

ẢNH HƯỞNG CỦA BỔ SUNG DẦU THỰC VẬT LÊN SỰ ĐA DẠNG QUẦN THỂ VI SINH VẬT TRONG BỂ LỌC SINH HỌC

Phạm Thị Tuyết Ngân¹, Tô Công Tâm¹ và Trương Quốc Phú¹

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effects of vegetable oil on the nitrification and denitrification processes in aquaria system. The experiments were designed in freshwater and seawater systems. Each system had two treatments including the control and bio-filter module connected with a membrane tube as a bioreactor. Water parameters such as pH, DO, NO₂ and NO₃ were monitored continuously in the aquaria (70 L). Nitrification and denitrification processes were observed after adding ABIL (ammonia binding inoculum liquid) and vegetable oil into the bio-filter module. The results showed that in the module treatment in freshwater system, pH slightly decreased at the end of experiment. DO was always lower in the module treatment. Nitrate removal rate was faster in the module treatment than in the control from date 9 onwards. Nitrification process took place faster in the third pulse than in the first and the second pulse. The microbial community in the module treatment was more diverse than that of the control. Similarly, in seawater system pH also decreased at the end of experiment. DO in the module treatment was lower than in the control. Nitrate removal rate in the module treatment was faster than in the control. However, the diversity of microbial community was similar in both treatments.

Keyword: nitrification, denitrification, recirculating system, aquaria

Title: Effects of vegetable oil supplementation on the diversity of bacteria in bio-filter system

TÓM TẮT

Mục đích của nghiên cứu này nhằm tìm hiểu ảnh hưởng của dầu thực vật lên quá trình nitrate hóa và phản nitrate hóa trong hệ thống lọc tuần hoàn. Thí nghiệm được bố trí trong hệ thống nước ngọt và mặn. Mỗi hệ thống có 2 nghiệm thức, nghiệm thức đối chứng và nghiệm thức có bổ sung lọc sinh học lắp ghép (module). Các thông số môi trường nước như pH, DO, NO₂ và NO₃ trong bể kính (70 L) được theo dõi liên tục. Quá trình nitrate hóa và phản nitrate hóa được theo dõi sau khi bổ sung ABIL và dầu thực vật vào bể có lọc sinh học module. Kết quả cho thấy trong hệ thống nước ngọt có gắn lọc sinh học, pH giảm nhẹ vào cuối thí nghiệm. DO ở nghiệm thức có gắn lọc sinh học luôn thấp hơn đối chứng. Tốc độ loại bỏ NO₃ ở nghiệm thức module diễn ra nhanh hơn nghiệm thức đối chứng sau ngày thứ 9. Sự nitrate hóa xảy ra nhanh hơn ở chu kỳ thứ ba so với chu kỳ thứ nhất và thứ hai. Quần thể vi khuẩn trong nghiệm thức module đa dạng hơn đối chứng. Trong khi đó kết quả trong hệ thống lọc sinh học nước lợ cho thấy, pH cũng giảm vào cuối thí nghiệm. DO ở nghiệm thức module luôn thấp hơn đối chứng. Tốc độ loại bỏ nitrate ở nghiệm thức module nhanh hơn đối chứng và sự đa dạng quần thể vi sinh trong 2 nghiệm thức tương đương nhau.

Từ khoá: nitrate hóa, phản nitrate hóa, hệ thống tuần hoàn, bể kính, dầu thực vật

1 GIỚI THIỆU

Tổng hàm lượng đạm amôn (TAN, bao gồm NH₃ và NH₄⁺) là thông số chất lượng nước quan trọng trong sản xuất giống và nuôi thủy sản. Ammonia (NH₃) được hình thành trong suốt quá trình trao đổi protein của cá. Cá tiết ra ammonia qua mang; trong nước ngọt, ion ammonium (NH₄⁺) có thể cũng được trao đổi qua mang. Ammonia và ammonium được thải ra từ mang chiếm khoảng 60-90% tổng lượng đạm do cá tiết ra (Forster và Goldstein,

¹ Bộ môn Thủy sinh học ứng dụng, Khoa Thủy sản, Đại học Cần Thơ.

1969; Rychly, 1980). Urea cũng được thải ra từ mang và chiếm khoảng 9-27% tổng đạm hòa tan. Một nguồn khác của ammonia trong bể nuôi cá cảnh và trong hệ thống nuôi thủy sản sinh ra từ các hoạt động của vi khuẩn phân huỷ thức ăn dư thừa và chất thải. Vật chất hữu cơ chỉ chiếm khoảng 3,4-4,2% tổng đạm trong hệ thống nuôi (Clark *et al.*, 1985). Khí ammonia độc hơn ion ammonium, hàm lượng thấp khoảng 0,1 mg/L đã gây bất lợi cho cá (Van Rijn *et al.*, 1990) và trong thực tế thấy cá có dấu hiệu bị nhiễm bệnh ở mức NH₃-N cao hơn 50µg N/L (Frances *et al.*, 2000). Đối với ấu trùng, thậm chí yêu cầu còn nghiêm ngặt hơn.

Sự loại bỏ ammonia (NH₃) có vai trò vô cùng quan trọng trong việc cải thiện chất lượng nước trong hệ thống ương nuôi ấu trùng và góp phần làm tăng năng suất trong sản xuất. Trong nuôi trồng thủy sản, biện pháp thay nước thường được áp dụng để giảm hàm lượng ammonia. Tuy nhiên, biện pháp này cũng có những mặt hạn chế như: chi phí sản xuất cao, mầm bệnh có nhiều cơ hội xâm nhập vào hệ thống sản xuất... Trong những năm gần đây, hệ thống lọc sinh học tuần hoàn thường được ứng dụng rộng rãi để loại bỏ ammonia dựa trên cơ sở của quá trình nitrate hóa. Nitrate hóa là một quá trình mà ammonia được oxy hóa thành nitrate (NO₃⁻) qua 2 giai đoạn được thực hiện bởi 2 nhóm vi khuẩn khác nhau. Ở giai đoạn thứ nhất, vi khuẩn *Nitrosomonas* oxy hóa ammonium thành nitrite (NO₂⁻), nitrite cuối cùng chuyển thành nitrate nhờ hoạt động của vi khuẩn *Nitrobacter* (Focht và Vertraete, 1977). Theo Grommen *et al.*, (2002), có thể cấy vi khuẩn nitrate hóa vào bể để rút ngắn thời gian khởi động bể lọc sinh học.

