



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

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

(11)



1-0031234

(51)⁷ C12N 1/20; C12R 1/125; C12R 1/10;
C12R 1/11; C02F 3/34; C12R 1/07

(13) B

(21) 1-2016-04422

(22) 26/04/2015

(86) PCT/CN2015/077473 26/04/2015

(87) WO 2015/184935 10/12/2015

(30) 201410241782.8 03/06/2014 CN

(45) 25/02/2022 407

(43) 25/07/2017 352A

(73) JIANGNAN UNIVERSITY (CN)

ZHANG, Liang No. 1800 Lihu Road Wuxi, Jiangsu 214122, China

(72) ZHANG, Liang (CN).

(74) Công ty TNHH Sáng chế ACTIP (ACTIP PATENT LIMITED)

(54) CHŨNG VI KHUẨN BACILLUS CẢI THIỆN TẦNG ĐÁY HIỆU QUẢ VÀ CHẾ PHẨM VI SINH PHỨC HỢP CẢI THIỆN TẦNG ĐÁY ĐƯỢC BẢO CHẾ TỪ VI KHUẨN NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn *Bacillus tequilensis* ZSGD5 có số truy cập là CCTCC M 2014004, được lưu giữ tại Bảo tàng giống chuẩn của Trung Quốc, Đại học Vũ Hán, Thành phố Vũ Hán, Trung Quốc vào ngày 06 tháng 01 năm 2014. Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm vi sinh *Bacillus* phức hợp bao gồm các chủng vi khuẩn *Bacillus tequilensis*, *Bacillus subtilis* thứ nhất, *Bacillus subtilis* thứ hai, *Bacillus licheniformis* thứ nhất, *Bacillus licheniformis* thứ hai, *Bacillus pumilus* và *Bacillus megaterium*. Chủng vi khuẩn *Bacillus tequilensis* theo sáng chế có khả năng làm sạch hiệu quả nước ở tầng đáy, đồng thời có thể nhanh chóng phân hủy và giảm lượng bùn dưới đáy ao hồ cũng như cải thiện hiệu quả nước môi trường đối với các hiện tượng như nước bị đen và nước bị đục, do đó vi khuẩn *Bacillus tequilensis* có thể được dùng để xử lý môi trường nước trong nuôi trồng thủy sản và xử lý nước thải đô thị.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế liên quan đến lĩnh vực công nghệ sinh học trong công nghiệp, cụ thể là sáng chế đề cập đến vi khuẩn *Bacillus tequilensis* và chế phẩm vi sinh bào chế từ vi khuẩn *Bacillus tequilensis* dùng trong nuôi trồng thủy sản và xử lý nước thải.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Việc sử dụng các tác nhân vi sinh để xử lý nước hoặc cải thiện và giữ gìn tốt môi trường sinh thái là mô hình kết hợp hiệu quả giữa các công nghệ kỹ thuật sinh học hiện đại với ứng dụng thực tế. Tuy nhiên, do có sự khác biệt lớn về chức năng giữa các vi sinh vật khác nhau nên việc sử dụng vi sinh vật hiệu quả nhất với lượng ít nhất để đạt được hiệu quả xử lý cao luôn là hướng nghiên cứu và phát triển liên tục của nhiều tổ chức nghiên cứu khoa học, các trường đại học và các doanh nghiệp.

Hiện nay, thức ăn thừa và phân của vật nuôi trong nuôi trồng thủy sản gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến môi trường nuôi, và đồng thời, do nước thải sinh hoạt ở nhiều đô thị được xả trực tiếp vào các con sông nằm trong hoặc chảy qua xung quanh các khu vực đó nên dẫn đến nước sông bị tích tụ nhiều chất hữu cơ, gây ra hiện tượng nước sông đen kịt. Việc phát triển các chế phẩm chứa quần thể vi sinh vật có hiệu quả dựa trên các đặc tính khác nhau của các vi sinh vật này để xử lý các chất hữu cơ dư thừa trong những khu vực nuôi trồng thủy sản và trong các con sông ở đô thị có ý nghĩa vô cùng thiết thực cho việc cải thiện và xử lý nước trong tương lai.

