

**ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC TỰ NHIÊN**

LÊ PHƯƠNG CHUNG

**NGHIÊN CỨU VI SINH VẬT HỌC CỦA QUÁ TRÌNH
FEAMMOX VÀ KHẢ NĂNG ỨNG DỤNG ĐỂ XỬ LÝ Ô
NHIỄM NITƠ TRONG NƯỚC THẢI**

Chuyên ngành: Vi sinh vật học

Mã số: 9420101.07

**DỰ THẢO
TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ**

Hà Nội – 2021

Công trình được hoàn thành tại: Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội.

Người hướng dẫn khoa học:

1. TS. Đinh Thúy Hằng; Đơn vị công tác: Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội.
2. PGS.TS. Phạm Thế Hải; Đơn vị công tác: Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội.

Phản biện:

.....

Phản biện:

.....

Phản biện:

.....

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng cấp Đại học Quốc gia chấm luận án tiến sĩ họp tại.....

vào hồi giờ ngày tháng năm 2021

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- Thư viện Quốc gia Việt Nam
- Trung tâm Thông tin - Thư viện, Đại học Quốc gia Hà Nội

MỞ ĐẦU

Trong môi trường nước, nitơ tồn tại dạng chủ yếu ở dạng ammoniac (NH_3), ammonium (NH_4^+), nitrite (NO_2^-) và nitrate (NO_3^-), nếu ở nồng độ cao sẽ trở thành nguồn ô nhiễm nguy hại cho hệ sinh thái nước và sức khỏe con người, do vậy cần phải được xử lý trước khi xả nước thải vào các thủy vực.

Loại NH_4^+ là khâu xử lý quan trọng trong các quy trình xử lý nước thải, được quan tâm nghiên cứu về nhiều phương diện, bao gồm cả cơ chế (vật lý, hóa học, sinh học) và công nghệ (thiết bị, điều kiện vận hành xử lý). Các biện pháp sinh học ứng dụng trong xử lý ô nhiễm, trong đó có việc loại NH_4^+ từ nước thải luôn được xem là mang lại hiệu quả tối ưu nhất bởi tính thân thiện môi trường, có chi phí thấp và hiệu quả bền vững.

Theo cách truyền thống, NH_4^+ trong nước thải được loại bằng hai bước (i) nitrate hóa (hiếu khí, tự dưỡng) và (ii) khử nitrate (kỵ khí, dị dưỡng). Quy trình này được áp dụng sau khi nước thải đã được loại carbon hữu cơ để giảm cạnh tranh của các vi sinh vật hiếu khí dị dưỡng với các vi khuẩn nitrate hóa. Tuy nhiên, ở bước tiếp theo, carbon hữu cơ lại cần thiết để khử nitrate, và trong thực tế nhu cầu này thường được đáp ứng bằng cách bổ sung methanol, do vậy làm tăng chi phí vận hành. Một cách tiếp cận khác để xử lý NH_4^+ là công nghệ nitrite hóa bán phần kết hợp với anammox, gồm hai bước, (i) oxy hóa một nửa NH_4^+ thành NO_2^- nhờ vi khuẩn oxy hóa ammonium (hiếu khí, tự dưỡng), và (ii) sau đó oxy hóa nửa NH_4^+ còn lại bằng NO_2^- thành N_2 nhờ vi khuẩn anammox (kỵ khí). Công nghệ này giúp giảm tới 60% chi phí năng lượng cho việc cấp oxy, tuy nhiên đòi hỏi quy trình vận hành có độ chính xác cao để đảm bảo tỷ lệ NH_4^+ và NO_2^- ở mức phù hợp cho phản ứng anammox diễn ra sau đó. Các

công nghệ xử lý ammonium hiện hành nêu trên có hiệu quả xử lý tốt, tuy nhiên có nhu cầu về năng lượng lớn (trong bước nitrate/nitrite hóa) và đòi hỏi tính ổn định cao của nước thải, cũng như tính chính xác trong quy trình vận hành, là những trở ngại khi triển khai thực tế. Do đó, việc nghiên cứu phát triển các quy trình công nghệ mới giúp giảm sự phụ thuộc vào oxy và thích hợp cho nhiều loại nước thải vẫn là vấn đề hấp dẫn các nhà khoa học.

Trong thập kỷ gần đây, một con đường trao đổi chất mới ở vi sinh vật là oxy hóa NH_4^+ kết hợp với khử Fe^{3+} trong điều kiện không có oxy, gọi tắt là feammox, đã được phát hiện và được chứng minh là đóng vai trò quan trọng trong chu trình chuyển hóa nitơ, góp phần đáng kể vào việc hoàn trả khí N_2 vào khí quyển. Quá trình feammox cũng bắt đầu được quan tâm nghiên cứu để đưa vào ứng dụng cho mục đích loại ammonium từ nước thải nhằm giảm tiêu tốn năng lượng trong quy trình xử lý. Tuy nhiên, cho đến nay các kết quả nghiên cứu đã công bố về quy trình công nghệ xử lý ammonium theo cơ chế feammox cũng như các vi sinh vật tham gia còn hạn chế và chưa có sự thống nhất. Do vậy feammox và các vi sinh vật có khả năng thực hiện hình thức dinh dưỡng này là đối tượng lý thú cho nghiên cứu cơ bản, cũng như nghiên cứu ứng dụng. Hiểu biết về các vi sinh vật feammox và các đặc tính sinh lý của chúng là cơ sở để phát triển các công nghệ xử lý mới để loại nitơ trong nước thải.

Đề tài ***“Nghiên cứu vi sinh vật học của quá trình feammox và khả năng ứng dụng để xử lý ô nhiễm nitơ trong môi trường”*** được đề xuất cho luận án tiến sỹ với mục tiêu nghiên cứu quá trình feammox trong mô hình xử lý nước thải có hàm lượng ammonium cao và xác định các vi sinh vật tham gia để làm cơ sở phát triển công nghệ.

Các nội dung nghiên cứu chính bao gồm:

1. Thiết kế mô hình feammox quy mô phòng thí nghiệm và làm giàu quần thể vi sinh vật feammox có hoạt tính ổn định.
2. Nghiên cứu thành phần quần thể vi sinh vật feammox đã thiết lập sử dụng các phương pháp PCR-DGGE, FISH và gen 16S rDNA làm marker phân tử.
3. Nghiên cứu mối liên quan giữa các yếu tố COD, NH_4^+ , thế oxy hóa khử tới quá trình feammox trong mô hình, làm cơ sở phát triển công nghệ xử lý NH_4^+ trong thực tế.

