



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

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

(11)   
**2-0002100**

(51)<sup>7</sup> **C12N 1/00, 1/20, C02F 11/00, 3/00**

(13) **Y**

(21) 2-2018-00433

(22) 30.12.2016

(67) 1-2016-05188

(45) 25.09.2019 378

(43) 27.03.2017 348

(73) **VIỆN CÔNG NGHỆ MÔI TRƯỜNG, VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG  
NGHỆ VIỆT NAM (VN)**

Nhà A30, số 18 Hoàng Quốc Việt, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) **Tăng Thị Chính (VN), Đỗ Văn Mạnh (VN), Huỳnh Đức Long (VN)**

(54) **QUY TRÌNH SẢN XUẤT CHẾ PHẨM VI SINH CHỊU MẶN DỪNG ĐỂ XỬ LÝ  
BÙN ĐÁY VÀ NƯỚC BỊ Ô NHIỄM CHẤT HỮU CƠ Ở CÁC VÙNG NƯỚC LỢ  
VÀ NƯỚC MẶN, VÀ CHẾ PHẨM VI SINH THU ĐƯỢC**

(57) Giải pháp hữu ích đề xuất quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh dùng để xử lý bùn đáy và nước bị ô nhiễm chất thải hữu cơ ở các vùng nước lợ và nước mặn bao gồm các bước: a) Tuyển chọn các chủng vi sinh vật; b) Nhân giống cấp 1; c) Nhân giống cấp 2; và d) Tạo chế phẩm vi sinh vật. Ngoài ra, giải pháp hữu ích đề xuất chế phẩm vi sinh thu được bởi quy trình nêu trên. Chế phẩm vi sinh này có khả năng phân hủy các hợp chất hữu cơ cao như xenluloza, tinh bột, protein, lipid để thúc đẩy quá trình phân hủy, làm sạch các chất ô nhiễm hữu cơ trong môi trường nước lợ hoặc nước mặn ở các thủy vực. Chế phẩm vi sinh theo giải pháp hữu ích bao gồm các thành phần: chủng *Bacillus subtilis* DN1.3; chủng *Bacillus amyloliquefaciens* TB10; chủng *Sphingobacterium mizutaii* B8; và chất mang.

### **Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Sáng chế thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học môi trường, cụ thể là sáng chế đề cập đến việc kết hợp các chủng vi khuẩn chịu mặn để tạo ra chế phẩm vi sinh có khả năng phân hủy các hợp chất hữu cơ cao như xenluloza, tinh bột, protein, lipit để thúc đẩy quá trình phân hủy, làm sạch các chất ô nhiễm hữu cơ trong môi trường nước lợ hoặc nước mặn ở các thủy vực, như tại các âu thuyền ven biển, các đầm phá nuôi trồng thủy sản.

### **Tình trạng kỹ thuật của sáng chế**

Hiện nay, nghiên cứu kiểm soát ô nhiễm tại các thủy vực ngày một có xu hướng được đề cập nhiều hơn do hoạt động ô nhiễm không được kiểm soát xả xuống, trong đó những nghiên cứu chỉ ra việc thiếu cân bằng khu hệ vi sinh vật nền đáy là một trong những mắt xích quan trọng trong việc đánh giá. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra vai trò của vi sinh vật trong thủy vực và đặc biệt nền đáy là rất quan trọng. Sự có mặt của các nhóm vi sinh vật trong môi trường không những làm chức năng chỉ thị sinh học để đánh giá hiện trạng môi trường mà còn đóng một vai trò quan trọng trong việc duy trì sự cân bằng của tự nhiên. Ví dụ, trong nghiên cứu của Atreyee, 2013 và Huiluo Cao, 2011 được thực hiện tại Vịnh Jiaozhou phía Bắc Trung Quốc, khu bảo tồn thiên nhiên Po Mai ven biển của Hồng Kông đã cho thấy cấu trúc quần xã của tác nhân oxy hóa amoniac hiếu khí gồm amoniac-oxy hóa Betaproteobacteria (Beta-AOB) và vi khuẩn cổ oxy hóa amoniac (AOA). Gần đây hơn, tác nhân kị khí oxy hóa amoni (anammox) bởi vi khuẩn được có thể thích ứng ở điều kiện môi trường bao gồm độ mặn, pH, các ion kim loại, nồng độ nitơ vô cơ, tổng phospho, tỷ lệ cacbon hữu cơ-nitơ và các yếu tố trầm tích như kích thước hạt trung bình. Những công trình nghiên cứu này đều chỉ ra những mối quan hệ giữa nồng độ các chất ô nhiễm và mật độ vi sinh vật trong vai trò chuyển hóa chúng trong tự nhiên, tốc độ chuyển hóa các chất ô nhiễm đều phụ thuộc vào nồng độ và các yếu tố tác động bên ngoài môi trường và mật độ vi sinh vật có mặt trong môi trường.

Tác giả Hugo Ribeiro và các cộng sự, 2012 đã đề cập đến ảnh hưởng của lớp trầm tích đến khả năng phân hủy sinh học của nhóm vi sinh vật bào rễ *Juncus maritimus*. Nghiên cứu đã chỉ ra mối tương quan giữa chất ô nhiễm với mật độ vi sinh vật tự nhiên trong thủy vực, nếu một trong hai đầu của mối liên kết này bị phá vỡ thì đều dẫn đến ảnh hưởng lâu dài cho hệ sinh thái. Tại Tây Ban Nha, Andrade và các cộng sự và Boorman đã cho thấy chế độ thủy triều cũng là một trong những yếu tố có ảnh hưởng lớn đến chức năng của hệ sinh thái nước nhiễm mặn và điều này có thể chứng minh nếu môi trường của các nguồn nước đưa vào thủy vực được kiểm soát tốt thì thủy triều rất ít có ảnh hưởng, còn nếu không được kiểm soát thì ngược lại, khi thủy triều rút nồng độ chất ô nhiễm từ các nguồn đưa xuống thủy vực tiếp nhận càng tăng lên, gây lắng đọng xuống đáy và phá vỡ khả năng tự xử lý của hệ sinh thái.

Do vậy, cần có chế phẩm vi sinh hiệu quả để xử lý bùn đáy và nước bị ô nhiễm chất thải hữu cơ ở các vùng nước lợ và nước mặn. Chế phẩm vi sinh này phải chứa các chủng vi sinh có phổ rộng hoạt tính để xử lý nhiều loại chất thải hữu cơ và vừa có khả năng tồn tại được trong môi trường nước lợ và nước mặn.

### **Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích**

Mục đích của giải pháp hữu ích là tuyển chọn được các chủng vi sinh vật chịu mặn sinh tổng hợp các enzym amylaza, proteaza, xenlulaza ngoại bào cao, khử sulfua từ các vùng nước lợ, nước mặn để tạo ra chế phẩm vi sinh phù hợp dùng để bổ sung vào các âu thuyền, các vùng nuôi trồng thủy sản nước lợ và nước mặn để làm tăng mật độ của các vi sinh hữu ích, cải thiện quần xã vi sinh vật hữu ích trong môi trường nước cũng như trong bùn đáy để tăng cường khả năng phân hủy các chất ô nhiễm góp phần làm giảm thiểu ô nhiễm bảo vệ và cải thiện môi trường các thủy vực.