Nhằm giải quyết những vấn đề còn tồn tại nêu trên trong các giải pháp kỹ thuật đã biết, người nộp đơn đề xuất chủng vi khuẩn *Bacillus* cải thiện tăng đáy hiệu quả và chế phẩm vi sinh phức hợp cải thiện tăng đáy được bào chế từ chủng vi khuẩn này. Chủng vi khuẩn *Bacillus tequilensis* được đề xuất theo sáng chế có khả năng làm sạch nước ở tầng đáy một cách hiệu quả, đồng thời có thể nhanh chóng phân hủy và làm giảm lượng bùn ở tầng đáy cũng như cải thiện môi trường nước một cách hiệu quả đối với các hiện tượng như nước đen và đục, vì thế chủng vi khuẩn *Bacillus tequilensis* có thể được dùng để xử lý môi trường nước trong nuôi trồng thủy sản và xử lý nước thải đô thị.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Cụ thể, sáng chế đề xuất giải pháp kỹ thuật như sau:

Sáng chế đề xuất chủng vi khuẩn *Bacillus tequilensis* ZSGD5 được nộp lưu chủng vào ngày 06/01/2014 với mã số truy cập là CCTCC M 2014004 tại Bảo tàng giống chuẩn của Trung Quốc (China Center for Type Culture Collection - CCTCC), Đại học Vũ Hán, thành phố Vũ Hán, Trung Quốc.

Sáng chế còn đề xuất chế phẩm vi sinh *Bacillus* phức hợp bao gồm các loại vi khuẩn sau đây:

Chủng *Bacillus tequilensis*, chủng *Bacillus subtilis* thứ nhất, chủng *Bacillus subtilis* thứ hai, chủng *Bacillus licheniformis* thứ nhất, chủng *Bacillus licheniformis* thứ hai, chủng *Bacillus pumilus*, và chủng *Bacillus megaterium*;

Các chủng *Bacillus tequilensis*, *Bacillus subtilis* thứ nhất và *Bacillus licheniformis* thứ hai đều đã được lưu giữ tại Bảo tàng giống chuẩn của Trung Quốc (CCTCC) với các mã số truy cập lần lượt là CCTCC M 2014004, CCTCC M 2011443 và CCTCC M 2012458. Các chủng vi khuẩn còn lại là các sản phẩm thương mại có trên thị trường.

Chế phẩm vi sinh *Bacillus* phức hợp có số lượng vi sinh vật sống có hoạt lực nằm trong khoảng từ $5,0 \times 10^8$ - $2,0 \times 10^{10}$ cfu/g (cfu (Colony-forming units): đơn vị hình thành khuẩn lạc) với liều dùng nằm trong khoảng 20-100 g/mu (≈ 30 -150 g/1000 m² (1 mu (mẫu Trung Quốc) $\approx 666,666$ m²)), và thành phần các chủng vi khuẩn cụ thể như sau:

Loại vi khuẩn	Số lượng vi sinh vật sống trong mỗi gam sản phẩm, tính theo đơn vị cfu/g
Chủng <i>Bacillus tequilensis</i>	$1,0 \times 10^8$ - $5,0 \times 10^9$
Chủng <i>Bacillus subtilis</i> thứ nhất	$1,0 \times 10^8$ - $5,0 \times 10^9$
Chủng <i>Bacillus subtilis</i> thứ hai	$1,0 \times 10^8$ - $5,0 \times 10^9$
Chủng <i>Bacillus licheniformis</i> thứ nhất	$5,0 \times 10^7$ - $1,0 \times 10^9$
Chủng <i>Bacillus licheniformis</i> thứ hai	$0,8 \times 10^7$ - $5,0 \times 10^8$
Chủng <i>Bacillus pumilus</i>	$0,2 \times 10^7$ - $1,0 \times 10^8$
Chủng <i>Bacillus megaterium</i>	$5,0 \times 10^7$ - $1,0 \times 10^9$
Tổng số vi sinh vật sống	$5,0 \times 10^8$ - $2,0 \times 10^{10}$

