



(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)



1-0025211

(51)⁷ C12N 1/20; C02F 11/02; C02F 3/12; (13) B
C12R 1/07; C12N 1/16; C02F 1/44;
C02F 3/34

(21) 1-2013-03807

(22) 28/02/2013

(86) PCT/JP2013/055504 28/02/2013

(87) WO 2013/137010 19/09/2013

(30) 2012-053981 12/03/2012 JP

(45) 25/08/2020 389

(43) 25/02/2014 311A

(73) HINODE SANGYO CO., LTD. (JP)

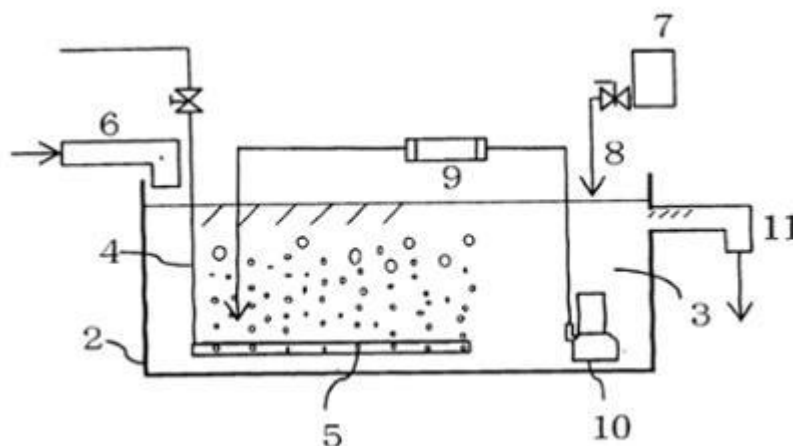
3854 Ikonobe-cho, Tsuzuki-ku, Yokohama-shi, Kanagawa 224-0053, Japan

(72) OHBAYASHI Seiichi (JP); KURITA Ryouzou (JP); NAKAYAMA Kouji (JP);
HASHIMOTO Hideo (JP).

(74) Công ty TNHH Sở hữu trí tuệ WINCO (WINCO CO., LTD.)

(54) VI SINH VẬT THUỘC GIỐNG BACILLUS VÀ PHƯƠNG PHÁP LÀM GIẢM LƯỢNG BÙN DƯ SỬ DỤNG VI SINH VẬT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến vi sinh vật thuộc giống *Bacillus* mà không cần nhiều thời gian để làm giảm lượng chất béo và dầu trong nước thải và có thể xử lý nước thải chứa chất béo và dầu một cách hiệu quả. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp làm giảm lượng bùn dư trong thiết bị xử lý nước thải và làm giảm lượng chất béo và dầu trong nước thải bằng cách sử dụng vi sinh vật này. Vi sinh vật theo sáng chế thuộc giống *Bacillus* và vi sinh vật này có đặc tính làm thoái biến ít nhất là thành tế bào của vi khuẩn và lipit. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến tác nhân xử lý nước thải dạng vi khuẩn sống chứa vi sinh vật này để ngăn ngừa sự tạo ra bùn dư hoặc để làm giảm lượng bùn dư, và thiết bị và phương pháp xử lý nước thải, khác biệt ở chỗ, thiết bị và phương pháp này đưa một loại vi sinh vật hoặc hỗn hợp của hai hoặc nhiều loại vi sinh vật này vào nước cần được xử lý trong thiết bị xử lý nước thải.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến vi sinh vật thuộc giống *Bacillus*; cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến vi sinh vật thuộc giống *Bacillus*, ngăn chặn được sự tạo ra bùn dư khi xử lý nước thải bằng phương pháp bùn hoạt tính và sống cộng sinh với nấm để xử lý một cách hiệu quả nước thải chứa chất béo và dầu. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp xử lý bùn ưa khí, thiết bị xử lý nước thải và thiết bị tương tự sử dụng vi sinh vật này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Theo các báo cáo năm 2005, lượng bùn từ hệ thống cung cấp nước, hệ thống thoát nước và hệ thống tương tự được tạo ra ở Nhật Bản chiếm 44,5% tổng lượng chất thải công nghiệp, và khoảng 187.790.000 tấn bùn được tạo ra mỗi năm (theo Bộ Môi trường). Cụ thể, 48% (79.610.000 tấn) là bùn nước thải được tạo ra trong các nhà máy xử lý nước thải, 21% (39.440.000 tấn) là phân động vật và 31% (58.220.000 tấn) là nước thải từ các nhà máy.

Liên quan đến tình trạng điển hình về việc xử lý và thải bỏ bùn nước thải, tỷ lệ tái sinh là 9%, tỷ lệ xử lý trung gian là 86% và tỷ lệ thải bỏ cuối cùng là 5%. Việc xử lý trung gian phần lớn là cô đặc, loại nước hoặc thiêu, việc xử lý này tiêu thụ nhiều năng lượng. Bùn thường chứa nước với lượng nằm trong khoảng từ 60 đến 90%, và cần nhiều chi phí năng lượng để xử lý và thải bỏ bùn.

Mặc dù một phần bùn dư từ hệ thống xử lý nước thải của các nhà máy được sử dụng làm tác nhân cải tạo đất hoặc nguyên liệu làm phân ủ, phần lớn lượng bùn dư này chủ yếu được xử lý sơ bộ bằng cách loại nước hoặc thiêu và sau đó được thải bỏ dưới dạng chôn lấp. Việc xử lý này tiêu thụ rất nhiều năng lượng, các nhà sản xuất và kinh doanh phải đối mặt với việc gia tăng chi phí năng lượng, và các nhà quản lý, người điều hành việc thải bỏ cuối cùng gặp khó khăn trong việc đảm bảo bãi thải bỏ và các vấn đề về luật định. Các vấn đề này vẫn còn là nghiêm trọng.

Theo tài liệu không phải sáng chế 1, đã biết các phương pháp làm giảm lượng bùn bằng biện pháp hóa học, phương pháp làm giảm lượng bùn bằng biện pháp hóa lý,

phương pháp làm giảm lượng bùn bằng biện pháp sinh học và các phương pháp tương tự để làm giảm lượng bùn. Trong số các phương pháp này, đối với phương pháp làm giảm lượng bùn bằng biện pháp hóa học, đã biết các phương pháp sau: phương pháp ozon trong đó thành tế bào được làm thoái biến bằng khả năng oxy hóa của ozon, phương pháp enzym trong đó thành tế bào được hòa tan bằng enzym như xenlulaza, proteaza và amylaza, phương pháp kiềm sử dụng kiềm để làm thoái biến protein và phương pháp tương tự. Các phương pháp này có nhược điểm là: phương pháp ozon có chi phí ban đầu cao, chi phí vận hành của phương pháp enzym cũng cao, và các vấn đề tương tự.

Ngoài ra, đối với phương pháp làm giảm lượng bùn bằng biện pháp hóa lý, đã biết các phương pháp sau: phương pháp làm thoái biến bằng biện pháp cơ học trong đó bùn được nghiền cơ học bằng cách sử dụng lực cắt mạnh tạo ra bởi máy nghiền hạt, đĩa quay nhanh và biện pháp tương tự và do đó việc hòa tan được thúc đẩy; phương pháp phân hủy bằng nhiệt dẫn đến việc tạo ra khí nhiệt phân bằng nhiệt; phương pháp phản ứng thủy nhiệt trong đó tất cả các chất hữu cơ được phân hủy thành các hợp chất có trọng lượng phân tử thấp và được hòa tan bằng cách thủy phân hoặc phân hủy bằng nhiệt sử dụng phản ứng thủy nhiệt của nước siêu tới hạn hoặc nước dưới tới hạn; và phương pháp oxy hóa điện phân trong đó các vi sinh vật bị tiêu diệt/hòa tan bởi clo và axit hypoclorơ được tạo ra từ sự phân hủy điện phân của nước muối và được phân hủy sinh học. Các phương pháp làm giảm lượng bùn này có nhược điểm chủ yếu là chi phí đầu tư ban đầu và chi phí vận hành cao.

Hơn nữa, phương pháp làm giảm lượng bùn bằng biện pháp sinh học bao gồm phương pháp tự oxy hóa và phương pháp chuỗi thức ăn. Trong đó, phương pháp tự oxy hóa là phương pháp mà trong đó các vi sinh vật có mặt trong bùn sử dụng các vi sinh vật khác làm nguồn năng lượng hữu cơ trong hoàn cảnh không cung cấp nguồn năng lượng hữu cơ nào khác từ bên ngoài, và theo thời gian, phân hủy các vi sinh vật này thành nước và cacbon dioxide, nhờ đó làm giảm lượng bùn. Phương pháp chuỗi thức ăn là phương pháp tạo ra hệ thống chuỗi thức ăn của vi khuẩn–động vật nguyên sinh–động vật đa bào. Phương pháp tự oxy hóa có nhược điểm là cần tạo ra bể giảm khối lượng để chứa bùn trong một tuần và chi phí vận hành để duy trì nhiệt độ bể ở 60°C, và phương pháp chuỗi thức ăn có nhược điểm về việc tích lũy các bí quyết kỹ

thuật để nuôi vi khuẩn, động vật đơn bào và động vật đa bào ở trong một hệ mở.

