

NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG TẠO MÀNG SINH HỌC (BIOFILM) CỦA MỘT SỐ CHỦNG VI KHUẨN CHUYỂN HÓA NITROGEN

Hoàng Phương Hà¹, Nguyễn Quang Huy², Nghiêm Ngọc Minh¹

¹Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

TÓM TẮT

Mục tiêu của nghiên cứu này là tìm kiếm và lựa chọn những chủng vi khuẩn nitrate hóa có khả năng tạo màng sinh học (biofilm), các vi khuẩn này thích nghi khi sống bám trên giá thể và có khả năng oxy hóa các hợp chất chứa nitrogen cao hơn so với môi trường dịch thể. Kết quả nghiên cứu đặc điểm sinh lý, sinh hóa ảnh hưởng đến hoạt tính nitrate hóa, sinh trưởng và khả năng tạo màng sinh học cho thấy, vi khuẩn nitrate hóa thích nghi ở nhiệt độ $\pm 28^\circ\text{C}$, pH 7,5 - 8, hàm lượng nitrogen trong khoảng 10 - 200 mgN/L; ở nồng độ 1000 mg N/L hoạt tính nitrate hóa không bị ức chế. Chất mang được sử dụng trong thí nghiệm này là miếng bọt nêc kích thước: (1x1x1) cm. Khi có chất mang hoạt tính nitrate hóa của vi khuẩn tuyển chọn cao hơn từ 1,2 + 1,4 lần so với môi trường dịch, nghiên cứu ảnh hưởng của chất mang cũng cho thấy hoạt tính nitrate hóa cao nhất khi chất mang chiếm 30% tổng thể tích. 20 mg NH₄-N/L được loại bỏ hàng ngày, đạt hiệu suất tới 96% khi nghiên cứu thử nghiệm theo mẻ trong phòng thí nghiệm trên hệ lọc chứa chất mang có dung tích 10 lít.

Từ khóa: Chất mang, màng sinh học, hệ lọc, nitrate hóa, vi khuẩn nitrate hóa

MỞ ĐẦU

Cuộc sống hiện đại ngày một phát triển và đổi mới với sự gia tăng chóng mặt về tỷ lệ dân số trên toàn cầu, đi kèm với nó là rất nhiều loại hình hoạt động của con người đã làm gia tăng chất thải ra môi trường: ngành công nghiệp hóa dầu, y dược, phân bón, công nghiệp chế biến thức ăn, chất thải từ các đô thị, các nông trang nuôi gia súc, gia cầm... là nguyên nhân gây ô nhiễm môi trường trầm trọng (Carrera et al., 2003). Nước thải chảy ra các cửa biển dẫn đến suy tàn chất lượng môi trường tại các vùng biển trên toàn thế giới. Nước thải đô thị ngày càng tăng, việc xử lý nước thải ra tại các trạm xử lý nước thải không còn đạt hiệu quả dẫn đến lãng phí dinh dưỡng với hàm lượng chính là nitrogen và phosphorus (Michel et al., 2005). Để loại bỏ các thành phần gây ô nhiễm này, phương pháp sinh học như quá trình nitrate hóa - khử nitrate vẫn là chiến lược dẫn đầu thành công làm giảm thiểu hàm lượng các hợp chất nitrogen mà không tạo sản phẩm từ cấp ảnh hưởng đến môi trường sinh thái như một số phương pháp hóa - lý. Quá trình nitrate hóa được thực hiện theo phương trình: $\text{NH}_4^+ + \text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$.

Ngày nay, nhiều nhà khoa học đã và đang quan tâm đến sự trao đổi chất của các vi sinh vật thông qua cấu trúc của màng sinh học làm tăng sự tiếp xúc giữa các tế bào với các thành phần của nước thải (Araya et al., 2000), nên hiệu quả loại bỏ các hợp chất gây ô nhiễm cao.

