



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ**

(11)



2-0002507

(51)⁷ **C12N 1/00**

(13) **Y**

(21) 2-2017-00243

(22) 16/08/2017

(45) 25/11/2020 392

(43) 25/12/2017 357A

(73) Viện Tài nguyên và Môi trường biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)

Số 246 đường Đà Nẵng, quận Ngô Quyền, thành phố Hải Phòng

(72) Đỗ Mạnh Hào (VN); Trần Đình Lân (VN); Đào Thị Ánh Tuyết (VN).

(54) **QUY TRÌNH SẢN XUẤT CHẾ PHẨM SINH HỌC XỬ LÝ CHẤT Ô NHIỄM AMONIAC VÀ NITRIT**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm sinh học xử lý chất ô nhiễm amonia và nitrit, trong đó quy trình này bao gồm hai công đoạn chính là làm giàu quần xã vi khuẩn và thu hồi chế phẩm sinh học. Trong đó, khác biệt ở chỗ giải pháp hữu ích cho phép nhân và chọn lọc cả quần xã vi khuẩn có khả năng oxi hóa amoni thành nitrit và vi sinh vật oxy hóa nitrit thành nitrat từ mẫu bằng kỹ thuật bổ sung dần cơ chất trên cơ sở kiểm soát thông số $\text{NH}_4^+ - \text{N}$, $\text{NO}_2^- - \text{N}$, $\text{NO}_3^- - \text{N}$ và pH trong môi trường nuôi cấy để kích thích chọn lọc quần thể vi khuẩn hữu ích. Quy trình sản xuất chế phẩm sinh học xử lý chất ô nhiễm amonia và nitrit theo giải pháp hữu ích cho phép chọn lọc quần xã vi khuẩn ngay từ mẫu thực địa nên có khả năng thích nghi và không phá vỡ mối liên hệ hữu cơ giữa các vi khuẩn trong quần thể.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực công nghệ vi sinh và công nghệ xử lý môi trường. Cụ thể, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm sinh học để xử lý chất ô nhiễm amoniac và nitrit bằng phương pháp làm giàu nhiều bước quần xã vi khuẩn nitrat hóa từ môi trường tự nhiên.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Quá trình nitrat hóa sinh học đã được Schoesing và Müntz phát hiện năm 1877, nhưng đến năm 1890, nhà khoa học người Nga Winogradsky mới phân lập được các chủng vi khuẩn này. Nhờ những nhận định đúng đắn của mình, Winogradsky đã sử dụng môi trường khoáng vô cơ để phân lập. Sau đó, nhiều chủng vi khuẩn nitrat hóa đã được phân lập từ các môi trường khác nhau trên khắp thế giới. Theo công bố của Bergey và cộng sự (1989), nhóm vi khuẩn này gồm 11 loài thuộc 9 giống. Dựa vào đặc tính sử dụng cơ chất, vi khuẩn nitrat hóa được chia thành hai nhóm là nhóm oxy hóa amoniac thành nitrit và nhóm oxy hóa nitrit thành nitrat. Nhóm vi khuẩn oxy hóa amoniac gồm các loài thuộc giống *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosospira*, *Nitrosolobus* và *Nitrosovibrio*. Nhóm vi khuẩn oxy hóa nitrit gồm các loài thuộc giống *Nitrobacter*, *Nitrospina*, *Nitrococcus* và *Nitrospira*.

Amoniac và nitrit là sản phẩm của quá trình phân hủy các chất thải giàu đạm từ nguồn chất thải sinh hoạt, nhà máy chế biến thức ăn, nuôi trồng thủy sản, v.v.. Hai chất này cũng được sinh ra thông qua bài tiết trực tiếp từ gia súc, gia cầm, vật nuôi. Nếu chúng không được xử lý mà thải trực tiếp vào nguồn nước xung quanh sẽ gây ô nhiễm môi trường. Amoniac và nitrit đều có tính độc đối với động vật thủy sinh. Amoniac ở dạng khí (NH_3) có thể gây độc cho động vật thủy sinh tại nồng độ rất thấp đến 0,01ppm (Maede, 1985). Sự có mặt của amoniac và nitrit không những gây độc trực tiếp đối với thực vật thủy sinh mà còn kích thích sự nở hoa của tảo dẫn đến mất cân bằng hệ sinh thái thủy vực.

Do đó, nhóm vi khuẩn này đã và đang được quan tâm nghiên cứu ứng dụng vào xử lý môi trường nói chung và nuôi trồng thủy sản nói riêng. Trước kia, đã có một số nghiên cứu thăm dò khả năng ứng dụng vi khuẩn nitrat hóa dựa trên các chủng vi

khuẩn thuần khiết riêng biệt. Tuy nhiên, nghiên cứu dựa trên các chủng vi khuẩn thuần khiết gặp nhiều khó khăn trong việc phân lập và lưu giữ. Vi khuẩn nitrat hóa sinh trưởng rất chậm, thời gian thế hệ dao động trong khoảng từ 12 đến 32 giờ (Ehrich et al., 1995), do đó rất khó phân lập được chủng thuần khiết. Đây là nhóm vi khuẩn hóa tự dưỡng nên việc chuẩn bị môi trường không có chất hữu cơ để nuôi và phân lập cũng không dễ dàng. Hơn nữa, vi khuẩn này thường bám vào các tinh thể như CaCO_3 trong môi trường cũng là rào cản để phân lập.

Gần đây, các nghiên cứu hướng vào việc làm giàu cả quần xã vi khuẩn nitrat hóa từ nguồn tự nhiên hơn là hướng vào một hoặc vài chủng vi khuẩn cụ thể nào đó. Grommen và cộng sự (2001) đã tiến hành làm giàu theo mẻ chế phẩm vi khuẩn nitrat hóa có tên thương mại là ABIL của hãng AVECOM (Bỉ) trong bể lên men dung tích 500L. Cơ chất được bổ sung hàng ngày để hỗ trợ cho sự sinh trưởng của vi khuẩn nitrat hóa. Để duy trì nguồn carbon, pH và giá thể bám, CaCO_3 cũng được bổ sung thường xuyên. Oxy được bổ sung bằng máy nén khí thông qua ống và các viên đá sỏi. Nhiệt độ nuôi cấy được duy trì tại nhiệt độ từ 22 đến 24°C. Quần xã vi khuẩn được cô đặc và đạt mật độ 0,5g VSS/L. Kết quả thử nghiệm chế phẩm này vào hệ thống nuôi cá cảnh nước ngọt rất tốt. Với liều lượng là 5mg VSS/L, nồng độ N (TAN, NO_2^- -N) đã giảm từ 10mg/L xuống dưới giới hạn phát hiện chỉ sau 4 ngày.

