

# PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN CÁC CHỦNG VI KHUẨN NITRAT HÓA ĐỂ ỨNG DỤNG TRONG XỬ LÝ NƯỚC HỒ Ô NHIỄM

TRẦN LIÊN HÀ, PHẠM TUẤN ANH, NGUYỄN THỊ THANH

## I. MỞ ĐẦU

Ngày nay, việc ứng dụng các chế phẩm vi sinh vật để xử lý nước các hồ bị ô nhiễm được sử dụng ngày một phổ biến. Khác với các phương pháp vật lý, hóa lý..., việc bổ sung các chế phẩm vi sinh vào trong hồ giúp tăng cường khả năng phục hồi và thúc đẩy quá trình tự làm sạch trong hệ sinh thái của hồ. Do vậy, đây là phương pháp có tính ổn định cao và là một hướng đi rất thân thiện với môi trường.

Các chế phẩm vi sinh vật được sử dụng sẽ loại bỏ hàm lượng các chất C, N, P, ... dư thừa trong nước theo các quá trình khác nhau như để tạo sinh khối tế bào vi sinh vật, oxy hoá các chất thành sản phẩm cuối cùng là  $\text{CO}_2$  và  $\text{H}_2\text{O}$ , chuyển hoá nitơ dạng hữu cơ và vô cơ thành dạng khí  $\text{N}_2$  thoát ra ngoài môi trường, tích tụ P trong cơ thể tế bào, ... Quá trình loại bỏ nitơ dư thừa trong nước hồ diễn ra chủ yếu bởi các quá trình amôn hoá, nitrat hóa và phản nitrate hóa [2]. Trong đó, nitrate hóa là quá trình hiếu khí, đầu tiên  $\text{NH}_4^+$  được oxi hóa thành nitrit  $\text{NO}_2^-$ , sau đó nitrit  $\text{NO}_2^-$  sẽ chuyển hóa thành nitrate  $\text{NO}_3^-$  [5], các biến đổi này được thực hiện bởi các vi khuẩn như *Nitrosomonas*, *Nitrobacter* [3]. Tiếp đó nitrite, nitrate chuyển thành nitơ phân tử phát tán vào trong không khí nhờ tác dụng của các vi khuẩn phản nitrat hóa.

Vào năm 1994, Mulde và cộng sự [4] đã phát hiện thêm một quá trình oxi hóa amoniac yếm khí, tên gọi là Anammox. Trong quá trình này  $\text{NH}_4^+$  đóng vai trò là chất nhường electron,  $\text{NO}_2^-$  là chất nhận electron và sản phẩm của quá trình là  $\text{N}_2$ . Tuy nhiên quá trình này diễn ra chậm hơn so với các quá trình trên.

Trong nghiên cứu này chúng tôi phân lập, tuyển chọn và tìm các điều kiện nuôi cấy thích hợp để thu sinh khối các chủng có khả năng nitrate hóa để ứng dụng trong sản xuất các chế phẩm vi sinh xử lý nước hồ ô nhiễm.

## II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 1. Các mẫu dùng để phân lập

Chín mẫu đất và nước ở xung quanh Hà Nội được thu thập để làm nguồn vi sinh vật. Trong đó hai mẫu đất ở Thanh Trì và Từ Liêm và bảy mẫu nước gồm có 4 mẫu nước ở hồ Sài Đồng 1 (2 mẫu ở hồ nhỏ và 2 mẫu ở hồ to với vị trí ở mặt hồ và ở độ sâu 0,5 m), các mẫu nước ở bề mặt hồ Hà Đông, hồ Ba mẫu và mẫu nước ở độ sâu 0,5 m của hồ Đông Anh.

### 2. Môi trường phân lập

Môi trường phân lập là môi trường Vinogradski, thành phần gồm có  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2 (g/l);  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1 (g/l);  $\text{MgSO}_4$  0,5 (g/l);  $\text{FeSO}_4$  0,4(g/l);  $\text{NaCl}$  2(g/l); pH 8. Môi trường được thanh trùng ở  $121^\circ\text{C}$  trong 15 phút.

### 3. Phương pháp phân lập

Các mẫu sau khi thu thập được cấy vào môi trường Vinogradski. Khả năng chuyển hoá amon thành nitrit của các mẫu được xác định bằng thuốc thử Griess. Đối với các mẫu có hoạt tính sẽ được sử dụng để phân lập. Các mẫu này được pha loãng theo hệ số thập phân và cấy trên môi trường Vinogradski có bổ sung 2% aga. Các khuẩn lạc riêng rẽ được kiểm tra lại hoạt tính trên môi trường Vinogradski lỏng.

