



(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) 
2-0002027

(51)⁷ **C02F 3/00, 3/34**

(13) **Y**

(21) 2-2015-00368

(22) 24.11.2015

(45) 27.05.2019 374

(43) 26.06.2017 351

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

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

(72) Hoàng Phương Hà (VN), Đỗ Thị Tố Uyên (VN), Lê Thị Nhi Công (VN), Đỗ Thị Liên
(VN), Cung Thị Ngọc Mai (VN)

(54) **QUY TRÌNH SẢN XUẤT CHẾ PHẨM SINH HỌC DÙNG ĐỂ XỬ LÝ NƯỚC BỊ
NHIỄM AMONI VÀ CHẾ PHẨM THU ĐƯỢC TỪ QUY TRÌNH NÀY**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm sinh học dùng để xử lý nước bị nhiễm amoni và chế phẩm thu được từ quy trình này, trong đó chế phẩm sinh học này chứa hỗn hợp các chủng vi khuẩn oxy hóa amoni *Nitrosomonas eutropha* PD 58, *Nitrosomonaseuropaea* PD 60 và chủng vi khuẩn oxy hóa nitrit *Nitrobacter winogradski* 2NM, *Nitrobacter vulgaris* 5NM.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực xử lý ô nhiễm môi trường bằng công nghệ sinh học, cụ thể là đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm sinh học dùng để xử lý nước bị ô nhiễm amoni và chế phẩm thu được từ quy trình này.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Việt Nam có ngành nuôi trồng thủy sản đã và đang phát triển, nằm trong những nước xuất khẩu thủy sản lớn nhất thế giới, mang lại hiệu quả kinh tế cao. Tuy nhiên nghề nuôi trồng thủy sản ở nước ta cũng gặp không ít khó khăn bất cập trong quá trình nuôi con giống như quản lý môi trường ao nuôi, kỹ thuật, nguồn giống, v.v., nhưng đặc biệt ảnh hưởng lớn là tình hình dịch bệnh gây thiệt hại lớn đến nền kinh tế.

Nguyên nhân chính của tình hình dịch bệnh là do ô nhiễm môi trường bởi lượng thức ăn cho động vật nuôi dư thừa và chất thải của chúng, trong đó ô nhiễm các hợp chất nitơ vô cơ chiếm tới 30-40%. Trong NTTS, sự ô nhiễm amoni không cao như trong các loại nước thải nhưng dễ dẫn đến ấu trùng con giống bị ngộ độc, chỉ với hàm lượng 0,09 mg/l NH_3 đã làm giảm sự sinh trưởng của tôm càng xanh (*Macrobrachium rosenbergii*), ở hàm lượng 0,425 mg/l đã làm giảm 50% sự sinh trưởng của các loài tôm he. Đối với tôm sú hậu ấu trùng (*Penaeus monodon*) có tỷ lệ LC50/24 giờ là 5,71 mg/l NH_3 . Ô nhiễm amoni đồng nghĩa với việc ô nhiễm nitrit do chất này được hình thành từ các quá trình oxy hóa amoni và khử nitrat. Đây là hợp chất cực kỳ độc cho động vật thủy sinh đặc biệt là các ấu trùng nuôi, chỉ với hàm lượng nitrit vượt quá 0,3 mg/l sẽ ức chế sự vận chuyển oxy trong máu.

Chính vì vậy tại các cơ sở nuôi giống hải sản, việc sử dụng chế phẩm vi sinh vật trong xử lý nước bị ô nhiễm ngày càng phổ biến do lợi thế của chúng làm tăng cường khả năng phục hồi và thúc đẩy quá trình tự làm sạch trong các đầm, ao nuôi

tái sử dụng nước, cân bằng quần thể vi sinh vật trong nước, loại ngay những nguyên nhân ban đầu dẫn đến dịch bệnh, bên cạnh đó nó còn có tính ổn định cao và thân thiện với môi trường.

Hiện nay, đã có các giải pháp để làm giảm thiểu tình trạng ô nhiễm các hợp chất nitơ trong nuôi trồng hải sản như giải pháp tăng cường sinh học, giải pháp kích thích sinh học và giải pháp lọc sinh học. Trong đó, giải pháp tăng cường sinh học sử dụng các chế phẩm sinh học được coi là phù hợp hơn cả.

Tăng cường sinh học là giải pháp khi sử dụng đồng thời các vi khuẩn chuyển hóa nitơ như nhóm vi khuẩn oxy hóa amoni, vi khuẩn oxy hóa nitrit đã cho kết quả cao trong môi trường nuôi trồng thủy sản, làm giảm thiểu amoni, nitrit, các chất hữu cơ, ức chế sự phát triển của các loài *Vibrio* gây bệnh. Hiện nay trên thế giới, có rất nhiều chế phẩm sinh học cho giải pháp này đã được ứng dụng trong thực tế, các sản phẩm được sản xuất và thương mại hóa như chế phẩm sinh học với tên thương mại là TANOX (Total Amoni Nitrogen Oxidizer) của Achuthan và cộng sự (2006), trong đó giống vi sinh vật được phân lập từ trong các bể nuôi tôm, chế phẩm này được cố định vi khuẩn trên bột gỗ trong 72 giờ thì chế phẩm có hoạt lực nitrat hoá cao nhất. Shan và Obbard (2001) nghiên cứu quy trình bẫy vi khuẩn nitrat hoá vào đất sét nhằm tạo ra chế phẩm có hoạt lực phân giải amoni cao. Một số chế phẩm nitrat hóa dùng cho công nghệ tái sử dụng nước nuôi tôm đã có mặt trên thị trường dạng dịch như Novozymes Biological, Pond Protect-L. Một số sản phẩm thương mại của Dr Tim[®]- Aquatic như One and Only live Nitrifying bacteria, sản phẩm này dạng dịch được sử dụng để loại bỏ những hợp chất độc hại amoni và nitrit trong các bể nuôi cá; Bioclean Aqua chứa các vi khuẩn phân hủy amoni và photphát; chế phẩm FLO1100-50x của ALKEN Murray Corp; Microtack 221 của Baxel Co. Ltd, v.v.. Các chế phẩm sinh học này đã trở thành một giải pháp công nghệ thiết yếu trong quy trình nuôi tôm công nghiệp của nhiều nước trên thế giới.

Tại Việt Nam, hiện nay có nhiều loại chế phẩm sinh học khác nhau sử dụng trong nuôi trồng thủy sản được lưu hành trên thị trường, nhưng hầu hết các chế phẩm này đang được người tiêu dùng trong nước ưa chuộng có nguồn gốc nhập

ngoại. Chất lượng của chế phẩm chưa được kiểm chứng triệt để về mức độ an toàn, không có nguồn gốc rõ ràng của vi khuẩn, chế phẩm đôi khi không phù hợp với điều kiện ngoại cảnh của Việt Nam, giá thành lại cao.