Trong hệ thống lọc sinh học tuần hoàn, hàm lượng nitrate hình thành trong quá trình nitrate hóa có khuynh hướng tăng dần trong hệ thống. Mặc dù nitrate không độc nhưng nếu hàm lượng quá cao sẽ ảnh hưởng xấu đối với thủy sinh vật, một số nghiên cứu cho rằng hàm lượng nitrate cao hơn 20 mg/L có thể ảnh hưởng đến hệ miễn dịch và khả năng sinh sản của thủy sinh vật. Vì vậy, nghiên cứu biện pháp loại bỏ nitrate trong hệ thống lọc sinh học là hướng nghiên cứu được nhiều nhà khoa học quan tâm. Hiện nay có 2 hướng nghiên cứu chính là sử dụng thực vật để hấp thu nitrate và ứng dụng quá trình phản nitrate hóa để khử nitrate. Trong thí nghiệm trước đây của Schrijver (2005) nhận thấy rằng khi thêm dầu thực vật vào môi trường nước có bổ sung ABIL (ammonia binding inoculum liquid) thì tốc độ giảm nitrate đạt rất nhanh, ở chu kỳ đầu sau 4 ngày hàm lượng nitrate giảm = 0 (hàm lượng nitrate ban đầu 60 mg/L), ở chu kỳ 2 và 3 chỉ sau một ngày hàm lượng nitrate giảm = 0. Trong khi hàm lượng nitrate vẫn giữ nguyên không đổi ở nghiệm thức đối chứng (không thêm dầu thực vật). Từ thí nghiệm trên cho thấy dầu thực vật đóng vai trò như nguồn dinh dưỡng carbon, cung cấp thức ăn cho vi khuẩn hoạt động. Vấn đề đặt ra ở đây, nếu sử dụng dầu thực vật trong hệ thống lọc tuần hoàn thì kết quả sẽ như thế nào? Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện với mục đích tìm hiểu ảnh hưởng của dầu thực vật lên quá trình nitrate hóa và phản nitrate hóa trong hệ thống tuần hoàn nước ngọt và mặn có bổ sung lọc sinh học lắp ghép (module). Mặt khác mật độ và sự đa dạng của quần thể vi khuẩn cũng được xác định dựa theo phương pháp điện di biến tính theo trọng lượng (DGGE).

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Quá trình nitrate hóa đã được kiểm tra trong 2 hệ thống: nước ngọt và nước mặn với thể tích mỗi bể 70 L. Mỗi hệ thống có 2 bể kính (một bể đối chứng, một bể có gắn lọc sinh học lắp ghép (module). Thí nghiệm có tổng cộng 4 bể. Hệ thống nước ngọt được chuẩn bị với 70% nước máy và 30% nước cất (có độ tinh khiết cao). Hệ thống nước mặn, được chuẩn bị có độ mặn từ 32-35ppt bằng muối nhân tạo (Instant Ocean, Aquarium Systems, Pháp) pha với nước cất. Độ mặn được kiểm tra bằng máy đo pH (ATAGO S-10E, Nhật). Lọc sinh học module là một hệ thống lọc bao gồm một bộ lọc hình trụ bên trong cấu tạo

bằng sợi mịn, nối với một máy bơm và ống than hoạt tính. Khi bố trí thí nghiệm dầu và vi khuẩn được cấy vào đây, các phản ứng sẽ xảy ra ở đây, vi khuẩn sẽ chuyển hóa nitrate thành N_2 .

Mỗi bể được gắn sục khí nhằm cung cấp oxy cho quá trình nitrate hóa. Mỗi hệ thống (nước ngọt và nước mặn) đều có một nghiệm thức đối chứng, nghiệm thức đối chứng chỉ cung cấp sục khí cho quá trình nitrate hóa, còn trong nghiệm thức có module vừa có sục khí cho quá trình nitrate hóa vừa có lọc cho quá trình phân nitrate hóa. Sử dụng tăng nhiệt để duy trì nhiệt độ nước 25°C (100 W).

Muối Ammonium chloride (NH_4Cl) được thêm vào từng bể với nồng độ N-NH_4^+ là 10 mg/L, khi ammonium được chuyển hóa hết sang nitrate, liều NH_4Cl tương tự sẽ được thêm vào (ngày thứ 9, 17 và 22 trong hệ thống nước ngọt và vào ngày 8, ngày 15 trong hệ thống nước mặn). Lượng ABIL đã được thêm vào 100mL/70L ở ngày thứ nhất, một liều mới được thêm vào ở ngày 17 và ngày 22 đối với hệ thống nước ngọt; ngày 9 và ngày 14 trong hệ thống nước mặn. Trong nghiệm thức có lắp module được cung cấp thêm 7 mL/L ABIL và 0,7 mL dầu/L (Arachide, Bì) ở lúc bắt đầu thí nghiệm và liều thứ hai được thêm vào ngày 22 đối với hệ thống nước ngọt và ngày 14 cho hệ thống nước mặn. Màng lọc sinh học lắp ghép được nối với hệ thống GAC (Granular Active Carbon, than hoạt tính). ABIL và dầu đã được thêm vào ở nghiệm thức đối chứng với lượng bằng thêm vào nghiệm thức module. Hàm lượng pH, TAN, DO, COD, nitrite, nitrate và tốc độ thay nước được đo mỗi ngày.

2.1 Phương pháp phân tích chất lượng nước

Hàm lượng oxygen hòa tan (DO) được đo mỗi ngày bằng máy đo điện cực oxy (Endress + Hauser, Bì) và pH được đo bằng máy đo pH (C 532, Bì). COD được phân tích dựa vào sự oxy hóa trong acid theo phương pháp của Greenberg *et al.* 1992. Trong hệ thống nước ngọt, lấy 2,5 ml mẫu nước hòa tan với 7,5 ml nước cất. Hỗn hợp được lọc qua lưới lọc 0,2 μm trước khi xác định hàm lượng nitrite và nitrate bằng máy quang phổ (IC, 761 compact, Methanol). TAN được xác định bằng máy quang phổ theo phương pháp của Greenberg *et al.*, 1992. Tốc độ thay nước đã được tính dựa vào thể tích nước chảy vào bể trong một đơn vị thời gian (30 giây).

2.2 Phương pháp cấy vi khuẩn

Mỗi 3 ngày một lần, mẫu nước được thu vào ống nghiệm, sau đó pha loãng và cấy trên môi trường marine agar, MA (đối với vi khuẩn nước mặn) và môi trường TSA (đối với vi khuẩn nước ngọt). Thời gian ủ 48 giờ, nhiệt độ 28°C . Tổng số vi khuẩn được biểu thị bằng đơn vị Log CFU/mL.

