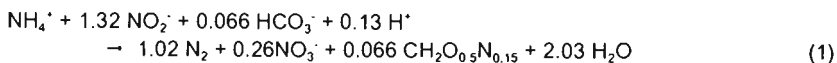
Các hệ thống xử lý nitơ truyền thống về cơ bản dựa trên sự kết hợp 2 quá trình nitrat hóa (nitrification) và khử nitrat (denitrification).

Năm 1995, quá trình chuyển hóa nitơ mới chưa từng được biết đến trước đó về cả lý thuyết và thực nghiệm đã được phát hiện. Đó là phản ứng oxy hóa kỵ khí nitơ amôn (Anaerobic Ammonium Oxidation - *Anammox*) trong đó nitơ amôn được oxy hóa bởi nitrit trong điều kiện kỵ khí, không cần cung cấp chất hữu cơ, để tạo thành nitơ phân tử (Strouss và cs., 1995).

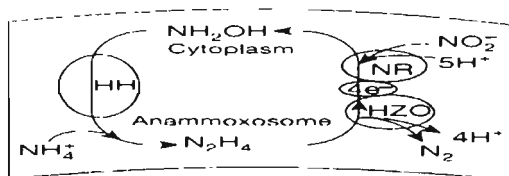


Hình 1. Chu trình chuyển hóa nitơ

Như đã nói ở trên, phản ứng *anammox* đã được xác nhận là sự oxy hóa nitơ amôn bởi nitrit, phản ứng hóa học đơn giản với tỉ lệ mol $\text{NH}_4^+ : \text{NO}_2^- = 1:1,32$ như ở phương trình dưới đây:



Trong đó sự tạo thành lượng nhỏ nitrat từ nitrit được giả thiết là để sinh ra các đường lượng khử khi đồng hóa CO_2 . Phương trình này đã được chấp nhận rộng rãi như là đại diện cho phản ứng *anammox* khi tính toán, giải thích,...



Hình 2. Cơ chế sinh hóa quá trình Anammox

NR: enzyme khử nitrit (sản phẩm giả thiết là NH_2OH); HH: hydrazine hydrolase, enzyme xúc tác tạo hydrazine từ nitơ amôn và hydroxylamine; HZO: enzyme oxy hóa hydrazine

Đến nay đã có 3 chi của vi khuẩn *anammox* được phát hiện, gồm *Brocadia*, *Kuenenia* và *Scalindua*. Về mặt phân loại, các vi khuẩn *anammox* là những thành viên mới tạo thành phần nhánh sâu của ngành *Planctomycetes*, bộ *Planctoycetales* (Schmid và cs., 2005).

Mặc dù về nguyên tắc, vi khuẩn *anammox* tồn tại trong môi trường tự nhiên và các hệ thống xử lý nước thải có nồng độ nitơ amôn cao, nhưng việc làm giàu, nuôi cấy rất khó khăn do chúng sinh trưởng chậm.

Trong quá trình tham gia đề tài "Nghiên cứu xử lý sinh học nitơ amôn nồng độ cao trong nước thải chăn nuôi lợn" và tham khảo một số tài liệu, chúng tôi đã quyết tâm và tiến hành nghiên cứu nuôi cấy và làm giàu vi khuẩn *anammox*.

Trong nghiên cứu này chúng tôi dựa vào phương trình phản ứng (1) để khảo sát khả năng tồn tại của các vi khuẩn *Anammox* trong các loại bùn kỵ khí và hiếu khí ở các hệ thống xử lý nước thải có nồng độ nitơ amôn cao như bùn kỵ khí ở bể UASB của hệ thống xử lý nước thải chăn nuôi lợn, bùn kỵ khí ở bể UASB của hệ thống xử lý nước rỉ rác, bùn hiếu khí ở bể hiếu khí của hệ thống xử lý nước thải chế biến thủy hải sản. Từ các kết quả khảo sát sơ bộ tiến hành nghiên cứu làm giàu vi khuẩn *anammox* từ bùn kỵ khí của hệ thống xử lý nước thải nuôi lợn, để oxy hoá kỵ khí nitơ amôn có nồng độ cao.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Mô hình thí nghiệm

Thiết bị dùng cho thí nghiệm làm giàu vi khuẩn *anammox* ở 2 giai đoạn với mục đích và thời gian khác nhau như sau:

Giai đoạn I: Giai đoạn thích nghi của bùn được thực hiện trong 150 ngày, với lưu lượng 10 L/ngày, trong một cột hình trụ D 200mm, H 800mm, dung tích công tác 20 L.

