



KHẢ NĂNG NITRIT HÓA AMONI CỦA CHỦNG VI KHUẨN *PSEUDOMOONAS AERUGINOSA* HT1 PHÂN LẬP TỪ NƯỚC THẢI SAU BIOGAS CỦA TRANG TRẠI CHĂN NUÔI LỢN Ở HÀ TĨNH

Nguyễn Hữu Đồng¹, Nguyễn Thị Việt², Đinh Thị Thu Hằng³, Phan Đỗ Hùng⁴,
Nguyễn Quang Lịch⁵, Trần Hòa Duân^{2*}

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

² Trường Cao Đẳng Công nghiệp Huế, 70 Nguyễn Huệ, 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, Nghĩa Đô, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

⁴ Viện Công nghệ Môi trường – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam
18 Hoàng Quốc Việt, Nghĩa Đô, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

⁵ Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế, 102 Phùng Hưng, Huế, Việt Nam

Tóm tắt: Vi khuẩn oxi hóa amoni có một vai trò quan trọng trong chuyển hóa amoni thành nitrit tạo điều kiện cho quá trình nitrat hóa và phân nitrat diễn ra trong công nghệ xử lý nước thải. Mục đích của nghiên cứu này là phân lập các chủng vi khuẩn có khả năng nitrit hóa amoni từ nước thải chăn nuôi lợn sử dụng phương pháp dây ống nghiệm pha loãng và định danh vi khuẩn bằng phương pháp sinh học phân tử. Sự chuyển hóa amoni trong các thử nghiệm được phân tích theo phương pháp quang phổ. Trong nghiên cứu này, chủng *Pseudomonas aeruginosa* HT1 được phân lập từ nước thải sau biogas của trang trại chăn nuôi lợn tập trung tại Hà Tĩnh có khả năng chuyển hóa amoni với nồng độ lên đến 545 mg/L. Tuy nhiên, chủng vi khuẩn này chuyển hóa amoni với nồng độ tối ưu là từ 50 mg/L trở xuống và nồng độ này được chuyển hóa hoàn toàn sau 4 ngày nuôi cấy. Sự chuyển hóa amoni của chủng *Pseudomonas aeruginosa* HT1 diễn ra trong cả điều kiện nuôi cấy có nồng độ oxy từ 0,1 đến 7,0 mg/L. Hoạt động chuyển hóa amoni bởi chủng vi khuẩn này vẫn diễn ra trong môi trường muối mặn 3%. Chủng *Pseudomonas aeruginosa* HT1 có khả năng sinh trưởng trong môi trường có pH từ 6,0 đến 8,0 và thuộc nhóm vi khuẩn ưa ấm với nhiệt độ phát triển tốt nhất trong khoảng 30-37 °C.

Từ khóa: *Pseudomonas aeruginosa*; nitrit hóa; vi khuẩn oxi hóa amoni

1 Đặt vấn đề

Amoni có công thức hóa học là NH_3 , là một chất khí không màu và có mùi khai. Trong nước, amoni tồn tại ở hai dạng là NH_3 và NH_4^+ và cũng là một trong những thành phần quan trọng của chỉ số nitơ trong nước thải. Việc xử lý amoni trong môi trường thường diễn ra theo ba quá trình. Quá trình oxi hóa amoni hay còn gọi là quá trình nitrit hóa $\text{NH}_4^+ + 3/2\text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_2^- + 2\text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}$, tiếp đến là quá trình nitrat hóa $\text{NO}_2^- + 1/2\text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_3^-$ và cuối cùng là quá trình phân

* Liên hệ: tranhoadian@yahoo.com

Nhận bài: 06-6-2019; Hoàn thành phản biện: 13-6-2019; Ngày nhận đăng: 14-8-2019

nitrat hóa để chuyển hóa nitrat thành nitơ tự do thoát vào không khí $2\text{NO}_3^- + 10\text{e}^- + 12\text{H}^+ \rightarrow \text{N}_2 + 6\text{H}_2\text{O}$. Quá trình nitrit hóa là một bước quan trọng trong xử lý amoni và thường do các chủng vi khuẩn *Nitrosomonas* chịu trách nhiệm [10, 13, 16–18]. Tuy nhiên, nhiều công bố đã khẳng định rằng có nhiều nhóm vi sinh vật chịu trách nhiệm oxy hóa amoni tồn tại trong tự nhiên và phân bố rất rộng rãi trong môi trường đất và nước [2, 7, 15] và cũng như trong các hệ thống xử lý nước thải do con người tạo ra [1, 14]. Thêm vào đó, các nghiên cứu cũng chỉ ra rằng vi khuẩn nitrit hóa có khả năng tồn tại trong một số môi trường khắc nghiệt như đất nhiễm axit [6, 12], trong quặng chứa nhiều sunfua [2] và trong môi trường nhiệt độ cao [8].

Vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* là trực khuẩn Gram âm, có khả năng gây bệnh phổ biến đối với người và động vật. Chúng tồn tại đa dạng trong các môi trường khác nhau như trong đất, nước, trên cơ thể động vật và con người. Ngoài ra, chúng có khả năng tồn tại trong các điều kiện sống khác nhau pH, nhiệt độ, dinh dưỡng và mức độ hiếu khí. Vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* được khẳng định có khả năng tham gia cả quá trình nitrat hóa ($\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$) và quá trình phân nitrat ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{N}_2$) [3–5, 9]. Tuy nhiên, theo hiểu biết của nhóm nghiên cứu thì chưa có một công bố nào trên thế giới cũng như ở Việt Nam về khả năng oxy hóa amoni của vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa*. Do đó, mục tiêu của nghiên cứu này là phân lập các chủng vi khuẩn có khả năng chuyển hóa amoni mà trong đó tập trung phân lập các chủng vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* và thử nghiệm khả năng chuyển hóa amoni của chúng. Có thể nói rằng đây là một nghiên cứu đầu tiên về khả năng oxy hóa amoni của loại vi khuẩn này ở Việt Nam.

2 Vật liệu và phương pháp

2.1 Vật liệu

Ba mẫu nước ở ba vị trí khác nhau được thu từ nguồn nước thải sau biogas của hồ sinh học thứ nhất ngay sau hầm biogas của trang trại chăn nuôi lợn ở xã Kỳ Đông – huyện Kỳ Anh – tỉnh Hà Tĩnh. Mẫu được thu với thể tích 4 lít và chứa trong bình nhựa vô trùng chuyên dụng có thể tích 5 lít. Mẫu được bảo quản trong hộp xốp cách nhiệt chứa đá khô và đưa về phòng thí nghiệm.

2.2 Hóa chất

Tất cả các hóa chất được sử dụng cho nghiên cứu này bao gồm MgCl_2 ; NaCl ; K_2PO_4 ; CaCO_3 ; FeCl_3 ; Na_2COONa ; NaHCO_3 được cung cấp bởi công ty Merck - CHLB Đức và thạch có nhiệt độ nóng chảy thấp được mua từ hãng Lonza – Mỹ. Tất cả hóa chất có độ tinh khiết từ 99.0–99.9% sử dụng cho các phép phân tích và phòng thí nghiệm.

2.3 Phương pháp

Nuôi cấy và phân lập vi khuẩn

Mẫu được pha loãng dãy liên tục bằng cách lấy 5 mL mẫu pha loãng trong 45 mL nước cất vô trùng, lắc đều và sau đó 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 (gram/L) $MgCl_2$: 0,5 g; NaCl: 1,0 g; K_2PO_4 : 1,0 g; $CaCO_3$: 1,0 g; $FeCl_3$: 0,02 g; Na_2COONa : 1,0 g; $NaHCO_3$: 1,0 g; nước cất vừa đủ 1 lít; pH = $7,2 \pm 0,2$ và 2 mL thạch có nhiệt độ nóng chảy thấp 2%. Các ống nghiệm được nuôi ở nhiệt độ 37 °C và quan sát sự hình thành của khuẩn lạc đồng thời kiểm tra sự chuyển hóa của amoni bằng phản ứng định tính dùng thuốc thử Nessler sau thời gian nuôi cấy 5 ngày với định kỳ kiểm tra 1 ngày một lần. 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. Chỉ có những ống nghiệm cho kết quả dương tính với thuốc thử ở bất kỳ mức độ nào sẽ được lựa chọn tiếp tục cho việc phân lập vi khuẩn. Các khuẩn lạc vi khuẩn 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. Kiểm tra sự chuyển hóa amoni của các khuẩn lạc trong suốt quá trình 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.

Thử nghiệm xác định các đặc tính nuôi cấy của chủng vi khuẩn vi khuẩn phân lập được

Chủng vi khuẩn phân lập được được khảo sát các điều kiện nuôi cấy khác nhau

+ Ảnh hưởng của pH: Sự sinh trưởng, phát triển và khả năng chuyển hóa amoni của chủng vi khuẩn phân lập được khảo sát trên môi trường nuôi cấy có các mức pH là 5,0; 6,0; 7,0; 8,0 và 8,5.

+ Ảnh hưởng của nhiệt độ: Các mức nhiệt độ 5 °C; 30 °C; 37 °C; 45 °C và 50 °C được khảo sát cho khả năng sinh trưởng, phát triển và khả năng chuyển hóa amoni của chủng vi khuẩn phân lập.

+ Khảo sát sự ảnh hưởng của nồng độ oxy hòa tan (DO): Các nồng độ DO khác nhau của môi trường nuôi cấy 0,1; 3,0; 4,5 và 7,0 mg/L được thiết lập để nuôi cấy vi khuẩn. Việc hạ thấp nồng độ DO trong môi trường được thực hiện bằng cách sục khí CO_2 vào môi trường nuôi cấy 10 phút trước khi hấp tiệt trùng môi trường và thêm TiCl 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.

