



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

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

(11)



1-0034961

(51)^{2020.01} C12N 1/20; C02F 3/12

(13) B

(21) 1-2020-06964

(22) 02/12/2020

(45) 27/03/2023 420

(43) 25/02/2021 395

(73) Viện Vi sinh vật và Công nghệ Sinh Học - Đại học Quốc gia Hà Nội (VN)

Nhà E2, 144 Xuân Thủy, Cầu Giấy, Hà Nội

(72) Đinh Thúy Hằng (VN); Lê Phương Chung (VN).

(54) QUY TRÌNH XỬ LÝ ĐỒNG THỜI NH_4^+ VÀ COD Ở ĐIỀU KIỆN KHỬ Fe^{3+}
TRÊN HỆ THỐNG BỂ KỶ KHÍ

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình xử lý đồng thời NH_4^+ và COD ở điều kiện khử Fe^{3+} trên hệ thống bể kỵ khí theo sáng chế bao gồm các bước:

(i) thiết lập hệ thống bể kỵ khí;

(ii) làm giàu vi khuẩn *feamox*; và

(iii) xử lý nước thải có hàm lượng NH_4^+ và COD cao theo chế độ vận hành liên tục.

Quy trình theo sáng chế sử dụng chủng vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* FN9 được phân lập từ bùn của nhà máy xử lý nước thải chế biến thủy sản có khả năng oxy hóa NH_4^+ với tốc độ 44,64 mg/L/ngày và khử Fe^{3+} với tốc độ 208 mg/L/ngày. Trình tự 16S rADN của chủng FN9 được lưu giữ trong ngân hàng dữ liệu GenBank với mã số MT568614. Hệ vi khuẩn *feammox* được làm giàu trong các bể của hệ thống sử dụng bùn từ nhà máy xử lý nước thải chế biến thủy sản và chủng FN9 được phân lập trong sáng chế. Môi trường làm giàu chứa NH_4^+ làm chất cho điện tử, Na-axetat làm nguồn cacbon và ferrhydrit làm chất nhận điện tử. Việc loại đồng thời COD và NH_4^+ đạt hiệu quả cao nhất khi tỷ lệ $[\text{COD}]/[\text{NH}_4^+]$ trong nước thải đạt 1,4. Quy trình xử lý áp dụng với dòng thải chứa ≤ 100 mg/L NH_4^+ và COD theo tỷ lệ với NH_4^+ là 1,4 theo chế độ liên tục với vận tốc 17% thể tích của toàn bộ hệ thống đạt hiệu quả loại tới $>90\%$ NH_4^+ và $>60\%$ COD với thời gian lưu là 6 ngày, sản phẩm chuyển hóa NH_4^+ là khí N_2 .

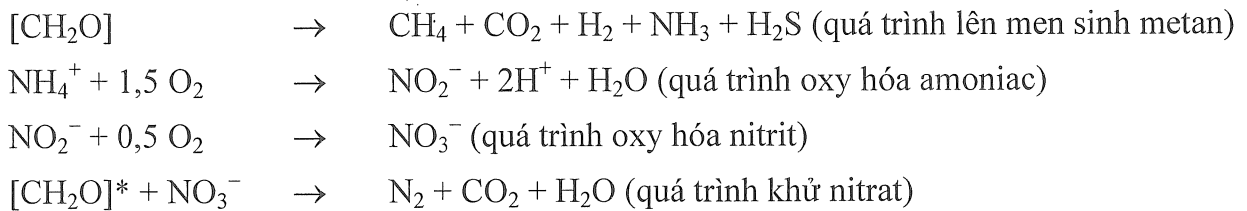
Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp đồng thời loại NH_4^+ và COD trong nước thải ở điều kiện kỵ khí, dựa trên hoạt tính oxy hóa NH_4^+ kết hợp khử ion sắt Fe^{3+} của vi sinh vật. Cụ thể, sáng chế đề xuất quy trình xử lý đồng thời NH_4^+ và COD ở điều kiện khử Fe^{3+} trên hệ thống bể kỵ khí. Việc loại NH_4^+ và COD ở điều kiện kỵ khí khử Fe^{3+} khi áp dụng quy trình này đạt hiệu quả cao, không tiêu tốn năng lượng, là giải pháp công nghệ mới trong xử lý nước thải giàu amoniac.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Nước thải có hàm lượng amoniac cao là nguồn ô nhiễm nguy hiểm cần được xử lý trước khi xả ra môi trường. Tiêu chuẩn xả thải dành cho NH_4^+ áp dụng đối với các loại nước thải là 5 mg/L (kênh A) hoặc 10 mg/L (kênh B) (TCVN:2014-BTNMT), và dần tiến tới thống nhất ở mức kênh A. Amoniacc là nguyên nhân gây ra tình trạng thiếu oxy trong nước do hoạt động của vi khuẩn nitrat hóa ($1 \text{ mg } \text{NH}_4^+$ đòi hỏi $4,6 \text{ mg } \text{O}_2$), ảnh hưởng đến các loài sinh vật nước (Bitton, 1999). Dư lượng NH_4^+ trong các thủy vực có thể dẫn đến hiện tượng phú dưỡng của nước, tạo điều kiện cho các thực vật nước, đặc biệt là vi tảo phát triển nhanh, làm chết các động vật thủy sinh do thiếu oxy (hiện tượng tảo nở hoa) (Abdel-Raouf, 2012). Người, đặc biệt là trẻ em, thu nhận nguồn nước có hàm lượng NH_4^+ cao sẽ có nguy cơ tích lũy các hợp chất nitrit trong cơ thể, có thể (i) oxy hóa Fe^{2+} trong hemoglobin thành Fe^{3+} , kết hợp với hemoglobin tạo thành methemoglobin, không có khả năng vận chuyển oxy dẫn đến cơ thể bị thiếu máu, hoặc (ii) kết hợp với các amin tạo nitrosoamin, là tác nhân gây sảy thai, đột biến gen và ung thư (Bouchard *et al.*, 1992).

Thông thường, nước thải có hàm lượng COD và NH_4^+ cao như nước thải từ các hệ thống chăn nuôi gia súc, chế biến thực phẩm... được xử lý trong các hệ thống kỵ khí chuyển hóa COD thành metan, sau đó loại NH_4^+ theo nguyên lý nitrat hóa – khử nitrat. Hai quá trình này cần được diễn ra độc lập vì (i) chuyển hóa COD thành metan là quá trình kỵ khí hoàn toàn, miễn cảm với nồng độ NH_4^+ cao trong hệ thống, trong khi đó (ii) nitrat hóa là quá trình hiếu khí nhờ các vi khuẩn tự dưỡng vô cơ, miễn cảm với hàm lượng COD cao trong hệ thống (Bitton, 1999; Letinga *et al.*, 1997). Toàn bộ quá trình xử lý COD kỵ khí sinh metan và loại NH_4^+ theo nguyên lý nitrat hóa – khử nitrat diễn ra theo các phương trình phản ứng như sau (Bitton, 1999):

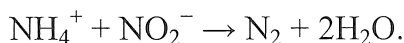


* Chú thích: $[\text{CH}_2\text{O}]$ là công thức rút ngắn biểu diễn cho chất hữu cơ

Loại COD ở điều kiện kỵ khí sinh metan là kỹ thuật được áp dụng từ thế kỷ 19 đến nay vẫn thể hiện tính hiệu quả cao, được áp dụng theo các hình thức công nghệ khác nhau như bể biogas, UASB, AF, bể tự hoại (Bitton, 1999). Quá trình được thực hiện nhờ tổ hợp các vi sinh vật (ở dạng bùn kỵ khí) đóng vai trò khác nhau trong chuyển hóa cacbon hữu cơ thành metan, cụ thể là (i) thủy phân các hợp chất cao phân tử thành đơn phân, (ii) lên men sinh axit, (iii) chuyển hóa axit béo bay hơi (VFA), hydro thành axetat (nhóm acetogen) và (iv) sinh metan từ hydro và axetat. Quá trình kỵ khí chuyển hóa COD thành metan được ứng dụng để xử lý nguồn thải có hàm lượng COD rất cao, thậm chí tới hàng chục nghìn mg/L (Lettinga *et al.*, 1997).

Nitrat hóa là quá trình chuyển hóa sinh học tối quan trọng, thường là yếu tố hạn chế (limiting factor) đối với toàn bộ quá trình loại NH_4^+ (Bitton, 1999). Điều kiện thuận lợi cho bước nitrat hóa xảy ra là hàm lượng oxy hòa tan ở mức $> 2 \text{ mg/l}$, nhiệt độ ở mức 30°C , pH nằm trong khoảng 7,5 – 8 và tỷ lệ BOD/TKN ở mức 3 (Schapleigh, 2000). Trong thực tế, khó thiết lập điều kiện tối ưu để quá trình nitrat hóa diễn ra hiệu quả, đặc biệt do các vi khuẩn nitrat hóa sinh trưởng tự dưỡng vô cơ, có tính miễn cảm cao đối với cacbon hữu cơ và có nhu cầu về năng lượng để cấp oxy rất lớn (Bitton, 1999).