Giai đoạn II: Giai đoạn tích lũy làm giàu nhóm vi khuẩn *anammox*, vận hành trong thời gian 120 ngày, với lưu lượng 10 L/ngày, trong cột hình trụ có dung tích công tác 10 L (D 100mm và H 1000mm).

2.2 Bùn gốc

Bùn gốc dùng để nuôi cấy và làm giàu các vi khuẩn *anammox* là bùn kỵ khí được lấy ở bể UASB từ trạm xử lý nước thải nuôi lợn Gò Sao, Quận 12, thành phố Hồ Chí Minh. Đặc điểm của bùn có màu nâu đen và chỉ số bùn SVI 300-450 mL/L.

2.3 Môi trường làm giàu

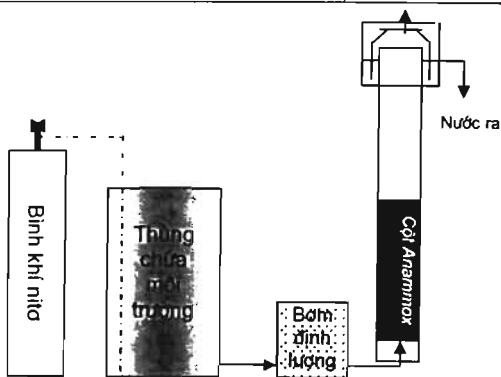
Bảng 1. Môi trường thích nghi và tích lũy làm giàu nhóm vi khuẩn *anammox*

Thành phần môi trường	Nồng độ
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	10-250 mg/L
NaNO_2	10-250 mg/L
KHCO_3	500 mg/L
KH_2PO_4	27m g/L
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.180 g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.120 g/L
Vi lượng I* (g/L): EDTA:5, FeSO_4 :5	1 mL/L
Vi lượng II* (g/L): EDTA:5, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.43, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 0.24, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 0.99, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 0.25, $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0.22, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 0.19, $\text{NaSeO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$: 0.21, H_3BO_3 : 0.014	1 mL/L

Nguồn: Van de Graaf và cs., 1996

2.4 Phương pháp phân tích

Phân tích thành phần hóa lý các chỉ tiêu trong nước trước và sau mô hình như: N-NH_4 , N-NO_3 , N-NO_2 , COD, DO, pH, TDS,...). Phân tích các chỉ tiêu tiến hành theo các phương pháp chuẩn nêu trong "Standard methods for the examination of water and wastewater" bằng máy so màu Thermo Spectronic Model 4001/4, USA, máy TOA, Model 22, Japan và máy đo pH (Model 2000 VWR Scientific, USA), tại phòng phân tích Môi trường, Viện Sinh học Nhiệt đới.



Hình 3. Sơ đồ mô hình thí nghiệm giai đoạn II

2.5 Phương pháp phân tích xác định vi khuẩn

Mẫu bùn được lấy sau 9 tháng tích lũy làm giàu, bảo quản lạnh và gửi sang Nhật Bản để phân tích định danh vi khuẩn *Anammox* bằng kỹ thuật sinh học phân tử.

Mẫu được chiết xuất DNA, thực hiện phản ứng PCR (Polymerase Chain Reaction) đặc hiệu khuếch đại gen 16s rDNA, giải mã trình tự và so sánh với ngân hàng gen thế giới BLAST NCBI.

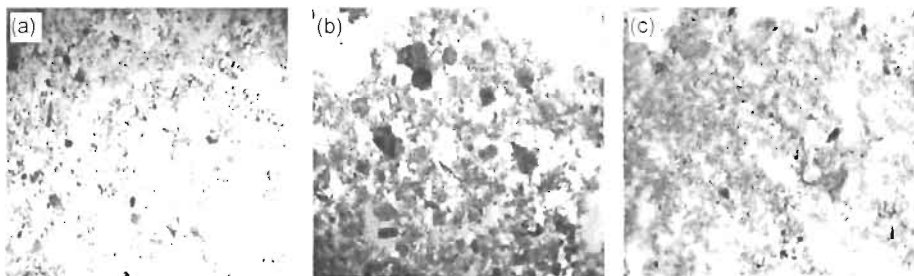
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Quá trình làm giàu bùn Anammox