Theo sáng chế, chế phẩm vi sinh *Bacillus* phức hợp có thể kiểm soát hiệu quả sự ô nhiễm gây ra do thức ăn thừa và phân của vật nuôi trong nước nuôi trồng nhằm duy

trì sự gia tăng lượng khí oxy hòa tan, ngăn chặn rong rêu dưới đáy ao và giảm nồng độ nitơ amoniac, nitrit và hydro sulfua trong nước khi được sử dụng nhằm cải thiện chất lượng nước ở tầng đáy của ao hồ nuôi trồng thủy sản.

Theo sáng chế, chế phẩm vi sinh *Bacillus* phức hợp có thể cải thiện tình trạng sông chết với dòng nước đen kịt, và giảm đến 40% nhu cầu oxy hóa học (chemical oxygen demand: COD) trong nước sông khi được sử dụng nhằm xử lý tình trạng nước đen và đục ở các con sông đô thị.

Các đặc điểm sinh học chính của vi khuẩn *Bacillus tequilensis*: đây là một loại vi khuẩn gram dương, hình que, có kích thước là 0,7-0,8 μm x 2-3 μm , không có vỏ nhầy, có lông roi và có khả năng di chuyển.

Chủng *Bacillus tequilensis* được sàng lọc từ bùn đáy của ao nuôi trồng thủy sản bằng phương pháp sàng lọc như sau: Cho nước muối sinh lý vô trùng vào bùn đáy lấy từ ao nuôi trồng thủy sản, lắc hỗn hợp trên bàn lắc ở nhiệt độ 37°C với tốc độ 120 vòng/phút trong khoảng thời gian 20 phút. Dùng pipet hút dịch nổi trên bề mặt rồi trộn vào chất lỏng có chứa bùn đáy lấy từ một con sông ô nhiễm khác làm chất nền. Lắc hỗn hợp dung dịch này trong thời gian 6 giờ. Sau khi pha loãng 10.000 lần, sử dụng que cấy gạt để chuyển chất lỏng đã được làm giàu này lên đĩa nuôi cấy rắn có môi trường nuôi cấy chỉ chứa lớp bùn đáy lấy từ sông ô nhiễm. Ủ đĩa nuôi cấy trong tủ ấm ở nhiệt độ 37°C trong khoảng thời gian từ 40 đến 48 giờ để cho phép các chủng vi khuẩn phát triển trên đĩa nuôi cấy. Tiến hành sàng lọc sau khi các chủng vi khuẩn đã phát triển tốt trên đĩa nuôi cấy.

Chủng *Bacillus tequilensis* được nuôi cấy theo phương pháp sau đây:

(1) Chuẩn bị môi trường nhân giống: hòa tan pepton với lượng 10 g/l, natri clorua với lượng 10 g/l và bột nấm men với lượng 5 g/l trong nước cất; sau khi tan hoàn toàn, điều chỉnh độ pH ở mức 7,5-7,6; đối với môi trường nuôi cấy rắn, bổ sung thêm bột aga với lượng 15 g/l vào môi trường nuôi cấy sau khi đã điều chỉnh độ pH; hấp tiệt trùng dung dịch đã chuẩn bị nêu trên ở nhiệt độ 121°C trong thời gian 20 phút.

(2) Tách một cụm khuẩn lạc *Bacillus* từ đĩa nuôi cấy rồi cấy chuyển trên môi trường thạch nghiêng trong ống nghiệm vô trùng, sau đó nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong khoảng thời gian từ 18 đến 24 giờ.