Màng sinh học (biofilm) là tập hợp các vi sinh vật gắn trên một bề mặt của vật thể cứng hoặc bề mặt chất lỏng, tạo thành lớp màng bao phủ bề mặt đó. Các vi sinh vật tạo màng sinh học liên kết với nhau một cách chặt chẽ tạo thành một cấu trúc bền vững. Các chủng vi khuẩn nitrate hóa sinh trưởng chậm, nhưng sự hình thành màng sinh học và bám dính lên chất mang làm cho quá trình trao đổi các thành phần nitrogen trong nước thải có hiệu quả hơn so với khi không được bám dính trên chất mang (DeBeer & Kuhl, 2001). Vi khuẩn nitrate hóa rất nhạy cảm với các điều kiện môi trường dẫn đến quá trình nitrate hóa thường không ổn định, nên nhiều nghiên cứu đã quan tâm đến các điều kiện thích hợp cho công nghệ loại bỏ các hợp chất chứa nitrogen như sự thay đổi môi trường nuôi cấy phù hợp để kích thích sự phát triển của vi khuẩn, nghiên cứu các đặc điểm sinh lý, sinh hóa ảnh hưởng đến sinh trưởng và hoạt tính của vi khuẩn luôn được đặt ra hàng đầu vì nó gắn liền với các công nghệ xử lý nước bị ô nhiễm. Một trong những biện pháp đang được đặc biệt quan tâm là cố định vi khuẩn lên các vật liệu mang để kích thích sự hình thành màng sinh học. Các vi khuẩn tạo màng sinh học hỗ trợ và liên kết với nhau một cách chặt chẽ nên khả năng oxy hóa các hợp chất chứa nitrogen sẽ xảy ra nhanh hơn. Vì vậy, màng sinh học được ứng dụng cao trong xử lý ô nhiễm môi trường như ô nhiễm dầu, ô nhiễm nitrogen. Việc ứng dụng thành công màng sinh học trong công nghệ xử lý các hợp chất nitrogen trong nước và trên thế giới đem lại hiệu quả kinh tế cao và thân thiện với môi trường. Trong nghiên cứu này, ảnh hưởng của một số điều kiện ngoại cảnh đến sự tạo thành của màng sinh học và khả năng oxy hóa các hợp chất chứa nitrogen của vi khuẩn nitrate hóa có khả năng tạo màng sinh học được tiến hành.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nguyên liệu

Nguồn phân lập: Công tập trung nước thải của làng bùn Phú Đô, Hà Nội; nước thải của trung tâm giết mổ lợn tại Bình Đa, Hà Nội; hệ thống xử lý nước thải của hồ Trúc Bạch, Hà Nội. **Chất mang:** miếng bọt nêc kích thước (1x1x1) cm dùng để cố định vi khuẩn nitrate hóa, đây là vật liệu mang được ứng dụng thành công trong xử lý nước thải bị ô nhiễm ammonium được sản xuất tại Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. **Môi trường Winogradsky** để phân lập và nuôi cấy vi khuẩn nitrat hóa (Ronad, 1995)

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp đánh giá khả năng tạo màng sinh học của các chủng vi khuẩn nghiên cứu theo Mohamed et al., (2004); Các đơn chủng vi khuẩn được phân lập theo phương pháp cấy ria 3 pha. Các vi khuẩn lựa chọn được nuôi cấy riêng rẽ trong ống nghiệm chứa 10ml môi trường Winogradsky (hoặc Winogradsky II) ở 30°C . Sau 3 ngày nuôi cấy, hút 1 ml

dịch vi khuẩn vào ống eppendorf đã khử trùng và ủ tiếp 3 ngày, xác định mật độ tế bào bằng cách đo mật độ quang học ở $\lambda = 600$ (OD₆₀₀). Phương pháp quan sát khả năng tạo màng sinh học Ống eppendorf (chứa dịch vi khuẩn đã nuôi cấy ở trên) được rửa sạch 2 lần bằng nước cất khử trùng, sau đó bổ sung 1ml dung dịch tím kết tinh 1% và giữ trong 20 phút ở nhiệt độ phòng, loại bỏ dung dịch tím kết tinh, rửa sạch 2 lần bằng nước cất và quan sát sự bắt màu của màng sinh học bám trên thành ống với tím kết tinh. Xác định được mật độ màng sinh học và được tạo thành nhiều hay ít bằng cách: Ống eppendorf sau khi bắt màu tím kết tinh được tráng bằng nước cất 2 lần, các bình thể tích 50ml hay ít bằng eppendorf được hòa tan trong 1ml etanol 70°, đo độ hấp thụ dịch này ở $\lambda = 570$ nm trên máy quang phổ kế. Sự hình thành màng sinh vật tỷ lệ thuận với chỉ số OD₅₇₀ tạo thành.

Các phương pháp xác định hóa học: Định lượng ammonium trong nước ngọt theo phương pháp Nessler; Định lượng NO₂ theo phương pháp Griss; Định lượng NO₃ theo phương pháp Brucina (Franson, 1995).

Các phương pháp nghiên cứu sinh lý, sinh hóa:

Ảnh hưởng của nhiệt độ, pH: Dải nhiệt độ được chọn cho nghiên cứu là 10°C, 25°C, 30°C, 37°C và 40°C; pH là 5; 6; 7; 7,5; 8; 9 và 10; Các chủng vi khuẩn sau khi phân lập được nuôi cấy lắc (200 vòng/phút) trong bình tam giác có thể tích 100 ml chứa 20 ml môi trường lỏng Winogradsky I (hoặc Winogradsky II) ở các nhiệt độ hoặc pH nghiên cứu. Sau 6 ngày nuôi cấy đánh giá hoạt tính và quan sát khả năng tạo màng sinh học và sinh trưởng của các chủng vi khuẩn.