Kết quả thu được sau 270 ngày vận hành với việc nạp liên tục môi trường cho bùn Anammox với nồng độ $N-NH_4$ và $N-NO_2$ theo tỉ lệ 1:1 tăng dần nồng độ từ 10 đến 250 mg/L. vào mô hình được trình bày ở các đồ thị 1 và 2. Kết quả cho thấy trong giai đoạn này đã có xuất hiện sự tiêu thụ đồng thời cả $N-NH_4$ và $N-NO_2$ kèm theo sự tạo thành một lượng nhỏ $N-NO_3$. Hiệu suất loại $N-NH_4$ tăng dần từ 0 đến 81,5%, loại $N-NO_2$ tăng dần từ 0 đến 85,6% và lượng $N-NO_3$ tạo ra từ 1,0 - 5,5 mg/L, nhưng để đạt được hiệu suất loại tổng nitơ khoảng 50% thì mất thời gian là 150 -160 ngày vận hành và có xuất hiện các phần tử màu đỏ trong bùn. Điều đó chứng tỏ phản ứng Anammox theo phương trình (1) đã xảy ra trong hệ thống.

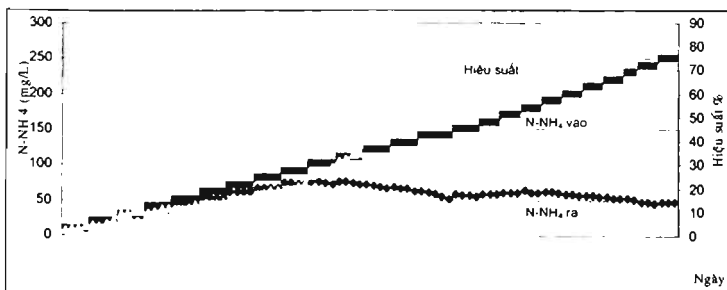
Sau 150 ngày nồng độ bùn (MLSS) trong hệ thống giảm từ 5.500 mg/L còn 3.200mg/L, đó là kết quả của sự phân hủy kỵ khí sinh khối vi khuẩn dị dưỡng trong điều kiện không cung cấp nguồn dinh dưỡng cacbon hữu cơ. Kết quả này phù hợp với nồng độ COD đầu ra giảm dần theo đồ thị 3. Trong giai đoạn này bùn chuyển từ màu đen sang màu nâu. Sau 120 ngày tiếp theo nồng độ bùn giảm từ 3.200 mg/L xuống còn 1.120 mg/L và COD đầu ra tiếp tục giảm tới gần 50% (đồ thị 3) và bùn chuyển từ màu nâu sang màu đỏ, trong thời gian này đã xuất hiện dấu hiệu đặc trưng của vi khuẩn Anammox như (Schmidt, và cs., 2003; van Dongen và cs., 2001) đã nghiên cứu và có kết luận là vi ion trung tâm của các phần tử bùn này là ion sắt (Fe II và Fe III), nên vi khuẩn *Anammox* có màu đỏ đặc trưng khi quần tụ ở mật độ lớn. Xuất hiện màu đỏ trong bùn hoạt tính là một chỉ thị tốt về sự hiện diện của vi khuẩn *Anammox* (hình 4).

Các kết quả nghiên cứu cho thấy sau 270 ngày nuôi cấy, tích lũy và làm giàu trong môi trường từ bùn kỵ khí ở bể UASB của hệ thống xử lý nước thải nuôi lợn, sinh khối nhóm vi khuẩn *Anammox* đã xuất hiện và phát triển.

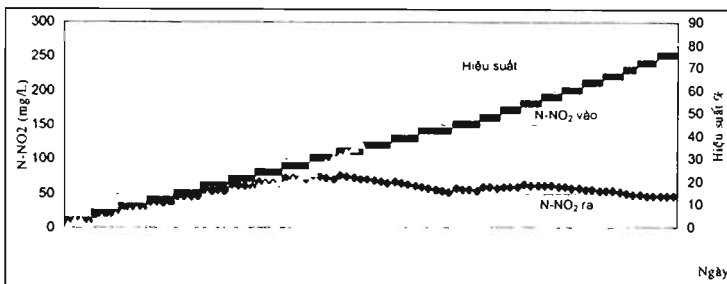


Hình 4. Sự thay đổi màu sắc của sinh khối vi khuẩn *Anammox* trong quá trình làm giàu với môi trường (bảng 1) theo thời gian (kính soi nổi Leica độ phóng đại 1,6)