Tính mới của luận án:

Nghiên cứu đã thu được một số kết quả khoa học mới công bố lần đầu tiên, tóm tắt như sau:

1. Quá trình feammox đã được thiết lập trong mô hình phòng thí nghiệm ở điều kiện dị dưỡng và pH trung tính, cho phép chuyển hóa hoàn toàn NH_4^+ thành N_2 ; hệ vi sinh vật được hình thành ở điều kiện này do vi khuẩn thuộc lớp γ -Proteobacteria (gồm nhiều loài vi khuẩn kỵ khí tùy tiện khử Fe^{3+}) chiếm ưu thế.
2. Carbon hữu cơ được xác định đóng vai trò quan trọng trong quá trình feammox; tỷ lệ $[\text{COD}]/[\text{NH}_4^+] = 1,4$ là thích hợp nhất để quá trình chuyển hóa NH_4^+ thành N_2 ở điều kiện feammox diễn ra ổn định và hiệu quả, ngay cả khi nồng độ NH_4^+ rất cao là 200 mg/L.
3. Trên cơ sở các kết quả nghiên cứu về ảnh hưởng của carbon hữu cơ tới quá trình feammox trong mô hình thí nghiệm, việc xử lý đồng thời NH_4^+ (ở mức 50 mg/L) và COD (ở tỷ lệ $[\text{COD}]/[\text{NH}_4^+] = 1,4$) đã được thực hiện thành công trong mô hình theo chế độ vận hành liên tục với tốc độ dòng thải là 3 L/ngày, thời gian lưu 6 ngày, hiệu quả loại NH_4^+ và COD tương ứng đạt ~ 91% và 60%, nước thải sau xử lý đạt tiêu chuẩn A theo QCVN

40:2011/BTNMT. Nguyên lý feammox ở pH trung tính và điều kiện dị dưỡng cho phép oxy hóa hoàn toàn NH_4^+ thành N_2 trong một bước phản ứng, giúp đơn giản về quy trình công nghệ và giảm tiêu tốn năng lượng, đồng thời có thể áp dụng cho nhiều loại nước thải trong thực tế, khắc phục những hạn chế của công nghệ nitrate hóa/khử nitrate và nitrite hóa bán phần/anammox hiện hành.

Giới thiệu luận án:

Luận án gồm 109 trang (3 chương): Mở đầu 3 trang, chương 1 (Tổng quan tài liệu) 24 trang, chương 2 (Vật liệu và phương pháp nghiên cứu) 24 trang, chương 3 (Kết quả và thảo luận) 34 trang, kết luận và kiến nghị 3 trang, danh mục các công trình nghiên cứu của tác giả liên quan đến luận án 1 trang, tài liệu tham khảo 15 trang, phụ lục 3 trang. Luận án có 36 hình, 14 bảng, 125 tài liệu tham khảo (6 tài liệu tiếng Việt, 119 tài liệu tiếng Anh).

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. ẢNH HƯỞNG CỦA DƯ LƯỢNG NITƠ TRONG NƯỚC THẢI TỚI HỆ SINH THÁI

Các hợp chất nitơ trong nước khi tồn tại với hàm lượng lớn đều có khả năng ảnh hưởng tiêu cực đối với hệ sinh thái. Trong môi trường nước, NH_4^+ có mặt ở nồng độ quá cao sẽ dẫn đến hiện tượng phú dưỡng (eutrophication [Jonathan, Bess, 2002; Camargo, Alonso, 2006]). Ammoniac rất độc đối với các loài thủy sinh, có thể gây độc cho cá qua đường máu ở nồng độ 0,01 mg/L, gây độc cấp tính ở nồng độ 0,2 – 0,5 mg/L [Lương Đức Phẩm, 2008].

Nitrite gây ra chứng thiếu vitamin, thiếu máu, và có thể kết hợp với các amin để tạo thành các hợp chất nitrosamines gây tổn thương

di truyền tế bào, là một trong những nguyên nhân dẫn đến ung thư thực quản, ung thư dạ dày, ung thư ruột kết và các khối u khác [Lundberg *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2015; Bedale *et al.*, 2016].

1.2. VI SINH VẬT THAM GIA CHU TRÌNH NITƠ

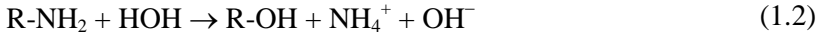
1.2.1. Cố định nitơ (nitrogen fixation)

Cố định nitơ sinh học là mắt xích đầu tiên, chuyển nitơ phân tử N_2 trong khí quyển thành ammonium (phản ứng 1.1). Vi sinh vật cố định nitơ có thể sinh trưởng tự do (như *Azospirillum* sp.) hoặc cộng sinh (như *Rhizobium* spp. trên cây họ đậu) [Bitton, 2005].



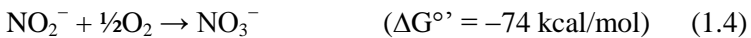
1.2.2. Khoáng hóa nitơ (Ammonification)

Khoáng hóa nitơ là quá trình phân giải các hợp chất nitơ hữu cơ (protein, nucleic acid) thành sản phẩm cuối cùng NH_4^+ (phản ứng 1.2) [Moir, 2011].



1.2.3. Nitrate hóa (Nitrification)

Nitrate hóa là quá trình oxy hóa NH_4^+ thành NO_3^- bởi các vi sinh vật, diễn ra theo hai bước (phản ứng 1.3 và 1.4) [Bitton, 2005]:



Bước oxy hóa NH_4^+ thành NO_2^- được thực hiện bởi vi khuẩn oxy hóa ammonium (Ammonium Oxidizing Bacteria – AOB), là nhóm hiếu khí tự dưỡng vô cơ (như *Nitrosomonas*, *Nitrosospira* ...). Trong bước tiếp theo, NO_2^- được chuyển hóa thành NO_3^- nhờ các vi khuẩn oxy hóa nitrite (Nitrite Oxidizing Bacteria – NOB) (như *Nitrobacter*, *Nitrospira*...) [Wolfe, Lieu, 2002; Moir, 2011].

1.2.4. Khử nitrate (Denitrification)

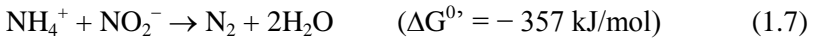
Khử NO_3^- là quá trình hô hấp kỵ khí trong đó NO_3^- đóng vai trò là chất nhận điện tử (phản ứng 1.6).



Khử NO_3^- diễn ra qua một chuỗi các chất trung gian (các oxit nito), cuối cùng thành N_2 [Takaya *et al.*, 2003].

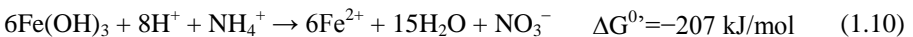
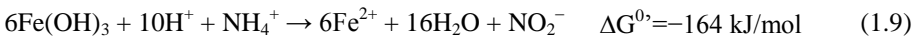
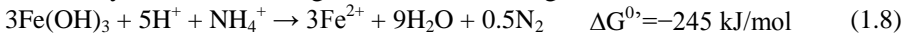
1.2.5. Anammox (Anaerobic Ammonium Oxidation)

Anammox là quá trình sinh học ở nhóm vi khuẩn *Planctomycetes* sinh trưởng tự dưỡng vô cơ (autolithotrophy), sử dụng CO_2 như là nguồn carbon duy nhất và nguồn năng lượng từ oxy hóa NH_4^+ bằng NO_2^- , tạo sản phẩm là N_2 (phản ứng 1.7) [Schmidt *et al.*, 2003].



1.2.6. Feammox (Anaerobic ammonium oxidation coupled to iron reduction)

Feammox là quá trình oxy hóa NH_4^+ ở điều kiện kỵ khí sử dụng Fe^{3+} làm chất nhận điện tử, diễn ra ở nhiều hệ sinh thái ngập nước. Phản ứng feammox có thể tạo ra các sản phẩm khác nhau như khí N_2 , NO_2^- hoặc NO_3^- tùy thuộc điều kiện môi trường, đặc biệt là pH [Sawayama, 2006; Yang *et al.*, 2012; Huang, Jaffé, 2015].



Phản ứng oxy hóa NH_4^+ thành N_2 có mức tích lũy năng lượng cao nhất và cũng diễn ra ở môi trường có pH trung tính và kiềm, trong khi đó hai phản ứng tạo ra NO_2^- hoặc NO_3^- chỉ xảy ra ở điều kiện pH thấp [Luther *et al.*, 1997; Clement *et al.*, 2005; Sawayama, 2006; Shrestha *et al.*, 2009].