Một mục đích khác của giải pháp hữu ích là tạo ra được chế phẩm vi sinh chịu mặn và quy trình phù hợp sử dụng chúng để nâng cao hiệu quả phân giải các chất ô nhiễm trong môi trường nước và các chất hữu cơ tích tụ lâu ngày trong bùn đáy các thủy vực nước lợ và nước mặn.

Để đạt được mục đích này, giải pháp hữu ích đề xuất quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh dùng để xử lý bùn đáy và nước bị ô nhiễm chất thải hữu cơ ở các vùng nước lợ và

nước mặn bao gồm các bước cơ bản sau: a) Tuyển chọn các chủng vi sinh vật; b) Nhân giống cấp 1; c) Nhân giống cấp 2; và d) Tạo chế phẩm vi sinh vật.

Ngoài ra, giải pháp hữu ích đề xuất chế phẩm vi sinh thu được bởi quy trình nêu trên. Chế phẩm vi sinh này có khả năng phân hủy các hợp chất hữu cơ cao như xenluloza, tinh bột, protein, lipid để thúc đẩy quá trình phân hủy, làm sạch các chất ô nhiễm hữu cơ trong môi trường nước lợ hoặc nước mặn ở các thủy vực. Chế phẩm vi sinh này bao gồm các thành phần: chủng *Bacillus subtilis* DN1.3; chủng *Bacillus amyloliquefaciens* TB10; chủng *Sphingobacterium mizutaii* B8; và chất mang.

### **Mô tả vắn tắt các hình vẽ**

Hình 1.1: Là ảnh chụp mô hình thử nghiệm trong phòng thí nghiệm chế phẩm theo giải pháp hữu ích

Hình 1.2: Là ảnh chụp kết quả thử ngày ngày đầu cho chế phẩm

Hình 1.3: Là ảnh chụp kết quả thử nghiệm sau 7 ngày cho chế phẩm

Hình 1.4: Là ảnh chụp kết quả thử nghiệm sau 14 ngày cho chế phẩm

Hình 1.5: Là ảnh chụp kết quả thử nghiệm sau 21 ngày cho chế phẩm

Hình 2.1: Là đồ thị thể hiện hiệu quả xử lý COD trong nước ở 4 mẫu thử nghiệm

Hình 2.2: Là đồ thị thể hiện hiệu quả xử lý BOD trong nước ở 4 mẫu thử nghiệm

Hình 2.3: Là đồ thị thể hiện hiệu quả xử lý  $\text{NH}_4^+$  trong nước ở 4 mẫu thử nghiệm

Hình 2.4: Là đồ thị thể hiện hiệu quả xử lý TOC trong trầm tích ở các mẫu thử nghiệm

Hình 2.5: Là đồ thị thể hiện hiệu quả xử lý TN trong trầm tích ở các mẫu thử nghiệm

Hình 2.6: Là đồ thị thể hiện hiệu quả xử lý TP trong trầm tích ở các mẫu thử nghiệm

Hình 2.7: Là đồ thị thể hiện mật độ vi sinh vật hiếu khí trong trầm tích ở các mẫu thử nghiệm

Hình 2.8: Là đồ thị thể hiện mật độ vi sinh vật phân giải xenluloza trong trầm tích ở các mẫu thử nghiệm

Hình 2.9: Là đồ thị thể hiện mật độ vi sinh vật phân giải tinh bột trong trầm tích ở các mẫu thử nghiệm

Hình 2.10: Là đồ thị thể hiện mật độ vi sinh vật phân giải protein trong trầm tích ở các mẫu thử nghiệm

Hình 2.11: Là đồ thị thể hiện mật độ vi sinh vật phân giải kitin trong trầm tích ở các mẫu thử nghiệm

Hình 3: Là sơ đồ thể hiện quy trình sản xuất chế phẩm theo sáng chế.

### **Mô tả chi tiết sáng chế**

Theo một phương án, như được thể hiện trên hình 3, quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh dùng để xử lý bùn đáy và nước bị ô nhiễm chất thải hữu cơ ở các vùng nước lợ và nước mặn được tiến hành như sau:

#### **a) Tuyển chọn các chủng vi sinh vật**

Các chủng vi sinh vật dùng để tạo chế phẩm vi sinh được phân lập và tuyển chọn từ môi trường tự nhiên ở Việt Nam như từ các mẫu bùn đáy của các thủy vực nước mặn như mẫu bùn tại âu thuyền Thọ Quang, tại các cảng cá ven biển, tại các ruộng nuôi thủy sản nước lợ, nước mặn, trên các môi trường đặc hiệu cho các chủng vi khuẩn là môi trường MPA cải tiến có thành phần trong 1 lít môi trường bao gồm: cao thịt: 3g, pepton: 5g, thạch aga 20g, nước cất 1000ml, được bổ sung thêm 3% NaCl. Ngoài ra còn cần bổ sung thêm 1% cơ chất (tinh bột để tuyển chọn chủng vi khuẩn phân hủy tinh bột, bột xenluloza để tuyển chọn chủng phân hủy xenluloza, casein để tuyển chọn chủng phân giải protein). Sau đó, môi trường được thanh trùng ở 121<sup>0</sup>C, 15 phút. Các mẫu bùn được pha loãng trong nước muối sinh lý 0,85% NaCl với các nồng độ sau: 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>. Lấy 100μl dung dịch pha loãng nhỏ và các đĩa thạch chứa các cơ chất khác nhau. Nuôi trong tủ ổn nhiệt ở 30<sup>0</sup>C, sau 48 giờ lấy ra để xác định hoạt lực enzym của các chủng vi khuẩn sinh ra.

Ví dụ, để phân lập, tuyển chọn chủng vi khuẩn có khả năng sinh enzym xenlulaza, các đĩa môi trường MPA có bổ sung xenluloza sau khi tiến hành nuôi cấy lấy ra nhỏ dung dịch lugol, nếu xung quanh khuẩn lạc nào có vùng không màu trong suốt, vùng không bắt màu xanh tím càng lớn thì khả năng sinh enzym của chủng vi khuẩn đó càng cao. Chỉ

tuyển chọn những khuẩn lạc có đường kính vòng phân giải trên 30mm để tiếp tục nghiên cứu.

Thực hiện tương tự như trên để tuyển chọn các chủng vi khuẩn sinh enzym amylaza phân hủy tinh bột, cũng sử dụng dung dịch lugol. Còn đối với chủng phân giải protein thì sử dụng dung dịch axit axetic 1%.

Các chủng vi sinh vật chịu mặn phân lập được tiến hành định tên đến loài bằng phương pháp phân loại truyền thống vi sinh vật của Bergey's Manual và bằng kỹ thuật sinh học phân tử (trình tự gen 16S-ARN), xác định được các chủng sử dụng để tạo chế phẩm cụ thể như sau:

Các chủng vi sinh vật được tuyển chọn bao gồm chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* DN1.3 sinh tổng hợp enzym xenlulaza, chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* TB10 sinh tổng hợp enzym amylaza và chủng *Sphingobacterium mizutaii* B8 sinh tổng hợp proteinaza.