(3) Xử lý ống thạch nghiêng đã cấy nêu trên trong nước ở nhiệt độ 95-100°C trong thời gian 5-10 phút, lấy ra và làm mát nhanh xuống nhiệt độ phòng; tách một cụm khuẩn và cấy chuyển vào bình nón có dung tích 500 ml đã chứa 50 ml môi trường nuôi cấy lỏng rồi nuôi cấy trên bàn lắc ở nhiệt độ 37°C với tốc độ lắc 150 vòng/phút trong khoảng thời gian từ 18 đến 24 tiếng; và sau đó thu được dung dịch vi khuẩn có số lượng vi sinh vật sống là $1 \times 10^7 - 3 \times 10^{10}$ cfu/ml.

(4) Chủng vi khuẩn này có thể phát triển tốt trong môi trường nuôi cấy chứa nitrat hoặc nitrit dưới dạng nguồn nitơ duy nhất, và môi trường nuôi cấy đã nitrat hóa duy nhất bao gồm: glucoza 20 g/l, natri nitrat 2 g/l (hoặc natri nitrit 2 g/l), kali dihydro phosphat 2 g/l và magie sulfat 0,5 g/l với độ pH trong khoảng 6,0-6,2. Chủng *Bacillus tequilensis* được nuôi cấy tăng sinh bằng phương pháp như sau: Chuẩn bị môi trường nuôi cấy tăng sinh chứa glucoza 20 g/l, bột nấm men 10 g/l, pepton 15 g/l, kali dihydro phosphat 5 g/l và magie sulfat 1 g/l với độ pH 7,0. Quá trình nuôi cấy tăng sinh được thực hiện bằng cách lên men trong bể lên men lỏng ở các điều kiện được duy trì như sau: hệ số thông gió 1:2 vvm (Ventilation Volontaire Maximale), tốc độ khuấy 200 vòng/phút, áp suất 1 kg/m²; và độ pH được kiểm soát ở mức 6,0 bằng dung dịch NaOH hoặc HCl.

Sau khi thực hiện nuôi cấy lên men ở các điều kiện nêu trên trong thời gian từ 24 đến 48 giờ, thu được bào tử vi khuẩn với số lượng bào tử chiếm hơn 95% tổng số vi sinh vật sống và tổng số bào tử đạt đến $1 \times 10^9 - 5 \times 10^{10}$ cfu/ml trong dịch lên men. Vi khuẩn được thu gom từ dịch lên men bằng các phương pháp như ly tâm, lọc qua tấm lọc và lọc qua khung lọc sau đó được sấy phun để thu các bào tử mong muốn. Theo sáng chế, vi khuẩn thu được dưới dạng bào tử sẽ dùng làm nguyên liệu vi khuẩn để bào chế chế phẩm vi sinh phức hợp cải thiện tăng đáy.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Sáng chế có các hiệu quả kỹ thuật như sau:

Sau khi trải qua quy trình tạo hạt ở nhiệt độ cao, các chủng vi khuẩn có trong chế phẩm vi sinh *Bacillus* theo sáng chế vẫn giữ được hiệu lực cao. Ở các thử nghiệm trong các môi trường nước nuôi trồng khác nhau và trong nước lấy từ các con sông đô thị, chế phẩm vi sinh phức hợp này thể hiện chức năng tốt và khả năng phát triển cao của các tác nhân vi sinh được bổ sung trong chế phẩm.

Các loài vi khuẩn trong chế phẩm vi sinh *Bacillus* phức hợp được bào chế theo

sáng chế có thể nhanh chóng phân hủy các chất hữu cơ (thức ăn và phân, v.v., trong nước nuôi trồng) ở tầng đáy của môi trường nước được xử lý, đồng thời chuyển hóa hoàn toàn các chất hữu cơ để khử mùi hôi khó chịu ở tầng đáy; các loài vi khuẩn này có thể giúp đáy ao không bị đục và hôi thối; có thể kiểm soát các chất độc hại và nguy hiểm như hydro sulfua và nitơ amoniac trong ao; và có thể giúp tránh được tình trạng nước bùn vàng, nước đen, nước đỏ, nước sinh và nước đục, nhờ đó có tác dụng ức chế rõ ràng sự phát triển của tảo độc, bao gồm rong rêu và tảo lam, tảo lục, giúp nước nuôi trồng được duy trì ở môi trường sinh thái tốt.