2.3 Phân tích DGGE

Mẫu nước có chứa vi khuẩn được lọc qua lưới 0,2 μm , lấy phần lắng có chứa vi khuẩn được dùng để phân tích DGGE nhằm xác định quần thể vi sinh trong bể. Các bước thực hiện bao gồm ly trích ADN, sau đó chạy PCR, nếu có kết quả tốt sẽ tiếp tục phân tích DGGE. Chi tiết thực hiện như sau:

2.3.1 Ly trích ADN và PCR

Phương pháp ly trích ADN dựa theo Boon *et al.*, 2002. Dùng gel agarose 1,2% để kiểm tra sự hiện diện của phân tử ADN. Sự khuếch đại phân đoạn 465bp của gene 16S rRNA của vi khuẩn *proteobacteria* đã được thực hiện bằng môi CTO trong giai đoạn chạy PCR thứ nhất (Kowalchuk *et al.*, 2001). Sự khuếch đại của phân đoạn 650bp của gen 16S rARN từ vi khuẩn *Nitrobacterial spp* đã được thực hiện bằng một môi đặc biệt kết hợp

với môi P338F (Reagan *et al.*, 2002). Mẫu ADN sau đó được pha loãng ra 10 lần trước khi chạy PCR.

2.3.2 DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) (Boon *et al.*, 2002)

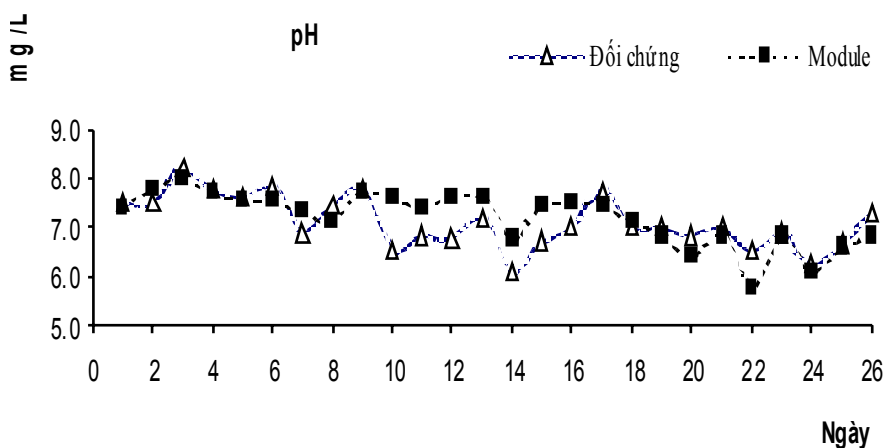
DGGE là kỹ thuật mới nghiên cứu về sự đa dạng của quần thể vi sinh. Phương pháp phân tích có nguồn gốc từ trong y học được Muyzer *et al.*, (1993) áp dụng vào lĩnh vực vi sinh. Theo phương pháp của Muyzer *et al.*, (1993), phân tích DGGE dựa vào sự khuếch đại PCR của phân đoạn 16S rARN của mẫu vi sinh đã được ly trích ADN hoặc là những dòng vi khuẩn phân lập, ADN đã được làm biến tính thành 2 chuỗi ADN bằng nhiệt độ, urê hoặc formaldehyde. Sự thay đổi điện di của những phân đoạn ADN khác nhau di chuyển trong gel polyacrylamide 8% trong 1xTAE (20mM Tris, 10mM acetate, 0,5 mM EDTA pH 7,4), bằng cách sử dụng hệ thống gene Bio-rad D (Bio-Rad, Hercules, Mỹ). Mẫu sau khi chạy PCR sẽ được cho vào polyacrylamide được làm từ dung dịch biến tính biến động từ 45-60%. Chạy điện di được thực hiện trong 16 giờ ở 60°C và dòng điện 38V. Sau khi chạy điện di, gel được nhuộm trong 20 phút bằng thuốc nhuộm nucleic acid SYBR Green I (1:10000, FMC BioProducts, Mỹ). Mẫu sau khi nhuộm lập tức được cho vào hệ thống có chụp hình qua tia tử ngoại UV và nối với máy ảnh (Vibert Lourmat, Pháp).

3 KẾT QUẢ

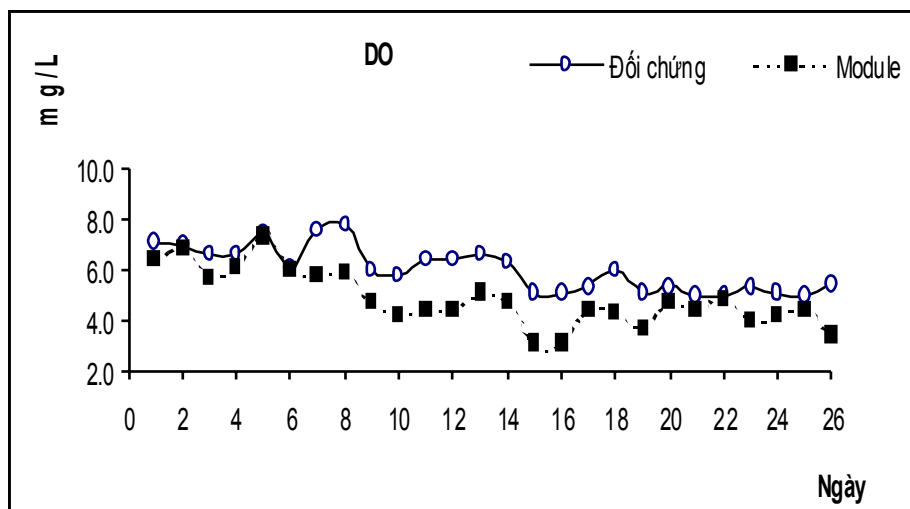
3.1 Hệ thống lọc sinh học nước ngọt

Hình 1, 2 & 3 trình bày biến động pH, DO và COD trong suốt quá trình thí nghiệm. pH giảm nhẹ vào cuối quá trình thí nghiệm. Hàm lượng DO ở nghiệm thức có module luôn thấp hơn ở nghiệm thức đối chứng. Có thể do hoạt động của vi khuẩn ở nghiệm thức có module nhiều hơn nghiệm thức đối chứng. Cuối cùng, COD cao nhất ở nghiệm thức module khi có thêm dầu mới vào, điều này chứng tỏ rằng dầu hoặc các sản phẩm phân hủy hòa tan vào trong bể.