Ngoài ra, đối với các cách làm giảm lượng bùn, phương pháp bổ sung vi sinh vật ưa nhiệt đã được mô tả trong tài liệu sáng chế 1, và phương pháp xử lý bùn đã được mô tả trong tài liệu sáng chế 2, trong đó bùn được sục khí ở điều kiện kiềm với sự có mặt của vi sinh vật ưa khí và được đưa trở lại công đoạn xử lý sinh học, đã được đề xuất.

Tài liệu sáng chế 3 mô tả phương pháp làm giảm lượng bùn bằng vi sinh vật, vi sinh vật này có thể sinh trưởng trong điều kiện độ kiềm và nhiệt độ cao và có khả năng làm giảm lượng bùn. Các kỹ thuật này cần điều kiện nhiệt độ và độ kiềm cao, và do đó cần sử dụng các chất kiềm, chất trung hòa, và năng lượng để duy trì nhiệt độ cao vào tất cả các ngày. Do đó, có nhược điểm về chi phí ban đầu và chi phí vận hành cao để xử lý bùn bằng các kỹ thuật này.

Hơn nữa, nước thải từ các nhà máy sản xuất kem hoặc nước sốt mai-o-ne có hàm lượng chất béo và dầu cao, và các nhà hàng hoặc cửa hàng sản xuất thức ăn có sử dụng kem hoặc nước sốt mai-o-ne cũng thải ra nước thải có hàm lượng chất béo và dầu cao. Nước thải có hàm lượng chất béo và dầu cao, bất kể là dầu thực vật hay dầu động vật, đều khó được xử lý trực tiếp bởi các vi sinh vật, và chất béo và dầu này cần được loại bỏ bằng biện pháp vật lý hoặc hóa học và sau đó đưa nước thải này tới công đoạn xử lý nước thải như phương pháp bùn hoạt tính.

Đối với phương pháp loại bỏ chất béo và dầu ra khỏi nước thải, mong muốn là nước thải chứa chất béo và dầu với nồng độ nằm trong khoảng từ 200 đến 500 mg/l dưới dạng chất chiết N-hexan được xử lý bằng cách sử dụng bể tách chất béo và dầu. Khi nồng độ này vượt quá 500 mg/l, cần xử lý nước thải sau khi loại bỏ chất béo và dầu bằng cách sử dụng bể tách tuyển nổi theo áp suất và làm giảm chất chiết N-hexan. Việc xử lý nước thải chứa chất béo và dầu cần chi phí ban đầu để đầu tư thiết bị và chi phí vận hành như phí thải bỏ chất béo và dầu nổi, và việc bảo quản trong mùa hè làm sinh ra mùi rất nặng. Vì vậy, việc xử lý bằng vi sinh vật là rất được mong muốn.

Do đó, phương pháp đồng hóa dầu và chất béo từ động vật và thực vật bằng cách sử dụng nhiều loại nấm men đã được đề xuất. Trong số đó, giải pháp nêu trong tài liệu sáng chế 4 là kỹ thuật xử lý nước thải bằng biện pháp sinh học để tiếp cận, do khoảng giá trị độ pH để nấm men đồng hóa chất béo và dầu phát triển là rộng và

không cần sử dụng chất clo để ngăn chặn tác nhân vi khuẩn gây ô nhiễm. Tuy nhiên, kỹ thuật này có nhược điểm là cần thời gian để làm giảm lượng chất béo và dầu trong nước thải.

Các tài liệu kỹ thuật đã biết

Tài liệu sáng chế

Tài liệu sáng chế 1: JP-A-9-253699

Tài liệu sáng chế 2: JP-A-9-136097

Tài liệu sáng chế 3: JP-A-2000-139449

Tài liệu sáng chế 4: Bằng độc quyền sáng chế Nhật Bản số 4654332

Tài liệu không phải sáng chế 1: “Newest Microbiology for Environmental Purification” pp285-296 (xuất bản bởi Yuhei Inamori)

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế được tạo ra khi tính đến các yếu tố nêu trên. Mục đích của sáng chế là tìm ra vi sinh vật có thể nâng cao khả năng xử lý nước thải, cụ thể là có thể xử lý nước thải một cách hiệu quả; và đề xuất kỹ thuật cho phép làm giảm lượng bùn dư khi xử lý nước thải, và làm giảm lượng chất béo và dầu và các chất tương tự trong nước thải bằng cách sử dụng vi sinh vật, và thiết bị xử lý nước liên quan đến chúng.

Để giải quyết các vấn đề nêu trên, các tác giả sáng chế đã tập trung nghiên cứu các vi sinh vật thuộc giống *Bacillus* tiết ra nhiều loại enzym khác nhau, tìm kiếm các vi sinh vật tiết ra các enzym làm thoái biến hữu hiệu để xử lý nước thải chứa chất béo và dầu, và nhờ đó đã phát hiện được rằng một số chủng kiểu đại của giống *Bacillus* tiết ra các enzym làm thoái biến lipid và thành tế bào của vi khuẩn. Ngoài ra, để cải thiện khả năng tiết ra enzym, các tác giả sáng chế đã tạo ra các chủng vi sinh vật tiết ra nhiều loại enzym khác nhau bằng cách tạo ra các tế bào chức năng, và nhờ đó hoàn thành sáng chế này.

Cụ thể, sáng chế đề xuất vi sinh vật thuộc giống *Bacillus* và có đặc tính làm thoái biến ít nhất là thành tế bào của vi khuẩn và lipid.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất tác nhân xử lý nước thải dạng vi khuẩn sống để ngăn chặn sự tạo ra bùn dư hoặc để làm giảm lượng bùn dư, tác nhân này chứa vi sinh vật nêu trên.

Hơn nữa, sáng chế đề xuất chế phẩm dạng vi khuẩn sống để xử lý nước thải chứa chất béo và dầu, chế phẩm này chứa vi sinh vật nêu trên và nấm men đồng hóa dầu và chất béo.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất phương pháp làm giảm lượng bùn dư trong thiết bị xử lý nước thải, khác biệt ở chỗ, phương pháp này bao gồm bước đưa một loại vi sinh vật nêu trên hoặc hỗn hợp của hai hoặc nhiều loại vi sinh vật này vào nước cần được xử lý trong thiết bị xử lý nước thải.

Hơn nữa, sáng chế đề xuất phương pháp ngăn chặn sự giảm dòng chảy đi qua màng trong phương pháp xử lý nước thải bằng cách tách chất rắn – chất lỏng, để loại bỏ nước bằng cách sử dụng màng tách chất rắn – chất lỏng, khác biệt ở chỗ, phương pháp này bao gồm bước cho một loại vi sinh vật nêu trên hoặc hỗn hợp của hai hoặc nhiều loại vi sinh vật này phản ứng với màng tách chất rắn - chất lỏng nêu trên.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất thiết bị xử lý nước có bể xử lý để chứa và xử lý nước cần được xử lý, ống dẫn dòng để cho phép nước chảy vào trong bể xử lý, ống xả để xả nước và ống sục khí để sục khí cho nước, khác biệt ở chỗ, thiết bị này có bộ phận nạp tác nhân xử lý để nạp tác nhân xử lý nước.

Hiệu quả của sáng chế

Vi sinh vật thuộc giống *Bacillus* theo sáng chế bao gồm vi sinh vật có đặc tính làm thoái biến ít nhất là thành tế bào của vi khuẩn và lipit và còn có tác dụng làm thoái biến protein và tinh bột. Do đó, bằng cách sử dụng vi sinh vật theo sáng chế khi xử lý nước thải bằng phương pháp sinh học ưa khí thông thường, việc xử lý phân hủy bùn và sự đồng hóa chất béo và dầu được tạo điều kiện thuận lợi, và vì vậy có thể làm giảm sự tạo ra lượng bùn dư, chất béo và dầu thải.

Cụ thể, khi bể phân hủy chất béo và dầu bằng nấm men được tạo ra trong công đoạn xử lý nước thải và nấm men đồng hóa dầu và chất béo được sử dụng kết hợp trong bể này, có thể làm giảm hoặc loại bỏ lượng bùn dư và chất béo và dầu thải.

Hơn nữa, phương pháp xử lý nước thải bằng cách tách chất rắn-chất lỏng để loại bỏ nước sử dụng màng tách chất rắn-chất lỏng, bằng cách cho vi sinh vật thuộc giống *Bacillus* theo sáng chế phản ứng với màng tách chất rắn-chất lỏng này, có thể ngăn chặn được việc làm giảm dòng chảy đi qua màng do tắc màng.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Fig.1 là hình vẽ dạng sơ đồ thể hiện thiết bị xử lý nước thải theo một phương án của sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Vi sinh vật thuộc giống *Bacillus* được sử dụng trong sáng chế có đặc tính làm thoái biến ít nhất là thành tế bào của vi khuẩn và lipit. Vi sinh vật có đặc tính như vậy có thể thu được từ nguồn tự nhiên bằng cách sàng lọc, hoặc bằng cách biến nạp vi sinh vật thu được từ nguồn tự nhiên bằng cách sàng lọc sử dụng kỹ thuật di truyền.