Khảo sát khả năng sinh trưởng và chuyển hóa của amoni trong điều kiện môi trường khoáng có bổ sung NaCl với nồng độ 1,0%; 3,0% và 5,0%.

Khảo sát khả năng chuyển hóa amoni của chủng vi khuẩn phân lập được

Chủng vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* HT1 được thử nghiệm với các nồng độ amoni khác nhau cụ thể là 10; 50 và 545 mg/L trong môi trường khoáng. Kết quả của sự chuyển hóa amoni của chủng vi khuẩn HT1 được đo đo trên máy đo amoni của hãng MARTINI có thang đo 0,00–9,99 mg/L với sai số 0,01 mg/L theo phương pháp quang phổ 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 thử nghiệm trong nghiên cứu này đều tiến hành trong 3 bình nuôi cấy và kết quả là giá trị trung bình của bình nuôi cấy đó. Ngoài ra, các thí nghiệm đối chứng được tiến hành trong các bình môi trường chứa amoni nhưng không có chứa vi khuẩn hoặc chứa chủng vi khuẩn HT1 đã được khử trùng ở 121 °C, 1 atm trong 15 phút trước khi bổ sung vào môi trường.

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Phân lập và định danh vi khuẩn

Từ ba mẫu nước thải sau biogas của trang trại chăn nuôi lợn, một chủng vi khuẩn được phân lập trong các ống nghiệm chứa môi trường khoáng trong điều kiện hiếu khí và nhuộm Gram cho kết quả Gram âm (Hình 1). Kết quả định danh vi khuẩn khi so sánh trình tự 16S rDNA của chủng vi khuẩn phân lập được với ngân hàng dữ liệu NCBI với chương trình BLAST đã xác định chủng vi khuẩn phân lập được thuộc *Pseudomonas aeruginosa* với mức tương đồng 99,8% (Hình 2) và chủng này được đặt tên là *Pseudomonas aeruginosa* HT1.



Hình 1. Kết quả của sự hình thành khuẩn lạc trong ống nghiệm và nhuộm Gram của chủng vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* HT1

Kết quả giải trình tự 16S rDNA của chủng vi khuẩn phân lập được

CCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGAT
 GAAGGGAGCGTTGCTCCTGGATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTG
 CCTGGTAGTGGGGGATAACGTCCGGAAACGGGCGCTAATACCGCATAACGTCCTGAGGG
 AGAAAGTGGGGGATCTTCGGACCTCACGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTA
 GTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCGTAACGGTCTGAGAGGATGATC
 AGTCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAT
 ATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCG
 GATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGA
 CGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGC.

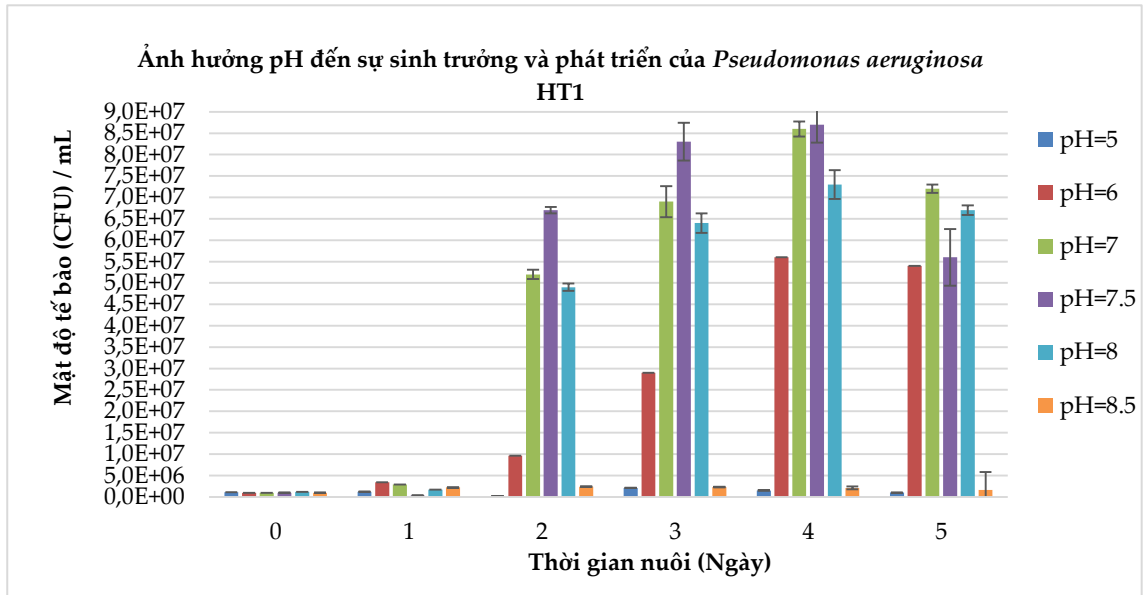
Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