Chế phẩm nitrat hóa: được hình thành dựa trên nguyên lý hoạt động của nhóm vi khuẩn nitrat hóa tham gia vào quá trình nitrat hóa. Nitrat hóa là quá trình mà amoni bị oxy hóa thành nitrit có sự tham gia của nhóm các vi khuẩn oxy hóa amoni, nitrit (được hình thành từ quá trình oxy hóa amoni) tiếp tục bị oxy hóa thành nitrat nhờ nhóm các vi khuẩn oxy hóa nitrit. Cả hai bước của quá trình nitrat hóa đều thực hiện trong điều kiện hiếu khí. Sơ đồ chuyển hóa nitơ của quá trình nitrat hóa như sau: $\text{NH}_4^+ + \text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_2^-$; $\text{NO}_2^- + \text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_3^-$

Nhóm các vi khuẩn nitrat hóa sau khi được lựa chọn sẽ được phối trộn với cơ chất và môi trường thích hợp để tạo chế phẩm sinh học, khi bổ sung chế phẩm vào môi trường nước, hệ vi khuẩn nitrat hoá sẽ tiến hành chuyển hoá amoni trong nước thành nitrit rồi tiếp tục tạo thành nitrat. Hệ vi khuẩn nitrat hóa có thể tồn tại ở trong đất và nước, đặc trưng của chúng là sống trong môi trường khoáng vô cơ và lấy năng lượng từ quá trình oxy hoá chuyên biệt amoni, nitrit. Vì vậy, các nhà khoa học xếp chúng vào nhóm khoáng vô cơ tự dưỡng (lithoautotrophic) (Bock et al., 1992).

Vi khuẩn oxy hóa amoni là nhóm các vi khuẩn hóa tự dưỡng hiếu khí bắt buộc, lấy năng lượng từ quá trình oxy hóa amoni thành nitrit, sử dụng nguồn cacbon chính là CO_2 trong khí quyển thông qua chu trình Calvin-Benson, thời gian sinh trưởng của vi khuẩn này chậm ít nhất từ 7-8 giờ, thậm chí kéo dài tới vài ngày. Cho đến nay, các nghiên cứu đã chứng minh nhóm các vi khuẩn oxy hóa amoni gồm 5 chi: *Nitrosomonas*, *Nitrosopira*, *Nitrosococcus*, *Nitrosolobus* và *Nitrosovibrio* (Koop et al, 2006).

Vi khuẩn oxy hóa nitrit là nhóm vi khuẩn oxy hóa nitrit thành nitrat có cơ chế sinh trưởng và sử dụng nguồn cacbon giống như nhóm vi khuẩn oxy hóa amoni, lấy năng lượng từ quá trình oxy hóa nitrit thành nitrat, chúng sinh trưởng chậm, thời gian nhân đôi tế bào từ 8-59 giờ thậm chí kéo dài tới 140 giờ. Các

ngiên cứu về sự phân loại của nhóm vi khuẩn cho thấy, chúng gồm 4 chi: *Nitrobacter*, *Nitrospina*, *Nitrococcus* và *Nitrospira* (Eva và Bock, 2005).

Nhóm vi khuẩn nitrat hóa sinh trưởng và có hoạt tính nitrat hóa tốt trong điều kiện hiếu khí, việc sử dụng chế phẩm nitrat hóa trong môi trường nuôi trồng thủy sản kết hợp với sục khí cho hiệu quả loại amoni tăng lên đáng kể; nhiệt độ $28^{\circ}\text{C}\pm 2$; pH từ 7-9; nguồn cacbon sử dụng thích hợp nhất là cacbonat và bicacbonat, chúng được cung cấp vào môi trường dưới dạng muối kiềm, các muối kiềm này ngoài việc cung cấp cho vi khuẩn nguồn cacbon, mà còn làm ổn định và duy trì pH môi trường do có sự sản sinh ra axit trong quá trình nitrat hóa.

Khả năng bám dính trên chất mang của nhóm vi khuẩn nitrat hóa: vi khuẩn nitrat hóa được biết có khuynh hướng tiết ra những polyme ngoại bào và dính vào chất mang. Khi chất mang có lớp lipopolysaccarit phủ bên ngoài thì sự bám dính được tốt hơn, nếu bề mặt chất mang không phù hợp, các vi sinh vật sẽ bị nước rửa trôi, những cụm tế bào hình thành gọi là zoogloes. Trong nguồn nước tự nhiên, vi khuẩn oxy hoá amoni thường liên kết với nhau thành từng cụm và nổi trên bề mặt hơn là ở dạng tự do. Diab và Shilo (1988) đã chứng minh vi khuẩn nitrat hóa có thể bám dính từ 70 - 95% lên một bề mặt mịn, trở sau 30 phút kể từ khi cho tiếp xúc. Do vậy chất mang là yếu tố thích hợp cho nhóm vi khuẩn này sinh trưởng.

Tác động tích cực của chất mang lên hoạt động sinh lý của hệ vi khuẩn nitrat hóa hiện vẫn còn chưa được giải thích rõ. Powell và Prosser (1986) đã ghi nhận, quá trình nitrat hóa ở trong đất, đá sẽ ít nhạy cảm hơn 10 lần so với quá trình nitrat hóa xảy ra trong nước nếu dùng cùng nitrapyrin làm chất ức chế. Abeliovich (1987) nhận thấy, số lượng tế bào của *Nitrosomonas* sp giảm nhanh trong điều kiện kỵ khí ở dịch tế bào tự do so với tế bào nằm trong lớp bùn, khả năng sống sót trong vài tháng. Diab và Shilo (1988) cũng chứng minh khả năng tồn tại mạnh mẽ của vi khuẩn nitrat hóa trong điều kiện cố định ở các chế độ kỵ khí và thiếu nguồn dinh dưỡng. Audic và cộng sự (1984) khám phá ra hoạt động hô hấp nitrat hóa của vi khuẩn cố định trong cột sẽ tăng đến 130% so với bình thường, và tốc độ nitrat hóa tăng rất mạnh trong giờ đầu tiên. Hoạt động nitrat hóa và khả năng sống sót sẽ rất

thấp nếu vi khuẩn ở dạng tự do, vì thế yêu cầu cố định là cần thiết, việc tạo ra những chất mang nhân tạo sẽ nhân hiệu quả của quá trình nitrat hoá tự nhiên lên rất cao.

Quá trình lên men của vi khuẩn: được dùng cho các quá trình mà trong đó các vi khuẩn được sinh trưởng bằng cách sử dụng các vật liệu không tan trong nước. Trong quá trình lên men xộp, nước là yếu tố thiết yếu nhưng độ ẩm không vượt quá hàm lượng bão hòa của cơ chất xộp. Ưu điểm của kỹ thuật lên men xộp là môi trường nuôi cấy đơn giản, lượng chất thải sinh ra ít hơn so với lên men dịch thể, enzym tạo ra từ quá trình lên men xộp ít nhạy cảm hơn với các chất kìm hãm hoặc ức chế trao đổi chất, thu hồi sản phẩm tốt hơn, không phải phá bọt. Quá trình lên men xộp sử dụng chất mang phù hợp cho vi khuẩn nitrat hóa bám dính. Một ưu điểm khác mang tính lợi thế là các cơ chất sử dụng cho lên men xộp luôn có sẵn và rẻ, được thu thập từ các phế phẩm công, nông nghiệp như: trấu gạo, cám gạo, bã mía, bã cà phê, bã nho, cùi dừa, tro trấu, v.v..

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích là khắc phục được các thiếu sót nêu trên của các chế phẩm sinh học đã biết. Để đạt được mục đích đó, giải pháp hữu ích đề xuất quy trình sản xuất chế phẩm sinh học dùng để xử lý nước bị nhiễm amoni và chế phẩm thu được từ quy trình này.