Các quá trình xử lý kỵ khí có ưu điểm vượt trội so với các quá trình xử lý hiếu khí do hoàn toàn không tiêu tốn năng lượng. Từ những năm 1980, công nghệ xử lý NH_4^+ trong nước thải theo nguyên lý anammox đã được nghiên cứu và áp dụng ở một số quốc gia tiên tiến như Hà Lan, Nhật Bản, cho phép tiết kiệm 50% năng lượng (Sheela, Khasim, 2014). Các chủng vi khuẩn anammox được phân lập tới nay thuộc 5 chi của ngành *Planctomycetes*, cụ thể là *Brocadia*, *Kuenenia*, *Anammoxoglobus*, *Jettenia*, và *Scalindua* (Pereira *et al.*, 2017). Phương trình phản ứng của quá trình anammox diễn ra như sau:



Hệ thống xử lý NH_4^+ vận hành theo chế độ Sequencing Batch Reactors (SBR) là phương án công nghệ dựa trên nguyên lý annamox (Bae *et al.*, 2016). Công nghệ được vận hành theo 2 bước, trong đó bước thứ nhất là nitrit hóa (hiếu khí) nhờ vi khuẩn oxy hóa NH_4^+ *Nitrosomonas* spp. ($2\text{NH}_4^+ + 3\text{O}_2 \rightarrow 2\text{NO}_2^- + 4\text{H}^+ + 2\text{H}_2\text{O}$) và bước thứ hai là kỵ khí

oxy hóa NH_4^+ bằng nitrit thành nitơ nhờ vi khuẩn anammox ($\text{NH}_4^+ + \text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$). Mặc dù có ưu điểm là tiết kiệm năng lượng trong quá trình vận hành, công nghệ xử lý NH_4^+ theo nguyên lý anammox có một số điểm hạn chế như (i) mẫn cảm với điều kiện oxy trong hệ xử lý do kết hợp hai quá trình hiếu khí (oxy hóa NH_4^+ thành NO_2^- nhờ vi khuẩn *Nitrosobacter*) và quá trình kỵ khí (oxy hóa NH_4^+ kết hợp với khử NO_2^- nhờ vi khuẩn anammox), (ii) tỷ lệ $\text{NH}_4^+/\text{NO}_2^-$ cần được duy trì ổn định để phản ứng anammox có thể diễn ra hoàn toàn, (iii) tốc độ sinh trưởng của vi khuẩn anammox rất chậm (10 ngày – 2 tuần), do vậy khó tạo ra lượng sinh khối đủ lớn để vận hành các hệ thống xử lý (Bae *et al.*, 2016; Du *et al.*, 2014).

Trong vài năm gần đây, một con đường chuyển hóa NH_4^+ mới có tên gọi là feammox được phát hiện ở vi sinh vật, theo đó NH_4^+ được sử dụng làm nguồn điện tử để khử Fe^{3+} và tích lũy năng lượng cho quá trình sinh trưởng (Clemen *et al.*, 2005; Sawayama, 2006; Shrestha *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2012). Vi sinh vật feammox đầu tiên được phân lập là *Acidimicrobiaceae* sp. A6 có khả năng oxy hóa NH_4^+ kết hợp với khử Fe^{3+} ở pH thấp (pH 4 – 5), NH_4^+ được chuyển hóa thành NO_2^- , trong khi Fe^{3+} bị khử thành Fe^{2+} , quá trình diễn ra theo phản ứng như sau (Huang, Jaffe, 2018):



Trên cơ sở đặc tính sinh học của nhóm vi khuẩn feammox này, Jaffe và cộng sự (Đại học Princeton) đã đề xuất giải pháp mới cho việc loại NH_4^+ trong nước thải (Jaffe *et al.*, 2015). Quá trình loại NH_4^+ nhờ vi khuẩn feammox được thực hiện trong điều kiện kỵ khí hoàn toàn, do vậy không tiêu tốn năng lượng để cấp oxy cho bước nitrat hóa như ở các quy trình công nghệ trước đây. Chúng vi khuẩn feammox *Acidimicrobiaceae* sp. A6 sinh trưởng trong điều kiện pH thấp (4 – 5) và tự dưỡng (sử dụng CO_2 làm nguồn cacbon để sinh trưởng) (Jaffe *et al.*, 2015; Huang, Jaffe, 2018). Do vậy, việc áp dụng loại vi khuẩn này để loại NH_4^+ trong nước thải trong thực tế sẽ bị hạn chế bởi 2 yếu tố (i) cacbon hữu cơ và (ii) pH. Theo đó, quy trình xử lý cần có hai bước hỗ trợ như sau:

- Thứ nhất, cacbon hữu cơ trong nước thải cần được xử lý bằng lên men kỵ khí sinh metan trước khi chuyển sang quy trình loại NH_4^+ bằng vi khuẩn feammox *Acidimicrobiaceae* sp. A6 để giảm thiểu sự cạnh tranh của các loài dị dưỡng cũng như đáp ứng tính mẫn cảm của vi khuẩn này đối với cacbon hữu cơ.
- Thứ hai, pH của nước thải sau bước lên men sinh metan có tính kiềm (thường ở mức 7,5 – 8) cần được điều chỉnh về 4 – 5 để phù hợp với vi khuẩn này.

Trong thực tế rất thường gặp nước thải đồng thời chứa NH_4^+ và cacbon hữu cơ ở nồng độ cao. Việc kết hợp loại hai chất ô nhiễm này ở điều kiện kỵ khí sẽ giúp rút ngắn thời gian xử lý. Do đó, vẫn có nhu cầu về quy trình xử lý nước thải có khả năng xử lý đồng thời NH_4^+ và COD ở điều kiện kỵ khí có hiệu quả cao hơn.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất quy trình xử lý đồng thời NH_4^+ và COD ở điều kiện khử Fe^{3+} ở dạng ferrihydrit là chất nhận điện tử duy nhất trên hệ thống bể kỵ khí. Các yếu tố liên quan đến hiệu quả xử lý như nồng độ NH_4^+ , tỷ lệ $[\text{COD}]/[\text{NH}_4]$, hiệu điện thế oxy hóa khử, pH môi trường trong hệ thống xử lý được xác định ở mức tối ưu. Quy trình ứng dụng chủng vi khuẩn thuần khiết *Pseudomonas stutzeri* FN9 với khả năng oxy hóa NH_4^+ dị dưỡng và khử Fe^{3+} . Chủng *Pseudomonas stutzeri* FN9 được phân lập từ lớp bùn sắt của nhà máy xử lý nước thải chế biến thủy sản. Chủng vi khuẩn này được sử dụng để làm giàu hệ vi khuẩn feamox ứng dụng trong quy trình theo sáng chế.

Quy trình xử lý đồng thời NH_4^+ và COD ở điều kiện khử Fe^{3+} trên hệ thống bể kỵ khí theo sáng chế bao gồm các bước:

- (i) thiết lập hệ thống bể kỵ khí;
- (ii) làm giàu vi khuẩn feamox; và
- (iii) xử lý nước thải có hàm lượng NH_4^+ và COD cao theo chế độ vận hành liên tục.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là hình ảnh sơ đồ thiết kế hệ thống bể kỵ khí để xử lý nước thải có hàm lượng COD và NH_4^+ cao ở điều kiện khử Fe^{3+} .

Hình 2 là hình ảnh tế bào chủng FN9 phân lập từ bùn của nhà máy xử lý nước thải (A) và cây phân loại dựa trên trình tự 16S rADN của chủng FN9 so với các loài liên quan đã công bố trên ngân hàng dữ liệu GenBank (B).

Hình 3 là hình ảnh hoạt tính oxy hóa NH_4^+ và khử Fe^{3+} của chủng FN9.

Hình 4 là hình ảnh minh họa hoạt tính oxy hóa NH_4^+ của hệ vi khuẩn feamox được làm giàu trong hệ thống bể kỵ khí quy mô phòng thí nghiệm.

Hình 5 là hình ảnh thí nghiệm vận hành hệ thống bể kỵ khí theo mẻ để xác định tỷ lệ $[\text{COD}]/[\text{NH}_4^+]$ phù hợp cho quá trình loại đồng thời COD và NH_4^+ ở điều kiện khử Fe^{3+} .

Hình 6 là hình ảnh khí N_2 tạo thành trong các bể của hệ thống xử lý khí xử lý nước thải có tỷ lệ $[COD]/[NH_4^+]$ khác nhau theo chế độ mẻ.

Hình 7 là hình ảnh kết quả xử lý đồng thời NH_4^+ và COD của dòng thải có tỷ lệ $[COD]/[NH_4^+] = 1,4$ trên hệ thống bể kỵ khí theo chế độ vận hành liên tục.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề quy trình xử lý đồng thời NH_4^+ và COD ở điều kiện khử Fe^{3+} trên hệ thống bể kỵ khí, quy trình theo sáng chế gồm các bước như sau:

(i) Thiết lập hệ thống bể kỵ khí:

Thiết lập hệ thống bể kỵ khí gồm 3 bể kỵ khí, có nắp đậy kín khí, kích thước bằng nhau, và 1 bể lắng không có nắp đậy, trong đó thể tích làm việc của bể lắng lớn hơn thể tích làm việc của bể kỵ khí. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực xử lý nước thải sẽ biết cách xác định thể tích làm việc trong hệ thống bể kỵ khí. Trong mỗi bể, bổ sung giá thể hạt nhựa kích thước 12×7 mm (diện tích bề mặt riêng là $850 \text{ m}^2/\text{m}^3$), trong đó thể tích giá thể hạt nhựa bằng 1/30 so với thể tích làm việc của bể kỵ khí. Nước thải di chuyển lần lượt qua các bể thông qua các ống nổi hướng đáy, đảm bảo được tiếp xúc với lớp giá thể chứa vi sinh vật.