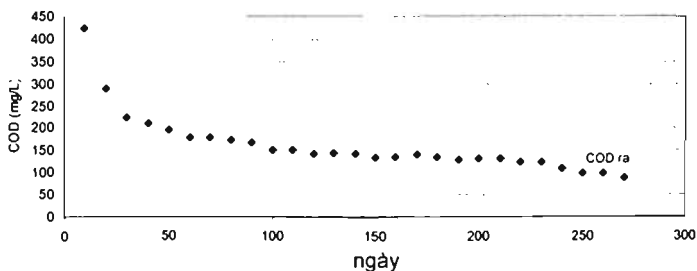
- (a) Bùn kỵ khí ở bể UASB ban đầu, (b) Sinh khối vi khuẩn *Anammox* sau 160 ngày làm giàu
(c) Sinh khối vi khuẩn *Anammox* sau 270 ngày làm giàu.



Đồ thị 1. Sự giảm $N-NH_4$ và hiệu suất của quá trình làm giàu



Đồ thị 2. Sự giảm $N-NO_2$ và hiệu suất của quá trình làm giàu

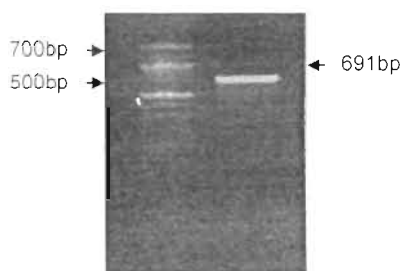


Đồ thị 3. Sự giảm COD trong quá trình làm giàu

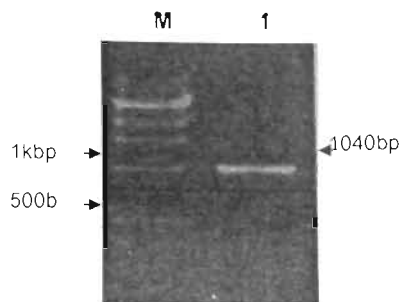
3.2 Kết quả định danh nhóm vi khuẩn *Anammox*

Dựa trên 2 cặp mồi đặc hiệu của chủng vi khuẩn *Anammox* các dòng được khuếch đại ở 2 đoạn gen riêng biệt. Trong đoạn gen 16S rDNA với cặp mồi (16S-5'II và Ana-3') sẽ khuếch đại đoạn gen 1040 bp nằm ở vị trí cách đầu 5' của 16S rDNA khoảng 300 bp, còn cặp mồi (Ana 5' và 16S 3') khuếch đại đoạn gen 691 bp nằm ở vị trí cách phần sau 3' khoảng 850 bp (hình 4, 5).

• Nhân bản 16S rDNA bằng phương pháp PCR



Hình 4. Sự nhân bản phần sau Gen 16S rDNA (Ana-5 và 16S-3)
- M: 100bp
1. Vạch PCR phần sau 16S rDNA



Hình 5. Sự nhân bản phần đầu Gen 16S rDNA (16S-5' II và Ana-3)
- M: 1kb
1. Vạch PCR phần đầu 16S rDNA

• Kết quả giải mã gen và so sánh độ tương đồng với các đoạn gen của vi khuẩn Anammox trên ngân hàng dữ liệu gen cho thấy các trình tự thu được có độ tương đồng cao với các chủng được liệt kê trong bảng 2 và 3 dưới đây.

Bảng 2. So sánh trình tự đoạn gen tương đồng với vùng 5'16S rDNA (nửa đầu khoảng 300bp)

TT	Chủng vi khuẩn có độ tương đồng	Số Accession	Độ tương đồng (%)
1	Anaerobic ammonium-oxidizing planctomycete KOLL2a	AJ250882	100
2	Uncultured anoxic sludge bacterium KU 2	AB054007	100
3	Candidatus Kuenenia stuttgartiensis		100
4	Candidatus Brocadia anammoxidans		95

Bảng 3. So sánh trình tự đoạn gen tương đồng với vùng 5' 16S rDNA (phần sau khoảng 850bp)

TT	Chủng vi khuẩn có độ tương đồng	Số Accession	Độ tương đồng (%)
1	Anaerobic ammonium-oxidizing planctomycete KOLL2a	AJ250882	100
2	Uncultured anoxic sludge bacterium KU2	AB054007	100
3	Candidatus Kuenenia stuttgartiensis		99
4	Uncultured anoxic sludge bacterium KU1		94