Theo một khía cạnh, giải pháp hữu ích đề xuất quy trình sản xuất chế phẩm sinh học dùng để xử lý nước bị nhiễm amoni, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

i) chuẩn bị môi trường khoáng cơ sở MA (Modified Alexander) và nền mang, trong đó: môi trường khoáng cơ sở được chuẩn bị bằng cách lấy các thành phần theo tỉ lệ: 2 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,5 g K_2HPO_4 , 0,5 g NaHCO_3 , 50 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2 mg $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 5 mg Fe-EDTA, 0,1 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,05 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,001 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,1 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 mM HEPES (pH 7,8) hòa trong một lít nước cất cho vi khuẩn oxy

hóa amoni, đối với vi khuẩn oxy hóa nitrit cũng sử dụng các thành phần môi trường như trên chỉ thay đổi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bằng NaNO_2 , và nền mang là tro trấu được nhiệt hóa từ trấu, sau đó tiến hành khử trùng môi trường và nền mang này ở 121°C trong thời gian 30 phút;

ii) hoạt hóa và nhân giống riêng rẽ các chủng vi khuẩn oxy hóa amoni *Nitrosomonas eutropha* PĐ 58, *Nitrosomonaseuropaea* PĐ 60 và chủng vi khuẩn oxy hóa nitrit *Nitrobacter winogradski* 2NM, *Nitrobacter vulgaris* 5NM; trong đó với mỗi chủng vi khuẩn sau khi được hoạt hóa, lấy một số khuẩn lạc riêng rẽ cấy vào bình chứa môi trường khoáng cơ sở nêu trên để nhân giống cấp 1, nuôi lắc ở 120 vòng/phút trong 3 ngày ở $28^\circ\text{C}\pm 2$, chuyển 10% canh môi trường nuôi giống cấp 1 vào bình chứa môi trường khoáng cơ sở mới rồi tiến hành nuôi như điều kiện của nhân giống cấp 1 để nhân giống cấp 2, phối trộn mỗi chủng vi khuẩn sau khi nhân giống cấp 2 theo tỉ lệ 1:1, sau đó lại phối trộn hai nhóm vi khuẩn này theo tỷ lệ 1:1;

iii) thu sinh khối: dịch nuôi cấy thu được ở bước ii) được ly tâm 5000 vòng/phút trong 10 phút thu được sinh khối, sinh khối này được rửa lại 2 lần bằng nước cất vô trùng, sau đó hòa tan sinh khối bằng môi trường khoáng cơ sở nêu trên sao cho mật độ tế bào trong dịch sinh khối thu được đạt 10^8CFU/ml ;

iv) chuẩn bị môi trường lên men xốp bằng cách phối trộn dịch sinh khối vi khuẩn: môi trường: nền mang theo tỉ lệ là 1:10:20 [v(ml): v(ml): w(g)];

v) lên men xốp trong 3 ngày ở nhiệt độ $28^\circ\text{C}\pm 2$; và

vi) sấy, kiểm tra mật độ tế bào và đóng gói.

Theo một khía cạnh khác, giải pháp hữu ích đề cập đến chế phẩm sinh học dùng để xử lý nước nhiễm amoni thu được từ quy trình nêu trên, trong đó chế phẩm này chứa hỗn hợp các chủng vi khuẩn oxy hóa amoni *Nitrosomonas eutropha* PĐ 58, *Nitrosomonaseuropaea* PĐ 60 và chủng vi khuẩn oxy hóa nitrit *Nitrobacter winogradski* 2NM, *Nitrobacter vulgaris* 5NM.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là sơ đồ khối quy trình sản xuất chế phẩm sinh học nitrat hóa để xử lý nước bị nhiễm amoni.

Fig.2 là các ảnh chụp chủng vi khuẩn nitrat hóa với đặc điểm hình thái khuẩn lạc, hình thái tế bào và khả năng tạo màng sinh học của chúng.

Fig.3 là sơ đồ nhân giống sinh khối vi khuẩn nitrat hóa.

Fig.4 là biểu đồ hoạt tính của chế phẩm trong môi trường muối NaCl.

Fig.5 là sơ đồ vị trí phân loại của 4 chủng vi khuẩn PĐ58; PĐ60; 2NM và 5NM.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Thuật ngữ “vi khuẩn nitrat” dùng để chỉ nhóm vi khuẩn tham gia vào quá trình oxy hóa amoni thành sản phẩm cuối cùng là nitrat thông qua sự hình thành nitrit

Thuật ngữ “chế phẩm sinh học” theo giải pháp hữu ích để xử lý nước bị ô nhiễm amoni đặc biệt là nước nuôi trồng thủy sản là chế phẩm chứa hỗn hợp các chủng vi khuẩn nitrat hóa là chủng vi khuẩn oxy hóa amoni *Nitrosomonas eutropha* PĐ 58, *Nitrosomonaseuropaea* PĐ 60 sẽ chuyển hóa amoni thành nitrit; và chủng vi khuẩn oxy hóa nitrit *Nitrobacter winogradski* 2NM, *Nitrobacter vulgaris* 5NM sẽ chuyển hóa nitrit thành nitrat. Do đó, khi bổ sung chế phẩm này vào môi trường nước bị ô nhiễm amoni, các vi khuẩn này sử dụng các hợp chất nitơ vô cơ gây ô nhiễm nước làm nguồn thức ăn, do vậy nguồn nước luôn được làm sạch. (Kiểm tra nước đạt quy chuẩn kỹ thuật Quốc gia theo QCVN 01-80:2011/BNNPTNT).

Giải pháp hữu ích đề xuất quy trình sản xuất chế phẩm sinh học sử dụng tro trấu là cơ chất cho quá trình lên men xộp cũng là một điểm hoàn toàn mới so với các chế phẩm khác trên thị trường dùng để xử lý nước bị ô nhiễm amoni. Quy trình sản xuất chế phẩm sinh học này bao gồm các bước sau:

i) Chuẩn bị môi trường và nền mang:

Môi trường: sử dụng môi trường khoáng cơ sở MA (Modified Alexander) với các thành phần (lấy theo tỷ lệ): 2 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,5 g K_2HPO_4 , 0,5 g NaHCO_3 , 50 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2 mg $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 5 mg Fe-EDTA, 0,1 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,05 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,001 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,1 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 mM HEPES (pH 7,8) trong một lit nước cất cho vi khuẩn oxy hóa amoni, đối với vi khuẩn oxy hóa nitrit cũng sử dụng các thành phần môi trường như trên chỉ thay đổi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bằng NaNO_2 . Môi trường được khử trùng ở 121°C trong 30 phút.

