MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC CỦA VI KHUẨN ANAMMOX ĐƯỢC PHÁT HIỆN TẠI MỘT SỐ NGUỒN THẢI Ở VIỆT NAM

Hoàng Phương Hà, Đỗ Thị Tố Uyên

Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

TÓM TẮT

Để loại bỏ các hợp chất chứa nitrogen vô cơ trong quá trình xử lý nước thải, công nghệ thông dụng thường được áp dụng là nitrate hóa - phản nitrate hóa. Phương pháp này sẽ không phù hợp đối với loại nước thải có hàm lượng C/N thấp như nước thải công nghiệp do phải bổ sung một lượng lớn hàm lượng COD. Vì vậy, một công nghệ mới loại bỏ các hợp chất chứa nitrogen đã hình thành và được phát triển thay thế cho những công nghệ truyền thống do phù hợp với tính chất nước thải và giảm giá thành công nghệ. Đó là quá trình oxy hóa ammonium kỵ khí (Anaerobic Ammonium Oxidation - ANAMMOX) sử dụng nitrite làm chất nhận điện tử, sản phẩm tạo khí hydro với sự tham gia của nhóm vi khuẩn anammox. Sau khi phát hiện được quá trình ANAMMOX từ 3 mẫu bùn thải đã được làm giàu (làng nghề Phú Đô, khu vực giết mổ lợn Bình Đà và hồ ga của khách sạn TOSERCO - Hà Nội). Các nghiên cứu về tính chất sinh học của sinh khối anammox đã được tiến hành. Kết quả cho thấy, Đã phát hiện vi khuẩn anammox như kỹ thuật PCR khuếch đại đoạn gen 16S rRNA với cặp mồi đặc trưng của vi khuẩn anammox. Điều kiện thích hợp để tăng hoạt tính anammox của vi khuẩn oxy hóa ammonium kỵ khí có pH từ 7 đến 8 và nhiệt độ từ 30 đến 42°C. Hoạt tính anammox hoàn toàn bị ức chế khi nồng độ nitrite ≥ 100 mg N/L

Từ khóa: *Anammox, bùn thải, hoạt tính, khử nitrate, nitrate hoá, vi khuẩn ammonium kỵ khí*

MỞ ĐẦU

Ngày nay, một quá trình khác được biết đến trong chu trình nitrogen tự nhiên đó là quá trình ANAMMOX (anaerobic ammonium oxidation), quá trình này ammonium được chuyển đổi thành khí nitrogen trong điều kiện kỵ khí sử dụng nitrite như chất nhận điện tử (Strous *et al.*, 1997). Quá trình ANAMMOX được phát hiện đầu tiên ở Delft (Hà Lan) (Mulder *et al.*, 1995), cho đến nay hoạt tính anammox đã được phát hiện ở một vài nước tại những trạm xử lý nước thải hoặc tại những trầm tích biển (Michael *et al*., 2005).

ANAMMOX là quá trình kỵ khí hoàn toàn mà tại đó vi khuẩn tự dưỡng trực tiếp oxy hóa ammonium thành khí nitrogen. Quá trình này chỉ thực hiện một bước từ việc chuyển đổi ammonium thành khí nitrogen khác với quá trình truyền thống phải thực hiện hai bước nitrate hóa và khử nitrate. Chính vì vậy, quá trình đã hình thành một công nghệ mới trong việc loại bỏ ammonium trong nước thải với giá thành thấp so với công nghệ nitrate hóa-khử nitrate do tiết kiệm được oxy và nguồn cacbon hữu cơ. Trong công nghệ này người ta thường kết hợp quá trình ANAMMOX với quá trình SHARON, tại hệ thống SHARON, 50% ammonium bị oxy hóa thành nitrite, 50% nitrite được tạo thành này sẽ kết hợp với 50% ammonium còn lại được chuyển đến hệ thống anammox để hoàn thành quá trình xử lý nước thải bị ô nhiễm ammonium.

Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng, sản phẩm trung gian quan trọng của quá trình ANAMMOX là hydroxylamine và hydrazine. hydroxylamine oxidoreductase có trong cytochrome P_{460} được chiết từ quá trình nuôi vi khuẩn anammox là enzyme xúc tác cho quá trình này. Các nghiên cứu về microsensor đã chỉ ra rằng, ở rất nhiều hệ sinh thái trong tự nhiên chứa ammonium và nitrite tại vùng tiếp giáp giữa vùng chứa oxy và không chứa oxy (oxic/anoxic) bị mất đi trong sự thiếu vắng oxy. Thêm vào đó, số lượng các công bố về sự thiếu hụt nitrogen tại các trạm xử lý nước thải ngày càng nhiều, điều này cho thấy sự oxy hóa ammonium kỵ khí có thể ngày càng phổ biến. Quá trình được thực hiện với sự tham gia của vi khuẩn anammox. Vi khuẩn anammox sinh trưởng chậm, thời gian nhân đôi tế bào khoảng 11 ngày trong điều kiện thuận lợi. Vi khuẩn anammox thuộc Bộ *Planctomycetales* (Strous *et al*., 1999). Các phân tích về metagenomic từ nước biển (Venter *et al*, 2004) và đất (Treusch *et al*., 2005) đã phát hiện thêm một số chi tham gia vào quá trình ANAMMOX. Nhiều yếu tố ức chế đến quá trình ANAMMOX như ảnh hưởng của cơ chất, pH, nhiệt độ,.

