



(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)



2-0002687

(51) **C02F 3/00; C12N 11/04; C12N 1/00**
2020.01

(13) **Y**

(21) 2-2021-00234

(22) 01/06/2018

(67) 1-2018-02358

(45) 25/08/2021 401

(43) 27/08/2018 365A

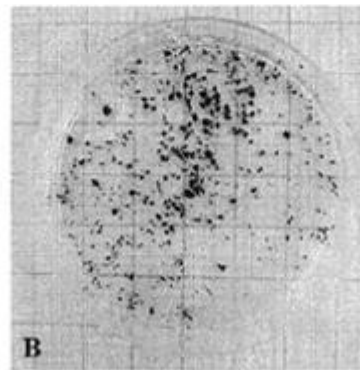
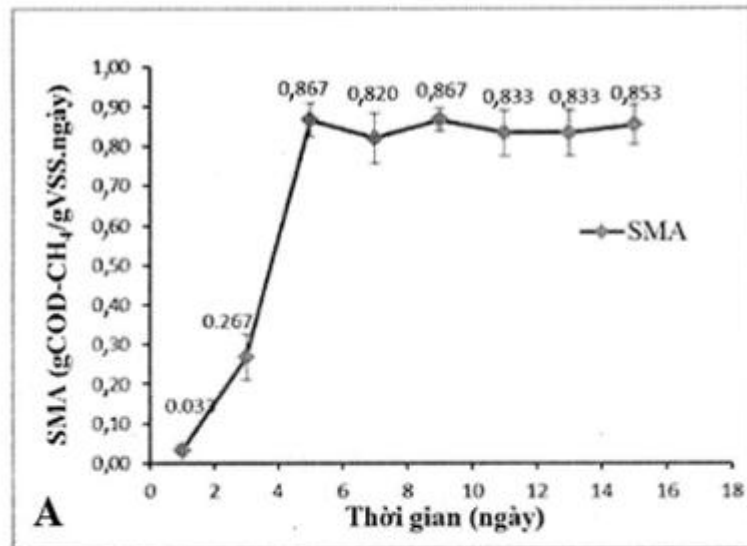
(73) Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga, Bộ Quốc phòng (VN)

Nguyễn Văn Huyền, Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) Nguyễn Thu Hoài (VN); Đỗ Thị Thu Hồng (VN); Đinh Thúy Hằng (VN).

(54) QUY TRÌNH SẢN XUẤT HẠT BÙN CHỨA VI SINH VẬT KỶ KHÍ ƯA MẶN ĐƯỢC VI
BAO BẰNG ALGINAT

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất hạt bùn chứa vi sinh vật kỵ khí ưa mặn (BKM) được vi bao bằng alginat để ứng dụng trong xử lý chất thải hữu cơ nhiễm mặn nước biển, quy trình theo giải pháp hữu ích cho phép hoạt hoá, nhân giống để thu sinh khối vi sinh vật kỵ khí ưa mặn ở dạng bùn, tiếp đó bao hạt bùn trong alginat để cố định vi sinh vật. Quy trình cho phép tạo ra được hạt alginat được cố định vi sinh vật kỵ khí ưa mặn (vi sinh vật BKM) hữu ích trong xử lý chất thải hữu cơ nhiễm mặn.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực công nghệ vật liệu và kỹ thuật môi trường, cụ thể là giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất bùn kỵ khí ưa mặc được vi bao trong polyme sinh học alginat, trong đó chứa vi sinh vật kỵ khí có khả năng thích nghi, phát triển trong điều kiện nhiễm mặn để xử lý chất thải hữu cơ nhiễm mặn trong môi trường biển.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Theo báo cáo của Chương trình môi trường Liên Hiệp Quốc, khoảng 80% chất gây ô nhiễm ở biển có nguồn gốc từ đất liền và xu hướng ngày càng tăng tính đến năm 2050 (Vikas, 2015). Ở khu vực Châu Á, có đến 90% lượng nước thải đổ thẳng xuống biển mà không qua xử lý. Chương trình hành động quốc gia để ngăn chặn những nguồn ô nhiễm biển từ đất liền đã được xây dựng ở nhiều nước, song kết quả đạt được không bù đắp nổi những thiệt hại đối với môi trường do chất thải sinh hoạt và khai thác kinh tế của con người gây ra (EU Enviromental Implementation, 2017).

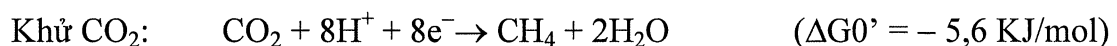
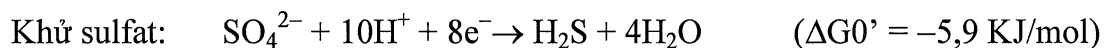
Ở Việt Nam, các khu vực phát triển kinh tế và đô thị ven biển và hải đảo phần lớn chưa có hệ thống xử lý nước thải đồng bộ, chất thải tại nhiều nơi được xả thẳng ra biển mà không qua xử lý (Bùi Cách Tuyến, 2013). Ô nhiễm chất hữu cơ trong nước biển ven bờ đang diễn ra phổ biến và ngày càng trở nên nghiêm trọng. Khảo sát trong giai đoạn 2011-2015 cho thấy hàm lượng COD, NH_4 tại hầu hết các khu vực biển Việt Nam cao vượt ngưỡng QCVN, đặc biệt ở các khu vực phát triển nuôi trồng thủy sản và du lịch (Phan Thu Ngân, 2016). Đứng trước tình trạng này việc đưa ra các giải pháp công nghệ xử lý phù hợp với điều kiện môi trường ven biển là rất cấp thiết.

Phân hủy kỵ khí chất hữu cơ là quá trình chuyển hóa sinh học trong điều kiện không có oxy với sự tham gia của nhiều nhóm vi sinh vật có quan hệ mật thiết với nhau theo chuỗi thức ăn. Bốn nhóm vi khuẩn chính tham gia vào quá trình phân hủy kỵ khí gồm có (i) vi khuẩn thủy phân, (ii) vi khuẩn lên men sinh axit, (iii) vi khuẩn sinh axetat và (iv) cổ khuẩn sinh metan (Mikucki và cộng sự, 2003). Các công nghệ xử lý chất thải hữu cơ vận hành theo nguyên lý phân hủy kỵ khí sinh metan như bể khí sinh học (biogas), bể tự hoại (septic tank), bể UASB (upflow anaerobic sludge blanket), tầng lọc kỵ khí (anaerobic filter) được ứng dụng rộng rãi với hiệu quả cao

trong môi trường đất liền (Lu và cộng sự, 2016; Marta và cộng sự, 2000). Tuy nhiên, trong môi trường nước biển, quá trình phân hủy kỵ khí chuyển hóa chất hữu cơ thành metan bị suy giảm đáng kể do nhiều yếu tố, trong đó đáng kể nhất là:

(i) Độ mặn: phân hủy kỵ khí trong môi trường nước mặn (10 - 47,2 g NaCl/L) kém thuận lợi do hoạt tính của vi sinh vật thấp hơn rất nhiều so với trong môi trường nước ngọt. Mori và cộng sự đã chứng minh nồng độ NaCl từ 12 g/L trở lên làm chậm quá trình phân hủy các chất hữu cơ của vi sinh vật tới 50% (Mori và cộng sự, 2012). Một số cổ khuẩn sinh metan ưa mặn mặc dù có khả năng loại tới 80% COD tại nồng độ muối 35 g/L, tuy nhiên ở nồng độ muối cao hơn 37 g/L thì hiệu suất chỉ còn 50% (Riffat và cộng sự, 2007). Do vậy, để vận hành các hệ phân hủy kỵ khí xử lý các loại chất thải có hàm lượng muối cao như bùn ao nuôi thủy sản hay rong biển, người ta thường bổ sung nước ngọt để giảm ảnh hưởng của nồng độ muối cao tới hoạt động của vi sinh vật (Ganzert và cộng sự, 2007).

(ii) Cạnh tranh của vi khuẩn khử sulfat (SRB): trong môi trường biển, sulfat là chất nhận điện tử quan trọng thứ hai sau oxy (với hàm lượng khoảng 28 mM), do vậy SRB là nhóm vi sinh vật chiếm ưu thế ở đây. Về mặt nhiệt động học, quá trình khử sulfat tích lũy được năng lượng lớn hơn so với quá trình sinh metan đối với cùng một cơ chất hữu cơ, do vậy SRB là đối thủ cạnh tranh ưu thế của cổ khuẩn sinh metan trong thế giới kỵ khí (Chen và cộng sự, 2013).



