

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Nguyễn Thị Minh

**NGHIÊN CỨU CHẾ TẠO VẬT LIỆU XÓP TÍCH HỢP
VI SINH VẬT VÀ MANG HẠT QUANG XÚC TÁC
NHẪM XỬ LÝ MÔI TRƯỜNG NƯỚC NUÔI TÔM**

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC ỨNG DỤNG

Ngành: Công nghệ sinh học

Mã số: 9 42 02 01

Hà Nội - 2025

Công trình được hoàn thành tại: Học viện Khoa học và Công nghệ,
Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Người hướng dẫn khoa học:

1. Người hướng dẫn 1: TS. Hoàng Phương Hà, Viện Sinh học,
Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam
2. Người hướng dẫn 2: PGS.TS. Hà Phương Thư, Viện Khoa học
Vật liệu, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Phản biện 1: PGS.TS. Đào Văn Dương, Trường Kỹ thuật Phenikaa,
Đại học Phenikaa

Phản biện 2: TS. Nguyễn Kim Thoa, Viện Sinh học, Viện Hàn lâm
Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Phản biện 3: PGS.TS. Đỗ Khắc Uẩn, Trường Hóa và Khoa học sự
sống, Đại học Bách Khoa Hà Nội

Luận án được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp
Học viện họp tại Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm
Khoa học và Công nghệ Việt Nam vào hồi giờ,
ngày tháng năm

Có thể tìm hiểu luận án tại:

1. Thư viện Học viện Khoa học và Công nghệ
2. Thư viện Quốc gia Việt Nam

DANH MỤC CÁC BÀI BÁO ĐÃ XUẤT BẢN LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. **Nguyễn Thị Minh**, Hà Phương Thu, Lê Thị Thu Hương, Phan Kế Sơn, Lê Thị Nhi Công, Mai Thị Thu Trang, Hoàng Phương Hà (2022). “*Modification of expanded clay carrier for enhancing the immobilization and nitrogen removal capacity of nitrifying and denitrifying bacteria in the aquaculture system*”. Journal of Bioscience and Bioengineering, 134(1): 41-47. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2022.04.006.

2. Hoàng Phương Hà, **Nguyễn Thị Minh**, Lê Thị Nhi Công, Phan Kế Sơn, Mai Thị Thu Trang, Hà Phương Thu (2022). “*Characterization of isolated aerobic denitrifying bacteria and their potential use in the treatment of ni-trogen polluted aquaculture water*”. Current microbiology, 79(7): 209. DOI: 10.1007/s00284-022-02898-2.

3. Hoàng Phương Hà, **Nguyễn Thị Minh**, Phan Kế Sơn, Bùi Hương Giang, Lê Thị Thu Hương, Chu Nhật Huy, Hồ Ngọc Anh, Phạm Quang Huy, Trần Xuân Khôi, Hà Phương Thu (2024). “*Multilayer immobilizing of denitrifying Bacillus sp. and TiO₂-AgNPs on floating expanded clay carrier for co-treatment of nitrite and pathogens in aquaculture water*”. RSC advance 14: 1984-1994. DOI: 10.1039/d3ra07361k.

4. **Nguyễn Thị Minh**, Hà Phương Thu, Lê Thị Thu Hương, Bùi Hương Giang, Phan Kế Sơn, Chu Nhật Huy, Mai Thị Thu Trang, Ứng Thị Diệu Thúy, Lê Thị Ánh Tuyết, Hoàng Phương Hà (2025). “*A floatable TiO₂-Ag photocatalyst enables effective antibiotic degradation and pathogen growth control*”. RSC advance, 15: 18324–18337. DOI: 10.1039/d5ra02333e.

I. GIỚI THIỆU LUẬN ÁN

1. Tính cấp thiết của đề tài

Trong thực tế sản xuất, hoạt động nuôi thủy sản thường gặp phải nhiều nguyên nhân ô nhiễm có mối quan hệ tương quan lẫn nhau như: i) mật độ nuôi thả cao, sử dụng lượng lớn thức ăn công nghiệp giàu dinh dưỡng trong khi hệ số chuyển hóa thức ăn thấp sẽ gây nên tình trạng dư thừa và ô nhiễm hợp chất hữu cơ; ii) sự phân hủy hữu cơ này tạo nên các hợp chất nitơ vô cơ độc hại như amoni, nitrit; iii) sự xuất hiện của các hợp chất ô nhiễm trên làm chất lượng nước suy giảm, đây là cơ hội cho sự gia tăng mật độ của các nhóm vi khuẩn gây bệnh; iv) kháng sinh tổng hợp bị lạm dụng nhiều trong phòng và trị bệnh nhiễm khuẩn dẫn đến tình trạng tồn dư trong thực phẩm và nguồn nước. Do vậy, cần có các biện pháp xử lý đồng bộ để đảm bảo chất lượng và năng suất vụ nuôi.

Vật liệu quang xúc tác TiO_2 đã được nghiên cứu cho thấy tiềm năng trong việc xử lý ô nhiễm hữu cơ và ức chế vi khuẩn gây bệnh một cách hiệu quả nhờ đặc tính oxy hóa rất mạnh. Khi được chiếu sáng bởi tia cực tím ($\lambda \leq 400 \text{ nm}$), vật liệu này tạo ra các gốc oxy hóa tự do (ROS) phân hủy chất hữu cơ có cấu trúc phức tạp thành phân tử nước, carbon dioxit và một số ion vô cơ đơn giản khác, do đó giải quyết được một số nhược điểm của các quy trình xử lý thông thường. Gốc ROS cũng gây ra các tổn thương cho tế bào vi khuẩn gây bệnh, làm giảm nhanh mật độ của chúng trong môi trường. Việc sử dụng nano TiO_2 dưới dạng bột trong xử lý nước ô nhiễm đem lại hiệu quả cao, nhưng ứng dụng nó ở quy mô lớn còn gặp nhiều trở ngại do sự phân tách xúc tác này phức tạp, tốn nhiều thời gian và chi phí cao, đặc biệt nó có thể lắng đọng dưới đáy ao/hồ gây ô nhiễm thứ cấp. Như đã biết, tia cực tím chỉ chiếm khoảng 5% ánh sáng mặt trời, nhỏ hơn nhiều so với tỷ lệ của ánh sáng khả kiến với bước sóng $400 \leq \lambda \leq 780 \text{ nm}$ (chiếm 45%). Để giải quyết vấn đề này, TiO_2 được biến đổi với nano Ag - một vật liệu thường được ứng dụng trong kháng khuẩn và thể hiện khả năng hấp thụ ánh sáng tốt trong khoảng 400–500 nm, từ đó tạo thành vật liệu nano

$\text{TiO}_2\text{-Ag}$ có khả năng hấp thụ ánh sáng khả kiến và tăng hiệu quả diệt khuẩn; đồng thời để tránh sự lắng đọng các hợp chất nano này, $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ được đề xuất cố định trên vật liệu (sử dụng như một chất mang) thích hợp để có thể dễ dàng tách loại khỏi môi trường. Mặc dù một số nghiên cứu đã cho thấy, $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ có thể phân hủy nhiều loại hợp chất ô nhiễm khác nhau kể cả amoni và nitrit, nhưng trong nước nuôi thủy sản pH thường dao động trong khoảng 7,8 – 8,5 thì hai hợp chất nitơ vô cơ này tồn tại chủ yếu ở dạng NH_4^+ và HNO_2 , nên khó hấp thụ lên bề mặt mang điện dương của $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ do lực đẩy tĩnh điện. Bởi vậy, cần có kết hợp của các phương pháp và công nghệ phù hợp để xử lý toàn diện những vấn đề ô nhiễm trong nuôi thủy sản.

Đối với tình trạng ô nhiễm nitơ, các quá trình oxi hóa, khử tự nhiên có thể được thực hiện bởi nhóm vi khuẩn nitrat hóa và khử nitrat. Trong đó, amoni được chuyển hóa thành nitrit và nitrat nhờ vi khuẩn oxi hóa amoni và vi khuẩn oxi hóa nitrit, tiếp theo nhóm vi khuẩn khử nitrat đảm nhận nhiệm vụ khử các hợp chất nitrat, nitrit sang hợp chất nitơ dạng khí. Sự kết hợp của các quá trình này trong xử lý nước nhiễm nitơ sẽ giúp loại bỏ hoàn toàn các hợp chất ô nhiễm khỏi nguồn nước. Tuy nhiên, vi khuẩn chuyển hóa nitơ dạng tự do dễ bị rửa trôi khỏi hệ thống xử lý hơn so với vi khuẩn tạo màng sinh học được bám dính trên chất mang. Sự tương đồng giữa đặc tính của vật liệu quang xúc tác và vi khuẩn chuyển hóa nitơ đã mở ra phương thức kết hợp chúng trong giải pháp xử lý đồng thời 4 vấn đề ô nhiễm liên đới đã nêu ở trên.

Gần đây, việc đồng thích hợp chất quang xúc tác và vi sinh vật để tăng khả năng phân hủy một số loại hợp chất như kháng sinh hay thuốc nhuộm... đã được đề xuất, nhưng trong nghiên cứu hiện tại chúng tôi hướng đến mục đích xử lý cả 4 yếu tố gồm hợp chất hữu cơ, kháng sinh, vi khuẩn gây bệnh và hợp chất nitơ vô cơ trong môi trường nuôi thủy sản. Trong đó, $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ đóng vai trò chính để phân hủy hợp chất hữu cơ, tiêu diệt/ức chế vi khuẩn gây bệnh; còn vi khuẩn chuyển hóa nitơ sẽ tham gia

vào việc loại bỏ amoni và nitrit. Bên cạnh, yêu cầu về diện tích bề mặt lớn, cấu trúc rỗng xốp để tăng khả năng tích hợp $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ và nổi được trên mặt nước, thì vật liệu này lựa chọn cần được bổ sung thêm các thành phần dinh dưỡng để hỗ trợ sinh trưởng cho vi khuẩn chuyển hóa nitơ, đồng thời vi khuẩn lựa chọn này phải có khả năng tạo màng sinh học (biofilm) cao.