Nền mang: Trấu được nhiệt hóa tạo thành tro, để nguội sau đem khử trùng ở 121°C trong 30 phút.

ii) Hoạt hóa và nhân giống

Các chủng vi khuẩn oxy hóa amoni *Nitrosomonas eutropha* PĐ58, *Nitrosomonas europaea* PĐ60 và chủng vi khuẩn oxy hóa nitrit *Nitrobacter winogradski* 2NM, *Nitrobacter vulgaris* 5NM được phân lập từ nguồn thải của làng nghề chế biến thức ăn tại làng bún Phú Đô (Hà Nội) và Minh Khai (Hoài Đức, Hà Nội), các chủng vi khuẩn này đã được xác định vị trí phân loại bằng gen 16S DNAr với cặp mồi 16S (16Sf, 16Sr) có độ dài 1500 bp với trình tự: 16Sf 5'- AGA GTT TGA TCA TGG CTCA - 3' và 16Sr 5'- AAG GAG GTG ATC CAG CC - 3'. Các chủng vi khuẩn này đã được đăng ký trên GenBank (Ngân hàng gen) có mã số lần lượt là HM446363; HM446362; HM371092; HM446361. Các chủng vi khuẩn được nhân giống trong môi trường MA, trước tiên chúng được cấy ria trên đĩa thạch để hoạt hóa lại từng chủng. Với mỗi chủng vi khuẩn oxy hóa amoni: dùng que cấy lấy một số khuẩn lạc riêng rẽ cấy vào bình tam giác chứa môi trường khoáng cơ sở để nhân giống cấp 1, nuôi lắc ở 120 vòng/phút trong 3 ngày ở $28^\circ\text{C} \pm 2$. Sau đó, chuyển 10% canh trường nuôi giống cấp 1 vào bình tam giác chứa môi trường mới thích hợp và tiến hành nuôi như điều kiện của nhân giống cấp 1 để nhân giống cấp 2. Hai chủng vi khuẩn oxy hóa nitrit cũng được tiến hành tương tự. Tiến hành phối trộn hai chủng trong mỗi nhóm vi khuẩn sau khi nhân giống cấp 2 theo tỉ lệ 1:1, sau đó phối trộn hai nhóm vi khuẩn này theo tỷ lệ 1:1 và kiểm tra mật

độ tế bào bằng cách đo dịch huyền phù tế bào ở bước sóng 600 nm và phương pháp đếm tế bào (Fig.3).

Phương pháp xác định mật độ tế bào: trước tiên là pha loãng mẫu, lấy 1 ml dịch nuôi cấy cho vào 9 ml nước muối sinh lý, lúc này ta đã được nồng độ pha loãng là 10^{-2} . Sau đó, dùng pipet hút 1 ml mẫu từ độ pha loãng 10^{-2} cho vào ống nghiệm chứa 9 ml nước muối sinh lý 0,85%, khi đó ta sẽ được nồng độ pha loãng là 10^{-3} , hút tiếp 1 ml từ ống nghiệm 10^{-3} cho vào ống nghiệm chứa 9 ml nước muối sinh lý 0,85% ta sẽ được độ pha loãng 10^{-5} , tiếp tục như vậy đến nồng độ tới hạn. Mỗi một nồng độ tới hạn được cấy gặt trên môi trường thạch tương ứng, sau 5 ngày đếm số khuẩn lạc mọc trên đĩa thạch và xác định số lượng tế bào trong 1 ml sinh khối hoặc trong 1 g chất rắn theo công thức:
$$N \text{ (CFU/g hay CFU/ml)} = \frac{\sum C}{(n_1 v d_1 + \dots + n_i v d_i)}$$

Trong đó:

N: số tế bào vi khuẩn trong 1 g hay 1ml mẫu

C: tổng số khuẩn lạc đếm được trên các hộp petri đã chọn

n_1, n_i : số hộp petri cấy tại độ pha loãng thứ 1 và thứ i

d_i : hệ số pha loãng tương ứng

v : thể tích dịch mẫu (ml) cấy vào trong đĩa petri

iii) Thu sinh khối

Dịch nuôi cấy thu được ở bước ii) được ly tâm 5000 vòng/phút trong 10 phút để loại dịch và thu lại sinh khối, sinh khối này được rửa lại 2 lần bằng nước cất vô trùng, sau đó hòa tan sinh khối bằng môi trường khoáng cơ sở nêu trên sao cho độ đục của dịch sinh khối có $OD_{600} = 0,18$ tương đương với mật độ tế bào là 10^8 CFU/ml.

iv) Chuẩn bị môi trường lên men xốp

Chuẩn bị môi trường lên men xốp bằng cách phối trộn dịch sinh khối vi khuẩn: môi trường: nền mang theo tỉ lệ 1:10:20 [v(ml):v(ml):w(g)]. Ví dụ như, bổ sung 100 ml dịch vi khuẩn nitrat hóa với 1000 ml môi trường khoáng vô cơ và 2000 g chất mang.

v) Lên men xốp

Chuyển hỗn hợp đã được phối trộn này sang các khay inox, ví dụ có kích thước (40 x 30 x 5)cm và đặt vào tủ lên men, ví dụ có dung tích (5x1x1,5)m, bắt đầu lên men xốp, nhiệt độ lên men $28^{\circ}\text{C}\pm 2$, thời gian lên men 3 ngày sau đó thu hồi sản phẩm.

vi) Sấy, kiểm tra mật độ tế bào vi khuẩn nitrat hóa và đóng gói

Sản phẩm lên men được sấy trong tủ sấy (Ketong-Trung Quốc) ở 40°C cho đến khi sản phẩm có độ ẩm còn lại là 15-20%. Lúc này đã có chế phẩm nitrat hóa, chế phẩm tạo thành được kiểm tra mật độ tế bào và hoạt tính nitrat hóa của hai nhóm vi khuẩn oxy hóa amoni và oxy hóa nitrit trước khi đóng gói trong bao bì. Bao bì sử dụng để đóng gói chế phẩm là bao nhựa hoặc bao thiếc, chế phẩm nitrat hóa được sử dụng tại các đầm, ao nuôi hải sản công nghiệp, trong các hệ nuôi trồng hải sản tái sử dụng nước hoặc trong hệ thống xử lý nước thải bị ô nhiễm amoni. Thời gian bảo quản chế phẩm là 6 tháng.

Hoạt tính nitrat hóa được kiểm tra bằng cách xác định nồng độ amoni còn lại so với lượng ban đầu, lượng nitrit và nitrat tạo thành.

Định lượng amoni trong nước ngọt theo phương pháp Nessler:

Hàm lượng amoni trong mẫu nghiên cứu được xác định thông qua phản ứng màu vàng với thuốc thử Nessler, có khả năng hấp thụ ánh sáng ở bước sóng 420nm, cường độ màu tỉ lệ thuận với nồng độ NH_4^+ có trong dung dịch.

Thuốc thử Nessler: Pha 10g KI trong 10ml nước cất, thêm từ từ dung dịch HgCl_2 bão hòa đến khi xuất hiện kết tủa đỏ bền. Bổ sung 30 g KOH. Thêm 10ml dung dịch HgCl_2 bão hòa, thêm nước cất đến thể tích cuối cùng là 200ml. Để dung dịch trong chai tối màu qua đêm, sau đó lọc lấy phần dung dịch trong, bảo quản trong chai tối màu có nút nhám.

Tiến hành: 2ml dung dịch Nessler vào 25ml dung dịch mẫu nghiên cứu (hoặc pha loãng mẫu được với nồng độ thích hợp) và khuấy đều, để yên 15 phút. Sau đó định lượng amoni bằng cách đo độ hấp thụ ở A_{420} trên máy quang phổ kế.

Dụng đồ thị chuẩn biểu diễn sự tương quan giữa độ hấp thụ ánh sáng và nồng độ amoni từ dung dịch chuẩn N-NH_4 1 g/l (Sigma) với các nồng độ: 1; 2; 3; 4; 5; 6 mg/l. Dựa trên đồ thị chuẩn để xác định hàm lượng amoni trong mẫu.

Định lượng amoni trong nước lợ theo phương pháp Phenate:

Phương pháp xác định dựa trên nguyên tắc tạo phức hợp màu xanh đậm với thuốc thử phản ứng kết hợp giữa amoni, hypoclorit và natri nitroprusit.