(ii) Làm giàu vi khuẩn feammox (oxy hóa NH_4^+ , khử Fe^{3+})

Đưa vào các bể kỵ khí nguồn Fe^{3+} ở dạng dịch huyền phù ferrihydrit, được chuẩn bị theo phương pháp do Ratering (1999) mô tả. Fe^{3+} ở dạng ferrihydrit như được tạo ra theo phương pháp này để tham gia các phản ứng hóa học và sinh học nhất. Trong điều kiện thực tế có thể sử dụng bùn sắt từ các nhà máy xử lý nước sạch hay bùn đỏ từ các điểm khai thác bùn đỏ bô xít làm nguồn Fe^{3+} . Môi trường khoáng dành cho vi khuẩn khử Fe^{3+} (Ratering, 1999) được đuổi oxy bằng khí N_2/CO_2 (90/10, thể tích/thể tích) trong thời gian 3 – 5 phút và chuyển vào các bể của hệ thống xử lý bằng bơm nhu động. Môi trường được ổn định pH ở 7 – 7,2 bằng hệ đệm bicacbonat $NaHCO_3$ (30 mM) hoặc đá vôi đập nhỏ tùy điều kiện thực tế.

Để tạo hệ vi khuẩn feammox, bùn từ nhà máy xử lý nước thải chế biến thủy sản được sử dụng làm nguồn vi sinh vật ban đầu và được bổ sung vào các bể theo tỷ lệ 10% thể tích. Bổ sung dịch nuôi cấy chủng vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* FN9 vào cùng với bùn sắt theo tỷ lệ 3% thể tích. Các bể kỵ khí của hệ thống sau đó được đóng kín và dịch được bơm tuần hoàn với tốc độ tương đương 17% thể tích chứa của toàn bộ hệ thống/ngày đêm, nhiệt độ ổn định ở 28 – 32°C.

Chủng vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* FN9 được phân lập từ bùn của nhà máy xử lý nước thải chế biến thủy sản, sử dụng phương pháp ống thạch bán lỏng. Chủng này có trình tự 16S rADN tương đồng tới 99% so với loài *Pseudomonas stutzeri*, là một loài vi khuẩn dị dưỡng được mô tả với đặc tính trao đổi chất đa dạng, trong đó có khả năng oxy hóa NH_4^+ dị dưỡng và khử Fe^{3+} (Lalucat *et al.*, 2006). Trình tự 16S rADN của chủng FN9 được đăng ký trên ngân hàng dữ liệu GenBank với mã số MT568614. Chủng vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* FN9 được bảo quản ở dạng ống đông khô tại Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội.

Hoạt tính của vi khuẩn feammox trong bùn kỵ khí được đánh giá thông qua hàm lượng NH_4^+ bị loại. Sau 25 ngày, hệ vi khuẩn feammox trong bùn kỵ khí có hoạt tính oxy hóa NH_4^+ và khử Fe^{3+} cao. Hệ vi khuẩn feammox được hình thành ở đáy các bể kỵ khí của hệ thống, chủ yếu bám dính trên bề mặt giá thể nhựa và các hạt ferrihydrit.

(iii) Xử lý nước thải có hàm lượng NH_4^+ và COD cao theo chế độ vận hành liên tục

Rút dịch môi trường ra khỏi các ngăn kỵ khí sao cho không ảnh hưởng tới lớp bùn đã được hình thành ở đáy.

Xác định tỷ lệ $[\text{COD}]/[\text{NH}_4^+]$ trong nước thải cần xử lý và thực hiện điều chỉnh ở mức 1,4. Việc xác định tỷ lệ $[\text{COD}]/[\text{NH}_4^+]$ trong nước thải có thể được thực hiện bằng cách đo nồng độ COD và NH_4^+ . Trong trường hợp tỷ lệ này trong nước thải không phù hợp, thường là thiếu hụt COD, thực hiện điều chỉnh bằng cách bổ sung nguồn cacbon hữu cơ đơn giản (như axetat) hoặc hỗn hợp (như rỉ đường hay nước thải chăn nuôi), thành phần COD và NH_4^+ cần được xác định trước khi bổ sung.

Dịch nước thải được loại oxy bằng cách thổi khí argon trong 3 phút, sau đó được bơm vào hệ thống từ ngăn đầu tiên, tốc độ bơm là 17% thể tích chứa của toàn bộ hệ thống/ngày đêm.

Dịch nước thải chảy từ bể đầu tiên sang bể thứ hai và thứ ba theo nguyên lý chảy tràn, thời gian lưu tương ứng ở mỗi bể lần lượt là 2, 4 và 6 ngày. Sau bể thứ ba, nước thải chảy sang bể cuối (không kín khí), tại đây diễn ra quá trình lắng của Fe^{2+} . Trong trường hợp sử dụng đệm NaHCO_3 trong dịch nước thải, Fe^{2+} lắng chủ yếu ở dạng FeCO_3 kết tủa trắng, còn trong trường hợp sử dụng đá vôi, Fe^{2+} sẽ phản ứng và kết tủa với cacbonat sinh ra từ đá vôi được đưa vào bể trước đó. Hàm lượng NH_4^+ và COD trong mỗi bể được xác định hàng ngày. Kết quả vận hành cho thấy với thời gian lưu 6 ngày ở bể kỵ khí thứ 3, hiệu quả xử lý NH_4^+ đạt mức cao nhất là 80 – 90%. Hiệu điện thế oxy hóa khử ở bể kỵ khí thứ 3 đối với nước thải có tỷ lệ $[\text{COD}]/[\text{NH}_4^+]$ là 1,4 cũng đạt mức ổn định, dao động trong

khoảng $-20 \div 5$ mV. Đồng thời, COD trong nước thải được loại ở mức 54 – 66%. Toàn bộ quá trình xử lý hoàn toàn không tiêu tốn năng lượng và đạt hiệu quả cao.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Phân lập chủng vi khuẩn Pseudomonas stutzeri FN9 có khả năng oxy hóa NH_4^+ khử Fe^{3+}

Bùn sắt từ nhà máy xử lý nước thải chế biến thủy sản được sử dụng để phân lập vi khuẩn. Lấy 1 g bùn và pha loãng trong dung dịch muối 0,9% theo tỷ lệ 1:10 (thể tích), lắc mạnh trên máy vortex trong 1 – 2 phút, sau đó cấy vào các ống thạch bán lỏng (1%) trong môi trường FM chứa NH_4^+ (10 mM) làm chất cho điện tử và sắt (III) xitrat (30 mM) làm chất nhận điện tử. Na-axetat (1 mM) được bổ sung vào môi trường làm nguồn cacbon cho vi khuẩn sinh trưởng. Các ống thạch sau đó được đặt ở nhiệt độ 28°C trong tư thế đảo đầu. Khuẩn lạc vi khuẩn xuất hiện trong cột thạch sau 2 – 3 tuần, được tách bằng mao quản thủy tinh và chuyển sang ống nghiệm kín khí chứa môi trường FM dịch thể kỵ khí. Chủng FN9 thu được bằng phương pháp này có tế bào hình trực khuẩn ngắn, kích thước $2,1 - 3,3 \times 0,6 - 0,7 \mu\text{m}$ (Hình 2A).

ADN hệ gen của chủng FN9 được tinh sạch theo phương pháp do Zhou và cs. mô tả (1996) với cải biến về nồng độ đệm phosphate (tăng từ 100 mM lên 120 mM) trong đệm tách. Các bước tiến hành như sau:

- Trộn 2 ml mẫu môi trường với 5,4 ml đệm tách ADN (gồm 100 mM Tris pH 8; 100 mM EDTA pH 8; 120 mM đệm phosphate $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$; 1,5 M NaCl; 1% CTAB) trong ống falcol 15 ml.
- Bổ sung 40 μl proteinaza K (10 mg/ml), lắc ngang với tốc độ 225 vòng/phút trong 30 phút ở 37°C .
- Thêm 600 μl SDS (20%), ủ ở 65°C trong 2 giờ, 25 phút đảo lộn đầu một lần.
- Bổ sung với lượng tương đương PCI về thể tích, sau đó trộn đều. Ly tâm 6000 vòng/phút trong 10 phút ở nhiệt độ phòng.
- Thu lấy phần dịch phía trên sang ống mới, lặp lại bước trên 1 lần.
- Thu lấy phần dịch phía trên sang ống mới, bổ sung 0,6 lần thể tích isopropanol, ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ.

- Ly tâm thu kết tủa ADN ở 12000 vòng/ phút trong 25 phút ở nhiệt độ phòng. Đổ phần dịch ở trên, rửa kết tủa với 10 ml etanol 80%, ly tâm 12000 vòng/phút trong 15 phút ở nhiệt độ phòng. Đổ etanol, để khô ở nhiệt độ phòng.
- Hòa tan ADN trong 50 μ l nước MQ đã khử trùng, chuyển ADN sang ống eppendorf 1,5 ml và giữ ở -20°C .

Đoạn 16S rADN (~1500 bp) của chủng FN9 sau đó được khuếch đại trong phản ứng PCR sử dụng cặp mồi 27F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) và 1492R (GGTTACCTTGTTACGACT T) (Weisburg *et al.*, 1991) với thành phần phản ứng được trình bày cụ thể tại bảng 1.