Mô tả chi tiết sáng chế

1. Sàng lọc các loài vi khuẩn cải thiện tầng đáy hiệu quả

Chúng vi khuẩn thích hợp để cải thiện chất lượng nước được phân lập từ bùn đáy và nước trong ao nuôi trồng thủy sản, và có thể định danh chủng vi khuẩn này một cách hiệu quả và chính xác thông qua các phương tiện bao gồm quan sát đặc điểm hình thái, các thử nghiệm sinh lý học và sinh hóa, và phân tích trình tự gen 16S rADN của chủng đó.

Cân 2 g mẫu bùn đáy lấy từ một ao nuôi cua ở Khương Yên, Thái Châu, Giang Tô, Trung Quốc (Jangyan, Taizhou, Jiangsu, China). Bổ sung 98 ml nước muối sinh lý vô trùng. Lắc hỗn hợp này trên bàn lắc ở nhiệt độ 37°C với tốc độ lắc 120 vòng/phút trong thời gian 20 phút. Dùng pipet hút 1ml dịch nổi trên bề mặt rồi chuyển vào chất lỏng chứa bùn ở tầng đáy lấy từ một con sông ô nhiễm ở thành phố Vô Tích, Trung Quốc (Wuxi, China) làm chất nền. Lắc chất lỏng thu được này trong thời gian 6 giờ. Sau khi pha loãng chất lỏng đã được làm giàu này 10.000 lần, sử dụng que cấy gạt để chuyển chất lỏng đã pha loãng lên đĩa nuôi cấy rắn có môi trường nuôi cấy chỉ chứa bùn đáy lấy từ con sông ô nhiễm, sau đó ủ đĩa nuôi cấy trong tủ ấm ở nhiệt độ 37°C trong khoảng thời gian từ 40 đến 48 giờ. Sau đó thu được ba chủng vi khuẩn phát triển trên đĩa nuôi cấy, các chủng vi khuẩn này được đánh số lần lượt là ZSGD-1, ZSGD-5 và ZSGD-9. Các khuẩn lạc riêng rẽ được tách ra để nuôi cấy tăng sinh. Các thể vi khuẩn thu được từ quá trình nuôi cấy tăng sinh sẽ được sử dụng để thử nghiệm xử lý nước sông ô nhiễm. Chủng ZSGD-5 có tác dụng tương đối tốt được chọn ra. Kết quả thử nghiệm và xác định trình tự gen 16S rADN cùng các đặc tính sinh lý và sinh hóa cho thấy chủng vi khuẩn này thuộc loài *Bacillus tequilensis*, và có thể phát triển nhanh ở môi trường có nồng độ

oxy thấp cũng như có thể tiêu thụ được các dưỡng chất trong nước ô nhiễm.

Chủng ZSGD-5 thu được ở trên sau khi đã được phân loại thuộc loài *Bacillus tequilensis* được lưu giữ tại Bảo tàng giống chuẩn của Trung Quốc vào ngày 06 tháng 01 năm 2014 với số truy cập là M 2014004.

2. Nuôi cấy tăng sinh chủng vi sinh vật và thu gom sản phẩm

Chủng *Bacillus tequilensis* có số truy nhập tại CCTCC là M 2014004 được nuôi cấy và tăng sinh theo các phương pháp nuôi cấy được đề cập ở trên và dịch bào từ *Bacillus subtilis* được thu ở nồng độ nhất định; dịch bào từ này được ly tâm, sấy phun, v.v. để thu lấy sản phẩm bào tử ở dạng bột.