Ảnh hưởng của hàm lượng N-NH₄ (đối với vi khuẩn oxy hóa ammonium) và hàm lượng N-NO₂ (đối với vi khuẩn oxy hóa nitrite): Bổ sung hàm lượng N-NH₄ (hoặc N-NO₂) khác nhau: 5 mg/L, 10 mg/L, 100 mg/L, 200 mg/L, 500 mg/L và 1000 mg/L vào các ống nghiệm chứa 10ml môi trường nuôi cấy vi khuẩn oxy hóa ammonium hoặc vi khuẩn oxy hóa nitrite. Đánh giá kết quả sau 6 ngày nuôi cấy ở nhiệt độ 28±2°C.

Ảnh hưởng của chất mang: Thí nghiệm tiến hành trong bình nuôi có thể tích 250 ml với 150 ml môi trường chứa ammonium (vi khuẩn oxy hóa ammonium) hay nitrite (vi khuẩn oxy hóa nitrite) với hàm lượng ban đầu 5mg N/ l. Tỷ lệ chất mang với môi trường là 10%; 20%; 30% và 50% (V/V). Sau 6 ngày nuôi cấy, tiến hành xác định khả năng loại bỏ ammonium hay nitrite của vi khuẩn lựa chọn.

Đánh giá khả năng loại bỏ ammonium trong hệ lọc có dung tích 10 lít: Theo từng mẻ, hàm lượng ammonium được thay đổi theo từng mẻ 5, 10 và 20 mgN-NH₄/l. Chất mang được bổ sung vào bình lọc là 30%.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tuyển chọn những vi khuẩn nitrate hóa có khả năng tạo màng

Từ các mẫu nước thải bị ô nhiễm ammonium thu thập được, tiến hành phân lập các chủng vi khuẩn sinh trưởng được trên môi trường đặc trung. Các chủng vi khuẩn lựa chọn được xác định hoạt tính nitrate hóa. Kết quả đã phân lập và làm sạch được 8 chủng vi khuẩn oxy hóa ammonium được đặt tên lần lượt là: NLI-1, NLI-2, NLI-3, NLI-4, NLI-5, NLI-6, NLI-7, NLI-8. Các chủng vi khuẩn này được nghiên cứu khả năng chuyển hóa ammonium, kết quả cho thấy các chủng NLI-3, NLI-4, NLI-5, NLI-6 và NLI-7 là những chủng có hoạt tính oxy hóa ammonium cao hơn những chủng còn lại (bảng 1). Chính vì vậy, những chủng vi khuẩn này tiếp tục nghiên cứu đánh giá khả năng tạo màng sinh học và sinh trưởng của chúng. Kết quả nhận được cho thấy, chủng NLI-6 và NLI-7 là hai chủng vi khuẩn không những có hoạt tính oxy hóa ammonium mà khả năng tạo màng sinh học (giá trị OD₅₇₀) và sinh trưởng (giá trị OD₆₀₀) cao hơn những chủng vi khuẩn còn lại. Ba chủng NLI-1, NLI-2 và NLI-8 có khả năng sinh trưởng được trên môi trường Winogradsky I nhưng oxy hóa ammonium lại kém nên chúng không được lựa chọn cho nghiên cứu tạo màng sinh học (bảng 1).

Bảng 1. Khả năng oxy hóa ammonium, sinh trưởng và tạo màng sinh học của vi khuẩn lựa chọn

Chủng	N-NH ₄ ban đầu (mg/l)	N-NH ₄ còn lại (mg/l)	N-NO ₂ tạo ra (mg/l)	OD ₅₇₀	OD ₆₀₀
ĐC	5	4,853	0,01	0,1	0,123
NLI-1	5	3,887	1,1	-	-
NLI-2	5	3,901	1,1	-	-
NLI-3	5	1,734	3,1	1,218	0,282
NLI-4	5	1,726	3,2	1,278	0,462
NLI-5	5	1,891	2,9	1,123	0,358
NLI-6	5	1,076	3,6	1,337	0,513
NLI-7	5	1,541	3,4	1,745	0,555
NLI-8	5	2,937	1,8	-	-

Bảng 2. Khả năng oxy hóa nitrite, sinh trưởng và tạo màng sinh học của vi khuẩn lựa chọn

