

NGHIÊN CỨU MỘT SỐ ĐIỀU KIỆN THÍCH HỢP CHO SINH TRƯỞNG VÀ TẠO BIOFILM CỦA CÁC CHỦNG VI KHUẨN KHỬ NITRATE

Hoàng Phương Hà¹, Nguyễn Quang Huy², Hoàng Thị Yến¹

¹Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

Ngày nhận bài: 08.9.2014

Ngày nhận đăng: 20.8.2015

TÓM TẮT

Quá trình khử nitrate là bước tiếp theo của quá trình nitrate hóa. Quá trình khử nitrate xảy ra trong điều kiện kỵ khí sử dụng các chất hữu cơ như nguồn cacbon và nitrate như chất nhận điện tử cuối cùng. Các chủng vi khuẩn khử nitrate có khả năng tạo màng sinh học (biofilm) và được gắn trên chất mang để ứng dụng trong công nghệ xử lý nước bị ô nhiễm nitrate. Quá trình này được thực hiện đồng thời với quá trình nitrate hóa, lúc này vi khuẩn nitrate hóa cần oxy nằm trên màng biofilm, còn vi khuẩn khử nitrate nằm dưới màng biofilm. Việc lựa chọn các điều kiện thích hợp cho sự sinh trưởng và tạo màng biofilm của vi khuẩn khử nitrate là mục tiêu của nghiên cứu này. Hai chủng vi khuẩn D10 và D32 có khả năng khử nitrate và tạo biofilm cao nhất, chúng thích nghi ở pH 6,5-7; nhiệt độ 37°C; nồng độ các chất hữu cơ Methanol và Ethanol (M_1 , E_2) là 0,006 % thì hiệu suất khử $N-NO_3^-$ đạt 80% và 100% tương ứng. Khi có oxy quá trình khử nitrate vẫn xảy ra ở chủng D32 nhưng chỉ đạt hiệu suất 25,8%. Kết quả xác định vị trí phân loại của 2 chủng vi khuẩn lựa chọn dựa vào phân tích trình tự gen 16S rRNA của chúng cho thấy, chủng D10 gần với loài *Bacillus fusiformis*, D32 gần với *Pseudomonas denitrificans*.

Từ khóa: Chất mang, chế phẩm, chất hữu cơ, khử nitrate, màng sinh học

MỞ ĐẦU

Sự ô nhiễm nitrate trong các nguồn nước ngày càng trở nên nghiêm trọng, đặc biệt đối với nguồn nước ăn uống đang là vấn đề báo động ở nhiều nơi trên thế giới. Nguyên nhân chính là do ô nhiễm amoni từ nhiều nguồn nước thải, sử dụng phân hóa học không đúng cách, bên cạnh đó còn dùng nước thải sinh hoạt để tưới tiêu và sự thay đổi mô hình trồng trọt. Các hợp chất nitơ được chuyển đổi trong đất thông qua hoạt động của vi sinh vật, kết quả là nitrate được hình thành, chúng là các ion dễ biến đổi và dễ thẩm thấu qua các tầng đất để vào tầng nước ngầm.

Ngày nay, nhiều nước trên thế giới sử dụng nguồn nước ngầm như một nguồn nước cho ăn uống đặc biệt ở các vùng khô hạn như Saudi Arabia, riêng Trung Quốc có tới 50% các thành phố sử dụng nguồn nước ngầm làm nước ăn uống (Wang *et al.*, 2009). Khi con người ăn phải nguồn nước bị nhiễm nitrate sẽ dẫn đến hiện tượng rối loạn máu do máu không đủ oxy nuôi cơ thể (methaemoglobinaemia), sinh ra hội chứng xanh da ở trẻ em dưới 6 tháng tuổi. Nitrate chuyển hóa

thành nitrite trong ruột là nguyên nhân hình thành các hợp chất nitrosoamine - là hợp chất gây ung thư trong bộ máy tiêu hóa của người và động vật. Ô nhiễm nitrate không những gây hại cho con người mà còn ảnh hưởng lớn đến hệ sinh thái, với hàm lượng vượt quá 10 mg/l gây nên sự phú dưỡng, ảnh hưởng lớn đến môi trường thủy sinh.