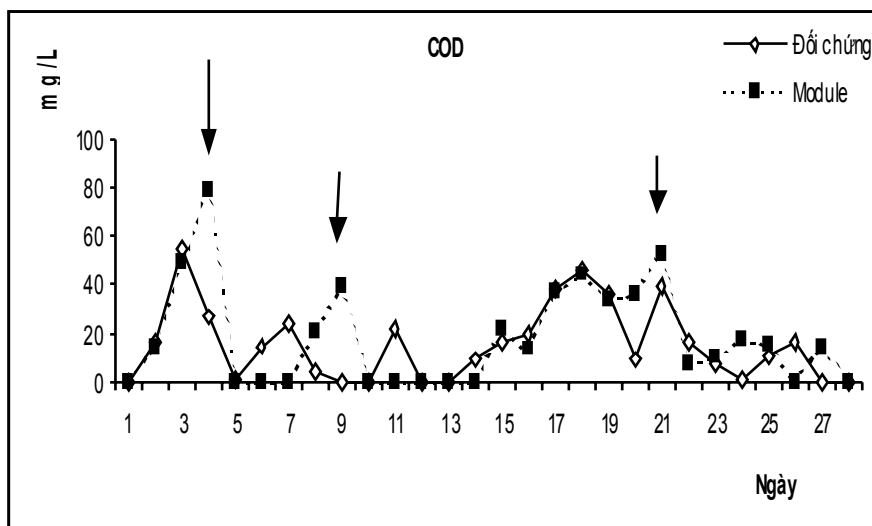
Hình 4 & 5 cho thấy hàm lượng TAN, nitrite, nitrate trong nghiệm thức đối chứng và nghiệm thức module có khuynh hướng giống nhau vào lúc bắt đầu thí nghiệm, nhưng từ ngày 9 trở đi, tốc độ chuyển hóa nitrate ở nghiệm thức module nhanh hơn nghiệm thức đối chứng. Hầu như không có nitrite ở nghiệm thức đối chứng, trong khi đó ở nghiệm thức module một lượng nhỏ đã được hình thành, có lẽ do tốc độ nước chảy qua hệ thống tương đối cao. Sự nitrite hóa xảy ra nhanh hơn ở chu kỳ thứ ba so với chu kỳ thứ nhất và thứ hai. Cuối cùng, ammonia không hoàn toàn được chuyển hóa trong nghiệm thức đối chứng vào cuối thí nghiệm và có khuynh hướng tập trung vào cuối thí nghiệm.



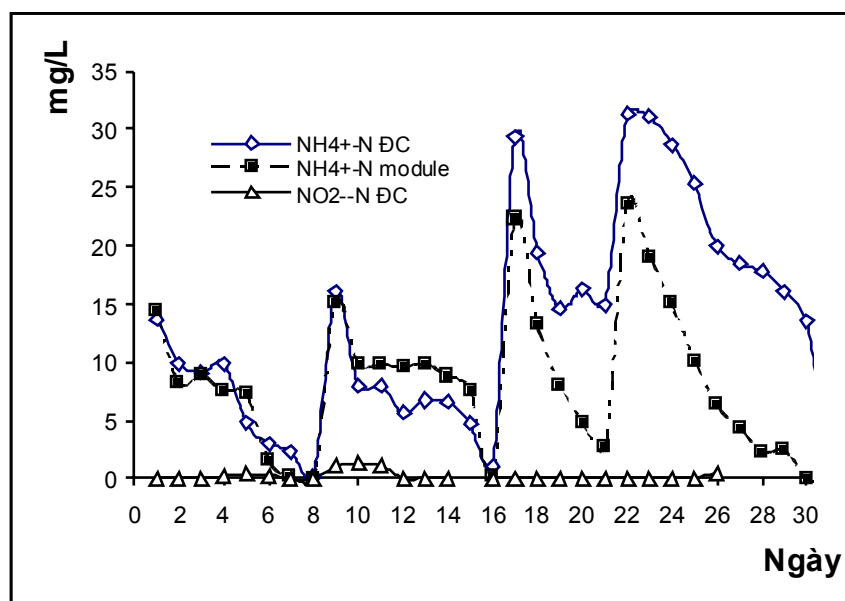
Hình 1: Biến động pH trong quá trình thí nghiệm



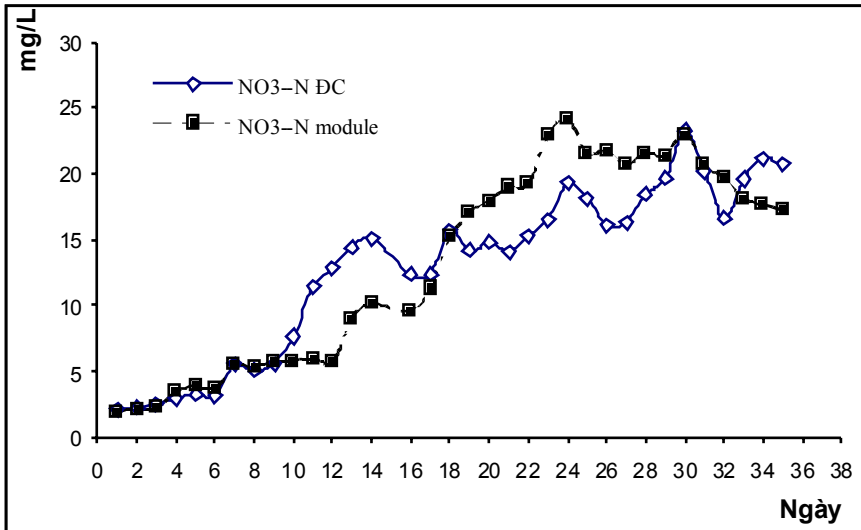
Hình 2: Biến động DO trong quá trình thí nghiệm



Hình 3: Biến động COD trong quá trình thí nghiệm (mũi tên chỉ NH_4Cl và dầu mới được thêm vào)