Sản phẩm nhân bản 16S rDNA bằng 2 cặp mồi (16S-5'II và Ana-3') và (Ana 5' và 16S 3') của các dòng *Anammox* 3, 5, 6, 8, 9 và 10 có độ tương đồng là 100% *Anaerobic ammonium-oxidizing planctomycete* KOLL2a và *Uncultured anoxic sludge bacterium* KU2 và *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis* 99%, với cặp mồi (16S-5'II và Ana-3') và có độ tương đồng là 100% *Anaerobic ammonium-oxidizing planctomycete* KOLL2a và *Uncultured anoxic sludge bacterium* KU2 và *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis* 100%, với cặp mồi (Ana 5' và 16S 3'). Điều đó chứng tỏ các dòng *Anammox* phân lập từ sinh khối bùn được làm giàu bởi nghiên cứu có thể là các chủng đã được biết trên ngân hàng dữ liệu gen của thế giới.

4. KẾT LUẬN

1. Kết quả theo dõi sau 270 ngày ở hai giai đoạn thí nghiệm làm giàu từ bùn kỵ khí của hệ thống UASB xử lý nước thải nuôi lợn cho thấy có sự hiện diện của phản ứng anammox, với N-NH_4 giảm khoảng 81,5% và N-NO_2 giảm khoảng 85,6% và đồng thời trong nước đầu ra có xuất hiện N-NO_3 .

2. Kết quả phân tích vi khuẩn bằng kỹ thuật sinh học phân tử đã xác định sự hiện diện của vi khuẩn *anammox*, tương tự với các vi khuẩn đã biết trên thế giới. Đây là nhóm vi khuẩn *anammox* được tìm thấy gần đây, có khả năng oxy hoá N-NH_4 trong điều kiện kỵ khí tự dưỡng, được đặt tên *Ho Chi Minh anammox reactor*.

3. Đây là nghiên cứu đầu tiên ở Việt Nam về anammox, ở bước phát hiện, tích lũy vi sinh vật. Trong thời gian tới chúng tôi sẽ nghiên cứu tiếp về quá trình thích nghi, làm giàu các loại bùn khác nhau và khả năng ứng dụng nhóm vi khuẩn để xử lý nước thải có nồng độ N-NH_4 cao ở Việt Nam.

Tài liệu tham khảo

1. Egli, K., Franger, U., Alvarez, P.J.J., Siegrist, H., Vandermeer, J.R. and Zehnder, A.J.B. (2001). *Enrichment and characterization of an anammox bacterium from a rotating biological contactor treating ammonium-rich leachate*. Arch. Microbiol. 175, 198-207.
2. Fujii, T., H. Rouse, D.J., and Furukawa, K. (2002). *Characterization of the microbial community in an anaerobic ammonium-oxidizing biofilm cultured on a nonwoven biomass carrier*. J. Biosci. Bioeng., 94, 412-418
3. Hellinga C, Schellen AAJC, Mulder JW, van Loosdrecht MCM, Heijnen JJ (1998). *The SHARON process: an innovative method for nitrogen removal from ammonium-rich wastewater*. Wat Sci Tech. 37:135-142.
4. Jetten, M.S.M., Wagner, M., Fuerst, J., Van Loosdrecht, M.C.M., Kuenen, G. and Strous, M. (2001). *Microbiology and application of the anaerobic ammonium oxidation ('anammox') process*. Curr. Opin. Biotechnol. 12, 283-288.
5. Mulder A. (2003). *The quest for sustainable nitrogen removal technologies*. Waste Science and Technology 48 (1), 67-75.
6. Schmid M.C., Maas B., Dapena A., and others (2005). *Biomarkers for in situ detection of anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria*. Appl Environ Microbiol 71(4) 1677-1684.
7. Strous M, Kuenen JG & Jetten MSM (1999). *Key physiology of anaerobic ammonium oxidation*. Appl. Environ. Microbiol. 65, 3248-3250.
8. Strous, M., Heijnen J. J., Kuenen J.G., and Jetten M. S. M. (1998). *The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 50, 589-596.
9. Van de Graaf AA, Mulder A, de Bruijn P, Jetten MSM, Robertson LA, Kuenen JG. (1995). *Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process*. Appl Environ Microbiol 61, 1246-1251.
10. Van de Graaf AA, de Bruijn P, Robertson LA, Jetten MSM, Kuenen JG. (1996). *Autotrophic growth of anaerobic ammonium oxidizing microorganisms in a fluidized bed reactor*. Microbiology 142, 2187-2196.