Các chủng vi sinh vật này vừa có khả năng sinh trưởng và phát triển có nhiệt độ từ 15-40°C), nồng độ NaCl từ 0,05% đến 4%, chúng sinh tổng hợp mạnh các enzym ngoại bào như là xenlulaza, amylaza, proteaza cao. Do vậy, khi sử dụng chế phẩm vi sinh bao gồm hỗn hợp các chủng nêu trên để đưa vào các thủy vực nước lợ và nước mặn các chủng này sẽ sinh trưởng và phát triển tốt làm tăng mật độ của chúng trong môi trường nước và trong bùn đáy, thúc đẩy nhanh quá trình phân hủy các chất ô nhiễm hữu cơ trong nước và trong bùn đáy của các thủy vực này, làm giảm thiểu ô nhiễm môi trường.

Sau khi tuyển chọn, các chủng này được cấy vào các ống môi trường thạch và bảo quản trong tủ lạnh ở nhiệt độ 4°C để giữ giống.

#### b. Nhân giống cấp 1

Trước khi tiến hành nhân giống, các chủng vi khuẩn được tuyển chọn nêu trên bao gồm 3 chủng: *Bacillus subtilis* DN1.3, *Bacillus amyloliquefaciens* TB10 và *Sphingobacterium mizutaii* B8 được hoạt hóa bằng cách cấy truyền các chủng giống từ ống thạch sang các ống thạch mới chứa môi trường MPA + 3%NaCl và tiến hành nuôi trong tủ ấm ở nhiệt độ 30°C từ 24-48 giờ. Các chủng giống đã được hoạt hóa được nhân giống cấp 1 trên môi trường MPB có thành phần trong 1 lít môi trường bao gồm: cao thịt: 3g, pepton: 5g, NaCl: 30g, nước cất 1000ml. Các công đoạn cụ thể được tiến hành như sau: Đổ 200ml

môi trường nêu trên vào các bình nón 500ml, tiến hành khử trùng trong 30 phút ở 121°C, làm nguội đến nhiệt độ 40°C thì tiến hành cấy giống. Dùng que cấy lấy toàn bộ sinh khối của các chủng vi khuẩn từ ống giống thạch nghiêng cho vào bình nón (500ml) chứa 200ml môi trường MPB đã được thanh trùng nêu trên. Mỗi chủng vi khuẩn cho vào 1 bình riêng. Quá trình cấy giống đều phải được tiến hành trong buồng cấy vô trùng. Các bình nón chứa môi trường sau khi cấy giống vi sinh vật vào được để trong máy lắc ổn nhiệt ở nhiệt độ 30°C, với vận tốc lắc 200 vòng/phút, thời gian nuôi 24 giờ;

#### c. Nhân giống cấp 2

Các chủng *Bacillus subtilis* DN1.3, *Bacillus amyloliquefaciens* TB10 và *Sphingobacterium mizutaii* B8 sau khi được nhân giống cấp 1 sẽ được tiến hành nhân giống cấp 2 riêng rẽ trên các môi trường đặc hiệu. Cụ thể là:

- Chủng *Bacillus subtilis* DN1.3 được nhân giống cấp 2 trên môi trường MPB +3%NaCl + 2% bột xenluloza.

- Chủng *Bacillus amyloliquefaciens* TB10 được nhân giống cấp 2 trên môi trường MPB +3%NaCl + 2% tinh bột.

- Chủng *Sphingobacterium mizutaii* B8 được nhân giống cấp 2 trên môi trường MPB +3%NaCl + 2% bột casein + 2% dầu thực vật.

Trong đó, các môi trường nêu trên và thiết bị lên men được tiến hành khử trùng trong 30 phút ở 121°C, làm nguội đến nhiệt độ 40°C trước khi tiến hành cấy giống. Tỷ lệ bổ sung dịch giống cấp 1 là 5%. Điều kiện nuôi cấy là nhiệt độ 30°C, sục khí để đảm bảo lượng oxy hòa tan 90-95%, tốc độ khuấy 150vòng/phút, điều chỉnh độ pH=7 bằng các dụng dịch NaOH 1N và H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N đã thanh trùng. Thời gian nuôi khoảng 36 giờ, khi mật độ vi sinh vật đạt  $\geq 10^9$ CFU/ml.

#### d. Tạo chế phẩm vi sinh vật

Chất mang là thành phần có vai trò quan trọng trong chế phẩm vi sinh vật. Chất mang vừa có tác dụng cung cấp dinh dưỡng và chất khoáng đồng thời làm giá thể để các vi sinh vật bám vào. Do vậy, giải pháp hữu ích đã tiến hành thử nghiệm đánh giá để lựa chọn chất mang thích hợp. Cụ thể là:

Dịch giống cấp 2 được bổ sung với tỷ lệ 10% giống cấp 2 của từng chủng vi khuẩn sau khi nuôi 36 giờ, mật độ vi sinh trong dịch giống đạt  $10^9$  CFU/ml vào các chất mang chứa các thành phần có tỷ lệ khác nhau như được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Bố trí thử nghiệm thay đổi thành phần các chất mang

TN1	TN2	TN3	TN4
Cám gạo: 5%	Cám gạo: 5%	Cám gạo: 10%	Cám gạo: 10%
Vỏ trấu: 5%	Vỏ trấu: 5%	Vỏ trấu: 10%	Vỏ trấu: 10%
Than bùn 50%	Than bùn: 40%	Than bùn: 40%	Than bùn: 35%
Diatomit: 40%	Diatomit: 50%	Diatomit: 40%	Diatomit: 45

Sau 1 tháng bảo quản, tiến hành đánh giá mật độ vi sinh của các thử nghiệm: TN1, TN2, TN3 và TN4. Kết quả được trình bày trong bảng 2 dưới đây.

Bảng 2. Sự tồn tại của các chủng vi sinh trong các công thức phối trộn chất mang sau 1 tháng bảo quản ở nhiệt độ phòng

Chủng vi sinh vật	Mật độ vi sinh vật (CFU/g), sau 1 tháng bảo quản			
	TN1	TN2	TN3	TN4
<i>Bacillus subtilis</i> DN1.3	$2,5 \times 10^9$	$1,5 \times 10^9$	$8,2 \times 10^9$	$5,5 \times 10^8$
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> TB10	$2,7 \times 10^8$	$3,5 \times 10^8$	$2,6 \times 10^9$	$6,7 \times 10^8$
<i>Sphingobacterium mizutaii</i> B8	$7,3 \times 10^8$	$8,3 \times 10^8$	$3,3 \times 10^8$	$3,3 \times 10^8$

Từ kết quả trên cho thấy công thức phối trộn chất mang tốt nhất là ở thử nghiệm TN3: với tỷ lệ là 10% cám gạo, 10% trấu, 40% than bùn và 40% bột diatomit.

Chuẩn bị chất mang: Thành phần các nguyên liệu sử dụng để làm môi trường xốp bao gồm (% trọng lượng): cám gạo 10%, vỏ trấu 10%, than bùn 40% diatomit 40%. Trong đó, các thành phần cám gạo, vỏ trấu và than bùn có vai trò cung cấp chất dinh dưỡng và chất khoáng cho các chủng vi sinh vật. Diatomit có vai trò quan trọng trong việc làm giảm độ ẩm của hỗn hợp và làm giá thể để các chủng vi sinh vật bám vào.

Các thành phần này được cho vào máy đảo trộn đều trước khi thanh trùng. Sau đó, chất mang được sấy khô ở  $130^\circ\text{C}$  trong 2 -3 giờ đến khi độ ẩm đạt 10%. Chất mang sau sấy được làm nguội đến nhiệt độ  $30^\circ\text{C}$ , bổ sung 10% dịch giống cấp 2 của 3 chủng vi khuẩn nêu trên đảo trộn đều rồi ép thành viên nén có đường kính 5-10cm.