Việt Nam là nước có nền nông nghiệp phát triển. Sự lạm dụng phân bón hóa học cho sản xuất nông nghiệp là một trong những nguyên nhân dẫn đến ô nhiễm nitrate trong nước ngầm. Tình trạng nước ngầm bị ô nhiễm các hợp chất nitơ ngày càng trở nên trầm trọng. Đối với các hệ nuôi trồng thủy sản, môi trường nước nuôi cũng thường bị ô nhiễm bởi các hợp chất nitơ do sự phân hủy của lượng thức ăn dư thừa và phế thải từ động vật nuôi. Để loại bỏ các hợp chất chứa nitơ này, rất nhiều mô hình của quá trình nitrate hóa - khử nitrate được sử dụng. Hệ thống xử lý nitrate với màng sinh học (biofilm) đang được sử dụng rộng rãi đặc biệt đối với nước ăn uống (McAdam *et al.*, 2006). Do vậy, lựa chọn các chủng vi khuẩn khử nitrate có khả năng tạo biofilm và nghiên cứu một số điều kiện thích hợp cho sinh trưởng và hoạt tính khử nitrate của chúng là mục tiêu của bài báo.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Các chủng vi khuẩn khử nitrate được phân lập trong điều kiện hiếu khí từ mẫu nước thải Phú Đô, Minh Khai, trạm xử lý Trúc Bạch. Môi trường nuôi cấy vi khuẩn khử nitrate với các thành phần như sau (g/L): Pepton (5), NaCl (5), cao nấm men (2), cao thịt (1), NaNO₃ (0,1), thạch (15), pH môi trường 7,5, nhiệt độ nuôi cấy và phân lập 37°C (Atlas, 1995).

Phương pháp

Xác định khả năng sinh khí N₂ trong ống Dulhan: chuyển môi trường nuôi cấy vi khuẩn vào ống nghiệm có chứa ống Durham, tiến hành thí nghiệm trong điều kiện kỵ khí (toàn bộ dụng cụ và môi trường đều ở trạng thái vô trùng), cấy vi khuẩn vào từng ống nghiệm, đẩy nút cao su, sau 6 - 7 ngày nếu vi khuẩn có khả năng khử nitrate sẽ sinh khí trong ống phao (Durham) và đẩy ống lên phía trên dịch nuôi cấy, ngược lại nếu vi khuẩn không có khả năng khử nitrate sẽ không thấy hiện tượng này.

Đánh giá khả năng tạo màng sinh vật của vi sinh vật theo Mohamed *et al.*, (2004): các chủng vi khuẩn được nuôi riêng rẽ trong môi trường dịch ở điều kiện hiếu khí ở 37°C trong 2 ngày, xác định mật độ tế bào bằng cách đo mật độ quang học ở $\lambda = 600$ nm (OD₆₀₀), sau đó chuyển dịch nuôi cấy vi khuẩn và môi trường dịch thể theo tỷ lệ 1:7 tương ứng vào ống eppendorf và ủ tiếp 1 ngày, loại dịch nuôi cấy đi và rửa lại 2 lần ống nuôi cấy bằng nước cất vô trùng, sau đó bổ sung 1 ml dung dịch tím kết tinh 1% và giữ trong 20 phút ở nhiệt độ phòng, loại bỏ dung dịch tím kết tinh, rửa sạch 2 lần bằng nước cất và quan sát sự bắt màu của màng sinh học bám trên thành ống với tím kết tinh. Xác định được mật độ màng sinh học tạo thành nhiều hay ít bằng cách: ống eppendorf sau khi bắt màu với tím kết tinh được tráng rửa bằng nước cất 2 lần, các tinh thể bám vào thành ống eppendorf được hòa tan trong 1 ml etanol 70°C, đo độ hấp thụ dịch này ở $\lambda = 570$ nm trên máy quang phổ kế. Sự hình thành màng sinh học tỷ lệ thuận với chỉ số OD₅₇₀ tạo thành.

Các phương pháp xác định hóa học: Định lượng amoni theo Nessler, định lượng NO₂⁻ theo phương pháp Griss, định lượng NO₃⁻ theo phương pháp Brucine (Franson, 1995).