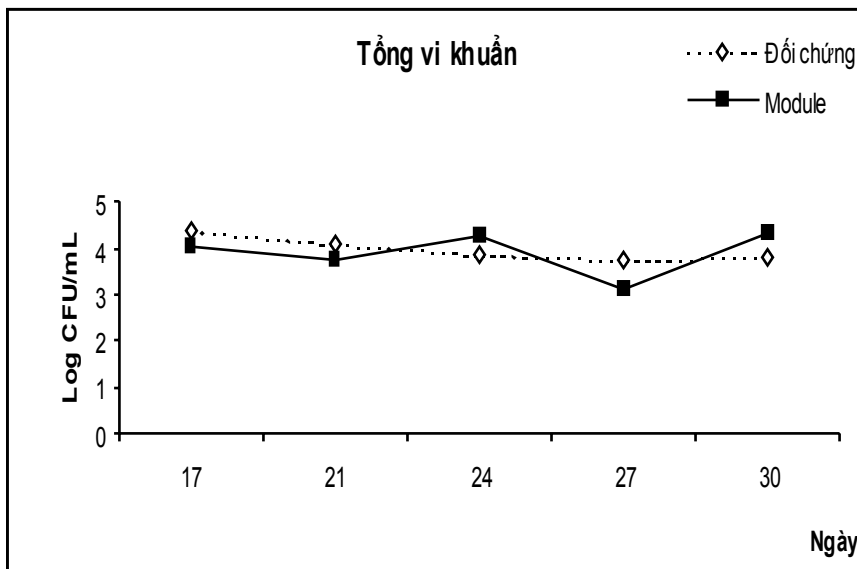


Hình 4: Biến động hàm lượng ammonia và nitrite trong quá trình thí nghiệm



Hình 5: Biến động hàm lượng nitrate trong quá trình thí nghiệm

Tốc độ nước chảy giảm theo thời gian trong cả hai hệ thống thí nghiệm nước ngọt và nước mặn do bị vật chất lơ lửng và màng bám bám vào. Tốc độ nước chảy được điều chỉnh vào ngày 8 trong hệ thống nước mặn để đạt $Q = 2L/h$.

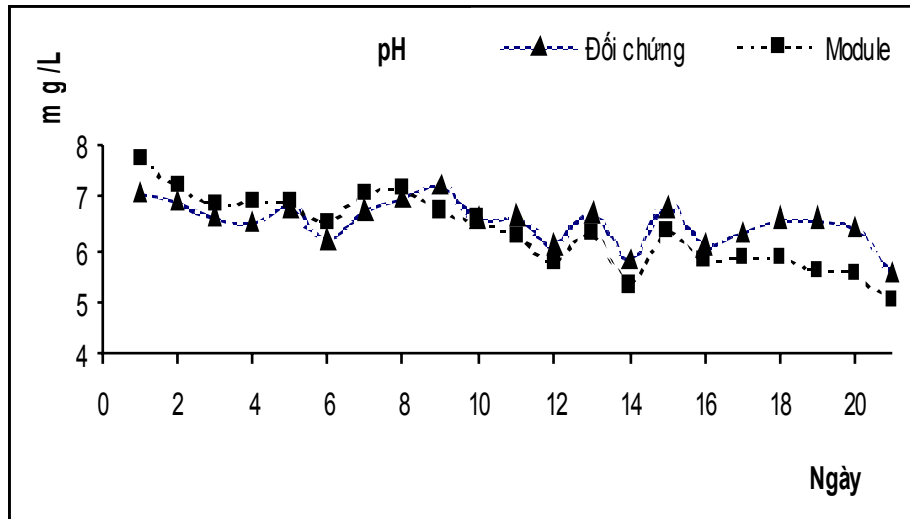


Hình 6: Tổng vi khuẩn trên môi trường TSA sau 48 giờ

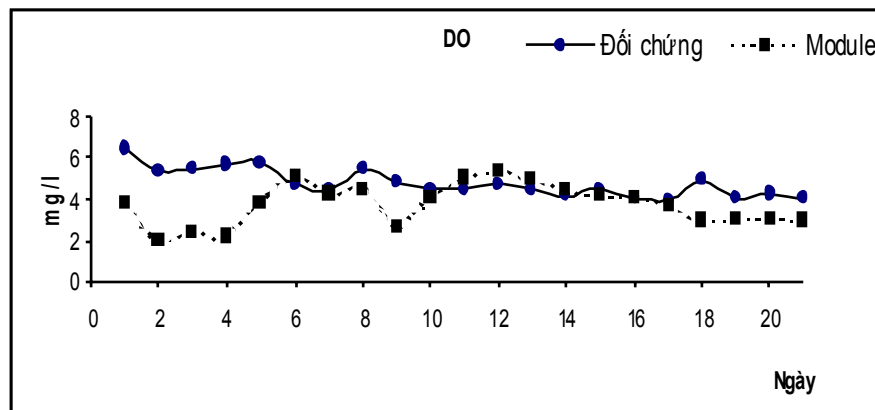
Hình dạng khuẩn lạc (Hình 13) ở nghiệm thức đối chứng và nghiệm thức module khác nhau. Kích thước khuẩn lạc ở nghiệm thức đối chứng luôn lớn hơn ở nghiệm thức module, nhưng quần thể vi khuẩn ở nghiệm thức module đa dạng hơn. Điều này cho thấy những loài vi khuẩn khác nhau đã chiếm ưu thế ở hai môi trường nước khác nhau.

3.2 Hệ thống lọc sinh học nước mặn

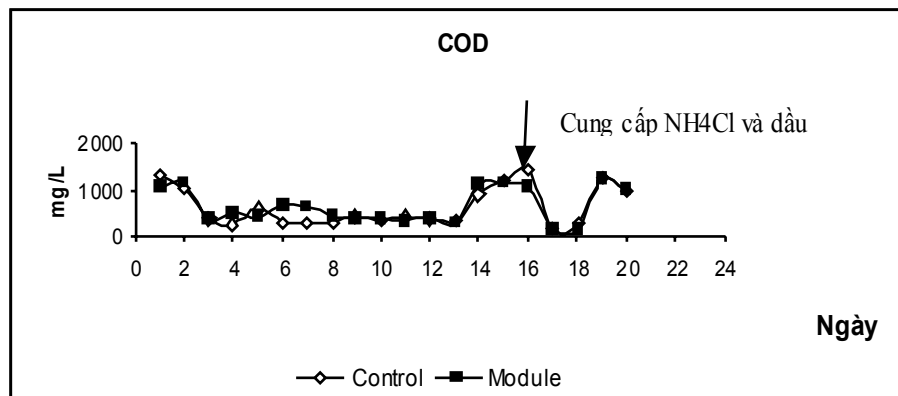
pH ổn định từ lúc bắt đầu thí nghiệm và có khuynh hướng giảm vào cuối thí nghiệm. DO luôn cao hơn ở nghiệm thức đối chứng so với nghiệm thức có module, có thể do vi khuẩn hoạt động mạnh hơn trong nghiệm thức này. COD cao hơn khi thêm NH_4Cl và dầu mới vào.