Vì vậy dựa trên cơ sở đó, chúng tôi thực hiện luận án “Nghiên cứu chế tạo vật liệu xốp tích hợp vi sinh vật và vật liệu xốp mang hạt xúc tác quang nhằm xử lý môi trường nước nuôi tôm”.

2. Mục tiêu nghiên cứu:

Chế tạo được vật liệu xốp tích hợp vi khuẩn chuyển hóa nitơ và vật liệu xốp mang hạt xúc tác quang $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ để ức chế vi khuẩn gây bệnh cho tôm, phân hủy kháng sinh, hợp chất hữu cơ và loại bỏ các hợp chất nitơ vô cơ (amoni và nitrite) trong môi trường nước nuôi tôm

3. Nội dung nghiên cứu:

- Chế tạo vật liệu đất sét EC (Expanded clay) và EC cải tiến làm tăng hiệu quả tích hợp chất quang xúc tác $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ và vi khuẩn chuyển hóa nitơ trên vật liệu.

- Tích hợp chất quang xúc tác $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ trên EC và đánh giá hoạt tính vật liệu.

- Tích hợp các nhóm vi khuẩn chuyển hóa nitơ trên EC_Alg_N và đánh giá hoạt tính của vật liệu.

- Thử nghiệm đồng tích hợp vi khuẩn khử nitrit trên vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$.

II. NỘI DUNG LUẬN ÁN

CHƯƠNG I. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

Trình bày tổng quan các hệ lụy về ô nhiễm môi trường trong quá trình nuôi thủy sản. Trong đó phân tích được sự tương quan của các vấn đề ô nhiễm hữu cơ, hợp chất nitơ vô cơ, sự xuất hiện của vi khuẩn gây bệnh và tồn dư kháng sinh trong môi trường nuôi thủy sản.

Tìm hiểu, thu thập thông tin khoa học về các phương pháp phổ biến ứng dụng trong xử lý vấn đề ô nhiễm nguồn nước trong môi trường nuôi

thủy sản. Trên cơ sở đó chỉ ra ưu điểm của phương pháp sử dụng chất quang xúc tác $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ trong phân hủy hợp chất hữu cơ, kháng sinh dư thừa và ức chế sinh trưởng của vi khuẩn gây bệnh. Bên cạnh đó, phân tích được hạn chế của quá trình quang xúc tác chuyển hóa hợp chất nitơ vô cơ, bao gồm amoni và nitrit, từ đó chứng minh được tính cần thiết của việc kết hợp quá trình nitrat hóa- khử nitrat sinh học với $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ để xử lý được cả bốn vấn đề ô nhiễm trong nuôi thủy sản. Phân tích chỉ ra việc tích hợp chất $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ hay vi khuẩn chuyển hóa nitơ trên vật liệu mang đóng vai trò quan trọng để có thể duy trì ổn định hiệu suất xử lý, tăng khả năng thu hồi tái sử dụng và giảm thiểu sự phát sinh của ô nhiễm thứ cấp. Phân tích chỉ ra điểm tương đồng và khác biệt trong nghiên cứu hiện tại và các nghiên cứu khác trên thế giới để đưa ra định hướng chế tạo các loại vật liệu mang riêng biệt phù hợp với từng mục đích gồm: (1) - vật liệu mang tích hợp chất quang xúc tác $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ có tác dụng xử lý ô nhiễm hữu cơ, kháng sinh tồn dư và ức chế vi khuẩn gây bệnh; (2) - vật liệu mang tích hợp vi khuẩn chuyển hóa nitơ có tác dụng loại bỏ các hợp chất nitơ vô cơ trong môi trường nước.

Phân tích đưa ra ưu nhược điểm của các loại vật liệu mang thường được áp dụng trong nghiên cứu về xử lý môi trường. Đồng thời nêu ra được một số phương pháp cải tiến vật liệu mang để tăng khả năng tích hợp chất quang xúc tác hay vi khuẩn lên bề mặt vật liệu. Dựa trên phân tích này để lựa chọn được vật liệu mang đất sét (expanded clay, EC) được chế tạo thông qua quá trình nhiệt phân hỗn hợp đất sét và trấu rồi kết hợp với bước làm lạnh nhanh. Vật liệu tạo thành có cấu trúc rỗng dạng xốp, nhẹ nổi trên mặt nước và có độ nhám cao, tạo ra nhiều vị trí cho sự “neo đậu” của hạt quang xúc tác hay tế bào vi khuẩn chuyển hóa nitơ trên bề mặt vật liệu. Đặc biệt, nghiên cứu đã chỉ ra bên cạnh các đặc tính vật lý thì thành phần dinh dưỡng trên bề mặt vật liệu đóng vai trò quan trọng trong quá trình tích hợp vi khuẩn trên vật liệu. Do đó, vật liệu EC nguyên bản được định hướng biến đổi tích hợp thêm các thành phần dinh dưỡng dưới dạng nano (N, P, K và C) để kích thích sự sinh trưởng và khả năng tạo màng của nhóm vi

khuẩn chuyển hóa nitơ trên bề mặt vật liệu (ký hiệu EC_Alge_N).

Trên cơ sở so sánh các kỹ thuật tích hợp chất quang xúc tác trên vật liệu mang cho thấy trong kỹ thuật sol-gel, ma trận polymer sol-gel có đặc tính trong suốt, không ảnh hưởng đến khả năng hấp thụ ánh sáng của chất quang xúc tác bên trong màng, từ đó đảm bảo hiệu suất phản ứng quang xúc tác phân hủy các chất ô nhiễm. Mặt khác, sự hình thành sol-gel có thể thực hiện ở nhiệt độ thấp, giúp đơn giản hóa quy trình và giảm tiêu tốn năng lượng. Vì vậy, phương pháp này sẽ được lựa chọn để tích hợp chất quang xúc tác TiO_2 -Ag lên hạt đất sét EC trong nghiên cứu này. Đồng thời, nhằm nâng cao hiệu quả của quá trình tích hợp vi khuẩn chuyển hóa nitơ trên bề mặt vật liệu hạt đất sét EC_Alge_N, có thể kết hợp phương pháp hấp thụ và kỹ thuật “bẫy” tế bào (entrapment). Vi khuẩn sẽ được phân tán trong các dung dịch polymer tự nhiên để gia tăng tính ổn định của tế bào trước khi tích hợp lên vật liệu. Nhờ vào cấu trúc xốp của mình, khi được bao phủ bởi mạng lưới polymer chứa tế bào vi khuẩn, EC sẽ tạo ra nhiều vị trí để tế bào vi khuẩn cư trú và bắt đầu hình thành màng sinh học, từ đó nâng cao sự liên kết của tế bào với bề mặt vật liệu.

Những biến đổi nêu trên trong cấu trúc của EC được kỳ vọng đem lại hiệu quả cao trong việc tích hợp chất xúc tác quang/ vi khuẩn chuyển hóa nitơ, đây là tiền đề để nâng cao hiệu suất xử lý ô nhiễm của các loại vật liệu tích hợp tạo thành khi ứng dụng trong môi trường nuôi thủy sản.

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

- Đất sét và vỏ trấu được sử dụng trong nghiên cứu chế tạo hạt đất sét EC (Expanded clay). Các hóa chất khác bao gồm: TiCl_4 , NaBH_4 , AgNO_3 , alginate, Tetracycline, Oxytetracycline hydrochloride, Rifampicin...

- Các chủng vi khuẩn sử dụng trong nội dung nghiên cứu bao gồm: Vi khuẩn oxi hóa amoni (*Nitrosomonas* sp. PD58, *Nitrosomonas* PD60) và vi khuẩn oxi hóa nitrit (*Nitrobacter* sp. 2NM, *Nitrobacter* sp. 5NM). Vi khuẩn gây bệnh: *V. harveyi* VTCC 70222 và *V. parahaemolyticus* VTCC 910192

và *Escherichia coli* ATCC 25922. Vi khuẩn có lợi *Lactobacillus acidophilus* LB. Các chủng vi khuẩn này được lưu giữ trong bộ sưu tập chủng giống tại Phòng thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ lên men và Kỹ thuật cải biến sinh tổng hợp hoạt chất sinh học, Viện Sinh học, VAST.

- Mẫu nước nuôi tôm thẻ chân trắng *Litopenaeus vannamei* tại tỉnh Bạc Liêu được thu thập vào ngày thứ 60 của vụ nuôi được sử dụng để phân lập nhóm vi khuẩn khử nitrat hiếu khí.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Phương pháp chế tạo vật liệu hạt đất sét EC và EC biến đổi

➤ Chế tạo vật liệu hạt đất sét EC

Hạt đất sét (EC) được chế tạo từ hỗn hợp đất sét và vỏ trấu theo phương pháp nhiệt phân. Bột đất sét (đường kính < 2 mm) được trộn với trấu xay theo tỷ lệ 1:1 (w/w). Thêm nước để tạo độ dẻo phù hợp cho hỗn hợp. Tạo hình các hạt có đường kính khoảng 1 cm và sấy khô tự nhiên đến khi đạt độ ẩm 30-40%. Sau đó, chúng được đặt trong lò nung ở 1200 °C trong 2 giờ giúp đất sét giãn nở. Quá trình làm mát nhanh ngay sau đó sẽ cố định cấu trúc xốp của đất sét giãn nở (EC).