1.3. LOẠI NITƠ TRONG NƯỚC THẢI BẰNG BIỆN PHÁP SINH HỌC

1.3.1. Các công nghệ hiện hành xử lý loại nitơ trong nước thải

1.3.1.1. Công nghệ xử lý NH_4^+ theo nguyên lý nitrate hóa/khử nitrate

Công nghệ nitrate hoá/khử nitrate gồm hai bước (i) nitrate hóa ($\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$) và (ii) khử nitrate ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{N}_2$) nhờ các vi khuẩn khử nitrate (NRB). Trong ứng dụng thực tế, quy trình này được tích hợp trong hệ thống xử lý nước thải sau khi carbon hữu cơ đã được loại trước đó, ví dụ như quy trình AAO. Công nghệ có nhược điểm là tiêu tốn năng lượng ở bước nitrate hóa và cần được bổ sung carbon hữu cơ (như methanol) ở bước khử nitrate.

1.3.1.2. Công nghệ xử lý loại ammonium trong nước thải theo nguyên lý nitrite hóa bán phần/anammox

Nguyên lý công nghệ gồm hai bước (i) oxy hóa 50% lượng NH_4^+ thành NO_2^- (hiếu khí) và (ii) oxy hóa 50% lượng NH_4^+ còn lại kết hợp khử NO_2^- (kỵ khí). Công nghệ cho phép tiết kiệm tới 60% chi phí năng lượng và lượng carbon cần bổ sung (so với bước khử nitrate) [Jetten *et al.*, 2002]. Nhược điểm của công nghệ là có thời gian khởi động dài, vẫn phụ thuộc vào oxy, và cần được kiểm soát chặt chẽ để có tỷ lệ $\text{NH}_4^+/\text{NO}_2^-$ cho phản ứng anammox. Quy trình công nghệ điển hình là SHARON.

1.3.2. Feammox và tiềm năng phát triển công nghệ mới cho xử lý NH_4^+ trong nước thải

Feammox là con đường trao đổi chất mới được phát hiện ở vi sinh vật, trong đó NH_4^+ được chuyển hóa ở điều kiện kỵ khí khử Fe^{3+} , hoàn toàn không phụ thuộc vào oxy. Một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng quá trình feammox ở điều kiện tự dưỡng và pH trung tính hoặc axit chuyển hóa NH_4^+ thành NO_2^- [Sawayama, 2006; Huang, Jaffé,

2015]. Theo đó, để loại nito hoàn toàn thì cần có các bước oxy hóa NO_2^- thành NO_3^- sau đó khử NO_3^- thành N_2 hoặc anammox.

Thông tin về các vi khuẩn feammox còn hạn chế, chủng thuần khiết duy nhất được công bố là *Acidimicrobiaceae* bacterium A6 có thể sinh trưởng nhờ oxy hóa NH_4^+ kết hợp khử Fe^{3+} tạo sản phẩm là NO_2^- ở điều kiện pH thấp (pH 5).

Nghiên cứu feammox ở điều kiện pH trung tính và có mặt carbon hữu cơ sẽ phù hợp với đặc tính của nhiều loại nước thải trong thực tế. Do vậy, khác với các nghiên cứu đã tiến hành trước đây, quá trình feammox trong nghiên cứu này được tiến hành ở điều kiện dị dưỡng và pH trung tính.

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG VÀ VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU

2.1.1. Đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu sử dụng mẫu bùn chứa sắt từ cụm xử lý kỵ khí trong hệ thống xử lý nước thải của nhà máy chế biến thủy sản (xã Tam Tân, huyện Củ Chi, TP. Hồ Chí Minh).

2.1.2. Hóa chất, thiết bị

Hóa chất do hãng Merck, Wako, BioBasic, Sigma, Fermentas, Bioneer cung cấp; các loại khí sử dụng (N_2 , N_2/CO_2 , Heli, H_2 , CO_2 , Argon) do hãng Messer (Việt Nam) cung cấp.

Nghiên cứu sử dụng các trang thiết bị tại các phòng thí nghiệm của Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, ĐH Quốc gia Hà Nội.

2.1.3. Các loại dung dịch và môi trường [Ratering, 1999]

Môi trường FRB: sử dụng trong các thí nghiệm làm giàu và nuôi cấy vi sinh vật feammox, pha nước thải nhân tạo

Môi trường ferrictrate (FC): sử dụng để phân lập, nuôi cấy vi khuẩn feammox, xác định mật độ vi khuẩn theo phương pháp MPN.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Các thí nghiệm trên mô hình

2.2.1.1. Thiết kế và chế tạo mô hình phòng thí nghiệm

Mô hình feammox phòng thí nghiệm được thiết kế mô phỏng theo hệ thống xử lý kỵ khí tại Củ Chi. Mô hình được chế tạo bằng nhựa mica không màu, độ dày 6 mm, gồm 3 bể nối tiếp kích thước 20 cm × 12 cm × 40 cm (dài × rộng × cao), tổng thể tích làm việc là 18 lít. Các bể có nắp đậy kín khí, được bố trí van thu mồi nước và mồi khí.

2.2.1.2. Làm giàu vi sinh vật feammox trong mô hình

Hệ vi sinh vật feammox được làm giàu trực tiếp trong mô hình bằng cách bơm tuần hoàn (2 mL/min, trong 30 ngày) dịch nước thải nhân tạo là môi trường FRB, bổ sung NH_4^+ (200 mg/L) và Na-acetate (250 mg/L). Kết quả làm giàu được đánh giá thông qua biến đổi của hàm lượng các chất có liên quan gồm NH_4^+ , COD, Fe^{2+} , NO_2^- , NO_3^- , N_2 trong các bể của mô hình.

2.2.1.3. Thí nghiệm vận hành mô hình theo mẻ

Kết thúc quá trình làm giàu, nước thải được rút ra và thay bằng nước thải nhân tạo với hàm lượng NH_4^+ là 200 mg/L và tỷ lệ $[\text{COD}]/[\text{NH}_4^+]$ khác nhau trong mỗi bể, tương ứng là 1,4; 1,1 và 0,7. Theo dõi và phân tích NH_4^+ , COD, NO_2^- , NO_3^- , N_2 , thế oxy hóa khử (RP) để đánh giá ảnh hưởng của COD tới hiệu quả xử lý trong mô hình trong thời gian 30 ngày.

2.2.1.4. Thí nghiệm vận hành mô hình theo chế độ liên tục

Nước thải nhân tạo có hàm lượng NH_4^+ ở mức 50 mg/L, hàm lượng COD 70 mg/L, phù hợp với tỷ lệ tối ưu đã được xác định từ thí nghiệm theo mẻ. Duy trì tốc độ bơm liên tục 2 L/ngày đêm, tương ứng thời gian lưu các bể 1, 2, 3 là 2, 4 và 6 ngày. Hiệu quả xử lý được đánh giá thông qua lượng NH_4^+ và COD được loại.

2.2.2. Các phương pháp phân tích hóa học

2.2.2.1. Phân tích COD hòa tan:

Sử dụng các ống phân tích COD của Hach, theo phương pháp của US.EPA 410.4.

2.2.2.2. Phân tích hàm lượng NH_4^+ :

Sử dụng phương pháp chuẩn DIN 38406-5 với thuốc thử N-nitroprusside [DIN-38406-5, 1983].

2.2.2.3. Phân tích hàm lượng Fe^{2+}

Sử dụng phương pháp chuẩn DIN 38406 E1-1 (1983) với thuốc thử O-phenanthrolin [DIN-38406-E1, 1983].