#### 4. Phương pháp xác định hàm lượng $\text{NH}_4^+$

Lấy 5 ml dung dịch chứa  $\text{NH}_4^+$  và 20 ml NaOH 40 % vào bình cất đậm. Sau đó thêm 20 ml dung dịch  $\text{H}_3\text{BO}_3$  3% cùng 3 - 5 giọt thuốc thử taxiro vào bình hứng. Tiến hành quá trình cất đậm và kiểm tra sự kết thúc quá trình cất đậm bằng giấy quỳ. Định lượng amon tetraborat sinh ra bằng  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Một mililit  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1 N dùng chuẩn độ tương ứng với 1,4 mg N.

#### 5. Phương pháp xác định hàm lượng $\text{NO}_2^-$

Hàm lượng  $\text{NO}_2^-$  được xác định dựa vào phản ứng màu của ion  $\text{NO}_2^-$  với thuốc thử Griess [1]. Hỗn hợp phản ứng gồm có 4 ml mẫu nghiên cứu (được pha loãng với tỉ lệ thích hợp), 1 ml Griess 1 và 1 ml Griess 2. Sau đó hỗn hợp này được lắc đều và để yên trong 10 phút. Nếu trong dung dịch có chứa ion  $\text{NO}_2^-$  thì nó sẽ phản ứng với thuốc thử cho màu hồng. Cường độ màu tỉ lệ thuận với nồng độ ion  $\text{NO}_2^-$  có trong dung dịch.

#### 6. Nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của các chủng nitrit hoá

Trong bài này hai yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của các chủng nitrit hoá được khảo sát đó là nhiệt độ và pH. Để khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ các chủng nitrit hoá được nuôi trong môi trường Vinogradski với pH ban đầu 6,7,8 và 9 ở 30°C. Đối với ảnh hưởng của nhiệt độ, các chủng được nuôi cấy trong môi trường Vinogradski pH ban đầu 8 ở các nhiệt độ khác nhau 20°C, 30°C, 40°C và 50°C.

### III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 1. Phân lập vi khuẩn nitrat hoá

Bốn chủng vi khuẩn có khả năng nitrate hóa đã được phân lập từ nước 7 mẫu nước hồ và 2 đất. Trong số 2 mẫu đất, không một vi khuẩn nitrat hóa nào được tìm thấy.

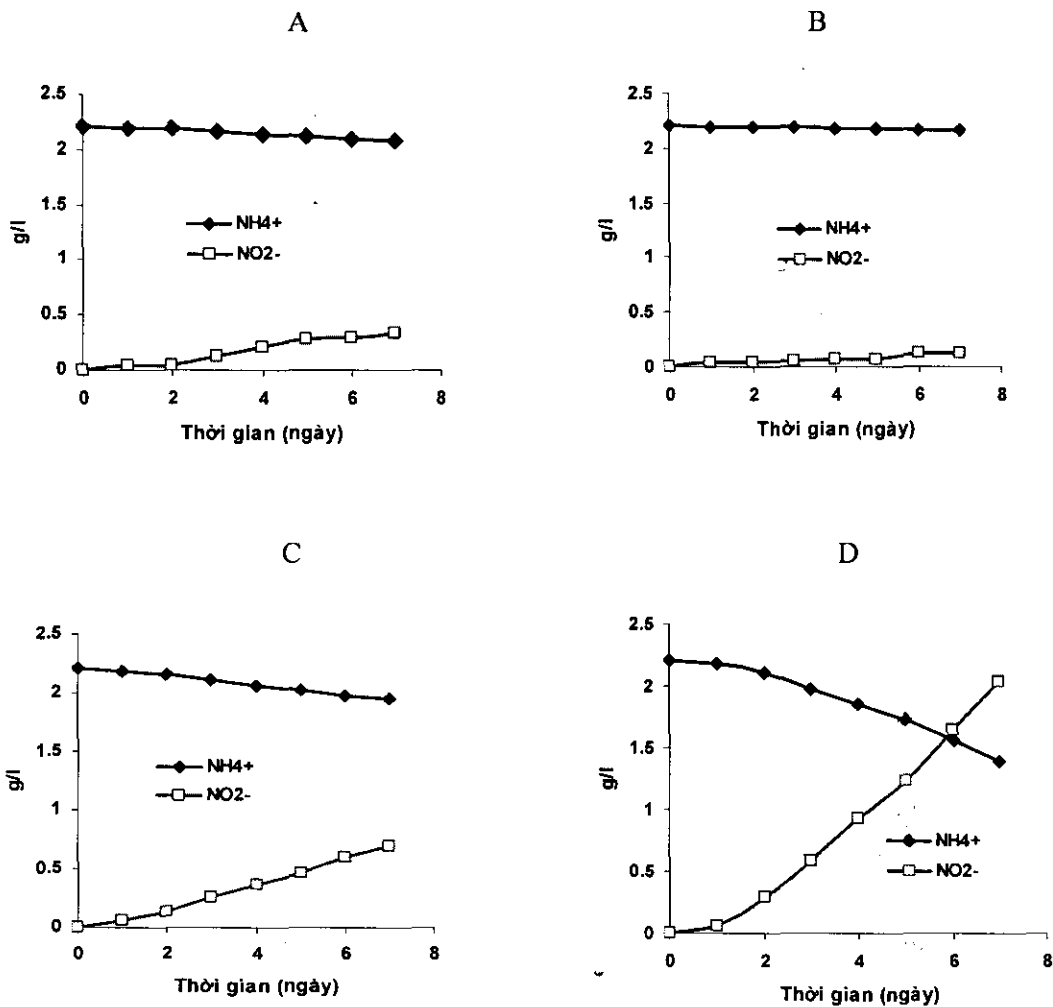
Với 7 mẫu nước được sử dụng trong nghiên cứu này, 4 mẫu được lấy ngay trên bề mặt hồ và 3 mẫu được lấy ở độ sâu 0,5 m, kết quả thu được chỉ ra rằng chỉ những mẫu nào được lấy trên bề mặt mới thu được các chủng nitrat hóa, điều này phù hợp với nhận định của nhiều tác giả cho rằng nitrat hóa là quá trình hiếu khí [3].