Nghiên cứu ảnh hưởng của oxy: chủng D32 nuôi trong dịch môi trường chứa 30 mg N-NO₃/l (thể tích

500ml) được đặt trong hai điều kiện: sục khí và yếm khí. Sau hai ngày ủ mẫu các chỉ số nitrate và nitrite được phân tích; Ảnh hưởng của pH: các giá trị pH được thay đổi trong môi trường nuôi vi khuẩn chứa 20 mg N-NO₃⁻/L là 5; 6; 6,5; 7; 7,5; 8; 9 và 9,5. Ảnh hưởng của nhiệt độ: dải nhiệt độ cho thí nghiệm được tiến hành là 5; 15; 20; 30 và 37°C, môi trường nuôi ban đầu chứa 25 mg N-NO₃/L; Ảnh hưởng của nguồn hữu cơ: nguồn NO₃⁻ bổ sung trong môi trường nuôi vi khuẩn là 40 mg N/L và được so sánh hoạt tính khử nitrate khi bổ sung nguồn hữu cơ là methanol và ethanol (M1, E2) với nồng độ lần lượt là 0,003% và 0,006%.

Vi khuẩn được định loài dựa trên trình tự gen 16S rRNA được tiến hành theo Moore (1996). Gen 16S rRNA có độ dài 1,5 kb. DNA plasmid tái tổ hợp trên được tinh sạch bằng bộ sinh phẩm Invitrogen và giải trình tự trên ABI 3100 (Applied Biosystems).

Thống kê sinh học

Sử dụng phương pháp xử lý thống kê sinh học bằng phần mềm Excel: tính toán kết quả trung bình của các kết quả thí nghiệm với số lần lặp lại thí nghiệm là 3 và phép tính sai số.

KẾT QUẢ THẢO LUẬN

Phân lập và tuyển chọn

Ba mẫu nước thải bị ô nhiễm amoni được sử dụng để phân lập vi khuẩn có khả năng sinh trưởng trên môi trường khử nitrate. Kết quả trong 32 chủng vi khuẩn được phân lập có 9 chủng có khả năng khử nitrate bằng phân tích khả năng sinh khí của chúng trong ống Dulhan. Các chủng này được gọi tên lần lượt là D2, D4, D10, D14, D18, D21, D27, D28 và D32. Khả năng sinh khí nhiều hay ít phụ thuộc vào ống Dulhan được đẩy lên cao hay thấp, kết quả cho thấy, bốn chủng D2, D10, D18 và D32 có khả năng sinh khí nhiều nhất (kết quả không được trình bày).

Xác định hoạt tính khử nitrate của các chủng tuyển chọn

Bốn chủng D2, D10, D18 và D32 được tiến hành nghiên cứu hoạt tính khử nitrate của chúng trong điều kiện kỵ khí. Hoạt tính khử nitrate dựa vào sự giảm nitrate hoặc xuất hiện nitrite trong môi trường nuôi cấy dịch thể. Hàm lượng nitrate ban đầu trong môi trường nuôi cấy là 20 mg N-NO₃, thí nghiệm được theo dõi trong 32 giờ. Cứ sau 16 giờ, mẫu được lấy ra để đánh giá các thành phần nitrate và nitrite.

Bảng 1. Biến động hàm lượng N-NO₃ và N-NO₂ trong môi trường nuôi vi khuẩn.

Thời gian	0 h		16 h		32 h	
	N-NO ₃ (mg/l)	N-NO ₂ (mg/l)	N-NO ₃ (mg/l)	N-NO ₂ (mg/l)	N-NO ₃ (mg/l)	N-NO ₂ (mg/l)
Chủng vi khuẩn						
D2	22,4	0	0,02	2,9	0,01	0,58
D10	22,9	0	0,04	3,03	0,03	0,28
D18	23,0	0	0,03	4,11	0,05	0,64
D32	22,5	0	0,01	2,9	0,02	0

Kết quả nhận được từ bảng 1 cho thấy, hàm lượng nitrate hầu như không còn trong môi trường nuôi cấy của cả 4 chủng vi khuẩn nghiên cứu chỉ sau 16 giờ, còn lượng nitrite trong môi trường nuôi cấy lại tăng lên, chứng tỏ phản ứng khử nitrate đã xảy ra, chuyển nitrate thành nitrite và lượng nitrite này giảm đi ở giờ thứ 32.