Hóa chất: Dung dịch phenol: trộn 11,1 ml dung dịch phenol nóng (89%) với cồn 95% (v/v) đến thể tích cuối cùng là 100 ml; dung dịch muối nitroprusit 0,5% (w/v), đựng trong chai màu sẫm để tối đa 1 tháng; dung dịch kiềm xitrat: hoà 200g natri xitrat và 10g NaOH trong nước khử ion đến thể tích cuối cùng là 1 lit; dung dịch muối hypoclorit 5% (sản phẩm thương mại); dung dịch oxy hoá: trộn 100ml dung dịch kiềm xitrat với 25ml dung dịch muối hypoclorit, chuẩn bị hằng ngày; dung dịch chuẩn gốc N-NH_4 1 g/l.

Tiến hành: Hỗn hợp phản ứng chứa 1 ml dung dịch phenol, 1 ml dung dịch muối nitroprusit, 2,5 ml dung dịch oxy hoá. Phản ứng bắt đầu bằng việc bổ sung mẫu nghiên cứu chứa amoni, lắc đều. Phản ứng kết thúc ít nhất trong 1 giờ và đo độ hấp thụ A_{640} . Lượng amoni trong mẫu nghiên cứu tính được dựa vào đồ thị chuẩn sử dụng dung dịch chuẩn N-NH_4 1 g/l (Sigma).

Định lượng NO_2^- theo phương pháp Griss:

Hàm lượng NO_2^- được xác định dựa trên phản ứng tạo màu hồng của NO_2^- với thuốc thử Griss.

Thuốc thử: Griss I: Hoà tan 0,5 g axit sunfanilic vào 150 ml axit axetic 5N. Griss II: Hoà tan 0,5 g α -Naphtylamin vào 50ml nước cất, bổ sung 150 ml axit axetic 5N. Bảo quản trong tủ lạnh.

Tiến hành: Thêm 0,05 ml Griss I và 0,05ml Griss II vào 5 ml dung dịch mẫu nghiên cứu, sau 10 phút phản ứng kết thúc, đo độ hấp thụ ở A_{520} . Cường độ màu tỉ lệ thuận với nồng độ nitrit. Lượng nitrit có trong mẫu nghiên cứu tính được dựa vào đồ thị chuẩn sử dụng dung dịch N-NO_2 5mg/l

Định lượng NO_3 theo phương pháp Brucine:

Phương pháp này dựa trên nguyên tắc giữa phản ứng của nitrat và hợp chất brucin tạo thành phức hợp màu vàng có khả năng hấp thụ ánh sáng ở bước sóng 410 nm.

Hóa chất: Dung dịch nitrat chứa 100 mg N/l; muối asenit: hòa tan 0,5 g NaAsO_2 trong 100 ml nước cất; thuốc thử brucin: hòa tan 1g brucin-sunfat và 0,1g axit sulfanilic trong 70 ml nước cất nóng, thêm 3 ml axit HCl, làm lạnh và bổ sung nước cất đến thể tích cuối cùng là 100 ml; dung dịch axit sunfuric: bổ sung cẩn thận 500 ml axit H_2SO_4 trong 125 ml nước cất, làm lạnh ở nhiệt độ phòng; dung dịch NaCl: hòa tan 300 g NaCl trong 1000 ml nước cất.

Tiến hành: thêm lần lượt 2 ml dung dịch NaCl, 10 ml dung dịch H_2SO_4 vào cốc chịu nhiệt chứa 10 ml mẫu nghiên cứu (hoặc pha loãng mẫu đến 10 ml với nồng độ thích hợp chứa từ 0,1-8 mg N- NO_3), cốc được đặt trên giá ngâm trong bể nước lạnh, bổ sung 0,5 ml thuốc thử brucin, chuyển giá đựng cốc thí nghiệm lên bể nước nóng ở 95°C trong 20 phút, để nguội và đo độ hấp thụ ở A_{410} . Lượng nitrat trong mẫu nghiên cứu tính được khi đối chiếu với đồ thị chuẩn sử dụng dung dịch N- NO_3 1 mg/l.

Chế phẩm sinh học theo giải pháp hữu ích để xử lý nước bị ô nhiễm amoni đặc biệt là nước thải thủy sản thu được từ quy trình sản xuất nêu trên. Khi bổ sung chế phẩm vào môi trường bị ô nhiễm amoni, vi khuẩn nitrat hóa sẽ sử dụng các hợp chất nitơ vô cơ làm chất cho điện tử để chuyển hóa, lấy năng lượng cho sinh trưởng tế bào từ các quá trình chuyển hóa này và sử dụng bicacbonat làm nguồn cacbon, cụ thể nhóm vi khuẩn oxy hóa amoni sẽ chuyển hóa amoni thành nitrit, nitrit tạo thành sẽ được nhóm vi khuẩn oxy hóa nitrit chuyển hóa thành nitrat. Các vi khuẩn này sẽ bám dính trên chất mang của hệ thống hoặc trôi nổi theo dòng nước sử dụng các hợp chất nitơ vô cơ gây ô nhiễm này làm nguồn thức ăn, do vậy nguồn nước luôn được làm sạch.

Cụ thể, khi bổ sung 0,1-1 kg chế phẩm vào hệ thống nước nuôi trồng hải sản hoặc nước thải bị ô nhiễm amoni ($\approx 2-10$ mgN/L) có dung tích xử lý 20 m³. Sử dụng với liều lượng tăng tuyến tính đối với bể xử lý có dung tích lớn hơn. Chỉ sau 24-48 giờ hàm lượng amoni tính theo nitơ đã được chuyển hóa gần như hoàn toàn $\leq 0,05$ mg/L, đạt qui chuẩn kỹ thuật Quốc gia đối với cơ sở nuôi trồng thủy sản thương phẩm hay theo QCVN 01-80:2011/BNNPTNT (hàm lượng amoni tính theo nitơ ≤ 10 mg/L).

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1: Tạo 10 kg chế phẩm sinh học theo giải pháp hữu ích

Các chủng vi khuẩn oxy hóa amoni *Nitrosomonas eutropha* PĐ 58, *Nitrosomonaseuropaea* PĐ 60 và chủng vi khuẩn oxy hóa nitrit *Nitrobacter winogradski* 2NM, *Nitrobacter vulgaris* 5NM được cấy ria trên đĩa thạch để hoạt hóa lại chủng, dùng que cấy lấy một số khuẩn lạc riêng rẽ cấy vào bình tam giác chứa 10 ml môi trường khoáng cơ sở, mỗi chủng vi khuẩn cần 2 bình, được 20 ml mỗi chủng, nuôi lắc ở 120 vòng/phút trong 3 ngày ở 28°C±2 (nhân giống cấp 1). Chuyển 10% canh trường nuôi giống cấp 1 vào bình tam giác 500 ml chứa 250 ml môi trường mới thích hợp cho mỗi loại vi khuẩn và tiến hành nuôi như điều kiện của nhân giống cấp 1, mỗi chủng vi khuẩn nhân nuôi được 250ml (nhân giống cấp 2). Như vậy, nhóm vi khuẩn oxy hóa amoni có 500 ml, nhóm vi khuẩn oxy hóa nitrit có 500 ml, tổng số lượng sinh khối cho cả 2 nhóm là 1 lit. Sử dụng 0,4 lit sinh khối (có mật độ tế bào 10⁸CFU/ml tương đương với OD₆₀₀ = 0,18), 4 lit môi trường khoáng cơ sở và 8 kg tro trấu, trộn đều với nhau, chuyển sang các khay inox rồi tiến hành lên men ở 28°C±2 trong 3 ngày. Sản phẩm được sấy trong tủ sấy ở nhiệt độ 40°C đến độ ẩm 15% -20%, sản phẩm tạo thành là 10 kg chế phẩm nitrat hóa, chế phẩm đạt yêu cầu khi mật độ tế bào vi khuẩn đạt 10⁸ CFU/g và có hoạt tính nitrat hóa.

