

THỬ NGHIỆM ĐIỀU KIỆN ẢNH HƯỞNG ĐẾN SINH TRƯỞNG CỦA ĐỒNG VI KHUẨN PHÂN GIẢI NITƠ PHÂN LẬP TỪ MỘT SỐ MẪU NƯỚC TẠI TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM – ĐH THÁI NGUYÊN

Phạm Thị Mỹ^{*}, Hoàng Thị Mai, Vi Đại Lâm, Dương Mạnh Cường
Trường Đại học Nông Lâm – ĐH Thái Nguyên

TÓM TẮT

Dư thừa nitơ trong nước thải là một trong những nguyên nhân lớn gây nên những tác hại tiêu cực đến môi trường, đe dọa sự phát triển bền vững và tính đa dạng của quần xã sinh vật nước. Việc loại bỏ nitơ trong nước thải có thể được thực hiện nhờ sự kết hợp của hai quá trình diễn ra kế tiếp nhau, gồm nitrat hóa và phân nitrat hóa. Nitrat hóa là sự chuyển hóa các hợp chất của nitơ, chủ yếu ở dạng muối amoni thành các muối nitrat, quá trình chuyển hóa nitrat thành nitơ tự do được gọi là phân nitrat hóa. Mục tiêu của thí nghiệm là nhằm phân lập các dòng vi khuẩn có đặc tính nitrat hóa tại một số khu vực có biểu hiện ô nhiễm tại Trường Đại học Nông Lâm - ĐH Thái Nguyên bằng việc sử dụng môi trường Winogradsky. Hai dòng vi khuẩn có đặc tính nitrit hóa và hai dòng có đặc tính nitrat hóa đã được phân lập. Các dòng vi khuẩn thể hiện khả năng sinh trưởng tốt ở pH 8 và nhiệt độ 30°C. Đặc điểm hình thái, đặc tính sinh hóa của các dòng vi khuẩn cho thấy các dòng vi khuẩn có khả năng thuộc chi *Nitrobacter* và *Nitrosomonas*. Cần thực hiện các thí nghiệm bổ sung để định danh loài và xây dựng các quy trình phục hồi sinh học nhằm loại bỏ tối ưu lượng nitơ trong nước thải.

Từ khóa: Nitrat hóa, Winogradsky, Phục hồi sinh học, *Nitrobacter*, *Nitrosomonas*

ĐẶT VẤN ĐỀ

Ô nhiễm môi trường là vấn đề đáng lo đối với các quốc gia trên thế giới, đặc biệt là các nước đang phát triển, trong đó có Việt Nam. Tình trạng ô nhiễm đất, nước, không khí đang trở thành thách thức mang tính toàn cầu. Ô nhiễm môi trường nước gây ảnh hưởng lớn đến hoạt động sinh hoạt và sản xuất của người dân hiện nay. Một trong những nguyên nhân dẫn đến ô nhiễm nguồn nước là hàm lượng nitơ quá cao dẫn đến dư thừa dinh dưỡng gây tác động tiêu cực đến hệ sinh thái nước, có thể dẫn đến hiện tượng tảo nở hoa, gây chết hàng loạt quần thể thủy sinh vật [3].

Để giải quyết vấn đề trên, việc nghiên cứu ứng dụng vi sinh vật nhằm xử lý nước bị ô nhiễm đang ngày càng phổ biến. Khác với các phương pháp vật lý, hóa học... việc sử dụng vi sinh vật giúp tăng cường khả năng phục hồi, tự làm sạch môi trường, có tính ổn định cao và thân thiện với môi trường.