➤ Chế tạo EC biến đổi chứa chất dinh dưỡng dưới dạng nano

Các chất dinh dưỡng N, P, K, C dưới dạng hợp chất $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 và CH_3COONa được phân tán đều trong dung dịch polymer alginat để tạo thành dung dịch dưỡng chất dưới dạng nano. Dưới tác dụng khuấy đảo nhẹ của máy khuấy từ lớp polymer alginat chứa dinh dưỡng sẽ được tích hợp trên vật liệu EC, tạo thành vật liệu EC_Alginat_N.

2.2.2. Phương pháp tổng hợp chất quang xúc tác TiO_2 -Ag

Nano TiO_2 được tổng hợp bằng phương pháp kết tủa dung dịch TiCl_4 với amoni hydroxit. Sử dụng NaBH_4 9 mM (30 mL) để khử ion Ag^+ trong AgNO_3 2 mM (120 mL) về dạng Ag^0 . Sử dụng phương pháp khử hóa học các hạt nano bạc trên bề mặt nano TiO_2 để thu được vật liệu nano TiO_2 -Ag.

2.2.3. Tích hợp vật liệu nano TiO_2 -Ag trên chất mang EC

Chuẩn bị các dung dịch TiO_2 -Ag có nồng độ Ti khác nhau

(20.000, 25.000, 30.000 hoặc 35.000 ppm). Bổ sung EC vào các cốc thủy tinh chứa dung dịch $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ đã chuẩn bị với tỷ lệ khối lượng EC so với thể tích dịch là 1:2. Trong quá trình tích hợp $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ lên EC, cốc thí nghiệm chứa hai thành phần này được trên máy lắc với tốc độ 100 vòng/phút. Sau 6, 12 hoặc 18 giờ, lọc tách chất mang khỏi dung dịch và sấy khô ở 60°C trong 5 giờ để xác định hàm lượng Ti và Ag đã tích hợp trên vật liệu EC ($\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$).

2.2.4. Phương pháp nghiên cứu đặc trưng tính chất của vật liệu

Xác định diện tích bề mặt riêng, thể tích và kích thước lỗ rỗng của mẫu vật liệu EC bằng đường đẳng nhiệt hấp phụ vật lý N_2 ở 77 K. Sử dụng phương pháp phổ hồng ngoại biến đổi Fourier để phân tích cấu trúc phân tử của $\text{TiO}_2\text{-Ag}$. Cấu trúc tinh thể của các hệ nano tổng hợp ở trên cũng được kiểm tra bằng thiết bị Bruker D8-Advance. Áp dụng phương pháp Rietveld để đánh giá đặc tính chi tiết của vật liệu. Hàm lượng Ti và Ag trong vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ được xác định thông qua phân tích quang phổ phát xạ plasma ghép nối khối phổ ICP-MS. Phân tích quang phổ UV-vis thực hiện bằng máy quang phổ UV-6300PC có tác dụng xác định sự thay đổi trong các tính chất quang học của vật liệu nano $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ so với TiO_2 và Ag. Sự phân bố kích thước và độ ổn định của các hạt nano được kiểm tra bằng phương pháp tán xạ ánh sáng động DLS trên thiết bị Malvern Zetasizer Nano ZS. Hình thái của vật liệu được kiểm tra bằng kính hiển vi điện tử quét phát xạ trường (FESEM) và kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM).

2.2.5. Đánh giá khả năng xử lý môi trường của vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$

Các thí nghiệm kiểm tra hoạt tính của vật liệu quang xúc tác được trong điều kiện chiếu sáng mặt trời tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (tọa độ $21^\circ02'57.2''\text{N}$ $105^\circ48'06.8''\text{E}$) trong thời gian từ tháng 7-9/2024, cường độ ánh sáng và nhiệt độ trong khoảng 70 – 100 klux và $30\text{-}35^\circ\text{C}$.

➤ ***Khả năng tiêu diệt vi khuẩn gây bệnh***

Vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ được đánh giá khả năng ức chế một số loại vi khuẩn gây bệnh gồm: *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus* và *E. coli* (mật độ ban đầu $\sim 10^6$ CFU/mL) trong 2 giờ chiếu sáng dưới ánh nắng mặt trời. Hiệu quả diệt khuẩn của vật liệu theo công thức:

$$A = \text{Log} N_0 - \text{Log} N_t = \text{Log} \left(\frac{N_0}{N_t} \right)$$

trong đó, A là hiệu quả diệt khuẩn của vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$; N_0 và N_t lần lượt là mật độ vi khuẩn trong mẫu trước và sau xử lý bởi $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$.

➤ **Khả năng phân hủy kháng sinh**

Thí nghiệm được kiểm tra với 3 loại kháng sinh: Tetracycline (TET), Oxytetracycline (OTC) và Rifampicin (RIF). Mỗi loại kháng sinh được chuẩn bị ở các nồng độ (10, 20 và 30 ppm) và pH (3, 5, 7 hay 9) khác nhau. Bình phản ứng được đặt dưới ánh sáng mặt trời trong 4 giờ. Hiệu suất phân hủy kháng sinh được xác định theo công thức:

$$\text{Hiệu suất (\%)} = \frac{C_0 - C_t}{C_0} \times 100\%$$

trong đó, C_0 là nồng độ kháng sinh tại thời điểm bắt đầu thí nghiệm và C_t là nồng độ kháng sinh còn lại trong bình phản ứng tại thời điểm t.

➤ **Khả năng xử lý hợp chất hữu cơ**

- Ảnh hưởng của nồng độ COD ban đầu đến hiệu suất xử lý

Vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ với tỷ lệ 10% w/v được bổ sung vào các dung dịch có nồng độ COD khác nhau (25, 50 và 100 mg/L) và đặt dưới ánh sáng mặt trời trong thời gian 8 tiếng/ngày (khung giờ từ 8h30 sáng đến 16h30 chiều) để đánh giá hiệu suất làm giảm COD của vật liệu.

- Ảnh hưởng của tỷ lệ $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ bổ sung đến hiệu suất xử lý

Bổ sung các tỷ lệ khác nhau (0,5; 1, 2,5; 5 và 7,5% w/v) của vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ vào bình thí nghiệm chứa 1 lit dung dịch có nồng độ COD 100 mg/L, tiến hành quá trình quang xúc tác phân hủy dưới ánh sáng mặt trời.

2.2.6. Lựa chọn vi khuẩn chuyển hóa nitơ để tích hợp trên vật liệu EC

➤ **Làm giàu nhóm vi khuẩn khử nitrat**

Mẫu nước được làm giàu trong môi trường BSM (pH~ 6,5-7) trong 6-7 ngày để phân lập các chủng vi khuẩn có khả năng khử nitrat/nitrit.

➤ **Đánh giá khả năng khử nitrat/nitrit của vi khuẩn phân lập**

▪ *Khả năng khử nitrat/nitrit trong điều kiện yếm khí:*

Trong thí nghiệm kiểm tra khả năng khử nitrat/nitrit trong điều kiện yếm khí của các chủng vi khuẩn, các bình thí nghiệm trước khi nuôi cấy được sục bằng khí N_2 trong 15 phút và bịt kín bằng nút cao su để tạo ra môi trường thiếu oxy. Sau 7 ngày, đo nồng độ nitrat/nitrit còn lại trong dịch.

▪ *Khả năng khử nitrat/nitrit trong điều kiện hiếu khí:*

Sinh khối mỗi chủng vi khuẩn đã phân lập được bổ sung vào môi trường BSM chứa 20 mgN- NO_3/L hay 20 mgN- NO_2/L . Sau 72 giờ nuôi, thu mẫu dịch để đo sự sinh trưởng của vi khuẩn và hàm lượng nitrit, nitrat còn lại trong môi trường theo phương pháp Grissess và Salicylate.

2.2.7. Phương pháp tích hợp vi khuẩn chuyển hóa nitơ trên vật liệu

Sinh khối vi khuẩn oxi hóa amoni, vi khuẩn oxi hóa nitrit và vi khuẩn khử nitrat được phối trộn theo tỷ lệ 1:1:1 để đạt được mật độ vi khuẩn tổng số tương đương 10^4 , 10^5 hay 10^6 CFU/mL. Ba loại vật liệu mang EC, EC_Alge và EC_Alge_N được đưa vào hỗn hợp dịch sinh khối và nuôi tĩnh trong 48 – 72 giờ ở 35 °C để vi khuẩn tạo màng tích hợp trên vật liệu, sau đó lọc tách vật liệu và làm khô ở nhiệt độ phòng để thu được vật liệu tích hợp vi khuẩn chuyển hóa nitơ.

2.2.8. Đánh giá khả năng chuyển hóa amoni, nitrit của vật liệu đã tích hợp vi khuẩn chuyển hóa nitơ

➤ *Ảnh hưởng của nồng độ amoni, nitrit đến hiệu suất xử lý*

Vật liệu EC đã tích hợp vi khuẩn được bổ sung vào bình thí nghiệm chứa 10 mL môi trường, hàm lượng amoni và nitrit được bổ sung đồng thời (tỷ lệ 1:1) với các nồng độ nitơ khác nhau 10, 30, 40 và 60 mg-N/L. Xác định các thành phần amoni, nitrit còn lại trong môi trường theo phương pháp Phenate và Griess tại thời điểm bắt đầu và sau 24 giờ theo dõi.