Bảng 1. Thành phần phản ứng PCR khuếch đại 16S rADN ở chủng FN9

Thành phần phản ứng	Thể tích (μ l)
Nước PCR	13,5
10 $\times$ đệm PCR	2,5
BSA (3 mg/ml)	2,5
MgCl ₂ (20 mM)	2
dNTP (2,5 mM)	2
Mồi 27F (50 pmol/ μ l)	0,5
Mồi 1492R (50 pmol/ μ l)	0,5
<i>Taq</i> polymeraza (5u/ μ l)	0,5
ADN Khuôn	1
Tổng thể tích phản ứng	25

Chu trình nhiệt của phản ứng PCR gồm các bước như sau: biến tính tại 94°C trong 3 phút, sau đó thực hiện 35 chu kỳ 3 bước 94°C trong 30 giây, 55°C trong 45 giây và 72°C trong 1,5 phút, kết thúc bằng bước kéo dài chuỗi ở 72°C trong 7 phút rồi dừng ở 20°C . Sản phẩm PCR sau đó được tinh sạch bằng kit PCR-purification (Bioneer - Hàn Quốc) và tiến hành phản ứng giải trình tự với ABI Prism BigDye Terminator cycle sequencing kit và đọc trình tự trên máy tự động 3110 Avant Applied Biosystems. Trình tự 16S rADN được phân tích, so sánh với trình tự 16S rADN của các loài có liên quan hiện đã công bố trên ngân hàng dữ liệu DDBJ/EMBL/GenBank sử dụng phần mềm BLAST Search. Cây phân loại được dựng theo phương pháp neighbour-joining (Saitou và Nei, 1987), trong đó định dạng cây được tiến hành dựa trên 1000 phép so sánh đa chiều (Felsenstein, 1985).

Trình tự 16S rADN của chủng FN9 có độ tương đồng cao nhất với loài *Pseudomonas stutzeri* (99,86%) và được lưu giữ tại ngân hàng dữ liệu GenBank với mã số MT568614. Chủng FN9 được đặt tên khoa học là *Pseudomonas stutzeri* FN9, cây phân loại dựa trên so sánh trình tự 16S rADN của chủng này với các loài có liên quan được trình bày tại hình 2B. *Pseudomonas* là chi vi khuẩn thuộc phân lớp γ -*Proteobacteria*, phổ biến trong tự nhiên và có nhiều loài mang các đặc tính sinh lý đặc biệt. Riêng ở *P. stutzeri* thì khả năng oxy hóa NH_4^+ ở điều kiện khử Fe^{3+} lần đầu tiên được phát hiện trong nghiên cứu này thông qua chủng FN9.

Đánh giá khả năng oxy hóa NH_4^+ và khử Fe^{3+} của chủng *Pseudomonas stutzeri* FN9

Trong thí nghiệm đánh giá khả năng oxy hóa NH_4^+ , chủng FN9 được nuôi trong bình serum thể tích 100 ml chứa 70 ml môi trường SNDM (Bảng 2) và lượng NH_4^+ bị oxy hóa theo thời gian được xác định (Hình 3A). Trong thí nghiệm đánh giá khả năng khử Fe^{3+} , chủng FN9 được nuôi trong môi trường FM kỵ khí (Bảng 3, 4, 5) chứa ferrihydrit (30 mM) là chất nhận điện tử và xác định lượng Fe^{2+} tạo ra theo thời gian (Hình 3B).

Bảng 2. Thành phần môi trường SNDM (Xu *et al.*, 2017)

Thành phần hóa học	Hàm lượng (g)
K_2HPO_4	7
KH_2PO_4	3
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,05
CH_3COONa , pH 7.2	10
KNO_3	1,45
Nước cất	Tối 1000 ml

Bảng 3: Thành phần môi trường khoáng FM (Ratering, 1999)

Thành phần hóa học	Hàm lượng (g)
NaCl	1 g
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,4 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,15 g
KCl	0,5 g
KH_2PO_4	0,2 g
NH_4Cl	0,25 g
Nước cất	Tối 1000 ml

Môi trường sau khi pha được bổ sung một số dung dịch như sau (Bảng 4):

Bảng 4: Các dung dịch bổ sung thêm vào môi trường khoáng FM (Ratering, 1999)

Tên dung dịch	Nồng độ dung dịch gốc	Thể tích bổ sung vào 1 L môi trường	Chú thích
Dung dịch NaHCO_3	1M	30 ml	
Dung dịch vi lượng		1 ml	Bảng 5
Dung dịch vitamin		1 ml	Bảng 5
Dung dịch NH_4Cl	Tùy thuộc điều kiện thí nghiệm		
Dung dịch Na-axetat (sử dụng làm nguồn cacbon)	1M	1 ml	
Dịch huyền phù ferrihydrit	~ 270 mM	200 ml	Ratering, (1999)
Dung dịch Na-ascorbat	1M	1 ml	

Bảng 5: Thành phần dung dịch vi lượng và vitamin (Widdel, Bak, 1992)

Thành phần dung dịch vi lượng		Thành phần dung dịch vitamin	
Thành phần	Hàm lượng	Thành phần	Hàm lượng
HCl 25% (7,7 M)	13 ml	$\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 25 mM pH 7,1	100 ml
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2100 mg	4-Aminobenzoic axit	4 mg
H_3BO_3	30 mg	D(+)- Biotin (Vitamin H)	1 mg
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	100 mg	Nicotinic axit (Niacin)	10 mg
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	190 mg	Calcium-D(+)- Pantothenat	5 mg
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	24 mg	Pyridoxin 2 HCl	15 mg
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2 mg	Lipoic axit	1.5 mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	144 mg	Folic axit	4 mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	36 mg	Na-2-Mercaptoethan sulfonat	25 mg
Nước khử ion: dẫn tới 1000 ml. Bảo quản dung dịch ở nhiệt độ phòng, tránh ánh sáng		Khử trùng qua màng lọc 0,2 μm . Bảo quản dung dịch tại 4°C trong lọ thủy tinh tối màu.	

Ferrihydrit được điều chế theo phương pháp do Ratering (1999) mô tả, gồm các bước như sau:

- Pha 1 lít dung dịch FeCl_3 0,25 M vào cốc đong thủy tinh (thể tích 5 lít), đặt trên máy khuấy từ và nhúng đầu đo pH vào dung dịch.

- Bổ sung 740 ml dung dịch NaOH 1M, khuấy liên tục, theo dõi giá trị pH để không vượt quá 7, phản ứng hóa học sẽ tạo ra huyền phù $\text{Fe}(\text{OH})_3$ màu nâu đỏ. Cần thận chỉnh pH tới 7,6 bằng dung dịch NaOH 1M và tiếp tục khuấy hỗn hợp trong vòng 30 phút, theo dõi pH và tiếp tục chỉnh tới 7,6 bằng NaOH 1M.
- Ly tâm hỗn hợp trong 10 phút ở tốc độ 4000 – 5000 vòng/phút, bỏ dịch rồi hòa cạn tua trong nước cất để rửa và ly tâm. Lặp lại bước rửa 2 – 3 lần để đảm bảo không còn ion Cl^- trong hỗn hợp. Sau bước rửa cuối cùng, cạn tua sẽ được hòa trong nước khử ion (MQ).

Xác định hàm lượng ferrihydrit trong mẫu bằng cách lấy 5 ml vào đĩa petri, sấy khô và cân trọng lượng (lặp lại 3 lần).

Xác định hàm lượng NH_4^+

- Dung dịch A: phenol (3 g), Na-nitroprusside (0,003 g) và nước cất (100 ml)
- Dung dịch B: NaOH (2 g) hòa trong 80 ml nước cất, thêm NaClO 13% bảo quản ở 4°C (2 ml) thêm nước cất vừa đủ 100 ml.
- Lấy 0,02 ml mẫu vào ống nghiệm chứa 4,98 ml H_2O (tỉ lệ 1: 250).
- Thêm 0,5 ml dung dịch A, vortex trộn đều.
- Thêm 0,5 ml dung dịch B, vortex trộn đều.
- Đậy nắp ống nghiệm và ủ tại nhiệt độ phòng trong bóng tối 1 giờ.
- Đo OD ở bước sóng 635 nm.

Đường chuẩn NH_4^+ là dung dịch NH_4Cl có nồng độ từ 1 – 10 mg/L (tinh thể NH_4Cl được sấy khô trước khi sử dụng để pha dung dịch chuẩn).

Tốc độ oxy hóa NH_4^+ là lượng NH_4^+ (mg) bị oxy hóa trong một đơn vị thời gian, được tính theo công thức:

$$V_A = (C_{A0} - C_A) / T_A$$

Trong đó: V_A : Tốc độ oxy hóa NH_4^+ (mg/L/ngày)

C_{A0} : Nồng độ NH_4^+ ban đầu trong môi trường (mg/L)

C_A : Nồng độ NH_4^+ còn lại trong môi trường sau khi nuôi cấy (mg/L)

T_A : Thời gian nuôi cấy (ngày)

Xác định hàm lượng Fe^{2+} : theo phương pháp DIN 38406 E1-1 (1983), chi tiết như sau:

Nguyên lý: O-phenanthrolin phản ứng với Fe^{2+} tạo phức có màu tím đỏ trong khoảng pH 3 – 9, đo được ở bước sóng 510 nm. Nồng độ Fe^{2+} cho phép đo là 0,01 – 5 mg/L.