Shan và Obbard (2001) đã phát triển 2 phương pháp làm giàu để tạo ra chế phẩm nitrat hóa, đó là phương pháp làm giàu theo mẻ và làm giàu liên tục. Trong phương pháp làm giàu liên tục, cấy truyền mẫu vào bình tam giác dung tích 1000ml có chứa môi trường nuôi cấy thể tích 500ml. Nuôi vi khuẩn tại 30°C, trong tối và môi trường mới được bổ sung liên tục vào bình với tốc độ 4 ml/h. Nồng độ amoniac được bổ sung tăng dần trong chu kỳ nuôi. Quá trình nuôi kết thúc sau 40 ngày nuôi, thời điểm mà nồng độ cơ chất ở dòng ra được duy trì ở giá trị 0mg/L. Phương pháp nuôi theo mẻ, mẫu được cấy truyền vào bình tam giác dung tích 250ml chứa 100ml môi trường. Khi nồng độ cơ chất bị tiêu thụ gần hết thì cấy truyền sang môi trường mới với tỉ lệ 1:9 (v/v). Chế phẩm sau khi tạo màng trên mảnh vụn đất sét (clay pellet) đã cho khả năng loại bỏ amoniac rất tốt đối với nguồn nước nuôi tôm sú thâm canh ở Singapo.

Achuthan và cộng sự (2006) đã tạo ra 4 dạng chế phẩm đặt tên là chế phẩm oxy hóa amoniac (AMOPCU-1 và AMONPCU-1) và oxy hóa nitrit (NIOPCU-1 và NIONPCU-1). Chế phẩm được tạo thành bằng phương pháp làm giàu 2 bước từ nguồn

tự nhiên. Bước thứ nhất, mẫu thu thập từ tự nhiên được làm giàu trong chậu chứa môi trường khoáng và cát. Cơ chất được bổ sung định kỳ khi 90% cơ chất được loại bỏ. Na_2CO_3 cũng được bổ sung để ổn định pH và duy trì nguồn carbon. Ôxy được bổ sung bằng máy nén khí thông qua hạt đá sỏi. Giai đoạn này kéo dài đến khi 80-300mg NH_4^+ -N/L được tiêu thụ trong thời gian từ 90 đến 160 ngày. Bước thứ hai, 1ml mẫu hoặc 1g hạt lọc đã được làm giàu lần thứ nhất được cấy truyền sang bình tam giác 250ml chứa 100ml môi trường, nuôi trong tối trên máy lắc tại nhiệt độ phòng. Quá trình này kết thúc khi sự sinh trưởng của vi khuẩn bước sang pha ổn định. Thử nghiệm kích hoạt chế phẩm này trong bể phản ứng nitrat hóa của hệ thống nuôi sản xuất tôm giống cho kết quả tốt ở Ấn Độ.

Ở Việt Nam, việc nghiên cứu về nhóm vi khuẩn nitrat hóa cũng đang được quan tâm nghiên cứu. Các công trình chính có thể kể đến là đề tài “Nghiên cứu công nghệ xử lý bùn ao nuôi tôm góp phần làm sạch môi trường nuôi trồng thủy sản và sản xuất phân bón hữu cơ-vi sinh” do Đặng Đình Kim và cộng sự thực hiện năm 2012-2013. Đề tài đã phân lập thành công một số chủng vi khuẩn nitrat hóa và các chủng vi khuẩn khác từ bùn đáy ao nuôi tôm và thử nghiệm sản xuất chế phẩm vi sinh vật. Kết quả thử nghiệm cho thấy chế phẩm có khả năng xử lý tốt các chất ô nhiễm hữu cơ và các chất độc như amoniac và nitrit. Công trình nghiên cứu của tập thể tác giả thuộc trường Đại học Bách Khoa Hà Nội (Nguyễn Thị Thanh và Trần Lê Hà và cộng sự. 2006, 2007) cũng đã phân lập thành công một số chủng vi khuẩn nitrat từ các ao hồ ven Hà Nội, tuy nhiên kết quả đánh giá khả năng nitrat hóa cho thấy hiệu quả oxy hóa là rất thấp. Việc phân lập các chủng vi khuẩn thuần khiết không những mất thời gian và công sức mà hoạt lực của các loại chế phẩm được tạo thành từ các chủng riêng biệt thường yếu và kém thích nghi với môi trường.

Nhiều nghiên cứu chỉ ra những chế phẩm tạo ra từ các chủng vi khuẩn ngoại lai thường không phát huy hiệu quả xử lý vì kém thích nghi với điều kiện thổ nhưỡng ở địa phương và chịu sự cạnh tranh bởi khu hệ vi sinh vật bản địa. Hơn nữa, việc sử dụng các chế phẩm sinh học có nguồn gốc ngoại lai cũng gây ra những rủi ro đối với hệ sinh thái bản địa. Do đó, việc tạo ra chế phẩm có nguồn gốc từ vi sinh vật bản địa có khả năng thích ứng và phát huy được hiệu quả xử lý môi trường tốt hơn các chế phẩm có nguồn gốc ngoại lai và không gây ra những rủi ro cho hệ sinh thái địa phương.

Thông thường, mật độ của nhóm vi khuẩn nitrat hóa có mặt trong môi trường nước tự nhiên khoảng $10^2 - 10^3$ tb/ml, trong khi mật độ vi khuẩn tổng số là $10^5 - 10^6$ tb/ml, như vậy chỉ chiếm 1/1000 lần trong quần xã vi sinh vật. Hơn nữa, do vi khuẩn nitrat hóa có tốc độ sinh trưởng rất chậm với thời gian thế hệ khoảng 12-32 giờ nên thường sinh trưởng chậm và kém cạnh tranh so với các nhóm vi sinh vật khác. Do đó, khâu làm giàu mà tách được nhóm vi khuẩn nitrat hóa ra khỏi các nhóm vi khuẩn khác từ nguồn tự nhiên và tăng sinh khối của chúng là khâu mang tính quyết định đến sự thành công của quy trình sản xuất chế phẩm. Đặc biệt là trong những lần nhân giống đầu tiên khi vẫn còn có mặt các chất dinh dưỡng hữu cơ từ dịch cấy truyền là mẫu nước tự nhiên.

Do đó, giải pháp để tăng sinh khối nhóm vi khuẩn nitrat hóa và hạn chế các nhóm vi khuẩn khác phát triển là tăng số lần nhân giống. Tuy nhiên, sau mỗi lần cấy truyền, mật độ của vi khuẩn nitrat hóa tăng dần trong khi đó mật độ của các nhóm vi khuẩn khác lại giảm dần.

Nhiều nghiên cứu cho thấy vi khuẩn nitrat có khả năng thích ứng khác nhau với nồng độ cơ chất, có nhóm vi khuẩn có thể bị ức chế ở nồng độ cơ chất cao nhưng có nhóm vi khuẩn lại có thể sinh trưởng tốt tại nồng độ cơ chất cao.

Do đó, giải pháp bổ sung cơ chất vào dịch nuôi từ nồng độ thấp đến nồng độ cao sẽ kích thích sự phát triển của cả 2 nhóm vi khuẩn này. Như vậy, sau nhiều lần nhân giống, cấy truyền nhưng sự đa dạng của quần xã vi khuẩn nitrat vẫn được duy trì. Chế phẩm với sự đa dạng sinh học cao của quần xã vi khuẩn nitrat hóa không những có hiệu quả xử lý tốt mà còn có khả năng thích ứng cao với các điều kiện môi trường khác nhau.