Theo một phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm vi sinh thu được bởi quy trình nêu trên. Chế phẩm vi sinh này có khả năng phân hủy các hợp chất hữu cơ cao như xenluloza, tinh bột, protein, lipit để thúc đẩy quá trình phân hủy, làm sạch các chất ô nhiễm hữu cơ trong môi trường nước lợ hoặc nước mặn ở các thủy vực. Chế phẩm vi sinh này bao gồm các thành phần: *Bacillus subtilis* DN1.3 phân giải tinh bột :  $\geq 10^8$  CFU/gam; *Bacillus amyloliquefaciens* TB10 phân giải xenluloza:  $\geq 10^8$  CFU/gam; *Sphingobacterium mizutaii* B8 phân giải protein, lipit:  $\geq 10^8$  CFU/gam; và chất mang bao gồm các thành phần (% trọng lượng): cám gạo 10%, vỏ trấu 10%, than bùn 40% và diatomit 40%. Ngoài ra, chế phẩm theo sáng chế không chứa các vi sinh vật gây bệnh như *E.coli*, *Salmonella*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*.

### Ví dụ thực hiện sáng chế

Để ứng dụng chế phẩm từ các chủng vi khuẩn chịu mặn vào quá trình xử lý âu thuyền Thọ Quang có hiệu quả, sáng chế đã tiến hành đánh giá khả năng xử lý bùn đáy (được lấy từ âu thuyền Thọ Quang) của các chủng vi sinh vật tuyển chọn trong quy mô phòng thí nghiệm. Mô hình thử nghiệm được trình bày chi tiết như sau:

Việc thực nghiệm xử lý tại phòng thí nghiệm được tiến hành trong các bể chứa làm bằng tấm nhựa có kích thước dài, rộng, cao là 50x50x40 cm. Bùn đáy và nước mặt được lấy tại khu vực âu thuyền sau đó vận chuyển về phòng thí nghiệm để tiến hành xử lý. Vị trí lấy mẫu được lấy tại vị trí dự kiến sẽ tiến hành lắp đặt mô hình thực nghiệm tại hiện trường. Lượng bùn cho mỗi ô thử nghiệm là 5 kg bùn và 5 lít nước mặt. Mô hình thử nghiệm tại phòng thí nghiệm bao gồm 4 ô, trong đó có 3 ô được bổ sung chế phẩm vi sinh, ô còn lại không bổ sung chế phẩm vi sinh và được sử dụng làm đối chứng.

Theo dõi thử nghiệm trong 63 ngày, 7 ngày lấy mẫu phân tích một lần. Tổng số mẫu cần lấy để phân tích = 4 mẫu/lần x 9 lần/đợt thử nghiệm = 36 mẫu.

Các chỉ tiêu cần theo dõi đánh giá như: tổng cacbon hữu cơ, tổng nitơ, tổng phospho,  $\text{NH}_4^+$ , BOD, COD, các nhóm vi sinh vật tổng số hiếu khí, vi sinh vật phân giải protein, kitin, tinh bột, xenluloza.

Bố trí thử nghiệm được thể hiện trên Hình 1.1, cụ thể là:

Các mẫu bùn tươi được lấy tại âu thuyền rồi chuyển về phòng thí nghiệm. Vị trí lấy mẫu là điểm giao tiếp của vùng tiếp nhận nước thải từ các cống xả nước thải từ các khu dân cư và đặc biệt là nước thải từ trạm xử lý nước thải tập trung Khu công nghiệp Dịch vụ Thủy sản Thọ Quang với nước thải từ khu vực tiếp nhận nguyên liệu hải sản vào khu vực chợ. Do đó thành phần các chất hữu cơ có chứa protein, lipit, xenluloza và tinh bột cao.

Phân tích các chỉ tiêu trong nước như: COD, BOD,  $\text{NH}_4^+$ . Phân tích các chỉ tiêu trong bùn như: tổng cacbon hữu cơ, tổng nitơ, tổng phospho, các nhóm vi sinh vật tổng số hiếu khí, vi sinh vật phân giải protein, kitin, tinh bột, xenluloza.

Chế tạo bể phân hủy bùn làm 4 ngăn mỗi ngăn có kích thước dài, rộng, cao là 50x50x40 cm. Cho bùn vào mỗi bể theo thể tích 5 l/bể; Bổ sung chế phẩm vi sinh vào bể ① 10g chế phẩm (kí hiệu M1) , ② 5g chế phẩm (kí hiệu M2) và ③ 1 g chế phẩm (kí hiệu M3) sau đó khuấy đều; Bể đối chứng ④ không bổ sung chế phẩm vi sinh (ký hiệu M4). Theo dõi thử nghiệm trong 63 ngày, 7 ngày lấy mẫu phân tích một lần; Các chỉ tiêu cần theo dõi đánh giá như: tổng cacbon hữu cơ, COD, BOD,  $\text{NH}_4^+$ , tổng nitơ, tổng phospho, tổng số vi sinh vật hiếu khí, vi sinh vật phân giải protein, kitin, tinh bột xenluloza. Thử nghiệm được thực hiện trong điều kiện nhiệt độ phòng khoảng 25°C– 30°C.

Kết quả thử nghiệm được thể hiện trên các hình từ 1.2 đến hình 2.11.

- Về chất lượng nước cho thấy: hàm lượng COD, BOD giảm dần theo thời gian.

Đối với COD: sau 14 ngày mẫu M1 đã nằm dưới mức QCVN08:2015/BTNMT, sau 21 ngày thì mẫu M2 và M3 giảm đến mức thấp hơn so với QCVN, còn mẫu không bổ sung chế phẩm M4 thì sau 35 ngày COD= 48,7 mg/l nhỏ hơn so với QCVN. Sau 63 ngày, hiệu suất xử lý COD của các ô M1, M2, M3, M4 lần lượt là 87,52%; 79,81%; 70,99%; 38,56%. Qua đây cho thấy, ô thử nghiệm bổ sung 10g chế phẩm xử lý COD tốt hơn so với 3 ô thử nghiệm còn lại.

Đối với BOD: ở ô thử nghiệm M1 sau 21 ngày BOD= 21,5 mg/l nằm dưới QCVN, sau 28 ngày thì ô thử nghiệm M2, M3 có BOD lần lượt là 17,4 và 22,3mg/l nhỏ hơn QCVN, còn đối mẫu M4 không bổ sung chế phẩm thì hàm lượng BOD có giảm chậm nhưng vẫn lớn hơn so với QCVN (sau 63 ngày BOD=29,4mg/l). Sau 63 ngày, hiệu suất xử lý BOD của các ô M1, M2, M3, M4 lần lượt là 86,23%; 80,53%; 78,22%; 30,17%. Qua

đây cho thấy, các ô thử nghiệm bổ sung chế phẩm xử lý BOD tốt hơn so với ô thử nghiệm không bổ sung chế phẩm.