Ngoài ra, sản phẩm trao đổi chất của SRB là S^{2-} có tác dụng độc hại tới các loài sinh vật nói chung, trong đó có cổ khuẩn sinh metan.

(iii) Nguồn cổ khuẩn sinh metan thích nghi với môi trường biển: ở môi trường nước ngọt, phân trâu bò, bùn cống hay bùn hoạt tính từ các hệ thống xử lý nước thải có thể được sử dụng làm nguồn cổ khuẩn sinh metan để bổ sung vào các hệ thống xử lý kỵ khí. Tuy nhiên, trong môi trường biển các nguồn vi sinh vật sẵn có chứa cổ khuẩn sinh metan với mật độ cao là hoàn toàn không tồn tại. Tuy nhiên, một số nghiên cứu đã công bố các loài cổ khuẩn sinh metan thích nghi tốt với điều kiện môi trường có hàm lượng muối cao như *Methanosaeta* sp. sinh trưởng ở nồng độ NaCl từ 11,7 – 46,8 g/l, tối ưu ở 16,4 g/l (Mori và cộng sự, 2012), *Methanococcoides vulcani* sinh trưởng ở nồng độ NaCl từ 14,6 – 58,5 g/l, tối ưu ở 29,25 g/l (Stephane và cộng sự, 2014).

Để các công nghệ xử lý chất thải hữu cơ theo nguyên lý kỵ khí có thể vận hành được trong môi trường nước biển người ta cần bổ sung nguồn vi sinh vật thích nghi tốt với môi trường nước biển (Mori và cộng sự, 2012). Nguồn vi sinh vật này có thể được tạo ra nhờ quá trình làm giàu từ các hệ vi sinh vật kỵ khí ở trầm tích biển, sử dụng nguồn dinh dưỡng phức hợp, ví dụ như hỗn hợp các axit béo bay hơi, cám gạo lên men hay rỉ đường lên men. Các nguồn dinh dưỡng này đồng thời chứa các dạng cơ chất khác nhau thích hợp với cả bốn nhóm vi sinh vật tham gia quá trình phân hủy kỵ khí sinh metan, gồm tinh bột/xenluloza cho nhóm thủy phân, đường cho nhóm lên men sinh axit, các axit hữu cơ bay hơi (VFA) cho nhóm sinh axetat, H_2 và CO_2 cho nhóm sinh metan.

Tổ hợp vi sinh vật tham gia quá trình phân hủy kỵ khí nếu được nuôi dưỡng phát triển ở mật độ cao sẽ tạo thành bùn kỵ khí, là thành phần chìa khóa để vận hành các hệ thống xử lý chất thải hữu cơ theo nguyên lý kỵ khí. Bùn có chất lượng cao cần đạt kích thước tối ưu ở mức 1 – 2 mm (đường kính) với tỷ trọng riêng khoảng 1 g/cm^3 , có màu nâu đen (Peyman, 2002). Để bùn kỵ khí có hoạt tính ổn định trong thời gian dài và có thể sử dụng làm nguồn giống khởi động cho các hệ thống xử lý kỵ khí, người ta có thể áp dụng công nghệ vi bao tạo hạt bùn dạng gel chứa các tế bào bao trong lớp màng polyme (i) sinh học như alginat, carrageenan, chitosan hay (ii) hóa học như polyvinyl alcohol (PVA), polystyren, polyuretan (Peyman, 2002). Ưu điểm của công nghệ vi bao tế bào trong màng polyme là giúp bảo vệ tế bào khỏi các yếu tố bất lợi trong môi trường, tăng khả năng thích nghi của chúng khi được đưa vào môi trường mới. Nhiều loại vi sinh vật đã được đưa vào ứng dụng trong xử lý môi trường dưới dạng hạt vi bao trong màng polyme như các vi sinh vật xử lý ô nhiễm dầu và hydrocacbon và được minh chứng là có hiệu quả cao (Oz và cộng sự, 2003).

Công trình của tác giả Nguyễn Thu Hoài (2015) là nghiên cứu đầu tiên ở Việt Nam về nhóm cổ khuẩn sinh metan ở môi trường biển nhằm định hướng ứng dụng cho công nghệ xử lý kỵ khí chất thải hữu cơ tại đây. Tác giả đã tạo ra tổ hợp vi sinh vật sinh metan BKM có hoạt tính cao ở môi trường có nồng độ muối từ 10 – 30 g/L để khởi động nhanh và vận hành ổn định các mô hình phân hủy kỵ khí xử lý chất thải hữu cơ trong môi trường nước biển. Tổ hợp này được tạo ra qua quá trình làm giàu, sử dụng trầm tích biển Nha Trang làm nguồn vi sinh vật ban đầu. Tác giả cũng đã xác định được *Methanosarcina* spp. và *Methanosaeta* spp. là các nhóm cổ khuẩn sinh metan chiếm ưu thế trong tổ hợp vi sinh vật này.

Tuy nhiên, các nghiên cứu hiện nay mới chỉ dừng lại ở việc chứng minh quá trình phân hủy sinh học hợp chất hữu cơ trong điều kiện nước biển để tạo ra metan là có thể thực hiện được và còn phụ thuộc vào sự có mặt của một số loài cổ khuẩn sinh metan ưa mặn hay chịu mặn thuộc các chi *Methanosarcina* hoặc *Methanosaeta*. Trong khi đó, việc khởi động và vận hành các hệ thống xử lý kỵ khí chất thải hữu cơ ở điều kiện nước biển chỉ có thể được thực hiện một cách chủ động khi có nguồn vi sinh vật kỵ khí thích nghi tốt với nồng độ muối cao, bao gồm cả các nhóm cổ khuẩn sinh metan kể trên. Do đó, vẫn cần có một quy trình tổng thể để xử lý kỵ khí chất thải hữu cơ ở môi trường biển và không phụ thuộc vào sự có mặt ngẫu nhiên của các loài cổ khuẩn sinh metan ưa mặn hay chịu mặn tại hiện trường.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích nhằm giải quyết các vấn đề nêu trên, cụ thể bằng cách nuôi cấy sinh khối vi sinh vật kỵ khí ưa mặn (BKM) và bao bằng alginat cho phép thu được hạt bùn chứa vi sinh vật hữu ích trong xử lý chất thải hữu cơ nhiễm mặn nước biển. Theo đó, giải pháp hữu ích đề xuất quy trình sản xuất hạt bùn chứa vi sinh vật kỵ khí ưa mặn (BKM) được vi bao bằng alginat, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) hoạt hóa tổ hợp vi sinh vật kỵ khí ưa mặn (BKM) có nguồn gốc từ trầm tích biển bằng cách cấy vào môi trường bao gồm 26,4 g/l NaCl, 0,09 g/l KBr, 11,4 g/l $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1,47 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,66 g KCl, 0,25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,25 g NH_4Cl và 0,2 g KH_2PO_4 bổ sung cơ chất bao gồm hỗn hợp metanol, Na-axetat và trimetylamin nồng độ 10 mM mỗi loại, sau khi khử trùng ở 121°C , 20 phút, môi trường được sục khí N_2 trong 5 phút ở 80°C , sau đó làm nguội và bổ sung 30 ml/L dung dịch NaHCO_3 1M và 1ml/L dung dịch Na_2S 1M, tiếp đó sục khí N_2/CO_2 với tỷ lệ 90:10 (theo thể tích) để loại hoàn toàn oxy hòa tan rồi bổ sung tổ hợp vi sinh vật vào bình nuôi cấy, đậy kín bình nuôi cấy bằng nút cao su và nuôi cấy trong 10 ngày ở nhiệt độ 35°C , thu được tổ hợp vi sinh vật kỵ khí ưa mặn (BKM) được hoạt hóa;

b) nhân giống vi sinh vật kỵ khí ưa mặn hoạt hóa bằng cách cấy tổ hợp vi sinh vật kỵ khí ưa mặn (BKM) đã được hoạt hóa vào môi trường nuôi cấy bao gồm 26,4 g/l NaCl, 0,09 g/l KBr, 11,4 g/l $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1,47 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,66 g KCl, 0,25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,25 g NH_4Cl và 0,2 g KH_2PO_4 sau khi khử trùng ở 121°C , 20 phút, môi trường được sục khí N_2 trong 5 phút ở 80°C , sau đó làm nguội và bổ sung 30 ml/L dung dịch NaHCO_3 1M và 1ml/L dung dịch Na_2S 1M, tiếp đó sục khí N_2/CO_2 với tỷ lệ 90:10 (theo thể tích) để loại hoàn toàn oxy hòa tan và bổ sung cơ chất dịch cám gạo