Những nghiên cứu trước kia của chính tác giả đã cố gắng làm giàu thành 2 nhóm vi khuẩn oxy hóa amoniac và nhóm vi khuẩn oxy hóa nitrit, nhưng kết quả cho thấy hoạt lực của 2 chế phẩm này không cao, việc duy trì hoạt lực của chế phẩm trong quá trình bảo quản cũng gặp nhiều khó khăn.

Vi khuẩn nitrat hóa là nhóm vi khuẩn không có khả năng sinh bào tử và bào nhầy nên việc bảo quản trong thời gian dài với điều kiện giống như các chế phẩm có chứa các vi khuẩn sinh bào tử có thể làm cho vi khuẩn nitrat hóa bị bất hoạt hoặc giảm hoạt lực. Giải pháp cô đặc mẫu, bảo quản lạnh và tăng sinh từ chế phẩm gốc vừa giúp bảo

quản tốt được chế phẩm nhưng cũng giảm tối đa chi phí bảo quản (thiết bị làm lạnh, dụng cụ chứa và điện năng) và có tính khả thi cao.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích là khắc phục tình trạng nêu trên, cụ thể là giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm sinh học xử lý chất ô nhiễm amoniac và nitrit, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) Làm giàu quần xã vi khuẩn:

+ nhân quần xã vi khuẩn trong mẫu:

thu mẫu nước từ môi trường ô nhiễm bằng dụng cụ tiệt trùng và bảo quản ở điều kiện 4°C đến khi sử dụng làm mẫu sản xuất chế phẩm sinh học;

cấy 15ml mẫu nước thu được ở trên vào 135 ml môi trường khoáng vô cơ với tỷ lệ 1:10 (theo thể tích) đã được tiệt trùng, pH = 7,8 trong bình tam giác dung tích 250ml, sau đó tiến hành nuôi trong điều kiện tối với tốc độ lắc 120 vòng/phút, nhiệt độ nằm trong khoảng từ 28 đến 30°C;

xác định các thông số $\text{NH}_4^+ \text{-N}$, $\text{NO}_2^- \text{-N}$, $\text{NO}_3^- \text{-N}$ và pH trong môi trường nuôi cấy theo khoảng thời gian 6 giờ/lần và so sánh với thông số này với thời điểm trước đó, các thông số này tương ứng với tốc độ loại bỏ cơ chất của quần thể vi khuẩn trong mẫu;

bổ sung vào môi trường nuôi cấy dung dịch bao gồm nước biển tự nhiên lọc qua màng 0,2µm, nước cất có bổ sung (tính theo lít) 1 g K_2HPO_4 , 0,5 g MgSO_4 , 0,4 g FeSO_4 , 1g CaCO_3 và 1mg/l cơ chất NH_4Cl ở dạng dịch pha loãng với nồng độ 100 mg N/l được lọc qua màng 0,2µm theo lượng cơ chất tương ứng với thông số $\text{NH}_4^+ \text{-N}$, $\text{NO}_2^- \text{-N}$ được xác định trước đó, đồng thời duy trì pH=7,8 trong dung dịch bằng dung dịch Na_2CO_3 ; và

lặp lại quá trình xác định thông số và bổ sung môi trường nuôi cấy cho đến khi tốc độ loại bỏ cơ chất ở lần bổ sung cơ chất cuối cùng không tăng so với tốc độ loại bỏ cơ chất ở lần bổ sung cơ chất trước đó thu được dịch chứa quần xã vi khuẩn đã được làm giàu;

+ nhân chọn lọc quần xã vi khuẩn:

cấy 15ml dịch chứa quần xã vi khuẩn đã được làm giàu vào 135 ml môi trường khoáng vô cơ với tỷ lệ 1:10 (theo thể tích) đã được tiệt trùng pH =7,8 trong bình tam giác dung tích 250ml, sau đó tiến hành nuôi trong điều kiện tối với tốc độ lắc 120 vòng/phút, nhiệt độ nằm trong khoảng từ 28 đến 30°C;

xác định các thông số $\text{NH}_4^+ \text{-N}$, $\text{NO}_2^- \text{-N}$, $\text{NO}_3^- \text{-N}$ và pH trong môi trường nuôi cấy theo khoảng thời gian từ 1-3 ngày/lần và so sánh với thông số này với thời điểm trước đó, các thông số này tương ứng với tốc độ loại bỏ cơ chất của quần thể vi khuẩn trong mẫu;

bổ sung vào môi trường nuôi cấy dung dịch bao gồm nước biển tự nhiên lọc qua màng 0,2µm, nước cất có bổ sung (tính theo lít) 1 g K_2HPO_4 , 0,5 g MgSO_4 , 0,4 g FeSO_4 , 1g CaCO_3 và 1mg/l cơ chất NH_4Cl ở dạng dịch pha loãng với nồng độ 100 mg N/l được lọc qua màng 0,2µm theo lượng cơ chất tương ứng với thông số $\text{NH}_4^+ \text{-N}$, $\text{NO}_2^- \text{-N}$ được xác định trước đó, đồng thời duy trì pH=7,8 trong dung dịch bằng dung dịch Na_2CO_3 ;

lặp lại quá trình xác định thông số và bổ sung môi trường nuôi cấy cho đến khi tốc độ loại bỏ cơ chất ở lần bổ sung cơ chất cuối cùng không tăng so với tốc độ loại bỏ cơ chất ở lần bổ sung cơ chất trước đó thu được dịch chứa quần xã vi khuẩn được chọn lọc; và

cấy quần xã vi khuẩn đã được chọn lọc vào môi trường mới và lặp lại bước chọn lọc quần xã vi khuẩn đến khi tốc độ loại bỏ cơ chất tối đa trong lần chọn lọc quần xã vi khuẩn lần cuối cùng không tăng so với lần chọn lọc trước đó, thu được dung dịch chứa quần xã vi khuẩn chọn lọc đã được làm giàu; và

b) Thu hồi chế phẩm sinh học:

để lắng tự nhiên dung dịch chứa quần xã vi khuẩn chọn lọc đã được làm giàu thu được trên trong 24 giờ ở 4°C trong điều kiện tối, sau đó gạn bỏ phần dịch phía trên và thu hồi lớp cặn phía dưới;

cô đặc lớp cặn bằng cách chia phần cặn vào các ống falcon 50ml và tiến hành ly tâm lạnh với tốc độ ly tâm nằm trong khoảng từ 7.000 đến 8.000 vòng/phút trong 15 phút, sau khi loại phần dịch, phần kết tủa được huyền phù hóa trong môi trường nuôi mới, thu được chế phẩm sinh học dạng lỏng.