Chủng	N-NO ₂ ban đầu (mg/l)	N-NO ₂ còn lại (mg/l)	N-NO ₂ tạo ra (mg/l)	OD ₅₇₀	OD ₆₀₀
ĐC	5	4,89	0,001	0,089	0,11
NLI1-1	5	2,75	2,01	1,38	0,336
NLI1-2	5	2,9	1,69	0,785	0,446
NLI1-3	5	2,82	1,17	1,265	0,306
NLI1-4	5	2,48	1,25	1,767	0,601
N II-5	5	3,891	0,87	-	-
NLI1-6	5	0,6	0,21	-	-
NLI1-7	5	3,541	0,76	-	-
NLI1-8	5	1,937	2,5	1,968	0,69

Bên cạnh nhóm vi khuẩn oxy hóa ammonium, nhóm vi khuẩn oxy hóa nitrite cũng được tiến hành phân lập và tuyển chọn được 8 chủng vi khuẩn có khả năng sinh trưởng được trên môi trường Winogradsky II và được đặt tên lần lượt là: NLI1-1, NLI1-2, NLI1-3, NLI1-4, NLI1-5, NLI1-6, NLI1-7 và NLI1-8. Các chủng vi khuẩn này được xác định khả năng chuyển hóa nitrite, sinh trưởng và tạo màng sinh học. Kết quả được trình bày ở bảng 2.

Kết quả nhận được từ bảng 2 cho thấy, tất cả 8 chủng vi khuẩn sinh trưởng được trên môi trường khoáng cơ sở II đều có khả năng oxy hóa nitrite thành nitrate, nhưng chỉ có NLI1-1, NLI1-2, NLI1-3, NLI1-4 và NLI1-8 có khả năng oxy hóa nitrite cao hơn những chủng còn lại nên 5 chủng vi khuẩn này được tiếp tục nghiên cứu khả năng tạo màng sinh học và sinh trưởng của chúng (bảng 2). Kết quả cũng chỉ ra, cả 5 chủng vi khuẩn này đều có khả năng tạo màng sinh học, nhưng chỉ có hai chủng NLI1-4 và NLI1-8 có khả năng sinh trưởng và tạo màng sinh học cao hơn những chủng vi khuẩn còn lại.

Từ kết quả nghiên cứu trên đã lựa chọn được 4 chủng NLI-6, NLI-7 (vi khuẩn oxy hóa ammonium), NLI-4 và NLI-8 (vi khuẩn oxy hóa nitrite) không những có khả năng chuyển hóa nitrogen tốt mà còn có khả năng tạo màng sinh học cao, các chủng vi khuẩn này còn được khẳng định hơn khi chúng có khả năng bắt màu đậm với tím kết tinh (được trình bày ở phần phương pháp) hơn những chủng khác (không minh họa bằng hình ảnh), do đó 4 chủng vi khuẩn này được lựa chọn cho những nghiên cứu tiếp theo.

Hoạt tính nitrate hóa của vi khuẩn khi có giá thể

Nhiều nghiên cứu về ảnh hưởng của giá thể lên sinh trưởng và hoạt tính của các chủng vi khuẩn oxy hóa ammonium. Kết quả cho thấy, khi có định vi khuẩn nghiên cứu lên các giá thể (chất mang), các vi khuẩn có hoạt tính chuyển hóa ammonium tăng hơn so với môi trường dịch thể do khả năng tạo màng sinh học của vi khuẩn nên chúng đã bám dính lên vật liệu mang (Christopher, 2008). Vì vậy, nghiên cứu tiếp theo đánh giá hoạt tính chuyển hóa ammonium của các chủng vi khuẩn NLI-6, NLI-7, NLI-4 và NLI-8 trong môi trường có bổ sung chất mang được tiến hành (bảng 3).

Bảng 3. Ảnh hưởng của chất mang đến khả năng oxy hóa các hợp chất nitrogen của vi khuẩn tuyển chọn

Chủng	N-NH ₄ ban đầu (mg/L)	Không chất mang		Bổ sung chất mang	
		N-NH ₄ còn lại (mg/L)	N-NO ₂ tạo ra (mg/L)	N-NH ₄ còn lại (mg/L)	N-NO ₂ tạo ra (mg/L)
NLI-6	5	0,701	3,518	0,466	4,341
NLI-7	5	0,714	3,482	0,549	3,833

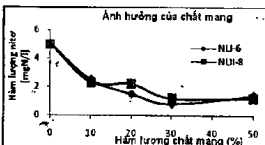
Chủng	N-NO ₂ ban đầu	Không chất mang		Bổ sung chất mang	
		N-NO ₂ còn lại (mg/L)	N-NO ₂ tạo ra (mg/L)	N-NO ₂ còn lại (mg/L)	N-NO ₂ tạo ra (mg/L)
NLI-4	5	0,917	3,78	0,707	3,91
NLI-8	5	0,909	4,02	0,759	4,22