Ở Việt Nam, rất nhiều nguồn thải bị ô nhiễm ammonium như nước thải công nghiệp, nước thải của các làng nghề chế biến thực phẩm, nước thải tại các lò giết mổ gia súc, nước thải sinh hoạt... Các loại nước thải này phần lớn đổ trực tiếp ra cống, ao, hồ, không qua xử lý hoặc xử lý không triệt để, chính vì vậy mà nguồn nước ngày càng trở nên ô nhiễm nghiêm trọng. Để giải quyết tình trạng ô nhiễm ammonium này, công nghệ truyền thống nitrate hóa - khử nitrate vẫn được áp dụng chủ yếu. Quá trình oxy hóa ammonium kỵ khí mới bắt đầu nghiên cứu ở Việt Nam, nghiên cứu thăm dò quá trình này trước đây (Hoàng Phương Hà, 2010) và nghiên cứu gần đây của chúng tôi đã phát hiện được quá trình ANAMMOX trong một số nguồn thải Phù Đổ, lò giết mổ lợn và hồ ga (Hoàng Phương Hà *et al*., 2012). Bên cạnh đó, một số đơn vị khác cũng đã và đang quan tâm nghiên cứu đến quá trình này như trường Đại học Bách Khoa Hà Nội, Viện Môi trường và Tài nguyên, thành phố Hồ Chí Minh (Lê Công nhất Phương *et al*., 2012). Tuy nhiên, các nghiên cứu đang trong giai đoạn đầu và cần có những nghiên cứu sâu hơn về một số tính chất sinh lý, sinh hóa của vi khuẩn tham gia vào quá trình cũng như các điều kiện ngoại cảnh ảnh hưởng đến hoạt tính anammox.

Các nghiên cứu tiếp theo của chúng tôi ngoài việc phát hiện quá trình ANAMMOX, sự tồn tại của vi khuẩn anammox trong một số nguồn thải chế biến thực phẩm, lò giết mổ gia súc và hồ ga có hàm lượng ammonium cao mà còn nghiên cứu các yếu tố ngoại cảnh ảnh hưởng lớn đến hoạt tính anammox như ảnh hưởng của pH, nhiệt độ, nồng độ cơ chất ($N\text{-}NO_2^-$). Đây là bước nghiên cứu để đưa ra được những thông số quan trọng cho công nghệ anammox xử lý ammonium trong điều kiện kỵ khí

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Đối tượng nghiên cứu

Các mẫu bùn thải: 1 cống thải của làng bún Phú Đô (PĐ), 2 khu vực giết mổ lợn tại Bình Đà (LM), 3 hồ ga của khách sạn TOSERCO thuộc địa bàn Hà Nội (HG) đã được làm giàu sinh khối anammox.

Các hóa chất sử dụng trong môi trường làm giàu sinh khối anammox có nguồn gốc Trung Quốc.

Các thiết bị sử dụng để làm giàu bùn kỵ khí là các bình plastic, bình thủy tinh được thiết kế sao cho không để oxy lọt vào, có dẫu vào, ra để lấy mẫu và luân chuyển khí. Sử dụng bình khí nitrogen để đẩy oxy ra khỏi bình.

Các thiết bị cần thiết cho thí nghiệm như máy ly tâm, máy quang phổ, tủ cấy vi sinh, máy PCR...là trang thiết bị của phòng Công nghệ Sinh học Môi trường, phòng Thí nghiệm Trọng điểm về Công nghệ Gene, Viện Công nghệ sinh học.

Phương pháp nghiên cứu

Môi trường làm giàu vi khuẩn anammox trong điều kiện kỵ khí theo Egli (2001) (Jetten *et al*., 1999; Mora *et al*., 2004)

Xác định hàm lượng ammonium, nitrite, nitrate: Các chỉ số ammonium được phân tích theo Nessler, NO_2^- theo Griss, NO_3^- theo Brucine (Franson, 1995). Hoạt tính anammox được xác định thông qua sự giảm đồng thời hàm lượng ammonium và nitrite trong điều kiện kỵ khí, sản phẩm trung gian là hydrazine (N_2H_4)

Định lượng hydrazine (ASTM, http://www.astm.org): Dung dịch *p*-dimethylaminobenzaldehyde hòa tan *p*-dimethylaminobenzaldehyde trong 200 ml methyl alcohol, thêm 20ml HCl đậm đặc. Dung dịch chuẩn gốc hydrazine 1mg/lit.

Tiến hành: Thêm 1ml dung dịch dimethylaminobenzaldehyde và 0,1 ml HCl đậm đặc vào 5 ml dung dịch mẫu. Sau 10 phút ở nhiệt độ phòng đo độ hấp thụ ánh sáng ở bước sóng 458 nm. Dựng đồ thị chuẩn hydrazine từ dung dịch 1mg/l với các nồng độ: 5; 10; 25; 50; 100 và 200 µg/l. Tính lượng hydrazine tạo thành trong mẫu nghiên cứu dựa vào đồ thị chuẩn

Hàm lượng BOD_5, hàm lượng ammonium, nitrite, nitrate, trong các mẫu nước thải được xác định theo các phương pháp chuẩn quốc tế (Franson, 1995).