2.2.2.4. Phân tích hàm lượng nitrate và nitrite

Sử dụng Kit NitraVer® 5 Nitrate Reagent Powder Pillows (Hach) và Kit NitriVer® 3 Nitrite Reagent Powder Pillows (Hach).

2.2.2.5. Xác định thể oxy hóa khử

Xác định bằng dụng cụ đo gồm một điện cực tham khảo Ag/AgCl được nối với điện cực than chì thông qua Vol kế.

2.2.2.6. Xác định thể tích khí sinh ra

Thể tích khí sinh ra trong các bể bằng phương pháp cột nước [Lettinga, 1995].

2.2.2.7. Xác định hàm lượng N_2

Phân tích bằng sắc ký khí 7890A (Agilent) gắn đầu dò TCD, nhiệt độ đầu dò 250 °C, nhiệt độ buồng tra mẫu 100 °C, nhiệt độ lò 200 °C, tốc độ dòng khí mang argon 3 mL/phút.

2.2.3. Các phương pháp vi sinh vật học

2.2.3.1 Phân lập vi khuẩn feammox và đánh giá hoạt tính sinh học:

Phân lập vi sinh vật feammox bằng phương pháp cấy ống thạch bán lỏng (agar 1%) và môi trường FC [Ratering, 1999]. Tiến hành

đánh giá khả năng oxy hóa NH_4^+ , khả năng sinh trưởng trong điều kiện khử Fe^{3+} , khả năng khử nitrate của các vi khuẩn phân lập được.

2.2.3.2. Phương pháp MPN

Most Probable Number (MPN) là phương pháp xác định mật độ vi khuẩn sử dụng môi trường và điều kiện nuôi cấy đặc hiệu.

2.2.3.3. Phương pháp chụp kính hiển vi điện tử quét (SEM)

Mẫu bùn được cố định, sau đó chụp SEM và phân tích EDX tại Viện Khoa học và Công nghệ tiên tiến (AIST), Trường Đại học Bách Khoa Hà Nội.

2.2.4. Các phương pháp sinh học phân tử

2.2.4.1. Phương pháp tách DNA

Tách DNA tổng số từ mẫu bùn: theo phương pháp do Zhou và cs. mô tả với cải biến về nồng độ đệm phosphate [Zhou *et al.*, 1996].

Tách DNA từ chủng thuần khiết: theo phương pháp của Marmur mô tả [Marmur, 1961].

2.2.4.2. Phương pháp PCR và điện di biến tính (PCR-DGGE)

Vùng V3 - V5 của 16S rDNA được khuếch đại bằng cặp mồi GM5F (CCTACGGGAGGCAGCAG) và 907R (CCGTCAATTCCTTTRAGTTT) [Muyzer *et al.*, 1993].

PCR-DGGE được tiến hành trên gel polyacrylamide 6% với dải biến tính urea/formamid từ 30% đến 60%. Quá trình điện di được thực hiện bằng bộ điện di Dcode™ System (BioRad) trong đệm TAE, ở nhiệt độ 60 °C, tại 100 V, trong 16 giờ. Băng điện di được cắt, rửa và thổi trong nước qua đêm tại 4 °C, sau đó dùng làm khuôn để tạo sản phẩm PCR và giải trình tự.

2.2.4.3. Giải trình tự 16S rDNA và xác định vị trí phân loại:

Đoạn 16S rDNA (1500 bp) của vi khuẩn được khuếch đại bằng cặp mồi 27F (5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') và 1492R (5'- GGTTACCTGTTACGACTT-3') [Weisburg *et al.*, 1991].

Cây phân loại được dựng theo phương pháp neighbour-joining [Saitou, Nei, 1987], trong đó định dạng cây được tiến hành dựa trên 1000 phép so sánh đa chiều [Felsenstein, 1985].

2.2.4.4. Phương pháp lai huỳnh quang tại chỗ (FISH)

FISH được tiến hành với hai đầu dò GAM42a đặc hiệu cho γ -*Proteobacteria* (AAACGATGTGGGAAGGC) và đầu dò SRB385 đặc hiệu cho δ -*Proteobacteria* (CGGCGTCGCTGCGTCAGG), gắn chất huỳnh quang Cy3 [Schramm *et al.*, 1996; Amann *et al.*, 2001].

2.2.5. Các phương pháp xử lý số liệu

Các phép đo đạc, phân tích được thực hiện lặp lại 3 lần; kết quả được xử lý tính toán bằng phần mềm MS Excel 2010; đồ thị minh họa kết quả được vẽ bằng phần mềm Sigmaplot 14.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

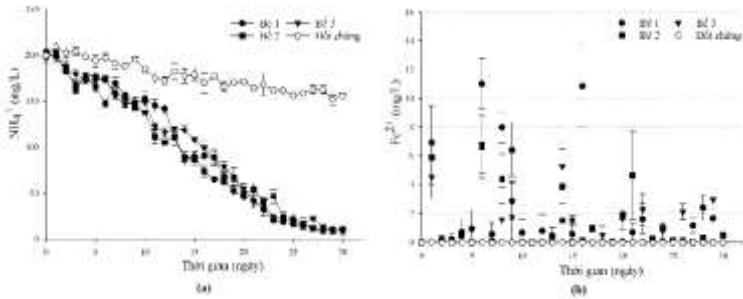
3.1. LÀM GIÀU HỆ VI SINH VẬT FEAMMOX TRONG MÔ HÌNH PHÒNG THÍ NGHIỆM

3.1.1. Quan sát vi sinh vật được làm giàu trong mô hình

Phân tích bùn trong mô hình bằng nhuộm DAPI và chụp SEM cho thấy hệ vi sinh vật đã được hình thành, tập trung ở đáy các bể, bám dính trên bề mặt giá thể nhựa và các hạt ferrihydrite.

3.1.2. Phân tích các chất tham gia phản ứng và sản phẩm của quá trình feamnox trong thời gian làm giàu ở mô hình

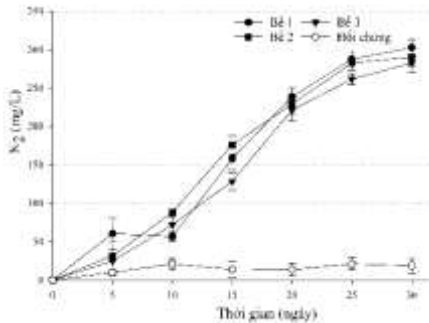
Trong suốt thời gian làm giàu, quá trình oxy hóa NH_4^+ diễn ra tích cực và đến ngày thứ 30 thì trong cả 3 bể chỉ còn lại là 8 – 10 mg/L (từ nồng độ ban đầu là 200 mg/L), hiệu suất đạt > 90% (Hình 3.3a).



Hình 3.3. Oxy hóa NH_4^+ (a) và sản sinh Fe^{2+} (b) trong các bể của mô hình PTN trong thời gian làm giàu vi sinh vật feammox

Đồng thời, một lượng Fe^{3+} đã được khử thành Fe^{2+} tích lũy trong môi trường (Hình 3.3b). Do tính phức tạp của điều kiện trong mô hình, Fe^{2+} sinh ra có thể tham gia vào một số quá trình như (i) kết tủa ở dạng muối carbonate hoặc (ii) oxy hóa ngược trở lại thành Fe^{3+} .

Kết quả phân tích sản phẩm chuyển hóa NH_4^+ cho thấy cả NO_2^- và NO_3^- đều không được tìm thấy trong các bể, chỉ có khí N_2 là sản phẩm duy nhất (Hình 3.4).