➤ *Đánh giá hoạt tính loại bỏ amoni và nitrite của vật liệu EC_Alge_N tích hợp vi khuẩn chuyển hóa nitơ trên mô hình 50 lít*

Vật liệu EC_Alge_N đã tích hợp vi khuẩn (1% w/v) được đưa vào bể thí nghiệm số 1 có chứa 50 L nước nuôi thu tập từ hồ nuôi tôm thẻ chân

trắng *Litopenaeus vannamei*. Amoni $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ và nitrit (NaNO_2) được bổ sung thêm vào mỗi bể phản ứng sao cho đạt tổng nồng độ nitơ ban đầu là 40, 100 và 200 mgN/L (tỷ lệ $\text{N-NH}_4^+/\text{N-NO}_2^-$ là 1: 1) lần lượt trong các Giai đoạn I, II và III. Sự thay đổi của nồng độ NH_4^+ , NO_2^- và NO_3^- được xác định thông qua phương pháp Phenate, Griess và Salicylate tương ứng.

2.2.9. Phương pháp tích hợp vi khuẩn khử nitrat trên $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$

➤ Ảnh hưởng của vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ đến vi khuẩn khử nitrat

Ba loại vật liệu gồm EC nguyên bản (ký hiệu EC), EC chứa $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ (ký hiệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$) và EC chứa $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ được phủ thêm lớp polymer chitosan (ký hiệu $(\text{TiO}_2\text{-Ag})\text{c/EC}$) đã được sử dụng để đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của chúng đối với vi khuẩn gây bệnh *V. parahaemolyticus* và vi khuẩn khử nitrat *Bacillus* sp. ST20, *Bacillus* sp. ST26 (mật độ vi khuẩn ban đầu 10^6 CFU/mL). Tỷ lệ sống của mỗi chủng vi khuẩn sau thí nghiệm được xác định theo công thức:

$$\text{Tỷ lệ sống (\%)} = \frac{\text{Mật độ vi khuẩn trong bình xử lý với vật liệu chứa } \text{TiO}_2 - \text{Ag}}{\text{Mật độ vi khuẩn trong mẫu đối chứng}} \times 100\%$$

➤ Tích hợp vi khuẩn khử nitrat lên vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$

Dịch sinh khối vi khuẩn khử nitrat, *Bacillus* sp. ST20 và *Bacillus* sp. ST26 với mật độ khoảng 10^8 CFU/mL được phối trộn với tỷ lệ 1:1, sau đó phân tán trong polymer alginat (0,5% w/v) để tích hợp trên các vật liệu gồm: EC nguyên bản, $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ và $(\text{TiO}_2\text{-Ag})\text{c/EC}$. Vật liệu đồng tích hợp tạo thành được kiểm tra các đặc điểm về mật độ vi khuẩn, khả năng xử lý nitrit và ức chế vi khuẩn gây bệnh *V. parahaemolyticus*.

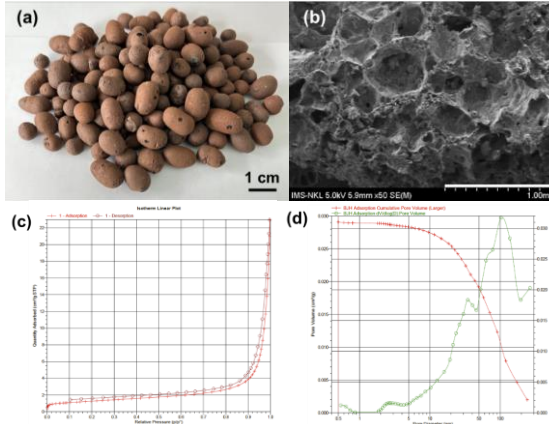
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Chế tạo vật liệu đất sét EC (Expanded clay) và EC cải tiến

3.1.1. Chế tạo vật liệu đất sét EC

Sản phẩm EC tạo thành sau quá trình nhiệt phân có hình tròn bầu dục với trọng lượng trung bình $1,2 \pm 0,35$ g (Hình 3.1). Phép đo Brunauer-Emmett-Teller (BET) cho thấy vật liệu EC có diện tích bề mặt riêng 4,4

$\pm 0,12 \text{ m}^2/\text{g}$ và kích thước lỗ rỗng là $25,1 \pm 0,05 \text{ nm}$ với thể tích khoảng $0,027 \pm 0,005 \text{ cm}^3/\text{g}$. Đây là những đặc điểm có lợi để tạo điều kiện cho việc tích hợp hạt quang xúc tác $\text{TiO}_2\text{-AgNP}$ hay các nhóm vi khuẩn xử lý môi trường lên vật liệu.



Hình 3.1. Hình dạng bề ngoài (a), cấu trúc bên trong (b), đồ thị BET (c) và phân bố kích thước lỗ rỗng của vật liệu EC đã chế tạo (d).

3.1.2. Cải tiến vật liệu EC tích hợp dinh dưỡng dưới dạng nano

Vật liệu đất sét EC được cải tiến bằng cách phủ thêm hỗn hợp alginate tích hợp thêm các chất dinh dưỡng dạng nano ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, CH_3COONa , KH_2PO_4), thích hợp cho việc tích hợp vi khuẩn nitrat hóa và khử nitrat. Sau khi tích hợp, phân tích EDX cho thấy sự xuất hiện của các thành phần nguyên tố K (1,8%), N (2,28%), P (0,09%) và C (1,71%) trên bề mặt vật liệu EC cải tiến (ký hiệu EC_Alq_N), chung khi chúng không được phát hiện trên vật liệu EC nguyên bản (Bảng 3.1).

Như vậy, nghiên cứu này đã chế tạo được hai loại vật liệu gồm: (1) vật liệu EC có đặc tính rỗng dạng xốp, nhẹ nổi trên mặt nước phù hợp để tích hợp làm tăng hiệu quả chất quang xúc tác trên vật liệu, và (2) vật liệu EC biến đổi phủ lớp alginate có chứa các thành phần dinh dưỡng (N, P, K, C), ký hiệu là EC_Alq_N, cần thiết để kích thích sự sinh trưởng, tạo màng sinh học của nhóm vi khuẩn chuyển hóa nitơ khi tích hợp trên vật liệu.

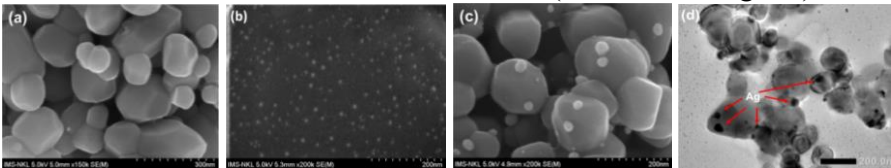
Bảng 3.1. Thành phần nguyên tố bề mặt của EC nguyên bản và EC cải tiến tích hợp dinh dưỡng nano (EC_Alge_N).

TT	Nguyên tố	Tỷ lệ thành phần nguyên tố bề mặt	
		EC nguyên bản (EC)	EC tích hợp dinh dưỡng (EC_Alge_N)
1	O	57,43%	41,58%
2	Al	14,31%	11,56%
3	Si	13,54%	12,88%
4	Fe	11,92%	26,91%
5	K	1,52%	1,80%
6	Mg	0,89%	0,61%
7	C	-	1,71%
8	N	-	2,28%
9	S	-	0,18%
10	Ca	-	0,39%
11	Ag	-	0,01%
12	P	-	0,09%
13	Ti	0,39%	-
Tổng		100%	100%

3.2. Tích hợp TiO_2 -Ag trên EC và đánh giá hoạt tính vật liệu

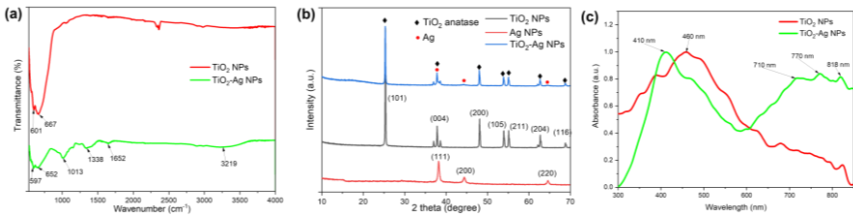
3.2.1. Tổng hợp chất quang xúc tác TiO_2 -Ag

Các hạt nano TiO_2 -Ag được tổng hợp bằng phương pháp khử hóa học hạt nano bạc trên bề mặt TiO_2 . Trong đó, các hạt nano Ag với kích thước nhỏ $25,29 \pm 3,61$ nm có thể dễ dàng nhìn thấy trên bề mặt các hạt TiO_2 có kích thước lớn 98 ± 11 nm (Hình 3.2, Bảng 3.2).



Hình 3.2. Ảnh FESEM và TEM: TiO_2 (a), Ag (b), TiO_2 -Ag (c) và TiO_2 -Ag
Dựa trên phân tích quang phổ hồng ngoại biến đổi Fourier và

những xạ tia X có thể chứng minh sự hiện diện ổn định của Ag trong $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ mà không phá vỡ cấu trúc tinh thể TiO_2 , vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ phân tán ổn định trong polymer alginate với thế zeta $-43,70 \pm 1,12$ mV (Hình 3.3, Bảng 3.2). Bên cạnh đó, Hình 3.3c thể hiện khi TiO_2 được biến đổi với Ag, hiệu ứng cộng hưởng plasmon bề mặt của Ag giúp dịch chuyển ngưỡng hấp thụ của TiO_2 từ 460 nm sang 700 - 800 nm, thuộc vùng ánh sáng khả kiến và “giảm” năng lượng vùng cấm của vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ xuống 2,0 eV.