Kết quả nhận được cho thấy, 4 chủng vi khuẩn lựa chọn đều có hoạt tính nitrate hóa cao hơn khi trong môi trường chứa chất mang, tốc độ oxy hóa các hợp chất chứa nitơ cao hơn khoảng 1,2 + 1,4 lần so với môi trường dịch thể. Rất có thể, chất mang có mặt trong môi trường dịch thể là cơ hội cho vi khuẩn bám dính và tạo biofilm, bên

cạnh đó vi khuẩn nitrate hóa là vi khuẩn tự dưỡng hóa năng, chúng sinh trưởng chậm, nếu muốn lưu giữ chúng trong các hệ thống xử lý nước bị ô nhiễm phải có định chúng lên chất mang. Đây là tính chất rất quan trọng trong việc ứng dụng chúng vào các công nghệ xử lý nước bị ô nhiễm ammonium.

Ảnh hưởng của hàm lượng chất mang

Như vậy, các chủng vi khuẩn nghiên cứu đều có hoạt tính oxy hóa hợp chất nitrogen tốt hơn khi có chất mang so với trong trạng thái dịch thể. Nhưng sử dụng chất mang với hàm lượng phù hợp là yếu tố quan trọng dẫn đến thành công trong các công nghệ xử lý do tiết kiệm được giá thành và đạt hiệu quả xử lý cao. Nghiên cứu tiếp theo về ảnh hưởng của hàm lượng chất mang đã được thực hiện với hai chủng vi khuẩn NLI-6 và NLI-8. Thí nghiệm tiến hành như đã trình bày ở phần phương pháp, kết quả thể hiện ở hình 1.



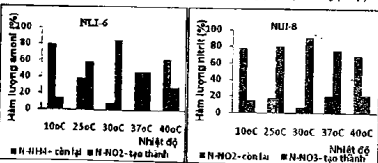
Hình 1. Ảnh hưởng của chất mang đến hoạt tính nitrate hóa của NLI-6 và NLI-8

Các chủng vi khuẩn nghiên cứu có hoạt tính nitrate hóa tốt hơn trong điều kiện có chất mang. Hiệu quả oxy hóa của các chủng vi khuẩn nghiên cứu đạt tốt nhất khi hàm lượng chất mang trong môi trường từ 20% và đạt hiệu suất cao nhất khi môi trường nuôi chứa 30%, khi môi trường nuôi vi khuẩn chứa tới 50% chất mang thì khả năng xử lý các hợp chất nitrogen vẫn cao. Chủng NLI-6 đạt hiệu suất loại ammonium là 70%, 84% và 72% khi chất mang chiếm 20%, 30% và 50% tương ứng; còn chủng NLI-8 đạt hiệu suất loại nitrite là 56% khi chất mang chiếm 20%, đạt 76% khi chất mang chiếm 30% và 50%, hàm lượng chất mang trong môi trường là 10% hiệu quả loại các hợp chất nitrogen thấp hơn. Như vậy, hàm lượng chất mang trong môi trường dịch thể là 30% sẽ có lợi thế hơn trong việc loại bỏ các hợp chất chứa nitrogen.

Ảnh hưởng của các điều kiện ngoại cảnh đến sinh trưởng và khả năng tạo màng của vi khuẩn lựa chọn

Ảnh hưởng của nhiệt độ

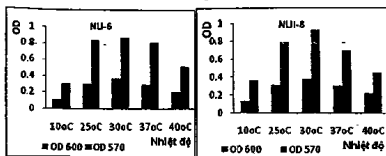
Khi nhiệt độ thay đổi, hoạt tính nitrate hóa của vi khuẩn nghiên cứu cũng ảnh hưởng theo, nghiên cứu ảnh hưởng của dải nhiệt độ khác nhau từ 10°C đến 40°C (trình bày phần phương pháp) đã được tiến hành.