Hình 3.4. Hàm lượng N_2 trong các bể của mô hình trong quá trình làm giàu vi sinh vật feammox

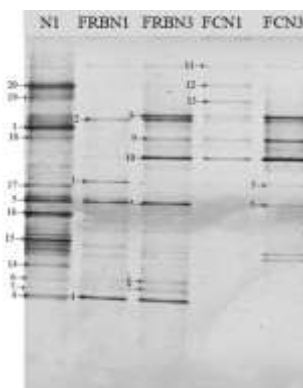
Hiệu quả oxy hóa NH_4^+ thấp trong mẫu đối chứng không bổ sung carbon hữu cơ (~ 20%) (Hình 3.3a), chứng tỏ COD có tác dụng kích

thích quá trình oxy hóa NH_4^+ ở điều kiện feammox thiết lập trong mô hình. Nghiên cứu feammox ở điều kiện tự dưỡng, pH thấp (pH 5,5) do Jaffe và cs. thực hiện cũng chỉ ra tốc độ oxy hóa NH_4^+ ở mức thấp là 9,8% sau 6 ngày và 64,5% sau 150 ngày [Huang, Jaffé, 2015]. Tương tự, feammox ở điều kiện tự dưỡng ở pH trung tính do Sawayama công bố (2006) cũng có tốc độ oxy hóa NH_4^+ ở mức thấp, đạt 20% sau 50 ngày [Sawayama, 2006].

3.2. NGHIÊN CỨU HỆ VSV ĐƯỢC LÀM GIÀU TRONG MÔ HÌNH

3.2.1. Phân tích thành phần của hệ VSV bằng PCR-DGGE

Kết quả phân tích PCR-DGGE cho thấy hệ VSV được làm giàu trong mô hình khá đa dạng (Hình 3.5).



Hình 3.1. Hình ảnh gel điện di biến tính đoạn gen 16S rDNA của hệ vi khuẩn trong mô hình feammox. Ký hiệu các mẫu: N1 – mẫu làm giàu ở bể 1; FRBN1, FRBN3 là mẫu cấy chuyển của N1 ở độ pha loãng 10^{-1} và 10^{-3} trong môi trường FRB; FCN1, FCN3 là mẫu cấy chuyển của N1 ở độ pha loãng 10^{-1} và 10^{-3} trong môi trường FC.

Tổng số 20 băng được phân tích, có 8 băng được giải trình tự thành công và đăng ký mã GenBank (Bảng 3.1). Một số nhóm vi khuẩn có tiềm năng liên quan đến các quá trình chuyển hóa sắt và nitơ như *Geobacter* sp., *Geoalkalibacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Alicyclophilus* sp. đã được xác định.

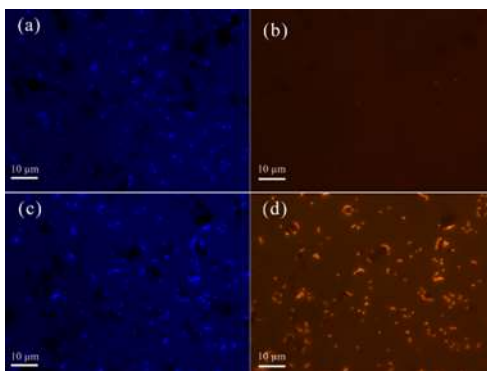
Bảng 3.1. Kết quả giải trình tự các băng điện di biến tính

STT băng	Chiều dài (bp)	Loài gần gũi (% tương đồng)	Mã GenBank
2	393	Uncultured iron-reducing bacterium HN-HFO6 (98,73%)	MN866007
4	423	<i>Geoalkalibacter</i> sp. EGB (99%)	MN866008
5	418	<i>Geobacter</i> sp. B4 (100%)	MN866009
6	431	<i>Geoalkalibacter</i> sp. (98,59%)	MN866010
10	318	uncultured bacterium (98,43%)	MN866011
14	382	uncultured bacterium AS-B17 (100%)	MN866012
11	453	<i>Pseudomonas</i> sp. (98%)	
18	448	<i>Alicyclophilus</i> sp. (98,7%)	

Geobacter là các vi khuẩn khử sắt điển hình thuộc lớp δ -*Proteobacteria*, kỵ khí bắt buộc; ngoài Fe^{3+} còn có thể khử một số kim loại khác như Mn^{4+} , U^{5+} [Lovley, 2004]. *Geoalkalibacter* spp. là các vi khuẩn khử Fe^{3+} ưa kiềm. Loài chuẩn *G. ferrihydriticus* có khả năng trao đổi chất rộng, sử dụng nhiều hợp chất hữu cơ đơn giản làm chất cho điện tử, chất nhận điện tử là Fe^{3+} , Mn^{4+} và S° [Zavarzina *et al.*, 2006]. *Pseudomonas* là một chi thuộc lớp γ -*Proteobacteria*, sinh trưởng dị dưỡng, có khả năng oxy hóa NH_4^+ dị dưỡng (hiếu khí), khử NO_3^- và khử Fe^{3+} khi không có mặt oxy [Silva *et al.*, 2020; Kumari *et al.*, 2015]. *Alicyclophilus* spp. là các vi khuẩn hiếu khí, thuộc lớp β -*Proteobacteria*, có khả năng oxy hóa NH_4^+ dị dưỡng (khi sinh trưởng hiếu khí) và khử NO_3^- khi không có mặt oxy [Klodowska *et al.*, 2018; Mechichi *et al.*, 2003].

3.2.2. Phân tích hệ VSV bằng lai huỳnh quang tại chỗ (FISH)

Phân tích kết quả FISH cho thấy các vi khuẩn trong mẫu bùn đa số thuộc lớp γ -*Proteobacteria* (Hình 3.6D) chiếm >90% tín hiệu nhuộm DAPI từ cùng một vi trường (Hình 3.6C). Trong khi đó, số lượng vi khuẩn δ -*Proteobacteria* rất thấp (Hình 3.6B), chỉ chiếm từ 2,64 – 9,66% tín hiệu nhuộm DAPI từ cùng một vi trường (Hình 3.6A).



Hình 3.6. Hình ảnh nhuộm DAPI (a, c) và tín hiệu lai với các đầu dò Delta385 đặc hiệu δ -proteobacteria (b), GAM42a đặc hiệu γ -proteobacteria (d) thực hiện trên mẫu bùn N1 chứa hệ vi khuẩn đã được làm giàu trong mô hình

Như vậy quá trình làm giàu vi khuẩn ở điều kiện feammox trong mô hình phòng thí nghiệm đã dẫn đến sự tích lũy của các vi khuẩn khử Fe^{3+} thuộc các lớp γ - và δ -*Proteobacteria*, trong đó các đại diện thuộc lớp γ -*Proteobacteria* chiếm ưu thế.

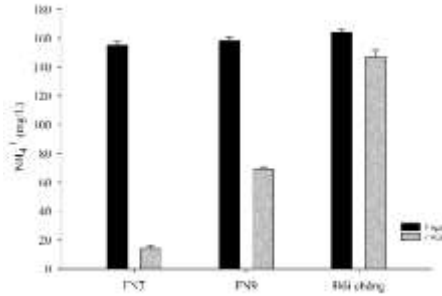
3.2.3. Phân lập vi khuẩn feammox từ mô hình

3.2.3.1. Phân lập và định danh vi khuẩn feammox

Từ mẫu bùn của mô hình, đã phân lập được 2 chủng vi khuẩn, ký hiệu là FN7 và FN9. Chủng FN7 có trình tự 16S rDNA tương đồng cao nhất là (99%) với loài *A. denitrificans*; chủng FN9 tương đồng cao nhất (99%) với loài *P. stutzeri*. Các trình tự 16S rDNA của chủng FN7 và FN9 hiện đã được lưu tại Genbank với mã số tương ứng là LC474369 và MT568614.