Ví dụ 2: Xác định mật độ vi khuẩn và hoạt tính nitrat hóa của chế phẩm trong môi trường nước lợ

Chế phẩm nitrat hóa chứa nhóm vi khuẩn chuyển hóa nitơ, rất cần thiết cho quá trình chuyển hóa các hợp chất chứa nitơ vô cơ trong nước nuôi trồng thủy sản. Do vậy nhóm các vi khuẩn chuyển hóa nitơ này phải sinh trưởng được và có hoạt tính nitrat hóa trong môi trường nước lợ.

Bảng 1. Mật độ tế bào vi khuẩn của chế phẩm trong môi trường chứa muối NaCl

Nồng độ muối NaCl (‰)	Vi khuẩn oxy hóa amoni (CFU/g)	Vi khuẩn oxy hóa nitrit (CFU/g)
0 ‰	2×10^8	7×10^8
10 ‰	4×10^8	8×10^8
20 ‰	3×10^8	2×10^8
30 ‰	8×10^8	6×10^8
40 ‰	3×10^8	2×10^8

Kết quả đã thể hiện nhóm vi khuẩn nitrat hóa sinh trưởng tốt trên môi trường chứa muối NaCl tới nồng độ 40‰. Bên cạnh đó hoạt tính của nhóm vi khuẩn này trong môi trường chứa muối cũng được xác định (Fig.4), hàm lượng amoni ban đầu đưa vào môi trường nuôi là 10 mg N/L, sau 5 ngày theo dõi lượng amoni đã chuyển hóa tới 85%, như vậy các chủng vi khuẩn nitrat hóa này không những sinh trưởng tốt trong môi trường nước lợ mà hoạt tính nitrat hóa của chúng cũng thể hiện rất tốt ngay ở tất cả các nồng độ NaCl từ 0 – 40‰.

Ví dụ 3: Xử lý 1000 lit nước bị ô nhiễm amoni bằng chế phẩm sinh học theo giải pháp hữu ích

Sử dụng 5-50 g chế phẩm nitrat hóa rắc đều trên 1000 lit nước bị ô nhiễm amoni (mức độ ô nhiễm từ 2 – 10 mg N-NH₄/L), cứ sau 24 giờ mẫu được lấy để xác định hàm lượng amoni, nitrit theo phương pháp Phenate và Griss tương ứng. Kết quả cho thấy, chỉ sau 48 giờ cả hai thành phần amoni và nitrit trong mẫu nước bị ô nhiễm amoni đã được chuyển hóa gần như hoàn toàn, hàm lượng amoni chỉ còn 0,05 mgN/L. Khi dùng chế phẩm nitrat hóa này đối với nước nuôi trồng thủy

sản thì cứ sau 4 – 6 ngày sẽ bổ sung một lượng từ 5 – 50 g cho khoảng 1000 lit nước nuôi chứa hàm lượng amoni từ 2 – 10 mg N/L, nước nuôi hải sản sẽ không còn bị ô nhiễm các hợp chất nitơ vô cơ (amoni và nitrit).

Ví dụ 4: Đánh giá khả năng xử lý nước bị ô nhiễm amoni bằng chế phẩm sinh học theo giải pháp hữu ích

Chế phẩm sinh học có nền chất mang là trấu đã được nhiệt hóa và sinh khối các chủng vi khuẩn nitrat hóa (*Nitrosomonas eutropha* PĐ 58, *Nitrosomonas europaea* PĐ 60; *Nitrobacter winogradski* 2NM, *Nitrobacter vulgaris* 5NM) ở dạng dịch, để xử lý nước thải chế biến bún lại làng bún Phú Đô (Hà Nội) có hàm lượng amoni ban đầu là 65 mg N-NH₄/L. Hàm lượng chế phẩm đưa vào hệ lọc là 10g/L; dịch sinh khối vi khuẩn là 10%; hệ lọc có dung tích 10 lit có chứa 20% mút xốp, tốc độ dòng chảy của nước thải Phú Đô qua hệ lọc là 0,5 L/giờ. Kết quả chỉ ra ở bảng 2.

Bảng 2. Hiệu quả xử lý amoni trong nước thải Phú Đô của chế phẩm nghiên cứu và dịch sinh khối vi khuẩn nitrat hóa

Thời gian (giờ)	NH ₄ -N còn lại (mg/L)		NO ₂ -N tạo thành (mg/L)		NO ₂ -N tạo thành (mg/L)	
	Chế phẩm sinh học (tro trấu)	Dịch sinh khối vi khuẩn	Chế phẩm sinh học (tro trấu)	Dịch sinh khối vi khuẩn	Chế phẩm sinh học (tro trấu)	Dịch sinh khối vi khuẩn
0	65	65	0,06	0,06	0,02	0,02
1	2,34	32	1,55	10	59	20
2	0,65	29	2,0	11	60,5	22
3	0,63	28	2,58	10,5	60	23
4	0,60	27	2,45	11	60	24
5	0,60	27	2,55	10	59	25

6	0,57	25	2,36	11	61	25
7	0,59	25.5	2,45	10,5	60	26
8	0,55	25	2,56	11	61	25

Hàm lượng amoni của nước thải làng bún Phú Đô được xác định ban đầu là 65 mg/l, nhưng sau khi qua hệ lọc (bổ sung chế phẩm trên nền cơ chất là trấu được nhiệt hóa) chỉ sau một giờ hoạt động, hệ lọc đã loại bỏ được 96,4 % lượng amoni ban đầu, từ giờ thứ hai trở đi khả năng loại bỏ amoni lên tới 99% và khả năng loại bỏ amoni này duy trì trong suốt 8 giờ thí nghiệm. Lượng nitrit được kiểm tra tại cùng thời điểm là rất ít (khoảng hơn 2 mg/l N-NO₂⁻) trong khi nitrat hình thành trung bình lên đến 60 mg/l N-NO₃⁻. Điều này cho thấy hệ lọc đã xử lý gần như hoàn toàn amoni có trong nước thải với nồng độ amoni khá cao (trên 60 mg/l N-NH₄⁺). Trong khi đó hệ lọc chỉ bổ sung dịch sinh khối vi khuẩn thì hiệu quả xử lý amoni trung bình trong 8 giờ chỉ đạt 58%.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Chế phẩm sinh học theo giải pháp hữu ích thu được từ quy trình sản xuất chế phẩm theo giải pháp hữu ích là một chế phẩm an toàn sinh học, có hiệu quả cao trong việc làm sạch môi trường nước bị ô nhiễm amoni đặc biệt là nước nuôi trồng hải sản, chế phẩm được sử dụng trực tiếp tại các đầm, ao nuôi tôm cá công nghiệp và rất hữu hiệu trong các công nghệ tái sử dụng nước nuôi trồng hải sản không cần thay nước.