Hình 7: Biến động pH trong quá trình thí nghiệm

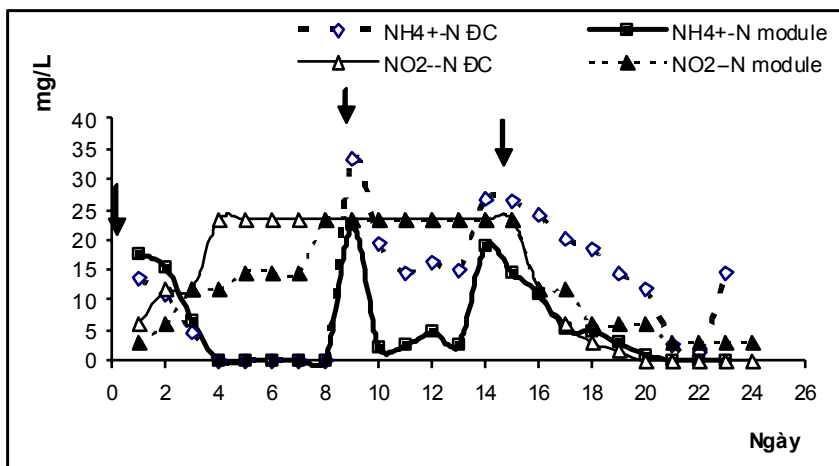


Hình 8: Biến động hàm lượng DO trong quá trình thí nghiệm

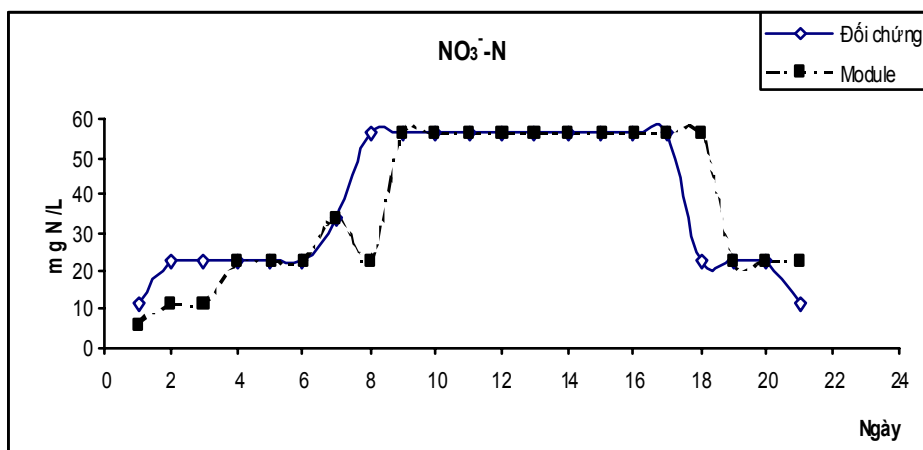


Hình 9: Biến động hàm lượng COD trong quá trình thí nghiệm

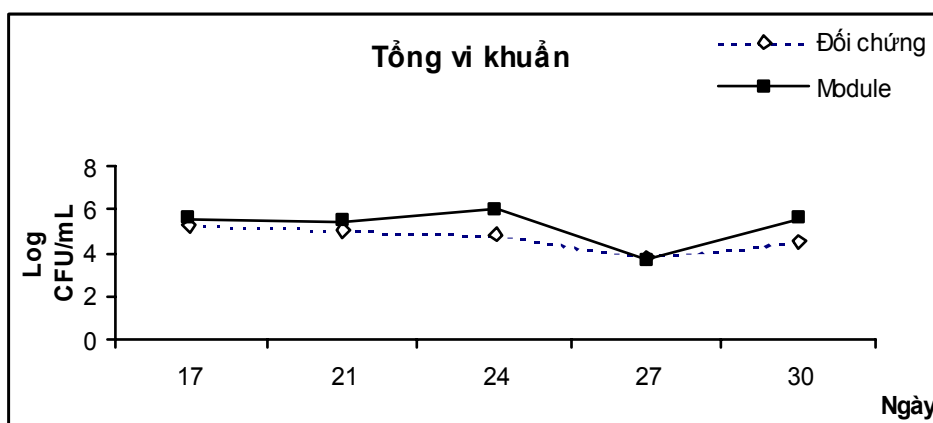
Vì khuẩn nitrate hóa chuyển hóa ammonium thành nitrite, sau đó được chuyển tiếp thành nitrate bởi vi khuẩn nitrate hóa. Ở chu kỳ thứ nhất, không có sự khác nhau giữa đối chứng và nghiệm thức có module, nhưng từ chu kỳ thứ hai về sau, sự chuyển hóa ở nghiệm thức module tốt hơn ở nghiệm thức đối chứng. Trong thời gian từ 3-4 ngày hoàn tất quá trình chuyển hóa. Hàm lượng nitrite khá cao trong hệ thống này. Tốc độ chuyển hóa nitrate khá chậm Hàm lượng nitrate bắt đầu giảm từ ngày 18.



Hình 10: Biến động hàm lượng TAN và nitrite trong quá trình thí nghiệm (mũi tên chỉ NH₄Cl và dầu mới được thêm vào)