Kết quả về chỉ số  $\text{NH}_4^+$  cho thấy có sự khác biệt giữa các mẫu bổ sung nồng độ chế phẩm khác nhau. Ở mẫu không bổ sung chế phẩm hàm lượng  $\text{NH}_4^+$  giảm dần theo thời gian nhưng rất chậm thậm chí sau 63 ngày hàm lượng vẫn khoảng xấp xỉ 5mg/l. Đối với mẫu thử nghiệm bổ sung 1g/l thì hàm lượng  $\text{NH}_4^+$  giảm tương đối nhanh trong khoảng 0 – 42 ngày, sau đó tốc độ giảm chững lại và sau 42 ngày hàm lượng  $\text{NH}_4^+$  đã đạt quy chuẩn cho phép. Với lượng chế phẩm bổ sung ban đầu 5g thì trong vòng 14 ngày đầu hàm lượng  $\text{NH}_4^+$  có tăng đôi chút, nhưng sau đó giảm rất nhanh và sau 42 ngày đã đạt quy chuẩn cho phép của nước mặt. Ở mẫu bổ sung 10g chế phẩm hàm lượng  $\text{NH}_4^+$  tăng vọt sau 14 ngày (xấp xỉ 25 mg/l) cao hơn nhiều so với mẫu bổ sung 1 và 5g chế phẩm. Điều này cho thấy khi lượng chế phẩm bổ sung vào tương đối thì chất hữu cơ sẽ phân hủy nhanh chóng và như chúng ta biết các sản phẩm protein hữu cơ phân hủy thường tạo ra một lượng  $\text{NH}_4^+$ . Tuy nhiên, theo thời gian do nước ở mô hình không được lấy ra và tiếp tục bổ sung vào nên lượng hữu cơ sẽ giảm dần theo thời gian và lượng  $\text{NH}_4^+$  cũng được chuyển hóa trong quá trình sống bởi các vi sinh vật nên lượng  $\text{NH}_4^+$  sẽ giảm dần theo thời gian và sau 42 ngày hàm lượng  $\text{NH}_4^+$  của mẫu bổ sung 10g chế phẩm cũng đạt quy chuẩn cho phép.

Từ các kết quả về COD, BOD và  $\text{NH}_4^+$  đã phân nào khẳng định được hiệu quả của chế phẩm đối với quá trình cải thiện chất lượng nước khi thực hiện ở mô hình thử nghiệm. Lượng chế phẩm bổ sung 1 – 10g đều cho hiệu quả xử lý nước tương đối tốt so với mẫu không bổ sung.

#### Chất lượng trầm tích

Bên cạnh chất lượng nước thì cần đánh giá một số chỉ tiêu bùn để xem quá trình đưa chế phẩm vào, các thông số của bùn đáy có ổn định không. Khả năng tồn tại của các nhóm vi sinh vật (VSV) trong chế phẩm tồn tại trong bùn đáy ra sao. Dưới đây là một số thông số quan trắc từ bùn đáy trong quá trình thử nghiệm chế phẩm.

Từ kết quả thử nghiệm ở các hình 2.4 đến 2.6 cho thấy: Hàm lượng TOC, TN, TP đều có xu hướng giảm theo thời gian.

Đối với hàm lượng TOC: hàm lượng TOC có sự giảm đều theo thời gian hay nói cách khác hiệu quả xử lý tổng lượng chất hữu cơ tăng lên theo thời gian. Sau 63 ngày hiệu suất xử lý TOC trong các ô thử nghiệm M1, M2, M3, M4 lần lượt là 32,02%; 25,02%; 19,86%; 11,71%. Qua đây cho thấy, mẫu M1 xử lý TOC tốt nhất và các mẫu thử nghiệm bổ sung chế phẩm xử lý TOC tốt hơn so với mẫu thử nghiệm không bổ sung chế phẩm.

Đối với hàm lượng TN: Nitơ trong nước thải cao chảy vào thủy vực làm tăng hàm lượng chất dinh dưỡng. Do vậy, nitơ gây ra sự phát triển mạnh mẽ của các loại thực vật phù du như rêu, tảo gây tình trạng thiếu oxy trong nước, phá vỡ chuỗi thức ăn, giảm chất lượng nước, phá hoại môi trường trong sạch của thủy vực, sản sinh nhiều chất độc trong nước  $H_2S$ ,  $CH_4$ ,  $CO_2$ ,... tiêu diệt nhiều loại sinh vật có ích trong nước, gây mùi hôi thối và làm ô nhiễm không khí khu dân cư. Qua phân tích và đánh giá hiệu quả xử lý nitơ bằng chế phẩm VSV chịu mặn cho kết quả cao. Trong 4 ô thử nghiệm thì ô M1 cho kết quả xử lý nitơ tốt nhất, sau 63 ngày, hiệu suất xử lý TN của các ô M1, M2, M3, M4 lần lượt là 44,33%; 30,71%; 24,52%; 12,93%. Qua đây cho thấy, ô thử nghiệm bổ sung chế phẩm xử lý TN tốt hơn so với ô thử nghiệm không bổ sung chế phẩm.

Đối với hàm lượng TP: Chất dinh dưỡng nitơ và phospho rất quan trọng đối với sự sinh trưởng và phát triển của VSV. Mỗi một cơ thể sinh vật nhất định có một nhu cầu dinh dưỡng về N, P. Trong điều kiện môi trường thừa hoặc thiếu N, P, sự sinh trưởng và phát triển của VSV đều có thể bị ảnh hưởng. Ngoài ra, phospho cũng là nguyên nhân chính gây ra bùng nổ tảo ở một số nguồn nước mặt, gây ra hiện tượng tái nhiễm bản và nước có màu, mùi khó chịu. Qua phân tích và đánh giá hiệu quả xử lý phospho bằng chế phẩm VSV chịu mặn cho kết quả cao. Sau 63 ngày, hiệu suất xử lý TP của các ô M1, M2, M3, M4 lần lượt là 27,54%; 21,74%; 15,94%; 11,59%. Qua đây cho thấy ô thử nghiệm bổ sung 5g và 10g chế phẩm xử lý TP tốt hơn so với ô bổ sung 1g chế phẩm và ô đối chứng.

Tương tự các chỉ số hóa học các chỉ số VSV trong bùn cũng biến động theo thời gian. Với mẫu không bổ sung chế phẩm và 1g chế phẩm mật độ VSV không có sự biến động nhiều theo thời gian. Còn đối với mẫu bổ sung 10g chế phẩm mật độ VSV đặc biệt 4 nhóm phân hủy xenluloza, tinh bột, protein, kitin tăng 0 – 28 ngày, sau đó bắt đầu giảm, còn với mẫu bổ sung 5g chế phẩm cũng tăng theo quy luật tương tự với mẫu 10g, nhưng

tốc độ chậm hơn. Quy luật của VSV trong mẫu có lượng chế phẩm bổ sung 5, 10g phù hợp với quy luật của COD, BOD,  $\text{NH}_4^+$  trong nước và TOC, TP, TN trong bùn. Qua đó cho thấy, VSV trong chế phẩm có khả năng tồn tại trong bùn đáy và xử lý nước trong mô hình thử nghiệm.