10% đã lên men trước tới pH = 4 chứa axit béo bay hơi (volatile fatty acid – VFA) nồng độ 900 mg/L, tiếp tục bổ sung tổ hợp vi sinh vật ưa mặn (BKM) đã được hoạt hóa với tỷ lệ 10%, nuôi cấy trong thời gian 3 tuần ở 35°C thu được vi sinh vật kỵ khí ưa mặn (BKM) cấp một;

c) tạo hạt bùn kỵ khí ưa mặn bằng cách cấy chuyển môi trường chứa vi sinh vật kỵ khí ưa mặn cấp một với tỷ lệ 10% sang môi trường nuôi cấy bao gồm 26,4 g/l NaCl, 0,09 g/l KBr, 11,4 g/l $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1,47 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,66 g KCl, 0,25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,25 g NH_4Cl và 0,2 g KH_2PO_4 sau khi khử trùng ở 121°C, 20 phút, môi trường được sục khí N_2 trong 5 phút ở 80°C, sau đó làm nguội và bổ sung 30 ml/L dung dịch NaHCO_3 1M và 1ml/L dung dịch Na_2S 1M, tiếp đó sục khí N_2/CO_2 với tỷ lệ 90:10 (theo thể tích) để loại hoàn toàn oxy hòa tan và bổ sung cơ chất dịch cám gạo 10% đã lên men trước tới pH = 4 chứa axit béo bay hơi (volatile fatty acid – VFA) nồng độ 900 mg/L, nuôi cấy trong thời gian 3 tuần ở 35°C, sau đó ly tâm môi trường nuôi cấy ở điều kiện 4°C, tốc độ 6000 vòng/phút trong 10 phút thu được sinh khối vi sinh vật kỵ khí ưa mặn (BKM) dạng cặn bùn;

d) vi bao bùn chứa vi sinh vật kỵ khí ưa mặn bằng cách hòa cặn bùn chứa vi sinh vật kỵ khí ưa mặn (BKM) với môi trường bao gồm 26,4 g/l NaCl, 0,09 g/l KBr, 11,4 g/l $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1,47 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,66 g KCl, 0,25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,25 g NH_4Cl và 0,2 g KH_2PO_4 sau khi khử trùng ở 121°C, 20 phút, môi trường được sục khí N_2 trong 5 phút ở 80°C, sau đó làm nguội và bổ sung 30 ml/L dung dịch NaHCO_3 1M, tiếp đó sục khí N_2/CO_2 với tỷ lệ 90:10 (theo thể tích) để loại hoàn toàn oxy hòa tan, với tỷ lệ 1/10 (theo thể tích) thu được hỗn hợp bùn BKM, sau đó trộn hỗn hợp này với dung dịch Na-alginat 2% (có bổ sung rezazurin làm chất chỉ thị cho sự có mặt của oxy) với tỷ lệ 1:1 (theo thể tích) trong điều kiện thổi khí N_2 , hỗn hợp bùn BKM-alginat được khuấy đều trên máy khuấy từ và nhỏ vào dung dịch CaCl_2 0,55%, hạt sinh ra lọc và rửa 2 – 3 lần trong nước cất loại oxy thu được hạt bùn chứa vi sinh vật kỵ khí ưa mặn được vi bao trong alginat (hạt BKMA).

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là hình ảnh hạt bùn BKM thu được từ vi sinh vật BKM sau ba tuần nuôi tăng sinh, có kích thước từ 1 – 2 mm (A) và hoạt tính sinh metan riêng của hạt bùn đạt khoảng 0,8 g COD- CH_4 /gVSS/ngày (B);

Hình 2 là hình ảnh các hạt BKMA có đường kính khoảng 4,5 mm gồm bùn BKM vi bao trong polyme alginat (A) và hình ảnh các hạt BKMA được bảo quản trong bình

kín chứa nước biển nhân tạo đã loại oxy ở nhiệt độ phòng (B). Ở điều kiện bảo quản này sản phẩm hạt BKMA giữ được hoạt tính ổn định trong thời gian trên 6 tháng;

Hình 3 là hình ảnh kết quả xác định số lượng tế bào cổ khuẩn sinh metan và vi khuẩn kỵ khí tổng số trong sản phẩm hạt BKMA (A) và hoạt tính sinh metan riêng của sản phẩm này trong thời gian bảo quản 6 tháng (B);

Hình 4 thể hiện phương pháp cột nước theo Lettinga, 1997.

Hình 5 là hình ảnh mô hình bể xử lý kỵ khí 50 lít và kết quả thử nghiệm ứng dụng sản phẩm hạt BKMA trong khởi động và vận hành mô hình để xử lý chất thải nuôi lợn thịt ở điều kiện nước biển;

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Sau đây, giải pháp hữu ích được mô tả chi tiết với các ví dụ và các phương án thực hiện cụ thể, tuy nhiên các ví dụ và các phương án thực hiện cụ thể này chỉ nhằm minh họa làm rõ bản chất của giải pháp hữu ích chứ không nhằm giới hạn phạm vi yêu cầu bảo hộ của giải pháp hữu ích.

Giải pháp hữu ích đề xuất quy trình sản xuất hạt bùn chứa vi sinh vật kỵ khí ưa mặn (BKM) được vi bao bằng alginat, trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) hoạt hoá tổ hợp vi sinh vật kỵ khí ưa mặn (BKM); b) nhân giống vi sinh vật kỵ khí ưa mặn hoạt hoá; c) thu sinh khối bùn chứa vi sinh vật kỵ khí ưa mặn (BKM); và d) vi bao bùn chứa vi sinh vật kỵ khí ưa mặn trong alginat.

Môi trường để nuôi vi sinh vật kỵ khí ưa mặn là môi trường nước biển nhân tạo có nồng độ muối 26,4‰ bao gồm các thành phần chính như nêu trong Bảng 1.

Bảng 1 - Môi trường nước biển nhân tạo

Thành phần	Hàm lượng
Nước cất	1 lít
NaCl	26,4 g
KBr	0,09 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	11,4 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,47 g
KCl	0,66 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,25 g
NH ₄ Cl	0,25 g

KH_2PO_4	0,2 g
Khử trùng môi trường ở 121°C, 20 phút. Lấy ra khỏi nồi khử trùng ở 80°C, sục khí N_2 trong 5 phút, làm nguội, sau đó bổ sung:	
- NaHCO_3 1M đã đuổi oxy (30 ml/L); - Na_2S 1M (1 ml/L).	

Môi trường nước biển nhân tạo nêu trên được sử dụng làm môi trường nền để nuôi cấy hoạt hoá, nhân giống vi sinh kỵ khí ưa mặn và thu sinh khối bùn theo giải pháp hữu ích.

Trong bước hoạt hóa tổ hợp vi sinh vật kỵ khí ưa mặn (BKM), tổ hợp vi sinh vật kỵ khí ưa mặn trong ống bảo quản được sử dụng để hoạt hoá vi sinh vật kỵ khí ưa mặn theo giải pháp hữu ích. Các kỹ thuật hoạt hóa và cấy vào môi trường là đã biết và có thể được thực hiện bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể tuân theo kỹ thuật lấy mẫu vi sinh trong các tài liệu hướng dẫn chuyên ngành. Môi trường nuôi cấy được chuẩn bị bao gồm 26,4 g/l NaCl , 0,09 g/l KBr , 11,4 g/l $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1,47 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,66 g KCl , 0,25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,25 g NH_4Cl và 0,2 g KH_2PO_4 được bổ sung cơ chất bao gồm hỗn hợp metanol, Na-axetat và trimetylamin nồng độ 10 mM mỗi loại. Môi trường nuôi cấy sau khi khử trùng ở 121°C, 20 phút, môi trường được sục khí N_2 trong 5 phút ở 80°C và được làm nguội rồi bổ sung 30 ml/L dung dịch NaHCO_3 1M và 1ml/L dung dịch Na_2S 1M, tiếp đó sục khí N_2/CO_2 với tỷ lệ 90:10 (theo thể tích) để loại hoàn toàn oxy hòa tan. Tiếp đó cấy tổ hợp vi sinh vật trong ống bảo quản vào bình nuôi cấy và đậy kín bình. Tiến hành nuôi cấy trong khoảng thời gian 10 ngày, nhiệt độ 35°C, trong quá trình nuôi cấy bình được đậy kín để đảm bảo kỵ khí để thu được tổ hợp vi sinh vật kỵ khí ưa mặn (BKM) được hoạt hóa.