Hình 3.3. Phổ FTIR (a), nhiễu xạ tia X (b) và phổ hấp phụ UV-Vis (c) của các vật liệu quang xúc tác $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$.

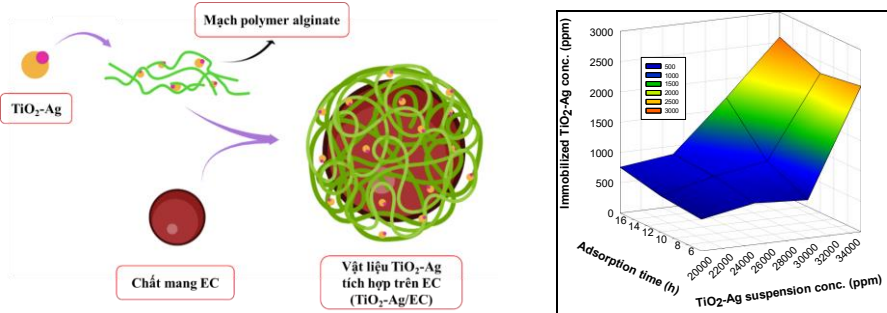
Bảng 3.2. Phân bố kích thước, thế zeta và nồng độ các thành phần của vật liệu TiO_2 , Ag và $\text{TiO}_2\text{-Ag}$.

	Kích thước (nm)	Thế Zeta (mV)	Nồng độ (ppm)
TiO₂	97,75 ± 11,06	-47,2 ± 6,42	4976,82 ± 45,20
Ag	25,29 ± 3,61	-35,51 ± 13,10	185,49 ± 14,63
TiO₂-Ag	458,90 ± 18,51	-43,70 ± 1,12	Ti: 4852,51 ± 23,72 Ag: 194,58 ± 6,29

3.2.2. Tối ưu quá trình tích hợp $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ trên EC

Khi vật liệu EC được đưa vào các dung dịch nano $\text{TiO}_2\text{-Ag}$, dưới tác động khuấy đảo liên tục trong quá trình tích hợp, mạch alginate có đỉnh các hạt nano $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ sẽ bao quanh EC (Hình 3.4). Cấu trúc gồm nhiều lỗ rỗng của EC tạo ra các vị trí neo đậu phù hợp cho hạt nano $\text{TiO}_2\text{-Ag}$. Kết quả trong nghiên cứu này cho thấy hiệu quả tích hợp $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ trên chất mang phụ thuộc đồng thời vào đặc tính, nồng độ của $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ và đặc điểm cấu trúc của bản thân chất mang đó. Trong đó, nồng độ $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ ở mức 35.000 ppm và thời gian tích hợp 12 giờ là phù hợp để đạt được hàm lượng Ti cao

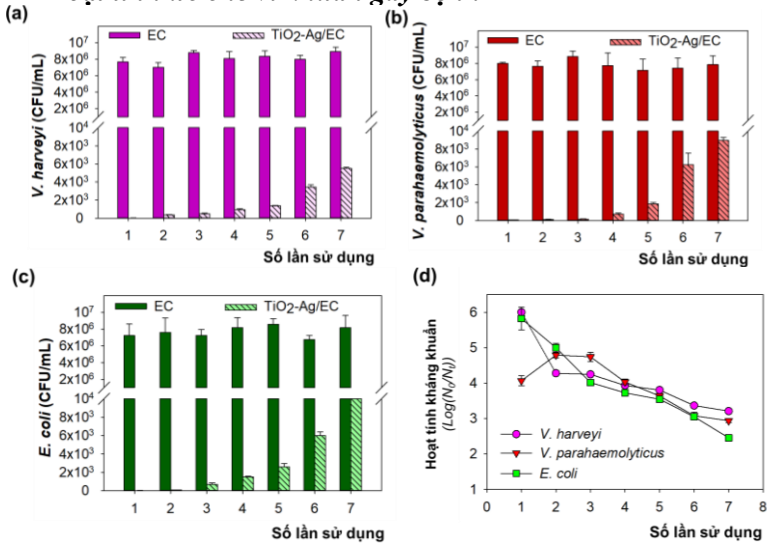
nhất trên vật liệu EC, đạt trên 2.500 ppm



Hình 3.4. Ảnh hưởng của thời gian và nồng độ $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ sử dụng đến hiệu quả tích hợp.

3.2.3. Đánh giá khả năng xử lý môi trường của vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$

➤ Hoạt tính ức chế vi khuẩn gây bệnh



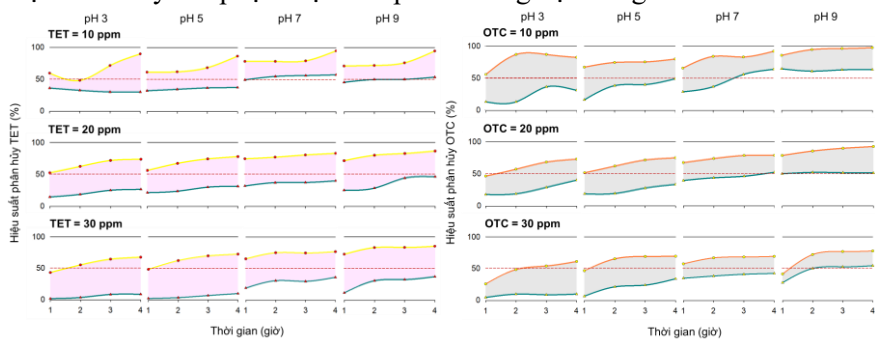
Hình 3.5. Khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh *V. harveyi* (a), *V. parahaemolyticus* (b), *E. coli* (c) của vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ và hiệu suất diệt khuẩn tương ứng của chúng (d).

Hoạt tính quang xúc tác của $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ được kích thích bởi ánh sáng mặt trời nhanh chóng ức chế làm giảm mạnh mật độ vi khuẩn từ 10^6 CFU/mL xuống 7, 68 và 12 CFU/mL, tương ứng với hiệu suất kháng lại ba loại vi khuẩn trên lần lượt là 6,0; 5,1 và 5,8 Log (N_0/N_t) (Hình 3.5). Sau bảy lần sử

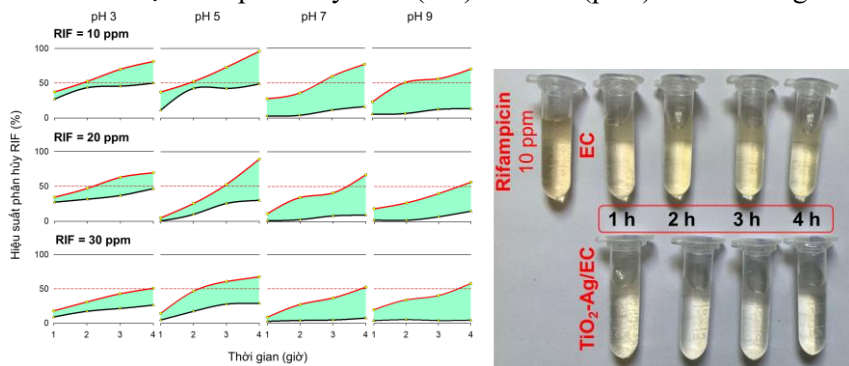
dụng, hiệu quả kháng khuẩn của $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ giảm dần từ 5,1 – 6,0 xuống còn 2,5 – 3,2 $\text{Log}(N_0/N_t)$, nhưng $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ vẫn có khả năng tiêu diệt vi khuẩn gây bệnh từ mật độ ban đầu ở 10^6 CFU/mL xuống xấp xỉ 10^3 CFU/mL sau 2 giờ xử lý trong lần sử dụng thứ 7. Do đó, vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ được kỳ vọng vẫn có thể tiêu diệt hiệu quả nhanh chóng mầm bệnh trong môi trường nuôi thủy sản.

➤ Khả năng phân hủy kháng sinh

Vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ được chứng minh có khả năng phân hủy kháng sinh Tetracycline (TET), Oxytetracycline (OTC) và Rifampicin (RIF) với hiệu suất thay đổi phụ thuộc vào pH và nồng độ kháng sinh ban đầu.



Hình 3.6. Hiệu suất phân hủy TET (trái) và OTC (phải) bởi $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$.



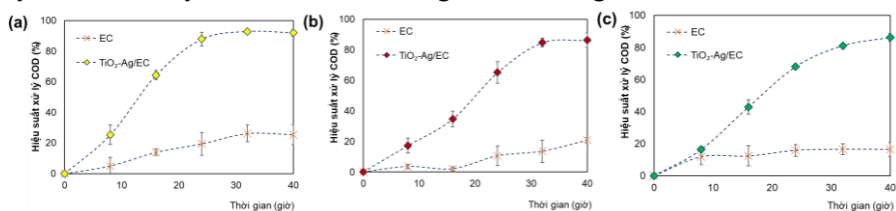
Hình 3.7. Hiệu suất phân hủy Rifampicin (RIF) bởi vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$.