Trong tự nhiên, vi sinh vật loại bỏ hàm lượng Nitơ dư thừa trong nước bằng cách chuyển hóa

nitơ dạng hữu cơ và vô cơ thành dạng khí N_2 thoát ra ngoài môi trường. Quá trình này diễn ra chủ yếu nhờ các quá trình amon hóa, nitrat hóa và phân nitrat hóa. Trong đó, quá trình nitrat hóa là một mắt xích quan trọng trong chu trình nitơ tự nhiên nhờ sự chuyển hóa các muối amoni thành các muối nitrat là dạng mà các thực vật thủy sinh có thể hấp thụ. Quá trình này được thực hiện bởi các dòng vi khuẩn như *Nitrobacter*, *Nitrosomonas*... [3]

Các dòng vi khuẩn nitrat hóa gồm nhiều loài với các đặc tính sinh trưởng khác nhau. Đồng thời, đây là nhóm vi khuẩn hiếu khí bắt buộc, sinh trưởng chậm và rất nhạy cảm với một số chất gây độc và sự thay đổi của nhiệt độ, pH. Do đó, việc tối ưu những điều kiện để tăng số lượng của vi khuẩn là yếu tố cần thiết giúp đẩy nhanh quá trình chuyển hóa nitơ trong nước giúp cho quá trình xử lý nước ô nhiễm hiệu quả hơn.

Trường Đại học Nông Lâm ĐH Thái Nguyên có diện tích khoảng 108 ha, là địa điểm học tập và sinh hoạt của trên 14.000 sinh viên các trường trong khối Đại học Thái Nguyên. Các hoạt động sinh hoạt và làm việc

^{*} Tel: 0988335869; Email: Phammy249@mail.com

trong trường thường xuyên gây phát sinh một lượng nước thải lớn. Một phần chất thải không được xử lý đã gây ô nhiễm nguồn nước, ao xung quanh trường làm giảm khả năng sinh trưởng và phát triển của các sinh vật trong nước. Do đó, việc phân lập các dòng vi khuẩn phân giải nitơ đóng vai trò quan trọng, giúp thiết lập các quy trình phục hồi sinh học nhằm làm giảm nồng độ nitơ trong nước thải, bảo vệ môi trường cảnh quan trong nhà trường và góp phần giảm thiểu những ảnh hưởng tiêu cực đến các khu vực lân cận.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu

Mẫu nước lấy từ các nguồn nước thải và các nguồn nước gồm ao, hồ, suối trong khu vực Trường Đại học Nông Lâm ĐH Thái Nguyên. Quy trình lấy mẫu đảm bảo vô trùng, mẫu được lấy bằng chai và đưa trực tiếp về phòng thí nghiệm để xử lý và giảm thiểu ảnh hưởng bởi điều kiện bên ngoài đến hoạt động của hệ vi sinh vật.

Phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp phân lập và tuyển chọn vi khuẩn

Các dòng vi khuẩn nitrit hóa và nitrat hóa được phân lập dựa trên môi trường đặc hiệu là Winogradsky I và Winogradsky II. Thuốc thử Griess được sử dụng nhằm kiểm tra sự có mặt của muối nitrat, từ đó giúp xác định sự có mặt của các dòng vi khuẩn phân giải nitơ [4], [5].

- Phương pháp nghiên cứu ảnh hưởng của pH và nhiệt độ

Dung dịch nuôi cấy vi khuẩn sau khi đã phân lập được pha loãng và nuôi cấy ở các dải pH và nhiệt độ khác nhau. Mật độ vi khuẩn được xác định nhờ máy đo OD (bước sóng 620 nm) sau các khoảng thời gian 24 giờ, 48 giờ, 72 giờ, 96 giờ và 120 giờ [1].

Kết quả và thảo luận

Phân lập vi khuẩn nitrat hóa

Từ các mẫu nước thải được thu thập, 4 dòng vi sinh vật đã được phân lập, trong đó có 2

dòng có khả năng phát triển được trên môi trường Winogradsky I và 2 dòng có khả năng phát triển trên môi trường Winogradsky II. Các dòng vi khuẩn tiếp tục được nghiên cứu xác định khả năng phân giải nitơ và các điều kiện sinh trưởng khác.