Quy trình theo giải pháp hữu ích đơn giản, dễ thực hiện và phù hợp với các điều kiện thực tế, có thể ứng dụng trong các công nghệ xử lý ô nhiễm amoni tại một số khu vực nuôi trồng thủy sản ở Việt Nam.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất chế phẩm sinh học dùng để xử lý nước bị nhiễm amoni, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

i) chuẩn bị môi trường khoáng cơ sở MA (Modified Alexander) và nền mang, trong đó:

môi trường khoáng cơ sở được chuẩn bị bằng cách lấy các thành phần theo tỉ lệ: 2 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,5 g K_2HPO_4 , 0,5 g NaHCO_3 , 50 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2 mg $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 5 mg Fe-EDTA, 0,1 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,05 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,001 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,1 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 mM HEPES (pH 7,8) hòa trong một lít nước cất cho vi khuẩn oxy hóa amoni, đối với vi khuẩn oxy hóa nitrit cũng sử dụng các thành phần môi trường như trên chỉ thay đổi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bằng NaNO_2 , và

nền mang là tro trấu được nhiệt hóa từ trấu,

sau đó tiến hành khử trùng môi trường và nền mang này ở 121°C trong thời gian 30 phút;

ii) hoạt hóa và nhân giống riêng rẽ các chủng vi khuẩn oxy hóa amoni *Nitrosomonas eutropha* PD 58, *Nitrosomonas europaea* PD 60 và chủng vi khuẩn oxy hóa nitrit *Nitrobacter winogradski* 2NM, *Nitrobacter vulgaris* 5NM, trong đó đối với mỗi chủng vi khuẩn sau khi được hoạt hóa, lấy một số khuẩn lạc riêng rẽ cấy vào bình chứa môi trường khoáng cơ sở nêu trên để nhân giống cấp 1, nuôi lắc ở 120 vòng/phút trong 3 ngày ở $28^\circ\text{C} \pm 2$, chuyển 10% canh môi trường nuôi giống cấp 1 vào bình chứa môi trường khoáng cơ sở mới rồi tiến hành nuôi như điều kiện của nhân giống cấp 1 để nhân giống cấp 2, phối trộn mỗi chủng vi khuẩn sau khi nhân giống cấp 2 theo tỉ lệ 1:1, sau đó lại phối trộn hai nhóm vi khuẩn này theo tỉ lệ 1:1;

iii) thu sinh khối: dịch nuôi cấy thu được ở bước ii) được ly tâm 5000 vòng/phút trong 10 phút để loại dịch và thu sinh khối, sinh khối này được rửa lại 2

lần bằng nước cất vô trùng, sau đó hòa tan sinh khối bằng môi trường khoáng cơ sở nêu trên sao cho mật độ tế bào trong dịch sinh khối thu được đạt 10^8 CFU/ml;

iv) chuẩn bị môi trường lên men xộp bằng cách phối trộn dịch sinh khối vi khuẩn: môi trường: nền mang theo tỉ lệ là 1:10:20 [v(ml): v(ml): w(g)];

v) lên men xộp trong 3 ngày ở nhiệt độ $28^{\circ}\text{C}\pm 2$; và

vi) sấy, kiểm tra mật độ tế bào và đóng gói.

2. Chế phẩm sinh học dùng để xử lý nước nhiễm amoni thu được từ quy trình theo điểm 1, trong đó chế phẩm này chứa hỗn hợp các chủng vi khuẩn oxy hóa amoni *Nitrosomonas eutropha* PĐ 58, *Nitrosomonas europaea* PĐ 60 và chủng vi khuẩn oxy hóa nitrit *Nitrobacter winogradski* 2NM, *Nitrobacter vulgaris* 5NM.

Fig.1

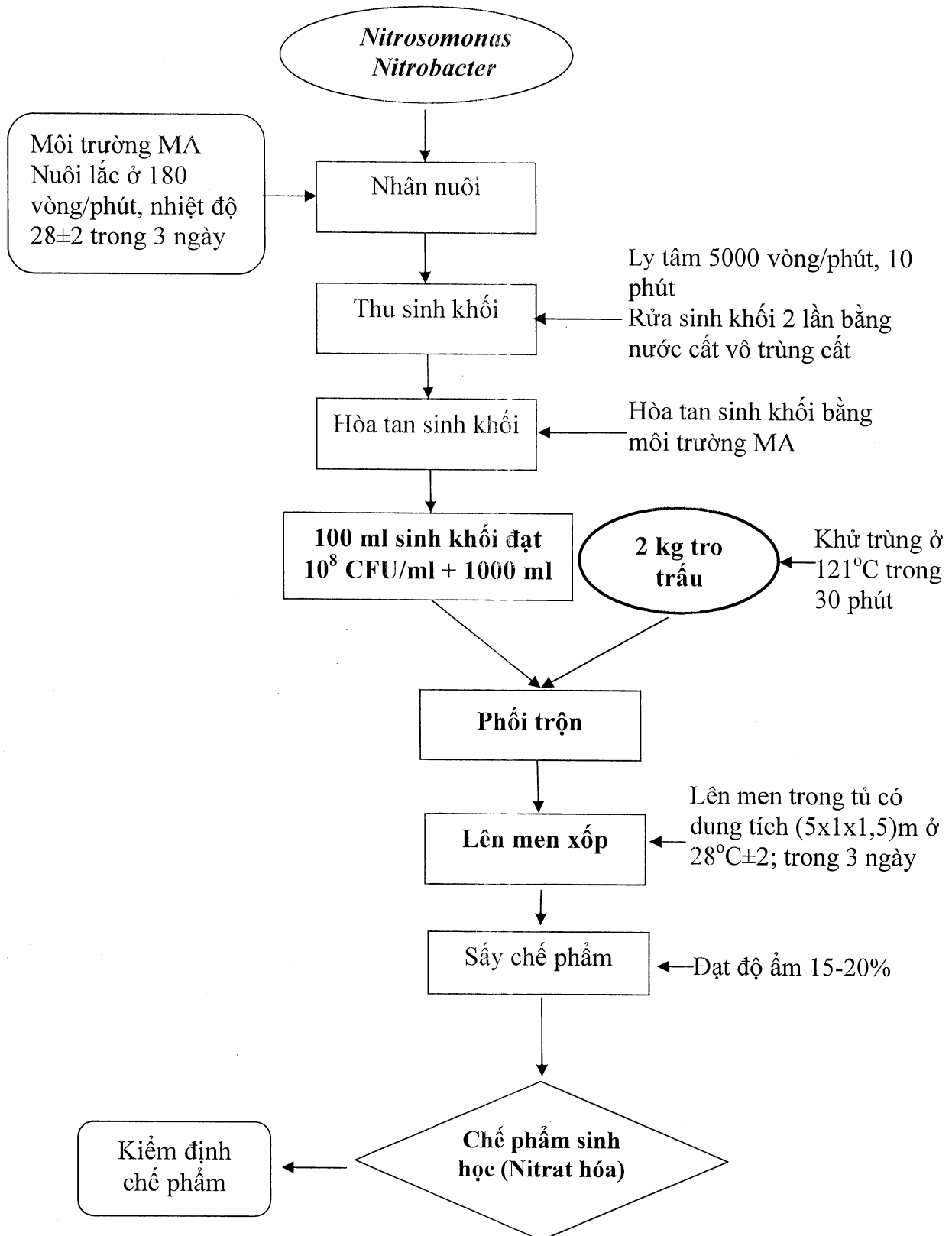
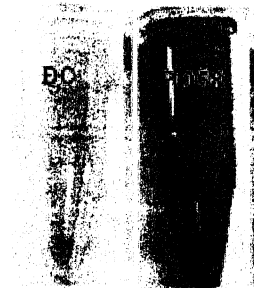
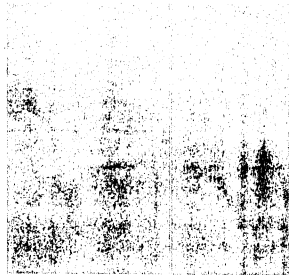