Hình 2. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính nitrate hóa của NLI-6 và NLI-8

Kết quả nhận được cho thấy, ở 30°C chủng NLI-6 chuyển hóa được trên 80% hàm lượng ammonium trong khi ở các nhiệt độ khác 25 °C, 37 °C, chúng vẫn chuyển hóa ammonium nhưng với hiệu suất thấp hơn khoảng 60% và 40% tương ứng, thấp nhất tại nhiệt độ 10 °C và 40 °C khả năng chuyển hóa nitrogen chỉ đạt khoảng 10%, 30% tương ứng (hình 2). Đối với NLI-8 (vi khuẩn oxy hóa nitrit) cũng vậy, chúng đều có khả năng chuyển hóa nitrit tốt nhất tại điểm nhiệt độ 30°C, hiệu suất đạt hơn 80% và giảm ở các điểm nhiệt độ khác, chỉ đạt dưới 40% khả năng

chuyển hóa nitrite tại nhiệt độ 10 °C và 40 °C. Bên cạnh việc xác định hoạt tính nitrate hóa khi thay đổi nhiệt độ thì khả năng tạo màng sinh học và sinh trưởng của chúng cũng được tiến hành, kết quả được chỉ ra ở hình 3



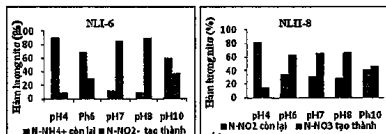
Hình 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng tạo màng sinh học và sinh trưởng của các vi khuẩn nghiên cứu

Nhiệt độ thích hợp cho sinh trưởng của các chủng vi khuẩn nghiên cứu ở nhiệt độ 25 °C và 30 °C. Ở các điểm nhiệt độ khác, vi khuẩn vẫn sinh trưởng nhưng yếu hơn và thấp nhất tại 10 °C. Không chỉ sinh trưởng tốt tại 25 °C và 30 °C, mà tại khoảng nhiệt độ này các chủng vi khuẩn nghiên cứu còn tạo màng sinh học rất tốt, khả năng tạo màng sinh học kém nhất tại nhiệt độ 10 °C và 40 °C. Khi nhiệt độ thích hợp, sinh khối của vi khuẩn tăng thì khả năng tạo màng cũng tăng và khả năng chuyển hóa các hợp chất chứa nitrogen cũng tăng. Các kết quả nghiên cứu về

nhiệt độ cho thấy, ở nhiệt độ 25 °C đến 30 °C khả năng oxy hóa các hợp chất chứa nitrogen, khả năng sinh trưởng và khả năng tạo màng là cao nhất. Kết quả này cũng phù hợp với những nghiên cứu của Vijaya và đtg (2005), ở nhiệt độ 30 °C cả vi khuẩn oxy hóa ammonium và vi khuẩn oxy hóa nitrit đều sinh trưởng tốt, khả năng sinh trưởng giảm đi đến 50% khi nhiệt độ môi trường là 20 và 40 °C. Công bố của Koop và Moller (1992) cũng cho thấy, các chủng thuộc chi *Nitrosomonas* có tính chuyển hóa ammonium cao nhất ở nhiệt độ 30 °C.

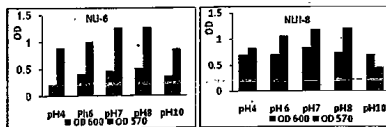
Ảnh hưởng của pH môi trường

Một trong những điều kiện khác ảnh hưởng trực tiếp đến sinh trưởng, hoạt tính chuyển hóa nitrogen và khả năng tạo màng sinh vật của vi khuẩn là pH môi trường. Hai chủng NLI-6 và NLI-8 tiếp tục tiến hành nghiên cứu.



Hình 4. Ảnh hưởng của pH tới hoạt tính nitrate hóa của NLI-6 và NLI-8

Kết quả nhận được cho thấy (hình 4), cả hai chủng vi khuẩn nghiên cứu đều có khả năng sinh trưởng và tạo màng sinh học ở các điểm pH khác nhau từ pH 6 đến pH 10. Nhưng chúng có khả năng chuyển hóa nitrogen đạt cực đại ở pH 7 và pH 8, tại pH này hiệu suất chuyển hóa ammonium của chủng NLI-6 đạt khoảng 80%, của NLI-8 là 70%, hiệu suất chuyển hóa nitrogen thấp nhất và gần như không xảy ra ở pH 4.



Hình 5. Ảnh hưởng của pH đến khả năng tạo màng sinh học và ST của NLI-6 và NLI-8

Ngoài nghiên cứu ảnh hưởng của pH đến hoạt tính nitrate hóa, ảnh hưởng của pH đến khả năng sinh trưởng và tạo màng sinh học của các chủng vi khuẩn nghiên cứu cũng được tiến hành (hình 5).