Xác định trọng lượng khô của bùn bằng cách sấy bùn ở nhiệt độ 105°C/2 h

Phân tích trình tự gene 16S rRNA

Các phương pháp sinh học phân tử như tách chiết DNA tổng số và plasmid, kỹ thuật PCR, điện di DNA, tinh sạch DNA được thực hiện theo Amano và đồng tác giả (2007). Cặp mồi được sử dụng cho tách dòng gen 16S RNAr là cặp mồi đặc hiệu cho nhóm vi khuẩn anamox Amx820f 5' AAA ACC CCT CTA CTT AGT GCC C 3' và Pla46r. 5' GGA TTA GGC ATG CAA GTC 3'. Sử dụng kit FastDNA SPIN Kit for soil để tách DNA tổng số từ các mẫu bùn của hãng MPbio (Mỹ).

PCR được thực hiện với tổng thể tích 25 µl

chứa: 2,5 µl đệm PCR 10x; 2,5 µl 2,5 mM dNTP; 2 µl 10 mM $MgCl_2$; 1 µl mỗi 10 µM 16Sf, 1 µl 10 µM 16Sr; 1 µl DNA khuôn (≈ 100 µg/ml); 0,3 µl Taq DNA polymerase 1 U/µl, 15,7 µl H_2O. Chu trình: 94°C/ 4 phút; 30 chu kỳ (94°C/30 giây; 58°C/1 phút; 72°C/1 phút); 72°C/ 5 phút. DNA plasmid tái tổ hợp trên được tinh sạch bằng bộ sinh phẩm Invitrogen và đọc trình tự trên A3I 3100 (Applied Biosystems)

Nghiên cứu một số tính chất sinh lý ảnh hưởng đến hoạt tính anammox

Nghiên cứu ảnh hưởng của pH lên hoạt tính anammox được tiến hành ở pH 5; 6, 7; 7,5; 8; 9; 10; 12 Để thay đổi pH ban đầu. Dung dịch H_2SO_4 4N và $NaHCO_3$ 15% được sử dụng để điều chỉnh pH ban đầu của môi trường.

Nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ lên hoạt tính anammox được tiến hành ở 10; 20, 25, 30, 37; 42; 45°C. Thay đổi nhiệt độ bằng cách đặt mẫu nghiên cứu trên các máy khuấy gia nhiệt.

Nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ với hàm lượng ammonium lúc đầu là 10 mg N/L, và nitrite là 6 mg N/L. Nghiên cứu ảnh hưởng của pH với hàm lượng ammonium lúc đầu là 5 mg N/L, và nitrite là 2,5 mg N/L

Nghiên cứu ảnh hưởng của nitrite lên hoạt tính anammox: hàm lượng $N\text{-}NH_4$ luôn ở 10 mg/L, hàm lượng $N\text{-}NO_2$ thay đổi trong phạm vi từ 2,5; 5, 10; 20, 50; 100; 200 mg N/L.

Để tiến hành các thí nghiệm trên, các mẫu bùn có hoạt tính anammox được chia vào các bình có dung tích 100 ml chứa 30ml môi trường nuôi, hàm lượng bùn lắng đạt 2,7g/l. Bình thí nghiệm đặt trong điều kiện kỵ khí và được khuấy đảo môi trường nuôi bằng hệ thống khuấy từ.

Thống kê sinh học

Sử dụng phương pháp xử lý thống kê sinh học bằng phần mềm Excel. Kết quả là trung bình của các kết quả thí nghiệm với số lần lặp lại thí nghiệm là 3 và phép tính sai số.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

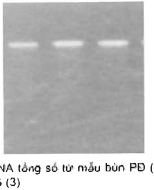
Nghiên cứu làm giàu vi khuẩn anammox của chúng tôi trước đây đã phát hiện được quá trình oxy hóa ammonium trong điều kiện kỵ khí (ANAMMOX) của cả 3 mẫu bùn (bùn thải Phú Đô, bùn thải của lò giết mổ Bình Đà và bùn hồ ga) (Hoàng Phương Hà *et al.*, 2012). Quá trình ANAMMOX được phát hiện bằng sự giảm đồng thời ammonium và nitrite trong điều kiện kỵ khí, đặc biệt là sự hình thành sản phẩm trung gian hydrazine của quá trình. Đây là tính chất rất quan trọng minh chứng thêm cho sự có mặt của quá trình ANAMMOX. Sự phát hiện quá trình ANAMMOX này đồng nghĩa với việc hình thành một công nghệ mới trong việc xử lý nước thải bị ô nhiễm ammonium. Để tìm hiểu thêm về quá trình ANAMMOX và vi khuẩn tham gia vào quá trình này, một số đặc điểm sinh học của vi khuẩn anammox đã được quan tâm nghiên cứu