Trong đó, hiệu suất loại bỏ TET và OTC (10 ppm) của $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ đạt trên 92% ở điều kiện pH 7 – 9 sau 4 giờ chiếu sáng mặt trời. RIF (10

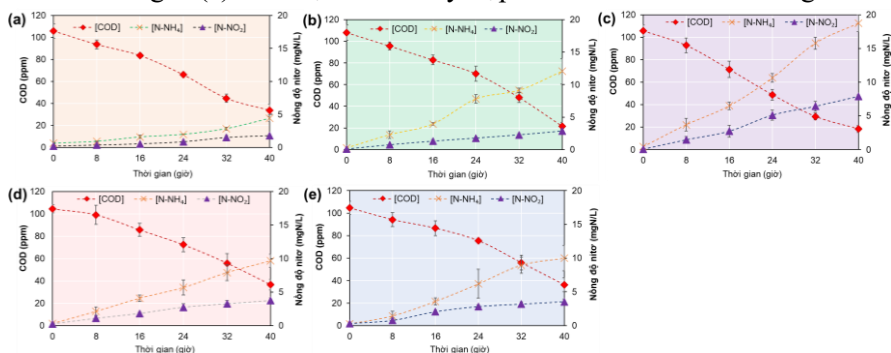
ppm) được phân hủy hiệu quả tại pH 5 với hiệu suất cao nhất là 95,7%. Khi đặt dưới ánh sáng mặt trời, các hợp chất kháng sinh cũng bị chuyển hóa một phần bởi sự quang hóa trực tiếp (photolysis), với hiệu suất thấp hơn nhiều khi so với quá trình quang xúc tác (photocatalysis) bằng vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ (Hình 3.6, 3.7).

➤ Khả năng xử lý hợp chất hữu cơ (COD)

Kết quả thể hiện tại Hình 3.8 cho thấy trong điều kiện chiếu sáng mặt trời, sau 32 giờ vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ có thể loại bỏ $92,9 \pm 0,7\%$ hàm lượng COD ban đầu là 25 mg/L. Tăng nồng độ COD ban đầu lên 50 hay 100 mg/L không ảnh hưởng nhiều đến khả năng xử lý của vật liệu, hiệu suất xử lý vẫn được duy trì trên 86% sau 40 giờ chiếu sáng.



Hình 3.8. Ảnh hưởng của nồng độ COD ban đầu: 25 mg/L (a), 50 mg/L (b) và 100 mg/L (c) đến hiệu suất xử lý hợp chất hữu cơ của $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$.



Hình 3.9. Ảnh hưởng của tỷ lệ $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ bổ sung: 0,5 (a); 1 (b); 2,5 (c); 5 (d) và 7,5% w/v (e) đến hiệu suất xử lý hợp chất hữu cơ.

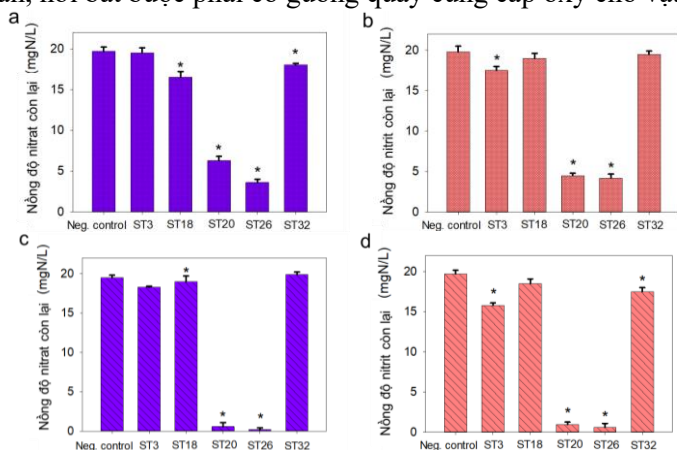
Khi đánh giá các tỷ lệ bổ sung $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ khác nhau (0,5; 1; 2,5; 5 và 7,5% w/v) của đến hiệu quả xử lý COD (100 ppm), Hình 3.9 thể hiện thử

nghiệm trong mô hình 1 L với nồng độ COD ban đầu 100 mg/L cho thấy, vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ ở tỷ lệ bổ sung 2,5% w/v là phù hợp để đạt được hiệu quả phân hủy COD trên $82,7 \pm 2,0\%$ sau 40 giờ chiếu sáng, hiệu suất này không tăng dù tăng khối lượng vật liệu quang xúc tác bổ sung nếu thể tích diện tích bề mặt của mô hình xử lý không đổi. Tuy nhiên cần có sự kết hợp sử dụng phương pháp sinh học để có thể đồng thời xử lý hợp chất NH_4^+ và NO_2^- hình thành trong quá trình quang xúc tác loại bỏ hợp chất hữu cơ.

3.3. Tích hợp các nhóm vi khuẩn chuyển hóa nitơ trên EC_Alg_N

3.3.1. Lựa chọn vi khuẩn loại bỏ nitrit hiệu khí

Mẫu nước thu thập tại hồ nuôi tôm thẻ chân trắng *Litopenaeus vannamei* được sử dụng để phân lập chủng *Bacillus* sp. ST20 và *Bacillus* sp. ST26 có hiệu quả loại bỏ nitrat/nitrit vượt trội trong điều kiện hiếu khí, đạt hiệu suất lần lượt là 95,2 và 97,0%, cao hơn so với trong điều kiện kỵ khí (Hình 3.10). Vì vậy, vi khuẩn ST20 và ST26 được nhận định phù hợp ứng dụng trong nhiều loại mô hình xử lý khác nhau, đặc biệt tại các đầm ao nuôi thủy sản, nơi bắt buộc phải có guồng quay cung cấp oxy cho vật nuôi.

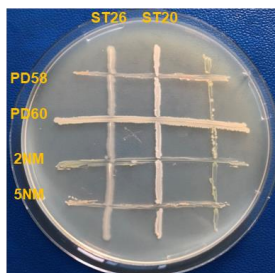


Hình 3.10. Hoạt tính loại bỏ nitrat/nitrit của các chủng vi khuẩn trong điều kiện yếm khí (a, b) và hiếu khí (c, d).

3.3.2. Lựa chọn vi khuẩn nitrat hóa

Kết quả nhận được từ Hình 3.11 cho thấy, hai chủng vi khuẩn ST20 và

ST26 không có hiện tượng đối kháng sinh trưởng với các chủng vi khuẩn oxy hóa amoni (PD58, PD60) và vi khuẩn oxy hóa nitrit (2NM, 5NM).



Hình 3.11. Khả năng đối kháng của vi khuẩn nitrat hóa và khử nitrat

Đồng thời dữ liệu tại Bảng 3.3 chỉ ra sáu chủng vi khuẩn lựa chọn có khả năng tạo màng sinh học thể hiện thông qua sự tăng của giá trị OD_{570} theo thời gian và đạt cao nhất sau 4 ngày nuôi cấy. Vì vậy, trong các thí nghiệm tiếp hiệu quả chuyển hóa đồng thời amoni, nitrit khi kết hợp vi khuẩn nitrat hóa (PD58, PD60, 2NM và 5NM) với vi khuẩn khử nitrat (ST20 và ST26) sẽ kiểm tra để đánh giá tiềm năng ứng dụng của chúng trong xử lý ô nhiễm nitơ vô cơ tại vùng nuôi thủy sản.

Bảng 3.3. Khả năng tạo màng sinh học của các chủng vi khuẩn

	Chủng	OD_{570}			
		Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 4
VK oxy hóa amoni	PD 58	$0,12 \pm 0,03$	$0,15 \pm 0,01$	$0,32 \pm 0,05$	$0,41 \pm 0,01$
	PD 60	$0,09 \pm 0,03$	$0,18 \pm 0,05$	$0,23 \pm 0,01$	$0,30 \pm 0,09$
VK oxy hóa nitrit	2NM	$0,07 \pm 0,04$	$0,10 \pm 0,02$	$0,19 \pm 0,01$	$0,25 \pm 0,02$
	5NM	$0,14 \pm 0,01$	$0,14 \pm 0,02$	$0,16 \pm 0,03$	$0,29 \pm 0,04$
VK khử nitrat	ST20	$0,58 \pm 0,06$	$0,49 \pm 0,01$	$0,54 \pm 0,08$	$0,89 \pm 0,16$
	ST26	$0,27 \pm 0,02$	$0,29 \pm 0,08$	$0,36 \pm 0,07$	$0,33 \pm 0,13$

3.3.3. Tối ưu điều kiện tích hợp các nhóm vi khuẩn nitrat hóa và khử nitrat trên EC_Al_g_N

Sự đa dạng của thành phần dinh dưỡng, quan trọng nhất là sự hiện diện của các hợp chất C, N, P, K và các nguyên tố vi lượng trong giá thể EC_Al_g_N có thể tạo ra môi trường thích hợp cho sự hình thành màng sinh học của vi khuẩn nitrat hóa và khử nitrat. Kết quả thể hiện tại Bảng 3.4 cho

thấy nồng độ vi khuẩn chuyển hóa nitơ ở mật độ 10^5 CFU/mL là phù hợp để sử dụng tích hợp trên vật liệu EC_Alge_N, sau hai ngày, số lượng tế bào vi khuẩn đã tích hợp tạo màng sinh học trên vật liệu đạt đạt $(69 \pm 1) \times 10^7$, $(57 \pm 3) \times 10^7$ và $(430 \pm 30) \times 10^7$ CFU/g, lần lượt tương ứng với nhóm vi khuẩn oxy hóa amoni, oxy hóa nitrit và khử nitrat.