Kết quả cho thấy, các chủng vi khuẩn nghiên cứu đều sinh trưởng và tạo màng ở pH 6 + 10, nhưng tốt nhất ở pH 7 và pH 8 (hình 5), tại pH 4 vi khuẩn hầu như không sinh trưởng nhưng vẫn có khả năng tạo màng sinh vật. Ở các pH 6 và

pH 10 khả năng tạo màng và sinh trưởng giảm từ 30+50% so với ở pH 7 và pH 8. Trong 2 chủng vi khuẩn nghiên cứu thì NLI-6 có khả năng tạo màng tốt NLI-8. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của pH cũng khá tương hợp với nghiên cứu của các tác giả như Ruiz và đtg (2003) cho rằng ở pH thấp hơn 6,45 và trên 8,95 thì quá trình nitrate hóa bị ức chế. Vijaya và đồng tác giả (2005) cũng đã chứng minh, vi khuẩn nitrate hóa sinh trưởng bình thường ở pH 7-8, tốc độ sinh trưởng tối đa của cả 2 nhóm vi khuẩn oxy hóa ammonium và oxy hóa nitrite là ở pH 8.

Ảnh hưởng của nồng độ ammonium và nitrite

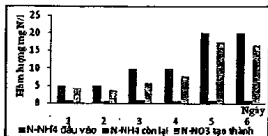
Bảng 4. Ảnh hưởng của nồng độ ammonium đối với chủng NLI-6, của nitrite đối với chủng NLI-8

	5mg		10mg		100mg		200mg		500mg		1000mg	
	ĐC	TN	ĐC	TN	ĐC	TN	ĐC	TN	ĐC	TN	ĐC	TN
NLI-6												
N-NH ₄ CL	4.97	1.02	9.76	3.65	98,82	90.34	199,89	169,57	499,5	489,87	999,6	985,16
N-NO ₂ TT	0,001	3,92	0,002	6,22	0,004	6,02	0,005	8,83	0,006	9,41	0,004	10,00
NLI-8												
N-NH ₄ CL	4,89	1,22	9,75	6,16	99,76	94,38	199,85	185,42	499,2	482,62	999,7	981,53
N-NO ₂ TT	0,002	3,58	0,925	3,54	0,005	3,62	0,003	13,57	0,003	15,57	0,005	16,47

Chú thích: CL: còn lại; TT: tạo thành; ĐC: môi trường không chứa vi khuẩn

Ảnh hưởng của ammonium hay nitrite đến hoạt tính nitrate hóa, sinh trưởng, và khả năng tạo màng của hai đại diện vi là NLI-6 và NLI-8 đã được tiến hành, kết quả nhận được cho thấy (bảng 4), ở các nồng độ ammonium hay nitrite khác nhau, hai chủng vi khuẩn nghiên cứu vẫn chuyển hóa và đặc biệt hoạt tính nitrate hóa của chúng không bị ức chế ở nồng độ cao tới 1000 mgN/l. Điều này có sự khác biệt với nghiên cứu trước đây của chúng tôi đối với chủng PD 58, PD 60 (vi khuẩn oxy hóa ammonium); 2NM, 5NM (vi khuẩn oxy hóa nitrite) bị ức chế khi ở nồng độ 500 mgN/l. Kết quả nghiên cứu này có ý nghĩa rất quan trọng khi sử dụng chúng trong xử lý nước thải chứa hàm lượng ammonium cao.

Ứng dụng khả năng loại các hợp chất nitrogen ở hệ lọc có dung tích 10 lít



Hình 6. Khả năng loại bỏ ammonium trong bình lọc của vi khuẩn nghiên cứu

Bốn chủng vi khuẩn nghiên cứu NLI-6, NLI-7, NLI-4 và NLI-8 được nhân nuôi và cố định trên chất mang trong hệ lọc có dung tích 10lít, thí nghiệm được tiến hành theo mẻ. Hàm lượng ammonium được đưa vào trong bình lọc được thay đổi hàng ngày. Kết quả cho thấy ở ngày thứ 5 và 6, mặc dù hàm lượng ammonium được đưa vào là 20 mgN/l/ngày nhưng hiệu suất loại bỏ vẫn đạt 96%. Thí nghiệm này cũng được chúng tôi thử nghiệm và so sánh với hệ lọc không chứa chất mang (không minh họa bằng hình vẽ), kết quả đạt được cho thấy ở bình chứa chất mang, hiệu suất loại bỏ ammonium vẫn cao hơn ở bình không chứa chất mang khoảng 1,4 lần. Thí nghiệm này một lần nữa chứng tỏ hiệu quả loại ammonium khi có chất mang cao hơn hẳn.

KẾT LUẬN

Khi có chất mang hoạt tính nitrate hóa của vi khuẩn tuyển chọn cao hơn từ 1,2-1,4 lần so với môi trường dịch thể và đạt hiệu quả cao nhất khi chất mang chiếm 30%.