Với mục tiêu lựa chọn những vi khuẩn không những có khả năng khử nitrate mà còn có khả năng tạo màng sinh học, nên 4 chủng D2, D10, D18 và D32 được nghiên cứu khả năng biofilm. Các chỉ số

OD₆₀₀ (sinh trưởng của vi khuẩn) và OD₅₇₀ (màng sinh học) được chỉ ra ở bảng 2.

Kết quả cho thấy, chỉ trong 1 ngày nuôi tinh lượng sinh khối đưa vào ban đầu rất ít (phần phương pháp) nhưng 4 chủng vi khuẩn nghiên cứu đã thể hiện rõ khả năng sinh trưởng riêng cho mỗi loài, hai chủng D10 và D32 vừa có khả năng sinh trưởng tốt lại tạo màng biofilm cao (Bảng 2). Kết quả này còn được khẳng định bằng khả năng bắt màu với tím kết tinh của 4 chủng vi khuẩn nghiên cứu, khả năng bắt màu của chủng D10 và D32 là đậm nhất (kết quả không được trình bày).

Bảng 2. Khả năng tạo màng sinh học của các chủng nghiên cứu.

Chủng	OD ₆₀₀	OD ₅₇₀
D2	0,08	0,762
D10	0,348	1,775
D18	0,318	1,337
D32	0,496	1,723

Ảnh hưởng của một số điều kiện đến hoạt tính khử nitrate của vi khuẩn nghiên cứu

Ảnh hưởng của oxy

Hai chủng D10 và D32 đều sinh trưởng tốt trong điều kiện hiếu khí và có hoạt tính khử nitrate cao trong điều kiện kỵ khí, như vậy cả hai chủng vi khuẩn này thuộc nhóm vi khuẩn yếm khí tùy nghi. Ngoài ra chúng còn có khả năng tạo màng sinh học tốt, nhưng chủng D32 vẫn trội hơn chủng D10 nên chúng tôi lựa chọn chủng D32 cho các

nghiên cứu tiếp theo. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của oxy đến hoạt tính khử nitrate của chủng D32 đã cho thấy, trong điều kiện có oxy, khả năng khử nitrate vẫn xảy ra nhưng chỉ đạt hiệu suất 25,8%, còn trong điều kiện yếm khí hiệu suất khử nitrate đạt 82% (Bảng 3). Như vậy, khi có oxy quá trình khử nitrate vẫn xảy ra mặc dù hiệu suất không cao. Đây cũng là tính chất rất quan trọng trong công nghệ loại bỏ các hợp chất chứa nitơ khi kết hợp với các chủng vi khuẩn nitrate hóa trên hệ thống biofilm.

Bảng 3. Ảnh hưởng của oxy không khí đến quá trình khử nitrate.

Điều kiện thí nghiệm	Lượng nitrate ban đầu (mg N-NO ₃)	Lượng N-NO ₃ ⁻ bị khử(mg/l)	Lượng N-NO ₂ ⁻ sinh ra(mg/l)	Hiệu suất khử N-NO ₃ ⁻ (%)
Hiếu khí (ĐC)	30	7,76	1,368	25,8%
Thiếu khí (TN)	30	24,6	0,77	82%