Các điều kiện hoạt hóa vi sinh vật BKM đều là kết quả đã được các tác giả giải pháp hữu ích nghiên cứu trong thời gian dài nhằm tối ưu hóa hoạt tính phân hủy chất hữu cơ sinh metan của vi sinh vật BKM. Việc sử dụng nước biển nhân tạo giúp duy trì ổn định đặc tính ưa mặn của vi sinh vật BKM một cách chủ động, không phụ thuộc vào nguồn nước biển tự nhiên thường có độ mặn không ổn định và khó bảo quản lâu dài trong phòng thí nghiệm mà không bị thay đổi về thành phần. Nếu không được nuôi trong môi trường nước biển nhân tạo thì các loài vi sinh vật kém chịu mặn sẽ có cơ hội phát triển trong tổ hợp BKM, thậm chí có thể lấn át các nhóm ưa mặn, làm giảm tính thích ứng với môi trường biển của toàn bộ vi sinh vật BKM. Các cơ chất được bổ sung trong quá trình này là hỗn hợp chất hữu cơ đơn giản (cụ thể là metanol, Na-axetat,

trimethylamin) phù hợp cho nhóm cổ khuẩn sinh metan, là nhóm chìa khóa nhưng lại kém phát triển nhất trong toàn bộ tổ hợp vi sinh vật BKM. Thời gian hoạt hóa 10 ngày giúp vi sinh vật BKM đạt trạng thái hoạt động tích cực, hàm lượng metan trong khí sinh ra đạt mức ổn định khoảng 80%, thuận lợi cho việc sử dụng làm nguồn vi sinh vật cho các bước tiếp theo. Vi sinh vật BKM hoạt hóa có màu xám đen và khi quan sát trên kính hiển vi huỳnh quang thì có nhiều tín hiệu phát sáng xanh do tế bào cổ khuẩn sinh metan ở trong trạng thái hoạt động tích cực chứa coenzym F₄₂₀.

Trong bước nhân giống vi sinh vật kỵ khí ưa mặn hoạt hóa, môi trường nuôi cấy nền được sử dụng là môi trường nước biển nhân tạo nêu trên, cụ thể tiến hành cấy tổ hợp vi sinh vật kỵ khí ưa mặn (BMK) sau khi đã được hoạt hóa thu được ở trên vào môi trường nuôi cấy bao gồm 26,4 g/l NaCl, 0,09 g/l KBr, 11,4 g/l MgCl₂.6H₂O, 1,47 g/l CaCl₂.2H₂O, 0,66 g KCl, 0,25 g MgSO₄.7H₂O, 0,25 g NH₄Cl và 0,2 g KH₂PO₄ sau khi khử trùng ở 121°C, 20 phút, môi trường được sục khí N₂ trong 5 phút ở 80°C, sau đó làm nguội và bổ sung 30 ml/L dung dịch NaHCO₃ 1M và 1ml/L dung dịch Na₂S 1M, tiếp đó sục khí N₂/CO₂ với tỷ lệ 90:10 (theo thể tích) để loại hoàn toàn oxy hòa tan và bổ sung cơ chất dịch cám gạo 10% đã lên men trước tới pH = 4 chứa axit béo bay hơi (volatile fatty acid – VFA) nồng độ 900 mg/L. Lượng vi sinh vật hoạt hóa được bổ sung vào môi trường nuôi cấy nhân giống là 10%. Thời gian nuôi cấy trong thời gian 3 tuần ở 35°C trong điều kiện kín, kỵ khí thu được vi sinh vật kỵ khí ưa mặn cấp một. Quá trình này còn được gọi là quá trình nhân giống cấp một.

Trong bước thu sinh khối bùn chứa vi sinh vật kỵ khí ưa mặn (BKM), tiến hành cấy chuyển môi trường chứa vi sinh vật kỵ khí ưa mặn hoạt động sang môi trường nuôi cấy bao gồm 26,4 g/l NaCl, 0,09 g/l KBr, 11,4 g/l MgCl₂.6H₂O, 1,47 g/l CaCl₂.2H₂O, 0,66 g KCl, 0,25 g MgSO₄.7H₂O, 0,25 g NH₄Cl và 0,2 g KH₂PO₄ sau khi khử trùng ở 121°C, 20 phút, môi trường được sục khí N₂ trong 5 phút ở 80°C, sau đó làm nguội và bổ sung 30 ml/L dung dịch NaHCO₃ 1M và 1ml/L dung dịch Na₂S 1M, tiếp đó sục khí N₂/CO₂ với tỷ lệ 90:10 (theo thể tích) để loại hoàn toàn oxy hòa tan và bổ sung cơ chất dịch cám gạo 10% đã lên men trước tới pH = 4 chứa axit béo bay hơi (volatile fatty acid – VFA) nồng độ 900 mg/L. Lượng giống chứa vi sinh vật ưa khí hoạt động được cấy là 10%. Quá trình nuôi cấy trong thời gian 3 tuần ở 35°C trong điều kiện kỵ khí. Sau đó ly tâm môi trường nuôi cấy ở điều kiện 4°C, tốc độ 6000 vòng/phút trong 10 phút thu được sinh khối vi sinh vật kỵ khí ưa mặn (BKM) dạng cặn bùn.

Các điều kiện tạo sinh khối vi sinh vật kết tụ dạng hạt bùn BKM đều là kết quả đã được các tác giả giải pháp hữu ích nghiên cứu trong thời gian dài nhằm tối ưu hóa hoạt tính phân hủy chất hữu cơ sinh metan của tổ hợp vi sinh vật BKM. Tương tự như trong bước hoạt hóa vi sinh vật BKM, nhân giống vi sinh vật BKM cấp một và nuôi tăng sinh tạo bùn BKM đều được thực hiện trong môi trường nước biển nhân tạo nhằm duy trì ổn định đặc tính ưa mặn của vi sinh vật BKM một cách chủ động. Tuy nhiên, khác với bước hoạt hóa, bước nhân giống cấp một và nuôi tăng sinh tạo bùn BKM sử dụng cơ chất là dịch cám gạo 10% đã lên men trước tới độ pH = 4 có tổng lượng axit béo bay hơi (volatile fatty acid – VFA) là 900 mg/L với tỷ lệ bổ sung là 10%. Đây là loại cơ chất phức hợp, có đủ các thành phần cơ chất phù hợp cho cả bốn nhóm vi sinh vật trong thành phần hạt bùn phát triển, gồm (i) hydratcacbon cho nhóm sinh enzyme thủy phân, (ii) đường đơn cho nhóm lên men sinh axit, (iii) các axit hữu cơ bay hơi và hydro cho nhóm sinh axetat và (iv) axetat, hydro, CO₂ cho nhóm cổ khuẩn sinh metan. Hạt bùn có cấu trúc tốt cần chứa vi sinh vật thuộc cả bốn nhóm này, phân bố theo thứ tự từ trong ra ngoài là cổ khuẩn sinh metan – vi khuẩn sinh axetat – lên men sinh axit – sinh enzyme thủy phân, theo mối quan hệ chuỗi thức ăn.

Khi kết thúc quá trình tạo hạt bùn BKM, lượng metan trong khí sinh học tạo ra đạt mức ổn định khoảng 80%. Hạt bùn BKM tại thời điểm thu có màu xám, lắng tốt, mật độ cổ khuẩn sinh metan cao khi đưa hạt bùn lên kính hiển vi huỳnh quang để quan sát.

Trong bước vi bao bùn chứa vi sinh vật kỵ khí ưa mặn trong alginat, sau khi thu được cặn bùn chứa vi sinh vật, tiến hành hoà hòa cặn bùn chứa vi sinh vật kỵ khí ưa mặn (BKM) với môi trường bao gồm 26,4 g/l NaCl, 0,09 g/l KBr, 11,4 g/l MgCl₂.6H₂O, 1,47 g/l CaCl₂.2H₂O 0,66 g KCl, 0,25 g MgSO₄.7H₂O, 0,25 g NH₄Cl và 0,2 g KH₂PO₄ sau khi khử trùng ở 121°C, 20 phút, môi trường được sục khí N₂ trong 5 phút ở 80°C, sau đó làm nguội và bổ sung 30 ml/L dung dịch NaHCO₃ 1M và 1ml/L dung dịch Na₂S 1M. Tỷ lệ bùn/môi trường là 1/10 (theo thể tích) thu được hỗn hợp bùn BKM dạng sệt. Tiếp đó trộn hỗn hợp này với dung dịch Na-alginat 2% có bổ sung rezazurin làm chất chỉ thị cho sự có mặt của oxy với tỷ lệ 1:1 (theo thể tích) trong điều kiện thổi khí N₂ để đảm bảo kỵ khí. Hỗn hợp bùn BKM-alginat được khuấy đều trên máy khuấy từ và nhỏ vào từ từ vào dung dịch CaCl₂ 0,55%, ngay khi nhỏ vào dung dịch, các hạt bùn nhanh chóng được bao thành hạt, hạt sinh ra được lọc và rửa trong nước biển nhân tạo loại oxy thu được hạt bùn chứa vi sinh vật kỵ khí ưa mặn được vi bao trong alginat (hạt BKMA) có đường kính khoảng 4,5 mm.