Chuẩn bị các dung dịch cần thiết:

- Dung dịch H_2SO_4 loãng (hạ pH): H_2SO_4 đặc : nước = 1 : 4 (thể tích).
- Dung dịch ammonium axetat 5,2 M (đệm):

CH ₃ COONH ₄	40 g
CH ₃ COOH	50 ml
Nước cất	đủ 100 ml

- Dung dịch hydroxyl ammonium chloride 1,4 M (khử Fe³⁺ thành Fe²⁺)

NH ₂ OH. HCl	10 g
Nước cất	đủ 100 ml

- Dung dịch phenanthrolin 21 mM (bảo quản trong lọ tối, hạn sử dụng trong 1 tuần):

C ₁₂ H ₉ ClN ₂ .H ₂ O	0,5 g
Nước cất	đủ 100 ml

Dung dịch chuẩn:

FeSO ₄ .7H ₂ O	2,78 mg
HCl 25%	6,25 ml
Nước cất	đủ 100 ml

Các bước tiến hành:

- Sau khi thu mẫu, lập tức hạ pH tới 1 bằng dung dịch H₂SO₄ loãng (1% thể tích).
- Thêm vào 50 ml mẫu 5 ml dung dịch ammonium axetat và 2 ml dung dịch hydroxyl amoni clorua, trộn đều bằng vortex, hỗn hợp phải có pH nằm trong khoảng 3,4 - 5,5 (tối ưu là 4,5).
- Thêm 2 ml dung dịch phenanthrolin, trộn đều.
- Thêm nước cho tới 100 ml, trộn đều. Giữ ở nhiệt độ phòng trong 15 phút.
- Đo OD tại bước sóng 510 nm. Đường chuẩn được tiến hành với dung dịch FeSO₄ với nồng độ Fe²⁺ từ 5 - 50 µM.

Tốc độ khử Fe³⁺ được tính dựa trên lượng Fe²⁺ được tạo ra trong một đơn vị thời gian, theo công thức:

$$V_F = (C_F - C_{F0})/T_F$$

Trong đó: V_F: Tốc độ tạo Fe²⁺ (mg/L/ngày)

C_{F0}: Nồng độ Fe²⁺ trong môi trường ban đầu (mg/L)

C_F: Nồng độ Fe²⁺ trong môi trường sau khi nuôi cấy (mg/L)

T_F: Thời gian nuôi cấy (ngày)

Kết quả thu được cho thấy chủng FN9 có khả năng oxy hóa NH₄⁺ rất cao với tốc độ là 44,64 mg/L/ngày (Hình 3A). Tương ứng với tốc độ oxy hóa NH₄⁺, tốc độ khử Fe³⁺ tính theo hàm lượng Fe²⁺ tạo ra trong môi trường là 208 mg/L/ngày (Hình 3B).

Ví dụ 2: Thử nghiệm quy trình xử lý đồng thời NH₄⁺ và COD ở điều kiện khử Fe³⁺ trên hệ thống bể kỵ khí

Hệ thống bể kỵ khí quy mô phòng thí nghiệm được thiết kế bằng vật liệu mica gồm 3 bể có nắp đậy kín khí (N1, N2, N3), nối với nhau bằng đường ống chảy tràn hướng đáy (Hình 1), thể tích mỗi bể là 4800 ml, thể tích làm việc chứa nước thải khoảng 3 lít do cửa chảy tràn ở độ cao 260 mm, và 01 bể lắng (N4) không có nắp đậy có thể tích làm việc khoảng 4 lít. Mỗi bể đều có cửa xả ở đáy để thu mẫu bùn. Dọc theo mặt đứng của các bể kỵ khí có van lấy mẫu tầng nước đáy và tầng nước mặt, phía trên nắp đậy có van thu khí. Trong mỗi bể kỵ khí có bổ sung 100 cm³ giá thể hạt nhựa kích thước 12 × 7 mm (diện tích bề mặt riêng là 850 m²/m³), đặt trong túi lưới để đảm bảo ổn định vị trí của các hạt giá thể ở sát đáy.

Vi khuẩn feammox được làm giàu trong các bể của hệ thống xử lý quy mô phòng thí nghiệm ở điều kiện kỵ khí hoàn toàn. Các hạt giá thể nhựa cố định ở đáy mỗi ngăn là nơi bám dính của tế bào vi khuẩn. Môi trường khoáng dịch thể FM (Bảng 3, 4, 5) chứa NH₄⁺ ở nồng độ khoảng 300 mg/L là nguồn điện tử, ferrihydrit ở nồng độ 30 mM làm chất nhận điện tử và Na-axetat (10 mM) làm nguồn cacbon được đưa vào các bể với thể tích 3 lít/bể, sau đó bổ sung Na-ascorbat (1 mM), đậy kín và thổi khí argon để đuổi oxy.

Nguồn vi sinh vật ban đầu để làm giàu là bùn sắt từ nhà máy xử lý nước thải chế biến thủy sản tại Bình Dương, được bổ sung vào mỗi bể theo tỷ lệ 10%. Bổ sung dịch nuôi cấy chủng vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* FN9 (có mật độ tế bào $\geq 10^9$ MPN/ml) vào cùng với bùn sắt theo tỷ lệ 3% thể tích. Chủng vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* FN9 được bảo quản ở dạng ống đông khô tại Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội. Các bể kỵ khí của hệ thống sau đó được đóng kín và dịch được bơm tuần hoàn với tốc độ tương đương 17% thể tích chứa của toàn bộ hệ thống/ngày đêm, nhiệt độ ổn định ở 28 – 32°C, duy trì trong 25 ngày để làm giàu. Hoạt tính của vi khuẩn được theo dõi thông qua xác định lượng NH₄⁺ bị oxy hóa theo thời gian (phương pháp mô tả ở ví dụ 1 nêu trên).

Kết quả làm giàu (Hình 4) cho thấy quá trình oxy hóa NH₄⁺ diễn ra rõ rệt ở cả 3 bể N1, N2, N3 của hệ thống xử lý. Sau 25 ngày, nồng độ NH₄⁺ trong cả 3 bể giảm từ 285 mg/L xuống còn khoảng 140 mg/L (khoảng 50% so với ban đầu). Cụ thể, quá trình oxy hóa NH₄⁺ bắt đầu từ ngày thứ 8, sau đó diễn ra với tốc độ ổn định cho tới thời điểm cuối kỳ theo dõi.

Dịch môi trường trong các bể được rút ra, thay bằng nước thải nhân tạo có thành phần tương tự như môi trường khoáng FM nhưng không chứa ferrihydrit, có hàm lượng NH₄⁺ và COD ở tỷ lệ [COD]/[NH₄⁺] = 1,4 và vận hành xử lý liên tục. Nước thải được bơm vào hệ

thống xử lý với tốc độ tương ứng với 17% thể tích của toàn bộ hệ thống/ngày đêm. Chi tiết về điều kiện vận hành quy trình xử lý liên tục được trình bày tại bảng 6.

Bảng 6: Điều kiện vận hành xử lý liên tục để loại đồng thời NH_4^+ và COD

Yếu tố vận hành	Giá trị
Hàm lượng NH_4^+	100 mg/L
Hàm lượng COD	140 mg/L (tỷ lệ $[\text{COD}]/[\text{NH}_4^+] = 1,4$)
Tốc độ nạp	17% thể tích/ngày đêm (tương đương 3 lít/ngày đêm)
Nhiệt độ	28 – 32°C
pH môi trường	7 – 7,2
Thời gian lưu	N1 = 2 ngày; N2 = 4 ngày; N3 = 6 ngày

Hiệu quả xử lý được đánh giá thông qua hàm lượng NH_4^+ và COD mất đi ở trong các bể tương ứng với thời gian lưu khác nhau. Xác định hàm lượng NH_4^+ và COD được tiến hành theo như mô tả tại các ví dụ ở trên.

Kết quả xác định hàm lượng NH_4^+ (Hình 7A) cho thấy với thời gian lưu 2 hoặc 4 ngày chỉ có 30 – 60% NH_4^+ bị loại, tuy nhiên khi thời gian lưu kéo dài tới 6 ngày thì hiệu quả loại NH_4^+ đạt tới mức 80 – 90%. Tương ứng, tốc độ loại COD cũng phù hợp với tốc độ loại NH_4^+ trong các bể xử lý và tỷ lệ với thời gian lưu (Hình 7B). Hiệu suất loại COD ở mức 54 – 66% với thời gian lưu 6 ngày được quan sát ổn định trong 30 ngày thí nghiệm.

Ví dụ 3: Xác định tỷ lệ $[\text{COD}]/[\text{NH}_4]$ phù hợp để vận hành quy trình xử lý

Hệ thống xử lý được xây dựng như trong Ví dụ 2. Trong đó, sau khi hệ vi khuẩn feammox được làm giàu thành công trong các bể xử lý, dịch môi trường FM của bước làm giàu được rút ra và thay bằng môi trường FM mới nhưng không chứa ferrihydrit, có hàm lượng NH_4^+ ở mức khoảng 200 mg/L và hàm lượng COD (nạp bằng Na-axetat) khác nhau ở mỗi bể theo tỷ lệ $[\text{COD}]/[\text{NH}_4^+]$ tương ứng là 1,4 ; 1 và 0,7 (Bảng 7).