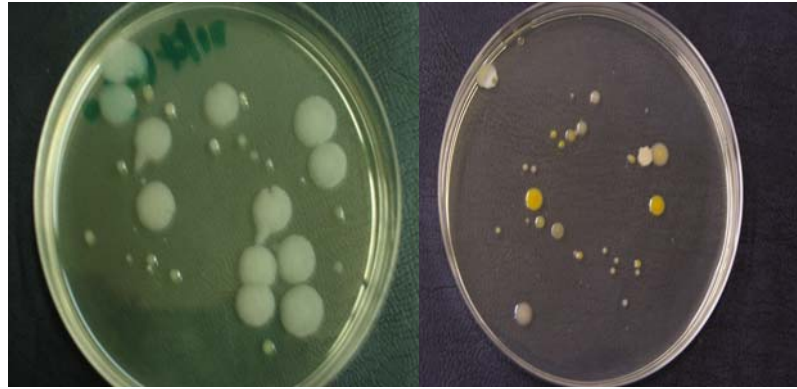


Hình 11: Biến động hàm lượng nitrate trong quá trình thí nghiệm



Hình 12: Tổng vi khuẩn cấy trong môi trường MA sau 48 giờ

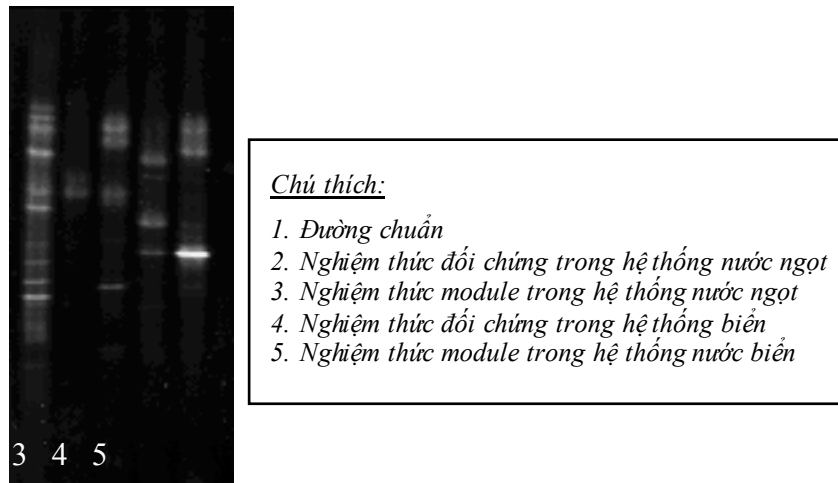
Hình dạng khuẩn lạc ở hai nghiệm thức trong hệ thống nước mặn giống nhau. Kích thước, màu sắc khuẩn lạc cũng tương tự. Điều này cho thấy rằng ở đây có thể chỉ có 1-2 loại vi khuẩn chiếm ưu thế trong bể thí nghiệm.



Hình 13: Hình dạng khuẩn lạc của vi khuẩn trong bể lọc sinh học nước ngọt (trái) và nước mặn

3.3 Kết quả phân tích DGGE

Hình 14 là kết quả phân tích DGGE của mẫu thí nghiệm, cột thứ 1 là đường chuẩn, cột thứ 2 là kết quả nghiệm thức đối chứng và cột thứ 3 nghiệm thức module trong nước ngọt vào ngày cuối của thí nghiệm (ngày 34). Cột thứ 4 phản ánh kết quả nghiệm thức đối chứng và cột thứ 5 nghiệm thức module trong nước mặn vào ngày cuối của thí nghiệm (ngày 26). Tương ứng với mỗi vạch ngang (band) trên từng cột là một dòng vi khuẩn. Kết quả cho thấy ở cả 2 nghiệm thức bể nước ngọt đều có cùng 1 dòng vi khuẩn chiếm ưu thế, nhưng trong nghiệm thức có module số dòng vi khuẩn đa dạng hơn (5 dòng). Tương tự trong hệ thống nước mặn, cả 2 nghiệm thức cũng có cùng một dòng vi khuẩn chiếm ưu thế, các dòng còn lại khác nhau ở cả 2 nghiệm thức và nghiệm thức module cũng đa dạng hơn.



Hình 14: Kết quả phân tích đa dạng vi khuẩn bằng phương pháp DGGE

Trong nước ngọt, pH giảm suốt quá trình thí nghiệm. DO trong nghiệm thức đối chứng luôn cao hơn nghiệm thức lọc sinh học. Ở chu kỳ thứ nhất TAN hoàn toàn bị oxy hóa thành nitrate trong thời gian 6 ngày. Ở chu kỳ thứ hai, thứ ba và thứ tư tốc độ chuyển hóa như nhau. Tốc độ oxy hóa trung bình của TAN ở chu kỳ thứ nhất là 210, 177.7, 247 và 224.7 mg/L/ngày lần lượt ở chu kỳ thứ hai, thứ ba và thứ tư. Nitrate tăng dần đến ngày thứ 24 và bắt đầu giảm. Nitrite hầu như không hiện diện trong hệ thống này. Trong hệ thống nước mặn, pH trong nghiệm thức module cao hơn trong đối chứng ở thời điểm bắt đầu thí nghiệm, nhưng giảm vào cuối thí nghiệm. DO trong nghiệm thức module luôn thấp hơn đối chứng. COD tăng cao khi bổ sung thêm NH_4Cl và dầu. TAN hoàn toàn bị oxy hóa thành nitrate trong 4 ngày trong chu kỳ thứ nhất, trong 3 ngày ở chu kỳ hai và 6 ngày sau chu kỳ ba. Tốc độ oxy hóa trung bình của TAN sau chu kỳ thứ nhất là 412 và 344 và 189 mg/L/ngày ở chu kỳ thứ hai và thứ ba. Nitrite và nitrate cao suốt quá trình thí nghiệm, nhưng nitrite bắt đầu giảm và đạt 0 ở ngày 20.

4 THẢO LUẬN

Các tác giả trước đây như Grommen *et al.*, 2002 chỉ nghiên cứu hoặc quá trình nitrate hóa hoặc phản-nitrate hóa trong hệ thống riêng biệt. Trong thí nghiệm này, chúng tôi đã kết hợp hai quá trình trong cùng một bể kính. Trong quá trình thứ nhất, vi khuẩn oxy hóa ammonium thành nitrite, được chuyển hóa tiếp thành nitrate bởi vi khuẩn nitrate hóa ở giai đoạn thứ hai (Focht & Vertraete, 1977). Thời gian để tổng TAN hoàn toàn bị oxy hóa thành nitrate trong nước ngọt (6 ngày) lâu hơn trong nước mặn (4 ngày) sau chu kỳ thứ nhất. Trong chu kỳ thứ hai, chỉ cần 3 ngày trong nước mặn trong khi hệ thống nước ngọt cần tới 6 ngày. Thời gian chuyển hóa ammonium trong nước ngọt trong thí nghiệm này bằng với thí nghiệm của Roeland (Grommen *et al.* 2002). Hàm lượng nitrite duy trì <2,4 mg/L, ở mức an toàn trong nuôi trồng thủy sản (Mazik *et al.* 1991, Chen & Lee, 1997).

Quá trình thứ 2, phản nitrate hóa, cũng xảy ra trong cùng một hệ thống. Trong thí nghiệm của Roeland và Peter, các tác giả này thêm KNO₃ vào bể như là nguồn cung cấp nitrate. Trong thí nghiệm này, sản phẩm cuối cùng của quá trình nitrate hóa (NO₃), được sử dụng như nguồn nitrate ban đầu cho quá trình phản nitrate hóa mà không cần thêm hóa chất vào. Dầu đã được thêm vào như là chất cho điện tử cho quá trình khử nitrate hóa. Hàm lượng nitrate tăng chậm và cao nhất vào ngày thứ 24, nhưng bắt đầu giảm từ đó về sau. Từ ngày 19 về sau, hàm lượng nitrate trong nghiệm thức đối chứng luôn cao hơn trong nghiệm thức module.