Chế phẩm sinh học thu được theo giải pháp hữu ích được bảo quản ở dạng chế phẩm gốc trong bình bằng nhựa hoặc thủy tinh có nắp kín, bổ sung thêm cơ chất là dung dịch NH_4Cl vô trùng tới nồng độ cuối cùng là 2mg/L ở nhiệt độ 4°C. Cứ sau 2 tháng lại tiến hành kiểm tra nồng độ cơ chất, nếu cơ chất hết lại bổ sung thêm cơ chất tới nồng độ cuối cùng là 2mg/L.

Khi sử dụng, chế phẩm cần được kích hoạt và tăng sinh khối để tăng lượng đủ để mục đích xử lý bằng cách cấy chế phẩm vào môi trường tăng sinh theo tỷ lệ 1:100 (v/v), điều kiện môi trường pH 7,8, lắc 120 vòng/phút, trong tối, nhiệt độ 28-30°C. Thời gian kích hoạt và nhân chế phẩm kéo dài khoảng từ 1 đến 5 ngày, phụ thuộc vào thời gian bảo quản chế phẩm. Bổ sung môi trường và tăng dần nồng độ cơ chất đến khi đạt lượng đủ cho mục đích sử dụng.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là hình vẽ thể hiện sơ đồ quy trình sản xuất và bảo quản chế phẩm sinh học theo giải pháp hữu ích.

Hình 2 là hình vẽ thể hiện sơ đồ quy trình làm giàu quần xã vi khuẩn nitrat hóa nhiều bước từ nguồn vi khuẩn bản địa ngoài tự nhiên.

Hình 3 là biểu đồ thể hiện tốc độ loại bỏ cơ chất NH_4^+-N (mg/l/h) của quần xã vi khuẩn trong các lần làm giàu.

Hình 4 là biểu đồ thể hiện khả năng sử dụng cơ chất NH_4^+-N (mg/l) của quần xã vi khuẩn trong các lần làm giàu.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Sau đây, giải pháp hữu ích sẽ được mô tả một cách chi tiết với các phương án thực hiện và các ví dụ minh họa cụ thể. Tuy nhiên, các phương án và các ví dụ thực hiện cụ thể này chỉ nhằm mục đích làm rõ bản chất của giải pháp hữu ích chứ không nhằm mục đích giới hạn phạm vi của giải pháp hữu ích.

Quy trình sản xuất chế phẩm sinh học xử lý chất ô nhiễm amoniac và nitrit theo giải pháp hữu ích bao gồm các bước: a) làm giàu quần xã vi khuẩn; và b) thu hồi chế phẩm sinh học.

Trong bước làm giàu quần xã vi khuẩn, bước này bao gồm hai công đoạn là nhân quần xã vi khuẩn trong mẫu và nhân chọn lọc quần xã vi khuẩn.

Trong công đoạn nhân quần xã vi khuẩn trong mẫu, mẫu nước từ môi trường ô nhiễm được thu nhận bằng dụng cụ tiệt trùng và bảo quản ở điều kiện 4°C đến khi sử dụng làm mẫu sản xuất chế phẩm sinh học. Trong các phương án ưu tiên, mẫu nước từ môi trường ô nhiễm này được thu trực tiếp từ môi trường cần được xử lý do ô nhiễm ô nhiễm amoniac và nitrit.

Tiến hành cấy 15ml mẫu nước thu được ở trên vào 135 ml môi trường khoáng vô cơ với tỷ lệ 1:10 (theo thể tích) đã được tiệt trùng, pH =7,8 trong bình tam giác dung tích 250ml. Môi trường khoáng vô cơ là môi trường nuôi cấy cơ bản đã được sử dụng trong nuôi cấy vi khuẩn. Sau đó tiến hành nuôi trong điều kiện tối với tốc độ lắc 120 vòng/phút, nhiệt độ nằm trong khoảng từ 28 đến 30°C.

Sau khi cấy, tiến hành xác định các thông số $\text{NH}_4^+ - \text{N}$, $\text{NO}_2^- - \text{N}$, $\text{NO}_3^- - \text{N}$ và pH trong môi trường nuôi cấy. Các phương pháp xác định các thông số này là đã biết và được sử dụng rộng rãi và không bị giới hạn bởi phương pháp bất kỳ. Các thông số này được xác định theo khoảng thời gian 6 giờ/lần. Tiếp đó tiến hành so sánh hai thông số với nhau, thông số tại thời điểm trước đó và thông số tại thời điểm liền kề sau đó. Từ các thông số này, xác định được tốc độ loại bỏ cơ chất amoni trong môi trường nuôi cấy của quần thể vi khuẩn trong mẫu. Trên cơ sở đó tính được lượng muối amoni được loại bỏ theo thời gian để từ đó xác định được lượng muối amoni cần bổ sung tương ứng.

Tiếp đó, bổ sung vào môi trường nuôi cấy dung dịch bao gồm nước biển tự nhiên lọc qua màng 0,2µm, nước cất có bổ sung (tính theo lít) 1 g K_2HPO_4 , 0,5 g MgSO_4 , 0,4 g FeSO_4 , 1g CaCO_3 và 1mg/l cơ chất NH_4Cl ở dạng dịch pha loãng với nồng độ 100 mg N/l được lọc qua màng 0,2µm. Lượng dung dịch được bổ sung được xác định theo lượng cơ chất NH_4Cl tương ứng với lượng cơ chất mất đi đã được xác định theo thông số $\text{NH}_4^+ - \text{N}$, $\text{NO}_2^- - \text{N}$ được xác định ở trên. Điều này đảm bảo lượng muối amoni trong dung dịch nuôi cấy cân bằng và ổn định, tránh sốc gây ảnh hưởng đến quần xã vi sinh vật. Duy trì pH=7,8 trong dung dịch bằng dung dịch Na_2CO_3 .

Tiến hành lặp lại quá trình xác định thông số và bổ sung môi trường nuôi cấy cho đến khi tốc độ loại bỏ cơ chất ở lần bổ sung cơ chất cuối cùng không tăng so với tốc độ loại bỏ cơ chất ở lần bổ sung cơ chất trước đó. Quá trình này được xác định là quần xã vi khuẩn phân hủy amoniac và nitrit phát triển đến ngưỡng tối đa và không có khả năng phát triển tiếp. Tiến hành thu dịch chứa quần xã vi khuẩn được làm giàu.

Trong công đoạn nhân chọn lọc quần xã vi khuẩn, tiến hành cấy 15ml dịch chứa quần xã vi khuẩn được làm giàu ở trên vào 135 ml môi trường khoáng vô cơ với tỷ lệ 1:10 (theo thể tích) đã được tiết trùng pH =7,8 trong bình tam giác dung tích 250ml. Công đoạn này tương tự với công đoạn nhân quần xã vi khuẩn trong mẫu với các điều kiện môi trường, điều kiện nuôi, lắc, cụ thể môi trường được nuôi trong điều kiện tối với tốc độ lắc 120 vòng/phút, nhiệt độ nằm trong khoảng từ 28 đến 30°C.