#### 2. Khả năng nitrit hoá của các chủng

Bốn chủng vi khuẩn phân lập được nuôi cấy trên môi trường Vinogradski, ở pH 8, lắc ở tốc độ 150 vòng phút và nhiệt độ 30°C. Khả năng nitrat hoá của các chủng thể hiện thông qua sự thay đổi về hàm lượng  $\text{NH}_4^+$  và  $\text{NO}_2^-$  (hình 1).

Hai chủng S3 và S4 có tốc độ chuyển hoá  $\text{NH}_4^+$  rất chậm (hình 1A, 1B). Sau 7 ngày nuôi khả năng nitrate hóa của các chủng S3 và S4 chỉ đạt 5,88 % và 2,35 %. Hàm lượng nitrit sinh ra trong môi trường lên men lần lượt là 0,332 (g/l) và 0,132 (g/l). Đối với hai chủng S5 và S6 khả năng nitrate hoá thể hiện rõ sau 2 ngày nuôi cấy và hàm lượng nitrit sinh ra tương ứng là 0,14 (g/l) và 0,32 (g/l) (hình 1C, 1D). Sau 7 ngày nuôi cấy khả năng nitrate hóa của các chủng S5 và S6 lần lượt là 37,29% và 111,67% và hàm lượng nitrit sinh ra là 0,692 (g/l) và 2,042 (g/l). Từ kết quả trên

cho thấy hai chủng S3, S4 có tốc độ chuyển hóa  $\text{NH}_4^+$  chậm so với hai chủng S5, S6. Do vậy hai chủng S5, S6 được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.



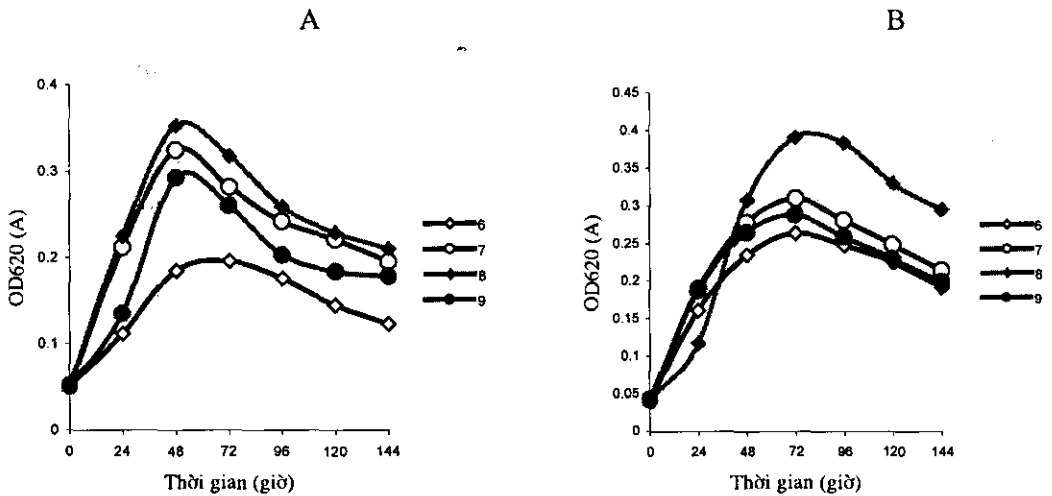
Hình 1. Khả năng nitrate hoá của các chủng trong môi trường Vinogradski (A: chủng S3, B: chủng S4, C: chủng S5, D: chủng S6)