Ảnh hưởng của pH, nhiệt độ

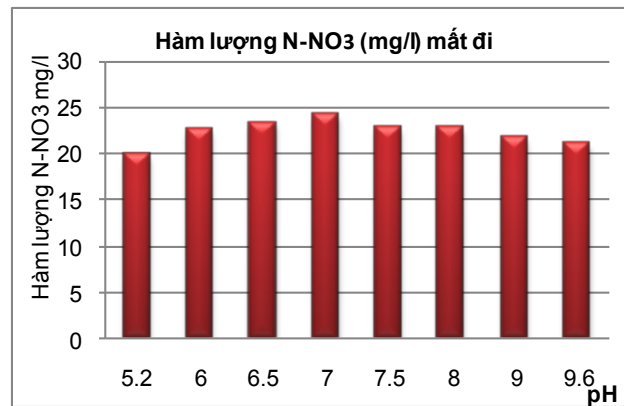
Quá trình khử nitrate xảy ra với tốc độ cao ở pH trong khoảng 6 ÷ 8 và tối ưu ở 6,5 ÷ 7,0. Đây là giá

trị pH thường gặp đối với các nguồn nước ngầm ở các tỉnh đồng bằng miền Bắc nước ta, quá trình khử nitrate vẫn xảy ra bình thường mà không ảnh hưởng đến pH môi trường (Hình 1). Nghiên cứu của Wang

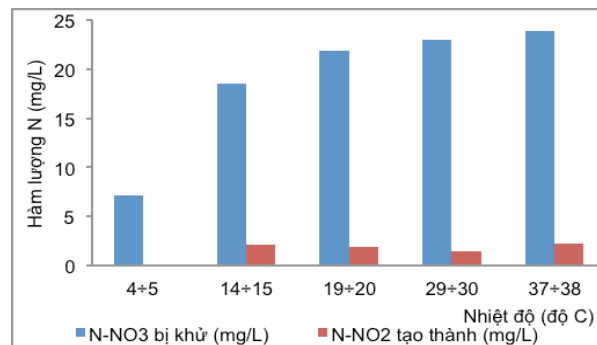
et al., (2009) khi nghiên cứu quá trình khử nitrate trong nước ngầm bị nhiễm nitrate thì quá trình này tối ưu ở pH 7-7,5.

tính khử nitrate, kết quả nghiên cứu cũng chỉ ra, hoạt tính khử nitrate xảy ra với tốc độ đáng kể ở nhiệt độ từ 20 ÷ 37°C và tối ưu ở 37°C, hoạt tính này hầu như không xuất hiện khi nhiệt độ xuống tới 5°C (Hình 2).

Nhiệt độ cũng không ảnh hưởng nhiều đến hoạt



Hình 1. Ảnh hưởng của pH đến khả năng khử nitrate của D32.



Hình 2. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng khử nitrate của D32.

Ảnh hưởng của nguồn hữu cơ

Quá trình khử nitrate được thực hiện phải bổ sung nguồn carbon hữu cơ như chất nhận điện tử. Khi bổ sung chất hữu cơ hoạt tính khử nitrate tăng lên rõ rệt. Trong thí nghiệm này, sinh khối của chủng D32 được chuyển vào bình có thể tích 500 ml, bổ sung NO₃⁻ và hai chất hữu cơ methanol (M₁) và etanol (E₂) với nồng độ lần lượt là 0,003% và 0,006%. Kết quả nhận được cho thấy với nồng độ M₁, E₂ là 0,003% thì hiệu suất khử NO₃⁻ đạt 55% và 72% tương ứng. Nhưng khi tăng nồng độ M₁, E₂

đến 0,006 % thì hiệu suất khử N- NO₃⁻ đạt 80% và 100% tương ứng. Như vậy, khi thêm nguồn carbon hữu cơ đã tăng rõ rệt hiệu suất khử NO₃⁻. Theo tổng hợp của Soares (2000) cũng đã cho thấy, rất nhiều nghiên cứu đã sử dụng methanol và ethanol làm nguồn carbon hữu cơ cho quá trình khử nitrate đạt hiệu quả trên 90% đối với nhóm vi khuẩn khử nitrate dị dưỡng. Nghiên cứu của Green *et al.*, (1994) cho thấy, sử dụng ethanol trong bể phản ứng USB (upflow sludge blanket reactor) cho hệ khử nitrate chứa vi khuẩn *Pseudomonas denitrificans* đã xử lý được 19,2 Kg N/ngày.

