



KHẢ NĂNG OXY HÓA AMONI CỦA BA CHỦNG VI KHUẨN THUỘC CHI *BACILLUS* PHÂN LẬP TỪ NƯỚC THẢI SAU BIOGAS CỦA CÁC TRANG TRẠI CHĂN NUÔI LỢN

Nguyễn Hữu Đồng¹, Nguyễn Thị Việt², Đinh Thị Thu Hằng³, Phan Đỗ Hùng⁴, Trần Hòa
Duân², Nguyễn Quang Lịch^{5*}

¹ Trường Đại học Hà Tĩnh, Cẩm Vịnh, Cẩm Xuyên, Hà Tĩnh, Việt Nam

² Công ty Cổ phần Nghiên cứu Khoa học và Chuyển giao Công nghệ Hard Bee, Lô A124, Phú Mỹ Thượng,
Phú Thượng, Huế, Việt Nam

³ Học Viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt,
Hà Nội, Việt Nam

⁴ Viện Công nghệ Môi trường, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt, Hà
Nội, Việt Nam

⁵ Khoa Kỹ thuật và Công nghệ, Đại học Huế, 1 Điện Biên Phủ, Huế, Việt Nam

Tóm tắt. Việc loại bỏ nitơ bằng phương pháp sinh học có vai trò rất quan trọng trong công nghệ xử lý nước thải. Quá trình xử lý này bắt đầu bằng việc oxy hóa amoni thành nitrit để tạo điều kiện cho các quá trình nitrat và phân nitrat diễn ra sau đó. Nhiều chủng vi khuẩn khác nhau có khả năng oxy hóa amoni đã được công bố. Trong nghiên cứu này, ba chủng vi khuẩn với định danh *Bacillus megaterium* HT1, *Bacillus licheniformis* HT1 và *Bacillus subtilis* HT1 được phân lập từ mẫu nước thải chăn nuôi lợn có khả năng oxy hóa amoni. Sự chuyển hóa amoni trong các thí nghiệm được phân tích theo phương pháp quang phổ. Cả ba chủng vi khuẩn đều sinh trưởng và chuyển hóa amoni trong môi trường với pH và nhiệt độ tối ưu 7–7,5 và 30–37 °C. Cả ba chủng đều có khả năng chuyển hóa hoàn toàn amoni với nồng độ lên đến 750 mg/L sau năm ngày nuôi cấy và tốc độ chuyển hóa amoni của cả ba chủng vi khuẩn tỷ lệ thuận với nồng độ amoni thử nghiệm. Ba chủng có khả năng chịu NaCl ở nồng độ 3% và sinh trưởng và chuyển hóa amoni trong môi trường với nồng độ oxy hòa tan thấp (0,1 mg/L). Kết quả nghiên cứu đã đóng góp vào sự đa dạng của các loài vi khuẩn có khả năng chuyển hóa amoni và tiềm năng lớn trong việc ứng dụng các chủng này vào xử lý nước thải.

Từ khóa: Bacillus, vi khuẩn oxy hóa amoni, sự nitrit hóa, nước thải chăn nuôi lợn, biogas

* Tác giả liên hệ: nguyenquanglich@hueuni.edu.vn

Oxidation of ammonia with three bacterial strains belonging to genus *Bacillus* isolated from pig-farm wastewater after biogas tanks

Nguyen Huu Dong¹, Nguyen Thi Viet², Dinh Thi Thu Hang³, Phan Do Dung⁴,
Tran Hoa Duan², Nguyen Quang Lich^{5*}

¹ Ha Tinh University, Cam Vinh, Cam Xuyen, Ha Tinh, Vietnam

² Hard Bee Scientific Research and Technology Transfer Joint Stock Company, No. A124, Phu My Thuong, Hue, Vietnam

³ Academy Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology, 18 Hoang Quoc Viet St., Ha Noi, Vietnam

⁴ Institute of Environmental Technology, Vietnam Academy of Science and Technology 18 Hoang Quoc Viet St., Ha Noi, Vietnam

⁵ School of Engineering and Technology, Hue University, 1 Dien Bien Phu St., Hue, Vietnam

Abstract. The biological removal of ammonia plays an essential role in the wastewater treatment technology. The oxidation of ammonia is the first step converting ammonia to nitrite, which is then transformed to nitrate as an intermediate substance and finally biotransforming to free nitrogen. A variety of bacterial strains with the ability to oxidation of ammonia were published. In this study, three ammonia-oxidizing bacterial strains were isolated from wastewater after biogas tanks of industrial pig farms in Ha Tinh province, named *Bacillus megaterium* HT1, *Bacillus licheniformis* HT1, and *Bacillus subtilis* HT1. The biotransformation of ammonia was monitored by the spectrum analysis method. The optimal pH and temperature for the three isolates' growth are 7–7.5 and 30–37 °C. They can oxidize ammonia with a concentration of up to 750 mg/L within five days of incubation, and their ammonia-oxidizing rate is proportional to the concentrations of ammonia tested. The bacteria work well in the medium containing NaCl at a concentration of 3%. Besides, the low level of DO (0.1 mg/L) does not significantly affect their growth and ammonia-oxidizing activity. The results of this study can contribute to the diversity of ammonia-oxidizing bacteria and bring great potential to apply them to treat ammonia in wastewater.

Keywords: Bacillus, ammonia-oxidizing bacteria, pig farm, wastewater, biogas tank

1 Đặt vấn đề

Amoni tồn tại trong nước ở hai dạng là NH_3 và NH_4^+ và là một trong những thành phần quan trọng của chỉ số nitơ trong nước thải. Việc xử lý amoni trong nước thải chủ yếu dựa vào phương pháp sinh học. Đây là một quá trình chuyển hóa sinh học phức tạp với sự tham gia của nhiều nhóm vi khuẩn khác nhau để chuyển hóa amoni thành nitơ tự do thoát vào không khí. Nitrit hóa là quá trình quan trọng đầu tiên tạo điều kiện cho các quá trình nitrat hóa và phân nitrat diễn ra tiếp theo trong quá trình oxy hóa sinh học loại bỏ amoni trong nước thải. Các nhóm vi khuẩn có khả năng oxy hóa amoni (ammonia-oxidizing bacteria, AOB) khó phân lập,

phát triển chậm và thường rất nhạy cảm với các điều kiện môi trường. Do đó, quá trình oxy hóa amoni sinh học trong các nhà máy xử lý nước thải công nghiệp thường được xem là quá trình khó dự đoán và không đáng tin cậy [3]. Rất nhiều chủng vi khuẩn thuộc chi *Nitrosomonas* có khả năng oxy hóa amoni và chúng được xem là nhóm vi khuẩn quan trọng nhất và được áp dụng phổ biến nhất trong việc xử lý xử lý amoni trong nước [8, 10, 24, 27, 30]. Bên cạnh sự phổ biến và vai trò của chi *Nitrosomonas* trong sự oxy hóa amoni thì hai nhóm vi khuẩn khác là *Nitrospira* và *Nitrosococcus* cũng rất phổ biến và có khả năng oxy hóa amoni [20]. Các nhóm vi khuẩn này phân bố rộng rãi trong các môi trường khác nhau như đất, nước và trong các công trình xử lý nước thải nhân tạo [1, 4, 6, 11, 17] cũng như trong các môi trường sống khắc nghiệt như đất nhiễm axit [5, 9], trong quặng chứa nhiều sunfua [4] và trong môi trường với nhiệt độ cao [7]. Mặc dù các nhóm vi khuẩn này thể hiện vai trò quan trọng của chúng trong quá trình xử lý amoni trong nước, nhưng chúng vẫn có một số yếu điểm hạn chế khả năng xử lý của chúng trong tự nhiên cũng như áp dụng trong các công trình xử lý nước thải. Thuộc nhóm vi khuẩn tự dưỡng nên chúng sinh trưởng và phát triển chậm và do đó dễ bị các nhóm vi sinh vật khác trong nước thải cạnh tranh [21, 31]; tốc độ phân chia tế bào nhỏ; chúng rất nhạy cảm với các điều kiện môi trường như pH, nhiệt độ, ánh sáng, COD và DO [2]. Đặc biệt, mặc dù chúng là những vi khuẩn có khả năng oxy hóa amoni, nhưng chúng lại không chịu được môi trường sống với nồng độ amoni cao [12, 13, 21].