Đối với một ví dụ cụ thể về phương pháp thu được vi sinh vật thuộc giống *Bacillus* theo sáng chế, vi sinh vật này có thể thu được bằng cách chọn lọc vi sinh vật được phân lập từ thực vật, nước, thức ăn hoặc đất bằng cách sử dụng sự có mặt hoặc không có mặt của đặc tính làm thoái biến thành tế bào của vi khuẩn và đặc tính làm thoái biến lipit làm chỉ số. Ngoài ra, được ưu tiên hơn nếu vi sinh vật này cũng có đặc tính làm thoái biến protein, tinh bột và chất tương tự. Về mặt này, đặc tính làm thoái biến thành tế bào có nghĩa là sự làm phá vỡ hoặc làm tan toàn bộ hoặc một phần thành tế bào. Bằng cách sàng lọc, thu được chủng HB-88 và chủng HB-113.

Do đó, vi sinh vật thu được có thể được chọn lọc trực tiếp theo đặc tính làm thoái biến thành tế bào của vi khuẩn và đặc tính làm thoái biến lipit như đã mô tả trên đây, nhưng cũng có thể gây đột biến bằng phương pháp chung là cho tiếp xúc với tia cực tím hoặc phương pháp tương tự và trong điều kiện phát triển khoảng 10%, và sau đó tiến hành việc sàng lọc.

Hơn nữa, việc sử dụng môi trường biến nạp để tạo ra các tế bào chức năng, đặc tính biến nạp của chủng Marburg của *Bacillus subtilis* có đặc tính biến nạp tự nhiên cao hoặc chủng được dẫn xuất của nó là 160, 166 hoặc 168 có thể được cải thiện, và chủng thể cho có thể được đưa vào các giống nêu trên để thu được các đặc tính mới. Về mặt này, chủng Marburg nêu trên và các chủng dẫn xuất có thể được mua từ RIKEN, NBRC, ATCC và các nhà cung cấp khác.

Do chủng Marburg được sử dụng tiết ra enzym làm thoái biến tinh bột và enzym làm thoái biến lipit, sự biến nạp để bổ sung enzym làm thoái biến vi khuẩn Gram dương hoặc vi khuẩn Gram âm được tiến hành theo cách tương tự. Vi khuẩn được cải biến bằng công đoạn này được cải biến sao cho vi khuẩn này tiết ra các enzym làm thoái biến lipit, thành tế bào của vi khuẩn, tinh bột hoặc protein. Có 16

chúng được cải biến, và một chủng tiết ra nhiều enzym trong số này được chọn. Chủng này được gọi là chủng HB-14.

Như đã mô tả trên đây, thu được ba loại vi sinh vật, chủng HB-14, chủng HB-88 và chủng HB-113. Kết quả của việc so sánh các đặc tính vi khuẩn học của các vi sinh vật này với tài liệu: “Bergey’s manual of systematic bacteriology Volume 2 (1984)”, đã phát hiện được rằng tất cả các vi sinh vật này thuộc về giống *Bacillus*.

Ngoài ra, với kết quả của việc phân tích ADN, chủng HB-14 được cho là *Bacillus subtilis* và chủng HB-88 được cho là *Bacillus methylotrophicus* bằng cách phân tích di truyền ADN 16s (TechnoSuruga Laboratory Co., Ltd.). Chủng HB-113 được xác định là *Bacillus subtilis* bởi API50CHB.

Tiếp theo, các đặc tính vi khuẩn học khác nhau của chủng HB-14 và HB-88 được chọn lọc bằng cách sàng lọc được thể hiện trên đây. Đối với phân tích ADN, việc nuôi cấy được tiến hành trong môi trường aga dinh dưỡng ở nhiệt độ 30°C trong 40 giờ như môi trường nuôi cấy ưa khí để tạo ra vi khuẩn trong khi thử nghiệm. Đối với việc xác định chủng bằng rADN-toàn phần 16S; ADN được chiết bằng cách sử dụng Achromopeptidaza (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.); PCR của PrimeSTAR HS ADN polymeraza (Takara Bio Inc.) được sử dụng; trình tự theo chu kỳ của kit giải trình tự theo chu kỳ BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, CA, USA) được sử dụng; các đoạn mồi (khuếch đại PCR: 9F và 1510R, và giải trình tự: 9F, 785F, 802R và 1510R) được sử dụng; việc giải trình tự được tiến hành bằng cách sử dụng hệ thống phân tích di truyền ABIPRISM3130xl (Applied Biosystems, CA, USA); ChromasPro1.4 (Technelysium Pty Ltd., Tewantin, USA) được sử dụng để xác định trình tự nucleotit; và phần mềm Apollon 2.0 và các cơ sở dữ liệu quốc tế về trình tự nucleotit Apollon DB-BA7.0 (TechnoSuruga Laboratory Co., Ltd.), (GenBank/DDBJ/Embl) được sử dụng để tra cứu tính tương đồng và phân tích chuỗi thể hệ đơn giản. Ngoài ra, đối với chuỗi HB-113, theo phương pháp tra cứu (Spore Experimental Manual pp110-111, Gihodo Shuppan Co., Ltd.), nhiều nghiên cứu khác nhau được tiến hành trong khi việc xác định với hệ thống API được tiến hành.

Danh sách các đặc tính của vi sinh vật I (nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C)

Bảng 1

Mục thử nghiệm	HB-14	HB-88	HB-113
Hình dạng tế bào	<i>Bacillus</i> (0,8-0,9×1,5-2,5) μm	<i>Bacillus</i> (0,9-1,0×1,5-2,5) μm	<i>Bacillus</i> (0,5-0,6×2,5-3,5) μm
Nhuộm màu Gram	+	+	+
Sự có mặt của các bào tử	+	+	+
Tính di động	+	+	+
Hình dạng khuẩn lạc (môi trường aga dinh dưỡng) Thời gian nuôi cấy: 24 giờ	Đường kính: 2,0-3,0 mm Tông màu: màu kem Hình dạng: tròn Trạng thái gợn sóng: phẳng Vùng ngoài: toàn bộ vùng ngoài Hình dạng bề mặt: gợn sóng Độ trong suốt: mờ đục Độ nhớt: giống bơ	Đường kính: 1,0-3,0 mm Tông màu: màu kem Hình dạng: tròn Trạng thái gợn sóng: phẳng Vùng ngoài: toàn bộ vùng ngoài Hình dạng bề mặt: gợn sóng Độ trong suốt: mờ đục Độ nhớt: giống bơ	Đường kính: 1,0-3,0mm Tông màu: màu kem Hình dạng: tròn Trạng thái gợn sóng: phẳng Vùng ngoài: toàn bộ vùng ngoài Hình dạng bề mặt: gợn sóng Độ trong suốt: mờ đục Độ nhớt: giống bơ
Thử nghiệm nhiệt độ sinh trưởng (°C)	37°C: + 45°C: +	37°C: + 45°C: +	37°C: + 45°C: +
Phản ứng catalaza	+	+	+
Phản ứng oxidaza	+	-	+
Sự sản sinh axit/khí	- / -	- / -	- / -

từ glucoza (sản xuất axit/khí)			
Thử nghiệm O/F (oxy hóa/ lên men)	- / -	- / -	- / -

+: dương, -: âm

Danh sách các đặc tính của vi sinh vật II

Bảng 2

Mục thử nghiệm	HB-14	HB-88	HB-113
Sinh trưởng trong điều kiện kỵ khí	-	-	-
Sinh trưởng ở nhiệt độ 15°C	+	+	+
Sinh trưởng trong NaCl 10%	-	-	-
Đặc tính làm thoái biến tinh bột	+	+	+
Đặc tính làm thoái biến casein	+	+	+
Đặc tính làm thoái biến lipid	+	+	+
Đặc tính làm thoái biến <i>Escherichia coli</i>	+	+	+
Đặc tính làm thoái biến vi khuẩn axit lactic	+	+	+
Đặc tính đồng hóa <i>Escherichia coli</i>	+	+	+

+: dương, -:âm

Các vi sinh vật chủng HB-14, HB-88 và HB-113 được lưu giữ quốc tế ngày 07/03/2012 tại Văn phòng quản trị tích hợp, Viện Công nghệ và đánh giá công nghệ Quốc gia, Bộ phận nhận giữ vi sinh vật phục vụ việc đăng ký sáng chế (2-5-8 Kazusakamatar, Kisarazu-shi, Chiba 292-0818, Japan), với số hiệu lưu giữ lần lượt là NITE BP-1275, NITE BP-1276 và NITE BP-1277.

Vi sinh vật thuộc giống *Bacillus* theo sáng chế đã mô tả trên đây có thể được sử dụng cho tất cả các loại nước thải với nồng độ BOD trong công đoạn xử lý nước thải ra khí, nhưng tốt hơn nếu có thể được sử dụng để xử lý nước thải và nước thải công nghiệp từ các nhà máy chế biến thực phẩm và các nhà máy tương tự.

Khi vi sinh vật thuộc giống *Bacillus* theo sáng chế được sử dụng trong phương pháp bùn hoạt tính và lượng bùn được làm giảm, từ 1 đến 1000 ppm vi sinh vật được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy (từ 10^7 đến 10^8 /ml), tốt hơn nữa là từ 10 đến 300 ppm, có thể được đưa vào bể nước ban đầu hoặc bể sục khí của thiết bị xử lý nước

thải. Nhằm duy trì hiệu quả lâu dài, việc bổ sung một lượng vi sinh vật một lần trong thời gian từ một đến ba ngày là được ưu tiên hơn.