Xác định sự có mặt của vi khuẩn anammox bằng phân tích trình tự gen 16S rRNA

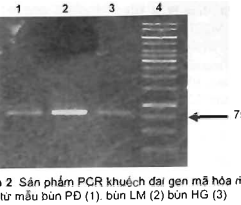
Tham gia vào quá trình ANAMMOX là nhóm vi khuẩn anammox. Nhóm các vi khuẩn này thường xuất hiện ở những vùng thiếu khí, trong các hệ thống xử lý nước thải hay trong bùn thải bị nhiễm ammonium với nồng độ cao. Để biết chính xác sự có mặt của nhóm vi khuẩn anammox tham gia vào quá trình oxy hóa ammonium kỵ khí, kỹ thuật PCR khuếch đại đoạn gen 16S rRNA của vi khuẩn đã được tiến hành. Dịch chiết DNA tổng số từ các mẫu bùn Phú Đô, lò mổ và hồ ga (PĐ, LM, HG) đã sử dụng trong phản ứng PCR, mồi Pla46 được thiết kế dựa trên trình tự gen 16SrRNA các chủng vi khuẩn thuộc Bộ *Planctomycetales* và mồi Amx820 từ các chủng vi khuẩn thuộc nhóm anammox đã mô tả ở phần vật liệu và phương pháp. Kết quả được thể hiện ở hình 1 và 2.

Kết quả tách chiết DNA tổng số của 3 mẫu bùn được kiểm tra trên bản điện di cho thấy DNA là một băng sáng rõ nét có thể sử dụng làm khuôn khuếch đại đoạn gen 16S rRNA của vi khuẩn bằng kỹ thuật PCR. Sản phẩm PCR (Hình 2) của các vi khuẩn thuộc cả 3 mẫu bùn đều chỉ có một băng DNA rõ nét, đặc hiệu với kích thước khoảng 770 bp phù hợp với tính toán lý thuyết. Sản phẩm PCR này sau khi được tinh sạch bằng bộ sinh phẩm của hãng Invitrogene cung cấp đã giải trình tự DNA trên máy giải trình tự tự động ABI 3100 (Applied Biosystems, Phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Gen - Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam)

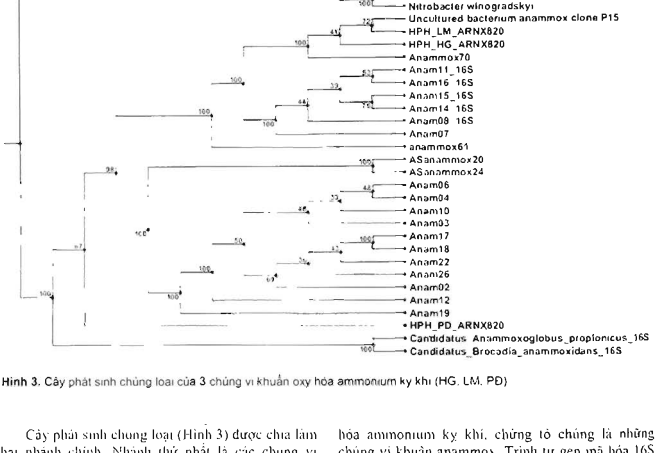
Kết quả giải trình tự gen 16S rRNA của các chủng vi khuẩn từ 3 mẫu bùn PĐ, HG và LM đã được xử lý bằng phần mềm BLAST và Biodit, sau đó sử dụng phần mềm CLC sequence Viewer để so sánh với trình tự gen mã hóa 16S rRNA của các chủng vi khuẩn thuộc Bộ *Planctomycetales* nhóm vi khuẩn anammox trên Ngân hàng Gen quốc tế. Mối quan hệ phát sinh chủng loại của 3 chủng vi khuẩn trong các mẫu bùn nghiên cứu được thể hiện ở hình 3.



Hình 1. DNA tổng số từ mẫu bùn PĐ (1), bùn LM (2) bùn HG (3)



Hình 2. Sản phẩm PCR khuếch đại gen mã hóa ribosome 16S từ mẫu bùn PĐ (1), bùn LM (2) bùn HG (3)



Hình 3. Cây phát sinh chủng loại của 3 chủng vi khuẩn oxy hóa ammonium kỵ khí (HG, LM, PĐ)

Cây phát sinh chủng loại (Hình 3) được chia làm hai nhánh chính. Nhánh thứ nhất là các chủng vi khuẩn hiếu khí oxy hóa ammonium (*Nitrosomonas europaea; Nitrosomonas marina*) và vi khuẩn oxy hóa nitrite (*Nitrobacter winogradskyi, Nitrobacter haburgensis*). Nhánh thứ hai bao gồm các chủng vi khuẩn oxy hóa ammonium kỵ khí, chúng đều là các chủng chưa được phân lập riêng rẽ mà chỉ phát hiện chúng nhờ các kỹ thuật sinh học phân tử. Kết quả nhận được từ hình 3 cho thấy, cả 3 chủng vi khuẩn HG, LM, PĐ đều nằm trong nhóm các vi khuẩn oxy hóa ammonium kỵ khí, chứng tỏ chúng là những chủng vi khuẩn anammox. Trình tự gen mã hóa 16S rRNA của các vi khuẩn trong mẫu bùn HG và LM có độ tương đồng 98% và 99% tương ứng với chủng uncultured bacterium Anammox70 và chúng đều có độ tương đồng tới 98% với hai chủng uncultured bacterium Anammox clone P15 và uncultured bacterium Anammox61. Chúng có độ tương đồng 94% về trình tự gen 16S rRNA đối với các chủng *uncultured planstomyces clone Anam* 16; 11, 08, 07, 15 và 14 và có độ tương đồng với nhóm các chủng