Việc xác định các thông số NH_4^+ -N, NO_2^- -N, NO_3^- -N và pH trong môi trường nuôi cấy và so sánh các thông số này được thực hiện giống như trong công đoạn nhân quần xã vi khuẩn trong mẫu, khác biệt ở chỗ các thông số này được xác định theo khoảng thời gian từ 1-3 ngày/lần. Điều này nhằm mục đích nhân chọn lọc quần xã phân hủy amoniac và nitrit do chu kỳ phát triển của các vi khuẩn này chậm hơn so với các vi khuẩn khác nên việc kéo dài thời gian tiếp diễn lượng cơ chất giúp các vi khuẩn này dần phát triển và dần tạo ra xu hướng quần thể trội. Lượng cơ chất bổ sung được xác định tương ứng với tốc độ loại bỏ cơ chất của quần thể vi khuẩn trong mẫu.

Lượng dung dịch chứa cơ chất được bổ sung là dung dịch bao gồm nước biển tự nhiên lọc qua màng 0,2 μm , nước cất có bổ sung (tính theo lít) 1 g K_2HPO_4 , 0,5 g MgSO_4 , 0,4 g FeSO_4 , 1g CaCO_3 và 1mg/l cơ chất NH_4Cl ở dạng dịch pha loãng với nồng độ 100 mg N/l được lọc qua màng 0,2 μm . Lượng dung dịch được bổ sung được xác định theo lượng cơ chất NH_4Cl tương ứng với lượng cơ chất mất đi đã được xác định theo thông số NH_4^+ -N, NO_2^- -N được xác định ở trên. Điều này đảm bảo lượng muối amoni trong dung dịch nuôi cấy cân bằng và ổn định theo nhu cầu của quần thể vi khuẩn, tránh sốc gây ảnh hưởng đến quần xã vi sinh vật. Duy trì pH=7,8 trong dung dịch bằng dung dịch Na_2CO_3 .

Tiến hành lặp lại quá trình xác định thông số và bổ sung môi trường nuôi cấy cho đến khi tốc độ loại bỏ cơ chất ở lần bổ sung cơ chất cuối cùng không tăng so với tốc độ loại bỏ cơ chất ở lần bổ sung cơ chất trước đó. Thu được dịch chứa quần xã vi khuẩn được chọn lọc.

Các cấp nhân chọn lọc này được lặp lại bằng cách cấy cấy quần xã vi khuẩn đã được chọn lọc sang môi trường mới và lặp lại bước chọn lọc quần xã vi khuẩn đến khi tốc độ loại bỏ cơ chất tối đa trong lần chọn lọc quần xã vi khuẩn lần cuối cùng không tăng so với lần chọn lọc trước đó, thu được dung dịch chứa quần xã vi khuẩn chọn lọc đã được làm giàu. Các cấp nhân chọn lọc này có thể được lặp lại một hoặc nhiều lần.

Trong bước thu hồi chế phẩm sinh học, tiến hành để lắng tự nhiên dung dịch chứa quần xã vi khuẩn chọn lọc đã được làm giàu thu được trên trong 24 giờ ở 4°C trong điều kiện tối. Quá trình này nhằm loại bỏ các tế bào chết và các chất lơ lửng có trong dung dịch, sau đó gạn bỏ phần dịch phía trên và thu hồi lớp cặn phía dưới.

Tiến hành cô đặc lớp cặn bằng cách chia phần cặn vào các ống falcon 50ml và tiến hành ly tâm lạnh với tốc độ ly tâm nằm trong khoảng từ 7.000 đến 8.000 vòng/phút trong 15 phút. Sau khi loại phần dịch, phần kết tủa được huyền phù hóa trong môi trường nuôi mới, thu được chế phẩm sinh học dạng lỏng.

Chế phẩm sinh học thu được theo giải pháp hữu ích được bảo quản ở dạng chế phẩm gốc trong bình bằng nhựa hoặc thủy tinh có nắp kín, bổ sung thêm cơ chất là dung dịch NH_4Cl vô trùng tới nồng độ cuối cùng là 2mg/L ở nhiệt độ 4°C. Cứ sau 2 tháng lại tiến hành kiểm tra nồng độ cơ chất, nếu cơ chất hết lại bổ sung thêm cơ chất tới nồng độ cuối cùng là 2mg/L.

Khi sử dụng, chế phẩm cần được kích hoạt và tăng sinh khối để tăng lượng đủ để mục đích xử lý bằng cách cấy chế phẩm vào môi trường tăng sinh theo tỷ lệ 1:100 (v/v), điều kiện môi trường pH 7,8, lắc 120 vòng/phút, trong tối, nhiệt độ 28-30°C. Thời gian kích hoạt và nhân chế phẩm kéo dài khoảng từ 1 đến 5 ngày, phụ thuộc vào thời gian bảo quản chế phẩm. Bổ sung môi trường và tăng dần nồng độ cơ chất đến khi đạt lượng đủ cho mục đích sử dụng.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1: Sản xuất chế phẩm sinh học để xử lý chất ô nhiễm amoniac và nitrit

Ví dụ được lựa chọn để thực hiện giải pháp hữu ích này là quy trình sản xuất chế phẩm cụ thể mà mẫu được lựa chọn làm nguyên liệu sản xuất chế phẩm là nguồn nước cửa sông Lạch Tray tại tọa độ (20°46'32.64"N; 106°47'38.76"E), ngày 12/4/2015.

Mẫu nước từ cửa sông Lạch Tray được thu nhận bằng bình Duran vô trùng, dung tích 100ml, sau khi thu nhận, mẫu được bảo quản trong hộp đá (4°C) và chuyển về phòng thí nghiệm Trạm Nghiên cứu biển Đồ Sơn - Viện Tài nguyên và Môi trường biển để xử lý tiếp theo. Mẫu nước có độ muối là 14‰, pH 7,8.

Cấy truyền 15 ml dịch mẫu sang 03 bình tam giác, mỗi bình có dung tích 250ml chứa sẵn 135 ml môi trường khoáng vô cơ đã tiệt trùng theo tỷ lệ môi trường khoáng

vô cơ là 10% theo thể tích đưa lên thiết bị nuôi trong điều kiện tối với tốc độ lắc 120 vòng/phút, nhiệt độ 28°C.

Tiến hành xác định các chỉ số NH_4^+ -N, NO_2^- -N, NO_3^- -N và pH trong môi trường nuôi cấy bằng phương pháp chuẩn tại thời điểm nuôi cấy và cách nhau sau mỗi 6 giờ để xác định lượng amoniac có trong dung dịch được chuyển hóa.

Dung dịch bổ sung cho dịch nuôi cấy bao gồm nước biển 30‰ được lọc qua màng 0,2µm, nước cất có bổ sung (tính theo lít) 1 g K_2HPO_4 , 0,5 g MgSO_4 , 0,4 g FeSO_4 , 1g CaCO_3 và 1mg/l cơ chất NH_4Cl ở dạng dịch pha loãng với nồng độ 100 mg N/l được lọc qua màng 0,2µm. Lượng dung dịch bổ sung rất thấp do tốc độ loại bỏ cơ chất NH_4Cl chậm, pH được duy trì pH=7,8 trong suốt quá trình nhân bằng dung dịch Na_2CO_3 . Quá trình nuôi kết thúc sau 20 ngày, thu được dung dịch chứa quần xã vi khuẩn đã được làm giàu với tốc độ loại bỏ cơ chất của quần xã vi khuẩn đạt khoảng 0,11 mg/l/giờ.