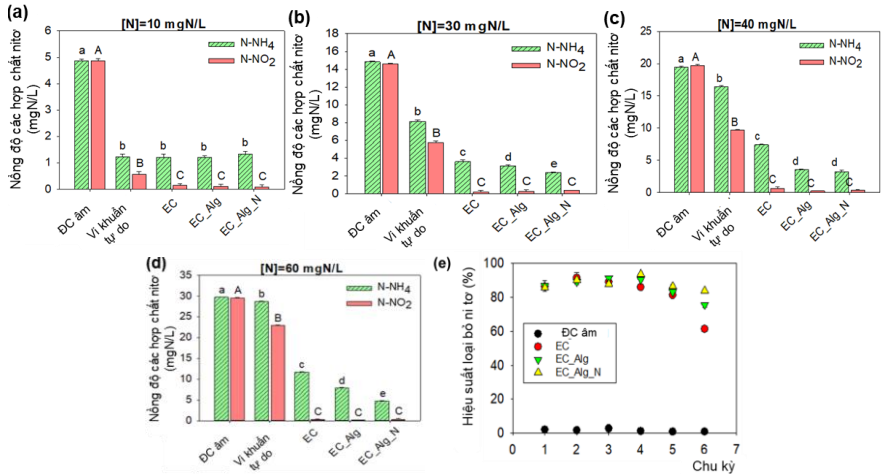
Bảng 3.4. Ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn ban đầu và loại vật liệu đến hiệu quả tích hợp vi khuẩn trên chất mang.

Dịch sinh khối VK ban đầu	Thời gian tích hợp	Loại vật liệu	Mật độ vi khuẩn trên vật liệu sau tích hợp ($\times 10^7$ CFU/g EC)		
			Vi khuẩn AOB	Vi khuẩn NOB	Vi khuẩn khử nitrat
10^4 CFU/mL	Ngày 2	EC	$1,2 \pm 0,2$	$1,4 \pm 0,7$	$5,5 \pm 3,9$
		EC Alge	$1,5 \pm 0,9$	$4,3 \pm 0,9$	87 ± 24
		EC Alge N	$1,3 \pm 0,4$	$18,1 \pm 2,6$	$93 \pm 3,3$
	Ngày 4	EC	$2,6 \pm 0,3$	$5,8 \pm 3$	$11 \pm 5,0$
		EC Alge	$2,8 \pm 0,4$	$23,2 \pm 9,5$	$162,8 \pm 1,2$
		EC Alge N	$3,3 \pm 0,5$	$39 \pm 4,0$	294 ± 28
10^5 CFU/mL	Ngày 2	EC	$5,6 \pm 0,6$	$3,2 \pm 0,5$	19 ± 9
		EC Alge	$3,3 \pm 0,3^{*a}$	$45 \pm 2^{*a}$	$210 \pm 60^{*a}$
		EC Alge N	$69 \pm 1^{*b}$	$57 \pm 3^{*b}$	$430 \pm 30^{*b}$
	Ngày 4	EC	$6,1 \pm 1,1$	$2,8 \pm 1$	35 ± 12
		EC Alge	$4,0 \pm 0,5$	20 ± 1	230 ± 32
		EC Alge N	58 ± 13	$46 \pm 6,5$	419 ± 28
10^6 CFU/mL	Ngày 2	EC	$4,3 \pm 0,27$	$5 \pm 0,6$	26 ± 9
		EC Alge	$4,9 \pm 3,1^a$	39 ± 12	183 ± 10
		EC Alge N	34 ± 8	63 ± 19	425 ± 83
	Ngày 4	EC	$2,1 \pm 0,3$	$3,9 \pm 0,7$	$22 \pm 3,5$
		EC Alge	$5,8 \pm 2,2$	$38 \pm 0,8$	149 ± 53
		EC Alge N	$15 \pm 9,2$	$50 \pm 7,4$	402 ± 74

3.3.4. Khả năng xử lý nitơ của vật liệu EC_Alge_N tích hợp vi khuẩn

➤ Ảnh hưởng của nồng độ amoni, nitrit đến hiệu suất xử lý

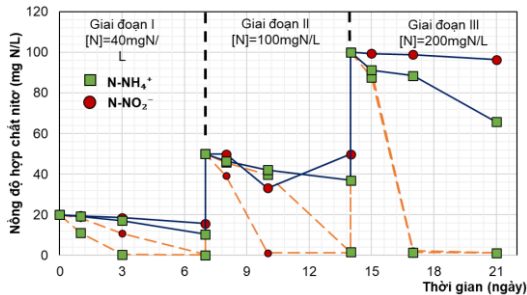
Số liệu trên hình Hình 3.14 cho thấy vật liệu tích hợp EC_Alge_N có khả năng loại bỏ amoni và nitrit đạt trên $91,62 \pm 0,67\%$ khi bổ sung nồng độ nitơ ban đầu là 60 mg-N/L, cao hơn khi so sánh với vi khuẩn ở dạng tự do hay khi vi khuẩn tích hợp trên vật liệu EC nguyên bản. Đồng thời EC_Alge_N có khả năng tái sử dụng cao, có thể duy trì hiệu suất loại bỏ nitơ ở mức $83,95 \pm 0,15\%$ ngay cả sau 6 chu kỳ xử lý.



Hình 3.14. Khả năng xử lý nitơ của vật liệu EC_Alg_N tích hợp vi khuẩn trong các nồng độ nitơ ban đầu khác nhau: 10 mg-N/L (a), 30 mg-N/L (b), 40 mg-N/L (c), 60 mg-N/L (d) và khả năng tái sử dụng của vật liệu (e).

➤ **Hiệu suất loại bỏ amoni và nitrit của vật liệu EC_Alg_N tích hợp vi khuẩn chuyển hóa nitơ trên mô hình 50 lít**

Vật liệu EC_Alg_N tích hợp vi khuẩn được thử nghiệm đánh giá độ ổn định của hoạt tính xử lý nitơ trên mô hình thể tích 50 lít. Với tỷ lệ bổ sung vật liệu ở mức 1% w/v, hệ xử lý vẫn duy trì hiệu suất loại bỏ đồng thời amoni, nitrit trên 96% ngay cả khi tổng hàm lượng nitơ ban đầu được tăng dần từ 40 lên 200 mgN/L trong 21 ngày thử nghiệm (Hình 3.15).



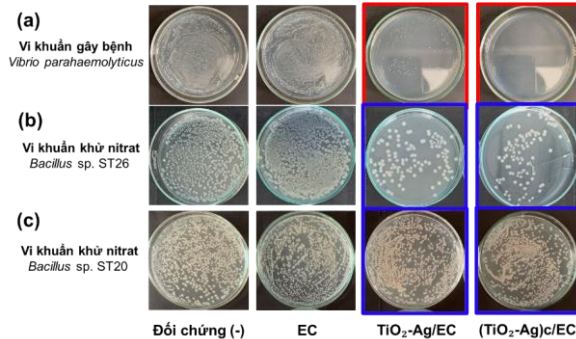
Hình 3.15. Khả năng xử lý amoni, nitrit của vi khuẩn chuyển hóa nitơ dạng tự do (nét liền) và vi khuẩn tích hợp vật liệu EC_Alg_N (nét đứt).

3.4. Thử nghiệm đồng tích hợp vi khuẩn khử nitrit trên TiO₂-Ag/EC

Trong nuôi thủy sản, hàm lượng cao của nitrit không chỉ làm giảm khả năng vận chuyển oxy trong máu, phá vỡ hệ thống nội tiết của vật nuôi mà còn kích thích sự phát triển của các nhóm vi khuẩn gây bệnh, đặc biệt là vi khuẩn thuộc chi *Vibrio* gây ra bệnh hoại tử gan tụy cấp. Do đó, để tạo môi trường an toàn cho vật nuôi, các biện pháp xử lý ô nhiễm nitơ vô cơ và ức chế tác nhân gây bệnh cần được kết hợp đồng thời. Chính vì vậy, bên cạnh mục tiêu tích hợp nhóm vi khuẩn chuyển hóa nitơ trên vật liệu EC_Alg_N để xử lý môi trường ô nhiễm amoni, nitrit, chúng tôi còn hướng đến thử nghiệm tích hợp nhóm vi khuẩn khử nitrit trên chất mang EC có chứa chất quang xúc tác $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ nhằm tạo ra sản phẩm kết hợp vừa có tác dụng ức chế vi khuẩn gây bệnh đồng thời có khả năng chuyển hóa loại bỏ nitrit trong môi trường nuôi thủy sản

3.4.1. Ảnh hưởng của $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ đến vi khuẩn khử nitrit

Số liệu thể hiện tại Hình 3.16 chỉ ra vật liệu $(\text{TiO}_2\text{-Ag})\text{c/EC}$ có khả năng ức chế đến $99,93 \pm 0,1\%$ mật độ vi khuẩn *V. parahaemolyticus*. Tuy nhiên, khi được đặt trong điều kiện thí nghiệm tương đương, vi khuẩn khử nitrat *Bacillus* sp. ST20 và *Bacillus* sp. ST26, không bị ảnh hưởng nhiều bởi vật liệu $(\text{TiO}_2\text{-Ag})\text{c/EC}$, duy trì tỷ lệ sống sót đạt lần lượt là $95,70 \pm 3,26\%$ và $12,60 \pm 8,22\%$.