Bảng 7: Công thức thí nghiệm trong các bể xử lý với tỷ lệ $[\text{COD}]/[\text{NH}_4^+]$ khác nhau

Vị trí bể	Nồng độ NH_4^+ (mg/L)	Nồng độ COD (mg O_2 /L) (tính theo Na-axetat)	Tỷ lệ $[\text{COD}]/[\text{NH}_4^+]$ (theo nồng độ)
Bể N1	213	298	1,4
Bể N2	205	210	1
Bể N3	208	65	0,7

Sau khi nạp nguyên liệu, các bể xử lý được đóng kín, quá trình xử lý diễn ra ở nhiệt độ 28 – 32°C và được theo dõi trong 25 ngày qua các thông số là hàm lượng NH_4^+ và COD bị oxy hóa, lượng N_2 sinh ra và thế oxy hóa khử. Các phương pháp phân tích được tiến hành như sau:

Xác định nhu cầu oxy hóa học (COD): Được thực hiện theo phương pháp TCVN 6491:1999

Xác định hàm lượng NH_4^+ : Được thực hiện theo phương pháp mô tả ở ví dụ 1.

Xác định thế oxy hóa khử của dịch môi trường: Mẫu dịch môi trường (80 ml) được lấy ở van thu mẫu trên thân của hệ thống xử lý, chuyển vào bình Schott 100 ml. Hiệu điện thế của dịch môi trường được xác định bằng dụng cụ đo gồm một điện cực tham khảo Ag/AgCl được nối với điện cực than chì thông qua Vol kế (mV). Chỉ số (mV) hiển thị trên Vol kế chính là độ chênh lệch điện thế của dịch môi trường.

Xác định lượng khí N_2 tạo thành trong các bể của hệ thống xử lý: được thực hiện bằng phương pháp sắc ký khí sử dụng thiết bị sắc ký 7890A (Agilent) gắn cột HT-plot/Q và TCD detector. Các thông số vận hành GC như sau: nhiệt độ lò 60°C, nhiệt độ detector 250°C, khí mang là argon (Messer Vietnam) với tốc độ dòng 3 ml/phút. Thể tích mẫu khí là 0,2 ml/lần. Đường chuẩn thành phần khí N_2 được xây dựng dựa trên dãy bình serum kín khí chứa hỗn hợp khí nitơ trong argon trong khoảng 0 – 100%.

Kết quả (Hình 5A, 5B) cho thấy quá trình loại NH_4^+ và COD diễn ra tích cực ở cả ba bể, trong đó bể N1 đạt hiệu quả loại NH_4^+ cao nhất, từ mức 213 mg/L ban đầu xuống còn 5,79 mg/L sau 25 ngày (tương đương với ~ 97% NH_4^+ bị loại), trong khi đó COD giảm từ 298 mg/L xuống còn 120 mg/L (tương đương với 60% COD bị loại). Tỷ lệ loại COD ở mức ~60% cũng được xác định ở các bể N2 và N3 sau 25 ngày, tuy nhiên không tiếp tục giảm sau đó (Hình 5B). Thế oxy hóa khử được duy trì ổn định hơn cả ở bể N1, luôn ở trong khoảng $-20 \text{ mV} \div 5 \text{ mV}$ (Hình 5C). Trong khi đó, ở bể N2 mức oxy hóa khử tăng lên $> 0 \text{ mV}$ sau 15 giờ vận hành, đạt $> 22 \text{ mV}$ sau 25 giờ; còn ở bể N3 thì mức oxy hóa khử tăng $> 0 \text{ mV}$ ngay sau 3 – 4 ngày xử lý, đạt $> 30 \text{ mV}$ sau 22 ngày, sau đó giảm còn 7,5 mV tại ngày 25, hiệu quả loại COD cũng kém hơn so với bể N1 và N2. Như vậy, có thể kết luận rằng ở điều kiện kỵ khí khử Fe^{3+} , NH_4^+ và COD có thể được loại đồng thời với hiệu quả cao nhất khi tỷ lệ $[\text{COD}]/[\text{NH}_4^+]$ là 1,4 và thế oxy hóa khử trong môi trường ở mức $-20 \text{ mV} \div +20 \text{ mV}$.

Đặc biệt, N_2 được phát hiện là sản phẩm chuyển hóa duy nhất của NH_4^+ trong cả ba bể N1, N2, N3 (Hình 6), không phát hiện nitrit (NO_2^-) hay nitrat (NO_3^-) tích lũy trong pha dịch. Như vậy NH_4^+ đã được loại khỏi môi trường dịch thể hoàn toàn ở dạng khí N_2 . Trong ba bể N1, N2, N3 thì lượng khí N_2 tích lũy trong bể N3 cao hơn hai bể còn lại, tương ứng với mức oxy hóa NH_4^+ cao nhất tại đây.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Sáng chế đưa ra quy trình xử lý đồng thời NH_4^+ và COD ở điều kiện kỵ khí khử Fe^{3+} (feammox) để ứng dụng trong việc loại các chất ô nhiễm này trong các loại nước thải khác nhau, cho phép (i) tiết kiệm năng lượng (do hoàn toàn không có nhu cầu oxy) và (ii) rút ngắn quá trình xử lý nhờ kết hợp đồng thời bước loại NH_4^+ và bước loại COD. Quá trình này diễn ra ở điều kiện pH trung tính, phù hợp cho việc tích hợp với quy trình xử lý COD bằng lên men kỵ khí sinh methane để xử lý hoàn toàn nước thải có hàm lượng hữu cơ cao tới mức đạt yêu cầu xả thải quy định. Sản phẩm chuyển hóa NH_4^+ là khí N_2 , tức là nitơ đã được loại hoàn toàn khỏi môi trường khí chỉ qua một bước xử lý duy nhất. Chúng vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* FN9 được phát hiện có khả năng oxy hóa NH_4^+ và khử Fe^{3+} cao, có tiềm năng ứng dụng để chủ động làm giàu hệ vi khuẩn feammox, điều khiển vận hành các hệ thống xử lý theo nguyên lý feammox trong thực tế.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Abdel-Raouf N, Al-Homaidan A, Ibraheem I (2012) Microalgae and wastewater treatment. *Saudi J Biol Sci* 19(3): 257-275.
2. Bae H, Paul T, Kim D, Jung J-Y (2016) Specific ANAMMOX activity (SAA) in a sequencing batch reactor: optimization test with statistical comparison. *Environ Earth Sci* 75:1452.
3. Bitton G (1999) *Wastewater Microbiology*. Willey-Liss Inc., New York, Weinheim, Singapore, Toronto.
4. Bouchard DC, Williams MK, Surampalli RI (1992) Nitrate contamination of groundwater: sources and potential health effects. *J Am Water Works Assoc.* 84:85 – 90.
5. Clement J, Shrestha J, Ehrenfeld J, Jaffe P (2005) Ammonium oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron under anaerobic conditions in wetland soils. *Soil Biol Biochem* 37: 2323-2328.
6. Du R, Peng Y, Cao S, Wu C, Weng D, Wang S, He J (2014) Advanced nitrogen removal with simultaneous anammox and denitrification in sequencing batch reactor. *Biores Technol* 162:316-322.
7. Huang S, Jaffe PR (2018) Isolation and characterization of an ammonium-oxidizing iron reducer: *Acidimicrobiaceae* sp. A6. Plos One doi.org/10.1371/journal.pone.0194007.
8. Jaffe PR, Huang S, Uriguen MR (2015) Method and composition for nitrogen removal using feammox microorganisms. US Patent US 2015/0321933 A1.
9. Lalucat J, Bennasar A, Bosch R, Garcia-Valdes E, Palleroni J (2006) Biology of *Pseudomonas stutzeri*. *Microbiol Mol Biol Rev* 70(2):510 – 547.
10. Lettinga G, Field J, Van Lier J, Zeeman G, Hulshoff LW (1997) Advanced anaerobic wastewater treatment in the near future. *Water Sci Technol* 35:5-12.
11. Park W, Nam Y-K, Lee M-J, Kim T-H (2009) Anaerobic ammonia-oxidation coupled with Fe^{3+} reduction by an anaerobic culture from a piggery wastewater acclimated to $\text{NH}_4^+/\text{Fe}^{3+}$ medium. *Biotechnol Bioprocess Engineer* 14(5):680 – 685.
12. Pereira AD, Cabezas A, Etchebehere C, Chernicharo CAL, Araujo JC (2017) Microbial communities in anammox reactors: a review. *Environ Technol Rev* 6(1):74 – 93.