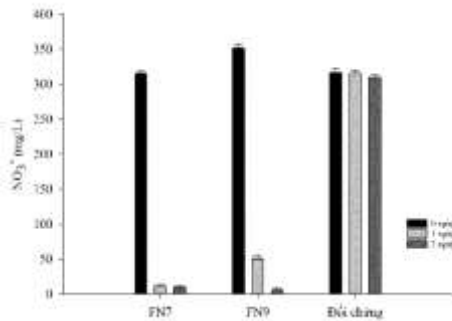
3.2.3.2. Đánh giá hoạt tính sinh học của các chủng phân lập

Khả năng oxy hóa NH_4^+ : hai chủng FN7 và FN9 oxy hóa NH_4^+ ở mức cao sử dụng oxy làm chất nhận điện tử (oxy hóa NH_4^+ dị dưỡng) (Hình 3.9). Cả hai chủng đều không oxy hóa NH_4^+ ở điều kiện kỵ khí có Fe^{3+} là chất nhận điện tử.



Hình 3.9. Oxy hóa NH_4^+ bởi chủng FN7 và FN9 trong điều kiện hiếu khí (dị dưỡng)

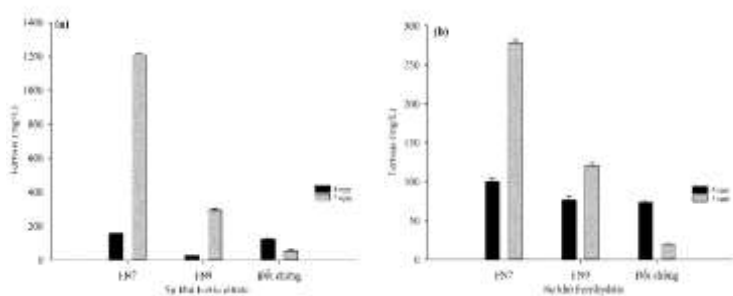
Khả năng khử NO_3^- : Trong điều kiện kỵ khí, các chủng FN7 và FN9 đều thể hiện khả năng khử NO_3^- sử dụng nguồn điện tử từ carbon hữu cơ (Na-acetate) để thu năng lượng (Hình 3.10).



Hình 3.10. Khả năng khử NO_3^- của chủng FN7 và FN9

Khả năng khử Fe^{3+} : cả hai chủng FN7 và FN9 đều khử Fe^{3+} khi Na-acetate là nguồn điện tử (Hình 3.11), không phân biệt nguồn Fe^{3+} ở dạng Fe-citrate hay ferrihydrite. Khả năng khử Fe^{3+} của vi khuẩn *Pseudomonas* spp. và một vài chi khác thuộc lớp γ -*Proteobacteria* như *Sewanella* spp., *Acidibacter* spp. đã được công bố trước đây [Nielsen *et al.*, 2002; Falagán, Johnson, 2014]. Tuy nhiên, các chủng thuộc loài *A. denitrificans* đã được công bố về khả năng sinh trưởng trong điều kiện kỵ khí khử chlorate và nitrate [Weeklink *et al.*, 2008;

Atashgahi *et al.*, 2018], nhưng chưa được đánh giá trong điều kiện khử Fe^{3+} .



Hình 3.11. Khả năng khử Fe^{3+} của chủng FN7 và FN9. (a) Fe-citrate; (b) ferrihydrite

Chủng FN7 và FN9 được phân lập được trong nghiên cứu này mặc dù chưa phải là vi khuẩn feammox đích thực (có khả năng oxy hóa NH_4^+ kết hợp khử Fe^{3+}), nhưng chúng chắc chắn đóng vai trò nhất định trong việc loại NH_4^+ ở mô hình thí nghiệm.

3.3. XÁC ĐỊNH ẢNH HƯỞNG CỦA CARBON HỮU CƠ TỚI QUÁ TRÌNH OXY HÓA NH_4^+ TRONG MÔ HÌNH - THÍ NGHIỆM THEO MẼ

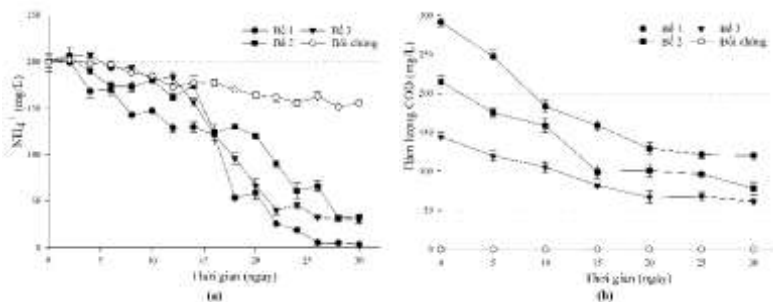
3.3.1. Đánh giá ảnh hưởng của carbon hữu cơ tới quá trình oxy hóa NH_4^+

3.3.1.1. Đánh giá qua hiệu quả oxy hóa NH_4^+ và COD

Kết quả theo dõi trong 30 ngày cho thấy quá trình oxy hóa NH_4^+ diễn ra tích cực ở cả ba bể của mô hình, tuy nhiên hiệu quả oxy hóa NH_4^+ cao nhất (~ 98%) là ở bể 1 với tỷ lệ $[\text{COD}]/[\text{NH}_4^+]$ là 1,4, cao hơn hẳn hai bể còn lại (83% và 85%) với tỷ lệ $[\text{COD}]/[\text{NH}_4^+]$ thấp hơn (Hình 3.12a và Bảng 3.3).

Song song với quá trình oxy hóa NH_4^+ , quá trình oxy hóa COD cũng được ghi nhận (Hình 3.12b). Hiệu suất oxy hóa COD cao nhất

là ở bể 2 (63,7%) với $[\text{COD}]/[\text{NH}_4^+]$ là 1,1; cao hơn so với ở bể 1 và bể 3 (~ 58%) khi phân tích ở ngày thứ 25.



Hình 3.12. Ảnh hưởng của carbon hữu cơ tới quá trình oxy hóa NH_4^+ trong mô hình feammox phòng thí nghiệm. (a) Oxy hóa NH_4^+ trong các bể của mô hình với tỉ lệ $[\text{COD}]/[\text{NH}_4^+]$ khác nhau; (b) Oxy hóa COD tương ứng trong các bể.

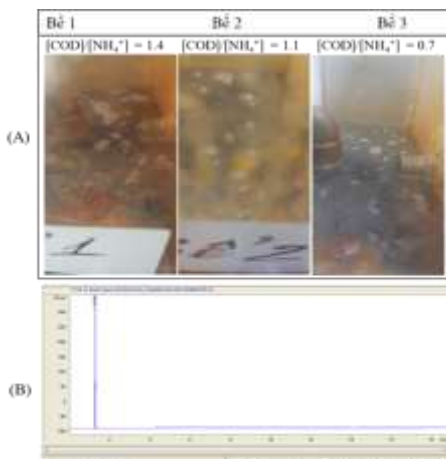
3.3.1.2. Đánh giá qua sản phẩm khử Fe^{2+}

Hàm lượng Fe^{2+} trong các bể dao động trong khoảng lớn, không tuân theo tỷ lệ lý thuyết tương ứng với lượng NH_4^+ bị oxy hóa. Nhiều khả năng Fe^{2+} không tồn tại trong dung dịch mà tạo kết tủa FeCO_3 và/hoặc $\text{Fe}(\text{OH})_2$. Hiện tượng này cũng đã được quan sát trước đó trong thí nghiệm làm giàu vi khuẩn feammox. Mặc dù vậy, sự có mặt của Fe^{2+} trong môi trường là minh chứng cho quá trình khử Fe^{3+} .