Tốt hơn, nếu vi sinh vật thuộc giống *Bacillus* theo sáng chế được sử dụng trong phương pháp xử lý nước thải bằng cách sử dụng màng. Điều này là do vi sinh vật theo sáng chế có đặc tính làm thoái biến thành tế bào của vi khuẩn như đã mô tả trên đây, vì vậy làm giảm lượng vi khuẩn sinh trưởng trong hoặc xung quanh các lỗ nhỏ của màng xử lý được sử dụng trong khi xử lý nước thải và làm giảm chất nhớt, và do đó khả năng xử lý bùn có thể được duy trì đủ mà không làm tắc các lỗ nhỏ của màng xử lý. Màng xử lý có thể là màng phẳng hoặc màng dạng sợi dệt hình ống, và cả hai loại màng này có thể được sử dụng theo cách tương tự nhau. Màng MF là màng thích hợp nhất khi tính đến kích thước lỗ của nó.

Hơn nữa, tỷ lệ làm giảm lượng bùn dư có thể được tăng thêm bằng cách sử dụng vi sinh vật thuộc giống *Bacillus* theo sáng chế trong khi xử lý kết hợp phương pháp xử lý nước thải sử dụng màng và phương pháp bùn hoạt tính. Sự kết hợp của các phương pháp này bao gồm phương pháp xử lý song song và phương pháp xử lý lần lượt. Khi các loại chất hữu cơ trong nước thải là không đổi, phương pháp xử lý nồng độ cao có thể được thực hiện bằng cách sử dụng biện pháp xử lý lần lượt với giống *Bacillus* này mà không gây ra hiện tượng tắc lỗ. Mặt khác, khi loại nguyên liệu được xử lý thay đổi trong khoảng rộng, tốt hơn là sử dụng phương pháp xử lý song song, trong đó chỉ nước thải nồng độ cao được xử lý bằng cách sử dụng màng và sau đó để nước thải chảy vào thùng bùn hoạt tính.

Tiếp theo, thiết bị xử lý nước thải có thể được sử dụng một cách hiệu quả để tiến hành việc xử lý nước thải bằng vi sinh vật thuộc giống *Bacillus* theo sáng chế, sẽ được giải thích.

Fig.1 là hình vẽ dạng sơ đồ thể hiện thiết bị xử lý nước thải theo một phương án của sáng chế. Trên hình vẽ này, số chỉ dẫn 1 thể hiện thiết bị xử lý nước, số chỉ dẫn 2 thể hiện bể xử lý, số chỉ dẫn 3 thể hiện nước cần được xử lý, số chỉ dẫn 4 thể hiện ống sục khí, số chỉ dẫn 5 thể hiện lỗ sục khí, số chỉ dẫn 6 thể hiện ống dẫn dòng nước cần được xử lý, số chỉ dẫn 7 thể hiện bộ phận nạp tác nhân xử lý, số chỉ dẫn 8 thể hiện ống nạp tác nhân xử lý, số chỉ dẫn 9 thể hiện bộ phận tạo bọt khí mịn cỡ micro, số chỉ dẫn 10 thể hiện bơm nước ngầm và số chỉ dẫn 11 thể hiện ống xả để xả nước

cần được xử lý.

Thiết bị xử lý nước thải được thể hiện trên Fig.1 bao gồm bể xử lý 2 để chứa và xử lý nước 3, ống dẫn dòng 6 để cho nước chảy vào trong bể xử lý, ống xả 11 để xả nước, ống sục khí 4 để sục khí vào nước, và ngoài ra còn có bộ phận nạp tác nhân xử lý 7 để nạp tác nhân xử lý.

Chất và kích thước bất kỳ có thể được chấp nhận đối với bể xử lý 2, miễn là có thể chứa được nước 3, và tốt hơn nếu bể thường được sử dụng làm bể điều chỉnh trong thiết bị xử lý nước thải được sử dụng. Hơn nữa, đối với ống sục khí 4, các ống sục khí thường được sử dụng để sục khí khi xử lý nước thải có thể được sử dụng mà không có vấn đề bất kỳ, miễn là số lượng thích hợp lỗ sục khí 5 được tạo ra. Tốt hơn nếu tính đến dung tích và độ sâu của bể xử lý và sau đó điều chỉnh số lượng và đường kính của lỗ sục khí 5 sao cho có đủ lượng không khí thổi vào.

Ngoài ra, đối với ống dẫn dòng 6 và ống xả 11, các ống dẫn thường được sử dụng cho thiết bị xử lý nước có thể được sử dụng, miễn là chúng cho phép nước chảy vào hoặc tháo nước ra. Nước cần được xử lý chảy vào từ ống dẫn dòng 6 có thể là nước thải, nước này được thải ra từ các nhà máy sản xuất thức ăn hoặc từ các cửa hàng chế biến và phục vụ đồ ăn, cụ thể là nước này chứa lipit, protein, tinh bột và các chất tương tự, hoặc có thể là nước thải chứa lượng lớn chất béo và dầu thực vật hoặc động vật. Tốc độ dòng chảy của nó có thể thay đổi trong khoảng rộng. Về mặt này, ống xả 11 có thể được tạo ra ở bể chảy tràn mà ở đó nước 3 được xả tự nhiên khi mực nước xả đạt tới một mức nhất định. Theo cách khác, ống xả 11 có thể được nối với máy bơm và tháo nước bằng bơm điện một cách liên tục hoặc không liên tục.

Thiết bị xử lý nước khác biệt ở chỗ, bộ phận nạp tác nhân xử lý 7 được tạo ra và tác nhân xử lý có thể được nạp vào từ thiết bị này. Điều này có nghĩa là trong thiết bị xử lý nước thải, lipit, protein, tinh bột và chất tương tự có thể được làm thoái biến theo cách tích cực, không chỉ bằng cách sục khí từ ống sục khí 4 mà còn bằng cách nạp tác nhân xử lý, như tác nhân xử lý nước thải dạng vi khuẩn sống chứa vi sinh vật thuộc giống *Bacillus* có đặc tính làm thoái biến ít nhất là thành tế bào của vi khuẩn và lipit (đôi khi dưới đây được gọi là “vi sinh vật theo sáng chế”), hoặc chế phẩm dạng vi khuẩn sống để xử lý nước thải có chất béo và dầu, chứa vi sinh vật này và nấm men đồng hóa chất béo và dầu, vào nước đã được sục khí. Có thể nạp tất cả tác nhân

xử lý một lần từ bộ phận nạp tác nhân xử lý 7; nhưng tốt hơn là nạp một lượng nhất định tác nhân xử lý này bằng phương tiện như phương tiện nạp theo từng mẻ, cho thêm hoặc bổ sung tác nhân xử lý dạng bột với mục đích là duy trì khả năng xử lý không đổi. Ngoài ra, cũng có thể nạp tác nhân xử lý tương ứng với lượng nước từ ống dẫn dòng 6.

Hơn nữa, trong thiết bị xử lý nước, cũng có thể tạo ra bộ phận tạo bọt khí mịn cỡ micro 9 có bơm nước ngầm 10 để bơm nước vào bể xử lý 2 để có thể tuần hoàn nước 3. Bằng cách tạo ra bộ phận tạo bọt khí mịn cỡ micro 9 này, lượng không khí trong nước tăng lên, nước trong bể được tuần hoàn, và hoạt tính của vi sinh vật theo sáng chế và vi sinh vật tương tự tăng lên. Vì vậy, sự làm thoái biến lipid, protein, tinh bột và chất tương tự được cho là được tạo điều kiện thuận lợi.

Bộ phận tạo bọt khí mịn cỡ micro 9 theo sáng chế liên tục tạo ra bọt khí như các bọt cỡ micro (đường kính nằm trong khoảng từ 1 đến 1000 μ m) và các bọt cỡ nano (đường kính nằm trong khoảng từ 1 đến 1000nm), bằng các cơ chế như nghiền, tạo lỗ trống, tạo dòng chảy rối hoặc tạo lực cắt, tạo các lỗ nhỏ, nhúng riêng, điện phân, và phản ứng hóa học. Các bọt khí mịn này có đặc tính làm tăng lượng oxy hòa tan trong nước, và cho phép nước thải trong bể chảy và làm đồng nhất nước thải trong bể này với lực xả thải hoặc sự khác biệt về trọng lượng riêng của nước.

Do thiết bị xử lý nước 1 được mô tả trên đây có thể làm giảm đáng kể nồng độ BOD, COD và chất béo và dầu như được mô tả trong các ví dụ dưới đây, thiết bị này có thể được sử dụng một mình để xả nước đã được xử lý trực tiếp tới hệ thống thoát nước. Cũng có thể sử dụng thiết bị này cho bước xử lý ở giai đoạn sơ bộ (bể xử lý sinh học đầu tiên) trong thiết bị xử lý nước tổng thể.