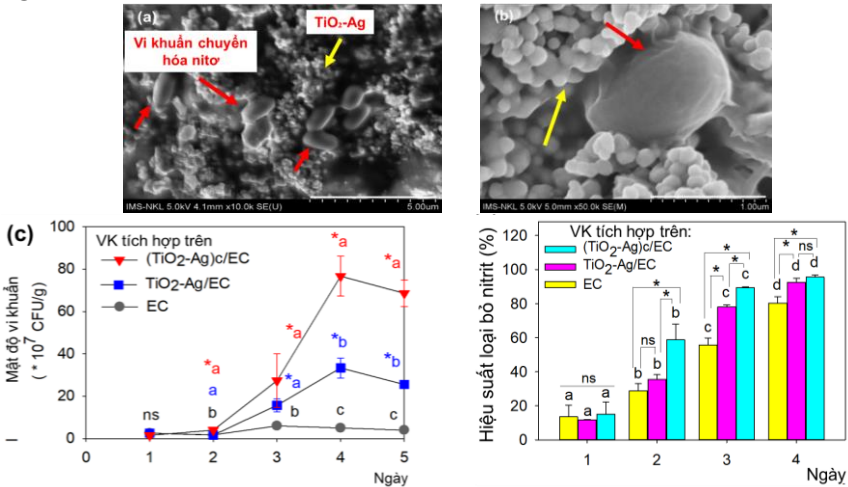


Hình 3.16. Ảnh hưởng của vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ đến vi khuẩn *V. parahaemolyticus* (a), *Bacillus* sp. ST20 (b) và *Bacillus* sp. ST26 (c).

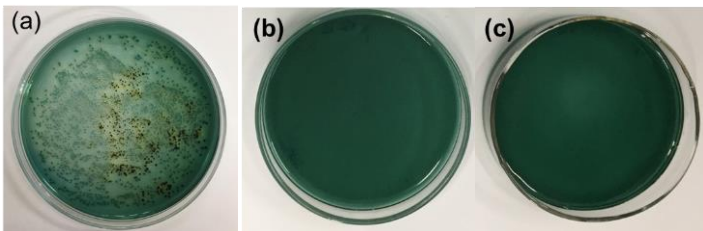
3.4.2. Thử nghiệm đồng tích hợp vi khuẩn khử nitrit trên $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$

Để tăng hiệu quả tích hợp và giảm thiểu tác động của các gốc

ROS tạo ra bởi $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ đến vi khuẩn khử nitrit, tế bào hai chủng vi khuẩn này sẽ được bao bọc trong lớp polymer alginate trước khi tích hợp trên vật liệu $(\text{TiO}_2\text{-Ag})\text{c}/\text{EC}$. Chitosan và alginate là hai loại polymer tự nhiên có điện tích trái dấu. Tận dụng đặc tính này, sinh khối vi khuẩn trong lớp polymer alginate cũng có thể dễ dàng được tích hợp lên vật liệu $(\text{TiO}_2\text{-Ag})\text{c}/\text{EC}$ có lớp chitosan bao phủ bên ngoài nhờ lực hút tĩnh điện.



Hình 3.17. Ảnh FESEM (a, b) của vi khuẩn khử nitrit tích hợp trên $(\text{TiO}_2\text{-Ag})\text{c}/\text{EC}$; mật độ vi khuẩn (c) và hiệu suất loại bỏ nitrit (d) của vi khuẩn trên ba loại vật liệu theo thời gian tích hợp.



Hình 3.18. So sánh hoạt tính ức chế vi khuẩn *V. parahaemolyticus* của vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag}/\text{EC}$ (b) và vật liệu $(\text{TiO}_2\text{-Ag})\text{c}/\text{EC}$ tích hợp vi khuẩn khử nitrit (c). Mẫu đối chứng âm (a) gồm dịch vi khuẩn không bổ sung vật liệu.

Quá trình tích hợp các vi khuẩn này trên vật liệu EC, $\text{TiO}_2\text{-Ag}$

Ag/EC và (TiO₂-Ag)c/EC được thực hiện trong 4 ngày. Theo đó, tại ngày thứ 4, (TiO₂-Ag)c/EC có mật độ vi khuẩn cao nhất là $(76,67 \pm 9,43) \times 10^7$ CFU/g, cao hơn so với mật độ $(33,33 \pm 4,71) \times 10^7$ CFU/g và $5,0 \times 10^7$ CFU/g lần lượt ở vật liệu TiO₂-Ag/EC và EC (Hình 3.17). Vật liệu (TiO₂-Ag)c/EC tích hợp vi khuẩn có hiệu suất loại bỏ nitrit đạt 95,5%; cao hơn đáng kể so với vật liệu EC. Bên cạnh đó, kết quả thể hiện trên Hình 3.18 cho thấy việc tích hợp vi khuẩn khử nitrit trên (TiO₂-Ag)c/EC không ảnh hưởng đến hoạt tính quang xúc tác ức chế vi khuẩn gây bệnh *V. parahaemolyticus* của vật liệu.

KẾT LUẬN

1. Chế tạo thành công vật liệu EC (Expanded Clay) từ hỗn hợp đất sét và trấu bằng phương pháp nhiệt phân, tạo ra vật liệu có cấu trúc rỗng, dạng xốp, nổi trên mặt nước, và bề mặt nhám, phù hợp cho việc tích hợp chất quang xúc tác và vi khuẩn chuyển hóa nitơ. Đặc tính nổi giúp vật liệu tiếp xúc hiệu quả với ánh sáng và oxy, tăng hiệu suất xử lý trong môi trường nước nuôi thủy sản.

2. Đã tối ưu quá trình tích hợp TiO₂-Ag lên EC, tạo vật liệu quang xúc tác nổi có hiệu quả xử lý cao. Vật liệu với tỷ lệ 10% (w/v) TiO₂-Ag/EC cho hiệu quả ức chế vi khuẩn gây bệnh cao, làm giảm mật độ vi khuẩn gây bệnh từ 10^6 xuống $<10^2$ CFU/mL sau 2 giờ chiếu sáng và ổn định hiệu quả xử lý duy trì sau ít nhất 7 chu kỳ sử dụng; TiO₂-Ag/EC còn có khả năng phân hủy >90% kháng sinh TET, OTC (10 ppm) ở pH 7–9 và 95% RIF ở pH 5; đồng thời có thể xử lý COD đạt hiệu quả trên 92% (25 mg/L) sau 32 giờ chiếu sáng. Duy trì 83% hiệu suất COD ở mô hình 1 L với tỷ lệ bổ sung chỉ 2,5% (w/v).

3. Đã phân lập và tuyển chọn được các chủng vi khuẩn khử nitrat/nitrit trong điều kiện hiếu khí, góp phần nâng cao hiệu quả xử lý nitơ trong môi trường nuôi thủy sản có hàm lượng O₂ cao.

4. Vật liệu EC được cải tiến bằng cách phủ lớp polymer alginate chứa các dưỡng chất (N, P, K) và nguồn cacbon dạng nano, nhằm kích thích sự sinh trưởng và hình thành biofilm của các vi khuẩn nghiên cứu trên bề mặt

vật liệu. Sau 2 ngày nuôi, mật độ vi khuẩn nitrat hóa và khử nitrat/nitrit hiếu khí tích hợp trên vật liệu EC cải tiến (EC_Alg_N) tăng từ 10^5 lên 10^7 CFU/mL. Ở tỷ lệ 10% (w/v) EC_Alg_N có khả năng loại bỏ 91% hàm lượng amoni và nitrit ở nồng độ 60 mgN/L sau 24 giờ, đạt hiệu suất 83% sau 6 lần tái sử dụng. Ở quy mô mô hình 50 L, tỷ lệ bổ sung vật liệu EC_Alg_N ở mức 1% w/v vẫn loại bỏ được >96% amoni và nitrit khi tổng nồng độ nitơ đạt 200 mgN/L sau 7 ngày thử nghiệm.

5. Tích hợp thành công vật liệu EC mang hạt quang xúc tác TiO_2 -Ag và vi khuẩn khử nitrit, tạo ra hệ vật liệu có khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh *V. parahaemolyticus* VTCC 910192 và loại bỏ đến 95% hàm lượng nitrit ô nhiễm trong nước.

TÍNH MỚI CỦA LUẬN ÁN

1. Đã chế tạo được vật liệu EC từ thành phần đất sét và trấu thông qua phương pháp nhiệt phân, chúng có đặc tính nhẹ, rỗng dạng xốp, độ nhám cao phù hợp để tích hợp thành công TiO_2 -Ag và vi khuẩn chuyển hóa nitơ. Khả năng nổi trên mặt nước của EC tạo điều kiện tiếp xúc ánh sáng và oxy, từ đó làm tăng hiệu quả chất quang xúc tác. Khi biến đổi TiO_2 với hạt nano Ag đã giúp chuyển vùng ánh sáng hấp phụ của TiO_2 -Ag từ 460 nm đến 700-800 nm, do vậy tăng khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh (giảm mật độ 10^6 xuống $< 10^2$ CFU/mL sau 2 giờ chiếu sáng), xử lý COD (từ 83 - 92%) và phân hủy > 90% kháng sinh dư thừa trong môi trường nuôi thủy sản.

2. Vật liệu EC tạo thành được tích hợp thêm các thành phần dưỡng chất (N, P, K) và nguồn cacbon dưới dạng nano đã làm tăng khả năng sinh trưởng và tạo màng sinh học cũng như khả năng bám dính của vi khuẩn xử lý nitơ trên bề mặt vật liệu. Đặc biệt, đã phân lập được vi khuẩn khử nitrat/nitrit trong điều kiện hiếu khí, điều này làm tăng hiệu quả xử lý nitơ trong môi trường nuôi thủy sản có hàm lượng O_2 cao.

3. Tích hợp thành công vật liệu EC mang hạt quang xúc tác TiO_2 -Ag và vi khuẩn khử nitrit, hệ vật liệu tạo thành có khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh *V. parahaemolyticus* VTCC 910192 và loại bỏ đến 95% hàm lượng nitrit ô nhiễm trong nước.