Trong thí nghiệm của Roeland, hàm lượng TAN đã bị oxy hóa thành nitrite và nitrate cao nhất sau 10 ngày trong nước biển, nhưng nitrite hoàn toàn chuyển thành nitrate cần tới 15 ngày. Tốc độ oxy hóa TAN là 43±2 mg/L/ngày, trong khi tốc độ oxy hóa của nitrite là 26±1 mg/L/ngày. Trong khi trong thí nghiệm này thời gian hoàn thành sự chuyển hóa chỉ diễn ra trong 4 ngày sau chu kỳ thứ nhất và 3 ngày sau chu kỳ thứ hai. Sự khác nhau có thể giải thích do trong thí nghiệm của chúng tôi có sử dụng ABIL thêm vào bể nước mặn vào ngày thứ 8 trước khi thêm NH₄Cl vào. Vào thời điểm đó, mật độ vi khuẩn *Nitrosomonas* và *Nitrobacter* đã tăng cao trong môi trường và do vậy hoạt động mạnh hơn, khi thêm vào ammonium chúng sẽ chuyển hóa NH₄Cl thành nitrate rất nhanh.

5 KẾT LUẬN

5.1 Hệ thống lọc sinh học nước ngọt

- Trong hệ thống nước ngọt, pH giảm nhẹ vào cuối thí nghiệm. DO ở nghiệm thức module luôn thấp hơn đối chứng, do hoạt động vi khuẩn phong phú hơn.
- Tốc độ loại bỏ nitrate sau ngày thứ 9 ở nghiệm thức module nhanh hơn đối chứng
- Sự nitrate hóa xảy ra nhanh hơn ở chu kỳ thứ ba so với chu kỳ thứ nhất và thứ hai
- Quần thể vi khuẩn trong nghiệm thức module đa dạng hơn đối chứng.

5.2 Hệ thống lọc sinh học nước mặn

- pH cũng giảm vào cuối thí nghiệm. DO ở nghiệm thức module luôn thấp hơn đối chứng;
- Tốc độ loại bỏ nitrate ở nghiệm thức module nhanh hơn đối chứng;
- Sự đa dạng quần thể vi sinh trong 2 nghiệm thức tương tự nhau.

LỜI CẢM ƠN

Xin chân thành cảm ơn Giáo Sư Willy Vertraete, Tom Defoird và Tom Vercauteren, thuộc Phòng thí nghiệm sinh thái và kỹ thuật vi sinh, bộ môn sinh hóa và kỹ thuật vi sinh, khoa Nông nghiệp và vi sinh ứng dụng, đã nhiệt tình giúp đỡ chúng tôi trong công việc thiết kế thí nghiệm cũng như xử lý số liệu và viết báo cáo. Kinh phí thực hiện thí nghiệm từ dự án giáo dục mức C1 và VLIR R1.2.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bremner, J.M. and R.D. Keeney, 1965. Stem distillation methods for determination of ammonium, nitrate and nitrite. *Anal. Chem. Acta* 31, 485-495.
- Boon N., W. DeWindt, W. Vertraete and E.M. Top, 2002. Evaluation of nested PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) with group-specific 16S rRNA primer for the analysis of bacterial communities from different wastewater treatment plants. *FEMS Microbiology Ecology* Vol. 39, 101-112.
- Chen, J.C. and Y. Lee, 1997. Effects of nitrite on mortality, ion regulation and acid-balance of *Macrbrachium rosenbergii* at different external chloride concentrations. *Aquaculture Toxicol.* 39, 291-305.
- Clark, E.R., J.P. Harman and J.R.M. Forster, 1985. Production of metabolic and waste products by intensively farmed Rainbow Trout, *Salmo gairdneri Richardson*. *J. Fish Biology*, 27, 381-393.
- Focht, D.D. and W. Vertraete, 1997. Biochemical ecology of nitrification and denitrification. In: Alexander, M. (Ed.), *Advances in Microbial Ecology*. Plenum Press, New York, pp. 135-214.
- Foster, R.P. and L. Goldstein, 1996. Formation of excretory products. In: Hoar, W.S., Randall, D.J. (Eds), *Fish Physiology*. Academic Press, New York, pp. 313-350.
- Frances, J., B.F. Nowak and G.L. Allan, 2000. Effects of ammonia on juvenile silver perch (*Bidyanus bidyanus*). *Aquaculture* 183, 95-103.
- Greenberg, A.E., L.S. Clesceri and A.D. Eaton, 1992. Standard methods for the examination of water and wastewater. APHA, Washington, 18th Edition, p 5-7.
- Grommen R., I. Van Hautegehem, M. Van Wambeke and W. Vertraete, 2002. An improved nitrifying enrichment to remove ammonium and nitrite from freshwater aquaria systems. *Aquaculture*, 211, 115-124.
- Hargreaves, J.A., 1998. Nitrogen biogeochemistry of aquaculture ponds. *Aquaculture* 166, 181-212.
- Kowalchuk, G.A. and J.R. Stephen, 2001. Ammonia-oxidizing bacteria: A model for molecular microbiology ecology. *An. Rev. Microbiology* 55, 485-529.
- Mazik, P.M., M.L. Hinman, D.A. Winkelmann, S.J. Klaine, B.A. Simco and N.C. Parker, 1991. Influence of nitrite and chloride concentrations on survival and hematological profiles of striped bass. *Trans. Am. Fish. Soc.* 120, 247-254.
- Muyzer, G., E.C. Dewaal and A.G. Uiterlinden, 1993. Profiling of complex microbial-populations by Denaturing Gradient Gel-Electrophoresis of Polymerase Chain Reaction-Amplified genes - coding for 16S ribosomal -RNA. *Application Environment Microbiology* 59, 695-700.
- Reagan, J.M., G.W. Harrington and D.R. Noguera, 2002. Ammonia and nitrite oxidizing bacteria communities in a pilot scale chloraminated drinking water distribution system. *Application Environment Microbiology* 68, 73-81.
- Rychly, J., 1980. Nitrogen Balance in Trout. 2. Nitrogen-excretion and retention after feeding diets with varying protein and carbohydrate-levels. *Aquaculture* 20, 343-350.
- Schrijver, P.D., 2005. Luận văn tốt nghiệp.
- Van Rijn, J. and G. Rivera, 1990. Aerobic and anaerobic biofiltration in an aquaculture unit nitrite accumulation as a result of nitrification and denitrification. *Aquaculture Engineering* 9, 217-234.
- Van Rijn, J., M. Shilo, T. Bejerano and S. Nizan, 1990. The effect of inorganic nitrogen on microorganisms and fish in fish ponds. In: Sarig, S., Rosenthal, H. (Eds), *Research in Modern Aquaculture. Proceeding of the 3th Status Seminar held from April 27 to May 1 1987, Plaza Hotel, Tiberias, Israel, under the auspice of the German Israeli Cooperation in Science and Technology. Special Publication of European Aquaculture Society, vol. 11, EAS, Oostene, pp. 3-27.*