Bảng 4. Ảnh hưởng của nồng độ chế phẩm đến hiệu suất khử NO_3^-

Điều kiện thí nghiệm	Lượng N-NO_3^- mg/l được loại bỏ	
	Nồng độ chế phẩm 0.003 %	Nồng độ chế phẩm 0.006 %
Không chế phẩm (đối chứng)	18,0	18,0
Chế phẩm M_1	22,0	32,0
Chế phẩm E_2	29,0	40,0

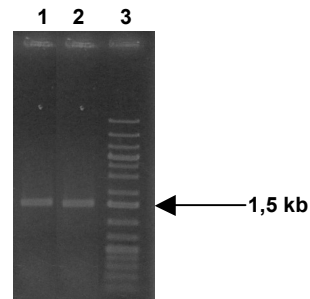
Định loại vi khuẩn khử nitrate

D10 và D32 không những có khả năng khử nitrate hóa cao mà còn có khả năng tạo biofilm tốt nên được lựa chọn để xác định vị trí phân loại của nó. Gen 16S rRNA của D10 và D32 đã được tách dòng và xác định trình tự (Hình 3, Bảng 5). Kết quả phân tích PCR của gen 16S rRNA với cặp mồi lựa chọn cho thấy sự hiện diện duy nhất của băng DNA được khuếch đại có kích thước 1,5 kbp.

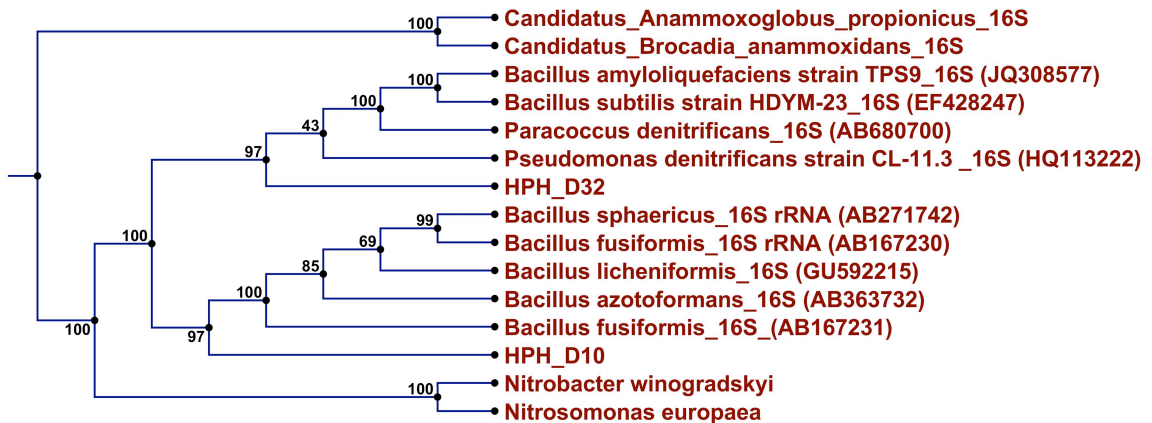
Kết quả này hoàn toàn phù hợp với tính toán lý thuyết, sau khi tinh sạch sản phẩm PCR tiến hành đọc trình tự gen.

Trình tự gen 16S rRNA của hai chủng vi khuẩn này đã được xử lý bằng phần mềm BLAST, CLC sequence Viewer để so sánh với trình tự gen mã hóa 16S rRNA của các đại diện khác trên Ngân hàng Gen quốc tế. Mọi quan hệ phát sinh chủng loại của 2 chủng vi khuẩn này

cho thấy (Hình 4), trình tự gen16S rRNA của chủng D10 có độ tương đồng 98% so với trình tự của *Bacillus fusiformis* và *B. sphaericus*. Trình tự gen16S rRNA chủng D32 có độ tương đồng 98% so với trình tự của *Pseudomonas denitrificans* và *Paracoccus denitrificans*.



Hình 3. Sản phẩm PCR: Giếng1. Chủng D10; Giếng 2. Chủng D32; Giếng 3. Maker 1Kb.



Hình 3. Cây phát sinh chủng loại của hai chủng D10 và D32.