Hình 1. Các dòng vi khuẩn được phân lập trên môi trường Winogradsky

- Tuyển chọn dòng có hoạt tính oxy hóa amon thành nitrit

Các dòng vi khuẩn phân lập trên môi trường Winogradsky I được ký hiệu là A1, A2. Tiến hành thử khả năng nitrit hóa của từng dòng bằng phương pháp thử nhanh với thuốc thử Griess. Khi mọc trên môi trường Winogradsky I, khuẩn lạc của dòng nào cho phản ứng dương tính với thuốc thử Griess thể hiện khả năng oxy hóa amon để tạo thành nitrit [2].

Kết quả thu được cho thấy trong 2 dòng phân lập được trên môi trường Winogradsky I, thuốc thử thể hiện màu rõ rệt với dòng A2, dòng A1 phản ứng yếu với thuốc thử Griess mặc dù sinh trưởng được trên môi trường chọn lọc Winogradsky I. Mẫu nước cất được được sử dụng làm đối chứng trong thí nghiệm.



Hình 2. Thử nghiệm thuốc thử Griess nhằm đánh giá khả năng nitrit hóa của các dòng vi khuẩn (bên phải) và so sánh với mẫu nước cất (bên trái)

- *Tuyển chọn dòng có hoạt tính oxy hóa nitrit thành nitrat*

Các dòng vi khuẩn phân lập trên môi trường Winogradsky II được kí hiệu là B1, B2. Tiến hành thử khả năng nitrat hóa của từng dòng bằng phương pháp thử nhanh với thuốc thử Griess.

Kết quả cho thấy cả 2 dòng vi khuẩn phân lập trên môi trường Winogradsky II đều có phản ứng dương tính với thuốc thử Griess, tuy nhiên màu thuốc thử thể hiện ở dòng B2 nhạt hơn rõ rệt so với dòng B1. Điều này cho thấy dòng B2 này có khả năng oxy hóa nitrit thành nitrat cao hơn. Mẫu nước cất cũng được sử dụng làm đối chứng trong thí nghiệm.



Hình 3. Thử nghiệm thuốc thử Griess nhằm đánh giá khả năng nitrat hóa của các dòng vi khuẩn (bên phải) và so sánh với mẫu nước cất (bên trái)

Từ các kết quả trên, hai dòng vi khuẩn A2 và B2 được lựa chọn để nghiên cứu các điều kiện sinh trưởng trong các thí nghiệm tiếp theo.

Ảnh hưởng của pH đến sinh trưởng của các dòng vi khuẩn nitrat hóa

pH của môi trường ảnh hưởng trực tiếp đến sự phát triển của vi khuẩn nitrat hóa. pH môi trường quá cao dẫn đến việc tạo một lượng NH_3 trong môi trường và làm ức chế sự phát triển của vi khuẩn oxy hóa amon và nitrit. Đồng thời, pH quá thấp dẫn đến việc ức chế sự phát triển của vi khuẩn nitrat hóa.

Kết quả nghiên cứu ở bảng 1 cho thấy dòng A2 phát triển tốt nhất ở khoảng pH 8, giá trị OD ở bước sóng 620 nm đạt cực đại 0,37 sau 72 giờ nuôi cấy. Sự phát triển của A2 bị giảm rõ rệt khi pH thay đổi. Ở pH 6, pH 7, pH 9, giá trị OD ở bước sóng 620 nm cực đại dao động trong khoảng 0,25 đến 0,27 sau 96 giờ nuôi cấy chứng tỏ khả năng sinh trưởng của vi khuẩn diễn ra chậm hơn so với ở pH 8.

Tương tự dòng A2, ở pH 8 sự phát triển của B2 đạt giá trị cao nhất. Giá trị OD ở bước sóng 620 nm đo được là 0,36 sau 72h nuôi cấy. Khi tăng pH lên 9 hay giảm xuống dưới 8 thì giá trị OD ở bước sóng 620 nm giảm, đạt cực đại trong khoảng 0,22 đến 0,30 sau 72 đến 96 giờ nuôi cấy. Do đó, pH 8 là phù hợp cho sự phát triển của cả hai dòng vi khuẩn trong thí nghiệm (bảng 2).

Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự sinh trưởng của các dòng vi khuẩn nitrat hóa

Nhiệt độ là yếu tố ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng hoạt động của vi sinh vật. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự phát triển của dòng A2 được thể hiện trong bảng 3.

Bảng 1. Ảnh hưởng của pH đến sự phát triển của dòng A2

Thời gian (h)	0	24	48	72	96	120	
Mật độ ($\text{OD}_{620\text{nm}}$)	pH=6	0,05	0,08	0,14	0,18	0,25	0,22
	pH=7	0,05	0,09	0,17	0,29	0,27	0,24
	pH=8	0,05	0,07	0,29	0,37	0,33	0,32
	pH=9	0,05	0,08	0,15	0,26	0,24	0,20

Bảng 2. Ảnh hưởng của pH đến sự phát triển của dòng B2

Thời gian (h)	0	24	48	72	96	120	
Mật độ ($\text{OD}_{620\text{nm}}$)	pH=6	0,05	0,09	0,13	0,18	0,22	0,18
	pH=7	0,05	0,09	0,17	0,30	0,28	0,23
	pH=8	0,05	0,08	0,25	0,36	0,34	0,32
	pH=9	0,05	0,08	0,15	0,26	0,24	0,20

Bảng 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ môi trường nuôi cấy đến dòng A2

Thời gian (h)	0	24	48	72	96	120	
Mật độ (OD _{620nm})	20°C	0,05	0,12	0,19	0,18	0,16	0,14
	30°C	0,05	0,24	0,37	0,35	0,27	0,24
	40°C	0,05	0,16	0,20	0,18	0,17	0,15
	50°C	0,05	0,10	0,14	0,12	0,105	0,11

Bảng 4. Ảnh hưởng của nhiệt độ môi trường đến nuôi cấy dòng B2

Thời gian (h)	0	24	48	72	96	120	
Mật độ (OD _{620nm})	20°C	0,05	0,08	0,12	0,20	0,18	0,15
	30°C	0,05	0,15	0,30	0,38	0,37	0,33
	40°C	0,05	0,12	0,27	0,34	0,33	0,31
	50°C	0,05	0,07	0,10	0,15	0,14	0,13

Dòng A2 phát triển tốt nhất ở nhiệt độ khoảng 30°C, giá trị OD ở bước sóng 620 nm đạt cực đại 0,37 sau 48 giờ nuôi cấy. Sự phát triển của A2 bị giảm rõ rệt khi nhiệt độ thay đổi. Ở 20°C, 40°C và 50°C, dòng A2 phát triển chậm và giá trị OD ở bước sóng 620 nm cực đại lần lượt là 0,19; 0,20 và 0,14 sau 48 giờ nuôi cấy. Ở khoảng nhiệt độ 50°C dòng A2 phát triển kém nhất.

Kết quả ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự phát triển của dòng vi khuẩn B2 được thể hiện trong bảng 4.

Dòng B2 phát triển chậm hơn so với dòng A2 và phát triển tốt nhất ở 30°C. Giá trị OD ở bước sóng 620nm cực đại sau 72 giờ nuôi cấy là 0,38. Ở 40°C, giá trị OD ở bước sóng 620 nm cực đại giảm xuống so với ở 30°C, đạt 0,34. Khi nhiệt độ tăng lên 50°C hay giảm xuống 20°C sự phát triển của B2 giảm đi rõ rệt và giá trị OD ở bước sóng 620nm cao nhất đạt 0,20 và 0,15. Kết quả thí nghiệm phù hợp với các công trình nghiên cứu khác về hoạt động của vi khuẩn nitrat hóa của các tác giả Trần Liên Hà và cs. (2007) [1] hay Hoàng Thị Yến và cs. (2008) [2] nhằm xác định các điều kiện sinh trưởng của chủng vi khuẩn phân giải nitơ.