3. Phương pháp bào chế chế phẩm vi sinh phức hợp cải thiện tăng đáy (cụ thể là chế phẩm vi sinh *Bacillus* phức hợp)

Chủng *Bacillus tequilensis* đã sàng lọc và các chủng vi sinh vật có hoạt lực khác được phối trộn với nhau theo tỷ lệ số lượng vi sinh vật sống trong bột vi khuẩn rắn tương ứng; tỷ lệ số lượng vi khuẩn sống (so với tổng số lượng vi sinh vật sống của sản phẩm) trong chế phẩm bột vi khuẩn rắn có chứa các chủng vi sinh vật có hoạt lực khác nhau như sau:

Loại vi khuẩn	Số lượng vi sinh vật sống trong mỗi gam sản phẩm, tính theo đơn vị cfu/g
Chủng <i>Bacillus tequilensis</i> (CCTCC M 2014004)	$1,0 \times 10^9$
Chủng <i>Bacillus subtilis</i> thứ nhất (CCTCC M 2011443)	$1,0 \times 10^9$
Chủng <i>Bacillus subtilis</i> thứ hai	$1,0 \times 10^9$
Chủng <i>Bacillus licheniformis</i> thứ nhất (CCTCC M 2012458)	$1,0 \times 10^8$
Chủng <i>Bacillus licheniformis</i> thứ hai	$0,8 \times 10^8$
Chủng <i>Bacillus pumilus</i>	$0,2 \times 10^8$
Chủng <i>Bacillus megaterium</i>	$1,0 \times 10^8$
Tổng số vi sinh vật sống	$5,0 \times 10^9$

Tất cả các chủng vi khuẩn có mã số truy cập ở trên được lưu giữ tại Bảo tàng giống chuẩn của Trung Quốc, trong khi các chủng *Bacillus subtilis* thứ hai, *Bacillus licheniformis* thứ hai, *Bacillus pumilus* và *Bacillus megaterium* là do công ty Taizhou LvShengYuan Biological Co., Ltd. cung cấp.

Sau khi các loại bột vi khuẩn khác nhau nêu trên được trộn đều theo các tỷ lệ định trước, bổ sung một hoặc nhiều chất mang (bột cám, glucoza, bột ngô, bột cám gạo, bột

zeolit, diatomit, than hoạt tính, bột sericit) để tăng tổng trọng lượng đến 100% (với các chủng vi khuẩn *Bacillus* là các thành phần có hiệu quả, và các chất mang được bổ sung để có tổng trọng lượng sản phẩm phù hợp với số lượng vi sinh vật sống cuối cùng đạt $5,0 \times 10^9$ cfu/g). Cuối cùng, thực hiện quy trình tạo hạt để thu chế phẩm vi sinh dạng hạt và sau đó các hạt chế phẩm vi sinh này được đưa vào sử dụng.

Cũng có thể bào chế riêng mỗi loại bột vi khuẩn có hoạt lực theo phương pháp nêu trên, sau đó phối trộn các loại bột vi khuẩn này theo tỷ lệ định trước để thu được chế phẩm vi sinh phức hợp cải thiện tầng đáy, còn được gọi là chế phẩm vi sinh phức hợp *Bacillus* theo sáng chế. Sản phẩm này được dùng để cải thiện tầng đáy một cách hiệu quả ở các vùng nước bị ô nhiễm bởi các chất hữu cơ khác nhau, giúp bùn đáy chuyển từ màu đen sang màu vàng, đồng thời có thể giảm lượng thức ăn thừa và phân của vật nuôi tích tụ ở đáy ao nuôi trồng cũng như loại bỏ một cách hiệu quả các chất như nitơ amoniac, nitrit và hydro sulfua ở đáy ao.