	Descriptic	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Pseudomonas aeruginosa strain F8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	909	909	100%	0.0	99.80%	MK123308.1
<input type="checkbox"/>	Pseudomonas sp. strain ASA235 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	909	909	100%	0.0	99.80%	MH580294.1
<input type="checkbox"/>	Pseudomonas aeruginosa strain LCS1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	909	909	100%	0.0	99.80%	MK430420.1
<input type="checkbox"/>	Uncultured Pseudomonas sp. clone 034528_018 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	909	909	100%	0.0	99.80%	MK424366.1
<input type="checkbox"/>	Pseudomonas sp. strain DNM49 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	909	909	100%	0.0	99.80%	MK351590.1
<input type="checkbox"/>	Pseudomonas aeruginosa strain 12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	909	909	100%	0.0	99.80%	MH368439.2
<input type="checkbox"/>	Pseudomonas aeruginosa strain NAPH6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	909	909	100%	0.0	99.80%	MH388026.1
<input type="checkbox"/>	Pseudomonas aeruginosa strain FC11723 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	909	909	100%	0.0	99.80%	MH244221.1

Hình 2. Kết quả so sánh trình tự 16S rDNA của chủng vi khuẩn phân lập được với cơ sở dữ liệu NCBI

3.2 Ảnh hưởng của pH đến sự sinh trưởng, phát triển và khả năng chuyển hóa amoni của chủng *Pseudomonas aeruginosa* HT1

Kết quả nuôi cấy chủng vi khuẩn HT1 trên môi trường nuôi cấy có các mức pH là 5,0; 6,0; 7,0; 8,0 và 8,5 cho thấy chủng vi khuẩn này có khả năng phát triển trên môi trường có pH dao động từ 6,0 đến 8,0 (Hình 3).