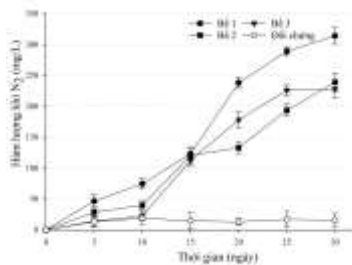
3.3.1.3. Đánh giá qua sản phẩm oxy hóa NH_4^+

Tương tự như trong quá trình làm giàu vi khuẩn feammox, cả NO_2^- và NO_3^- đều không được tìm thấy trong các bể của mô hình. Duy nhất chỉ có khí N_2 được sinh ra và tích lũy trong các bể, tạo thành các bọt khí có thể quan sát bằng mắt thường (Hình 3.14A). Phân tích thành phần khí trong các bể chỉ có N_2 (Hình 3.14B).

Định lượng khí N_2 sinh ra trong các bể cho thấy khí này được sinh ra ở mức cao nhất ở bể 1, nơi có hiệu suất oxy hóa NH_4^+ cao nhất. Lượng khí N_2 sinh ra trong bể 2 và bể 3 ở mức tương đương nhau, thống nhất với mức oxy hóa NH_4^+ ở hai bể này (Hình 3.15).



Hình 3.14. Khí N₂ sinh ra từ quá trình oxy hóa NH₄⁺ trong mô hình feammox. (A) Bọt khí quan sát được trong các bể của mô hình; (B) Sắc ký đồ của mẫu khí từ mô



Hình 3.2. Lượng N₂ tạo thành trong các bể của mô hình feammox

3.3.1.4. Đánh giá qua điện thế oxy hóa khử

Điện thế oxy hóa khử RP ở bể 1 ổn định hơn cả, luôn ở trong khoảng $-20 \text{ mV} \div +20 \text{ mV}$. Trong khi đó, bể 2, bể 3 và bể đối chứng có RP dao động mạnh, ở mức dương từ $+20 \text{ mV}$ trở lên. Rõ ràng, điều kiện RP trong bể 1 là thích hợp nhất cho các quá trình khử kỵ khí Fe³⁺ và cả NO₃⁻. Trong tự nhiên các chất oxy hóa này tham gia các quá trình khử sinh học ở RP $\sim 0 \text{ mV}$.

3.3.2. Tính toán cân bằng chất cho quá trình feammox ở điều kiện thí nghiệm

Phân tích các chất chuyển hóa ở bể 1 trong thí nghiệm xử lý theo mẻ ([COD]/[NH₄⁺]=1,4) (Bảng 3.4) nhằm tìm hiểu về cơ chế chuyển hóa sinh học của NH₄⁺ và carbon hữu cơ ở điều kiện feammox trong mô hình. Một số luận giải được đưa ra như sau:

- Lượng NH₄⁺ bị oxy hóa (mmol) và sản phẩm tạo thành N₂ phù hợp với lý thuyết 1:0,5.

- Hàm lượng COD đo được ở các thời điểm 5, 10 và 15 ngày cho thấy lượng acetate bị oxy hóa phù hợp với các giá trị lý thuyết của quá trình khử NO_3^- , tức là tỷ lệ 5/8 mmol acetate khử 1 mmol NO_3^- (phản ứng 3.2), nếu NO_3^- là sản phẩm của quá trình feammox (phản ứng 1.9 và 1.10). Tuy nhiên, xu hướng này không được quan sát thấy trong những ngày tiếp theo, lượng acetate bị oxy hóa chỉ chiếm 56% ở ngày thứ 20; 45,8% ở ngày 25 và 42,5% ở ngày 30. Như vậy acetate không bị tiêu thụ như là chất cho điện tử để khử NO_3^- .
- Một quá trình chuyển hóa sinh học khác có khả năng tiêu hao acetate là khử Fe^{3+} , trong đó acetate có thể được sử dụng (i) làm chất cho điện tử để khử Fe^{3+} dị hóa (phản ứng 3.1) hoặc (ii) làm nguồn carbon trong phản ứng feammox tạo ra N_2 (phản ứng 1.8). Có thể giả thuyết rằng quá trình khử Fe^{3+} bằng acetate chiếm ưu thế trong hai tuần đầu tiên, sau đó nhanh chóng bị thay thế bằng quá trình feammox tiêu tốn ít acetate hơn.

Bảng 3.4. Hàm lượng NH_4^+ , carbon hữu cơ và các chất chuyển hóa ở điều kiện feammox trong bể 1 của mô hình

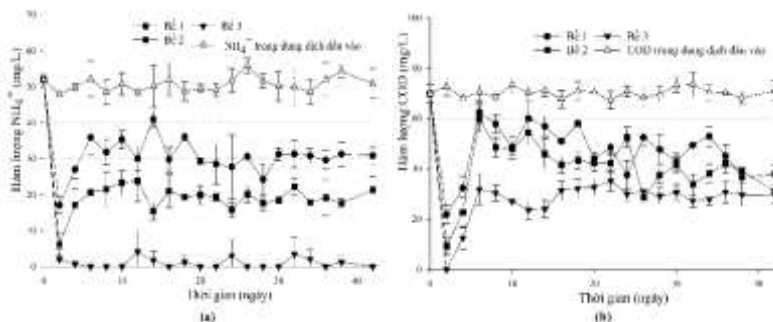
Thời gian (ngày)	Chất bị oxy hóa (mmol)			Sản phẩm tạo thành (mmol)			
	NH_4^+		Lý thuyết (a)	N_2		NO_3^-	
	Thực nghiệm	Thực nghiệm		Thực nghiệm	Lý thuyết (b)	Thực nghiệm	Lý thuyết (c)
5	9.79 ± 1.65	4.44 ± 0.80	6.12	4.53 ± 1.10	4.90	0.0 ± 0.0	9.79
10	17.39 ± 0.62	10.96 ± 0.75	10.87	7.26 ± 0.83	8.69	0.0 ± 0.0	17.39
15	23.23 ± 1.99	13.44 ± 0.67	14.52	11.99 ± 0.90	11.62	0.0 ± 0.0	23.23
20	46.80 ± 2.41	16.42 ± 0.72	29.25	23.21 ± 0.90	23.40	0.0 ± 0.0	46.80
25	60.19 ± 0.69	17.25 ± 0.45	37.62	28.18 ± 0.76	30.10	0.0 ± 0.0	60.19
30	65.31 ± 1.03	17.37 ± 0.55	40.82	30.62 ± 1.31	32.65	0.0 ± 0.0	65.31

- a) Acetate bị oxy hóa theo lý thuyết: là lượng acetate cần thiết sử dụng để khử NO_3^- nếu NO_3^- được tạo ra trong quá trình feammox (theo phản ứng 1.9 và 1.10), sau đó tiếp tục phản ứng 3.2. Theo đó các chất $\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^- : \text{CH}_3\text{COO}^-$ có tỷ lệ là 1:1:5/8
- b) Khí N_2 sản sinh ở điều kiện feammox theo lý thuyết: là lượng khí tạo thành từ quá trình oxy hóa NH_4^+ theo phản ứng 1.8; Khi đó, cân bằng các chất $\text{NH}_4^+ : \text{N}_2$ là 1:0,5.
- c) Lượng NO_3^- có thể được tạo thành khi quá trình feammox xảy ra theo phản ứng 1.10 (hoặc qua bước trung gian NO_2^- theo phản ứng 1.9).