Tiếp đó mẫu được nhân chọn lọc qua liều cấp khác nhau bằng phương pháp như trên, nhưng thời gian xác định các chỉ số NH_4^+ -N, NO_2^- -N, NO_3^- -N và pH trong môi trường nuôi cấy được xác định theo khoảng thời gian từ 1 đến 3 ngày. Kết quả được thể hiện trên biểu đồ hình 3 và hình 4, tương ứng. Trong đó, bước nhân chọn lọc cấp 1 là 29 ngày, cấp 2 là 17 ngày, cấp 3 là 20 ngày, cấp 4 là 28 ngày và cấp 5 là 28 ngày. Tốc độ loại bỏ cơ chất (NH_4^+ -N) tăng lên 32,5 lần, lần nhân giống cấp 1 tốc độ loại bỏ cơ chất chỉ đạt tối đa 0,11 mg/l/h trong khi đó tốc độ loại bỏ cơ chất của quần xã vi khuẩn này trong lần làm giàu cấp 5 đạt 3,58 mg/l/h (hình 3).

Tốc độ sử dụng cơ chất tăng rõ rệt sau mỗi lần nhân giống chọn lọc. Trong lần nhân giống cấp 1, quần xã vi khuẩn đã sử dụng 28 mg/L sau 29 ngày làm giàu và oxy hóa toàn bộ amoniac thành nitrit và nitrit thành nitrat. Lần làm giàu cấp 2, quần xã vi khuẩn đã oxy hóa 89 mg /L cơ chất thành nitrat sau 17 ngày. Lần làm giàu cấp 3, quần xã vi khuẩn đã oxy hóa 211 mg/L cơ chất hoàn toàn thành nitrat sau 20 ngày. Trong lần làm giàu thứ 4 và 5, quần xã vi khuẩn đã oxy hóa lần lượt 415 và 495 mg/L cơ chất thành nitrat sau 28 ngày nuôi cấy (hình 4). Quá trình làm giàu đã sử dụng khoảng 1554,8 mg/L Na_2CO_3 để duy trì pH và cung cấp nguồn carbon cho quần xã vi khuẩn nitrat hóa phát triển. Kết quả thu được dung dịch chứa quần xã vi khuẩn chọn lọc đã được làm giàu có khả năng oxy hóa tới 495 mg/L cơ chất thành nitrat sau 28 ngày nuôi cấy và khả năng loại bỏ cơ chất lên tới 3,58 mg/L/giờ (hình 2 và hình 3).

Dung dịch huyền phù sau khi làm giàu và chọn lọc nhiều bước ly tâm trong thiết bị ly tâm lạnh với tốc độ 7000 vòng/phút trong thời gian 15 phút. Sau khi loại bỏ dịch trong phía trên và bổ sung phần cặn vào môi trường khoáng mới với nồng độ cơ chất ban đầu 2mg/L với thể tích bằng 1/10 thể tích dịch ban đầu thu được chế phẩm sinh học gốc.

Chế phẩm sinh học gốc được bảo quản tại 4°C khi pha loãng với môi trường nuôi cấy 10 lần có khả năng phân giải oxy hóa 0,73 mg/L/giờ cơ chất thành nitrat. Sinh khối khô của vi sinh vật trong chế phẩm đạt 620 mg/l. Sinh khối vi sinh vật tổng số trong chế phẩm được định lượng bằng cân phân tích với độ chính xác 0,001g, ly tâm chế phẩm và môi trường nuôi với tốc độ 7.000 vòng/phút trong thời gian 30 phút, gạn bỏ lớp dịch trong phía trên và cân phần sinh khối phía dưới sau khi sấy qua đêm trong tủ sấy tại 37°C. Sinh khối chế phẩm là hiệu số giữa phần kết tủa của chế phẩm và phần kết tủa của môi trường nuôi cấy.

Ví dụ 2: Kích hoạt và tăng sinh vi khuẩn từ chế phẩm gốc

Lấy 1,5ml dịch chế phẩm gốc sau thời gian bảo quản lạnh 3 tháng thu được từ Ví dụ 1 và cấy vào bình tam giác dung tích 250 ml chứa 150 ml dịch môi trường tăng sinh bao gồm (theo 1 lít môi trường) 1 g K₂HPO₄, 0,5 g MgSO₄, 0,4 g FeSO₄, 1g CaCO₃ và 1mg/l cơ chất NH₄Cl ở dạng dịch pha loãng với nồng độ 100 mg N/l được lọc qua màng 0,2µm (1:10, v/v), nồng độ cơ chất ban đầu 2 mg/l, điều kiện môi trường pH 7,8, độ muối 15‰, tốc độ lắc 120 vòng/phút trong điều kiện tối, nhiệt độ được khống chế trong khoảng từ 28 đến 30°C.

Thời gian nuôi cấy kích hoạt chế phẩm kéo dài 02 ngày. Để tăng sinh khối, nồng độ cơ chất được điều chỉnh tăng dần và khi đạt tốc độ tối đa thì cấy truyền sang môi trường mới. Sau thời gian 15 ngày tăng sinh, từ chế phẩm gốc thể tích 1,5 ml đã tạo ra chế phẩm có thể tích 150 ml để xử lý chất ô nhiễm amoniac và nitrit.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Quy trình sản xuất chế phẩm sinh học xử lý chất ô nhiễm amoniac và nitrit theo giải pháp hữu ích cho phép phân lập quần xã vi khuẩn từ chính môi trường ô nhiễm amoniac và nitrit mà không phải phân lập từng chủng cụ thể, điều này giúp giữ được quần xã với các mối quan hệ cộng sinh, hỗ sinh giúp phân giải các chất gây ô nhiễm amoniac và nitrit một cách hiệu quả.

Quy trình sản xuất chế phẩm sinh học có thể áp dụng cụ thể đối với các nguồn gây ô nhiễm khác nhau. Việc phân lập, làm giàu quần thể vi sinh trực tiếp từ nguồn ô nhiễm cho phép quần thể thích nghi nhanh chóng với môi trường cần xử lý, giúp giảm thời gian thích nghi, thích ứng quần thể với môi trường.