Các điều kiện tạo hạt BKMA đã được tác giả giải pháp hữu ích nghiên cứu tối ưu nhằm đạt hiệu quả tạo hạt cao nhất trong thời gian ngắn nhất. Ion Ca^{2+} là yếu tố cần thiết để các phân tử alginat kết nối thành mạng lưới và tạo màng bao quanh các hạt bùn. Ở nồng độ CaCl_2 0,55%, hạt vi bao alginat được hình thành ngay lập tức khi hỗn hợp BKM-alginat được nhỏ vào, mặc dù chế độ khuấy liên tục được duy trì. Bên cạnh đó, hạt alginat hình thành ở điều kiện này có khả năng bị phá vỡ khá dễ dàng trong dung dịch Na-xitrat 2M để giải phóng tế bào sau này.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1: Nhân giống vi sinh thu bùn chứa vi sinh vật kỵ khí ưa mặn (BKM)

Tổ hợp vi sinh vật kỵ khí ưa mặn (BKM) được sử dụng để nhân giống vi sinh vật kỵ khí trước hết được hoạt hóa bằng cách cấy tổ hợp vi sinh vật kỵ khí ưa mặn (BKM) trong ống bảo quản vào môi trường chứa 26,4 g/l NaCl, 0,09 g/l KBr, 11,4 g/l $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1,47 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,66 g KCl, 0,25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,25 g NH_4Cl và 0,2 g KH_2PO_4 bổ sung cơ chất bao gồm hỗn hợp metanol, Na-axetat và trimetylamin nồng độ 10 mM và đã được khử trùng trước đó. Sau khi cấy loại hoàn toàn oxy trong bình nuôi bằng cách sục khí N_2/CO_2 (90:10, v/v) và đậy kín bình bằng nút cao su.

Tiến hành hoạt hóa vi sinh vật trong thời gian 10 ngày ở nhiệt độ 35°C , thu vi sinh vật BKM hoạt hóa. Vi sinh vật BKM hoạt hóa có màu xám đen và khi quan sát trên kính hiển vi huỳnh quang thì có nhiều tín hiệu phát sáng xanh.

Bước nhân giống từ tổ hợp BKM đã hoạt hóa được tiến hành trong bình serum thể tích 100 ml, chứa 80 ml môi trường nước biển nhân tạo 26,4 g/l NaCl, 0,09 g/l KBr, 11,4 g/l $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1,47 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,66 g KCl, 0,25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,25 g NH_4Cl và 0,2 g KH_2PO_4 sau khi khử trùng ở 121°C , 20 phút, môi trường được sục khí N_2 trong 5 phút ở 80°C , sau đó làm nguội và bổ sung 30 ml/L dung dịch NaHCO_3 1M và 1ml/L dung dịch Na_2S 1M, tiếp đó sục khí N_2/CO_2 với tỷ lệ 90:10 (theo thể tích) để loại hoàn toàn oxy hòa tan và bổ sung cơ chất dịch cám gạo 10% đã lên men trước tới pH = 4 chứa axit béo bay hơi (volatile fatty acid – VFA) nồng độ 900 mg/L. Vi sinh vật BKM hoạt hóa được bổ sung với tỷ lệ 10% theo thể tích, sau khi loại oxy bằng khí nitơ, tiến hành nuôi trong thời gian ba tuần ở 35°C , thu được vi sinh vật BKM kỵ khí ưa mặn cấp một.

Thu sinh khối bùn chứa vi sinh vật kỵ khí ưa mặn (BKM) được tiến hành trong bình Schott 2 lít chứa 1,8 lít môi trường nuôi cấy bao gồm 26,4 g/l NaCl, 0,09 g/l KBr, 11,4 g/l $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1,47 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,66 g KCl, 0,25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,25 g

NH_4Cl và 0,2 g KH_2PO_4 sau khi khử trùng ở 121°C , 20 phút, môi trường được sục khí N_2 trong 5 phút ở 80°C , sau đó làm nguội và bổ sung 30 ml/L dung dịch NaHCO_3 1M và 1ml/L dung dịch Na_2S 1M, tiếp đó sục khí N_2/CO_2 với tỷ lệ 90:10 (theo thể tích) để loại hoàn toàn oxy hòa tan và bổ sung cơ chất dịch cám gạo 10% đã lên men trước tới pH = 4 chứa axit béo bay hơi (volatile fatty acid – VFA) nồng độ 900 mg/L. Tỷ lệ giống cấp 10% và nuôi cấy trong thời gian 3 tuần ở 35°C . Chất lượng của sản phẩm bùn BKM tạo ra được đánh giá thông qua tỷ lệ khí metan trong tổng lượng khí sinh ra, kích thước hạt bùn, hoạt tính sinh metan riêng của bùn cũng như số lượng vi khuẩn kỵ khí và cổ khuẩn sinh metan trong bùn. Các phương pháp phân tích gồm có:

Xác định tổng thể tích khí sinh ra:

Thể tích khí sinh ra được xác định theo phương pháp cột nước theo sơ đồ trong Hình 4 (Lettinga, 1997), theo đó khí sinh ra theo đường dẫn đi vào cột nước đặt úp, thể tích được đo bằng phần không gian phía trên cột nước bị áp lực khí đẩy xuống.

Xác định thành phần khí metan:

Thành phần khí metan được xác định trên máy sắc ký khí Agilent 7890A sử dụng cột HT-plot/Q, detector FID ở nhiệt độ 250°C , khí mang He với tốc độ dòng 3 ml/phút, nhiệt độ lò 60°C (Youngsukkasem, 2012). Đường chuẩn CH_4 được xây dựng dựa trên dãy hỗn hợp CH_4 trong nitơ từ 0 – 90%. Thể tích khí metan sinh ra được tính theo công thức sau:

$$V_{\text{CH}_4} = A \times V$$

Trong đó: A – Thành phần CH_4 (%), V – Tổng thể tích khí sinh ra (lít).

Xác định kích thước hạt bùn:

Kích thước hạt bùn được xác định bằng phương pháp phân tách lần lượt qua các loại sàng với ba kích thước lỗ từ lớn đến nhỏ là 2 mm, 1 mm và 0,5 mm. Các phân đoạn bùn có kích thước khác nhau được sấy ở 105°C trong 2 giờ. Phân bố kích thước hạt bùn được tính theo công thức sau (Francese và cộng sự, 1998):

$$P_i = \frac{m_i}{\sum_1^4 m_i} \times 100$$

Trong đó: P_i – Phần trăm bùn của phân đoạn bùn thứ i (%);

m_i – Khối lượng của phân đoạn bùn thứ i (g).

Xác định hoạt tính sinh metan riêng của bùn:

Hoạt tính sinh metan riêng của bùn (SMA) được xác định bằng cách lấy 5 ml bùn đưa vào bình serum chứa 45 ml môi trường nước biển nhân tạo có bổ sung Na-axetat (10 mM) làm cơ chất. Nuôi tĩnh ở 35°C và theo dõi tổng lượng khí sinh ra cũng như thành phần CH₄ trong hỗn hợp khí. Hoạt tính sinh metan được xác định dựa trên công thức tính như sau (Hussain và cộng sự, 2015):

$$SMA = \frac{V}{350 \times VSS}$$

Trong đó: SMA – Hoạt tính sinh metan (mg COD/mgVSS);

V – Thể tích khí metan (ml);

VSS – Hàm lượng chất rắn lơ lửng dễ bay hơi (mg/l);

350 – Hệ số quy đổi theo lý thuyết 1g COD sinh ra 350 ml CH₄.

Xác định hàm lượng chất rắn lơ lửng bay hơi:

Hàm lượng chất rắn lơ lửng bay hơi (Volatile Suspended Solid, VSS) được xác định bằng cách nung lượng chất rắn lơ lửng (SS) ở lần lượt ở 105°C và 550°C trong 30 phút rồi cân và tính theo công thức sau (APHA, 2005):

$$VSS \left(\frac{mg}{l} \right) = \frac{m_2 - m_3}{V}$$

Trong đó: m₂ – khối lượng mẫu sau khi sấy ở 105°C;

m₃ – khối lượng mẫu sau khi sấy ở 550°C;

V – thể tích mẫu được lọc (l).