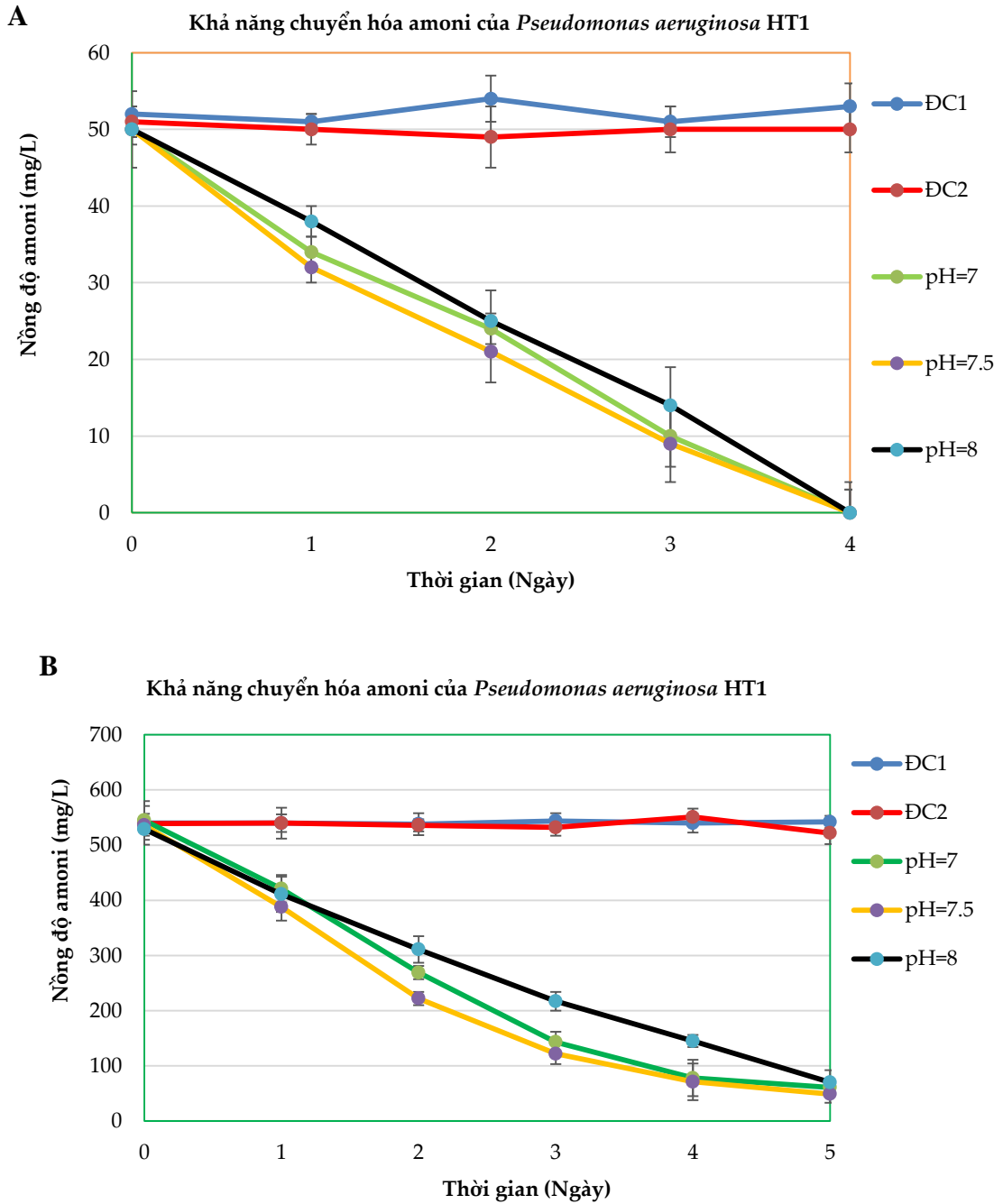


Hình 3. Ảnh hưởng của pH đến sự sinh trưởng và phát triển của chủng vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* HT1

Chủng vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* HT1 phát triển tốt nhất trên môi trường có pH từ 7,0–8,0 nên các môi trường có mức pH= 7,0; 7,5 và 8,0 được chọn để khảo sát khả năng chuyển hóa amoni của chủng vi khuẩn này với nồng độ amoni khảo sát lần lượt là 10, 50 và 545 mg/L. Kết quả cho thấy rằng chủng vi khuẩn HT1 đã chuyển hóa hoàn toàn amoni với nồng độ 10 mg/L sau 24 giờ nuôi cấy. Đối với các bình nuôi cấy có nồng độ amoni 50 và 545 mg/L thì 50% lượng amoni đã được chuyển hóa trong vòng 48 giờ đầu nuôi cấy và sau đó tốc độ chuyển hóa này diễn ra chậm lại. Các bình nuôi cấy có nồng độ 50 mg/L amoni ban đầu đã bị chuyển hóa hoàn toàn sau 4 ngày nuôi cấy trong khi đó amoni vẫn còn được phát hiện với nồng độ dao động từ 50 đến 70 mg/L sau 5 ngày nuôi cấy đối với các bình nuôi cấy chứa 545 mg/L ban đầu (Hình 4).

Sản phẩm của quá trình chuyển hóa amoni là nitrit. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này chúng tôi chỉ quan tâm đến sự chuyển hóa của amoni hơn là hàm lượng của nitrit được tạo ra. Quá trình chuyển hóa amoni không xảy ra trong các bình nuôi cấy đối chứng hoặc không bố

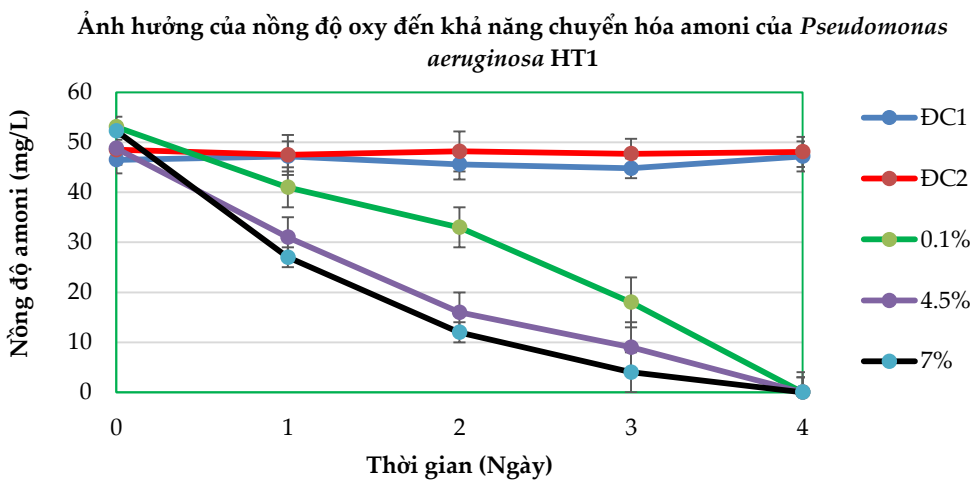
sung vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* HT1 (ĐC1) hoặc có bổ sung vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* HT1 (ĐC1) đã được hấp khử trùng trước khi cho vào môi trường (ĐC2).



Hình 4. Sự nitrit hóa của chủng vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* HT1 trong môi trường có bổ sung amoni với hàm lượng 50 mg/L (A) và 545 mg/L (B)