Các nhóm vi khuẩn dị dưỡng (heterotrophic bacteria) có khả năng chuyển hóa amoni trong điều kiện dị dưỡng với những đặc tính ưu việt hơn so với các nhóm vi khuẩn oxy hóa amoni tự dưỡng như sinh trưởng phát triển mạnh, tốc độ nhân đôi tế bào nhanh, có khả năng cạnh tranh tốt đối với nhóm vi khuẩn khác trong nước thải và có khả năng thích nghi với nhiều điều kiện môi trường khác nhau như pH, nhiệt độ, COD và DO. Đặc biệt, nhiều nhóm vi khuẩn dị dưỡng có khả năng oxy hóa amoni trong môi trường nước với nồng độ amoni rất cao [12, 19, 26]. *Bacillus* là nhóm vi khuẩn dị dưỡng có khả năng chuyển hóa amoni khá tốt [14, 26, 32]. Oxy hóa amoni là một quá trình phức tạp, đòi hỏi sự tham gia của một số enzyme do nhóm vi khuẩn có khả năng oxy hóa amoni (AOB) tạo ra và sự có mặt của oxy. Sự tham gia của hai enzyme ammonia monooxygenase (AMO) và hydroxylamine oxidoreductase (HAO) có vai trò xúc tác cho quá trình thu năng lượng trong quá trình oxy hóa amoni. Quá trình bắt đầu bằng enzyme ammonia monooxygenase xuyên màng xúc tác cho quá trình oxy hóa amoni thành hydroxylamine để thu hai electron trực tiếp từ quinone. Quá trình này cần sự có mặt của oxy và phản ứng xảy ra theo các phương trình sau: $\text{NH}_3 + \text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_2^- + 3\text{H}^+ + 2\text{e}^-$ và $\text{NH}_3 + \text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{NH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$. Sau đó, enzyme hydroxylamine oxidoreductase xúc tác cho quá trình chuyển hydroxylamine thành NO_2^- theo phương trình phản ứng sau: $\text{NH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NO}_2^- + 5\text{H}^+ + 4\text{e}^-$. Nhóm vi khuẩn này được các nhà nghiên cứu vi sinh vật môi trường quan tâm do chúng có một số đặc tính ưu việt như sinh trưởng và phát triển mạnh, có khả năng tồn tại cao trong các môi trường có điều kiện sống khắc nghiệt do chúng có khả năng sinh bào tử, tốc độ nhân đôi tế bào lớn, tính cạnh tranh cao với các nhóm vi khuẩn khác trong nước thải, sinh

trường và phát triển trong nhiều loại môi trường khác nhau. Đặc biệt, nhiều công bố đã chứng minh rằng nhiều chủng vi khuẩn thuộc nhóm *Bacillus* có khả năng oxy hóa trong môi trường có nồng độ amoni rất cao (trên 1.000 mg/L) và nhiều chủng có khả năng trực tiếp loại bỏ amoni thông qua sự hình thành nitơ tự do [14, 18, 26, 30]. Tuy nhiên, rất ít những nghiên cứu ở Việt Nam công bố về khả năng oxy hóa amoni của các nhóm vi khuẩn dị dưỡng nói chung và nhóm *Bacillus* nói riêng. Từ đó, mục tiêu của nghiên cứu này là phân lập, mô tả các đặc tính sinh học và thử nghiệm khả năng oxy hóa amoni các chủng vi khuẩn thuộc nhóm *Bacillus*. Nghiên cứu này sẽ góp phần khẳng định tính đa dạng của nhóm vi khuẩn có khả năng oxy hóa amoni và mở ra tiềm năng ứng dụng của chúng trong xử lý amoni trong nước thải và trong nuôi trồng thủy sản.

2 Vật liệu và phương pháp

2.1 Vật liệu

Ba mẫu nước được thu từ nguồn nước thải sau biogas của hồ sinh học thứ nhất ngay sau hầm biogas của ba trang trại chăn nuôi lợn ở xã Sơn Kim 1 – huyện Hương Sơn – tỉnh Hà Tĩnh – với tọa độ lần lượt là 18°27'41.80"N và 105°13'59.33"E, 18°28'28.67"N và 105°16'13.18"E và 18°27'36.30"N và 105°15'39.56"E. Mẫu được thu với thể tích bốn lít và chứa trong can nhựa vô trùng chuyên dụng với thể tích năm lít. Mẫu được bảo quản trong hộp xốp cách nhiệt chứa đá khô và đưa về phòng thí nghiệm. Sau đó mẫu được tiến hành nuôi cấy tối đa trong 36 giờ sau khi lấy. Mẫu được lắc mạnh và lọc qua bông thấm nước vô trùng để loại bỏ cặn trước khi tiến hành thí nghiệm.

2.2 Hóa chất

Tất cả các hóa chất được sử dụng cho nghiên cứu này được mua từ công ty Merck – CHLB Đức và công ty Hanna – Rumani với độ tinh khiết 99–99,9% và sử dụng cho các phép phân tích và phòng thí nghiệm.

2.3 Phương pháp

Nuôi cấy và phân lập vi khuẩn

5 mL mẫu được lấy bằng dụng cụ vô trùng và pha loãng trong 45 mL nước cất vô trùng, lắc đều và thu được dung dịch có độ pha loãng 10^{-1} . Tiếp tục lấy 5 mL từ dung dịch có nồng độ pha loãng 10^{-1} pha loãng trong 45 mL nước cất vô trùng, lắc đều và thu được dung dịch có độ pha loãng 10^{-2} . Tiến hành tương tự, cho đến khi có được nồng độ pha loãng 10^{-5} . Tất cả các bước pha loãng đều được tiến hành trong tủ cấy vô trùng. Mẫu được phân lập trong các ống nghiệm chứa 10 mL môi trường khoáng với các thành phần (g/L) $MgCl_2$: 0,5 g, NaCl: 1 g, K_2PO_4 : 1 g, $CaCO_3$: 1 g, $FeCl_3$: 0,02 g, Na_2COONa : 1 g, $NaHCO_3$: 1 g, $(NH_4)_2SO_4$: 0,2 g và nước cất vừa

đủ một lít; pH = $7,2 \pm 0,2$ và 2 mL thạch có nhiệt độ nóng chảy thấp 2%. Các ống nghiệm được giữ ở 37 °C trong tủ ẩm. Quan sát sự hình thành của khuẩn lạc đồng thời kiểm tra sự chuyển hóa của amoni bằng phản ứng định tính với thuốc thử Nessler. Thời gian nuôi cấy để phát hiện khuẩn lạc là năm ngày và kiểm tra sự chuyển hóa amoni cứ sau 24 giờ nuôi cấy. Sự chuyển hóa màu thuốc thử (phản ứng dương tính) từ màu vàng sang màu nhạt dần và sự oxi hóa hoàn toàn amoni khi màu vàng của thuốc thử chuyển thành không màu. Những ống nghiệm nuôi cấy có sự chuyển màu của thuốc thử ở bất kỳ mức độ nào đều được xem là dương tính và sẽ được lựa chọn cho bước tiếp theo của việc phân lập vi khuẩn. Các khuẩn lạc vi khuẩn có hình dạng và màu sắc khác nhau trong ống nghiệm sẽ được cấy chuyển riêng rẽ sang các ống nghiệm mới cho đến khi đạt được sự đồng nhất về hình dạng và màu sắc của khuẩn lạc thì được xem là thuần khiết. Ngoài ra, các ống nghiệm chứa khuẩn lạc cũng được kiểm tra khả năng chuyển hóa amoni trong suốt quá trình nuôi cấy và phân lập để loại bỏ bớt các khuẩn lạc không phải là các vi khuẩn oxi hóa amoni.