uncultured planstomyces clone Anam 19; 22; 26; 02, 18; 17; 12 04; 06; 10; 03 là **90%**. Chủng vi khuẩn của mẫu bùn **PĐ** có độ tương đồng về trình tự gen mã hóa 16S rRNA là **96%** so với các chủng *uncultured planstomyces clone Anam* 19; 22; 26; 02, 18; 17; 12 04; 06, 10; 03, và **92%** với nhóm các chủng *uncultured planstomyces clone Anam* 16; 11; 08, 07; 15 và 14. Trình tự gen mã hóa 16S rRNA của các chủng vi khuẩn từ 3 mẫu bùn HG; LM và PĐ đều có độ tương đồng 84% với loài *Brocadia anammoxidant* và loài *Anammoxolobus propionicus*. Độ tương đồng về trình tự gen 16S rRNA của 3 chủng vi khuẩn anammox so sánh với một số chủng trên ngân hàng gen quốc tế được tổng kết ở bảng 1

Bảng 1. Độ tương đồng trình tự gen 16S rRNA của 3 chủng LM, HG, PĐ

Các chủng trên NHGQT	LM (%)	HG (%)	PĐ (%)
uncultured bacterium Anammox70	99	98	
uncultured bacterium Anammox clone P15	98	98	
uncultured bacterium Anammox61	98	98	
uncultured planstomyces clone Anam 16, 11, 08, 07, 15 và 14	94	94	92
uncultured planstomyces clone Anam 19, 22, 26, 02, 18, 17, 12, 04, 06; 10, 03 là	90	90	96
Brocadia anammoxidant	84	84	84
Brocadia anammoxidant	84	84	84

Chủng vi khuẩn ký hiệu Anam 01 (*Uncultured planstomycete clone Anam* 01); các chủng khác ký hiệu từ Anam 03, 04, 06, 07; 10, 11, 12, 14; 15, 16; 17; 18, 19, 22, 26 có tên tương ứng *Uncultured planstomycete clone Anam* 03...26. Các chủng vi khuẩn này được phát hiện trên hệ lọc sinh học của trạm xử lý nước thải chăn nuôi lợn. Còn các chủng ký hiệu ASanammox 20 và ASanammox 24 được phát hiện trong nước thải của hệ nuôi hai sản nước lợ. Các chủng vi khuẩn Anammox60, Anammox70, uncultured bacterium clone P15 là những chủng vi khuẩn được phát hiện trong các hệ thống làm giàu vi khuẩn anammox ở trạng thái tự nhiên và nhân tạo khi nghiên cứu về vi trí phân loại của các vi khuẩn. Chủng vi khuẩn *Brocadia anammoxidant* và *Anammoxoglobus propionicus* được phát hiện tại trạm xử lý nước thải, tất cả các chủng này đều không thể nuôi cấy được, chúng chỉ phát hiện bằng các chỉ thị phân tử khi nghiên cứu sự đa dạng loài. Kết quả phân tích trình tự gen 16S rRNA của 3 chủng vi khuẩn từ 3 mẫu bùn HG, LM và PĐ một lần nữa khẳng định sự có mặt của nhóm vi khuẩn anammox trong các mẫu bùn nghiên cứu. Có thể tạm đặt tên của 3 chủng vi khuẩn được phát hiện trong các mẫu bùn là: *Planstomyces clone Anam* HG; *Planstomyces clone Anam* LM; *Planstomyces clone Anam* PĐ và chúng đã được đăng ký trên ngân hàng gen quốc tế và có mã số tương ứng là KC243150; KC243149, KC243148

Cho đến nay, các nghiên cứu về đa dạng sinh học môi quan hệ di truyền và nguồn gốc phát sinh chung loài của các chủng vi khuẩn oxy hóa ammonium kỵ khí cũng chỉ phát hiện nhóm các vi khuẩn anammox bằng kỹ thuật sinh học phân tử, đã phát hiện được 5 chi thuộc Bộ *Planctomycetales*: *Candidatus* Brocadia, *Candidatus* Kuenenia, *Candidatus* Scalindua, *Candidatus* Anammoxoglobus và *Candidatus* Jettenia

Một số tính chất sinh lý ảnh hưởng đến hoạt tính anammox

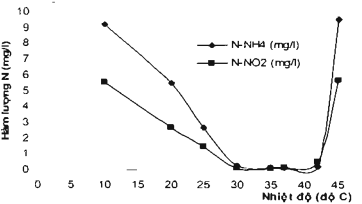
Một số nghiên cứu trước đây của chúng tôi đã chứng minh có quá trình ANAMMOX trong các mẫu bùn nghiên cứu (Hoàng Phương Hà *et al.*, 2012), kỹ thuật phân tử xác định trình tự gene 16S rRNA của vi khuẩn một lần nữa khẳng định sự có mặt của vi khuẩn anammox trong các mẫu bùn PĐ, LM và HG. Để tìm hiểu thêm về vai trò của nhóm vi khuẩn này tham gia vào quá trình ANAMMOX, một số nghiên cứu về tính chất sinh lý của chúng được tiến hành. Sinh khối chứa vi khuẩn anammox là đối tượng nghiên cứu.