KẾT LUẬN

Bốn dòng vi khuẩn phân giải nitơ đã được phân lập, trong đó có 2 dòng nitrit hóa (A1,

A2) và 2 dòng nitrat hóa (B1; B2). Điều kiện tối ưu cho sự sinh trưởng và phát triển dòng nitrat hóa A2 và B2 là pH = 8, nhiệt độ là 30°C. Đặc điểm hình thái, đặc tính sinh hóa và điều kiện sinh trưởng của các dòng tương tự như vi khuẩn thuộc các chi *Nitrosomonas* và *Nitrobacter* là các chi vi khuẩn nitrat hóa điển hình. Việc phân lập và xác định các điều kiện hoạt động tối ưu của các dòng vi khuẩn phân giải nitơ là cơ sở xây dựng quy trình phục hồi sinh học trong việc xử lý nitơ trong nước thải.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Trần Liên Hà, Phạm Tuấn Anh, Nguyễn Thị Thanh (2007), "Phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn nitrat hóa để ứng dụng trong xử lý nước hồ ô nhiễm", *Tạp chí Khoa học và Công nghệ - Đại học Đà Nẵng*, tập 45, số 3, tr. 95-100.
2. Hoàng Thị Yến, Trần Văn Nhị, Đỗ Thị Liên (2008), "Nghiên cứu xây dựng kỹ thuật khử Nitơ liên kết trong nước ăn uống", *Tạp chí Khoa học và Công nghệ - Đại học Quốc gia Hà Nội*, tập 46, số 4, tr. 73-81.
3. Alfred Brown and Heidi Smith (2015), "Benson's Microbiological Applications 13th", *McGraw-Hill Education Publisher*, pp. 125-163
4. Krueger C. L. and Sheikh W. (1986), "A New Selective Medium for Isolating *Pseudomonas* spp. from Water", *Applied and Environmental Microbiology*, Apr. pp. 895-897
5. Odokumaand L.O., Akponah E. (2008), "Response of *Nitrosomonas*, *Nitrobacter* and *Escherichia coli* to drilling fluids", *Journal of Cell and Animal Biology* Vol. 2 (2), pp. 043-054

SUMMARY
TESTING CONDITIONS FOR THE GROWTH OF NITRIFYING
BACTERIA ISOLATED AT UNIVERSITY OF AGRICULTURE AND FORESTRY –
THAI NGUYEN UNIVERSITY

Phạm Thị Mỹ*, Hoàng Thị Mai, Vi Dai Lam, Duong Manh Cuong
University of Agriculture and Forestry – TNU

The nitrogen redundancy in wastewater is one of reasons causing harmful effects to water environment, threatening the sustainable development and diversity of aquatic communities. The clean-up of nitrogen in wastewater occurs in nature by the combination of two processes – nitrification and denitrification. Nitrification is the transformation of nitrogen compound to nitrate, the process converting nitrite to nitrogen is called denitrification. The aim of this research was to isolate some microorganism strains with nitrification ability in some pollutant areas at University of Agriculture and Forestry - Thai Nguyen University using Winogradsky medium. Four bacteria strains showing nitrification ability were isolated. Optimal pH and temperature for growth of those strains were 8 and 30°C, respectively. Morphology and biochemical activities shown that selected strains might belong to genera *Nitrosomonas* and *Nitrobacter*. More researches need to be carried out to identify species taxonomy and establish the bioremediation process for removing nitrogen in wastewater.

Keywords: *Nitrification bacteria, Winogradsky, Bioremediation, Nitrobacter, Nitrosomonas*

Ngày nhận bài: 23/02/2017; Ngày phản biên: 07/3/2017, Ngày duyệt đăng: 27/4/2017

* Tel: 0988335869; Email: Phammy249@gmail.com