Xác định số lượng cổ khuẩn sinh metan và vi khuẩn kỵ khí:

Số lượng cổ khuẩn sinh metan trong hạt bùn BKM được xác định bằng phương pháp đếm MPN trong môi trường nước biển nhân tạo kỵ khí với cơ chất Na-axetat (10 mM). Các ống được nuôi tĩnh tại 35°C và theo dõi lượng CH₄ sinh ra trong các ống bằng sắc ký khí để xác định sự có mặt của cổ khuẩn sinh metan.

Số lượng vi khuẩn kỵ khí cũng được xác định bằng phương pháp đếm MPN trong môi trường kỵ khí tổng số có thành phần như sau (g/l): glucoza – 5; cao thịt bò – 2,5; pepton – 5; NaCl – 3; amonium axetat – 2; MgSO₄.7H₂O – 0,3; FeSO₄.7H₂O – 0,01. Các ống MPN được ghi nhận kết quả dương tính là các ống có độ pH giảm từ 7 xuống dưới 5 do quá trình lên men sinh axit của vi khuẩn.

Mật độ cổ khuẩn sinh metan methanogen hay vi khuẩn kỵ khí trong hạt bùn BKM được tính dựa theo bảng chỉ số MPN (APHA, 2005), đơn vị MPN/ml.

Kết quả phân tích các chỉ số cho thấy bùn BKM sau 21 ngày nuôi tăng sinh ở 35°C có màu xám đen, đạt mức độ sinh metan cao nhất và ổn định ở 80 – 83% tổng thể tích khí sinh ra. Hoạt tính sinh metan riêng của bùn SMA ở mức rất cao, $0,867 \pm 0,042$ gCOD-CH₄/gVSS.ngày (Hình 1B), tương đương với bùn trong hệ thống UASB đang hoạt động ổn định ở điều kiện nước ngọt (Shin và cộng sự, 2010). Về kích thước hạt bùn BKM sau hai mươi ngày nuôi tăng sinh, các hạt có kích thước chuẩn 1 – 2 mm chiếm 51,3% thể hiện độ sinh trưởng tốt của bùn (Hình 1A). Mật độ cổ khuẩn sinh metan trong bùn BKM đạt $2,8 \times 10^9$ MPN/ml và mật độ vi khuẩn kỵ khí tổng số đạt $4,6 \times 10^{10}$ MPN/ml (Hình 2), tương đương với nhiều loại bùn kỵ khí đang hoạt động tốt ở điều kiện nước ngọt (Ahmad, 2014).

Ví dụ 2: Tạo hạt alginat bao hạt bùn chứa vi sinh vật kỵ khí ưa mặn

Bùn chứa vi sinh vật kỵ khí ưa mặn thu được ở Ví dụ 1 được thu bằng phương pháp ly tâm dịch nuôi cấy tại 4°C ở tốc độ 6000 vòng/phút trong thời gian 10 phút (4 ống ly tâm thể tích 500 ml). Sau khi ly tâm chất bỏ môi trường và hòa sinh khối bùn trong 50 ml môi trường nước biển nhân tạo kỵ khí rồi chuyển vào bình Schott 500 ml (4 ống $\times$ 50 ml = 200 ml), đuổi oxy bằng hỗn hợp khí N₂:CO₂ (với tỉ lệ 9:1) trong 1 phút rồi đóng kín bình bằng nút cao su.

Chuẩn bị các dung dịch cho quá trình tạo hạt gel alginat bao gồm dung dịch CaCl₂ (Merck) 0,55%; dung dịch Na-alginat (Merck) 2%, bổ sung resazurin (1 ml 0,1% trong 1 lít); nước biển nhân tạo bao gồm 26,4 g/l NaCl, 0,09 g/l KBr, 11,4 g/l MgCl₂.6H₂O, 1,47 g/l CaCl₂.2H₂O 0,66 g KCl, 0,25 g MgSO₄.7H₂O, 0,25 g NH₄Cl và 0,2 g KH₂PO₄ và bổ sung 30 ml/L dung dịch NaHCO₃ 1M và 1ml/L dung dịch Na₂S 1M. Các dung dịch được khử trùng và loại oxy trong dung dịch bằng sục khí N₂ trong 1 phút và đầy kín các bình bằng nắp cao su.

Sản phẩm hạt BKMA gồm các hạt gel alginat vi bao bùn BKM được tạo thành theo các bước như sau:

- Trộn dung dịch Na-alginat với dịch sinh khối bùn theo tỷ lệ 1:1 thể tích.
- Dùng bơm nhu động bơm nhỏ giọt hỗn hợp vào dung dịch CaCl₂ 0,55% khuấy đều dung dịch trên thiết bị khuấy từ, đồng thời sục khí N₂ liên tục trong quá trình bơm.
- Sau khi kết thúc bơm, đầy kín bình bằng nút cao su, để tĩnh trong 1 giờ để tạo độ cứng cho hạt gel.

- Loại bỏ dung dịch CaCl_2 , rửa hạt gel 2 – 3 lần bằng nước biển nhân tạo đã loại oxy. Cuối cùng giữ hạt gel trong nước biển nhân tạo trong bình kín khí có nắp cao su, bảo quản ở nhiệt độ phòng (Hình 2A).

Quy trình này cho phép tạo ra các hạt gel hình cầu, kích thước khá đồng đều với đường kính khoảng 4,5 mm (tương đương với thể tích khoảng 45 mm^3 mỗi hạt) (Hình 2B). Mật độ vi sinh vật trong hỗn hợp tạo hạt gel là 10^{10} MPN/ml, theo đó lượng tế bào trong mỗi hạt gel theo tính toán là khoảng 5×10^8 MPN/hạt.

Ví dụ 3: đánh giá mật độ vi sinh vật và hoạt tính sinh metan của sản phẩm hạt BKMA trong quá trình bảo quản.

Mật độ vi sinh vật và hoạt tính sinh metan của sản phẩm hạt BKMA được đánh giá định kỳ mỗi tháng một lần.

Kiểm tra mật độ vi sinh vật trong các sản phẩm hạt BKMA bằng cách lấy ngẫu nhiên 5 hạt BKMA chuyển vào ống nghiệm chứa 0,5 ml dung dịch Na-xitrat 2M vô trùng, sục khí N_2 trong 30 giây để loại oxy, đậy kín bằng nắp cao su và voltex nhẹ để giải phóng tế bào từ các hạt gel. Dịch tế bào được đưa vào đếm theo phương pháp MPN, sử dụng môi trường nước biển nhân tạo có cơ chất Na-axetat (10 mM) đối với cổ khuẩn sinh metan và môi trường kỵ khí tổng số đối với các vi khuẩn lên men kỵ khí. Kết quả cho thấy trong sáu tháng bảo quản, mật độ cổ khuẩn sinh metan và vi khuẩn kỵ khí tổng số được giữ ở mức khá ổn định, tương ứng đạt $11 - 7,5 \times 10^9$ MPN/ml và $2 - 1,7 \times 10^{10}$ MPN/ml (Hình 3A).

Kiểm tra hoạt tính sinh metan riêng của sản phẩm hạt BKMA bằng cách lấy ngẫu nhiên 10 hạt BKMA đưa vào bình nuôi chứa 25 ml môi trường nước biển nhân tạo kỵ khí có Na-axetat (10 mM) làm cơ chất. Hoạt tính sinh metan riêng của hỗn hợp được xác định dao động trong khoảng $0,848 - 0,846 \text{ gCOD-CH}_4/\text{gVSS.ngày}$ (Hình 3B), thể hiện tính ổn định của sản phẩm trong sáu tháng bảo quản.

Ví dụ 4: Đánh giá hiệu quả của sản phẩm hạt BKMA trong việc khởi động và xử lý chất thải hữu cơ trong mô hình 50 lít kỵ khí.

Sản phẩm hạt BKMA được ứng dụng thử nghiệm trên mô hình 50 lít mô phỏng bể tự hoại (Hình 5A) xử lý chất thải từ trại nuôi heo thịt nhiễm mặn nước biển. Bổ sung BKMA với tỷ lệ 1% thể tích cho phép khởi động nhanh hệ thống sau 2 tuần và vận hành ổn định sau 8 tuần ở chế độ tải trọng hữu cơ OLR khoảng $2,67 \text{ kgCOD}/\text{m}^3.\text{ngày}$ và thời gian lưu HRT là 72 giờ (Hình 5B). Ở điều kiện vận hành ổn

định, hệ thống loại được trên 95% COD, tỷ lệ metan trong khí sinh ra ở mức khoảng 60%.