Trong toàn bộ quy trình bào chế nêu trên, cần đảm bảo môi trường xung quanh luôn sạch sẽ để tránh tình trạng nhiễm bẩn. Độ ẩm của môi trường phải được kiểm soát ở mức dưới 70% và độ ẩm trong từng nguyên liệu phải dưới 15%. Sản phẩm bào chế được này có thể bảo quản trong thời gian 18 tháng ở nhiệt độ bình thường; thời hạn sử dụng có thể đạt tới 36 tháng ở nhiệt độ -18°C và số lượng vi sinh vật sống luôn ổn định trong thời hạn sử dụng.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ thử nghiệm 1: Sử dụng chế phẩm vi sinh *Bacillus* phức hợp để cải thiện môi trường nước nuôi cá vàng (*Carassius auratus*).

Lấy mẫu nước: Mẫu nước được lấy ở vị trí 30 cm dưới mặt nước và cách bờ ao 1,5 m tại một ao nuôi ở Thái Thương, Tô Châu, tỉnh Giang Tô, Trung Quốc (Taicang, Suzhou, Jiangsu, China). Mẫu nước được xử lý theo Thông số quan trắc môi trường nước. Trong thử nghiệm, nhiệt độ nước nuôi nằm trong khoảng từ $22-27^{\circ}\text{C}$ và kết quả đối chứng được lấy từ ao đối chứng không sử dụng chế phẩm vi sinh cải thiện tầng đáy theo sáng chế. Các hạt chế phẩm vi sinh được rải vào ao với liều lượng $500 \text{ g/mu}\cdot\text{m}$ ($\approx 750 \text{ g/1000 m}^3$). Các kết quả xử lý được thể hiện trong Bảng 1.

Bảng 1

	Nitơ amoniac (ppm*)		Nitrit (ppm)		Tổng lượng nitơ vô cơ (ppm)		Oxy hòa tan (ppm)		Phosphat (ppm)	
	Ao đối chứng	Ao thử nghiệm	Ao đối chứng	Ao thử nghiệm	Ao đối chứng	Ao thử nghiệm	Ao đối chứng	Ao thử nghiệm	Ao đối chứng	Ao thử nghiệm
Trước khi xử lý	2,4	2,5	0,15	0,14	0,249	0,241	3,2	3,1	0,065	0,067
2 ngày sau khi xử lý	2,3	1,9	0,13	0,09	0,252	0,185	3,1	3,5	0,093	0,043
3 ngày sau khi xử lý	2,3	0,08	0,16	0,07	0,247	0,102	3,4	4,5	0,087	0,038
4 ngày sau khi xử lý	2,4	0,07	0,15	0,06	0,253	0,103	3,6	5,2	0,087	0,029

(*) ppm (parts-per-million): phần triệu

Theo dữ liệu trong Bảng 1, có thể thấy rằng chế phẩm vi sinh phức hợp theo sáng chế có thể làm giảm một cách hiệu quả lượng nitơ amoniac, nitrit, tổng lượng nitơ vô cơ và phosphat trong nước và đồng thời có thể làm tăng nồng độ oxy hòa tan trong nước.

Ví dụ thử nghiệm 2: Sử dụng chế phẩm vi sinh *Bacillus* phức hợp để xử lý nước sông bị đen.

Hai mẫu nước ô nhiễm được lấy tại các vị trí khác nhau của một con sông bị ô nhiễm ở thành phố Vô Tích, Trung Quốc (Wuxi, China). Các thử nghiệm xử lý lần lượt được tiến hành với chế phẩm vi sinh theo sáng chế; nhóm đối chứng không được xử lý. Quy mô thử nghiệm là 5 lít và nhu cầu ô xy hóa học (COD) được kiểm tra theo tiêu chuẩn quốc gia tương ứng của Trung Quốc. Các hạt chế phẩm vi sinh được sử dụng với liều lượng là 500 g/mu•m (≈ 750 g/1000 m³). Các kết quả xử lý được thể hiện trong Bảng 2.