KẾT LUẬN

Từ ba mẫu nước thải Phú Đô, Minh Khai, trạm xử lý Trúc Bạch (Hà Nội), 9 chủng vi khuẩn khử nitrate đã được phân lập, trong đó có 2 chủng D10 và

D32 không những có hoạt tính khử nitrate cao mà còn có khả năng tạo biofilm cao. Hoạt tính khử nitrate của D32 tối ưu ở pH 6,6-7; nhiệt độ 37°C; nồng độ methanol và ethanol (M_1 , E_2) là 0,006 % bổ sung thêm vào môi trường nuôi cấy đã làm hiệu suất

khử N- NO₃ lên tương ứng 80% và 100%. Khi có oxy quá trình khử nitrate vẫn xảy ra ở chủng D32 nhưng chỉ đạt hiệu suất 25,8%.

Bằng phương pháp phân tích trình tự gen 16S rRNA, đã xác định vị trí phân loại của 2 chủng vi khuẩn nghiên cứu D10 và D32. Chủng D10 gần với loài *Bacillus fusiformis* còn chủng D32 gần với loài *Pseudomonas denitrificans*

Lời cảm ơn: Các thí nghiệm được tiến hành bằng nguồn kinh phí từ đề tài nghiên cứu phát triển công nghệ màng sinh học biofilm trong xử lý nước thải giàu nito và phốt pho do Bộ công thương tài trợ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Atlas RM (1995) Media for environmental microbiologists. CRC Press USA342-344.

Franson MAH (1995) Standard methods for the examination of water and wastewater, Publication Office American Public Health Association-Washington, DC

20005, 19th Edition: 225-227; 240-243; 461-464.

Green M, Tarre S, Schnizer M, Bogdan B, Armon R and Shelef G (1994) *Water Res* 28: 631-637.

McAdam EJ, Judd SJA (2006) Review of membranebioreactor potential for nitrate removal from drinking water. *Desalination* 196: 135-148.

Mohamed JA, Huang W, Nallapareddy SR, Teng F and Murray BE (2004) Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates and various genes on biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun* 72: 3658-63.

Moore DD (1996) Purification and concentration of DNA from aqueous solutions. In *Current protocols in Molecular Biology*. Ausubel FM., Brent R., Kingston RE., Moore DD, Sidman GJ, Smith JA, Struhl K (eds), John Wiley & Sons Inc. Wiley Chichester 2: 2.1.1-2.1.10.

Soares MIM (2000) Biological denitrification of groundwater. *Water, Air, and Soil Pollution* 123: 183-193.

Wang Q, Feng C, Zhao Y, Hao C (2009) Denitrification of nitrate contaminated groundwater with a fiber-based biofilm reactor. *Bio Tech* 100: 2223-2227.

INVESTIGATION OF SUITABLE CONDITIONS FOR THE GROWTH AND PRODUCING BIOFILM OF DENITRIFYING BACTERIA

Hoang Phuong Ha^{1,✉}, Nguyen Quang Huy², Hoang Thi Yen¹

¹*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science technology*

²*University of Science, Vietnam National University, Hanoi*

SUMMARY

Denitrification occurs under anaerobic conditions, utilizing organic substances such as a carbon source and nitrate as the terminal electron acceptor. Some bacteria strains that are capable of producing biofilm and are attached to the carrier for the applications of the nitrate contaminated water treatment. This process is done simultaneously with the process of nitrification, nitrifying bacteria on the biofilm surface (oxic zone), denitrifying bacteria under biofilm (anoxic zone). The selection of suitable conditions for the growth and production of biofilm of denitrifying bacteria is the target of this research. Two strains D10 and D32 are capable to reduce nitrate and created the best biofilm. Optimal conditions for the strain growth were: 37°C, pH 6.6 - 7. Supplementation of 0.006% M1, E2 (methanol, ethanol) increased the reducing N-NO₃ to 80% and 100% respectively. Denitrification process still occurred in aerobic condition but with lower efficiency (25.8%) by D32 strain. Based on 16S rRNA gene analysis, D10 strain was the closest relative with *Bacillus fusiformis*, D32 closest to *Pseudomonas denitrificans*.

Keywords: Carrier, product, denitrification activity, biofilm, denitrification

✉ Author for correspondence: Tel: +84-4-37564295; Fax: +84-4-38363144; E-mail: ha27682002@yahoo.com