Như vậy carbon hữu cơ đích thực có ảnh hưởng quan trọng tới quá trình feammox. Hiệu quả oxy hóa NH_4^+ đạt mức cao nhất (> 98% sau 30 ngày) khi tỷ lệ $[\text{COD}]/[\text{NH}_4^+] = 1,4$, cao hơn đáng kể so với trường hợp nước thải có thành phần COD thấp ở tỷ lệ $[\text{COD}]/[\text{NH}_4^+] = 1,1$ hoặc 0,7.

3.4. THỬ NGHIỆM XỬ LÝ NH_4^+ TRONG MÔ HÌNH FEAMMOX THEO CHẾ ĐỘ VẬN HÀNH LIÊN TỤC

Từ kết quả của thí nghiệm trong mô hình theo chế độ mẻ, thí nghiệm vận hành liên tục thực hiện với nước thải có hàm lượng NH_4^+ ở mức 50 mg/L, COD được bổ sung ở mức 70 mg/L để có tỷ lệ $[\text{COD}]/[\text{NH}_4^+] = 1,4$. Sau 40 ngày vận hành liên tục, hiệu quả loại NH_4^+ là đạt 91% khi thời gian lưu là 6 ngày (Hình 3.17a). Lượng COD cũng bị loại đạt mức ~ 60% khi thời gian lưu của nước thải là 6 ngày (Hình 3.17b).



Hình 3.17. Xử lý loại NH_4^+ (a) và COD (b) trong mô hình feammox ở chế độ vận hành liên tục

Như vậy mô hình feammox có thể xử lý đồng thời cả NH_4^+ và COD. Nước thải sau khi xử lý có hàm lượng $\text{NH}_4^+ < 5 \text{ mg/L}$ và hàm lượng COD $< 30 \text{ mg/L}$, đạt tiêu chuẩn xả thải loại A theo QCVN40:2011/BTNMT. Kết quả này mở ra hướng nghiên cứu phát triển công nghệ mới để xử lý loại NH_4^+ , khắc phục những hạn chế của các công nghệ hiện hành.

KẾT LUẬN

1. Quá trình feammox ở điều kiện dị dưỡng và pH trung tính đã được nghiên cứu trong mô hình phòng thí nghiệm quy mô 3 L/ngày đêm. Vi sinh vật feammox trong mô hình được làm giàu từ bùn kỵ khí chứa sắt của hệ thống xử lý nước thải kỵ khí ở Cù Chi bằng bơm tuần hoàn nước thải nhân tạo có hàm lượng NH_4^+ và COD rất cao (tương ứng là 200 mg/L và 250 mg/L) trong 30 ngày, ở thời điểm kết thúc làm giàu $> 90\%$ NH_4^+ bị loại, trong khi đối chứng không bổ sung carbon hữu cơ chỉ loại được 20% NH_4^+ , khí N_2 là sản phẩm chuyển hóa NH_4^+ duy nhất được xác định.
2. Hệ vi sinh vật feammox trong mô hình được phân tích bằng phương pháp PCR-DGGE và một số chi vi khuẩn chính như *Geobacter*, *Geoalkalibacter* (thuộc lớp δ -*Proteobacteria*), *Pseudomonas* (thuộc lớp γ -*Proteobacteria*) và *Alicyclophilus* (thuộc lớp β -*Proteobacteria*) được xác định. Phân tích quần thể bằng phương pháp FISH sử dụng đầu dò Delta385 và GAM42a đặc hiệu cho các nhóm chính của vi khuẩn khử Fe^{3+} là lớp δ -*Proteobacteria* và γ -*Proteobacteria* cho thấy vi khuẩn thuộc lớp γ -*Proteobacteria* đóng vai trò ưu thế, chiếm $> 90\%$ tổng số tế bào bắt tín hiệu DAPI.
3. Hai chủng vi khuẩn *Alicyclophilus* sp. FN7 và *Pseudomonas* sp. FN9 được phân lập từ quần thể feammox trong mô hình. Với khả

năng oxy hóa NH_4^+ dị dưỡng (hiếu khí), khử NO_3^- và Fe^{3+} (kỵ khí), mặc dù không phải là vi khuẩn feammox thực thụ nhưng đóng vai trò nhất định trong quá trình loại NH_4^+ ở điều kiện feammox tại pH trung tính. Trình tự gen 16S rDNA của chủng FN7 và FN9 được đăng ký tại GenBank với mã số tương ứng là LC474369 và MT568614.

4. Carbon hữu cơ (COD) được xác định là có vai trò thúc đẩy quá trình feammox trong mô hình, khi có mặt trong nước thải ở tỷ lệ $[\text{COD}]/[\text{NH}_4^+] = 1,4$ cho phép quá trình feammox diễn ra ổn định và đạt hiệu quả cao, chuyển hóa được $> 90\%$ NH_4^+ từ nồng độ 200 mg/L thành N_2 sau 30 ngày.

5. Nghiên cứu xử lý đồng thời NH_4^+ và COD trong mô hình feammox theo chế độ vận hành liên tục áp dụng với nước thải có nồng độ NH_4^+ ở mức 50 mg/L, $[\text{COD}]/[\text{NH}_4^+]$ là 1,4 đạt hiệu quả cao, 91% NH_4^+ và 60% COD bị loại với thời gian lưu 6 ngày. Nước thải sau khi xử lý có hàm lượng $\text{NH}_4^+ < 5$ mg/L và hàm lượng COD < 30 mg/L, đạt tiêu chuẩn xả thải loại A theo QCVN 40:2011/BTNMT. Kết quả này mở ra hướng nghiên cứu phát triển công nghệ mới dựa trên nguyên lý feammox để xử lý loại NH_4^+ trong nước thải, khắc phục những hạn chế của công nghệ nitrate hóa/khử nitrate và nitrite hóa bán phần/anammox hiện hành.

KIẾN NGHỊ

1. Tiếp tục phân lập, tìm kiếm các vi sinh vật feammox và nghiên cứu hệ vi sinh vật feammox trong mô hình thí nghiệm bằng cách tiếp cận metagenome.
2. Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ muối tới quá trình feammox trong mô hình để hướng tới ứng dụng cho xử lý nước thải chế biến hải sản.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC CỦA TÁC GIẢ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

- 1. Chung Phuong Le**, Hai Thi Nguyen, Toi Nguyen Duy, Quyen Huynh Minh Nguyen, Hai The Pham, Hang Thuy Dinh (2021), “Ammonium and organic carbon co-removal under feammox-coupled-with-heterotrophy condition as an efficient approach for nitrogen treatment”, *Scientific Reports* **11**, 784 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80057-y>
- 2. Le Phuong Chung**, Nguyen Thi Hai, Nguyen Huynh Minh Quyen, Pham The Hai, Dinh Thuy Hang (2021), “Iron-reducing β - and γ -proteobacteria isolated from laboratory-scaled heterotrophic feammox bioreactor”, *Vietnam Journal of Biotechnology*, 2/2021.
- Đinh Thúy Hằng, **Lê Phương Chung** (2021), Đăng ký sáng chế “Quy trình xử lý đồng thời NH_4^+ và COD ở điều kiện khử Fe^{3+} trên hệ thống bể kỵ khí”, *Cục SHTT*, đơn chấp thuận hợp lệ.