Quy trình sản xuất chế phẩm sinh học theo giải pháp hữu ích áp dụng kỹ thuật phân lập hướng đích cả quần xã vi sinh vật mà không phải phân lập từng loài và kết hợp các loài theo phương pháp thông thường nên có khả năng tăng hiệu suất xử lý của chế phẩm lên rất cao, từ 0,11 mg/L/giờ lên tới 3,58 mg/l/giờ. Điều này cho thấy hiệu quả của quy trình sản xuất chế phẩm sinh học xử lý chất ô nhiễm amoniac và nitrit theo giải pháp hữu ích.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất chế phẩm sinh học xử lý chất ô nhiễm amoniac và nitrit, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) Làm giàu quần xã vi khuẩn:

+ nhân quần xã vi khuẩn trong mẫu:

thu mẫu nước từ môi trường ô nhiễm bằng dụng cụ tiệt trùng và bảo quản ở điều kiện 4°C đến khi sử dụng làm mẫu sản xuất chế phẩm sinh học;

cấy 15ml mẫu nước thu được ở trên vào 135 ml môi trường khoáng vô cơ với tỷ lệ 1:10 (theo thể tích) đã được tiệt trùng, pH = 7,8 trong bình tam giác dung tích 250ml, sau đó tiến hành nuôi trong điều kiện tối với tốc độ lắc 120 vòng/phút, nhiệt độ nằm trong khoảng từ 28 đến 30°C;

xác định các thông số $\text{NH}_4^+\text{-N}$, $\text{NO}_2^-\text{-N}$, $\text{NO}_3^-\text{-N}$ và pH trong môi trường nuôi cấy theo khoảng thời gian 6 giờ/lần và so sánh với thông số này với thời điểm trước đó, các thông số này tương ứng với tốc độ loại bỏ cơ chất của quần thể vi khuẩn trong mẫu;

bổ sung vào môi trường nuôi cấy dung dịch bao gồm nước biển tự nhiên lọc qua màng 0,2μm, nước cất có bổ sung (tính theo lít) 1 g K_2HPO_4 , 0,5 g MgSO_4 , 0,4 g FeSO_4 , 1g CaCO_3 và 1mg/l cơ chất NH_4Cl ở dạng dịch pha loãng với nồng độ 100 mg N/l được lọc qua màng 0,2μm theo lượng cơ chất tương ứng với thông số $\text{NH}_4^+\text{-N}$, $\text{NO}_2^-\text{-N}$ được xác định trước đó, đồng thời duy trì pH=7,8 trong dung dịch bằng dung dịch Na_2CO_3 ;

lặp lại quá trình xác định thông số và bổ sung môi trường nuôi cấy cho đến khi tốc độ loại bỏ cơ chất ở lần bổ sung cơ chất cuối cùng không tăng so với tốc độ loại bỏ cơ chất ở lần bổ sung cơ chất trước đó thu được dịch chứa quần xã vi khuẩn đã được làm giàu;

+ nhân chọn lọc quần xã vi khuẩn:

cấy 15ml dịch chứa quần xã vi khuẩn đã được làm giàu vào 135 ml môi trường khoáng vô cơ với tỷ lệ 1:10 (theo thể tích) đã được tiệt trùng pH = 7,8 trong bình tam giác dung tích 250ml, sau đó tiến hành nuôi trong điều kiện tối với tốc độ lắc 120 vòng/phút, nhiệt độ nằm trong khoảng từ 28 đến 30°C;

xác định các thông số NH_4^+ -N, NO_2^- -N, NO_3^- -N và pH trong môi trường nuôi cấy theo khoảng thời gian từ 1-3 ngày/lần và so sánh với thông số này với thời điểm trước đó, các thông số này tương ứng với tốc độ loại bỏ cơ chất của quần thể vi khuẩn trong mẫu;

bổ sung vào môi trường nuôi cấy dung dịch bao gồm nước biển tự nhiên lọc qua màng 0,2 μm , nước cất có bổ sung (tính theo lít) 1 g K_2HPO_4 , 0,5 g MgSO_4 , 0,4 g FeSO_4 , 1g CaCO_3 và 1mg/l cơ chất NH_4Cl ở dạng dịch pha loãng với nồng độ 100 mg N/l được lọc qua màng 0,2 μm theo lượng cơ chất tương ứng với thông số NH_4^+ -N, NO_2^- -N được xác định trước đó, đồng thời duy trì pH=7,8 trong dung dịch bằng dung dịch Na_2CO_3 ;

lặp lại quá trình xác định thông số và bổ sung môi trường nuôi cấy cho đến khi tốc độ loại bỏ cơ chất ở lần bổ sung cơ chất cuối cùng không tăng so với tốc độ loại bỏ cơ chất ở lần bổ sung cơ chất trước đó thu được dịch chứa quần xã vi khuẩn được chọn lọc; và

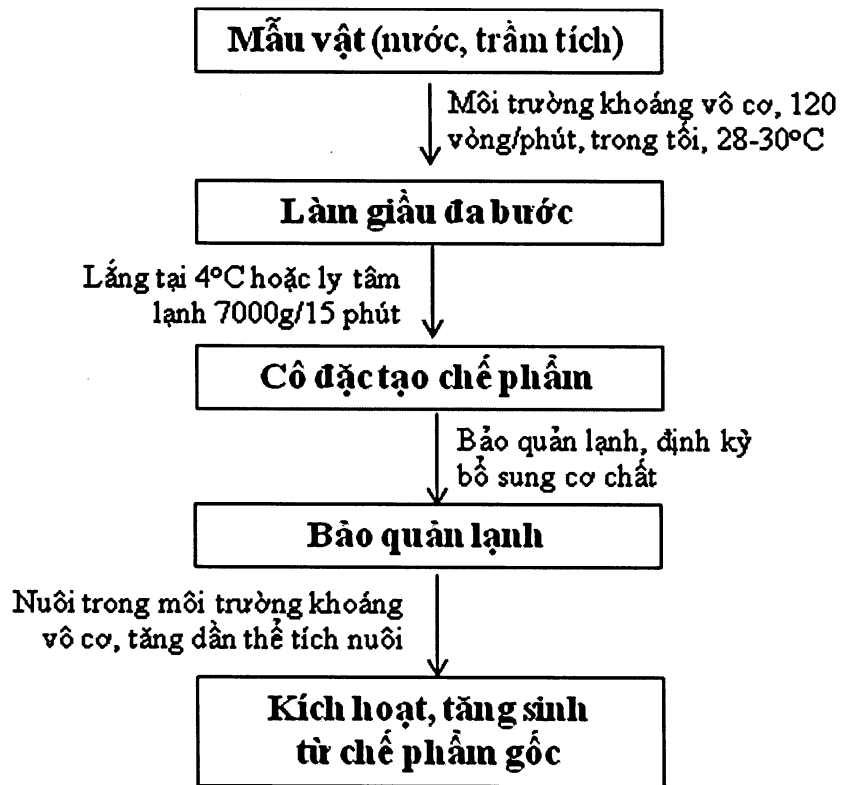
cấy quần xã vi khuẩn đã được chọn lọc sang môi trường mới và lặp lại bước chọn lọc quần xã vi khuẩn đến khi tốc độ loại bỏ cơ chất tối đa trong lần chọn lọc quần xã vi khuẩn lần cuối cùng không tăng so với lần chọn lọc trước đó, thu được dung dịch chứa quần xã vi khuẩn chọn lọc đã được làm giàu; và

b) Thu hồi chế phẩm sinh học:

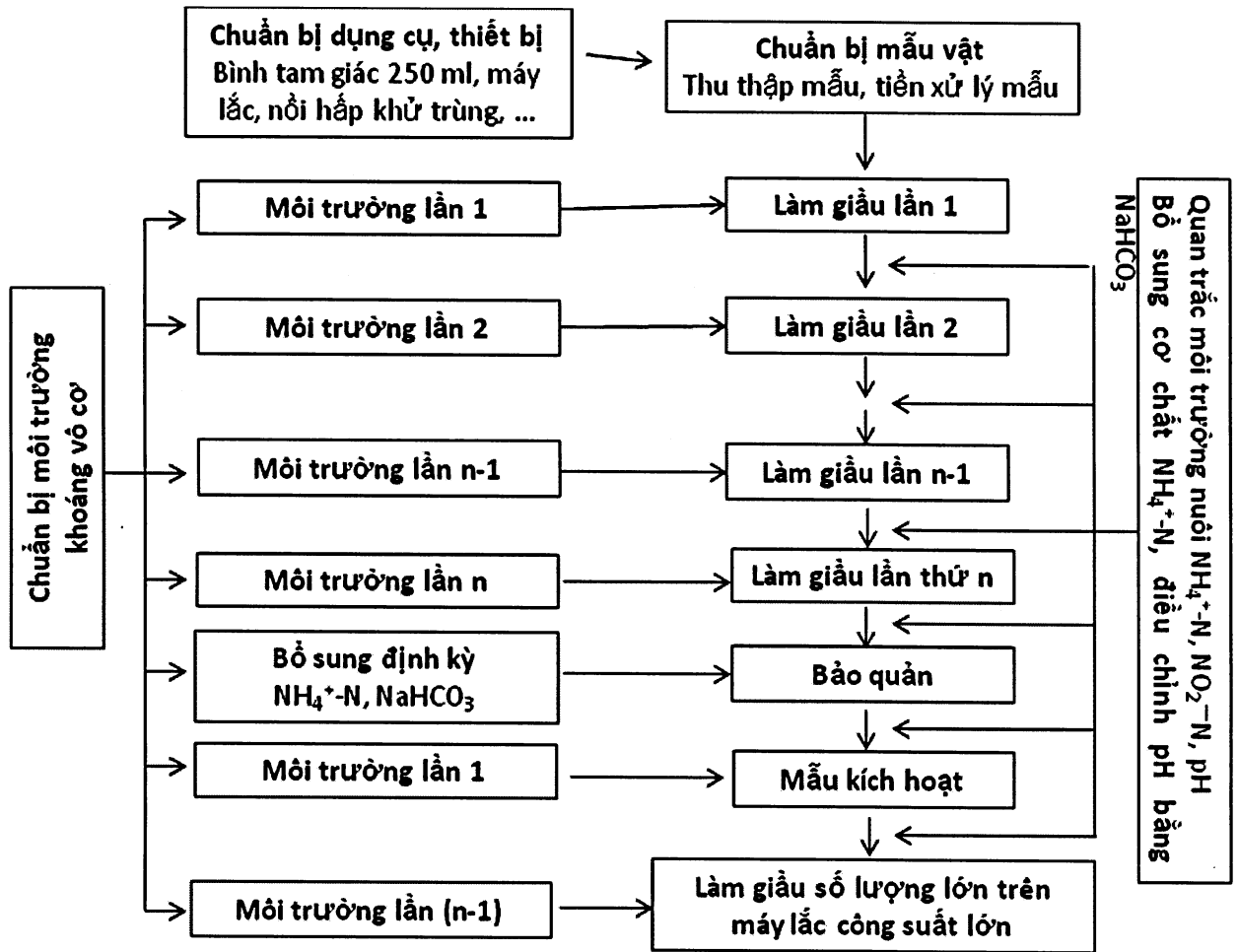
để lắng tự nhiên dung dịch chứa quần xã vi khuẩn chọn lọc đã được làm giàu thu được trên trong 24 giờ ở 4°C trong điều kiện tối, sau đó gạn bỏ phần dịch phía trên và thu hồi lớp cặn phía dưới;

cô đặc lớp cặn bằng cách chia phần cặn vào các ống falcon 50ml và tiến hành ly tâm lạnh với tốc độ ly tâm nằm trong khoảng từ 7.000 đến 8.000 vòng/phút trong 15 phút, sau khi loại phần dịch, phần kết tủa được huyền phù hóa trong môi trường nuôi mới, thu được chế phẩm sinh học dạng lỏng.

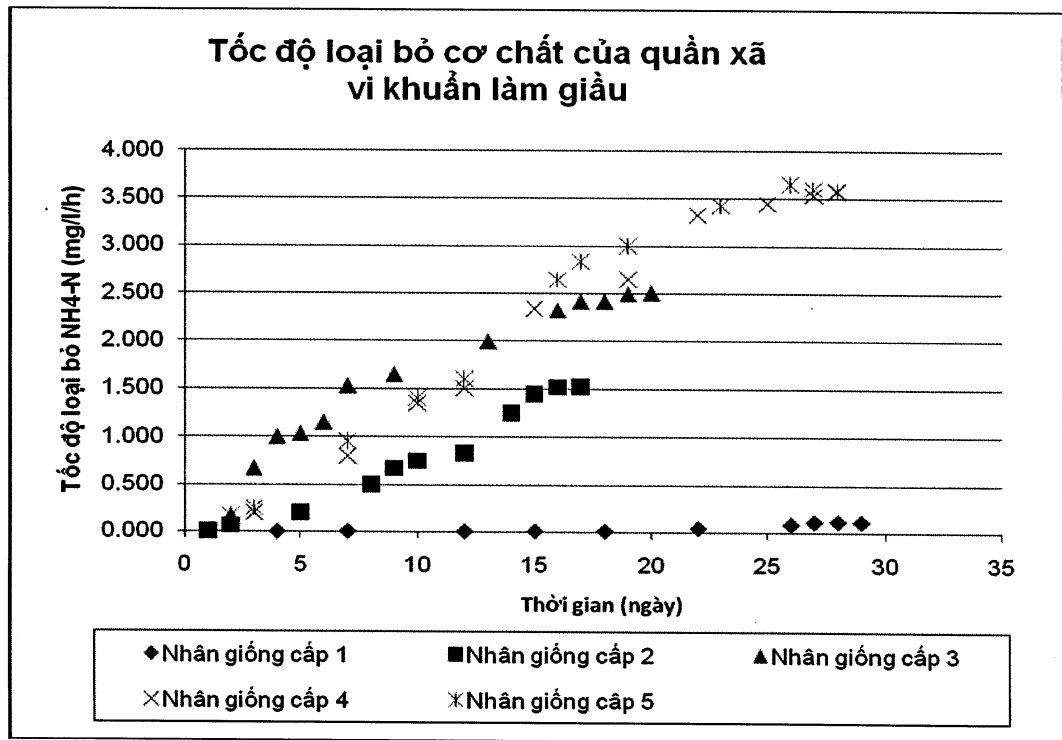
HÌNH 1



HÌNH 2



HÌNH 3



HÌNH 4