Mô hình 50 lít gồm 2 ngăn, kích thước tương ứng (ngang $\times$ cao $\times$ rộng) là $60,5 \times 27,7 \times 25$ cm và $23 \times 27,7 \times 25$ cm với tổng thể tích là 50 lít, mô phỏng quy trình xử lý trong bể tự hoại (Hình 5A). Các đường ống đưa nguyên liệu đầu vào và nổi từ ngăn thứ nhất sang ngăn thứ hai đều hướng đáy. Hai ngăn thông nhau theo nguyên lý chảy tràn. Khí tạo ra được thu vào túi khí để phân tích tổng thể tích và thành phần metan. Mỗi ngăn đều có van xả đáy để xả bùn khi cần.

Nguyên liệu thải để xử lý trong mô hình là chất thải nuôi lợn thịt tại trang trại ở Tây Mỗ, Hà Nội trộn với nước biển Cửa Lò, Nghệ An (độ mặn khoảng 26‰) theo tỷ lệ 1:7 để đạt COD ~ 8000 mg O_2/L . Sản phẩm hạt BKMA được bổ sung vào ngăn thứ nhất của bể xử lý theo tỷ lệ 1% thể tích. Mô hình được vận hành theo chế độ liên tục với tải trọng hữu cơ OLR $\sim 2,67$ kgCOD/ m^3 .ngày, thời gian lưu tương ứng là 72 giờ. Điều kiện vận hành là $30^\circ C$, tốc độ khuấy trong ngăn thứ nhất là 50 vòng/phút.

Kết quả thu được (Hình 5B) cho thấy hệ thống được khởi động nhanh sau 2 tuần và đạt mức ổn định sau 8 tuần với hiệu suất xử lý COD $>95\%$ và thành phần CH_4 trong khí sinh ra trung bình khoảng 60%.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích đề xuất quy trình sản xuất bùn hạt bùn chứa vi sinh vật kỵ khí ưa mặn được vi bao bằng alginat để ứng dụng xử lý chất thải hữu cơ trong điều kiện nhiễm mặn nước biển. Trong quy trình này, hạt bùn BKM có tính thích nghi tốt với môi trường nhiễm mặn nước biển, từ đó tạo sản phẩm hạt BKMA dạng hạt gel alginat vi bao vi sinh vật kỵ khí ưa mặn từ hạt bùn BKM, đảm bảo khả năng sống và khả năng hoạt động ổn định cho phép ứng dụng trong các hệ thống kỵ khí xử lý chất thải hữu cơ nhiễm mặn nước biển. Kỹ thuật này cho phép xử lý chất thải hữu cơ, làm sạch vệ sinh môi trường như nhà tiêu utor hay bể biogas với sự trợ giúp của sản phẩm hạt BKMA có thể được vận hành ở điều kiện dội rửa trực tiếp bằng nước biển hay xử lý các chất thải có hàm lượng muối cao như rong biển, bùn đáy đầm nuôi thủy sản.

Giải pháp hữu ích cho phép nhân giống vi sinh vật kỵ khí ưa mặn và vi bao dễ dàng mà không ảnh hưởng đến chất lượng sinh khối vi sinh, quy trình bao hạt alginat dễ thực hiện và có thể ứng dụng rộng rãi, giúp phát triển kỹ thuật xử lý môi trường dựa trên công nghệ vi sinh cho phép xử lý môi trường ô nhiễm hiệu quả, đặc biệt ở những vùng ven biển, hải đảo bị nhiễm mặn nước biển.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất hạt bùn chứa vi sinh vật kỵ khí ưa mặn (BKM) được vi bao bằng alginat, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) hoạt hóa tổ hợp vi sinh vật kỵ khí ưa mặn (BKM) có nguồn gốc từ trầm tích biển bằng cách cấy vào môi trường bao gồm 26,4 g/l NaCl, 0,09 g/l KBr, 11,4 g/l $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1,47 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,66 g KCl, 0,25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,25 g NH_4Cl và 0,2 g KH_2PO_4 bổ sung cơ chất bao gồm hỗn hợp metanol, Na-axetat và trimetylamin nồng độ 10 mM mỗi loại, sau khi khử trùng ở 121°C , 20 phút, môi trường được sục khí N_2 trong 5 phút ở 80°C , sau đó làm nguội và bổ sung 30 ml/L dung dịch NaHCO_3 1M và 1ml/L dung dịch Na_2S 1M, tiếp đó sục khí N_2/CO_2 với tỷ lệ 90:10 (theo thể tích) để loại hoàn toàn oxy hòa tan rồi bổ sung tổ hợp vi sinh vật vào bình nuôi cấy, đậy kín bình nuôi cấy bằng nút cao su và nuôi cấy trong 10 ngày ở nhiệt độ 35°C , thu được tổ hợp vi sinh vật kỵ khí ưa mặn (BKM) được hoạt hóa;

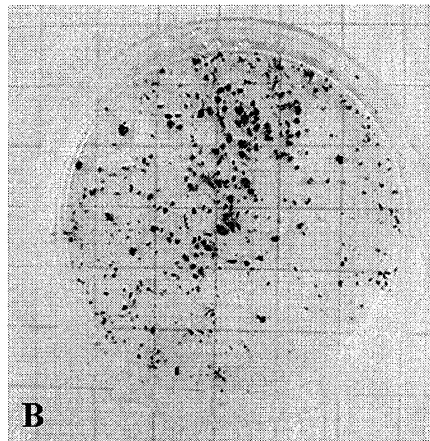
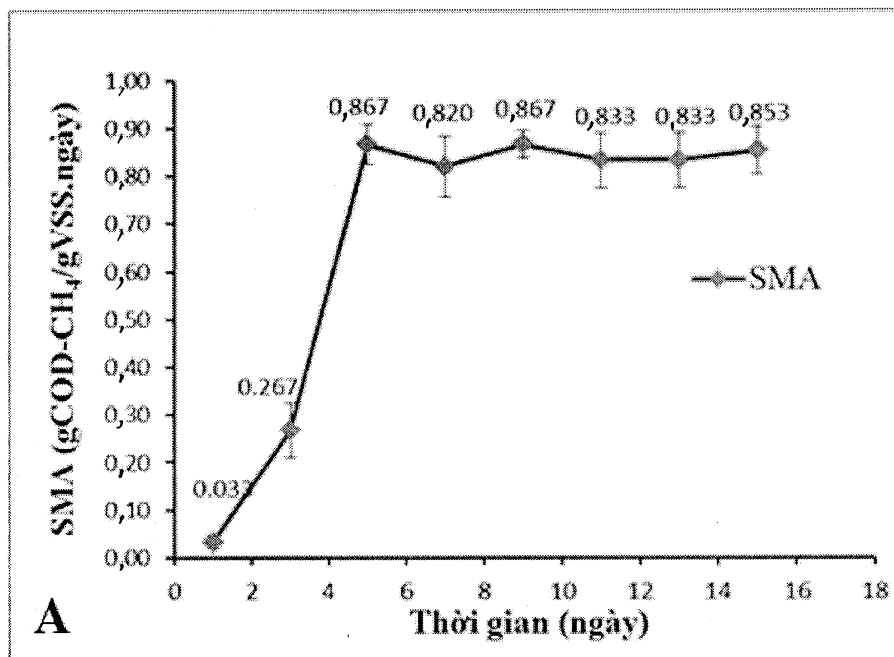
b) nhân giống vi sinh vật kỵ khí ưa mặn hoạt hóa bằng cách cấy tổ hợp vi sinh vật kỵ khí ưa mặn (BKM) đã được hoạt hóa vào môi trường nuôi cấy bao gồm 26,4 g/l NaCl, 0,09 g/l KBr, 11,4 g/l $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1,47 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,66 g KCl, 0,25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,25 g NH_4Cl và 0,2 g KH_2PO_4 sau khi khử trùng ở 121°C , 20 phút, môi trường được sục khí N_2 trong 5 phút ở 80°C , sau đó làm nguội và bổ sung 30 ml/L dung dịch NaHCO_3 1M và 1ml/L dung dịch Na_2S 1M, tiếp đó sục khí N_2/CO_2 với tỷ lệ 90:10 (theo thể tích) để loại hoàn toàn oxy hòa tan và bổ sung cơ chất dịch cám gạo 10% đã lên men trước tới pH = 4 chứa axit béo bay hơi (volatile fatty acid – VFA) nồng độ 900 mg/L, tiếp tục bổ sung tổ hợp vi sinh vật ưa mặn (BKM) đã được hoạt hóa với tỷ lệ 10%, nuôi cấy trong thời gian 3 tuần ở 35°C thu được vi sinh vật kỵ khí ưa mặn (BKM) cấp một;