Điều kiện thích hợp để vi khuẩn có khả năng tạo màng và hoạt tính nitrate hóa cao khi nhiệt độ ± 28 °C, pH 7,5-8; hàm lượng nitrogen trong khoảng 10-100 mgN/l.

20mg NH₄-N/L được loại bỏ hàng ngày tới 96% khi nghiên cứu thử nghiệm theo mẻ trên hệ lọc có dung tích 10lít trong phòng thí nghiệm.

Lời cảm ơn

Các thí nghiệm được tiến hành bằng nguồn kinh phí từ đề tài nghiên cứu phát triển công nghệ màng sinh học trong xử lý nước thải giàu nitơ và phốt pho do Bộ công thương tài trợ và sử dụng các trang thiết bị của Phòng thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Gen, Viện Công nghệ Sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Atlas RM (1995) *Winogradsky's Medium, Modified, Handbook of Media for Environmental Microbiology*. CRC Press Boca Raton: New York-London-Tokyo: 503.

Carrera J, Baeza JA, Vicent T, Lafuente J (2003) Biological nitrogen removal of high-strength ammonium industrial wastewater with two-sludge system. *Water Research* 37: 4211-4221.

Christopher BH and Eakalak Khan (2008) A Comparative Study of Immobilized Nitrifying and Co-immobilized Nitrifying and Denitrifying Bacteria for Ammonia Removal from Sludge Digester Supernatant. *Water Air Soil Pollut* 195:23-33.

DeBeer D. and Kuhl M (2001) Interfacial microbial mats and màng sinh học. In B. P. Boudreau & B. B. Jorgensen eds. Oxford University Press, New York ISBN 0-19-511881-2: 374-394.

Franson MAH (1995) Standard methods for the Examination of Water and Wastewater, Publication Office American Public Health Association-Washington, DC 20006., 19th Edition: 225-227; 240-243; 461-484.

Koops HP and Moller UC (1992) The lithotrophic ammonia oxidizing bacteria. In *The prokaryotes, a handbook in the biology of bacteria, ecophysiology, isolation, identification, application* Balows A, Truper HG, Dworkin M, Harder W and Schleifer K, eds. Springer Verlag, New York 3.2625-2637.

Michel P., Franco-Rivera A., Jason J., Cantera L. and Stein YL. (2005). Activity of nitrifying màng sinh học constructed on low-density polyester enhances bioremediation of a coastal wastewater effluent. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 21:1371-1377.

Mohamed JA, Huang W, Nallaopreddy SR, Teng F, Murray BE (2004) Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates and various genes on màng sinh học formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun* 72: 3658-63.

Rosand MA (1995). *Winogradsky's Medium, Modified. Handbook of Media for Environmental Microbiology*. CRC Press Boca Raton: New York-London-Tokyo: 503.

Vijaya BK and Charyulu PBBN (2005) Effect of environmental factors on nitrifying bacteria isolated from the rhizosphere of *Setaria italica* (L.) Beauv. *African J. Biotechnol.* 4 (10): 1145-1146

BIOFILM FORMING ABILITY OF NITROGEN CONVERSION BACTERIA

Hoang Phuong ¹, Nguyen Quang Huy², Nghiem Ngoc Minh¹

¹*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology*²*University of Science, Vietnam National University, Hanoi***SUMMARY**

A biofilm is a complex aggregation of micro-organisms growing on a solid substrate. Màng sinh học generally form on surfaces immersed in fluid and are generally resistant to antibiotics, disinfectants and cleaning fluids. Tests were performed to investigate nitrifying bacteria not only oxidation of inorganic nitrogen compounds but also capable of producing biofilm. Nitrifying bacteria make màng sinh học achieved nitrogen removal efficiencies higher when cell immobilized in carriers. Research on physiological, biochemical affect nitrification activity, growth and the ability to create màng sinh học indicates that nitrifying bacteria optimal in temperature $\pm 28^{\circ}\text{C}$, pH 7- 8, the nitrogen content in the range 10 - 200 mg/L. Nitrification activity is not inhibited by nitrogen concentration of 1000 mgN/l, the carrier used in this experiment is lightweight sponge size (1x1x1) cm, when cell immobilize on carrier, nitrogen removal capacity increased 1.2 to 1.4 fold in comparison to that in fluid medium. The influence of carrier concentration on the nitrification active also indicates that the highest activity when carrier for 30% of total volume. In nitrogen treatment systems with 10 liter volume, 20 mg $\text{NH}_4\text{-N}$ /liter was removed daily and efficiency of 96 %.

Keyword: biofilm, carrier, filter, nitrification, nitrifying bacteria

*Author for correspondance: Tel. +84 0988754688; Email: Ha27682002@yahoo.com