Khi thiết bị này được sử dụng trong các giai đoạn xử lý sau, phương pháp xử lý trong các giai đoạn sau (giai đoạn xử lý sinh học thứ hai) bao gồm xử lý bằng biện pháp sinh học như phương pháp sinh học xử lý bùn hoạt tính, phương pháp tăng sôi và phương pháp tăng cố định, xử lý đông tụ, xử lý bằng màng hoặc biện pháp tương tự. Nước được xử lý trong hai giai đoạn như vậy có thể được xả trực tiếp ra sông, và sự tạo ra lượng bùn dư có thể được giảm đáng kể bằng thiết bị xử lý nước thải này.

Do vi sinh vật được sử dụng trong sáng chế đã giải thích trên đây là vi sinh vật thuộc giống *Bacillus* và tạo ra các bào tử, nó có thể được sử dụng ở dạng bột bằng

cách sử dụng các bào tử này. Trong trường hợp này, có thể sử dụng vi sinh vật ở dạng hỗn hợp với chất khoáng, thành phần dạng hạt như cám, hoặc chất hữu cơ như glucoza, để phân tán vi sinh vật này vào trong nước một cách dễ dàng. Ngoài ra, vi sinh vật này cũng có thể được sử dụng ở dạng chất rắn bằng cách ngào trộn vào đất sét (chứa xi măng được tạo bột và chất tương tự), và chất rắn này cũng có thể ở dạng khô hoặc ướt. Ngoài ra, tác nhân kìm hãm vi khuẩn có thể được bổ sung để kiểm soát sự sinh trưởng của vi sinh vật, và ví dụ, vi sinh vật này có thể được sử dụng trong chất lỏng, mà rượu, muối, chất nhũ hóa và chất tương tự, hoặc một thành phần khác có tác dụng điều chỉnh độ pH ở mức thấp được thêm vào.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Dưới đây, sáng chế sẽ được mô tả một cách cụ thể hơn bằng các ví dụ, tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn bởi các ví dụ này.

Ví dụ thử nghiệm 1

Sàng lọc vi khuẩn có ích

Các vi sinh vật thuộc giống *Bacillus* được thu thập và phân lập từ đất, lá rụng, nước thải và thức ăn. Việc xác định giống vi khuẩn dùng cho sáng chế này được thực hiện theo phương pháp xác định/phân lập chung cho giống *Bacillus* trong thức ăn (Spore Experimental Manual pp110-111, Gihodo Shuppan Co., Ltd.).

Cụ thể, trước tiên, các mẫu thu thập được được pha loãng hoặc tạo huyền phù bằng lượng thích hợp của nước muối sinh lý, gia nhiệt ở nhiệt độ 80°C trong khoảng 10 phút, được đánh dấu trên môi trường aga bình thường (Eiken Chemical Co., Ltd.), và được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong bốn ngày. Vi khuẩn sinh ra ở nhiệt độ này là hơn 3000 chủng.

Các chủng được nuôi cấy hoàn toàn được nhuộm Gram và vi khuẩn *Bacillus* tạo ra bào tử Gram dương (vi khuẩn thuộc giống *Bacillus*) được xác nhận. Sau đó, các đặc tính sinh hóa được thử nghiệm theo quy trình thử nghiệm nêu trên, và các loài vi khuẩn này được đánh giá. Các loài vi khuẩn đã được đánh giá là *Bacillus licheniformis*, *B.coagulans*, *B.polymyxa*, *B.cereus*, *B.alvei*, *B.subtilis*, *B.pumilus*, *B.stearothermophilus*, *B.macerans*, *B.megaterium*, *B.circulans*, *B.firmus*, *B.laterosprus*, *B.brevis*, *B.sphericus*, *B.larvae*, *B.popilliae*, và *B.lentimorbus*.

Trong trường hợp vi khuẩn *Bacillus* tạo ra bào tử Gram dương, các thử nghiệm

được tiến hành đối với catalaza, thử nghiệm VP, đặc tính sinh trưởng trong môi trường aga kỵ khí và đặc tính thủy phân tinh bột, và 180 chủng được chọn làm vi khuẩn thuộc giống *Bacillus*. Các đặc tính tiết ra nhiều loại enzym khác nhau được xem xét, vi khuẩn có hai hoặc nhiều enzym được lấy làm gốc, và 68 chủng được lựa chọn bằng cách loại bỏ các chủng có độc tính thông qua thử nghiệm API về đặc tính lên men và đặc tính tương tự. Đối với các chủng này, thử nghiệm về đặc tính làm thoái biến trong ví dụ thử nghiệm 3 dưới đây được thực hiện và cuối cùng chủng *Bacillus* HB-88 và chủng *Bacillus* HB-113 có các đặc tính cao được chọn.

Ví dụ thử nghiệm 2

Tạo ra thể biến nạp bằng cách sử dụng phương pháp chức năng

Đối với chủng Marburg của vi khuẩn *Bacillus subtilis* để đánh giá chức năng, chủng NBRC14144 thu được từ NBRC được sử dụng. Chủng này có đặc tính biến nạp thông qua việc đưa ADN thể cho vào vi khuẩn, nhưng loại của các enzym được tiết ra là ít và nồng độ của các enzym này cũng không đủ. Chủng *Bacillus* HB-88 được phát hiện là chủng tiết ra các enzym rất mạnh bằng cách sàng lọc *Bacillus subtilis* kiểu đại và được sử dụng làm vi khuẩn thể cho.

Sau khi tạo huyền phù của chủng NBRC14144 trong nước muối sinh lý (0,85%) trong đĩa petri, vi khuẩn kháng kháng sinh được tạo ra bằng cách cho tiếp xúc với tia cực tím, và vi khuẩn này được chọn bằng phương pháp đĩa gradien kháng sinh (Manual of Methods for General Bacteriology p230, 1981) bằng cách sử dụng chloramphenicol.

Liên quan đến sự biến nạp tự nhiên, các tế bào chức năng được tạo ra bằng cách sử dụng môi trường tối thiểu theo phương pháp trong tài liệu: the method of Microorganism Genetic Experiment Method pp96-101 (1982), và chủng thể cho được đưa vào để biến nạp. Kết quả là thu được chủng *Bacillus* HB-14.

Ví dụ thử nghiệm 3

Chọn vi sinh vật thuộc giống *Bacillus* tiết ra các enzym làm thoái biến

(1) Mức độ tiết ra enzym được xác định bằng phương pháp theo tài liệu: "Investigative Approach to NATTO", p44 (Kouseisha Kouseikaku Co., Ltd., supervised by Kan Kinouchi). Cơ chất cần được nghiên cứu được hòa tan trong môi trường aga tiêu chuẩn và được tiết trùng theo phương pháp chung, và các đĩa được

tạo ra bằng cách rót môi trường này vào nhiều đĩa petri có đường kính 85mm. Đối với chuẩn độ, vùng sạch bên ngoài các khuẩn lạc được xác định bằng cách sử dụng đĩa giấy có đường kính 8mm và độ dày 1,5mm (Toyo Roshi Kaisha, Ltd.). Tất cả các môi trường nuôi cấy vi khuẩn cần được xác định được đánh dấu và nuôi cấy sau khi nuôi cấy kiểu quay trong môi trường bouillon bình thường trong 20 giờ, các đĩa được ngâm bằng 30 đến 70 μ l môi trường nuôi cấy vi khuẩn hữu hiệu và sau đó được gắn với các đĩa xác định. Các chuẩn độ được xác định với vùng sạch trong phạm vi 1mm tính từ rìa ngoài của khuẩn lạc là (+), trong phạm vi từ 2 đến 3mm là (++), và 3mm hoặc rộng hơn là (+++). Về điểm này, khi không có vùng sạch được tạo ra, nó sẽ được xác định là (-).

(2) Xác nhận đặc tính làm thoái biến lipit

Sau khi tiệt trùng môi trường aga tiêu chuẩn chứa 3% tributyrin, môi trường này được nhũ hóa bằng máy trộn đều polytron (KINEMATICA.CH) ở tốc độ 20000 vòng/phút trong 5 phút và được rót vào các đĩa petri, và các đĩa để xác nhận đặc tính làm thoái biến lipit được chuẩn bị. Đối với lần sàng lọc đầu tiên, các vi sinh vật thuộc giống *Bacillus* đã phân lập trước đó được đánh dấu và nuôi cấy trên các đĩa này, và đặc tính làm thoái biến lipit được kiểm tra. Các đĩa được ngâm trong 70 μ l môi trường nuôi cấy vi khuẩn dương tính và đưa vào các đĩa, các đĩa này được đặt trong tủ áp ở nhiệt độ 37°C trong 5 ngày, và các vùng sạch được xác định. Khi các khuẩn lạc phát triển lớn, các khuẩn lạc này được đưa vào các vùng sạch khi các phần bên dưới trở nên trong suốt. Tất cả các chủng HB-14, chủng HB-88 và chủng HB-113 đều được đánh giá là (+++).