Ảnh hưởng của nhiệt độ

Rất nhiều nghiên cứu cho rằng, nhiệt độ ảnh hưởng đến hoạt tính anammox. Để nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình oxy hóa ammonium kỵ khí, mẫu bùn Phú Đô (PĐ) có hoạt

tính anammox được tiến hành nghiên cứu ở 10; 20; 25; 30; 37; 42 và 45°C. Hoạt tính anammox được xác định bằng sự giảm đi đồng thời hàm lượng ammonium và nitrite trong bình nghiên cứu sau 6 h.

Kết quả nghiên cứu cho thấy (Hình 4), ở 20°C hoạt tính anammox đã rõ ràng, hoạt tính anammox được tăng dần khi nhiệt độ tăng và tối ưu khi ở nhiệt độ 30-42°C. 10 mg N-NH_4 và 6 mg N-NO_2 được chuyển hóa gần như hoàn toàn ở dải nhiệt độ từ này, không có hoạt tính anammox khi nhiệt độ ở 10°C và 45°C. Như vậy, vi khuẩn anammox trong mẫu bùn Phú Đô có phổ hoạt động ở khoảng nhiệt độ rộng, khi nhiệt độ lên tới 42°C hoạt tính anammox của vi khuẩn vẫn cao, hàm lượng ammonium chỉ còn lại trong dịch môi trường là 0,22 mgN/L còn nitrite là 0,55 mgN/L. Nghiên cứu của Egli và đồng tác giả (2001) cũng chỉ ra rằng, vi khuẩn anammox được phát hiện tại hệ thống xử lý nước thải sinh học ở Kölliken, Thụy sĩ có hoạt tính tối ưu ở 37°C

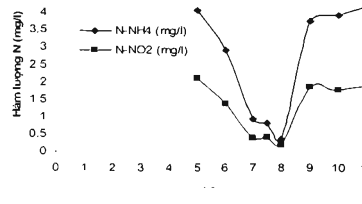


Hình 4. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính anammox của vi sinh vật trong mẫu bùn PĐ

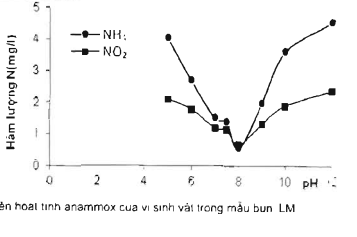
Ảnh hưởng của pH

Nghiên cứu ảnh hưởng của pH đến hoạt tính anammox, mẫu bùn Phú Đô có hoạt tính anammox được nuôi cấy trên hệ thống khuấy ở nhiệt độ 30°C với các giá trị pH khác nhau 5; 6; 7; 7,5; 8, 9; 10; 12 (Hình 5).

Kết quả nhận được sau 6 h ủ mẫu cho thấy, không phát hiện hoạt tính anammox ở pH 5 và 12. Ở pH 6 hoạt tính anammox rất yếu, hàm lượng ammonium và nitrite hầu như không thay đổi. Hoạt tính anammox cao ở pH 7 và 7,5 và cao nhất ở pH 8 (giảm đi hơn 90% hàm lượng ammonium và hơn 80% nitrite trong môi trường nuôi), hoạt tính anammox cũng được phát hiện ở pH 9 và 10 nhưng hàm lượng nitrogen (ammonium và nitrite) chỉ giảm khoảng 24% và 20% tương ứng. Các thử nghiệm về ảnh hưởng của pH đối với mẫu lỏ mỏ cũng cho kết quả gần tương tự (Hình 6)



Hình 5. Ảnh hưởng của pH đến hoạt tính anammox của vi sinh vật trong mẫu bùn PĐ

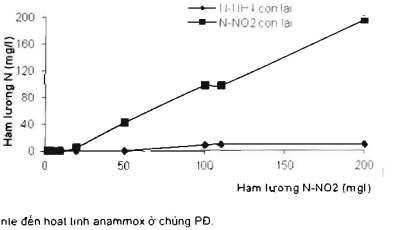


Hình 6. Ảnh hưởng của pH đến hoạt tính anammox của vi sinh vật trong mẫu bùn LM

Các nghiên cứu ảnh hưởng của pH đến hoạt tính anammox cho thấy, khả năng chuyển hóa ammonium và nitrite thích hợp ở pH trung tính và hơi kiềm, hoạt tính anammox cao nhất ở pH 8 (đối với cả 2 mẫu LM và PĐ). Trong môi trường pH quá cao (pH=12) hoặc quá thấp (pH=5) thì hoạt tính chuyển hóa các hợp chất chứa nitrogen của chúng rất kém. Một số nghiên cứu trước đây về tính chất sinh lý của vi khuẩn anammox ở loài *B.anamoxidam* và *K. stuttgartiensis* cũng cho thấy 2 chủng này có hoạt tính ở pH từ 6,5 đến 8,3 và nhiệt độ trong khoảng 20-43°C. Hoạt tính tối ưu ở pH 8 và 37°C đối với chủng *K.stuttgartiensis*, nhưng chủng *B.anamoxidam* lại tối ưu ở pH 8 và 40°C (Egli *et al*., 2001; Jentten *et al*, 1999).