Định danh và xác định loài vi khuẩn

Các chủng vi khuẩn được xác định là thuần khiết dựa trên hình thái về độ đồng nhất khuẩn lạc trên môi trường phân lập được định danh bằng phương pháp khuếch đại PCR và giải trình tự gene mã hóa 16S rARN và tra cứu bằng công cụ BLAST. DNA của các chủng vi khuẩn phân lập được có khả năng oxy hóa amoni được tách chiết bằng sử dụng bộ kit Macherey-Nagel (Hãng Fisher Scientific). Mẫu DNA sau đó được tinh sạch bằng bộ kit của hãng Promega trước khi được khuếch đại bằng máy luân nhiệt Bio-Rad T100 PCR Thermal Cycler, sử dụng cặp mồi xuôi là 27F và mồi ngược là 1492R. Mẫu DNA sau khi khuếch đại được kiểm tra độ thuần khiết bằng bộ điện di ngang Mini Sub Cell GT của hãng Bio-Rad và sau đó mẫu điện di được chụp ảnh và phân tích trên hệ thống Gel OmniDOC Cleaver Scientific – Anh. Cuối cùng, DNA được giải trình tự gene trên máy giải trình tự DNA tự động Sanger Sequencing DNA Analyzer của hãng Applied Biosystems – Mỹ.

Thử nghiệm xác định các đặc điểm nuôi cấy của các chủng vi khuẩn

Các chủng vi khuẩn đã phân lập được khảo sát ở các điều kiện nuôi cấy khác nhau:

+ Ảnh hưởng của pH: Khảo sát khả năng sinh trưởng, phát triển và chuyển hóa amoni của các chủng vi khuẩn phân lập được trong các môi trường nuôi cấy có các mức pH 5, 6, 7, 8 và 8,5. Việc điều chỉnh pH của môi trường nuôi cấy được thực hiện trên máy đo pH của hãng Toledo – Thụy Sĩ, sử dụng dung dịch NaOH 0,5 M và dung dịch HCl 0,5 M.

+ Ảnh hưởng của nhiệt độ: Các mức nhiệt độ 5, 30, 37, 45 và 50 °C được khảo sát cho khả năng sinh trưởng, phát triển và khả năng chuyển hóa amoni của các chủng vi khuẩn đã phân lập. Các bình nuôi cấy của các thí nghiệm ở các mức nhiệt độ 30, 37, 45, và 50 °C được ủ trong

tủ ấm có điều chỉnh nhiệt độ, trong khi các bình nuôi cấy của thí nghiệm ở 5 °C được nuôi trong ngăn lạnh của tủ lạnh có nhiệt kế để điều chỉnh nhiệt độ trong suốt quá trình nuôi.

+ Ảnh hưởng của nồng độ oxy hòa tan (DO): Các nồng độ DO khác nhau của môi trường nuôi cấy 0,1, 4,5 và 7 mg/L được thiết lập để nuôi cấy các chủng vi khuẩn. Việc hạ thấp nồng độ DO trong môi trường được thực hiện bằng cách sục khí CO₂ vào môi trường nuôi cấy 10 phút trước khi hấp tiệt trùng môi trường và thêm TiCi 1,5% cho đến khi đạt được DO mong muốn. Ngược lại, sử dụng máy thổi khí mini có điều chỉnh để cung cấp khí nhằm tăng DO cho hệ nuôi. Các bình nuôi cấy của thí nghiệm này được nuôi trong các bình Schott Duran với thể tích 1 L chứa 700 mL môi trường nuôi cấy. Miệng bình được đậy bằng nút cao su (septa) để ngăn không khí. Nút cao su có thiết kế vị trí cho kim tiêm để bổ sung oxy, CO₂, hóa chất và chiết mẫu đo. Nút cao su và miệng bình được vặn kín bằng nắp nhựa. DO của mẫu nuôi cấy được đo và điều chỉnh hàng ngày. DO của mẫu thường sụt giảm theo thời gian nuôi và oxy được bổ sung vào bình nuôi cấy bằng kim tiêm vào khoảng trống phía trên bình nuôi cấy (headspace). Sau đó bình được lắc trộn 50 lần trong vòng một phút để đảm bảo oxy hòa tan hoàn toàn trong mẫu nuôi cấy và tiếp tục đo DO cho đến khi đạt mức theo thí nghiệm.

+ Ảnh hưởng của nồng độ muối: Khảo sát khả năng sinh trưởng và chuyển hóa của amoni trong điều kiện môi trường khoáng có bổ sung NaCl với nồng độ 1, 3 và 5%.

Khảo sát ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn nuôi cấy ban đầu và nồng độ amoni đến khả năng chuyển hóa amoni của ba chủng vi khuẩn đã phân lập

+ Các chủng vi khuẩn đã phân lập được khảo sát về khả năng chuyển hóa amoni với các mật độ vi sinh ban đầu là 10⁴, 10⁵ và 10⁶ tế bào/mL. Dung dịch vi khuẩn ban đầu được pha loãng bằng nước cất hấp vô trùng và mật độ vi khuẩn được xác định bằng phương pháp đếm trực tiếp vi khuẩn trên kính hiển vi sử dụng buồng đếm Neubauer và điều chỉnh thể tích nước pha loãng để đạt được mật độ của thí nghiệm.

+ Ảnh hưởng của nồng độ amoni đến khả năng chuyển hóa amoni của các chủng vi khuẩn phân lập được thiết lập với các môi trường nuôi cấy có nồng độ amoni ban đầu khác nhau 100, 500 và 750 mg/L. Kết quả của sự chuyển hóa amoni của chủng vi khuẩn được đo trên máy đo amoni của hãng MARTINI Model Mi405 có thang đo 0–9,99 mg/L với sai số 0,01 mg/L theo phương pháp đo quang sử dụng thuốc thử Nessler. Đối với các mẫu nuôi cấy có nồng độ amoni cao vượt quá ngưỡng đo của máy thì việc pha loãng mẫu được thực hiện để đưa nồng độ mẫu về khoảng giá trị đo và kết quả sẽ được nhân với hệ số pha loãng tương ứng.