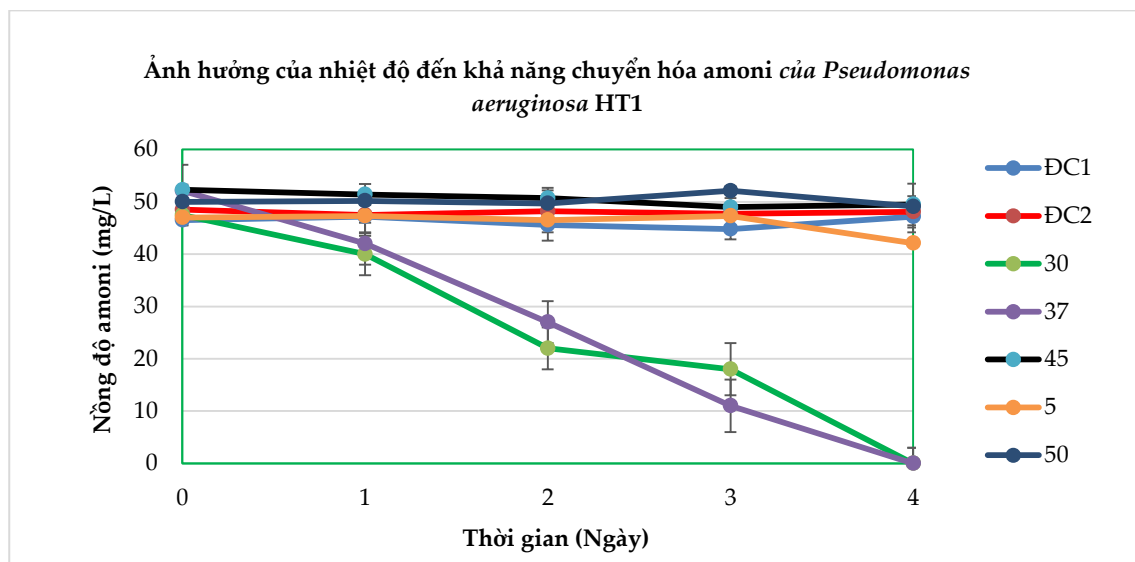
3.3 Ảnh hưởng của nồng độ oxy hòa tan (DO) và nhiệt độ đến sự sinh trưởng, phát triển và khả năng chuyển hóa amoni của chủng *Pseudomonas aeruginosa* HT1

Ba mức nồng độ oxy hòa tan là 0,1; 4,5 và 7,0 mg/L được khảo sát cho khả năng sinh trưởng và chuyển hóa amoni của chủng vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* HT1 trong môi trường có pH = 7,5, mức pH đã được chứng minh là có sự sinh trưởng và chuyển hóa amoni tốt nhất của chủng vi khuẩn này. Kết quả thử nghiệm cho thấy rằng chủng vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* HT1 có khả năng sinh trưởng, phát triển và oxy hóa amoni tốt trên môi trường có các mức oxy đã thử nghiệm ở trên (Hình 5).



Hình 5. Ảnh hưởng của nồng độ oxy đến khả năng nitrit hóa của chủng vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* HT1

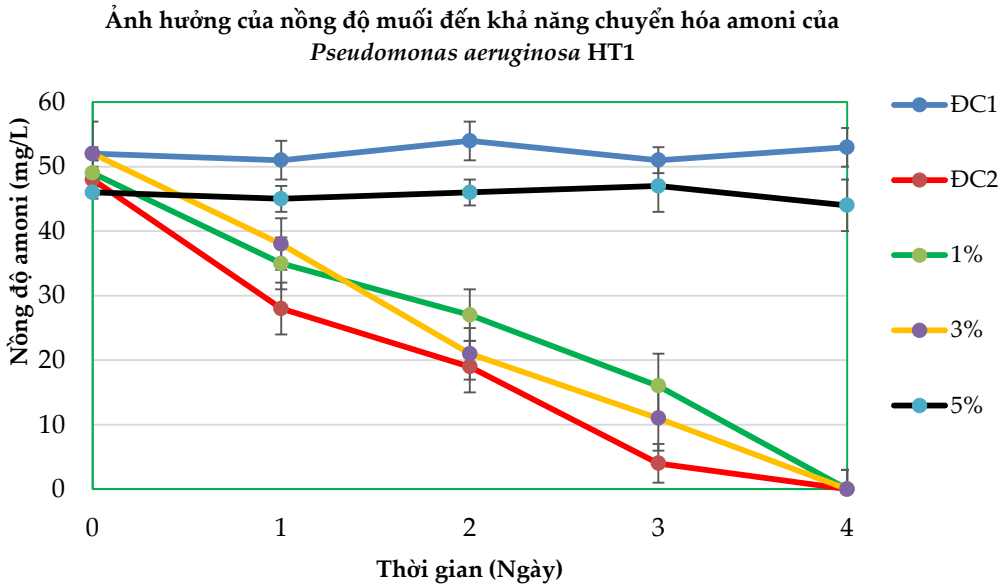
Ngoài ra, 5 mức nhiệt độ là 5 °C; 30 °C; 37 °C; ; 45 °C và 50 °C được thử nghiệm để khảo sát khả năng sinh trưởng và chuyển hóa amoni của chủng vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* HT1. Kết quả chỉ ra rằng chủng vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* HT1 là một chủng vi khuẩn ưa ấm (mesophile) với khoảng nhiệt độ phát triển ưa thích là 30–37 °C (Hình 6).