Nhận xét chung:

- Chế phẩm vi sinh chịu mặn có khả năng cải thiện chất lượng nước rất rõ rệt so không bổ sung chế phẩm, sau 63 ngày thử nghiệm COD, BOD,  $\text{NH}_4^+$  ở các mẫu có bổ sung chế phẩm đều đạt yêu cầu của QCVN 08:2015/BTNMT. Hiệu quả loại bỏ các chất ô nhiễm tăng khi liều lượng bổ sung chế phẩm tăng.
- Đối với việc xử lý bùn đáy thì mẫu có bổ sung chế phẩm cho hiệu quả xử lý TOC, TN, TP tốt hơn so với mẫu không bổ sung, sau 63 ngày: hiệu suất xử lý của các mẫu bổ sung 10g, 5g, 1g chế phẩm TOC tăng lần lượt 20,3%; 10,3%; 8,2%; TN tăng lần lượt 31,4%; 17,8%; 11,6%; TP tăng lần lượt 15,9%; 10,1%; 4,35 so với mẫu không bổ sung chế phẩm.

#### **Những hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích**

Quy trình theo giải pháp hữu ích đã tuyển chọn, kết hợp 3 chủng vi khuẩn chịu mặn để tạo ra chế phẩm vi sinh có khả năng phân hủy các hợp chất hữu cơ cao như xenluloza, tinh bột, protein, lipit để thúc đẩy quá trình phân hủy, làm sạch các chất ô nhiễm hữu cơ trong môi trường nước lợ hoặc nước mặn ở các thủy vực, như tại các âu thuyền ven biển, các đầm phá nuôi trồng thủy sản.

## YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh vật chịu mặn dùng để xử lý bùn đáy và nước bị ô nhiễm chất hữu cơ ở các vùng nước lợ và nước mặn bao gồm các bước:

### a. Nhân giống cấp 1

Chọn 3 chủng vi sinh vật chịu mặn trong bộ sưu tập giống vi sinh vật chịu mặn được lưu giữ tại phòng thí nghiệm Viện Công nghệ môi trường, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, bao gồm chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* DN1.3 sinh tổng hợp enzym xenlulaza, chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* TB10 sinh tổng hợp enzym amylaza và chủng *Sphingobacterium mizutaii* B8 sinh tổng hợp proteinaza;

Trước khi tiến hành nhân giống, 3 chủng vi khuẩn được tuyển chọn nêu trên được hoạt hóa bằng cách cấy truyền các chủng giống từ ống thạch sang các ống thạch mới chứa môi trường MPA + 3%NaCl và tiến hành nuôi trong tủ ấm ở nhiệt độ 30°C trong 24-48 giờ; Các chủng giống đã được hoạt hóa được nhân giống cấp 1 trên môi trường MPB có thành phần trong 1 lít môi trường bao gồm: cao thịt: 3g, pepton: 5g, NaCl: 30g, nước cất 1000ml; Mỗi chủng vi khuẩn được nhân giống trong các bình riêng rẽ, trong máy lắc ổn nhiệt ở nhiệt độ 30°C, với vận tốc lắc 200 vòng/phút, thời gian nuôi 24 giờ;

### b. Nhân giống cấp 2

Các chủng *Bacillus subtilis* DN1.3, *Bacillus amyloliquefaciens* TB10 và *Sphingobacterium mizutaii* B8 sau khi được nhân giống cấp 1 sẽ được tiến hành nhân giống cấp 2 riêng rẽ trên các môi trường đặc hiệu; trong đó:

- Chủng *Bacillus subtilis* DN1.3 được nhân giống cấp 2 trên môi trường MPB +3%NaCl + 2% bột xenluloza;

- Chủng *Bacillus amyloliquefaciens* TB10 được nhân giống cấp 2 trên môi trường MPB +3%NaCl + 2% tinh bột;

- Chủng *Sphingobacterium mizutaii* B8 được nhân giống cấp 2 trên môi trường MPB +3%NaCl + 2% bột casein + 2% dầu thực vật;

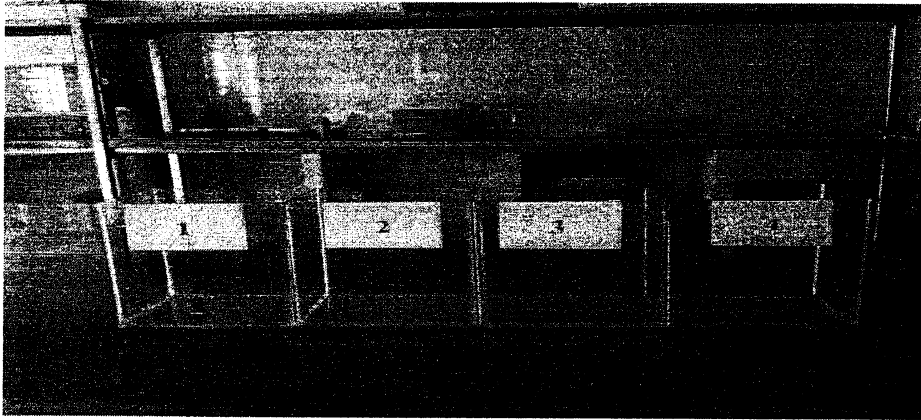
Trong đó, tỷ lệ bổ sung dịch giống cấp 1 là 5%; Điều kiện nuôi cấy là nhiệt độ 30°C, sục khí để đảm bảo lượng oxy hòa tan 90-95%, tốc độ khuấy 150 vòng/phút, điều

c. Tạo chế phẩm vi sinh vật

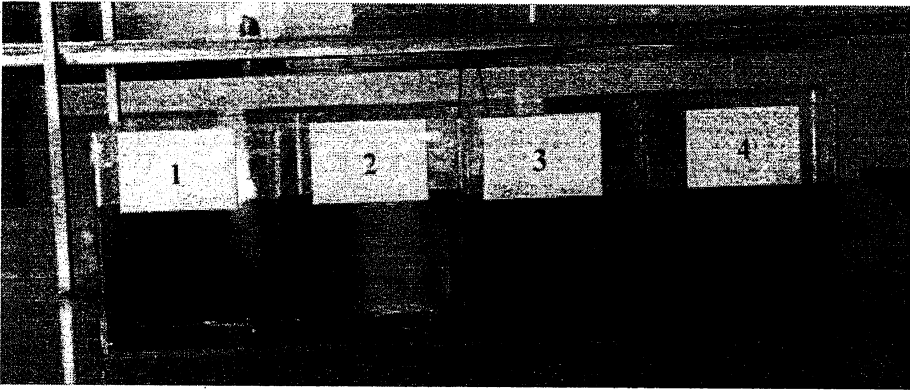
Chuẩn bị chất mang bao gồm các thành phần (% trọng lượng): cám gạo 10%, vỏ trấu 10%, than bùn 40%, và diatomit 40%; Các thành phần này được cho vào máy đảo trộn đều trước khi thanh trùng; Sau đó, chất mang được sấy khô ở 130°C trong 2 -3 giờ đến khi độ ẩm đạt 10%; Chất mang sau sấy được làm nguội đến nhiệt độ 30°C, bổ sung 10% dịch giống cấp 2 của 3 chủng vi khuẩn nêu trên đảo trộn đều rồi ép thành viên nén có đường kính 5-10cm.