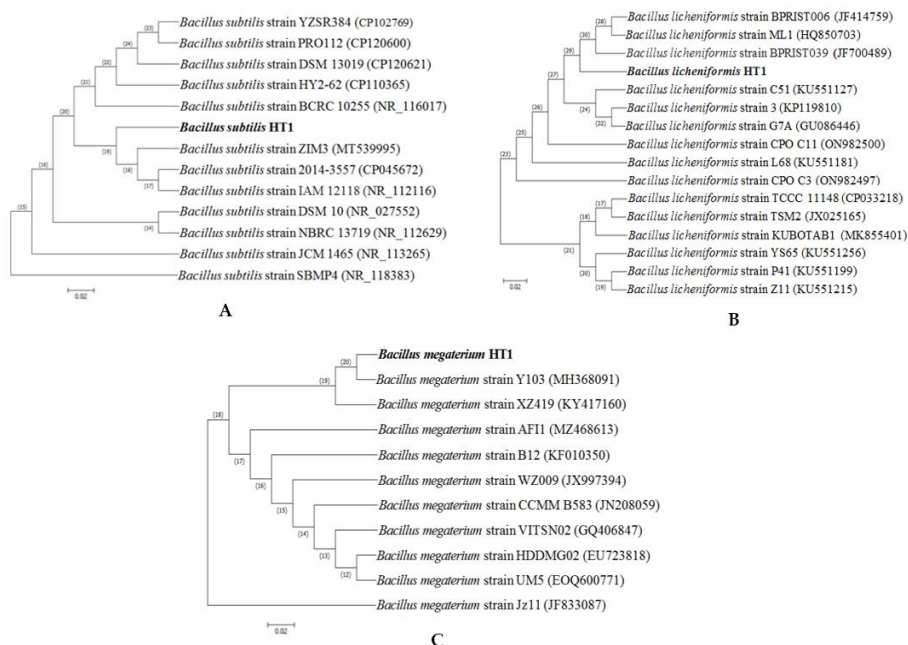
Tất cả các thí nghiệm trong nghiên cứu này được tiến hành trong ba bình nuôi cấy khác nhau và giá trị trên đồ thị là giá trị trung bình của ba bình nuôi cấy đó. Đối với các bình nuôi cấy chứa ba mẫu nước thải ban đầu và các bình nuôi cấy các khuẩn lạc phân lập có phản ứng dương tính với sự oxy hóa amoni thì được cấy chuyển ít nhất qua ba lần liên tiếp để khẳng định tính ổn định về khả năng oxy hóa của các mẫu nuôi cấy cũng như các khuẩn lạc đã phân lập.

Tất cả các thử nghiệm khảo sát các đặc tính sinh trưởng và khả năng oxy hóa amoni của các chủng vi khuẩn thuần khiết (ngoại trừ thử nghiệm khảo sát ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn nuôi cấy ban đầu) thì mật độ vi khuẩn được điều chỉnh về khoảng 10^6 tế bào/mL cho các bình nuôi cấy ban đầu. Ngoài ra, các thí nghiệm đối chứng được tiến hành trong các bình môi trường chứa amoni nhưng không có chứa vi khuẩn (ĐC1) hoặc chứa chủng vi khuẩn phân lập được nhưng đã được khử trùng ở $121\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 atm trong 15 phút trước khi bổ sung vào môi trường (ĐC2).

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Phân lập và định danh vi khuẩn

Từ ba mẫu nước thải sau biogas của ba trang trại chăn nuôi lợn, chín chủng vi khuẩn thuần khiết đã được phân lập trong các ống nghiệm chứa môi trường khoáng trong điều kiện hiếu khí. Trong số đó, chỉ ba chủng có khả năng oxy hóa amoni. Kết quả nhuộm Gram cho thấy rằng cả ba chủng vi khuẩn đều là vi khuẩn Gram dương. So sánh trình tự 16S rDNA của ba chủng vi khuẩn này với ngân hàng dữ liệu NCBI bằng chương trình BLAST kết hợp phân tích số liệu bằng phần mềm MEGA6 (So sánh sự khác nhau về vị trí các nucleotide giữa các cặp loài dùng ClustalW; cây phát sinh loài được xây dựng theo phương pháp Neighbor Joining), chúng tôi đã xác định ba chủng vi khuẩn đã phân lập thuộc *Bacillus megaterium*, *Bacillus licheniformis* và *Bacillus subtilis* với mức tương đồng 100% (Hình 1). Các chủng này được đặt tên là *Bacillus*

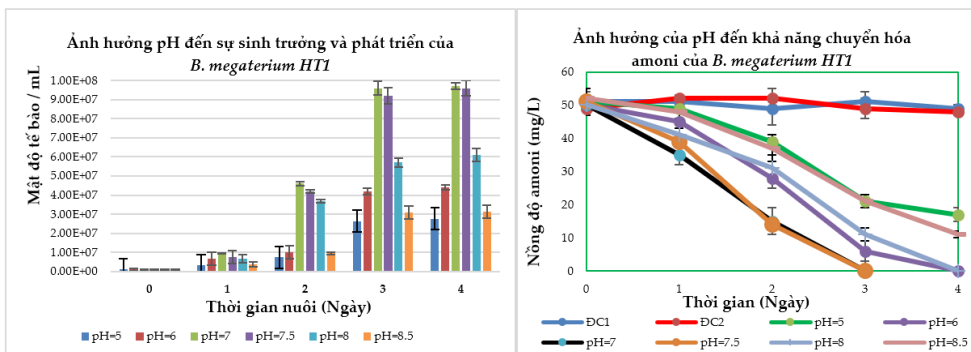


Hình 1. Cây phân loại của chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* HT1 (A), *Bacillus licheniformis* HT1 (B) và *Bacillus megaterium* HT1 (C) dựa vào trình tự gen mã hóa 16S rDNA

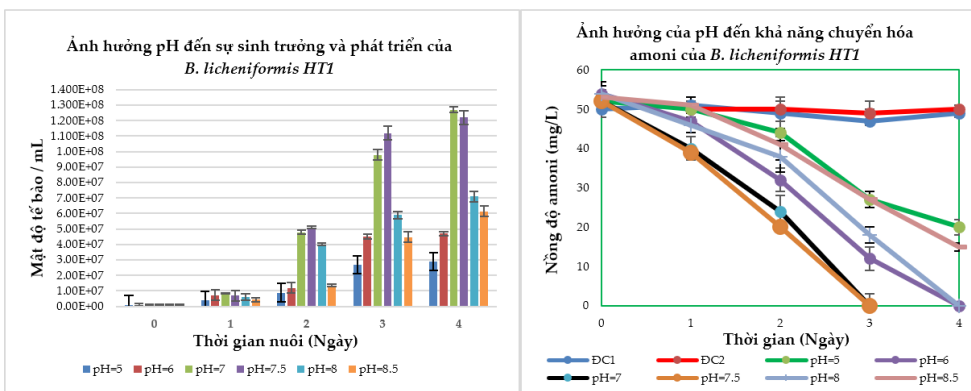
megaterium HT1, *Bacillus licheniformis* HT1 và *Bacillus subtilis* HT1. Chủng vi khuẩn *Bacillus megaterium* HT1 được phân lập từ nguồn nước thải sau biogas của trang trại lợn của hộ thứ hai. Trong khi đó, hai chủng vi khuẩn *Bacillus licheniformis* HT1 và *Bacillus subtilis* HT1 được phân lập theo thứ tự từ mẫu nước thải của trang trại lợn của hộ thứ nhất và hộ thứ ba.

3.2 Ảnh hưởng của pH đến sự sinh trưởng, phát triển và khả năng chuyển hóa amonia của các chủng vi khuẩn

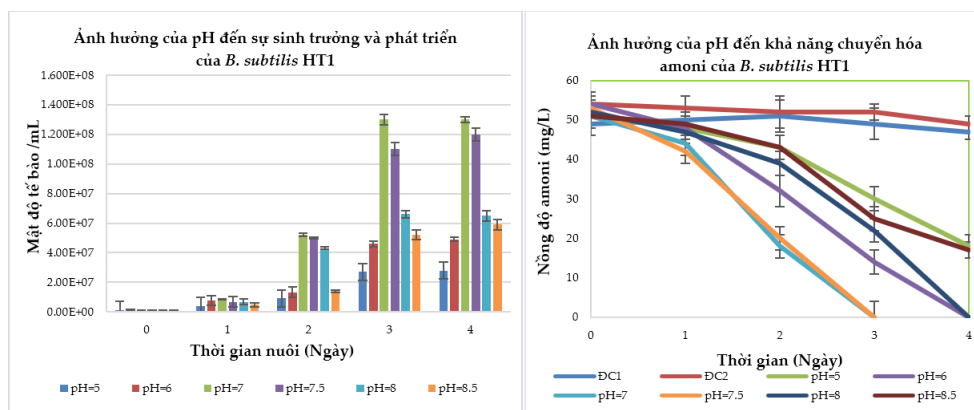
Kết quả nuôi cấy ba chủng vi khuẩn *B. megaterium* HT1, *B. licheniformis* HT1 và *B. subtilis* HT1 đã phân lập trên các môi trường nuôi cấy với các mức pH 5, 6, 7, 7,5, 8 và 8,5 cho thấy rằng cả ba chủng vi khuẩn này có khả năng phát triển trên môi trường với pH dao động từ 5 đến 8,5. Tuy nhiên, tất cả chúng đều phát triển tốt nhất trên môi trường có mức pH từ 7 đến 7,5 mặc dù cả ba chủng đều phát triển khá tốt hai mức pH 6 và pH 8. Tương tự, cả ba chủng này đều có khả năng oxy hóa amoni trong các môi trường có pH từ 5 đến 8,5, nhưng quá trình oxy hóa mạnh nhất diễn ra ở hai môi trường với pH 7 và pH 7,5 với khả năng chuyển hóa hoàn toàn khoảng 50 mg/L amoni trong thời gian ba ngày nuôi cấy (Hình 2, Hình 3 và Hình 4).