Ảnh hưởng của nồng độ nitrite

Nitrite là chất nhận điện tử, bắt buộc phải có mặt trong quá trình oxy hóa ammonium kỵ khí, nhưng ở hàm lượng nitrite quá cao có thể gây ức chế đến quá trình. Nghiên cứu tiếp theo về ảnh hưởng của nitrite đến quá trình ANAMMOX cũng được đề cập đến. Các thử nghiệm với các nồng độ nitrite khác nhau, hàm lượng ammonium ban đầu là không đổi đã được mô tả trong phần phương pháp nghiên cứu. Trong điều kiện nhiệt độ 28 ± 2°C, pH = 7,5. Sau 6 h nuôi kỵ khí, chúng tôi đã xác định hàm lượng ammonium và nitrite còn lại trong mẫu.



Hình 7. Ảnh hưởng của nitrite đến hoạt tính anammox ở chủng PĐ.

Kết quả cho thấy (Hình 7), khi nồng độ nitrite trong môi trường là 2,5; 5, 10; 20 và 50 mg N/L, quá trình oxy hóa ammonium kỵ khí vẫn diễn ra bình thường, cụ thể 10 mg $N\text{-}NH_4$ trong bình thí nghiệm được chuyển hóa gần như hoàn toàn. Không phát hiện hoạt tính anammox khi nồng độ $N\text{-}NO_2$ cao hơn hoặc bằng 100 mg N/L, lượng ammonium lúc này gần như không thay đổi và chỉ dao động trong khoảng từ 9,5-9,9 mg N/L. Như vậy, có thể khi nồng độ nitrite tăng từ 100 mg N/L trở lên, quá trình ANAMMOX bị ức chế. Các nghiên cứu của Jentten và đồng tác giả (2001) cũng cho rằng, nitrite ở nồng

độ 5-10 mM hoàn toàn ức chế quá trình ANAMMOX. Strous và đồng tác giả (1999) cũng kết luận, hàm lượng $N\text{-}NO_2$ trên 0,1g/l sẽ mất hoạt tính anammox. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi một lần nữa chứng tỏ vi khuẩn anammox rất nhạy cảm và hoàn toàn bị ức chế khi hàm lượng nitrite từ 100 mg N/l trở đi.

Tóm lại, các kết quả nghiên cứu từ quá trình làm giàu bùn kỵ khí đến tính chất sinh lý, sinh hóa của các vi khuẩn có mặt trong các hệ bùn nghiên cứu đã chứng tỏ có quá trình oxy hóa ammonium kỵ khí (ANAMMOX), kết quả phân tích trình tự gen 16S rRNA của các chủng vi khuẩn từ 3 mẫu bùn PĐ, LM, HG đã khẳng định, các chủng vi khuẩn này đều thuộc nhóm vi khuẩn anammox tham gia vào quá trình ANAMMOX. Các nghiên cứu này đã cung cấp một số dẫn liệu về sự tồn tại của nhóm vi khuẩn anammox tại Việt Nam. Đây là nghiên cứu rất quan trọng và là tiền đề cho các nghiên cứu ứng dụng tiếp theo trong các mô hình công nghệ mới để xử lý nước thải bị ô nhiễm ammonium bằng phương pháp kỵ khí. Công nghệ xử lý này còn mới đối với nước ngoài và rất mới ở Việt Nam.

KẾT LUẬN

Một số nghiên cứu về tính chất sinh lý của vi khuẩn anammox tham gia vào quá trình ANAMMOX đã được xác định, điều kiện nhiệt độ thích hợp cho hoạt tính anammox từ 30 – 42°C và pH tối ưu từ 7 – 8; Quá trình ANAMMOX hoàn toàn bị ức chế khi hàm lượng nitrite từ 100mg N/l trở đi.

Bằng phương pháp phân tích trình tự gen 16S rRNA, đã xác định vị trí phân loại của 3 chủng vi khuẩn được lấy từ 3 mẫu bùn HG, LM và PĐ. Chúng đều thuộc nhóm vi khuẩn oxy hóa ammonium kỵ khí và được tạm đặt tên lần lượt là *Planctomycetes clone Anam* HG; *Planctomycetes clone Anam* LM; *Planctomycetes clone Anam* PĐ.