#### 4. Các yếu tố ảnh hưởng đến sinh trưởng của các chủng nitrit hoá

##### a. Ảnh hưởng của pH

pH của môi trường ảnh hưởng trực tiếp đến sự phát triển của vi khuẩn nitrate hoá. Khi pH môi trường quá cao dẫn đến việc tạo ra một lượng lớn  $\text{NH}_3$  trong môi trường [6] và làm ức chế sự phát triển của vi khuẩn oxi hoá amon và nitrit. Trong trường hợp pH của môi trường quá thấp dẫn đến việc tích tụ một lượng lớn axit nitric và chất ức chế sự phát triển của vi khuẩn nitrate hoá. Do vậy việc xác định giá trị pH phù hợp cho quá trình nitrate hoá cần được nghiên cứu. Kết quả ảnh hưởng pH đến sự phát triển của hai chủng được chỉ ra trên hình 2. Cả hai chủng S5 và S6 đều phát triển tốt nhất ở pH 8, tuy nhiên mức độ ảnh hưởng của pH là khác nhau. Hình 2B

chỉ ra rằng pH có ảnh hưởng rất lớn đến sự phát triển của chủng S6. Ở pH 8 sự phát triển của S5 đạt giá trị cao nhất OD 620 nm 0,391 sau 72 h nuôi cấy. Khi pH tăng 9 hay giảm 7 hay 6 thì giá OD 620 nm lần lượt là 0,288, 0,31 và 0,264. Chủng S5 bị ảnh hưởng của pH ít hơn trong giải pH từ 7-9. Giá trị OD 620 nm đạt cực đại ở pH 7, 8 và 9 lần lượt là 0,325, 0,353 và 0,293 sau 48 h nuôi cấy. Đối với cả hai chủng, pH 6 không thích hợp cho sự phát triển. Theo số liệu thống kê của Công ty TNHH nhà nước một thành viên cấp thoát nước Hà Nội, pH của các nước hồ Hà Nội dao động 6,89 đến 9,13 và từ các kết quả thu được ta thấy rằng hai chủng S5 và S6 có thể phát triển tốt ở ngoài môi trường. pH môi trường thích hợp cho hai chủng S5 và S6 là 8. Kết quả này cũng phù hợp điều kiện đối với *Nitrosomonas* và *Nitrobacter* [3, 6]. Tuy nhiên các chủng *Nitrosomonas* và *Nitrobacter* phát triển chậm hơn. *Nitrosomonas* đạt giá trị OD 620 nm cực đại là 0,17 sau 72 giờ và *Nitrobacter* đạt giá trị OD 620 nm cực đại là 0,15 sau 96 giờ nuôi cấy. Vi khuẩn *Nitrosomonas* và *Nitrobacter* là điển hình cho quá trình nitrate hoá tuy nhiên so với các chủng chúng tôi phân lập được thì tốc độ phát triển của chúng chậm hơn. Đối với việc sử dụng vi sinh vật để xử lý nước hồ thì tốc độ phát triển của vi sinh vật đóng vai trò quan trọng vì khi vi sinh vật phát triển chúng chuyển hoá các chất dư thừa trong nước thành sinh khối và góp phần đáng kể việc làm giảm ô nhiễm.