Hình 2. Ảnh hưởng của pH đến sự sinh trưởng, phát triển và khả năng oxy hóa amoni của chủng vi khuẩn *Bacillus megaterium* HT1



Hình 3. Ảnh hưởng của pH đến sự sinh trưởng, phát triển và khả năng oxy hóa amoni của chủng vi khuẩn *Bacillus licheniformis* HT1

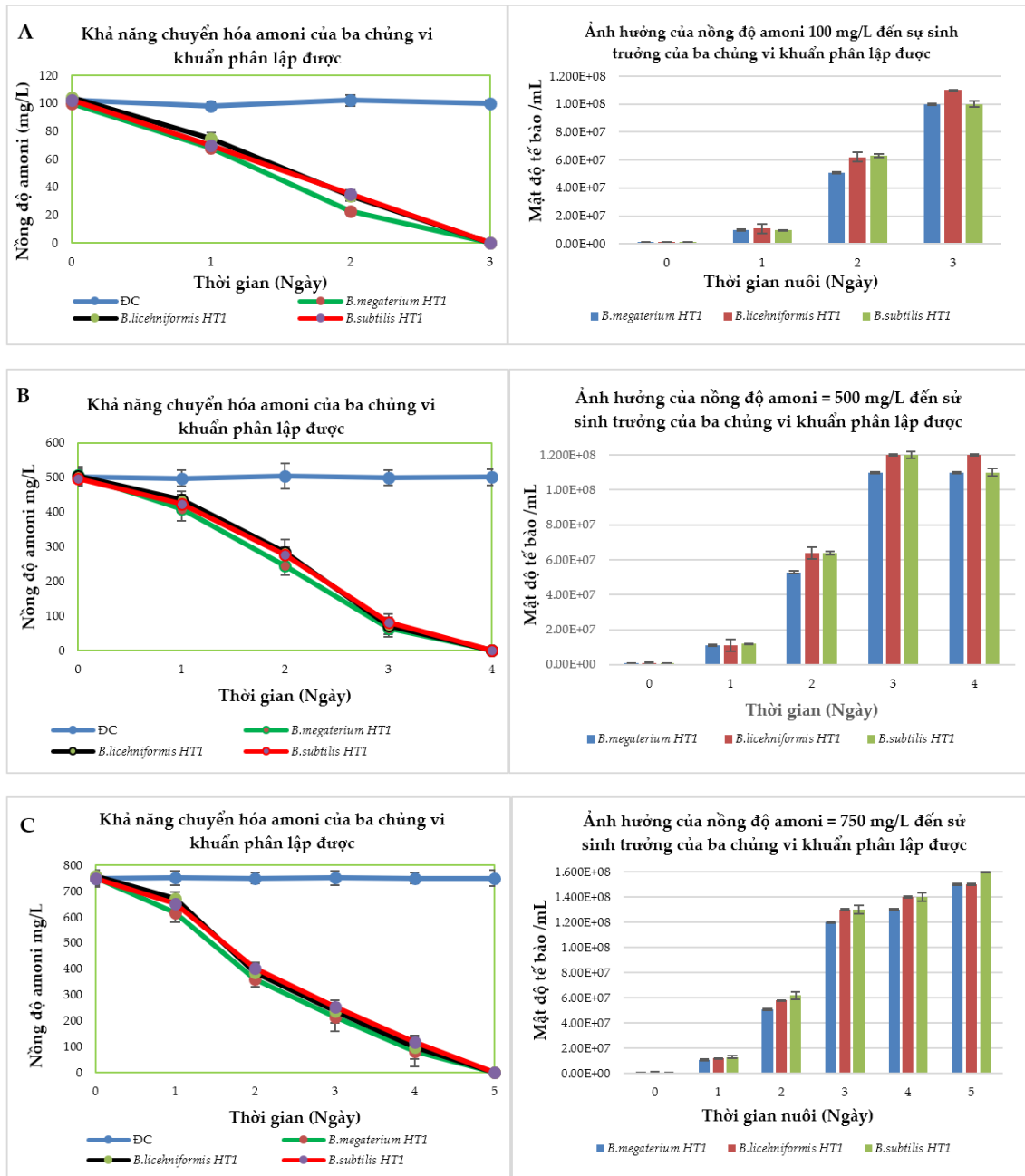


Hình 4. Ảnh hưởng của pH đến sự sinh trưởng, phát triển và khả năng oxy hóa amoni của chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* HT1

3.3 Khả năng sinh trưởng, phát triển và chuyển hóa amonia của các chủng vi khuẩn phân lập được

Do cả ba chủng vi khuẩn *Bacillus megaterium* HT1, *Bacillus licheniformis* HT1 và *Bacillus subtilis* HT1 sinh trưởng và phát triển tốt nhất trên môi trường với pH 7 và pH 7,5 nên môi trường nuôi cấy với mức pH 7,5 được chọn để khảo sát khả năng chuyển hóa amoni của chúng với các nồng độ amoni khảo sát là 100, 500 và 750 mg/L. Mật độ vi khuẩn nuôi cấy ban đầu được thử nghiệm khoảng 10^6 tế bào/mL. Kết quả cho thấy cả ba chủng vi khuẩn thử nghiệm đều có khả năng chuyển hóa hoàn toàn amoni với nồng độ lên đến 750 mg/L sau năm ngày nuôi cấy. Kết quả cũng cho thấy tốc độ chuyển hóa amoni tỷ lệ thuận với nồng độ amoni thử nghiệm, tức là tốc độ chuyển hóa amoni tăng lên trong các bình nuôi cấy có nồng độ amoni tăng lên. Ngoài ra, sự chuyển hóa amoni diễn ra nhanh nhất vào ngày nuôi cấy thứ hai và thứ ba đối với cả ba nồng độ amoni thử nghiệm mặc dù quá trình chuyển hóa diễn ra tương đối chậm sau 24 giờ đầu tiên nuôi cấy. Tốc độ chuyển hóa amoni sau đó có xu hướng giảm kể từ ngày nuôi cấy thứ tư trở đi. Khi so sánh mật độ vi khuẩn của cả ba chủng thử nghiệm trong các bình nuôi cấy với nồng độ amoni tăng dần lên, chúng tôi thấy rằng nồng độ amoni thử nghiệm đã không ảnh hưởng nhiều đến sự sinh trưởng và phát triển của cả ba chủng vi khuẩn thử nghiệm (Hình 5).