13. Ratering S (1999) Iron cycle in Italian rice field soil: Localization of the redox processes and characterization of the involved microorganisms. PhD thesis, Faculty Biology, University of Marburg.
14. Sawayama S (2006) Possibility of anoxic ferric ammonium oxidation. *J Biosci Bioeng* 101:70-72.
15. Shapleigh JP (2000) The denitrifying prokaryotes. In *The Prokaryotes*, an Evolving electronic resource for the microbiological community, Dworkin W, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E (ed.). Springer-Verlag, New York.
16. Sheela B, Khasim BS (2014) Bioremediation of ammonia from polluted waste waters: a review. *Am J Microbiol Res* 2(6):201 – 2010.
17. Shrestha J, Rich JJ, Ehrenfeld JG, Jaffe PR (2009) Oxidation of ammonium to nitrite under iron-reducing conditions in wetland soils. *Soil Sci* 174:156-164.
18. Xu Y, He T, Li Z, Ye Q, Chen Y, Xie E, Zhang X (2017) Nitrogen removal characteristics of *Pseudomonas putida* Y-9 capable of heterotrophic nitrification and aerobic denitrification at low temperature. *BioMed Research International*. <https://doi.org/10.1155/2017/1429018>
19. Yang WH, Weber KI, Silver WL (2012) Nitrogen loss from soil through anaerobic ammonium oxidation coupled to iron reduction. *Nat Geosci* 5:538 – 541.
20. Zhou J, Bruns MA, Tiedje JM (1996) ADN recovery from soils of diverse composition. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:316-322.
21. Widdel F, Bak F (1992) Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria. In *The Prokaryotes*, 2nd ed. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp. 3352-3378.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình xử lý đồng thời NH_4^+ và COD ở điều kiện khử Fe^{3+} trên hệ thống bể kỵ khí bao gồm các bước như sau:

(i) thiết lập hệ thống bể kỵ khí :

thiết lập hệ thống bể kỵ khí gồm 3 bể kỵ khí, có nắp đậy kín khí, kích thước bằng nhau, và 1 bể lắng không có nắp đậy, trong đó thể tích làm việc của bể lắng lớn hơn thể tích làm việc của bể kỵ khí;

trong mỗi bể, bổ sung giá thể hạt nhựa kích thước 12×7 mm có diện tích bề mặt riêng là $850 \text{ m}^2/\text{m}^3$, trong đó thể tích giá thể hạt nhựa bằng 1/30 so với thể tích làm việc của bể kỵ khí;

cho nước thải di chuyển từ lần lượt qua các bể thông qua các ống nổi hướng đáy, đảm bảo được tiếp xúc với lớp giá thể chứa vi sinh vật;

(ii) làm giàu vi khuẩn *ferammox*

đưa vào các bể kỵ khí nguồn Fe^{3+} ở dạng dịch huyền phù ferrihydrit, được chuẩn bị theo phương pháp do Ratering (1999) mô tả hoặc sử dụng bùn sắt từ các nhà máy xử lý nước sạch hay bùn đỏ từ các điểm khai thác bùn đỏ bô xít, trong đó môi trường khoáng dành cho vi khuẩn khử Fe^{3+} (Ratering, 1999) được đuổi oxy bằng khí N_2/CO_2 theo tỷ lệ 90/10 (thể tích/thể tích) trong thời gian 3 – 5 phút và chuyển vào các bể của hệ thống xử lý bằng bơm nhu động;

môi trường được ổn định pH ở 7 – 7,2 bằng hệ đệm bicarbonat NaHCO_3 30 mM hoặc đá vôi đập nhỏ tùy điều kiện thực tế;

sử dụng bùn từ nhà máy xử lý nước thải chế biến thủy sản làm nguồn vi sinh vật ban đầu và được bổ sung vào các bể theo tỷ lệ 10% thể tích;

bổ sung dịch nuôi cấy chủng vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* FN9 vào cùng với bùn sắt theo tỷ lệ 3% thể tích, trong đó chủng vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* FN9 được phân lập từ bùn của nhà máy xử lý nước thải chế biến thủy sản, sử dụng phương pháp ống thạch bán lỏng và có trình tự 16S rADN của chủng FN9 được đăng ký trên ngân hàng dữ liệu GenBank với mã số MT568614;

các bể kỵ khí của hệ thống sau đó được đóng kín và dịch được bơm tuần hoàn với tốc độ tương đương 17% thể tích chứa của toàn bộ hệ thống/ngày đêm, trong 25 ngày, nhiệt độ ổn định ở $28 - 32^\circ\text{C}$;

hoạt tính của vi khuẩn feammox trong bùn kỵ khí được đánh giá thông qua hàm lượng NH_4^+ bị loại và hệ vi khuẩn feammox được hình thành ở đáy các bể kỵ khí của hệ thống, chủ yếu bám dính trên bề mặt giá thể nhựa và các hạt ferrihydrit; và

(iii) xử lý nước thải có hàm lượng NH_4^+ và COD cao theo chế độ vận hành liên tục

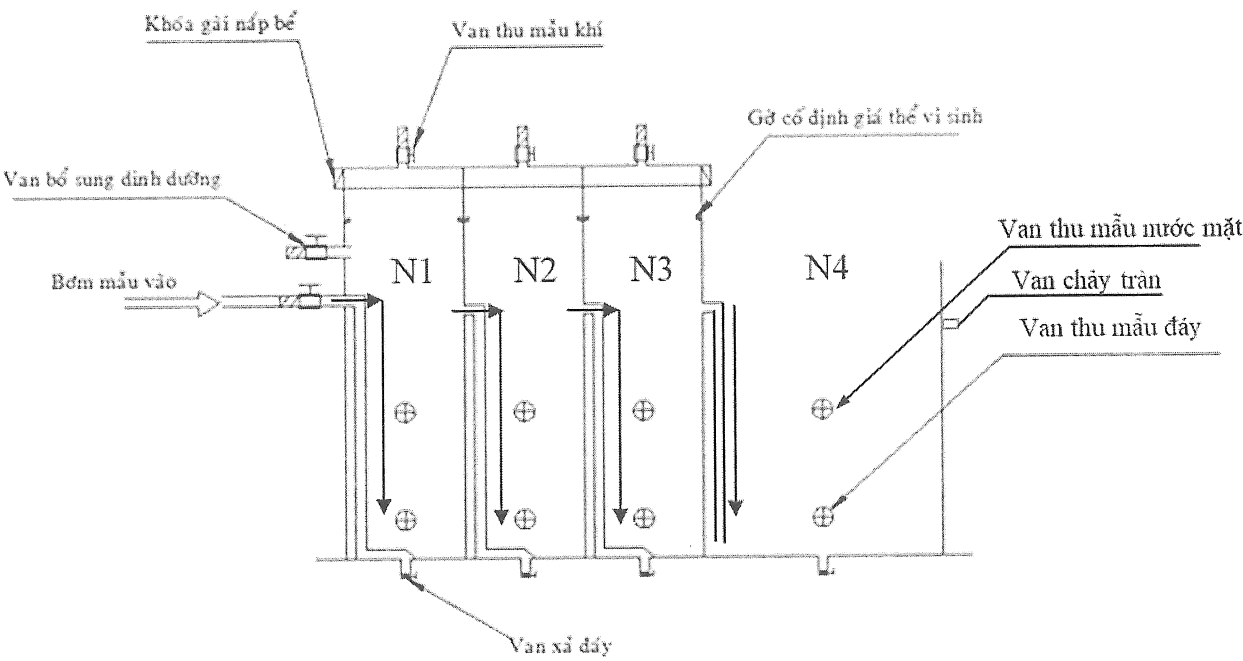
rút dịch môi trường ra khỏi các ngăn kỵ khí sao cho không ảnh hưởng tới lớp bùn đã được hình thành ở đáy.

xác định tỷ lệ $[\text{COD}]/[\text{NH}_4^+]$ trong nước thải cần xử lý và thực hiện điều chỉnh ở mức 1,4;

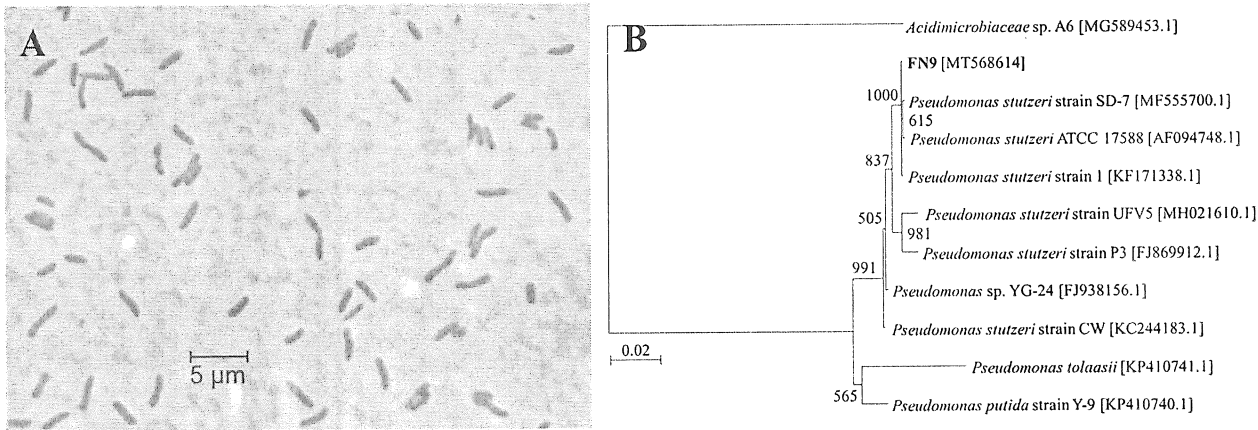
dịch nước thải được loại oxy bằng cách thổi khí argon trong 3 phút, sau đó được bơm vào hệ thống từ ngăn đầu tiên, tốc độ bơm là 17% thể tích chứa của toàn bộ hệ thống/ngày đêm ;

dịch nước thải chảy từ bể đầu tiên sang bể thứ hai và thứ ba theo nguyên lý chảy tràn, thời gian lưu tương ứng ở mỗi bể lần lượt là 2, 4 và 6 ngày, trong đó hàm lượng NH_4^+ và COD trong mỗi bể được xác định hàng ngày;

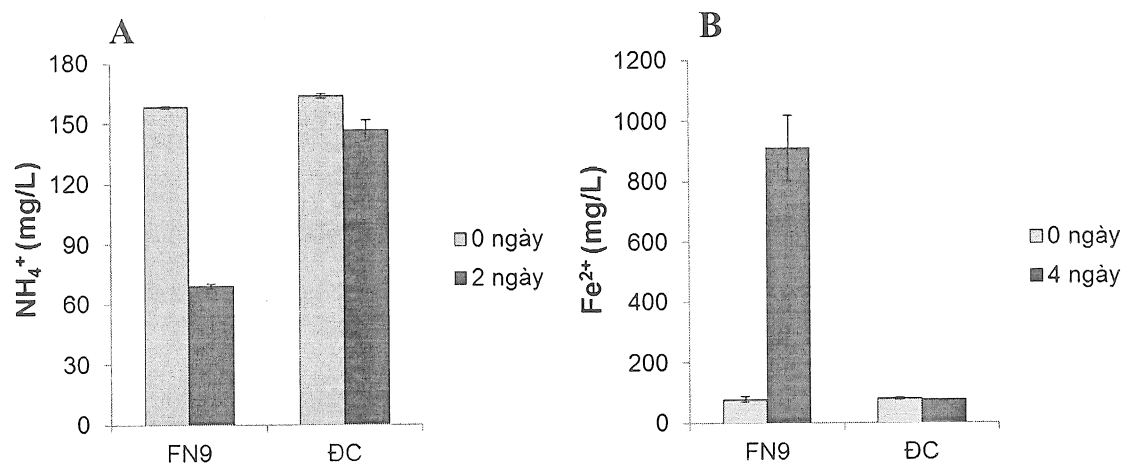
sau bể thứ ba, nước thải chảy sang bể lắng và hàm lượng NH_4^+ và COD trong mỗi bể được xác định hàng ngày.