Bảng 2

	Nito amoniac (ppm)		Nitrit (ppm)		Tổng lượng nito vô cơ (ppm)		Oxy hòa tan (ppm)		Phosphat (ppm)	
	Ao đối chứng	Ao thử nghiệm	Ao đối chứng	Ao thử nghiệm	Ao đối chứng	Ao thử nghiệm	Ao đối chứng	Ao thử nghiệm	Ao đối chứng	Ao thử nghiệm
Trước khi xử lý	2,4	2,5	0,15	0,14	0,249	0,241	3,2	3,1	0,065	0,067
2 ngày sau khi xử lý	2,3	1,9	0,13	0,09	0,252	0,185	3,1	3,5	0,093	0,043
3 ngày sau khi xử lý	2,3	0,08	0,16	0,07	0,247	0,102	3,4	4,5	0,087	0,038
4 ngày sau khi xử lý	2,4	0,07	0,15	0,06	0,253	0,103	3,6	5,2	0,087	0,029

Theo kết quả được thể hiện trong Bảng 2, có thể thấy rằng có thể giảm một cách hiệu quả nhu cầu oxy hóa học (COD) trong nước sông ô nhiễm khi dùng chế phẩm vi sinh theo sáng chế để xử lý nước sông bị ô nhiễm.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chủng vi khuẩn *Bacillus tequilensis* ZSGD5 có mã số truy cập là CCTCC M 2014004, được lưu giữ tại Bảo tàng giống chuẩn của Trung Quốc, Đại học Vũ Hán, Thành phố Vũ Hán, Trung Quốc (Wuhan University, Wuhan City, China) vào ngày 06 tháng 01 năm 2014.

2. Chế phẩm vi sinh *Bacillus* phức hợp, khác biệt ở chỗ, chế phẩm này bao gồm các loại vi khuẩn sau đây:

chủng *Bacillus tequilensis*, chủng *Bacillus subtilis* thứ nhất, chủng *Bacillus subtilis* thứ hai, chủng *Bacillus licheniformis* thứ nhất, chủng *Bacillus licheniformis* thứ hai, chủng *Bacillus pumilus*, và chủng *Bacillus megaterium*;

trong đó chủng *Bacillus tequilensis*, chủng *Bacillus subtilis* thứ nhất và chủng *Bacillus licheniformis* thứ nhất đã được lưu giữ tại Bảo tàng giống chuẩn của Trung Quốc với các số truy cập lần lượt là CCTCC M 2014004, CCTCC M 2011443 và CCTCC M 2012458; và tất cả các loài vi khuẩn khác hiện đã có mặt trên thị trường.

3. Chế phẩm vi sinh theo điểm 2, khác biệt ở chỗ, chế phẩm này có số lượng vi sinh vật sống có hoạt lực là $5,0 \times 10^8 - 2,0 \times 10^{10}$ cfu/g với liều dùng là 20-100 g/mu ($\approx 30-150$ g/1000 m²) và thành phần các loài vi khuẩn như sau:

loài vi khuẩn	số lượng vi sinh vật sống trong mỗi gam sản phẩm, tính theo đơn vị cfu/g
chủng <i>Bacillus tequilensis</i>	$1,0 \times 10^8 - 5,0 \times 10^9$
chủng <i>Bacillus subtilis</i> thứ nhất	$1,0 \times 10^8 - 5,0 \times 10^9$
chủng <i>Bacillus subtilis</i> thứ hai	$1,0 \times 10^8 - 5,0 \times 10^9$
chủng <i>Bacillus licheniformis</i> thứ nhất	$5,0 \times 10^7 - 1,0 \times 10^9$
chủng <i>Bacillus licheniformis</i> thứ hai	$0,8 \times 10^7 - 5,0 \times 10^8$
chủng <i>Bacillus pumilus</i>	$0,2 \times 10^7 - 1,0 \times 10^8$
chủng <i>Bacillus megaterium</i>	$5,0 \times 10^7 - 1,0 \times 10^9$
tổng số vi sinh vật sống	$5,0 \times 10^8 - 2 \times 10^{10}$.