Thử nghiệm định tính và định lượng nitrit trong quá trình nuôi cấy cũng được tiến hành và xác định rằng nitrit là sản phẩm của quá trình chuyển hóa amoni. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này sự chuyển hóa của amoni được quan tâm hơn là lượng nitrit sinh ra. Quá trình chuyển hóa amoni không xảy ra trong các bình nuôi cấy đối chứng hoặc không bổ sung các chủng vi khuẩn (ĐC1) hoặc có bổ sung các chủng vi khuẩn đã được hấp khử trùng trước khi cho vào môi trường (ĐC2).

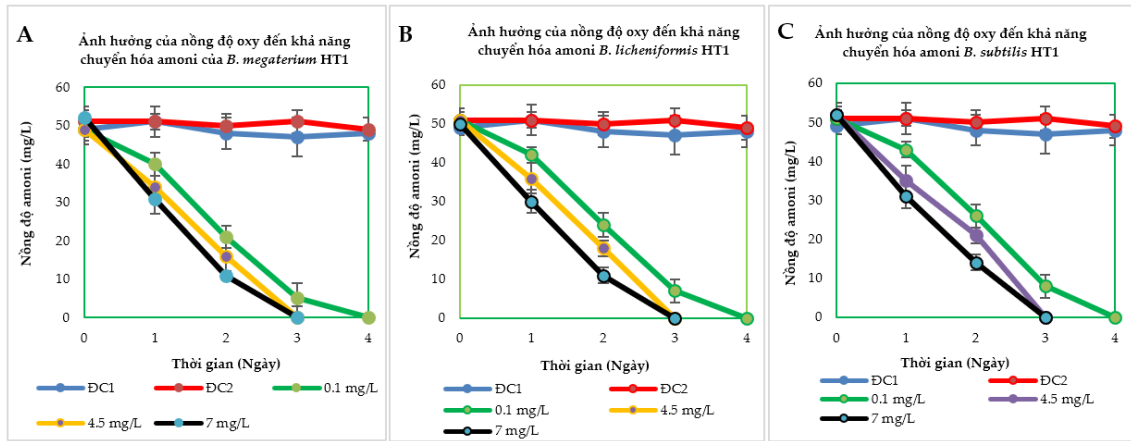


Hình 5. Khả năng sinh trưởng, phát triển và chuyển hóa amoni của ba chủng vi khuẩn phân lập được trong môi trường có bổ sung amoni với hàm lượng 100 mg/L (A), 500 mg/L (B) và 750 mg/L (C)

3.4 Ảnh hưởng của nồng độ oxy hòa tan và nhiệt độ đến khả năng chuyển hóa amoni của các chủng vi khuẩn thử nghiệm

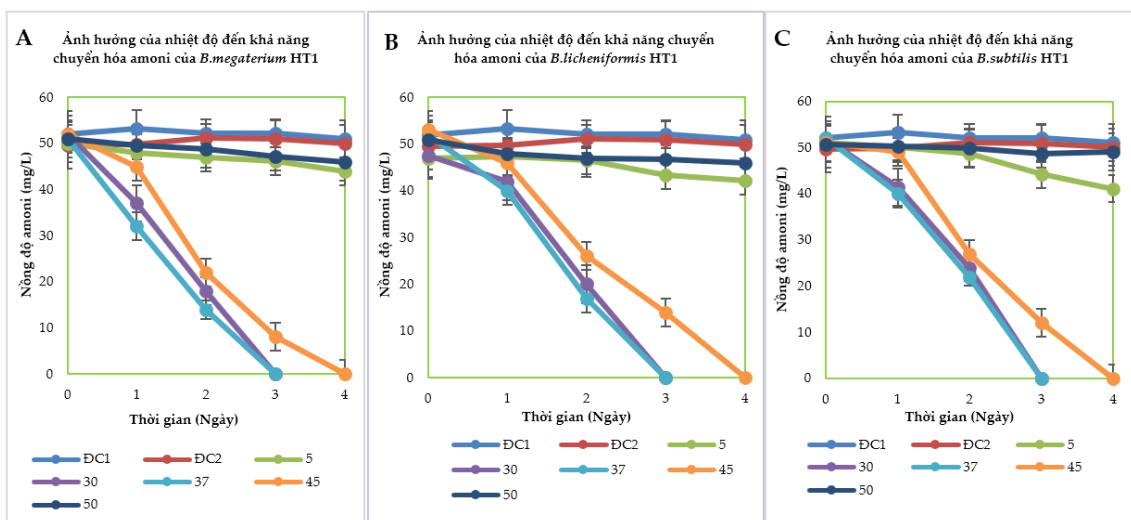
Ba mức nồng độ oxy hòa tan là 0,1, 4,5 và 7 mg/L được khảo sát cho khả năng sinh trưởng và chuyển hóa amoni của ba chủng vi khuẩn *Bacillus megaterium* HT1, *Bacillus*

licheniformis HT1 và *Bacillus subtilis* HT1 trong môi trường với pH 7,5. Kết quả thử nghiệm cho thấy rằng cả ba chủng vi khuẩn đều có khả năng chuyển hóa amoni tốt trên môi trường có các mức oxy đã thử nghiệm. Tốc độ chuyển hóa tỷ lệ thuận với nồng độ oxy của môi trường nuôi cấy (Hình 6)



Hình 6. Ảnh hưởng của nồng độ oxy đến khả năng chuyển hóa amoni của ba chủng vi khuẩn phân lập được: *Bacillus megaterium*(A); *Bacillus licheniformis* (B) và *Bacillus subtilis* (C) với hàm lượng oxy 0,1 mg/L (A), 4,5 mg/L (B) và 7 mg/L (C)

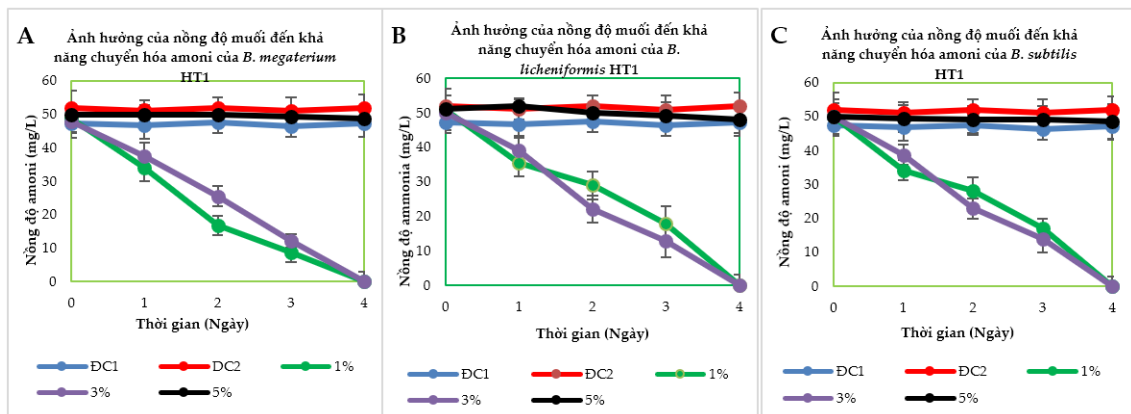
Bên cạnh thử nghiệm ảnh hưởng của nồng độ oxy hòa tan (DO) thì ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng chuyển hóa amoni của ba chủng vi khuẩn phân lập được với sáu mức nhiệt độ 5, 30, 37, 40, 45 và 50 °C cũng được khảo sát. Kết quả cho thấy rằng cả ba chủng vi khuẩn phân lập được thuộc vi khuẩn ưa ấm (mesophile) với khoảng nhiệt độ phát triển ưa thích 30–37 °C mặc dù các vi khuẩn vẫn có khả năng chuyển hóa amoni ở 45 °C (Hình 7 A, B, C).