c) tạo hạt bùn kỵ khí ưa mặn bằng cách cấy chuyển môi trường chứa vi sinh vật kỵ khí ưa mặn cấp một với tỷ lệ 10% sang môi trường nuôi cấy bao gồm 26,4 g/l NaCl, 0,09 g/l KBr, 11,4 g/l $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1,47 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,66 g KCl, 0,25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,25 g NH_4Cl và 0,2 g KH_2PO_4 sau khi khử trùng ở 121°C , 20 phút, môi trường được sục khí N_2 trong 5 phút ở 80°C , sau đó làm nguội và bổ sung 30 ml/L dung dịch NaHCO_3 1M và 1ml/L dung dịch Na_2S 1M, tiếp đó sục khí N_2/CO_2 với tỷ lệ 90:10 (theo thể tích) để loại hoàn toàn oxy hòa tan và bổ sung cơ chất dịch cám gạo

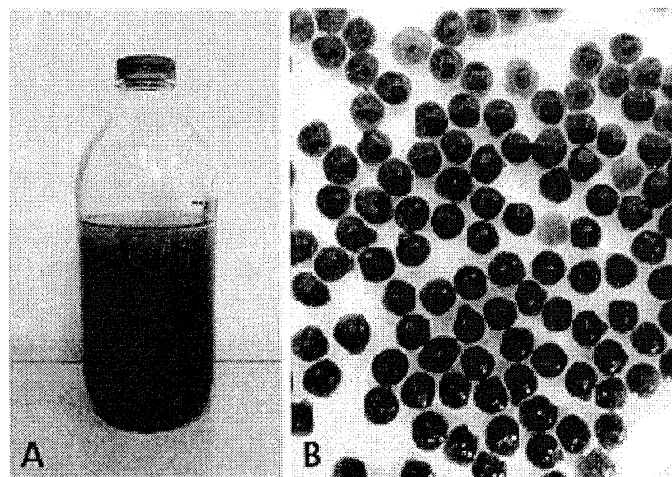
10% đã lên men trước tới pH = 4 chứa axit béo bay hơi (volatile fatty acid – VFA) nồng độ 900 mg/L, nuôi cấy trong thời gian 3 tuần ở 35°C, sau đó ly tâm môi trường nuôi cấy ở điều kiện 4°C, tốc độ 6000 vòng/phút trong 10 phút thu được sinh khối vi sinh vật kỵ khí ưa mặn (BKM) dạng cặn bùn;

d) vi bao bùn chứa vi sinh vật kỵ khí ưa mặn bằng cách hòa cặn bùn chứa vi sinh vật kỵ khí ưa mặn (BKM) với môi trường bao gồm 26,4 g/l NaCl, 0,09 g/l KBr, 11,4 g/l MgCl₂.6H₂O, 1,47 g/l CaCl₂.2H₂O 0,66 g KCl, 0,25 g MgSO₄.7H₂O, 0,25 g NH₄Cl và 0,2 g KH₂PO₄ sau khi khử trùng ở 121°C, 20 phút, môi trường được sục khí N₂ trong 5 phút ở 80°C, sau đó làm nguội và bổ sung 30 ml/L dung dịch NaHCO₃ 1M và 1ml/L dung dịch Na₂S 1M, tiếp đó sục khí N₂/CO₂ với tỷ lệ 90:10 (theo thể tích) để loại hoàn toàn oxy hòa tan, với tỷ lệ 1/10 (theo thể tích) thu được hỗn hợp bùn BKM, sau đó trộn hỗn hợp này với dung dịch Na-alginat 2% (có bổ sung rezazurin làm chất chỉ thị cho sự có mặt của oxy) với tỷ lệ 1:1 (theo thể tích) trong điều kiện thổi khí N₂, hỗn hợp bùn BKM-alginat được khuấy đều trên máy khuấy từ và nhỏ vào dung dịch CaCl₂ 0,55%, hạt sinh ra lọc và rửa 2 – 3 lần trong nước biển nhân tạo loại oxy thu được hạt bùn chứa vi sinh vật kỵ khí ưa mặn được vi bao trong alginat (hạt BKMA).

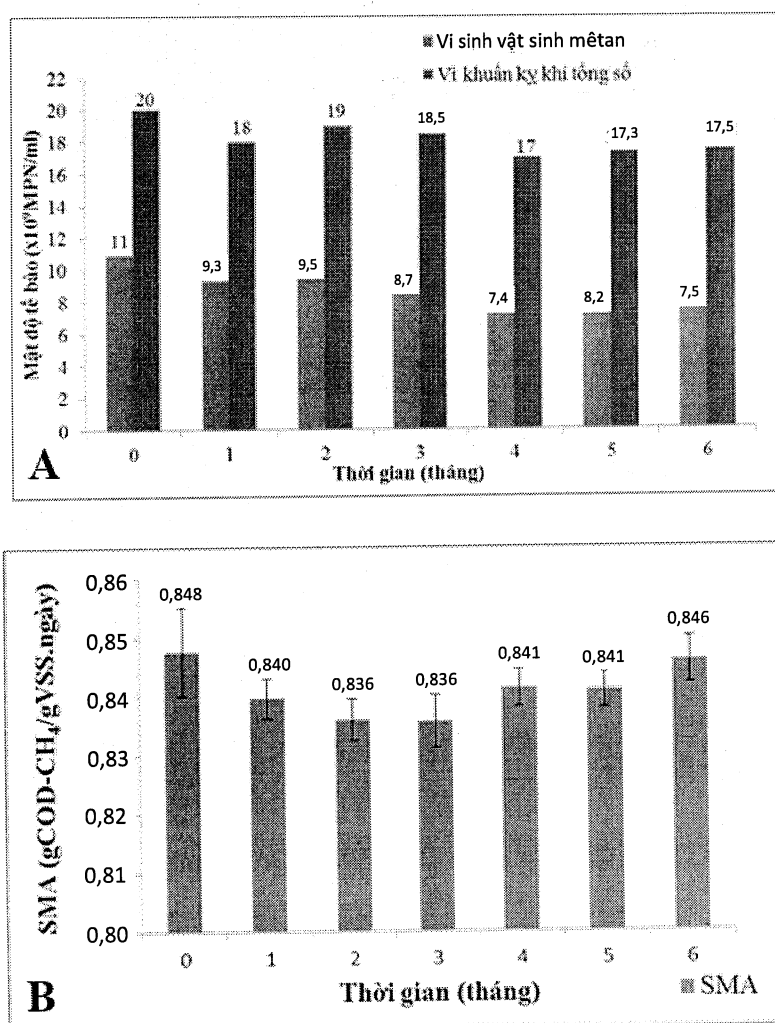
HÌNH 1



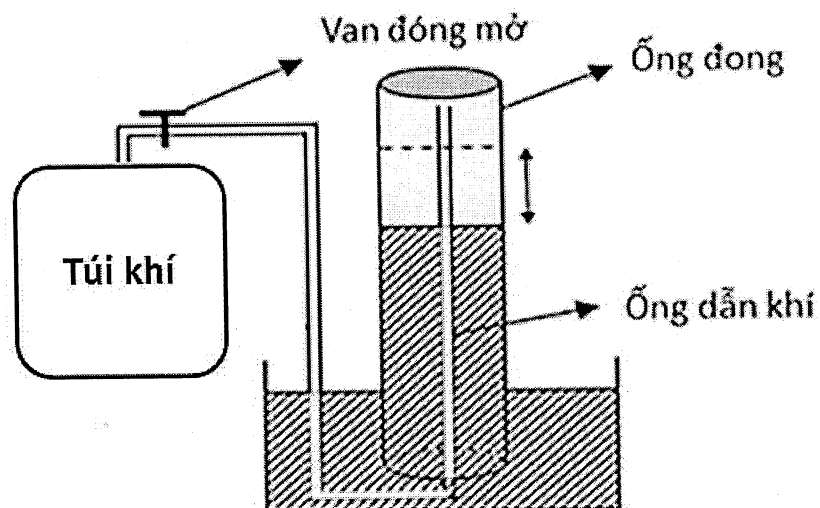
HÌNH 2



HÌNH 3



HÌNH 4



HÌNH 5