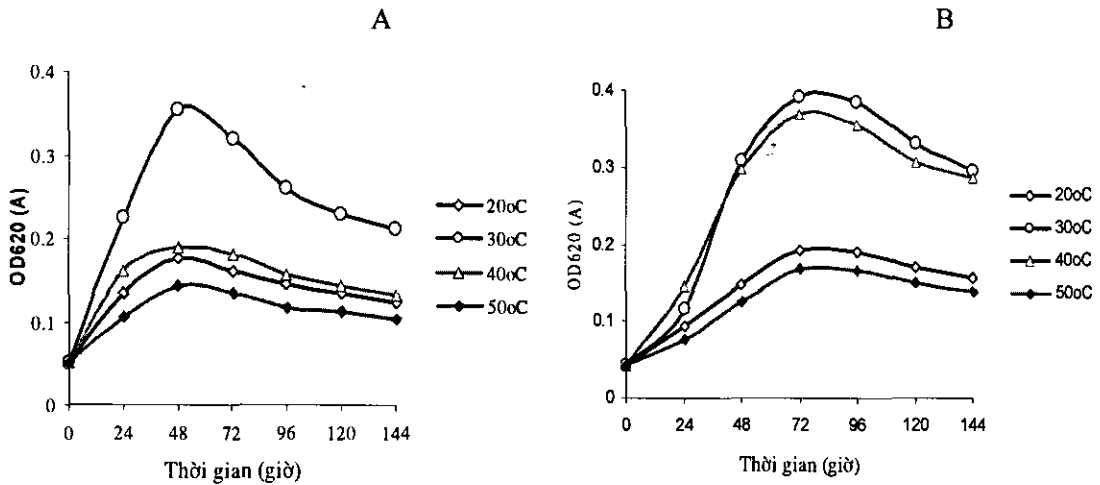
Hình 2. Ảnh hưởng của pH đến sự phát triển của các chủng S5 và S6  
(A: chủng S5; B: chủng S6)

### b. Ảnh hưởng của nhiệt độ

Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự phát triển của hai chủng được thể hiện trên hình 3. Chủng S5 phát triển tốt nhất ở nhiệt độ 30°C và đạt giá trị OD 620 nm cực đại 0,353 sau 48 giờ nuôi cấy (hình 3A). Sự phát triển của S5 bị giảm đi rõ rệt khi nhiệt độ thay đổi. Ở 20°C, 30°C và 40°C S5 phát triển chậm và giá trị OD 620 nm cực đại lần lượt là 0,175, 0,188 và 0,142 sau 48 giờ nuôi cấy.

Chủng S6 phát triển chậm hơn so với S5 và đạt giá trị OD 620 nm cực đại sau 72 giờ nuôi cấy (hình 3B). Chủng này phát triển tốt ở nhiệt độ 30°C và 40°C, giá trị OD 620nm cực đại lần lượt là 0,391 và 0,368. Khi nhiệt độ tăng lên 50°C và giảm xuống 20°C thì sự phát triển của S6 giảm đi rõ rệt và giá trị OD 620 nm cao nhất chỉ còn là 0,168 và 0,192.

Các chủng S5, S6 có nhiệt độ tối ưu là 30°C, pH ban đầu tối ưu là 8. Tốc độ sinh trưởng cao nhất của S5 ở thời gian 48 giờ, của S6 là 72 giờ, đây là các điều kiện tối ưu để thu hồi sinh khối của hai chủng vi khuẩn nhằm ứng dụng vào trong chế phẩm sinh học để xử lý nước hồ. Tuy nhiên trong nghiên cứu này, sự ảnh hưởng của các yếu tố tới sinh trưởng của các chủng mới chỉ được khảo sát độc lập, để có thể áp dụng ở quy mô lớn thì cần phải khảo sát sự tương tác giữa các yếu tố tới sinh khối thu được và đưa ra một hàm toán học về mối quan hệ giữa các yếu tố và sinh khối.



Hình 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự phát triển của các chủng S5 và S6  
(A: sự phát triển của chủng S5; B: sự phát triển của S6)

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Thị Thanh, Trần Liên Hà - Phân lập chủng vi khuẩn phân nitrat hoá với mục tiêu ứng dụng trong xử lý nước hồ nhiễm, Tuyển tập báo cáo Hội nghị Khoa học lần thứ 20, Trường Đại Học Bách Khoa Hà Nội, 2006, tr. 243- 246.
2. D. Barnes, P. J. Bliss - Biological Control of Nitrogen in Wastewater Treatment. London: E & FN Spon Ltd., 1983.
3. K.V. Bhaskar, P. B. B. N. Charyulu - Effect of environmental factors on nitrifying bacteria isolated from the rhizosphere of *Setaria italia* (L) Beauv, African Journal of Biotechnology 4 (10) (2005) 1145-1146.
4. A. Mulder - Anoxic Ammonia Oxidation; International Application Published under the patent Cooperation Treaty (PCT) PCT/NL89/00004, 1989.
5. A. A. Van de Graaf, A. Mulder, Peter de Bruijn, M.S.M. Jette, L. A. Robertson, J. Gijs Kuenen - Anaerobic Oxidation of Ammonium Is a Biologically Mediated Process, Applied and Environmental Microbiology 61 (4) (1995) 1246-1251.
6. P. H. Antonious, J. Hamilton, B. Koopman, R. Jain, B. Holloway, G. Lyberatos, and S. A. Svoronos - Effect of temperature and pH on the effective maximum specific growth rate of nitrifying bacteria, Water Research 24 (1990) 97-101.