(3) Xác nhận đặc tính làm thoái biến tinh bột

Sau khi tiệt trùng môi trường aga tiêu chuẩn chứa tinh bột hòa tan 3% (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), môi trường này được rót vào các đĩa petri, và các đĩa để xác nhận đặc tính làm thoái biến tinh bột được chuẩn bị. Đối với lần sàng lọc đầu tiên, các vi sinh vật thuộc giống *Bacillus* đã phân lập trước đó được đánh dấu và nuôi cấy trên các đĩa này, và đặc tính làm thoái biến tinh bột được kiểm tra. Các đĩa được ngâm trong 30 μ l môi trường nuôi cấy vi khuẩn dương tính và được đưa vào các đĩa, các đĩa này được đưa vào tủ áp ở nhiệt độ 37°C trong tám giờ, và các vùng sạch được xác định sau khi nhỏ giọt dung dịch Lugol. Tất cả các chủng HB-14, chủng HB-88 và

chủng HB-113 đều được đánh giá là (+++).

(4) Xác nhận đặc tính làm thoái biến protein

Sau khi tiệt trùng môi trường aga tiêu chuẩn chứa sữa đậu nành 10% (Fukuren. Co.), môi trường này được rót vào các đĩa petri, và các đĩa để xác nhận đặc tính làm thoái biến protein thực vật được chuẩn bị. Đối với lần sàng lọc đầu tiên, các vi sinh vật thuộc giống *Bacillus* đã phân lập trước đó được đánh dấu trên các đĩa này, và đặc tính làm thoái biến protein được kiểm tra. Các đĩa này được ngâm trong 50µl môi trường nuôi cấy vi khuẩn dương tính và được đưa vào các đĩa, các đĩa này được đưa vào tủ áp ở nhiệt độ 37°C trong 3 ngày, và các vùng sạch được xác định. Tất cả các chủng HB-14, chủng HB-88 và chủng HB-113 đều được đánh giá là (+++).

Sau khi tiệt trùng môi trường aga tiêu chuẩn chứa 5% sữa không có chất béo (Takanashi milk products co. ltd.), môi trường này được rót vào các đĩa petri, và các đĩa để xác nhận đặc tính làm thoái biến protein động vật được chuẩn bị. Đối với lần sàng lọc đầu tiên, các vi sinh vật thuộc giống *Bacillus* đã phân lập trước đó được đánh dấu trên các đĩa này, và đặc tính làm thoái biến protein được kiểm tra. Các đĩa được ngâm trong 70µl môi trường nuôi cấy vi khuẩn dương tính và được đưa vào các đĩa, các đĩa này được đưa vào tủ áp ở nhiệt độ 37°C trong 10 giờ, và các vùng sạch được xác định. Tất cả các chủng HB-14, chủng HB-88 và chủng HB-113 đều được đánh giá là (+++).

(5) Xác nhận đặc tính làm thoái biến vi khuẩn (I)

Vi khuẩn *Escherichia coli* (chủng *E.coli* NBRC14237) được nuôi cấy trong môi trường bouillon bình thường trong 20 giờ, môi trường này được bổ sung vào môi trường aga tiêu chuẩn đã tiệt trùng với tỷ lệ 1% và được trộn đều, và các đĩa để xác nhận đặc tính làm thoái biến vi khuẩn được chuẩn bị trong các đĩa petri. Đối với lần sàng lọc đầu tiên, các vi sinh vật thuộc giống *Bacillus* đã phân lập trước đó được đánh dấu trên các đĩa này, và đặc tính làm thoái biến vi khuẩn được kiểm tra. Các đĩa được ngâm trong 70µl môi trường nuôi cấy vi khuẩn dương tính và được đưa vào các đĩa, các đĩa này được đưa vào tủ áp ở nhiệt độ 37°C trong hai ngày, và các vùng sạch được xác định. Tất cả các chủng HB-14, chủng HB-88 và chủng HB-113 đều được đánh giá là (+++).

Tiếp theo, vi khuẩn axit lactic (*Lactobacillus acidophilus* (chủng

ATCC53103)) được nuôi cấy trong môi trường tổng hợp MRS trong 48 giờ, môi trường này được bổ sung vào môi trường aga tiêu chuẩn đã tiệt trùng với tỷ lệ 1% và được trộn đều, và các đĩa để xác nhận đặc tính làm thoái biến vi khuẩn được chuẩn bị trong các đĩa petri. Đối với lần sàng lọc đầu tiên, các vi sinh vật thuộc giống *Bacillus* đã phân lập trước đó được đánh dấu trên các đĩa này, và đặc tính làm thoái biến vi khuẩn được kiểm tra. Các đĩa được ngâm trong 70µl môi trường nuôi cấy vi khuẩn dương tính và được đưa vào các đĩa, các đĩa này được đưa vào tủ áp ở nhiệt độ 37°C trong một ngày, và các vùng sạch được xác định. Tất cả các chủng HB-14, chủng HB-88 và chủng HB-113 đều được đánh giá là (+++).

(6) Xác nhận đặc tính làm thoái biến vi khuẩn (II)

Để làm rõ mức độ làm thoái biến thành tế bào, mỗi loại vi khuẩn *Escherichia coli* và vi khuẩn axit lactic được nuôi cấy trong 20 giờ, và 160ml mỗi loại môi trường nuôi cấy được ly tâm ở tốc độ 5000 vòng/phút trong 15 phút để phân lập các tế bào vi khuẩn. Các tế bào vi khuẩn của cả vi khuẩn *Escherichia coli* và vi khuẩn axit lactic được ly tâm-rửa hai lần bằng 80ml nước muối sinh lý tiệt trùng (0,85%) để thu được 20ml môi trường nuôi cấy vi khuẩn. Các môi trường nuôi cấy vi khuẩn này được tiệt trùng ở nhiệt độ 85°C trong 10 phút, được bổ sung vào môi trường aga tiêu chuẩn đã tiệt trùng với tỷ lệ 5% (theo thể tích) sau khi làm nguội bằng nước lạnh và được trộn đều, và các đĩa để xác nhận đặc tính làm thoái biến thành tế bào đối với vi khuẩn *Escherichia coli* và vi khuẩn axit lactic được chuẩn bị. Đối với lần sàng lọc đầu tiên, các vi sinh vật thuộc giống *Bacillus* đã phân lập trước đó được đánh dấu trên các đĩa này, và đặc tính làm thoái biến vi khuẩn được kiểm tra. Các đĩa được ngâm trong 70µl môi trường nuôi cấy vi khuẩn dương tính và được đưa vào các đĩa của cả hai loại, các đĩa này được đưa vào tủ áp ở nhiệt độ 37°C trong 10 giờ, và các vùng sạch được xác định. Đối với cả vi khuẩn *Escherichia coli* và vi khuẩn axit lactic, tất cả các chủng HB-14, chủng HB-88 và chủng HB-113 đều được đánh giá là (+++).

(7) Đặc tính sinh trưởng từ dịch tan vi khuẩn

Vi khuẩn *Escherichia coli* đã mô tả trên đây được nuôi cấy trong môi trường bouillon bình thường trong 20 giờ, và 40ml môi trường nuôi cấy này được tách bằng cách ly tâm ở tốc độ 5000 (vòng/phút) trong 15 phút. Vi khuẩn này được rửa- ly tâm theo cách tương tự bằng nước muối sinh lý (0,85%), và thao tác này được lặp lại ba

lần. Các muối vô cơ cần tối thiểu là (NH_4NO_3 : 1,0%, KH_2PO_4 : 0,25%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,25%, và $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,0002%) và aga được bổ sung vào 20% trong tổng số vi khuẩn đã rửa, và các đĩa để xác nhận đặc tính làm thoái biến vi khuẩn được chuẩn bị trong các đĩa petri. Các đĩa này được đánh dấu và nuôi cấy trong tủ áp ở nhiệt độ 37°C trong hai ngày, và đặc tính làm thoái biến được kiểm tra. Kết quả là các đặc tính sinh trưởng của chủng HB-14, chủng HB-88 và chủng HB-113 được xác nhận, và môi trường xung quanh các khuẩn lạc trở nên trong suốt. Về mặt này, đối với các chủng dương tính, đã xác nhận được rằng chúng không sinh trưởng trong môi trường aga chỉ chứa các muối vô cơ nêu trên.

Đối với 68 chủng có hai loại enzym làm thoái biến (lipit và tinh bột) trong số 180 chủng, chuẩn độ của các enzym làm thoái biến khác được xác nhận thông qua ví dụ thử nghiệm 3. Các kết quả của chúng được thể hiện trong bảng 3. Năm chủng có chuẩn độ của các đặc tính làm thoái biến (+++) đối với tất cả các mục được tìm thấy, và chủng HB-14, HB-88 và HB-113 được chọn làm đại diện của chúng.