Hình 6. Ảnh hưởng của nhiệt độ muối đến khả năng nitrit hóa của chủng vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* HT1

3.4 Ảnh hưởng của nồng độ muối đến sự sinh trưởng, phát triển và khả năng chuyển hóa amoni của *Pseudomonas aeruginosa* HT1

Thí nghiệm được tiến hành trên môi trường khoáng có pH = 7,5 được bổ sung thêm muối NaCl với các nồng độ 1,0; 3,0 và 5,0%. Kết quả cho thấy rằng quá trình chuyển hóa amoni vẫn diễn ra trong môi trường có bổ sung muối đến 3,0% trong khi đó khả năng oxi hóa amoni của chủng vi khuẩn này bị mất đi trong môi trường bổ sung NaCl 5,0% (Hình 7).



Hình 7. Ảnh hưởng của nồng độ muối đến khả năng nitrit hóa của chủng vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* HT1

3.5 Thảo luận

Pseudomonas aeruginosa được biết đến là trực khuẩn mũ xanh thường gây bệnh cho người và động vật. Ngoài ra, chúng có khả năng sinh trưởng và phát triển trên môi trường khoáng, điều đó chứng tỏ loài vi khuẩn này có sự đa dạng về nguồn dinh dưỡng. Với khả năng chuyển hóa amoni của *Pseudomonas aeruginosa* HT1 đã chứng tỏ rằng mỗi vi sinh vật tồn tại trong tự nhiên thì bên cạnh mặt hại thì chúng đều có vai trò nhất định đối với môi trường. Hơn thế nữa, *Pseudomonas aeruginosa* trước đây đã chứng minh có khả năng chuyển hóa cả NO^{-2} và NO^{-3} [3], [4], [5], [9]. Điều này một lần nữa khẳng định vai trò của vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* đối với môi trường. Nghiên cứu cũng cho thấy rằng vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* HT1 có khả năng chuyển hóa amoni trong nước thải chăn nuôi ở nồng độ rất cao 545 mg/L, nhưng hiệu quả chuyển hóa tốt nhất khi nồng độ amoni nhỏ hơn 50mg/L ở nhiệt độ và pH phù hợp. Kết quả đó cho thấy chủng vi khuẩn này có tiềm năng trong việc chuyển hóa amoni trong nước thải chăn nuôi nói riêng và nước thải nói chung tạo điều kiện thuận lợi cho các quá trình nitrat hóa và phân nitrat. Hiện nay, một số nhóm vi khuẩn khác nhau được chứng minh là tham gia vào quá trình oxy hóa amoni [8], [11], [19]. Tuy nhiên, sự đa dạng của các loại vi khuẩn có khả năng oxy hóa amoni vẫn còn hạn chế đã khiến cho vi khuẩn *Nitrosomonas* vẫn được biết đến như là 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, sự chuyển hóa amoni bởi *Pseudomonas aeruginosa* HT1 này đã có ý nghĩa lớn trong việc làm tăng thêm sự đa dạng của các nhóm vi

khuẩn oxy hóa amoni trong môi trường. Thêm vào đó, công trình nghiên cứu này còn có ý nghĩa hơn khi đó là công bố đầu tiên về khả năng oxy hóa amoni của chủng vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* trên thế giới cũng như ở Việt Nam. Kết quả thử nghiệm đối chứng âm gồm các bình môi trường chứa amoni nhưng không được bổ sung dịch vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* HT1 hay đối chứng chứa môi trường có bổ sung dịch chế phẩm đã được hấp khử trùng hoàn toàn đã không cho thấy bất kỳ dấu hiệu nào của sự oxy hóa amoni. Điều đó chứng tỏ rằng sự oxy hóa amoni trong các bình nuôi cấy thử nghiệm là do chủng vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* HT1 trong dịch nuôi cấy bổ sung chịu trách nhiệm. Thử nghiệm về mức độ hiếu khí (nồng độ oxy hòa tan-DO) cho thấy chủng vi khuẩn có khả năng sinh trưởng, phát triển và oxy hóa amoni trong điều kiện oxy rất thấp 0,1 mg/L. Điều này chứng tỏ rằng chủng vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* HT1 có vai trò rất quan trọng trong quá trình oxy hóa amoni diễn ra trong tự nhiên, đặc biệt là trong các hồ xử lý sinh học là nơi thường có mức oxy thấp và sự phân bố của *Pseudomonas aeruginosa* trong môi trường là rất đa dạng và phổ biến.

4 Kết luận

Đã phân lập được chủng vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* HT1 có khả năng nitrit hóa amoni từ nước thải chăn nuôi lợn sử dụng phương pháp dây ống nghiệm pha loãng và định danh vi khuẩn bằng phương pháp sinh học phân tử. Chủng vi khuẩn này có khả năng chuyển hóa amoni với nồng độ lên đến 545 mg/L, nhưng nồng độ hoạt động tối ưu là dưới 50 mg/L. Sự chuyển hóa amoni diễn ra trong cả điều kiện nuôi cấy có nồng độ oxy thấp. Vi khuẩn 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. *Pseudomonas aeruginosa* HT1 là chủng vi khuẩn tiềm năng trong xử lý các loại nước thải hiện nay.