Hình 7. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng chuyển hóa amoni của ba chủng vi khuẩn phân lập được: *Bacillus megaterium*(A), *Bacillus licheniformis* (B) và *Bacillus subtilis* (C)

3.5 Ảnh hưởng của nồng độ muối đến khả năng chuyển hóa amoni của ba chủng vi khuẩn đã phân lập

Ảnh hưởng của nồng độ muối NaCl đến khả năng chuyển hóa amoni của ba chủng vi khuẩn đã phân lập được tiến hành thử nghiệm trên môi trường khoáng với pH 7,5 và bổ sung thêm NaCl ở các nồng độ 1, 3 và 5%. Kết quả phân tích cho thấy cả ba chủng thử nghiệm đều có khả năng chuyển hóa amoni trong môi trường với nồng độ muối 3%. Tuy nhiên, khả năng này của cả ba chủng vi khuẩn đã bị mất đi trong môi trường với nồng độ NaCl 5% (Hình 8 A, B, C).



Hình 8. Ảnh hưởng của nồng độ muối đến khả năng chuyển hóa amoni của ba chủng vi khuẩn phân lập được: *Bacillus megaterium*(A), *Bacillus licheniformis* (B) và *Bacillus subtilis* (C)

3.6 Thảo luận

Cả ba chủng vi khuẩn phân lập được là *Bacillus megaterium* HT1, *Bacillus licheniformis* HT1 và *Bacillus subtilis* HT1 thuộc ba loài vi khuẩn *Bacillus megaterium*, *Bacillus licheniformis* và *Bacillus subtilis* là trực khuẩn lợi khuẩn (probiotics) và được sử dụng rất rộng rãi trong nông nghiệp, công nghệ thực phẩm và xử lý môi trường do chúng có một hệ enzyme rất đa dạng nên có khả năng chuyển hóa nhiều hợp chất khác nhau như protein, cellulose, lipid và tinh bột [15, 22, 25]. Ngoài ra, nhiều nghiên cứu đề cập ở phần trước đã khẳng định rằng ba loài trực khuẩn này cũng có khả năng chuyển hóa amoni rất cao. Kết quả nghiên cứu này một lần nữa khẳng định khả năng chuyển hóa amoni của ba loài trực khuẩn nói trên và chứng minh vai trò quan trọng của chúng trong chu trình chuyển hóa nitơ trong tự nhiên và ứng dụng chúng trong công nghệ xử lý amoni trong nước thải. Trong tất cả các thí nghiệm của nghiên cứu này, môi trường khoáng đã được sử dụng (môi trường khoáng được xem là môi trường nghèo dinh dưỡng thường hợp với nuôi cấy nhóm vi khuẩn tự dưỡng), nhưng kết quả thí nghiệm cho thấy rằng mật độ vi khuẩn của cả ba chủng đều tăng lên với cấp số nhân chỉ sau ba ngày nuôi cấy. Điều đó chứng tỏ rằng ba chủng vi khuẩn phân lập được có khả năng thích ứng cao với nhiều môi trường sống khác nhau mặc dù chúng là những vi khuẩn dị dưỡng. Một điều thú vị là khi nồng độ amoni thử nghiệm tăng lên thì tốc độ chuyển hóa amoni của các chủng vi khuẩn cũng tăng

lên. Điều này có thể là do amoni trong khoảng nồng độ thử nghiệm đã kích thích khả năng chuyển hóa của các chủng vi khuẩn phân lập được [29]. Khả năng chuyển hóa amoni lên đến khoảng 750 mg/L cùng với sự gia tăng tốc độ chuyển hóa khi nồng độ amoni tăng lên đã cho thấy tiềm năng to lớn trong việc ứng dụng các chủng này trong xử lý nước thải chứa amoni nồng độ cao. Nhiều kết quả nghiên cứu trước đây cho thấy rằng các nhóm vi khuẩn có khả năng oxy hóa amoni thường bị ức chế bởi sự có mặt của amoni với nồng độ không vượt quá 150 mg/L [28]. Kết quả thử nghiệm về ảnh hưởng của mức độ hiếu khí đến khả năng sinh trưởng và chuyển hóa amoni đến các chủng thử nghiệm cho thấy cả ba chủng vi khuẩn có khả năng oxy hóa amoni trong điều kiện nồng độ oxy rất thấp (0,1 mg/L) mặc dù tốc độ oxy hóa amoni tỷ lệ thuận với nồng độ oxy của môi trường nuôi cấy. Trục khuẩn *Bacillus* có khả năng tồn tại và phát triển trong các điều kiện môi trường bất lợi khác nhau và đặc biệt trong môi trường với nồng độ oxy thấp. Điều này đã được khẳng định bởi vì nhiều chủng vi khuẩn thuộc nhóm *Bacillus* đã được phân lập từ nhiều nguồn có môi trường khắc nghiệt khác nhau như môi trường trầm tích đại dương thiếu oxy [23]. Khả năng sinh trưởng và chuyển hóa amoni trong môi trường có nồng độ oxy thấp một lần nữa khẳng định thêm tiềm năng ứng dụng to lớn của các chủng vi khuẩn phân lập được trong xử lý amoni của nước thải, đặc biệt là trong các hồ xử lý sinh học là nơi thường có mức oxy thấp. Tương tự, kết quả thử nghiệm khả năng chịu muối của các chủng vi khuẩn này cho thấy rằng cả ba chủng vi khuẩn *Bacillus megaterium* HT1, *Bacillus licheniformis* HT1 và *Bacillus subtilis* HT1 có khả năng sinh trưởng, phát triển và chuyển hóa amoni trong môi trường có nồng độ muối dao động khá lớn từ nước ngọt cho đến nước biển (3% tương đương với độ mặn của nước biển). Điều này một lần nữa khẳng định vai trò quan trọng của các chủng vi khuẩn này trong chu trình nitơ tự nhiên vì chúng có thể oxy hóa amoni trong cả môi trường nước ngọt, nước lợ và nước biển. Kết quả thử nghiệm đối chứng âm gồm các bình môi trường chứa amoni nhưng không bổ sung dịch vi khuẩn hay đối chứng chứa môi trường bổ sung dịch chế phẩm vi khuẩn đã được hấp khử trùng hoàn toàn đã không cho thấy bất kỳ dấu hiệu nào của sự oxy hóa amoni. Điều đó cho thấy vai trò của các chủng vi khuẩn thử nghiệm trong dịch nuôi cấy bổ sung trong sự oxy hóa amoni trong các bình nuôi cấy. Cho đến nay, ngày càng nhiều nhóm vi khuẩn khác nhau được công bố tham gia vào quá trình oxy hóa amoni [7, 16, 33]. Tuy nhiên, sự đa dạng và khả năng chuyển hóa amoni của các loại vi khuẩn này vẫn còn hạn chế đã khiến cho vi khuẩn *Nitrosomonas* trở thành một vi khuẩn có vai trò quan trọng và phổ biến trong quá trình chuyển hóa amoni trong tự nhiên cũng như trong các công trình xử lý nước thải. Do đó, việc phân lập được ba chủng vi khuẩn có khả năng chuyển hóa amoni thuộc nhóm *Bacillus* đã khẳng định sự đa dạng của các nhóm vi khuẩn chuyển hóa amoni trong tự nhiên. Ngoài ra, với khả năng chuyển hóa và những đặc tính nổi trội hơn rất nhiều của chúng so với vi khuẩn *Nitrosomonas*, một nhóm vi khuẩn đã biết đến và áp dụng rất rộng rãi trong xử lý amoni hiện nay, đã khẳng định tiềm năng ứng dụng rất lớn của chúng trong xử lý nước thải.