Chuẩn độ của đặc tính làm thoái biến của các enzym làm thoái biến của vi khuẩn thuộc giống *Bacillus*

Bảng 3

	(-)	(+)	(++)	(+++)
Đặc tính làm thoái biến lipit	106	49	18	7
Đặc tính làm thoái biến tinh bột	79	51	31	19
Đặc tính làm thoái biến protein thực vật	23	23	14	8
Đặc tính làm thoái biến protein động vật	26	16	17	9
Xác nhận đặc tính làm thoái biến <i>Escherichia coli</i> (I)	33	15	13	7
Xác nhận đặc tính làm thoái biến vi khuẩn axit lactic (I)	39	13	11	5
Xác nhận đặc tính làm thoái biến <i>Escherichia coli</i> (II)	31	16	12	9
Xác nhận đặc tính làm thoái biến vi khuẩn axit lactic (II)	35	14	11	8

Ví dụ 1

Giá trị số phân tích chung của việc xử lý ưa khí

Chủng HB-113 (NITE BP-1277), tiết ra rất nhiều enzym làm thoái biến lipit, thành tế bào, protein và tinh bột và có thể sinh trưởng bằng cách sử dụng dịch tan của

vi khuẩn làm nguồn dinh dưỡng, được sử dụng. Từ bể điều chỉnh nước ban đầu trong nhà máy sản xuất sản phẩm sữa, 200 lít nước thải được cho vào bể chứa có dung tích 500 lít, vi khuẩn nêu trên được đưa vào với tỷ lệ 100 mg/l, và việc xử lý được thực hiện trong 24 giờ trong điều kiện ưa khí với lượng oxy hòa tan ở thời điểm ban đầu là 10 mg/l (25°C) hoặc cao hơn bằng cách sử dụng thiết bị tạo ra bọt khí mịn cỡ micro MAB (Nihon Mizu Syori Giken Co.). Các giá trị phân tích khi nước thải được xử lý được thể hiện trong các bảng 4 và 5 dưới đây. Bể đã được xử lý bằng cách bổ sung chủng HB-113 cho thấy kết quả tốt hơn về tỷ lệ BOD, COD, N-hexan và SS giảm so với bể không được bổ sung chủng vi sinh vật nêu trên.

Kết quả khi xử lý bằng cách bổ sung chủng HB-113

Bảng 4

	BOD (mg/l)	COD (mg/l)	N-hexan (mg/l)	SS (mg/l)
Nước ban đầu	1900	560	77	912
Sau khi xử lý 24 giờ	860	275	32	459
Tỷ lệ giảm (%)	54,74	50,89	58,44	49,67

Kết quả khi không bổ sung vi khuẩn

Bảng 5

	BOD (mg/l)	COD (mg/l)	N-hexan (mg/l)	SS (mg/l)
Nước ban đầu	1300	413	170	724
Sau khi xử lý 24 giờ	1100	373	80	612
Tỷ lệ giảm (%)	15,38	9,68	52,94	15,46

Ví dụ 2

Thử nghiệm làm giảm lượng bùn

Nước chứa 7% sữa được sử dụng làm mẫu nước thải ban đầu, 2ml chủng *Bacillus* HB-14 (NITE BP-1275) được nuôi cấy trong môi trường bouillon bình thường (Eiken Chemical Co., Ltd.) được bổ sung vào 200ml nước nêu trên, và việc

nuôi cấy ở giai đoạn sơ bộ được thực hiện bằng cách nuôi cấy kiểu quay ở nhiệt độ 30°C trong 24 giờ. Môi trường nuôi cấy ở giai đoạn sơ bộ này được bổ sung vào 800ml bùn lỏng (bùn lỏng cần được thử nghiệm; COD=31) để xử lý nước thải trong nhà máy sản xuất bánh kẹo, dung dịch nêu trên được lọc qua đá bọt dùng cho bể cá nhiệt đới và không khí được thổi với lưu lượng nhất định để tuần hoàn bùn (nằm trong khoảng từ 1,2 đến 2,0mg oxy/l) để thực hiện việc nuôi cấy sục khí. Sau một ngày, 200ml mẫu được lấy, và môi trường nuôi cấy ở giai đoạn sơ bộ được bổ sung làm mẫu ngày đầu tiên. Công đoạn này được lặp lại trong một tuần, và giá trị MLSS của lượng bùn nêu trên được xác định.

Ngoài ra, để so sánh, vi sinh vật thuộc giống *Bacillus* được phân lập từ natto (vi sinh vật này không bị làm tan; đặc tính làm thoái biến protein là (+); đặc tính làm thoái biến lipid là (-); và đặc tính làm thoái biến tinh bột là (+++)) được sử dụng thay cho chủng HB-14. Các kết quả được thể hiện trong bảng 6.

Kết quả:

Bảng 6

	Sự làm giảm lượng bùn			
	Chủng HB-14		Chủng được phân lập từ natto	
	MLSS (mg/l)	Tỷ lệ làm giảm lượng bùn	MLSS (mg/l)	Tỷ lệ làm giảm lượng bùn
Bắt đầu	7935	0%	7935	0%
Sau 1 ngày	7351	7,4%	7649	3,6%
Sau 3 ngày	5044	36,4%	7102	10,5%
Sau 5 ngày	4311	45,7%	6959	12,3%
Sau 7 ngày	3984	49,8%	6459	18,6%

Ví dụ 3

Thử nghiệm về việc ngăn chặn sự tắc lỗ trong khi xử lý nước thải bằng cách sử dụng màng

(1) Để làm mẫu nước thải ban đầu, 1000ml nước thải chứa 10% sữa đậu nành (sữa đậu nành không đường; Fukuren. Co.) được sử dụng. 20ml chủng *Bacillus*

subtilis HB-88 (NITE BP-1276) được nuôi cấy trong môi trường bouillon bình thường trong 20 giờ được bổ sung vào mẫu nước thải nêu trên, và dung dịch này được lọc qua đá bọt dùng cho bể cá nhiệt đới và không khí được thổi với lưu lượng nhất định để tuần hoàn bùn (nằm trong khoảng từ 1,2 đến 2,0 mg oxy/l) để thực hiện việc nuôi cấy sục khí cả ngày. Sau từ một đến bốn ngày, 200ml mỗi loại mẫu được lấy, mẫu nước thải ban đầu chứa 10% sữa đậu nành được bổ sung vào mỗi mẫu nêu trên để điều chỉnh thể tích đến 1000ml, và việc nuôi cấy sục khí tiếp tục được thực hiện. Mỗi mẫu này được ly tâm (3000 vòng/phút) sau khi xác định MLSS, và có thể thực hiện việc xử nước trong năm ngày bằng cách sử dụng bộ lọc khử trùng cỡ 0,45 micron.

(2) Mặt khác, việc xử lý tương tự như trong phần (1) nêu trên được thực hiện, ngoại trừ bùn lỏng hoạt hóa được đưa trở lại (thu được từ nhà máy sản xuất thực phẩm; COD=31) được sử dụng thay cho chủng *Bacillus subtilis* HB-88 được nuôi cấy trong môi trường bouillon bình thường. Trong trường hợp này, bộ lọc khử trùng cỡ 0,45 micron bị tắc và việc lọc gần như không thể thực hiện được.

Ví dụ 4

Thử nghiệm về việc làm giảm lượng chất béo và dầu trong nước thải

(1) 500ml dung dịch nước, trong đó các muối vô cơ $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 5,0g, Na_2HPO_4 : 0,5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,25g, và CaCO_3 : 5,0g) được hòa tan, được tiệt trùng, và thu được dung dịch bằng cách bổ sung nước vào 100ml sữa đã loại bỏ chất béo (sữa không chứa chất béo Takanashi) để điều chỉnh thể tích đến 500ml được bổ sung vào dung dịch nước nêu trên để thu được 1000ml dung dịch, dung dịch này được sử dụng làm môi trường nuôi cấy sơ bộ. Hai môi trường nuôi cấy sơ bộ được tạo ra.

(2) Đối với môi trường nuôi cấy sơ bộ này, 20ml môi trường nuôi cấy nấm men (chủng YH-01, Hinode Sangyo Co., Ltd), được nuôi cấy kiểu quay trong môi trường bouillon bình thường ở nhiệt độ 30°C trong hai ngày, và 20ml môi trường nuôi cấy chủng *Bacillus* HB-113 (NITE BP-1277), được nuôi cấy theo cách tương tự, được bổ sung vào, và đồ chứa được duy trì ở nhiệt độ 30°C. Dung dịch này được lọc qua đá bọt và nuôi cấy trong một ngày, không khí được thổi với lưu lượng nhất định để tuần hoàn dung dịch (nằm trong khoảng từ 1,2 đến 2,0 mg oxy/l), nhờ đó thu được môi trường nuôi cấy ở giai đoạn sơ bộ (hai phần).

Nước được bổ sung vào 60ml sữa (sữa không đường Takanashi, chứa 3,6% chất béo) để điều chỉnh đến tổng thể tích là 1000ml, và dung dịch này được sử dụng làm mẫu nước thải ban đầu chứa chất béo và dầu. Môi trường nuôi cấy ở giai đoạn sơ bộ được bổ sung vào mẫu nước ban đầu này để thu được nước thải chứa chất béo và dầu (1080 mg/l) với tổng lượng 2000ml. Nước thải chứa chất béo và dầu này (hai phần) được duy trì trong đồ chứa ở nhiệt độ 30°C, được lọc qua đá bọt như trên đây và nuôi cấy trong ba ngày có không khí được thổi vào với lưu lượng nhất định để tuần hoàn dung dịch này. Để làm mẫu, 1000ml dung dịch nêu trên được lấy mỗi ngày, và lượng chất chiết n-hexan (lượng dầu) trong nước thải đã xử lý được xác định.