Fig.2

Chủng khuẩn	vi khuẩn	Đặc điểm hình thái khuẩn lạc vi khuẩn	Hình thái tế bào vi khuẩn	Khả năng tạo màng sinh học
----------------	-------------	--	------------------------------	-------------------------------

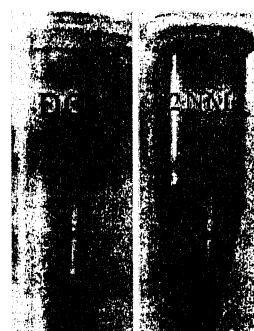
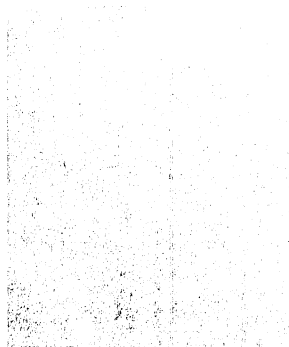
*Nitrosomonas
eutropha* PD58



*Nitrosomonas
uropaea* PD60



*Nitrobacter
winogradski*
2NM



*Nitrobacter
vulgaris* 5NM

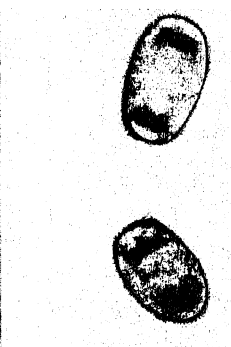


Fig.3

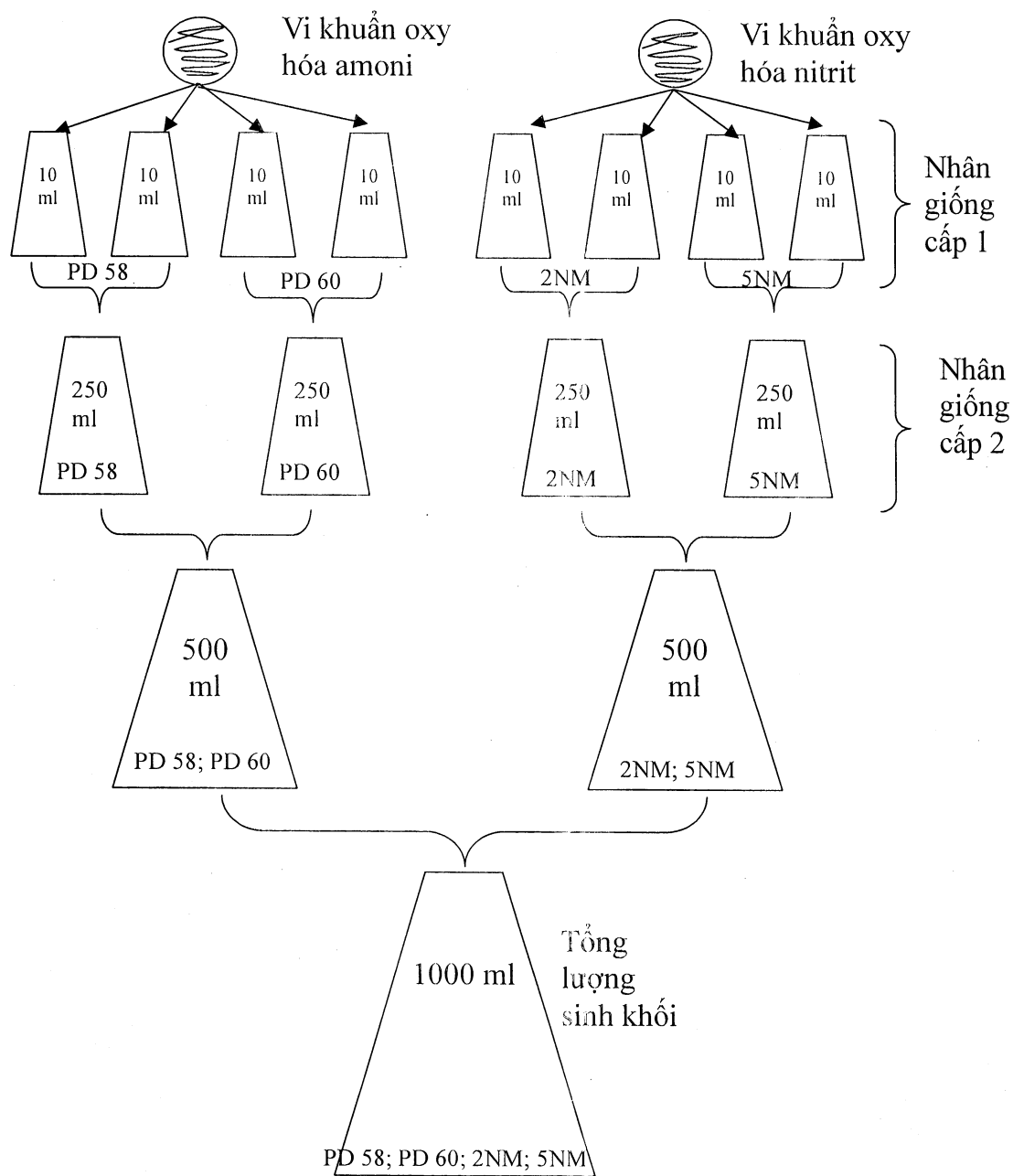


Fig.4

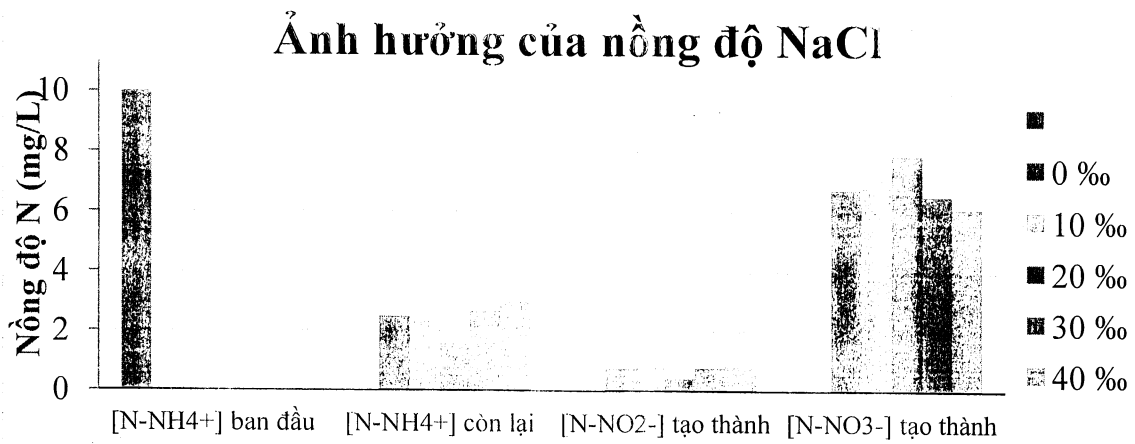


Fig.5