4 Kết luận

Sử dụng phương pháp cấy ống nghiệm pha loãng để phân lập và phương pháp sinh học phân tử để định danh vi khuẩn, chúng tôi đã phân lập và định danh được ba chủng vi khuẩn thuần khiết và đặt tên là *Bacillus megaterium* HT1, *Bacillus licheniformis* HT1 và *Bacillus subtilis* HT1. Cả ba chủng vi khuẩn này đều có khả năng chuyển hóa amoni lên đến 750 mg/L. Ngoài ra, tất cả chúng đều có thể chịu được NaCl ở nồng độ lên đến 3% và có khả năng chuyển hóa amoni trong điều kiện nồng độ oxy rất thấp (0,1 mg/L), chúng tỏ tiềm năng to lớn của chúng trong việc ứng dụng xử lý các loại nước thải có tính chất và nồng độ amoni khác nhau.

Tài liệu tham khảo

1. Abeliovich A (1987), Nitrifying bacteria in wastewater reservoirs, *Applied and Environmental Microbiology*, 53, 54–760.
2. Barnes D, Bliss PJ (1983), *Biological Control of Nitrogen in Wastewater Treatment*. University Press, Cambridge, 1983.
3. Bellucci M, Curtis TP (2011), Ammonia-oxidizing bacteria in wastewater. *Methods in Enzymology*, 496, 269-286.
4. Bock E, Koops HP (1992), *The genus Nitrobacter and related genera*. In: Balows HG, Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer KH (eds) *The prokaryotes*, 2nd edn, Springer, Berlin Heidelberg New York, 1, 2302-2309.
5. De Boer W, Laanbroek HJ (1989), Ureolytic nitrification at low pH by *Nitrosospira* species, *Archives of Microbiology*, 152, 178-181.
6. Diep CN, Cam PM, Vung NH, Lai TT, My NTX (2009), Isolation of *Pseudomonas stutzeri* in wastewater of catfish fish-ponds in the Mekong Delta and its application for wastewater treatment, *Bioresource Technology*, 100, 3787-3791.
7. Ehrich S, Behrens D, Lebedeva E, Ludwig W, Bock E (1995), A new obligately chemolithoautotrophic, nitrite-oxidizing bacterium, *Nitrosospira moscoviensis* sp. nov., and its phylogenetic relationship, *Archives of Microbiology*, 164, 16-23.
8. Fujitani H, Kumagai A, Ushiki N, Momiuchi K, Tsuneda S (2015), Selective isolation ammonia-oxidizing bacteria from autotrophic nitrifying granules by applying cell-sorting and sub-culturing of microcolonies, *Frontiers in Microbiology*, 6(1159), 1-10.
9. Hakinson TR, Schmidt EL (1988), An acidophilic and a neutrophilic *Nitrobacter* strain isolated from the numerical predominant nitrite-oxidizing population of an acid forest soil, *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 1536–154.
10. Itoh Y, Sakagami K, Uchino Y, Boonmak C, Oriyama T, Tojo F, Matsumoto M, Morikawa M (2013), Isolation and characterization of a thermotolerant ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas* sp. JPCCT2 from a thermal Power station, *Microbes Environments*, 28(4), 432-435.
11. Jetten MSM, Logemann S, Muyzer G, Robertson LA, de Vries S, van Loosdrecht MCM (1997), Novel principles in the microbial conversion of nitrogen compounds, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 72, 75-93.

12. Joo HS, Hirai M, Shoda M (2005), Nitrification and denitrification in high strength ammonium by *Alcaligenes faecalis*. *Biotechnology Letters*, 27 (11), 773-778.
13. Kim DJ, Lee DI, Keller J (2006), Effect of temperature and free ammonia on nitrification and nitrite accumulation in landfill leachate and analysis of its nitrifying bacterial community by FISH. *Bioresource Technology*, 97, 459-464.
14. Kim JK, Park JK, Cho KS, Nam SW, Park TJ, Bajpai R (2005), Aerobic nitrification-denitrification by heterotrophic *Bacillus* species strains. *Bioresource Technology*, 96, 1897-1906.
15. Kim YK, Lee SC, Cho YY, Oh HJ, Ko YH (2012), Isolation of cellulolytic *Bacillus subtilis* strains from agricultural environments. *ISRN Microbiology*, 2012, 1-6.
16. Kümme A, Harms H (1982), Effect of organic matter on growth and cell yield of ammonia-oxidizing bacteria, *Archives of Microbiology*, 133, 50-54.
17. Laanbroek HJ, Woldendorp JW (1995), Activity of chemolithotrophic nitrifying bacteria under stress in natural soils. *Advances in Microbial Ecology*, 14, 275-304.
18. Leejeerajumnean A, Ames JM, Owens JD (2000), Effect of ammonia on the growth of *Bacillus* species and some other bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 30, 385-389.
19. Muller T, Walter B, Wirtz A, Barkovski A (2006), Ammonium toxicity in bacteria. *Current Microbiology*, 52, 400-406.
20. Norton JM (2011), Diversity and environmental distribution of ammonia-oxidizing bacteria, ASM Press, Washington, 3, 39-55.
21. Rostron WM, Stuckey DC, Young AA (2001), Nitrification of high strength ammonia wastewaters: comparative study of immobilization media. *Water Research*, 35, 1169-1178.
22. Ruiz C, Pastor FIJ, Diaz P (2005), Isolation of lipid-and polysaccharide-degrading micro-organisms from subtropical forest soil, and analysis of lipolytic strain *Bacillus* sp.CR-179. *Letters in Applied Microbiology*, 40 (3), 218-227.
23. Sass AM, McKew BA, Sass H, Fichtel J, Timmis KN, McGenity TJ (2008), Diversity of *Bacillus*-like organisms isolated from deep-sea hypersaline anoxic sediments. *Saline Systems* (4), 1-11.
24. Satoh K, Tanaka T, Yuuichi O, Takahashi R, Tokuyama T (2004), Improvement of preservation method for ammonia-oxidizing bacteria by freeze-drying. *Soil Science Plant Nutrition*, 50(5), 777-781.
25. Shah F, Mishra S (2020), In vitro optimization for enhanced cellulose degrading enzyme from *Bacillus licheniformis* KY962963 associated with a microalgae *Chlorococcum* sp. using OVAT and statistical modeling. *SN Applied Science*, 2020, 2.
26. Sheela B, Khasim BS, Yellaji RO (2014), Bioremediation of ammonia using ammonia oxidizing bacteria isolated from sewage. *International Journal of Environmental Bioremediation and Biodegradation*, 4, 146-150.
27. Shimaya C, Hashimoto T (2008), Improvement of media for thermophilic ammonia-oxidizing bacteria in compost. *Soil Science and Plant Nutrition*, 54, 529-533.
28. Soliman M, Eldyasti A (2018), Ammonia-Oxidizing Bacteria (AOB): opportunities and applications – a review, *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 17, 285-321.
29. Stein LY (1987), Effects of Ammonia, pH, and Nitrite on the Physiology of *Nitrosomonas europaea*, an Obligate Ammonia-Oxidizing Bacterium. Oregon State University, 1998,

30. Tokuyama T, Mine A, Kamiyama K, Yabe R, Satoh K, Masumoto H, Takahashi R, Itonaga K (2004), *Nitrosomonas communis* strain YNSRA, an ammonia-oxidizing bacterium, isolated from the Reed Rhizoplane in an aquaponics plant. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 98(4), 309-312.
31. Van Loosdrecht MCM, Jetten MSM (1998), Microbiological conversion in nitrogen removal. *Water Science and Technology*, 38, 1-7.
32. Yang XP, Wang SM, Zhang DW, Zhou LX (2011), Isolation and nitrogen removal characteristics of an aerobic heterotrophic nitrifying-denitrifying bacterium, *Bacillus subtilis* A1. *Bioresource Technology*, 102, 854-862.
33. Zheng M, Liu YC, Xin J, Zuo H, Wang CW, Wu WM (2016), Ultrasonic treatment enhancement ammonia-oxidizing bacterial (AOB) activity of nitrification process. *Environmental Science and Technology*, 50(2), 864-871.