Lời cảm ơn

Nhóm nghiên cứu xin chân thành cảm ơn Trường Đại học Hà Tĩnh đã tài trợ cho nghiên cứu này theo hợp đồng tài trợ đề tài khoa học cấp trường số 06/2018/HĐKHCN và nhóm nghiên cứu của phòng công nghệ vi sinh thuộc trường Cao Đẳng Công Nghiệp Huế.

Tài liệu tham khảo

1. Abeliovich A, (1987), Nitrifying bacteria in wastewater reservoirs, *Applied and Environmental Microbiology*, 53, 54–760.
2. 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.
3. Chen F, Xia Q, Ju LK, (2003), Aerobic denitrification of *Pseudomonas aeruginosa* monitored by online NAD(P)H fluorescence, *Applied and Environmental Microbiology*, 69(11), 6715–6722.
4. Chen F, Xia Q, Ju LK, (2005), Competition between oxygen and nitrate respirations in continuous culture of *Pseudomonas aeruginosa* performing aerobic denitrification, *Biotechnology and Bioengineering*, 93(6), 1069–1078.
5. Davies KJP, Lloyd D, Boddy L, (1989), The Effect of Oxygen on Denitrification in *Paracoccus denitrificans* and *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of General Microbiology*, 135, 2445–2451.
6. De Boer W, Laanbroek HJ, (1989), Ureolytic nitrification at low pH by *Nitrospira* species, *Archives of Microbiology*, 152, 178–181.
7. 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.
8. Ehrich S, Behrens D, Lebedeva E, Ludwig W, Bock E, (1995), A new obligately chemolithoautotrophic, nitrite-oxidizing bacterium, *Nitrospira moscoviensis* sp. nov., and its phylogenetic relationship, *Archives of Microbiology*, 164, 16–23.
9. Fewson CA, Nicholas DJD, (1960), Nitrate reductase from *Pseudomonas aeruginosa*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 49, 335–349.
10. 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.
11. Kümmel A, Harms H, (1982), Effect of organic matter on growth and cell yield of ammonia-oxidizing bacteria, *Archives of Microbiology*, 133, 50–54.
12. 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.
13. 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.

14. 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.
15. Laanbroek HJ, Woldendorp JW, (1995), Activity of chemolithotrophic nitrifying bacteria under stress in natural soils, *Advances in Microbial Ecology*, 14, 275–304.
16. 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.
17. Shimaya C, Hashimoto T (2008), Improvement of media for thermophilic ammonia-oxidizing bacteria in compost. *Soil Science and Plant Nutrition*, 54, 529–533.
18. 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.
19. 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.

NITRIFICATION OF AMMONIUM BY *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* STRAIN HT1 ISOLATED FROM WASTEWATER AFTER BIOGAS TREATMENT OF AN INDUSTRIAL PIG FARM IN HA TINH PROVINCE

Nguyen Huu Dong¹, Nguyen Thi Viet², Dinh Thi Thu Hang³, Phan Do Hung⁴,
Nguyen Quang Lich⁵, Tran Hoa Duan^{2*}

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

² Hue Industrial College, 70 Nguyen Hue St., Hue, Vietnam

³ Graduate University of Science and Technology – Vietnam Academy of Science and Technology,
18 Hoang Quoc Viet St., Nghia Do, Cau Giay, Ha Noi, Vietnam

⁴ Institute of Environmental Technology – Vietnam Academy of Science and Technology,
18 Hoang Quoc Viet St., Nghia Do, Cau Giay, Ha Noi, Vietnam

⁵ University of Agriculture and Forestry, Hue University, 102 Phung Hung St., Hue, Vietnam

Abstract: Ammonia-oxidizing bacteria play an important role in converting ammonium to nitrite, giving a condition for the second phase of nitrification and denitrification occurring in wastewater treatment technology. This study isolates the ammonia-oxidizing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* strain HT1 from wastewater after biogas treatment of an industrial pig farm in Ha Tinh province by using the serial dilution method and bacterial identification by the molecular technique. The ammonium concentration was measured using the optical method. This bacterium can oxidize ammonium with a concentration of up to 545 mg/L. However, the optimal concentration of ammonium to be treated is lower than 50 mg/L and this concentration is completely removed after 4 days of incubation. This bacterium can oxidize ammonium in the medium containing the dissolved oxygen ranging from 0.1 to 7.0 mg/L. The activity of ammonium oxidation by this bacterial strain remains stable in the medium amended with 3% NaCl. *Pseudomonas aeruginosa* strain HT1 can grow in the medium with pH = 6.0-8.0, and it is a mesophilic bacterium growing optimally between 30 and 37 °C.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, ammonia-oxidizing bacteria, nitrification