2. Chế phẩm vi sinh chịu mặn dùng để xử lý bùn đáy và nước bị ô nhiễm chất thải hữu cơ ở các vùng nước lợ và nước mặn thu được bởi quy trình theo điểm 1, trong đó chế phẩm này bao gồm các thành phần: *Bacillus subtilis* DN1.3 phân giải tinh bột :  $\geq 10^8$  CFU/gam; *Bacillus amyloliquefaciens* TB10 phân giải xenluloza:  $\geq 10^8$  CFU/gam; *Sphingobacterium mizutaii* B8 phân giải protein, lipid:  $\geq 10^8$  CFU/gam; và chất mang bao gồm các thành phần (% trọng lượng): cám gạo 10%, vỏ trấu 10%, than bùn 40% và diatomit 40%.

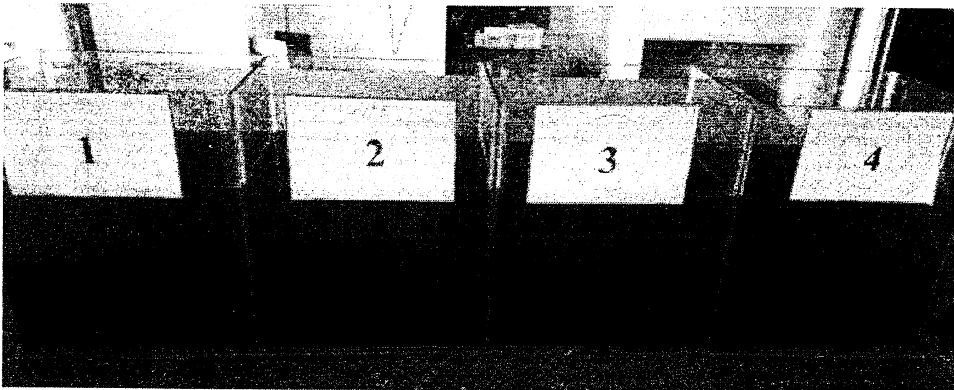
Hình 1.1



Hình 1.2

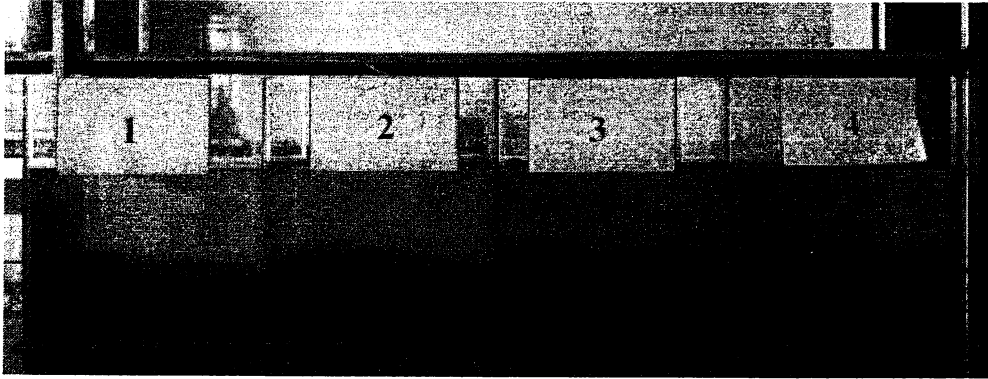


Hình 1.3