(3) Để so sánh, chỉ 20ml môi trường nuôi cấy nấm men (chủng YH-01, Hinode Sangyo Co., Ltd), được nuôi cấy kiểu quay trong môi trường bouillon bình thường ở nhiệt độ 30°C trong hai ngày, được bổ sung vào hai phần môi trường nuôi cấy sơ bộ được tạo ra trong phần (1) nêu trên. Môi trường này được nuôi cấy như trong phần (2), và lượng chất chiết n-hexan trong nước đã xử lý được xác định.

(4) Để so sánh, chỉ 20ml môi trường nuôi cấy chủng HB-113, được nuôi cấy kiểu quay trong môi trường bouillon bình thường ở nhiệt độ 30°C trong hai ngày, được bổ sung vào hai phần môi trường nuôi cấy sơ bộ được tạo ra trong phần (1) nêu trên. Môi trường này được nuôi cấy như trong phần (2), và lượng chất chiết n-hexan trong nước đã xử lý được xác định. Các kết quả của phần (2), (3) và (4) được thể hiện trong bảng 7.

Bảng 7

	Lượng dầu trước khi xử lý (tỷ lệ dầu còn lại)	Lượng dầu sau một ngày (giống như trong cột trái)	Lượng dầu sau 2 ngày (giống như trong cột trái)	Lượng dầu sau 3 ngày (giống như trong cột trái)
YH-01+	1080 mg/l	260 mg/l	49,7 mg/l	36,7 mg/l
HB-113	100%	24,1%	4,6%	3,4%
YH-01	1080 mg/l	386 mg/l	245 mg/l	116 mg/l
	100%	35,7%	22,7%	10,7%
HB-113	1080 mg/l	1065 mg/l	1051 mg/l	1059 mg/l
	100%	98,6%	97,3%	98,1%

Ví dụ 5

Tác dụng ức chế *Escherichia coli*

Các muối vô cơ ((NH₄)₂SO₄: 5,0g, Na₂HPO₄: 0,5g, MgSO₄·7H₂O: 0,25g và CaCO₃: 5,0g) được hòa tan trong 970ml nước, và 30ml sữa (tỷ lệ chất béo 3,6%) được bổ sung vào đó để thu được 1000ml dung dịch dùng làm mẫu nước thải ban đầu chứa chất béo và dầu. Tiếp theo, 10ml môi trường nuôi cấy nấm men (chủng YH-01), được nuôi cấy kiểu quay trong môi trường bouillon bình thường ở nhiệt độ 30°C trong hai ngày, 10ml môi trường nuôi cấy chủng HB-88 (NITE BP-1276), được nuôi cấy kiểu quay trong môi trường bouillon bình thường ở nhiệt độ 35°C trong một ngày, và 10ml *Escherichia coli* (chủng NBRC14237), được nuôi cấy kiểu tĩnh trong môi trường bouillon bình thường ở nhiệt độ 35°C trong một ngày, được bổ sung vào dung dịch nêu trên, và quá trình nuôi cấy kiểu quay được thực hiện nhẹ nhàng ở nhiệt độ 32°C trong ba ngày. Các mẫu phân tích được lấy sau một ngày và sau ba ngày, và hàm lượng dầu và lượng vi khuẩn được bổ sung vào mỗi mẫu được xác định. Để xác định lượng vi khuẩn, việc pha loãng được thực hiện theo cách thích hợp bằng nước muối sinh lý đã tiệt trùng theo phương pháp thông thường. Đối với việc phát hiện nấm men (YH-01), việc nuôi cấy được thực hiện ở nhiệt độ 30°C trong năm ngày bằng cách sử dụng môi trường aga Sabouraud (Eiken Chemical Co., Ltd.) và *Bacillus* (HB-88) được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong hai ngày bằng cách sử dụng môi trường aga tiêu chuẩn. Đối với *Escherichia coli*, 0,1ml môi trường ban đầu được phủ vào đĩa chứa môi trường deoxycholat và được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong hai ngày. Các kết quả được thể hiện trong bảng 8. Kết quả là *Escherichia coli* được giảm đi cả sau một ngày và sau ba ngày, và chất béo và dầu được thoái biến ở mức thỏa đáng như trong ví dụ 4.

Bảng 8

	Ngay sau khi cấy	Sau một ngày	Sau 3 ngày
Tỷ lệ chất béo và dầu trong nước thải	100%	27,5%	5,0%
Nấm men (YH-01)	$1,6 \times 10^5$ /ml	$7,1 \times 10^7$ /ml	$7,6 \times 10^7$ /ml
Chủng <i>Bacillus</i> HB-88	$3,6 \times 10^6$ /ml	$1,6 \times 10^8$ /ml	$2,1 \times 10^8$ /ml
<i>Escherichia coli</i>	$2,2 \times 10^6$ /ml	0/0,1ml	0/0,1ml

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Vi sinh vật thuộc giống *Bacillus* theo sáng chế có đặc tính làm thoái biến thành tế bào và sinh trưởng bằng cách sử dụng các tế bào đã được làm thoái biến, tiết ra enzym làm thoái biến lipit, và còn tiết ra các enzym làm thoái biến protein và tinh bột.

Ngoài ra, bằng cách sử dụng các đặc tính của vi sinh vật thuộc giống *Bacillus* nêu trên, có thể làm giảm lượng bùn dư trong phương pháp bùn hoạt tính, làm giảm lượng chất béo và dầu trong nước thải, và cải thiện khả năng tách chất rắn-chất lỏng. Cụ thể, bùn chứa các chất độ nhớt là protein, chất nhớt là polysacarit, chất đông tụ là chất béo, chất đông tụ là tế bào, các chất khoáng và chất tương tự, và là chất đông tụ của các thành phần này. Vi sinh vật thuộc giống *Bacillus* theo sáng chế tiết ra các enzym làm thoái biến các thành phần nêu trên ngoại trừ các chất khoáng và có thể sinh trưởng trên các thành phần được làm tan, và do đó việc làm giảm lượng bùn dư có thể được thúc đẩy một cách hiệu quả.

Ngoài ra, đối với nước thải chứa chất béo và dầu, tác dụng làm thoái biến dầu và chất béo có thể được tăng lên bằng cách để vi sinh vật này sống cộng sinh với men đồng hóa chất béo và dầu.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Vi sinh vật, trong đó vi sinh vật này có tên là chủng *Bacillus* HB-14 (NITE BP-1275), chủng *Bacillus* HB-88 (NITE BP-1276) hoặc chủng *Bacillus* HB-113 (NITE BP-1277).

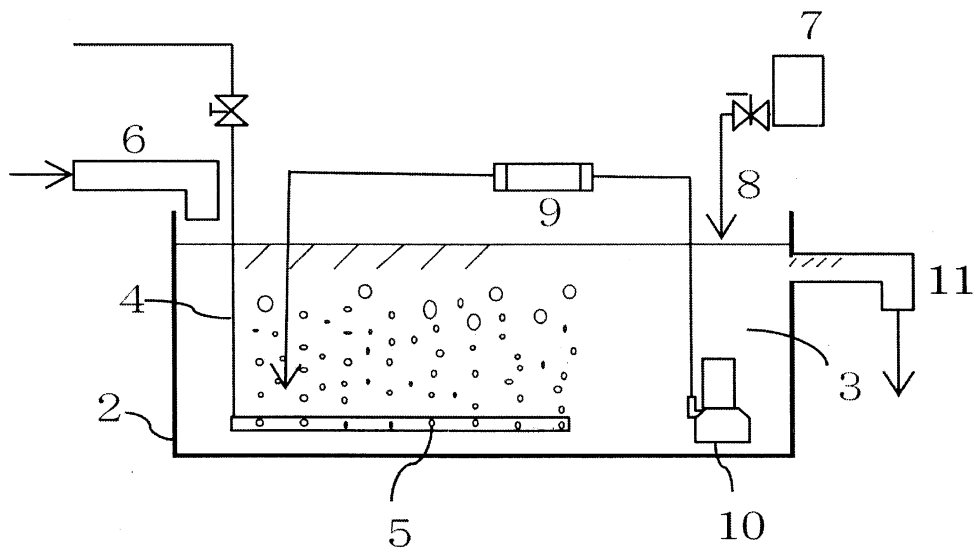
2. Tác nhân xử lý nước thải dạng vi khuẩn sống để làm giảm lượng bùn dư, trong đó tác nhân này chứa vi sinh vật theo điểm 1.

3. Chế phẩm dạng vi khuẩn sống để xử lý nước thải chứa chất béo và dầu, trong đó chế phẩm này chứa vi sinh vật theo điểm 1 và nấm men đồng hóa chất béo và dầu.

4. Phương pháp làm giảm lượng bùn dư trong thiết bị xử lý nước thải, trong đó phương pháp này bao gồm bước đưa một loại vi sinh vật theo điểm 1 hoặc hỗn hợp của hai hoặc nhiều loại vi sinh vật này vào nước cần được xử lý trong thiết bị xử lý nước thải.

5. Phương pháp ngăn chặn sự giảm dòng chảy đi qua màng trong phương pháp xử lý nước thải bằng cách tách chất rắn-chất lỏng để loại bỏ nước sử dụng màng tách chất rắn-chất lỏng, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho một loại vi sinh vật theo điểm 1 hoặc hỗn hợp của hai hoặc nhiều loại vi sinh vật này phản ứng với màng tách chất rắn-chất lỏng.

Fig. 1

1