Lời cảm ơn: *Các thí nghiệm được tiến hành bằng nguồn kinh phí từ đề tài cấp Viện Công nghệ Sinh học, trong thông báo này có sử dụng trang thiết bị của Phòng thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Gen, Viện Công nghệ sinh học*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Amano T, Yoshinaga I, Okada K, Yamagishi T, Ueda S, Obuchi A, Sakoand Y, Suwa Y (2007) Detection of anammox activity and diversity of anammox bacteria-related 16S rRNA genes in coastal marine sediment in Japan. *Microbes Environ* 22:232–242

ASTM International. Standard test method for hydrazine in water. ASTM D1385-01. *In* Book of ASTM standards, vol. 11.01. ASTM International, West Conshohocken, Pa [Online.] http://www.astm.org

Egli K, Franger U, Alvarez PJJ, Siegrist HR, van der Meer JR and Zehnder AJB (2001) Enrichment and characterization of an anammox bacterium from a rotating biological contactor treating ammonium-rich leachate *Arch Microbiol* 175: 198–207

Franson MAH (1995) *Standard methods for the Examination of Water and Wastewater*, Publication Office American Public Health Association-Washington, DC 20005 . 19th Edition: 225-227; 240-243; 461-464

Hoàng Phương Hà (2010) Nghiên cứu vi khuẩn nitrate hóa để ứng dụng trong công nghệ xử lý nước nhiễm ammonium *Luận án Tiến sĩ, chuyên ngành vi sinh vật. Viện Công nghệ Sinh học- Viện Hàn Lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.*

Hoàng Phương Hà, Đỗ Thị Liên và Đỗ Thị Tố Uyên (2012) Làm giàu sinh khối anammox từ một số nguồn thải chứa hàm lượng amonium cao. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 10 (3) 581-588

Jetten MSM, Strous M, van de Pas-Schoonen KT, Schalk J, Van Dongen UGJM, Van De Graaf AA, Logemann S, Muyzer G, Van Loosdrecht MCM and Kuenen JG (1999) The anaerobic oxidation of ammonium. *FEMS Microbiol. Rev* 22: 421- 437

Jetten MSM, Wagner M, Fuerst J, van Loosdrecht M, Kuenen J and Strous M (2001) Microbiology and application of the anaerobic ammonium oxidation (''anammox'') process *Curr Opin Biotechnol* 12: 283–288

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 nitrite hóa một phần/ anammox *Tạp chí Sinh học* 34(3SE) 105- 110

Mora DA, Van Hulle WHS, Campos LJ, Méndez R, Vanrolleghem PA and Jetten M (2004) Enrichment of Anammox biomass from municipal activated sludge: experimental and modelling results *J. Chem Technol Biotechnol* 79.1421–1428

Mulder A, Van de Graff AA, Robertson LA and Kuenen JG (1995) Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor *FEMS Microb Ecol* 16. 177-184.

Nielsen M, Bollmann A, Sliekers O, Jetten M, Schmid M, Strous M, Schmidt I, Larsen LH, Nielsen LP and Revsbech NP (2005) Kinetics, diffusional limitation and microscale distribution of chemistry and organisms in a CANON reactor. FEMS Microbiol. Ecolo. (51): 247–256.

Strous M, Kuenen JG and Jetten MSM. (1999) Key physiology of anaerobic ammonium oxidation. *Appl Environ Microbiol* 65: 3248–3250.

Strous M, van Gerven E, Kuenen JG, Jetten MSM (1997) Effect of aerobic and microaerobic conditions on anaerobic ammoniumoxidizing (anammox) sludge. *Appl Environ Microbiol* 63.

Treusch AH, Leininger S, Kletzin A, Schuster SC, Klenk HP, Schleper C (2005) Novel genes for nitrite reductase and Amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. *Environ Microbiol* 7:1985–1995

Venter JC, Remington K, Heidelberg JF, Halpern AL, Rusch D, Eisen JA, Wu D, Paulsen I, Nelson KE, Nelson W, Fouts DE, Levy S, Knap AH, Lomas MW, Nealson K, White O, Peterson J, Hoffman J, Parsons R, Baden-Tillson H, Pfannkoch C, Rogers YH, Smith HO (2004) Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 304, 66–74

CHARACTERIZATION OF ANAMMOX BACTERIA DETECTED FROM SEWAGE SLUDGE SOURCES IN VIETNAM

Hoang Phuong Ha*, Do Thi To Uyen

Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

To remove nitrogen compounds in wastewater treatment process, the traditional technologies are often applied nitrification – denitrification. This method will not be suitable for treatment of wastewater with low C/N concentration, such as industrial waste water because of COD supplying requirement. Therefore, new technologies for nitrogen compounds removal have been detected and developed to change to the traditional wastewater treatment technologies because it was consistent with nature of waste water and reducing technology costs. This is an anaerobic ammonium oxidation (ANAMMOX), this process with the participation of the anammox bacteria oxidize ammonia using nitrite as electron acceptor and producing atmospheric dinitrogen. After discovering the ANAMMOX process from enriched sludge samples (Phudo village, sewage sludge of pig slaughtering area in Binh Da and manholes of TOSERCO hotel - Hanoi). The research on the characterization of anammox biomass was carried out. Anammox bacteria were detected by sequence of 16S rRNA genes amplified by PCR using universal primers designed for anammox bacteria. The suitable conditions for anammox activity are pH from 7 to 8 and temperature from 30 to 42 °C. Anammox activity was completely inhibited when the nitrite concentration ≥ 100 mg N/L.

Keywords: *Anammox, activated sludge, denitrification, nitrification, anaerobic ammonia oxidizing bacteria*

*Author for correspondence: E-mail: ha27682002@yahoo.com