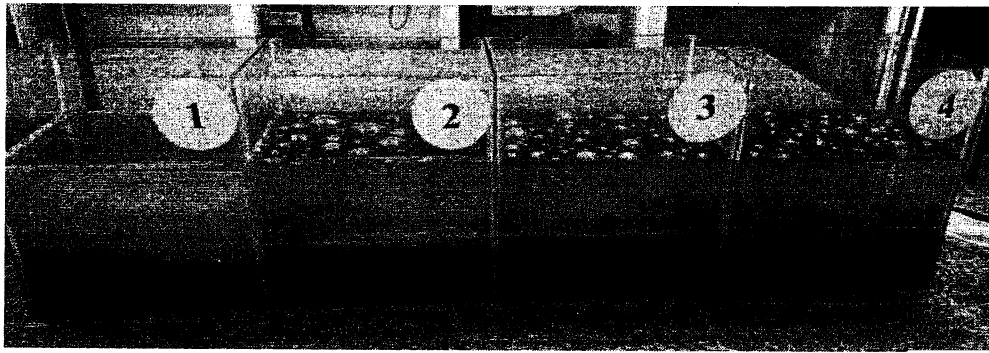




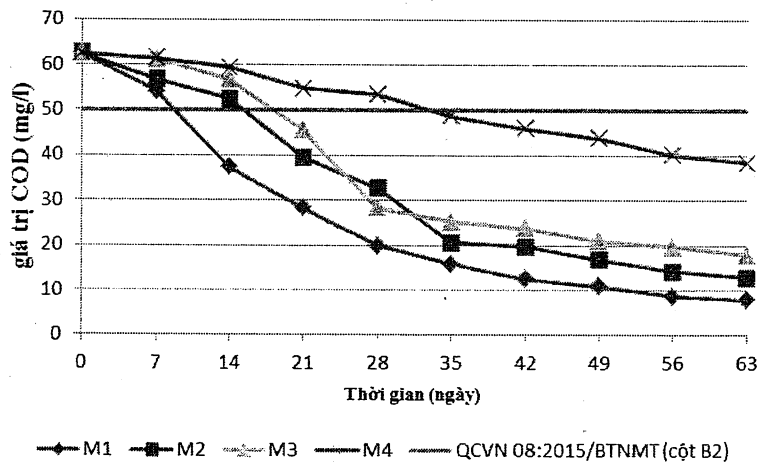
Hình 1.4



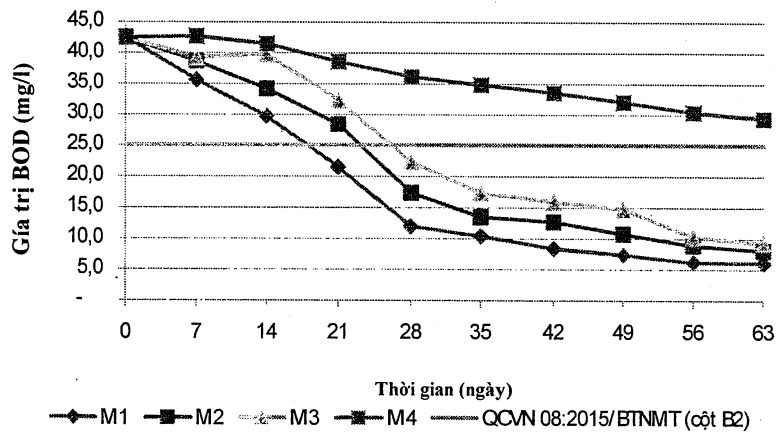
Hình 1.5



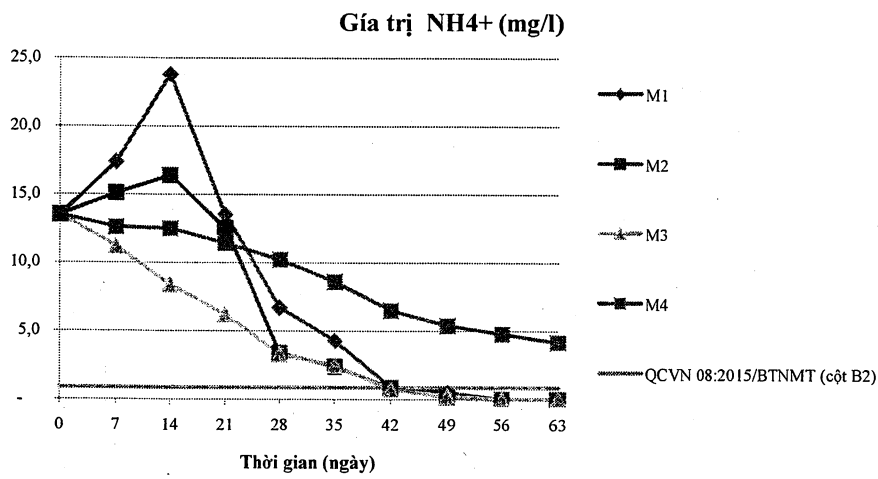
Hình 2.1



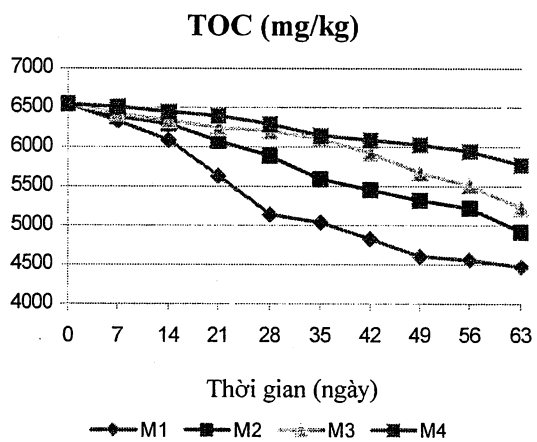
Hình 2.2



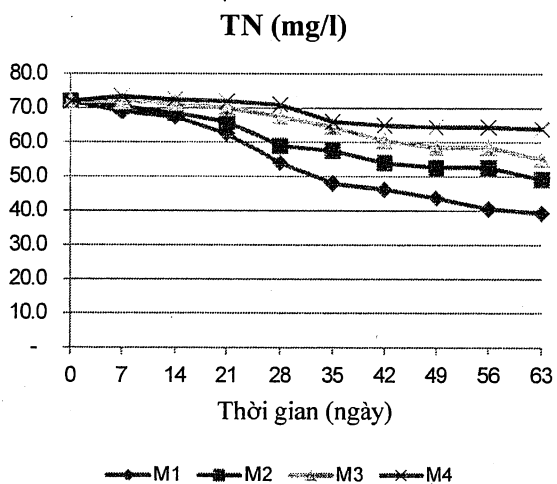
Hình 2.3



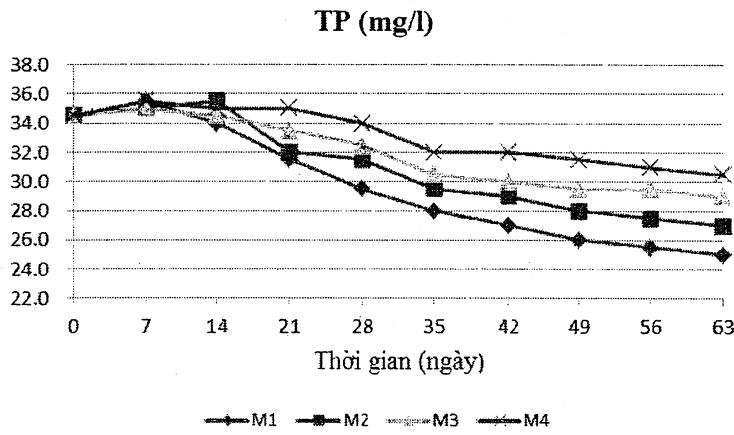
Hình 2.4



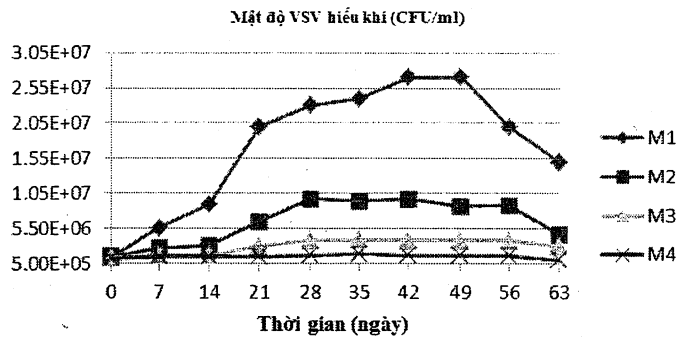
Hình 2.5



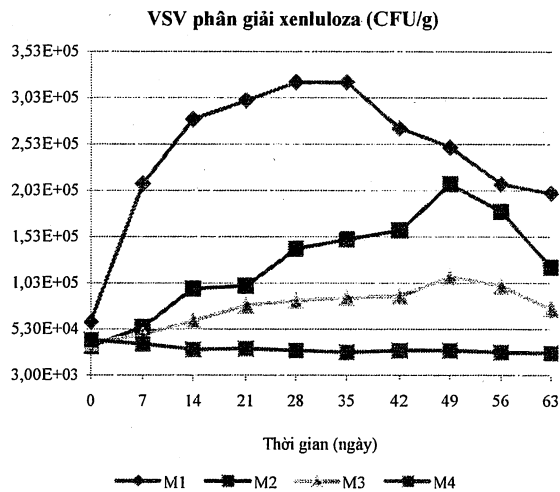
Hình 2.6



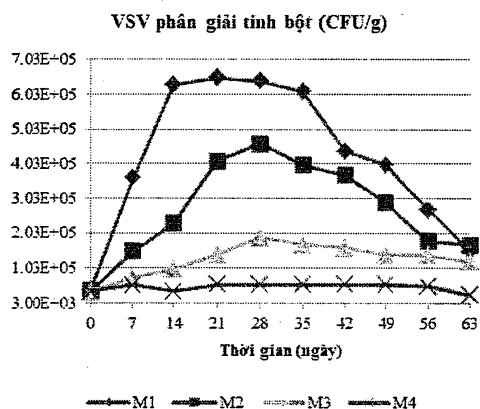
Hình 2.7



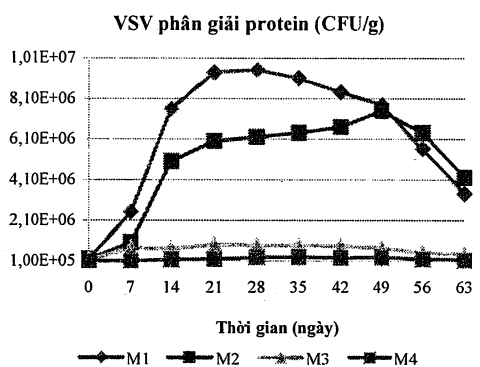
Hình 2.8



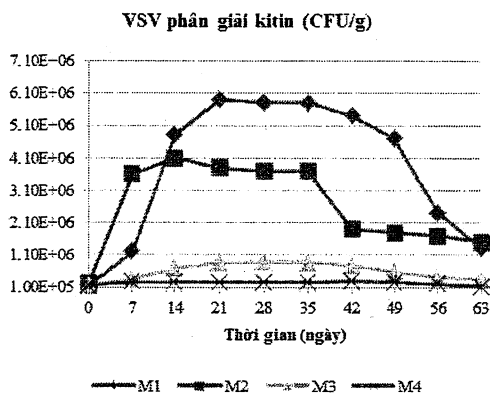
Hình 2.9



Hình 2.10



Hình 2.11



Hình 3