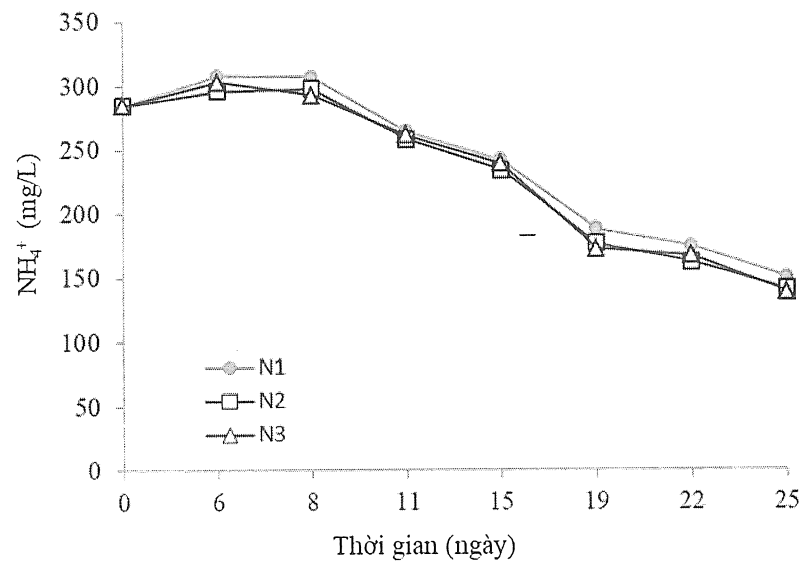
Hình 1



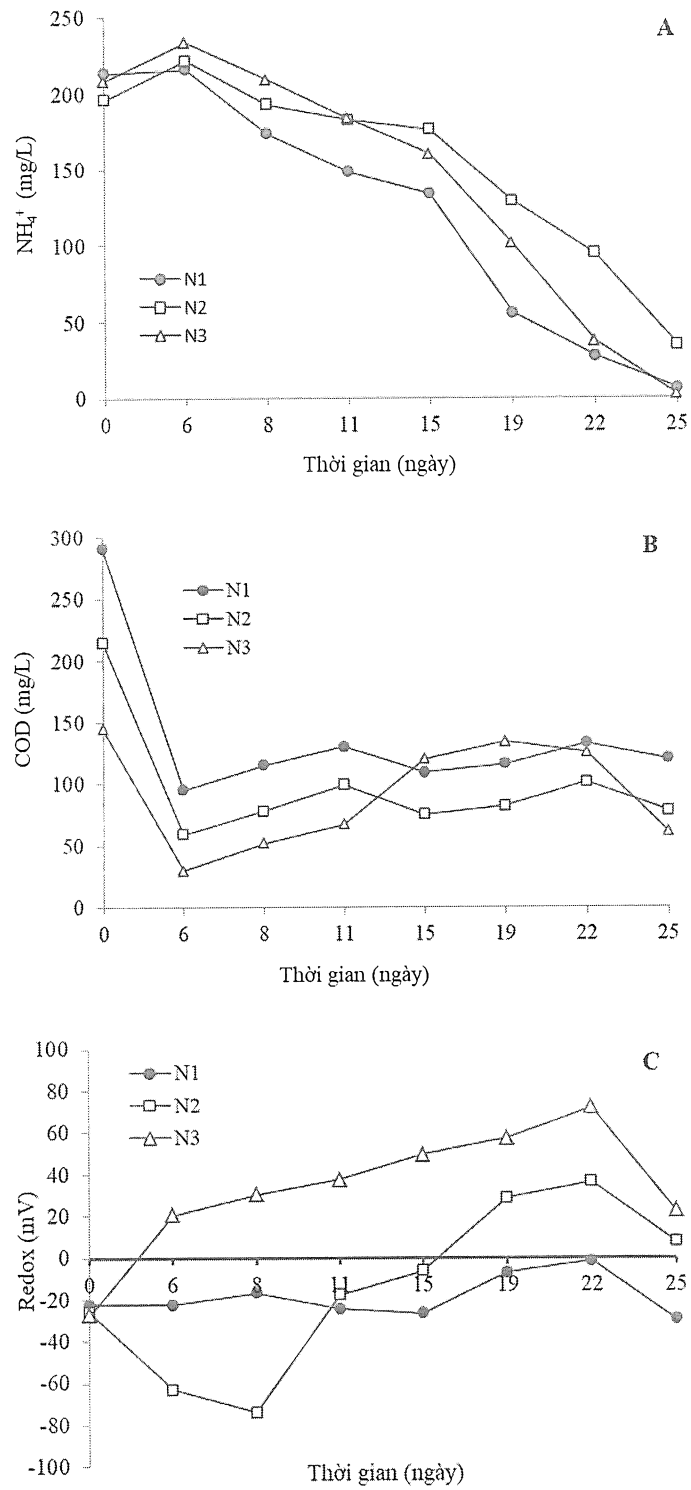
Hình 2



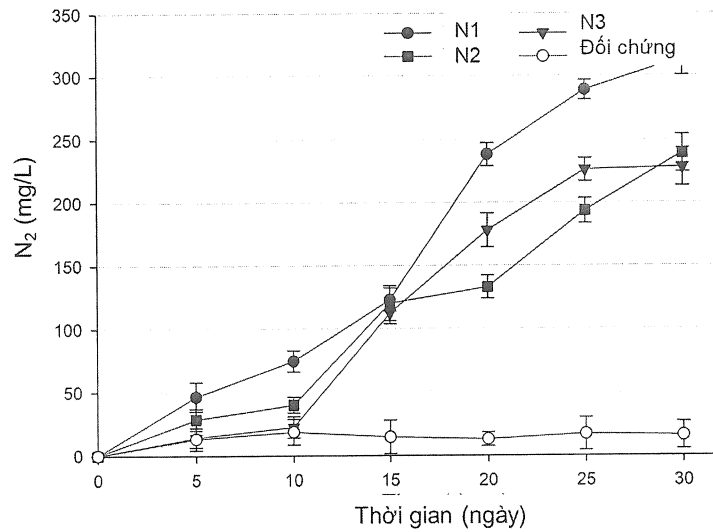
Hình 3



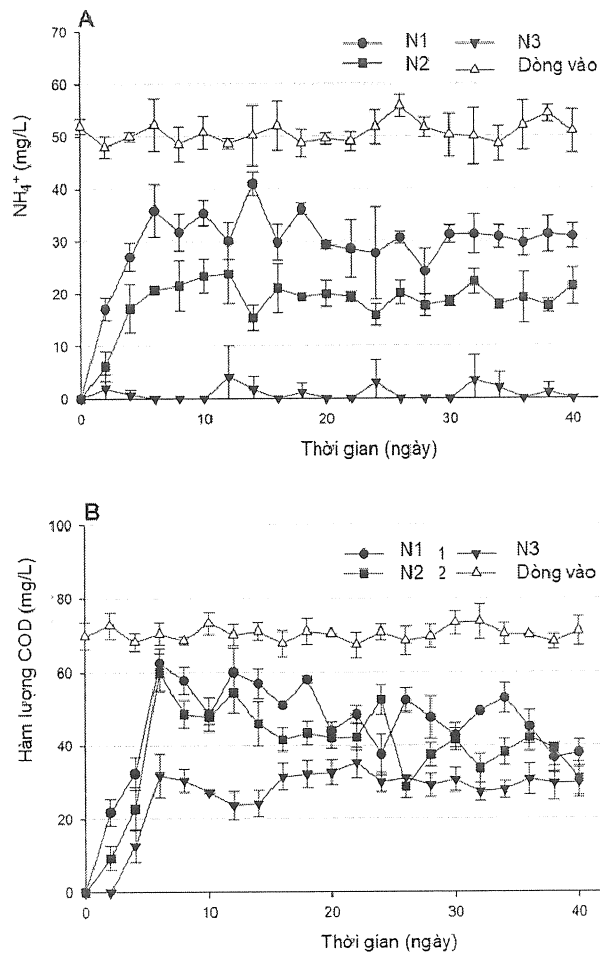
Hình 4



Hình 5



Hình 6



Hình 7